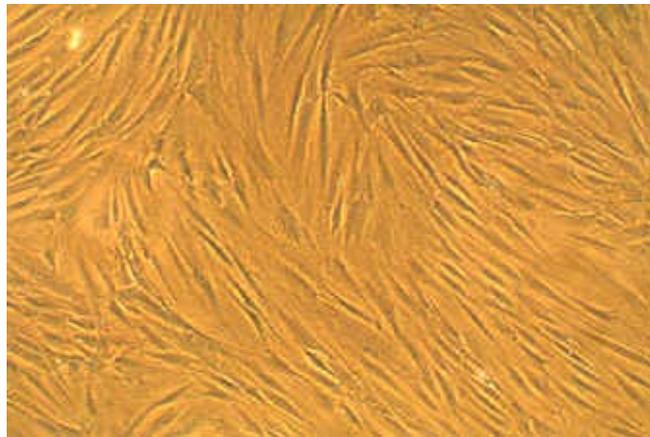


Miles MALLET Vanessa
DEMAY Fanny

Compte-rendu de Culture Cellulaire.

Mme LOUSTALOT.
Lycée St Louis.



Licence Professionnelle en Biotechnologies,
Techniques et Applications en Biologie Cellulaire et
Moléculaire.
2006-2007

INTRODUCTION.

La culture cellulaire est définie comme l'ensemble des techniques de laboratoires permettant la croissance et la multiplication des cellules en dehors de leur organisme d'origine.

Lors de ces travaux pratiques nous allons travailler sur deux types de cellules : les fibroblastes et des villosités chorales. Nous allons effectuer différents tests sur chaque souche qui nous permettront d'une part d'établir la "fiche d'identité" des souches. D'autre part nous allons effectuer un test de cytotoxicité. Enfin nous travaillerons à partir d'un tissu, appelé "explant", afin de mettre en place une culture de cellules donnant lieu à une lignée cellulaire primaire.

Ainsi nous aurons vue l'ensemble des techniques de base de la culture cellulaire.

SOMMAIRE.

Introduction.	p.2
1. <u>Présentation des conditions de travail.</u>	p.4
•Contexte.	p.4
•Matériel, Cellules et Milieux.	p.4
2. <u>Fiche d'identité de la souche de cellules.</u>	p.5
•Courbe de croissance.	p.5
•Efficacité de clonage.	p.8
3. <u>Mise en place d'une culture cellulaire primaire = Explant.</u>	p.10
4. <u>Test de cytotoxicité.</u>	p.12
Conclusion.	p.15
Annexe.	P.16



1. Présentation des conditions de travail.

•Contexte.

Durant ces travaux pratiques (T.P.) nous manipulons du matériel biologique de risque niveau 2, il faut donc travailler avec des gants, une blouse, dans une pièce stérile avec un sas et sous hotte à flux laminaire.

•Matériel, Cellules et Milieux.

Lors de ces T.P. nous travaillons avec le matériel courant de la culture cellulaire comme les pipettes automatiques, les boîtes de Pétri, les lames, les microscopes optiques normaux et les microscopes optiques inversés,... et entre autre une étuve à 37°C et 5% CO₂ pour permettre la croissance des cellules.

On utilisera deux sortes de milieux sur les deux types de cellules afin d'effectuer des comparaisons entre les différents résultats:

→R.P.M.I. qui est un milieu riche en oligoéléments, en acides aminés et vitamines nécessaires au bon développement des cellules (groupes A1, B1, A2, D2). Cf. annexe

→Chang D qui est issue d'un brevet américain; c'est un milieu très riche mais dont la composition exhaustive n'est pas connue et très cher, qui accélère notamment le cycle cellulaire (groupes C1, D1, B2, C2).

Pour la préparation de ces milieux on rajoutera 20 mL de Sérum de Veau Foetal (qui apporte notamment des facteurs de croissance et des hormones) + 0,9 mL d'antibiotiques (streptomycine+penicilline) + 0,1 mL d'antifongiques (fongizone et amphotéricine).

On ne rajoute pas de S.V.F. dans le milieu Chang D car c'est déjà un milieu très riche.

Les antibiotiques et antifongiques sont nécessaires afin de limiter les contaminations.

Les cellules utilisées sont :

-Des Fibroblastes (F) : cellules jeunes du tissu conjonctif qui élabore la matrice avant de se transformer en fibrocyte. Responsable de l'élaboration de l'élastine et du collagène, composants du tissu conjonctif.

-Des Villosités Chorales (V.C.) : petites excroissances se développant sur l'enveloppe de l'embryon et qui constituent le futur placenta. Le chorion est l'enveloppe externe de l'embryon.

Ce sont donc des tissus d'origines Humains: attention aux risques biologiques.

La classe de 15 personnes sera divisée en deux groupes de 8 et 7 personnes. Les deux groupes se partageant les deux types de cellules et les deux sortes de milieux.

Nous serons le groupe A1.

2. Fiche d'identité de la souche cellulaire.

Pour ce premier type de test nous travaillons sur une souche de Villosités Chorales développées en milieu R.P.M.I.

Le but de cette "fiche d'identité" est de mettre en évidence les caractéristiques spécifiques de la souche cellulaire. Elle consiste en plusieurs paramètres:

- la courbe de croissance qui permet de mettre en culture des cellules et d'observer leur expansion,
- l'efficacité de clonage qui permet de déterminer un seuil minimal de concentration cellulaire nécessaire au démarrage d'une culture.

.Courbe de croissance.

PROTOCOLE

Jour 0 (06/11/06):

Observation au microscope de la culture mère.

on vérifie que les cellules sont à confluence

Elimination du milieu

on n'oublie pas que les cellules sont adhérentes

Rincer avec 5mL du tampon P.B.S.

Eliminer le P.B.S.

on élimine le reste de l'ancien milieu

Ajouter 5mL de Trypsine

protéase qui agit sur les fonctions d'adhésion des cellules et qui les décolle du support, les cellules sont alors remises en suspension

Ajouter 1mL de S.V.F.

le S.V.F. arrête l'action de la Trypsine (car il contient une protéine α antitrypsine)

Préparer une cellule de Malassez

on dénombre la population mère afin de déterminer combien il faudra prélever de cette solution afin d'inoculer les 4 boîtes filles

Dilution au 1/2 de la culture mère

Inoculation de 4 boîtes de Pétri avec $\approx 3.10^5$ cell/boîte

on inocule avec le volume déterminé lors du dénombrement ci-dessus

Ajouter 5mL de milieu R.P.M.I

pour permettre la croissance cellulaire

Incubation à l'étuve

37°C, 5% de CO²

Ces 4 boîtes nous permettront d'avoir 4 points de dénombrement de la population cellulaire au cours du temps afin d'établir une courbe de croissance.

J+1 (07/11/06):

Observation au microscope des cultures filles
Selction d'une boîte parmi les 4
Elimination du milieu
Rincer avec 5mL du tampon P.B.S.
Eliminer le P.B.S.
Ajouter 5mL de Trypsine
Dénombrement en cellule de Malassez

J+2 (08/11/06):

On précède de la même manière qu'en J1 pour déterminer un dénombrement en J2, J3 (09/11/06) et J5 (14/11/06).

D'autre part on doit changer le milieu des 2 dernières boîtes:

Elimination du milieu
Rincer avec 5mL du tampon P.B.S.
Eliminer le P.B.S.
Ajouter 5mL de milieu R.P.M.I
Incubation à l'étuve

J+4 (13/11/06):

On précède comme en J2 pour changer à nouveau le milieu de culture de la dernière boîte.

RESULTATS

Suite au dénombrement de la culture mère , on a compté 117 cellules dans toute la cellule de Malassez (c'est-à dire 1 μ L) pour la dilution au 1/2. On obtient donc:

$N = (117/10^{-3}) \times 2 \times 6 = 1,40.10^6$ cellules au total dans la boîte mère.

(Les 6mL correspondant au volume total dans lequel on a fait le dénombrement, 5mL de Trypsine + 1mL de S.V.F.)

Or on veut inoculer 4 boîtes avec $\approx 3.10^5$ cell/bt.

On inocule donc 1,2mL de la population mère dans chacune des 4 boîtes, ce qui représente 2,80.10⁵ cell/bt.

Tableau récapitulatif des dénombrements:

<i>Jours de culture</i>	<i>Nombre de cellules par boîte</i>
J0	1,40.10 ⁶
J1	1,98.10 ⁵
J2	2,85.10 ⁵
J3	2,30.10 ⁵
J5	1,83.10 ⁵
Effectif cumulé	2,30.10 ⁶

Courbe de croissance de A1:

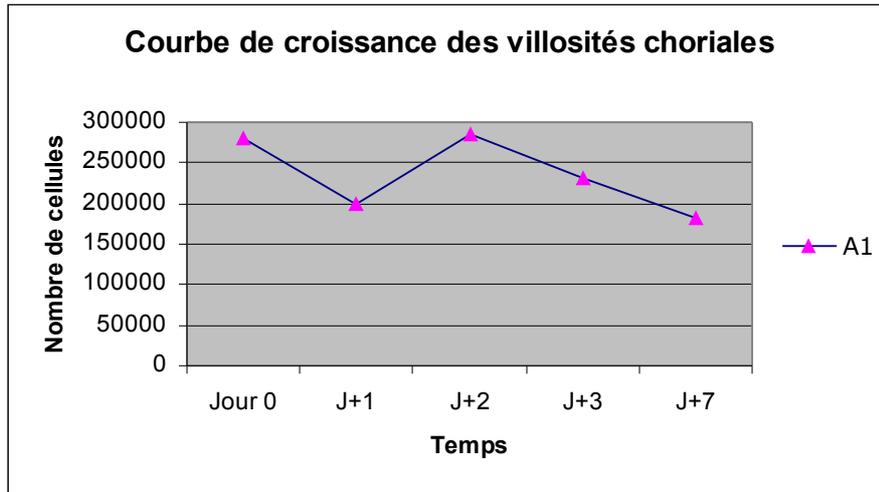
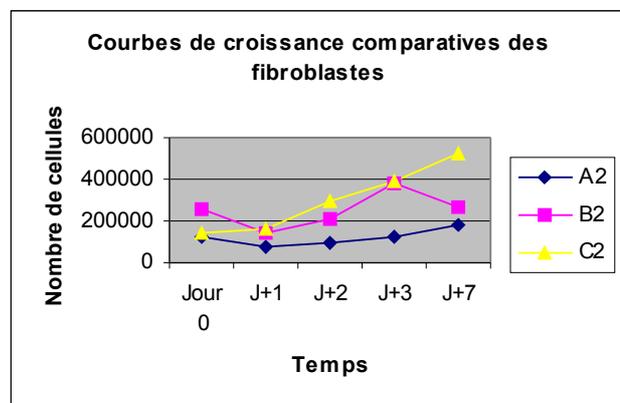
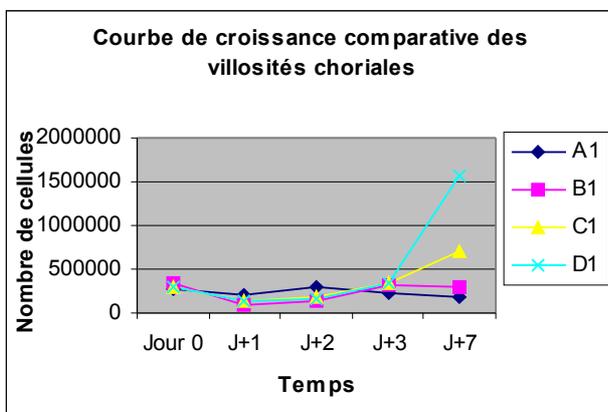


Tableau comparatif des résultats de la courbe de croissance dans le groupe:

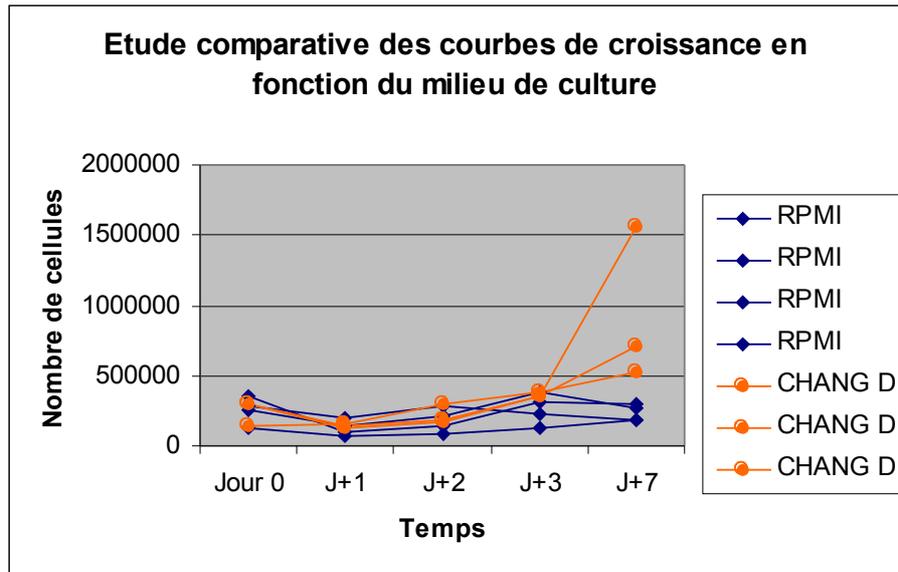
	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2
Jour 0	280800	350000	300000	300000	125000	256000	142000	/
J+1	198000	93000	144000	126000	72000	141000	162000	/
J+2	285000	138000	180000	165000	92000	213000	300000	/
J+3	230000	315000	351000	350000	128000	381000	390000	/
J+7	183000	294000	705000	1566000	180000	270000	528000	/

- Groupes ayant utilisé le milieu RPMI
- Groupes ayant utilisé les Villosités choriales.
- Groupes ayant utilisé le milieu CHANG D
- Groupes ayant utilisé les fibroblastes.

Etude comparative pour chaque type de cellule:



Etude comparative pour chaque milieu de culture:



Analyse:

On note qu'avec A1 et B1, on a une population qui diminue avec le milieu de culture RPMI, tout comme B2.

On pense que les cellules ont souffert du milieu durant le week end = 4 jours sans changer de milieu. Les cellules souffrent d'autant plus que la concentration était importante.

Par comparaison, on peut montrer que pour A2, les cellules ont moins souffert puisque la concentration était moindre au départ. Avec une population cellulaire élevée, le milieu de culture s'est épuisé plus vite (donc si l'on a moins de cellules, le milieu de culture dure plus longtemps).

Avec le milieu CHANG D, on note que la population croît car le milieu est riche, ainsi on observe une bonne croissance cellulaire.

•Efficacité de clonage.

Ici, on cherche à voir la capacité d'une souche à se multiplier. On compare cette propriété sur trois supports différents.

PROTOCOLE

Jour 0 (06/11/06):

A partir de la culture mère de villosités choriales qui nous a servi pour la courbe de croissance:

Inoculation ≈ 6000 cellules dans 3 boîtes différentes

- un flacon de culture cellulaire
- une boîte de pétri "NUNC"
- une boîte de pétri "FALCON"

on inocule avec le volume déterminé lors du dénombrement de la culture mère

Ajouter 5mL de milieu R.P.M.I

pour permettre la croissance cellulaire

Incubation à l'étuve

37°C, 5% de CO²

J+1 (07/11/06):

A J1, J3 et J7, on fait seulement des observations microscopiques.

RESULTATS

Suite au dénombrement de la culture mère, on a compté 117 cellules dans toute la cellule de Malassez (c'est-à-dire 1 μ L) pour la dilution au 1/2. On obtient donc:

$N = (117/10^{-3}) \times 2 \times 6 = 1,40.10^6$ cellules au total dans la boîte mère.

Or on veut inoculer 3 boîtes avec $\approx 6.10^3$ cell/bt.

On inocule donc 30 μ L de la population mère dans chacune des 3 boîtes.

Au bout de 24h on observe:

Présence de cellules au cytoplasme en forme d'étoile caractéristique de la souffrance cellulaire.

Présence de cellules bien rondes, réfringentes et avec un gros noyau = cellules en bonne santé.

On observe une quantité cellulaire plus importante dans le flacon que dans les 2 boîtes.

Au bout de 3 jours, la quantité cellulaire augmente régulièrement mais pas suffisamment pour changer le milieu de culture.

Au bout d'une semaine, on observe:

➤ **un flacon de culture cellulaire:** présence de très rares amas cellulaires, de quelques cellules seules et par endroits un début de tapis cellulaire avec quelques filipodes. On note que les cellules commencent à adhérer et à se multiplier.

➤ **une boîte de pétri "NUNC":** présence de cellules bien dispersées avec beaucoup moins d'amas. On note l'absence d'adhésion cellulaire.

➤ **une boîte de pétri "FALCON":** présence de beaucoup plus de cellules, toujours bien réparties dans la boîte. On note également l'absence d'adhésion cellulaire.

3. Mise en place d'une culture cellulaire primaire = Explant.

Ici on souhaite mettre en place une culture de cellule primaire à partir d'un morceau de tissus, appelé explant (fragment de villosités choriales), afin d'acquérir ultérieurement une lignée cellulaire. On pourra alors observer la prolifération cellulaire, leur multiplication (cellules en mitose) et essayer d'établir un caryotype.

PROTOCOLE

A l'origine nous avons deux souches de V.C. dans deux boîtes différentes : une petite et une grosse où la petite boîte est plus vieille que la grosse boîte.

L'explant est placé comme ci-contre, entre le support en plastique et une lamelle de verre, en milieu R.P.M.I.

Jour 0 (06/11/06):

Observations microscopiques

Elimination du milieu

Ajouter 5mL de milieu R.P.M.I dans la grosse boîte

Ajouter 3mL de milieu R.P.M.I dans la petite boîte

Incubation à l'étuve

J+2 (08/11/06):

Observations microscopiques

Elimination du milieu

Renouvellement du milieu R.P.M.I. en même quantité

Incubation

J+3 (09/11/06):

On ne s'occupe que de la petite boîte, la grosse boîte n'étant pas assez développée.

Elimination du milieu

Rinçage avec 3 mL de P.B.S.

Trypsination avec 1 mL

soulever de temps en temps la lamelle avec une pince stérile pour permettre une meilleure trypsination

Ajout de quelques gouttes de S.V.F.

Transvaser la lamelle, cellules vers le haut, dans une nouvelle boîte

Y rajouter 3 mL de milieu R.P.M.I

Transvaser la suspension cellulaire dans un flacon

Y rajouter 5 mL de milieu R.P.M.I

Incubation

J+7 (13/11/06):

**Observations microscopiques
Renouvellement des milieux en même quantité**

J+8 (14/11/06):

Observations microscopiques

On ne s'occupe que de la grosse boîte sur laquelle on va essayer d'observer des cellules en mitoses pour faire un caryotype.

Elimination du milieu

Trypsination avec 1 mL

Ajout de quelques gouttes de S.V.F.

Transvaser la suspension cellulaire dans la [boîte-lame]

Ajouter 2,5 mL de milieu Chang D

Incubation

RESULTATS

A l'origine l'explant présente peu de filipodes.

Au bout de 2 jours on observe:

- petite boîte: augmentation de la quantité de filipodes, à certains endroits il y a absence de prolifération; création d'un nouveau tapis cellulaire où les cellules s'étalent loin de l'explant.

Observation de cellules en mitose à la périphérie de l'explant et des filipodes.

- grosse boîte: filipodes moins importants que dans la petite boîte mais il y a quand même prolifération cellulaire.

Au bout d'une semaine on observe une contamination fongique dans le flacon où l'on avait repiqué notre lignée cellulaire. On l'élimine donc.

Le jour suivant, on observe aucune culture sur la lamelle issue de la petite boîte de l'explant.

On met en culture la grosse boîte afin d'y observer éventuellement des cellules en mitoses pour y faire un caryotype.

4. Test de Cytotoxicité.

Ce test permet d'étudier la tolérance des cellules vis-à-vis de concentrations croissantes en antibiotiques et/ou en antifongiques.

Ici nous travaillons sur une souche de Fibroblastes contre des antibiotiques (streptomycine+penicilline). On pourra alors observer les différentes étapes de la "souffrance cellulaire" subie par une population cellulaire suite à un traitement antibiotique.

PROTOCOLE

Jour 0 (07/11/06):

Elimination du milieu

Rincer avec 5mL du tampon P.B.S.

Eliminer le P.B.S.

Ajouter 3mL de Trypsine

on peut s'aider d'un râteau et de l'étuve

Ajouter 1mL de S.V.F.

Répartir une lame et 5mL de milieu R.P.M.I. dans chaque compartiment d'une boîte "quadriperm"

Répartir 1 mL de la suspension cellulaire dans chaque compartiment

Ajouter 0mL; 0,5mL; 1mL; 2mL dans chaque compartiment

gamme de concentration en antibiotiques avec un témoin

Incubation à l'étuve

J+1 (08/11/06):

Observations microscopiques

J+2 (09/11/06):

Recueillir le surnageant des différents compartiments

Y effectuer un test de viabilité au Bleu Trypan

dilution au 1/5 du Bleu Trypan c'est-à dire 200µL de cellules dans 50µL de Bleu Trypan

Elimination du milieu des compartiments

Double rinçage avec 5mL de tampon P.B.S.

Coloration des 4 lames en May Grunwald Giemsa

Observations au microscope

RESULTATS

Au bout de 24h nous observons les lames au microscope inversé.

Dans le témoin on note la présence de pas mal de cellules qui commencent à adhérer; il y en a des rondes et des fusiformes.

Dans le second compartiment on observe une quantité plus ou moins semblables de cellules rondes et fusiformes.

Dans le troisième compartiment on observe plus ou moins la même quantité de cellules mais il y a beaucoup moins de cellules rondes.

Enfin dans le dernier compartiment on note beaucoup moins de cellules.

Au bout de 48h on fait un test de viabilité (au Bleu Trypan qui colore les cellules mortes en bleu et les cellules vivantes sont réfringentes) sur les surnagent des lames, on obtient les résultats suivants:

Compartiment	1	2	3	4
Cellules vivantes	27	24	33	13
Cellules mortes	9	14	19	25
Cellules totales	36	38	52	38
% Viabilité	75	63	63	34

% Viabilité = nombre de cellules vivantes / nombre de cellules totales x 100

Tableau comparatif pour les résultats du groupe:

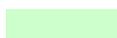
Fibroblastes

ATB ou AFG	A1		B1		C1		D1	
sans	27	9	12	8	11	21	17	5
0,5 ml	24	14	9	6	17	13	21	4
1 ml	33	19	7	4	8	12	8	10
2 ml	13	38	10	6	8	16	6	8

Villosités choriales

ATB ou AFG	A2		B2		C2		D2	
sans	11	2	48	9	18	8	12	16
0,5 ml	14	5	66	34	15	15	14	18
1 ml	8	16	22	36	20	23	11	14
2 ml	4	23	9	48	12	46	9	13

 Cellules blanches = cellules vivantes

 Cellules bleues = cellules mortes

 Addition d'antibiotique

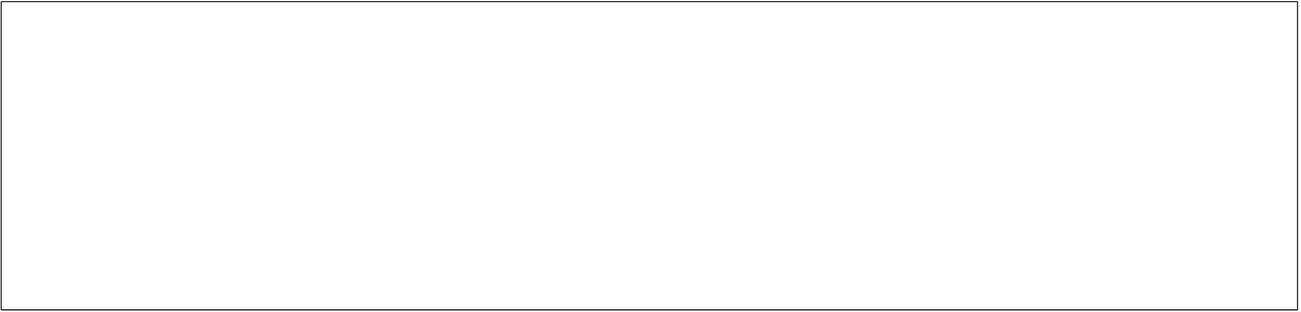
 Addition d'antifongique

L'action cytotoxique d'un antibiotique ou d'un antifongique est spécifique d'un type cellulaire:

- fibroblastes: on observe que les cellules mortes sont lysées au vu du petit nombre de cellules bleues dans le dernier compartiment (plus forte dose d'antibiotique ou antifongique)
- villosités choriales: on observe que les cellules mortes sont toujours présentes au vu du nombre élevé de cellules bleues dans le dernier compartiment.

D'autre part nous observons les lames après coloration au microscope ce qui nous donne:

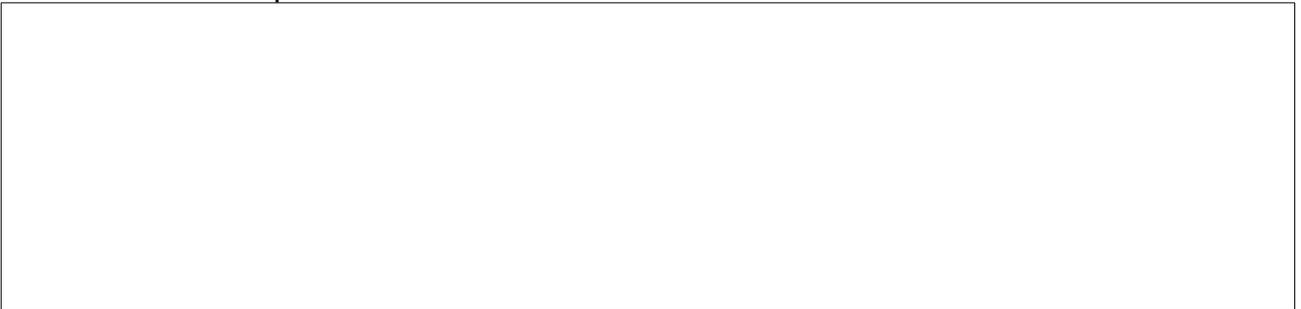
Lame 1: Témoin.



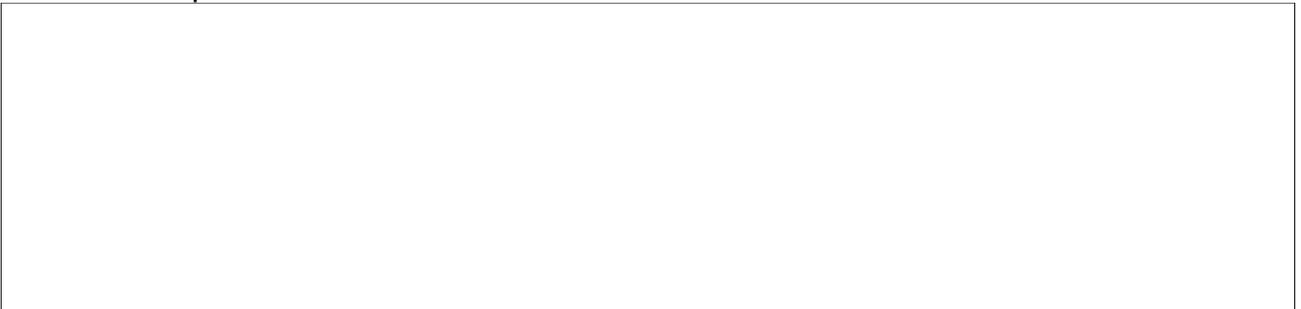
Lame 2: Cellules plus éfilées.



Lame 3: Beaucoup de cellules en forme de faucille.



Lame 4: Cellules filamenteuses. Présence de vacuoles dans le cytoplasme caractéristique de la "souffrance cellulaire".



CONCLUSION.

Cette semaine de travaux pratiques nous a permis d'étudier différents types cellulaires dans diverses conditions. Nous avons observé plusieurs résultats divergents en fonctions des milieux et types cellulaires. Nous avons remarqué que la culture cellulaire est une technique délicate car elle peut subir rapidement des contaminations.

D'autre part c'est aussi une technique très variée dans la mesure où l'on peut travailler sur n'importe quel type de cellules avec beaucoup de milieux existants et donnant de nombreux résultats hétérogènes.

ANNEXE.

◆ Milieu RPMI 1640 :

SELS INORGANIQUES

Ca(NO ₃) ₂	100mg/L
Kcl	400mg/L
MgSO ₄	100mg/L
NaCl	6000mg/L
NaHCO ₃	2000mg/L
NaHPO ₄	800mg/L

AUTRES COMPOSANTS

D Glucose	2000mg/L
Glutathione	1mg/L
Rouge de phénol	5mg/L

ACIDES AMINES

L Arginine	200mg/L	L Lysine + Hcl	20mg/L
L Asparagine	50mg/L	L Methionine	15mg/L
Acide L aspartique	20mg/L	L Phénylalanine	15mg/L
L Cystéine	50mg/L	L Proline	20mg/L
Glycine	10mg/L	L Sérine	30mg/L
L Histidine	15mg/L	L Thréonine	20mg/L
L Hydroxyproline	20mg/L	L Tryptophane	5mg/L
L Isoleucine	50mg/L	L Tyrosine	20mg/L
L Leucine	50mg/L	L Valine	20mg/L

VITAMINES

D Biotine	0.20mg/L	Nicotinamide	3.00mg/L
Pantothénate de calcium	0.25mg/L	Acide para- amino benzoïque	1,00mg/L
Chlorure de choline	3.00mg/L	Pyridoxal Hcl	1,00mg/L
Acide folique	1.00mg/L	Riboflavine	0,20mg/L
Inositol	35.00mg/L	Thiamine Hcl	1,00mg/L
		Vitamine B ₁₂	0.005mg/L

Doit être conservé entre 2 et 8 °C