

Chapitre I : Notion de base d'un laboratoire de culture cellulaire

I. Définition :

La culture cellulaire est une technique de laboratoire permettant de faire **vive in vitro** des cellules, d'en modifier les **propriétés** ou d'augmenter leur **nombre**, permettant ainsi la reproduction des cellules en quantité suffisante afin de pouvoir ensuite s'en servir comme matériel expérimental.

II. Propriétés de culture cellulaire :

a. Avantage:

- Une source continue et homogène des cellules utilisable dans différents domaines
- Peuvent être manipulés très facilement dans des conditions soigneusement contrôlées
- Peuvent être congelés sans que cela affecte leur potentiel multiplicatif ou leur patrimoine génétique
- L'utilisation des cultures cellulaires permet de minimiser le coût des expérimentations
- Elle permet de limiter le nombre des animaux de laboratoire

b. Inconvénient :

- La principale difficulté correspond à sa sensibilité aux contaminations et doit être réalisée dans des conditions stériles.
- Les contaminants (bactéries, levure, champignons) sont introduits par l'atmosphère, la surface de travail, le matériel utilisé et par l'opérateur.
- Pour éviter toute contamination, il est impératif d'établir des règles de conduite

III. Règle de conduite

a. Hygiène personnelle

- Se laver les mains en entrant dans la salle de culture.
- Porter des habits de protection : blouse, gants (ne pas mettre la même blouse pour le labo et la salle de culture).
- Jeter les gants si on a manipulé des cultures contaminées.
- Jeter les gants si le travail en culture est terminé

b. Hygiène et entretien du matériel

- Nettoyer la surface de travail de la hotte à l'éthanol à 70% avant de commencer à travailler.
- Ranger la surface de travail
- Garder un espace "clair" au centre du plan de travail

- En sortant les flacons de l'incubateur, fermer les bouchons le plus rapidement possible.
- Ne mettre sous la hotte que des boîtes de cellules propres (les nettoyer avec du papier absorbant et de l'éthanol à 70%)
- Si vous renversez du milieu ou des cellules, éponger immédiatement et désinfectez avec de l'éthanol à 70% et vérifier à la fin de la manipulation
- En cas de contaminations, changer les plateaux métalliques sur lesquels se trouvent les boîtes de cellules : autoclaver les plateaux sales et utiliser des plateaux stériles (ne jamais poser les boites de Pétri directement sur le plateau de l'incubateur).
- Bien observer les cultures " importées " d'autres laboratoires : elles comportent le risque d'avoir été contaminées soit par le labo d'origine, soit pendant le transport. Ne pas les mélanger avec d'autres cellules.
- Nettoyer l'extérieur des bouteilles à l'éthanol à 70% avant de les poser sous la hotte.
- Etre très attentif si on utilise la même bouteille de milieux pour plusieurs lignées.
- Nettoyer régulièrement hottes, incubateurs, centrifugeuses, réfrigérateurs, microscopes, bain-marie.

IV. Matériel de culture cellulaire

a. **Hotte** : Le meilleur moyen pour travailler stérilement est d'utiliser une hotte à flux laminaire. Le principe physique est d'obtenir une laminarité des filets d'air filtrés, ceux-ci devant s'écouler en filets rectilignes, parallèles, verticaux de même vitesse et même sens.

Hotte de type I : Ce type d'appareil dirige un flux laminaire vertical à travers un filtre absolu. Le manipulateur n'est pas protégé car une partie du flux d'air vertical (20%) sort de l'enceinte à l'avant de la hotte mais 80% sont recyclés (figure 01).

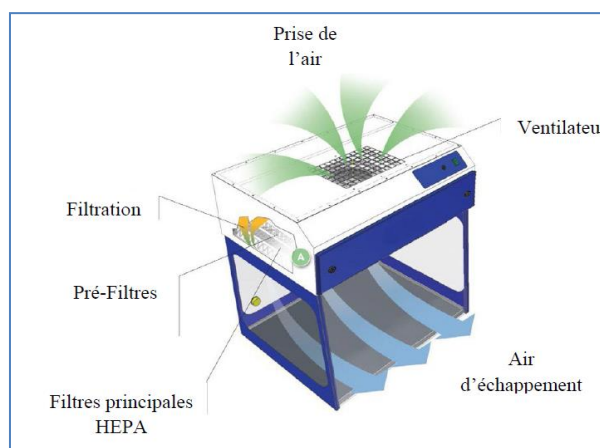


Figure 01 : Hotte de type 1

- **Hotte de type II (poste de sécurité microbiologique (PSM))**

La manipulation, le produit et l'environnement sont parfaitement protégés. Le flux d'air est repris par la base du panneau arrière pour recyclage (70%) et évacuation vers l'extérieur (30%) après passage par un filtre HEPA sur le haut de la hotte. La protection de l'environnement est assurée par un filtre absolu placé sur la sortie en partie haute et celle du manipulateur par un flux d'air entrant en façade avant qui compense celui rejeté à l'extérieur (figure 02)



Figure 02 : Hotte de type 2

b. Incubateur :

Incubateurs à CO₂ à jaquette d'eau et chauffage de porte. Le chauffage de porte permet d'éviter la condensation de la porte interne. La jaquette d'eau étanche permet de minimiser l'évaporation d'eau. L'objectif de cet appareil est de faire croître des cultures cellulaires en régulant les facteurs de croissance: température, humidité et ventilation



Figure 03 : Incubateur

c. **Autres équipements** : Centrifugeuses, Réfrigérateurs, Congélateurs, Microscopes, Bain-marie.

V. Milieux de culture

a. volume

le volume de milieu recommandé est de 0.2 ml / cm² de surface de culture , ce volume est également déterminé par la concentration en O₂ exigée par les cellules :

- Si les cellules exigent une concentration en O₂ élevée, il faut environ 2 mm de milieu sur les cellules
- Si les cellules exigent un taux faible en O₂, on peut aller jusqu'à 5 mm de milieu.

b. Stockage du milieu

Le milieu est stable pendant un an à 4°C et à l'obscurité.

- Si le milieu contient de la glutamine et du sérum, il est stable entre 4 à 6 semaines à 4°C
- Si le milieu est en contact avec les UV, il se dégrade

c. concentration en glutamine

La concentration en glutamine diminue de 50% en 3 à 5 jours à 37°C. La dégradation libère de l'ammoniaque NH₄OH qui est :

- soit cytostatique : ralentissement de la croissance cellulaire jusqu'à 80%.
- soit cytotoxique : problème de viabilité cellulaire.

d. Concentration de glucose

Le glucose est utilisé à une concentration de 1 g/l ou de 4.5 g/l dans la plupart des milieux.

En augmentant la concentration de glucose, on augmente la concentration d'acide lactique d'où une diminution du pH.

En effet, 99% du glucose est métabolisé en acide lactique

e. pH de milieu

Le pH intracellulaire se situe aux alentours de 7.35 à 7.40.

Si le pH augmente :

- diminution de la prolifération vers 7.7,
- arrêt de la croissance vers 8.0 à 8.5
- mort cellulaire vers 8.5 à 9.0.

Si le pH diminue : les cellules sont moins sensibles qu'à une augmentation de pH.

- Les propriétés des cellules ne sont pas affectées de 7.4 à 7.0.
- Ralentissement de la croissance si le pH est inférieur à 7.0
- arrêt de la croissance vers 6.5 puis mort cellulaire vers 6.0.

f. rayon UV :

L'action des rayons UV sur les milieux de culture provoque la formation de radicaux libres par photocatalyse. La présence de radicaux libres dans les milieux de culture entraîne la mort cellulaire (pour les cellules les plus sensibles)

Il faut donc stocker les milieux à l'obscurité et laisser les boîtes de cellules comprenant du milieu de culture le moins longtemps à la lumière

g. Effet de l'oxygène

Il ne faut pas laisser les bouteilles de milieux ouvertes sous la hotte. En présence d'oxygène, il y a formation de radicaux libres tels l'eau oxygénée H₂O₂. L'H₂O₂ rentre dans la cellule et provoque des peroxydations de la membrane plasmique et dans la cellule.

VI. Antibiotiques

Deux grandes familles d'antibiotiques sont utilisées pour prévenir la contamination bactérienne.

- **Pénicilline – Streptomycine**
- **Gentamicine**

Un des problèmes de la Pénicilline – Streptomycine est leur instabilité dans le milieu de culture. Leur avantage est qu'ils ne pénètrent pas dans les cellules de mammifères

VII. Contamination

Les contaminants agissent sur la croissance, altèrent les caractéristiques et les fonctions cellulaires, influent sur la qualité des résultats, certains agents ne sont pas toxiques individuellement mais peuvent le devenir, soit par leur forte concentration ou combinés avec un autre agent.

a. Origines des contaminations

Il existe plusieurs origines de contaminations possibles

- Poussières et spores dues aux particules présentes dans l'air de la pièce et à la circulation des personnes.
- Incubateurs non nettoyés.
- Stérilisation de la vaisselle.
- Réfrigérateurs non nettoyés.
- Hottes non nettoyées.
- Filtres des hottes non vérifiés
- Importation d'autres laboratoires de lignées cellulaires contaminées.

b. types de contaminations**➤ Bactéries - Levures - Champignons**

La contamination par bactéries, levures et champignons peut être visible à l'œil nu. Elle est détectée par la présence ou non d'un trouble et d'une variation de pH. Il faut obligatoirement faire une vérification au microscope.

- Bactéries : milieu trouble, diminution de pH.
- Levures : milieu trouble, peu de changement de pH.
- Champignons : milieu limpide, augmentation du pH

➤ Mycoplasmes

- La détection d'une contamination mycoplasémique nécessite des tests spécifiques (par exemple l'utilisation d'un fluorochrome et vérification au microscope à fluorescence).
- Les effets peuvent se faire sentir à long terme :
 - Croissance ralentie.
 - Changement au niveau de la morphologie.
 - Aberrations chromosomiques.
 - Altérations de certains métabolismes (acides aminés, acides nucléiques)