# Culture cellulaire

Les éléments dont ont besoins une cellule pour survivre dépend de son type. La sélection de types cellulaires se fait par la composition du milieu.

## Milieu de culture

Le milieu est composé :

* D’un milieu nutritif (généralement du DMEM). Certains nutriments vitaux comme le glutamate, un aa, ont une durée de demi-vie faible. Il faut soit en ajouter régulièrement soit utiliser des dérivés plus stables comme le GLutamax.
* Du sérum animal (par exemple veau ou cheval) qui apporte de nombreuses molécules annexes comme des facteurs de croissances, des acides gras, du fer… Le sérum a une composition variable.
* Antibiotiques (comme la pénicillines et la streptomycine) pour prévenir du développement bactérien.

Rappel : Osmolarité des cellules animales 300mosmol/L.

Coat substrat qui facilite l’adhésion composant de la MEC appelé.

Rmq : La glutamine est impliquée dans de nombreux processus notamment dans la fabrication des pyrimidines et de la purine (les précurseurs des nucléosides). Mais elle est extrêmement labile. Son temps de demi-vie est très faible et Trop délétère car il se transforme en ammoniac.

Confluence proportion de cellules ayant adhérée au support. % de l’espace occupé par les cellules.

pH tendance à basique en division importante pensez à acidifier le milieu. Dans les incubateurs, le pH est maintenu par la présence de CO2.

## Isoler les cellules

Pour isoler un type cellulaire, il existe deux techniques :

* Par explant. Des cellules émergent de l’explant.
* Par digestion enzymatique. On digère les composants pour dissocier les cellules et les isoler.

L’amplification de la culture d’un type passe par la composition du milieu.

1. Faire adhérer les cellules
2. Migration et prolifération (dynamisme du cytosquelette, intégrine).

Rmq : Pour décrocher les cellules du tissu ou de leur support, on utilise généralement la trypsine (endopeptidase) qui présente l’avantage d’avoir une efficacité élevée.

## Conservation des cellules

Pour conserver les cellules, elles sont congelées. Les paramètres à surveiller sont :

* La vitesse de congélation qui vitesse d’apparition des cristaux augmentent intracellulaire.
* Utiliser des agents de cryoprotecteurs comme le DMSO ou le glycérol qui abaisse le point de congélation de l’eau.

Rmq : les cristaux de glace sont constitués d’eau pur.

Attention, les cryoprotecteurs sont généralement des substances toxiques.

Les cellules doivent être :

* décongelées rapide pour limiter l’impact des cristaux
* dilution pour limiter les effets du DMSO.

## Fluorescence

### La Green Fluorescence Protein (GFP)

La GFP généralement est utilisé pour former un protéine chimérique est fabriqué vivo. Elle peut servir à

* Suivre le trajet de protéines dans la cellule.
* Déterminer la localisation d’une protéine.
* Mesure du pH.

La GFP est composé de :

* Chromophore formé par 3 aa.
* De 2 à 229 acides aminés annexes qui servent au maintien du chromophore.

La GFP présente plusieurs avantage :

* Résistance à la modification du pH (protonation).
* Résiste à la présence d’agents dénaturants.

Attention le pic d’excitation est situé à 395nm dans la lumière UV, ce qui peut endommager la cellule.

Disparition (blanchiment)

Excitation à 475 nm émet un fluorescent de faible intensité.

Rmq : De nombreux émettant dans d’autre couleur ont été obtenu par la mutation d’un seul acide aminé.

## Estimation de la mort cellulaire

### Marqueur des cellules vivantes

Pour estimer la mort cellulaire, on peut utiliser des substances comme :

* le bleu de Trypan. Lorsque la cellule est en vie elle l’expulse activement. Les cellules apparaissent plus claires.
* MTT qui précipite dans les lysosomes à cause du pH acide.
* Rouge neutre se concentre dans les mitochondries.

### Marqueur de mort cellulaire

* Iodure de propidium, un intercalant d’ADN.
* Annexine qui a une affinité avec les phosphatidylsérines. Elle est utilisée pour marquer l’apoptose.

# Culture bactérienne

## Culture en milieu solide

Dilution puis étalement sur une boîte de pétri. Les boites doivent être incubées à l’envers pour éviter que les gouttes de condensation tombent et dispersent les colonies.

## Culture en milieu liquide

La culture en milieu liquide nécessite d’utiliser un agitateur pour faciliter les échanges gazeux.