

Etapes de réalisation d'une culture cellulaire

Culture de tissus

Dissociation enzymatique ou/et mécanique du tissu en cellules

Mise en culture des cellules

Culture primaire de cellules

repiquage

Culture secondaire de cellules

repiquage

Nouvelle culture secondaire.....

Les cellules

Les cellules en culture peuvent être des cellules libres bactéries ou levures ou des cellules "saines" prélevées à partir d'un organe (biopsie,...)

On distingue 2 types de cellules:

Les cellules libres et circulantes comme les cellules du sang obtenues par prélèvement et centrifugation

Les cellules constituant un tissu obtenues par des méthodes de dissection et la méthode par digestion enzymatique.

Les cultures cellulaires

-sont les cellules qui ne peuvent habituellement être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (limite de Hayflick).

-des cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'"immortalité en culture").

Culture des micro-organismes: La plupart du temps, les micro-organismes sont cultivés en suspension sur un support nutritif semi-solide dans des boîtes de Petri.

Culture des cellules animales: Les cellules animales sont généralement cultivées en incubateurs, à une température de 37 °C et dans une atmosphère très humide à teneur en CO₂ contrôlée, souvent 5%.

Certaines cellules sont cultivées en suspension dans leur milieu nutritif (cellules non-adhérentes), d'autres sur des plastiques traités leur offrant des capacités d'adhérence.

Les techniques de culture:

La culture stationnaire ou monocouche:

Le support peut être du verre ou du plastique traité pour la culture. Le plastique peut être recouvert de support physiologique: collagène, fibronectine ou d'une membrane basale reconstituée ou encore l'utilisation de gel d'agarose, de collagène.

Les cellules sont placées dans des boîtes micropuits de diamètres différents ou sur des microporteurs (microbilles en plastique) recouverts ou non de support physiologique. Les microporteurs sont ensuite placés dans des récipients puis soumis à une agitation modérée et continue permettant aux cellules de demeurer dans le milieu de culture.

La culture en suspension:

Comme la plupart des cellules ont besoin d'un support pour croître, il faut donc trouver un artifice pour maintenir la plupart de celles-ci en suspension sous agitation.

milieu de culture

- optimisation des conditions "atmosphériques" (ajout d'oxygène...)
- optimisation de la composition des milieux nutritifs (ajout de certaines hormones,...)
- optimisation des supports (composition en biomolécules,...)
- culture sous agitation
- co-culture avec des cellules "nourricières"
- culture sur des tissus préalablement "tués" par un procédé de congélation/décongélation
- inclusion dans des gouttelettes d'alginate

Contrôles fonctionnels des cellules en culture:

Deux caractéristiques sont à considérer:

- La prolifération des cellules.
- La préservation des fonctions spécialisées.

Les contrôles réalisés pendant la préparation d'une culture:

Lors de la dissection : augmenter la dose d'antibiotique et fongique si nécessaire.
la viabilité cellulaire :

Dans un tissu, il existe plusieurs types de cellules, pour séparer un type cellulaire. Cela est réalisé: Les cellules sont diluées de façon à ce que chacune prolifère en formant un clone lorsqu'elles adhèrent à la surface. Il suffit alors d'isoler le clone par méthodes de séparation physique :

- centrifugation différentielle en gradient de Ficoll
- chromatographie d'affinité
- cytométrie de flux
- électrophorèse.

Le contrôle de la viabilité des cellules :

grâce à des colorants vitaux tels que le rouge neutre incorporé dans les lysosomes des cellules vivantes ou grâce à des colorants d'exclusion tels que le bleu Trypan pénétrant dans les cellules mortes .

Le bleu de trypan est un colorant qui a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue. Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues.

On vérifie la morphologie des cellules au microscope et la présence d'un marqueur biochimique spécifique du type cellulaire:

Vérifier la morphologie des cellules au microscope ainsi que l'adhérence de celles-ci. Le manque d'adhérence peut dévoiler l'absence de place pour la croissance des cellules, l'inadéquation du support, un milieu "usé". Le remplacement du milieu s'effectue tous les 2 à 3 jours. Le milieu doit être neutre (pH 7,2 à 7,4). Inférieur à 6,5 la viabilité des cellules est menacée. Il est donc important d'utiliser un indicateur pour vérifier l'acidité du milieu comme

le rouge de phénol dont le pH à l'équivalence se situe dans sa zone de virage (entre 6,6 et 8,4). En dessous de 6,6 le rouge de phénol vire au jaune.

Les techniques d'entretien

Changer le milieu par aspiration pour les cellules adhérentes. Les cellules en suspension seront soumises à une centrifugation. Lorsque la population cellulaire est confluente, on rince le milieu avec une solution EBSS (solutions salines équilibrées de Earle) et on utilise de la trypsine afin de détacher les cellules cultivées sur boîte de Pétri pour ensuite les répartir sur d'autre flacon.

La conservation

cryoconservation. : La conservation des cellules est indispensable pour les cellules à durée de vie limitée et pour les cellules difficiles à entretenir.

La conservation de longue durée se réalise dans de l'azote liquide à -180°C . La conservation de court durée se réalise à -20°C .

Les cellules sont placées en présence de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), de FCS à 10% et de DMSO (diméthyle sulfoxyde) à 10% ou de glycérol (Le DMSO et le glycérol sont des agents cryoprotecteurs) dans des tubes de congélation de 1ml. La concentration des cellules doit être de 10 milliards de cellules par ml.

La décongélation des cellules se fait de manière rapide, en plaçant celles-ci sous une ampoule dégageant une température de 37°C .

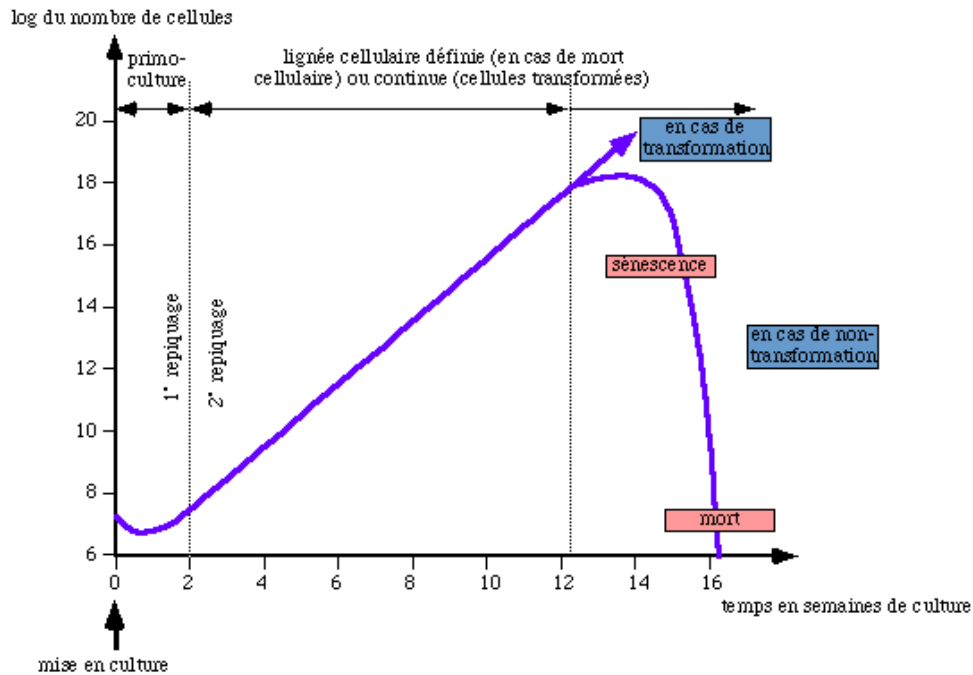
L'évolution des cellules en culture:

Les cellules in-vitro présentent 2 propriétés fondamentales qui sont: la capacité proliférative et leur fonction différenciée.

Les cellules conservent la plupart du temps leur potentiel de division, pouvant être stimulé au début de la culture par des facteurs de croissances. Même si au cours du temps, on peut noter un ralentissement de celui-ci. A l'inverse, les cellules en culture voient souvent leur fonction différenciée se modifier et même disparaître. Ce phénomène de dédifférenciation peut être visible morphologiquement.

Cycle de croissance d'une lignée cellulaire en culture in vitro

C'est le même pour tous les types cellulaires (de la bactérie aux cellules humaines).



- **1° cas** : Après un certain nombre de repiquages, représentant entre 30 et 60 mitoses (très approximativement), on constate que les cellules cessent de se multiplier et meurent (**apoptose**).

En effet, sur un signal de nature inconnue, les cellules lancent un programme d'apoptose conduisant à leur mort par lyse. Peut-être est-ce liée à la **perte des télomères** des chromosomes par absence dans les cellules d'activité de la télomérase. On constate en effet que les chromosomes se raccourcissent au cours des cycles cellulaires successifs. On ne pourra donc, à partir de la culture primaire, obtenir une culture continue comme avec les bactéries. Il existe pourtant de telles lignées, dites transformées.

- **2° cas** : Très rapidement, il est apparu que certaines **cellules tumorales**, se multipliant activement ne présentent plus ce mécanisme de mort programmée : elles sont **transformées** ce qui explique en partie le processus tumoral. Les mécanismes de contrôle ont été inhibés par une modification du DNA, liée soit à des mutations, soit à l'intégration de DNA étranger. Ce même mécanisme peut être obtenu pour les lymphocytes B par infection par un virus, **[l'EBV ou Epstein Barr Virus](#)**. Les cellules souches peuvent présenter un tel phénomène.