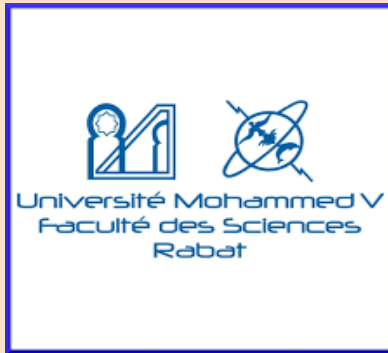




BIOLOGIE CELLULAIRE

S1

BENJELLOUN. J

CHERKAOUI. S

LAYACHI. R

**TD2 Fractionnement cellulaire et
culture de cellules**

1- Fractionnement cellulaire

- Technique qui permet d'isoler les organites cellulaires tout en conservant intactes leur structure et leurs propriétés physiologiques.
- Cette technique comporte 3 étapes :
 - broyage (homogénéisation)
 - centrifugation différentielle
 - purification des constituants cellulaires par centrifugation en gradient de densité

1-1- Broyage (homogénéisation)

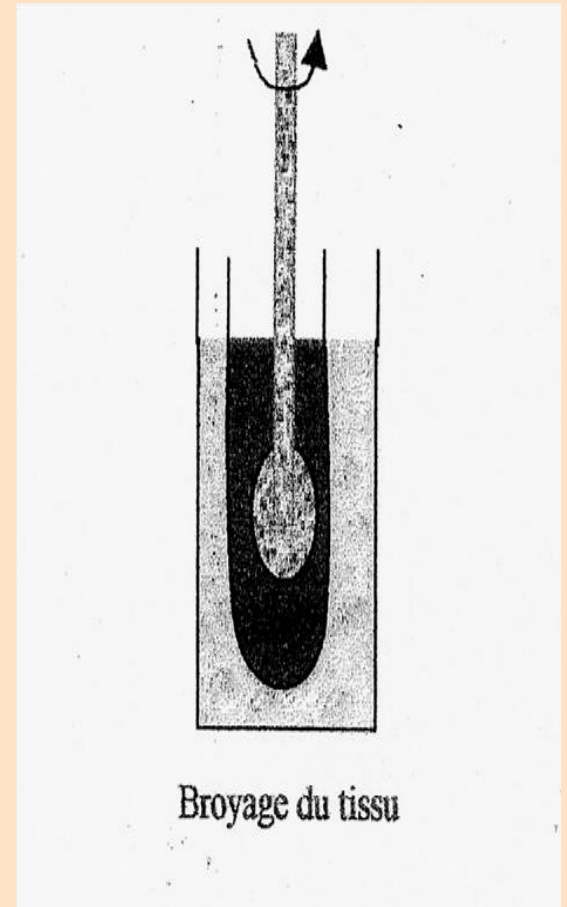
Le tissu cellulaire est broyé à 0°C (pour annuler l'activité enzymatique):

- dans une solution de saccharose isotonique par rapport au milieu intracellulaire pour éviter les échanges d'eau.

- puis dans une solution à pH constant pour éviter les échanges de protons.



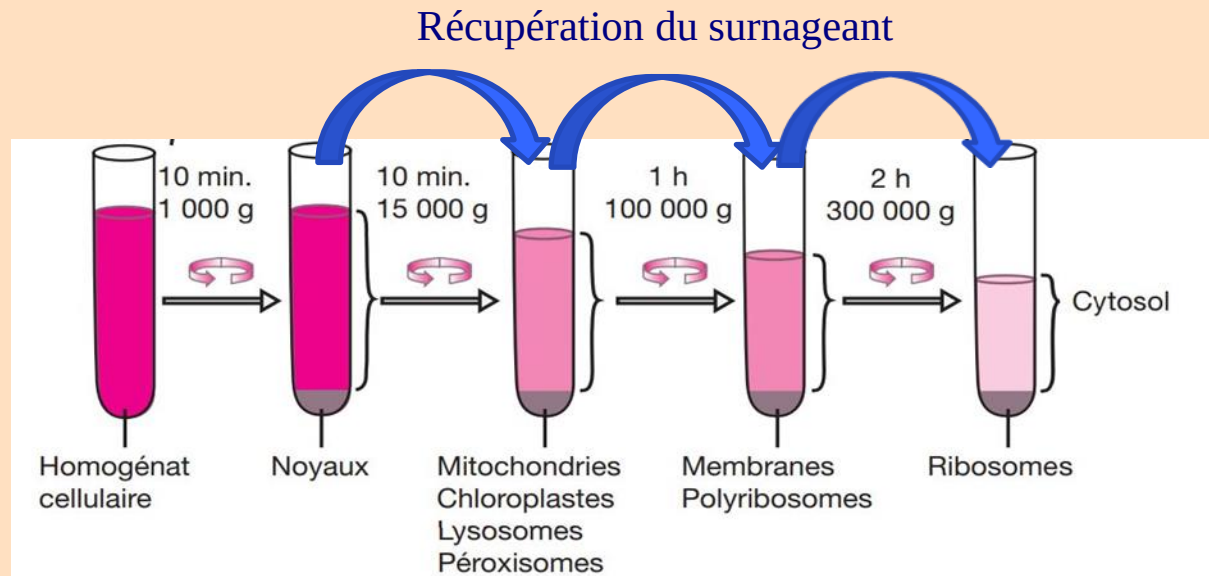
On obtient une suspension ou homogénat où sont dispersés les organites cellulaires vivants.



Fractionnement d'un tissu cellulaire par centrifugation

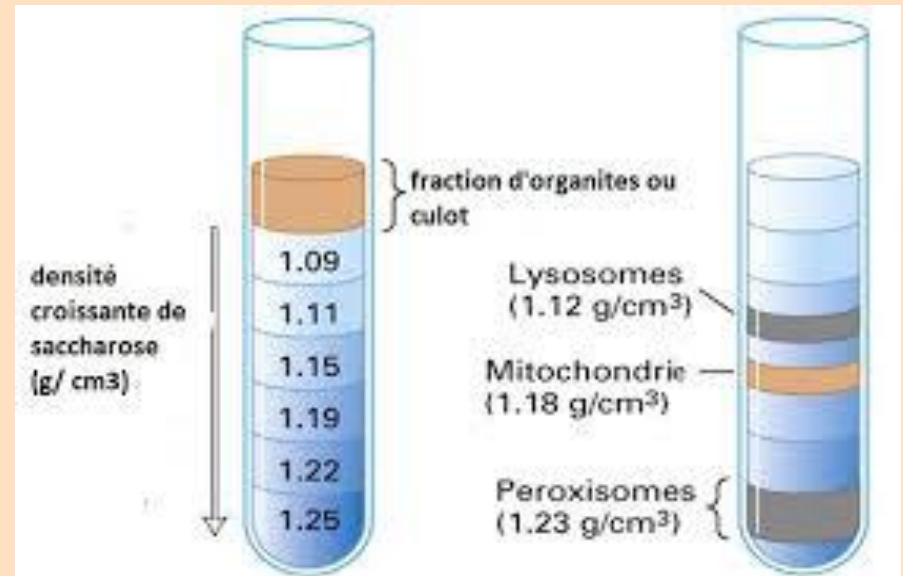
1-2- Centrifugation différentielle

- 1^{ère} centrifugation brève et à faible vitesse $\Rightarrow$ sédimentation des organites les plus lourds (noyaux) qui se séparent du surnageant contenant les particules les plus légères.
- Centrifugation du surnageant plus longtemps avec une vitesse plus élevée etc....
- Dernier surnageant: hyaloplasme qui contient des protéines (des enzymes libérés par le broyage), des acides aminés mais pas d'organites.



1-3 - Centrifugation en gradient de densité de saccharose

- Introduction dans le tube d'une solution de saccharose dont la cct molaire augmente du haut vers le bas (gradient)
- Etalement de la fraction à purifier en une fine couche sur la dernière solution de saccharose
- Centrifugation



3h, 40.000 rpm

Migration des organites selon leur densité et stabilisation dans des zones de saccharose de densité identique puis récupération des organites isolés, **vivants et fonctionnels**.

2- Culture cellulaire

2-1 Définition

Désigne un ensemble de techniques utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme (ex-vivo) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation in vitro.

Utilisée dans:

- Etudes de toxicologie:
- Etudes chromosomiques (caryotype fœtal)
- Suivi du déroulement de la mitose, dans les conditions normales ou après application de substances antimitotiques.
- Production de peau neuve par culture pour autogreffe (pour les grands brûlés).
- Culture de virus (production de vaccin ou diagnostic).
- Observation des cellules cancéreuses et leur comportement.

2-2- Conditions de stérilisation

Dans des conditions stériles ou d'asepsie, garantissant l'absence de toute contamination: autoclavage, filtres millipores, antibiotiques, sous hotte à flux laminaire (courant d'air stérile).

2-3- Conditions d'incubation des cultures

La fragilité des cultures cellulaires impose le contrôle strict des conditions de l'environnement: T° , humidité, photopériode (dans un incubateur ou chambre de culture).



2-4- Évolution des cellules en culture

- **Cellules normales:** Se multiplient rapidement. En quelques jours, lorsque tout le milieu est recouvert, les mitoses s'arrêtent, les cellules meurent. Ce mécanisme d'arrêt est **l'inhibition de contact** qui dépend de la transmission de signaux entre les cellules
⇒ nécessité de repiquages pour conserver des cellules longtemps (mais elles ne sont pas immortelles).
On peut réaliser des cultures à partir d'une seule cellule. Toutes les cellules issues de cette multiplication constituent un **clone**: elles possèdent toutes le même patrimoine génétique.
- **Cellules cancéreuses:** Les cellules cancéreuses ont perdu l'inhibition de contact et donc le signal d'arrêt des divisions : elles sont devenues immortelles. Leur mort est conditionnée uniquement par l'appauvrissement du milieu de culture. Des repiquages successifs les maintiennent en vie.