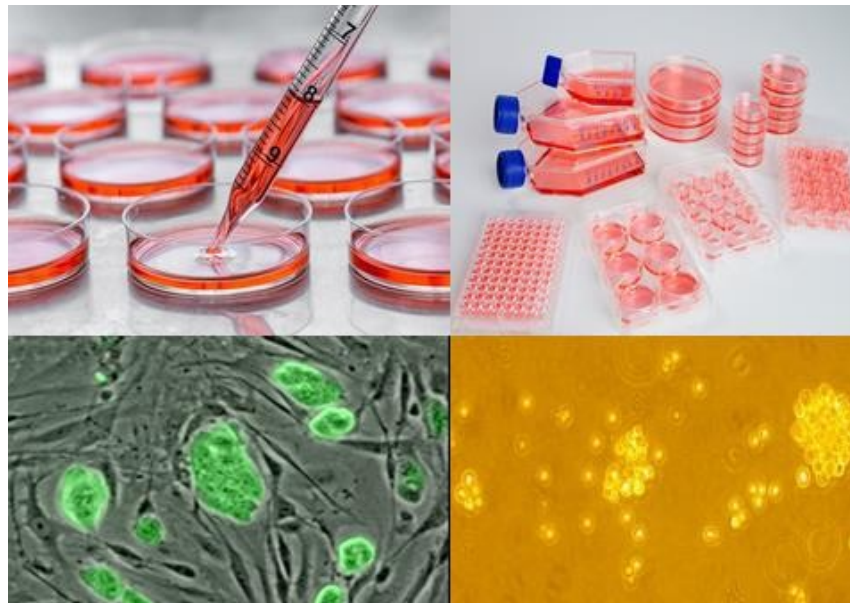


Chapitre IV : Culture cellulaire





MENAKH MOUNA
DÉPARTEMENT DES SCIENCES NATURELLES
ET DE LA VIE
CENTRE UNIVERSITAIRE DE MILA
EMAIL : M.MENAKH@CENTRE-UNIV-MILA.DZ

Table des matières



I - Introduction	5
II - Généralités en culture cellulaire	7
A. Culture cellulaire.....	8
III - Applications de la culture cellulaire	15
A. Systèmes de modèles.....	15
B. Tests de toxicité.....	15
C. Recherches sur le cancer.....	15
D. Virologie.....	16
E. La cellule comme usine de production.....	16
F. Génie génétique.....	16
IV - Techniques de culture cellulaire	17
A. Types de cellules cultivés.....	17
B. Obtention des cellules.....	17
1. Culture primaire.....	17
2. Culture secondaire (repiquage).....	18
C. Méthodes de culture.....	19
1. Culture stationnaire ou monocouche.....	19
2. Cultures en suspension.....	19
D. Condition de culture.....	20
1. Température.....	20
2. Substrat et facteurs d'adhérence.....	20
3. Milieu de culture.....	21
4. Congélation des cellules ou cryoconservation.....	21
V - Culture des micro-organismes	23
VI - Culture de cellules végétales	25

Introduction



La culture cellulaire est devenue une des techniques majeures utilisées aujourd'hui dans les sciences de la vie. Les scientifiques tentent de cultiver les cellules en laboratoire depuis la fin du **XIXe siècle**, mais sans succès car les échantillons meurent systématiquement. En 1912, Alexis Carrel, chirurgien français, réussit à mettre en culture les cellules d'un cœur de poulet, qui continuait à battre. La véritable avancée se produisit en **1951** lorsque les cellules d'Henrietta Lacks (**Cellules de HeLa**) se révélèrent « immortelles » en se reproduisant à l'infini. Pendant les années 1960 et 1970, la commercialisation de cette technologie a eu un impact supplémentaire sur la culture cellulaire, impact qui continue de nos jours. Les entreprises, comme Corning, ont commencé à développer et vendre des produits pour la culture cellulaire.

Généralités en culture cellulaire

A. Culture cellulaire



Définition

La culture cellulaire désigne l'ensemble des techniques utilisées pour **faire vivre** des cellules dans **un milieu de culture artificiel**. Ces modèles in vitro peuvent être des bactéries, des levures, des cellules d'origine animale ou végétale.



Définition : Cellules normales

En culture cellulaire, on appelle cellules normales, des cellules qui ne diffèrent en aucune façon de celles trouvées dans un organisme sain et intact. Par définition, des cellules normales présentent les caractéristiques suivantes :

- elles ont **un caryotype euploïde, normal**, ne comportant aucune anomalie chromosomique de nombre ou de structure visualisable par cytogénétique,
- elles **subissent la sénescence ou vieillissement** cellulaire après un nombre fini de divisions ; un nombre plus ou moins important, qui diffèrent d'un type cellulaire à un autre.

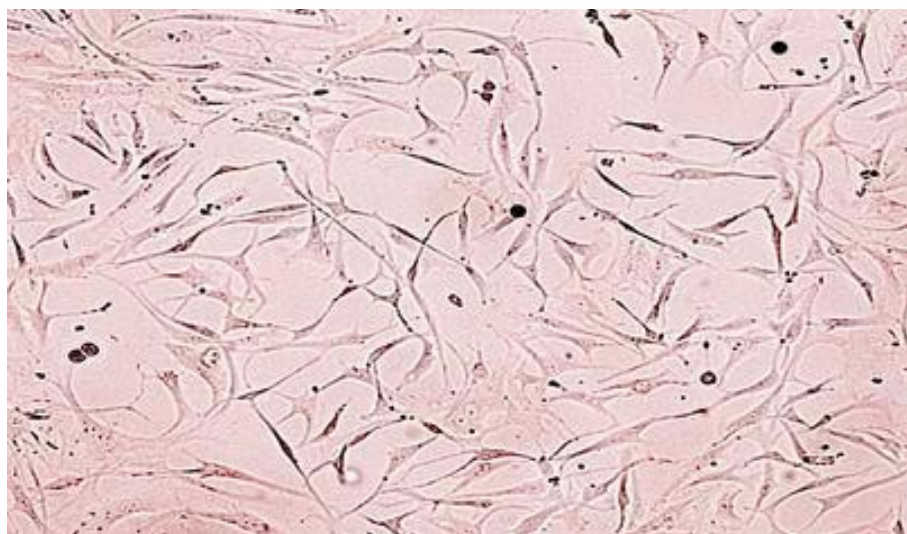


Figure 01 : culture des cellules normale type fibroblaste



Définition

Cellules transformées

En culture cellulaire, on appelle cellules transformées des cellules qui possèdent les propriétés des cellules cancéreuses in vivo. Elles s'opposent en tous points aux cellules normales. On peut considérer comme cellules transformées des cellules capables de :

- provoquer l'apparition de tumeurs malignes quand elles sont greffées à des hôtes appropriés,
- avoir une multiplication indépendante de l'ancrage : très souvent les cellules transformées peuvent se multiplier sans être obligées d'adhérer à un support solide.

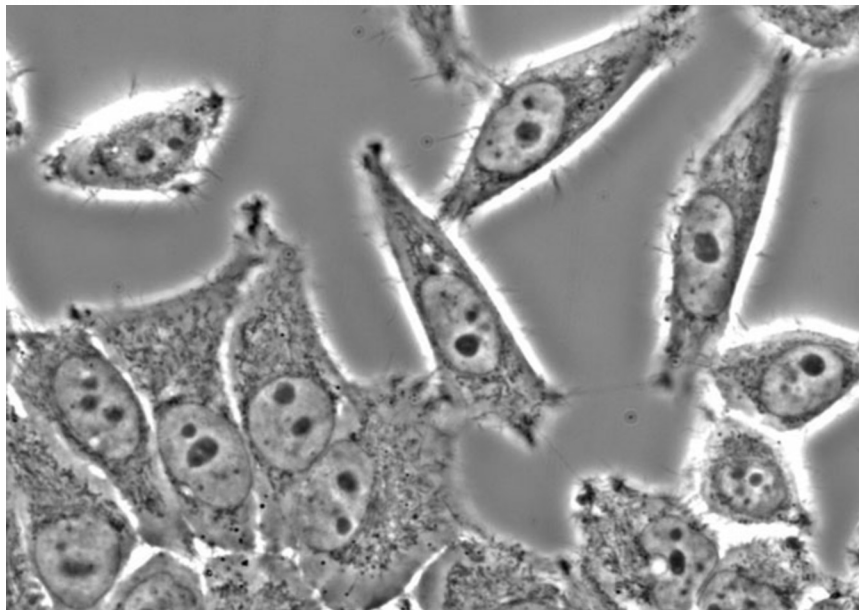


Figure 02 : Culture des cellules transformées



Définition : Cellules non transformées

On donne le nom de « cellule non transformée » à celles qui n'ont aucune des propriétés des cellules manifestement malignes. En effet, ces dernières présentent des propriétés intermédiaires entre cellules normales et cellules transformées.



Définition : Lignées cellulaires

Il s'agit d'une population cellulaire qui résulte de plus d'un passage en culture, non compris la primo-explantation et qui possède un certain potentiel à être subcultivée.

1. **Lignées finies (souches cellulaires)**: Une lignée finie est une lignée qui possède un potentiel important mais limité à être subcultivée. Les lignées finies sont constituées de cellules normales.
2. **Lignées indéfinies (lignées établies ou lignées permanentes)**: Une lignée indéfinie est une lignée qui possède un potentiel illimité à être subcultivée. Il s'applique aussi bien à des cellules transformées que non transformées.
3. **Lignées clonales**: Une lignée clonale est une lignée définie ou indéfinie constituée de la descendance d'une cellule unique (des cellules issues de divisions successives à partir d'une cellule).

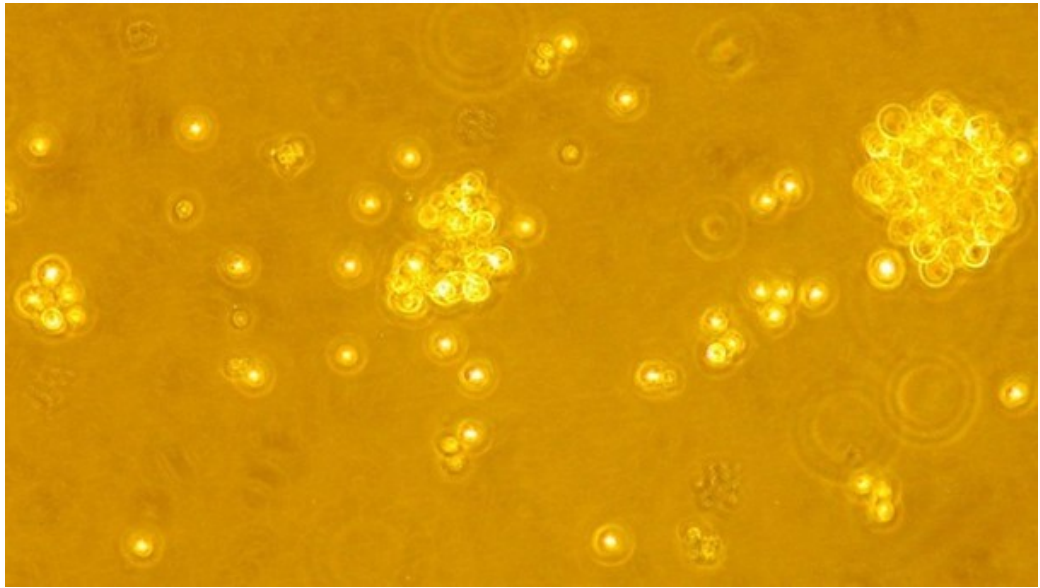


Figure 03 : Culture de cellules de Raji, première lignée cellulaire humaine cultivée en laboratoire qui soit continue et d'origine hématopoïétique.

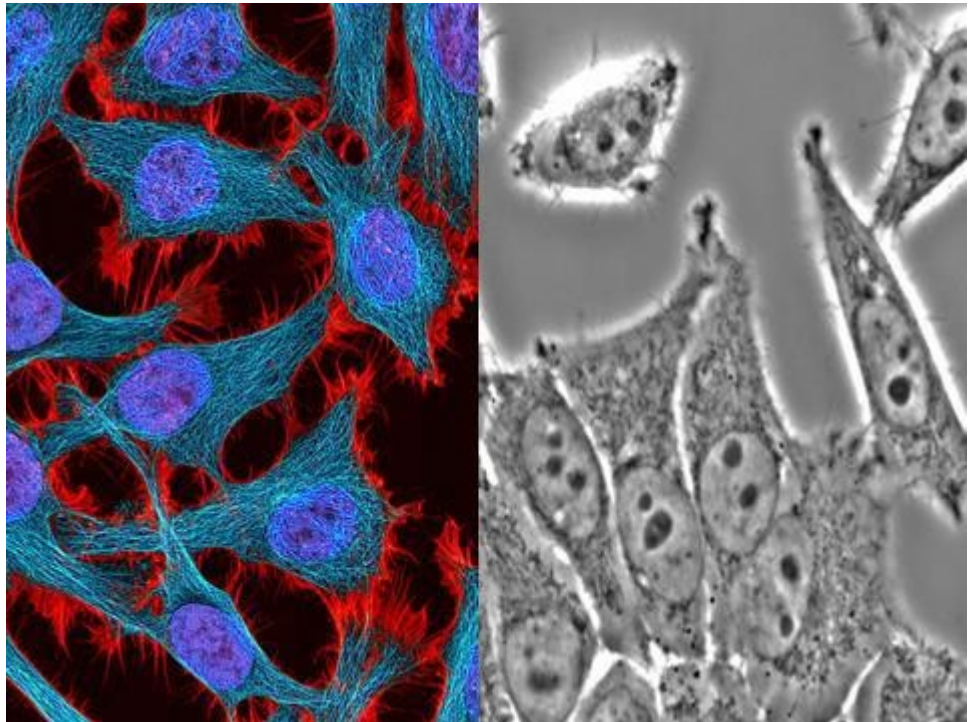


Figure 04 : Lignées de HeLa

Applications de la culture cellulaire



Systemes de modèles	15
Tests de toxicité	15
Recherches sur le cancer	15
Virologie	16
La cellule comme usine de production	16
Génie génétique	16

A. Systemes de modèles

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

- La biologie et la biochimie cellulaires de base.
- Les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies.
- Les effets des médicaments sur les cellules.

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. Recherches sur le cancer

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

Trois domaines se sont montrés plus intéressants :

- Le premier est la production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de vaccins. Ceci comprend les vaccins contre la rage, l'hépatite B, etc
- 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.

F. Génie génétique

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

Techniques de culture cellulaire



IV

Types de cellules cultivés	17
Obtention des cellules	17
Méthodes de culture	19
Condition de culture	20

A. Types de cellules cultivés

Les cellules cultivées sont généralement décrites d'après leur morphologie (forme et apparence) ou leurs caractéristiques fonctionnelles. Il existe trois morphologies de base :

1. Type épithélial : ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent plates et de forme polygonale.
2. Type lymphoblaste : ces cellules ne se fixent pas normalement à un substrat mais restent en suspension avec une forme sphérique.
3. Type fibroblaste : ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent allongées et bipolaires (Cellules normale et transformées)

B. Obtention des cellules

Au sein d'un organisme vivant, il existe deux types de cellules : les cellules **libres (circulantes)** et celles qui **vivent en cohésion** les unes avec les autres et constituent **un tissu**.

- Les cellules circulantes sont obtenues par prélèvement suivi de centrifugation.
- Les cellules organisées en tissu doivent être isolées soit par des méthodes de dissection, soit par des méthodes enzymatiques (action d'enzymes protéolytiques).

1. 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.

a) Méthode par dissection

Cette méthode est la plus ancienne. Elle a permis aux précurseurs de la culture de tissu d'obtenir les premières cellules in vitro (Culture d'**un explant**) .

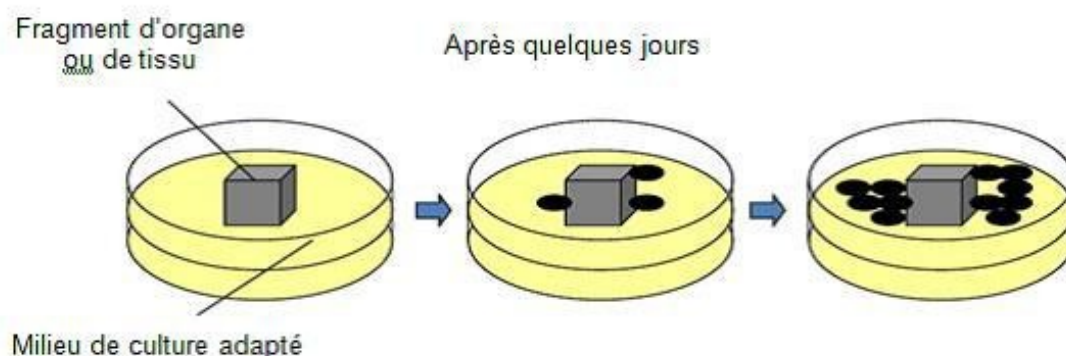


Figure 05 : Culture d'un explant

b) Dissociation enzymatique

la 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.

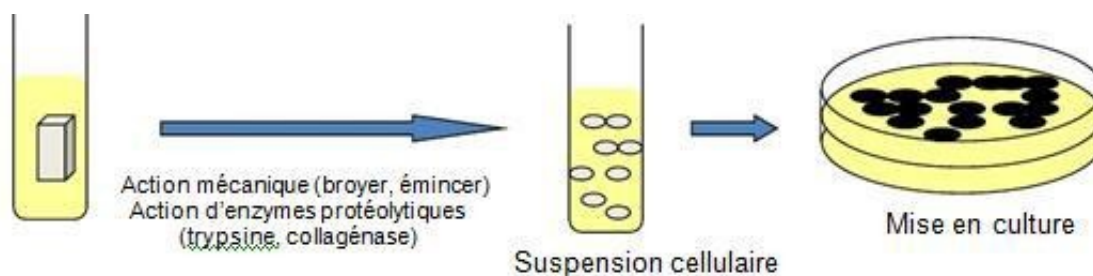


Figure 06 : Dissociation mécanique et enzymatique.

2. Culture secondaire (repiquage)

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

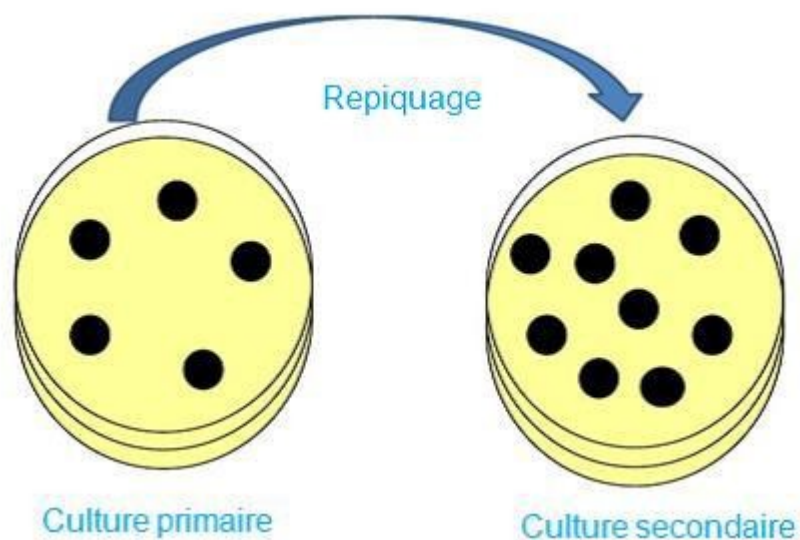


Figure 07 : Culture secondaire (repiquage).

C. Méthodes de culture

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 (**systèmes de culture monocouche**) ou à flotter librement dans le milieu de culture (**systèmes de culture en suspension**).

1. Culture stationnaire ou monocouche

Ce type de culture est basé sur l'affinité des cellules pour un support. Celui-ci peut être du verre ou du plastique. Il peut être recouvert ou non de collagène, de gélatine ou de la fibronectine.

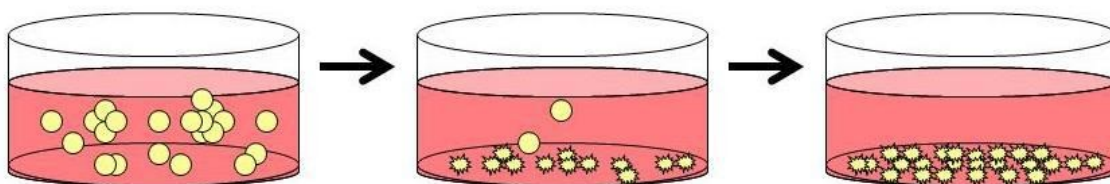


Figure 08 : Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture.

2. Cultures en suspension

Les cultures en suspension sont généralement cultivées :

- dans des flacons Spinner (rotation magnétique) ou dans des Erlenmeyers

Techniques de culture cellulaire

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, les cellules sont incapables de se fixer fermement au substrat.

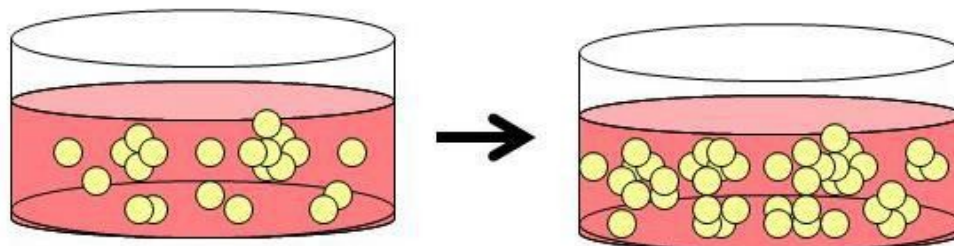


Figure 09 : Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, ...).

D. Condition de culture

Pour obtenir un environnement qui, au minimum, permet aux cellules d'augmenter en nombre par division cellulaire., il est important de fournir aux cellules certaines conditions.

1. Température

La température est généralement réglée sur la même valeur que la température corporelle de l'hôte à partir duquel les cellules ont été obtenues (36° à 37°C chez les mammifère). Cette plage de température est généralement maintenue à l'aide d'étuves soigneusement étalonnées et fréquemment contrôlées.

2. Substrat et facteurs d'adhérence

Les cellules adhérentes nécessitent également un bon substrat pour la fixation et la croissance. Le verre et les plastiques spécialement traités (pour rendre hydrophile la surface normalement hydrophobe des plastiques) sont les substrats les plus communément utilisés.

Cependant, des facteurs d'adhérence, comme le collagène, la gélatine, la fibronectine et la laminine, peuvent être utilisés pour recouvrir les substrats afin d'améliorer la croissance et la fonction de cellules normales.



Figure 10 : les substrats les plus communément utilisés en culture cellulaire.

3. Milieu de culture

Le milieu de culture est le facteur le plus important et le plus complexe à gérer pour rendre les cellules "heureuses". En plus de satisfaire aux besoins nutritionnels des cellules, le milieu de culture doit également posséder tous les facteurs de croissance nécessaires, réguler le pH et l'osmolarité, et fournir les gaz essentiels (O₂ et CO₂). On distingue 2 principaux types de milieux :

Les milieux empiriques composés :

- d'une base (sels minéraux, glucose, d'acides aminés, vitamines, tampon, indicateur de pH : rouge de phénol)
- de sérum de 2 à 20 % du volume. On utilise généralement du sérum de veau foetal.
- facteurs de croissance, protéines d'adhésion, protéines de transport, oligo-éléments.
- Il contient des inhibiteurs de protéases (inactive la trypsine utilisées lors de repiquage).
- Antibiotiques : pénicilline, streptomycine.
- Antifongiques.

Les milieux définis : ils contiennent les mêmes constituants que les milieux empiriques mais tout est quantifié. Ces milieux, bien adaptés à la culture cellulaire, peuvent être adaptés à la production, cependant ils sont chers car tous les constituants sont hautement purifiés.

4. Congélation des cellules ou cryoconservation

La cryoconservation est une méthode qui consiste à congeler les cellules, en maintenant leur viabilité, jusqu'à ce qu'elles soient décongelées des mois ou des années plus tard. Voici quelques intérêts de la cryoconservation des cellules :

- Minimiser les modifications génétiques

Techniques de culture cellulaire

- Éviter les contaminations par des micro-organismes et les contaminations croisées par d'autres lignées cellulaires
- Inhiber la transformation des caractéristiques de la croissance et l'acquisition des propriétés associées à la malignité
- Économiser du matériel et gagner du temps
- Distribution à d'autres utilisateurs

Culture des micro-organismes




La plupart du temps, les micro-organismes sont cultivés en suspension dans un milieu de culture ou sur un support nutritif semi-solide dans des boîtes de Petri. Les conditions physico-chimiques de croissance des bactéries en culture varient beaucoup, aussi bien en termes de température, pression atmosphérique, salinité du milieu, composition en biomolécules, et même parfois luminosité (exemple de certaines cyanobactéries).

Culture de cellules végétales

VI

L'avantage de la culture de cellules végétales réside dans la production pour l'industrie pharmaceutique et celle des cosmétiques de substances bioactives, par exemple de protéines thérapeutiques et de principes actifs provenant de métabolites secondaires, dans un environnement contrôlé, indépendant des influences du climat.

Les plantes ont une particularité qui les distingue de nombreux autres organismes : elles sont totipotentes. En principe, chaque cellule de plante peut régénérer une plante entière. Des fragments de tissus ou des cellules individuelles d'une plante sont prélevés et placés en laboratoire dans un milieu de culture spécial, où les cellules peuvent se développer et se diviser. Une plante entière peut ainsi être régénérée à partir d'un tissu développé en laboratoire.

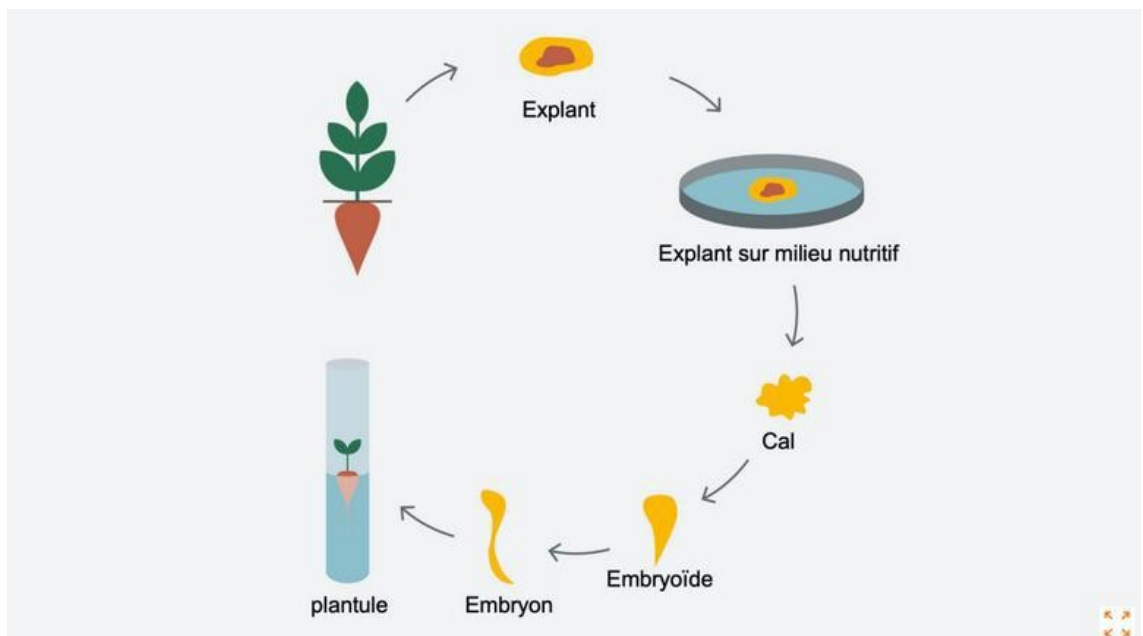


Figure 11 : Culture des cellules végétales.