

CORRIGE DE L'EXERCICE A PROPOS DE LA CULTURE CELLULAIRE

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

1-1 Milieu synthétique ? Oui car compositions qualitative et quantitative parfaitement définies.

1-2 Besoins de cellules en culture : voir documents de TP (composés minéraux, énergie, aminoacides, bases nucléiques, vitamines) → besoins à développer et à justifier.

Le milieu MEM répond à ces besoins :

2 apport de composés minéraux → ex : CaCl_2 , KCl , MgSO_4 ...

3 apport d'énergie : D-glucose

4 apport d'acides aminés → ex : L-Arg, L-Cys, L-Leu, L-Val...

5 apport de bases nucléiques : le MEM n'en contient pas → ces bases devront être apportées lors de la complémentation du milieu dans le cas où les cellules cultivées les exigent.

6 Vitamines → ex : acide folique, nicotinamide, thiamine...

1-3 Solution tampon = solution contenant des composés capables de maintenir un pH stable dans un milieu, en neutralisant les composés acides et alcalins susceptibles d'apparaître.

Autre tampon du MEM : NaHCO_3 (ce tampon implique l'usage d'un incubateur à CO_2).

1-4 Complémentation

1-4-1 SFV : apporte des protéines, de nombreux facteurs de croissance, notamment des substances cytoestimulantes qui activent les divisions cellulaires.

1-4-2 Antibiotiques : pénicilline, streptomycine.
Antifongiques : fungizone (amphotéricine B)

2- Préparation d'un milieu de culture :

2-1 Solutions tampon :

2-1-1 Pictogramme → irritant et corrosif.

R : indique le n° de code du risque lié à ce produit.

S : indique le n° de code des mesures de sécurité à prendre lors de la manipulation de ce produit.

2-1-2 Solution X 100 → $C = 100 \text{ mmol.dm}^{-3} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$

masse correspondante $m = M \times 0,1 \text{ mol.dm}^{-3} \rightarrow m = 88,06 \times 0,1 = 8,806 \text{ g}$

$d_{04}^2 = 1,265 \rightarrow 1 \text{ mL} = 1,265 \text{ g} \rightarrow 1 \text{ g} = 1/1,265 = 0,7905 \text{ mL}$

Volume à mesurer : $V = 0,7905 \times 8,806/1 = 6,96 \text{ mL}$ (V théorique si le produit était pur à 100%)

Pureté : $T > 98\% \rightarrow$ correction : si T était égal à 98% il faudrait mesurer $6,96 \text{ mL} \times 1/0,98 = 7,10 \text{ mL}$

Or $98\% < T < 100\% \rightarrow V$ compris entre 6,96 et 7,10 mL → on choisira **V = 7 mL**.

2-1-3 Chlorure de choline en solution X 1000 :

$C = 1000 \text{ mg.dm}^{-3} = 1 \text{ g.dm}^{-3}$

$V = 250 \text{ cm}^3 \rightarrow m = 0,250 \text{ g}$.

2-2 Stérilisation :

2-2-1 Certains aminoacides étant dénaturés par la chaleur, l'autoclavage est à éviter → choix d'une filtration stérilisante.

2-2-2 Diamètre des pores du filtre : doit être inférieur au diamètre des plus petites bactéries susceptibles de se développer dans ce milieu riche (on choisit par exemple $0,2 \mu\text{m}$).

2-3 Complémentation du milieu

2-3-1 Décomplémentation du SVF : permet d'inactiver le complément qui pourrait détruire les cellules dans le cas où le SVF contiendrait des Ac pouvant reconnaître les cellules cultivées (activation de la voie classique). Décomplémentation réalisée par chauffage 30 minutes à 56°C puis centrifugation afin d'éliminer les éventuelles protéines dénaturées qui ont précipité.

- 6-3-2 Inconvénients du SVF : peut contenir des contaminants, mycoplasmes notamment, prix élevé, problèmes de lots impliquant des essais préalables.
Risques biologiques : présence possible d'agents infectieux : virus transmissibles à l'Homme, prions.

3- Analyse d'une culture de cellules :

3-1 Protocole d'explantation :

Méthode	A chaud	A froid
Viabilité spontanée (%)	85,8	75
Viabilité à 24 h (%)	47,3	60,3
Nombre total de cellules viables	$0,80 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$

Comparaison :

- 7 Méthode à chaud : bonne viabilité spontanée, mais viabilité à 24 h très mauvaise, ce qui donne un mauvais rendement en cellules viables.
8 Méthode à froid : viabilité spontanée un peu moins bonne, rendement en cellules totales supérieur, viabilité à 24 h très supérieure → bon rendement en cellules viables.

La méthode à froid est plus intéressante car la viabilité à 24 h est supérieure (cellules qui se conservent mieux) et car le nombre total de cellules viables est supérieur.

3-2

3-2-1 $D =$ densité surfacique. Courbe $\ln D = f(t)$.

Voir fichier courbes sous Excel.

3-2-2 Partie linéaire (phase exponentielle) entre 22 et 79 h : équation de la droite correspondante (établie par régression linéaire) : $\ln D = 0,031 t + 10,05$, coefficient de corrélation $r = 0,99986$ (très bonne corrélation).

Le coefficient angulaire (pente) = **taux de croissance népérien** = $\mu_{\text{expo}} = 0,031 \text{ h}^{-1}$

Temps de génération : $G = \ln 2 \times 1/\mu_{\text{expo}} = 22,36 \text{ h}$ soit **22 h 21 min**.

Remarque : Taux de croissance $\mu = 1/G = 0,045 \text{ division.h}^{-1}$.

3-2-3 Document 5 : dénombrement $n = 52$ cellules dans 6 rectangles

$N = 52 \times 1/4 \times 100 \times 1000 \times 9 = 7,8 \cdot 10^6$ cellules dans les 9 cm^3 de suspension cellulaire S1

Soit pour S1 : **$0,87 \cdot 10^6 \text{ cellules.cm}^{-3}$**

Densité surfacique (rappel surface = 25 cm^2) **$D = 31,2 \cdot 10^4 \text{ cellules.cm}^{-2}$**

3-2-4 Volume total = $S \times h$ soit $175 \times 0,5 = 87,5 \text{ cm}^3$

Concentration cellulaire = $3,5 \cdot 10^5 \times 1/87,5 = 4 \cdot 10^3 \text{ cellules.cm}^{-3}$

Dilution finale = $4 \cdot 10^3 / 0,87 \cdot 10^6 = 1/217$

Protocole de réalisation :

9 milieu neuf : 87 cm^3

10 suspension S1 : $0,4 \text{ cm}^3$

3-2-5 Densité surfacique = $3,5 \cdot 10^5 / 175 = 2 \cdot 10^3 \text{ cellules.cm}^{-2}$

densité surfacique maximale = $31,2 \cdot 10^4 \text{ cellules.cm}^{-2}$ (voir 3-2-3)

Nombre de générations :

11 inoculum = $N_0 = 3,5 \cdot 10^5 \text{ cellules} \rightarrow \ln N_0 = 12,766$

12 $D_{\text{max}} = 31,2 \cdot 10^4 \text{ cellules.cm}^{-2} \rightarrow N = 31,2 \cdot 10^4 \times 175 = 5,46 \cdot 10^7 \text{ cellules} \rightarrow \ln N = 17,816$

$\ln N = \ln N_0 + \mu_x \times (t - t_0) \rightarrow t - t_0 = (\ln N - \ln N_0) \times 1/\mu_x$

Application numérique : $t - t_0 = 163 \text{ h}$.

Temps de génération $G = 22,36 \text{ h}$ (voir 3-2-2)

Nombre de générations = $163 \times 1/22,36 = 7,3$ soit **7 générations**.

Durée d'incubation prévisible = 18 h (latence) + $163 \text{ h} = 181 \text{ h}$ soit **environ 7 jours**.