

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI

OUM EL-BOUAGHI

*Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la
Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie*



Cours de
**CULTURE CELLULAIRE ET
APPLICATIONS**



Polycopié destiné aux étudiants de 1^{ère} année Master Biochimie Appliquée

(2^{ème} cycle LMD)

Réalisé par

Dr. ZEGHIB FOUAD

2023/2024

AVANT PROPOS

Ce support de cours a été conçu à l'intention d'étudiants de la 1^{ère} année Master Biochimie Appliquée. Il est le fruit d'une dizaine d'années d'enseignement de cette matière. Ce document sert de support pédagogique aux étudiants qui souhaitent acquérir une compréhension approfondie de la culture cellulaire et de ses applications.

La culture cellulaire est l'outil privilégié du biologiste cellulaire, car elle est facile à manipuler et à maintenir en laboratoire. Les cultures cellulaires ont permis d'importantes avancées dans la compréhension de l'architecture d'une cellule animale, des mécanismes de division cellulaire, du transport intracellulaire et de l'organisation des différents organites cellulaires.

L'objectif de ce module est de fournir aux étudiants une base théorique en ce qui concerne la culture cellulaire animale, ainsi que des notions fondamentales sur le comportement des cellules en culture. En outre, il offre un aperçu pratique qui aide les étudiants à se familiariser avec la pratique de la culture des cellules animales.

Le contenu de ce cours est conforme au programme de l'offre de formation approuvé par la tutelle, avec quelques petites modifications dans l'ordre de certains sous chapitres pour des fins méthodologiques et pédagogiques.

Les contenus du module sont répartis en trois chapitres. Le premier chapitre nous abordons les différents systèmes de cultures cellulaires et les méthodes d'obtention des cellules. Nous traitons par la suite leurs besoins nutritionnels ainsi les conditions de pratique et l'entretien de ces cellules en cultures en exposant les équipements nécessaires, les milieux de culture, et les problèmes liés aux contaminations. Les méthodes de conservation et de cultures industrielles de cellules ainsi des concepts fondamentaux de cytotoxicité cellulaire et de l'apoptose seront exposés à la fin de ce chapitre. Le deuxième chapitre est dédié à l'étude de méthode de culture de cellules spécialisées. Enfin, le dernier chapitre met en lumière les diverses applications de la culture cellulaire en biotechnologie et santé.

Des références bibliographiques et des illustrations bien choisies ont permis de faire une synthèse et rassembler l'essentiel d'informations à connaître en cultures cellulaires en générale, avec un style simple et adéquat à tous les niveaux.

Dr. ZEGHIB Fouad

Sommaire

Avant-Propos

Liste des figures

Liste des tableaux

I. CULTURES ET ANALYSES DE CELLULES

1. Culture cellulaire	1
1.1. Définition	1
1.2. Historique	1
1.3. Intérêts et applications de la culture cellulaire	2
2. Les différents systèmes cellulaires :	4
2.1. Types de cultures	4
2.1.1. Culture primaire (Primoculture)	4
2.1.2. Culture secondaire	4
2.2. Lignées cellulaires	4
2.2.1. Lignée finie	5
2.2.2. Lignée indéfinie	5
2.2.3. Lignée clonale	7
3. Méthodes de cultures et obtention des cellules.	8
3.1. Méthodes de cultures	8
3.1.1. Culture en monocouche	10
3.1.2. Culture tridimensionnelle sur des microporteurs.	11
3.1.3. Culture en suspension	12
3.2. Obtention des cellules cultivées	13
3.3. Les techniques d'obtention des cellules circulantes	13
3.2.1. Séparation par centrifugation différentielle en gradient de densité	14
3.2.2. Tri cellulaire par cytométrie en flux	15
3.4. Les techniques d'obtention des cellules adhérentes.	17
3.5. Les méthodes de dissociation.	20
4. Les besoins nutritionnels des cellules en culture	23
4.1. Les milieux de culture	23
4.2. Types et composition des milieux de culture	23
4.2.1. Milieux synthétiques de base	23
4.2.2. Milieux synthétiques définis sans sérum	30
5. Conditions et pratique des cultures cellulaires	32
5.1. Conditions de culture	32
5.2. Matériels et équipements	33
6. Entretien des lignées cellulaires	38
6.1 Cinétique de la croissance d'une lignée cellulaire	38
6.2 Entretien des lignées cellulaires	39
6.2.1. Examen macroscopique et microscopique des cultures	39
6.2.2. Changement de milieu	41

6.2.3.Repiquage ou passage	41
7. La conservation des cellules.	46

Liste des figures

Numéro	Titre
Figure 1	les différents types de lignées cellulaire utilisées en culture cellulaire.
Figure 2	caractéristiques prolifératives de lignées cellulaire en culture cellulaire.
Figure 3	schémas d'obtention de lignée clonale
Figure 4	Morphologies des lignées cellulaires de mammifères .En haut images réeles . En bas images schématisées
Figure 5	représentation schématique de mécanisme d'adhésion cellulaire au support
Figure 6	Image au microscope électronique à balayage d'un sphéroïdes multicellulaires de cellules .
Figure 7	Les flacons Spinner (Corning) servent à cultiver des cellules non adhérentes en suspension
Figure 8	séparation des lymphocytes par centrifugation sur gradient de Ficoll
Figure 9	séparation des lymphocytes par centrifugation sur gradient de Peroll
Figure 10	Appareil de Cytométrie de flux
Figure 11	Principe de la Cytométrie de flux
Figure 12	La méthode des explants
Figure 13	Carcinome épidermoïde de la peau chez la souris avec excroissance épithéliale
Figure 14	Technique de tubes roulants
Figure 15	raclettes ou grattoirs
Figure 16	principe de conception de hotte à flux laminaire verticale PSM II
Figure 17	courbe de croissance de lignée cellulaire
Figure 18	Etats de confluence estimés par pourcentage.
Figure 19	Etapas de passage cellulaire par trypsinisation

Liste des tableaux

Numéro	Titre
Tableau 1	Lignées cellulaires couramment utilisées et leurs caractéristiques pour chaque type de culture
Tableau 2	Les milieux synthétiques de base les plus utilisés en culture cellulaire.
Tableau 3	Les solutions salines équilibrées
Tableau 4	Composition du sérum

I. CULTURE ET ANALYSES DE CELLULES

I. Culture cellulaire

1. Définition :

La culture cellulaire regroupe un ensemble de techniques biologiques utilisées en laboratoire permettant de reproduire aussi fidèlement que possible *in vitro*, les conditions d'environnement que la cellule trouve dans son milieu naturel (*in vivo*). Elle n'est pas une finalité en soi, mais plutôt un outil indispensable pour l'étude de la biologie cellulaire eucaryote. Son objectif principal est de maintenir des cellules en vie dans un environnement artificiel. Cette approche permet de disposer d'un grand nombre de cellules en dehors de leur milieu naturel ou de l'organisme auquel elles appartiennent (*ex-vivo*). Ces cellules ainsi cultivées sont ensuite utilisées à des fins d'expérimentation scientifique, notamment pour étudier leurs propriétés structurales et fonctionnelles, ainsi que pour favoriser leur multiplication (prolifération).

Cette culture cellulaire se déroule généralement dans des flacons ou boîtes de culture appropriés, avec un milieu nutritif essentiel à la survie et à la croissance des cellules.

De plus, on distingue autres types de cultures apparentées comme la culture de tissu, qui concerne la culture de tissus spécifiques en dehors de l'organisme dans le but de préserver ou d'étudier leurs fonctions particulières. Le concept de culture tissulaire avait initialement pour objet les explants de tissus immergés dans un milieu de culture. Cependant, avec le temps, il a été étendu pour englober la culture cellulaire dans son ensemble, devenant ainsi obsolète dans son sens initial. Aujourd'hui, le terme le plus précis pour décrire cette pratique est la culture cellulaire, qui consiste en la dispersion d'un tissu en une suspension de cellules individuelles.

2. Historique :

Les premières expériences de culture cellulaire ont été menées au début du XXe siècle. En 1906, Ross Harrison a réalisé la première culture de tissu en dehors du corps en cultivant dans un milieu de lymphes des neuroblastes de grenouille. En 1912, Alexis Carrel a mis en place la culture de tissu embryonnaire, marquant le début de trois grandes avancées dans la culture de tissus à savoir : l'amélioration des méthodes d'obtention des tissus, la recherche des besoins nutritionnels *in vitro* et l'élaboration de règles d'asepsie. En 1951, Georges Gey a réussi à mettre en culture les célèbres cellules HeLa, issues du cancer du col de l'utérus d'Henrietta Lacks. En 1952, Moscona

a introduit la trypsinisation des tissus en digérant des tissus d'œuf de poulet avec de la trypsine pour obtenir des cellules isolées ou des agrégats cellulaires capables de se diviser in vitro.

3. But et applications de la culture cellulaire

La culture cellulaire est une technique essentielle en biologie cellulaire et en recherche médicale. Son but principal est de permettre la croissance et la multiplication de cellules vivantes en dehors de leur environnement naturel, généralement dans un environnement contrôlé en laboratoire. Les applications de la culture cellulaire sont vastes et comprennent :

1. **Recherche fondamentale** : Les cultures cellulaires sont utilisées pour étudier le comportement des cellules, leur physiologie, leur réponse aux stimuli, leur cycle de vie, et bien d'autres aspects fondamentaux de la biologie cellulaire. Cela permet de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à divers processus biologiques.
2. **Études pharmacologiques et toxicologiques** : En réponse aux préoccupations éthiques liées à l'utilisation d'animaux de laboratoire, les cultures cellulaires sont employées pour tester de nouveaux médicaments, produits cosmétiques et chimiques sur différents types de cellules.
3. **Recherche sur le cancer** : il est possible de convertir des cellules saines en cellules cancéreuses en recourant à des substances chimiques, des virus et des rayonnements. Cette approche offre la possibilité d'analyser les processus responsables de cette transformation. Les cellules cancéreuses cultivées sont également utilisées pour découvrir des médicaments et des techniques qui ciblent de manière spécifique certains types de cancers.
4. **Étude sur les virus** : La culture cellulaire est essentielle à la croissance des virus car ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Aujourd'hui, la méthode de choix de la propagation de la plupart des virus c'est la culture cellulaire. Celle-ci est largement employée à des fins de dépistage clinique des virus et d'isolement viral. En outre, elle revêt une importance capitale dans la recherche fondamentale visant à élucider les mécanismes de développement des virus et leur capacité à infecter les organismes.
5. **Études chromosomiques** : Il est possible d'analyser les cellules fœtales pour un diagnostic précoce des affections fœtales en scrutant d'éventuelles anomalies chromosomiques et génétiques au moyen de méthodes comme les caryotypes.
6. **Thérapie génique** : Les cultures cellulaires servent de base à la création de tissus et d'organes artificiels en laboratoire. Il est possible d'extraire des cellules d'un patient

atteint d'une anomalie génétique, corriger ou substituer le gène défectueux, puis cultiver les cellules modifiées en laboratoire en vue de les réintroduire chez le patient.

7. **Thérapie cellulaire et régénérative** : implique l'utilisation de cellules en culture pour remplacer des tissus et des organes dans des greffes autologues. De plus, ces cellules sont exploitées dans la génération de peaux en particulier pour le traitement des brûlures et des ulcères.
8. **Biotechnologie** : Les cultures de cellules sont utilisées dans la fabrication d'une large gamme de produits essentiels, tels que la production à grande échelle de virus utilisés pour la production de vaccins (contre la polio, la rage et l'hépatite B). De plus, elles permettent la production de cellules génétiquement modifiées afin de produire de protéines à intérêts médicaux ou commerciaux, notamment les anticorps monoclonaux, l'insuline, des hormones...ect..

2. Les différents systèmes cellulaires

1. Définition de types de cultures :

1.1. Culture primaire :

Les cultures primaires ou les primocultures sont des cultures dérivant de cellules directement prélevées d'un **explant** d'organe ou de tissu et placées dans un environnement de culture approprié sous forme de culture d'explants, soit sous forme de cellules libres en suspension après une digestion enzymatique. À l'origine, ces cultures sont hétérogènes, mais elles sont ensuite dominées par un type cellulaire spécifique (par exemple, les fibroblastes). Dans certaines situations, les cellules peuvent se fixer ou se diviser, mais pour de nombreux types cellulaires, il ne s'agira que de maintenir leur survie. La préparation des cultures primaires demande beaucoup de travail et elles ne peuvent être maintenues in vitro que pendant une période de temps limitée. Au cours de leur durée de vie relativement limitée, les cellules primaires conservent généralement bon nombre des caractéristiques différenciées de la cellule in vivo. On peut considérer ces cultures comme primaires jusqu'au premier repiquage. Elle se transforme ainsi en une lignée cellulaire.

- **Explants** : Fragments extraits d'un tissu ou d'un organe destinés à l'initiation d'une culture in vitro (primaire).

1.2. Culture secondaire :

Culture obtenue par repiquage à partir d'une culture primaire ou d'une autre culture secondaire est appelée culture secondaire. Après avoir atteint la **confluence**, il est nécessaire de retirer les cellules du support, de les disperser et de les réensemencer à une densité plus faible dans un nouveau récipient de culture. On nomme cette opération passage ou subculture.

- **Confluence** : le pourcentage de la surface couverte par les cellules. Une culture confluyente se produit lorsque toutes les cellules sont en contact et que toute la surface du récipient de culture est recouverte.

2. Lignée cellulaire :

La lignée cellulaire désigne une population de cellules homogènes qui reste stable après des mitoses successives et qui possède une capacité de division limitée ou illimitée en culture in vitro par repiquages successifs.

2.1. Lignée définie (lignée finie ou souche cellulaire) :

Se sont généralement des cellules diploïdes normales dérivées de cultures primaires qui conservent un certain degré de différenciation mais elles perdent souvent leurs caractéristiques normales dans un environnement artificiel. Le nombre de divisions (générations) de ces cellules est restreint (30 à 50 repiquages) avant de mourir : leur vie et leur mort sont programmées (durée de vie restreinte). Cette limite de division est connue par La limite de Hayflick découverte par Leonard Hayflick en 1965 qui avait observé que les cellules dans une culture cellulaire ont une capacité limitée à une cinquantaine de division. Lorsque des cellules s'approchaient de cette limite, leur vitesse de prolifération diminuait puis elles montraient des signes de sénescence (vieillesse cellulaire) et arrêtent de se diviser puis elles entrent en apoptose. Cette limite est variable selon le type cellulaire et le type de l'organisme. Cette limite est liée au raccourcissement des télomères.

2.2. Lignée indéfinie (lignée continue ou lignée établie ou lignée permanente) :

Quand une lignée cellulaire finie « normale » devient immortelle, c'est qu'elle a été transformée de manière irréversible ou « transformation cellulaire » et devient une lignée indéfinie (lignée continue). Ces cellules transformées et immortelles qui ont perdu leurs caractéristiques normales se comportent comme les cellules d'une tumeur maligne. Elles ont souvent des chromosomes supplémentaires ou anormaux (cellules aneuploïdes). Ces lignées qui sont obtenues de plus d'un passage, poussent rapidement et ont théoriquement un nombre illimité de divisions (immortelle = durée de vie illimitée, continus) avec ou sans support ce qui autoeise un nombre de passage de façon indéfini.

Les cellules constituant ces cultures :

- Perdent l'inhibition de contact et se développent en amas ou multicouche
- Changent de forme et d'aspect (s'arrondissent)
- Les cellules qui adhère au support perdent leur besoin d'ancrage et peuvent être cultivées en suspension. (Indépendante de l'ancrage au support).

Exemple de lignées permanentes (cellules transformées cancéreuses):

Les cellules Hela sont des cellules cancéreuses provenant du carcinome de l'utérus humain, les cellules KB sont issues d'un carcinome oral humain, les cellules 3T3 proviennent d'un embryon de souris, les cellules Véro proviennent de reins de singe et les cellules MRC-5 proviennent des poumons du premier fœtus humain. Les lignées continues sont généralement soit:

- Des cellules souches embryonnaires / adultes (cellules toti / pluri / multipotentes / germinales, auto-renouvellement)
- Des cellules transformées ou cancéreuses prélevées sur des tumeurs réelles chez un humain ou un animal.
- Des cellules transformées : spontanément à partir de cellules normales en culture ayant échappé à la sénescence (L'apparition de variants immortels est causée par des mutations des gènes qui régulent le cycle cellulaire, notamment la protéine p53).
- Des cellules immortalisées : l'immortalisation de certaines lignées peut également être induite artificiellement par l'emploi de :
 - ✓ Mutagènes chimiques : butyrate, agents alkylants.
 - ✓ Facteurs physiques : radiations
 - ✓ Gène de virus oncogènes : un gène immortalisant la cellule sans la rendre cancéreuse tel que l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) pour les lymphocytes B et l'antigène T Simian virus 40 (SV40) pour les fibroblastes.

Le principe c'est que ces lignées ne sont évidemment pas immortelles mais simplement elles vont résister un petit peu à la mort cellulaire et prolonge leur vie en proliférant plus rapidement que les autres cellules de culture primaires (par exemple les fibroblaste normales ont une dizaine de générations alors que les fibroblaste immortalisé peuvent atteindre trente à quarante générations). Les lignées cellulaires transformées ont l'avantage d'être disponible de façon théoriquement quasiment infinies, mais l'inconvénient est de ne conserver que très peu de caractéristiques originales in vivo.

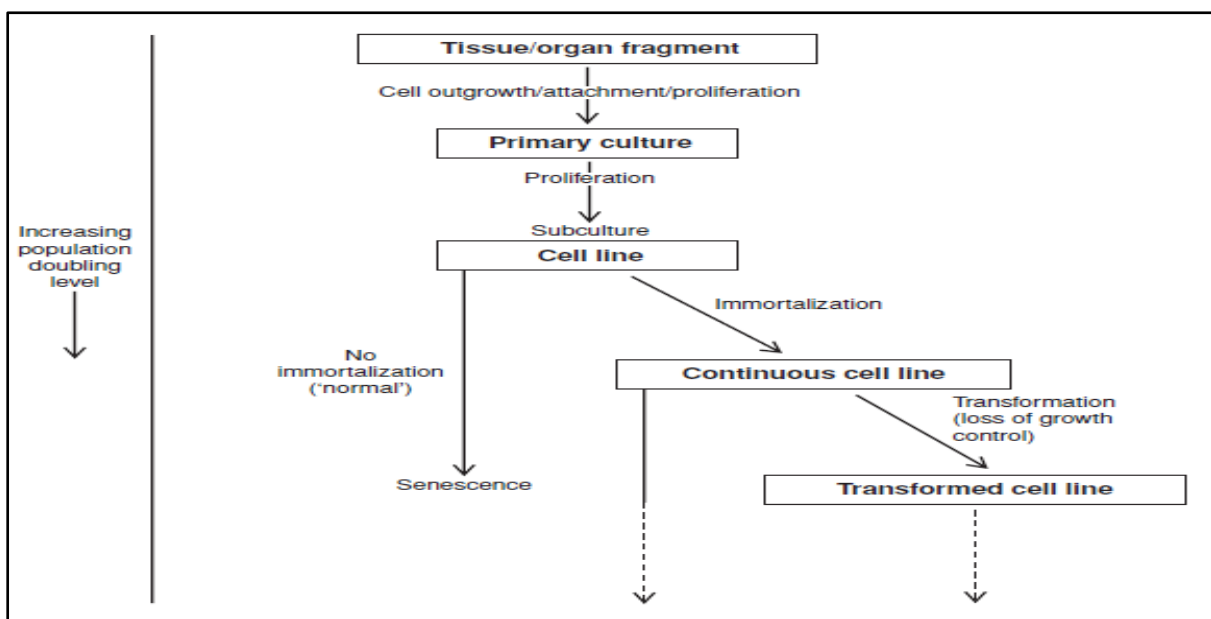


Figure 1 : les différents types de lignées cellulaire utilisées en culture cellulaire.

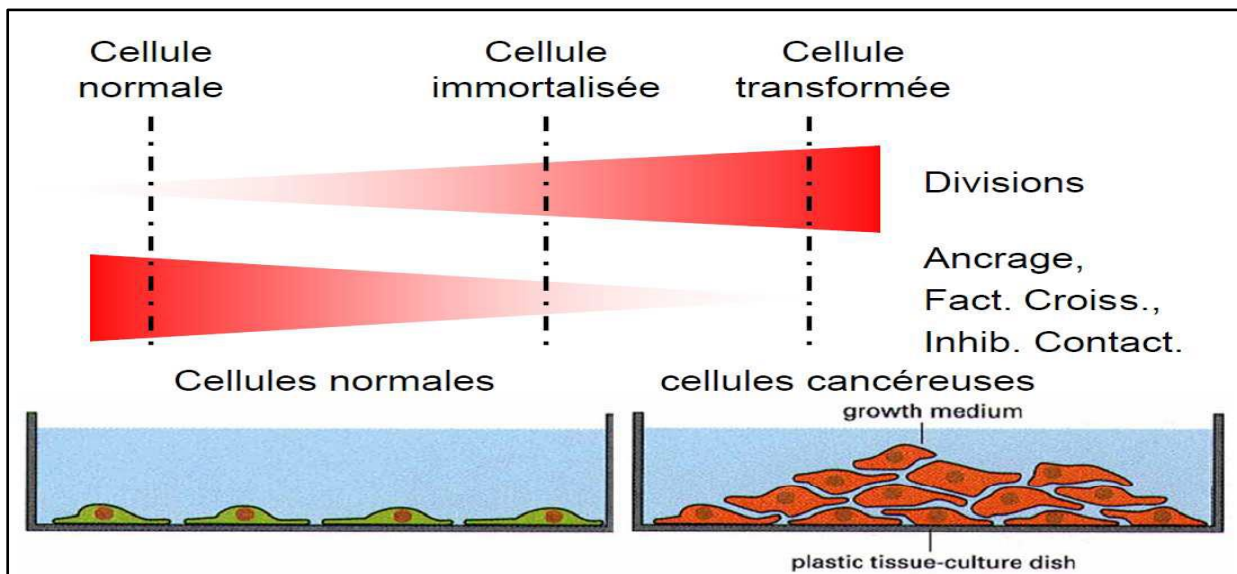


Figure 2 : caractéristiques prolifératives de lignées cellulaire en culture cellulaire.

2.3. Lignée clonale :

Les lignées clonales sont des lignées stables définies ou indéfinies ou primaires immortalisées auxquelles on a inséré un gène codant pour une protéine d'intérêt couplée à un agent sélectif et à partir desquelles on en isole des clones. La lignée clonale (clones) est formée par la descendance d'une seule cellule.

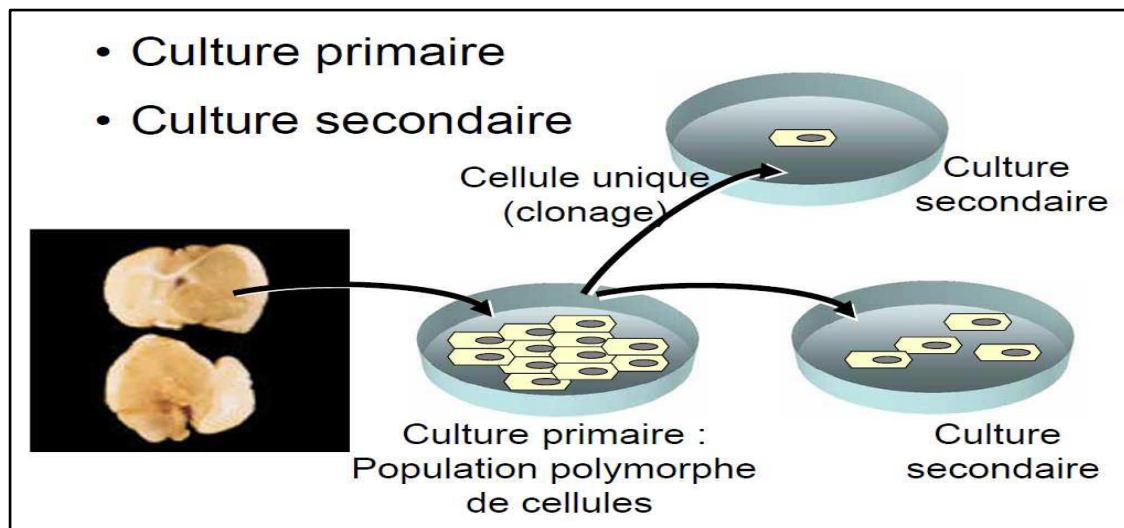


Figure 3 : schémas d'obtention de lignée clonale

3. Méthodes de cultures et obtention des cellules

3.1. Les méthodes de culture:

Deux méthodes différentes peuvent être utilisées pour cultiver les cellules in vitro, en fonction du comportement des cellules en culture. Ces méthodes se fondent sur leur capacité à s'adhérer à un substrat (comme un flacon de culture en verre ou en plastique) ou à flotter librement dans le milieu de culture (comme les systèmes de culture en suspension). Plusieurs lignées cellulaires, en particulier celles provenant de tissus normaux, sont perçues comme adhérentes, ce qui signifie qu'elles se développent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat qui leur convient. Il arrive fréquemment que certaines lignées cellulaires qui ne sont plus considérées comme normales (cellules transformées) puissent se développer soit en s'accrochant à un substrat, soit en flottant librement en suspension. En outre, certaines cellules normales, telles que celles présentes dans le sang, ne se fixent pas habituellement aux substrats et ont toujours une croissance en suspension.

➤ Types morphologiques des cellules en culture:

Chaque lignée cellulaire ou type cellulaire exprime des caractéristiques différentes en termes de croissance et d'apparence en culture. La forme prise par une lignée cellulaire reflète le tissu dont elle est issue. En général, on décrit les cellules cultivées en se basant sur leur morphologie globale (forme et apparence) ou leurs caractéristiques fonctionnelles. Trois morphologies de base existent :

1. Les cellules type épithélial : ces cellules sont fixées à un substrat et sont ovales et polygonales.
2. Les cellules du type lymphoblaste ne se fixent pas habituellement à un substrat, mais restent en suspension sous forme sphérique.
3. Les cellules du type fibroblaste sont fixées à un substrat et se présentent sous forme d'allonges et de bipolaires.

Il est important de se rappeler que la forme est déterminée par les conditions de culture et que de nombreuses cultures de cellules peuvent présenter différentes morphologies. Par exemple, la morphologie des cellules pourrait indiquer que le milieu est épuisé et son remplacement ou un repiquage est nécessaire.

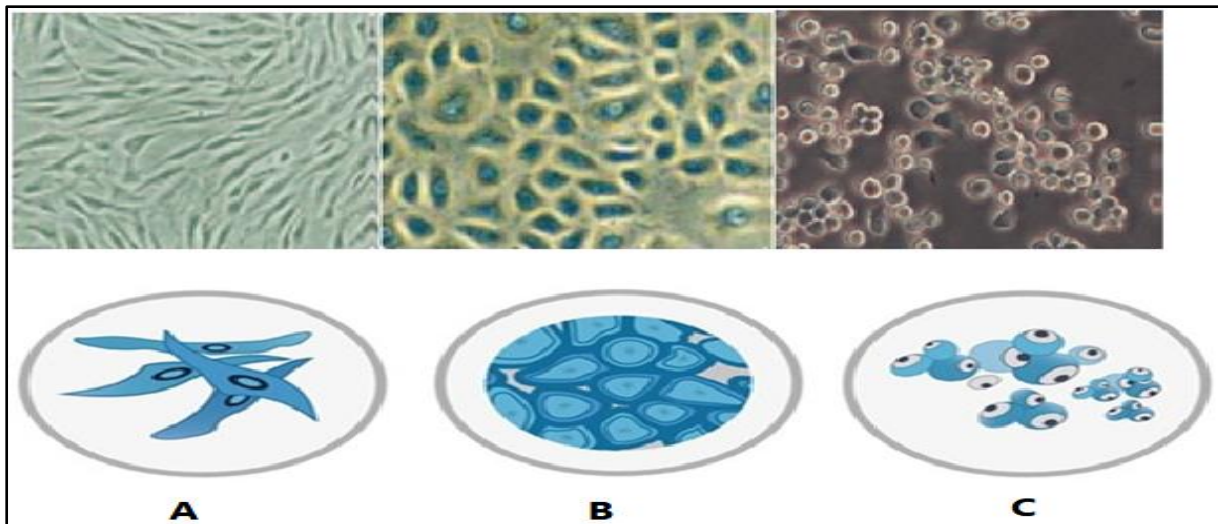


Figure 4: morphologies des lignées cellulaires de mammifères .En haut images réelles . En bas images schématisées. **A** : cellules adhérentes de type fibroblaste, de forme allongée ; **B** : adhérent de type épithélial avec une forme polygonale ; **C** : cellules en suspension de type lymphoblastique, de forme arrondie.

Tableau 1. Lignées cellulaires couramment utilisées et leurs caractéristiques pour chaque type de culture

Attached Cell Lines		
Name	Species and tissue of origin	Morphology
MRC-5	Human lung	Fibroblast
HeLa	Human cervix	Epithelial
Vero	African Green Monkey Kidney	Epithelial
NIH 3T3	Mouse embryo	Fibroblast
L929	Mouse connective tissue	Fibroblast
CHO	Chinese Hamster Ovary	Fibroblast
BHK-21	Syrian Hamster Kidney	Fibroblast
HEK 293	Human Kidney	Epithelial
Hep G2	Human Liver	Epithelial
BAE-1	Bovine aorta	Endothelial
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	Neuroblast
Suspension Cell Lines		
Name	Species and tissue of origin	Morphology
NS0	Mouse myeloma	Lymphoblastoid
U937	Human Histiocytic Lymphoma	Lymphoblastoid
Namalwa	Human Lymphoma	Lymphoblastoid
HL60	Human Leukaemia	Lymphoblastoid
WEHI 231	Mouse B-cell Lymphoma	Lymphoblastoid
YAC 1	Mouse Lymphoma	Lymphoblastoid
U 266B1	Human Myeloma	Lymphoblastoid

3.1.1. Culture en monocouche (ou culture stationnaire) :

Les membranes plasmiques des cellules animales portent des charges négatives fixes qui permettent l'adhésion cellule-cellule par des cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++}), mais les cellules peuvent également adhérer à des surfaces artificielles chargées négativement ou positivement. Les cellules forment une monocouche lorsqu'elles adhèrent non seulement les unes aux autres mais également à la surface des récipients de culture.

La culture en monocouche de cellules adhérentes est une culture de type statique (sans agitation). Le principe général de cette méthode est lié à l'affinité des cellules au support (l'ancrage) car la plupart des cellules appartiennent à des tissus solides organisés.

In vitro, il est essentiel que les cellules adhérentes s'ancrent afin de favoriser leur prolifération. Cet ancrage est conditionné par les éléments d'attachement qui seront créés par les cellules et introduits dans le milieu de culture. Dans le cadre de la culture en monocouche, les cellulesensemencées se sédimentent sur le support et s'y fixent, puis se divisent jusqu'à former un tapis qui recouvre toute la surface disponible. Cette situation de confluence se traduit souvent par une cessation de la prolifération, soit en raison de signaux transmis par les jonctions cellule-cellule qui provoquent une inhibition de contact, soit parce que la quantité de milieu disponible ne peut plus répondre aux besoins de la population cellulaire en croissance. Après avoir atteint ce stade, le tapis est lavé avec une solution saline isotonique sans Ca^{+2} et Mg^{+2} (solution tampon PBS). Les cellules sont décollées en utilisant une solution de trypsine et mises en suspension dans un petit volume de milieu de culture contenant du SVF (sérum de veau fœtal) en additif. Suite à une distribution adéquate des cellules (par exemple. Après avoir effectué l'aspiration et le renflement avec une pipette, on effectue le décompte et on ajuste la concentration en diluant la suspension initiale dans un volume adéquat de milieu de culture. Le ratio de démultiplication est le rapport entre le nombre de flacons à ensemenecer et le nombre de flacons de départ. Ce rapport varie généralement en fonction des cellules et des exigences du manipulateur.

- **La culture en monocouche sur verre ou sur plastique**

est une technique de base pour les cellules adhérentes. L'adhérence est rendu possible par l'utilisation du plastique « traité pour la culture cellulaire ». ce traitement est un traitement physique du polystyrène résultant des composés hydrophiles chargés négativement, ceci permet l'adsorption des molécules qui vont favoriser l'adhérence.

- **La culture sur couche de matrice mimant les conditions naturelles du milieu extracellulaire :**

pour certains types cellulaire, les protéines apportés par le milieu de culture ou synthétisés par la cellule elle-même sont insuffisantes pour permettre l'adhérence. Certaines molécules synthétiques telle la poly-L-lysine et la polyornithine ou bien molécules naturelles comme fibronectine sont utilisées pour tapisser et recouvrir le support (verre ; plastique) et favoriser l'adhérence cellulaire.

Pour autres modèles, l'adhérence au plastique seul ne pose pas de problèmes, mais la différenciation de cellules n'est possible que par contact d'une matrice. On utilise alors une protéine matricielle pure ou partiellement purifié comme le collagène type I sous forme d'un film ou gel avant d'ensemencer les cellules.

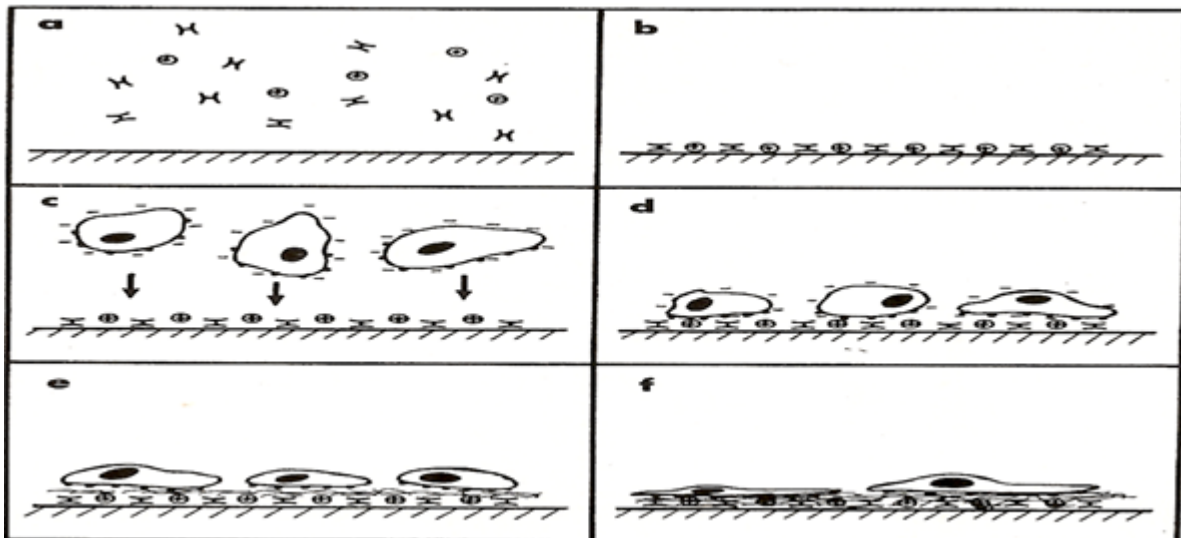


Figure 5: représentation schématique de mécanisme d'adhésion cellulaire au support

3.1.2. Culture en croissance tridimensionnelle sur des microporteurs (microcarriers):

Les explants primaires et les cellules transformées peuvent être cultivées et croître de manière tridimensionnelle sous forme de sphéroïdes multicellulaires en suspension. La culture est réalisée en se fixant sur des supports solides sphériques de petit diamètre. Pour différentes utilisations, ils sont fabriqués à partir de dextrane, de silicone ou d'autres polymères (comme les microbilles en plastique) et peuvent être recouverts de collagène ou d'autres molécules qui contribuent à l'adhérence.

Pour quelques lignées cellulaires dépendantes de l'ancrage, il suffit de démarrer une culture de ces cellules dans un flacon agitateur pour les cultures en suspension. Lorsque les cellules se rencontrent dans cette suspension, elles restent ensemble et forment ainsi des agrégats sphéroïdaux plus grands en quelques semaines. La plupart des autres lignées cellulaires doivent d'abord être conservées dans des boîtes à surface non adhésive pour induire cette croissance

tridimensionnelle sur microporteurs. Une fois que ces boîtes ont été cultivées pendant quelques jours, elles sont placées dans des récipients et soumises à une agitation modérée et continue, ce qui permet aux cellules de rester dans le milieu de culture où elles forment des sphéroïdes multicellulaires et peuvent être conservées pendant plusieurs semaines (Figure 5). Les sphéroïdes peuvent être directement récoltés avec des pipettes et le milieu est facilement remplacé, car les sphéroïdes précipitent rapidement lorsqu'ils ne sont plus agités.

Cette technique offre un rendement élevé en raison d'une surface d'adhérence accrue. Il s'agit d'une forme de culture monocouche effectuée en 3D.

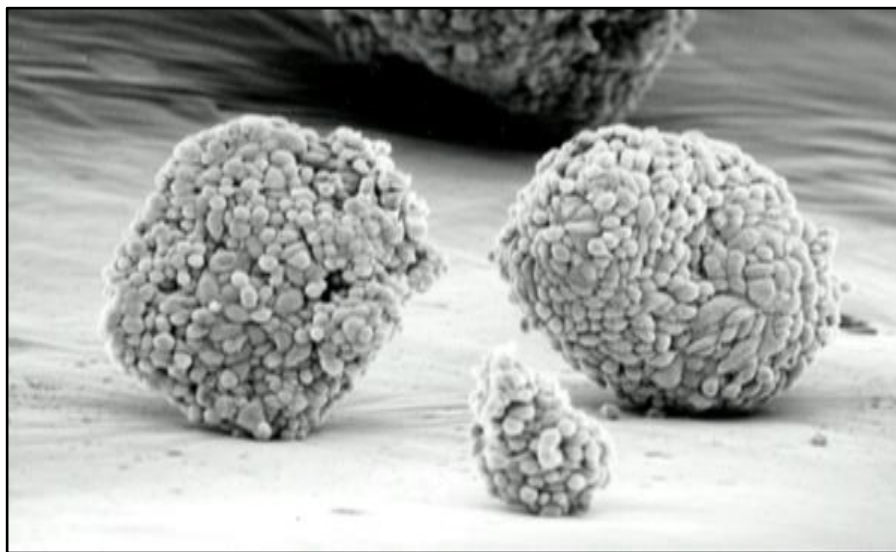


Figure 6 : Image au microscope électronique à balayage d'un sphéroïdes multicellulaires de cellules .

3.1.3. La culture en suspension:

Différentes cellules, notamment les cellules hématopoïétiques, peuvent et doivent être cultivées en suspension dans un milieu liquide, car leur croissance ne dépend pas de leur ancrage. Dans cette situation, la culture peut se faire de manière stationnaire (même si elle n'est pas maintenue en agitation, les cellules ne peuvent pas se fixer solidement au substrat) ou bien agitée de manière douce (20 à 30 tour/min). Différentes méthodes peuvent être utilisées pour effectuer l'agitation :

- Dans des flacons Spinner (où la rotation magnétique est maintenue par des barreaux magnétiques siliconés appelés "Spinner")
- Des appareils d'agitation sophistiqués appelés cytoculteurs, qui assurent une densité cellulaire, un environnement gazeux constant, ainsi qu'un apport constant de milieux frais et la récupération de milieux périmés.

Les cultures en suspension sont fréquemment enrichies d'un agent protecteur qui accroît la

viscosité du milieu.

Plusieurs lignées cellulaires monocouches ont perdu leur dépendance à l'ancrage par transformation et sont désormais également conservées sous forme de cultures en suspension. Les cellules HeLa du carcinome du col de l'utérus humain et les cellules HTC d'hépatome de rat font partie de ces cultures qui se développent en monocouches et en suspension.

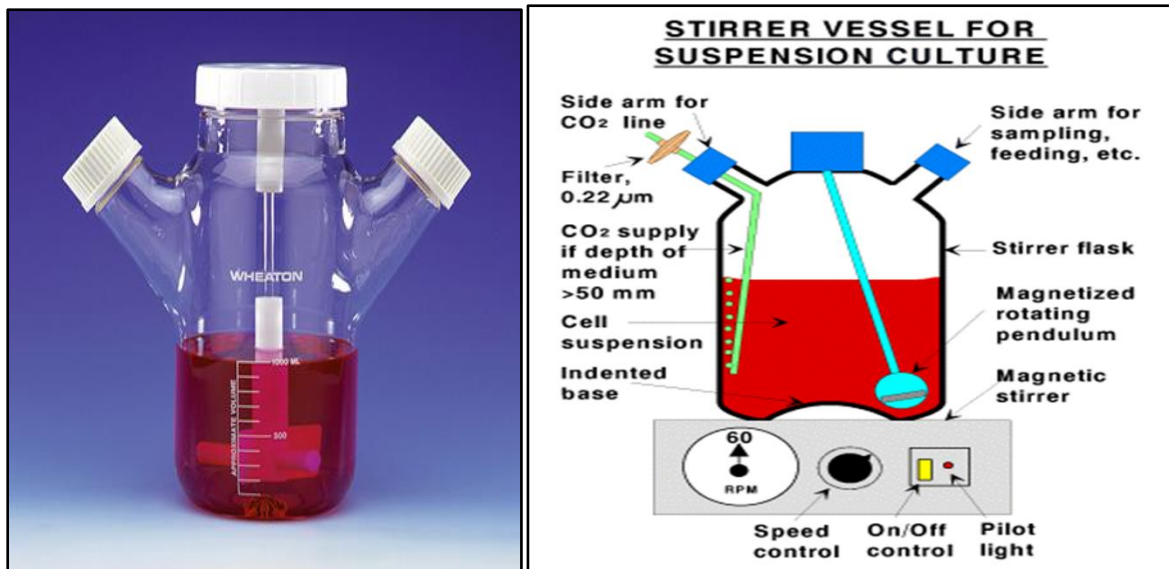


Figure 7 : Les flacons Spinner (Corning) servent à cultiver des cellules non adhérentes en suspension.

3.2.Obtention des cellules cultivées :

On peut distinguer deux types de sources de cellules dans l'organisme :

- **Les cellules circulantes (libres , flottantes):** quelles soient saines , tumorales ou transformées, ces cellules se développent rapidement et sont faciles à prélever, comme des cellules isolées dans les liquides biologiques telles les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, cellules du sang ou les cellules de la lymphe.
- **Les cellules adhérentes :** sont attachées les unes aux autres, provenant d'un tissu, d'un organe sain ou tumoral, ce qui nécessite leur dissociation et leur séparation.

3.3. Les techniques d'obtention des cellules circulantes:

Il est nécessaire de séparer les cellules circulantes. L'utilisation d'un gradient de Ficoll avec centrifugation est possible en raison de leur différence de densité. Il est également envisageable d'utiliser un trieur de cellules.

3.3.1. Séparation par centrifugation différentielle en gradient de densité .

Certains types de cellules présentent des densités assez variées pour permettre leur séparation en utilisant des gradients de densité. Il est principalement possible de distinguer des gradients de densité discontinue, dont le plus courant est le Ficoll. Il s'agit d'un glucide artificiel (polymère de polysaccharide) avec une densité à 20 °C de 1,077. On l'emploie pour séparer les lymphocytes sanguins qui présentent exactement cette densité.

Exemple : La séparation des lymphocytes

. Le sang est prélevé sur héparine ou EDTA puis dilué au tiers avec une solution tampon. Un tube de centrifugation est utilisé pour déposer du sang dilué à la surface du mélange de séparation (Ficoll). Suite à une centrifugation à 1 500 g pendant 15 minutes à une température de 20 °C, les globules rouges sont sédimentés par le Ficoll et se déposent au fond du tube, tandis que à l'interface entre la couche plasmatique et le mélange de séparation se trouvent les lymphocytes. Le recueil de l'interface et de la phase supérieure permet d'obtenir une suspension de cellules dites cellules mononucléées. Celles-ci sont lavées dans un tampon salin phosphaté lavés trois fois avec du milieu culture et centrifugés à 400 g pendant 5 mn de façon à éliminer toute trace de Ficoll, toxique pour les cellules en cas d'exposition prolongée. Grâce à des gradients comme le dextran, il est possible de séparer les granulocytes en utilisant une simple sédimentation. Une autre option est le Percoll, dont la densité (de 1,03 à 1,08) peut être ajustée en fonction de la population que l'on veut enrichir.

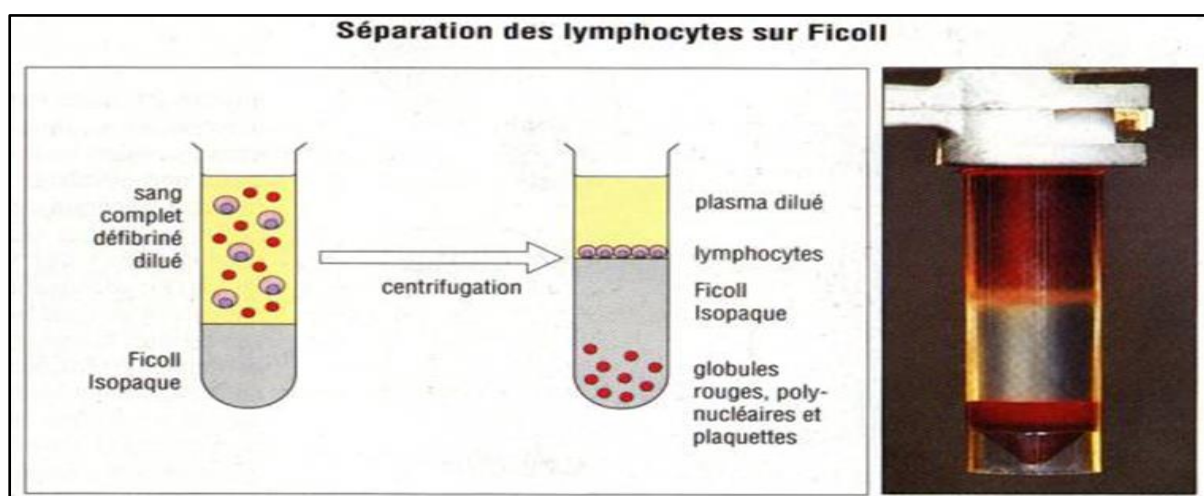


Figure 8 : séparation des lymphocytes par centrifugation sur gradient de Ficoll

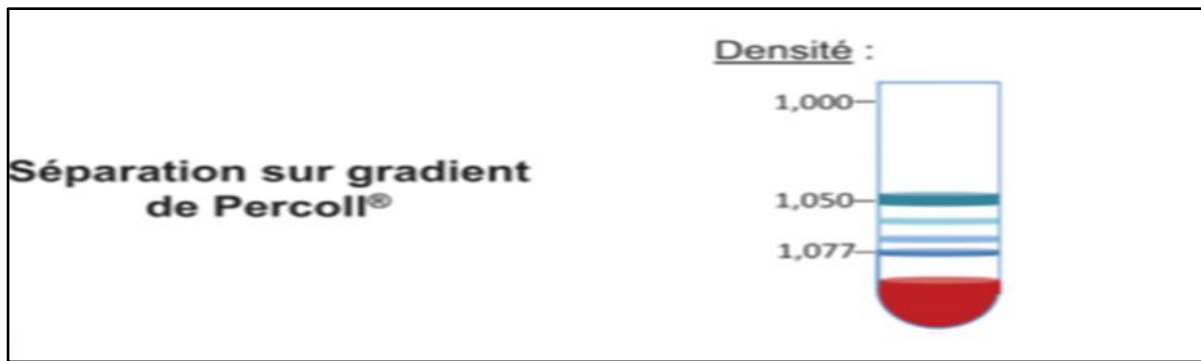


Figure 9 : séparation des lymphocytes par centrifugation sur gradient de Percoll

- **Séparation des lymphocytes par sédimentation**

Le prélèvement du sang se fait de la même façon. On laisse les tubes de sang à température ambiante pendant une période de 30 à 80 minutes. Plus denses que les lymphocytes, les globules rouges se sédimentent dans la moitié inférieure du tube, laissant une couche plasmatique riche en lymphocytes qui est collectée et utilisée pour les cultures.

3.3.2. Séparation et tri par cytométrie de flux

On appelle cette technique la « cytofluorimétrie » ou « technique de cytomètre de flux. »

Cet instrument est employé afin d'identifier, voire d'analyser les caractéristiques fonctionnelles, de sous-populations cellulaires au sein d'une population cellulaire variée. La cytométrie en flux est une méthode utilisée pour analyser les cellules ou particules biologiques en suspension qui se déplacent successivement dans un champ de mesure. Chaque particule ainsi injectée est excitée par un ou plusieurs lasers. Si les particules sont marquées par une ou plusieurs fluorochromes, la source lumineuse les excite et nous fournit des informations sur d'autres aspects biologiques. Pour que le cytomètre de flux puisse fonctionner, il est nécessaire d'avoir une combinaison de système :

- **Fluidique** : les cellules sont aspirées dans une gaine liquide dont la fin est un capillaire étroit qui ne permet que le passage d'une cellule à la fois, ce qui permet d'analyser les cellules individuellement afin de les introduire, de les canaliser et de les transporter vers le laser.

- **Optique** dans lequel la cellule passe devant un ou plusieurs faisceaux laser. Cela entraîne un déplacement du faisceau et une excitation des fluorochromes liés aux anticorps, ce qui entraîne la détection des cellules et l'émission d'une fluorescence. Il est essentiel d'utiliser des photomultiplicateurs et des systèmes de filtres pour exciter, récupérer et amplifier les signaux

émis par les déviations du faisceau ce qui permet de mesurer à la fois la taille et la granulosité des cellules.

- **Electronique** permet de transformer les signaux optiques en signaux électroniques proportionnels et de les numériser, -

-**Informatique** permet de visualiser les signaux électroniques

Il existe également des cytomètres équipés d'un trieur de cellule. Grâce à ce dispositif, il est possible de séparer et d'isoler les cellules sous-population. Si un seul anticorps fluorescent est utilisé pour marquer les cellules, les résultats du cytomètre sont habituellement présentés sous forme d'histogramme représentant en abscisse l'intensité de fluorescence et en ordonné le nombre de cellules analysées.



Figure 10 : Appareil de Cytomètre de flux

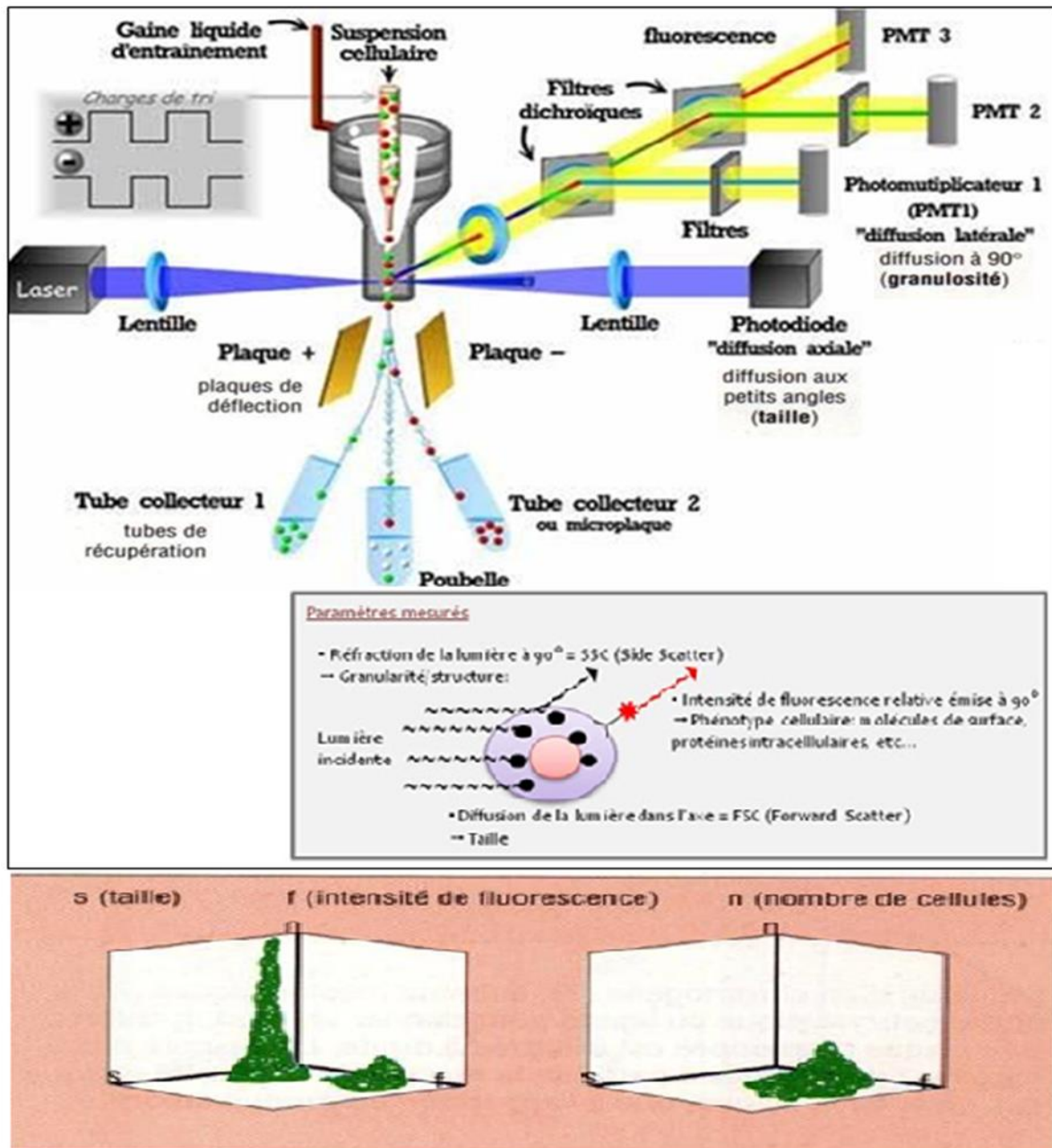


Figure 11 : Principe de la Cytométrie de flux

3.4. Les techniques d'obtention des cellules adhérentes :

Les cellules structurées en tissus requièrent l'utilisation de méthodes plus innovantes. Selon les organes et les cellules à extraire, les méthodes varient. En règle générale, il est possible de récupérer les cellules en utilisant deux méthodes différentes : la méthode de migration cellulaire à partir d'un explant et la méthode de dissociation enzymatique du tissu, avec libération des

cellules, afin d'obtenir une suspension de cellules que l'on peut purifier partiellement et séparer les cellules d'intérêt.

3.4.1. Migration cellulaires à partir d'explant:

C'est la méthode la plus ancienne qui repose sur la migration des cellules à partir d'**explants** provenant d'organes ou de tissus de la **culture primaire**. Les pionniers de la culture de tissu ont pu obtenir les premières cellules in-vitro grâce à cette méthode.

✓ *La technique des explants (méthode de dissection) :*

Consiste à découper le tissu en morceaux d'environ 1 à 4 mm³, puis à le réduire à l'aide d'une pince. Ensuite, ces morceaux sont disposés dans un flacon de culture contenant un environnement nutritif. Les cellules vont se déplacer à partir des divers fragments avant de se reproduire. Cette technique est fréquemment employée lorsque le tissu à cultiver est très petit. Le processus d'obtention des couches cellulaires confluentes est plutôt long (environ 30 jours).

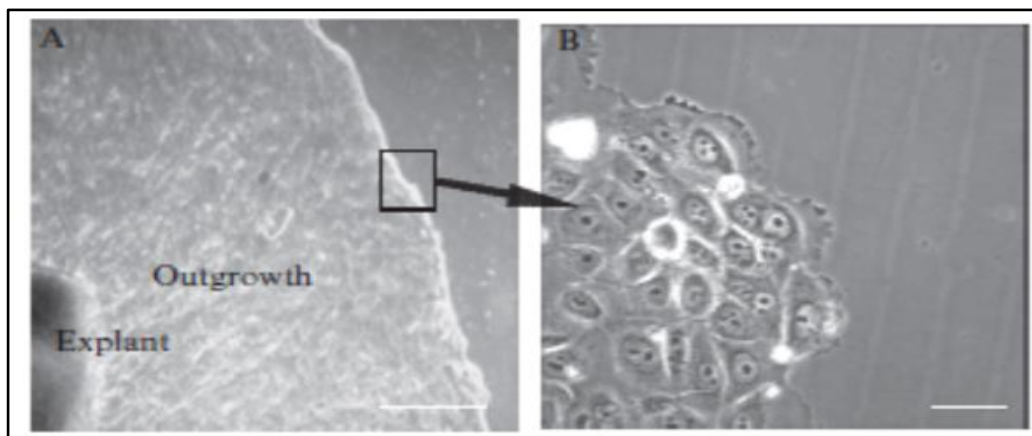


Figure 12 : La méthode des explants : **A :** image à faible grossissement montrant culture primaire d'un explant adhérent de l'épithélium respiratoire humain après 4 jours d'incubation. **B :** excroissance des cellules migratoires dédifférenciées à la périphérie de l'explant.

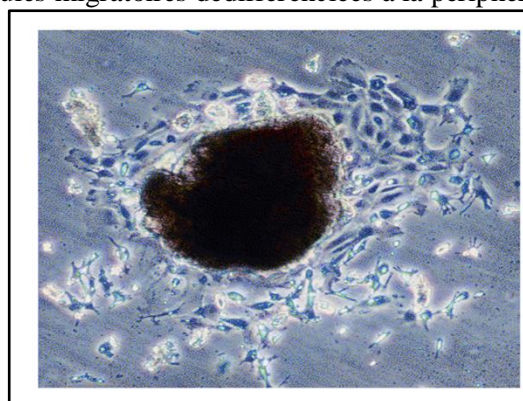


Figure 13 : Carcinome épidermoïde de la peau chez la souris avec excroissance épithéliale

✓ **Technique de Carrel :**

Il s'agit d'extraire un fragment de tissu qui est réduit en un très petit rectangle et placé dans un flacon contenant un mélange de plasma de coq et d'extrait embryonnaire de poule (qui fournissent les nutriments à l'explant). Après 24 heures passées à l'étuve, les premières cellules migrent de l'explant.

✓ **Technique de tubes roulants de Gey :**

Un tube recouvert d'un milieu nutritif est utilisé pour placer des explants de type Carrel plutôt que dans un flacon. Les tubes sont disposés à l'horizontale et en mouvement lent. Les explants sont successivement immergés dans le liquide avant d'être découverts. Les cellules quittent l'explant et se déplacent dans le liquide, puis elles se fixent sur le tube.

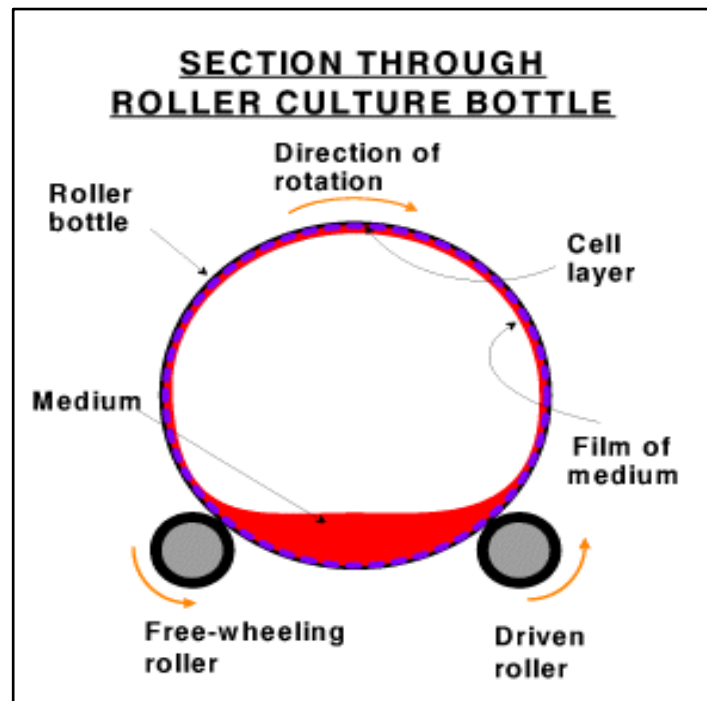


Figure 14 : Technique de tubes roulants

3.4.2. Méthode de dissociation enzymatique:

Des enzymes protéolytiques sont employées pour digérer la trame protéique qui entoure les cellules. La trypsine est fréquemment employée dans une solution saline. L'utilisation des enzymes est une méthode rapide et offre un bon rendement cependant, il est possible que certaines cellules à membrane fragile peuvent être affectées par ce procédé.

3.5. Obtention commerciale de lignées et modèles cellulaires

Une alternative à la constitution de cultures par culture primaire consiste à acheter des cultures cellulaires constituées auprès d'organisations telles que l'American Type Culture Collection (ATCC), ECCAC ou le Coriell Institute for Medical Research. Ces organisations proposent des lignées cellulaires de très bonne qualité qui sont soigneusement testées afin d'assurer l'authenticité des cellules. Exemple de lignées commercialisées : HeLa (épithéliales, utérus humain ; Helen Laks, 1952) ; 293 (épithéliales, rein humain embryonnaire) ; 3T3 (fibroblastes, embryon de souris) ; C2C12 (myoblastes, souris) ; Caco-2 (épithéliales, colon humain) et Cos-1/ Cos-7 (fibroblastes, rein de singe)

3.6. Les méthodes de dissociation :

3.6.1. Méthodes mécaniques :

La dissociation mécanique fait appel à la homogénéisation, ou utilisation des grattoirs (raclettes)

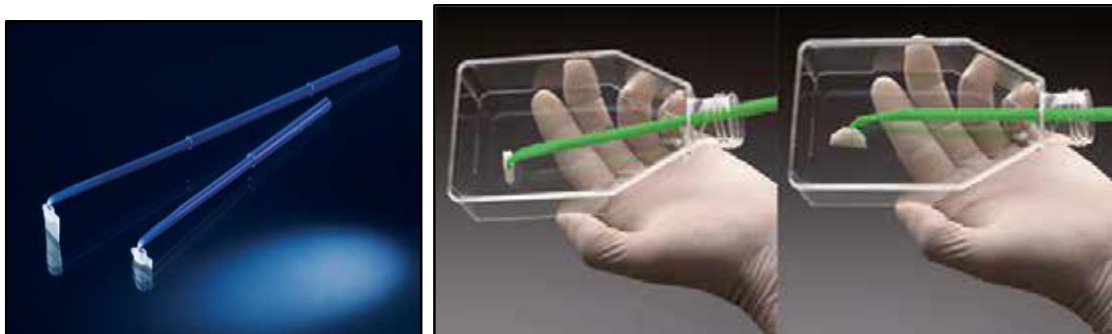


Figure 15 : raclettes ou grattoirs

3.6.2. Méthodes chimiques :

A. Méthode non enzymatiques :

A.1. élimination des cations divalents : c'est la plus simple des méthodes, elle consiste à éliminer les cations divalents essentiellement Ca^{+2} et Mg^{+2} impliqués dans les liaisons intercellulaires.

- *Par trempage* : consiste à une élimination abusive « excessive » par trempage dans une solution saline dépourvue de ces ions. Mais cette méthode ne permet pas en générale de

dissocier complètement les cellules, il y a un simple affaiblissement de la cohésion entre les cellules. Ce traitement favorise toute fois l'action ultérieure de la trypsine.

- *Par complexation* : elle consiste à lier le Ca^{+2} et Mg^{+2} avec un agent chélateur comme l'EGTA, EDTA,. Cette méthode appliquée a des tissu embryonnaire produit des dommages important lorsque elle pratiquée à des pH alcalin.
- *Méthodes mixte* : c'est la combinaison des enzymes et des chélateurs : les techniques mixtes prennent en considération que l'enzyme exige la présence des cations divalents (ex. le Ca^{+2} pour l'augmentation de l'activité des collagenase et la stabilisation de la trypsine; Mg pour les DNAase)

A.2. utilisation des disaccharides : certaines jonctions semblent pouvoir être cassée par des solutions hypertonique de maltose , lactose , saccharose ou bien de cellibiose.

B. Méthodes enzymatiques :

Les techniques les plus efficaces pour obtenir des suspensions de cellules bien dispersées et vivantes impliquent principalement l'utilisation des enzymes protéolytiques. Ces enzymes peuvent être utilisées soit à l'état brut, soit purifiées.

1. la trypsine :

Une sérine protéase avec une spécificité pour les liaisons peptidiques et est souvent associée à d'autres enzymes (par exemple, élastase et/ou collagénase) pour la dissociation tissulaire. Généralement on utilise solution à 25% de trypsine brute (la trypsine brute : est un mélange d'enzymes préparées à partir du pancréas (chymotrypsine, trypsine, RNAase , lipase , élastase collagénase) ou de 0,01 à 0,05 % de trypsine pure ayant un pH 7.2 à 7.4 à 4 à 37° C est couramment utilisé .

Bien que la trypsine est hautement efficace dans la dispersion de la cellule , il est en même temps un peu incompatible avec les cellules vivantes , il est donc important d'exposer les cellules à la trypsine pendant une période aussi courte que possible. Pour les types de cellules sensibles trypsine peut être préféré à 4 ° C.

Le principe de fonctionnement est donc exposer les cellules de son action pour la durée la plus courte possible, compatibles avec la dispersion adéquate des cellules ,

2. La collagénase:

La collagénase est une protéine spécifique pour le collagène car elle clive les liaisons peptidiques de la triple hélice du collagène natif. En raison de sa capacité unique à hydrolyser le collagène natif qui constitue la matrice intracellulaire, elle est largement utilisée pour la désagrégation de tissus adultes principalement et l'isolement de cellules, pour la préparation d'une culture primaire. Il est parfois également utilisé pour la séparation des cellules de l'embryon et principalement d'origine maligne.

En général, il n'est pas utilisé pour les tissus épithéliaux et elle n'a aucun effet sur les cellules du tissu fibreux. La collagénase brute qui est utilisée dans la concentration de 200-2000 U/ ml contient également des protéases non spécifiques.

3. Autres enzymes.

Hyaluronidase (Utilisé en combinaison avec la collagénase et catalyse l'hydrolyse des liaisons 1,4- β -D-glycosidiques) ; Élastase (Utilisé pour digérer les tissus contenant de grandes quantités d'élastine) la pronase

4. Besoins nutritionnels des cellules en culture

4.1. Les milieux de culture :

L'étape la plus cruciale et essentielle de la culture cellulaire est la sélection du milieu de croissance approprié. Le choix du milieu de culture est en fonction du type cellulaire (la localisation anatomiques, l'état de différenciation ...etc) et aussi de l'expérience à réaliser.

Pour favoriser la survie et la prolifération cellulaire, il est essentiel que l'environnement de culture in vitro réponde aux exigences physiologiques fondamentales de la cellule comme celle in vivo.

Les milieux de cultures sont des préparations qui fournissent tous les nutriments essentiels, vitamines, cofacteurs, substrats métaboliques, acides aminés, ions inorganiques et oligo-éléments nécessaires au soutien des fonctions cellulaires et à la synthèse de nouvelles cellules. En plus de satisfaire aux besoins nutritionnels des cellules, il faut assurer les conditions de base requises pour la croissance optimale des cellules dans un incubateur qui comprennent avec une température, pH et l'osmolarité contrôlées et fournir les gaz essentiels (O₂ et CO₂) .

4.2. Types et composition des milieux de culture :

Un milieu de culture peut être composé d'un milieu synthétique de base (avec ou sans sérum) et d'un milieu synthétique défini (sans sérum).).

4.2.1. Milieux synthétiques de base :

Ces milieux de base sont des milieux synthétiques et ont une composition plus ou moins complexe. Ils sont souvent nommés en l'honneur du chercheur qui les a créés : **Eagle (Eagle's Basal Medium)**, **Ham**, **Dulbecco**, **Parker...**, et sont également appelés **MEM** (Minimum essential medium) = Milieu Essentiel Minimum. Les milieux les plus utilisés : **DMEM (Dulbecco modified essential medium)** : la plupart des lignées cellulaires • **Ham's F12** : cellules de mammifères. • **MEM 199** : virus, production de vaccin, explants • **RPMI 1640 (Roswell Park Memorial institute)** : cellules en suspension, lymphocytes. Ces milieux sont appelés milieux de base car ils garantissent la survie des cellules in vitro. L'ajout de sérum au milieu synthétique de base est nécessaire pour la prolifération et l'expression des diverses fonctions cellulaires en culture.

Tableau 2: Les milieux synthétiques de base les plus utilisés en culture cellulaire.

Composés	Milieux de base			
	MEM	DMEM	RPMI-1640	Ham's F12
Sels inorganiques				
Chlorure de calcium, 2H ₂ O	200	265		44,1
Nitrate de calcium, 4H ₂ O			100	
Chlorure de magnésium, 6H ₂ O				123
Sulfate de magnésium	97,67	97,67	48,84	
Chlorure de potassium	400	400	400	224
Bicarbonate de sodium		3700	2000	1176
Chlorure de sodium	6800	6400	6000	7599
Phosphate de sodium dibasique	122		800	142,04
Phosphate de sodium monobasique		109		
Sulfate de cuivre, 7H ₂ O				0,0025
Sulfate ferreux, 7H ₂ O				0,834
Nitrate de fer, 9H ₂ O		0,1		
Sulfate de zinc				0,863
Acides aminés				
L-Alanine	25			9
L-Arginine, HCl	126	840	200	211
L-Asparagine, H ₂ O	50		50	15,01
L-Acide aspartique	30		20	13,3
L-Cystine, 2HCl	31,3		65,2	
L-Cystéine, HCl, H ₂ O	10	62,6		35
L-Acide glutamique	75		20	14,7
L-Glutamine	292	584	300	146
Glycine	50	30	10	7,51
L-Histidine, 3HCl, H ₂ O	42	42	15	20,96
L-Isoleucine	52	105	50	3,94
L-Leucine	52	105	50	13,1
L-Lysine, HCl	72,5	1460	40	36,5
L-Méthionine	15	30	15	4,48
L-Phénylalanine	32	66	15	4,96
L-Proline	40		20	34,5
Hydroxy-L-Proline			20	
L-Sérine	25	42	30	10,5
L-Thréonine	48	95	20	11,9
L-Tryptophane	10	16	5	2,04
L-Tyrosine, 2Na, 2H ₂ O	51,9	103,79	28,83	7,78
L-Valine	46	94	20	11,7
Vitamines				
Acide p-aminobenzoïque			1	
Acide folique	1	4	1	1,32
D-Acide Pantothénique		4	0,25	0,48
D-Biotine	0,1		0,2	0,0073
Chlorure de choline	1	4	3	13,96
L-Acide ascorbic, Na	50			
Myo-Inositol	2	7,2	35	18
Niacinamide	1	4	1	0,037
Pyridoxine, HCl	1	4	1	0,062
Riboflavine	0,1	0,4	0,2	0,038
Thiamine, HCl	1	4	1	0,34
Vitamine B12	1,36		0,005	1,36
Autres				
Acide alpha-lipoïque				0,21
Acide linoléique				0,084
Acide pyruvique, Na		110		110
Adénosine	10			
D-Glucose	1000	4500	2000	1802
Glutathion			1	
Guanosine	10			
Hypoxanthine				4,08
Rouge de phénol, Na		15,9	5,3	1,3
Putrescine, HCl				0,161
Thymidine	10			0,73

Les milieux synthétiques de base sont constitués des ensembles de composants suivants:

• **Une solution saline équilibrée**

Les solutions salines équilibrées comprennent un mélange de sels minéraux inorganiques destinés à : maintenir la pression osmotique, tamponner le milieu à pH physiologique, maintenir le potentiel membranaire, servir de cofacteurs dans les réactions enzymatiques et aider à l'attachement cellulaire. Les ions inorganiques les plus courants utilisés sont Na^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} et HCO_3^- . Les cellules ont également besoin d'oligo-éléments tels que Fe, Cu, Co, Se. Les principales de solution saline équilibrée utilisées sont : Solution saline d'Eagle (ESSS) , Solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) et Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS)

Tableau 3: Les solutions salines équilibrées .

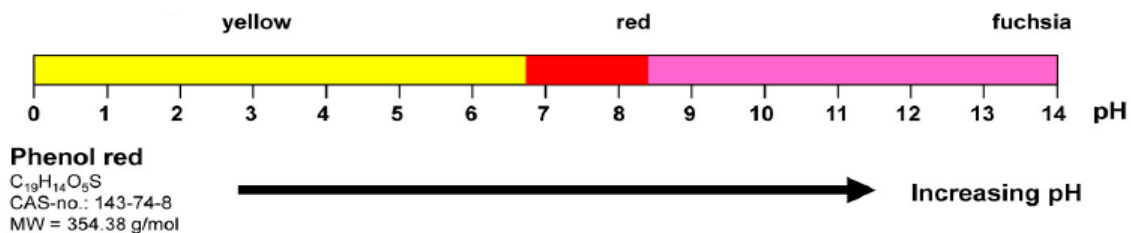
Component	Dulbecco's PBS											
	Earle's BSS		Without Ca^{2+} and Mg^{2+} (D-PBSA)		With Ca^{2+} and Mg^{2+}		Hanks's BSS		Spinner salts (as in S-MEM)			
	M.W.	g/L	mM	g/L	mM	g/L	mM	g/L	mM	g/L	mM	
Inorganic salts												
CaCl_2 (anhydrous)	111	0.02	0.18			0.2	1.80	0.14	1.3			
KCl	74.55	0.4	5.37	0.2	2.68	0.2	2.68	0.4	5.4	0.40	5.37	
KH_2PO_4	136.1			0.2	1.47	0.2	1.47	0.06	0.4			
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	203.3							0.1	0.5			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5	0.2	0.81			0.98	3.98	0.1	0.4	0.20	0.81	
NaCl	58.44	6.68	114.3	8	136.9	8	136.9	8	136.9	6.80	116.4	
NaHCO_3	84.01	2.2	26.19					0.35	4.2	2.20	26.19	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	268.1			2.2	8.06	2.16	8.06	0.09	0.3			
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	138	0.14	1.01							1.40	10.14	
Total salt			147.9		149.1		154.		149.4		158.9	
Other components												
D-glucose	180.2	1	5.55					1	5.5	1.00	5.55	
Phenol red	354.4	0.01	0.03					0.01	0.0	0.01	0.03	
Gas phase		5%				Air		Air		5%		
		CO_2								CO_2		

• **Les acides aminés :** sont des sources d'azote et les composants de base des protéines, dont huit sont essentielles : Ileu, Leu, Lys, Meth, Phé, Thr, Trp, Val. De plus, il y en a d'autres comme Gln, Tyr, Cys, Arg et His, dont la capacité de synthèse a été perdue.

- **Le glucose** constitue une source d'énergie et de carbone essentielle. Il est couramment utilisé à des concentrations de 1 g/L (par exemple, DMEM 1 g/L de glucose) ou de 4,5 g/L (DMEM 4,5 g/L de glucose) dans les milieux. Cependant, l'augmentation de la concentration de glucose n'est pas encouragée pour la croissance cellulaire car elle augmente les taux d'acide lactique, ce qui entraîne une diminution du pH.

De plus, des taux de glucose élevés déclenchent une oxydation intracellulaire intense du glucose, générant des radicaux libres nocifs. Parfois, le glucose est remplacé par d'autres sucres comme le galactose, le mannose ou le fructose.

- **Le rouge phénol** est un indicateur coloré avec une plage de transition de couleur comprise entre pH 7,2 et 7,6. Il aide à surveiller les changements de pH, car sa plage de virage correspond à la plage de pH physiologique de la cellule. Le pH intracellulaire se situe généralement entre 7,35 et 7,40. Les fluctuations du pH ont un impact sur le comportement des cellules : la prolifération diminue autour de 7,7, la croissance s'arrête entre 8,0 et 8,5 et la mort cellulaire survient en cas d'augmentation du pH entre 8,5 et 9,0, tandis que la croissance ralentit en dessous de 7,0, s'arrête autour de 6,5 et entraîne la mort cellulaire en cas de baisse du pH à 6,0



- **Le système tampon** est essentiel pour la régulation du pH en culture on utilise deux méthode: - utiliser une combinaison de bicarbonate de sodium $NaHCO_3$ dans le milieu et 5 % de CO_2 dans l'atmosphère de l'incubateur
 - soit utiliser la molécule tampon organique HEPES dans le milieu.

Additifs :

- **Sérum :**

- Mises en culture en présence d'un milieu synthétique de base, 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 sérum est caractérisé par une composition très complexe, comprenant une multitude de substances sécrétées par différents types de cellules au sein de l'organisme.

Le pourcentage de sérum introduit dans le milieu basal fluctue généralement entre 5 et 10 %

en fonction du type cellulaire. Il est impératif que le sérum subisse une décomplémentation, les protéines du complément étant rendues inactives à des températures comprises entre 30 °C et 56 °C. L'utilisation de sérums provenant de sources humaines ou animales, en particulier de jeunes individus, est possible, étant entendu que l'impact cytoestimulant (mitogène) global du sérum diminue en fonction de l'âge du donneur. Parmi les sérums couramment utilisés figurent le sérum de veau, le sérum de veau pour nouveau-né (SVNN) et le sérum de veau foetal (SVF), ce dernier présentant une efficacité supérieure.

Avantages du sérum dans un milieu de culture cellulaire

1. Le sérum contient des nutriments essentiels qui sont soit sous forme soluble, soit liés à des protéines, notamment des métabolites, des ions, des oligo-éléments et des lipides.
2. Il joue un rôle crucial en fournissant diverses hormones qui servent de molécules de signalisation essentielles à la régulation d'activités cellulaires spécifiques.
3. Le sérum contient de nombreux facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance transformant bêta (TGF-B) et le facteur de croissance épidermique (EGF), qui induisent la prolifération et la croissance cellulaires, et soutiennent aussi les fonctions spécialisées des cellules.
4. contient des protéines qui contribuent à l'adhésion des cellules à la surface de culture, comme la fibronectine.
5. renferme des protéines de liaison comme l'albumine et la transferrine, qui facilitent le transport des molécules dans les cellules.
6. contient des minéraux essentiels tels que le Ca, Mg, Fe, K, Na, Zn, entre autres, favorisant l'adhésion et la croissance cellulaire.
7. La viscosité du milieu est augmentée par le sérum, constituant une barrière protectrice contre les dommages mécaniques lors de l'agitation et de l'aération des cultures en suspension.
- 8 contribue au maintien de la pression osmotique appropriée nécessaire à une croissance et à une fonction cellulaire optimale.

Alors que les inconvénients associés au milieu contenant du sérum sont principalement:

1. le coût élevé : le sérum de veau foetal s'avère être une ressource coûteuse et difficile à acquérir en cas de besoin en quantités importantes.
2. Une variabilité notable entre les lots de sérum due aux différentes origines (différents pays), différents types (SVF, SVNN, Sérum de cheval..) et différentes qualités qui contribuent au manque d'uniformité de sa composition, ce qui peut avoir un impact sur les résultats de croissance cellulaire et les résultats expérimentaux globaux.

Tableau 4 : Composition du sérum

Constituent	Range of concentration ^a
Proteins and Polypeptides	40–80 mg/mL
Albumin	20–50 mg/mL
Fetuin ^b	10–20 mg/mL
Fibronectin	1–10 µg/mL
Globulins	1–15 mg/mL
Protease inhibitors: α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin	0.5–2.5 mg/mL
Transferrin	2–4 mg/mL
Growth factors:	
EGF, PDGF, IGF-I and -II, FGF, IL-1, IL-6	1–100 ng/mL
Amino acids	0.01–1.0 µM
Lipids	2–10 mg/mL
Cholesterol	10 µM
Fatty acids	0.1–1.0 µM
Linoleic acid	0.01–0.1 µM
Phospholipids	0.7–3.0 mg/mL
Carbohydrates	1.0–2.0 mg/mL
Glucose	0.6–1.2 mg/mL
Hexosamine ^c	6–1.2 mg/mL
Lactic acid ^d	0.5–2.0 mg/mL
Pyruvic acid	2–10 µg/mL
Polyamines:	
Putrescine, spermidine	0.1–1.0 µM
Urea	170–300 µg/mL
Inorganics:	0.14–0.16 M
Calcium	4–7 mM
Chlorides	100 µM
Iron	10–50 µM
Potassium	5–15 mM
Phosphate	2–5 mM
Selenium	0.01 µM
Sodium	135–155 mM
Zinc	0.1–1.0 µM
Hormones:	0.1–200 nM
Hydrocortisone	10–200 nM
Insulin	1–100 ng/mL
Triiodothyronine	20 nM
Thyroxine	100 nM
Vitamins:	10 ng–10 µg/mL
Vitamin A	10–100 ng/mL
Folate	5–20 ng/mL

3. Le risque à la contamination par divers agents pathogènes n'est pas exclu, notamment des virus, des champignons et des mycoplasmes, et constitue une préoccupation majeure dans les milieux à base de sérum.

4. Le sérum lui-même peut contenir des éléments cytotoxiques et des facteurs inhibiteurs susceptibles d'empêcher la prolifération et la croissance des cellules en culture.

5. L'inclusion de sérum dans les milieux de culture peut constituer un problème à l'isolation et à la purification efficaces des molécules à intérêts dans la culture (interférences) , ce qui peut nécessiter des procédures supplémentaires pour obtenir des produits de culture cellulaire.

- **La glutamine (Gln)**, un composant essentiel à la viabilité de presque toutes les cellules de mammifères dans un environnement de culture, joue le rôle de précurseur dans la biosynthèse des purines, des pyrimidines et de certains acides aminés. L'absence de glutamine peut entraîner

l'arrêt de la prolifération cellulaire en raison de la suppression de la réplication de l'ADN. En raison de sa sensibilité à la dégradation dans les solutions liquides, en particulier à des températures élevées (même à 4 °C), la glutamine doit être ajoutée fraîchement chaque fois que le milieu de culture est changé. Il existe une formule spécifique pour un milieu sans glutamine (w/o Gln), nécessitant son ajout à chaque fois.

La concentration de glutamine diminue de 50 % en 3 à 5 jours à une température de 37 °C.

La dégradation de la glutamine dégage de l'ammoniac NH_4OH , qui peut présenter des caractéristiques cyostatiques en entravant la croissance cellulaire jusqu'à 80 %, ou des propriétés cytotoxiques entraînant des problèmes de viabilité cellulaire.

- **Vitamines :** Les besoins en vitamines sont variables selon les types de cellules. ces vitamines jouent un rôle primordial en tant que cofacteurs enzymatiques ou précurseurs dans la biosynthèse de diverses molécules.

- **Antioxydants :**

Les antioxydants sont d'une importance capitale dans les cultures sans sérum, où ils sont essentiels pour neutraliser les effets nocifs des radicaux libres tels que les peroxydes qui sont produits pendant la croissance cellulaire. Dans des conditions sans sérum, des antioxydants tels que le mercaptoéthanol, le glutathion, les vitamines E et C sont couramment utilisés à cette fin.

- **Antibiotiques :**

Les antibiotiques sont utilisés pour éliminer complètement tous les contaminants microbiens présents dans les cultures. La sélection des antibiotiques est basée sur leur compatibilité avec les autres facteurs du milieu et n'interfère pas avec la viabilité et le métabolisme des cellules, ainsi que sur leur activité antibactérienne à large spectre. Généralement, deux groupes principaux d'antibiotiques, à savoir le système PS (pénicilline-streptomycine), sont utilisés pour prévenir la contamination bactérienne. La pénicilline cible les bactéries à Gram positif, tandis que la streptomycine est efficace contre les bactéries à Gram négatif. Cependant, un inconvénient du système PS est son instabilité dans les conditions de culture car sa dégradation se produit en un mois. Un autre système antibiotique, tel que la gentamicine, est préféré en raison qu'en utilisant un seul composé on a une efficacité supérieure contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives et qui reste stable dans les milieux de culture pendant de longues périodes.

4.2.2. Milieux synthétiques définis (sans sérum)

Compte tenu du défi que pose la reproductibilité inadéquate de certains résultats, les chercheurs se sont concentrés sur la mise au point de milieux sans sérum, enrichis d'éléments rigoureusement contrôlés connue sous l'appellation de milieux définis.

Ces paramètres impliquent l'ajout de divers constituants spécifiés à des quantités définies à un milieu de base synthétique. L'incorporation de ces éléments est adaptée aux besoins du type de cellule cultivé.

Les constituants introduits dans le milieu de base comprennent :

* **Hormones :**

GH, TSH, insuline, glucagon , cortisol, progestérogène , ACTH, adrénaline, ...

* **Facteurs de croissance :**

Les facteurs de croissance, principalement des polypeptides tels l'EGF (facteur de croissance épidermique) , FGF (facteur de croissance des fibroblastes) , FGF (facteur de croissance des fibroblastes) ,FGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) et différents interférons et interleukines, sont générés quantité suffisante par des méthodes de recombinaison génétique. Néanmoins, un milieu sans sérum contenant ces facteurs peut être très coûteux. Ce milieu est généralement utilisé à des fins de recherche plutôt que pour la production.

* **Facteurs d'attachement :**

Des facteurs d'attachement spécifiques(poly-L-lysine, collagène, fibronectine... etc.) incorporés au milieu de culture jouent un rôle en favorisant la différenciation des cellules cultivées

* **Protéines de transport :**

- L'albumine sérique bovine (BSA) sert de transporteur de substances lipophiles (acides gras, éléments- traces, hormones et vitamines liposolubles)
- La transferrine, joue un rôle dans le transport du fer et contribue également aux processus de détoxification.

✓ **Avantages des milieux de culture sans sérum**

1. Les milieux de culture sans sérum offrent une composition plus simple avec une définition améliorée.

2. Il est possible d'adapter ces milieux à des types de cellules spécifiques, ce qui permet de créer différents types de milieux qui peuvent passer d'un milieu favorisant la croissance à un milieu induisant la différenciation en ajustant les facteurs de croissance et les inducteurs.

3. La variabilité entre les lots est réduite, ce qui améliore l'uniformité de la reproduction des cultures.

4. Le traitement des produits issus de cultures cellulaires cultivées dans des milieux sans sérum est plus rationalisé.

5. Les risques de contamination microbienne (tels que les mycoplasmes, les virus et les prions) sont minimisés.

✓ **Inconvénients des milieux de culture sans sérum**

1. Le taux de croissance et la densité de saturation obtenus avec les milieux sans sérum sont généralement inférieurs à ceux des milieux contenant du sérum.

2. L'augmentation du coût est un inconvénient des milieux sans sérum en raison des dépenses importantes associées à l'incorporation d'hormones et de facteurs de croissance.

3. Différentes formulations de milieux sont essentielles pour divers types de cellules en fonction de leurs besoins spécifiques.

4. Il est essentiel de maintenir un contrôle précis du pH et de la température, ainsi que de garantir la plus grande pureté des réactifs et de l'eau, pour les milieux sans sérum par rapport à ceux contenant du sérum.

5. Conditions et pratique de cultures cellulaire

5.1. Conditions générales de la culture.

- **Température**

Dans la culture des cellules animales la température est maintenue à 37 °C dans un incubateur qui un appareil de type étuve. La température doit être vérifiée régulièrement si la température augmente, la croissance cellulaire ralentit puis on assiste à une mort cellulaire ; si la température diminue, la croissance cellulaire ralentit, mais les cellules restent viables.

- **Atmosphère :**

Gaz CO₂ : En général, on utilise une pression de CO₂ (pression partielle pCO₂ = 5-15 %, exprimée en % de pression totale).

- **Hygrométrie (L'humidité) :** l'air doit être humide (85 %), ceci est particulièrement important car à une température de 37 °C, l'environnement a tendance à être extrêmement sec. Par conséquent, le processus d'évaporation dans le milieu se produit, entraînant l'accumulation de sels et engendre la plasmolyse des cellules. Le taux d'humidité requis est apporté par le bac d'humidification situé dans le bas de l'incubateur. Les ouvertures fréquentes entraînent une perte d'humidité. Le niveau d'eau dans le réservoir d'humidification doit être fréquemment contrôlé.

- **Équilibre acido-basique (pH) :**

Le maintien d'un pH relativement constant est réalisé par le système tampon. Le système tampon carbonate-bicarbonate joue un rôle crucial dans l'atteinte de l'équilibre acido-basique dans les cellules en présence de CO₂. Le système permet la conversion du CO₂ en ions bicarbonate et en protons, acidifiant ainsi le milieu environnant selon la réaction :



Le volume prédéterminé de CO₂ (5 %) se dissout dans le milieu de culture tamponné au bicarbonate et la réaction se déplace vers la production de protons, ce qui entraîne une diminution progressive du pH pour atteindre l'équilibre (pH 7,2 à 7,4) empêchant ainsi une alcalinisation spontanée qui peut nuire à la viabilité cellulaire.

Le milieu de culture est complété par un indicateur coloré vital, le rouge phénol, qui confère

une couleur rose dans des conditions de pH normales. Une couleur rouge ou violet indique un environnement basique probablement dû à une contamination fongique, tandis qu'une couleur jaune signifie une acidité, indiquant une contamination bactérienne potentielle ou la mort cellulaire.

5.2. Matériels et équipements :

Pour mener des recherches nécessitant des travaux de culture cellulaire et pour exécuter des protocoles fondamentaux de culture cellulaire, plusieurs équipements clés et certains réactifs de base sont nécessaires.

- **Poste de Sécurité microbologique II (PSM II) Hotte à flux laminaire :**

Une hotte à flux laminaire verticale est le meilleur moyen de travailler stérilement. En préservant la surface de travail de l'introduction de tout micro-organisme ou autre contaminant porté par l'air, un flux d'air vertical continu et filtré assure la stérilité des manipulations sur les cellules en culture. Les filets d'air filtrés doivent s'écouler en filets rectilignes, parallèles et verticaux de même vitesse et sens, afin d'obtenir une laminarité. En conséquence, un apport d'air filtré est fourni au plan de travail et le flux laminaire forme un bouclier qui empêche les particules extérieures d'entrer dans l'enceinte. En conséquence, le travail se déroule sous une hotte de type II, également connue sous le nom de Poste de Sécurité microbologique II (PSM II), où la manipulation, le produit et l'environnement sont complètement protégés. Après passage par un filtre HEPA (High-Efficiency Particulate Air) sur le haut de la hotte, le flux d'air est repris par la base du panneau arrière pour recyclage (70%) et évacuation (30%).

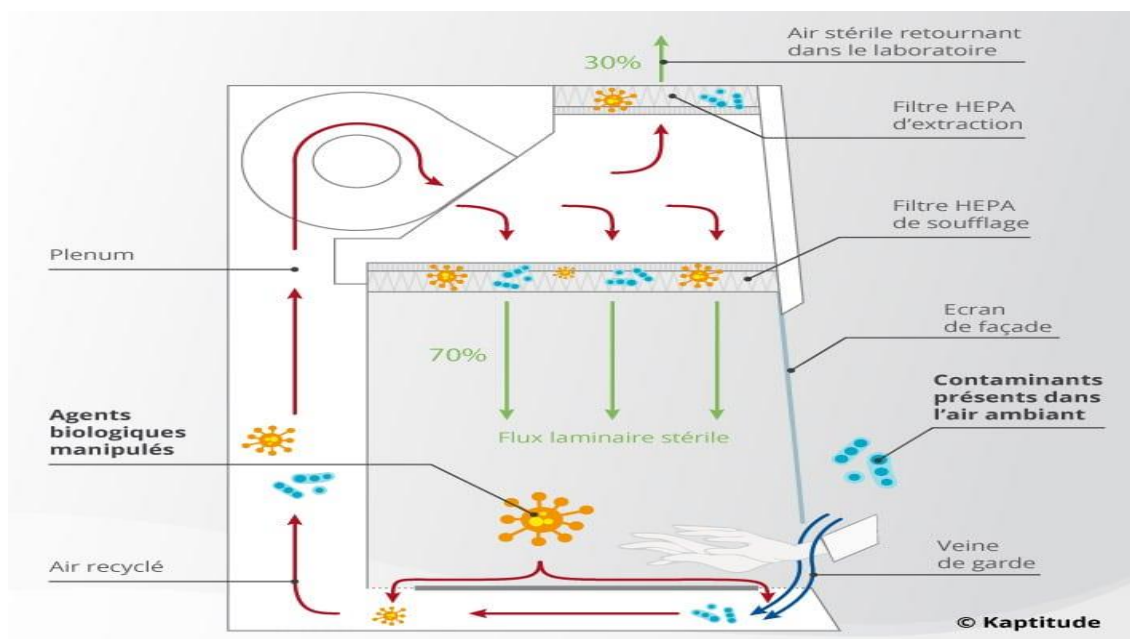


Figure 16 : principe de conception de hotte à flux laminaire verticale PSM II.

- **Contenants ou supports :** (flacons, boîtes, plaques multipuits, tubes...)

Les flacons en plastique sont disponibles avec une gamme de zones de culture, une variété de formes et plusieurs modèles de col différents. Le choix de la conception dépend des techniques de culture cellulaire utilisées ainsi que des préférences personnelles.



Culture vessel	Replicates	mL	cm ² *	Approximate cell yield (HeLa)
Multiwell plates				
Microtitration	96	0.1	0.3	1×10^5
Microtitration	144	0.1	0.3	1×10^5
4-well plate	4	2	2	5×10^5
6-well plate	6	2	10	2×10^6
12-well plate	12	1	3	7.5×10^5
24-well plate	24	1	2	5×10^5
Petri dishes				
3.5-cm diameter	1	2	8	2×10^6
5-cm diameter	1	4	17.5	4×10^6
6-cm diameter	1	5	21	5×10^6
9-cm diameter	1	10	49	1×10^7
Flasks				
10 cm ² (T10)	1	2	10	2×10^6
25 cm ² (T25)	1	5	25	5×10^6
75 cm ² (T75)	1	25	75	2×10^7
175 cm ² (T175)	1	75	175	5×10^7
225 cm ² (T225)	1	100	225	6×10^7
Roller bottle	1	200	850	2.5×10^8
Stirrer bottles				
500 mL (unsparged)	1	50		5×10^7
5000 mL (sparged)	1	4000		4×10^9

- **Incubateurs**

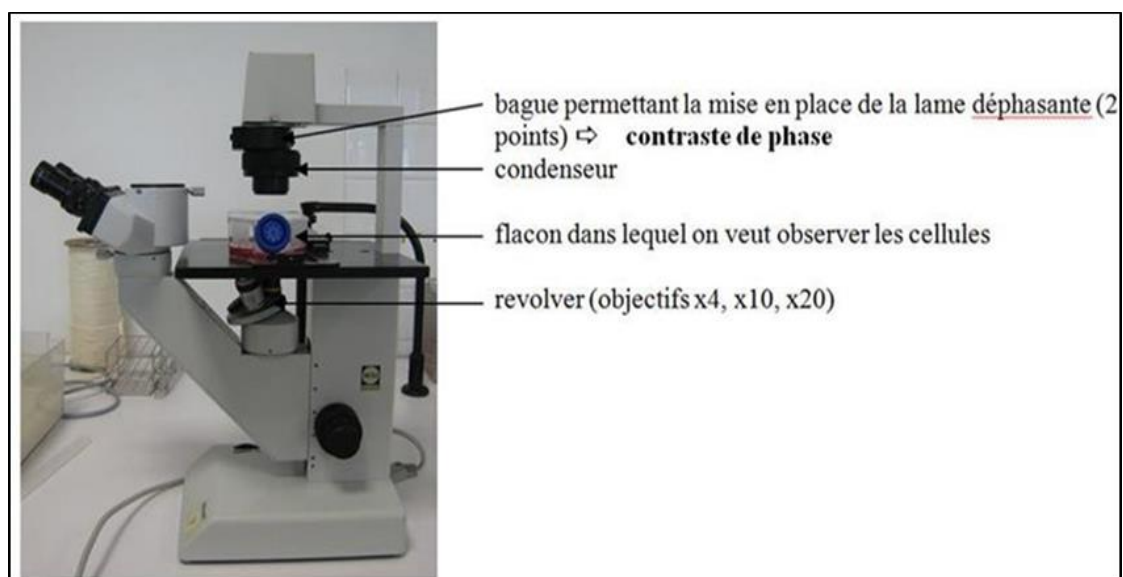
Il s'agit d'incubateurs à CO₂ dans lesquelles sont contrôlés également le cycle de température et d'illumination.

L'objectif de l'incubateur est de fournir un environnement approprié pour la croissance cellulaire. Construit d'acier inoxydable permet un nettoyage facile et offre une protection contre la corrosion, par l'air humide nécessaire pour l'incubation. Un nettoyage fréquent de l'incubateur est essentiel pour éviter la contamination de cultures de cellules.

Il ya deux Types d'incubateurs : incubateurs secs et les incubateurs à CO₂ humides.



- **Microscope inversé**



- **Centrifugeuses**



- **Réfrigérateurs (4° à 6°). Congélateurs (- 20°- 80°),**



- **Bains-marie**



- **Aspirateur de liquide**



- **Autres équipements :**

Pipettes jetables. Micropipettes. Pipeteur



6. Entretien des lignées cellulaires

1. Cinétique de la croissance d'une lignée cellulaire

Avant d'entamer toute procédure expérimentale, la compréhension et la documentation des caractéristiques de croissance de la lignée cellulaire sont essentielles. Une altération de la croissance cellulaire peut indiquer un problème important au sein de la lignée cellulaire qui, s'il n'est pas pris en compte, pourrait avoir un impact négatif sur les résultats des expériences. Les cellules en culture présentent généralement un modèle de prolifération sigmoïde avec une courbe de croissance typique. Les cellules normales traversent les phases suivantes de croissance :

1.2. La phase de latence : Les cellules ne se divisent pas pendant la phase de latence. La durée pendant laquelle les cellules peuvent s'acclimater aux conditions de culture varie selon la phase de croissance de la lignée cellulaire au moment de la sous-culture et la densité d'ensemencement. Le nombre de cellules reste inchangé, bien que la masse et le volume des cellules augmentent légèrement. Un faible volume d'inoculum et un mauvais état de l'inoculum peuvent être des signes d'une phase de latence prolongée.

1.3. La phase exponentielle ou phase de croissance logarithmique (Log) : Au cours de cette phase, les cellules prolifèrent activement, ce qui entraîne une augmentation exponentielle de la densité cellulaire. L'évaluation de la fonction cellulaire à ce stade est importante car c'est la période où la population cellulaire est la plus forte. la phase logarithmique est la période idéale pour déterminer le temps de doublement de la population car différentes lignées cellulaires ont des cinétiques de prolifération différentes.

1.4. La phase stationnaire (ou phase de plateau) : se caractérise par un ralentissement de la prolifération cellulaire provoqué par la confluence de la population cellulaire. À ce moment-là, le nombre de cellules dans le cycle cellulaire actif diminue de 0 à 10 % et les cellules sont les plus vulnérables aux lésions.

1.5. La phase de déclin : est caractérisée par une prédominance de la mort cellulaire et une diminution du nombre de cellules viables. le milieu devient toxique par accumulation des déchets et avec peu d'éléments nutritifs (carences). Mais la diminution des nutriments n'est pas responsable de la mort cellulaire, mais plutôt du déroulement naturel du cycle cellulaire.

Dans la dernière phase est la poursuite de la croissance cellulaire (repiquage) ou mort

cellulaire.

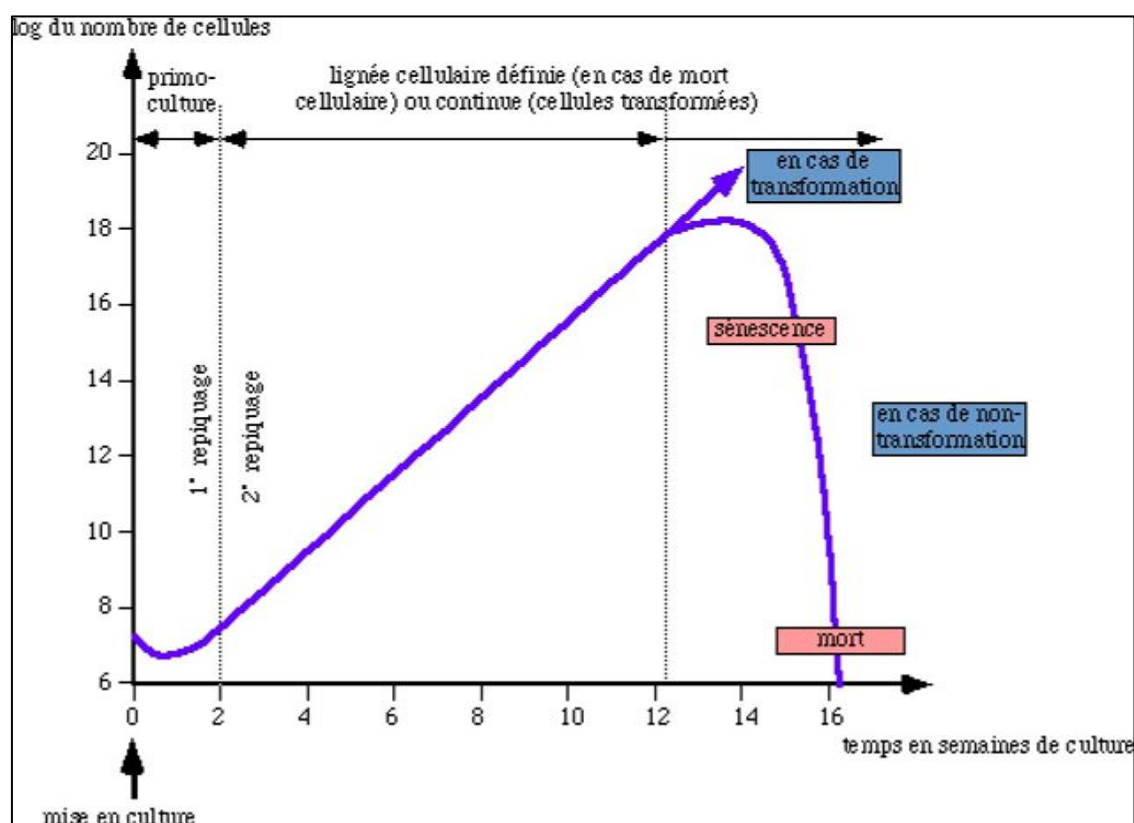


Figure 17 : courbe de croissance de lignée cellulaire.

6.2. Entretien des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires adhérentes prolifèrent *in vitro* jusqu'à occuper complètement la surface du récipient de culture. La prolifération cellulaire entraîne l'utilisation de nutriments, ainsi que l'accumulation de sous-produits du métabolisme qui contribuent à l'acidification de l'environnement et peuvent déclencher l'apoptose cellulaire. De plus, l'augmentation de la « densité » cellulaire entraîne l'arrêt de la prolifération et, en fin de compte, la mort cellulaire. Les marqueurs de cette affection incluent la déviation de la couleur du milieu vers le jaune (indiquée par les niveaux de pH) et les changements morphologiques des cellules (telles que l'arrondissement, le détachement, etc.). Ces observations qui se produisent dans les phases de plateau et de déclin de la courbe de croissance on peut les éviter si on procède au changement de l'ancien milieu par un milieu neuf, ou en fait un passage la culture (subculture). Ces opérations sont effectuées sous hotte à flux laminaire dans le strict respect des principes des bonnes pratiques en culture celulaire.

6.2.1. Examen macroscopique et microscopique des cultures :

Ce contrôle est réalisé au début de chaque passage en évaluant l'état des cellules en culture. Avant toute manipulation, il faut examiner visuellement les cultures à l'œil nu et au microscope inversé. Chaque lignée cellulaire présente des propriétés distincts en ce qui concerne sa prolifération et son aspect au cours de la culture. De nombreuses lignées cellulaires prolifèrent sous la forme d'une seule couche connectée les unes aux autres et au support de culture . Autres catégories de cellules sont présentes sous forme de cellules individuelles ou de groupes de cellules en suspension dans le milieu.

Examen macroscopique

Le milieu dans un flacon de culture est analysé visuellement afin de trouver des indices macroscopiques pouvant suggérer des signes de contamination microbienne. Cela comprend notamment des variations de pH inhabituelles (devenant jaune ou violet par rapport au rouge de phénol), une turbidité ou des particules. Il s'agit aussi de petites colonies fongiques qui se trouvent à l'interface milieu-air.

Examen microscopique

Il est nécessaire de surveiller quotidiennement les cellules au microscope afin de garantir qu'elles sont saines et qu'elles se développent conformément aux attentes.

Il est essentiel de procéder à l'examen à l'aide d'un microscope inversé à faible puissance (40×) afin d'obtenir une vision globale de la monocouche en culture et de vérifier que le tapis cellulaire est homogène et confluent (figure 18). Le microscope permet également d'observer l'aspect morphologique des cellules pour différencier les cellules mortes des cellules vivantes. La majorité des cellules qui s'adhèrent doivent être solidement fixées au fond du flacon, être allongées et réfléchir la lumière autour de leur couche. Il est nécessaire que la majorité des cellules adhérentes soient solidement fixées au fond du flacon, allongées et réfléchissent la lumière autour de leur membrane. Les cellules saines peuvent parfois s'arrondir et se détacher, ce qui peut être un signe de mitose, surtout si elles sont très réfringentes ou brillantes. Les cellules mortes, en revanche, s'arrondissent, se détachent du support et ont souvent des vacuolisations, sont plus petites et plus sombres (ne sont pas aussi lumineuses que les cellules saines).

L'observation microscopique permet aussi de détecter des indicateurs potentiels de contamination, tels que la présence de bactéries, de levures et de champignons. La contamination bactérienne se manifeste par de minuscules points noirs brillants dans les espaces intercellulaires. Les levures apparaissent sous forme de particules rondes ou en forme de

bourgeons, tandis que les champignons présentent un mycélium filamenteux mince.

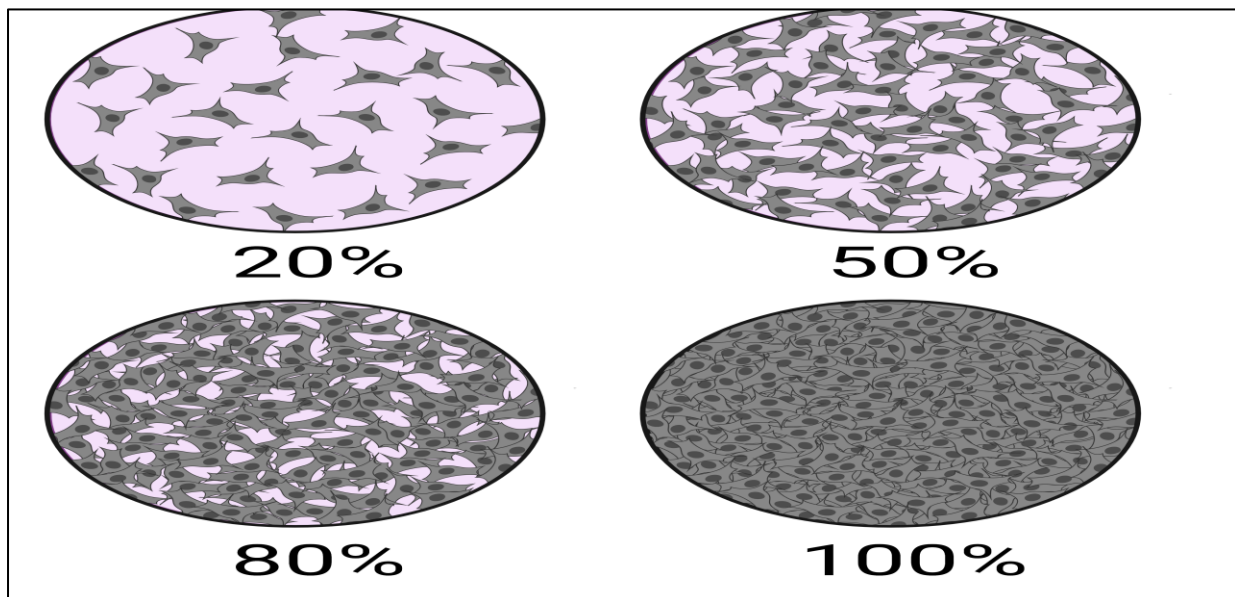


Figure 18: Etats de confluence estimés par pourcentage.

6.2.2. Changement de milieu

En cas où les cellules adhérentes ont montré une prolifération satisfaisante depuis quelques jours, mais qui ne sont pas encore confluentes, il sera nécessaire de changer l'ancien milieu appauvri pour reconstituer les nutriments et maintenir un pH adéquat afin de poursuivre leur multiplication. Si de nombreuses cellules sont en suspension (comme dans le cas des lignées cellulaires attachées) ou si le milieu commence à devenir orange plutôt que rose-orange, il est nécessaire de le changer dès que possible. Afin de changer le milieu de culture, il est nécessaire de le réchauffer à une température de 37°C dans un bain-marie ou un incubateur pendant au moins 30 minutes. Il est recommandé de verser avec précaution l'ancien milieu de culture du flacon dans un pot de récupération contenant un désinfectant. Immédiatement, remplacer l'ancien milieu par le même volume de milieu de culture frais préchauffé et le déposer dans l'incubateur à CO₂ à une température de 37°C

Préparation du milieu de culture

Avant de débiter la culture, il est nécessaire de vérifier les informations fournies avec la lignée cellulaire afin de préparer le type de milieu de culture, les additifs et les recommandations à suivre. La majorité des lignées cellulaires sont cultivables dans un milieu de culture DMEM ou RPMI contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de glutamine et des antibiotiques. Il est nécessaire d'utiliser des milieux de culture et des suppléments stériles et de les utiliser

uniquement dans des conditions aseptiques dans une hotte de culture

6.2.3. Repiquage ou passage

Cette fois, il s'agit de changer à la fois le milieu de culture et le récipient. Lorsqu'elles atteignent une confluence d'environ 80 %, les cellules entrent dans la phase de croissance logarithmique, ce qui nécessite leur transfert dans un nouveau contenant c'est à dire procéder à un **repiquage ou passage** afin de redistribuer les cellules en les diluant dans plusieurs nouveaux flacons pour que la croissance continue. la période à laquelle il faut répiquer dépend du type de cellule et la vitesse de croissance .

Les étapes qui doivent être suivies sont les suivantes :

Etape de préparation du passage

- Mettre en marche la hotte de sécurité biologique et effectuer un nettoyage de base avec de l'éthanol 70%.
- Stérilisez tous les contenants pour milieux de culture, pipettes et tubes avec de l'éthanol avant de les introduire et les mettre de façon organisé dans la hotte.
- Retirer le milieu de culture et le réactif de dissociation (ex : trypsine EDTA) du réfrigérateur et les chauffer préalablement soit en les immergeant dans un bain-marie réglé à 37 °C, soit en les laissant à la température ambiante (25 °C).

Etape de l'élimination de l'ancien milieu et lavage au PBS :

- Sous la hotte et à l'aide de la pipette-aid retirer l'ancien milieu par aspiration sur le bord du flacon incliné.
- Introduire délicatement le PBS (Phosphate Buffred Saline) sur le côté du flacon pour lavage de la monocouche de cellules en submergeant la surface de la monocouche afin d'éliminer les traces de l'ancien milieu qui contient le sérum (inhibiteur de la trypsine).

Etape de trypsinisation et détachement des cellules :

- Après avoir retiré le PBS détachez les cellules par trypsination:

Il est recommandé d'ajouter une quantité adéquate de réactif de dissociation trypsine-EDTA préchauffé pour recouvrir les cellules à la base du flacon. La trypsine a pour fonction de perturber les molécules d'adhésion responsables de la liaison des cellules au substrat, facilitée par la présence d'EDTA qui séquestre les cations divalents essentiels aux intégrines. Assurez un contact parfait de la trypsine avec toutes les cellules en faisant rouler doucement le flacon. Ensuite, incubé le flacon pendant environ 2 à 3 minutes dans l'incubateur, bien que les temps d'incubation puissent varier en fonction de la lignée cellulaire. Inspectez régulièrement le flacon et tapotez-le légèrement pour garantir le détachement

complet de toutes les cellules de la surface du flacon. Il est impératif de surveiller les cellules à de courts intervalles pour éviter une surexposition à la trypsine, car une trypsinisation excessive pourrait entraîner de graves dommages cellulaires.

Etape d'adjonction du milieu complet et remise en suspension

- le réactif de dissociation est neutralisé avec ajout de milieu complet contenant du sérum SVF qui contient de l'antitrypsine qui arrête l'action de la trypsine.
- la suspension cellulaire est transférée dans un tube à centrifuger pour la faire centrifuger pendant 5 minutes à 1500 tours/minute, à température ambiante.
- Après centrifugation on élimine le surnageant puis on remet le culot cellulaire en suspension dans un milieu stérile jusqu'à obtention d'un volume adéquat pour le comptage.

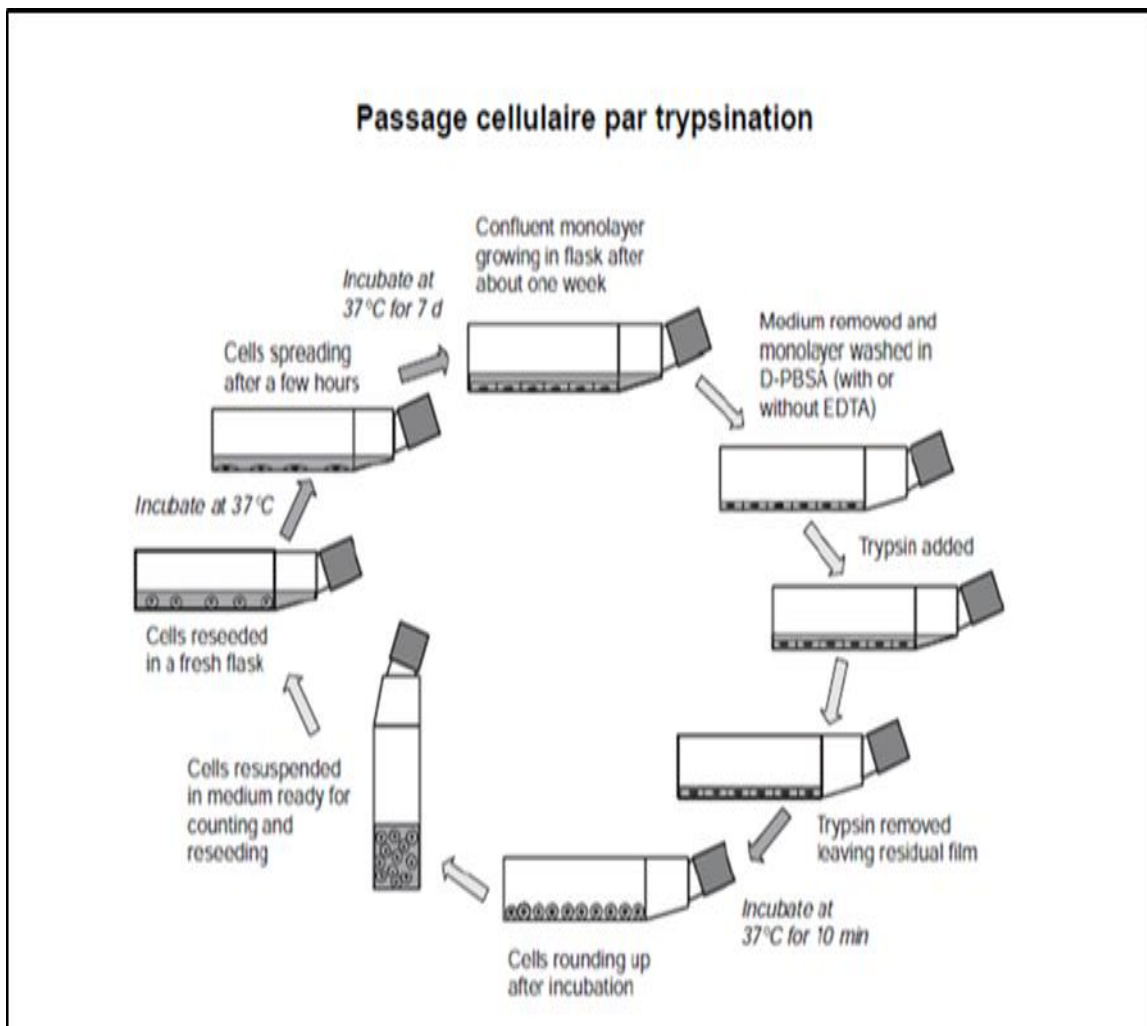


Figure 19 : Etapes de passage cellulaire par trypsinisation

Etape de comptage cellulaire et test de viabilité cellulaire

Comptage cellulaire

Afin de déterminer la concentration cellulaire et de diluer correctement la culture et compter les cellules à la cellule Malassez.

Le comptage des cellules est également utile pour évaluer les taux de croissance. Étant donné que les cellules sont souvent cultivées par millions, le nombre de cellules est d'abord compté dans un petit volume, puis extrapolé au volume cellulaire complet.

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de **cellules par millilitre**.

On effectue directement la numération cellulaire en utilisant un hémocytomètre, une cellule de comptage, comme la cellule de Malassez ou d'autres cellules. On peut observer 100 rectangles gravés sur la lame de Malassez. Le volume total correspondant au quadrillage est de 1 mm³, c'est-à-dire 1 µl.

Réalisation du comptage :

- Compter le nombre de cellules dans tous les rectangles. Pour les cellules qui chevauchent 2 rectangles, ne les compter qu'une fois : en pratique, compter les cellules qui chevauchent la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite.
- faire la moyenne du nombre de cellules par rectangle

Test de viabilité cellulaire

Les cellules peuvent mourir au cours du processus de culture, de manipulation et de passage. il est important de faire la distinction entre les cellules vivantes et les cellules mortes lorsque l'on a besoin d'une concentration spécifique de cellules vivantes pour démarrer une culture ou que l'on a besoin d'un nombre déterminé de cellules vivantes pour un essai.

Dans une dilution 1:1 avec 0,4 % de trypan bleu, un petit volume de la suspension cellulaire est mélangé dans un tube Eppendorf. Le colorant bleu de Trypan ne pénètre que dans les cellules non viables (mortes) qui ne peuvent donc pas l'expulser à l'extérieur, ce qui permet d'éliminer les cellules non viables de la quantification .

En utilisant un microscope inversé, de contraste de phase et un grossissement d'au moins 10X, toutes les cellules situées dans les quatre carrés extérieurs sont comptées. Pour déterminer le nombre total de cellules viables, le nombre de cellules trouvées dans les quatre carrés est divisé par 4 (pour déterminer le nombre moyen de cellules dans 1 mm²), multiplié par 10⁴ (pour obtenir le nombre de cellules par ml), multiplié par 2 (pour tenir compte du facteur de dilution du bleu Trypan) et multiplié par le volume initial du milieu de la suspension cellulaire. Le pourcentage de cellules viables peut être déterminé en divisant le

nombre de cellules non colorées par le nombre total de cellules et en multipliant le ratio par 100. Une culture cellulaire saine se caractérise par une viabilité cellulaire de 80 à 95 %.

Etape de réensemencement dans de nouveaux flacons

- En fonction des résultats de comptage et de viabilité, pipeter le volume nécessaire de cellules dans de nouveaux flacons en respectant le rapport de division requis. Ces flacons doivent ensuite être remplis de milieu de culture au volume nécessaire. Par exemple, un flacon de T 25 cm² contient environ 5-10 ml, un flacon de T 75 cm² contient environ 10-30 ml et un flacon de T 175 cm² contient environ 40-150 ml.
- Les flacons de culture doivent être étiquetés avec toutes les informations nécessaires, telles que la ligne cellulaire, le numéro de passage, la date, etc.
- Les nouveaux flacons doivent être placés dans un incubateur humidifié à l'air à 37°C et 5% de CO₂.

.

7. Conservation des lignées cellulaires

1. Principe

La cryoconservation consiste à la congélation des cellules à une température extrêmement basse (en azote liquide, à -196°C). Elle permet de créer un stock de cellules et de le maintenir en vie pendant de nombreuses années sans altérer les caractéristiques originelles des cellules. L'azote liquide est fréquemment utilisé pour la conservation des cellules en culture tissulaire, que ce soit en phase liquide à -196°C ou en phase vapeur à -156°C . L'impact néfaste de la congélation sur les cellules est principalement attribué aux dommages causés par les cristaux de glace, aux modifications de la concentration en électrolytes, à la déshydratation et aux fluctuations du pH.

2. Objectifs

Les objectifs de la cryoconservation des lignées cellulaires sont :

- Garantir l'approvisionnement en cellules primaires ou en lignées transformées, en créant une réserve de secours (back-up) en cas de perte, en particulier en cas de contamination microbiologique de la culture.
- Il est possible de réduire les changements génétiques qui peuvent survenir au sein d'une lignée en utilisant des cellules de passage précoce lorsque les cultures en cours ont été maintenues pendant une période prolongée.
- il est possible de standardiser les lignées utilisées d'un laboratoire à l'autre en utilisant des banques cellulaires primaires et secondaires.

3. Méthodologie

❖ La congélation :

Au cours de la congélation, les cellules sont mises dans un milieu approprié afin de préserver leur viabilité pendant le processus de congélation qui doit être progressif. On utilise pour cela des cryotubes en plastique spécial, qui résistent à cette température. Il est donc essentiel que les cellules soient congelées en présence d'un agent cryoprotecteur afin d'éviter la formation de dommages intracellulaires pendant la congélation.

Le système de cryoconservation est généralement composé d'un milieu de culture supplémenté avec :

- Un agent cryoprotecteur, qui est indispensable pour prévenir le stress cellulaire pendant la

congélation-décongélation tels l'éthylène glycol , le glycérol ou le dimethylsulfoxyde (DMSO) . Ce dernier est le plus couramment utilisé car il favorise une meilleure conservation des cellules que les autres molécules.

- Des protéines ; Dans la plupart des cas, il s'agit du sérum de veau fœtal. il est possible de compléter le milieu de culture avec du sérum humain ou de l'albumine humaine, ou des milieux conditionnés sans sérum.

Exemple de Composition: Deux types de solution de congélation peuvent être utilisés :

- soit 90 % SVF + 10 % DMSO
- soit 70 % milieu de culture + 20 % SVF + 5-10% DMSO

Il est conseillé d'utiliser des cellules robustes en phase de croissance logarithmique et de rafraîchir le milieu 24 heures avant la congélation.

Il faut répartir la suspension dans des cryotubes à raison d'1 ml / tube et déposer ceux-ci dans une boîte à congélation qui contient de l'isopropanol (permettant l'abaissement progressif de la température des cellules).

-, puis transférer ceux-ci en azote liquide

La congélation se fait en général en deux étapes :

- *Congélation progressive* : placer la boîte contenant les cryotubes dans un congélateur afin de passer les cellules de la température ambiante à -80 °C ($\pm 5\text{ °C}$) pendant 24 à 48 h qui permettent l'expulsion de l'eau des cellules avant la cryoconservation. La vitesse de refroidissement optimale se situe dans la plage de 1 à 3 °C par minute
- *Congélation rapide* après immersion des cryotubes dans l'azote liquide (-196 °C).

❖ La décongélation

Pour améliorer la récupération des cellules après la décongélation, un réchauffement rapide des cellules est recommandé afin de limiter des altérations dues à la déshydratation ainsi qu'à la toxicité du DMSO . Ce réchauffement rapide se fait en transférant le tube directement de la source d'azote liquide dans un bain-marie à 37 °C sous agitation douce.

Après la décongélation complète des cristaux de glace, les cellules sont rapidement diluées dans un milieu préchauffé. Le milieu doit être changé après 24 heures de mise en culture afin d'éliminer l'agent cryoprotecteur qui, à $+37\text{°C}$, est toxique pour les cultures cellulaires

Les contrôles de routine des cultures sont impératifs, en mettant l'accent sur la morphologie, l'aspect moyen et la densité cellulaire.

Références

- Abcam** : mammalian-cell-tissue-culture-techniques-protocol. *Abcam Manuals*.
<https://docs.abcam.com/pdf/protocols/mammalian-cell-tissue-culture-techniques-protocol.pdf>
- American Type Culture Collection (ATCC)**. 2024. Animal Cell Culture Guide.
<https://www.atcc.org/-/media/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide.pdf?rev=2bf8cf002d494f39adc3c138108ed795&hash=BF15948C0D3E8CEF042C6E3E66AFF66C>
- Bleloch J** .2022 .Cell Culture Basics: Equipment, Fundamentals and Protocols.Technology Networks
- Bonnomet A., Terryn C, Cutrona J, Jonquet A, Birembaut P, and Zahm J.-M.**.2012 Analysis of Cell Dispersion and Migration by Video-Microscopy .Methods in Enzymology, Vol 505. Elsevier.
- Braye, F., & Damour, O. (2010)**. Cultures cellulaires. In *Les brûlures* (First Edition). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/b978-2-294-70151-1.50020-2>.
- Cézard, F.** (2019). *Biotechnologies BTS*. Biotechnologies - BTS - 3e éd .Dunod.
- Davis JM**. 1996. Basic Cell Culture. New York (NY): Oxford University Press
- Davis, JM**, 2011 .Animal Cell Culture: Essential Methods. John Wiley & Sons.
- Dieter F. Hülser** . Animal_Cell_Culture. methods in animal cell culture.
- Doyle A, Griffiths JB**. 1997. Mammalian Cell Culture. West Sussex (UK): John Wiley and Sons.
- European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)**. Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook-2nd Edition. sigma-aldrich
- Freshney RI** 2005.. Culture of Animal Cells. John Wiley & Sons, Inc.; doi:10.1002/0471747599.cac012
- Freshney RI**. 1992. Animal Cell Culture: A Practical Approach. New York (NY): Oxford University Press .
- Freshney RI**. 2010 : Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. Wiley-Blackwell.
- Mani, S., Singhs, M., & Kumar, A. (2023)**. *Animal cell culture : Principles and applications*.Springer.
- Masters, J. R. (2000)**. *Animal Cell Culture: Practical approach*. 302.

Oyeleye O. O., Ogundeji S. T, Ola S. I. and Omitogun O. G. 2016. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science Biotechnology and Molecular Biology Reviews Vol. 11(2), pp. 6-16, DOI: 10.5897/BMBR2016.0261.

Pérard-viret, J., Quteishat, L., & Alsalim, R. (2020). *Cell Culutre: Growing Cells as Model Systems In Vitro. January*, 94–95.

Phelan, K., & May, K. M. (2016). Mammalian cell tissue culture techniques. *Current Protocols in Pharmacology*, 2016, 12.1.1-12.1.23. <https://doi.org/10.1002/cpph.1>.

Places, G., Hierholzer, J. C., & Killington, R. A. (1996). Cell Culture Cell Culture. *Virology Methods Manual*, 76(1), 2–6. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00048-5>.

Pollard, J. W., & Walker, J. M. (1990). Animal Cell Culture. *Animal Cell Culture*. <https://doi.org/10.1385/0896031500>.

Quinn, B. (2014). Preparation and Maintenance of Live Tissues and Primary Cultures for Toxicity Studies. In *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411604-7.00003-9>

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

Ryan J.A. (2007). Les bonnes pratiques de culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Corning.

Segeritz C-P. and Vallier L. (2017). Chapter-9 Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. in *Basic Science Methods for Clinical Researchers Elsevier..* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>

Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>

Sigma Aldrich (2016). Fundamental techniques in cell culture. Laboratory Handbook .3rd Ed. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf

Thermofisher(2020). Cell Culture Basics Handbook .

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

Verma A. (2013) .Animal Tissue Culture: Principles and Applications. Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation. Elsevier.

Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. In *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>