

TP de cytologie

Enseignante : ALLAOUI A

Public cible : les étudiants de première année docteur vétérinaire

Année universitaire : 2018/2019

Durée : 04 Séances de TP

Matériel nécessaire

Microscope optique

Micropipette

Lames porte objet/ Lamelles

Pinces/ Ciseaux

Porte lames et lames

Tubes secs / Tubes- Eppendorf

Sérum salé/ Eau distillée

Colorant éosine Y/Bleu de méthyle / Eau iodée

Béliers ou testicules collectés à l'abattoir

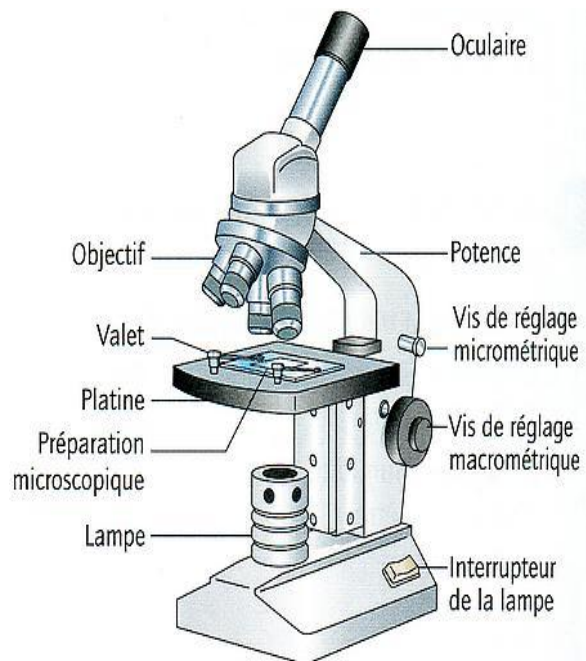
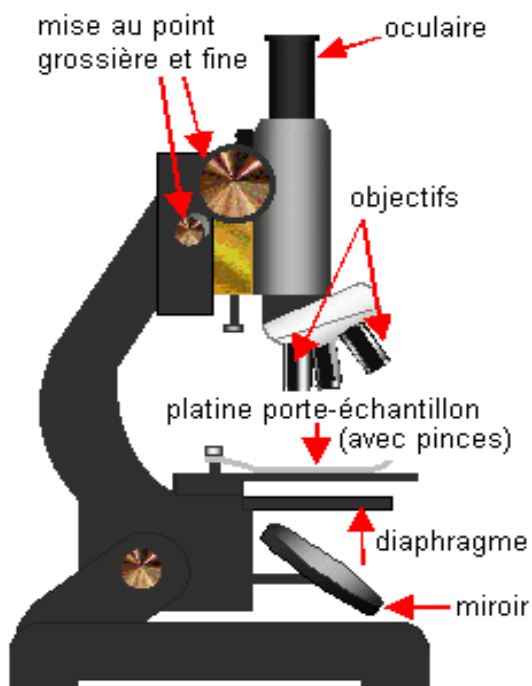
Activité I : présentation du matériel

I.1. Microscope optique

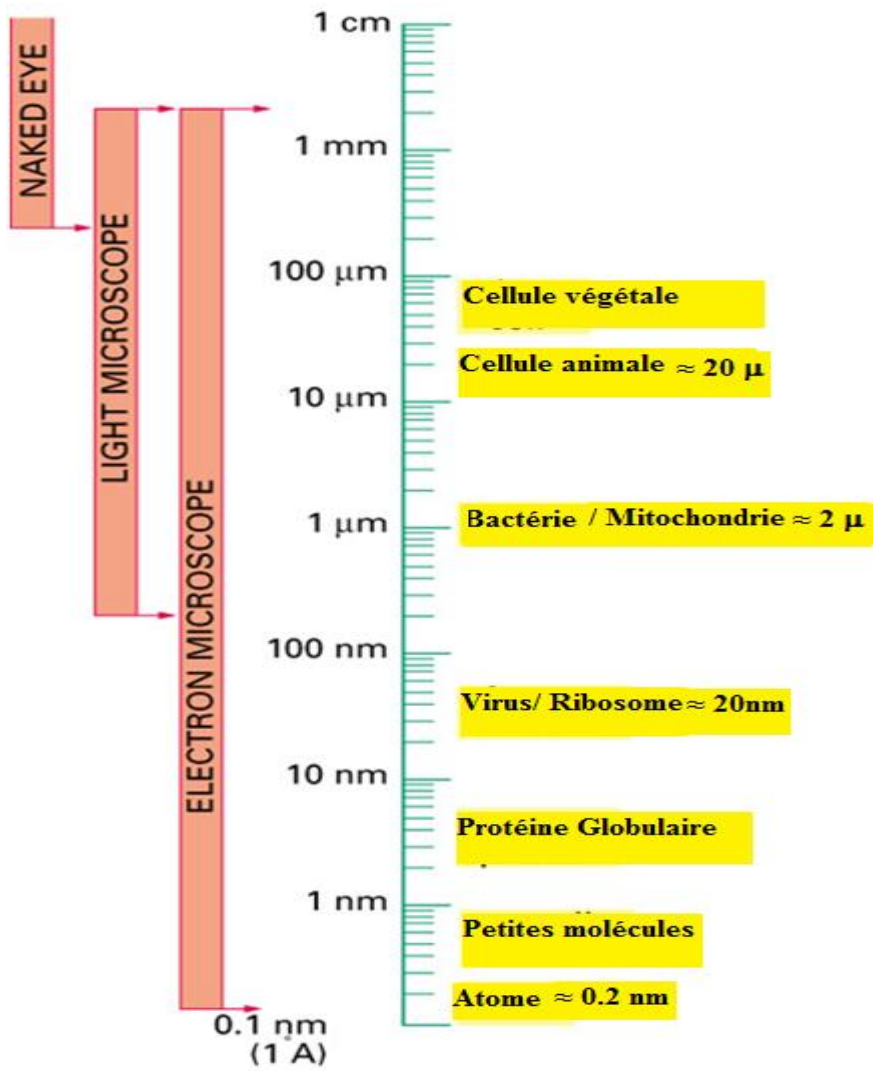
Il permet de visualiser des objets vivants (bactéries, levures, organismes unicellulaires) ou fixés (coupes de tissus) à l'échelle cellulaire. Pour observer la structure cellulaire sous le microscope optique (appelé aussi photonique), le principe se base sur la déviation des particules photoniques qui sont des éléments non chargés, ces particules traversent un système de lentilles de manière à former une image agrandie de l'échantillon à examiner.

Les objets illuminés deviennent très clairs mais il est souvent nécessaire de procéder à des colorations des tissus afin de les observer.

Les techniques de coloration permettent aussi de distinguer des objets précis, ou de différencier deux organismes proches, car tous les tissus ne fixent pas la coloration de la même façon.



Remarque : selon leur dimension, les éléments peuvent être visualisés à l'œil nu, au microscope optique ou au microscope électronique.



I.2. Micropipette

I.2. 1. Définition : Une pipette automatique ou micropipette est un système de pipetage de précision.

Il existe généralement une gamme de modèles selon le volume à pipeter et la précision du prélèvement à effectuer :

P5000 : permet de pipeter jusqu'à 5 ml de solution ;

P1000 : permet de pipeter de 200 à 1 000 μ l de solution ;

P200 : permet de pipeter de 20 à 200 μ l ;

P50: permet de pipeter de 5 à 50 μ L

P20 : permet de pipeter de 2 à 20 μ l ;

P10 : permet de pipeter de 0,5 à 10 μ l ;

P2 : permet de pipeter de 0,1 à 2 μ l.

I.2. 2. Principe d'utilisation

On commence par régler le volume à prélever sans dépasser la portée de la pipette : c'est-à-dire la tranche de volumes pour laquelle elle est conçue. Par exemple, une *P20* (2 μ l à 20 μ l) ne doit pas être réglée à moins de 2 μ l ou à plus de 20 μ l.

Il est nécessaire d'avoir des embouts (cônes de pipettes) qui soient adaptés à la micropipette utilisée. L'embout doit être le plus effilé possible, notamment pour les petits volumes, afin de mieux voir le volume prélevé. Les embouts sont généralement disposés dans des boîtes stériles, munies d'un plateau percé, où l'on les met. On prélève un embout simplement en appliquant le bout de la micropipette dans le col de l'embout. En appuyant un peu, l'embout s'enfonce et peut être retiré de la boîte.

Les pipettes automatiques sont dotées de trois crans en fonction de la force qu'on applique sur le piston :

- le premier permet d'aspirer le liquide avec la bonne pression correspondant au volume choisi ;
- le second permet l'éjection du liquide prélevé pour que rien ne reste dans le cône. En effet, un liquide visqueux (chargé par exemple en protéines ou acides nucléiques) a tendance à adhérer aux parois.
- Le troisième permet de jeter l'embout souillé de la micropipette sans se servir de ses mains.

Activité II : Introduction à la cytologie : Diversité cellulaire

II.1. Objectifs

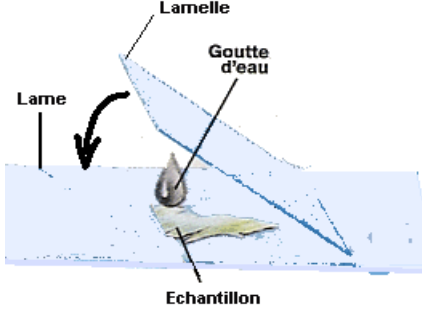
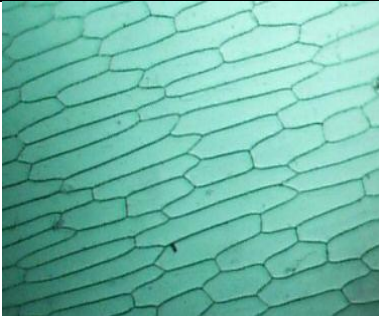
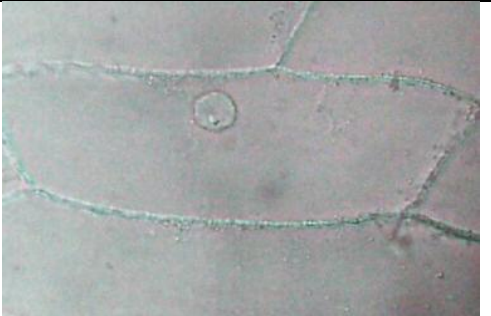
- Etre capable de préparer un échantillon tissulaire et de l'observer au microscope optique
- Pouvoir schématiser les cellules observées au microscope optique et légender ces schémas
- Connaître les constituants de base des principales classes cellulaires et faire la comparaison entre les structures cellulaires de ces différentes classes

II. 2. La cellule végétale

Exemple : *Cellule d'épiderme d'oignon*

II.2.1. Protocole

Couper un oignon en quatre et prélever un des fragments d'écaille avec une pince à épiler. Chaque écaille est limitée sur chacune de ses faces par un épiderme. Soulever avec la pince l'épiderme interne, c'est à dire la mince pellicule qui tapisse intérieurement (côté concave) l'écaille. Découper avec des ciseaux fins un fragment de quelques mm de côté et le déposer sur une lame dans une goutte d'eau et recouvrir d'une lamelle.

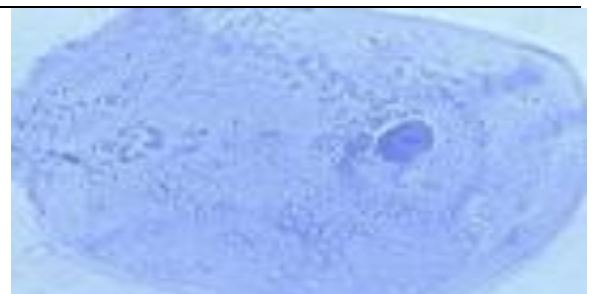
		
<p>Placer la lame sur la platine du microscope et observer d'abord au grossissement le plus faible.</p>	<p>Cellules de l'épiderme interne d'écaille d'oignon (Pas de coloration, X 400)</p>	<p>Cellule avec son noyau (X 600, zoom optique) <i>Noter l'épaisseur de la paroi, la présence d'un point à l'intérieur du noyau, le nucléole, ainsi que diverses inclusions à l'intérieur du cytoplasme (le contenu cellulaire)</i></p>

II. 3. La cellule animale

Exemple : *Cellule buccale humaine*

II.3.1. Protocole

1. Prendre une lame.
2. Prélever avec une tige en coton en frottant le fond de sa joue.
3. Déposer le prélèvement sur une lame.
4. Rajouter une goutte de bleu de méthyle pour colorer ce qu'on veut voir.
5. Recouvrir ensuite d'une lamelle.



Cellule buccale observée au microscope optique
Grossissement : *400

Activité III : La membrane plasmique

III.1. Objectifs :

- Evaluer la fonctionnalité et l'intégrité de la membrane plasmique
- Evaluer le principe de la diffusion simple à travers la bicouche lipidique et à travers les aquaporines
- Comprendre la notion de la perméabilité sélective des membranes et du déplacement des substances à travers cette membrane plasmique

Exemple : le gamète mâle (le spermatozoïde) du bœuf

1. Test de vitalité cellulaire : coloration à l'éosine « Y ».
2. Teste hypo-osmotique (HOST)

III. 2. Test de vitalité

III. 2. 1. Principe

Pour toutes les cellules vivantes, la membrane plasmique fonctionnelle et intacte est essentielle pour le métabolisme vital, du fait qu'elle agit comme une barrière protectrice de la cellule. Dans le cas des spermatozoïdes, en plus de ce rôle, l'intégrité de la membrane est également indispensable pour permettre l'interaction entre le spermatozoïde et l'épithélium du tractus génital femelle ainsi que pour la capacitation, lors de la rencontre du spermatozoïde avec l'ovule.

Le mécanisme d'action des colorants vitaux, dont le plus commun est l'éosine, est basé sur la perméabilité sélective de la membrane plasmique intacte d'une cellule vivante. En effet, la double couche phospholipidique de la membrane plasmique est imperméable aux molécules du colorant. En revanche, ces dernières peuvent traverser les membranes altérées, des cellules mortes, s'accumuler dans le cytoplasme ou dans le noyau et colorer ainsi le compartiment cellulaire en question. La vitalité de la cellule est donc attestée par l'exclusion du colorant.

III. 2. 2. Protocole

Pour la réalisation de ce test : une goutte (10 µl) d'éosine Y (0,5g d'éosine dilué dans 100ml diluée d'eau distillée) est mélangée sur une lame avec une goutte (10 µl) de sperme. Après 30 secondes d'incubation, le mélange est soit observé immédiatement entre lame et lamelle, soit étalé sur la lame à l'aide de la largeur d'une lamelle en un fin film, puis laissé sécher sur une plaque chauffante (à 37°C), pour être observé ensuite au microscope optique objectif $\times 40$, ou à l'objectif $\times 100$ en immersion. Les Spermatozoïdes colorés en rose sont morts et ceux non colorés qui sont restés blancs sont vivants. : Une cellule morte ne présentant pas une membrane plasmique intègre et fonctionnelle laisse diffuser le colorant à l'intérieur de sa cellule. Au total, 200 spermatozoïdes sont comptés sur cinq champs différents



Cellules mortes colorées en rose

Cellules vivantes colorées en blanc

III. 3. HOST : Test de gonflement flagellaire en milieu hypo-osmolaire

III. 3. 1. Principe

Le test de référence du statut membranaire est appelé test hypo-osmotique HOST (*Hypo-Osmotic Swelling Test*) (figure ci-dessous) ou encore test de gonflement flagellaire en milieu hypo-osmolaire. Initialement proposé comme un test fonctionnel, puis comme test de vitalité par Jeyendran en 1984. Il est basé sur le caractère semi-perméable des membranes biologiques et la fonctionnalité des protéines membranaires spécifiques appelées aquaporines. En présence d'un milieu extracellulaire hypo-osmolaire, il se produit un flux d'eau dans la cellule, de manière à rééquilibrer la pression osmotique de part et d'autre de la membrane. Ce qui provoque un gonflement ou une incurvation flagellaire visibles au microscope optique. Une cellule dont la membrane est altérée, perd cette capacité osmorégulatrice et par conséquent, ne gonfle pas en milieu hypo-osmolaire

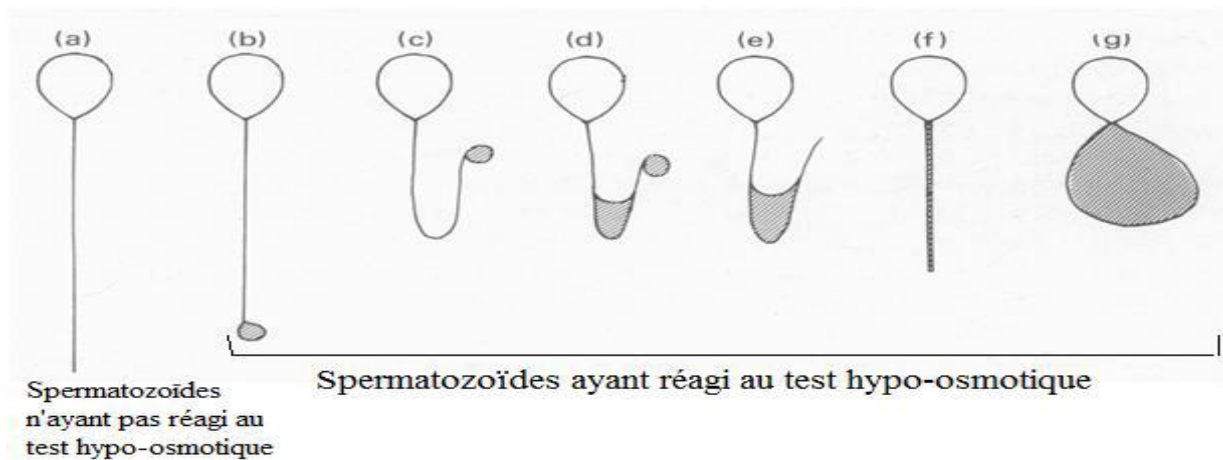


Figure: Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes soumis à un stress hypo-osmotique a = pas de changement (cellule ayant une membrane plasmique altérée) b-g = divers types de changements (gonflement et enroulement) de la queue des spermatozoïdes (cellules ayant une membrane plasmique intacte).

III. 3. 2. Protocole

0.5 ml de la solution hypo-osmotique 100 mOsM (mélange de 1 g de fructose et de 0.735 g de citrate de sodium dilués dans 100 ml d'eau distillée à 37 ° C) et 0.050 ml de semence sont soigneusement mélangés et incubés pendant au moins 45 minutes. Après l'incubation, 10 µl du mélange (semence, solution) sont mis entre lame et lamelle puis, placé sous microscope optique à grossissement x40. Les spermatozoïdes possédant une queue gonflée et enroulée sont supposés avoir une membrane fonctionnelle.

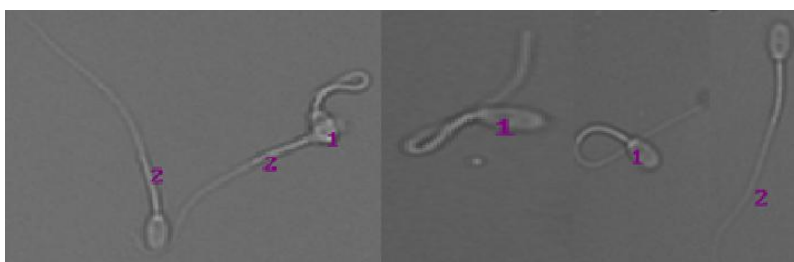


Figure: test de gonflement hypo-osmotique (HOST: hypo-osmotic swelling test).
(1) spermatozoïde gonflé (vivant), (2) spermatozoïde non gonflé (mort) (x40).