

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
FILIERE « Science de la Vie -SVI »
Module : « **SIGNALISATION CELLULAIRE** »
Travaux pratiques de signalisation cellulaire



Pr. Fouad BENHNINI

Année universitaire 2025-2026

TP N°4 : Exploration des Organes Lymphoïdes et Préparation de Suspensions Cellulaires chez la souris

I- Objectifs :

1. **Identification des organes lymphoïdes** : Observer et reconnaître les organes principaux du système immunitaire chez la souris.
2. **Préparation de suspensions cellulaires** : Extraire et préparer des cellules lymphoïdes à partir des tissus de la rate ou du thymus.

II- Les organes lymphoïdes :

Les organes lymphoïdes se classent en deux catégories : les organes primaires (ou centraux) et les organes secondaires (ou périphériques). Les premiers sont des sites où se forment et mûrissent les cellules du système immunitaire, tandis que les seconds sont impliqués dans l'initiation et le développement de la réponse immunitaire face aux agents pathogènes.

1- Les organes lymphoïdes primaires :

Les organes lymphoïdes primaires, ou organes centraux du système immunitaire, se forment dès les premières étapes du développement embryonnaire. Stratégiquement situés en dehors des voies de pénétration et de circulation des antigènes, ces organes se développent indépendamment de toute stimulation antigénique. Ils jouent un rôle crucial en servant de site de maturation et de différenciation des lymphocytes, les rendant immunocompétents.

On distingue deux principaux organes lymphoïdes primaires : la moelle osseuse et le thymus.

La moelle osseuse est présente à l'intérieur des os et se caractérise par un espace où la graisse occupe souvent plus de la moitié. Elle se divise en deux types : la moelle rouge, active et responsable de l'hématopoïèse ; la formation de toutes les cellules sanguines, qu'elles soient lymphoïdes ou myéloïdes, et la moelle jaune, inerte et riche en graisse.

Le second organe qui est le thymus est crucial pour le développement et la maturation des cellules T. Cet organe plat et bilobé est localisé dans la région antérieure du thorax, derrière le sternum et à proximité du cœur. Chaque lobe est enveloppé d'une capsule et divisé en lobules distincts par des cloisons de tissu conjonctif.

2- Les organes lymphoïdes secondaires :

Les organes lymphoïdes secondaires sont les lieux où les lymphocytes naïfs sont activés, ce qui marque le début de la réponse immunitaire adaptative. On distingue deux types d'organes lymphoïdes secondaires :

- Les organes lymphoïdes secondaires bien structurés, tels que la rate et les ganglions lymphatiques, qui répondent aux antigènes tissulaires ou sanguins.
- Les tissus lymphoïdes non encapsulés qui se trouvent de manière diffuse dans les muqueuses de l'organisme, notamment dans la muqueuse digestive, la muqueuse bronchique et la muqueuse urinaire. Ils sont collectivement appelés tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT, pour mucosal associated lymphoid tissue) et réagissent aux antigènes qui atteignent la surface des muqueuses. La communication entre ces compartiments du tissu lymphoïde est assurée par un pool de lymphocytes en circulation, permettant ainsi au système immunitaire de surveiller et de répondre aux menaces potentielles dans tout le corps.

III- La souris blanche, *Mus musculus* :

La souris blanche, *Mus musculus*, est incontestablement un modèle biologique indispensable dans la recherche scientifique, ayant largement contribué aux avancées majeures dans le domaine de la recherche biomédicale. Ses caractéristiques intrinsèques, et ses conditions d'élevage aisées, en font un outil précieux pour une gamme étendue de domaines scientifiques tels que la génétique, l'immunologie, les études comportementales, la recherche médicale, et bien d'autres.

Cette souris blanche, se distingue par son élevage économique nécessitant un faible espace et une consommation quotidienne modeste. Sa reproduction est aisée et rapide ; chaque femelle peut avoir de 5 à 15 portées par an, donnant naissance à une dizaine de souriceaux par portée, soit environ cinquante souriceaux par femelle chaque année. Cette capacité de reproduction rapide, associée à une durée de vie courte, correspond à une stratégie "r" qui compense la mortalité naturelle élevée (due à la prédation, à la famine, etc.). Cette stratégie se distingue de la stratégie "K", caractérisée par une longue durée de vie et une reproduction en faible nombre des animaux de grande taille.

De plus, la souris est un représentant exemplaire des mammifères, compte tenu du fait que 50% des espèces de mammifères sont des rongeurs. Sa proximité génétique avec l'Homme, partageant 99% de gènes communs, en fait un sujet d'étude pertinent pour de nombreuses recherches. Les connaissances accumulées sur cette espèce ouvrent la voie à une exploration variée de multiples domaines. Par exemple, depuis son séquençage complet en 2003, le génome de la souris constitue une base solide pour de nombreuses recherches scientifiques.

Localisation des organes lymphoïdes chez la souris

A) Matériel requis :

- Souris
- Matériel de dissection stérile : pincettes, ciseaux, aiguilles, pinces...
- Lames et lamelles dégraissées à l'alcool.
- Eau tamponnée à pH : 7.2 (PBS "Phosphate-Buffered Saline")
- Alcool éthylique ou méthylique à 95 % et pissette d'eau neutre.
- Un petit bécher, boîte de Laveran ou boîte de pétri, verre de montre ...
- Microscope optique.
- Tubes stériles
- Tamis ou filtres stériles
- Pipettes stériles
- Centrifugeuse
- Solution de Ringer
- Le Bleu de trypan
- Hématimètre De Malassez
- Des aiguilles
- Papier absorbant.
- Poubelle pour les cadavres des souris et les déchets

B) Étapes :

1. Prélèvement des Organes Lymphoïdes (Rate et Thymus) chez la Souris :

1- la souris est tuée par étirement en disloquant les vertèbres cervicales.

2- Fixer la souris sur le dos avec des aiguilles.

3- Ouvrir la peau de la face ventrale et l'écarter proprement pour découvrir les muscles péritonéaux.

4- Ouvrir la cavité abdominale et prélever la rate qui se trouve sur le flanc gauche, l'introduire dans une petite boîte de Pétri contenant la solution de Ringer (2ml).

Le thymus, avec ses deux lobes blanchâtres, se trouve dans la partie antérieure du thorax, plus haut que le cœur. Découper les côtes à droite et à gauche et soulever tout l'avant de la cage thoracique, vous verrez au-dessus du cœur une masse blanchâtre formée de deux lobes. Prélever le thymus et le déposer dans une autre boîte.

2. Extraction des cellules des organes lymphoïdes de souris :

- Préparation **des cellules spléniques** : Après avoir retiré les excès de graisse, de poils et tout tissu non essentiel, maintenir la rate à l'aide d'une aiguille recourbée. Percer une extrémité de la capsule splénique et vider le contenu cellulaire en utilisant une autre aiguille. Éliminer les débris de la capsule. Dissocier les cellules par quelques aspirations et refoulements à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une tétine, puis transférer dans un tube en polystyrène de 10 ml.

- Préparation **des cellules thymiques** : Placer le thymus dans un tube Eppendorf, ajouter 0,5 ml de milieu de culture. Broyer le thymus en 3-4 coups de micro-broyeur. Prélever le surnageant contenant les thymocytes et le transférer dans un tube à centrifuger. Répéter l'opération de broyage en ajoutant à nouveau 0,5 ml de milieu de culture sur ce qui reste du thymus.

3. Purification des suspensions cellulaires :

Commencez par éliminer d'abord les débris et agrégats visibles à l'œil nu par une sédimentation rapide. Pour cela, laissez reposer les agrégats pendant 5 minutes, puis prélevez le liquide au-dessus en utilisant une pipette pour le transférer dans un autre tube.

Remplissez le tube avec le milieu approprié. Centrifugez pendant 10 minutes à 1000 rotations par minute. Retournez le tube au-dessus de l'évier, remettez le culot en suspension en ajoutant un volume connu du milieu, puis procédez à la numération cellulaire.

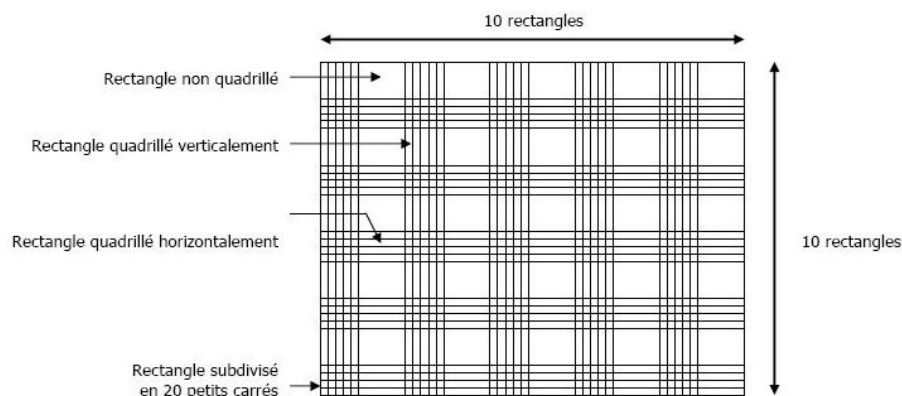
4. Numération des suspensions cellulaires :

L'hématimètre de Malassez se compose d'une lame de verre gravée avec $10 \times 10 = 100$ carrés, sur laquelle est collée une lamelle spéciale optiquement plane délimitant précisément un volume de 1 mm^3 .

- **Préparation de la lame** : Laver la lame et la lamelle à l'eau, puis les nettoyer à l'alcool. Sécher soigneusement les deux bordures à l'aide d'un mouchoir en papier. Humecter de salive le support. Déposer la lamelle et appuyer sur les deux bords pour faire apparaître des franges d'interférences irisées, délimitant la profondeur de la lame. La lame est alors prête à l'emploi.
- **Dilution** : L'hématimètre de Malassez est utilisé pour compter des suspensions cellulaires ayant une densité minimum de 10^5 /ml et maximum de 10^7 /ml. Il est donc recommandé de diluer convenablement les échantillons à dénombrer.
 - On reprend les cellules de rate et de thymus dans 5 ml de milieu.
 - Diluer cet échantillon au 1/20 pour la numération cellulaire.
- **Rappel** :

La cellule de Malassez Elle est constituée de 10 bandes verticales de 0,25 mm de large et de 10 bandes horizontales de 0,2 mm de large. On obtient dès lors 100 rectangles. La profondeur entre la lame et la lamelle est de 0,2 mm.

Le volume de la cellule est de 1 mm^3 soit $1 \mu\text{L}$. Chaque rectangle représente $0,01 \text{ mm}^3$.



- **Calcul** :

Compter au moins 100 cellules sur un nombre entier de grands carreaux. Supposons que vous ayez compté 124 cellules sur 3 grands carrés.

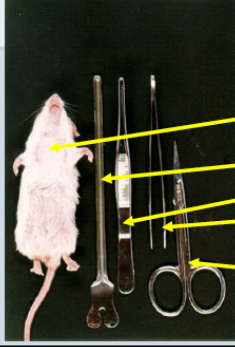
Pour une dilution au 1/2 :

Nombre de cellules/ml = $(124/3) \times 100 \times 2 \times 1000 = 8,3 \times 10^6$ /ml

La dissection se déroulera en plusieurs étapes:

1

Le matériel nécessaire :

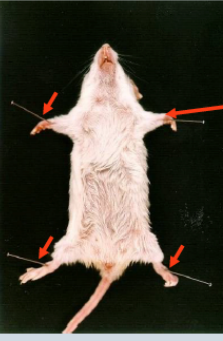


Dans l'ordre de gauche à droite :

- ✕ Une souris mâle ou femelle.
- ✕ Une sonde cannelée
- ✕ Une paire de pinces fines
- ✕ Une paire de ciseaux
- ✕ **Et des aiguilles !**

2


1ère étape : Enlever la peau (1/6).



- ↓ **Allongez** la souris sur le dos.
- ↓ **Fixez** la souris sur la cuvette à dissection en l'épinglant dans les quatre pattes.

3

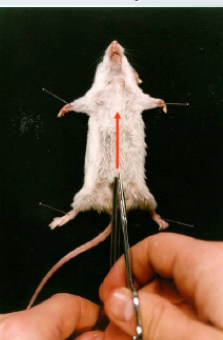
1ère étape : Enlever la peau (2/6).



- **Créez** une boutonnière en coupant la peau au dessus de l'orifice urinaire.

4

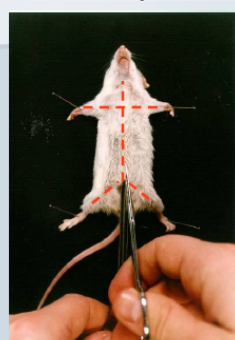
1ère étape : Enlever la peau (3/6).



- **Insérez** la sonde cannelée dans la boutonnière et faites la remonter sous la peau jusqu'au sternum.
- Puis **découpez** la peau.

5


1ère étape : Enlever la peau (4/6).



- De la même manière avec la sonde cannelée et les ciseaux, **Découper** la peau en suivant les pointillés !

6

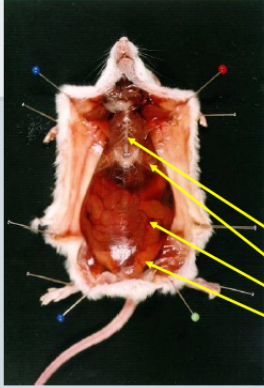
1ère étape : Enlever la peau (5/6).



- **Ecartez** la peau en la décollant doucement à l'aide des Pincettes.

7

1ère étape : Enlever la peau (6/6).

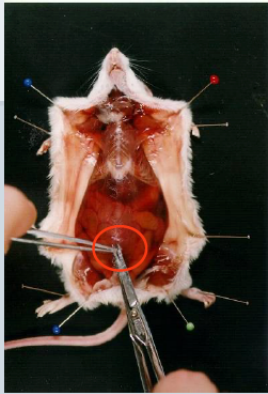


- **Épinglez** la peau.
- On commence à Voir des organes !

Le Sternum
Les Côtes
Les intestins
Les organes génitaux

8

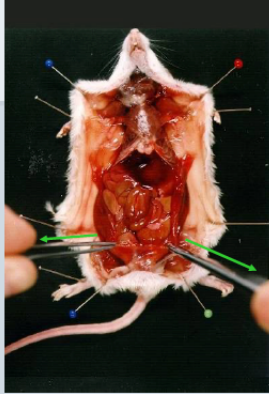
2ème étape : Accéder aux organes (1/6).



- **Réalisez** une boutonnière dans la « membrane » transparente abdominale.

9

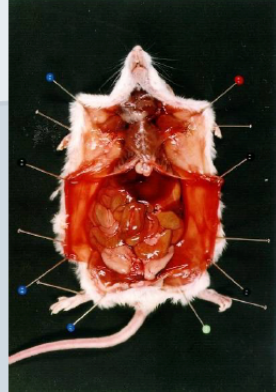
2ème étape : Accéder aux organes (2/6).



- **Enlevez** la membrane et **rabattez-la** sur les côtés.

10

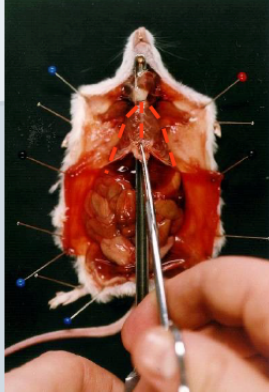
2ème étape : Accéder aux organes (3/6).



- **Épinglez** la membrane.

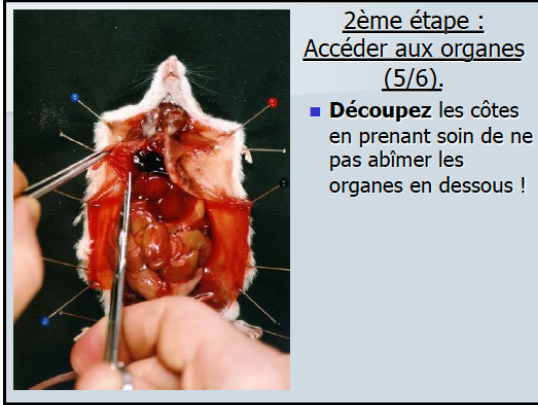
11

2ème étape : Accéder aux organes (4/6).

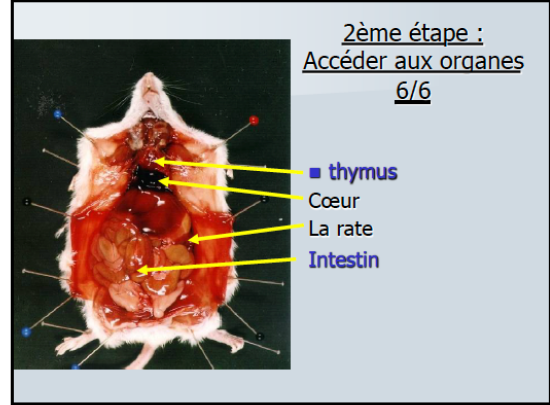


- **Découpez** la cage thoracique en suivant les pointillés.
- ⚠ **Aidez-vous** de la sonde cannelée !

12



13



14