

Mise en culture d'une lignée cellulaire

La lignée cellulaire VERO est conservée en flasks de 25 cm² de surface et cultivée en milieu essentiel minimum de Eagle modifié Dulbecco (DMEM).

1° Trypsination :

La trypsine est décongelée peu à l'avance et conserve à 4°C.

- Enlever le milieu épuisé surnageant à l'aide d'une pipette stérile et d'un pipetus.
- Introduire environ 1 mL de trypsine-EDTA. Renverser la boîte pour ne pas toucher la culture avec la pipette. Après avoir bien baigné le tapis cellulaire, enlever, à l'aide d'une pipette stérile, la solution de trypsine.
- Ajouter 1 mL de trypsine-EDTA, opérer de la même manière, fermer le flacon et l'incuber horizontalement à 37°C, après avoir bien humecté tout le tapis avec le film de trypsine.
- Surveiller l'action de la trypsine jusqu'à ce que les cellules s'arrondissent et que le tapis cellulaire se décroche du support plastique. Mettre le flask en position verticale.
- Achever le décollement du tapis par tapotement du flacon et en faisant circuler la suspension ainsi obtenue sur la surface de culture. Opérer rapidement.
- Arrêter l'action de la trypsine par addition de 4 mL de milieu DMEM + 5% de sérum de veau. Opérer par jets intermittents. Récupérer les cellules sur les parois du flask.

2° Préparation du milieu :

Préparer, pendant l'action de la trypsine, la quantité de milieu nécessaire pour le repiquage.

3° Numération et repiquage :

Numérer les cellules en hématimètre en présence de Bleu Trypan. On met un volume équivalent de milieu et de Bleu Trypan.

Apporter 500000 cellules par flask pour une croissance optimum, compléter à 5 mL avec le milieu DMEM complet.

Incuber à 37°C dans l'étuve à 5% de CO₂.