

I. Méthodes d'obtention :

Deux types de cellules à distinguer :

- cellules libres circulantes. exemple : cellules du sang.
- Les cellules qui constituent un tissu exemple : Tissu conjonctif... etc.

1. Les cellules circulantes :

Les cellules circulantes doivent être séparées. Leur différence de densité permet l'utilisation d'un gradient de Ficoll avec centrifugation. L'utilisation de trieur de cellules est aussi possible.

Exemple : Comment on prépare les lymphocytes T :

Le protocole :

- Prélèvement de sang sur un anticoagulant (héparine, EDTA Citrate)
- Mettre le sang prélevé à décanter en présence de glycérol ou du dextrane : (8-6 ml) de glycérol pour 10 ml de sang.
- Décantation pd 1h : formation de 3 phases :
 - le plasma
 - le buffy coat (les leucocytes : les polymorphonucléaires, monocytes, lymphocytes).
 - les hématies.
- Recueillir le buffy coat grâce à une pipette pasteur munie d'une poire.
- Addition de chlorure d'ammonium NH_4Cl .
- Dépôt du buffy coat pure sur une colonne de nylon : qui a la propriété d'éluer sélectivement les lymphocytes T.
- Le volume recueilli après lavage de la colonne est centrifugé à 1500 tours/min pd 10 min.
- Jeter le surnageant.
- Le culot obtenu contient les lymphocytes T.

Remarque :

- il est nécessaire de faire plusieurs lavages et centrifugation du culot avec un tampon physiologique: ou Tampon phosphate salin (TPS).

- Pour réussir l'opération, on travail à $\text{pH} \approx 7.2-7.5$.

Le culot final doit être analysé :

A. Dénombrement des cellules viables, pour cela on fait la culture dans un milieu contenant :

- 1- un additif au milieu : le sérum foetal
- 2- milieu de culture de cellules eucaryotes contenant les éléments de base : AA, AG, Vitamines....
- 3- Un agent effecteur qui engendre la transformation lymphoblastique et qu'on appelle l'agent mitogène : La PHA (phytohemaglutinine A), la concanavaline A.
- 4- Des antibiotiques.

B. Test de validité (car les cellules doivent être en bon état)

2. Les cellules organisées en tissus :

Un tissu est formé d'un ensemble de cellules et éventuellement d'une matrice extracellulaire. Dans les tissus de type épithélial, les cellules sont fortement liées entre-elles.

Rares sont les tissus isolés ou " purs " : ils appartiennent en général à un organe constitué d'un tissu principal et de nombreux tissus accessoires : tissus conjonctifs d'emballages, tissus des vaisseaux sanguins, neurones...).

Un organe contient donc de nombreux types de cellules.

La culture sera donc réalisée à partir d'un fragment plus ou moins important d'un organe. Deux méthodes :

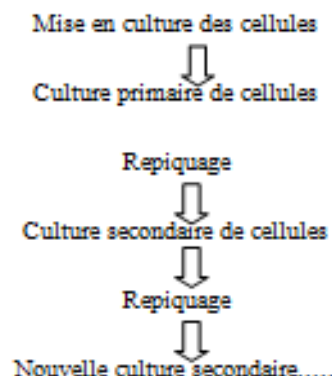
- o utilisation d'un fragment de tissu : Les cellules se développent à partir du fragment à la surface du support baignant dans le milieu de culture.
- o fragmentation de l'organe :
 - o le tissu est dissocié mécaniquement et enzymatiquement : on obtient une suspension de cellules que l'on peut partiellement purifier.
 - o les cellules sont mises en culture : c'est la culture primaire
 - o elles sont repiquées comme en microbiologie : c'est la culture secondaire

Culture de tissus



Dissociation enzymatique ou/et mécanique du tissu en cellules





Remarque :

1- Repiquages = passages.

On réalise un repiquage d'une culture cellulaire en dissociant le tapis obtenu par action de la **trypsine** (ou d'autres enzymes protéolytiques) qui, en détruisant certaines protéines de liaisons, brisent les liens entre les cellules.

La culture primaire = culture à partir des cellules prélevées sur l'organisme

La culture secondaire = culture à partir de cellules en culture (repiquage)

2- La dissociation enzymatique peut se faire:

- à 4°C : condition la plus douce, la dissociation a lieu alors lentement
- ou à 37°C : condition plus forte, il faut alors contrôler de façon très précise l'action de l'enzyme qui peut si la durée est trop longue par exemple attaquer les protéines membranaires des cellules.

3 - Le contrôle de la viabilité des cellules, c'est à dire de leur état vivant peut se faire :

- soit grâce à des colorants vitaux tels que le rouge neutre incorporé dans les lysosomes des cellules vivantes
- soit grâce à des colorants d'exclusion tels que le bleu **Trypan** pénétrant dans les cellules mortes.

3- Dans un tissu, il existe plusieurs types de cellules.

- Parfois il y a intérêt à conserver les différents types de cellules qui conservent certaines interactions.
- Parfois il y a nécessité de séparer un type cellulaire. Cela est réalisé:
 - **par méthode de clonage** (comme en microbiologie):
Les cellules sont diluées de façon à ce que chacune prolifère en formant un clone lorsqu'elles adhèrent à la surface. Il suffit alors d'isoler le clone.
 - **par méthodes de séparation physique**
 - centrifugation différentielle en gradient de **Ficoll**
 - chromatographie d'affinité
 - **cytométrie de flux**

- électrophorèse.

B.1. La dissection :

B.1.1. Méthode de CARREL :

Elle consiste à :

- prélever un morceau de tissu réduit en un très petit rectangle (l'explant)
- déposer à la surface de l'explant deux gouttes de plasma de coque + deux gouttes d'extrait embryonnaire.
- Incubation **pd** 24 h.

B.1.2. La méthode de dissection proprement dite :

Dans ce cas le tissu est **coupé** en fragments de 1-4 mm² de surface, ces derniers sont encore réduits de manière plus petite à l'aide de pince, puis placés dans un flacon de culture contenant le milieu nutritif.

Les cellules vont migrer à partir des différents fragments.

Mettre les explants dans un récipient de culture ne contenant qu'un très faible volume de milieu.

B.1.3. La méthode de jensen :

Elle est plus rarement utilisée que les autres, les fragments de tissus sont réduits en explants de 1 mm² de surface, placés sur un disque de papier filtre reposant lui-même sur un support métallique dans une boîte de pétrie.

B.1. Les méthodes enzymatiques :

On choisit les enzymes protéolytiques comme la trypsine.

Le protocole :

- Effectuer une dissection du tissu qui doit être choisis sous forme de pulpes épaisses, dont cette pulpe doit baigner dans une solution saline additionnée d'antibiotiques.
- On fait une **prétrypsination** qui doit avoir ≈ 15 min.
- **Trypsination** proprement dite : effectuée sous agitation lente.

Après quelques minutes d'action, les cellules vont s'individualiser. La trypsine ne doit pas être laissée plus de 30 min.

-Inactivation de la trypsine : se fait soit par dilution de la concentration suivie d'une centrifugation ;

Soit par addition d'un inhibiteur : l'inhibiteur qui est très utilisé est l'inhibiteur trypsinique de soja.

- On fait la dispersion des différents culots cellulaires obtenus dans du milieu de culture.

Remarque : Pour certains tissus riches en collagènes (ex : fibroblaste) on n'utilise pas la trypsine, mais la collagénase.

D'autres enzymes sont aussi utilisés : mélange d'aminopéptidase et de carboxypeptidases.

II. Méthodes de culture cellulaire :

A. Méthode de suspension :

Comme la plupart des cellules ont besoin d'un support pour croître, il faut donc trouver un artifice pour maintenir la plupart de celles-ci en suspension.

En 1933, Monsieur Gay arrive à faire croître dans des tubes en verres, des cellules en suspension tournant à grande vitesse.

L'agitation peut être réalisée par différents moyens :

- Elle peut être entretenue par des barreaux magnétiques siliconés appelés "SPINNER"
- Il existe également des appareils d'agitation perfectionnés appelés des cytoculteurs qui permettent de maintenir une densité cellulaire, un environnement gazeux constant ainsi qu'un apport continu de milieux frais et la récupération de milieux usés.

Remarque : La culture en suspension est très utile dans le domaine de virologie et la biotechnologie en vue de produire des substances biologiques tel que : l'interféron, l'hormone de croissance.....etc.

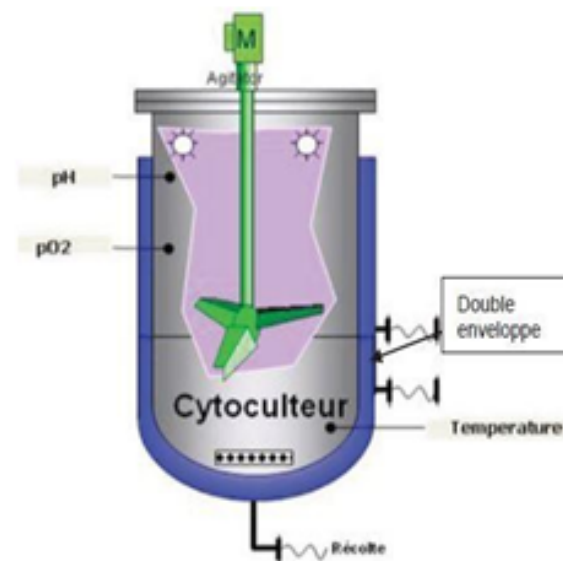


Figure : Cytoculteur

B. Méthode de culture stationnaire :

Le principe général de cette méthode est lié à l'affinité des cellules au support car la plupart appartient à des tissus solides organisés.

Le support peut être du verre ou du plastique traité pour la culture. Le plastique peut être recouvert de support physiologique : collagène, fibronectine ou d'une membrane basale reconstituée ou encore l'utilisation de gèle d'agarose, de gèle de collagène pour une orientation vers la culture 3D.

Les cellules sont placées dans des boîtes microgouttes de diamètres différents ou sur des microporteurs (microbilles en plastique) recouverts ou non de support physiologique.

Les microporteurs sont ensuite placés dans des récipients puis soumis à une agitation modérée et continue permettant aux cellules de demeurer dans le milieu de culture. Le rendement de cette technique est important. Cela étant dû à une surface d'adhérence plus grande.

B.1. LES SYSTEME CLOS :

Ils sont constitués par des flacons placés dans des étuves classiques. Dans ce cas on note un appauvrissement progressif de facteurs nutritifs qui conduit à une diminution du PH (qui est néfaste pour les cellules, car il permet aux germes contaminants acidophile de croître), d'où la nécessité d'un renouvellement du milieu de culture d'une manière plus fréquente.

B.2. LES SYSTEME SEMI CLOS :

On utilise des boîtes pétrie, des microplaques, des boîtes flacons non fermées hermétiquement. Ces boîtes et microplaques sont soumises dans des étuves spéciales où l'atmosphère de l'étuve est régulée avec une arrivée constante d'un mélange gazeux composé de 95% d'air, 5% de CO₂ et de la vapeur d'eau.

B.3. LES SYSTEME OUVERTS :

Ces systèmes sont appelés également systèmes de perfusion. Ils sont constitués par des chambres de culture qui comportent un système d'aération....etc.

Ces systèmes sont utilisés seulement pour des études nécessitant une observation permanente au microscope ou en microcinématographe.

III. Méthodes d'entretien des cellules :

En ce qui concerne les cellules adhérentes, le changement du milieu usé s'effectue par aspiration. Les cellules en suspension sont tant qu'à eux, soumis à une centrifugation à 800 jets. Lorsque la population cellulaire est confluite, on rince le milieu avec une solution EBSS (solutions salines équilibrées de Earle) et on utilise de la trypsine afin de détacher les cellules cultivées sur boîte de Pétri pour ensuite les répartir sur d'autres flacons.

Méthodes de repiquage :

Opération qui consiste à transférer la population cellulaire d'un flacon de culture dont toute la surface cellulaire est couverte à d'autres flacons à surface libre.

Protocole de la trypsination :

- Eliminer le milieu de culture appauvri et le remplacer par une solution de Trypsine-EDTA : l'enzyme est préparée dans un tampon physiologique salin (TPS) qui ne doit pas contenir le Ca²⁺ et Mg²⁺.
- Incubation à 37°C.
- Après la libération des cellules, effectuer un dénombrement.

IV. Les besoins nutritifs des cellules en culture :

Milieu de culture = milieu de base synthétique+ Sérum.

Objectif: imiter l'environnement chimique naturel tout en maximisant la croissance ou la production.

- les composés minéraux offrent généralement des propriétés de tampon afin de minimiser les fluctuations pH en cours de culture
- contrairement à ce que l'on penserait, il est nécessaire de fournir les différents composés selon un dosage (concentrations) précis.
- une alimentation en excès peut avoir des effets inhibiteurs sur les cellules.
- généralement, il est primordial de pouvoir fixer le composé qui sera limitant pour les cellules.

Synthétiques : la composition chimique est bien définie

Complexes : la composition chimique n'est pas entièrement définie ex. extraits de levures, sérum fœtal bovin, lait, sirop de maïs.

1. Sources d'éléments majeurs: C, H, O, N
2. Sources d'éléments mineurs: P, K, S, Mg
3. Vitamines et hormones, etc.
- facteurs de croissance: nutriments organiques essentiels tels que des acides aminés incorporés dans la structure cellulaire
4. Sources d'éléments traces

Un milieu minimal ne contient que les nutriments essentiels pour la croissance. Un milieu riche est un milieu minimal contenant en plus d'autres nutriments représentant des sources alternatives d'éléments:

- acides aminés.
- vitamines.
- précurseurs d'acides nucléiques.

- intermédiaires des réactions de synthèse cellulaire.

Éléments	Formes	Utilisation
C,H,O,N	organique	énergie, synthèses diverses
H	inorg./organique	régulation du pH intracellulaire, signalisation cellulaire
N	inorg./organique	synthèse de protéines, acides nucléiques et polymères des parois cellulaires
P	inorg. (Pi)	ATP, phosphorylation de protéines, acides nucléiques, sucres phosphatés, phospholipides, coenzymes
S	inorg.	composé de plusieurs acides aminés, acides nucléiques et protéines, coenzyme A
Mg	inorg.	complexe ATP, stabilise les ribosomes et les membranes
Mn	inorg.	requis pour des enzymes impliqués dans le transport du Pi, autres enzymes (ex. kinases)
Ca	inorg.	cofacteur d'enzymes impliqués dans l'hydrolyse d'ATP et de phospholipides, signalisation cellulaire
K	inorg.	cofacteur de plusieurs enzymes, régulation osmotique, régulation du potentiel membranaire
Cl	inorg.	régulation osmotique, régulation du potentiel membranaire
Mo	inorg.	constituant de la nitrogénase, nitrate réductase et autres
Co,Fe,Cu, Zn	inorg.	cofacteur d'enzymes
acides aminés	lévo./dextrogyre	synthèse de protéines
Na+	inorg.	Maintient des potentiels membranaires.

Exemple de solution physiologique : solutions de Hanks et les solutions des Earle.

Le Ca^{2+} et Mg^{2+} sont des cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques et interviennent dans l'attachement et l'étalement des cellules.

-Le D glucose : Dans certains cas, le glucose peut être remplacé par ses isomères tel que : le galactose.

-Les acides cétoniques : l'acide α -cétooglutarique ou l'acide pyruvique, les acides aminés.

12 Ac aminés sont indispensables : Les 8 AA essentielles (Trp, Lys, Met, Phe, Thr, Val, Leu, Ileu), Tyr, Lys, Arg et His.

Il y a un AA qui est utilisé dans tous les milieux de cultures et on le rajoute en tant qu'additif (nécessaire) ; c'est la L-glutamine.

-Les besoins en vitamines :

8 vitamines sont nécessaire aux cellules en culture : La choline, l'acide folique, le pyridoxal, la riboflavine, la thiamine, l'inositol, l'acide nicotinique, l'acide panthothénique.

➤ Le PH : Il doit être identique au PH sanguin (7.2- 7.4), mais l'optimum dépend des lignées cellulaires.

Pour résoudre ce problème de variations de PH, on rajoute dans le milieu de culture des indicateurs de PH,

Donc c'est le colorant qui va orienter le manipulateur : ce dernier doit contrôler l'origine de l'acidité au microscope.

Remarque : tous les milieux synthétiques contiennent des systèmes tampon : contenant de l'acide carbonique : HCO_3^- ou PO_4^{--} , ou des tampons organique tel que le tris qu'on appelle tampon HEPES.

➤ L'environnement gazeux : il contient le CO_2 , azote, O_2 , Vapeur d'eau.....

Dans l'étuve, l'atmosphère est constituée de 95% d'air et 5% de CO_2 .

Le CO_2 : intervient dans l'équilibre du PH par les HCO_3^- et dans la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Le sérum : il contient les facteurs nécessaires au déclenchement de la division.

L'origine du sérum : humaine ou animale. Il provient de donneurs jeunes, car on a montré que l'effet co-stimulant est inversement proportionnel à l'âge du donneur.

Les sérums les plus fréquemment utilisés sont :

- Sérum de veau.
- Sérum de nouveau née de veau.
- Sérum de veau fœtal.
- Sérum de cheval ou de poulets.

Les sérums d'animaux peuvent être contaminés par des virus, des champignons ... qui peuvent perturber le métabolisme des cellules en culture et les concentrations d'hormones et de facteurs de croissance sont instables dans le sérum.

On les appelle : Les milieux définis = milieu sans sérum synthétiques ;

Exemple de milieux définis :

- Milieu HAM F12.
- Milieu MCBF 104.

Les hormones et facteurs de croissance :

Dans le sérum on trouve :

- De l'insuline, de l'hydrocortisone, la prostaglandine, l'œstradiol, hormones de croissance.
- Des facteurs de croissance :
EGF : Epidermal growth factor.
FGF : Fibroblast growth factor.
NGF : Nerve growth factor.
PDGF : Platelet derived growth factor.
- Facteurs de transport qui jouent un rôle dans la croissance, différenciation et survie des cellules. Ex : la transferrine, l'albumine.
- Facteurs d'attachement tel que : Fibronectine.
- Facteurs nutritionnels tel que l'acide ascorbique.

V. Contrôle fonctionnel des cellules en culture :

Deux caractéristiques sont à considérer :

- La prolifération des cellules.
- La préservation des fonctions spécialisées.

Selon que l'on débute une culture ou qu'on est en culture de routine, les paramètres de contrôle différent.

Les contrôles réalisés lors de la mise en route d'une culture

On vérifie les conditions d'asepsie lors de la dissection et augmente la dose d'antibiotique et fongique si nécessaire. On vérifie l'état des cellules recueillies par le bleu de trypan.

Le bleu de trypan est un colorant qui a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue. Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues.

On vérifie la morphologie des cellules au microscope et la présence d'un marqueur biochimique spécifique du type cellulaire.

Les contrôles de routine

Vérifier la morphologie des cellules au microscope ainsi que l'adhérence de celles-ci. Le manque d'adhérence peut dévoiler l'absence de place pour la croissance des cellules, l'inadéquation du support, un milieu "usé". Le remplacement du milieu s'effectue tous les 2 à 3 jours. Le milieu doit être neutre (pH 7,2 à 7,4). Inférieur à 6,5 la viabilité des cellules est menacée. Il est donc important d'utiliser un indicateur pour vérifier l'acidité du milieu comme le rouge de phénol dont le pH à l'équivalence se situe dans sa zone de virage (entre 6,6 et 8,4). En dessous de 6,6 le rouge de phénol vire au jaune.

L'évolution des cellules en culture

L'évolution des cellules en culture

Les cellules in-vitro présentent 2 propriétés fondamentales qui sont : la capacité proliférative et leur fonction différenciée. Ces propriétés ont tendance à évoluer de manière très différente quelle que soit la méthode de culture employée. Les cellules conservent la plupart du temps leur potentiel de division, pouvant être stimulé au début de la culture par des facteurs de croissances. Même si au cours du temps, on peut noter un ralentissement de celui-ci. A l'inverse, les cellules en culture voient souvent leur fonction différenciée se modifier et même disparaître. Ce phénomène de dédifférenciation peut être visible morphologiquement.

Notons que certains types cellulaires révèlent leur fonction spécifique que lorsqu'ils sont cultivés en vie ralentie. Pour cela, on procède à un appauvrissement progressif du milieu ou on utilise une substance inhibitrice de la division cellulaire.

Contamination

La contamination est un problème naturel dans une culture primaire, car l'organisme dont proviennent les cellules n'était pas stérile. Il faut donc décontaminer les prélèvements, ce qui induit un stress supplémentaire pour les cellules, et ajouter des antibiotiques.

Le contaminant cellulaire principal dans une culture primaire issue d'un animal est les fibroblastes, qui sont les cellules cicatricielles. Elles prolifèrent facilement en s'étendant en tapis de cellule en fuseau, et forment elles-mêmes une couche nourricière parfois bénéfique ; mais parfois aussi elles envahissent la culture et affament les cellules d'intérêt. Il est difficile de s'en débarrasser.

Remarque : La vacuolisation des cellules et la présence de granules au tour du noyau sont des indices de souffrance cellulaire

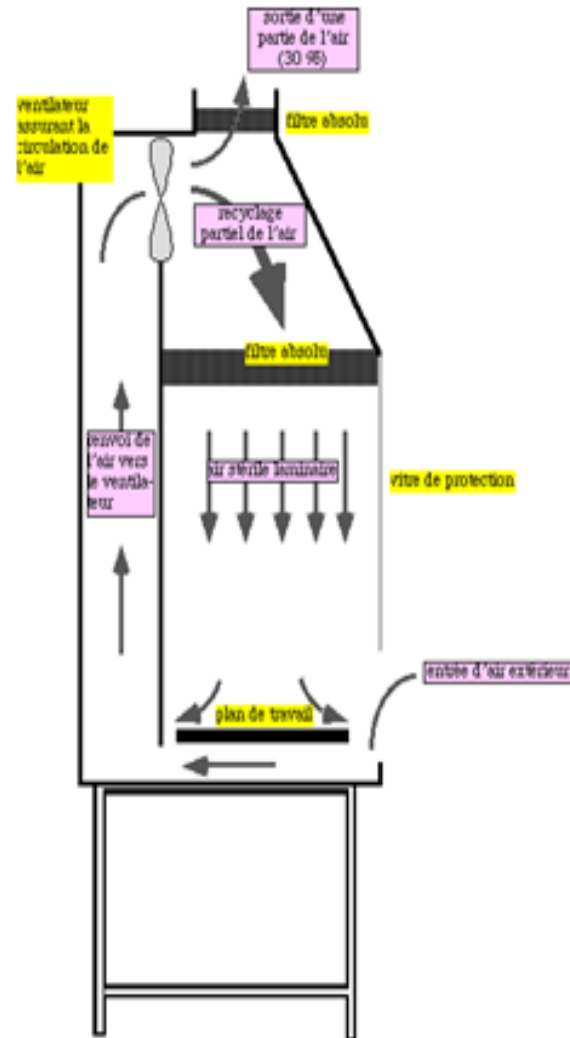
VI. La culture cellulaire et les conditions de stérilité :

Toutes les procédures nécessaires à la culture cellulaire nécessitent un travail en milieu stérile, c'est-à-dire un milieu exempt de tout micro-organisme vivant. Pour ce faire, de nombreux traitements existent pour stériliser le matériel utile au travail.

Traitement et description	Inconvénient possible
Traitement à la flamme Le matériel est chauffé au-dessus d'une flamme. Les micro-organismes meurent à cause de la chaleur.	Le matériel peut fondre sous la chaleur de la flamme.
Traitement au four à chaleur sèche Le matériel est chauffé à l'intérieur d'un four qui tue les micro-organismes.	Le matériel qui ne résiste pas à la chaleur peut casser.
Traitement chimique Le matériel est trempé dans une solution ou exposé à un gaz, ce qui tue les micro-organismes.	Les substances utilisées sont souvent nocives pour la santé humaine et difficiles à manipuler en toute sécurité.
Traitement à la vapeur d'eau Ce traitement se fait généralement dans un autoclave, c'est-à-dire un appareil qui possède une chambre hermétique dans laquelle on dépose le matériel à stériliser. La pression élevée et la chaleur font mourir les micro-organismes.	Le matériel qui ne résiste pas à l'humidité ne peut pas être stérilisé à la vapeur d'eau.
Traitement par rayonnements Le matériel est exposé à des rayonnements (rayons X, rayons UV, rayons gamma, etc.) qui tuent les micro-organismes.	L'exposition aux rayonnements peut être nocive pour la santé humaine.

PSM ou Poste de sécurité en Microbiologie**Schéma de principe du PSM**

Le filtre absolu assure l'arrêt de toute particule de plus de 0,3 µm de taille. L'air filtré est donc débarrassé de toute particule ou poussière, y compris bactérienne. De nombreuses applications industrielles, en particulier dans l'électronique, utilisent des PSM.



Remarques

- Les hottes à **flux horizontal** peu coûteuses mais encombrantes et surtout peu satisfaisantes car l'air extérieur entre dans la hotte et risque de contaminer la manipulation : un bec Bunsen s'impose et risque d'endommager les filtres absolus qui empêchent la contamination de l'extérieur. Elles sont donc à proscrire absolument en virologie, en microbiologie pour germes pathogènes, en toxicologie. Ce sont hélas encore les plus fréquentes dans les laboratoires, ce qui nécessite un remplacement dans les cas cités au dessus.
- Il existe des PSM plus perfectionnés où l'opérateur ne rentre pas ses mains.

1/ Manipulation.

- Puisqu'il s'agit d'un flux vertical en provenance du haut de la hotte on contamine en passant au dessus du matériel manipulé : les poussières ont tendance à tomber. Il est donc nécessaire de bien organiser la hotte pour ne pas passer les mains au dessus des tubes, boîtes, flacons, pipettes ouverts
- Il est nécessaire d'être au moins à 10 cm de la grille pour être dans la zone de stérilité.
- Tout le matériel introduit doit être passé à l'éthanol à 0,95 (ou à un mélange Javel/éthanol 0,70).
- Passer à l'éthanol les mains ou les gants (si travail avec gants non stériles) et de façon générale respecter une bonne hygiène corporelle.
- Travailler avec des blouses réservées à cet usage et surtout pas les blouses de bactériologie.

Remarque :

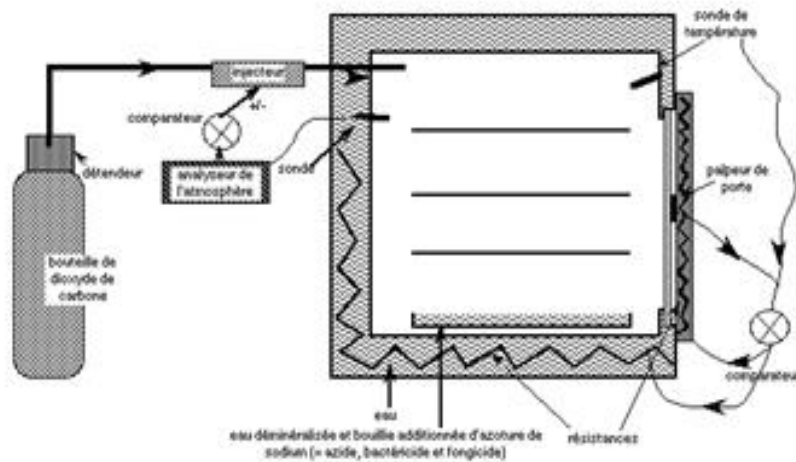
- Certains utilisent un bec Bunsen à l'intérieur de la hotte pour flamber l'ouverture des tubes et des flacons avant leur fermeture pour parfaire leur stérilité. Mais la flamme perturbe le flux et risque toujours de brûler les filtres. Le Bec Bunsen DOIT DONC ÊTRE PROSCRIT
- Si les pipettes utilisées ont servi pour un produit pathogène il faut prendre la précaution lorsque la pipette est mise dans le bac à détergent de bien la remplir avec le détergent pour bien détruire l'agent pathogène.

3: Nettoyage après manipulation :

- Nettoyer le plan de travail et les parois avec un désinfectant spécial ou un mélange Javel/Éthanol ou éventuellement Javel diluée. Pour assurer un bon nettoyage enlever le fond.
- Passer, si possible, aux UV l'intérieur de la hotte pour détruire les microorganismes présents dans les recoins et qui auraient pu ne pas être atteints par le désinfectant lors de l'étape précédente.

Étuve à dioxyde de carbone

Schéma de l'étuve

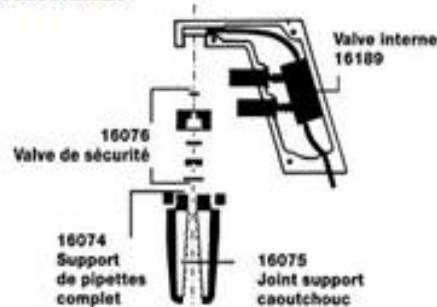


Principe de fonctionnement d'un incubateur à dioxyde de carbone

ATTENTION À LA PORTE QUI DOIT ÊTRE BIEN FERMÉE : dans le cas contraire de la buée se forme sur la porte et le CO₂ risque de ne pas être injecté.

PipetAid

Ce système permet l'utilisation de toute pipette classique : la pompe assure la fonction habituelle de la poire d'aspiration. Son filtre évite une contamination du liquide prélevé par l'air déplacé lors du prélèvement. Les pipettes utilisées doivent évidemment être stériles.



Microscope inversé

Le microscope utilisé pour regarder les boîtes ne peut pas les "voir" par dessus : l'objectif devrait obligatoirement pénétrer dans la boîte pour être suffisamment près des cellules situées sur le fond et recouvertes de liquide.

Il a donc fallu inverser le microscope : les objectifs regardent la boîte par dessous. L'éclairage est réalisé par dessus. Le contraste de phase s'impose.

Sur cette image on verra clairement la position des objectifs.

