

TP 10

Initiation à la culture cellulaire. (Mise en place d'une primo culture)



Les objectifs :

- Apprendre à gérer un poste de travail sous PSM.
- Connaître le fonctionnement d'un PSM et d'une hotte à flux laminaire.
- Appréhender les aspects hygiènes et sécurités en culture cellulaire.
- Apprendre les démarches pour faire une primo culture à partir d'un organe.
- Connaître les produits utilisés en culture cellulaire.
- Faire un comptage cellulaire avec le bleu trypan.
- Manipuler avec un microscope inversé.

Temps de travail :

1 Culture cellulaire/ 2 dosage chimique/ 3 TD et questions

Première partie du TP.**I Préparation d'une primo culture.****I.1 Sous le PSM : Destruction enzymatique du foie.**

- Nettoyer la paillasse à l'alcool. Se laver soigneusement les mains et avant-bras et enlever les objets personnels.
- Transférer le foie dans une boîte de pétri stérile remplie de milieu de PBS.
 - Découper le foie en morceaux. (Des petits morceaux ne dépassant pas le cm).
- Pour chaque étudiant, préparer une solution de trypsine.
 - A partir un flacon neuf de trypsine EDTA, prélever 20 ml de la solution pour y placer dans deux tubes propres et stériles. (2 x 10 ml)
 - Placer quelques minutes les tubes dans l'incubateur.
 - Récupérer le foie et le transférer dans les deux tubes de trypsine EDTA préalablement placés dans l'incubateur.
- Placer de nouveau les 2 tubes contenant le foie à l'incubateur à 37 degrés pendant 10 à 15 minutes selon la taille des morceaux de foie (A voir avec l'enseignant). Toutes les 5 minutes de cette séquence, prendre le flacon et le remuer.
 - Après 15 minutes, vérifier la décomposition du foie.
- Remettre au frigo le flacon de trypsine EDTA non utilisé.

Avec l'aide de votre cours :

Pendant le temps d'attente schématiser le fonctionnement de la hotte et du PSM et rappeler les consignes de sécurités liées à la culture cellulaire.

Voir l'enseignant pour la correction.

Préparer le poste du PSM (attention chaque PSM à son mode de fonctionnement)

=>Déterminer les différents matériels nécessaires à la culture cellulaire.

- _____.

- _____.

- _____.

A compléter proprement sur le cahier de paillasse....

I.2 Sous le PSM : Extraction des cellules.

A l'aide d'une pipette stérile aspirer et rejeter plusieurs fois le foie pour qu'il se désagrège.

Par étudiant : sous PSM, préparer 2 tubes de culture cellulaire.

Pour un tube de culture cellulaire.

- Prendre 5 ml de solution décomposée (principalement le surnageant) pour y déposer dans un tube de culture cellulaire propre et stérile.
- Avec une pipette stérile et neuve, ajouter 5 ml de milieu MEM de chez GIBCO. (Attention à la stérilité des flacons et des pipettes)
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2000 rpm.
- Vérifier la présence d'un culot (Cellules au fond du tube) puis éliminer le surnageant (partie liquide) du tube. Le surnageant est un déchet biologique qui doit être récupéré dans un pot (en verre dans notre labo) et traiter comme un déchet de nature DASRI.
- Avec une pipette stérile et neuve, ajouter de nouveau 5 ml de milieu MEM.
- Mélanger au vortex.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2000 rpm.
- Récupérer le culot...ajouter 5 ml de milieu MEM.
- Mélanger au vortex les tubes ;
- Transférer délicatement la solution dans une boîte de pétri de 5 cm et faire une observation sous microscopie inversé.
- Discuter des résultats avec l'enseignant.

Faire un schéma de votre observation et prendre une photographie :

A compléter proprement sur le cahier de paillasse....

II Comptage cellulaire de votre primo culture.

II.1 Faire une estimation des cellules vivantes avec le bleu trypan.

Discuter sur le rôle du bleu trypan : _____.

Nombre de vivantes : Blanches

Nombres de mortes : Bleues

Demander à l'enseignant le protocole de cette analyse.

Discuter avec l'enseignant sur les résultats :

II.2 Préparation du milieu de culture.

Les cellules doivent être dans du MEM avec sels de Earle (Gibco) supplémenté en L-glutamine, glucose, antibiotiques, sérum de veau fœtal.

Les cultures sont ensuite maintenues à 37°C dans un incubateur sous 5 % de CO₂, 95 % d'air et à saturation en vapeur d'eau.

Pour 10 ml de milieu de culture, il faut rajouter

- 1% du volume en antibiotique :

=>rôle _____.

- 10 % du volume en SVF :

=>rôle _____.

Et on peut rajouter d'autres molécules, à voir avec l'enseignant

- 1% du volume en glutamine :

=>rôle _____.

-1% du volume en PHA :

=>rôle _____.

=> Mettre en culture les cellules.

III Observation des boîtes.

- Faire une observation des boîtes au microscope.
- Prendre une photographie et récupérer le fichier sur le serveur.



- Placer les boîtes dans l'incubateur.

IV Entretien de la lignée. Après 3 jours :

Vous devez avoir un trouble blanc sur le fond de la boîte.

Si ce n'est pas le cas, faire une observation au microscope et essayer de voir les cellules.

Pour le repiquage :

- Eliminer le surnageant dans la boîte, sans enlever le tapis cellulaire.
- Ajouter 1 ml de Trypsine. Attendre 8 minutes en plaçant la boîte dans l'incubateur...
- Rajouter 3 ml de Milieu complété, ce qui stoppe l'action de la trypsine.
- Récupérer les 7 ml et les transférer dans deux boîtes. Pour obtenir votre deuxième culture.
- Discuter avec l'enseignant pour évaluer la capacité de culture des boîtes obtenues.



Deuxième partie du TP.

Avec l'aide des techniciennes.

Doser la quantité de protéine
dans le SVF.

Objectif de cette manipulation:

Déterminer une quantité de protéine dans une solution inconnue.

Remarque :

Attention à votre sécurité :
Maintenir les extraits dans la glace.

Analyse :

Préparer une gamme de SAB de 0 à 100 mg L⁻¹

Bien réfléchir avant de commencer. On vous conseille de préparer une solution mère 100 mL à 100 mg L⁻¹.

Prendre 100µL de chaque tube de la gamme et ajouter 2ml de bradford.

Prendre 100µL de l'extrait et ajouter 2 ml de réactif de Bradford

Attendre 20 minutes après ajout du réactif et faire une lecture à 595 nm.

Déterminer la quantité de protéine pour le SVF.

Rendre au final la gamme étalon et le résultat du dosage.

Troisième partie du TP.**TD Culture cellulaire****Questions générales sur la culture cellulaire.**

Pourquoi cultiver des cellules ?

Quels sont les organes utilisés pour les cultures cellulaires ?

Définir la notion de culture primaire.

Quel est le rôle du bleu trypan dans la culture cellulaire et expliquer son mécanisme biochimique?

Comment évolue dans le temps une culture cellulaire.

Comment conserve t-on les cellules dans les laboratoires.

Comment les cellules se développent dans les boites de pétri.

Quels sont les paramètres physico-chimiques important pour la culture cellulaire.

Expliquer le rôle du CO₂ dans ces cultures.

Les produits utilisés dans la culture cellulaire doivent être stériles, par contre les fortes températures détruisent les molécules organiques. Comment fait-on pour stériliser les produits utilisables pour la culture cellulaire.

Quelle est la particularité du milieu de base de Eagle ? Définir le terme de complémentation.

Quel est le rôle du SVF. Quels sont les dangers de ce produit d'origine animale ?

Question sur les cellules souches.

Expliquer pourquoi les chercheurs travaillent sur les cellules souches ?

Quels sont les moyens pour obtenir des cellules souches ?

Conservation des cellules.

Expliquer les intérêts de développer des recherches dans la conservation des cellules.

Définir le sigle DMSO et expliquer son rôle dans la conservation des cellules.

Quelles sont les bonnes pratiques de la congélation cellulaire ?