

II. La culture cellulaire

Ces dernières décennies, des découvertes fondamentales relatives à la biologie des organismes eucaryotes ont pu être réalisées grâce aux techniques de culture cellulaire. La **culture cellulaire** est devenue un des outils majeurs utilisés aujourd'hui dans les sciences de la vie.

II.1 Que signifie culture de cellules et de tissus?

Culture de tissus est le terme général englobant le prélèvement de cellules, tissus ou organes d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance. Cet environnement est généralement constitué de récipients de cultures appropriés en verre ou en plastique contenant un milieu liquide ou semi-solide qui apporte les nutriments essentiels à la survie et à la croissance.

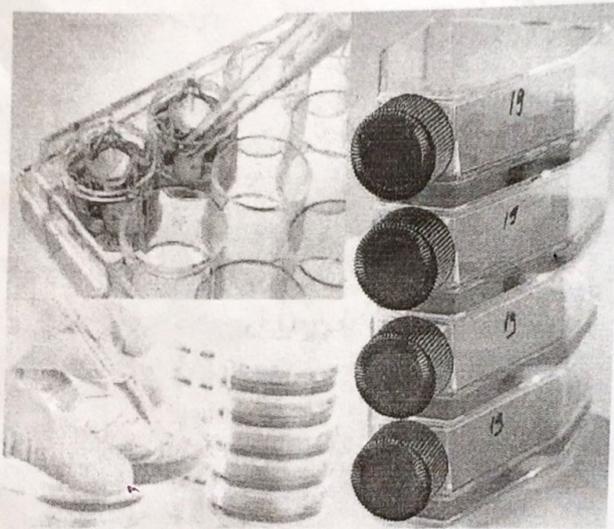


Fig 4 : milieux de cultures cellulaires.

La culture d'organes entiers ou de fragments d'organes intacts dans l'intention d'étudier leur fonctionnement ou leur développement prolongés est appelée Culture d'organe. Lorsque les cellules sont retirées des fragments d'organe avant, ou pendant la culture, interrompant ainsi leurs relations normales avec les cellules voisines, on appelle cela Culture de cellules. On appelle **culture cellulaire**, le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capable de se diviser *in vitro* et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques.

En biologie, la **culture cellulaire** désigne un ensemble de techniques utilisées pour faire croître des cellules en dehors de leur organisme (*ex vivo*) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation *in vitro*.

On appelle **culture d'organe**, le maintien en dehors de l'organisme, d'organes ayant conservé leur structure et leur fonction (cœur perfusé).

La culture *in vitro* ou **culture de tissus** se définit comme l'ensemble des techniques qui permettent de faire croître en milieu artificiel des cellules spécialisées, par exemple des cellules animales comme la peau humaine ou des cellules végétales, ce qui représente une grande variété de tissus.

a' dojectif :

La culture des cellules animales en dehors de l'organisme permet l'observation des cellules vivantes dans des conditions favorables. De plus, une culture cellulaire représente un système expérimental beaucoup plus simple qu'un animal entier et elle fournit un système qui peut être étudié dans des conditions soigneusement contrôlées.

Avantages

Donc la culture cellulaire possède de nombreux avantages : Elle fournit une source continue et homogène de cellules utilisables aussi bien en biochimie, que dans le domaine médical et dans celui de la santé. Les cellules en culture, à l'inverse des cellules *in vivo* peuvent être manipulées très facilement. Les cultures cellulaires peuvent être congelées pour une utilisation ultérieure sans que cela affecte leur potentiel multiplicatif (tout en gardant leur potentiel de division) ou leur patrimoine génétique. L'utilisation des cultures cellulaires, en limitant celle des animaux de laboratoire, permet de minimiser le coût des expérimentations, et de limiter en nombre le sacrifice des animaux de laboratoire.

a' Utilisation :

II.2 À quoi servent les cultures de cellules?

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

a) Systèmes de modèles

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

- 1) la biologie et la biochimie cellulaires de base,
- 2) les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies,
- 3) les effets des médicaments sur les cellules,
- 4) le processus et le déclenchement du vieillissement et
- 5) les études nutritionnelles.

b) Tests de toxicité

Les cellules en culture sont largement utilisées seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux pour étudier les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la

survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules. Les cultures de cellules dérivées du foie et des reins sont particulièrement importantes.

c) Recherche sur le cancer

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

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

d) Virologie

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

e) La cellule comme usine de production

Alors que les cellules cultivées peuvent être utilisées pour produire de nombreux produits importants, trois domaines se sont montrés plus intéressants. Le premier est la production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de vaccins. Ceci comprend les vaccins contre la polio, la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole. Le deuxième est la production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des protéines présentant une valeur médicale ou commerciale. Ceci inclut les anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc. Le troisième est l'utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes. La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce.

Toutefois, des tests sont en cours sur des organes artificiels comme le pancréas, le foie et les reins. Une réserve potentielle de cellules et tissus de remplacement peut ressortir de travaux en cours réalisés avec des cellules souches adultes et embryonnaires. Ce sont des cellules qui ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Apprendre à contrôler le développement de ces cellules représente un espoir pour de nouvelles approches de traitements pour une large variété de pathologies.

f) Thérapie génique

La capacité de modifier génétiquement des cellules a également conduit à leur utilisation en thérapie génique. Les cellules peuvent être prélevées sur un patient souffrant d'une déficience dans un gène fonctionnel, et le gène manquant (ou endommagé) peut alors être remplacé. Les cellules sont cultivées un moment puis réimplantées dans le patient. Une approche alternative consiste à placer le gène manquant dans un vecteur viral puis "d'infecter" le patient par le virus en espérant que le gène manquant sera exprimé dans les cellules du patient.

g) Découverte de médicaments

L'importance des tests basés sur des cellules a considérablement augmenté dans l'industrie pharmaceutique, pas seulement pour les tests de cytotoxicité, mais également pour le criblage à haut débit (HTS) de composés pouvant présenter une utilité potentielle comme médicament. À l'origine, ces tests de culture cellulaire étaient réalisés dans des plaques de 96 puits, mais les plaques de 384 et 1536 puits sont maintenant de plus en plus utilisées.

II.3 Les systèmes cellulaires :

3.1 Comment obtenir des cultures cellulaires?

a) Culture primaire

Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une Culture primaire. Il existe deux méthodes de base pour faire cela. Dans la première, pour les cultures d'explants, de petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture en verre ou en plastique traité et baignés dans du milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture (ou le substrat) où elles commencent à se diviser et proliférer. Dans la deuxième, méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que la trypsine ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser. Cette méthode est appelée Dissociation enzymatique.

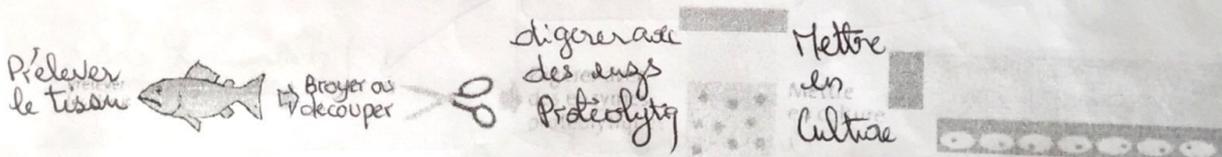


Fig 5 : Dissociation enzymatique.

Les cellules des tissus sont dispersées par hydrolyse enzymatique des protéines constituant la matrice extra cellulaire. La multiplication des cellules s'arrête quand un élément du milieu nutritif est épuisé. Quand elles sont cultivées sur support, leur croissance s'arrête par inhibition de contact. (c.à.d. quand elles forment un tapis confluent de mono couche cellulaire).

b) Culture secondaire

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du ^{m⁺ culture} substrat avec des enzymes. Ces enzymes sont similaires à celles utilisées pour obtenir la culture primaire et sont utilisées pour rompre les liaisons protéiques liant les cellules au substrat. Certaines lignées cellulaires peuvent être récoltées en grattant délicatement les cellules du fond du récipient de culture. Une fois libérées, les cellules en suspension peuvent être divisées et placées dans de nouveaux récipients de culture.

Ce sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour ensemercer d'autres cultures et ainsi de suite : ce sont donc les cultures secondaires. Ces cellules ainsi obtenues conservent les caractéristiques du tissu d'origine mais leur nombre de divisions est limité comme dans l'organisme.

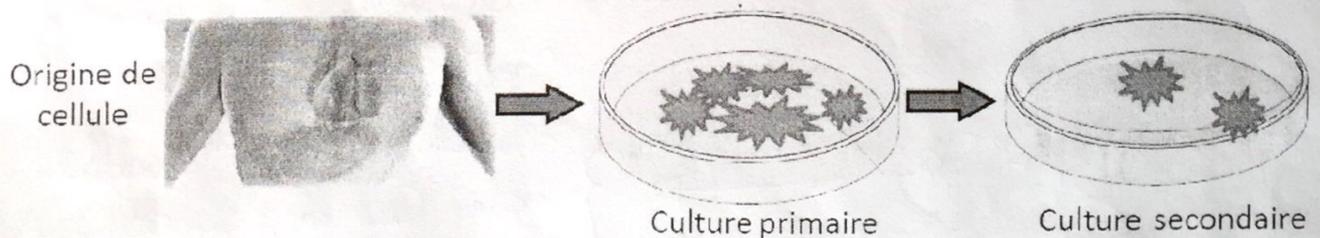


Fig 6 : Culture cellulaire.

3.2 Lignées cellulaires (2 définitions)

- Ensemble des cellules (normales ou cancéreuses), dérivant d'une même cellule mère et présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles identiques.
- Ensemble des cellules à divers stades de différenciation qui donnent naissance à un type cellulaire donné.

3.3 Qu'est-ce qu'une cellule souche ?

Une cellule souche est une cellule quiescente (en repos c'est-à-dire qu'elles ne se multiplient pas) qui a la capacité, si nécessaire de se diviser indéfiniment, souvent tout au long de la vie de l'organisme auquel elle appartient, assurant le renouvellement des cellules d'un individu. La division d'une cellule souche produit une nouvelle cellule souche cellule de «réserve» et une cellule s'engageant dans un processus de différenciation qui la conduira à remplir une fonction précise. Placées dans des conditions appropriées et en présence des signaux corrects, elles peuvent se transformer et donner naissance à diverses cellules spécialisées (ex : cellule de muscle, de foie, neurone, etc.) au cours d'un processus appelé «différenciation cellulaire».

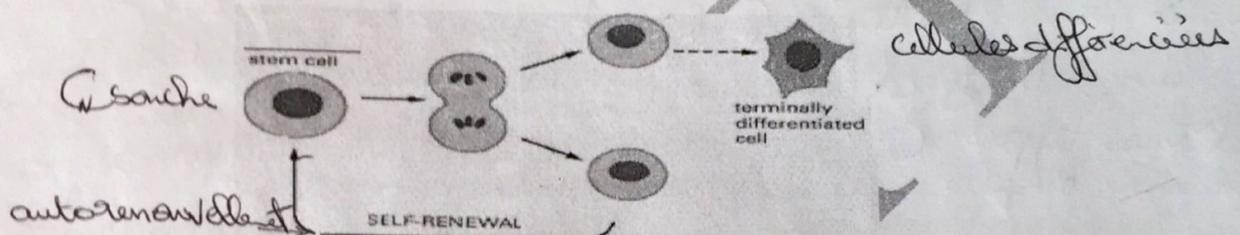


Fig 7 : Division des cellules souches.

La biologie des cellules souches et leur application thérapeutique constituent à l'heure actuelle un des sujets les plus excitants des sciences du vivant. L'intérêt majeur de ces cellules en biologie fondamentale comme en médecine régénérative, réside dans leur capacité unique à aussi bien s'auto-renouveler que s'engager dans une ou plusieurs voies de différenciation. Pourrons-nous un jour réparer n'importe quel organe du corps humain ? C'est en tout cas l'ambition de la médecine régénérative qui mise tout sur le potentiel des cellules souches. Les scientifiques veulent utiliser ces cellules souches pour remplacer des cellules endommagées chez des patients. On parle même de créer des organes à partir de cellules souches.

Néanmoins, de nombreuses questions demeurent et, à ce jour, très peu de pathologies peuvent être traitées par des approches fondées sur ces cellules. La rareté ou l'inaccessibilité des cellules souches adultes, l'absence de marqueurs permettant de les identifier physiquement et de les purifier ainsi que notre connaissance extrêmement limitée des mécanismes fondamentaux qui président à leur autorenewement sont autant de raisons qui limitent leur utilisation dans des approches cliniques.

a) les différents types de cellules souches

Toutes les cellules souches ne sont pas équivalentes, on distingue alors quatre catégories de cellules souches en fonction de la diversité des types cellulaires auxquels elles peuvent donner

naissance, donc elles sont classées selon leurs capacités de différenciation. Cependant les chercheurs en matière de thérapie cellulaire ne focalisent leur centre d'intérêt que sur les cellules souches pluripotentes et multipotentes.

1 Cellules souches totipotentes (toti=tout, potentes=puissantes) : elles sont les seules à permettre le développement d'un organisme entier donc elles peuvent engendrer tous les types de cellules d'un organisme. Les vraies cellules souche totipotentes sont l'œuf fécondé d'un embryon de mammifère (aussi appelé un zygote) et les cellules filles issues des premières divisions après la fécondation.

L'œuf fécondé est capable de produire un embryon entier mais aussi les tissus de soutien de l'embryon, comme le placenta et le cordon ombilical qui l'accompagnent). Cette seule cellule souche subit de nombreuses divisions cellulaires pour engendrer des tissus embryonnaires distincts.

2 Cellules souches pluripotentes (pluri=plusieurs, potentes=puissantes) : elles sont dénommées cellules souches embryonnaires ou encore appelées cellules ES (Embryonic Stem cells) ont conservé l'aptitude à donner pratiquement **tous les types cellulaires**. Leur capacité à se multiplier activement, alliée à leur potentiel élevé de **différenciation en divers types cellulaires**, fournit un outil puissant de production de cellules souches somatiques prédifférenciées. Ces dernières sont autant de moyens thérapeutiques potentiels pour régénérer des tissus adultes endommagés devenus inaptes à une régénération endogène. Au cours du développement ultérieur, les Cellules pluripotentes voient leur potentiel de différenciation progressivement se restreindre pour donner naissance à des cellules souches multipotentes

3 Cellules souches multipotentes (multi=beaucoup, potentes=puissantes) : **spécifiques d'un ou plusieurs tissus**, elles sont nommées également cellules souches adulte. Ces cellules engendrent à leur tour, les 200 types (chez l'homme) de cellules matures différenciées constitutives des différents tissus.

4 Cellules souches unipotentes : ne peuvent se différencier qu'en **un seul type cellulaire** qui constitue un seul type de tissu. Donc elles n'engendrent que des cellules différenciées d'un seul type tissulaire et conservent certaines capacités d'autorenouvellement et de prolifération.

b) Les niches d'hébergement des cellules souches : Les cellules souches existent en petits nombres dans un microenvironnement spécialisé désignés par le terme de niche (de cellules souches en état quiescente). C'est un endroit spécifique d'un tissu qui peut héberger des cellules souches. La niche se compose de cellules somatiques différenciées, de matrice extracellulaire et de cellules dérivées de cellules souches. Les niches fournissent les facteurs protéiques qui assurent les

interactions entre cellules et avec la matrice extracellulaire. Ces facteurs permettent de contrôler l'autorenouveaulement des cellules souches, leur prolifération et différenciation.

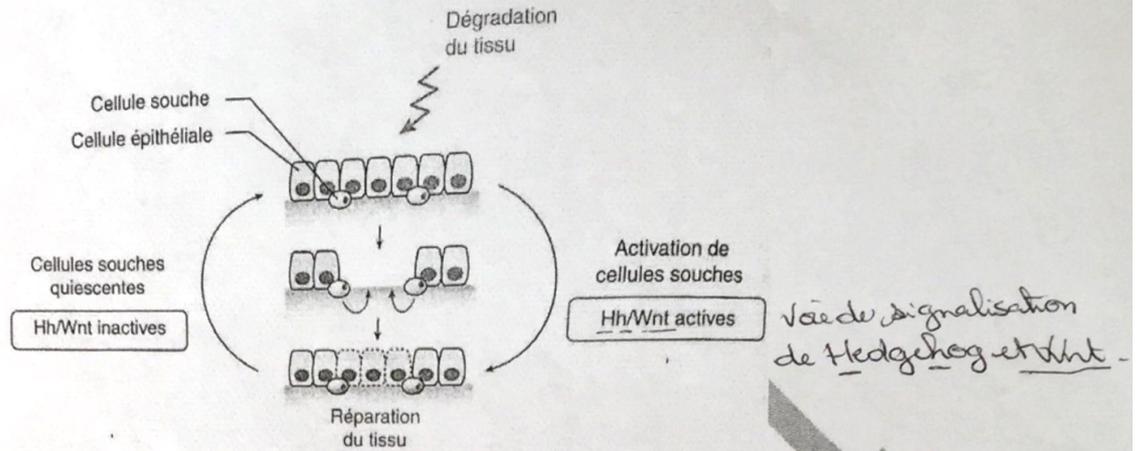


Fig 8 : Cycle de cellules souches alternant quiescence et activité sous la dépendance de des voies de signalisation de Hedgehog et Wnt, dans des situations physiologiques normales et en réponse à une lésion tissulaire.

Parce qu'elles représentent une réserve cellulaire quasi illimitée par leur propriété d'autorenouveaulement et possèdent la capacité de se différencier dans tous les lignages cellulaires *in vitro*, les cellules souches embryonnaires, ou cellules ES, constituent un outil de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques fondées sur le remplacement cellulaire.

Maintenues en culture, les cellules de la masse interne^(non figuré) forment les cellules souches embryonnaires pluripotentes. Dans l'organisme, elles donnent naissance aux cellules multipotentes qui incluent : les cellules souches épidermiques, à l'origine de la peau et des poils, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse à l'origine de toutes les lignées cellulaires sanguines, les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire du cerveau, les cellules souches gastro-intestinales, localisées dans les cryptes du petit intestin, les cellules souches du foie et les cellules souches mésenchymateuses, résidentes de la moelle osseuse qui forment les os, les cellules stromales et les adipocytes.

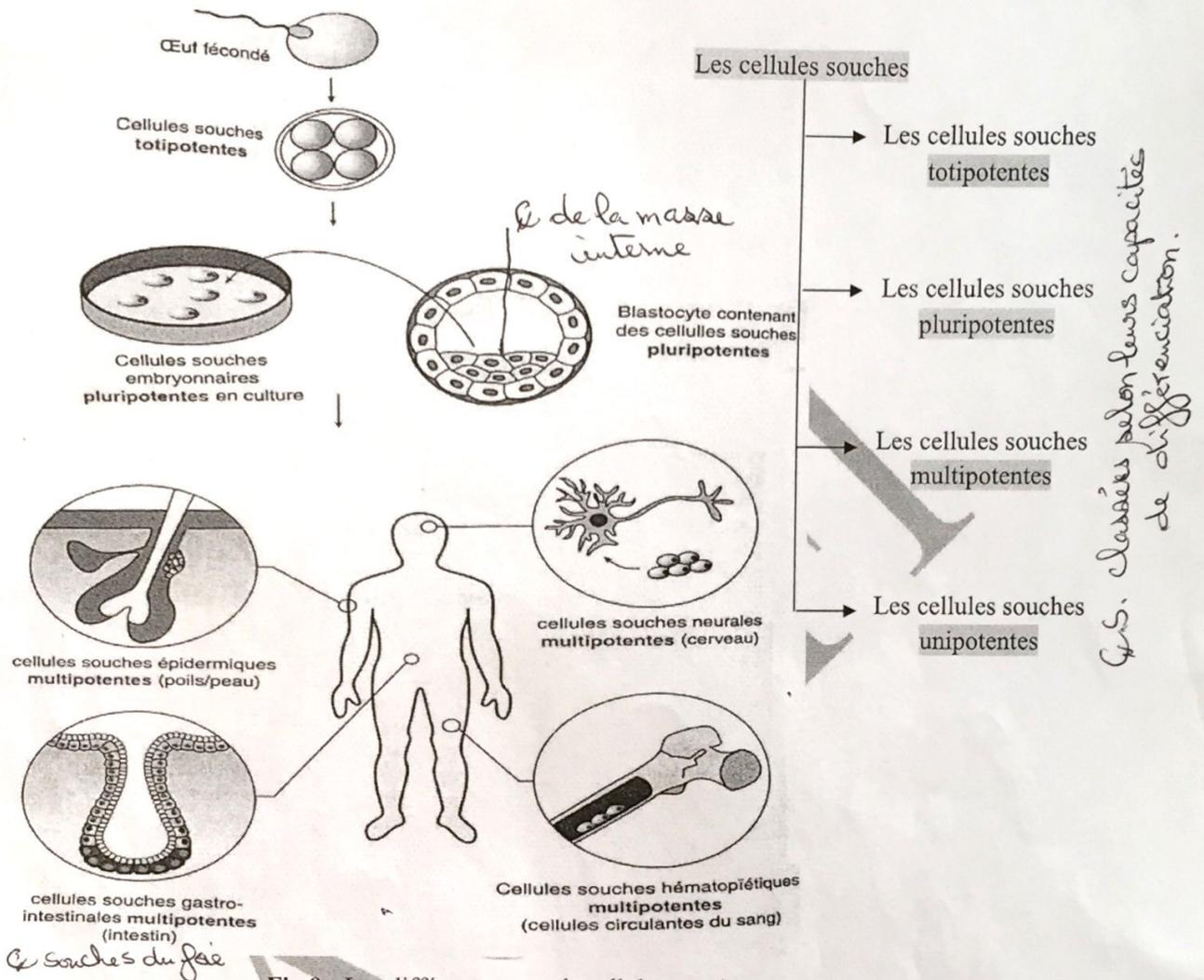


Fig 9 : Les différents types de cellules souches.

Les cellules souches font l'objet d'étude du développement de l'embryon et du fœtus. Elles peuvent s'engager dans un nombre illimité de division symétriques (sans se différencier), comme les cellules cancéreuses, propriété pour laquelle elles sont utilisées pour l'étude du cancer. Le contrôle de la différenciation de ces cellules souches pourrait constituer une réserve illimitée de tissus pour tester l'efficacité de médicaments ou les effets de substances toxiques. Grâce aux cellules souches, on espère produire et greffer des cellules neuves pour remplacer des cellules endommagées ou mortes de l'organisme.

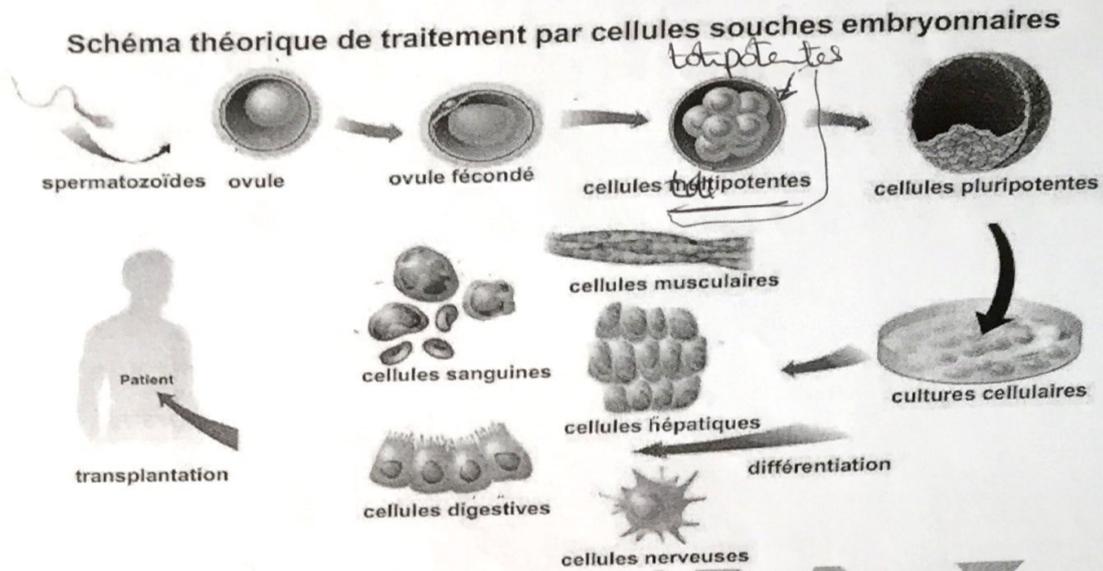


Fig 10 : Les cellules souches embryonnaires, pour un intérêt thérapeutique.

Les cellules souches embryonnaires sont particulièrement intéressantes dans la lutte contre les maladies neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson, de Huntington ou d'Alzheimer. On les utilise depuis des années pour reconstituer le système immunitaire d'un patient leucémique après une chimiothérapie. Au printemps 2010, une équipe de l'Université de Montréal a greffé des cellules souches à un patient pour régénérer son muscle cardiaque après un pontage coronarien.

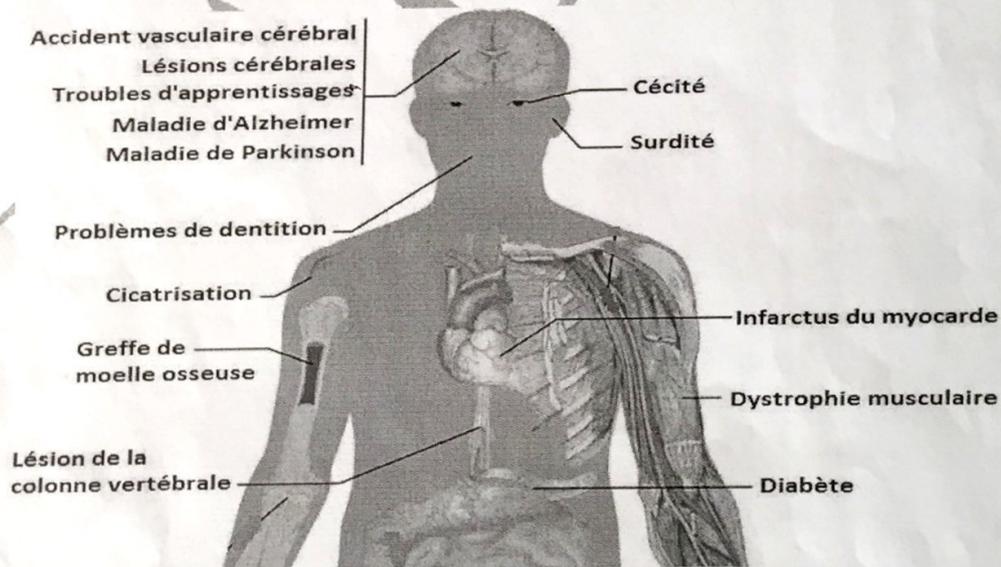


Fig 11 : Quelques maladies possiblement guérissables grâce à la recherche sur les cellules souches

III. La prolifération cellulaire : Courbe de croissance en culture

Est une courbe triphasique. On distingue 3 périodes : phase de latence ou d'adaptation ; phase exponentielle ; phase stationnaire.

1 La phase de latence (d'adaptation au milieu) ou « lag phase » : caractérisée par une faible croissance cellulaire. La cellule reconstitue son squelette, s'attache au substrat, s'étale. Il y a des synthèses d'ADN et de protéines.

2 La phase exponentielle ou « log phase » : (90 à 100% de croissance). Où ~~la~~ l'augmentation croissante du nombre de cellules rentrant en division. Les cellules se divisent rapidement, tant le milieu de culture est riche en nutriments.

3 La phase de plateau (stationnaire), ou « plateau phase » : Les cellules dans le récipient de culture primaire arrivent à confluence lorsqu'elle couvre tout le substrat de culture disponible.

La confluence cellulaire intervient vers la fin de la phase log et la culture devient ensuite stationnaire (0-10% de croissance), lorsque les cellules arrivent à confluence, on observe un ralentissement de la croissance cellulaire qui se stabilise. Ce phénomène est la conséquence ^{de} d'un épuisement des nutriments au sein du milieu cellulaire, soit d'une inhibition de contact exercée par les cellules via les jonctions intercellulaires, lorsqu'elles entrent en contact l'une avec l'autre soit d'une accumulation de déchets et un manque d'espace disponible sur le support (substrat). Les cellules perdent leur mobilité et certaines meurent plus que celles qui sont produites.

Les cellules épithéliales et endothéliales non transformées cessent de croître dès la confluence atteinte. Certaines cellules d'embryons de peau, les fibroblastes expriment des inhibitions de contact mais continuent à croître en s'organisant en couches superposées. Les cellules transformées atteignent des plateaux élevés. Ayant perdu leur dépendance vis à vis d'un support, elles peuvent souvent être cultivées en suspension.

Phase Lag : période d'adaptation au milieu. La cellule reconstitue son squelette, s'attache au substrat, s'étale. Il y a des synthèses d'ADN et de protéines.

Phase Log : phase de croissance exponentielle (90 à 100% de croissance).

Phase plateau : la confluence intervient vers la fin de la phase Log et la culture devient ensuite stationnaire (0-10% de croissance). Les cellules perdent leur mobilité, s'orientent les unes par rapport aux autres (Inhibition de contact).

Les cellules épithéliales et endothéliales non transformées cessent de croître dès la confluence atteinte. Certaines cellules d'embryons de peau, les fibroblastes, expriment des inhibitions de contact mais continuent à croître en s'organisant en couches superposées. Les cellules transformées atteignent des plateaux élevés. Ayant perdu leur dépendance vis-à-vis d'un support, elles peuvent souvent être cultivées en suspension.

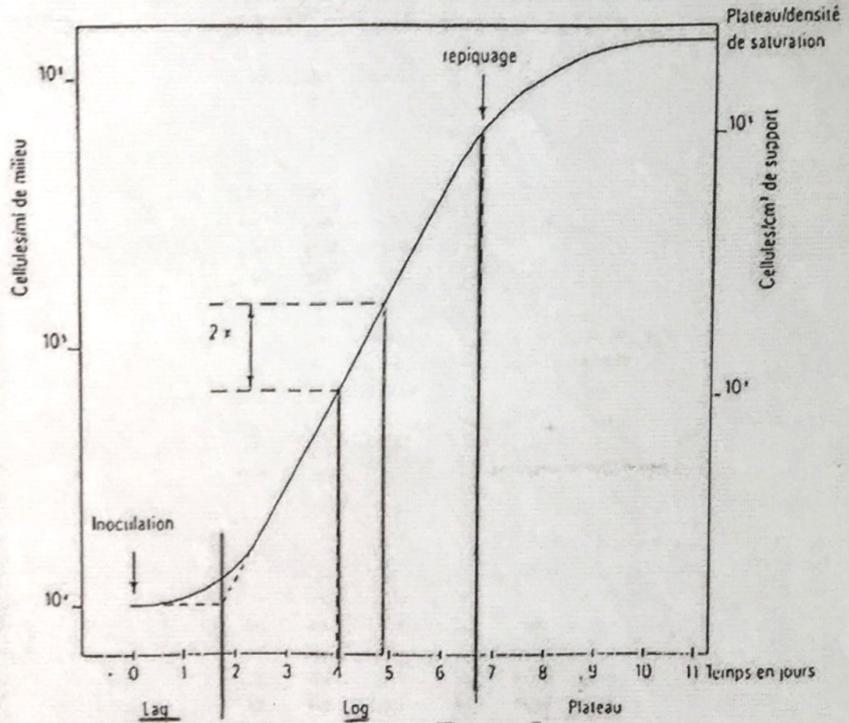


Fig 12 : Cycle de croissance d'une lignée cellulaire en culture (évolution d'une culture de cellules au cours du temps).

Phase déclin : Le nombre des cellules en culture décroît car les nutriments et l'espace se font trop rares pour maintenir un nombre de cellule maximum (perte de la capacité à se reproduire).

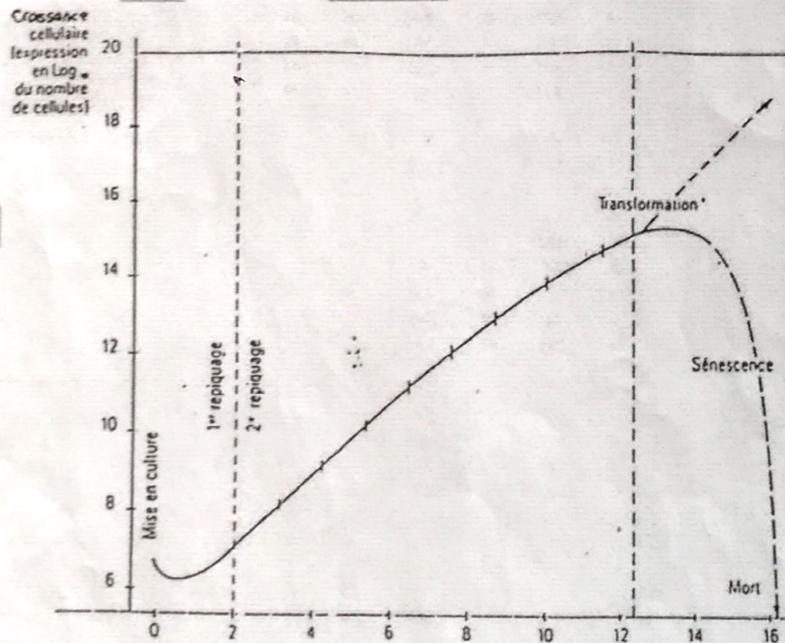


Fig 13 : Phase déclin au cours d'évolution d'une culture de cellules.

(14 et 16 jrs)

VI. La transformation cellulaire : l'immortalisation et la transformation tumorale

l'intérêt des cellules en culture =

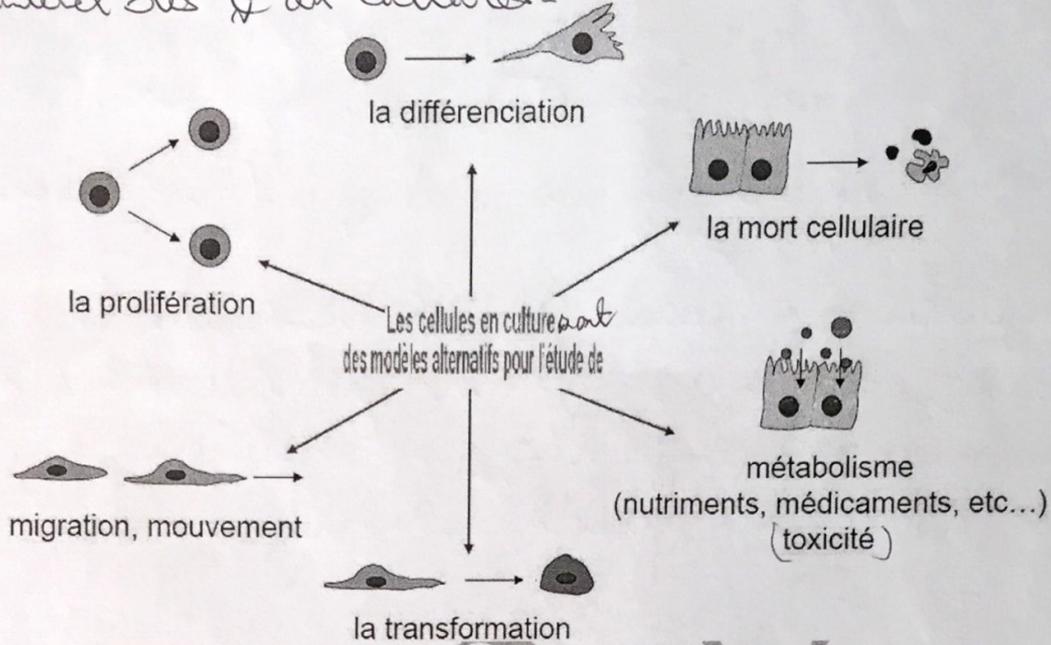


Fig 14 : L'intérêt des cellules en culture

VI.1 La transformation cellulaire

Certaines lignées cellulaires finissent par arrêter de se diviser et montrer des signes de vieillissement. Ces lignées sont appelées finies dont les cellules ne se multiplient que pendant un nombre limité de générations puis meurent : leur vie et leur mort sont programmées. On observe alors une diminution de leur vitesse de prolifération (phase de sénescence). الشيخوخة

D'autres lignées cellulaires sont, ou deviennent, immortelles ; elles peuvent continuer à se diviser indéfiniment et sont appelées lignées cellulaires continues. Lorsqu'une lignée cellulaire finie "normale" devient immortelle, elle a subi un changement fondamental irréversible ou "transformation". Ceci peut se produire spontanément ou peut être provoqué en utilisant intentionnellement des produits, des rayonnements ou des virus. Donc la transformation est un processus pathologique par lequel une cellule acquiert de nouvelles propriétés modifiant sa morphologie et sa croissance.

Les cellules transformées (lignées transformées ou immortelles) poussent généralement plus vite et plus facilement (la vitesse de multiplication ne diminue pas, ce qui permet un nombre de repiquage indéfini). Ces cellules transformées peuvent souvent présenter des chromosomes supplémentaires ou anormaux et peuvent fréquemment être cultivées en suspension puisqu'elles perdent leur besoin d'ancrage (n'adhèrent plus au support). Les cellules possédant le nombre normal de chromosomes sont appelées cellules diploïdes; celles qui possèdent un nombre de chromosomes

différents de la norme sont appelées aneuploïdes. Si les cellules forment des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des animaux, elles sont considérées comme étant néoplasiquement transformées.

On peut distinguer 2 états principaux dans la transformation : l'état préneoplasique auquel les cellules présentent des altérations dans leur morphologie et dans le contrôle de leur prolifération, et un état néoplasique où les cellules acquièrent en plus la capacité à former des tumeurs ou des leucémies in vivo.

VI.2 L'immortalisation et la transformation tumorale

- L'immortalisation est une des modifications associées à la transformation cellulaire.
- Immortalisation est la capacité à proliférer indéfiniment.
- Croissance jusqu'à une densité cellulaire anormalement élevée (perte de l'inhibition de contact).
- Faible dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance.
- Faible dépendance vis-à-vis de l'ancrage (capacité à survivre et proliférer en suspension).
- Capacité à induire des tumeurs après injection à des animaux sensibles.

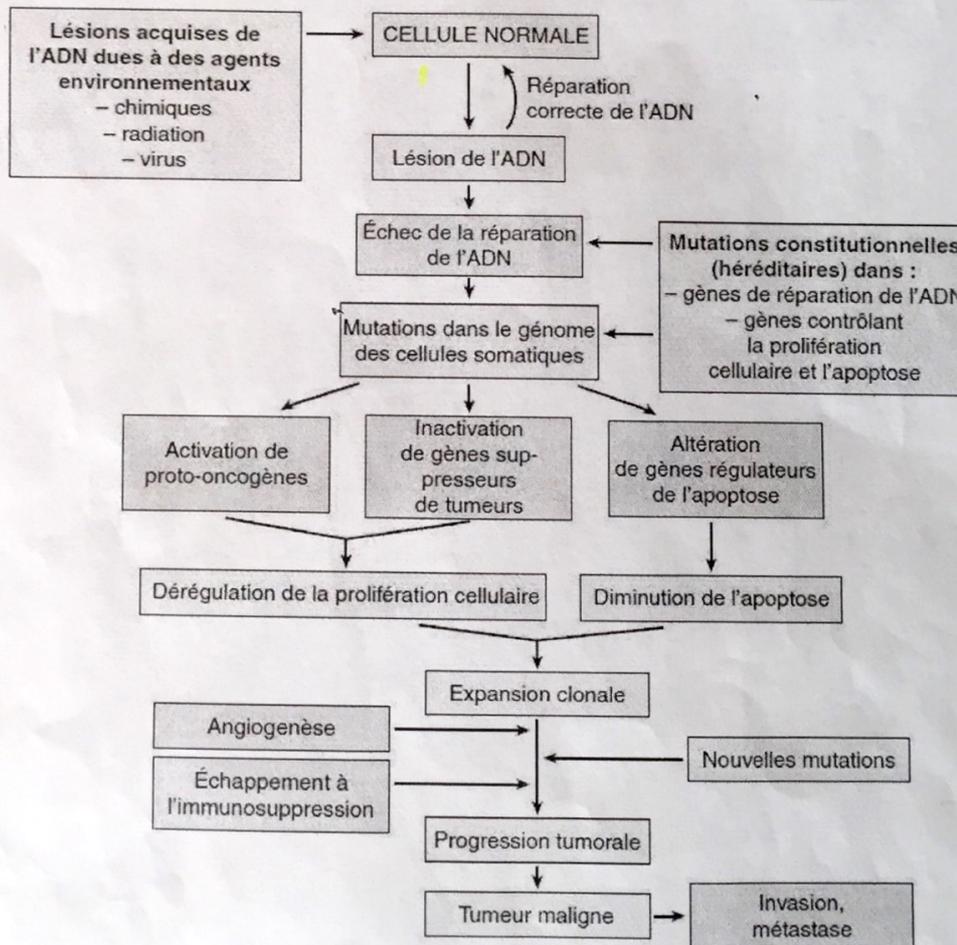


Fig 15 : la transformation tumorale

Transformation maligne et progression tumorale

Le cancer est lié à la prolifération anarchique et incontrôlée des cellules résultant d'une perturbation de l'homéostasie tissulaire. Cette dernière est définie comme un équilibre fragile entre la prolifération cellulaire, la différenciation ou la spécialisation irréversible des cellules, l'élimination par sénescence ou par apoptose.

La transformation néoplasique résulte d'une perturbation de ce fragile équilibre. Donc un néoplasme est la conséquence d'altérations successives du génome des cellules tumorales, qui perturbent de façon permanente l'homéostasie tissulaire. Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette transformation cancéreuse : le vieillissement, les facteurs extérieurs (virus, rayonnements, produits chimiques), les anomalies génétiques constitutionnelles.

Dans la cellule cancéreuse, il y a rupture permanente de l'équilibre entre les signaux intracellulaires (activation de voies stimulatrices par activation anormale de protéines activatrices : « oncoprotéines », suppression de voies inhibitrices par inactivation anormale de protéines inhibitrices « protéines oncosuppressives »).

La coexistence de plusieurs événements est nécessaire à la transformation cancéreuse. L'activation de nouveaux oncogènes se poursuit tout au long de la progression tumorale : processus multi-étapes.

Un oncogène est un gène altéré, dont le produit (protéine) est impliqué dans la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale.

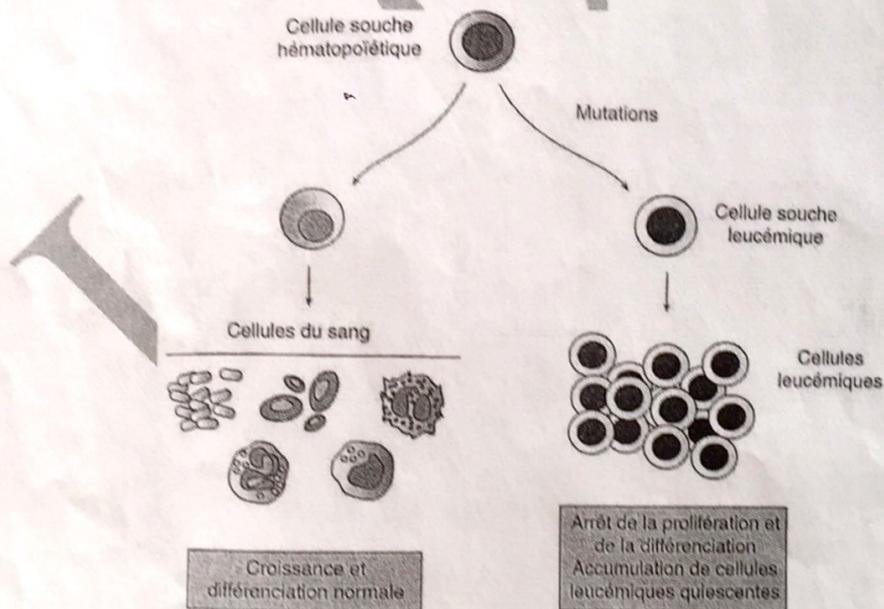


Figure 16 Les cellules souches hématopoïétiques normales subissent des mutations qui donnent naissance aux cellules souches leucémiques.

Ces dernières s'engagent alors dans un processus de différenciation, puis s'arrêtent pour s'accumuler à un stade intermédiaire. De telles cellules sont habituellement considérées comme des cellules leucémiques actives, biologiquement distinctes des cellules souches leucémiques.

V. Le milieu de culture et les conditions de culture

La détermination des exigences pour la mise au point de milieux et celle des conditions de cultures cellulaires suppose une bonne connaissance des conditions qui prévalent (prédominant) dans le milieu intérieur.

1. But d'un milieu de culture

Le milieu de culture a pour but de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de l'environnement cellulaire *in vivo* permettant ainsi aux cellules à la fois de survivre mais aussi de se multiplier tout en conservant leurs fonctions cellulaires principales.

2. Types de milieu de culture et leur composition

Selon les milieux cellulaires de base et l'objectif de culture pour lesquels on les utilise, les composants ne seront pas les mêmes. Néanmoins il existe des éléments essentiels qui seront retrouvés dans la plus grande majorité des milieux de bases et qui sont indispensables pour la survie des cellules. Si la base du milieu se constitue d'un mélange de petites molécules (tableau 2), l'apport de protéines, de facteurs de croissance et d'attachement s'effectue en général par l'addition de sérum de veau fœtal (SVF). Ces milieux habituels (empiriques) pour la plupart des cultures de routine, restreignent (délimitent) les connaissances sur l'environnement de la cellule et ses réels besoins pour croître. De nombreuses raisons ne manquent pas pour éliminer le SVF du milieu de culture et peu à peu on s'efforce de formuler des milieux de culture définis. Outre le mélange de nutriments, d'autres molécules apparaissent plus spécifiques. C'est le cas :

De l'insuline qui stimule la prolifération de la plus part des cellules somatiques *in vitro*. Elle agit en synergie avec de nombreuses hormones ;

Des facteurs de croissance : facteurs de croissance épidermiques, facteurs de croissance fibroblastiques, facteurs de croissance nerveux, etc. Les facteurs de croissance et hormones aident à réguler et contrôler la vitesse de croissance des cellules et leurs caractéristiques fonctionnelles ;

Des protéines comme la transferrine pour le transport du fer et l'albumine pour la fixation et le transport des acides gras ;

Des facteurs d'attachement, fibronectine, collagène, etc., qui sont prépondérants pour l'adhésion des cellules au flacon de culture.

3. Composition d'un milieu de culture pour cellules de Mammifères

Les cellules animales sont aérobies strictes, l'apport d'oxygène est donc indispensable. Le glucose constitue la principale source de carbone et d'énergie apportée aux cellules. Les acides aminés sont les principaux pourvoyeurs (fournisseurs) d'azote, et sont impliqués dans la

biosynthèse des protéines et des nucléotides chez les mammifères. Leur concentration varie de 0,1 à 0,2 mM ; Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité, elles n'excèdent pas 1µM, qui ne peuvent pas être synthétisées et doivent donc entrer dans la composition du milieu de culture. Les deux antibiotiques, pénicilline et streptomycine, empêchent la croissance d'éventuelles bactéries contaminantes. Les cultures se font dans des flacons en verre ou en plastique permettant l'attachement des cellules. Les flacons sont placés à 37 °C (les cellules doivent être placées à la température qui correspond à celle de l'organisme) dans une atmosphère contenant généralement 5 % de CO₂.

Tableau 2 : Composition d'un milieu de culture pour cellules de Mammifères.

Acides aminés	Vitamines	Sels inorganiques	Autres composants
Arginine	Biotine	Ca(NO ₃) ₂	Glucose
asparagine	Choline	KCL	HEPES
Acide aspartique	Pantothénate	MgSO ₄	Rouge de phénol
Cystine	Acide Folique	NaCl	Pénicilline
Acide glutamique	Nicotinamide	NaHCO ₃	Streptomycine
Glutamine	Pyridoxal	Na ₂ HPO ₄	
Glycine	Riboflavine		
Histidine	Vitamine B ₁₂		
Hydroxyproline	Thiamine		
Isoleucine			
Leucine			
Lysine			
Méthionine			
Phénylalanine			
Proline			
Sérine			
Thréonine			
Tryptophane			
Tyrosine			
Valine			

4. Conditions de culture

a) Conditions du milieu de culture

Le maintien d'un environnement physiologique suppose la détermination d'une température d'incubation correcte, d'une concentration équilibrée d'ions inorganiques essentiels, d'un pH et d'une osmolarité adaptés, l'usage d'un système tampon adéquat, le maintien d'un potentiel redox acceptable, et l'établissement de pressions partielles d'oxygène et de gaz carbonique à des valeurs acceptables et dépourvues de toxicité.

Fourniture de nutriments essentiels

Il est essentiel de mettre à la disposition des cellules tous les nutriments exigés pour les biosynthèses et les diataxies (ou biosynthèses macromoléculaires), le métabolisme énergétique, la catalyse biochimique (vitamines et oligoéléments appropriés).

Eléments minéraux

En fonction de leur nature, les ions inorganiques peuvent intervenir dans le maintien du pH et l'osmolarité du milieu, le transfert de molécules à travers les membranes et comme cofacteurs enzymatiques. Ces ions sont notamment le calcium, le magnésium, le phosphate, le potassium et le sodium. Les ions métalliques (Fer, Magnésium, Cuivre, Zinc...) sont apportés à l'état de traces par le milieu de culture, car ils sont essentiels à la croissance cellulaire, participent au site actif de certaines enzymes et interviennent dans les réactions de la chaîne respiratoire.

Mise à disposition de molécules informatives

Ces molécules informatives sont essentiellement des hormones et des facteurs de croissance qui vont stimuler spécifiquement les grands anabolismes et la multiplication cellulaires.

Mise à disposition des molécules de transport

Un certain nombre d'hormones, d'oligoéléments et les lipides ne peuvent être fournis à la cellule sans être associés à une molécule porteuse dont le rôle est de rendre disponible ou assimilable les éléments qu'elle transporte.

Maintien d'un équilibre quantitatif entre les facteurs

Les aliments, facteurs de croissance, hormones, ions doivent se trouver en concentrations équilibrées dans le milieu de culture. L'équilibre quantitatif entre facteurs est un élément aussi important que la présence ou l'absence de telle ou telle molécule.

Surface de culture et mise à disposition de facteurs d'adhérence

Puisque l'adhérence est une condition nécessaire pour la multiplication des cellules adhérentes, il faut leur offrir une surface de culture nécessaire à leur multiplication. Pour adhérer à leur support de multiplication, les cellules ont besoin de molécules d'adhérence qui vont "conditionner" celui-ci. C'est une exigence absolue pour les cellules qui ne produisent pas de facteurs d'adhérence ou n'en produisent pas en quantités adéquates. C'est une exigence relative pour celles qui le peuvent.

Procédures de culture et de subculture

Lors des cultures primaire (dissociation) et secondaire (processus de dispersion), les cellules subissent des dommages ou des traumatismes. Il faut donc utiliser des procédures douces qui minimisent ceux-ci ou apporter dans l'environnement des cellules des facteurs dont la seule fonction

consiste d'une part à neutraliser les agents utilisés pour assurer la dispersion ou la dissociation cellulaires, et d'autre part à aider les cellules à surmonter les traumatismes de dissociation ou de dispersion. Le tableau 3 résume quelques éléments essentiels et leurs rôles.

Eléments	Types	Rôles
Source d'énergie	glucose glutamine	Principale source d'énergie <i>in vitro</i> elle alimente la néoglucogénèse
Acides aminés	Gln, Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, lieu, Tyr, Cys, Arg, His	Indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés <i>in vitro</i>
Sels minéraux	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ Cu, Zn, Co, Fe	Maintien de l'osmolarité du milieu Rôle de facteurs d'adhésion (Ca ²⁺) Cofacteurs enzymatiques Oligoélément
Facteurs de croissance	épidermiques, fibroblastiques, nerveux, etc.	Hypertrophie (augmentation de taille) Hyperplasie (augmentation de la population cellulaire) Différenciation cellulaire
Vitamines	voir tableau 2	Coenzyme Précurseur des bases puriques et pyrimidiques
Facteurs d'adhésion	glycoprotéines calcium dépendante ou non fibronectine (fibroblaste) chondronectine (chondrocytes) collagène (toutes les cellules)	Adhésion des cellules au support
Protéines de transport	Albumine Transferrine	Transport des AG Transport du fer

Conditions physico-chimiques

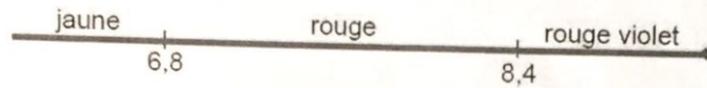
Température

La température du milieu de culture doit être régulée de façon précise. La température optimale de croissance des cellules animales est de 37°C, mais la croissance reste satisfaisante pour des températures comprises entre 36,5°C et 38°C. En deçà, la croissance est ralentie. A des températures trop élevées, ou trop faibles, les cellules génèrent des protéines de choc thermique (heat shock proteins) dont le rôle est d'adapter la cellule à cette élévation ou diminution de température.

pH

La majorité des cellules survive dans un intervalle de pH compris entre 6,8 et 7,6, donc elles doivent être placées au pH qui correspond à celle de l'organisme dont elles sont issues. Les cellules animales tolèrent de faibles variations de pH, et par conséquent le pH du milieu de culture, doit être

maintenu constant d'où l'utilisation de systèmes tampon dans les milieux de culture. Ce dernier est généralement tamponné par du bicarbonate de sodium, on utilise parfois un autre tampon l'HEPES qui est un tampon organique utilisé pour aider à conserver le pH du milieu dans une plage comprise entre 7,0 et 7,4 suivant le type de cellules cultivées. Toutes modifications du pH extracellulaire entraînent un blocage métabolique. La régulation du pH est essentielle car un pH inférieur à 7 peut provoquer une mort cellulaire importante. Pour suivre les variations de pH du milieu, on ajoute dans le milieu un indicateur de pH, le rouge de phénol.



Oxygène dissous

L'oxygène est un élément essentiel pour la croissance des cellules animales. En effet sa consommation est généralement comprise entre 0,05 et 0,5 mmol O₂/h/10⁹ cellules. En bioréacteur, l'oxygène est apporté directement dans le milieu de culture, ce qui permet de maintenir la pression partielle en oxygène (pO₂) à une valeur proche de 50% de la saturation en air. Si la pO₂ est trop élevée, les cellules subissent un stress oxydant, et produisent des espèces oxygénées hyper-réactives et toxiques (anion superoxyde, peroxyde, radical hydroxyle).

b) Conditions du matériel et du lieu de travail

La culture cellulaire nécessite des conditions de stérilité absolues, donc toutes les procédures nécessaires à la culture cellulaire nécessitent un travail en milieu stérile, c'est-à-dire d'un milieu exempt de tout micro-organisme vivant empêchant toute contamination microbienne qui provoque la lyse des cellules. C'est pourquoi on manipule dans des salles réservées où les mouvements sont réduits. De plus, on utilise de hottes spéciales équipées de système de filtration d'air et permet d'obtenir une zone de manipulation stérile (Manipulation sous la hotte).

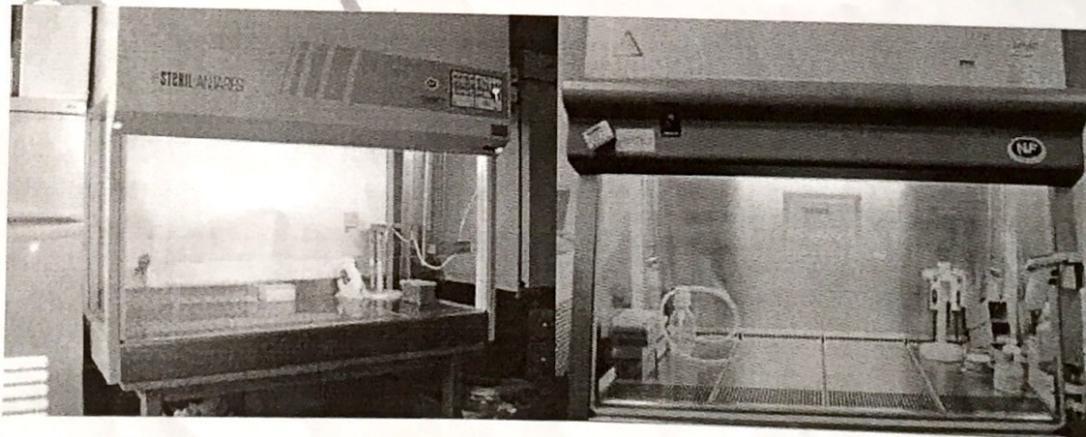


Fig 17 : Hottes spéciales utilisées pour la culture cellulaire

En Outre, tous matériel utilisé doit être stérilisé. Pour ce faire de nombreux traitements existent pour stériliser le matériel utile au travail (Exp : les étuves d'incubation doivent être décontaminées régulièrement). Parmi ces traitements figure la pré-désinfection, le nettoyage, la désinfection, l'antisepsie et la stérilisation.

Pré-désinfection

Opération au résultat momentané permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables, en fonction des objectifs fixés. La pré-désinfection est le premier traitement à effectuer sur le matériel et les objets souillés (contaminés) dans le but de diminuer la population de microorganismes et de faciliter le nettoyage ultérieur. Le terme « décontamination » est improprement utilisé et doit être réservé à des opérations visant à diminuer un risque de contamination radioactive ou chimique.

Nettoyage

Élimination des salissures et des souillures dans le but de présenter un état de propreté des surfaces ou des objets, contrôlable à l'œil nu. Le nettoyage peut être mécanique et chimique.

Désinfection

Opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés (sols, surfaces, instruments, air, eau...), en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération. Elle nécessite un nettoyage préalable. Le désinfectant peut être actif sur une ou plusieurs catégories de micro-organismes : bactéries (bactéricide), virus (virucide) et champignons (fongicide).

À chaque type de matériel ou substrat (verrerie réutilisable, paillasses, pipettes automatiques, surfaces peu accessibles, milieux de culture...) correspond une méthode adaptée de désinfection. Selon les caractéristiques de certains matériels et leur utilisation, des précautions particulières sont à observer.

Stérilisation

Mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer tous les microorganismes vivants de quelque nature que ce soit, portés par un objet parfaitement nettoyé (probabilité qu'il reste un micro-organisme viable). Elle s'applique à des objets dont le conditionnement est tel qu'il maintient l'état stérile. Le tableau 4 résume les différentes étapes nécessaires à la chaîne de stérilisation.

Antiseptie

Opération au résultat momentané permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus, en fonction des objectifs fixés.

Tableau 4 : Les différentes étapes nécessaires à la chaîne de stérilisation

Étapes	Objectifs	Exemples de modalités d'exécution
Pré-désinfection	Protection du personnel Facilité du nettoyage Protection de l'environnement de travail	Utilisation d'un détergent, de préférence bactéricide (par trempage par exemple)
Nettoyage	Élimination des salissures et des souillures	Machine à laver, ultrasons...
Désinfection	Élimination momentanée des micro-organismes présents en les tuant ou en les inactivant	Utilisation de bactéricides, virucides, fongicides tels que l'eau de javel, l'alcool à 70°...
Stérilisation	Obtenir un état stérile qui puisse être conservé	Autoclavage à 121° C pendant 20 minutes

L'eau de Javel

Le chlore détruit très rapidement les bactéries, virus ou champignons. En fonction de la concentration et du temps de contact, l'eau de Javel peut avoir une action différente : bactéricide, virucide, sporicide, fongicide. La dilution adaptée sera établie au cas par cas.

L'éthanol

L'éthanol détruit essentiellement les bactéries. Il peut être utilisé pour décontaminer des surfaces ou du matériel. L'éthanol doit être dilué à 70 % pour une efficacité optimale (ne jamais utiliser d'éthanol absolu).

VI. Systèmes de culture cellulaire

De nombreuses lignées cellulaires, surtout celles dérivées de tissus normaux, sont considérées comme adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat leur convenant. Certaines lignées cellulaires qui ne sont plus considérées comme normales (fréquemment désignées par cellules transformées) sont souvent capables de croître soit fixées à un substrat soit en flottant librement en suspension (~~elles sont en suspension~~). De plus, certaines cellules normales, comme celles trouvées dans le sang, ne se fixent pas normalement aux substrats et poussent toujours en suspension (Deux types de cellules dans l'organisme : les cellules des tissus solides et les cellules circulantes ou libres).

Deux systèmes de base de culture cellulaire sont utilisés pour cultiver des cellules. Ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un substrat de verre ou de

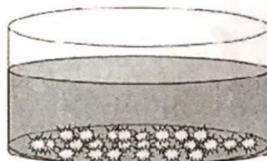
plastique traité (systèmes de culture mono-couche) ou à flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture en suspension).

1. Les cultures mono-couches (Culture sur support) caractérisée par l'adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture. Les cultures mono-couches sont généralement cultivées dans des boîtes, flacons T, flacons roulants ou plaques multipuits traités pour la culture de cellules, le choix se fait en fonction du nombre de cellules nécessaires, de la nature de l'environnement de culture, du coût et des préférences personnelles.

2. Les cultures en suspension où les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension. Les cellules non adhérentes sont cultivées dans les mêmes conditions mais se développent en suspension. Les cultures **en suspension** sont généralement cultivées:

- dans des flacons Spinner (rotation magnétique) ou dans des Erlenmeyers agités dans lesquels les cellules sont activement gardées en suspension dans le milieu ;
- dans des récipients de culture stationnaires comme les flacons T et les bouteilles dans lesquels, bien qu'elles ne soient pas maintenues en agitation, les cellules sont incapables de se fixer fermement au substrat.

Les flacons de culture et les boîtes de culture sont utilisés pour faire pousser des cellules adhérentes.



Les flacons Spinner et les flacons Erlenmeyers sont utilisés pour faire pousser des cellules non adhérentes en suspension.

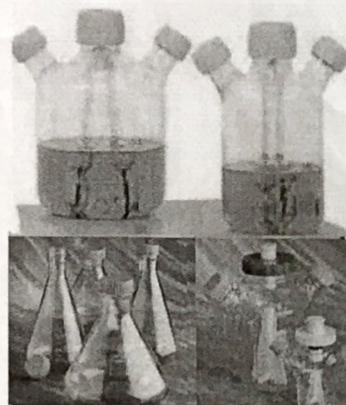
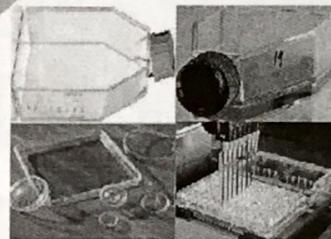
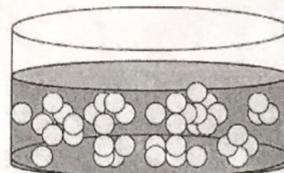


Fig 18 : Les deux systèmes de culture cellulaire