



Culture cellulaire

Responsable de la matière :

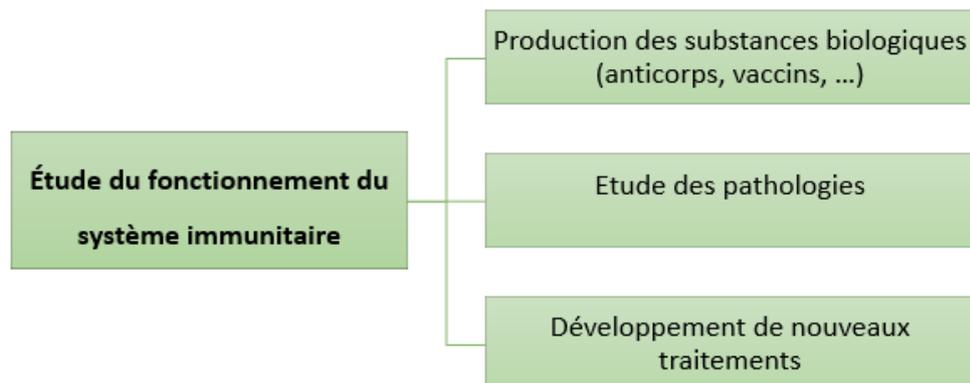
Dr. DJEZIRI Fatima Zohra

L 3 Immunologie : 2025/2026

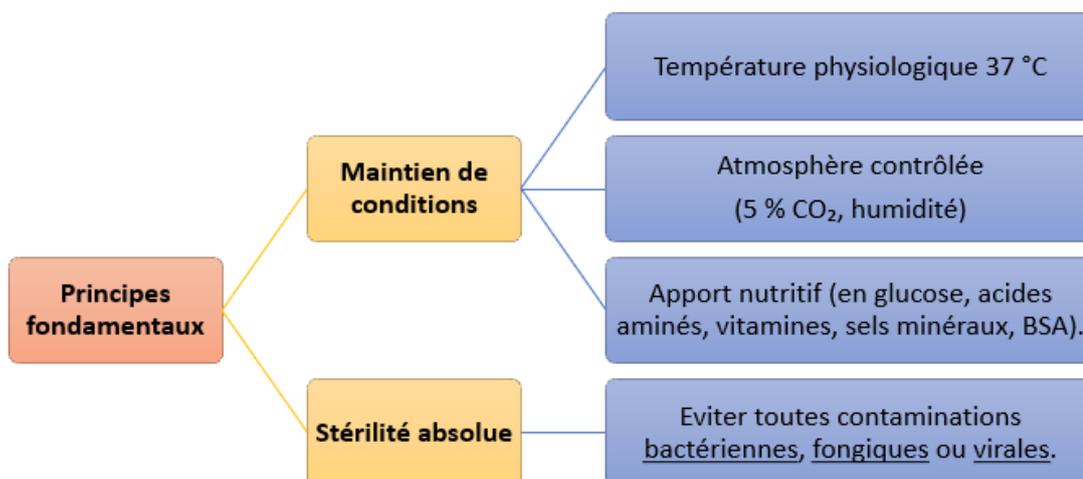
Qu'est ce que la culture cellulaire ?

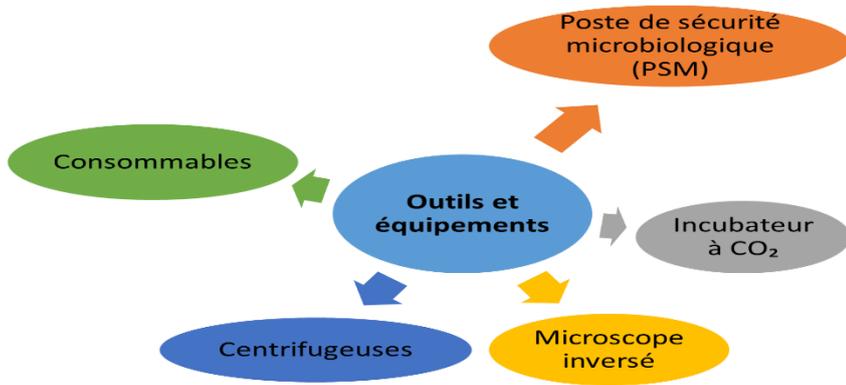
techniques biologiques permettant de **multiplier les cellules** animales ou végétales en **dehors de leur organisme** d'origine, dans un environnement artificiel **contrôlé**.

Quels sont les objectifs de la culture cellulaire en immunologie?



Principes fondamentaux :

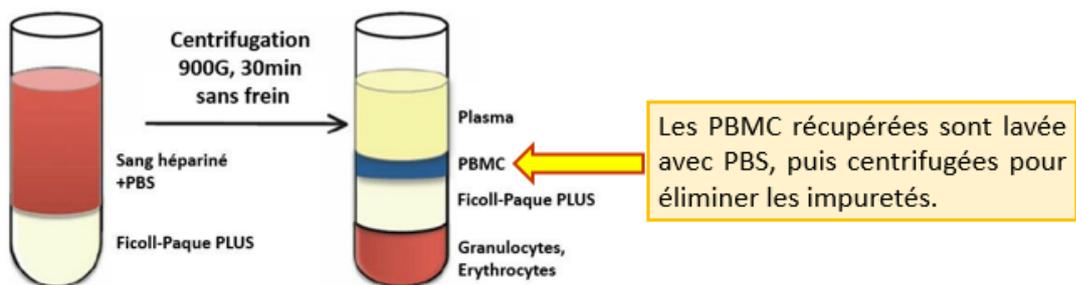




1. Isolement et purification des cellules immunitaires

1.1. Technique « Gradient de densité Ficoll » :

Le sang est déposé sur une solution de Ficoll puis soumis à une centrifugation. Les cellules les plus denses (**granulocytes et hématies**) sédimentent au fond du tube, tandis que les cellules moins denses (**lymphocytes et monocytes**) forment un **anneau** à l'interface **entre le plasma surnageant et la solution de Ficoll**.



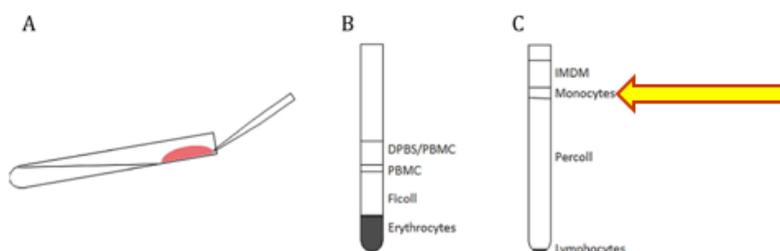
PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) = cellules **mononucléées** (un seul noyau rond)



- Lymphocytes (T, B, NK)
- Monocytes

1.2. Purification des monocytes par Percoll Plus :

- Les PBMCs + un milieu IMDM.
- Déposés sur solution Percoll Plus hyperosmotique (densité 1,058 g/ml).
- Centrifugation (580 g/15 min/21 ° C) : les monocytes migrent à l'interface.
- La fraction de monocytes est collectée, lavée au PBS puis centrifugée.
- Une coloration May-Grünwald est effectuée pour vérifier la présence majoritaire de monocytes.



2. Méthodes de maturation et de génération de différents phénotypes immunitaires

La **différenciation des cellules immunitaires *in vitro*** permet d'obtenir des populations ayant des **phénotypes précis**. Son objectif est d'étudier :

- les fonctions des cellules immunitaires
- leur activation et leurs interactions.

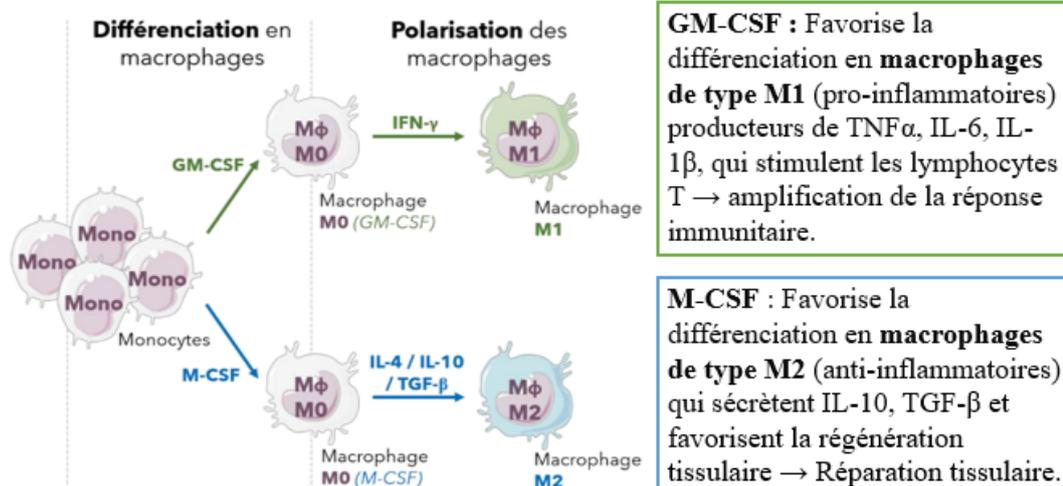
2.1. Principe de la différenciation *in vitro* :

La maturation est induite par **des cytokines et des facteurs de croissance**. Ces molécules agissent sur les récepteurs membranaires et activent des voies de signalisation intracellulaires qui orientent la cellule vers un phénotype fonctionnel spécifique.

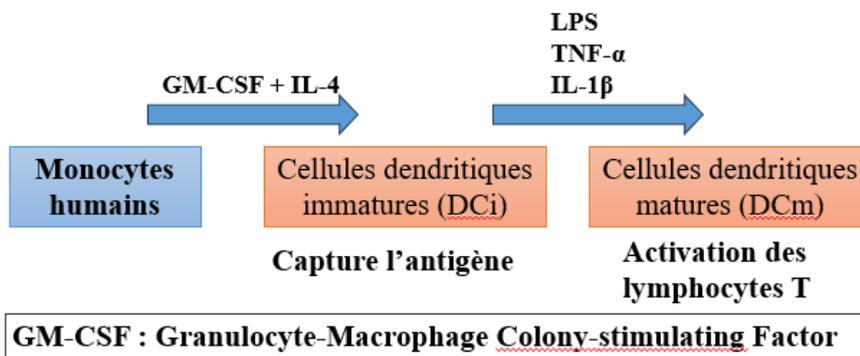
Quelques définitions :

- **Facteurs de croissance** : Molécules qui stimulent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules.
- **Cytokines** : **petites protéines de signalisation** sécrétées par les cellules immunitaires, régulent la **croissance et la différenciation,...**
- **IFN- γ (Interféron gamma)** : Cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les lymphocytes T et NK.
- **LPS (Lipopolysaccharide)** : Composant de la membrane des bactéries Gram⁻.
- **TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha)** : Cytokine pro-inflammatoire majeure produite par les macrophages.
- **IL-10 (Interleukine-10)** : Cytokine **anti-inflammatoire** produite par macrophages et LT.

2.2. Différenciation et maturation (polarisation) des monocytes :



2.3. Différenciation par GM-CSF + IL-4 :



2.4. Méthodes de différenciation des lymphocytes T :

Les lymphocytes T prolifèrent et se différencient en sous-populations effectrices (**Th1**, **Th2**, **Th17**, **Treg**), en fonction du microenvironnement cytokinique.

3. Tests de viabilité cellulaire :

3.1. Définition :

Le test de viabilité cellulaire consiste à distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, afin de déterminer le pourcentage de viabilité d'une population cellulaire.

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total des cellules}} \times 100$$

3.2. Méthodes :

a) Coloration au Bleu trypan :

- Définition : permet d'identifier les **cellules mortes colorées** (bleues) et les **cellules vivantes intactes** (transparentes).
- Principe : Le colorant pénètre uniquement dans les cellules mortes.
- Équipement : Microscope optique et compteur cellulaire.
- Calcul du pourcentage de viabilité.

4. Numération :

4.1. Définition :

La numération cellulaire correspond à l'observation et le comptage direct des cellules au microscope à l'aide d'une lame de numération (hémocytomètre). Elle est souvent associée au test de viabilité pour distinguer les cellules vivantes.

4.2. Calcul :

$$[C] \text{ cellules/mL} = \frac{\text{Moyenne des cellules comptées par carré}}{\text{Volume d'un carré (mL)}} \times F_d$$

➤ F_d = Facteur de dilution = Volume total de dilution (μl)/Volume de l'échantillon (μl)



Hémocytomètre (cellule de comptage) = Malassez / Thoma / Neubauer

4.3. Concentration cellulaire :

Concentration cellulaire (ou densité cellulaire) : C'est le nombre de cellules par unité de volume (cellules/mL). Elle influence plusieurs paramètres expérimentaux :

Croissance : une concentration faible → multiplication lente des cellules.

Viabilité : une densité élevée → manque de nutriments et accumulation de déchets → augmente la mortalité cellulaire.

Reproductibilité des résultats : des conditions expérimentales standardisées sont nécessaires (ex: deux cultures avec des densités différentes → rythmes de croissance différents).