

Culture cellulaire.....CONSERVATION DES LIGNEES CELLULAIRES

3.1) Conservation par le froid Les cellules peuvent etre conservees en azote liquide (-196°C) pendant de longues periodes, a condition d'avoir ete correctement congelees et dans une solution cryoprotectrice appropriee (le DMSO)

3.2) Conservation sur milieu pauvre : c'est une conservation de courte duree (10 a 20 jours) realisee sur des milieux pauvre en serum et/ou en baissant la temperature de la culture a 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-synthetiques : composes d'un milieu de base (sels minéraux, glucose, acides amines, 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 serum (a 10%)

le serum : le plus utilise est le serum de veau foetal (SVF) il optimise la survie et la croissance cellulaire en apportant les facteurs suivant : facteurs de croissance (FGF, les NGF, IGF, EGF les PDGF), proteines d'adhesion, proteines de transport, oligo-elements.

Le repiquage ou passage : Il s'agit cette fois de changer le milieu et le contenant, en transferant les cellules confluentes dans un contenant plus grand : d'abord elimination de l'ancien milieu par aspiration, lavage des cellules au PBS, decollement des cellules par trypsine-EDTA o ajout de milieu complet avec SVF : permet de remettre les cellules en suspension ; o numeration cellulaire : via le test de viabilite cellulaire (utilisant le bleu de trypan) afin de determiner la concentration cellulaire et d'ajouter une quantite definie de cellules dans un volume defini de milieu, sur une surface definie.

De repiquage en repiquage, les monocouches cellulaires sont lavees avec un tampon PBS puis traitees par une solution de trypsine- EDTA afin de rompre les liaisons proteiques intercellulaires et obtenir une suspension prete a etre ensemencees sur des milieux nutritifs neufs et avec une densite moindre

a- Lignes cellulaires :

- * les lignes finies : qui se proliferent pendant un certains nombres de passages puis cessent de se diviser. Generalement, le tissu primaire est decoupe en fragments de 1 a 4 mm puis incorpores dans un flacon de culture contenant le milieu nutritif et apres jours, on observe une migration cellulaire a partir des differents fragments tissulaires puis une proliferation de ces dernieres. (Fig 2)
- Pour les tissus mous (thymus, rate,...), la methode mecanique est la plus adoptee elle effectuee par dilaceration des tissus primaires a l'aide d'une pipette ou encore par frottement du tissu sur une grille. Le mode d'obtention de ces cellules repond a deux methodes principales citant la mecanique et l'enzymatique

Methodes d'obtention des cellules

- ? Methode de dissection mecanique (methode d'explant): c'est la plus ancienne, elle englobe differents protocoles (La methode de Carrel, La methode de Jensen et La methode de dissection sensu stricto) , ayant comme principe la migration des cellules a partir d'un explant (fragment).

4.3) Equipement de la salle de culture :

l'elaboration de cultures cellulaires necessite le materiel suivant : (Fig 4)

a) Une hotte a flux laminaire : 14 METHODO EXPE IMMUNO (M2) steriles en generant un flux d'air purifie via un filtre HEPA (High Efficiency Particulate Air), afin d'eviter 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 critere 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 lignes continues : Ces lignes proliferent sans arret, et sont donc immortelles ; car elles ont perdu quelques maillons du controle du cycle cellulaire
- * les lignes transformees :

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.