

Culture cellulaire.....CONSERVATION DES LIGNEES CELLULAIRES 3.1) Conservation par le froid Les cellules peuvent être conservées en azote liquide (-196 °C) pendant de longues périodes, à condition d'avoir été correctement congelées et dans une solution cryoprotectrice appropriée (le DMSO)

3.2) Conservation sur milieu pauvre : c'est une conservation de courte durée (10 à 20 jours) réalisée sur des milieux pauvres en sérum et/ou en baissant la température de la culture à 20 °C. 16 METHODO EXPE IMMUNO (M2) 4.4) – Les milieux de culture On distingue 2 principaux types de milieux de culture :

- a) les milieux semi-synthétiques : composés d'un milieu de base (sels minéraux, glucose, acides aminés, vitamines) tel que (BME : Eagle's Basal Medium, MEM : Eagle's Minimum Essential Medium, DMEM : Dulbecco Modified Eagle's Medium et le RPMI) et du sérum (à 10%) ?le sérum : le plus utilisé est le sérum de veau fœtal (SVF) il optimise la survie et la croissance cellulaire en apportant les facteurs suivants : facteurs de croissance (FGF, les NGF, IGF, EGF les PDGF), protéines d'adhésion, protéines de transport, oligo-éléments.
- oLe repiquage ou passage : Il s'agit cette fois de changer le milieu et le contenant, en transférant les cellules confluentes dans un contenant plus grand : d'abord élimination de l'ancien milieu par aspiration, lavage des cellules au PBS, décollement des cellules par trypsine-EDTA o ajout de milieu complet avec SVF : permet de remettre les cellules en suspension ; o numération cellulaire : via le test de viabilité cellulaire (utilisant le bleu de trypan) afin de déterminer la concentration cellulaire et d'ajouter une quantité définie de cellules dans un volume défini de milieu, sur une surface définie. De repiquage en repiquage, les monocouches cellulaires sont lavées avec un tampon PBS puis traitées par une solution de trypsine- EDTA afin de rompre les liaisons protéiques intercellulaires et obtenir une suspension prête à être ensemencées sur des milieux nutritifs neufs et avec une densité moindre

a- Lignées cellulaires : \* les lignées finies : qui se prolifèrent pendant un certain nombre de passages puis cessent de se diviser. Généralement, le tissu primaire est découpé en fragments de 1 à 4 mm puis incorporés dans un flacon de culture contenant le milieu nutritif et après quelques jours, on observe une migration cellulaire à partir des différents fragments tissulaires puis une prolifération de ces dernières. (Fig 2) Pour les tissus mous (thymus, rate,..), la méthode mécanique est la plus adoptée elle est effectuée par dilacération des tissus primaires à l'aide d'une pipette ou encore par frottement du tissu sur une grille. Le mode d'obtention de ces cellules répond à deux méthodes principales citant la mécanique et l'enzymatique

Methodes d'obtention des cellules ?Méthode de dissection mécanique (méthode d'explant): c'est la plus ancienne, elle englobe différents protocoles (La méthode de Carrel, La méthode de Jensen et La méthode de dissection sensu stricto) , ayant comme principe la migration des cellules à partir d'un explant (fragment).

4.3) Equipement de la salle de culture : l'élaboration de cultures cellulaires nécessite le matériel suivant : (Fig 4) a) Une hotte à flux laminaire : 14 METHODO EXPE IMMUNO (M2) stériles en générant un flux d'air purifié via un filtre HEPA (High Efficiency Particulate Air), afin d'éviter toute contamination de l'environnement, de l'utilisateur et/ou de la manipulation. 11 METHODO EXPE IMMUNO (M2) Fig 1(A) : Culture stationnaire Fig 1(B) : Culture en suspension

2.3)– le stade de culture selon ce critère il existe trois principaux types de cultures :

- a- Cultures primaires ou primoculture : c'est l'inoculation aseptique de cellules provenant directement d'un organe ou d'un tissu.\* les lignées continues : Ces lignées prolifèrent sans arrêt, et sont donc immortelles ; car elles ont perdu quelques maillons du contrôle du cycle cellulaire \* les lignées transformées :

Certaines lignées continues peuvent perdre leur propriété d'adhérence et sont capables de donner des tumeurs lorsqu'elles sont injectées chez un animal. Elle consiste à utiliser des enzymes protéolytiques telles que la trypsine, la collagenase, la hyaluronidase pour digérer la trame protéique et permettant ainsi la libération des cellules. Il en résulte une suspension de 12 METHODO EXPE IMMUNO (M2) cellules individuelles prêtes à être mises en primoculture.

**EVOLUTION D'UNE CULTURE CELLULAIRE (la Courbe de croissance)** Elle est caractérisée par 3 temps : –La phase d'adaptation : c'est la phase de latence pendant laquelle la vitesse de croissance est nulle –La phase exponentielle : correspond à une phase mitotique où le taux de croissance augmente jusqu'à devenir constant.

**APPLICATIONS DE LA CULTURE DES CELLULES ANIMALES** physiologiques (recherche fondamentale ou appliquée) à Test de cytotoxicité en pharmacologie ou cosmétologie par exemple interférons, interleukines, facteurs de croissance, anticorps monoclonaux ... appliquée) à Chirurgie réparatrice (peau, muscle, foie, vaisseaux sanguins, ....)

**INTRODUCTION :** Une culture de cellules est un bioprocédé permettant de maintenir en dehors de l'organisme et dans des conditions physiologiques artificielles, des cellules non organisées en tissu mais 10 METHODO EXPE IMMUNO (M2) capable de se proliférer in vitro.

Fig 1(A, B) a– Culture en monocouche ou stationnaire : dans ce type, les cellules se divisent jusqu'à former un tapis qui recouvre l'ensemble de la surface du support, ce stade est appelé confluence. b– Culture en suspension : elle est réalisée le plus souvent dans des flacons à agitation permanente afin d'éviter la décantation des cellules tels que : les flacons spinner (rotation magnétique) et les cytotraceurs.

**L'Équilibre du pH:** Le pH du milieu et le pH intracellulaire sont des paramètres clés contrôlant le bon fonctionnement métabolique, toute variation ou déséquilibre de ces derniers peut engendrer de graves conséquences sur le développement et la survie cellulaires. L'ajout de ces substances varie en fonction des exigences du type cellulaire et de l'objectif de la culture, on retrouve des hormones, facteurs de croissance, facteurs d'attachement, Antioxydants, les substances lipidiques et protéines de transport 5.

**NB:** Il est important d'adapter la concentration des enzymes à la nature du tissu traité afin d'assurer une meilleure dissociation sans anomalies cellulaires ( trypsine : 1 g de tissu pour 10 mL de solution).

**TYPES DE CULTURES CELLULAIRES** Ils sont classés selon plusieurs critères : 2.1) la morphologie cellulaire : Histologiquement on distingue : les cellules épithéliales, les cellules lymphoblastiques et les cellules .fibroblastiques. C : flacons. 1.2. ?4.7