

Culture cellulaire

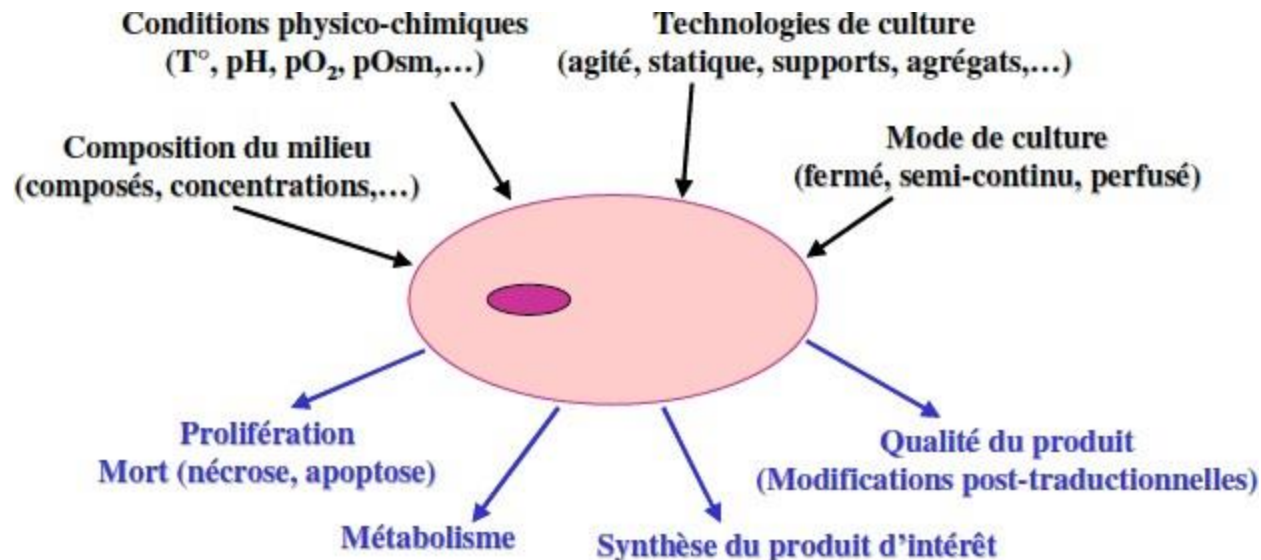


Culture cellulaire

Principales conditions nécessaires à la culture de cellules animales

Afin d'assurer un état physiologique favorable à la croissance cellulaire il est nécessaire de maîtriser plusieurs facteurs :

- **Le choix de milieux de culture** chargés de reproduire au mieux les conditions environnementales et nutritives que celles *in vivo*;
- **Les paramètres physico-chimiques**



Culture cellulaire

1. Choix du milieu de culture et renouvellement

❖ Milieu de culture

Le milieu de culture doit reproduire aussi fidèlement que possible les conditions de l'environnement cellulaire *in vivo*.

Il doit donc être à la fois

- vecteur d'éléments nutritifs;
- contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que pH et osmolarité;
- permettre la survie, prolifération des cellules (divisions cellulaires), tout en conservant leurs fonctions cellulaires principales

Culture cellulaire

A. Composants de base des milieux de culture

✓ Les minéraux

7 ions indispensables qui constituent la base de la solution saline: sodium, potassium, calcium magnésium phosphore, chlore, les bicarbonates .

Ces constituants permettent:

La survie cellulaire en intervenant à **plusieurs niveaux**

Membrane cellulaire: repose sur l'activité électrique **Na+**, **k+** et **cl-**, maintient du potentiel membranaire

-Conserver la stabilité membranaire;
-Bon fonctionnement métabolique;
-Assurent le fonctionnement des pompes et canaux ionique

cytosol:

-Maintient métabolisme cellulaire (respiration dans mitochondrie ou synthèse d ATP)
-Rôle de second messenger (ca^{+2})

Extra-cellulaire:

optimiser l'environnement cellulaire:
-maintient de la pression osmotique;
-étalement et adhésion des cellules à leurs supports

Culture cellulaire

✓ Les substances énergétiques

Le glucose (1g/l) constitue la principale **source de carbone et d'énergie** apportée aux cellules.

-le maltose, le galactose ou le fructose peuvent remplacer le glucose.

-il existe des milieux enrichis complémentés avec **des précurseurs du glucose** (acide cétonique acide a cétooglutarique ou pyruvates)

Culture cellulaire

✓ Les acides aminés

-Les principaux pourvoyeurs d'azote, et sont impliqués dans la biosynthèse des protéines, des nucléotides chez les mammifères et la système enzymatique et cycle cellulaire;

-13 AA dits essentiels pour les cultures de cellules animales: l'arginine, la cystéine, la glutamine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine et la valine.

-Les concentrations en acides aminés sont variables en fonction

❖ du milieu de culture considéré;

❖ type cellulaire ;

❖ phase dans la quelle sont maintenues les cellules

Culture cellulaire

✓ Les vitamines et cofacteurs

-Des molécules organiques requises en faible quantité, Selon la nature cellulaire;

-La concentration d'une vitamine dans un milieu de culture est susceptible **de modifier la vitesse de croissance cellulaire ainsi que la productivité;**

-Il existe des vitamines indispensables (hydrosolubles) à la culture cellulaire: **La choline, l'acide folique, le pyridoxal, la riboflavine, l'acide nicotinique, la thiamine, l'inositol, et l'acide pantothénique;**

-L'utilisation de la vitamine C et de la vitamine B8/biotine (**croissance et prolifération cellulaire**), ne sont pas systématiques et dépendent de la nature des cellules en culture (**essentiellement lignées cellulaire**).

Culture cellulaire

✓ Les Nucléotides

- Sont des molécules essentielles pour le métabolisme cellulaire.
- Participent au maintien du métabolisme énergétique (nucléotides mono-, di-, et tri phosphates (ATP, CTP, GTP et UTP))
- Ce sont des précurseurs des nucléotides-sucres,(l'UDP-Glc, l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNac, l'UDP-GalNac, le GDP-Man, le GDP-Fuc, le CMPNeuGc et le CMP-NeuAc)
- Ce sont des substrats donneurs de résidus glucidiques dans les réactions enzymatiques se (réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi).
- Participent à la synthèse de l'ADN et l'ARN.

Culture cellulaire

✓ Les lipides

- Sont les constituants des membranes cellulaires.
- Le cholestérol et les acides gras sont les composants lipidiques principaux des milieux de culture.
- Dans le cas de milieux sans sérum, il est indispensable de les ajouter pour assurer la croissance cellulaire
- Certains acides gras essentiels (l'acide linoléique), ont un effet stimulateur sur la croissance cellulaire

Culture cellulaire

B. Facteurs de croissance

- -Les facteurs de croissance sont des **polypeptides**.
- -Jouent un rôle primordial dans le **développement cellulaire**, (l'embryogenèse jusqu'à la sénescence) , par le biais de sécrétions autocrines ou paracrines.
- -Capables de former un **complexe** spécifique avec leur récepteur membranaire dans le but d'initier une **réponse cellulaire**

Culture cellulaire

b. Facteurs de croissance

Les principaux facteurs de croissance

- Epidermal Growth Factor (EGF)
- Nerve Growth Factor (NGF)
- Insulin-like Growth Factor (IGF)
- Platelet-derived Growth Factor (PDGF)
- Transforming Growth Factor (TGF)
- Fibroblast Growth Factors (FGF)

Culture cellulaire

Facteurs de croissance

L'activité des facteurs de croissances dépend

leur stabilité dans le milieu extracellulaire

l'accessibilité des récepteurs membranaires

la capacité d'induire une réponse

-Les facteurs qui peuvent influencer sur ces trois paramètres sont:

La nature du substrat sur lequel les cellules sont en culture:

stimulation ou inhibition de l'action des facteurs de croissance.

*EXP: le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) est **stimulé** par un substrat à base de matrice extracellulaire et **inhibé** par un substrat de nature plastique.*

La présence de plusieurs facteurs de croissance au sein du même milieu de culture:

entraîne des inhibitions d'action en jouant sur l'accessibilité des récepteurs membranaire et/ou l'expression des mécanismes de transduction.

Exp: facteur PDGF (Platelet Derived Growth Factor) qui régule négativement les récepteurs EGF

La présence d'un seul facteur de croissance, présent en excès, peut inhiber ses propres récepteurs, .

Exp: l'EGF qui inhibe ses propres récepteurs.

Culture cellulaire

C. Les types de milieux

- 1. Milieu semi-synthétique
- et
- 2. Milieu défini

Le milieu de base

Le sérum

Un système tampon, un indicateur colorimétrique de pH comme le rouge phénol, ainsi que des antibiotiques sont rajoutés

1. Milieu semi-synthétique

➤ Le milieu de base

* **Le milieu de base Eagle (BME: Eagle's Basal Medium)**, capable de supporter la croissance cellulaire d'un grand nombre de types cellulaires.

* **Le milieu MEM** (Eagle's Minimum Essential Medium): augmentation du taux d'acides aminés par rapport au milieu BME.

* **Le milieu DMEM** (Dulbecco Modified Eagle's Medium), milieu dérivé du milieu BME, contenant 4 fois plus de vitamines, acides aminés et glucose.

* **Le milieu IMDM** (Iscove's Modified Dulbecco Medium), dérivé du milieu DMEM, (cellules hématopoïétique); présence de sélénium, d'acides aminés et de vitamines supplémentaires, de pyruvate de sodium et par l'utilisation d'une solution tampon type HEPES.

* **Le milieu GMEM** (Glasgow Minimum Essential Medium), **Le milieu CMRL 1066** (Connaught Medical Research Laboratories), **Le milieu McCoy**. **Le milieu RPMI 1640**

Culture cellulaire

C. Les types de milieux

1. Milieu semi-synthétique

➤ **Le sérum** : à raison de 10% jusqu'à 20%.

*Molécules stimulant la croissance et les fonctions cellulaires: **Les facteurs de croissance** (FGF, les NGF, IGF-1 IGF-2, EGF et PDGF) et les **hormones** (insuline, glucocorticoïdes, hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes);

*Composants de la matrice extracellulaire: fibronectine, glycosaminoglycanes, collagène;

*Protéines de transport: albumine ou transferrin;

* Facteurs de stabilisation et de détoxification des milieux de culture: permettant ainsi de maintenir un pH physiologique ou d'inhiber certaines protéases.

Les principaux sérums utilisés sont ceux de veau, de veau nouveau-né et de veau fœtal, sérum humain et équin

Culture cellulaire

Le sérum de veau fœtal

Le sérum de veau fœtal est préparé à partir de sang récolté sur le fœtus de vaches gestantes partant à l'abattoir, soit par ponction cardiaque, soit par ponction de la veine ombilicale ou encore par ponction de la veine jugulaire.

Culture cellulaire

Les inconvénients de l'utilisation de sérum de veau foetal

➤ d'ordre technique et scientifique:

-Faible reproductibilité entre les cultures: le sérum étant un tissu, sa composition n'est pas contrôlable et dépend de chaque individu, il est donc impossible de recréer exactement les mêmes conditions expérimentales entre deux cultures utilisant des sérums de 2 lots différents, même si ils sont issus de la même espèce.

-Augmentation du risque de contamination de la culture cellulaire par des éléments infectieux présents dans le sérum (virus, mycoplasmes bactéries);

-Pouvoir cytotoxique du sérum:

➔ Le sérum de veau foetal contient en grande quantité une enzyme, **polyamine oxydase**, qui, en réaction avec **la spermine et la spermidine** (synthétisés par des cellules prolifératives, tumorales), **produit l'acroéline**, substance très toxique (**une diminution de la croissance cellulaire**).

➔ Le sérum possède des toxines bactériennes, ou encore d'inhibiteurs sélectifs.

-Teneur élevée en protéines créant des interférences majeures lors de la purification des protéines synthétisées par la culture.

Culture cellulaire

Les inconvénients de l'utilisation de sérum de veau fœtal

➤ **D'ordre économique:**

- Un prix de base très élevé;
- Une variabilité des coûts très importante.

➤ **D'ordre éthique:**

- Origine des sérums;
- Méthode de récolte;
- Bien-être animal et de la douleur chez les fœtus

Culture cellulaire

C. Les types de milieux

2. Milieu défini

Une alternative à l'utilisation du sérum de veau fœtal

-**Remplacer le sérum** par un autre fluide biologique de composition complexe, (des extraits de tissus, du lait, du sérum d'autres espèces);*

-**Réduire le besoin** de sérum de veau fœtal consiste en l'utilisation de milieux totalement définis (augmente les concentrations des composants du milieu de base jusqu'à obtenir une croissance cellulaire suffisante).

EXP: **trois composants**
(l'insuline, la
transferrine et le
sélénium).

le mélange ITS (Insuline, Transferrine, Sélénium) est devenu un supplément universel des milieux cellulaires

À ces 3 éléments, s'ajoute l'utilisation d'albumine et de fibrinogène ainsi que certaines hormones des glucocorticoïdes. des hormones thyroïdiennes, FSH (Follicle-stimulating hormone), ACTH (Adrenocorticotropin hormone), des facteurs de croissance (EGF, FGF, NGF et PDGF) et éléments biochimiques: lipides, acides gras, éthanolamine ainsi que des éléments traces.