

# UE 11 : TP BIOLOGIE CELLULAIRE

## Séance 1

### **A : Test de cytotoxicité cellulaire d'un solvant (DMSO = diméthylsulfoxyde) sur cellules Hela**

Différentes concentrations du solvant (0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 et 2 %) sont testées. La toxicité du solvant sera évaluée de J1 à J7 (selon les groupes) par rapport à un témoin maintenu dans le milieu de culture de référence (optiMEM additionné de 5% de serum de veau foetal = SVF). Les cellules ont été inoculées à différents temps sur des plaques 96 puits ou en flacon T25. Après 4 h d'incubation à 37°C en atmosphère à 5% CO<sub>2</sub>, les différentes solutions (2X) sont ajoutées dans le milieu de culture. Après différents temps, on évaluera l'influence de la concentration en DMSO sur la prolifération cellulaire afin de déterminer les concentrations de solvant utilisables sans altérer la prolifération cellulaire.

**Deux méthodes seront utilisées pour évaluer cette toxicité.**

#### **1. Test au WST (dérivé du MTT) = sels de tétrazolium**

- récupérer une plaque 96 puits et ajouter 10 µl / puit de la solution de WST-1 (sel de tétrazolium)
- incuber 2h à 37°C
- lire la DO de la plaque à 450 nm

#### **2 : numération et estimation viabilité cellulaire par coloration au bleu Trypan**

- récupérer un flacon de culture T25,
- éliminer à l'aide d'une pipette de 5 ml, le milieu de culture,
- rincer le flacon de culture avec 2 ml de PBS (déposer le PBS puis le réaspirer **avec la même pipette** sur la paroi opposée à celle du tapis cellulaire afin de ne pas altérer le tapis cellulaire),
- ajouter 1 ml de la solution de trypsine-EDTA (**avec une P1000**), toujours sur la paroi opposée, bien la répartir sur tout le tapis cellulaire. Puis éliminer la solution en ne laissant qu'un film sur le fond de la boîte de culture,
- incuber le flacon à 37°C jusqu'à ce que les cellules se détachent de la paroi (5 min), contrôler au microscope inversé (les cellules deviennent rondes !)
- ajouter 2 ml de milieu de culture complet et bien homogénéiser la suspension cellulaire à la pipette
- prélever 50µl de cette suspension et la déposer dans un microtube, ajouter 50 µl de bleu Trypan et mélanger,

- déposer 50µl de cette suspension cellulaire colorée sur la cellule de Malassez,
- déterminer la concentration de cellules vivantes par mL et le pourcentage de viabilité

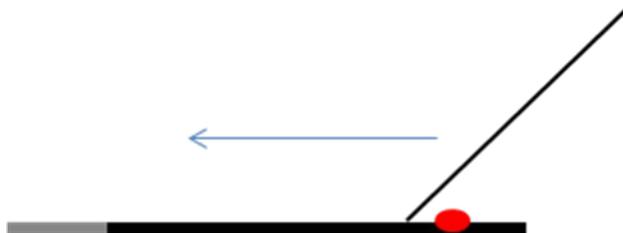
## **B. Observation de cellules fixées et colorées**

type cellulaire : cellules sanguines

2 colorations : - Giemsa rapide = RAL 555 et PAS

### **frottis (sang de chien) : 1 frottis par personne**

- Déposer 5 µl de sang à 1 cm environ du bord de la lame, à l'opposé à la zone dépolie,
- Placer le bord de la lamelle à étalement en contact avec la lame, avec un angle de 45°
- Faire glisser la lamelle inclinée vers la goutte de sang, jusqu'au contac. Le sang va s'étaler par capillarité le long de la lamelle
- Pousser la lamelle d'un mouvement rapide, en maintenant l'inclinaison à 45 ; tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'extrémité de la lame



- Laisser sécher sur la pailleasse (10 min environ, vérifier)

### **COLORATIONS :**

**Par binôme**, 1 lame sera colorée au RAL 555 et l'autre au PAS.

#### **•Coloration rapide RAL 555 :**

- Agiter la lame 12 sec dans le flacon 1 (fixateur) puis égoutter sur papier absorbant
- Agiter la lame 1 sec dans le flacon 2 (éosine) puis égoutter sur papier absorbant
- Agiter la lame 20 sec dans le flacon 3 (bleu) puis **rincer abondamment** et égoutter sur papier absorbant
- Laisser sécher 10 min sur pailleasse (verticalement)

- Observer au microscope (**objectif x 40 puis 100 en présence d'huile à immersion**)

#### •Coloration PAS (Periodic Acid-Schiff)

**A la sortie de chaque bain et après rinçage, les lames doivent être égouttées sur papier absorbant**

- \_\_\_ Plonger la lame 1 min dans le fixateur (formaldéhyde/éthanol 95% : 10 /90), flacon 1 puis égoutter sur papier absorbant
- \_\_\_ Rincer la lame sous un filet **d'eau du robinet** (environ 1 min)
- \_\_\_ Immerger la lame 5 min dans l'acide périodique (flacon 2)
- \_\_\_ Rincer la lame dans **l'eau distillée dans 2 bains successifs**
- \_\_\_ Immerger la lame 15 min dans le réactif de Schiff (flacon 3) Rem : bien refermer le flacon 3 immédiatement après usage
- \_\_\_ Rincer la lame sous **l'eau du robinet** pendant 5 min (la coloration doit devenir rose)
- \_\_\_ Immerger la lame dans la solution d'hématoxyline (flacon 4) pendant 90 sec
- \_\_\_ Rincer sous **l'eau du robinet** (1min) et laisser sécher
- \_\_\_ Observer au microscope (**objectif x 40 puis 100 en présence d'huile à immersion**)

#### Compte-rendu

##### **A : Test de cytotoxicité sur cellules Hela :**

- \_\_\_ Expliquer les 2 méthodes utilisées pour évaluer la viabilité cellulaire et les conditions d'utilisation de chacune d'elles,
  - expliquer le principe d'un test au WST et son intérêt,
  - expliquer l'intérêt de chacune des étapes du protocole de préparation de l'échantillon pour la numération cellulaire après coloration au bleu Trypan,
  - déterminer la viabilité cellulaire et la concentration cellulaire après coloration au bleu Trypan,
  - évaluer la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en DMSO après coloration au WST

- Analyser les résultats obtenus par chacun des groupes de travail afin d'évaluer l'influence de la concentration en DMSO et de la durée d'incubation avec le DMSO sur la prolifération cellulaire.

**B : Observation de cellules colorées au PAS ou au RAL 555 :**

- caractéristiques et intérêts de chacune des colorations
- repérer sur le frottis chacun des types cellulaires,
- descriptions des cellules observées (schémas commentés) et caractéristiques qui vous ont permis de les identifier ;