

Corrigé type de l'Examen de la matière Model Cellulaire et Etude *Ex. vivo*

R1. Explication du rôle de ces éléments dans la culture cellulaire : (06 pts.).

1. Rouge de phénol : indicateur de pH utilisé pour détecter la contamination microbienne des milieux de culture (virage au jaune : contamination par des bactéries, virage au rouge : contamination par des levures) (1,0 pt.)
2. Pipet Aid : dispositif de pipetage des liquides qui permet de travailler avec des volumes en millilitres sous le PSM (1,0 pt.)
3. Chambre de Boyden : un dispositif utilise pour vérifier la migration cellulaire (1,0 pt.)
4. Amphotericine B : Un antifongique utilise dans les milieux de culture pour prévenir la contamination par les champignons (1,0 pt.)
5. DAPI : Une molécule fluorescente bleue, utilisée pour étudier la viabilité cellulaire (1,0 pt.)
6. Cytomètre en flux : Un appareil utilise pour le tri des cellules et l'étude de la prolifération cellulaire (1,0 pt.)

R2. Lors d'une culture cellulaire, une mortalité totale ou partielle a été constatée. Les causes plausibles (06 pts.) :

- Epuisement du milieu (mort graduelle des cellules)
- Contamination microbienne [mort totale de toutes les cellules par changement de pH (7,4 >pH>7,4) ou lyse microbienne]
- Instabilité de la température (doit être fixe à 37°C)
- Asphyxie des cellules (manque d'oxygène : 95 %)
- Oxydation des cellules (excès d'oxygène : >95 %)
- Vieillesse des cellules (mort par apoptose et nécrose)

R3. Vérification de la mort cellulaire par apoptose :

- Double marquage fluorescent SYTO13 / iodure de propidium :

La détermination du type de mort cellulaire (apoptose ou nécrose) est réalisée grâce à l'utilisation de deux sondes fluorescentes, le SYTO-13 et l'iodure de propidium. Ces deux sondes marquent l'ADN : l'une en jaune (SYTO-13), l'autre en rouge (iodure de propidium). Le SYTO-13 a la propriété de pénétrer dans les cellules dont la membrane plasmique est intacte. A l'inverse, pour que l'iodure de propidium se fixe sur l'ADN, il est nécessaire que les membranes soient lésées ou perméabilisées. L'évaluation de l'état apoptotique, nécrotique ou normal des cellules est déterminée en fonction de deux paramètres : la coloration du noyau (rouge ou jaune) et sa morphologie (noyau de taille normale, augmentée ou réduite, présentant ou non une fragmentation). L'examen des cellules sous microscope inversé à fluorescence permet de détecter les cellules apoptotiques : noyaux condensés ou fragmentés colorés en jaune pour l'apoptose "récente" ou en vert à rouge pour l'apoptose "ancienne" **(01 pt.)**

- Marquage au DAPI : Les modifications morphologiques nucléaires liées à l'apoptose sont mises en évidence par la coloration de l'ADN par un marqueur fluorescent, le 4',6-diamidino-2-phénylindole ou DAPI. Les noyaux apparaissent fluorescents en bleu et peuvent être différenciés selon des critères morphologiques : Les noyaux des cellules apoptotiques présentent une taille réduite (condensation nucléaire) pouvant être associée à un aspect fragmenté ; ces noyaux apoptotiques présentent généralement une fluorescence intense **(01 pt.)**

- Marquage *in situ* des extrémités 3' libres de l'ADN nucléaire : méthode TUNEL

Le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL ("Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling") est réalisé à l'aide d'un kit ("détection et quantification de l'apoptose *in situ*"). Ce marquage permet de mettre en évidence *in situ* la fragmentation de l'ADN nucléaire résultant de l'activation des endonucléases au cours de l'apoptose. Cette méthode est basée sur le marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la « terminal transferase (tdt) » : cette enzyme catalyse l'accrochage de nucléotides marqués à la fluorescéine au niveau des extrémités 3'-OH libres (à ce stade, le marquage peut être examiné au microscope à fluorescence). La fluorescéine est ensuite détectée par un anticorps anti-fluorescéine couplé à la peroxydase. Le marquage est révélé en utilisant la diaminobenzidine comme chromogène. Après contre-coloration au bleu de toluidine et montage des lamelles, les cultures sont examinées au microscope optique. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par un marquage nucléaire brun **(02 pts.)**

R4. Vous avez réalisé une culture cellulaire et compté les cellules. Vous avez trouvé 8×10^7 cellules/mL. Pour vérifier la viabilité des cellules vous avez utilisé trois méthodes : le kit LDH, le double marquage DF/IP et le double marquage IP/Syto 13. Vous avez trouvé respectivement : 35 % de coloration rouge, $5,2 \times 10^7$ cellules colorées en jaune et 3×10^5 cellules avec des noyaux à ADN fragmenté et colorés en rouge. Pourcentages des cellules suivantes :

- % de cellules vivantes : 65 % (**100% -35% des mortes, vérifié par le DF**)
- % de cellules mortes 35 % (**coloration rouge**)
- % de cellules mortes par apoptose 0,37% apoptose tardive ($3 \times 10^5 / 8 \times 10^7$) x 100% (**3×10^5 cellules avec des noyaux à ADN fragmenté et colorés en rouge**)
- % de cellules mortes par nécrose : 34,62 % (35% -0,37%)

Chargée de la matière

M^{me} F. BENDALI