

## Repiquage d'une lignée cellulaire

Le repiquage est comme le changement de milieu, une opération à pratiquer régulièrement pour entretenir une culture cellulaire in vitro.

La plupart des cellules cultivées in vitro adhèrent au support qui leur est fourni. Quand on met en culture des cellules adhérentes cultivant en monocouche, elles prolifèrent jusqu'à former un tapis unicellulaire confluent, moment où leur multiplication s'arrête. Pour maintenir la culture, il faut procéder au repiquage des cellules, c'est à dire leur transfert dans y de nouveaux récipients et dans du milieu neuf, à une densité cellulaire inférieure à celle de la confluence.

### **1. Problème posé par le repiquage**

#### 1) Trypsination

Les cellules cultivées in vitro adhèrent au support et adhèrent entre elles grâce à la matrice extracellulaire. Le repiquage des cellules nécessite leur décollage du support et leur séparation les unes des autres, ce qui est obtenu par action d'une enzyme protéolytique, la trypsine. Son action est inhibée par les ions calcium et par le sérum de veau fœtal (SVF).

Conséquences:

- avant de faire agir la trypsine, toute trace de calcium et de SVF doit être éliminée: étape du lavage du tapis cellulaire
- une fois que l'enzyme a individualisé les cellules, il faut que l'action de la trypsine soit arrêtée par addition de SVF avant que les cellules ne soient abîmées. Il faut donc contrôler l'action de la trypsine en stoppant son activité dès que le tapis cellulaire s'est individualisé du support.

#### 2) Numération

Le repiquage des cellules dans le milieu neuf doit se faire à une densité inférieure à celle de la confluence. Connaissant la surface de la boîte et la quantité de cellules à repiquer pour obtenir une croissance optimale, il faut après trypsination dénombrer les cellules vivantes et mortes pour déterminer avec précision le volume de suspension cellulaire à introduire dans une nouvelle boîte de culture (lors d'un repiquage de routine, l'étape de numération devient souvent inutile).

#### 3) Préparation du milieu de culture

Les cellules sont cultivées en milieu DMEM. Ce milieu doit être complété au moment de l'emploi de la manière suivant:

produit à ajouter	concentration initiale	concentration finale	volume à ajouter pour 500ml
SVF		5% (5 à 10%)	
Antibiotique (pénicilline + streptomycine)	Pénicilline: 10 000U/ml Streptomycine: 10 000µg/ml	20 U/ml 300 mg/L	
glutamine (accessoire pour DMEM)	200 mmol/L	300mg/mL (M <sub>glutamine</sub> = 146g/mol)	

Calculer les volumes de SVF, d'antibiotiques et de glutamine à ajouter pour obtenir les concentrations voulues.

### **2. Protocole du repiquage d'une lignée cellulaire**

Toutes ces opérations auront lieu sous hotte à flux laminaire, mise à part la numération, en respectant les conditions de « bonnes » manipulations.

#### 1) Observation des cellules au microscope inversé

- Observer l'aspect des cellules au microscope inversé.

- Distinguer cellules mortes et cellules vivantes.
- Vérifier que le tapis cellulaire est uniforme et confluent.
- Noter la couleur du milieu.

#### 2) Lavage du tapis cellulaire

- Éliminer le milieu par retournement (ou par tout autre moyen respectant les règles d'asepsie).
- Laver le tapis cellulaire en introduisant 5mL de PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  (ou 2mL de trypsine 0,25% + EDTA pour les cellules difficiles à décoller).
- Agiter doucement la boîte pendant 30sec et éliminer tout le liquide à l'aide d'une pipette Pasteur.

#### 3) Trypsination

- Introduire 1,5 à 2mL de trypsine 0,25% + EDTA.
- Bien répartir sur tout le tapis cellulaire.
- Laisser agir à l'étuve.
- Examiner la bouteille toutes les 1 à 2 minutes à l'œil nu et au microscope inversé pour surveiller le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules qui deviennent rondes.
- Si besoin, aider le décollement en tapant sur la boîte.
- Dès que décollement et individualisation se sont produits, arrêter l'action de la trypsine.

#### 4) Arrêt de la trypsination

- Introduire 3mL de milieu de culture complété (l'action de la trypsine est stoppée par le SVF).
- Disperser soigneusement les cellules par aspiration et refoulement à la pipette.
- A chaque refoulement, envoyer le liquide sur le fond de la bouteille pour finir le décollement des cellules.

#### 5) Numération

- Prélever 0,4mL de suspension cellulaire dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération en présence de 0,1mL de bleu Trypan (concentration finale: 0,2%) en cellule de Malassez.

#### 6) Mise en culture dans de nouvelles boîtes

- Calculer le volume de suspension cellulaire et le volume de milieu à introduire dans chaque bouteille de sorte que les cellules en culture sont placées à une densité finale d'environ  $4 \cdot 10^4$  cellules par cm de surface (bouteille de 25cm<sup>2</sup> de surface contenant 10 ml de milieu).
- Ajouter du milieu de culture complété à qsp 10 mL.
- Placer les bouteilles à l'étuve à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Dévisser d'un quart de tour les bouchons.

#### 7) Entretien

- Tous les 2 jours, observer le milieu de culture et les cellules.
- Repiquer lorsque les cellules sont à confluence.
- Adapter le taux de repiquage en fonction de la vitesse de croissance de la lignée observée.
- Ne plus effectuer de numération lors d'un repiquage de routine.

### **3. Compte rendu**

- 1) Descriptions des observations microscopiques avant et après trypsination
- 2) Particularité du protocole expérimental: milieu utilisé, trypsination...
- 3) Résultat de la numération. Calcul du % de viabilité. Calcul des volumes de suspension cellulaire et de milieu introduit dans chaque nouvelle bouteille.
- 4) Dénombrement du nombre de cellules constituant le tapis cellulaire. A partir d'une boîte initiale, combien de nouvelles boîtes auraient pu être réalisées?
- 5) Analyse et observation du repiquage après 1, 2 et 3 jours de culture.