

CULTURE CELLULAIRE

2022/2023 - Dr Naouel AILANE

1 Introduction/Définitions

La culture cellulaire regroupe l'ensemble des techniques de laboratoire qui permettent de maintenir des cellules vivantes en dehors de l'organisme dont elles sont issues. Ces cellules ne sont pas organisées en tissus et conservent leur capacité à se multiplier et/ou à se différencier in vitro.

La culture cellulaire fait partie intégrante des démarches biotechnologiques, la biotechnologie étant la fusion entre la biologie et la technologie. En santé, les méthodes biotechnologiques sont utilisées pour produire différentes substances (réactifs, vaccins, médicaments...) ou pour mieux comprendre une maladie.

2 Culture des cellules animales

2.1 Origine et obtention des cellules

Selon que les cellules soient circulantes (cellules sanguines, lymphatiques) ou appartenant à un tissu solide (cellules adhérentes), les techniques d'obtention diffèrent.

2.2 Différents types de cultures cellulaires

2.2.1 Culture primaire :

C'est le premier mélange cellulaire obtenu directement du tissu. Les cellules dans ce type de culture se divisent toutes les 2 à 3 semaines.

Avantages : ce mélange cellulaire s'approche le plus de l'environnement réel de la cellule.

Inconvénients : *tous les types cellulaires du tissu y sont.

*La quantité des cellules d'intérêt est faible.

*Temps limité de culture (30-50) repiquages.

2.2.2 Lignées cellulaire

Il s'agit d'une population homogène qui a acquis artificiellement une résistance à la mort cellulaire (apoptose) et qui pourrait ainsi se multiplier indéfiniment : on dit qu'elle est immortalisée. Cette propriété correspond à une modification génétique provoquée par l'utilisation d'un virus.

Dans les lignées cellulaires, on retrouve les lignées tumorales qui sont spontanément résistantes à l'apoptose suite à l'accumulation de plusieurs mutations.

Les cellules normales immortalisées se divisent tous les 2 à 3 jours tandis que les cellules tumorales toutes les 24h.

Avantages :

Pour les lignées immortalisées :

*Matériel en grande quantité pour réaliser tout type d'expérimentation.

*Maintenues longtemps en culture cellulaire.

Pour les lignées tumorales : Maintenues indéfiniment en culture cellulaire.

Inconvénients :

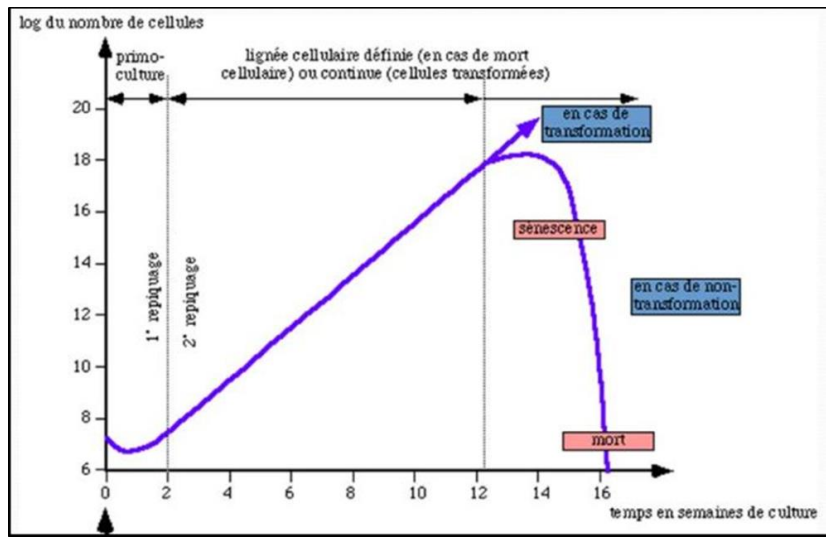
Pour les lignées immortalisées :

Le caractère immortalisé est acquis par l'introduction de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques. Par conséquent les fonctions cellulaires ne sont pas tout à fait conservées.

Pour les lignées tumorales :

Les cellules dans ces lignées ont cumulé un grand nombre de mutations et continuent tout au long de la culture à en accumuler.

2.3 Longévité des cultures cellulaires



3 Conditions expérimentales nécessaires à la culture cellulaire

Pour réussir la culture cellulaire il faut respecter les conditions d'asepsie, travailler avec le matériel approprié et utiliser les solutions adaptées.

3.1 Asepsie

La culture cellulaire fait appel à des conditions de stérilité absolue. La moindre contamination peut engendrer la mort des cellules.

3.1.1 Les locaux :

En fonction des expériences réalisées sur les cellules qui peuvent parfois utiliser des agents infectieux, on distingue 4 types de laboratoire de culture (L1, L2, L3, L4,) où le matériel utilisés et les mesures entreprises sont très différents.

Type de confinement	Risque	Exemples
L 1: Risque faible	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pas de maladie 2. Agent infectieux peu susceptible d'être transmis 	*Levure (de bière)
L2: Risque modéré	<ol style="list-style-type: none"> 1. Maladie pouvant être sévère et transmissible 2. Danger pour le travailleur 3. Existence de prophylaxie et de traitement efficaces 	*vibrio cholerae *Hépatite A
L3: Risque fort	<ol style="list-style-type: none"> 1. Maladie grave voire mortelle 2. Danger sérieux pour le travailleur 3. Transmission limitée 4. Existence d'une prophylaxie ou traitement efficace 	*HIV *Mycobactérium tuberculosis
L4: Risque majeur	<ol style="list-style-type: none"> 1. Maladie mortelle sur le plan individuel et collectif 2. Danger sérieux sur le travailleur 3. Aucun traitement et aucune prophylaxie connus 	*Ebola *COVID-19

3.1.2 Les PSM

Les postes de sécurité microbiologiques sont des hottes spécialement conçues pour assurer la protection de l'échantillon contre toute contamination, mais avant cela, leur rôle principal est de garantir la sécurité du manipulateur et de l'environnement.

Comme pour les laboratoires, il existe plusieurs types de PSM. Le choix du bon PSM est en fonction du germe manipulé.

3.2 Le matériel :

3.2.1 Support

On utilise des contenants dont la taille et la forme diffèrent selon les besoins de l'expérience.

Il s'agit de boîtes en polystyrène stériles optiquement claires qui ne présentent aucune toxicité pour les cellules. Dans ces boîtes, les cellules adhérentes se développent en tapis au fond et présentent la notion d'inhibition de contact tandis que les cellules non-adhérentes poussent tout en restant en suspension.

3.2.2 Incubateurs

Il s'agit d'étuves où les cellules sont cultivées dans des conditions aérobie à 37°C avec 5% de CO₂ sous forme gazeuse et 80 à 85% d'hygrométrie.

3.2.3 Microscope inversé en contraste de phase

Le microscope inversé est ainsi appelé à cause de l'ampoule placée au-dessus de l'échantillon et des objectifs situés en-dessous ce dernier.

Le contraste de phase est une technologie apportée au microscope qui permet de transformer les différences de réfraction de la lumière en contraste. Il devient possible de visualiser des structures à la base transparentes. Ce microscope trouve tout son intérêt en

culture cellulaire car il permet de mieux distinguer les composants de la cellule notamment les prolongements cellulaires.

3.2.4 Centrifugeuse

3.2.5 Poubelles biologiques et déchets (risque biologique)

Elles sont traitées par des entreprises spécialisées de manière à éviter la contamination de l'environnement. Ce traitement diffère en fonction du niveau de confinement du laboratoire.

3.2.6 Congélation des cellules dans l'azote liquide

Il est important dans un laboratoire de culture cellulaire d'avoir une cellulothèque qui serait comme un réservoir de cellules.

3.3 Les milieux de culture cellulaire

Le milieu de culture cellulaire doit être stérile. Il doit répondre aux exigences de la cellule et substituer les différents éléments qui lui manquent.

- Il existe une base commune à tous les milieux qui comprend : eau, sels minéraux, glucose (source de carbone), système tampon (HCO_3^-) et un indicateur de pH. Ce dernier permet de suivre les variations du pH : quand le pH est <6.8 la couleur du milieu vire vers le jaune, quand le $\text{pH} > 8.4$ elle change et devient rouge violet. Entre les deux le milieu reste rouge (aspect normal).
- En fonction des cellules cultivées et des conditions expérimentales, certains milieux peuvent contenir des compléments variables : AA, vitamines, cofacteurs, ribose et désoxyribose...
- Certains éléments sont à ajouter juste avant l'utilisation du milieu :
 - Un cocktail d'antibiotiques et d'antifongiques (ATB: Penicilline G, Streptomycine, Amphotéricine B).
 - Sérum de veau fœtal décomplémenté : qui apporte les différents facteurs de croissance et de différenciation nécessaires à la cellule.
 - Glutamine (AA essentiel non synthétisé par les cellules).

4 Entretien des cultures cellulaires

Le milieu doit être régulièrement changé afin d'éviter l'épuisement des réserves (tous les 2 à 3 jours). Quand les cellules arrivent à confluence, il devient impératif de les repiquer.

5 Culture cellulaire et médecine

L'apport de la culture cellulaire à la médecine est précieux. En effet, la compréhension du fonctionnement et de la physiologie de la cellule était à l'origine d'innombrables avancées lesquelles ont contribué à l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge de l'Homme. A nos jours, la culture cellulaire conserve son titre de méthode de référence et reste irremplaçable

5.1 En recherche médicale:

La culture cellulaire fournit le matériel nécessaire pour :

1. La recherche fondamentale: étude du métabolisme et de différents phénomènes comme la migration cellulaire, apoptose...
2. La Génomique, la transcriptomique et la protéomique qui sont les piliers du développement de la médecine personnalisée.
3. L'étude des mécanismes d'action des agents infectieux et le développement de substances pour lutter contre.
4. Des études toxicologiques : les nouvelles drogues sont d'abord et toujours testées in vitro sur des cellules vivantes.
5. Des études in vivo : Les cellules peuvent être implantée à des animaux afin de tester de nouvelles molécules thérapeutiques.

5.2 En pratique médicale :

1. Greffe de cellules souches directement ou après adressage vers un type cellulaire spécialisé.
2. Utilisation des cultures cellulaires en industrie pharmaceutique pour la production de différentes substances: anticorps, hormones, vaccins, insuline, réactifs...
3. Préparation de peau à partie de cultures cellulaires pour les grands brûlés.