

TP contrôle Biologie cellulaire et moléculaire

Étude de la prolifération d'une lignée cellulaire en présence de différentes concentrations de SVF

L'entretien de lignée cellulaire rend obligatoire l'ajout au milieu de culture de facteurs de croissance qui assurent le bon déroulement du cycle cellulaire. Ces facteurs de croissance sont essentiellement apportés par du sérum de veau fœtal. Au cours de ce travail, on se propose de vérifier le rôle du SVF. Des cellules d'une lignée cellulaire PC12 vont êtreensemencés en densité cellulaire variable et dans du milieu de culture contenant différentes quantités de sérum de veau fœtal (SVF) Ce milieu de culture contient des antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

1. Matériel et réactifs :

Au poste de travail :

- un flacon contenant une culture confluente de cellules épithéliales PC 12, en milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal
- un hématimètre de Malassez avec une lamelle plane
- un tube à hémolyse contenant du bleu Trypan à 0,4 %
- un tube à hémolyse vide
- pipettes automatique P100, P1000

Au laboratoire de biologie :

- un microscope inversé
- une étuve à CO₂ à 37°C
- un dispositif de lavage des mains
- un flacon d'alcool et du papier absorbant
- des blouses stériles

Sous là hôte à flux laminaire :

- un flacon contenant du tampon PBS stérile sans calcium
- un flacon contenant du milieu DMEM + 10% SVF stériles
- un flacon contenant du milieu DMEM sans SVF
- un tube à hémolyse contenant une solution de trypsine à 0,25% stérile
- un tube à hémolyse stérile vide
- une microplaque à fond en U (24 puits)
- 2 tubes à essais stériles
- pipettes stériles de 10mL, 5mL et 2mL
- récipient pour pipettes et réactifs contaminés

2. Mode opératoire :

2.1. Observation microscopique

Observer les cellules en culture au microscope inversé.

2.2. Trypsination - Ensemencement (25 minutes)

Éliminer le milieu de culture par aspiration.

Réaliser le lavage du tapis cellulaire avec 2ml de tampon PBS sans calcium.

Introduire 2mL de trypsine.

Laisser agir quelques minutes à 37°C en surveillant son action à l'œil nu ou au microscope inversé.

Ajouter 5mL de milieu complet.

Prélever un aliquote de la suspension cellulaire dans un tube à hémolyse stérile qui servira à la numération cellulaire au poste de travail.

2.3. Numération cellulaire au poste de travail

Réaliser une numération de la suspension après dilution au 1/2 dans du bleu Trypan.

Présenter un champ microscopique et la numération d'une ligne à un examinateur.

Calculer le volume de suspension cellulaire à prélever de sorte que vous prélèverez 25 000 cellules.

2.4. Ensemencement de la microplaque

Introduire dans tous les puits de la première ligne le volume V de suspension cellulaire préalablement calculé.

Pour la première moitié d'entre eux, ajouter 200µL de milieu DMEM sans SVF, pour la seconde moitié, compléter avec 200µL de DMEM+10% SVF.

Incuber 24 heures à 37°C dans une étuve à CO₂

3. Compte rendu

1. Descriptions des observations microscopiques avant et après trypsination.
2. Résultat de la numération. Viabilité.
3. Calcul des volumes de suspension cellulaire à introduire dans les puits.
4. Analyse et observation des puits après 1 jour de culture : indiquer ce que vous pensez obtenir après 24 h d'incubation.