
Chapitre 6. Culture de cellules isolées (support solide et en agitation)

1.Introduction

Avec l'avancement de la technologie, il est possible aujourd'hui de cultiver des cellules individuelles, et induire la division cellulaire et d'en faire sortir une plante entière. L'avantage d'une culture cellulaire isolées sur culture de cals ou de suspensions cellulaires ou culture d'organes intacts est que le système de culture cellulaire unique est un système idéal pour étudier le métabolisme cellulaire, l'effet de diverses substances sur les réponses cellulaires et obtenir un clone cellulaire unique.

Les cellules libres dans les cultures permettent une administration et un retrait rapide de divers produits chimiques ou substances, ce qui en fait des cibles faciles pour la sélection des mutants.

La culture de cellules individuelles est une méthode de culture de cellules isolées sur un milieu nutritif dans des conditions contrôlées.

2.Principe de la culture cellulaire unique :

Le principe de base est l'isolement d'un grand nombre de cellules vivantes intactes et les cultiver sur un milieu nutritif approprié pour la croissance et le développement requis. Les cellules individuelles peuvent être isolées à partir d'une variété de tissu et d'organe ainsi que de tissu calleux et de suspension cellulaire (**Figure 35**).

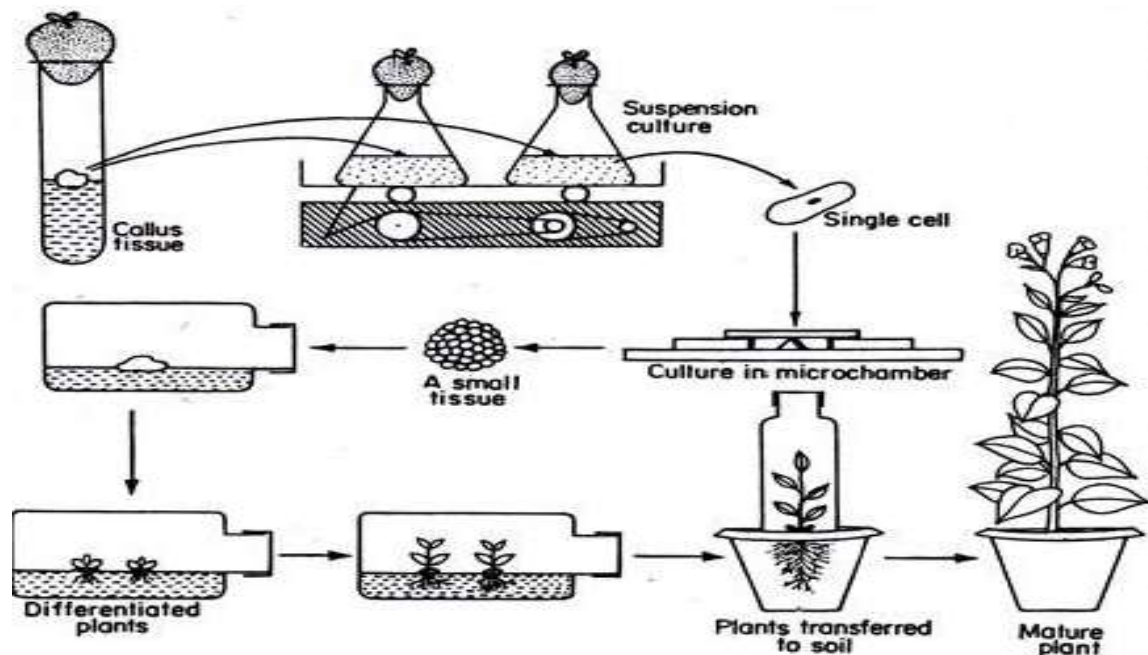


Figure 35. Principe de la culture cellulaire unique (*Tabac*)

3.Méthodes d'isolation cellulaire unique

A) De l'organe de la plante :

Le matériau le plus approprié pour l'isolement de cellules individuelles est le tissu foliaire, car une population plus ou moins homogène de cellules dans les feuilles offre de bons candidats pour élever une culture cellulaire à grande échelle définie et contrôlée.

A partir de tels organes végétaux intacts, des cellules uniques peuvent être isolées en utilisant des méthodes mécaniques ou enzymatiques.

i) Méthode mécanique :

L'isolation mécanique consiste à déchirer ou à hacher l'explant stérilisé en surface pour exposer les cellules, puis à mettre les cellules au rebut avec un scalpel fin pour libérer les cellules individuelles en espérant qu'elles ne sont pas endommagées.

La procédure implique une macération modérée de 10 g de feuilles dans 40 ml de milieu de broyage (20 μ mol de saccharose, 10 μ mol de $MgCl_2$, 20 μ mol de tampon tris-HCL, Ph7,8) avec un mortier et un pilon.

L'homogénat est passé à travers deux couches de tissu de mousseline et les cellules ainsi libérées sont lavées par centrifugation à basse vitesse en utilisant le même milieu.

L'isolement mécanique des cellules parenchymateuses libres peut également être réalisé à grande échelle.

ii) Méthode enzymatique :

Takebe et.al. (1968) ont traités du tissu de feuille de tabac avec de l'enzyme pectinase et obtenu un grand nombre de cellules métaboliquement actives. Le sulfate de dextrane et de potassium dans le mélange d'enzymes a amélioré le rendement en cellules libres.

B) à partir de tissu de culture :

L'approche la plus largement appliquée consiste à obtenir un système à une seule cellule à partir de tissus cultivés. Des morceaux fraîchement coupés d'organes végétaux

stérilisés en surface sont simplement placés sur un milieu nutritif constitué d'une proportion appropriée d'auxines et de cytokinines pour initier des cultures.

Explanter sur un tel milieu callusing aux extrémités coupées, qui s'étend progressivement à la surface entière du tissu.

Le cal est séparé d'un explant et transféré sur un milieu frais de la même composition pour lui permettre de constituer un tissu de masse.

Une sous-culture répétée sur un milieu gélosé améliore la friabilité du cal, pré-requis pour élever une fine suspension cellulaire dans un milieu liquide.

Le morceau de callus indifférencié et friable est transféré dans un milieu liquide agité en continu constitué d'un flacon appropriés.

L'agitation est faite en plaçant le milieu de culture exerce une légère pression sur les petits morceaux de tissu, les brisant en cellules libres et en agrégats de petites cellules. En outre, il augmente l'échange de gaz entre le milieu de culture et l'air de culture et assure également une distribution uniforme des cellules dans le milieu.

4. Facteurs affectant la culture cellulaire :

*La composition du milieu pour la croissance d'une culture cellulaire unique est généralement plus complexe que la culture de cals et de cellules en suspension.

*Dans le cas de la technique de placage de boîte de Pétri, la densité de cellules de placage initiale est très critique.

5. Méthodes de culture cellulaire isolées

Méthode 1. Technique de culture en radeau de papier :

1. Les cellules individuelles sont isolées à partir de cultures en suspension ou d'un cal friable à l'aide d'une micropipette ou d'une micro-spatule.
2. Quelques jours avant l'isolement cellulaire, des carrés stériles de 8 mm x 8 mm de papier filtre sont placés de manière aseptique sur la surface supérieure du tissu calleux en croissance active de la même espèce ou d'espèces différentes.
3. Le papier filtre sera mouillé en imbibant l'eau et les nutriments du calus tissue.
4. La cellule isolée est placée de manière aseptique sur le radeau de papier filtre humide.
5. L'ensemble du système de culture est incubé sous 16 heures. Lumière blanche froide (3000 lux) ou dans l'obscurité continue à 25 ° C.
6. La cellule unique se divise et forme une petite colonie de cellules. Elle est transférée dans un milieu frais où elle donne naissance au tissu calleux.

Le tissu calleux, sur lequel se développe la cellule unique (tissu infirmier) fournit à la cellule les nutriments du milieu de culture, ma. La cellule unique absorbe les nutriments à travers du papier filtre. Les nutriments diffusent en fait vers le haut à partir du milieu de culture à travers le tissu calleux et le papier filtrant vers la cellule unique. Un tissu calleux provenant d'une seule cellule est connu sous le nom de clone de cellule unique.

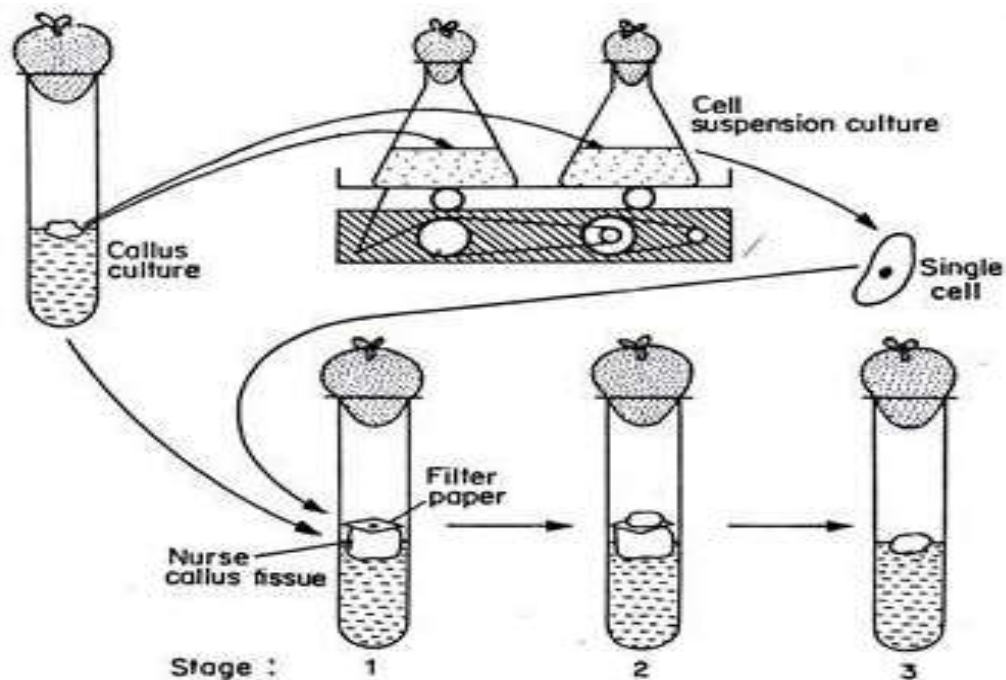


Figure 36. Technique de culture en radeau de papier

Méthode 2. Technique de placage de la boîte de Pétri :

1. Une suspension est préparée de manière aseptique à partir de la culture de suspension de cellules mères par filtration et centrifugation. La densité cellulaire requise est ajustée en ajoutant ou en réduisant le milieu liquide.
2. Le milieu solide (1,6% d'agar ajouté) est fondu au bain-marie.
3. Devant le flux d'air laminaire, le couvercle étanche de la boîte de Pétri est ouvert, à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée, 15ml de suspension sont mis à une quantité égale de milieu de gélose (refroidit à 35°C).
4. Le couvercle est rapidement remplacé et le plat entier est agité doucement pour disperser le mélange de cellules et de milieu uniformément dans la moitié inférieure.
5. On laisse le milieu se solidifier et la boîte de Pétri est maintenue en position inversée.
6. Les cultures sont incubées sous 16 h de lumière blanche froide (3 000 lux) ou sous une obscurité continue à 25 °C.
7. Les boîtes de Pétri sont observées sous microscope inversé à intervalles réguliers pour voir si les cellules se sont divisées ou non.
8. Après incubation, lorsque les cellules commencent à se diviser, une grille est dessinée sur la face inférieure de la boîte pétri pour faciliter le comptage de cellules en division.
9. Les cellules en division forment finalement des colonies de cellules en forme de tête d'épingle dans 21 jours suivant l'incubation.
10. L'efficacité de placage peut être calculée à partir du comptage des colonies cellulaires.
11. Les colonies en forme de tête d'épingle, lorsqu'elles atteignent une taille appropriée, sont transférées dans un milieu frais pour une croissance ultérieure.

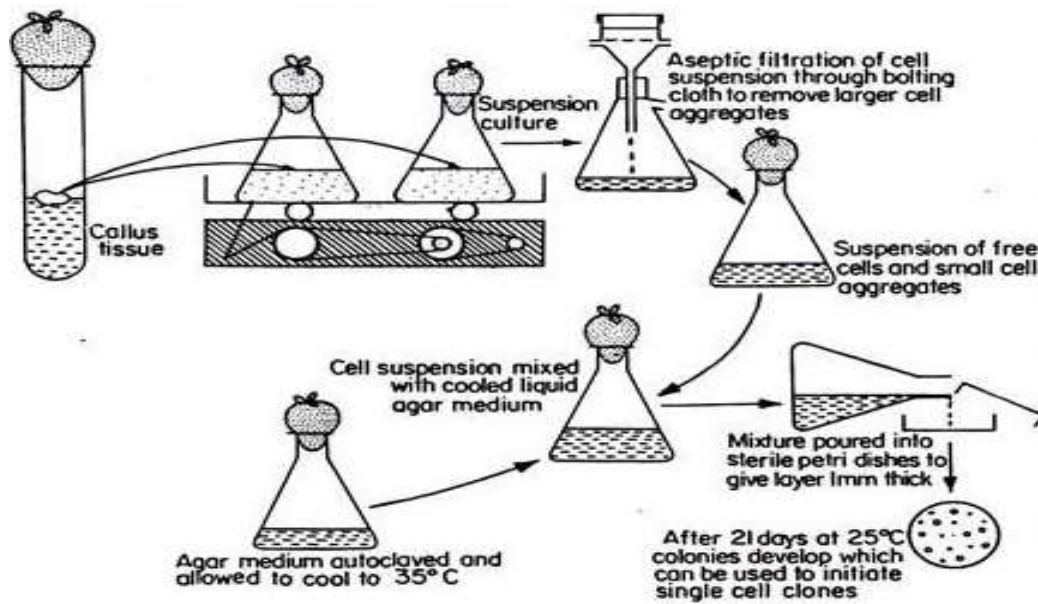


Figure 37. Technique de placage de la boîte de Pétri

Méthode 3. Technique de micro-chambre

1. Une goutte de milieu nutritif liquide contenant une seule cellule est d'abord isolée de manière aseptique de la culture en suspension mère à l'aide d'une pipette Pasteur fine.
2. La goutte de culture est placée au centre d'une lame microscopique stérile (25 x 75 mm) et entourée d'huile de paraffine stérile.
3. Un couvercle en verre (appelé rehausseur) est placé sur chaque goutte d'huile.
4. Un troisième couvercle en verre est ensuite placé sur la goutte de culture reliant les deux couvre-verres rehausseurs et formant une micro-chambre pour enfermer de manière aseptique la cellule unique dans l'huile de paraffine. L'huile empêche la perte d'eau de la goutte de culture mais permet un échange gazeux.
- 5 La lame de micro-chambre entière est placée dans une boîte de Pétri et est incubée sous 16 heures. Éclairage blanc froid (3000 lux) à 25°C.
6. La colonie cellulaire dérivée donne lieu à un clone de cellule unique.
7. Lorsque la colonie cellulaire devient suffisamment grande, le couvercle en verre est enlevé et le tissu est transféré sur un milieu solide ou semi-solide frais.

La technique de la micro-chambre permet une observation régulière de la cellule en croissance et en division.

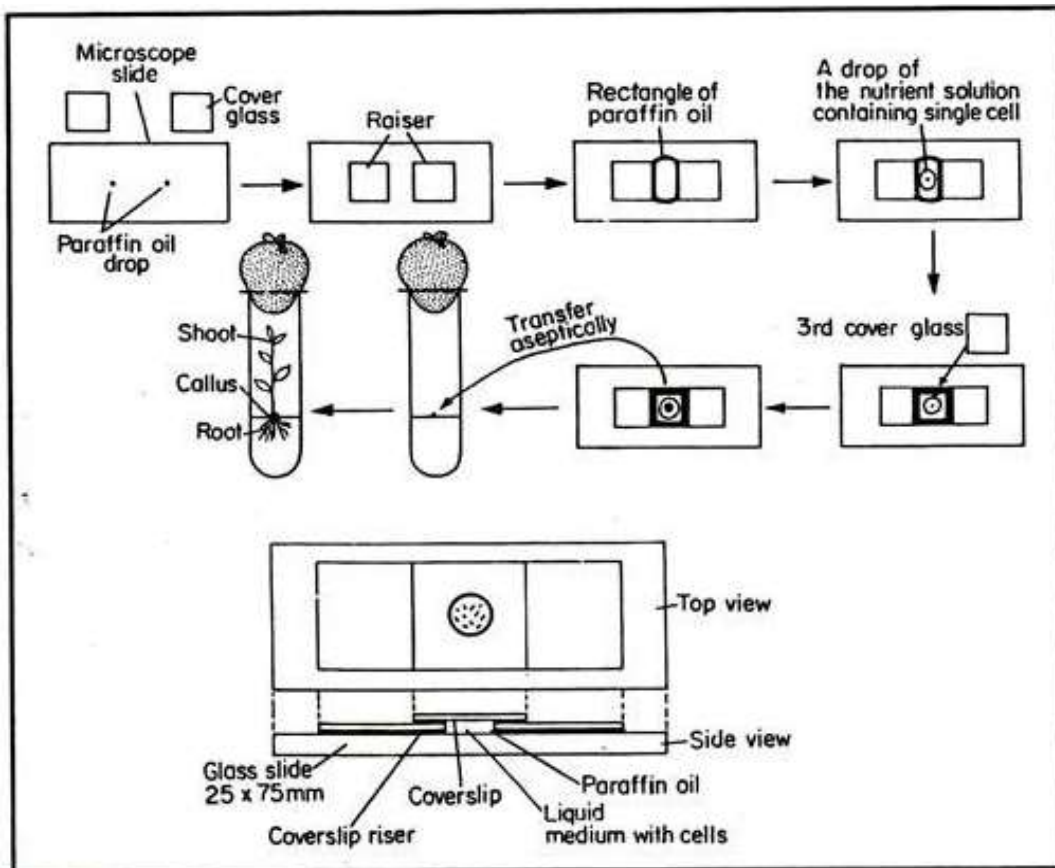


Figure 38. Technique de micro-chambre

Méthode 4. Technique de cals nourrice

Cette méthode est en fait une modification de la méthode de placage de la boîte pétri et de la méthode de culture en radeau de papier.

Des cellules individuelles sont plaquées sur du milieu gélose dans une boîte de pétri. Deux ou trois masses de cal (tissu nourrice) dérivées du même tissu végétal sont également incorporées directement avec les cellules individuelles dans le même milieu.

Ici, la barrière en papier entre les cellules individuelles et le tissu nourrice est à nouveau déplacé.

Les cellules commencent d'abord à se diviser dans les régions proches du cal d'infirmière, indiquant que les cellules individuelles dans le milieu solide obtiennent les facteurs de croissance essentiels qui sont libérés de la masse de cal.

Les colonies en développement qui poussent de cal nourricière stimulent également la division et la formation de colonies d'autres cellules.

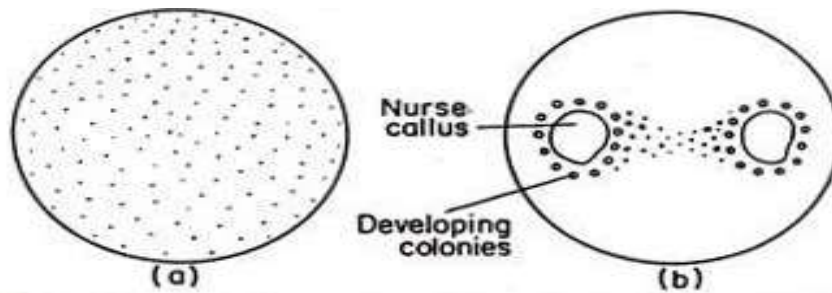


Figure 39. Technique de cal nourrice

Méthode 5. Technique des microgouttelettes

1. Dans cette méthode, des cellules individuelles sont cultivées dans des boîtes spéciales qui ont deux chambres - une externe et une interne.
- La grande chambre porte de nombreux puits numérotés, chacun d'une capacité de 0,25 à 25 μ l de milieu nutritif.
2. Chaque puits de la chambre intérieure est rempli d'une microgoutte de milieu liquide contenant une seule cellule isolée. La chambre extérieure est remplie d'eau distillée stérile pour maintenir l'humidité à l'intérieur du plat.
3. Après avoir recouvert le plat avec un couvercle, le plat est scellé avec de la paraffine.
4. La boîte est incubée sous 16 heures de lumière froide (3 000 lux) à 25 ° C.
5. La colonie cellulaire dérivée de la cellule unique est transférée sur un milieu solide ou semi-solide frais dans un tube de culture pour une croissance ultérieure.

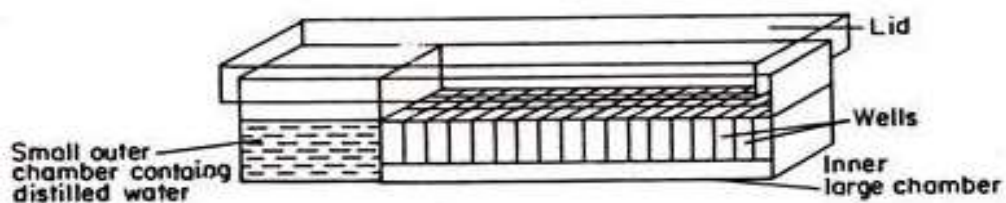


Figure 40. Technique des microgouttelettes

