

Culture cellulaire



1. Généralités

Culture cellulaire

La culture cellulaire:

Est le maintien en dehors de l'organisme un **milieu artificiel**, des cellules **non organisées en tissu** mais capable de se diviser *in vitro* et **d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques.**



Culture cellulaire

Culture cellulaire

Ces techniques sont liées au développement des biotechnologies.



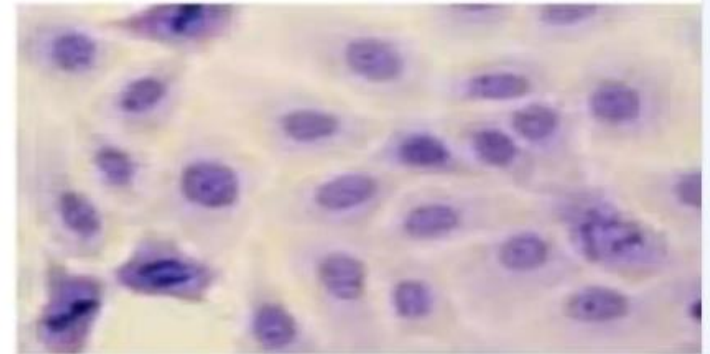
Elles ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques des mécanismes biochimiques sans avoir recours à l'expérimentation *in vivo*.

Different Types de Cellules

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 a un substrat et apparaissent plates et de forme polygonale

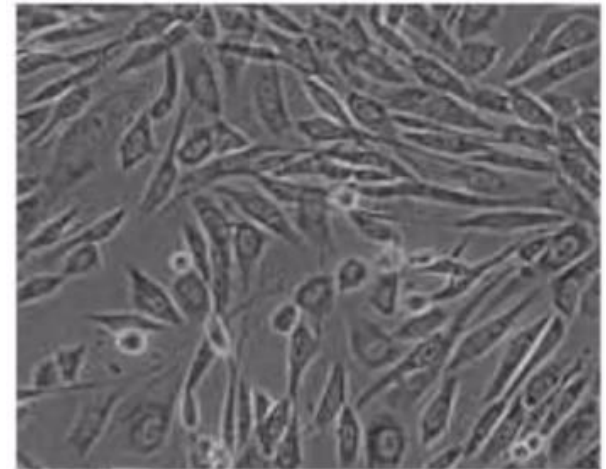


Lignée cellulaire de type épithélial (Cl-9) dérivée de foie de rat. Les cellules mitotiques indiquent que cette culture est en croissance active.

Different Types de Cellules

2. Type lymphoblaste: ces cellules ne se fixent pas normalement a un substrat mais restent en suspension avec une forme sphérique

3. Type fibroblaste: ces cellules sont attachées a un substrat et apparaissent allongées bipolaires et bipolaires



Cellules de type fibroblaste 3T3
dérivées d'embryons de souris.

Les Types de Culture Cellulaire

Il existe trois types de culture cellulaire:

1. Culture primaire
2. Culture secondaire
3. Lignée cellulaire

❑ La culture primaire

- Les cellules des tissus sont dispersées par hydrolyse enzymatique des protéine constituant la matrice extracellulaire. 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 monocouche cellulaire.)

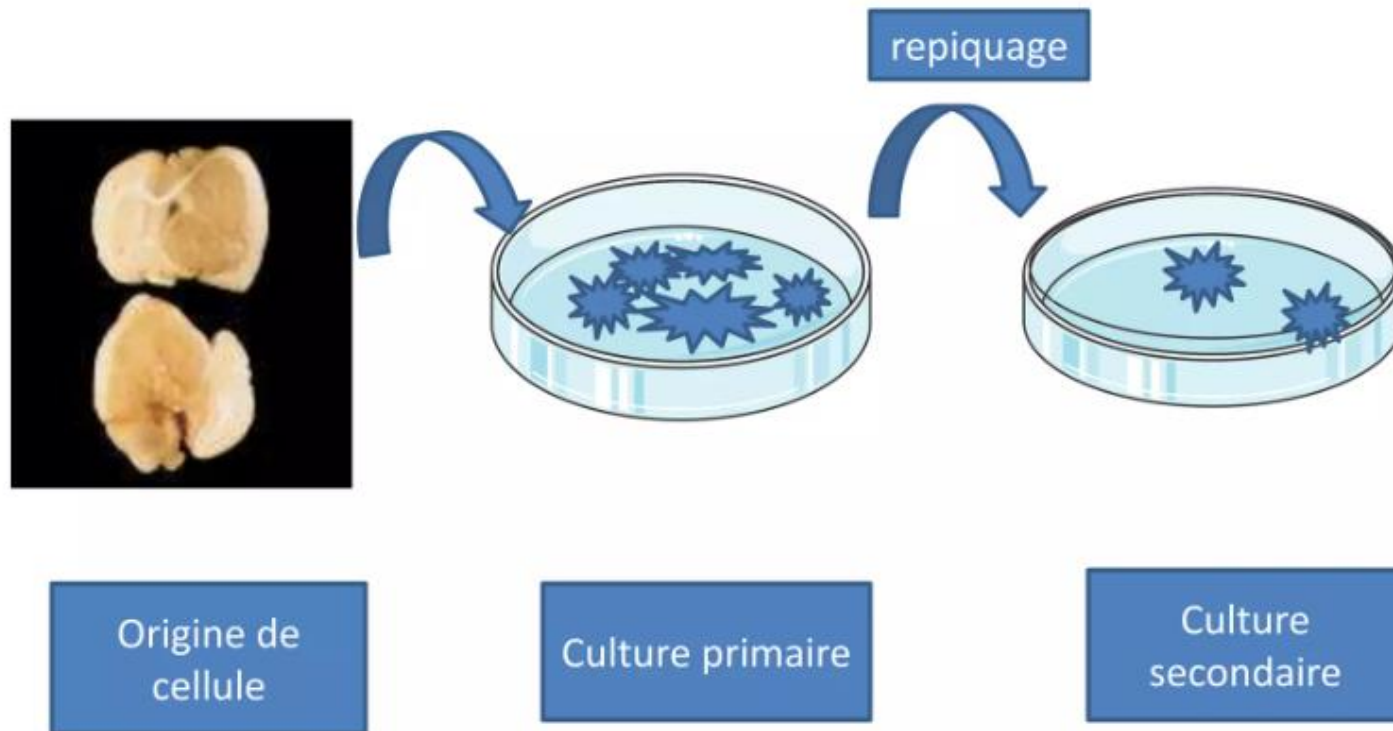


❑ La culture secondaire

- Ce sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour ensemencher 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.



☐ Culture secondaire



❑ Les lignées cellulaires

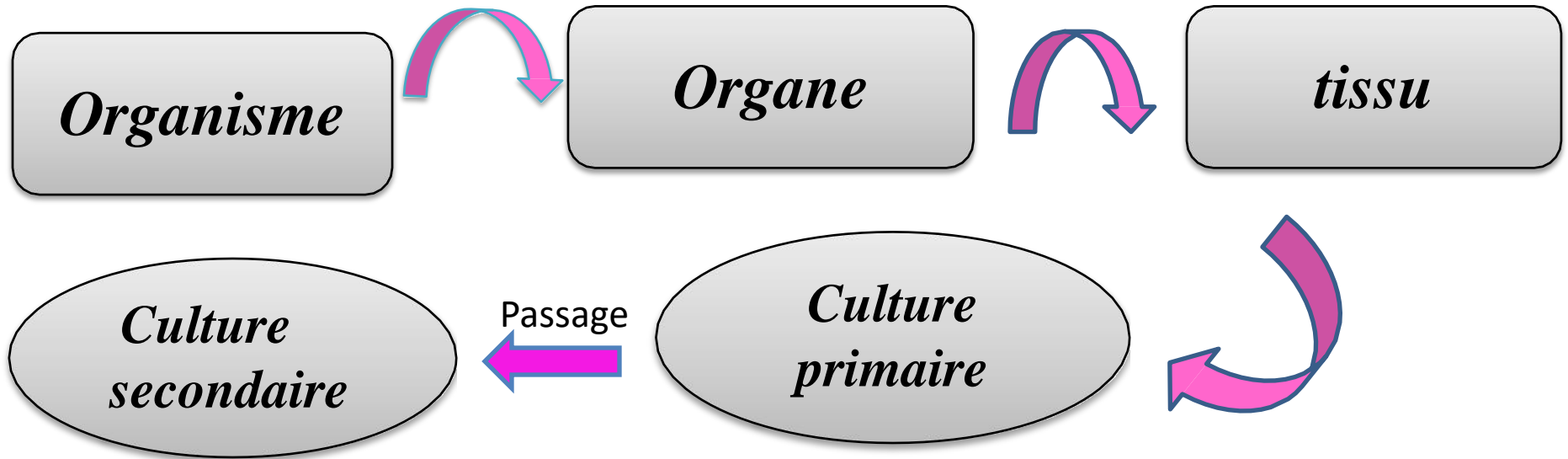
- (durée de vie indéfinie) : les cellule qui ont subi des modification génétique qui permettent leur croissance indéfini , elles proviennent de tumeurs spontanées ou de cellule transformées par immortalisation.



I-Culture cellulaire animale

Culture cellulaire animale

Les étapes de la culture cellulaire



Culture de cellule non immortalisé:

- Nombre de division limité
- Représentatives de l'état physiologique *in vivo*

Culture cellulaire animale

1. Etablissement de la culture primaire

➤ Obtention des cellules

Il existe 2 types de
Cellules

▪ Cellules circulantes

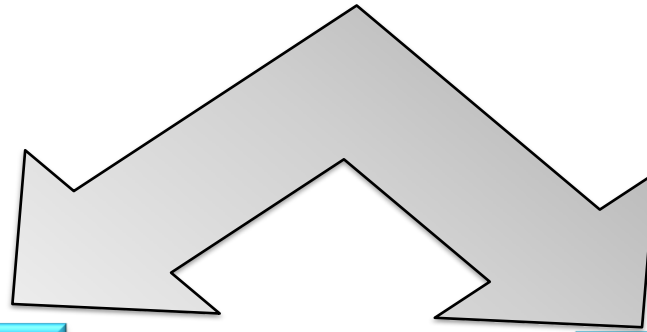
Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension (sang, lymphe, ascite, épanchement pleural)

▪ Cellules cohésives (prélèvement tissulaire):

**Culture sur support
adhésion des cellules sur
la paroi au fond du flacon
ou de la boîte de culture**

Culture cellulaire

Etablissement de la culture à partir d'un tissu solide



**La méthode
par dissection**

**La méthode
enzymatique**

Idéale pour les fragments de petites tailles.

- ❖ La méthode de dissection
- ❖ La méthode de Carrel
- ❖ La méthode Jensen
- ❖ La méthode mécanique pour tissus mous

Culture cellulaire

Etablissement de la culture à partir d'un tissu solide

➤ *Méthode enzymatique:*

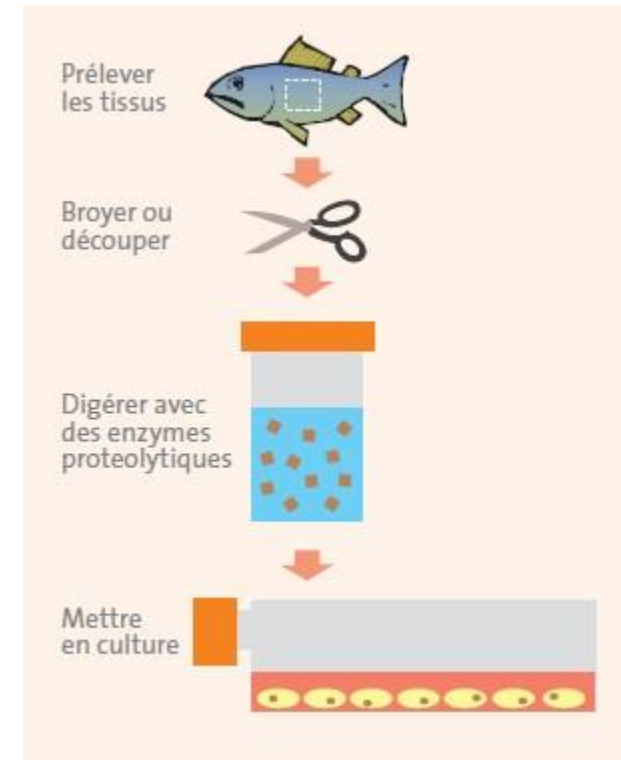
Repose sur la digestion enzymatique de **la trame protéique entourant** les cellules, permettant ainsi leur libération.

En utilisant des enzymes protéolytiques expl: **la trypsine, la collagénase**, la hyaluronidase, l'élastase, la dispase ou encore la papaine.

Un mélange enzymatique peut être également utilisé

Exemple, fragment de l'encéphale,

0,002% de DNase de type 1, 0,01% de hyaluronidase de type V et 0,1% de collagénase de type IV dans un milieu avec 1 à 3 heures d'incubation à 37°C.



Dissociation enzymatique

Adapter la concentration des enzymes à la nature du tissu traité de façon à obtenir la meilleure dissociation possible sans atteinte des membranes cellulaires.

Culture cellulaire

Etablissement de la culture à partir d'une suspension cellulaire.

C'est une culture plus facile à réaliser

Centrifugation du prélèvement

**20 min à 3000g à
4°C**

culot cellulaire

Remis en suspension dans une solution tampon de PBS.

Matériels et Equipements de Culture cellulaire

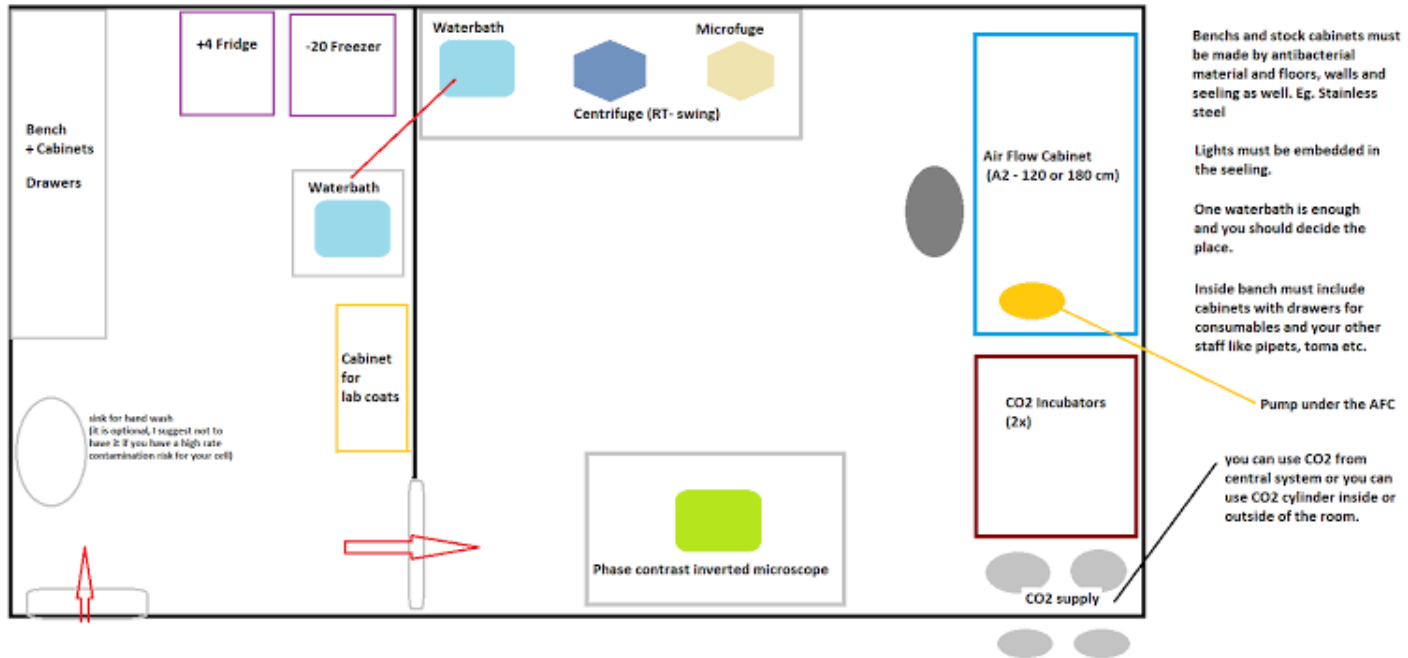
Culture cellulaire

La salle de culture cellulaire

- ❑ La salle de culture cellulaire doit être agencée de façon à limiter au maximum le trafic du personnel.

- ❑ La salle est dotée de :
 - Un ou plusieurs postes de sécurité microbiologique (PSM);
 - Un bain-marie;
 - Un ou plusieurs incubateurs à dioxyde de carbone (CO₂);
 - Un ou plusieurs microscopes inversés;
 - Une ou plusieurs centrifugeuses;
 - Un lavabo ou point d'eau;
 - Matériel et des instruments spécifiques à la manipulation cellulaire: verrerie stérile, flacon de culture, boîte de Pétri, pipettes et pipeteurs stériles...etc

Agencement salle de Culture cellulaire



Culture cellulaire

Méthodes de culture

➤ Méthode de culture stationnaire ou en monocouche

Repose sur l'affinité des cellules au support, leur permettant ainsi d'y adhérer et de s'y développer. Exp: **polystyrène**, polycarbonate, le polytétrafluoroéthylène, ou le polyvinyle



Plaques 384 puits



Plaques 96 puits



Plaques 6 puits



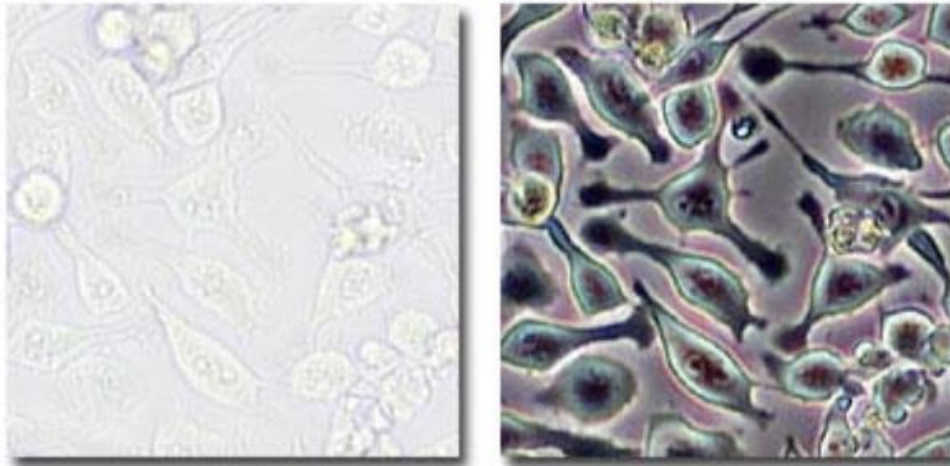
Flasques de culture



II. Microscopie à contraste de phase

Imagerie d'objets de phase (objets transparents: cellules et microorganismes)
Transforme des petits déphasages en variation d'amplitude

Living Cells in Brightfield and Phase Contrast



Échantillons minces non colorés sont transparents en fond clair.

Pourtant : suivant structure traversée par la lumière, **différence de phase différentes...**

MAIS l'œil et les détecteurs ne sont sensibles qu'aux changements d'intensité ou de couleur...

Pendant longtemps : fixations-colorations abîment les cellules, contraste de phase les respecte

Culture cellulaire

La salle de culture cellulaire

Postes de sécurité microbiologique (PSM)

-Dits aussi **hottes à flux laminaire**, au sein de laquelle doivent s'effectuer toutes les manipulations.

-Permettent de générer un flux d'air purifié afin d'éviter toute contamination de l'air extérieur, du manipulateur et/ou de la manipulation selon le type de hotte utilisé.

Ce flux est généré par l'air est prélevé depuis l'extérieur puis est traité à l'aide d'un filtre absolu: un filtre **HEPA (High Efficiency Particulate Air)**.



Culture cellulaire

Postes de sécurité microbiologique (PSM)

Selon le type de hotte le devenir de ce flux n'est pas le même: il existe

✓ les hottes à flux horizontal (**PSM type I**)

✓ les hottes à flux vertical (**PSM type II**)

-Dans le cas de **hottes à flux horizontal**: l'air est propulsé horizontalement vers le manipulateur et est rejeté dans le milieu extérieur sans être retraité.

Ce dispositif permet une **protection de la manipulation mais pas du manipulateur ni de l'environnement.**

-Dans le cas de **hottes à flux vertical**, l'air filtré est propulsé du **haut de la hotte** pour ensuite être évacué soit par l'ouverture frontale, permettant une protection similaire à celle des hottes à flux horizontal, soit par des perforations situées derrière le plan de travail pour être rejeté dans le milieu extérieur après passage par un second filtre absolu.

Ce fonctionnement permet à la fois une **protection du manipulateur, de la manipulation et de l'environnement**

Culture cellulaire

Postes de sécurité microbiologique (PSM)

Les PSM de classe 3: ce sont des systèmes complètement clos, encore appelés «boîtes à gants», où le manipulateur n'est jamais en contact direct avec le matériel.

L'air utilisé est filtré avant et après passage dans la hotte permettant une protection totale du manipulateur, de la manipulation et de l'environnement.

Ce dispositif est utilisé dans le cas de **dangers biologiques plus importants (ex: manipulation de virus).**

Quelle que soit la nature du PSM utilisé:

- *la qualité des flux d'air et l'intégrité des filtres HEPA doivent être vérifiées **tous les 6 à 12 mois**, et une asepsie rigoureuse doit être respectée lors de leur utilisation*

- *la hotte doit être **allumée 10 à 20 minutes avant toute utilisation**, et le plan de travail doit être nettoyé à l'éthanol avant et après chaque manipulation.*

- *Certains PSM peuvent être équipés d'une lampe à **rayon ultra-violet** permettant une stérilisation du plan de travail.*



Culture cellulaire

Incubateur et environnement physico-chimique

Un incubateur : une enceinte thermostatée dans les laboratoires (salle de culture cellulaire).

Généralement réglés à **37 °C** et équipés d'une arrivée **de CO₂** et d'un bac d'eau pour obtenir une atmosphère à **5 % de CO₂ et environ 98 % d'humidité**.

L'enceinte est habituellement faite en **acier inoxydable** et équipée d'une **double porte**.

L'incubateur est muni de divers boutons de réglage (la température, le pH, l'hygrométrie, la composition gazeuse de la chambre ...etc).

Culture cellulaire

Équilibre du pH en culture cellulaire

- Le pH optimal ne sera **pas le même selon** le type de cellules cultivées, et va dépendre de l'organisme à partir duquel elles sont issues.
- Le pH du milieu de culture et le pH intracellulaire sont des facteurs clés du bon fonctionnement métabolique.
- Ainsi, pour les cellules de mammifère, il est établi qu'il doit se situer dans les normes sanguines soit entre **7,2 et 7,4**.
- Toute variation du pH peut entraîner des conséquences graves sur la croissance cellulaire

Culture cellulaire

Équilibre du pH en culture cellulaire

Le **pH** intracellulaire peut agir de façon directe ou indirecte **sur le cycle cellulaire** et sur la **régulation de l'apoptose**

Effet direct du pH

- Une modification de 0,2 unite au dessus des norms physiologiques entraîne une **augmentation temporaire de l'apoptose cellulaire** avec un retour rapide au niveau initial.
- Pour des valeurs au-delà de ces seuils, toute croissance cellulaire est inhibée de façon irréversible.

Effet indirecte,

- une modification du pH peut entrainer une **diminution de la croissance cellulaire** en modifiant le **métabolisme cellulaire** ou la **synthèse des protéines**, via le métabolisme du glucose
- **toute augmentation du pH entraine une augmentation de la consommation de glucose, ainsi qu'une modification de la glycosylation responsable d'anomalies structurales des protéines**

Culture cellulaire

Équilibre du pH en culture cellulaire

- Une modification du pH peut être observée **en cas de contamination** de la **culture**,
- ❖ **Alcalinisation** du milieu cellulaire en cas de **contaminations fongiques**
- ❖ **Acidification** du milieu lors de **contaminations bactériennes** ou **mort cellulaire**.

En plus, la culture cellulaire peut être également sujette à

- ❖ une **acidification spontanée** du milieu en raison du dégagement de CO₂ généré par le métabolisme cellulaire lorsque le nombre de cellules devient trop important, ou, lors de mort cellulaire,
- ❖ une **basification** provoquée par la libération de **protéines alcalinisantes** au cours de la **lyse des cellules**.

Culture cellulaire

Équilibre du pH en culture cellulaire

Les variations de pH peuvent être mises en évidence par des **indicateurs colorés** de pH inclus dans le milieu de culture.

Le plus couramment employé est le **rouge de phénol**, dont la zone de virage correspond aux valeurs de pH que l'on veut maintenir pour la culture cellulaire, entre **7,2 et 7,6**.

En fonction du pH, on observera les colorations suivantes:

- pH = 6,5: coloration jaune
- pH = 7,0: orange
- pH = 7,4: rouge
- pH = 7,8: violet

Un milieu avec un **pH bien régulé** aura donc une coloration plutôt **rouge-orangé**.

Culture cellulaire

Équilibre du pH en culture cellulaire

Afin de réguler ce pH du milieu et le stabiliser, des systèmes tampon peuvent être utilisés, systèmes pouvant faire intervenir les réglages et paramètres de l'incubateur.

Deux systèmes tampons sont utilisés habituellement:

➤ le système tampon Sodium bicarbonate NaHCO_3 (fréquemment utilisés, nécessite l'utilisation d'une étuve à CO_2 et des concentrations élevées de bicarbonate dans le milieu)

➤ le tampon organique HEPES. constitué d'une molécule organique, l'acide[(hydroxyéthyl-2)-4-pipérazinyl-1-]-2-éthane sulfonique ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$).
- Cette molécule possède des charges ioniques de signe opposé, lui conférant le pouvoir de se **comporter soit comme une base soit comme un acide selon le pH du milieu**, et donc **d'exercer un rôle tampon très efficace** (composé zwitterionique)

Culture cellulaire

2. Environnement gazeux

L'environnement cellulaire doit être un mélange :

- Azote,
- Oxygène,
- CO₂
- Vapeur d'eau.

Culture cellulaire

2. Environnement gazeux

Azote le taux d'azote est identique à la concentration de l'air, soit environ 78%.

Oxygène la teneur optimale en oxygène varie selon le type cellulaire: la majorité des cellules se cultivent en:

❖ **Normoxie**: une teneur de **21% d'oxygène ambiant**.

➤ **Hyperoxie** devient **toxique** pour les cellules **au-delà de 50%**,

➤ **Hypoxie** peut être **bénéfique** dans certains cas (chez les cellules embryonnaires qui présentent une augmentation de leur capacité proliférative sous **faible tension en oxygène (5%)**).

Culture cellulaire

2. Environnement gazeux

CO₂

CO₂: cette concentration est particulièrement importante lorsque le système **tampon bicarbonate** est utilisé.

Elle est alors maintenue entre **5-10%** de l'air ambiant.

Le taux de CO₂ intervient également au **niveau de la prolifération cellulaire**, dans la **synthèse des bases puriques et pyrimidiques**.

➤ Le CO₂ n'est pas un besoin métabolique pour les cultures cellulaires.

Son but est de se dissoudre dans le milieu de culture cellulaire où une petite portion **réagit avec l'eau pour former de l'acide carbonique** qui à son tour **interagit avec sa base conjuguée** (càd, **les ions bicarbonate dissous dans le milieu**) afin de **contrôler un pH physiologique** stable grâce au **système tampon bicarbonate**.

Culture cellulaire

2. Environnement gazeux (suite)

H₂O:

H₂O: L'atmosphère doit être saturée en vapeur d'eau pour **limiter les phénomènes d'évaporation**.

Ce phénomène est responsable d'une augmentation de l'osmolarité dans le milieu de culture et donc de la concentration en sel, entraînant alors une lyse cellulaire par appel d'eau à l'extérieur de la cellule.

L'osmolarité du milieu doit être maintenue autour de **270 milliosmoles** pour la majorité des cultures cellulaires avec une **saturation en vapeur d'eau** se situant autour de **84 à 85%**.

Culture cellulaire

3. Température

La température optimale pour la croissance des cellules **de mammifère** se situe entre **35,1°C et 37,1°C** et nécessite ainsi une conservation des cultures cellulaires dans un incubateur maintenant une température aux alentours **de 37°C**.

Certaines cellules peuvent croître et proliférer à des températures plus basses, mais quel que soit le type cellulaire, les hautes températures sont généralement **mal supportées** avec une **augmentation de la mortalité** très marquée **au-dessus de 40°C**.