

Thème 3 – Chapitre 1 – Activité 2

ENTRETIEN ET CARACTÉRIQUE DE LA CROISSANCE D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE NON TRANSFORMÉE

Éléments de réponse



1.1.1.

Constituants minéraux (<i>inorganic salts</i>)	Ils interviennent entre autre : - dans le maintien de la pression osmotique ; - dans le transport transmembranaire de nombreuses molécules ; - en tant que cofacteur enzymatique ; - dans le maintien du potentiel transmembranaire. De plus, les ions calcium et magnésium sont indispensables à l'attachement et à l'étalement des cellules sur leur support et l'ion calcium est un important second messager intracytoplasmique.
Acides aminés (<i>amino acids</i>)	AA = précurseurs des protéines (et source de carbone et d'azote) On doit trouver obligatoirement les acides aminés essentiels que ni la cellule ni l'organisme ne sait synthétiser <i>in vivo</i> , soit pour des cellules humaines : met, leu, thr, lys, trp, phé, val, ile. On ajoute les acides aminés dont la synthèse est impossible <i>in vitro</i> par le type cellulaire étudié.
Vitamines (<i>vitamins</i>)	Ce sont des précurseurs de coenzymes que les cellules sont incapables de synthétiser.
Autres (<i>others</i>)	D glucose : source énergétique (et source de carbone). Rouge de phénol : indicateur coloré de pH qui permet la visualisation des modifications de pH du milieu. Bicarbonate de sodium : système tampon chimique qui limite les variations de pH du milieu.

1.1.2.

SVF : sérum de veau fœtal	Il permet la prolifération cellulaire <i>in vitro</i> . Le sérum est un mélange de composition complexe contenant entre autre un grand nombre de substances libérées par toutes sortes de cellules de l'organisme donneur. On y trouve : - des molécules intervenant dans l'adhérence et l'étalement des cellules sur leur support (fibronectine...) ; - des hormones (insuline, hydrocortisone, progestérone, GH, somatomédine, oestradiol...) ; - des facteurs de croissance (EGF, PDGF, NGF, PDGF...) [GF = <i>growth factor</i>] ; - des molécules lipidiques diverses ; - des protéines de transport ; - des vitamines.
Pénicilline et streptomycine	Antibiotiques : empêchent la contamination et le développement des bactéries dans le milieu de culture.

1.1.3.

SVF : 10 % (*v/v*) ; on met donc 50 mL de SVF.

Penicilline/streptomycine : 2 calculs possibles :

- celui d'une dilution de la pénicilline pour passer d'une solution mère (SM) à 10 000 unités par mL à une solution fille (SF) (milieu de culture supplémenté) à 100 unités par mL :

$$V_{\text{SM}} = C_{\text{SF}} \times V_{\text{SF}} / C_{\text{SM}} = 100 \times 500 / 10 000 = 5 \text{ mL} ;$$

- on peut aussi faire le calcul par rapport à la streptomycine :

$$V_{\text{SM}} = V_{\text{SF}} \times t_{\text{SF}} / t_{\text{SM}} = 500 \times 0,1 / 10 = 5 \text{ mL.}$$

On met donc 50 mL de SVF + 5 mL de solution d'antibiotiques + 445 mL de milieu.

1.2.1.

Observations macroscopiques : milieu jaune => virage de l'indicateur coloré de pH, le rouge de phénol à sa teinte acide => acidification du milieu suite à la libération de composés acides liée à l'activité métabolique des cellules.

Observations microscopiques : tapis cellulaire arrivé à confluence.

1.2.2.

Repiquage nécessaire car confluence atteinte.

1.3.1.

Cellules vivantes = cellules blanches.

Cellules mortes = cellules bleues.

1.3.2.

$$\begin{aligned}\% \text{ viabilité} &= \text{nombre de cellules vivantes} \times 100 / \text{nombre de cellules mortes} \\ &= 300 \times 100 / 328 = 91,4\%\end{aligned}$$

Ce % de viabilité permet de contrôler l'étape de la trypsinisation.

1.3.3.

- Facteur de dilution = volume total / volume de cellules = $(100 + 400) / 100 = 5$
- Volume de comptage = volume hématimètre complet (10 bandes)
 $= 1 \times L \times h = 2 \times 2,5 \times 0,2 = 1 \text{ mm}^3 = 1,10^{-3} \text{ mL}$
- Concentration cellulaire = nombre de cellules vivantes comptées x facteur de dilution / volume de comptage
 $= 300 \times 5 / 1,10^{-3} = 1,5 \cdot 10^6 \text{ cellules par mL}$

1.3.4.

$$\begin{aligned}V \text{ suspension par flacon} &= \text{nombre de cellules souhaité} / \text{concentration cellulaire} \\ &= 250 \, 000 / 1,5 \cdot 10^6 = 0,165 \text{ mL}\end{aligned}$$

1.4.

Étapes nécessaires à la mise en culture :

- introduire environ 160 µL de suspension cellulaire dans un flacon neuf et stérile ;
- compléter le flacon avec 5 mL de milieu de culture complet ;
- dévisser le bouchon du flacon et introduire le flacon dans un incubateur à CO₂ (37 °C, 5 % de CO₂, bonne hygrométrie).

2.1./2.2./2.3.

- Phase 1 = latence = temps nécessaire à l'adhésion des cellules sur le support.
 - Phase 2 = phase exponentielle de croissance : les cellules se divisent activement en utilisant les éléments présents dans le milieu de culture. On change le milieu de culture lorsque celui-ci présente une forte acidification pendant cette phase.
 - Phases 3 puis 4 = phase de ralentissement puis phase stationnaire = inhibition de contact => repiquage indispensable sinon les cellules meurent.
 - Phase 5 = mortalité cellulaire (trop forte densité) ; les cellules meurent et se détachent du support.
- La phase optimale pour réaliser un repiquage est donc la phase 3.

2.4.

Temps de génération = temps nécessaire au doublement de la population (à calculer pendant la phase exponentielle de croissance observée entre 10 et 60 heures).

G = 20 heures.

2.5.

Lignée A = présente une sénescence *in vitro* au bout de 12 semaines de repiquage => lignée non immortelle = lignée non transformée.

Lignée B = pas de sénescence *in vitro* => lignée « immortelle » = lignée transformée.