

TP MGF : INTRODUCTION AUX TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

NOM - Prénom :

1. TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE DE SUSPENSIONS DE LEVURES

1.1. BUTS

Déterminer par numération directe en lame de Kova :

- la concentration en nombre total de levures de deux suspensions cellulaires, dont une est chauffée.
- la concentration en nombre de levures viables de deux suspensions cellulaires, dont une est chauffée.
- le pourcentage de viabilité de deux suspensions de levures, dont une est chauffée.

1.2. MODE OPÉRATOIRE

Veiller à agiter soigneusement les suspensions avant tout prélèvement.

- Dans un tube à hémolyse, introduire exactement :
 - 0,5 mL de suspension de levures.
 - 0,5 mL de bleu de Funk.
- Effectuer un comptage en lame de Kova.
- Porter 2 mL de suspension de levures à 75°C pendant 15 minutes au moins.
- Dans un tube à hémolyse, introduire exactement :
 - 0,5 mL de suspension chauffée de levures.
 - 0,5 mL de bleu de Funk.
- Effectuer un comptage en lame de Kova.

1.3. RÉSULTATS BRUTS DES NUMÉRATIONS DIRECTES

✓ **Suspension non chauffée :**

[illegible]

✓ Suspension chauffée à 75°C :

Grand ou petit carré	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Cellules mortes (bleues)										
Cellules viables (blanches)										

1.4. EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Q1. Donner le raisonnement permettant le calcul d'une concentration en nombre de levures d'une suspension après numération directe en lame de Kova.

Q2. Donner l'équation aux grandeurs de la concentration en nombre de levures d'une suspension après numération directe en lame de Kova.

Q3. Donner l'équation aux grandeurs du pourcentage de viabilité.

Q4. Compléter le tableau de résultats suivant :

	Suspension non chauffée de levures	Suspension chauffée à 75°C de levures
Concentration en nombre total de levures		
Concentration en en nombre de cellules viables		
Pourcentage de viabilité		

2. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES EN CONTRASTE DE PHASE ET À ÉPIFLUORESCENCE

2.1. BUTS

Observer une suspension de levures grâce à deux méthodes microscopiques :

- la microscopie en contraste de phase.
- la microscopie à épifluorescence.

2.2. OBSERVATION EN MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

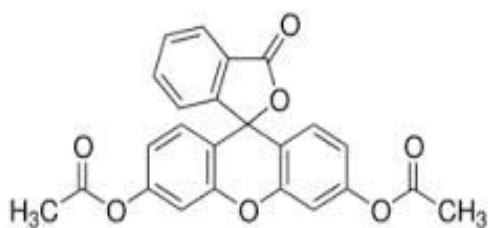
→ Observer la suspension de levures entre lame et lamelle en microscopie en contraste de phase.

Q5. Dessin d'observation :

2.3. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE À ÉPIFLUORESCENCE

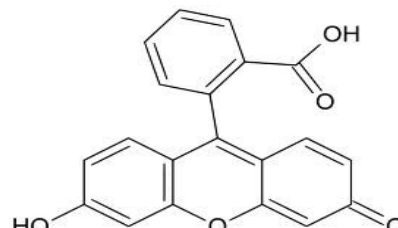
- À 1 mL de suspension non chauffée de levures, ajouter 1 goutte de solution de fluorescéine diacétate à $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.
- Attendre 10 minutes.
- Observer entre lame et lamelle en microscopie à épifluorescence.
- Recommencer la manipulation avec la suspension chauffée de levures.

La **fluorescéine diacétate** est un composé **très peu fluorescent** pouvant entrer dans les cellules. Dans les cellules viables, elle est le **substrat de diverses estérases** qui libèrent la **fluorescéine** qui, elle, est **fluorescente**.



Fluorescéine diacétate

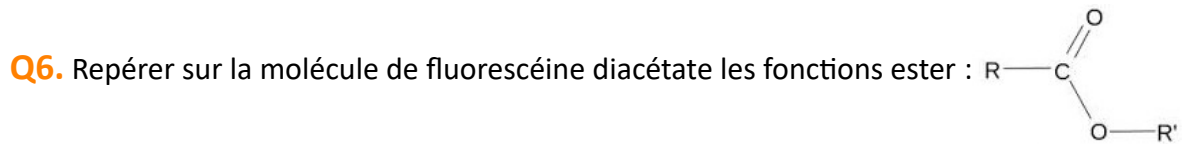
estérases



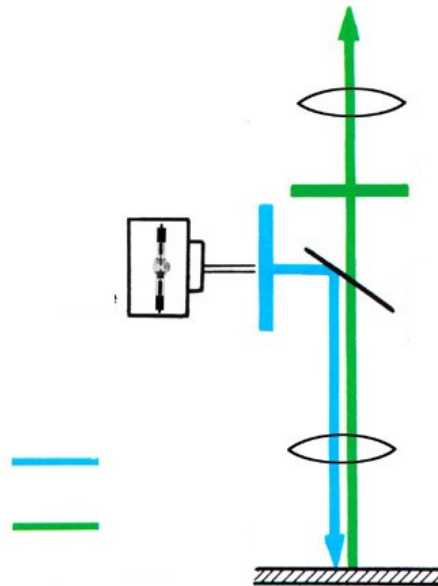
Fluorescéine

$\lambda_{\text{max excitation}} = 492-495 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max émission}} = 521 \text{ nm}$



Q7. Légender le schéma ci-dessous représentant le principe de fonctionnement du microscope à fluorescence.



Q8. Expliquer pourquoi la fluorescéine diacétate peut être utilisée pour réaliser un test de viabilité cellulaire.

Q9. Expliquer succinctement le principe de la microscopie à épifluorescence dans le cas appliqué du TP.

Q10. Les résultats de l'observation en épifluorescence sont-ils cohérents avec ceux obtenus pour le test de viabilité cellulaire au bleu de Funk ?

TP MGM : INTRODUCTION AUX TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

DOSSIER SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Fiche n°1 : Numération directe en lame de Kova

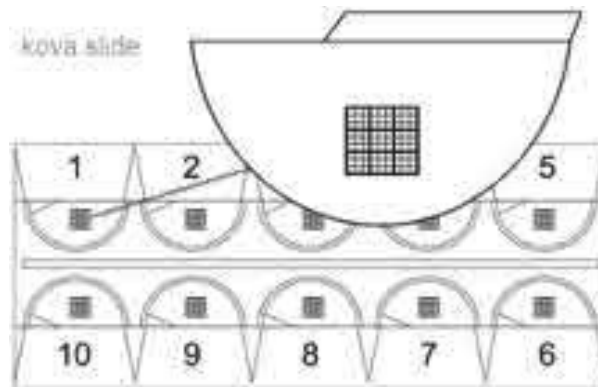
Fiche n°2 : Numération directe en hématimètre de Malassez

FICHE N°1 : NUMÉRATION DIRECTE EN LAME DE KOVA

Une lame Kova est une lame spéciale quadrillée qui permet le comptage direct de différents types de cellules.

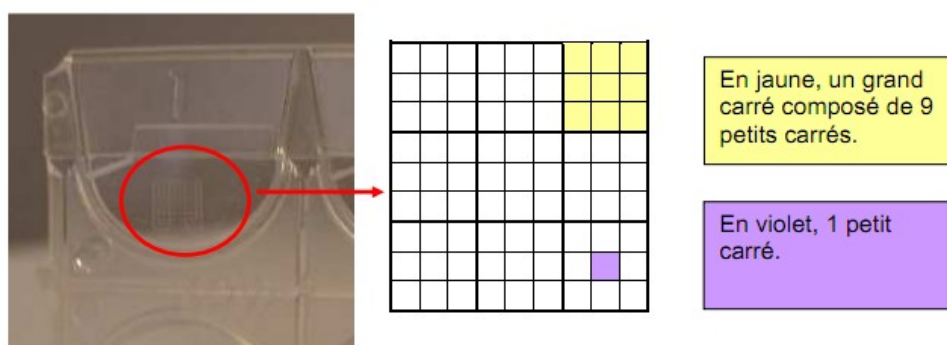
1. PRÉSENTATION DE LA LAME DE KOVA

Chaque lame de Kova comporte 10 cupules de comptage contenant chacune un quadrillage.

**2. LE QUADRILLAGE D'UNE CUPULE DE LAME DE KOVA**

Chaque cupule de comptage comprend une grille comportant 9 grands carrés (ou cases), chacun divisé en 9 petits carrés.

- L'ensemble du quadrillage (les 9 cases) correspond à un volume de $1 \mu\text{L}$ (1 mm^3).
- 1 case (grand carré) correspond à un volume de $0,1 \mu\text{L}$ ($0,1 \text{ mm}^3$).
- 1 petit carré correspond à un volume de $0,01 \mu\text{L}$ ($0,01 \text{ mm}^3$).

**3. REMPLISSAGE D'UNE CUPULE DE LAME DE KOVA**

- Homogénéiser la suspension avant de remplir la cupule.
- Remplir la cupule par capillarité à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans l'encoche, en une seule fois. Attention aux débordements et aux bulles d'air.
- Attendre 10 minutes afin que les cellules sédimentent.
- Vérifier aux objectifs 4, 10 et 40 la répartition homogène dans le quadrillage.
- Effectuer le comptage à l'objectif adéquat.

4. RÈGLES DE COMPTAGE ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

On ne compte que les cellules situées à l'intérieur des carrés. les cellules à cheval sur les traits de la grille ne sont pas prises en compte.

En fonction de la densité cellulaire, on a 3 possibilités de comptage :

- **Peu de cellules** \Rightarrow **comptage sur les 9 grands carrés (cases), donc pour 1 μL .**
- **Cellules nombreuses** \Rightarrow **comptage sur 1 seul grand carré (case), donc sur 9 petits carrés, donc pour 0,1 μL .**
- **Cellules très nombreuses** \Rightarrow **comptage sur 1 petit carré, donc pour 0,01 μL .**

Les résultats bruts de la numération doivent être présentés dans un tableau :

Grands ou petits carrés	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Cellules mortes (bleues)										
Cellules viables (blanches)										

On admet que les différents traits de la grille représentent 11 % de la surface. Comme on ne compte que les cellules situées à l'intérieur des carrés, il convient de **multiplier le résultat par 1,11**.

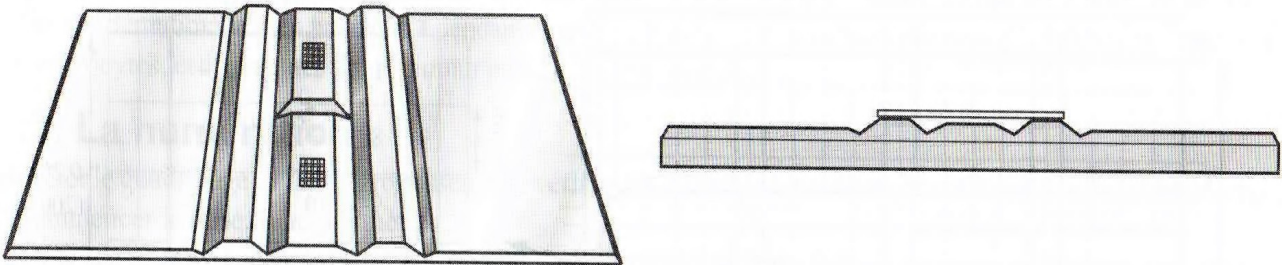
Le résultat final d'une numération est donné sous la forme :

$$C_N (\text{cellules ; suspension}) = \underbrace{X,Y}_{\text{Écriture scientifique avec un seul chiffre décimal}} \cdot 10^Z \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$$

FICHE N°2 : NUMÉRATION DIRECTE EN HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ

1. PRÉSENTATION DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ

L'hématimètre de Malassez

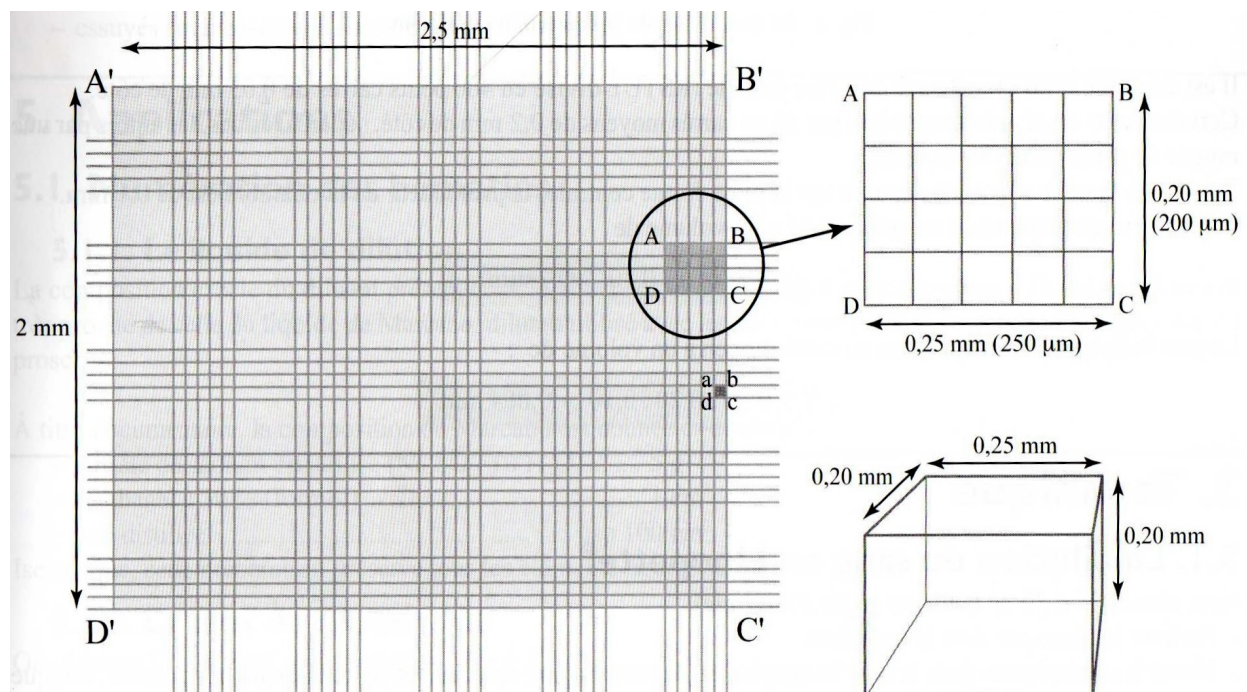


L'hématimètre de Malassez est une lame de verre épaisse, creusée de rigoles qui délimitent des plates-formes :

- deux plates-formes latérales élevées qui supportent la lamelle planée.
- une plate forme centrale légèrement abaissée, sur laquelle sont gravés un ou deux quadrillages.

2. LE QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ

Quadrillage de l'hématimètre de Malassez



Le quadrillage de l'hématimètre de Malassez est constitué d'un **grand rectangle A'B'C'D'** de :

- 2,5 mm de longueur.
- 2,0 mm de largeur.

Ce grand rectangle est divisé en **100 rectangles unitaires égaux ABCD**, dont 25 d'entre eux sont divisés en **20 petits carrés abcd**.

Lorsque la lamelle planée est déposée sur la plate-forme centrale, la **chambre de comptage** correspondant au quadrillage complet correspond à un **volume total de 1 mm³, soit 1 µL**.

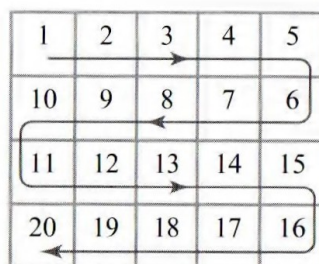
3. MISE EN HÉMATIMÈTRE

- Humidifier ou déposer du vernis ou de l'albumine sur les plate-formes latérales.
- Déposer la lamelle planée sur les plate-formes latérales afin quelle adhère.
- Remplir complètement la chambre de comptage à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, en une seule fois. Attention aux débordements et aux bulles d'air.
- Attendre 10 minutes afin que les cellules sédimentent.
- Vérifier à l'objectif 40 la répartition homogène dans le grand rectangle.
- Effectuer le comptage.

4. RÈGLES DE COMPTAGE ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

On compte les cellules déposées sur les **4 rectangles unitaires divisés en 20 petit carrés** qui sont situés au **4 coins du quadrillage**.

Pour chaque rectangle unitaire choisi, on compte les cellules carré après carré, de gauche à droite pour la première rangée, de droite à gauche pour la rangée suivante.



Pour les **cellules chevauchant** les limites du rectangle unitaire, compter seulement celles qui chevauchent 2 limites sur 4 : **choisir la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite**.

Les résultats bruts de la numération doivent être présentés dans un tableau :

Rectangle unitaire	1	2	3	4	Total
Cellules mortes (bleues)					
Cellules viables (blanches)					

Le résultat final d'une numération est donné sous la forme :

$$C_{N(\text{cellules ; suspension})} = \underbrace{X,Y \cdot 10^Z}_{\text{Écriture scientifique avec un seul chiffre décimal}} \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$$