

Université de Paris

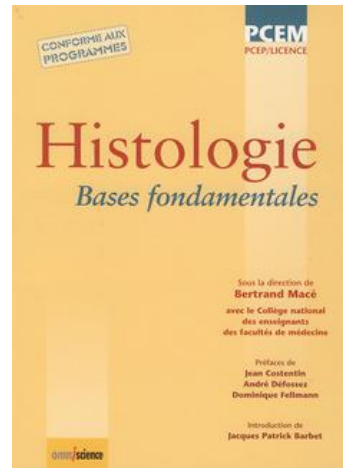
# Methodes en Histologie

F. Chrétien remplacé par F. Mouton-Liger



# Objectifs pédagogiques

- ✓ Connaître les principes des techniques permettant de réaliser des préparations histologiques observables au microscope
- ✓ Connaître différents types de microscopie
- ✓ Connaître les colorations de routine et spéciales
- ✓ Connaître les principes de l'étude *in situ* biochimique



# PLAN

## I- Différents types d'échantillons

- 1-1- Cellules vivantes
- 1-2- Frottis / étalements / cyto centrifugation
- 1-3- Empreintes / appositions
- 1-4- Préparations à plat
- 1-5- Coupes

## II- Descriptions morphologiques

- 2-1- Microscopie optique
- 2-2- Microscopie électronique

## III- Etudes *in situ* des constituants biochimiques

- 3-1- Histo chimie
- 3-2- Histo enzymologie

## IV- Analyses moléculaires *in situ*

- 4-1- Immunohistologie
- 4-2- Hybridation *in situ*
- 4-3- Autoradiographie

# INTRODUCTION

## 1- La cellule

- Êtres vivants constitués de cellules
- Cellule = unité fondamentale de la vie (êtres unicellulaires)  
= + petite quantité de matière vivante capable de subsister à l'état autonome et de se reproduire
- Cellules + matrice extracellulaire (MEC = SF + fibres) → Tissus fondamentaux
  - 1) épithéliums de revêtement et glandulaires
  - 2) tissus conjonctifs et squelettiques
  - 3) cellules sanguines et tissus hématopoïétiques
  - 4) tissus musculaires
  - 5) tissus nerveux

# INTRODUCTION

## 1- La cellule

- Tissus → **organes, appareils et systèmes**

- 1) appareil cardio-vasculaire
- 2) système immunitaire
- 3) appareil respiratoire
- 4) appareil digestif
- 5) système endocrinien
- 6) appareil urinaire
- 7) appareil de reproduction
- 8) appareil tégumentaire
- 9) système nerveux
- 10) organes des sens

- Organes, appareils et systèmes → **être vivant**

**Corps humain de 60 Kg = 60 000 milliards de cellules  
(10 000 fois plus que d'habitants sur terre...)**

# INTRODUCTION

## 2- La taille de la cellule

- Taille moyenne des cellules = 5 à 20  $\mu\text{m}$  : non visibles à l'œil nu

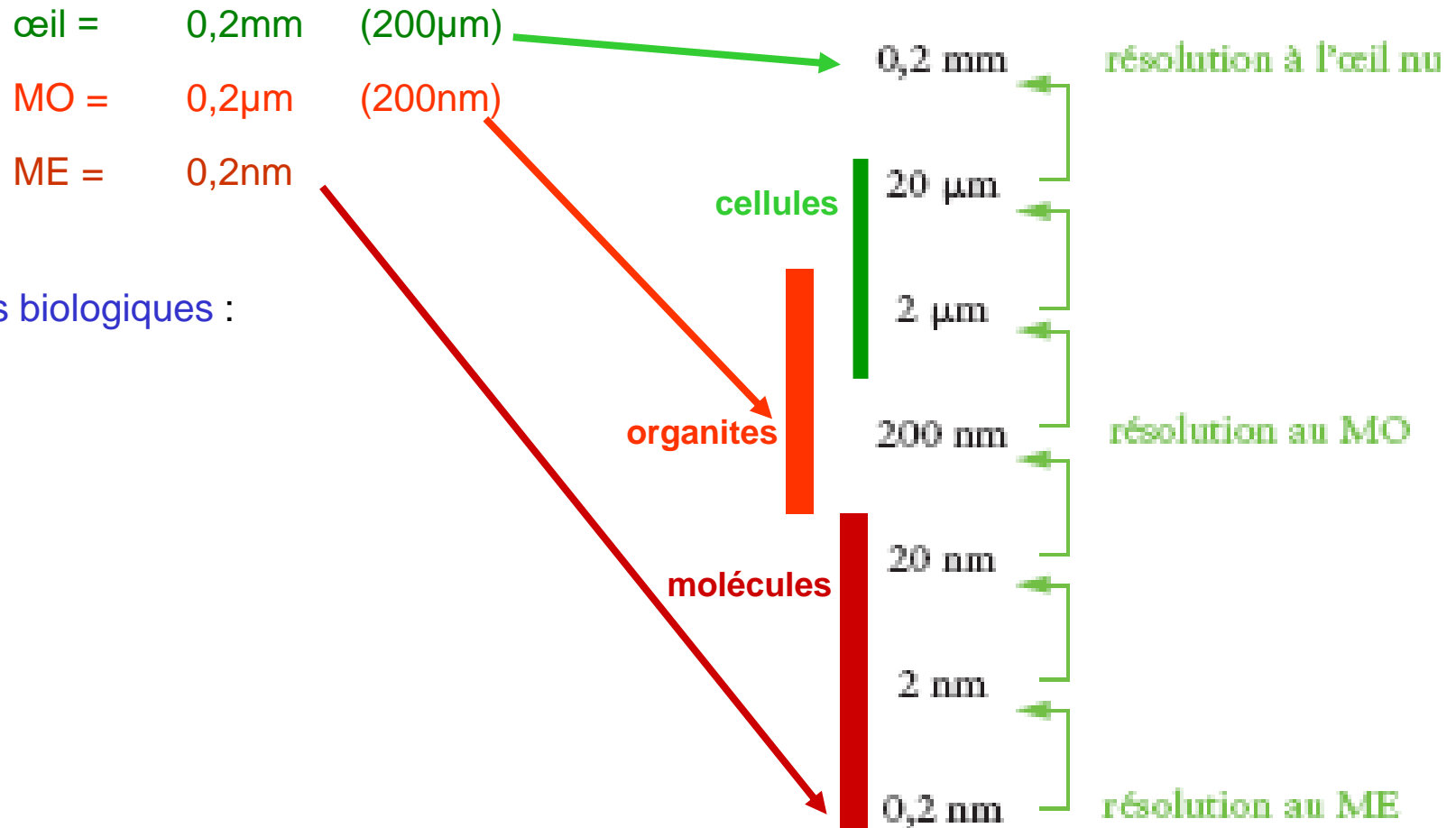
*NB : certaines  $\phi$  pls dizaines cm voire 1 m*

- → nécessité du recours à des techniques d'imagerie cellulaire :
  - microscopie (observations) +/- analyse d'images
  - cytométrie (mesures)

# INTRODUCTION

## 3- Pouvoir séparateur / Échelles biologiques

- **Pouvoir séparateur** = distance la plus petite entre deux points vus séparément



- Échelles biologiques :

# INTRODUCTION

## 4- Grandes étapes de l'imagerie cellulaire

### 1) Description morphologique des structures biologiques

microscopie optique (ou photonique) (MO)

*source lumineuse = faisceau de photons*

microscopie électronique (ME)

*source lumineuse = faisceau d'électrons*

### 2) Caractérisation et localisation des constituants

biochimiques *in situ*

histochimie

*réactions chimiques sur préparations histologiques*

histoenzymologie

*réactions enzymatiques sur préparations histologiques*



# INTRODUCTION

## 4- Grandes étapes de l'imagerie cellulaire

### 3) Analyse moléculaire *in situ*

immunohistologie

*avec des anticorps pour reconnaître des protéines (antigènes)*

hybridation *in situ*

*avec des sondes nucléiques pour explorer l'ADN et l'ARN*

autoradiographie

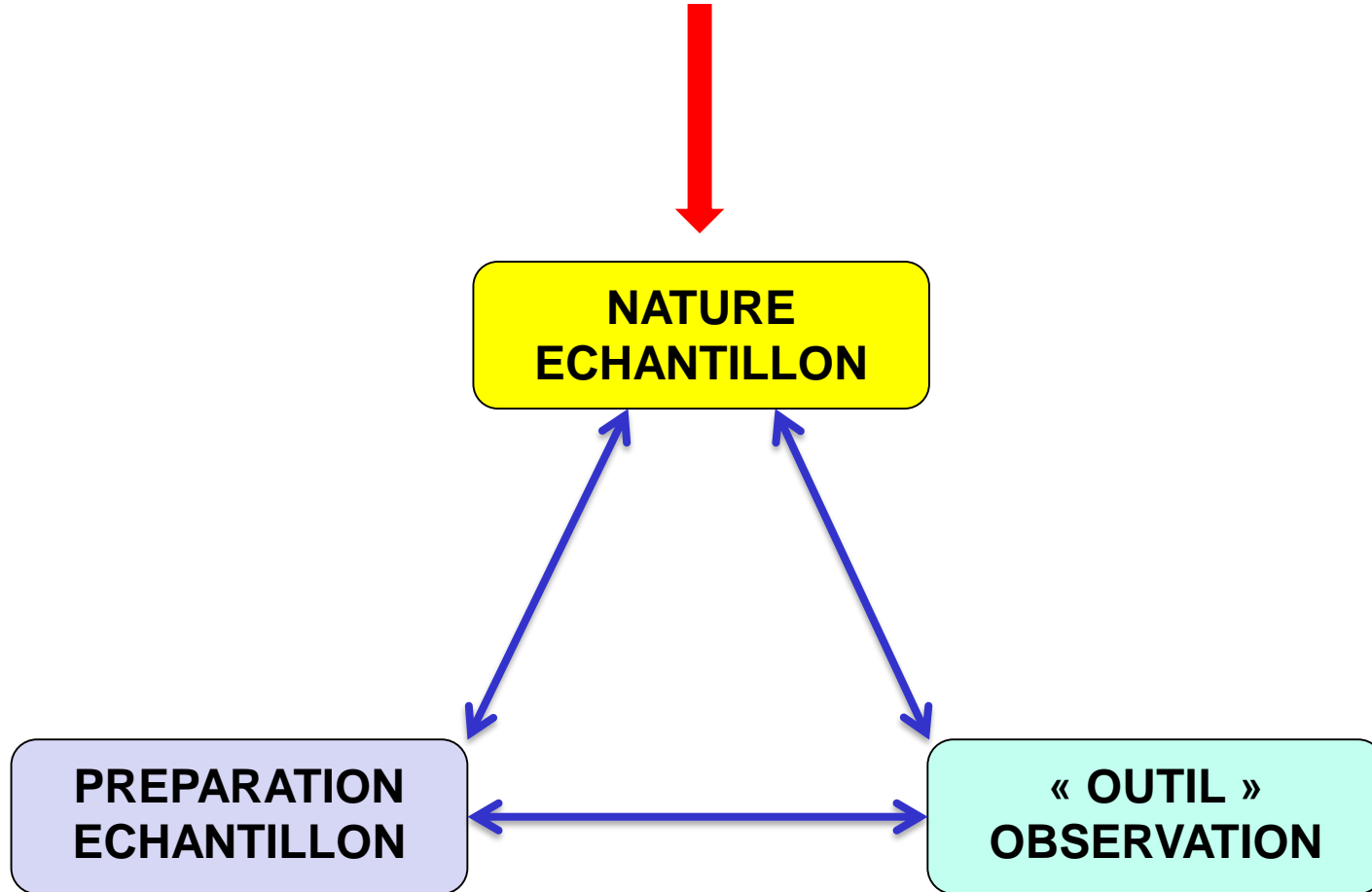
*avec des précurseurs des macromolécules marqués avec des isotopes radioactifs*

### 4) Approche quantitative

techniques de cytométrie

*réalisation de « mesures » à l'échelon cellulaire*

# POINT FONDAMENTAL = QUE VEUT-ON ETUDIER ?



# I- DIFFERENTS TYPES D'ECHANTILLONS

## 1-1- Cellules vivantes

en survie (*ex vivo*) / en culture (*in vitro*)

sur lame / boîtes de Pétri / flacons - tubes de culture...

milieux de survie / culture (*sérum physiologique, milieux de synthèse*)

étuve à 37°C saturation en vapeur H<sub>2</sub>O +/- CO<sub>2</sub> (*pour cultures longues*)

microscope inversé à contraste de phase, cytomètres

+/- colorations vitales (*préservent la vie*)

→ étude de la viabilité/vitalité cellulaire

*pour repérer cell mortes (bleu trypan) ou cell vivantes (sondes fluorescentes)*

## 1-2- Frottis - étalements / cytocentrifugation

pour les liquides (*biologiques, pathologiques, d'exploration*)

pour les produits de grattage ou brossage

sur lame

## 1-3- Empreintes / appositions

pour les échantillons solides (organes, tumeurs...) (*tranche de section*)

sur lame

# I- DIFFERENTS TYPES D'ECHANTILLONS

## 1-4- Préparations à plat

pour les organes fins  
après microdissection  
sur lame / boîte de Pétri

## 1-5- Coupes

le plus souvent, organes trop épais pour observation directe au microscope  
→ nécessité réaliser coupes fines/ultrafines (*après fixation et inclusion*)  
sur lame (MO) ou grille (MET)

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « **standard** » des échantillons

= préparation d'un fragment de tissu solide pour examen en MO

Différentes étapes : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

= préparation d'un fragment d'organe pour examen en MO

Différentes étapes : **fixation**, inclusion, coupe, coloration, montage

#### 1) Fixation :

- *indispensable pour préserver les structures biologiques (cellules et tissus)*
- *le plus rapidement possible après exérèse*
- *petits blocs d'organes immergés dans un grand volume de liquide fixateur*
- *fixateurs :*
  - acide acétique - méthanol*
  - paraformaldéhyde*
  - liquide de Bouin (formol + acide picrique) (! autofluorescence)*

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

= préparation d'un fragment d'organe pour examen en MO

Différentes étapes : fixation, **inclusion**, coupe, coloration, montage

#### 2) Inclusion :

- *pour « durcir » l'échantillon afin d'en permettre la coupe*
- *après déshydratation dans des bains d'alcool de degré croissant puis de toluène*
- *dans de la paraffine fondue (chauffée à 56°C)*

*[parfois résines plastiques ou congélation dans N<sub>2</sub>L]*

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

= préparation d'un fragment d'organe pour examen en MO

Différentes étapes : fixation, inclusion, **coupe**, coloration, montage

### 3) Coupe = microtomie :

- *coupes fines (2 à 10  $\mu\text{m}$ )*
- *avec un microtome (avance mécanique, couteau en acier)*
- *déposées et collées sur des lames de verre*

*coupes en congélation avec un cryostat  
(préservation des protéines, des lipides...)*





# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

= préparation d'un fragment d'organe pour examen en MO

Différentes étapes : fixation, inclusion, coupe, **coloration**, montage

#### 4) Coloration :

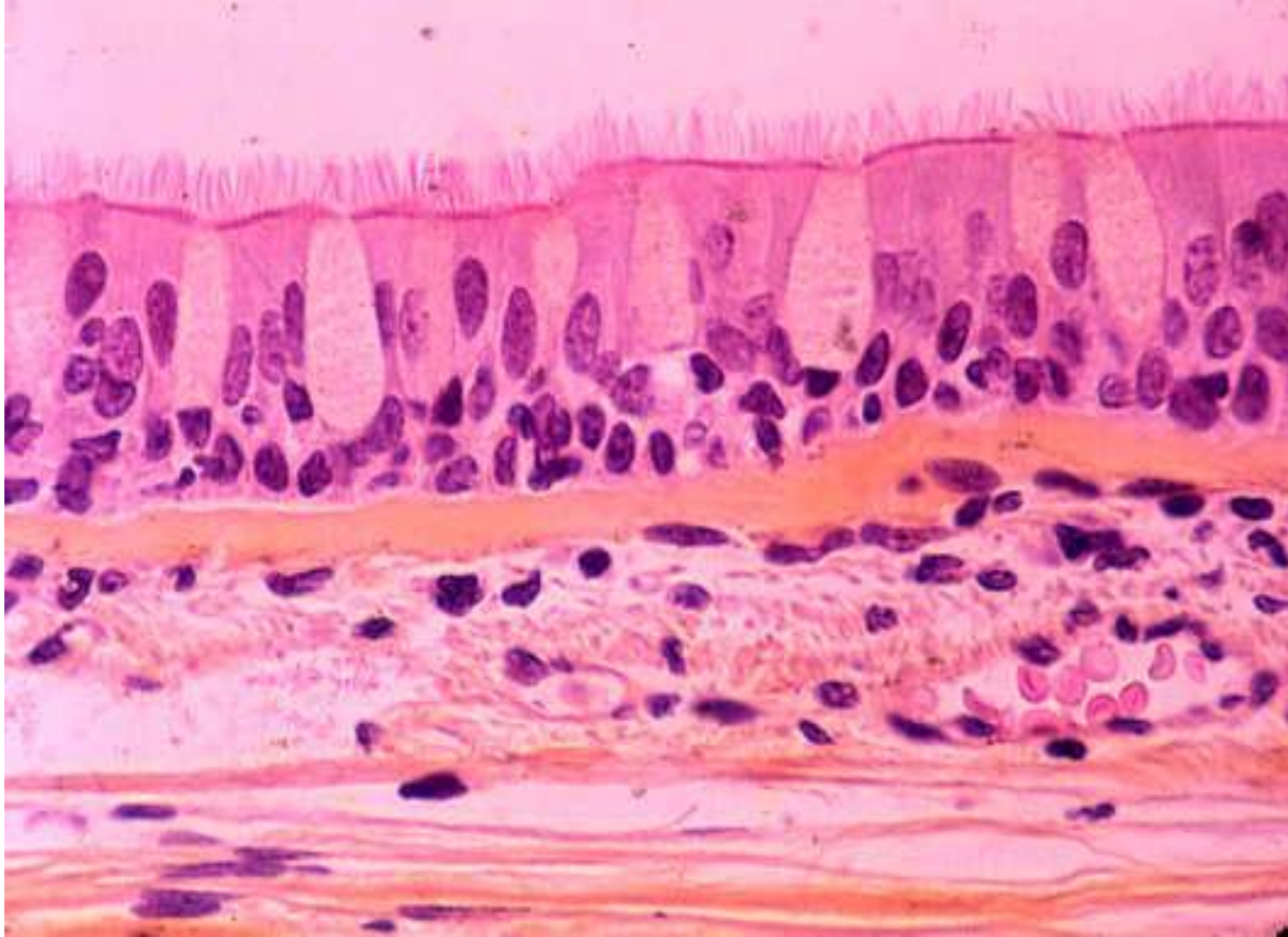
- *pour augmenter les contrastes et faire apparaître différents composants*
- *après déparaffinage (par la chaleur et bains de toluène)*
- *et réhydratation (bains d'alcool de degré décroissant puis eau distillée)*

*Colorations les plus utilisées :*

- *Hématéine-Eosine (HE) : H → noyaux en violet et E → cytoplasme en rose*
- *Hématéine-Eosine-Safran (HES) : S → fibres de collagène en jaune*
- *Trichrome de Masson :  
hématoxyline : noyaux en brun  
fuchsine acide : cytoplasme en rouge  
vert lumière : fibres de collagène en vert*
- *May Grünwald Giemsa pour cellules sanguines (NB : pour frottis sanguin)*  
*cf. infra pour histochimie, immunohistologie, hybridation in situ, autoradiographie*

# EXEMPLES D'APPLICATIONS

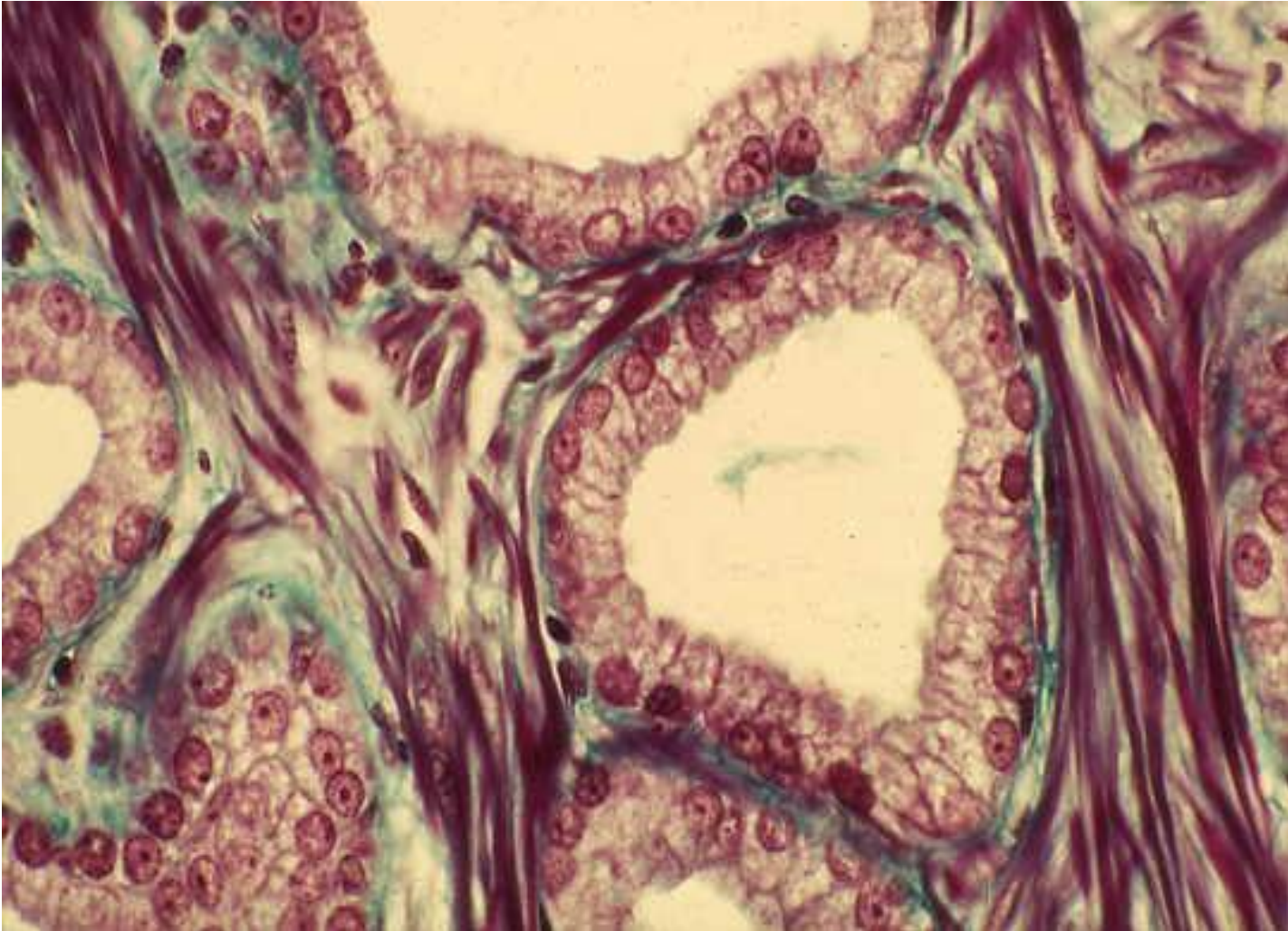
## Coupe d'organe en microscopie optique



Trachée, coupe, **Hématéine-Eosine-Safran**, MO x500

# EXEMPLES D'APPLICATIONS

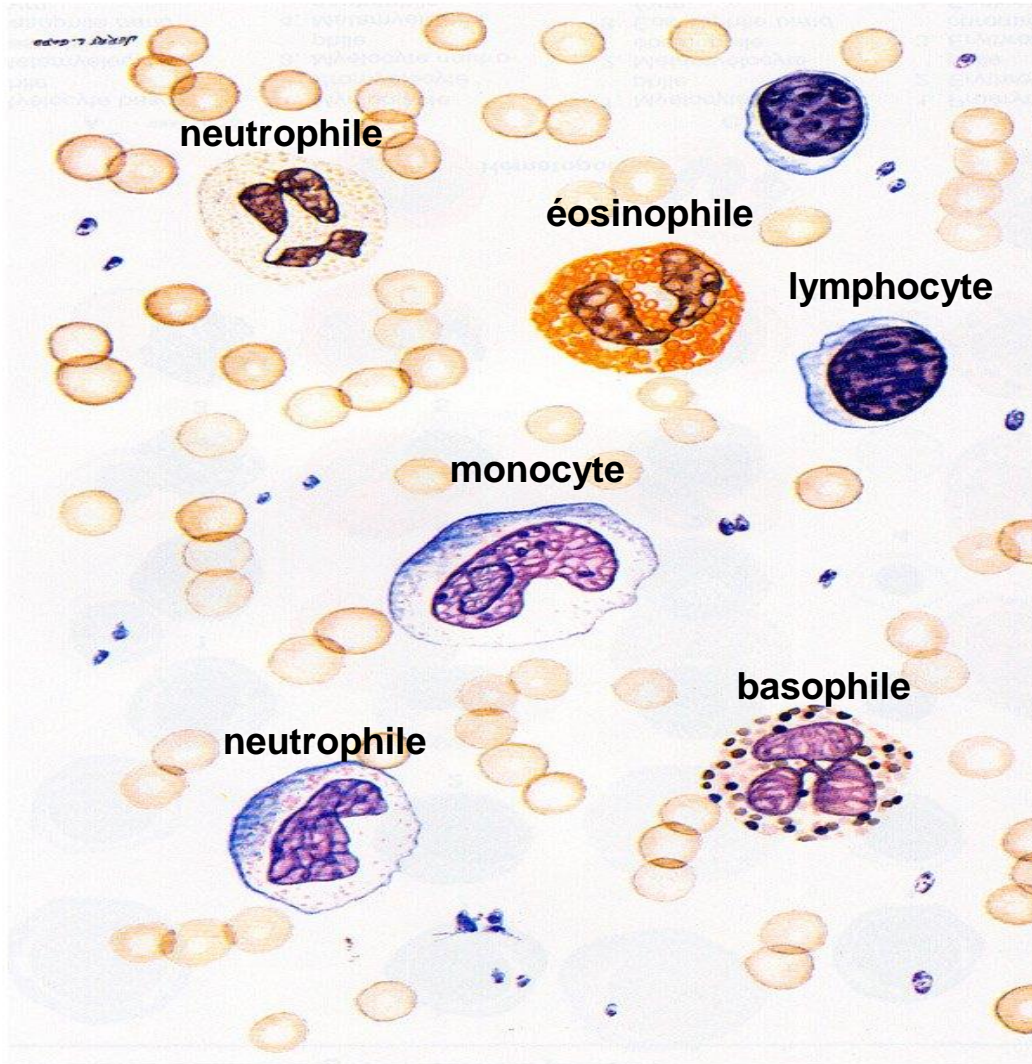
## Coupe d'organe en microscopie optique



Prostate, coupe, *Trichrome de Masson* , MO x250

# EXEMPLES D'APPLICATIONS

## Frottis sanguin



Goutte de sang, étalement sur lame, May Grünwald Giemsa, MO x1000

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

= préparation d'un fragment d'organe pour examen en MO

Différentes étapes : fixation, inclusion, coupe, coloration, **montage**

#### 4) Montage :

- *après coloration puis déshydratation (bains d'alcool de degré croissant puis de toluène)*
- *coupes montées entre lame et lamelle*
- *avec milieu de montage (résine synthétique) (indice de réfraction voisin de celui du verre)*

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

### 2-1-2 Le microscope optique

→ observation des préparations +/- production et traitement d'images

#### 1) Le microscope « standard »

- partie mécanique avec :

la potence

le tube optique

la platine

- source de lumière (photonique)

- partie optique avec :

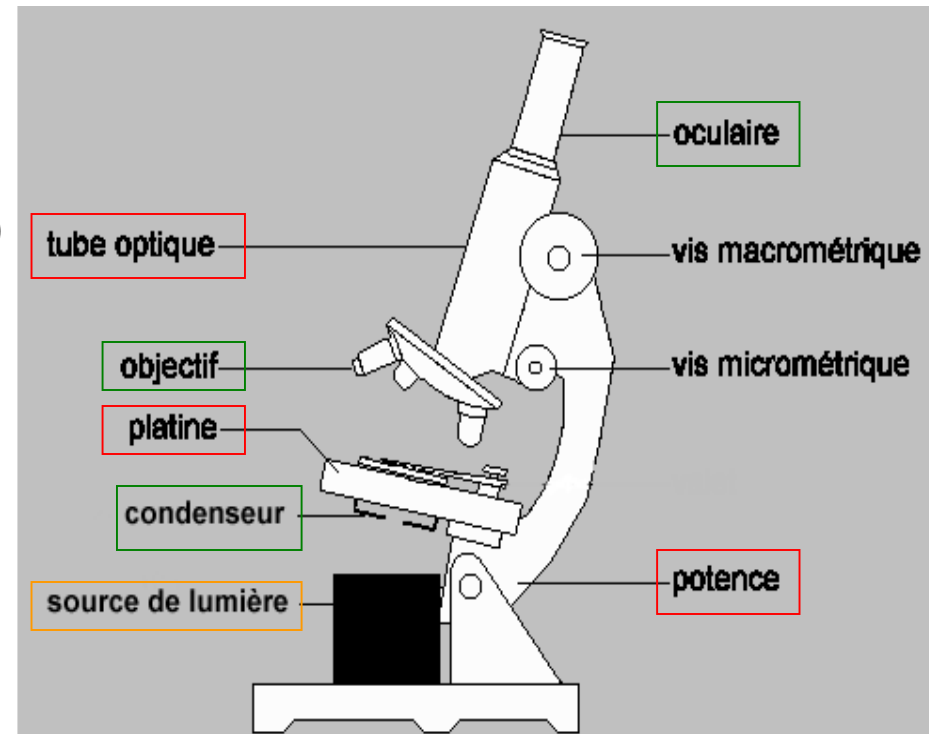
le condenseur

l'objectif

l'oculaire

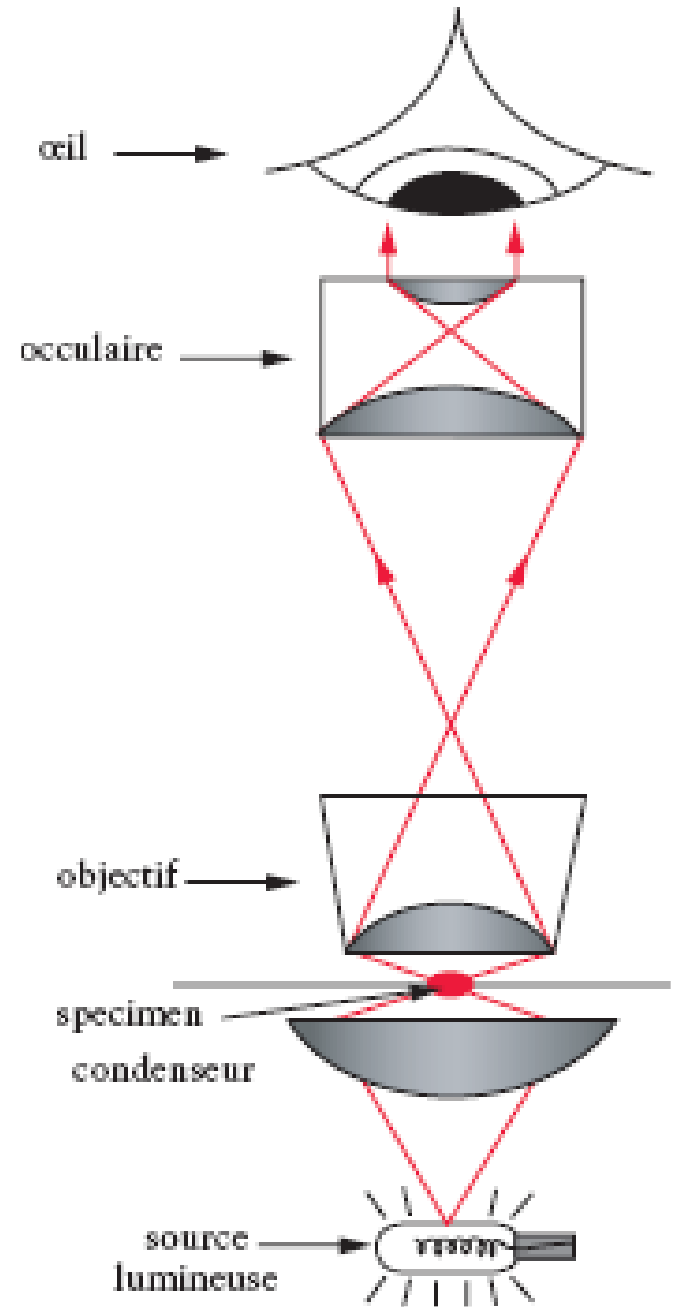
#### 2) La capture d'images

caméra numérique





Le microscope « standard »



# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

## 2-1- Microscopie optique (MO)

### 2-1-1 Préparation « standard » des échantillons

### 2-1-2 Les microscopes optiques

1) Le microscope « standard »

2) La capture d'images

3) Le microscope optique à contraste de phase

- met en évidence les différences d'indices de réfraction
- en révélant des différences de phases de la lumière
- permet l'étude des cellules vivantes et préparations **MÊME** non colorées

4) Le microscope à fluorescence

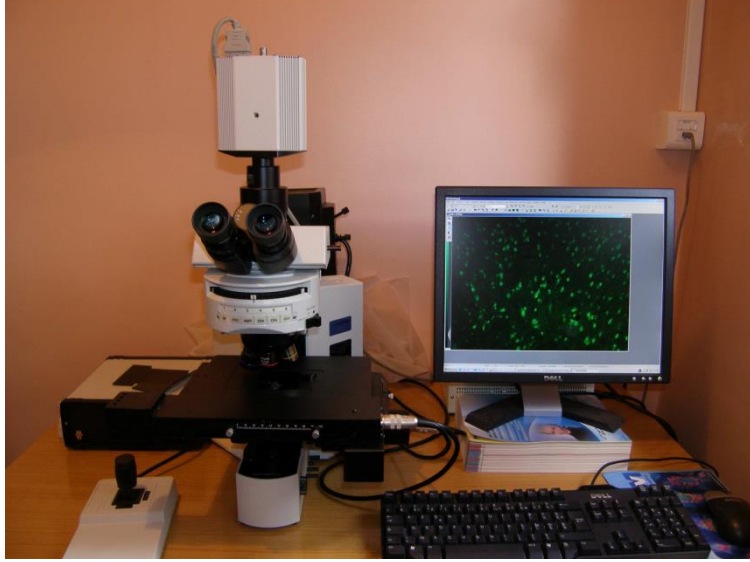
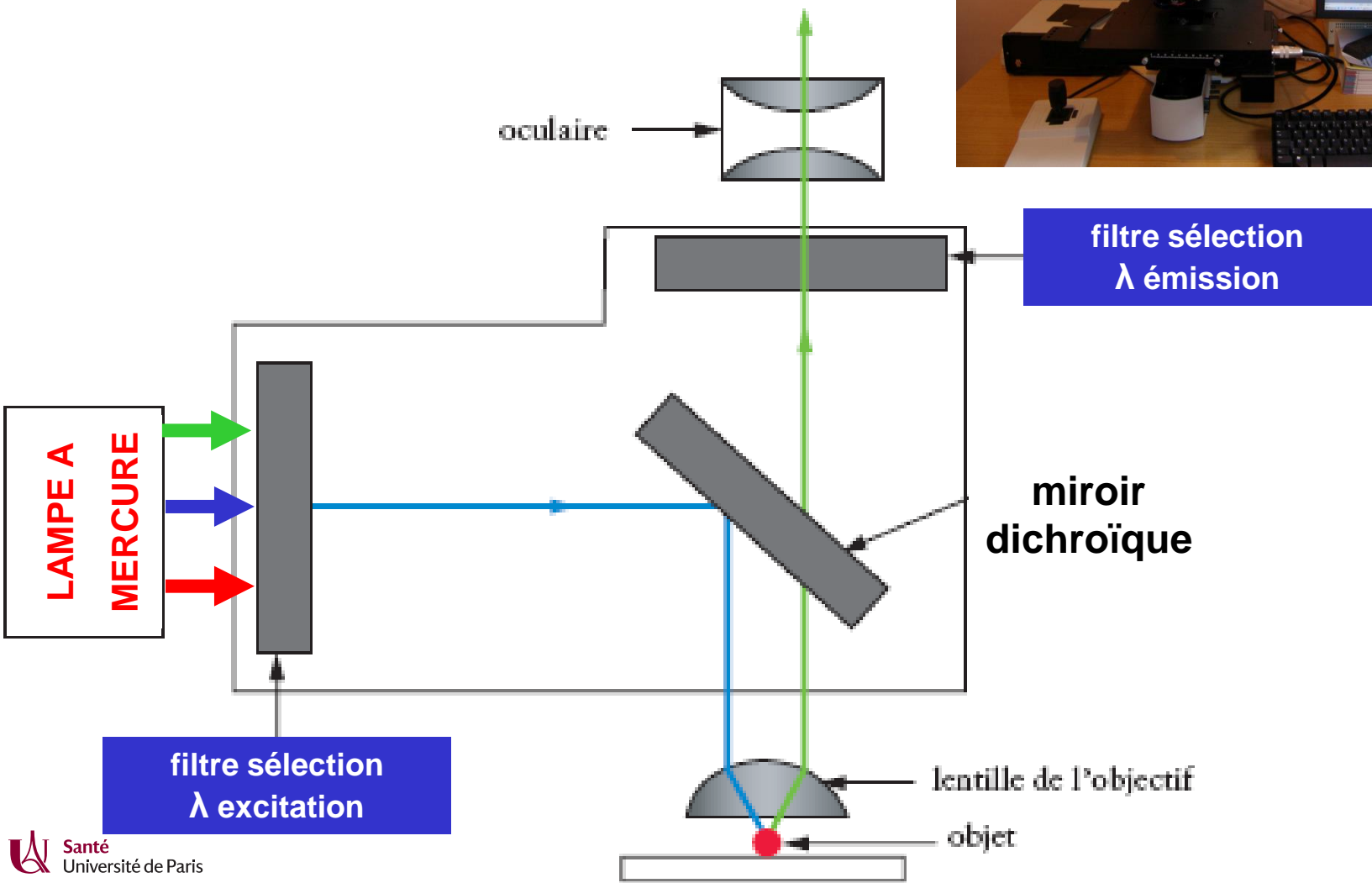
**Fluorochromes = substances :**

qui quand excitées à une  $\lambda$  donnée ( $\lambda$  d'excitation)  
émettent une lumière à une  $\lambda$  supérieure ( $\lambda$  d'émission)

- source lumineuse avec sélection de  $\lambda$  d'excitation
- filtres pour sélectionner les  $\lambda$  d'émission



# MICROSCOPE A FLUORESCENCE



# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

2-1- Microscopie optique (MO)

2-2- Microscopie électronique (ME)

2-2-1 Préparation des échantillons pour la ME à transmission (MET)

Différentes étapes : **fixation, inclusion, coupe, coloration** =  **contraste**

## 1) Fixation :

- *fixation* : *glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate (ou phosphate)*
- *post-fixation* : *acide osmique (tétroxyde d'osmium = Os O4)*

## 2) Inclusion :

- *après déshydratation (bains d'alcool de degré croissant puis d'oxyde de propylène)*
- *dans des résines synthétiques (Epon ou Araldite)*

## 3) Coupe :

- *coupes ultrafines (50 à 80 nm)*
- *avec un ultramicrotome (avance thermique, couteau en diamant)*
- *déposées sur des grilles de cuivre*

## 4) Contraste :

- *acétate d'uranyle (pour noyau, nucléole et ribosomes)*
- *citrate de plomb (pour les membranes)*



## II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

2-1- Microscopie optique (MO)

2-2- Microscopie électronique (ME)

2-2-1 Préparation des échantillons pour la ME à transmission (MET)

2-2-2 Préparation des échantillons pour la ME à balayage (MEB)

Différentes étapes : **fixation, déshydratation, métallisation**

### 1) Fixation :

- *fixation : glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate (ou phosphate)*
- *pas de post-fixation*

### 2) Déshydratation :

- *par des bains d'alcool de degré croissant puis de CO<sub>2</sub> liquide*
  - *et par passage au point critique du CO<sub>2</sub> (température : 32°C ; pression : 73 atmosphères)*
- NB : au point critique, le CO<sub>2</sub> passe de l'état liquide à l'état gazeux → dessiccation par lyophilisation*

### 3) Métallisation de toutes les surfaces de l'échantillon :

- *dépôt d'une couche fine (10 nm) d'or-palladium*

**NB : nouvelle génération de MEB = pression variable  
possibilité de travailler sur cellules ou microorganismes  
non métallisés, voire vivants**

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

2-1- Microscopie optique (MO)

2-2- Microscopie électronique (ME)

2-2-1 Préparation des échantillons pour la ME à transmission (MET)

2-2-2 Préparation des échantillons pour la ME à balayage (MEB)

2-2-2 Les microscopes électroniques

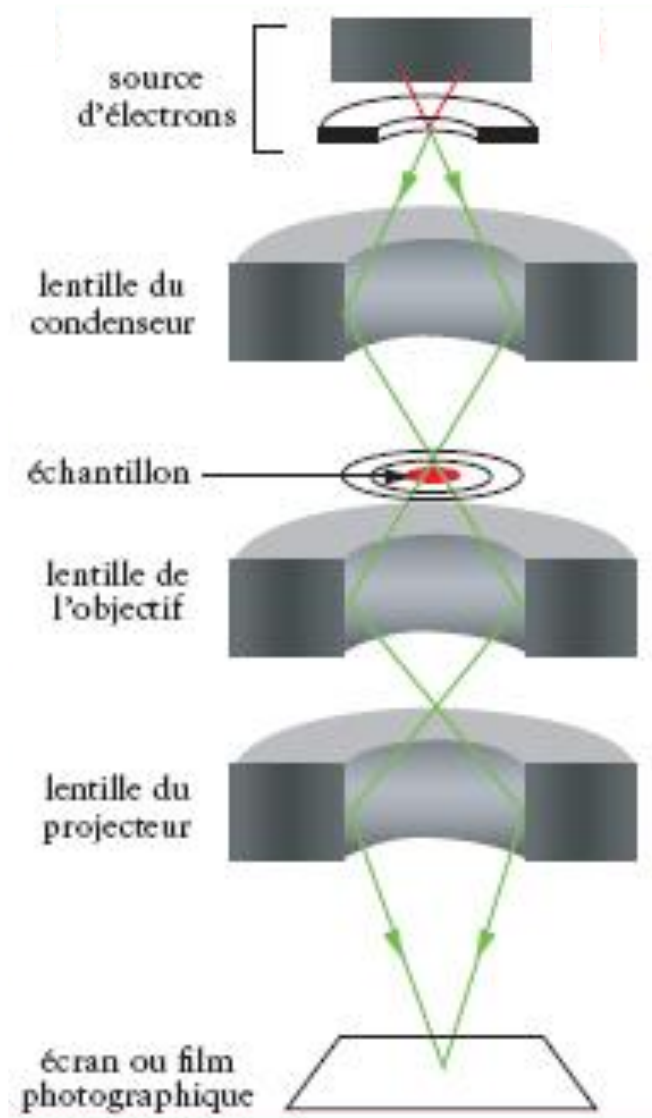
1) Le microscope électronique à transmission

- source de rayonnement = filament qui génère des électrons
- lentilles = solénoïdes générant un champ électrique
- recueil des électrons traversant la préparation
- fonctionne sous vide
- **résolution supérieure car  $\lambda$  des électrons inférieure**

2) La capture d'images

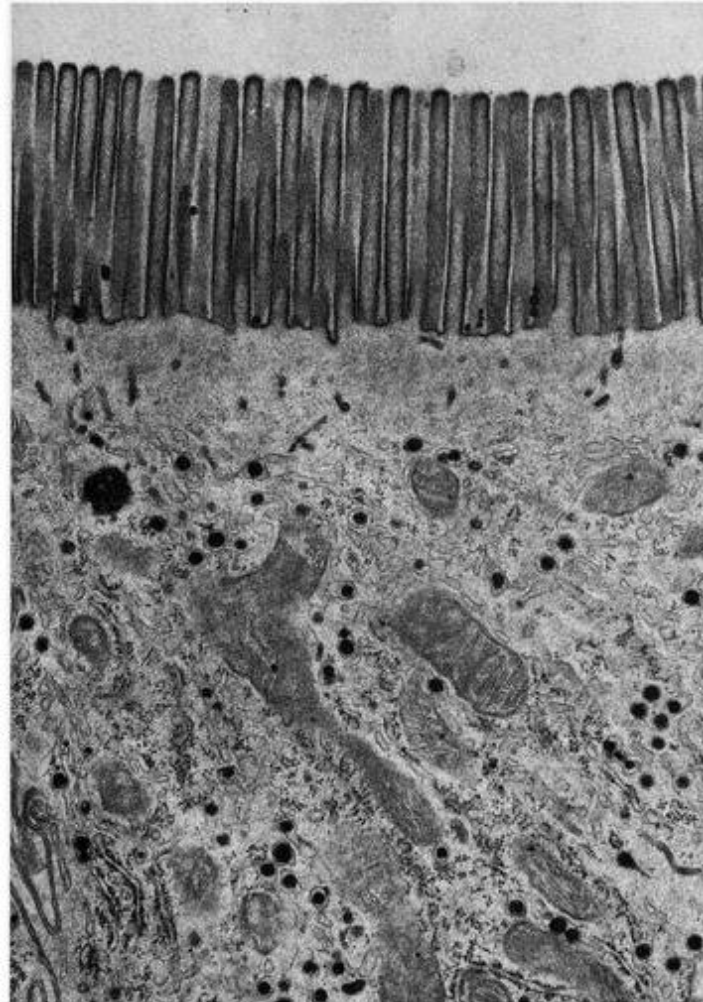
- *film photo*
- caméra numérique

# microscope électronique à transmission



# EXEMPLES D'APPLICATIONS

## Coupe d'organe en microscopie électronique à transmission



Enterocyte (rat), coupe, MET x1000

# II- DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES

2-1- Microscopie optique (MO)

2-2- Microscopie électronique (ME)

2-2-1 Préparation des échantillons pour la ME à transmission (MET)

2-2-2 Préparation des échantillons pour la ME à balayage (MEB)

## 2-2-2 Les microscopes électroniques

1) Le microscope électronique à transmission

2) La capture d'images

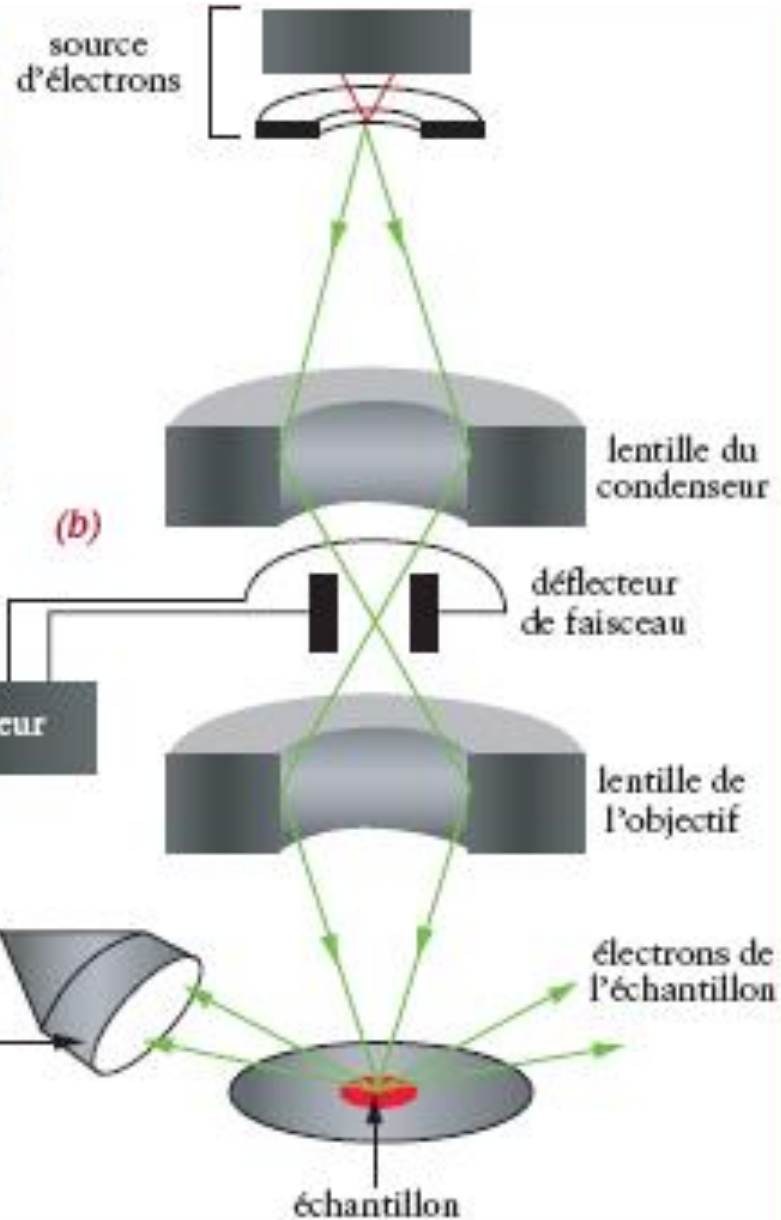
3) Le microscope électronique à balayage

- cf. MET mais recueil des électrons réfléchis par la préparation

# microscope électronique à balayage



(a)



(b)

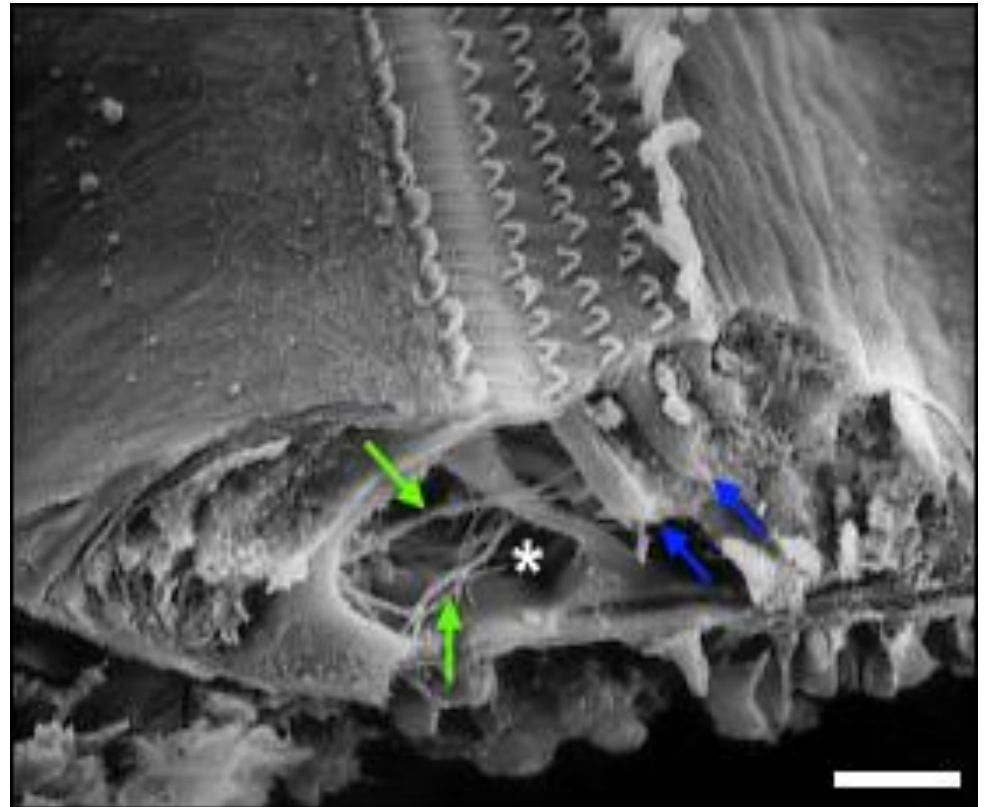


# EXEMPLES D'APPLICATIONS

Surface d'organe en microscopie électronique à balayage (*surface et non 3D*)



Cochlée et organe de Corti, MEB



# III- ETUDES *IN SITU* DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES

## 3-1- Histochimie

= **déceler** et **localiser**,  
sur des **préparations histologiques**,  
les substances organiques et minérales,  
en particulier des **constituants biochimiques** (lipides, glucides et protides),  
à partir de réactions chimiques  
mettant en évidence des **fonctions** ou des **groupements**

Exemples :

### 1) Glucides et réaction à l'acide périodique de Schiff (PAS)

1<sup>e</sup> tps : oxydation groupements glycol par acide périodique → formation d'aldéhydes

2<sup>e</sup> tps : révélation des aldéhydes par le réactif de Schiff → **coloration rouge pourpre**

### 2) ADN et réaction de Feulgen Rossenbeck

1<sup>e</sup> tps : hydrolyse de l'ADN → mise en évidence aldéhydes du désoxyribose

2<sup>e</sup> tps : révélation aldéhydes par le réactif de Schiff → **coloration rouge pourpre**

# III- ETUDES *IN SITU* DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES

## 3-1- Histochimie

## 3-2- Histoenzymologie (*appliquée à la cellule vivante / coupes à congélation*)

= **déceler / localiser** des **activités enzymatiques** (et non les enzymes elles-mêmes) en mettant en évidence le **produit de leur action** sur un **substrat** spécialement **fourni** :

1<sup>e</sup> tps : incubation des cellules vivantes / coupes à congélation en présence du substrat

2<sup>e</sup> tps : révélation du produit de la réaction enzymatique sur le substrat

### Exemples :

#### 1) **Activité des estérases (étude de la viabilité cellulaire)**

- la calcéine AM, substrat non fluorescent, traverse les membranes cellulaires ;
- dans le cytoplasme des cellules vivantes, elle est estérifiée en calcéine ;
- la calcéine est fluorescente et ne traverse pas les membranes cellulaires

#### 2) **Activité des peroxydases (marquage granulocytes éosinophiles)**

la peroxydase (*endogène*), en présence d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), oxyde la diaminobenzidine (DAB) → précipité brun noir

**NB : utilisé en immunohistologie donc sur cellules fixées ; dans ce cas la peroxydase est exogène**

# III- ETUDES *IN SITU* DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES

## 3-1- Histochimie

## 3-2- Histoenzymologie (*appliquée à la cellule vivante / coupes à congélation*)

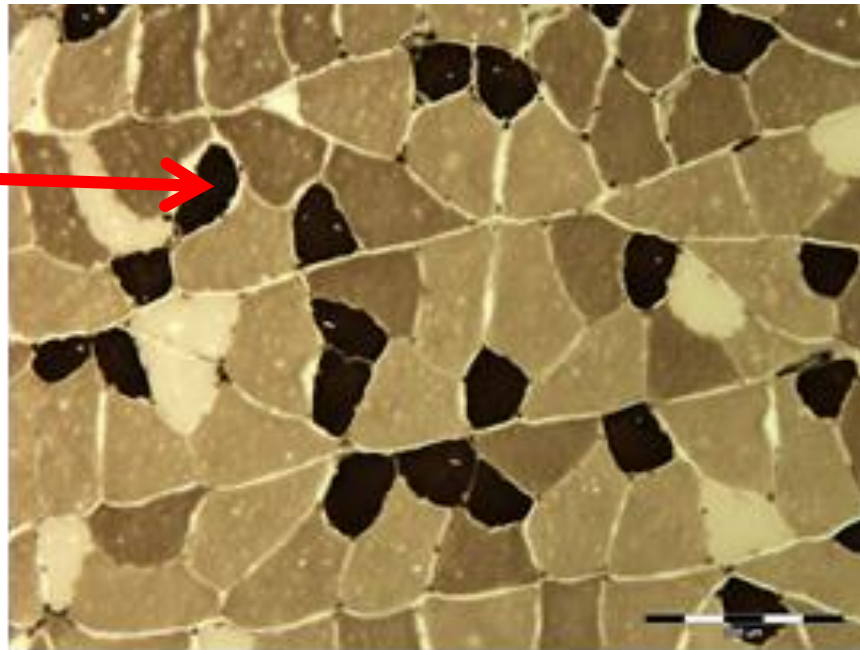
3) **Activité ATPasique** (caractérisation du type contractile des CMStSq) (*sur coupes à congélation*)

L'ATPase, en présence de chlorure de cobalt, → phosphate de cobalt

Phosphate de cobalt, en présence de sulfure d'ammonium, → sulfure de cobalt qui précipite

→ Les CMStSq « lentes » sont colorées en noir et les « rapides » en beige

CMStSq « lente »



# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

= utilisation d'un **anticorps** (Ac), Ac monoclonal (AcM) essentiellement, pour **détecter** et **localiser** très spécifiquement 1 **protéine (ou 1 polyoside)**, protéine/polyoside contre laquelle/lequel il est dirigé et qui se comporte alors comme un antigène (Ag)

Protéines = protéines de structure, hormones, enzymes, neurotransmetteurs, récepteurs...

Polyosides (ou polysaccharides) = polymères d'oses

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

Obtention des AcM

Souris immunisée  
avec 1 Ag



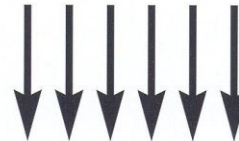
cellules spléniques  
dont lymphocytes B

cellules d'une lignée  
myélomateuse en culture



Hybrides

{ immortels  
secrétant Ac



Clonage  
Sélection



Culture

in vitro

in vivo

(ascite souris)

Recueil AcM

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

= utilisation d'un anticorps (Ac), Ac monoclonal (AcM) essentiellement, pour détecter et localiser très spécifiquement 1 protéine ou 1 polysaccharide, protéine/polysaccharide contre laquelle/lequel il est dirigé et qui se comporte alors comme un antigène (Ag)

Le complexe Ag-Ac est révélé :

- soit par un fluorochrome (techniques d'immunofluorescence)
  - soit par une enzyme (techniques immunoenzymatiques)
  - soit par de l'or colloïdal (pour la ME)
- 
- soit de façon directe
  - soit de façon indirecte
  - parfois après amplification

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- par un **fluorochrome**

Le fluorochrome est couplé directement ou indirectement à l'Ac (cf. infra)

Exemples de fluorochromes utilisés en immunofluorescence :

	$\lambda$ excitation	$\lambda$ émission
Fluorescéine (FITC)	488 nm	520 nm
Phycoérythrine (PE)	488 nm	580 nm





# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- par une **enzyme**

**L'enzyme** est couplée à l'Ac

Exemples d'enzymes utilisées pour la révélation immunoenzymatique :

- peroxydase [révélée par la diaminobenzidine (DAB)]
- phosphatase alcaline (révélée par du nitro bleu de tétrazodium)

- par de **l'or colloïdal**

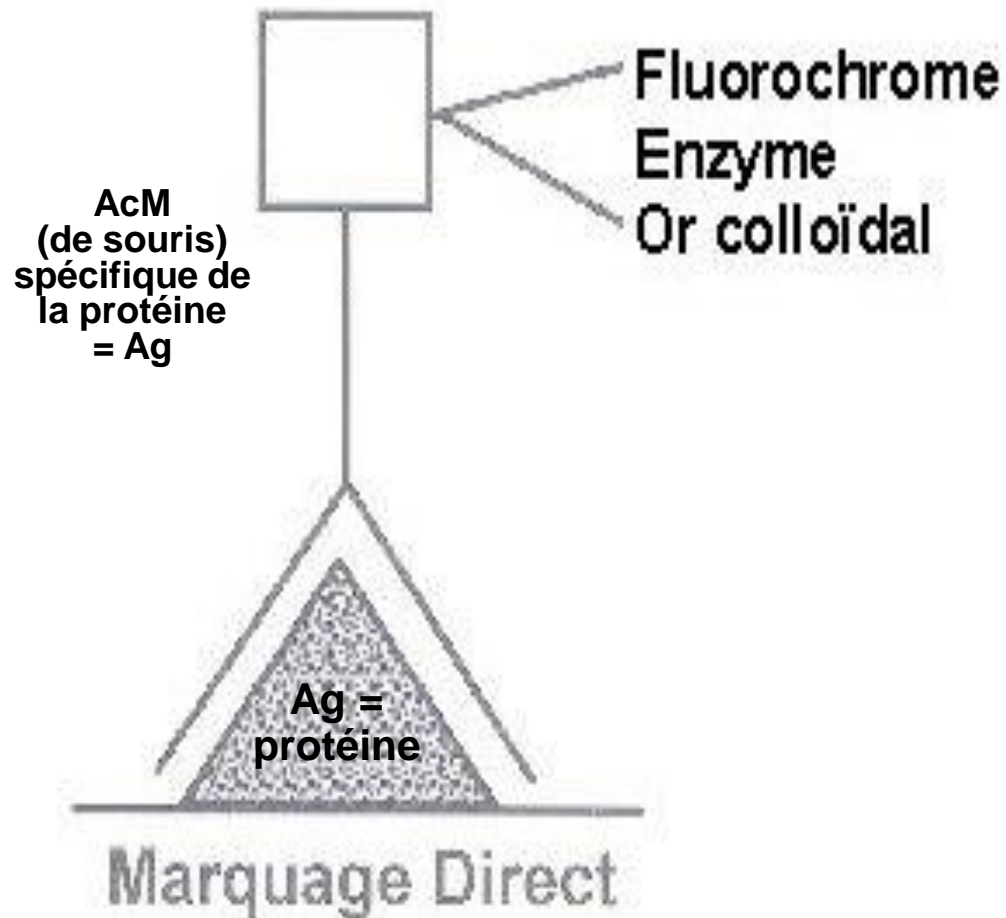
**L'or colloïdal** est couplé à l'Ac par l'intermédiaire d'une protéine (la protéine A)

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- de façon directe ou indirecte



# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

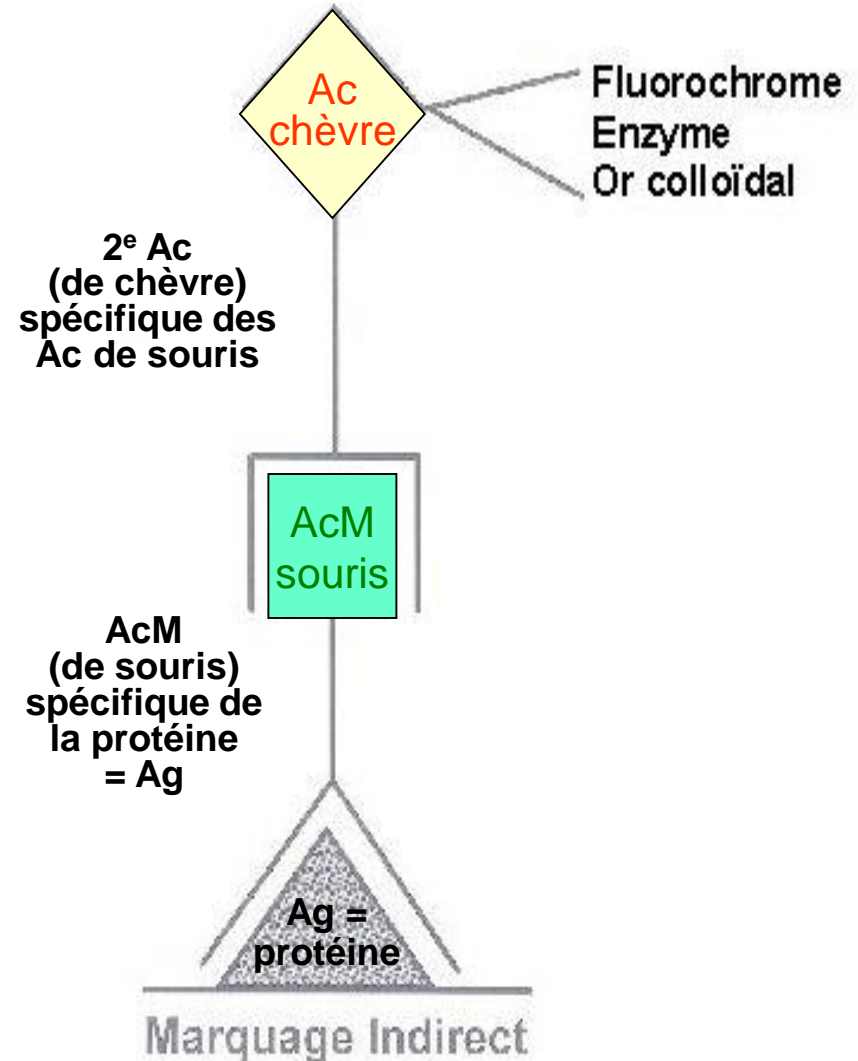
## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- de façon directe ou indirecte

Marquage indirect avec :

- un 2<sup>e</sup> Ac anti 1<sup>e</sup> Ac
- de l'avidine qui se lie à de la biotine attachée au 1<sup>e</sup> Ac
- un 2<sup>e</sup> Ac anti digoxigénine qui se lie à de la digoxigénine attachée au 1<sup>e</sup> Ac



# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

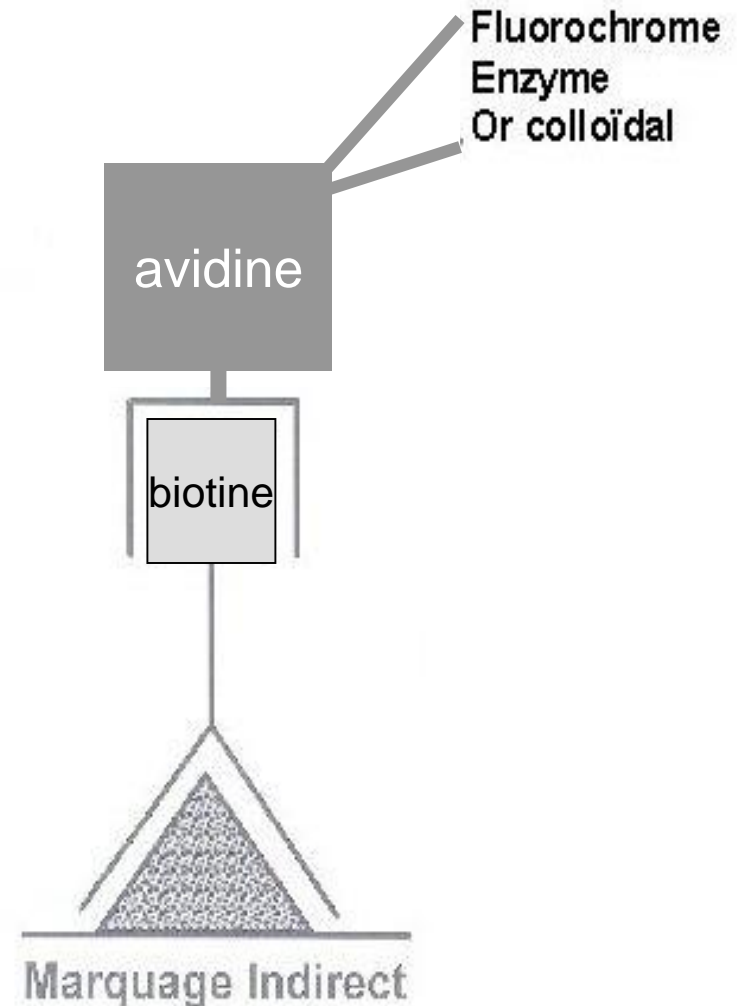
## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- de façon directe ou indirecte

Marquage indirect avec :

- un 2<sup>e</sup> Ac anti 1<sup>e</sup> Ac
- de l'avidine qui se lie à de la biotine attachée au 1<sup>e</sup> Ac
- un 2<sup>e</sup> Ac anti digoxigénine qui se lie à de la digoxigénine attachée au 1<sup>e</sup> Ac



# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

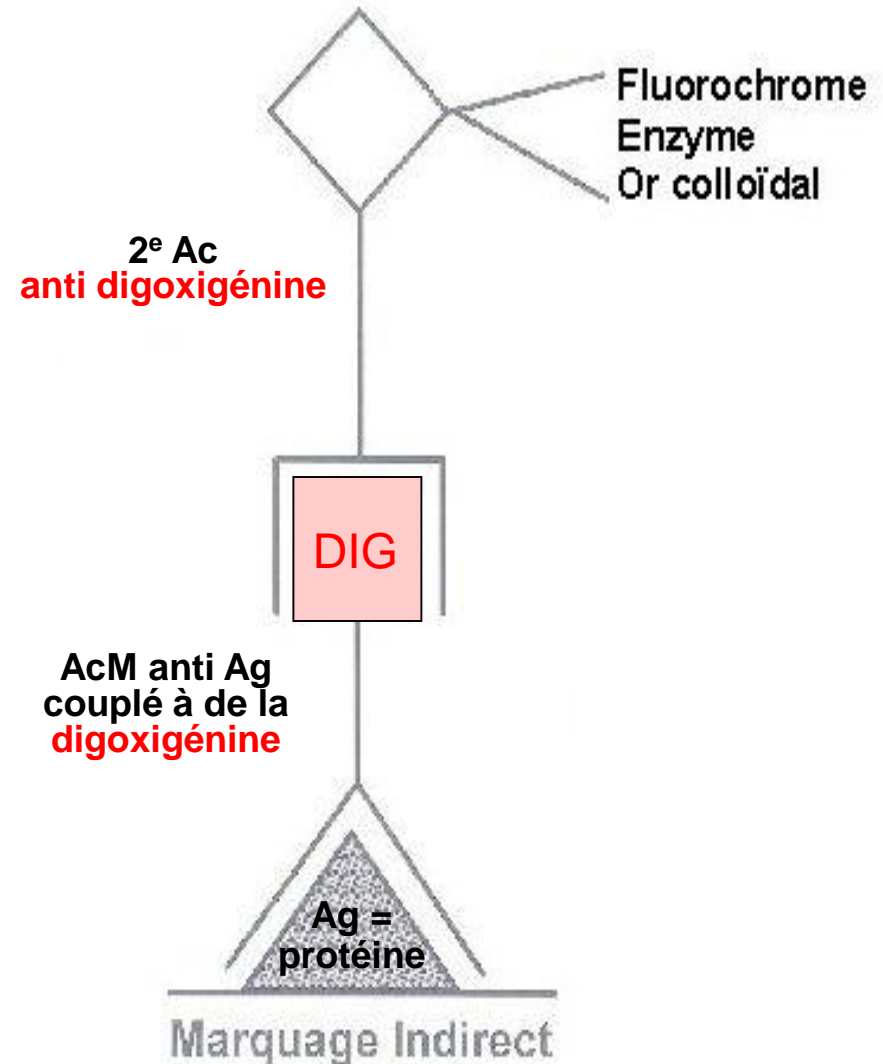
## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- de façon directe ou indirecte

Marquage indirect avec :

- un 2<sup>e</sup> Ac anti 1<sup>e</sup> Ac
- de l'avidine qui se lie à de la biotine attachée au 1<sup>e</sup> Ac
- un 2<sup>e</sup> Ac anti digoxigénine qui se lie à de la digoxigénine attachée au 1<sup>e</sup> Ac



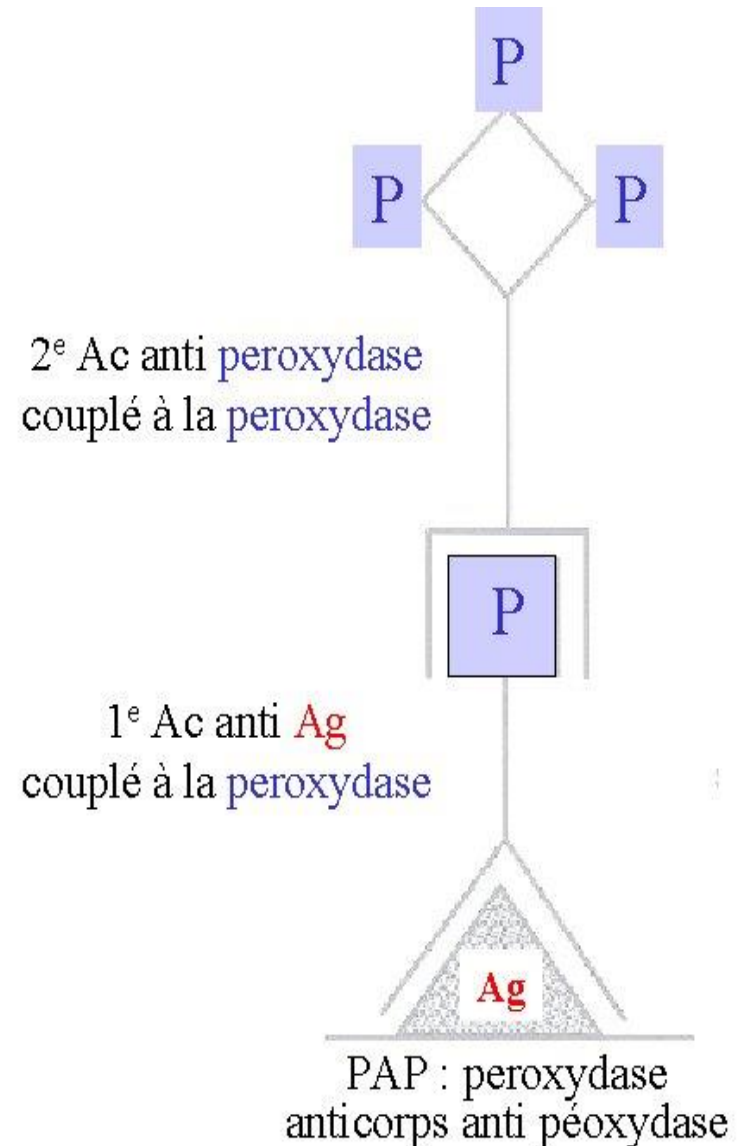
# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

Révélation du complexe Ag-Ac :

- parfois **après amplification**

But = obtenir un  
**signal de plus forte intensité**



3

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

## 4-2- Hybridation in situ

= utilisation d'une **sonde nucléique** « marquée »  
pour **détecter** et **localiser**,  
dans les cellules ou les tissus,  
une **séquence spécifique d'ADN** ou **d'ARN**,  
séquence complémentaire de celle de la sonde

Permet **l'étude des gènes (génomique) ou de leur expression (transcriptome)**

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

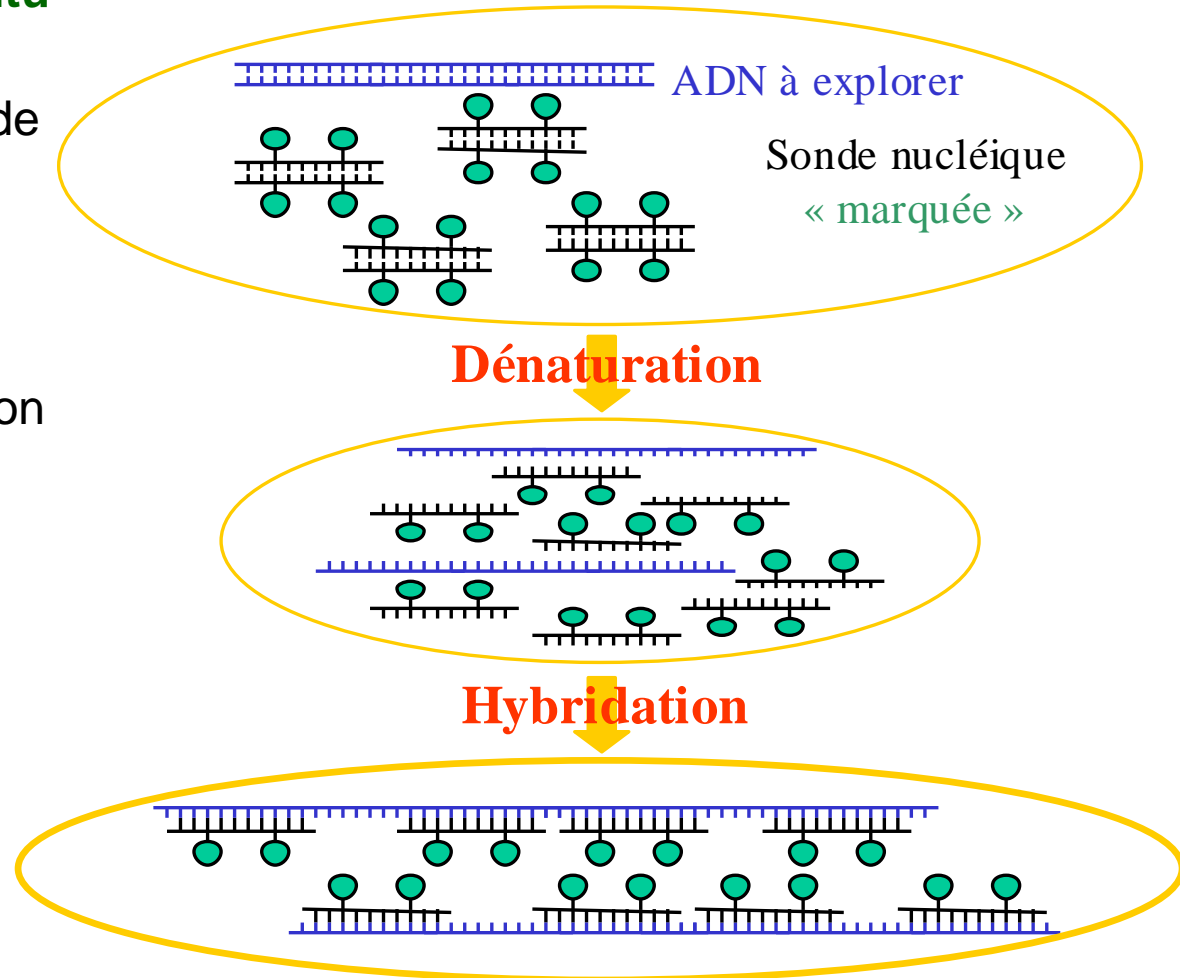
## 4-1- Immunohistologie

## 4-2- Hybridation in situ

1<sup>e</sup> tps : **dénaturation** de l'ADN et de la sonde

2<sup>e</sup> tps : **hybridation**

3<sup>e</sup> tps : **lecture**, fonction du « marqueur »





# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

## 4-1- Immunohistologie

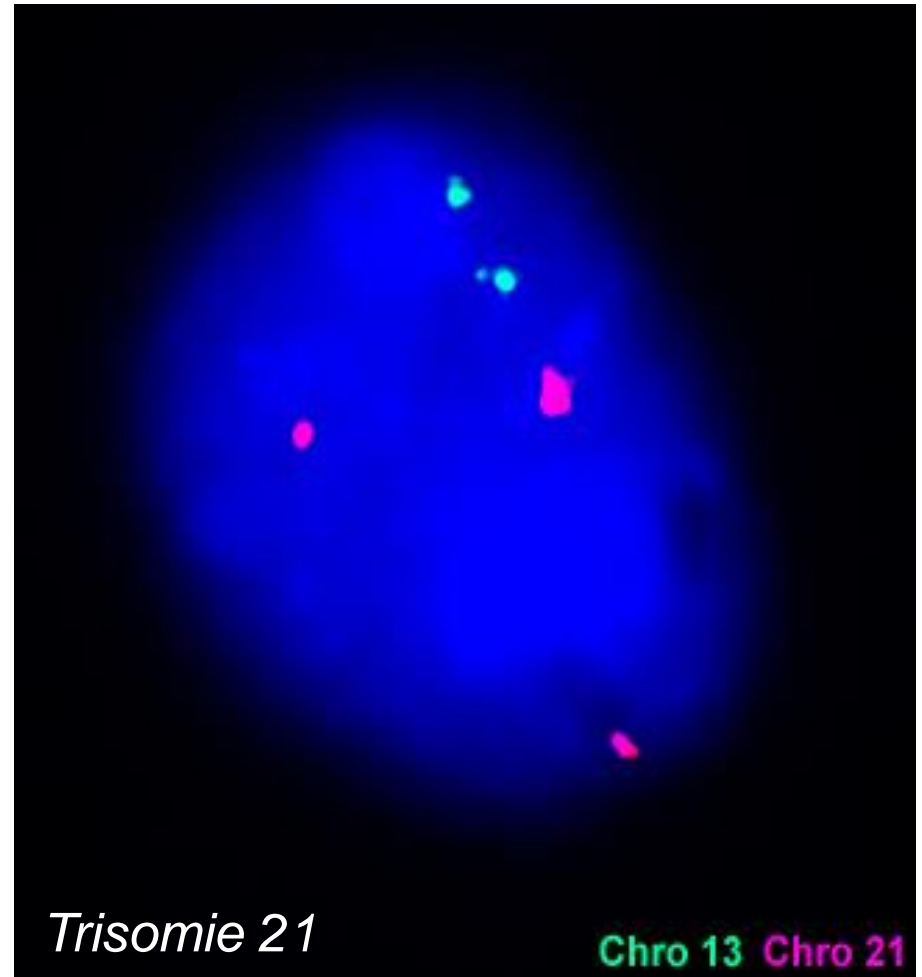
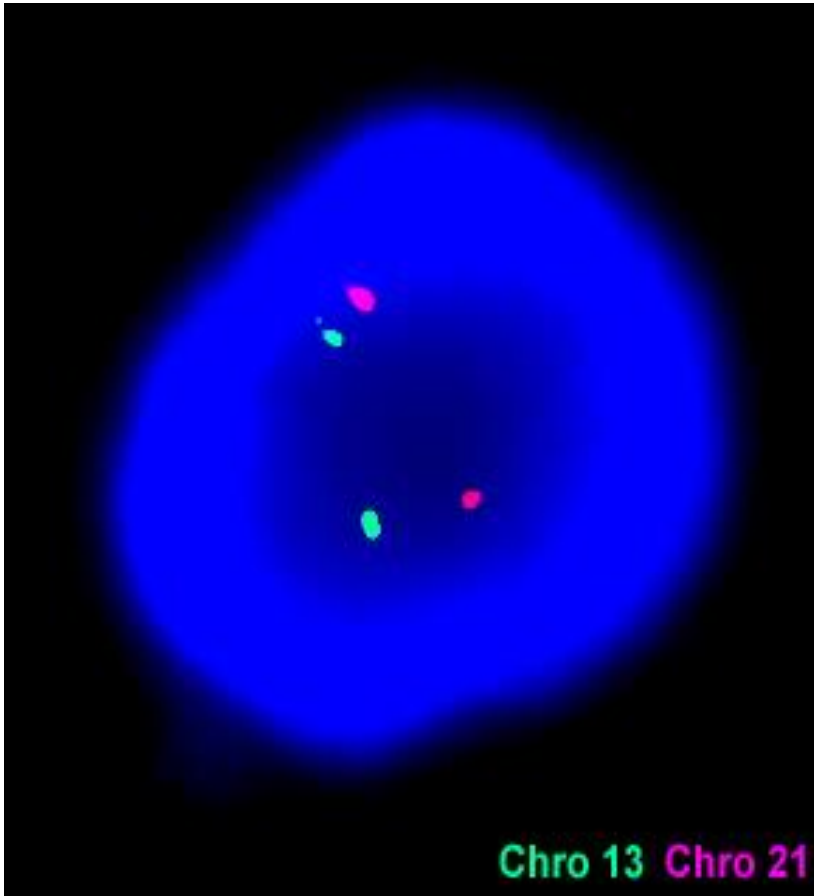
## 4-2- Hybridation in situ

La sonde est marquée par :

- des isotopes radio-actifs = « **sondes chaudes** »
- des produits non radio-actifs = « **sondes froides** »
  - \* **fluorochromes** → **FISH = Fluorescence *In Situ* par Hybridation**
  - \* **enzymes (phosphatase alcaline), biotine, digoxigénine**
  - \* **or colloïdal pour MET**

exemples : FISH / M-FISH

FISH chromosome spécifique pour diagnostic anomalies nombre chromosomes



P. Vago Clermont Ferrand

Amniocytes

# IV- ANALYSES MOLECULAIRES *IN SITU*

4-1- Immunohistologie

4-2- Hybridation in situ

## 4-3- Autoradiographie

= utilisation de **précurseurs** des macromolécules marqués avec des **isotopes radioactifs** pour repérer les **sites de synthèse** et étudier le **cheminement** de **composés biologiques**

1<sup>e</sup> tps : **incorporation *in vivo* / *in vitro*** du précurseur du métabolisme à étudier

2<sup>e</sup> tps : confection des **préparations**

3<sup>e</sup> tps : **autoradiographie** (émulsion photosensible appliquée plusieurs semaines sur la préparation)

4<sup>e</sup> tps : **développement** et **lecture** du film (au microscope)

**Exemple :**

Incorporation de la **thymidine tritiée** dans l'ADN : étude de la **synthèse de l'ADN**