



Université Ahmed Zabana , Relizane
Faculté des Sciences et Technologies
Département des Sciences Biologiques

Polycopié

Présenté par : Dr MELLALI Sarah

Intitulé



Ce polycopié est destiné aux étudiants de :

1ère année Master Biochimie Appliquée

Année universitaire : 2021/2022

AVANT PROPOS

Enseignante au niveau de Faculté des Sciences et Technologies, Département des Sciences Biologiques à l'université de Relizane depuis 20 octobre 2019, où j'ai pu intervenir et assurer un panel d'enseignement dans différentes matières. J'étais chargé de cours, de travaux dirigés (TD) et de travaux pratiques (TP) des modules de Culture cellulaire, technique d'analyse Biologique, Bioinformatique, Biologie cellulaire, Zoologie, Biochimie microbienne, Anglais scientifique, Traitement des données informatiques, Mycologie Algologie Virologie et Microbiologie alimentaire.

Dans le cadre de la préparation de l'habilitation universitaire pour le passage au grade de rang magistral "Maître de Conférences A", j'ai choisi de présenter un polycopié englobant le cours de la matière de Culture cellulaire. Ce module représente une unité méthodologie dans le programme de la 1ère année Master Biochimie Appliquée au niveau de Faculté des Sciences et Technologies, Département des Sciences Biologiques à l'université Ahmed Zabana , Relizane.

Ce module représente également un élément nécessaire et indispensable pour les différents modules qui suivent dans le programme prévu pour la première année et deuxième année master recherche ainsi pour réaliser leur travaux de recherche dans mémoire de fin d'étude et pourquoi pas les travaux de leur doctorat du fait que l'étudiant sera capable de faire une mise en culture des cellules et appliquer facilement cette technologie dans le but de recherche.

- ✓ On vise par ce cours, le développement chez les étudiants les compétences suivantes :
D'être capable de faire une mise en culture cellulaire avec succès dans le laboratoire,
- ✓ De pouvoir manipuler et cultiver tous les types des cellules selon leurs origine ; le but de la recherche et selon la nature de leurs travail.
- ✓ De pouvoir surmonter tous les problèmes rencontrer leur de la manipulation et être capable de choisir la méthode a approprié à leur recherche.

L'étudiant va construire progressivement cette performance complexe, en maîtrisant des savoirs, en mettant en œuvre des savoir-faire et en le faisant avec un savoir-être de professionnel.

A la fin de ce cours l'étudiant sera capable de :

❖ **En termes de connaissance :**

- ✓ Apprendre la terminologie et les notions de base en culture cellulaire ce qui facilitera l'apprentissage des étudiants et va élargir leurs connaissances.

❖ **En termes de savoir-faire :**

- ✓ Manipuler facilement les cellules mise en culture ; entretenir la culture et être capable de passer d'une culture primaire à secondaire.
- ✓ Utiliser les protocoles appropriés au type de cellule et la recherche en maîtrisant la préparation du milieu de culture.

❖ **En termes de savoir-être :**

- ✓ Respecter les exigences d'une culture cellulaire telles que les conditions de culture ; stérilisation et condition d'asepsie.
- ✓ Surmonter tous les problèmes rencontrés lors de la manipulation tels que les contaminations.

Cet enseignement détaille cinq axes principaux en Culture Cellulaire à savoir : Généralité sur la culture cellulaire, Infrastructures et appareillage, Préparation des milieux de culture, La culture cellulaire et Application de la culture cellulaire.

Le programme de la présente matière est comme suit :

Table des matières

Chapitre 1 : Généralités sur la culture cellulaire

1.	Introduction à la Culture cellulaire :.....	1
2.	Définition de la culture cellulaire :.....	1
3.	Historique de la culture cellulaire :	1
4.	Les cellules mise en culture :.....	4
4.1	Origine des cellules :.....	4
4.2	Classifications de la culture selon les sources de cellules :.....	4
4.2.1	Culture cellulaire :	4
4.2.2	Culture des tissus :.....	4
4.2.3	Culture d'organe:.....	4
5.	Les types de cultures cellulaires :.....	5
5.1	Culture primaire (Primoculture) :.....	5
5.2	Culture secondaire :	5

Références bibliographiques

Chapitre 2 : Infrastructures et appareillage

1.	Introduction :.....	9
2.	L'équipement d'un laboratoire de culture :.....	9
2.1	Poste de sécurité microbiologique (PSM) (Hotte à flux laminaire) :.....	9
2.1.1	Hotte de type I:.....	10
2.1.2	Hotte de type II ou poste de sécurité microbiologique (PSM) :.....	10
2.2	Incubateur :	11
3.	Les différentes méthodes de stérilisation :.....	14
3.1	Stérilisation par les méthodes physiques:.....	14
3.1.1	Stérilisation par la chaleur :.....	14
3.1.2	Stérilisation par filtration:	18
3.1.3	Stérilisation par les radiations:.....	19
3.2	Stérilisation par des agents chimiques :.....	19
3.2.1	Antiseptiques:.....	19
3.2.2	Les désinfectants:.....	20
3.3	La stérilité en Culture cellulaire :.....	21
3.3.1	Stérilisation des milieux :.....	21
3.3.2	Stérilité des cultures :.....	21

3.3.3	Stérilité des surfaces :	21
3.3.4	Stérilisation du matériel :	22

Références bibliographiques

Chapitre 3 : Préparation des milieux de culture

1.	Introduction :	24
2.	Composition des milieux de culture :	24
2.1	Milieux synthétiques de base:.....	25
2.1.1	Sels minéraux :	25
2.1.2	Acides aminés :	25
2.1.3	Vitamines :	26
2.1.4	Glucose :	26
2.1.5	Système tampon :	26
2.1.6	Rouge de phénol :	27
2.2	Sérum :	28
2.2.1	Sérum de veau fœtal : constituants et rôles :	28
2.2.2	Avantages et inconvénient de l'utilisation du sérum de veau fœtal :	29
2.3	Milieux définis ou milieux synthétiques sans sérum:.....	30
2.3.1	Hormones :	30
2.3.2	Facteurs de croissance :	30
2.3.3	Facteurs d'attachement :	31
2.3.4	Protéines de transport :	31
2.3.5	Antioxydants :	32
2.3.6	Substances lipidiques :	32
2.3.7	Facteurs divers :	32
2.3.8	Substances non définies :	32
2.3.9	Avantages et inconvénients des milieux définis (Sans sérum):.....	32
3.	Préparation d'un milieu de culture (protocole standards) :	33
1.	Techniques d'isolement des tissus et cellules :	35

Références bibliographiques

Chapitre 4 : La culture cellulaire

1.1	Introduction :	35
1.2	Obtention des cellules :	35
1.2.1	Les cellules libres ou circulantes :	35

1.2.2	Les cellules organisées en tissus ou en organe :	35
1.3	Isolement des cellules :	36
1.3.1	Les méthodes par dissection:	36
1.3.2	Les méthodes enzymatiques :	36
1.3.3	Les avantages et les inconvénients de ces méthodes :	38
2.	Conditions de cultures :	38
2.1	Introduction :	38
2.2	Oxygène :	38
2.3	CO ₂ :	39
2.4	Température :	39
2.5	Osmolarité :	39
2.6	PH :	39
2.6.1	La modification du pH :	40
2.6.2	La régulation du pH :	40
3.	Caractérisation des cellules en culture :	40
3.1	Introduction :	40
3.2	Limite de Hayflick :	41
3.3	Immortalité en culture Cellulaire :	42
3.4	Caractérisation des cellules en culture continue (lignées transformées) :	42
3.5	Croissance des cellules en culture cellulaire: cas normal :	42
3.6	Croissance des cellules en culture cellulaire: cas lignée cellulaire (type HeLa) :	44
4.	Les facteurs mitogènes :	45
4.1	Introduction :	45
4.2	Définition :	45
4.3	Facteurs de croissance pour la culture de la cellule :	46
4.3.1	Principaux facteurs de croissance :	46
4.4	La phytohémagglutinine, ou phasine (PHA) :	47
4.5	Applications :	47
5.	Contamination en culture cellulaire:	48
5.1	Introduction :	48
5.2	Origines des contaminations :	48
5.3	Types de contaminations :	49
5.3.1	Contaminants biologiques :	49
5.3.2	Contaminants chimiques :	52

5.3.3	Cross-contamination :	53
5.4	Traitements :	53
5.4.1	Traitement en cas d'urgence.....	53
5.5	Précautions à prendre pour empêcher toute contamination :.....	54
5.5.1	Technique opératoire :	54
5.5.2	Environnement :	54
5.5.3	Hottes à flux laminaire :	54
5.5.4	Incubateurs :.....	54
5.5.5	Réfrigérateurs :.....	55
5.5.6	Microscopes :	55
5.5.7	Bains-Marie :	55
5.5.8	Lignées cellulaires importées :	55

Références bibliographiques

Chapitre 5 : Application de la culture cellulaire

1.	Introduction :.....	57
2.	Application de la culture cellulaire :.....	57
2.1	Systèmes de modèles.....	57
2.2	Tests de toxicité :.....	57
2.3	Recherches sur les cellules cancéreuses :	58
2.4	Virologie :	58
2.5	La cellule comme usine de production :.....	58
2.6	Génie génétique :	59
3.	Les avantages de la culture cellulaire :.....	59

Chapitre 1 :
Généralités sur la culture
cellulaire

1. Introduction à la Culture cellulaire :

La culture cellulaire est devenue un des outils majeurs utilisés aujourd'hui dans les sciences de la vie. En effet, les cellules en culture constituent un matériel d'étude très important. Grâce aux avantages qu'elles offrent, les cellules continuent à être précieuses pour la recherche fondamentale et pour les applications directes. Les scientifiques ont mis au point le procédé de culture cellulaire pour cultiver des micro-organismes en dehors de leur milieu d'origine, dans des conditions contrôlées. Plusieurs types de cellules peuvent être cultivés : des microorganismes unicellulaires (bactéries, levures, etc.) et des cellules provenant d'organismes pluricellulaires (végétaux et animaux). En les cultivant en laboratoire, on peut contrôler leur croissance et obtenir de grandes quantités de micro-organismes ou de substances utiles.

Actuellement, les progrès technologiques jouent un rôle primordial pour relever les nouveaux défis complexes, et la manière dont les cellules sont cultivées *in vitro*.

2. Définition de la culture cellulaire :

La culture cellulaire est un processus complexe utilisant un ensemble de techniques biologiques qui permet aux cellules procaryotes, eucaryotes ou végétales de se reproduire en dehors de leur milieu de vie naturel (*ex-vivo*) ou de l'organisme dont elles proviennent, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation *in vitro*.

La culture cellulaire est une technique de laboratoire permettant d'obtenir un type de cellule vivante, de trouver un moyen de le faire survivre dans les conditions artificielles du laboratoire, au mieux de la faire proliférer, tout en maintenant des conditions de stress acceptables. Les conditions et les propriétés du milieu de culture sont pour cela capitales .

3. Historique de la culture cellulaire :

Les scientifiques tentent de cultiver les cellules en laboratoire depuis la fin du XIXe siècle, en effet, une série des événements historiques a marquée le développement de la culture cellulaire :

1878 : Claude Bernard a proposé que les systèmes physiologiques d'un organisme puissent être maintenus dans un système vivant après la mort d'un organisme.

1885 : Roux montrait que les cellules embryonnaires de poulet pouvaient être maintenues en vie dans une solution saline hors du corps de l'animal.

1903 : Jolly observa la division cellulaire des leucocytes de salamandres in vitro.

1907 : Harrison cultiva des cellules nerveuses de grenouille dans un caillot lymphatique (caillot ou coagulum ou thrombus (Masse molle, semi-solide, formée par la coagulation d'un liquide, tel que le sang, la lymphe, le lait, etc. Ce terme s'applique plus particulièrement au sang) et observa la croissance des fibres nerveuses in vitro pendant plusieurs semaines. Il fut considéré par certains comme le père de la culture cellulaire.

1910 : Burrows réussit à cultiver à long terme des cellules embryonnaires de poulet dans des caillots de plasma. Il fit une observation détaillée de la mitose.

1911 : Lewis et Lewis mettent au point les premiers milieux liquides composés d'eau de mer, de sérum, d'extrait d'embryon, de sels et de peptones. Ils observèrent une croissance monocouche limitée.

1912 : Alexis Carrel, chirurgien français, réussit à mettre en culture les cellules d'un cœur de poulet, qui continuait à battre.

1913 : Carrel introduit des techniques aseptiques strictes pour que les cellules puissent être cultivées pendant de longues périodes.

1916 : Rous et Jones introduisent l'enzyme protéolytique trypsine pour la sous-culture des cellules adhérentes.

1923 : Carrel et Baker développent «Carrel» ou «T-flask» en tant que premier récipient de culture cellulaire spécifiquement conçu. Ils utilisèrent l'évaluation microscopique des cellules en culture.

1943 : Earle isola des fibroblastes L de souris qui formèrent des clones à partir de cellules individuelles

1948 : Introduction d'antibiotiques dans une culture de tissu. L'utilisation des antibiotiques de pénicilline et streptomycine dans le milieu de culture diminue le problème de la contamination en culture cellulaire.

1952 : Gey établit une lignée cellulaire continue à partir d'un carcinome cervical humain connu sous le nom de cellules **HeLa** (Henrietta Lacks). Dulbecco mis au point un essai sur plaque pour les virus animaux en utilisant des monocouches confluentes de cellules cultivées.

1955 : Eagle étudia les besoins nutritionnels de cellules sélectionnées en culture et a établi le premier milieu chimiquement défini largement utilisé.

1961: Hayflick et Moorhead isolent des fibroblastes humains (WI-38) et montrent qu'ils ont une durée de vie limitée en culture.

1965 : Ham introduit le premier milieu sans sérum capable de supporter la croissance de certaines cellules. Harris et Watkins furent capables de fusionner des cellules humaines et de souris en utilisant un virus.

1978 : établissement de la base pour le développement de milieux sans sérum à partir de cocktails d'hormones et de facteurs de croissance.

1980 : Régulation de la croissance des gènes -Morphologie cellulaire et contrôle de la croissance.

1983 : Immortalisation cellulaire par SV40.

1990 : Culture à l'échelle industrielle de cellules transfectées, pour la production de produits pharmaceutiques.

2000 : Human genome project : génomique protéomique, déficiences génétiques et défauts d'expression.

2007 : Reprogrammation de cellules adultes en cellules souches pluripotentes (iPS) (**Ronot et Barlovatz-Meimon, 2014 ; Aschner et Costa, 2019**).

2010 : L'Institut National des Sciences et Techniques Industrielles Avancées (AIST, JAPON) et Kawasaki Heavy Industries ont présenté le premier robot (dit R-CPX, pour Robotized - Cell Processing eXpert system) capable de cultiver conjointement des cellules venant de plusieurs personnes.

Depuis les années 2010 : l'apparition de système de culture tridimensionnel (gel) a permis de réaliser de grandes avancées dans la mise en culture de système pluricellulaire et la formation d'organoïde (**Ravi et al., 2015**).

4. Les cellules mise en culture :**4.1 Origine des cellules :**

Les cellules mises en culture peuvent être:

- ✓ Des micro-organismes libres (bactéries ou levures).
- ✓ Des cellules « saines » prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie...), on parle alors de «culture primaire ». Ces cellules ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions.
- ✓ Des lignées cellulaires : des cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'«immortalité en culture »). Ce sont des lignées cellulaires. Les lignées sont soit des cellules cancéreuses, soit des cellules en voie de cancérisation, soit des cellules saines rendues «immortelles » artificiellement.
- ✓ Des explants d'organes (d'épaisseur optimisée selon le tissu) .

4.2 Classifications de la culture selon les sources de cellules :

Il existe 3 types:

4.2.1 Culture cellulaire :

La culture cellulaire est un processus complexe par lequel les cellules, procaryotes ou eucaryotes, sont cultivées dans des conditions contrôlées, en général à l'extérieur de leur environnement naturel.

4.2.2 Culture des tissus :

Le prélèvement des tissus d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance.

4.2.3 Culture d'organe:

La culture d'organes entiers ou de fragments d'organes intacts dans l'intention d'étudier leur fonctionnement ou leur développement prolongés est appelée Culture d'organe.

Remarque: Lorsque les cellules sont retirées des fragments d'organe avant, ou pendant la culture, interrompant ainsi leurs relations normales avec les cellules voisines, on appelle cela Culture de cellules.

5. Les types de cultures cellulaires :

5.1 Culture primaire (Primoculture) :

C'est une culture initiée à partir de cellules, de tissus ou d'organes prélevés directement sur un organisme (**Figure 1**). La multiplication des cellules s'arrête quand un élément du milieu nutritif est épuisé. Quand elles sont cultivées sur support, leur croissance s'arrête par inhibition de contact. (c.à.d. quand elles forment un tapis confluent de monocouche cellulaire.)

❖ Remarque :

Inconvénients : Ces cellules ne peuvent être maintenues en culture que pendant quelques générations (nécessite un repiquage).

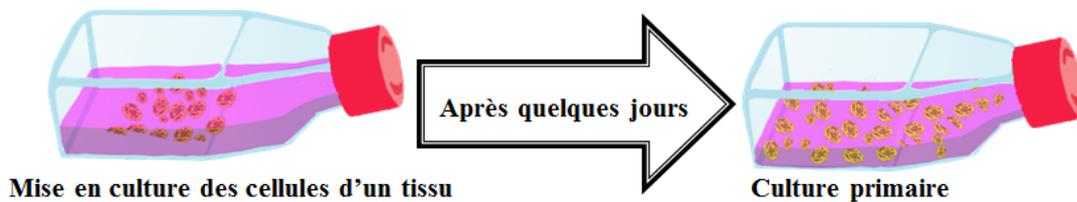


Figure 1 : schéma d'une culture primaire

5.2 Culture secondaire :

Quand les cellules de la culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible (arrivent à confluence) ; ces cellules, elles doivent être réensemencées à une densité plus faible dans un nouveau récipient de culture avec des milieux frais, cette opération est appelée: repiquage. Qui veut dire que ce sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour ensemercer d'autres cultures et ainsi de suite: ce sont donc les cultures secondaires (**Figure 2**). Ces cellules ainsi obtenues conservent les caractéristiques du tissu d'origine mais leur nombre de divisions est limité comme dans l'organisme.

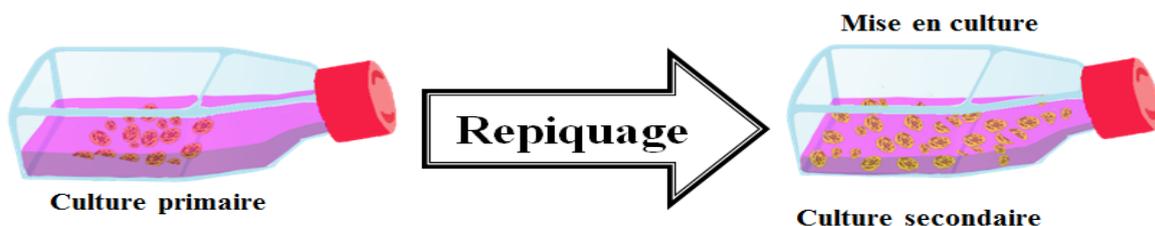


Figure 2 : schéma d'une culture secondaire

5.3. Lignée cellulaire :

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules qui ont subi des modifications génétique qui permettent leur croissance indéfinie (une capacité illimitée de division avec un entretien in vitro par repiquages successifs).

Elles proviennent de :

- ✓ Tumeurs spontanées : cellules cancéreuses prélevées sur une tumeur
- ✓ Cellule transformées par immortalisation.

Exemple : Cellules HeLa (Henrietta Lacks): lignée cellulaire cancéreuse .

6. Terminologie de la culture cellulaire :**❖ Explants :**

Fragments excisés d'un tissu ou d'un organe utilisés pour initier une culture in vitro.

❖ Mono-couche :

Couche unique de cellules se développant sur une surface.

❖ Culture en suspension :

Type de culture où les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension. Les cellules non adhérentes sont cultivées dans les mêmes conditions mais se développent en suspension.

❖ Culture des cellules adhérentes :

Culture sur un support : adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture .

❖ Passage (repiquage) :

Ce synonyme de repiquage peut également indiquer le passage des cellules d'un récipient de culture à un autre. Lorsque l'on utilise ce terme, il faut donc spécifier ce qui fait l'objet du passage car les spécialistes des questions virales utilisent ce terme pour décrire le transfert de fluides surnageant plutôt que de cellules.

❖ Cellule transformées par immortalisation :

Cellules saines rendues immortelles (transformation = cancérisation) par traitement mutagène: chimique, physique ou par utilisation de virus oncogènes.

❖ **Cellules HeLa :**

Les cellules HeLa (Henrietta Lacks) sont une lignée cellulaire cancéreuse utilisée en biologie cellulaire et en recherche médicale. Ces cellules proviennent d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente Afro Américaine atteinte d'un cancer du col de l'utérus.

❖ **La confluence :**

Elle décrit le degré d'écartement qui existe entre cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié ; par exemple 100 % de confluence décrit un tapis cellulaire présentant aucun interstice (espace) entre chaque cellule ; en clair, elles se touchent toutes.

❖ **Immortalisation cellulaire :**

Acquisition de la capacité illimitée à se multiplier in vitro.

❖ **La sénescence:**

Est le processus de vieillissement biologique : c'est la suite des changements inversibles dans un organisme qui aboutissent à la mort.

Références bibliographiques :

Aschner M., et Costa L., 2019. Cell Culture Techniques. Second Edition, Humana Press, New York, USA, 302p.

Béné MC., Drouet C., Fisson S., Seillès E., 2014. Méthodes en immunologie. Deuxième Édition, Elsevier Masson , 214p.

Ian Freshney R., « Subculture and Cell Lines », dans *Culture of Animal Cells*, American Cancer Society, 2005. (Ian Freshney, 2005)

Ian Freshney R., 2005. Culture of Animal Cells. 6 ème edition, John Wiley & Sons, Inc, UK, 676p.

Maddaly Ravi, V. Paramesh, S.R. Kaviya et E. Anuradha, « 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications: 3D CELL CULTURE SYSTEMS », *Journal of Cellular Physiology*, vol. 230, no 1, janvier 2015, p. 16–26.

Magniez F : La culture cellulaire . [web] (6/2/2008), disponible sur : <http://www.technobio.fr/article-16526675.html>. page consulté le 12/05/2020.

Ovaguimian O ., 2004. Le point sur la culture cellulaire. *Revue Française des Laboratoires*, 360 : Pages 66-67.

Ronot X., et Barlovatz-Meimon G., 2014. *Culture de cellules animales*. 3e édition, Lavoisier, Paris, France, 667p.

Uysal O., Sevimli T., Sevimli M. et Gunes S., *Cell and Tissue Culture*, dans *Omics Technologies and Bio-Engineering*, Elsevier, 2018, p. 391–429.

Chapitre 2 :
Infrastructures et appareillage

Chapitre 2 : Infrastructures et appareillage**1. Introduction :**

Les exigences spécifiques d'un laboratoire de culture cellulaire dépendent principalement du type de recherche effectuée. Cependant, la culture cellulaire nécessite des conditions de stérilité absolues, toute contamination microbienne entraîne la lyse des cellules. De ce fait, tous les laboratoires de culture cellulaire ont pour exigence commune d'être exempts de microorganismes pathogènes (condition d'asepsie) et partagent certains des mêmes équipements de base indispensables à la culture de cellules.

2. L'équipement d'un laboratoire de culture :

La culture cellulaire se base sur l'utilisation d'outils, que sont:

- ✓ Un endroit stérile et le restant, pour manipuler les cellules sans les contaminer : poste de sécurité microbiologique ou **hottes à flux laminaires** équipées de système de filtration d'air (PSM) , qui permet d'obtenir une zone de manipulation stérile .
- ✓ Un endroit remplissant les conditions nécessaires à la vie des cellules: un **incubateur**.
- ✓ Du **milieu de culture**, qui varient selon le type de cellule et ce que l'on veut en faire.
- ✓ Un **réfrigérateur** (+4 °C) pour stocker les milieux de culture.
- ✓ Un milieu de congélation
- ✓ Un **congélateur** (-80 °C, ou un congélateur à azote liquide) pour stocker les cellules congelées.
- ✓ Une **centrifugeuse réfrigérée**.
- ✓ Un **microscope inversé**.

2.1 Poste de sécurité microbiologique (PSM) (Hotte à flux laminaire) :

Une enceinte destinée à assurer la protection de l'utilisateur et de l'environnement contre les dangers liés aux aérosols, en créant un bouclier qui interdit aux particules extérieures d'entrer dans l'enceinte. Elle assure un flux constant d'air filtré qui protège l'espace de travail des poussières et contaminants microbiens. L'air ambiant est filtré par un filtre HEPA (High-Efficiency Particulate Air).

Elles existent deux types de hottes :

2.1.1 Hotte de type I:

La manipulation est parfaitement protégée par les flux d'air qui l'enrobent. Ce type d'appareil dirige un flux laminaire vertical à travers un filtre absolu (HEPA). En revanche, le manipulateur n'est pas protégé car une partie du flux d'air vertical (20%) sort de l'enceinte à l'avant de la hotte mais 80% sont recyclés (**Figure 3**).

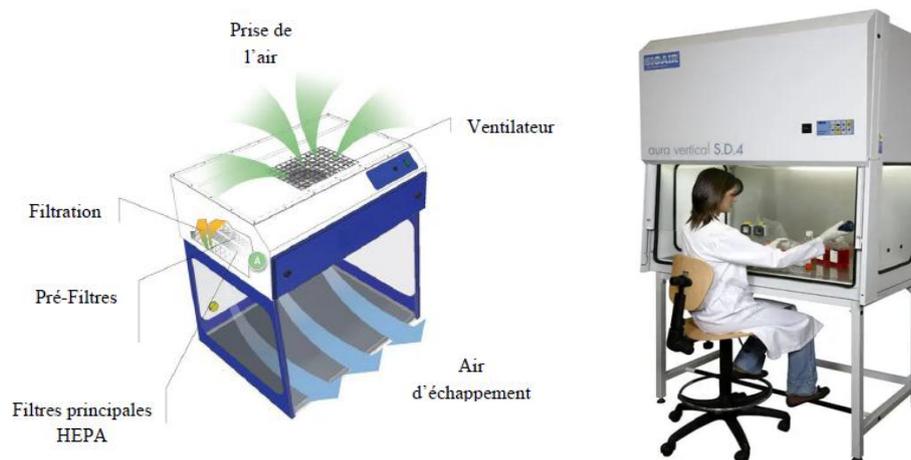


Figure 3 : Hotte à flux laminaire vertical HEPA.

2.1.2 Hotte de type II ou poste de sécurité microbiologique (PSM) :

La manipulation, le produit et l'environnement sont parfaitement protégés. Le flux d'air est repris par la base du panneau arrière pour recyclage (70%) et évacuation vers l'extérieur (30%) après passage par un filtre HEPA sur le haut de la hotte. La protection de l'environnement est assurée par un filtre absolu placé sur la sortie en partie haute et celle du manipulateur par un flux d'air entrant en façade avant qui compense celui rejeté à l'extérieur (**Figure 4**).

Pour l'utilisation de matériel à risque (lignées cellulaires de primates et d'humains, lignées produisant des virus), il faut utiliser des hottes PSM de type II.

Il ne faut rien poser sur les grilles se trouvant à l'entrée de la hotte, ni boucher les grilles se trouvant à l'arrière de manière à ne pas perturber le flux d'air.

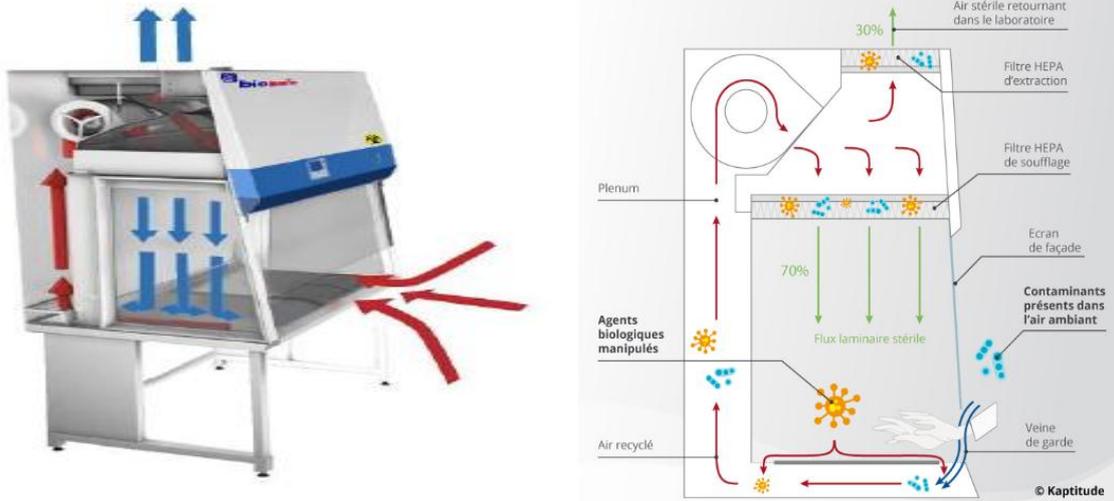


Figure 4 : Hotte de type II ou poste de sécurité microbologique (PSM).

2.2 Incubateur :

Il s'agit d'incubateurs à CO₂ à jaquette d'eau et chauffage de porte. Le chauffage de porte permet d'éviter la condensation de la porte interne. La jaquette d'eau étanche permet de minimiser l'évaporation d'eau. Les incubateurs fonctionnent à 37° C et à 5% de dioxyde de carbone pour maintenir le pH du milieu à un pH correct. Ils ont tous des compteurs pour enregistrer la température et le niveau de gaz. Il y a des alarmes pour indiquer quand elles s'écartent des paramètres réglés (**Figure 5**).



Figure 5 : Incubateur à CO₂ à jaquette d'eau et chauffage de porte.

2.3. Centrifugeuses:

Il y a des centrifugeuses dans chaque zone de culture cellulaire qui sont réfrigérées. Les cellules humaines doivent être centrifugées dans des rotors scellés. 100 x g est assez dur pour sédimenter les cellules, cependant des forces g plus élevées peuvent endommager les cellules.

2.4. Réfrigérateurs et congélateurs :

Les deux éléments sont très importants pour le stockage de milieux liquides à 4 ° C et pour des enzymes (par exemple, la trypsine) et certains composants de milieu (par exemple, la glutamine et le sérum) à -20 ° C.

Un réfrigérateur ou une chambre froide est nécessaire pour stocker les milieux et les tampons. Un congélateur sera nécessaire pour conserver des stocks pré-aliquotes de sérum, de nutriments et d'antibiotiques. Les réactifs peuvent être conservés à une température de -20 ° C mais si les cellules doivent être conservées, il peut être nécessaire de fournir de l'azote liquide ou un congélateur à -70 °C.

2.5. Microscopes:

Un simple **microscope inversé** est essentiel pour que les cultures puissent être examinées dans les flacons et des plaques. Il est essentiel de pouvoir reconnaître les changements morphologiques dans les cultures car ceux-ci peuvent être la première indication de la détérioration d'une culture (**Figure 6**).

Un **microscope optique** très simple avec un grossissement x 100 suffira pour les numérations cellulaires de routine dans un hémocytomètre, bien qu'un microscope de bien meilleure qualité soit nécessaire pour l'analyse chromosomique ou l'autoradiographie.



Figure 6 : Microscope inversé.

2.6. Congélateur d'azote liquide :

Invariablement, pour les lignées cellulaires continues et finies, les échantillons de cultures devront être congelés pour le stockage. Il est important de maintenir la continuité dans les cellules afin de prévenir la dérive génétique et de prévenir la perte de la lignée cellulaire due à la contamination et à d'autres problèmes.

La procédure de congélation des cellules est générale pour toutes les cellules en culture. Ils doivent être congelés en phase de croissance exponentielle avec un conservateur approprié, habituellement du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules sont congelées lentement à $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ jusqu'à -50°C puis maintenues à -196°C immergées dans du N_2 liquide (dans des ampoules de verre scellées) ou sur la surface liquide dans la phase gazeuse (ampoules à bouchon à vis).

2.7. Contenants de culture tissulaire :

Une variété de matériel de culture de tissus est disponible, la plus commune étant spécialement le polystyrène traité. Les cellules peuvent être maintenues dans des boîtes de Pétri ou des flacons (25 cm^2 ou 75 cm^2) qui ont l'avantage supplémentaire que les flacons peuvent être gazés et ensuite scellés de sorte qu'un incubateur à CO_2 n'a pas besoin d'être utilisé. Ceci est particulièrement utile si les incubateurs échouent (**Figure 7**).



Figure 7 : A gauche : Plaque à puits multiples (6 puits). A droite: Flacon de culture.

3. Les différentes méthodes de stérilisation :

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.

3.1 Stérilisation par les méthodes physiques:

3.1.1 Stérilisation par la chaleur :

A. La chaleur sèche :

La chaleur sèche fonctionne en dénaturant les enzymes et les acides nucléiques par oxydation, ce qui va tuer le micro-organisme.

❖ Le flamage (chauffage direct):

Il est basé sur l'emploi du bec Bunsen. Cette méthode est utilisée pour la stérilisation immédiate du matériel de manipulation. A utiliser pour les objets en verre (pipettes, tubes à essai...), pour certains objets en métal (anse, pince).

Il est à noter que le bec Bunsen, réglé avec une flamme bleue, la plus chaude, crée une zone de stérilité d'un diamètre d'environ 20 cm. Toutes les manipulations d'ouverture de tubes et boîtes de culture, d'ensemencement, devront être réalisées dans ce diamètre. Pour que cette zone soit effectivement stérile, les courants d'air et déplacements de personnes sont à proscrire (**Figure 8**).

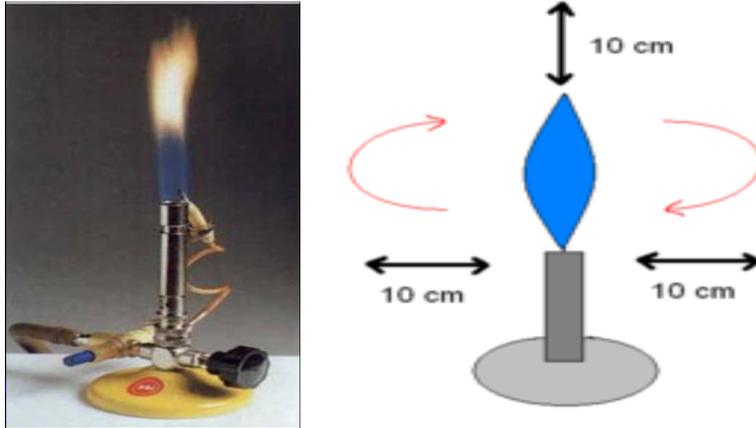


Figure 8 : Bec bunsen.

❖ **Le four pasteur, Poupinel (stérilisateur à air chaud) :**

C'est un four - étuve à air chaud et sec. Il est utilisé pour la stérilisation de la verrerie vide (tubes à essai, boîtes de Pétri, tubes à culture et bouchons, pipettes Pasteur et récipients divers), porcelaine et instruments métalliques (**Figure 9**).

La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Les spores et germes sont détruits en chaleur sèche, par un chauffage de :

- ✓ 30 minutes ou plus à 180°C.
- ✓ 1 heure ou plus à 170°C.
- ✓ 2 heures ou plus à 160°C.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières.



Figure 9 : L'étuve de POUPINEL (le four de Pasteur).

B. Chaleur humide:❖ **L'autoclave:**

Cette technique consiste à faire bouillir de l'eau dans une enceinte close pour augmenter la pression, donc le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 100° à 130°C, pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients (15 min au minimum) (**Figure 10**).

Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés, mais peut également stériliser tout autre matériel de microbiologie : matériel en caoutchouc, la verrerie...

En milieu saturé d'humidité et sous pression, la stérilisation s'opère à des températures inférieures à celles qui sont nécessaires en milieu sec.

Le matériel à stériliser est déposé dans les paniers métalliques de l'autoclave dont on aura vérifié le niveau d'eau avant chaque opération de stérilisation. Les récipients sont préalablement bouchés avec du coton (éviter de le prendre avec les doigts - utiliser de préférence une pince) et recouverts de papier d'aluminium ou de papier d'emballage très résistant.



Figure 10 : Autoclave.

❖ **Le bain-marie ou bain-thermostatés (ébullition):**

Un chauffage de 30 minutes à 100°C par ébullition ou un maintien dans la vapeur d'eau bouillante suffit à détruire toutes les formes végétatives (**Figure 11**).

A utiliser pour la stérilisation des produits liquides délicats : milieux albumineux, lait, gélatine, solutions concentrées de glucides, ...



Figure 11 : Bain marie.

C. Autres méthodes :

Certains milieux de culture fragiles ne supportant pas les températures élevées, on procède à une ébullition à 100°C.

❖ Pasteurisation :

La pasteurisation est toujours suivie d'un refroidissement rapide. Elle peut se faire en bouteilles.

Elle est utilisée dans la conservation des produits naturels pendant un temps limité, ne détruit que les formes végétatives mais pas les spores. Le liquide est porté rapidement à 90°C pendant 30s, par exemple, puis on le refroidit brusquement à 10°C.

Elle est utilisée en industrie pour la conservation des produits alimentaires: le lait, la bière, les jus de fruit....

❖ Tyndallisation

La tyndallisation est une série de chauffages brefs à des températures de 70°C à intervalles réguliers (3 chauffages d'une heure, 24 h entre 2 chauffages), ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

Elle est utilisée afin d'éliminer les formes végétatives (bactéries) et les formes de résistance (spores), il faut donc soumettre le milieu à un chauffage discontinu à basse température. Le chauffage suffit à éliminer les formes végétatives, et provoque un choc thermique, qui est un facteur déclenchant pour qu'une forme de résistance entre en germination, et donne ainsi des formes végétatives

Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles à base de sérum (ex vaccins) , ou de jaune d'œuf ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration.

3.1.2 Stérilisation par filtration:

La filtration consiste à faire passer le liquide à stériliser à travers une paroi poreuse ou une membrane qui retient les bactéries.

Cette méthode est utilisée pour les milieux sensibles à la chaleur, mais n'est possible que lorsque la viscosité de ces milieux est faible.

Il existe plusieurs types de filtration (**Figure 12**) :

- ✓ les bougies de porcelaine (type Chamberland): tubes à fond arrondi dont les parois sont poreuses, en porcelaine. La dimension de ces pores varie de quelques μm au 1/10ème de μm .
- ✓ Disques: disques en verre fritté de porosité de 150 à 1 μm .
- ✓ les membranes filtrantes à usage unique: membranes plastiques minces comportant des millions de pores par cm^2 dont la taille, très uniforme, varie de 8 à 0.01 μm , sont actuellement les plus utilisées dans les laboratoires.
- ✓ Stériliser des liquides altérables par la chaleur: solutions glucidiques, vitamine.



Figure 12 : Différents filtres.

3.1.3 Stérilisation par les radiations:**A. La stérilisation par les U.V :**

Elle est la plus utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection : le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. Des instruments ou des récipients tels que les boîtes de Pétri peuvent être stérilisées de la sorte.

Elle est utilisée en virologie, cultures cellulaires, préparation et conditionnement des produits pharmaceutiques, ensemencements bactériens, préparation de milieux.

B. D'autres radiations (rayons X...): peu utilisées, peuvent cependant servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique : stérilisation par ionisation, ou pour la conservation de certains produits alimentaires.

3.2 Stérilisation par des agents chimiques :

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles et plans de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué, dans nos laboratoires, pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

3.2.1 Antiseptiques:

Tuent les cellules vivantes, microorganismes et autres. Leur action est instantanée. Par exemple: teinture d'iode, permanganate de potassium, eau oxygénée ...

Utilisation locale chez les êtres vivants, au niveau des plaies et des muqueuses.

- ✓ L'alcool éthylique à 60% pour la désinfection des paillasse et des instruments. Mais certains germes étant résistants, la désinfection n'est pas toujours évidente.
- ✓ L'hypochlorite de sodium (eau de Javel) est utilisé dilué au 1/4 dans les bacs destinés à recevoir les lames usagées, ou en pissette pour la désinfection des mains, des paillasse et des sols.
- ✓ Les savons et détergents agissent surtout par leur pouvoir mouillant, ce qui facilite l'élimination des germes.

3.2.2 Les désinfectants:

Les désinfectants empêchent les contaminations humaines et animales. Il peut être vapeurs (formol, gaz sulfureux, oxyde d'éthylène) ou liquides (phénols, sulfate de cuivre, de fer, eau de Javel). Les désinfectants peuvent être utilisés pour tous les milieux extérieurs à l'Homme: eau, air, sol.

Les vapeurs d'une solution chauffée de formol sont utilisées pour désinfecter les pièces et les étuves.

L'oxyde d'éthylène est utilisé dans l'industrie pour la désinfection de certains matériels en plastique à usage unique.

3.2.3. Antibiotiques:

Il existe deux types les antibiotiques bactériostatiques qui stoppent la multiplication des bactéries sans les détruire et les antibiotiques bactéricides: qui tuent les bactéries. Les antibiotiques sont utilisés généralement pour les cultures in vivo (**Tableau 1**) .

Tableau 1 : Les inconvénients des méthodes de stérilisation

Traitement et description	Inconvénient possible
<p>Traitement à la flamme Le matériel est chauffé au-dessus d'une flamme. Les micro-organismes meurent à cause de la chaleur.</p>	Le matériel peut fondre sous la chaleur de la flamme.
<p>Traitement au four à chaleur sèche Le matériel est chauffé à l'intérieur d'un four qui tue les micro-organismes.</p>	Le matériel qui ne résiste pas à la chaleur peut casser.
<p>Traitement chimique Le matériel est trempé dans une solution ou exposé à un gaz, ce qui tue les micro-organismes.</p>	Les substances utilisées sont souvent nocives pour la santé humaine et difficiles à manipuler en toute sécurité.
<p>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.</p>	Le matériel qui ne résiste pas à l'humidité ne peut pas être stérilisé à la vapeur d'eau.
<p>Traitement par rayonnements Le matériel est exposé à des rayonnements (rayons X, rayons UV, rayons gamma, etc.) qui tuent les micro-organismes.</p>	L'exposition aux rayonnements peut être nocive pour la santé humaine.

3.3 La stérilité en Culture cellulaire :

La notion de stérilité en culture cellulaire est parfois difficile à appréhender. En effet, ce qui est "stérile" ne contient aucun organisme vivant. Mais une culture cellulaire "stérile" désigne en pratique une culture ne contenant que les cellules que l'on souhaite y trouver, et aucun autre organisme vivant.

3.3.1 Stérilisation des milieux :

Tout ce qui ne doit contenir aucune cellule doit être stérilisé. Pour cela, il faut filtrer, en condition de stérilité (c'est-à-dire sous une flamme ou sous un PSM), en utilisant un filtre à membrane de 0,22 μ m de taille de pores (filtre millipore). IL existe des filtres de tout type et de tout pas, la plupart nécessitent une pression pour fonctionner (prise de vide ou trompe à eau). Avec un filtre à 0,22 μ m, seuls les virus seront conservés.

L'autoclavage (passage à haute température ex. 121 °C pendant 20 minutes) de certains solutés est possible, mais cette technique ne peut concerner les milieux de cultures, qui contiennent des protéines: l'autoclavage les ferait cuire.

3.3.2 Stérilité des cultures :

La hantise du biologiste est la contamination des cultures. En effet, une cellule dont la culture est colonisée par un autre organisme est très perturbé, car l'étranger induit chez elle du stress par dérivation, car le contaminant prolifère plus vite et consomme les nutriments du milieu, et du stress par signaux de danger, qui modifient profondément les réactions d'une cellule.

Les contaminants les plus courants sont les bactéries de notre peau : E.coli et S.aureus, certaines levures également. Les contaminations par le genre Mycoplasma sont également fréquentes. Il arrive qu'une culture cellulaire se contamine avec un autre type cellulaire. C'est parfois le cas quand une même personne travaille sur de nombreuses lignées en même temps au même endroit.

3.3.3 Stérilité des surfaces :

La zone propre doit être le plus propre possible, par décontamination régulière utilisant un nettoyeur décontaminant de surface.

Par précaution, il faut également nettoyer et décontaminer toute surface entrant dans la zone propre: les flacons, les bouteilles, les gants, les mains ...

3.3.4 Stérilisation du matériel :

La disponibilité d'une large gamme de culture de tissus en plastique réduit la quantité de vaisselle nécessaire. Cependant, les objets en verre tels que les pipettes doivent être trempés dans un détergent approprié, puis soumis à une procédure de lavage rigoureuse avec un trempage complet dans de l'eau distillée avant le séchage et la stérilisation.

Les pipettes sont souvent bouchées avec du coton cardé non absorbant avant d'être stérilisées. La verrerie, telle que les pipettes, les fioles coniques, les béchers (recouverts d'une feuille d'aluminium) sont stérilisés dans un four à air chaud à 160 °C pendant une heure.

Tous les autres équipements, tels que les embouts de pipettes automatiques et les bouteilles (couvercles desserrés) sont autoclavés à 121 °C pendant 20 minutes.

Références bibliographiques :

Curtet-Benitski S. et Filiputti-Gilquin A.-L. (2014). Bonnes pratiques de culture cellulaire. In : Barlovatz-Meimom G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 118-127.

Langdon S.P. (2004). Basic Principles of Cancer Cell Culture. In : Methods in Molecular Medicine, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 3-15.

Langdon S.P. (2004). Cell Culture Contamination : An Overview. In : Methods in Molecular Medicine, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 309-317.

Mather J.P. et Roberts P.E. (1998). Introduction to Cell and Tissue Culture : Theory and Technique. Chapitre 2,3,4 et 7. New York et London : Plenum Press. 241 pages.

Philippeos C., Hughes R.D., Dhawan A. et Mitry R.R. (2012). Introduction to cell culture, chapter 1. In Mitry R.R. et Hughes R.D. Human Cell Culture Protocols, volume 806, Methods in Molecular Biology. P. 1-13.

Ryan J.A. (2007). Les bonnes pratiques de culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : www.corning.com/lifesciences.

Sigma Aldrich (2016). Fundamental techniques in cell culture. Handbook. 3e édition. 80 pages.

Chapitre 3 :
Préparation des milieux de
culture

Chapitre 3 : Préparation des milieux de culture**1. Introduction :**

Les milieux de culture doivent reproduire aussi fidèlement que possible les conditions de l'environnement que les cellules trouvaient in vivo. Ils doivent donc être à la fois :

- Vecteur d'éléments nutritifs,
- Contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que pH et osmolarité et permettre la prolifération des cellules (divisions cellulaires).

Le changement des milieux de culture est indispensable tous les 2 à 3 jours (cas de culture de longue durée)

Les milieux de culture sont disponibles chez de nombreux fournisseurs soit sous forme de poudre soit sous forme liquide

2. Composition des milieux de culture :

Un milieu de culture peut consister:

- en l'association d'un milieu synthétique de base + sérum (le plus performant étant le sérum de veau foetal).
- ou un milieu de culture peut-être un milieu défini= milieu synthétique sans sérum.

Un milieu de culture doit contenir les exigences cellulaires minimales : Eau, ions minéraux (osmolarité), sources de carbone et d'énergie : glucose, source d'acides aminés, solution tampon (la régulation du pH pH 7,4), rouge de phénol : indicateur de PH, vitamines: Cofacteurs d'enzyme et des bases azotées : ribose et désoxyriboses.

D'une autre part un milieu de culture contient des compléments variables selon les milieux : Glutamine à 1 %, sérum de veau fœtale (SVF), EGF : facteur de croissance épidermique, facteur d'adhésion, inhibiteur à antitrypsine et Mélange d'antibiotiques à 1% (Pénicilline, Streptomycine et Antifongique).

2.1 Milieux synthétiques de base:

Les milieux de base sont tous synthétiques, de composition plus ou moins complexe. On les désigne également par l'appellation MEM = Milieu Essentiel Minimum. Ces milieux sont dits de base car ils assurent seulement la survie des cellules in vitro.

La prolifération et l'expression des différentes fonctions cellulaires en culture nécessitent l'addition d'une certaine concentration de sérum au milieu synthétique de base.

Les milieux synthétiques de base doivent contenir:

2.1.1 Sels minéraux :

7 ions sont indispensables Na^+ , K^+ , PO_4^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , CO_3^{2-} (carbonate). Certains milieux contiennent aussi des métaux à l'état de traces comme le fer, le cuivre, le cobalt, le sélénium.

❖ Rôle :

Servent de cofacteurs d'enzymes, jouent un rôle dans la pression osmotique, aident à réguler le potentiel membranaire en apportant des ions sodium, potassium et calcium, les communications, la régulation du pH, attachement des cellules (notamment le Ca^{++}), entrent dans la constitution de certaines molécules.

2.1.2 Acides aminés :

Les acides aminés essentiels sont 8 chez l'homme (Ile: isoleucine, Leu: leucine, Lys: lysine, Meth: méthionine, Phé: phénylalanine, Thréo: thréonine, Trp: tryptophane, Val: valine).

Remarque: Cas particulier de la glutamine (Glu) qui est indispensable pour quasiment toutes les cellules de mammifères en culture. La Glu sert de précurseur pour la synthèse des purines, des pyrimidines et de quelques acides aminés. Une carence en glutamine peut conduire à un arrêt de la croissance cellulaire dû à une inhibition de la synthèse de l'ADN

❖ Rôle :

Les acides aminés sont les composants des protéines, Les acides aminés essentiels doivent être inclus dans le milieu de culture car les cellules ne peuvent pas les synthétiser elles-mêmes.

2.1.3 Vitamines :

Les besoins sont variables suivant les types cellulaires. Selon Eagle, 8 vitamines sont indispensables : choline (classé dans le groupe des vitamines B) , acide folique (B9), thiamine (B1) , pyridoxal (B6), riboflavine (B2), acide nicotinique (B3), inositol (B7), acide panthoténique (B5).

❖ Rôle :

Cofacteurs d'enzymes ou précurseurs pour la synthèse de molécules.

2.1.4 Glucose :

La substance énergétique fondamentale est généralement le glucose à la concentration de 1g/L, concentration semblable à celle du sérum humain. Le glucose est quelquefois substitué par d'autres oses tels que le galactose, le mannose ou le fructose.

❖ Rôle :

Source d'énergie (catabolisme énergétique) pour la prolifération cellulaire et source de carbone (anabolisme).

2.1.5 Système tampon :

On a deux possibilités :

- utilisation du couple (bicarbonate de sodium, dioxyde de carbone), NaHCO_3 apporté dans le milieu et CO_2 (à 5 %) dans l'atmosphère de l'étuve.
- utilisation d'une molécule organique tampon dans le milieu, l'HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique).

❖ Rôle:

Permet la régulation du pH : régulation obligatoire pour les cellules de mammifères notamment qui sont issues d'un organisme où règne l'homéostasie.

Pour suivre les variations de pH du milieu, on ajoute dans le milieu un indicateur de pH le rouge de phénol.

2.1.6 Rouge de phénol :

Le rouge de phénol est un bon indicateur coloré pour suivre l'évolution du pH au cours de la culture

❖ Rôle :

Permet de visualiser les variations du pH, adapté car zone de virage située à la valeur de pH à réguler. En effet, à pH faible (acide), le rouge de phénol rend le milieu jaune alors qu'à des pH élevés (alcalin) le milieu tourne au violet. Pour un pH adéquat de 7,4 : Le milieu est rouge orangée (**Figure 13**).

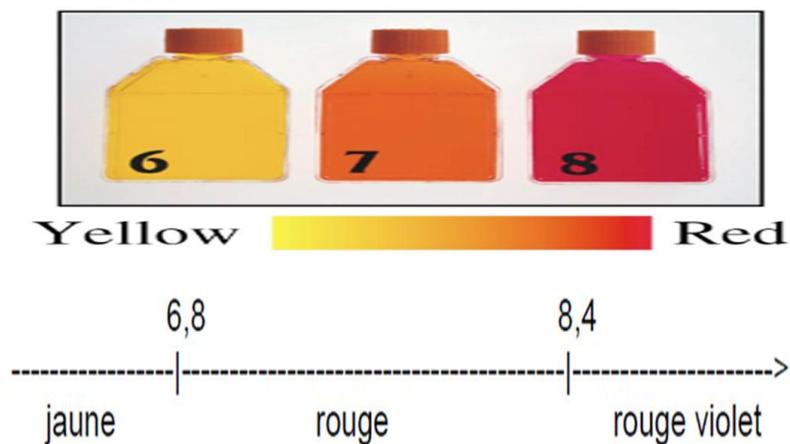


Figure 13 : Indicateur coloré (rouge de phénol).

❖ Cause du changement de la couleur du rouge de phénol :

- Un milieu correctement régulé devra présenter une coloration rouge-orangée.
- Une coloration rouge violacée est le signe d'un pH trop basique. C'est le signe d'une mortalité cellulaire, les cellules lysées libèrent des protéines qui alcalinisent le milieu.
- Une coloration jaune celui d'une acidification importante. Cette acidification s'observe lorsque le nombre de cellules devient trop important, elle est due à la dissolution du gaz carbonique produit lors de la respiration des cellules.

Un milieu jaunissant implique un repiquage obligatoire des cellules. Si l'acidification du milieu s'accompagne d'une opacification c'est alors le signe d'une contamination bactérienne

2.2 Sérum :

Mises en culture en présence d'un milieu synthétique de base tel que nous venons de le décrire, la plupart des cellules ne sont généralement aptes qu'à la survie. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fournis par le sérum. Le pourcentage de sérum additionné au milieu de base varie, selon le type cellulaire, de 2 à 20 %.

On peut utiliser des sérums d'origine humaine ou animale, d'individus jeunes, sachant que l'effet cytoestimulant global du sérum est inversement proportionnel à l'âge du donneur. Les plus fréquemment retrouvés sont : le sérum de veau, le sérum de veau nouveau-né, le sérum de veau fœtal (SVF), ce dernier ayant les meilleures performances. Il existe actuellement des mélanges permettant de remplacer le SVF, on peut citer aussi le liquide amniotique enrichi en certains constituants.

❖ **Remarque :** L'ajout du sérum dans les milieux de culture doit être réalisé extemporanément (tout juste avant le démarrage de la mise en culture) et dans des conditions strictement stériles.

2.2.1 Sérum de veau fœtal : constituants et rôles :

A. Facteurs de croissance et des hormones :

Facteurs de croissance = peptides impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (messagers chimiques), ils ont un effet mitogène et permettent la prolifération cellulaire.

Hormones = messagers nécessaires à la mise en place de certaines fonctions cellulaires

B. Facteurs d'attachement :

Sont des glycoprotéines qui favorisent l'adhérence des cellules (c'est important surtout en début de culture car les cellules sont peu nombreuses et conditionnent mal le milieu de culture). Par exemple l'albumine, la transferrine, la fibronectine (qui permet l'adhésion cellulaire au substrat)

C. Eléments qui assurent une protection des cellules :

Sont des inhibiteurs de protéases qui protègent les cellules de la protéolyse. Ils augmentent la viabilité.

D. Propriété nutritive :

Riche en nombreux oligoéléments; l'apport de minéraux, (comme Na⁺, K⁺, Zn²⁺, Fe²⁺).

- ❖ **Remarque :** L'ajout des Mélanges d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) sont nécessaires pour contrôler la croissance des bactéries et des levures (culture cellulaire doit se faire dans un environnement totalement stérile).

2.2.2 Avantages et inconvénient de l'utilisation du sérum de veau fœtal :

Tableau 2 : avantage et inconvénients de l'utilisation du sérum de veau fœtal

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apport facteurs de croissance permettant la prolifération cellulaire ▪ Apport d'hormones ▪ Apport de facteurs d'attachement contribuant à la bonne adhérence indispensable à la division cellulaire ▪ Rôle protecteur : augmente la viabilité cellulaire et la stabilité des produits cellulaires ▪ Propriétés nutritives (nombreux métabolites, ions, oligoéléments et lipides en solution) ▪ Pouvoir tampon ▪ Apport de protéines de transport (transportent des substances de faible poids moléculaire, fer et acides gras par exemple) ▪ Pouvoir détoxifiant : absorbe et neutralise les toxines 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Composition non définie ▪ Variabilité de lot à lot ▪ Problèmes d'innocuité : il s'agit d'un produit biologique qui même prélevé stérilement et stérilisé par filtration peut renfermer des virus, des toxines, des mycoplasmes ▪ Teneur élevée en protéines donc problème d'interférences lors de la purification des protéines d'intérêt synthétisées par les cellules (ex : protéines recombinantes, protéines avec application thérapeutique) ▪ Approvisionnement variable donc variabilité des prix ▪ Favorise préférentiellement la croissance des fibroblastes dans des cultures primaires (par rapport aux autres types de cellules)

2.3 Milieux définis ou milieux synthétiques sans sérum:

Devant la faible reproductibilité de certains résultats, les chercheurs ont évolué vers la mise au point de milieux dépourvus de sérum, enrichis en facteurs rigoureusement contrôlés. Ces milieux sont appelés milieux définis. Différents constituants définis sont additionnés à des concentrations définies à un milieu synthétique de base riche (ex milieu: type HAM F12 ou MCDB 104).

L'addition de ces substances varie en fonction des exigences du type cellulaire cultivé.

Ces substances peuvent être des :

- ✓ Hormones
- ✓ Facteurs de croissance
- ✓ Facteurs d'attachement
- ✓ Protéines de transport
- ✓ Antioxydants
- ✓ Substances lipidiques
- ✓ Facteurs divers

2.3.1 Hormones :

Insuline : (Utilisée à la concentration de 5 à 10 $\mu\text{g/mL}$). C'est une substance importante pour certaines lignées cellulaires. Cependant elle n'est pas très stable dans les milieux sans sérum, c'est pourquoi on peut admettre que pour beaucoup de cellules elle ne joue un rôle important qu'en début de culture. Elle serait inutile lorsque les cellules sont en pleine croissance.

2.3.2 Facteurs de croissance :

Les facteurs de croissance se classent plutôt comme étant des substances paracrines ou autocrines (si le médiateur agit à courte distance en diffusant vers sa cible, c'est une substance paracrine ou autocrine si la cible est une cellule de même type que la cellule), appelés de façon plus générale, médiateurs chimiques locaux. Leur action sur les cellules est déclenchée par la formation d'un complexe spécifique à un récepteur et il en résulte alors : soit une augmentation de la taille de la cellule, soit une augmentation de la population cellulaire, soit une induction ou un blocage d'une étape de différenciation.

Les facteurs de croissance sont des polypeptides dont la majorité d'entre eux sont actuellement produits et donc disponibles en quantité suffisante. Toutefois, un milieu sans sérum et contenant ces facteurs devient très onéreux. Un tel milieu n'est utilisable que pour la recherche, mais rarement pour la production. Il existe plusieurs facteurs de croissance notamment :

- ✓ EGF (Epidermal Growth Factor).
- ✓ FGF (Fibroblast Growth Factor).
- ✓ NGF (Nerve Growth Factor).
- ✓ PDGF (Platelet-Derived Growth Factor = facteurs de croissance des cellules endothéliales d'origine plaquettaire).
- ✓ TGF (Transforming Growth Factor).
- ✓ Différents interférons.
- ✓ Différentes interleukines.

2.3.3 Facteurs d'attachement :

Les supports sont tapissés avec un substrat protéique constituant des surfaces de choix pour la culture des cellules dont l'adhésion est difficile. Ils favorisent aussi la différenciation des cellules cultivées. Certains facteurs d'attachement peuvent aussi être introduits en solution dans le milieu de culture, par exemple Poly-L-lysine et Collagène.

2.3.4 Protéines de transport :

- ✓ Albumine sérique bovine (BSA):

L'albumine peut être utilisée à une concentration maximale de 5g/L. Elle remplit différentes fonctions dont celle d'être le transporteur de substances lipophiles (acides gras, éléments de trace, hormones et vitamines liposolubles), mais aussi de permettre la détoxification du milieu (transport de H₂O₂, fixation de toxines).

- ✓ Transferrine :

Elle est utilisée en concentration de 1 à 100 mg/L. Son premier rôle est de transporter le fer, mais elle permet également de détoxifier d'autres métaux.

2.3.5 Antioxydants :

Le rôle des antioxydants est très important lors de cultures menées en milieu sans sérum. Ils doivent inactiver les peroxydes générés au cours de la croissance, une fonction normalement assurée par le sérum.

2.3.6 Substances lipidiques :

Les substances lipidiques sont essentielles pour les cellules car elles contiennent les précurseurs de la synthèse des prostaglandines, nécessaires pour certaines cellules particulières, et sont incorporées après d'éventuelles modifications dans les membranes cellulaires. L'éthanolamine (10-20 μM) est requise dans la formulation de la plupart des milieux.

2.3.7 Facteurs divers :

- ✓ Métaux à l'état de trace : par exemple le sélénium, composant de l'enzyme glutathion-péroxydase ; cette enzyme intervient dans la dégradation des peroxydes toxiques métabolisés par la cellule au cours de la culture.
- ✓ Acide ascorbique (= vitamine C) : la vitamine C joue un rôle important dans le maintien du potentiel d'oxydo-réduction.
- ✓ Précurseurs des acides nucléiques comme la thymine, l'uridine, adénosine.

2.3.8 Substances non définies :

Comme les peptones, sont utilisées pour améliorer les milieux avec ou sans sérum. Elles apportent des acides aminés, des acides gras, des sels, des oligopeptides, etc.

L'avantage est qu'un milieu sans sérum contenant ces substances peut être plus facilement utilisé qu'un milieu sans ces ajouts.

2.3.9 Avantages et inconvénients des milieux définis (Sans sérum):**❖ Les avantages du milieu défini sont évidents :**

- la croissance cellulaire et la productivité sont optimisées,
- la reproductibilité est garantie, parfois, le prix du milieu peut même être réduit (si pas trop d'addition de facteurs de croissance).

❖ Les inconvénients :

La grande difficulté réside dans la nécessité de développer et d'optimiser les milieux sans sérum, pour les différents types de cellules utilisés.

3. Préparation d'un milieu de culture (protocole standards) :

- ✓ Récupérez les boîtes et les flacons spécifiques à la culture cellulaire. Elles ont été traitées par rayon X afin de les rendre stériles.
- ✓ Procurez-vous un milieu de culture synthétique quelconque. Il est composé principalement d'un liquide physiologique pour éviter aux cellules d'éclater.
- ✓ Prenez du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) qui est le milieu le plus couramment utilisé.
- ✓ Ajoutez-y des vitamines, de glucose et des acides aminés essentiels.
- ✓ Ajoutez un indicateur de pH, par exemple le rouge de phénol. Il colore votre milieu en rouge lorsque votre pH est physiologique. Quand vous observez une perte de coloration, refaites un milieu et transférez vos cellules dans celui-ci, car cela indique une variation de pH et on a un fort risque de mort cellulaire.
- ✓ Mettez du SVF (sérum de veau fœtal), il apporte les facteurs de croissances nécessaires à un bon développement cellulaire.
- ✓ N'oubliez pas les antibiotiques. En général, de la pénicilline et de la streptomycine suffisent. Ils empêchent simplement une infection de votre culture par des bactéries ou champignons, au cas où vos manipulations ne sont pas soignées.
- ✓ Tout ce mélange donne un certain pH à votre milieu qu'il faut stabiliser en ajoutant du tampon Hepès
- ✓ A partir de ce moment-là seulement, placez la souche cellulaire dans votre milieu et incubez à 37°C sous 5% de CO₂.
- ✓ Réglez l'incubateur pour obtenir ces paramètres particuliers. Evitez de l'ouvrir régulièrement afin de ne pas favoriser les contaminations ainsi que la perte de CO₂.

Références bibliographiques:

Adolphe M. (1988). Base des méthodes de culture. In : Barlovatz-Meimou G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales: Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 1-8.

Cezard F. (2013). Milieux et matériels de culture cellulaire. In : Biotechnologies en 27 fiches. 2e édition. Paris : DUNOD. P. 5-11.

Freshney R.I. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, chapitre 12 : primary culture. 5e édition. John Wiley & Sons, Inc. P. 175-197.

Froger B. et Adolphe M. (1988). Besoins nutritifs des cellules en culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales : Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 9-15.

Langdon S.P. (2004). Basic Principles of Cancer Cell Culture. In : Methods in Molecular Medicine, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 3-15.

Macleod K.G. et Langdon S.P. (2004). Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In : Methods in Molecular Medicine, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 17-29.

Ronot X., Kadri M. et Martel-Frchet V. (2014). Cryopréservation des cellules. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 128-136.

Ryan J.A. (2007). Introduction à la culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : www.corning.com/lifesciences.

Chapitre 4 :
La culture cellulaire

Chapitre 4 :

Chapitre 4 : la culture cellulaire**1. Techniques d'isolement des tissus et cellules :****1.1 Introduction :**

L'obtention des cellules diffère selon qu'elles proviennent d'êtres vivants unicellulaires ou pluricellulaires. Les cellules provenant d'être unicellulaire (levure, bactérie ...) sont directement prélevées dans divers milieux et transférées dans un milieu de culture appropriée. Exemple : la culture cellulaire d'une bactérie Par contre, dans le cas d'organismes formés de plusieurs cellules (pluricellulaire), c'est un processus plus compliqué.

1.2 Obtention des cellules :

Les organismes formés de plusieurs cellules (pluricellulaire), sont divisés en deux types de cellules :

1.2.1 Les cellules libres ou circulantes :

C'est cas de culture en suspension, sont des cellules qui vivent en cohésion les unes avec les autres et constituent un tissu par exemple le sang, moelle osseuse, liquide amniotique.... Les cellules circulantes sont récupérées facilement par prélèvement suivi de centrifugation sur ficoll (séparation selon la densité).

Cellules circulante ou libres: sont récupérées facilement par centrifugation sur ficoll (séparation selon la densité).

1.2.2 Les cellules organisées en tissus ou en organe :

C'est le cas de culture des cellules adhérentes, les cellules liées les unes aux autres doivent être isolées et séparées soit par des méthodes de dissection (par exemple broyage), soit par des méthodes enzymatiques (action d'enzymes protéolytiques). Après on peut les mettre : en culture primaire puis culture secondaire (**Figure 14**).

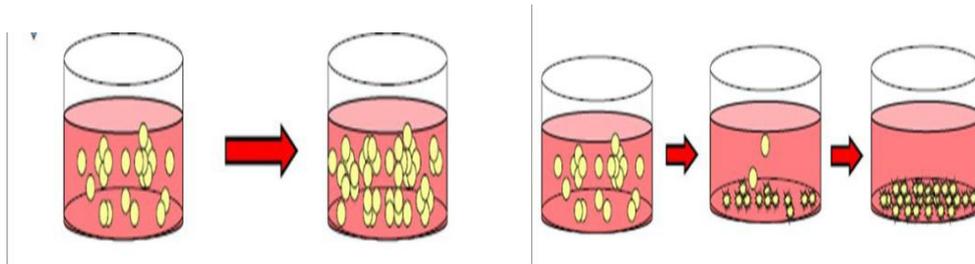


Figure 14 : Culture en suspension et culture adhérentes.

1.3 Isolement des cellules :

1.3.1 Les méthodes par dissection:

Cette méthode est la plus ancienne. Elle a permis aux précurseurs de la culture de tissu d'obtenir les premières cellules in-vitro.

❖ La méthode de Carrel :

Elle consiste à prélever un morceau de tissu qui est réduit en un très petit rectangle et déposé à la surface d'un mélange de 2 gouttes de plasma de coq et de 2 gouttes d'extrait embryonnaire à 50%. Après un séjour de 24H à l'étuve, on voit migrer les premières cellules à partir de l'explant.

❖ La méthode de dissection :

Exemple la peau, elle consiste à couper en fragment d'environ 1 à 4 mm³ le tissu que l'on réduit encore à l'aide de pince. Ces fragments sont ensuite placés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier. Cette méthode s'appelle également la méthode des explants.

❖ La méthode mécanique :

Cette technique s'applique pour des tissus mous comme le thymus, la rate. Elle consiste à frotter le tissu sur une grille puis de filtrer et centrifuger puis mise en culture. On peut également dilacérer les tissus à l'aide d'une pipette en verre en pipetant et refoulant les tissus.

1.3.2 Les méthodes enzymatiques :

Les enzymes utilisées sont des enzymes protéolytiques qui digèrent la trame protéique qui entoure les cellules, permettant ainsi leur libération.

Parmi les enzymes protéolytiques utilisées : la trypsine, la collagénase, la hyaluronidase, l'élastase, la dispase ou encore la papaïne. Il est important lors de la réalisation de cette technique, d'adapter la concentration des enzymes à la nature du tissu traité de façon à obtenir la meilleure dissociation possible sans atteinte des membranes cellulaires. Par exemple pour les tissus riches en collagène on utilise la collagénase.

❖ **Exemple : Utilisation de la trypsine:**

Les fragments de tissu primaire sont de nouveaux découpés en morceau de 2 à 3 mm auquel on ajoute une solution de trypsine à la densité de 1g de tissu pour 10 mL de solution. Cette suspension est mélangée à vitesse lente sous agitation magnétique pendant 30 minutes à 37°C, de façon à ne pas léser les cellules.

Le surnageant est ensuite récupéré et centrifugé à 600g pendant 5 minutes afin de récupérer les cellules qui se sont détachées sous l'action enzymatique et se situant dans le culot (**Figure 15**).

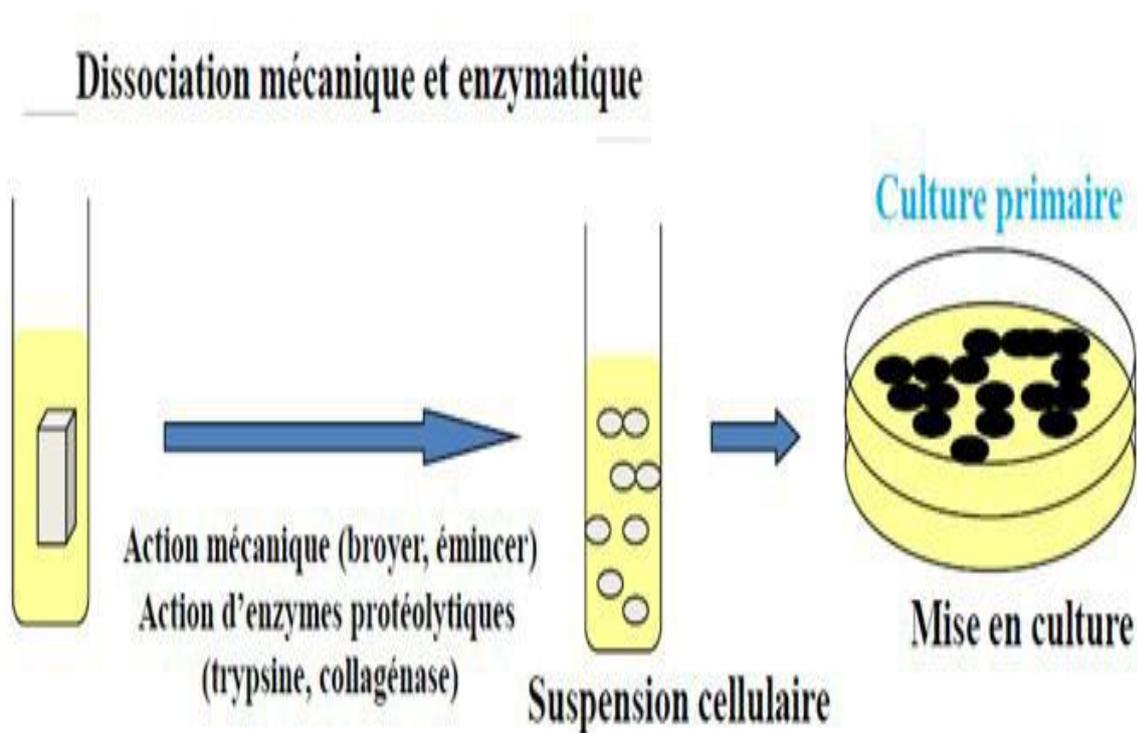


Figure 15 : Méthode de dissection et méthode enzymatique.

1.3.3 Les avantages et les inconvénients de ces méthodes :

Tableau1 : comparaison entre la méthode par dissection et la méthode enzymatique

	Les avantages	les inconvénients
La méthode par dissection	Elle est souvent utilisée quand le tissu à mettre en culture est très petit.	L'obtention nécessaire pour avoir des couches cellulaires confluentes est relativement long (environ 30 jours).
La méthode enzymatique	Elle est beaucoup plus rapide avec un bon rendement	Certaines cellules à membrane fragile peuvent être lésées par cette méthode

2. Conditions de cultures :

2.1 Introduction :

Un environnement heureux permet aux cellules de faire plus que juste survivre en culture. Généralement, cela signifie un environnement qui, au minimum, permet aux cellules d'augmenter en nombre par division cellulaire. Pour obtenir cet environnement, il est important de fournir aux cellules certaines conditions, en respectant certains paramètres physico-chimiques nécessaires à la culture cellulaire: en utilisant un incubateur. Ces paramètres physico-chimiques sont : rapport en milieu de culture Oxygène / CO₂ ; Température ; pH et Osmolarité. En addition, la culture cellulaire exige un milieu de culture adéquat et des conditions de stérilité stricte.

2.2 Oxygène :

Oxygène: la teneur optimale en oxygène varie selon le type cellulaire: la majorité des cellules se cultivent en normoxie c'est à dire avec une teneur de 21% d'oxygène ambiant. L'hyperoxie devient toxique pour les cellules au-delà de 50%, à l'inverse de l'hypoxie qui peut être bénéfique dans certains cas, notamment chez les cellules embryonnaires qui présentent une augmentation de leur capacité proliférative sous faible tension en oxygène (5%).

2.3 CO₂:

Cette concentration est particulièrement importante lorsque le système tampon bicarbonate est utilisé. Elle est alors maintenue à 5% de l'air ambiant. Le taux de CO₂ intervient également au niveau de la prolifération cellulaire, dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

2.4 Température :

Les cellules doivent être placées à la température qui correspond à celle de l'organisme dont elles sont issues. La température optimale pour la croissance des cellules de mammifère se situe entre 35,1°C et 37,1°C et nécessite ainsi une conservation des cultures cellulaires dans un incubateur maintenant une température aux alentours de 37°C.

Certaines cellules peuvent croître et proliférer à des températures plus basses, mais quel que soit le type cellulaire, les hautes températures sont généralement mal supportées avec une augmentation de la mortalité très marquée au-dessus de 40°C

2.5 Osmolarité :

L'atmosphère doit être saturée en vapeur d'eau pour limiter les phénomènes d'évaporation. Donc l'atmosphère de l'incubateur doit être saturée en vapeur d'eau, pour cela on « inonde » le plancher de l'étuve. Ce phénomène d'évaporation est responsable d'une augmentation de l'osmolarité dans le milieu de culture et donc de la concentration en sel, entraînant alors une lyse cellulaire par appel d'eau à l'extérieur de la cellule.

L'osmolarité du milieu doit être maintenue autour de 270 milliosmoles pour la majorité des cultures cellulaires avec une saturation en vapeur d'eau se situant autour de 84 à 85%.

2.6 PH :

Le pH optimal ne sera pas le même selon le type de cellules cultivées, et va dépendre de l'organisme à partir duquel elles sont issues. C'est ainsi que pour les cellules de mammifère, il a été établi qu'il doit se situer dans les normes sanguines soit entre 7,2 et 7,4.

La régulation du PH est obligatoire pour les cellules de mammifères. Elle peut être assurée par deux systèmes :

→ soit apport d'une molécule tampon dans le milieu de culture ; l'HEPES

→soit apport de bicarbonate de sodium NaHCO_3 dans le milieu et apport de CO_2 gazeux dans l'atmosphère de l'étuve.

2.6.1 La modification du pH :

Une modification du pH peut être observée en cas de contamination de la culture: avec une alcalinisation du milieu cellulaire en cas de contaminations fongiques et une acidification du milieu lors de contaminations bactériennes.

Associé à ces phénomènes, on peut observer :

- ✓ une acidification spontanée du milieu de culture en raison du dégagement de CO_2 généré par le métabolisme cellulaire lorsque le nombre de cellules devient trop important,
- ✓ une basification lors de mort cellulaire, une basification provoquée par la libération de protéines alcalinisantes au cours de la lyse des cellules.

2.6.2 La régulation du pH :

En utilisant un indicateur coloré : rouge de phénol, qui révèle à tout moment l'ordre de la valeur du pH de la suspension c'est-à-dire l'état de la culture.

Le rouge de phénol est le plus couramment employé pour suivre l'évolution du pH au cours de la culture. Un milieu avec un pH bien régulé aura une coloration plutôt rouge-orangé.

3. Caractérisation des cellules en culture :

3.1 Introduction :

Les caractérisations, des cellules en cultures cellulaire dépendaient en premier lieu du type des cellules :

- ✓ Cellules normales : À nombre de repiquages limité (limite de Hayflick).
- ✓ Cellules transformées (ou éventuellement embryonnaires) : À nombre de passages illimité donnant une lignée continue. Les cellules les plus utilisées en culture cellulaire et virologie médicale sont les cellules Vero et les cellules rénales de singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*). Ces cellules ont un aspect de fibroblaste

(fusiforme), elles adhèrent rapidement au support de verre ou plastique grâce aux ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} .

- ✓ Cellules tumorales : notamment les cellules HeLa (tumeur utérine) et

KB (carcinome oral humain)

- ✓ Cellules embryonnaires : notamment les cellules MRC-5 (poumon de fœtus humain) et 3T3 (embryon de souris).

3.2 Limite de Hayflick :

La limite de Hayflick a été découverte par Leonard Hayflick en 1965 qui avait observé que des cellules en division (mitose) dans une culture cellulaire ne se divisaient que 50 fois avant de mourir. Quand des cellules approchaient cette limite, elles montraient des signes de sénescence. Cette limite varie en fonction du type cellulaire, et plus encore en fonction du type de l'organisme. La limite pour l'homme se situe aux environs de 50 divisions. Cette limite a été reliée au raccourcissement des télomères.

De ce fait, les cellules normales ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions ~ 50 fois (**limite de Hayflick**). La vie et la mort des cellules normales sont programmées (**Figure 16**).

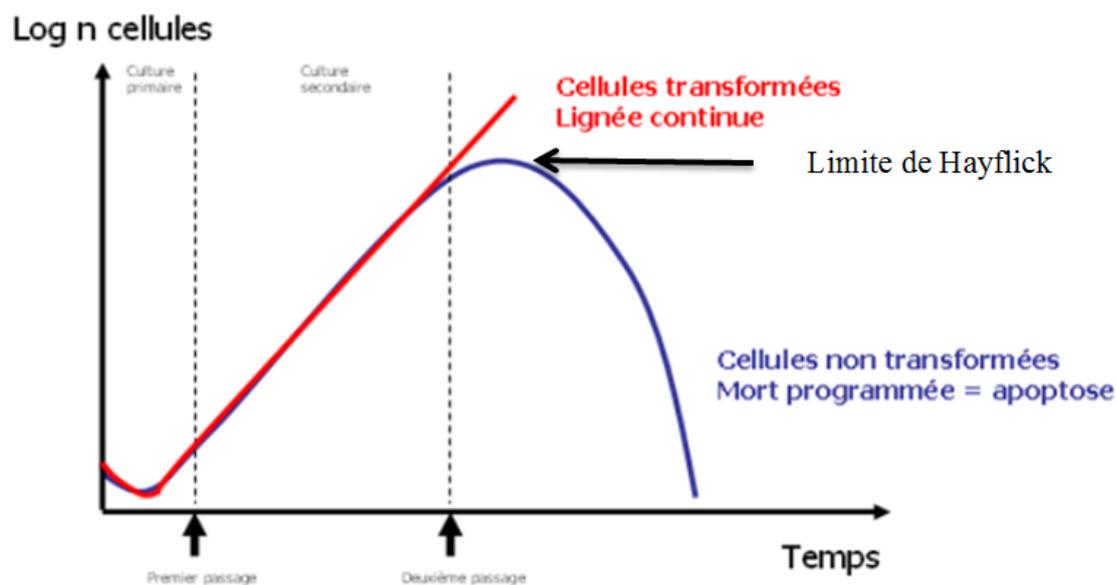


Figure 16 : limite de Hayflick.

3.3 Immortalité en culture Cellulaire :

Les cellules transformées sont des cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'immortalité en culture) sont des "lignées cellulaires". Les lignées sont soit des cellules cancéreuses (telles les cellules HeLa à développement très rapide, de Henrietta Lacks), soit des cellules en voie de cancérisation, soit des cellules saines rendues "immortelles" artificiellement.

❖ Remarque :

Les cancers ne deviennent problématiques que si les cellules qui les constituent ont trouvé le moyen de contourner la limite de Hayflick. De telles cellules sont appelées « cellules immortelles ». Ces cellules immortelles finissent quand même par mourir, mais l'ensemble des cellules rendues immortelles n'est pas limité quant au nombre de divisions cellulaires pouvant se réaliser en son sein.

3.4 Caractérisation des cellules en culture continue (lignées transformées) :

Dans la Culture continue ou lignées transformées ou immortelles :

La vitesse de multiplication ne diminue pas, ce qui permet un nombre de repiquage indéfini. Les cellules constituant ces cultures :

- ✓ Perdent l'inhibition de contact et se cultivent en amas ou multicouche.
- ✓ Elles peuvent souvent être cultivées en suspension (perdre leur dépendance vis-à-vis d'un support).
- ✓ Changent de morphologie (s'arrondissent).
- ✓ Les cellules adhérentes perdent leur besoin d'ancrage et peuvent être cultivées en suspension.
- ✓ Immortalité.
- ✓ Autonomie de croissance.
- ✓ Indépendance vis-à-vis des facteurs de croissances.

3.5 Croissance des cellules en culture cellulaire: cas normal :

Lors d'une culture cellulaire, le taux de croissance des cellules n'est pas constant. Il s'effectue plutôt selon une courbe dans laquelle on peut distinguer 4 phases (**Figure 17**):

- A. **La phase d'adaptation (phase de latence ou phase Lag):** Il n'y a pratiquement pas de croissance cellulaire puisque les cellules s'adaptent à leur nouvel environnement et s'y installent.
- B. **La phase de croissance rapide (phase exponentielle ou phase Log):** Les cellules se divisent rapidement, car elles consomment la majeure partie des nutriments contenus dans le milieu de culture.
- C. **La phase stationnaire (Phase Plateau):** Le nombre de cellules est constant puisqu'il y a autant de cellules qui meurent que de nouvelles qui sont produites. Cela s'explique par un épuisement des nutriments, une accumulation de déchets et un manque d'espace disponible.
- D. **La phase de déclin:** Les nutriments et l'espace (inhibition de contact) se font trop rares pour maintenir un nombre de cellules maximum. le nombre des cellules décroît (diminue). On observe aussi une diminution de la vitesse de prolifération due à la sénescence (vieillesse) = la mort programmée dans cas non transformé.

Cas des cellules transformées: La vitesse de multiplication ne diminue pas: immortalisation des cellules.

❖ **Remarque:**

Le maximum de cellules possible est atteint à la fin de la phase de croissance rapide. Lorsque la phase stationnaire est atteinte, il peut être utile d'arrêter la culture et de la conserver à des fins d'analyse ou d'utilisation ultérieure. On peut congeler les cultures afin de les conserver.

C'est aussi lors de cette phase stationnaire que l'on doit repiquer les cellules (les transférer) dans un nouveau milieu de culture puisque les nutriments du milieu initial sont en train de s'épuiser, ce qui déclenchera la phase de déclin.

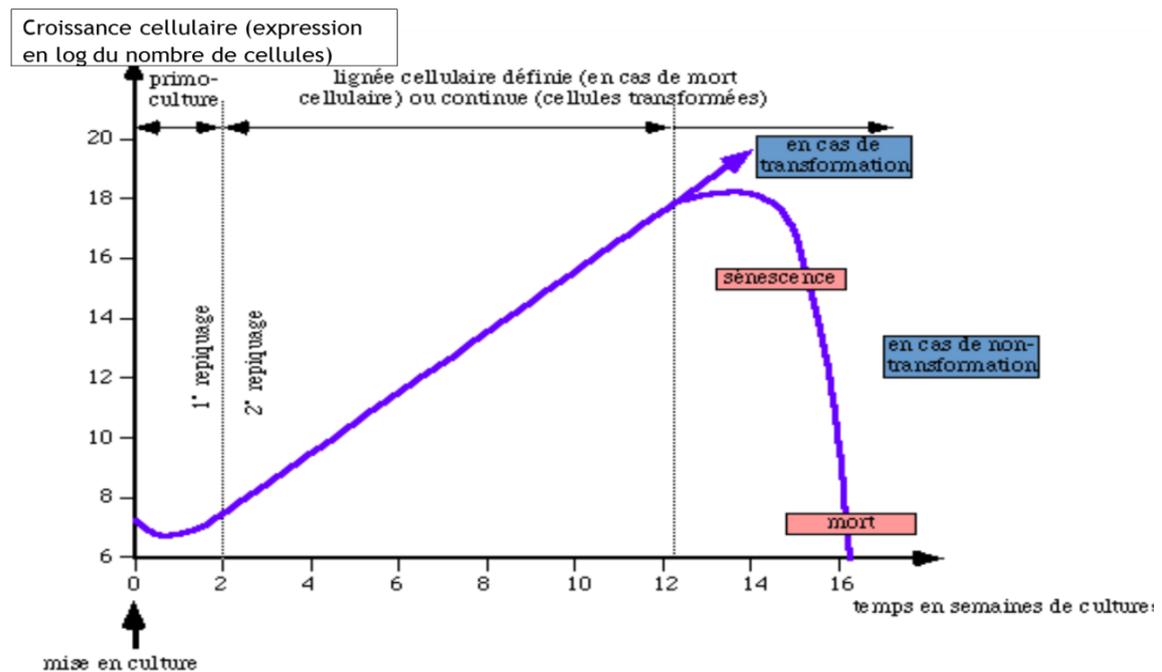


Figure 17 : Croissance des cellules en fonction du temps en culture cellulaire.

3.6 Croissance des cellules en culture cellulaire: cas lignée cellulaire (type HeLa) :

On distingue 3 périodes : phase d'adaptation (Lag) ; phase exponentielle (Log) ; phase stationnaire (Plateau) (**Figure 17**).

- A. **Phase Lag:** période d'adaptation au milieu. La cellule reconstitue son squelette, s'attache au substrat, s'étale. Il y a des synthèses d'ADN et de protéines.
- B. **Phase Log:** phase de croissance exponentielle. Les cellules se divisent rapidement, car elles consomment la majeure partie des nutriments contenus dans le milieu de culture.
- C. **Phase plateau :** La vitesse de multiplication cellulaire ne diminue pas, ce qui permet un nombre de repiquage indéfini.

Les cellules transformées atteignent des plateaux élevés. Ayant perdu leur dépendance vis-à-vis d'un support, elles peuvent souvent être cultivées en suspension.

Cependant, certaines cellules d'embryons de peau, les fibroblastes expriment des inhibitions de contact mais continuent à croître en s'organisant en couches superposées.

❖ Remarque:

Lorsque les cellules sont mises dans un milieu de culture, il s'opère une sélection entre les cellules viables et les cellules mortes (dans le cas de cellules qui adhèrent au support, les cellules viables se fixent sur le support alors que les mortes restent dans le milieu de culture.

D'autre part, il existe une compétition entre les cellules viables. Celles qui prolifèrent le plus vite envahissent la boîte jusqu'à faire disparaître les autres types cellulaires (exemple cas de contamination de la culture par des bactéries). On observe des changements de la culture dans le temps.

4. Les facteurs mitogènes :**4.1 Introduction :**

Un mitogène est un moyen favorisant la mitose et la division cellulaire. C'est le contraire de ce que cherchent à faire les traitements anticancéreux encore appelés anti-mitotiques. Les mitogènes sont le plus souvent des substances d'origine végétale, comme la phytohémagglutinine, extraite du haricot rouge.

4.2 Définition :

Les facteurs mitogènes sont des facteurs de croissance qui agissent dans la division cellulaire stimulant le cycle cellulaire. Ils peuvent stimuler la prolifération de nombreux types de cellules ou être spécifiques (par exemple, l'érythropoïétine « l'EPO » : un facteur stimulant la formation d'érythrocytes (**Figure 18**)).

L'appellation de facteurs mitogènes regroupe plusieurs protéines ou glycoprotéines sans relation entre elles, mais ayant toutes un effet sur la croissance d'un type cellulaire.

Le mot de croissance recouvre à la fois la multiplication des cellules et l'agrandissement d'un organisme.

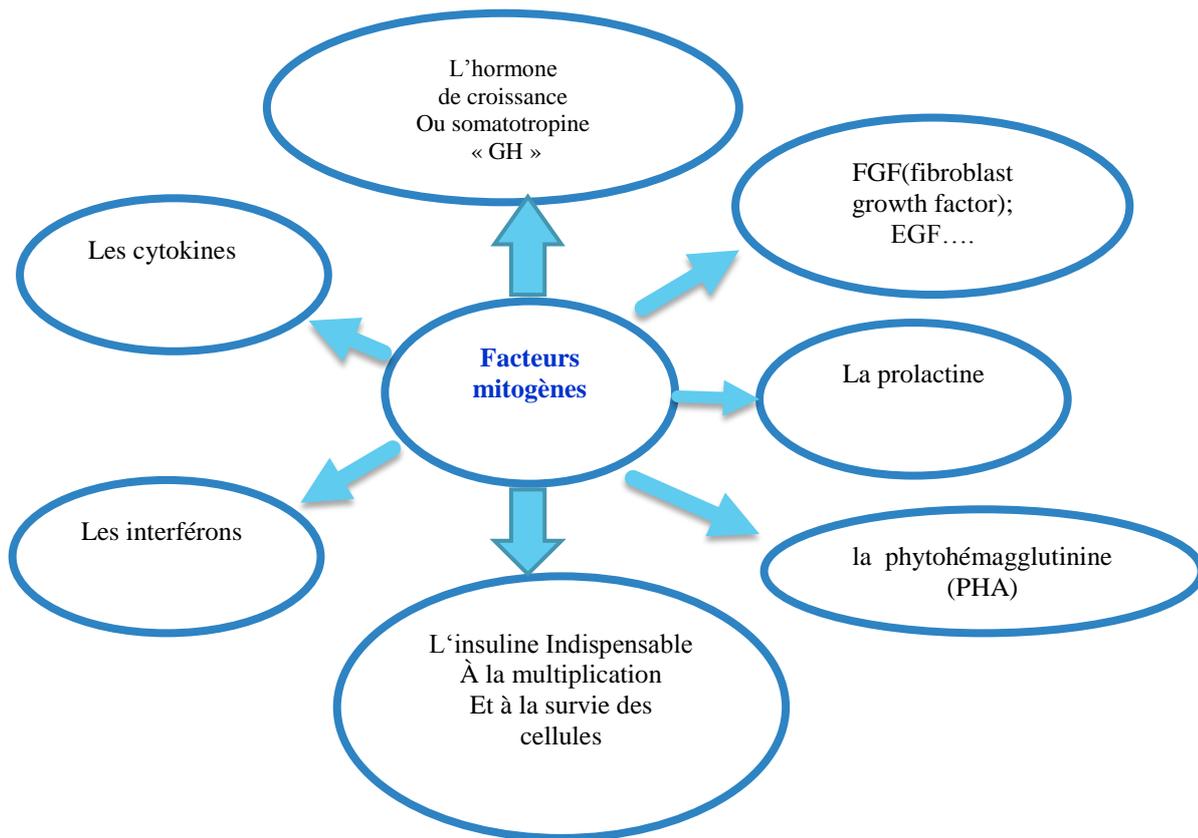


Figure 18 : Les facteurs mitogènes.

4.3 Facteurs de croissance pour la culture de la cellule :

Un facteur de croissance est une molécule qui répond aux critères suivants :

- ✓ La majorité de la structure est polypeptidique
- ✓ Son interaction avec la membrane de la cellule cible initie la réponse cellulaire qui est déclenchée uniquement par la formation d'un complexe spécifique avec un récepteur
- ✓ De la formation du complexe facteur de croissance / récepteur résulte spécifiquement une réponse hypertrophique (augmentation de la taille des cellules), une réponse hyperplasique (augmentation de la population cellulaire), une réponse qui induit ou bloque une étape de différenciation.
- ✓ Le facteur de croissance et son récepteur sont éliminés de la cellule par endocytose.

4.3.1 Principaux facteurs de croissance :

Les principaux facteurs de croissance sont :

- ✓ **L' Epidermal growth factor, EGF:** qui agit sur des cellules de l'épiderme, et joue un rôle important dans le développement embryonnaire.
- ✓ **L'insulin like growth factor, ILGF:** activité insulin like non suppressible par les anticorps anti-insuline
- ✓ **Le Nerve growth factor, NGF:** facteur augmentant la survie et la différenciation des cellules gliales
- ✓ **Le platelet derived growth factor, PDGF:** facteur de croissance dérivé des plaquettes nécessaire à la division des fibroblastes. Il est le mitogène principal des cellules mésenchymateuses
- ✓ **Le transforming growth factor, TGF:** le TGF englobe un grand nombre de facteurs de croissance différents, sécrétés par des cellules tumorales ou transformées in vitro. Ex: Le TGF- β (transforming growth factor beta), qui stimule la prolifération de certaines cellules, l'inhibe chez d'autres, et contrôle la différenciation de certaines cellules.
- ✓ **Le Fibroblast growth facteur, FGF:** est aussi une famille nombreuse de facteurs qui stimulent in vitro la croissance de cellules d'origine mésodermique et ectodermique ; ces facteurs présentent une grande affinité pour l'héparine.
- ✓ **l'érythropoïétine, ou EPO:** qui favorise la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs de globules rouges.
- ✓ **L'IL-2 (interleukine-2):** qui stimule la prolifération des lymphocytes T activés.
- ✓ **L'IGF-I (insulinlike growth factor I):** qui stimule le métabolisme cellulaire et la prolifération de cellules, en combinaison avec d'autres facteurs de croissance.
- ❖ **Remarque :** Il existe d'autres molécules sont mises à jour chaque année, ainsi que de nouvelles propriétés ou caractéristiques pour chacun de ces facteurs.

4.4 **La phytohémagglutinine, ou phasine (PHA) :**

La phytohémagglutinine est une lectine présente chez les plantes, particulièrement chez les légumineuses, notamment les haricots. Elle est utilisée comme mitogène pour déclencher la division cellulaire des T-lymphocytes.

4.5 **Applications :**

Les mitogènes sont utiles en cancérologie pour l'analyse des chromosomes d'une tumeur : ils favorisent les divisions cellulaires avant de les bloquer pour examiner les chromosomes individualisés au moment de la mitose ; en immunothérapie, ils stimulent la prolifération de

cellules immunocompétentes prélevées chez le malade, éventuellement au sein de la tumeur, pour obtenir, en culture cellulaire, de grandes quantités de cellules cytotoxiques qui seront réinjectées ensuite au malade pour le traiter.

5. Contamination en culture cellulaire:

5.1 Introduction :

La contamination est un problème naturel dans une culture primaire, il faut donc ajouter des antibiotiques et décontaminer les prélèvements, ce qui induit un stress supplémentaire pour les cellules.

Pour les éviter, il est indispensable d'adopter une bonne technique de travail stérile et de manipuler les cultures avec précaution et d'établir des règles de conduite strictes dans les salles de culture. En effet, si les règles ne sont pas respectées, la contamination peut s'étendre rapidement à plusieurs lignées, voire à tout le stock de lignées.

Qu'ils soient visibles ou non, destructeurs ou non, les contaminants agissent sur la croissance, altèrent les caractéristiques et les fonctions cellulaires et influent sur la qualité des résultats.

Parfois, certains agents ne sont pas toxiques individuellement mais peuvent le devenir, soit par leur forte concentration ou combinés avec un autre agent. Également, certains types cellulaires sont plus sensibles que d'autres. Voici quatre bonnes raisons de s'y attarder :

- ✓ Perte d'argent et de temps.
- ✓ Résultats expérimentaux erronés ou inappropriés.
- ✓ Perte de produits importants.
- ✓ Embarras personnel (réputation dû à des résultats erronés)

5.2 Origines des contaminations :

Il existe plusieurs origines de contaminations possibles :

- ✓ Stérilisation de la vaisselle.
- ✓ Poussières et spores dues aux particules présentes dans l'air de la pièce et à la circulation des personnes.
- ✓ Incubateurs non nettoyés.

- ✓ Réfrigérateurs non nettoyés.
- ✓ Hottes non nettoyées ou les filtres des hottes non vérifiés.
- ✓ Importation d'autres laboratoires de lignées cellulaires contaminées.
- ✓ Négligence et mauvaises pratiques en culture cellulaire.
- ✓ Importation d'autres laboratoires de lignées cellulaires contaminées.
- ✓ Négligence humaine.

5.3 Types de contaminations :

5.3.1 Contaminants biologiques :

A. Bactéries - Levures – Champignons :

La contamination par bactéries, levures et champignons peut être visible à l'œil nu. La croissance rapide de ces micro-organismes (surtout en absence d'antibiotique) permet de les détecter en peu de temps : une turbidité, la présence ou non d'un trouble et d'une variation de pH et une mort cellulaire. Il faut obligatoirement faire une vérification au microscope (**Figure 19**).

- ✓ Bactéries : milieu trouble, diminution de pH.
- ✓ Levures : milieu trouble, peu de changement de pH.
- ✓ Champignons : milieu limpide, augmentation du pH.

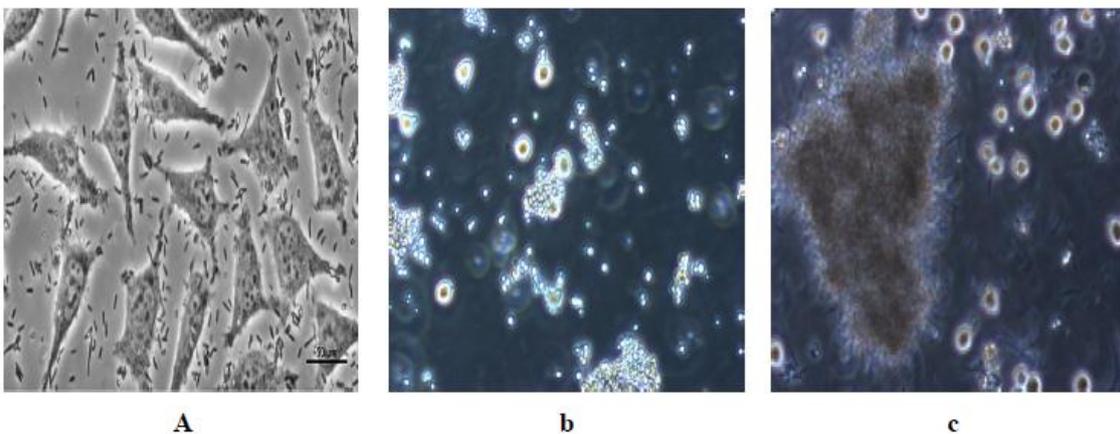


Figure 19 : Contaminations microbiennes dans les cultures de cellules de mammifères. a : contamination bactérienne ; b : contamination par levures et c : contamination fongique.

❖ Bactéries:

Elle est facilement détectée par une inspection visuelle. Les cultures infectées apparaissent généralement nuageuses (c'est-à-dire trouble), parfois avec un film mince sur la surface. Les bactéries sont mobiles, ont des formes définies, poussent rapidement, elles troublent et acidifient rapidement le milieu de culture (Une chute soudaine du pH). Sous un microscope de faible puissance, les bactéries semblent aussi minuscules, granulées entre les cellules en mouvement, et l'observation au microscope de haute puissance peut résoudre les formes de bactéries individuelles (**Figure 20**).

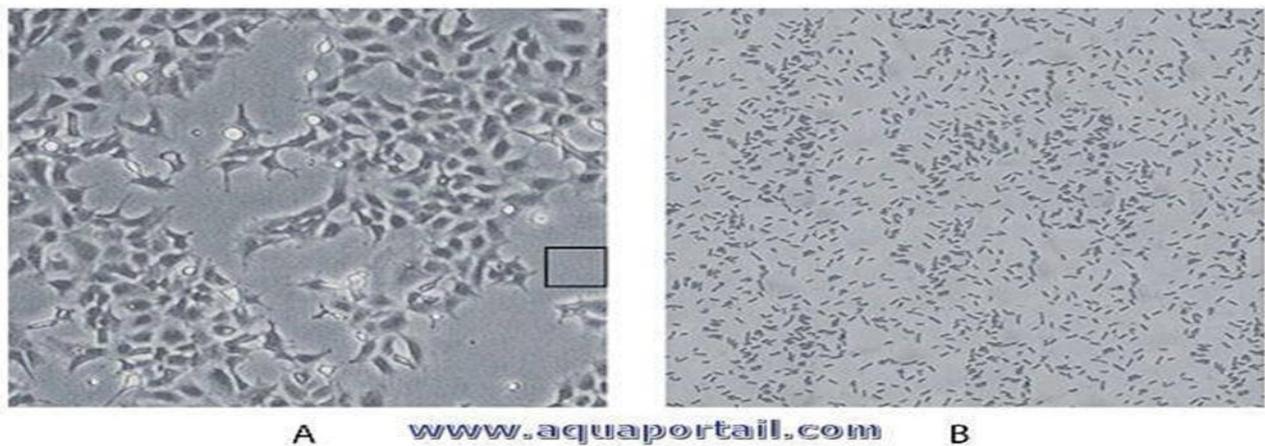


Figure 20 : Contamination bactérienne par Escherichia coli.

Ces images au-dessus de contamination bactérienne biologique à contraste de phase simulée montrent 293 cellules adhérentes contaminées par Escherichia coli.

Les espaces entre les cellules adhérentes montrent de minuscules granules sous faible microscopie de puissance, mais il n'est pas aisé de distinguer les bactéries individuelles (partie A). En outre, un agrandissement de la zone délimitée par le carré noir montre un individu de cellules de E. coli, qui sont généralement en forme de tige et sont d'environ 2 μm de long et 0,5 μm de diamètre. Chaque côté du carré noir dans la partie A est de 100 μm .

❖ Levures, Moisissures :

Les levures, comme les bactéries, ne collent pas aux cellules, elles flottent en suspension. Cependant, il existe toutes sortes de levures ayant des caractéristiques différentes. Leur croissance est lente et la formation de spores, propagée par la ventilation à l'intérieur de l'incubateur, peut causer des ennuis pour les utilisateurs.

B. Virus :

Les virus sont trop petits pour être détectables. Plusieurs donnent un effet cytopathique (mort des cellules). Ce pendant, il faut faire attention aux cultures primaires humaines (HIV, hépatite B, Epstein-Barr...).

❖ **Source :** Le sérum peut contenir des virus bovin

C. Protozoaires :

La plupart sont unicellulaires, tels que les amibes. Certains peuvent former des spores.

Certains ont un effet cytotoxique (cellules détruites en moins de 10 jours).

❖ **Source :** poussière, saleté, air, occasionnellement des tissus.

D. Les mycoplasmes :

Les mycoplasmes sont les plus dévastateurs et les plus répandus des contaminants. Elles sont insidieuses et décelent lorsqu'il y a la mort des cellules. On les surnomme les cancers des cellules. Ils sont sous formes filamenteuses ou en forme de coques. Aucun signe visible lorsqu'on observe les cellules, sauf dans le cas où elles meurent. Plus de 20% des cultures cellulaires sont infectées par des mycoplasmes.

Les effets peuvent se faire sentir à long terme, ils ont la capacité d'affecter leur cellule hôte dans la plupart de leur fonction :

Ils peuvent modifier la fonction cellulaire, l'attachement, les membranes, la propagation, peuvent causer également une croissance ralentie, changement au niveau de la morphologie, aberrations chromosomiques, Altérations de certains métabolismes (acides aminés, acides nucléiques). Pour bien déceler les mycoplasme dans une culture cellulaire, il est recommandé d'utiliser un test indirect qui est la coloration au fluorochrome de l'ADN.

C'est un test simple et relativement rapide, c'est de souiller l'ADN à l'aide d'un colorant fluorescent. Lorsque les cellules colorées et fixées sont examinées au microscope UV équipé de l'ensemble de filtres approprié, résultats l'ADN produit une fluorescence vive. Non seulement ce test détectera le mycoplasme mais, en plus, il détectera tout autre contaminant microbien.

La détection d'une contamination mycoplasmatique nécessite des tests spécifiques (par exemple l'utilisation d'un fluorochrome et vérification au microscope à fluorescence) (**Figure 21**).

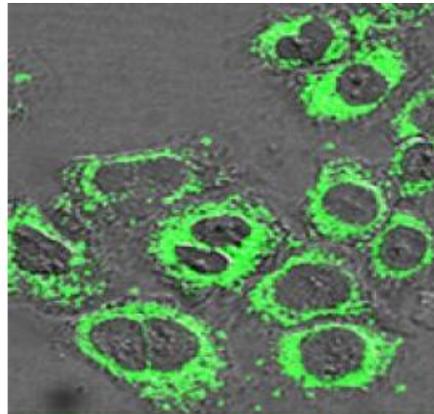


Figure 21 : Cellules de mélanome natif infectées par le mycoplasme.

5.3.2 Contaminants chimiques :

Ils peuvent être une source de variabilité des résultats, cette contamination peut être causée par :

- ✓ Ions métalliques, endotoxines et autres impuretés du milieu, du sérum ou de l'eau.
- ✓ Qualité du plastique jetable (pétris, tubes, bouteilles).
- ✓ Radicaux libres et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) présents dans le milieu.
- ✓ Dépôt de matière sur le verre ou sur les pipettes causé par un reste de détergent, résidu qui vient du papier aluminium.
- ✓ Résidu de germicides ou pesticides utilisés lorsqu'on désinfecte les incubateurs, comptoirs ou autres instruments.
- ✓ Impureté de CO₂ de l'incubateur.
- ✓ L'incubateur à CO₂ joue également un rôle important car il offre des conditions de croissance idéales pour les cultures cellulaires, mais aussi pour de nombreux microbes indésirables.
- ✓ C'est pourquoi il est préférable d'avoir un incubateur qui possède plusieurs fonctions permettant d'éviter les contaminations.

5.3.3 Cross-contamination :

Elle est due à la présence de plusieurs lignées simultanément sous la hotte, le plus répandu de ces cas est sans doute la cellule HeLa.

Des chercheurs ont démontré qu'environ 25% des cellules humaines sont contaminées par les cellules de types HeLa.

Afin d'éviter ce type de contamination il faut :

- ✓ Bien désinfecter la hotte entre chaque type cellulaire. Idéalement, on suggère d'attendre 20 minutes.
- ✓ Manipuler 1 lignée à la fois sous la hotte.
- ✓ Ne jamais replonger une pipette usagée dans une bouteille de milieu ou de trypsine.
- ✓ Ajouter d'abord le milieu dans les boîtes puis les cellules et fermer les boîtes de culture.
- ✓ Ne pas ouvrir simultanément des bouteilles différentes et des flacons de cellules différentes sous la hotte.

5.4 Traitements :

- ✓ Regarder les cultures au microscope dès que vous prenez une culture en main pour vérifier l'absence de contamination.
- ✓ Tester les mycoplasmes en cas de doute.
- ✓ S'il y a suspicion de contamination, nettoyer la hotte et l'incubateur.
- ✓ Si la contamination est confirmée, jeter les cellules contaminées (les autoclaver et ne pas les jeter à la poubelle), mettre de l'eau de Javel pendant une nuit dans le milieu utilisé et jeter la trypsine.
- ✓ Ne pas tenter de décontaminer : il faut éliminer la culture.
- ✓ Ne faire un essai de décontamination que si les cellules sont irremplaçables ou dans des situations extrêmes.
- ✓ Il faut redémarrer les cultures à partir du stock de cellules congelées.

5.4.1 Traitement en cas d'urgence

- ✓ Bactéries : différents antibiotiques.
- ✓ Levures et champignons : antifongiques.
- ✓ Mycoplasmes : anti-mycoplasmiques.

5.5 Précautions à prendre pour empêcher toute contamination :**5.5.1 Technique opératoire :**

- ✓ Si les réactifs sont stériles, l'atmosphère propre et exempte de poussière, et l'équipement propre, la contamination dépend du manipulateur.
- ✓ Manipuler une lignée à la fois sous la hotte.
- ✓ Ne pas ouvrir simultanément des bouteilles différentes et des flacons de cellules différentes sous la hotte.
- ✓ Ajouter d'abord le milieu dans les boîtes puis les cellules et fermer les boîtes de culture.

5.5.2 Environnement :

- ✓ Il doit être le plus propre possible.
- ✓ Il faut éviter les perturbations de l'air dues :
 - ✓ A une circulation trop importante de personnes.
 - ✓ A des ouvertures de portes trop fréquentes.
 - ✓ A du stockage de cartons.
 - ✓ Aux réfrigérateurs et aux centrifugeuses.

5.5.3 Hottes à flux laminaire :

- ✓ Le plan de travail doit être propre et rangé pour ne pas perturber le flux d'air filtré.
- ✓ Il faut bien nettoyer le fond de la hotte en enlevant les plaques du plan de travail 1X/ semaine.
- ✓ L'intégrité des filtres de la hotte doit être vérifiée 1X/ an.

5.5.4 Incubateurs :

- ✓ L'incubateur doit être nettoyé 1X/ mois ou plus si l'incubateur est ouvert fréquemment. L'eau du bac d'humidification doit être changé 1 à 2X/ mois.
- ✓ Si des gouttes de milieux se trouvent accidentellement sur les plateaux, il faut changer les plateaux de l'incubateur, changer les plateaux métalliques sur lesquels sont placées les boîtes de culture, et nettoyer le bac d'humidification.
- ✓ Si des cultures contaminées se trouvent dans l'incubateur, il faut les éliminer très rapidement en les mettant dans un sac autoclave, le fermer et autoclaver .Il faut ensuite nettoyer l'incubateur sans oublier de nettoyer le ventilateur.

5.5.5 Réfrigérateurs :

- ✓ Il faut les nettoyer 2 fois par an.

5.5.6 Microscopes :

- ✓ Les plateaux des microscopes doivent être nettoyés régulièrement avec un papier absorbant et de l'éthanol à 70%.

5.5.7 Bains-Marie :

- ✓ Il faut les nettoyer 2X/ mois.

5.5.8 Lignées cellulaires importées :

- ✓ Il faut apporter un soin particulier aux cultures primaires.
- ✓ Il faut manipuler les lignées cellulaires importées d'autres laboratoires avec beaucoup de précaution et les observer souvent au microscope pour détecter le plus tôt possible une éventuelle contamination.

Références bibliographiques :

Adolphe M. (1988). Base des méthodes de culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales: Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 1-8.

Cezard F. (2013). Milieux et matériels de culture cellulaire. In : Biotechnologies en 27 fiches. 2e édition. Paris : DUNOD. P. 5-11.

Curtet-Benitski S. et Filiputti-Gilquin A.-L. (2014). Bonnes pratiques de culture cellulaire. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 118-127.

Freshney R.I. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, chapitre 12 : primary culture. 5e édition. John Wiley & Sons, Inc. P. 175-197.

Froger B. et Adolphe M. (1988). Besoins nutritifs des cellules en culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales : Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 9-15.

Langdon S.P. (2004). Basic Principles of Cancer Cell Culture. In : Methods in Molecular Medicine, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 3-15.

Macleod K.G. et Langdon S.P. (2004). Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In : Methods in Molecular Medicine, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 17-29.

Magniez F :La culture cellulaire . [web] (6/2/2008), disponible sur : <http://www.technobio.fr/article-16526675.html>. page consulté le 12/05/2020

Mather J.P. et Roberts P.E. (1998). Introduction to Cell and Tissue Culture : Theory and Technique. Chapitre 2,3,4 et 7. New York et London : Plenum Press. 241 pages.

Ovaguimian O ., 2004. Le point sur la culture cellulaire. Revue Française des Laboratoires, 360 : Pages 66-67.

Philippeos C., Hughes R.D., Dhawan A. et Mitry R.R. (2012). Introduction to cell culture, chapter 1. In Mitry R.R. et Hughes R.D. Human Cell Culture Protocols, volume 806, Methods in Molecular Biology. P. 1-13.

Ronot X., Kadri M. et Martel-Frchet V. (2014). Cryopréservation des cellules. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 128-136.

Ryan J.A. (2007). Introduction à la culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : www.corning.com/lifesciences.

Sigma Aldrich (2016). Fundamental techniques in cell culture. Handbook. 3e édition. 80 pages.

Chapitre 5 :
Application de la culture
cellulaire

Chapitre 5 : Application de la culture cellulaire :**1. Introduction :**

La culture cellulaire est devenue un des outils majeurs utilisés en biologie cellulaire et moléculaire. Certains des domaines importants dans lesquels la culture cellulaire joue actuellement un rôle majeur sont brièvement décrits ci-dessous.

- ✓ L'étude des mécanismes de la physiologie cellulaire : contrôle de cycle cellulaire , métabolisme, régulation de l'expression du gènes, études des mouvements et des jonctions cellulaires . La culture cellulaire permet d'étudier la cellule eucaryote et ses relations avec son environnement.
- ✓ En médecine humaine : la culture cellulaire est utilisée pour la réalisation de greffes et d'autogreffes (cellules souches sanguines), le dépistage des maladies génétiques (caryotype), la thérapie génique .
- ✓ L'industrie pharmaceutique : est une grande utilisatrice de ces culture: étude pharmacologique et toxicologique de nouvelles molécules médicamenteuses, production des substances à usage thérapeutique (hormones de croissance , insuline , interférons et cytokines , anticorps monoclonaux) et production de vaccin .

2. Application de la culture cellulaire :**2.1 Systèmes de modèles**

Les cultures cellulaires fournissent de bons systèmes de modèles pour étudier :

- ✓ La biologie et la biochimie cellulaires de base.
- ✓ Les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies.
- ✓ Les effets des médicaments sur les cellules.
- ✓ Le processus et le déclenchement du vieillissement.
- ✓ Les études nutritionnelles.

2.2 Tests de toxicité :

Les cellules en culture sont largement utilisées seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux pour étudier les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules. Les cultures de cellules dérivées du foie et des reins sont particulièrement importantes.

2.3 Recherches sur les cellules cancéreuses :

Les cellules normales et les cellules cancéreuses pouvant toutes deux être cultivées, les différences de base entre elles peuvent être étudiées de près. De plus, il est possible, en utilisant des produits chimiques, virus et rayonnements, de convertir les cellules cultivées normales en cellules cancéreuses. Ceci permet ainsi d'étudier les mécanismes conduisant à ce changement.

Les cellules cancéreuses cultivées servent également de système de test pour déterminer les médicaments et méthodes adaptées pour détruire sélectivement certains types de cancers.

2.4 Virologie :

Une des utilisations les plus précoces et les plus importantes des cultures cellulaires a été la réplication de virus dans les cultures cellulaires (à la place des animaux) pour les utiliser dans la production de vaccins. Les cultures cellulaires sont également largement utilisées en détection clinique et isolement de virus, ainsi qu'en recherche fondamentale pour étudier comment ils se développent et infectent les organismes.

2.5 La cellule comme usine de production :

Alors que les cellules cultivées peuvent être utilisées pour produire de nombreux produits importants, trois domaines se sont montrés plus intéressants. Le premier est la production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de vaccins.

Ceci comprend les vaccins contre la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole. Le deuxième est la production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des protéines présentant une valeur médicale ou commerciale. Ceci inclut les anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc. Le troisième est l'utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes. La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce. Toutefois, des tests sont en cours sur des organes artificiels comme le pancréas, le foie et les reins. Une réserve potentielle de cellules et tissus de remplacement peut ressortir de travaux en cours réalisés avec des cellules souches adultes et embryonnaires. Ce sont des cellules qui ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Apprendre à contrôler le développement de ces cellules représente un espoir pour de nouvelles approches de traitements pour une large variété de pathologies.

2.6 Génie génétique :

La capacité de transférer ou de reprogrammer les cellules en culture par du nouveau matériel génétique (ADN et gènes) a fourni un outil précieux aux biologistes moléculaires désireux d'étudier les effets cellulaires de l'expression de ces gènes (nouvelles protéines).

Ces techniques peuvent également être utilisées pour produire ces nouvelles protéines en grande quantité dans les cellules en culture pour les étudier. Les cellules d'insectes sont largement utilisées comme usines cellulaires miniatures pour exprimer des quantités substantielles de protéines qu'elles fabriquent après avoir été infectées par des baculovirus génétiquement modifiés.

3. Les avantages de la culture cellulaire :

La culture cellulaire possède de nombreux avantages :

- ✓ Elle fournit une source continue et homogène de cellules utilisables aussi bien en biochimie, que dans le domaine médical et dans celui de la santé.
- ✓ Les cellules en culture, à l'inverse des cellules in-vivo peuvent être manipulées très facilement et de bien des façons.
- ✓ Les cultures cellulaires peuvent être congelées sans que cela affecte leur potentiel multiplicatif ou leur patrimoine génétique.
- ✓ L'utilisation des cultures cellulaires, en limitant celle des animaux de laboratoire, permet de minimiser le coût des expérimentations, et de limiter en nombre le sacrifice des animaux de laboratoire.

Références bibliographiques :

Adolphe M. (1988). Base des méthodes de culture. In : Barlovatz-Meimou G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales: Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 1-8.

Cezard F. (2013). Milieux et matériels de culture cellulaire. In : Biotechnologies en 27 fiches. 2e édition. Paris : DUNOD. P. 5-11.

Freshney R.I. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, chapitre 12 : primary culture. 5e édition. John Wiley & Sons, Inc. P. 175-197.

Froger B. et Adolphe M. (1988). Besoins nutritifs des cellules en culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales : Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 9-15.

Ovaguimian O ., 2004. Le point sur la culture cellulaire. Revue Française des Laboratoires, 360 : Pages 66-67

Ryan J.A. (2007). Introduction à la culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : www.corning.com/lifesciences.

Thouvenot D., Billaud G. et Morfin F. (2004). Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. Virologie 8 : 297-309.

Tekarslan Şahin S.H., Mesut B. et Özsoy Y. (2017). Applications of Cell Culture Studies in Pharmaceutical Technology. Acta Pharm Sci, 55 : 63-79.