

TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE



I. Culture cellulaire appliquée à la cytogénétique : principes généraux

A. Introduction

La réalisation d'une analyse cytogénétique nécessite de disposer de cellules en division pour l'obtention de mitoses

a- Deux impératifs :

1. Cellules vivantes

Nécessité de conditions de recueil adéquates
(milieu de transport; température; délai d'acheminement)

2. Absence de contamination bactérienne ou fongique

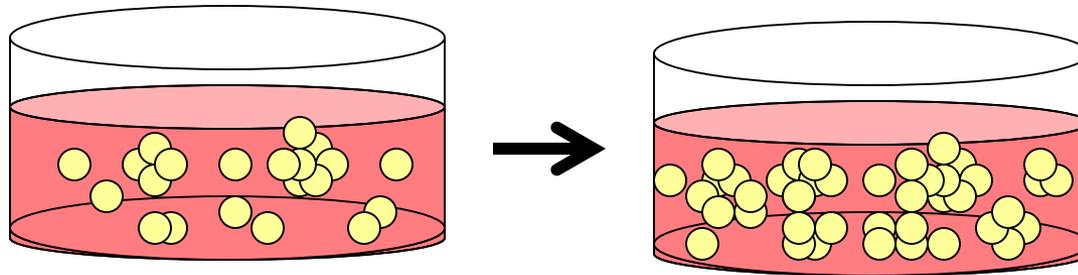
b- Quatre modes principaux de mise en culture :

1. Cellules en division active spontanée (moelle osseuse, cytotrophoblaste, certaines tumeurs...) : examen « direct » ou incubations très courtes (moins de 72 heures)
2. Incubations courtes de lymphocytes sanguins avec stimulation par des mitogènes, comme par exemple phytohématoglutinine (16 à 96 h)
3. Cultures cellulaires de quelques jours à plusieurs semaines : (cellules amniotiques, tissu tumoral, fibroblastes...)
4. Cas particulier des cellules cryoconservées et des lignées cellulaires



c- Deux types principaux de culture cellulaire :

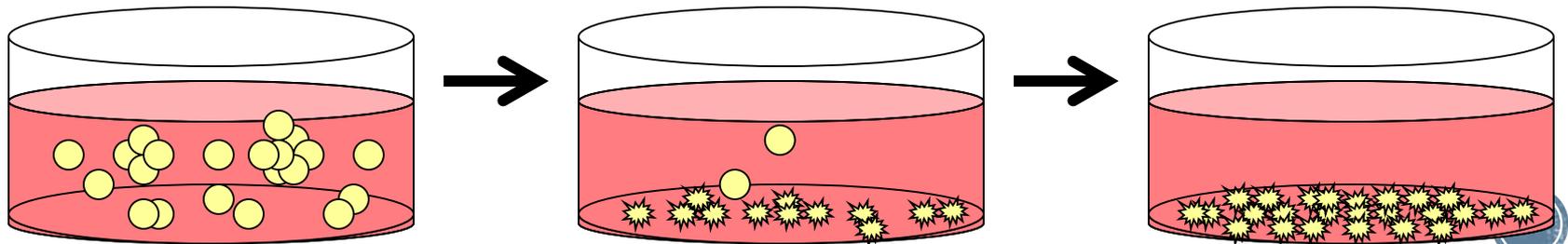
i) Culture de cellules en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, certains types de tumeurs comme les tumeurs à petites cellules rondes...) : les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension



ii) Culture sur support : adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture

*culture clonale « in-situ »

*culture panmictique



B. Impératifs de mise en culture

1. Cellules vivantes :

Recueil dans récipient et milieu de transport adéquat, adapté à chaque type de prélèvement selon les indications du laboratoire

Prélèvement non fixé (proscrire formol, liquide de Bouin etc...)

Prélèvement non congelé (proscrire recueil dans l'azote liquide ou carboglace; *si congélation de cellules nécessaire : à réaliser ultérieurement au laboratoire selon un protocole bien précis adapté aux cellules, en présence de produits cryoconservateurs*)

Acheminement au laboratoire à température ambiante
(pas de glace, pas de températures élevées)

Délai d'acheminement le plus rapide possible (si laboratoire d'analyse dans une autre ville que le lieu du prélèvement, envoi par courrier express)



2. Absence de contamination bactérienne ou fongique

La culture cellulaire s'effectue dans un incubateur à 37°C en milieu de culture riche : propice au développement bactérien

La contamination bactérienne ou fongique du prélèvement :
-empêche la prolifération cellulaire (échec du caryotype)
-risque d'entraîner la contamination d'autres prélèvements dans l'incubateur

→ **... cela impose des précautions drastiques....**

Précautions lors du recueil du prélèvement :

Utiliser du matériel stérile à usage unique, éviter les fautes d'asepsie

Si prélèvement tissulaire (peau, tumeur...) :

*désinfection de la peau

*prélèvement au bloc opératoire ou dans salle de prélèvement en conditions aseptiques

*utilisation de bistouri ou pinces stériles

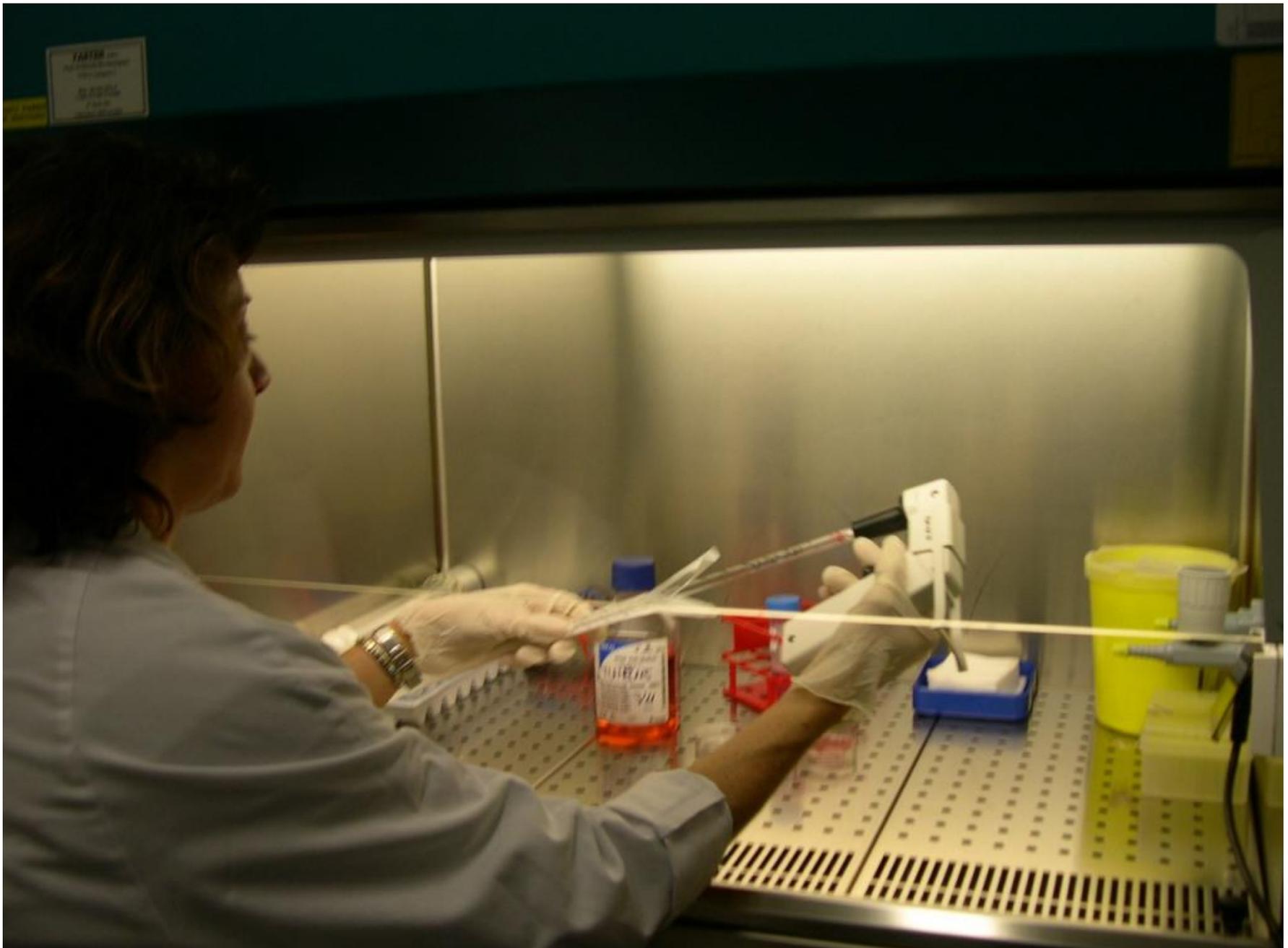
*prélèvement immédiatement déposé dans le flacon de recueil avec milieu de transport stérile

Précautions au laboratoire :

Toutes les manipulations sous hotte à flux laminaire en salle de culture, avec matériel de culture stérile.

Utilité des milieux de culture avec indicateurs colorés (témoins d'une variation de pH associée à la contamination)





QUELQUES EXEMPLES DE MISE EN CULTURE CELLULAIRE



II. MISE EN CULTURE D'UN FRAGMENT TISSULAIRE

- *PRELEVEMENT CUTANE POUR ETUDE DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL (FIBROBLASTES)
- *PRELEVEMENT DE TUMEUR SOLIDE
- *PRELEVEMENT DE PLACENTA

1. Recueil du prélèvement dans un tube contenant du milieu de transport stérile

- *par exemple milieu RPMI 1640, à température ambiante
- *conditions d'asepsie+++

- *taille du prélèvement : taille idéale = 1 cm³ (mais parfois petites biopsies)

- *prélèvement cutané : privilégier un prélèvement profond jusqu'à l'aponévrose plutôt qu'un prélèvement large en surface

- *tumeur : éliminer les zones de nécrose, les caillots sanguins

- * ne jamais laisser un prélèvement à sec; à défaut de milieu de transport : à déposer en serum physiologique stérile





Arrivée du prélèvement
au laboratoire :

Enregistrer le prélèvement

N° d'identification,
date, informations
concernant le patient,
consentement,
données
cliniques...

Noter l'aspect, la taille
de l'échantillon



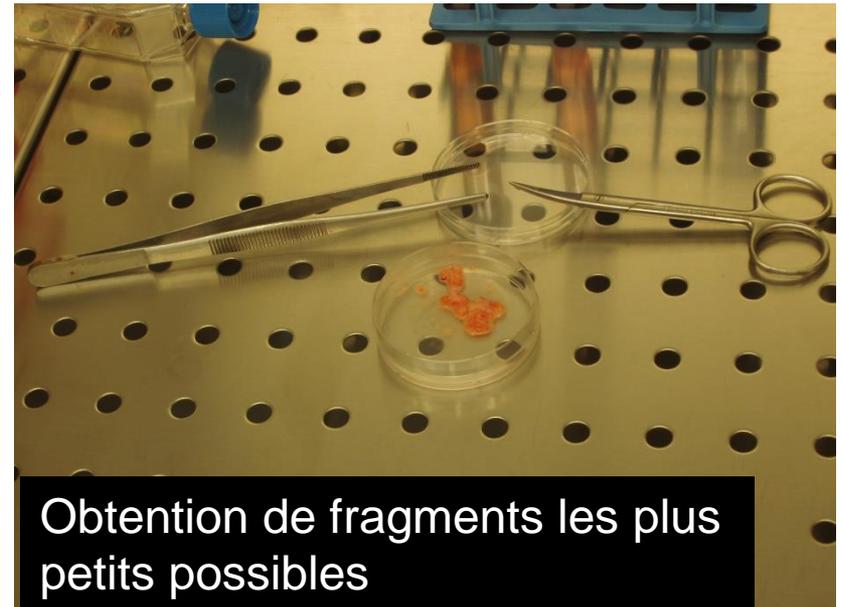
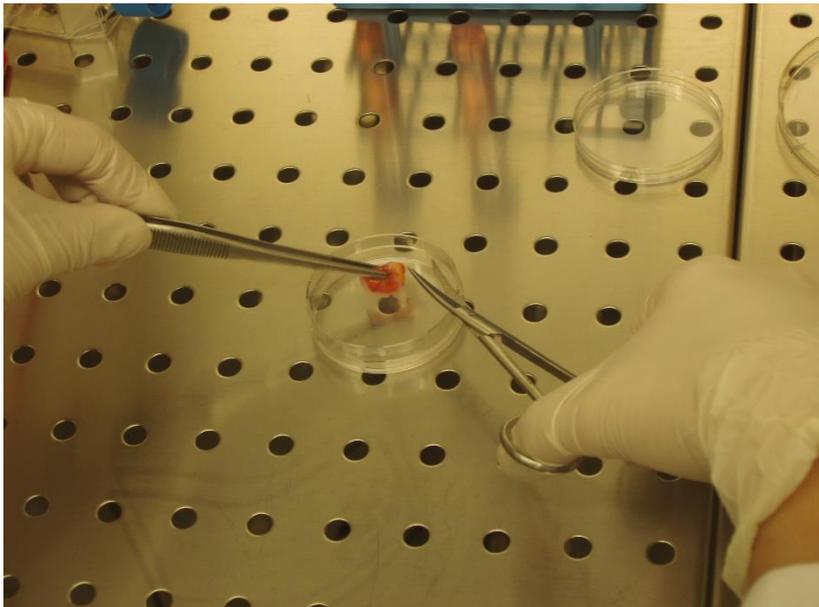
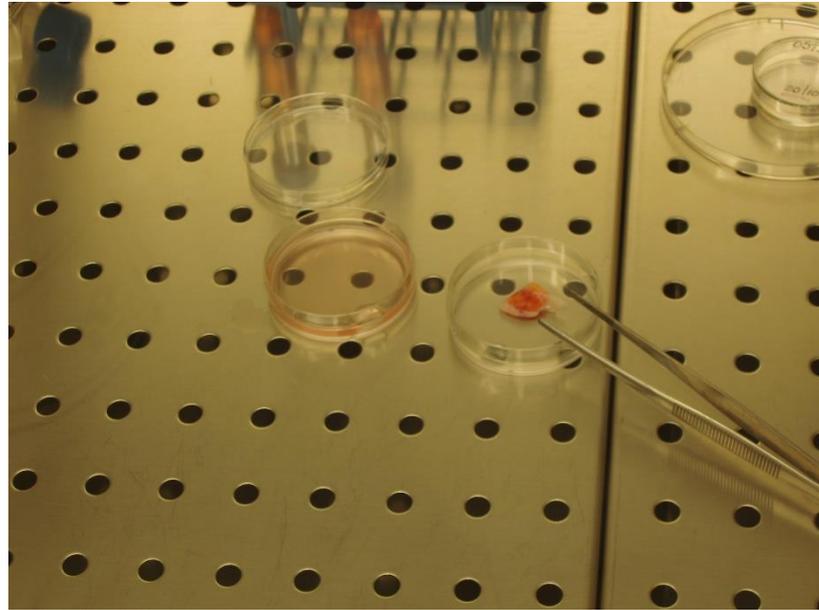
2. Le fragment tumoral est extrait du tube de transport et déposé dans une petite boîte de Petri stérile



Le milieu de transport est parfois conservé (voir étape 8)



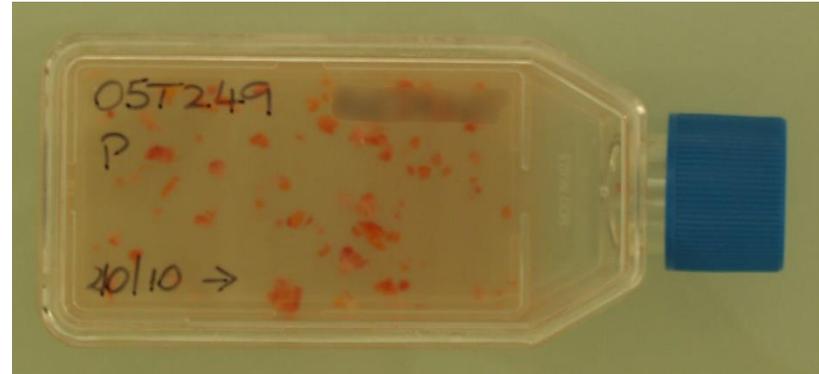
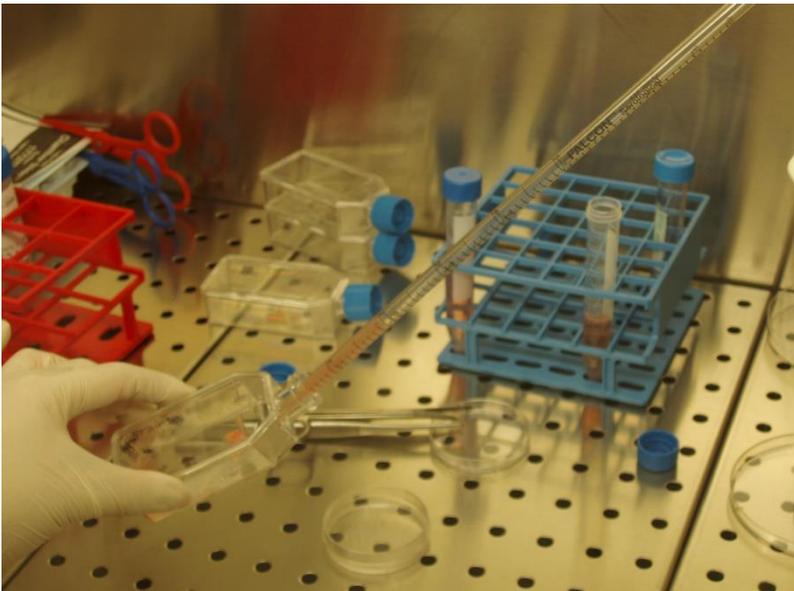
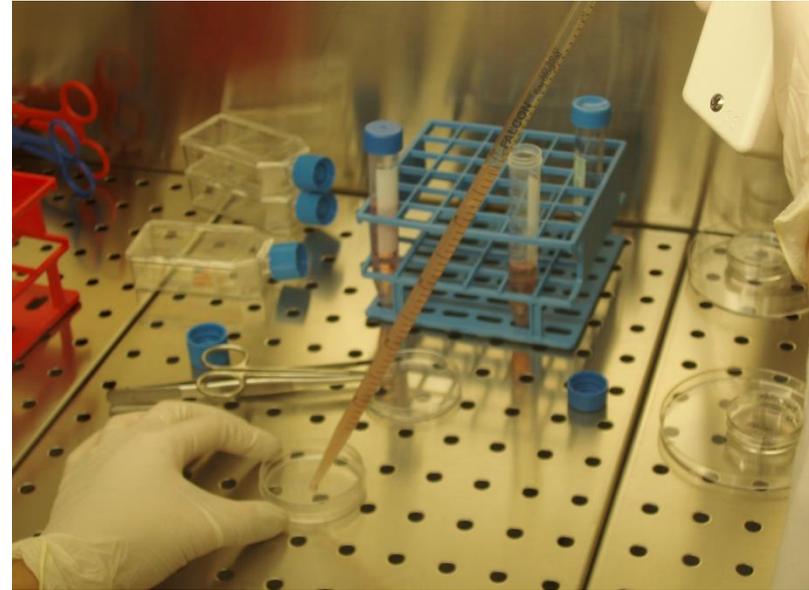
3. Dissociation mécanique (ciseau ou scalpel stérile)



Obtention de fragments les plus petits possibles



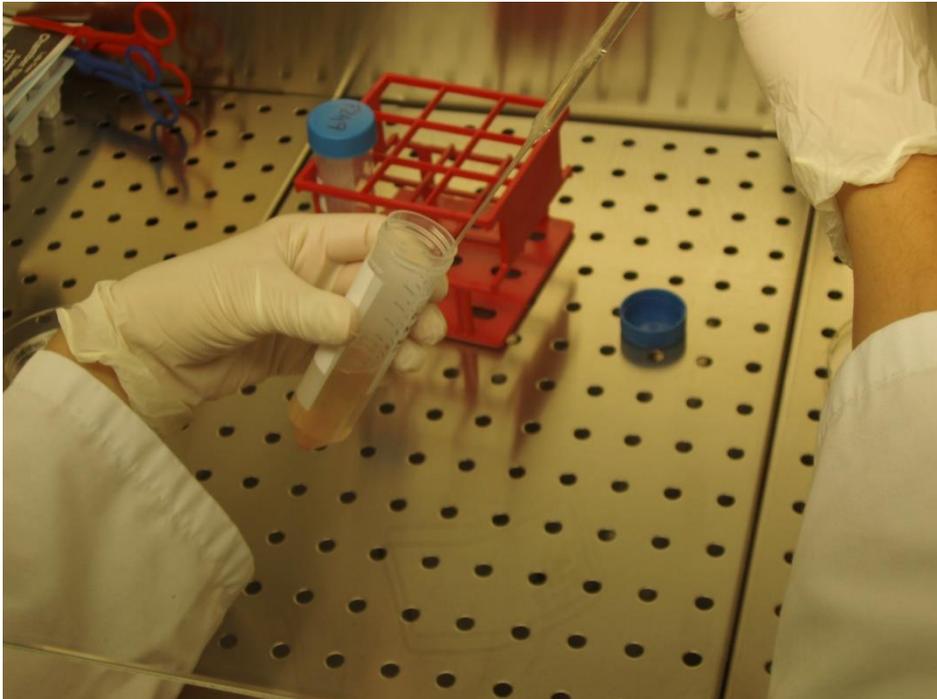
4. Dissociation enzymatique (solution de collagénase; 200U/ml) : complète la dissociation mécanique



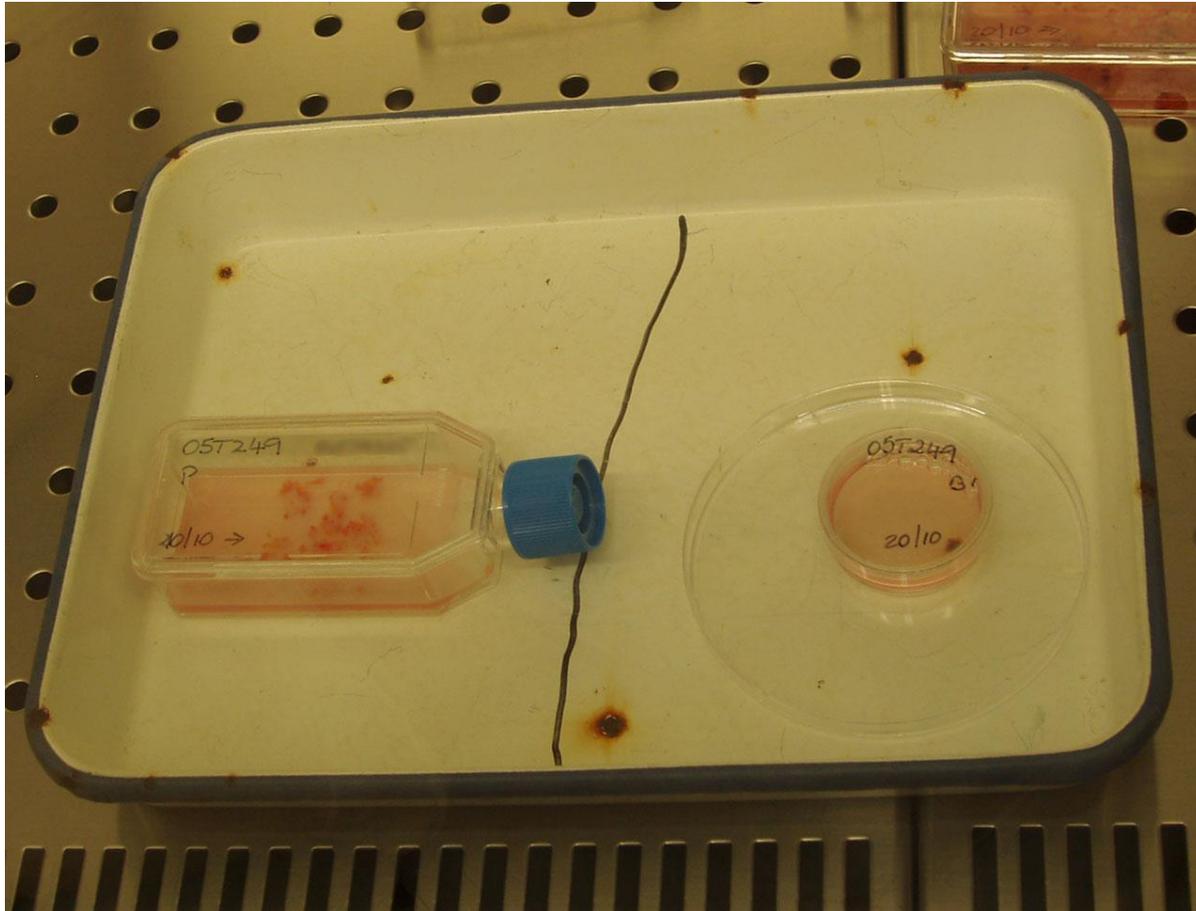
5. Incubation 16 à 72 heures à 37°C dans
RPMI 1640+ 10% serum de veau fœtal
+antibiotiques+collagénase
*Vérification visuelle de l'action de la
collagénase après 16h



6. Rinçage de la collagénase : transfert de la suspension cellulaire dans un tube conique, centrifugation, élimination du surnageant et reprise du culot cellulaire dans du milieu de culture.



7. Transfert des cellules dans un flacon plat et/ou une boîte de Petri puis incubation à 37°C+5% CO2 en atmosphère humide



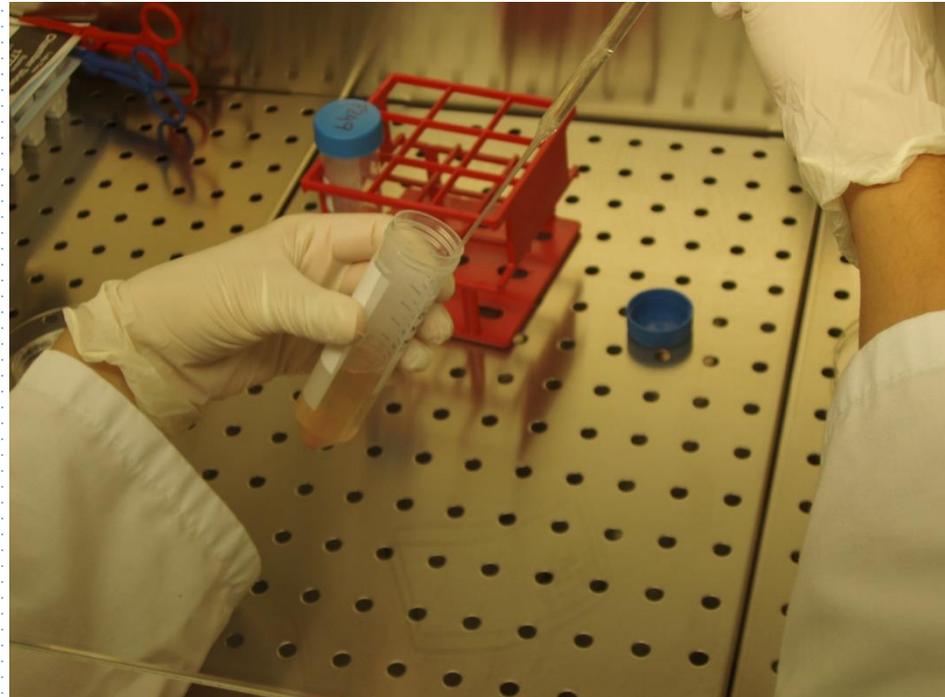


Les cellules en suspension vont sédimenter puis adhérer à la surface du flacon. Après quelques heures, elles commencent à se diviser et à proliférer

8. Facultatif: surtout pour tumeurs, les très petits prélèvements ou les prélèvements « friables » : récupération et ensemencement des cellules en suspension dans le milieu de transport lors de l'arrivée du prélèvement



1. Centrifugation du tube contenant le milieu de transport du prélèvement (800 t/min; 10 min)

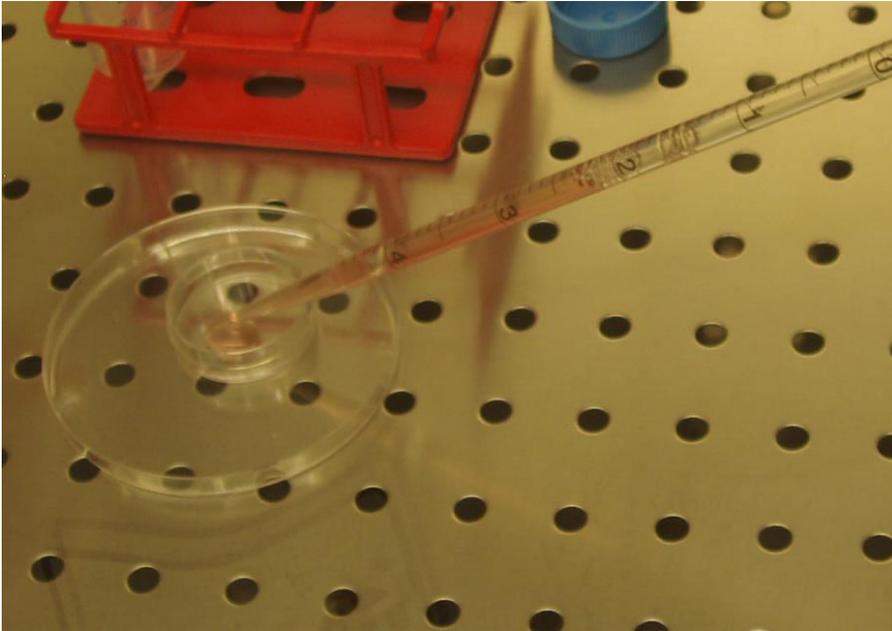


2. Aspiration et élimination du surnageant

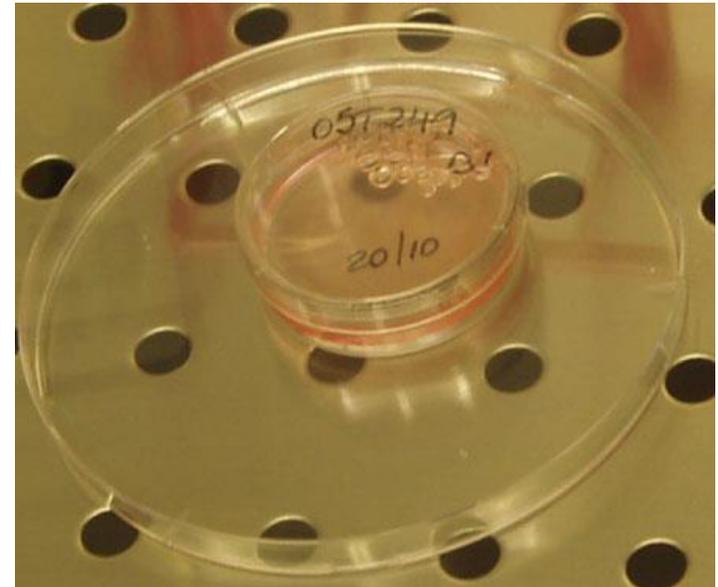
3. Obtention d'un culot cellulaire



4. Suspension du culot cellulaire dans du milieu de culture



5. Incubation à 37°C



Les cellules en suspension vont sédimenter puis adhérer à la surface du flacon. Après quelques heures, elles commencent à se diviser et à proliférer
Complément de la culture des cellules issues de la dissociation du fragment



9-a. Surveillance quotidienne des cultures cellulaires à la loupe binoculaire

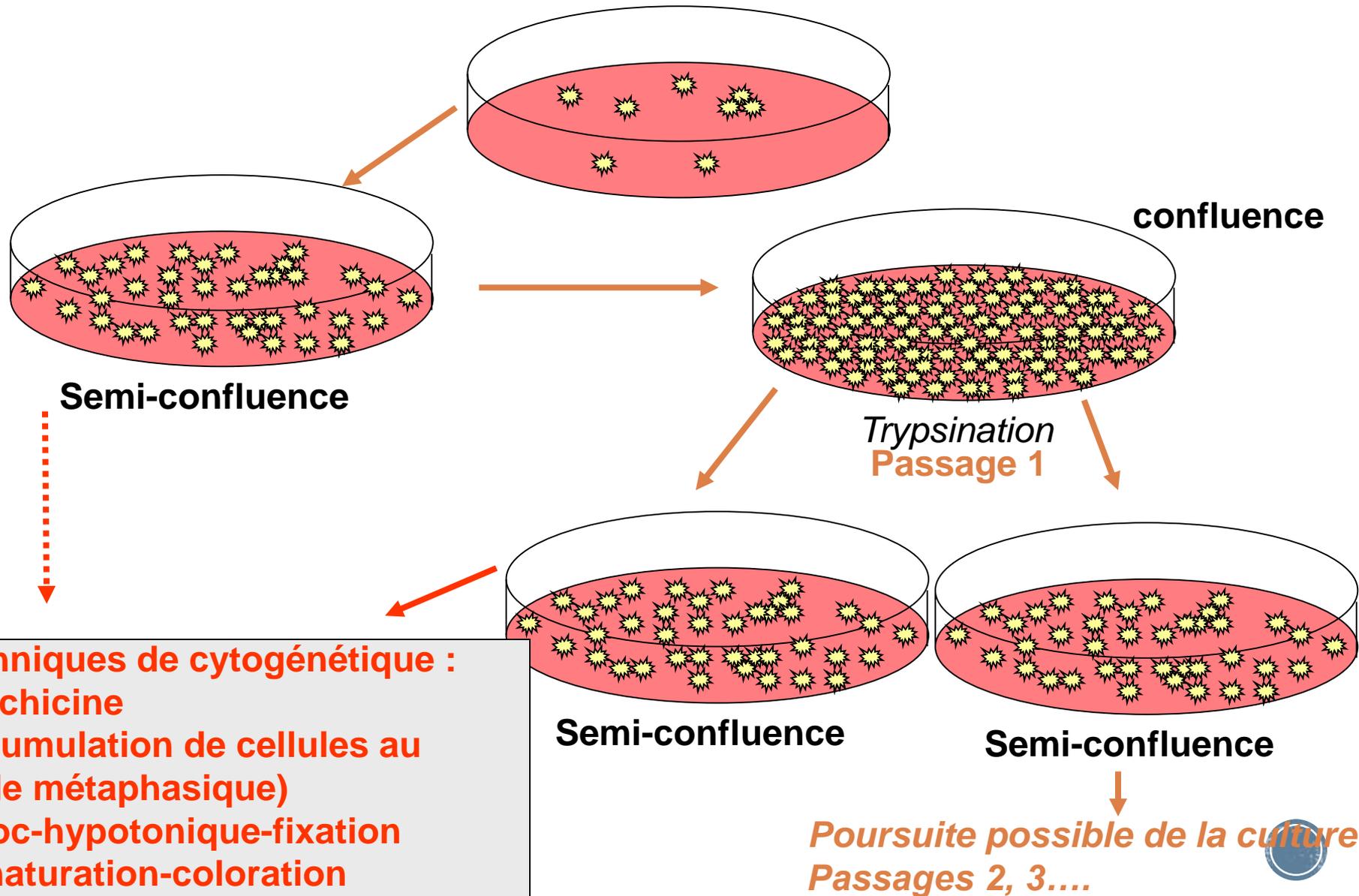


Estimation visuelle de la croissance cellulaire : atteinte de la phase exponentielle de croissance avec nombreuses cellules en mitoses

Prise de décision : arrêt de la culture et récolte des métaphases et/ou établissement de sous-cultures



9-b. Entretien des cultures : changement de milieu, établissement de sous-cultures, contrôle à la loupe binoculaire de la croissance cellulaire
Si mitoses: techniques de cytogénétique pour obtention du caryotype

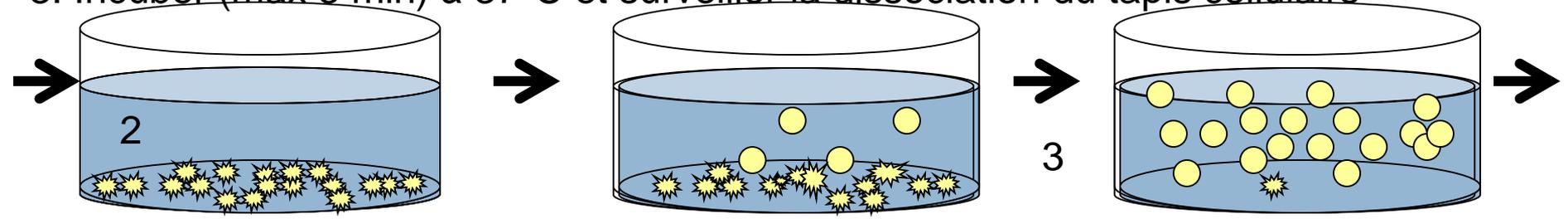
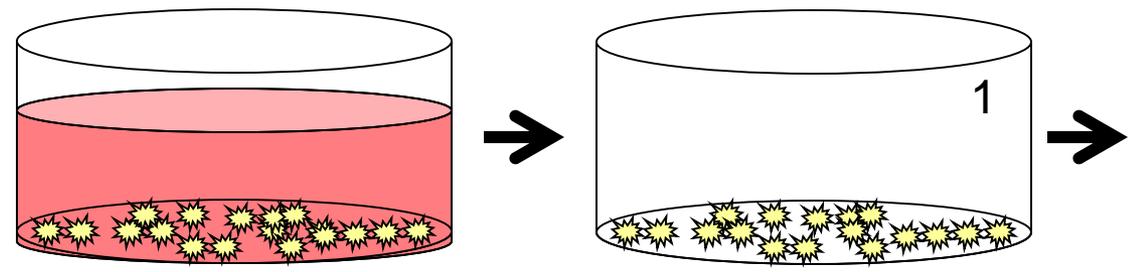


Techniques de cytogénétique :
-Colchicine
(accumulation de cellules au stade métaphasique)
-Choc-hypotonique-fixation
-dénaturation-coloration

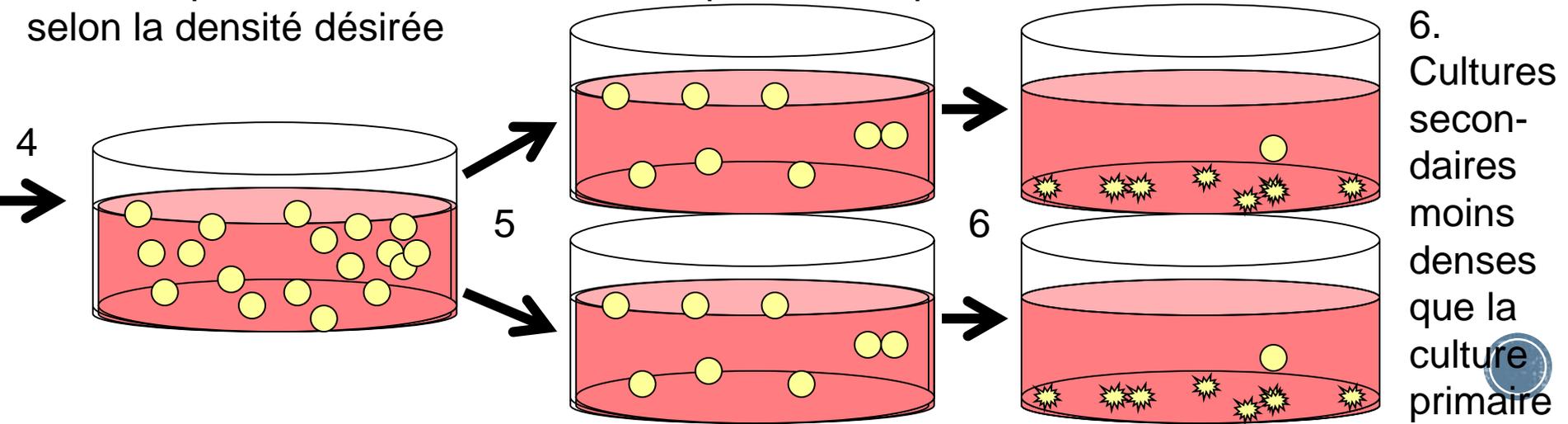
Trypsination (« passage ») : Utilisation d'une enzyme protéolytique (solution de trypsine) pour détacher les cellules -i) les unes des autres -ii) du support

Mode opératoire :

- 1. Aspirer le milieu surnageant, et rincer rapidement avec une solution de trypsine (pour éliminer les traces de milieu)
- 2. Laisser agir environ 0,5 ml à 1 ml de solution de trypsine sur la culture cellulaire
- 3. Incuber (max 5 min) à 37°C et surveiller la dissociation du tapis cellulaire



- 4. Inactiver la trypsine par adjonction de milieu de culture (action du calcium)
- 5. La suspension cellulaire est alors répartie dans plusieurs flacons ou boîtes de culture selon la densité désirée

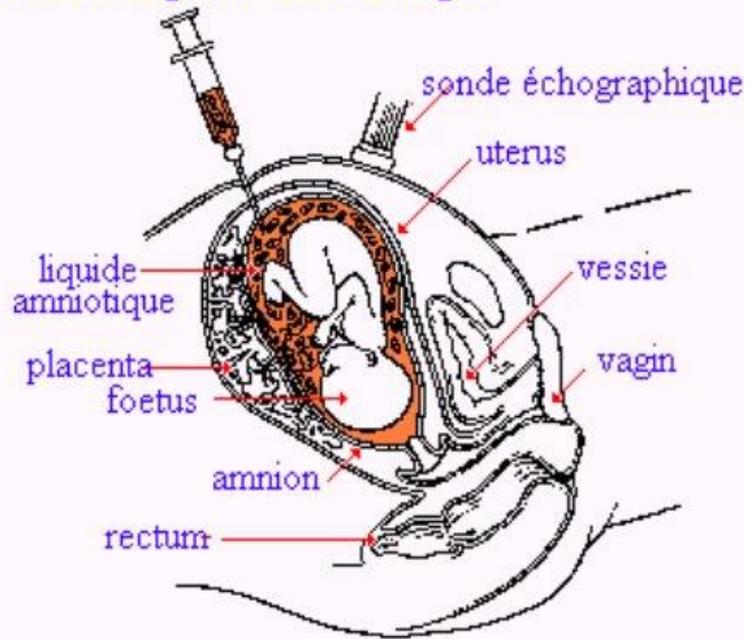


6. Cultures secondaires moins denses que la culture primaire

III. MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT DE LIQUIDE AMNIOTIQUE

- Prélèvement de 10-20 ml liquide amniotique à 15-18 semaines d'aménorrhée
- Les cellules fœtales sont en suspension dans le liquide (jaune clair)

Prélèvement liquide amniotique



Le liquide est transvasé dans des tubes coniques puis centrifugé



MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT DE LIQUIDE AMNIOTIQUE

Après centrifugation:

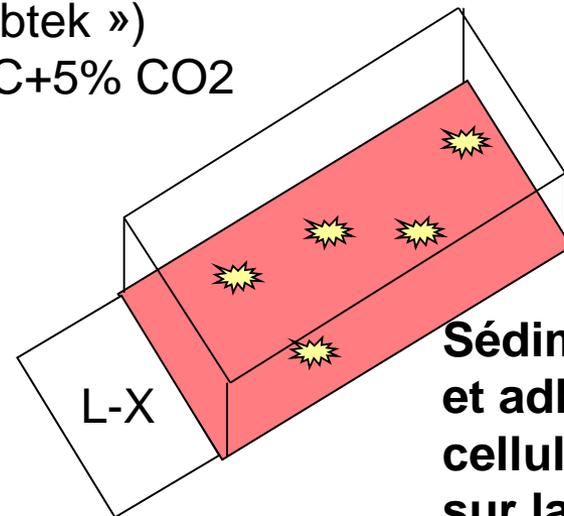
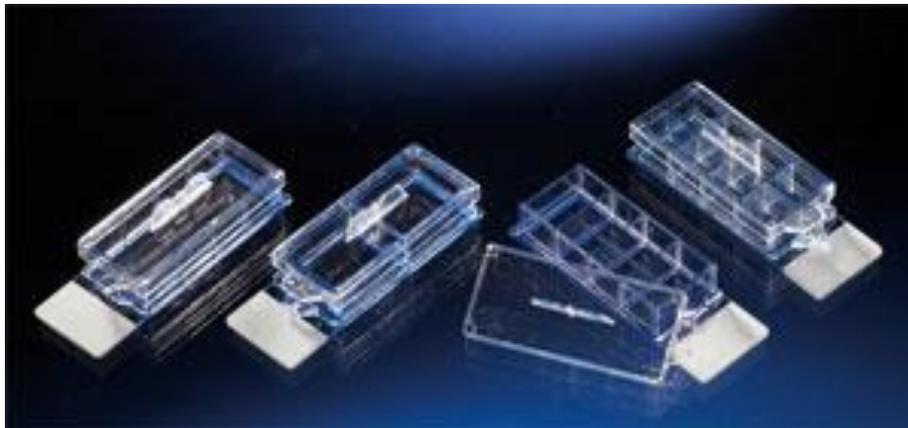
Elimination du liquide surnageant (sauf s'il doit être réservé pour des analyses biochimiques)

Mise en suspension du culot cellulaire dans du milieu de culture (par exemple : milieux « Amniomax », « Chang », « Cytomax »...)

1. Mise en culture « in situ » Méthode de préférence

3 ml de suspension cellulaire sontensemencés dans des petits compartiments à parois latérales plastifiées dont le fond est une lame de verre « chambres de culture » stériles, de type « Labtek »)

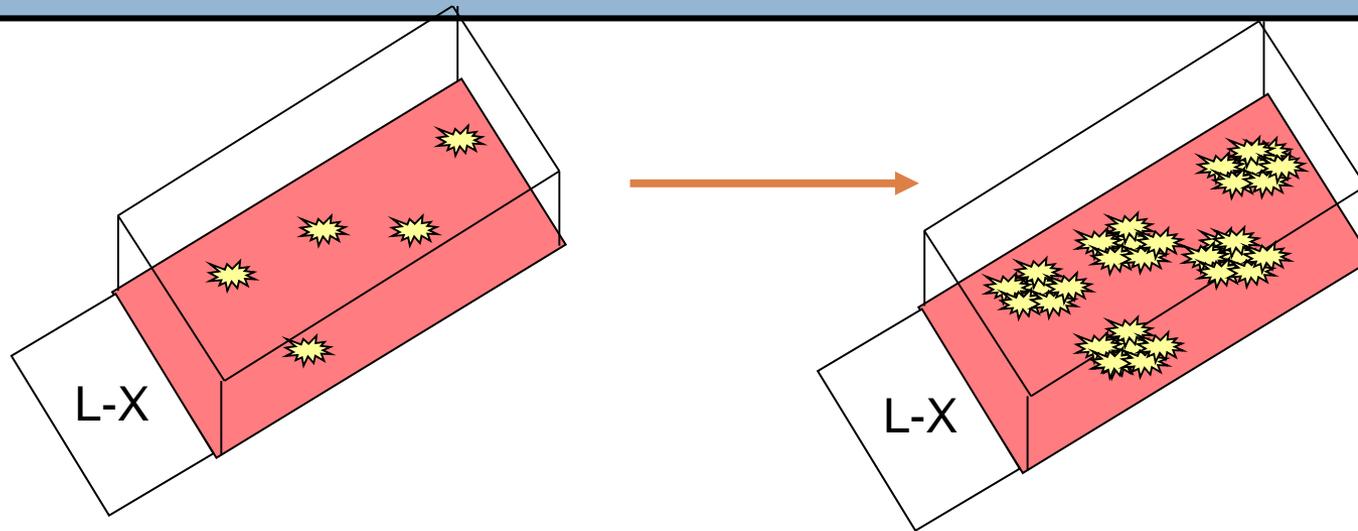
Les chambres de culture sont incubées à 37°C+5% CO₂



**Sédimentation
et adhésion des
cellules isolées
sur la
lame**



MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT DE LIQUIDE AMNIOTIQUE



*Après 24-48 heures : les cellules commencent à se diviser et à proliférer, en formant des clones (ou colonies) cellulaires

*72 heures : inspection visuelle de la culture à la loupe binoculaire et changement du milieu

*Dès que le nombre de clones et leur taille sont jugés suffisants (5-7 jours en moyenne), il est possible de procéder à la **récolte des métaphases « in situ »**

- ajout de colchicine 1h30

- aspiration et élimination du milieu surnageant

- ajout de solution hypotonique

- ajout de fixateur (méthanol 3 volumes: acide acétique 1volume)

- à ce stade : on décolle les parois plastifiées pour ne grader que la lame

- la lame est dénaturée, colorée, séchée et examinée au microscope pour analyse du caryotype



Pourquoi privilégier la méthode de culture *in situ* ?

-1. En raison de la petite taille de la surface de culture, il est possible de réaliser la récolte des métaphases rapidement (5-7 jours)

-2. La culture de clones bien distincts permet de faire la différence entre un mosaïcisme vrai et un pseudo-mosaïcisme : très important en diagnostic prénatal

mosaïcisme : présence d'une anomalie sous forme hétérogène (généralement une anomalie numérique) - phénomène rare

mosaïcisme vrai : il y a réellement chez le fœtus une population cellulaire avec anomalie chromosomique, de représentation variable selon les tissus ex: gonosomes (X ou Y), trisomie 21, trisomie 8, trisomie 20... et une population cellulaire sans anomalie

pseudo-mosaïcisme : il s'agit d'une anomalie non présente chez le fœtus, qui est survenue *in vitro*, lors de la culture cellulaire (artefact de culture). Elle n'est pas représentative des cellules du fœtus



MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT DE LIQUIDE AMNIOTIQUE

Pourquoi privilégier la méthode de culture in situ ?

Selon :

- Le nombre de cellules anormales dans un clone,
- Le nombre de clones anormaux
- La présence de l'anomalie a été observée dans une seule ou plusieurs chambres de culture,
- Le type de chromosome impliqué

Il existe des **règles de conduite** à tenir pour réaliser des contrôles afin de déterminer la conduite à tenir (exemple:

examen de 24 clones supplémentaires provenant d'autres chambres de culture)



Lamé 1



Lamé 2

Pseudo-mosaïcisme



Lamé 1



Lamé 2

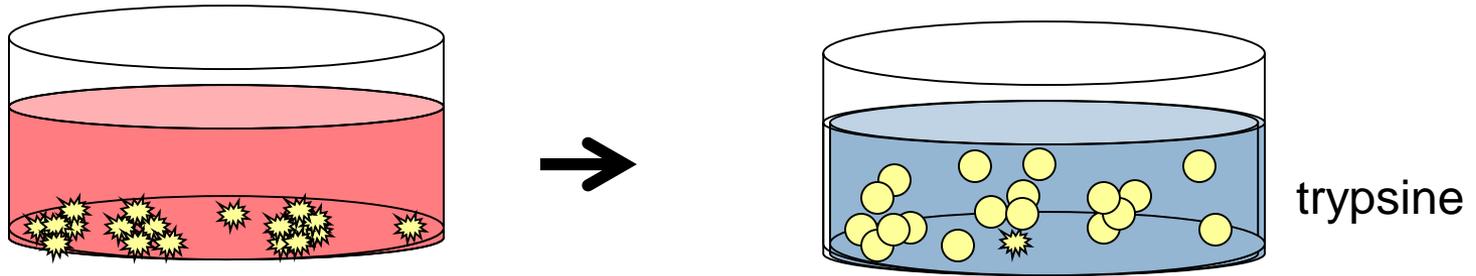
Mosaïcisme vrai



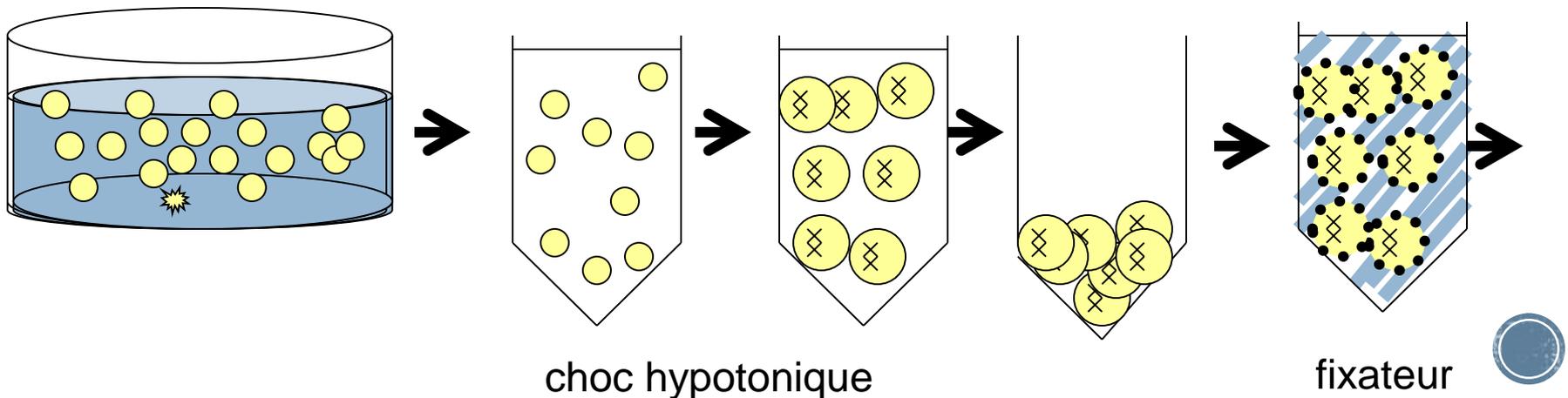
MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT DE LIQUIDE AMNIOTIQUE

2. Mise en culture « panmictique »

-Les cellules adhèrent au fond du flacon, prolifèrent en formant des clones.
A semi-confluence, elles sont soumises à l'action de la trypsine

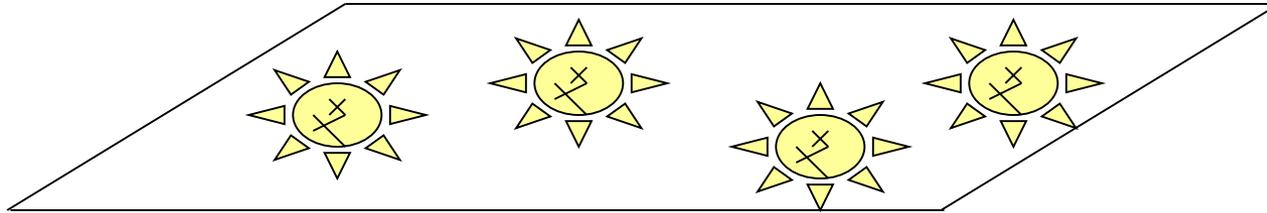


-Les cellules sont décollées par action de la trypsine et transvasées dans un tube à centrifuger puis soumises à l'action d'une solution hypotonique (« choc hypotonique ») puis de fixateur



MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT DE LIQUIDE AMNIOTIQUE

La suspension cellulaire fixée est étalée sur des lames qui sont traitées pour dénaturer et colorer les chromosomes puis étudier le caryotype

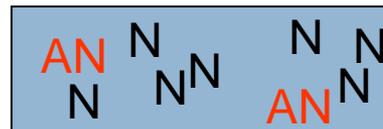


Avantages

- Après décollement par la trypsine, une partie des cellules peut être remise en culture et servir de « réserve » alors que l'autre est traitée pour obtention du caryotype
- Les chromosomes sont souvent de meilleure qualité que les chromosomes obtenus par arrêts in situ
- La suspension cellulaire métaphasique fixée restante peut être conservée plusieurs années à -20°C

Inconvénients

- Les cellules ayant été mélangées, il n'est pas possible de reconnaître le type de mosaïcisme en cas de présence d'une ou quelques cellules à caryotype anormal



?



IV. MISE EN CULTURE D'UN PRELEVEMENT SANGUIN EN VUE DE L'ETABLISSEMENT D'UN CARYOTYPE LYMPHOCYTAIRE

Recueil de sang veineux sur tube hépariné, (héparinate de lithium: tubes à bouchons verts), transport à température ambiante

Ensemencement de 0,5 ml de sang total dans 8 ml de milieu (RPMI 1640+ 10% serum de veau foetal+L-Glutamine+antibiotique) en présence d'un mitogène : phytohémaglutinine (PHA)

Culture cellulaire en suspension à court terme :

Incubation à 37°C :

-16 ou 24 heures (cas urgents/ moins bonne qualité des métaphases)

-72 heures ou 96 heures



Facultatif : techniques de synchronisation

La veille de l'arrêt de la culture, ajouter au milieu 400µl d'uridine et 100µl de 5-fluorodeoxyuridine (FRDU, analogue de la thymidine)

= blocage en milieu de phase S

17 heures après: ajouter 100µl de thymidine pendant 5h30, puis récolte des métaphases

Récolte des métaphases :

Colchicine pendant 1h30,

Choc hypotonique (KCl 0,075M),

Fixation méthanol:acide acétique (3:1),

Etalement sur lame des suspensions cellulaires fixées

Dénaturation; coloration

Analyse du caryotype



V. CONGELATION/DECONGELATION DE SUSPENSION CELLULAIRES

1. Cryoconservation : congélation d'une suspension cellulaire

- Sous hotte, conditions aseptiques
- Après dissociation à la collagénase, ou après culture cellulaire et passage
- En présence d'un cryoprotecteur (diméthylsulfoxyde (DMSO) ou glycérol) et de serum de veau foetal
- Refroidissement progressif (4°C, puis -20°C, puis -80°C) pour éviter la formation de cristaux intra-cellulaires et conservation en azote liquide (-195°C)
- Traçabilité: annotation des données concernant la congélation

2. Décongélation d'une suspension cellulaire

- Sous hotte, conditions aseptiques
- A 37°C dans milieu de culture
- Rinçage pour éliminer DMSO
- Poursuite de la culture en conditions habituelles
- Vérification du caryotype importante

