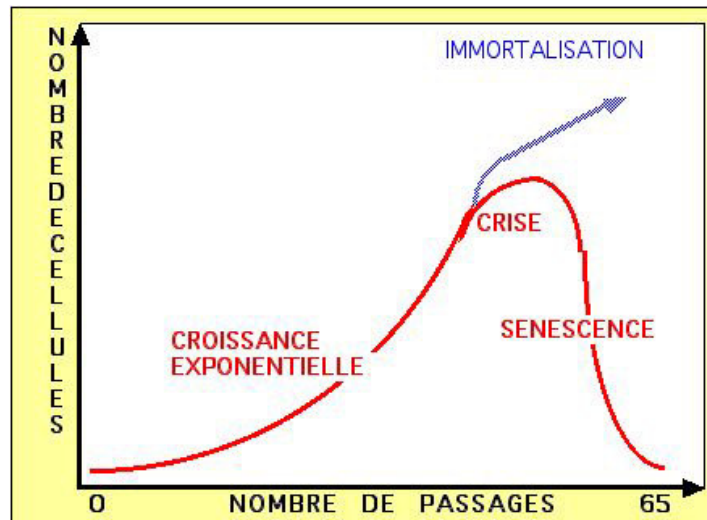


### TD n° 3 : culture cellulaire

La culture cellulaire vise à isoler des cellules à partir d'organismes puis à les maintenir vivantes pour une utilisation expérimentale.

La détermination des exigences pour la mise au point de milieux et celle des conditions de cultures cellulaires suppose une bonne connaissance des conditions qui prévalent dans le milieu intérieur.

Lorsque les cellules mises en culture proviennent de cellules "saines" prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie,...), on parle alors de "culture primaire". Ces cellules ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (limite de Hayflick).



**La limite de Hayflick :** Leonard Hayflick avait observé que des cellules en division (mitose) dans une culture cellulaire ne se divisaient que 50 fois avant de mourir. Quand des cellules approchaient cette limite, elles montraient des signes de sénescence. Cette limite varie en fonction du type cellulaire, et plus encore en fonction du type de l'organisme. La limite pour l'homme se situe aux environs de 52. Cette limite a été reliée au raccourcissement des télomères.

Les cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'immortalité en culture) sont des "lignées cellulaires". Les lignées sont soit des cellules cancéreuses (telles les cellules HeLa à développement très rapide, de Henrietta Lacks), soit des cellules en voie de cancérisation, soit des cellules saines rendues "immortelles" artificiellement.

**NB :** Les cancers ne deviennent problématiques que si les cellules qui les constituent ont trouvé le moyen de contourner la limite de Hayflick. De telles cellules sont appelées « cellules immortelles ». Ces cellules immortelles finissent quand même par mourir, mais l'ensemble des cellules rendues immortelles n'est pas limité quant au nombre de divisions cellulaires pouvant se réaliser en son sein.

### **Composition de base du milieu de culture**

Sels minéraux, Hormones, Acide aminés, Sources d'énergie (glucose), Vitamines  
Facteur de croissance

### **Étapes de la culture cellulaire :**

- 1- On décongèle une ou plusieurs tubes (à cryostat) de cellules. Ce tube contient des cellules dans un milieu de culture adapté + un agent protecteur (qui permet d'éviter une trop grande mortalité lors de la congélation. Le DMSO par exemple, qui est d'autre part toxique pour les cellules vivantes).
- 2- Après la décongélation on élimine l'agent protecteur par centrifugation puis on rajoute du milieu de culture adapté frais. Certaines cellules sont cultivées en suspension dans leur milieu nutritif (cellules non-adhérentes), d'autres sur des plastiques traités leur offrant des capacités d'adhérence. Ces supports peuvent prendre la forme de boîtes de différents formats ou de "flasks".



- 3- Enfin, on remet les cellules à l'incubateur pour les cultiver. Ainsi, les cellules sont généralement cultivées en incubateurs, à une température de 37°C et dans une atmosphère très humide à teneur en CO<sub>2</sub> contrôlée, souvent 5%.



Les cellules sont observées et la culture est suivie grâce à un microscope inversé



#### 4- Comptage des cellules de Malassez

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



Lame de Malassez en verre

