

EXERCICE A PROPOS DE LA CULTURE DE CELLULES ANIMALES

Auteur : Marc Lesquir, lycée de la Plaine de l'Ain, rue Léon Blum, 01500 AMBERIEU EN BUGEY

Exercice établi à partir d'un sujet de concours général de l'ancien baccalauréat F7, dont le texte a été actualisé.

Niveau : étudiants de BTS Biochimie et Biotechnologies

1- Etude de la composition d'un milieu de culture :

Le milieu de culture minimum d'Eagle (MEM) préparé à partir de la solution saline équilibrée d'Earle (SSE) permet de cultiver des cellules animales, notamment des cellules de souris. Sa composition, ainsi que celle de la SSE, sont décrites dans le [document 1](#).

1-1 Le MEM répond-t-il à la définition d'un milieu de culture synthétique ? Justifier la réponse.

1-2 Exposer les besoins des cellules en culture. Indiquer comment le milieu MEM répond à ces besoins.

1-3 Qu'est-ce qu'une solution tampon ? Quel est l'intérêt de la présence d'une solution tampon dans un milieu de culture ?

Quelles substances autres que HPO_4^{2-} et présentes dans le milieu MEM peuvent agir comme tampon ?

1-4 Au moment de son utilisation, le milieu MEM décrit dans dans le document 1 doit être complété en sérum de veau fœtal et en agents antimicrobiens.

1-4-1 Montrer l'intérêt de l'addition de sérum de veau fœtal (SVF).

1-4-2 Citer quelques exemples d'agents antimicrobiens couramment utilisés en culture cellulaire.

2- Préparation d'un milieu de culture :

Ainsi qu'on a pu le voir en 1-, la composition de ce milieu de culture fait appel à de nombreux constituants. La préparation est donc longue, d'autant plus que le milieu doit être stérile au moment de l'emploi. L'habitude est donc de constituer plusieurs solutions de stockage, concentrées et stériles, qui sont mélangées au moment de l'emploi.

2-1. Préparation de solutions stocks :

L'acide pyruvique sert parfois pour compléter le milieu MEM. Il est alors utilisé à la concentration finale de 1 mmol.dm^{-3}

À l'aide de la fiche signalétique de l'acide pyruvique tirée d'un catalogue commercial de réactifs ([document 2](#)) :

2-1-1 Indiquer la signification de la vignette de sécurité (pictogramme) ainsi que des lettres R et S.

2-1-2 Calculer le volume de solution commerciale à mesurer pour préparer un litre de solution stock d'acide pyruvique 100 fois concentrée (x 100).

N.B. - Sur la fiche signalétique, le symbole d_4^{20} désigne la densité du produit commercial et (T) la teneur en acide pyruvique. On rappelle la relation :

$$d_4^{20} = \frac{\rho_{\text{acidepyruvique}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

soit d_4^{20} = masse volumique de l'acide pyruvique/masse volumique de l'eau.

2-1-3 Calculer la masse de chlorure de choline à peser pour la préparation de 250 cm³ de solution stock de vitamines 1000 fois concentrée (x 1000).

2-2 Stérilisation des solutions :

La solution saline équilibrée est stérilisée par autoclavage, alors que la solution mélange d'acides aminés est stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,2 µm.

2-2-1 Quels arguments peuvent justifier le choix du mode de stérilisation de ce mélange d'acides aminés ?

2-2-2 Qu'est-ce qui détermine la taille choisie pour les pores du filtre ?

Remarque : Préparation du milieu.

Le milieu MEM est reconstitué à partir des solutions concentrées et stériles suivantes :

- solution stock saline équilibrée x 1
- solution stock d'acides aminés concentrée..... x 100
- solution stock de Trp et Tyr x 500
- solution stock de vitamines x 1000
- solution stock de glucose x 100

et pour la supplémentation :

- sérum de veau fœtal x 1

mélangées en proportions convenables.

2-3 Complémentation du milieu

Le SVF est ajouté, après décomplémentation, au taux de 10 %.

2-3-1 Pourquoi faut-il décomplémenter le SVF ? Comment réalise-t-on cette opération ?

2-3-2 Le SVF est progressivement remplacé par des substituts, à cause de certains inconvénients par rapport à la culture cellulaire, également pour des raisons de sécurité biologique.

- Quels sont les inconvénients liés à l'emploi de SVF en culture cellulaire ?
- Quels sont les risques biologiques liés à l'emploi de SVF ?

3- Analyse d'une culture de cellules :

Plusieurs étapes ont été nécessaires pour obtenir cette culture de cellules. En premier lieu l'explantation est la phase au cours de laquelle on a extrait des cellules à partir d'un organe par prélèvement d'un fragment de tissu puis dissociation mécanique et enzymatique de celui-ci avant la première mise en culture. Les cellules se sont multipliées tout en recouvrant la surface du flacon. Le milieu a été renouvelé plusieurs fois pour empêcher son épuisement.

Ensuite, les cellules ont été détachées de la surface par traitement enzymatique et triées en fonction de leur taille et de leur densité.

Enfin, les cellules sélectionnées ont été mises en culture et leur croissance a été suivie.

3-1 Étude du protocole d'explantation :

L'application de deux méthodes d'obtention de cellules embryonnaires de souris a fourni les résultats suivants ([document 3](#)). Commenter les résultats de ces deux méthodes.

3-2. Entretien et suivi d'une culture de cellules L 929.

3-2-1 Le protocole de repiquage décrit dans le [document 4](#) précise (étape 2) qu'il faut laver les cultures afin d'éliminer les traces de SVF.

Justifier la nécessité de cette élimination des traces de SVF.

3-2-2 En procédant comme pour 1'étude d'une croissance bactérienne, construire la courbe de croissance de cette culture à partir des données suivantes ([tableau 1](#)) : la croissance est suivie par l'évolution de la densité surfacique des cellules L 929.

N.B. - Densité surfacique = nombre de cellules par unité de surface.

Tableau 1 : Résultats d'une croissance de cellules L 929

Durée d'incubation (h)	0	8	12	22	30	34	48	52	56	60	70	79	94	100
Densité surfacique (X 10 ⁴ cellules.cm ⁻²)	3,00	3,10	3,35	4,50	5,95	6,70	10,2	11,5	12,9	14,8	20,0	26,5	38,2	40,5

3-2-3 Déterminer le taux de croissance néperien (ou vitesse de croissance maximale spécifique) et le temps de génération de cette culture.

3-2-4 Une culture de cellules L 929, au plateau de densité, dans un flacon de 25 cm² de surface utile (sur laquelle peuvent se multiplier les cellules), est remise en suspension selon le protocole décrit dans le [document 4](#). 9 cm² de suspension cellulaire (S₁) sont alors recueillis. Le résultat de l'observation X 190 de S₁ à l'hématimètre de Malassez (volume total 1 mm³) est fourni par le [document 5](#).

Déterminer la concentration exacte de la suspension S₁.

Quelle était la densité surfacique de cellules dans le flacon avant trypsinisation ?

N.B. - Caractéristiques de la cellule de Malassez : Hauteur..... 0,2 mm
Surface quadrillée (grand rectangle)..... 5 mm²
Nombre de rectangles dans le quadrillage 100
Distance entre deux lignes..... 50 µm

3-2-5 On veutensemencer un flacon de 175 cm² avec 3,5.10⁵ cellules et une hauteur de milieu de 5 mm.

Quel volume total doit contenir le flacon ?
Quelle sera la concentration cellulaire réalisée ?
Quelle dilution finale aura-t-on effectuée ?
Proposer un protocole pour réaliser cet ensemencement.

3-2-6 Quelle sera la densité surfacique de cellules dans le flacon ainsi repiqué ?

Combien de générations seront nécessaires pour atteindre la densité surfacique de cellules maximale ?

Sachant qu'une phase de latence de 18 heures est régulièrement observée après un repiquage, quelle est la durée d'incubation prévisible avant d'obtenir cette densité ?

Document 1 : Compositions de la solution saline équilibrée de Earle (SSE) et du milieu MEM de Eagle

Composants	MEM (mg.dm ⁻³)
L-arginine HCl	126
L-cystéine	24
L-glutamine	292
L)histidine HCl, H ₂ O	42,0
L-isoleucine	52,0
L-leucine	52,0
L-lysine HCl	73,1
L-méthionine	15,0
L-phénylalanine	33,0
L-thréonine	48,0
L-tryptophane	10,0
L-tyrosine	36,0
L-valine	47,0
D-Ca pentoténate	1,00
Chlorure de choline	1,00
Acide folique	1,00
i-inositol	2,00
Nicotinamide	1,00
Pyridoxal HCl	1,00
Riboflavine	0,10
Thiamine HCl	1,00
CaCl ₂	200
KCl	400
MgSO ₄ ,7H ₂ O	200
NaCl	6800
NaHCO ₃	2200
NaH ₂ PO ₄ ,H ₂ O	140
D-glucose	1000
Rouge de phénol	10,0
CO ₂ , gaz	5%
pH	7,4

Rappel

Elément	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
	40,1
	35,5
	24,3
	31,0
	39,1
	23,0
	32,1

Composants	SSE (g.L ⁻¹)
Constituants minéraux	
CaCl ₂	0,20
KCl	0,40
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,20
NaCl	6,80
NaHCO ₃	2,20
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,14
Autres composants	
D-glucose	1,00
Rouge de phénol	0,01
pH	7,4

Document 2 : fiche signalétique de l'acide pyruvique

Pyruvic acid (2-Oxopropionic acid) CH₃COCOOH C₃H₄O₃

M 88,06 [127-17-3]

15940 *purum* > 98 % (T) d_4^{20} 1.265 n_D^{20} 1,428

0-4° Merck Index 11,8032 Beil. 3,IV,1505

R : 34

S : 28

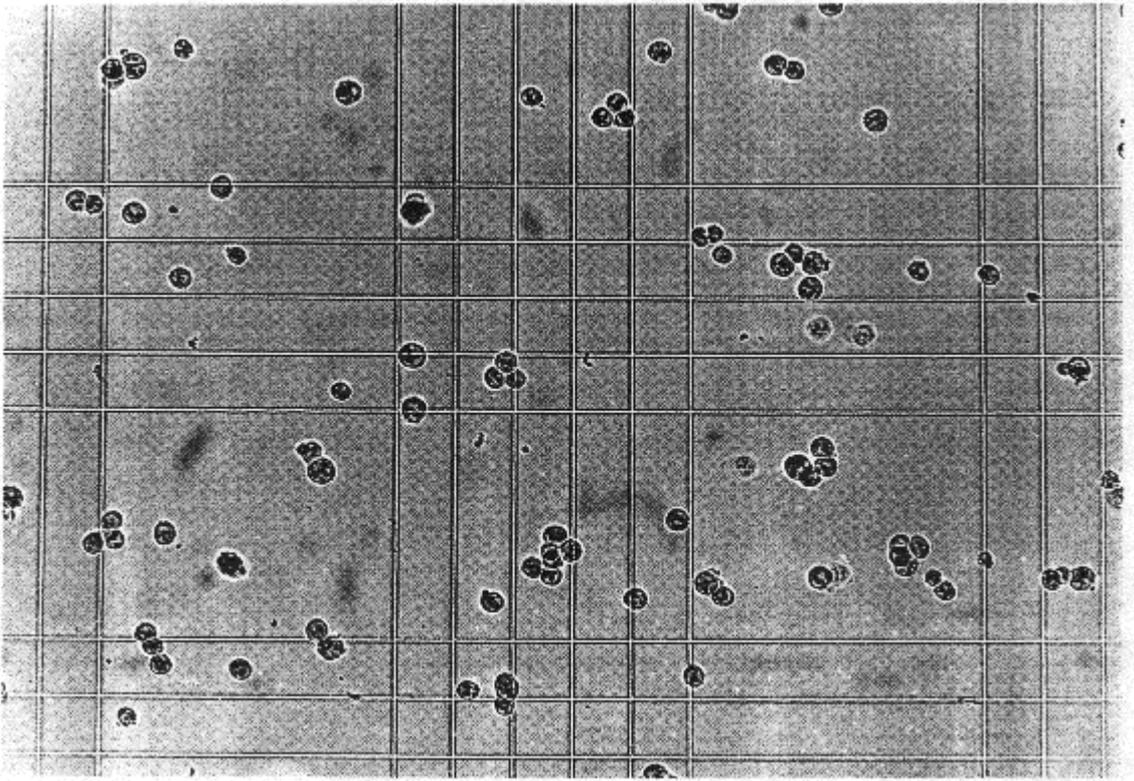
Document 3 Comparaison des résultats obtenus par désagrégation trypsique à chaud et à froid à partir d'embryons de souris.

Action de la trypsine		Nombre de cellules totales obtenues par embryon (X 10 ⁻⁷)	Nombre de cellules viables obtenues par embryon (X 10 ⁻⁷)	Nombre de cellules viables obtenues après 24 h. (X 10 ⁻⁷)
Durée (heures)	Température			
Méthode à chaud 4 h. à 36,5°C		1,69	1,45	0,80
Méthode à froid 24 h à +4°C et 0,5 h. à 36,5°C		3,40	2,55	2,05

Document 4 : Protocole résumé du repiquage d'une culture cellulaire

- 1- Retirer et jeter le milieu de culture.
- 2- Laver la culture avec du tampon PBS sans décoller les cellules, pour éliminer les traces de sérum.
- 3- Ajouter la trypsine à 0,25 % à raison de 3 mL pour 25 cm². Recouvrir entièrement la monocouche de cellules en inclinant la flasque (flacon). Laisser agir 15 à 30 secondes puis retirer la trypsine.
- 4- Incuber à 37°C environ 5 à 15 minutes. Lorsque les cellules s'arrondissent, arrêter l'incubation. Les cellules glissent alors vers le bas lorsqu'on incline la flasque.
- 5- Ajouter du milieu et remettre en suspension les cellules par pipetages délicats pour ne pas endommager les cellules.
- 6- Déterminer la concentration de la suspension cellulaire par comptage des cellules à l'hématimètre.
- 7-ensemencer les flasques contenant déjà un volume connu de milieu de culture à partir de cette suspension.
- 8- Boucher les flasques et les mettre à incuber.

Document 5 : Numération de la suspension S₁, hématimètre de Malassez (X 190)



Numération de la suspension S₁, Hématimètre de Malassez (x 190) ; [FS-JB ENCPB]