

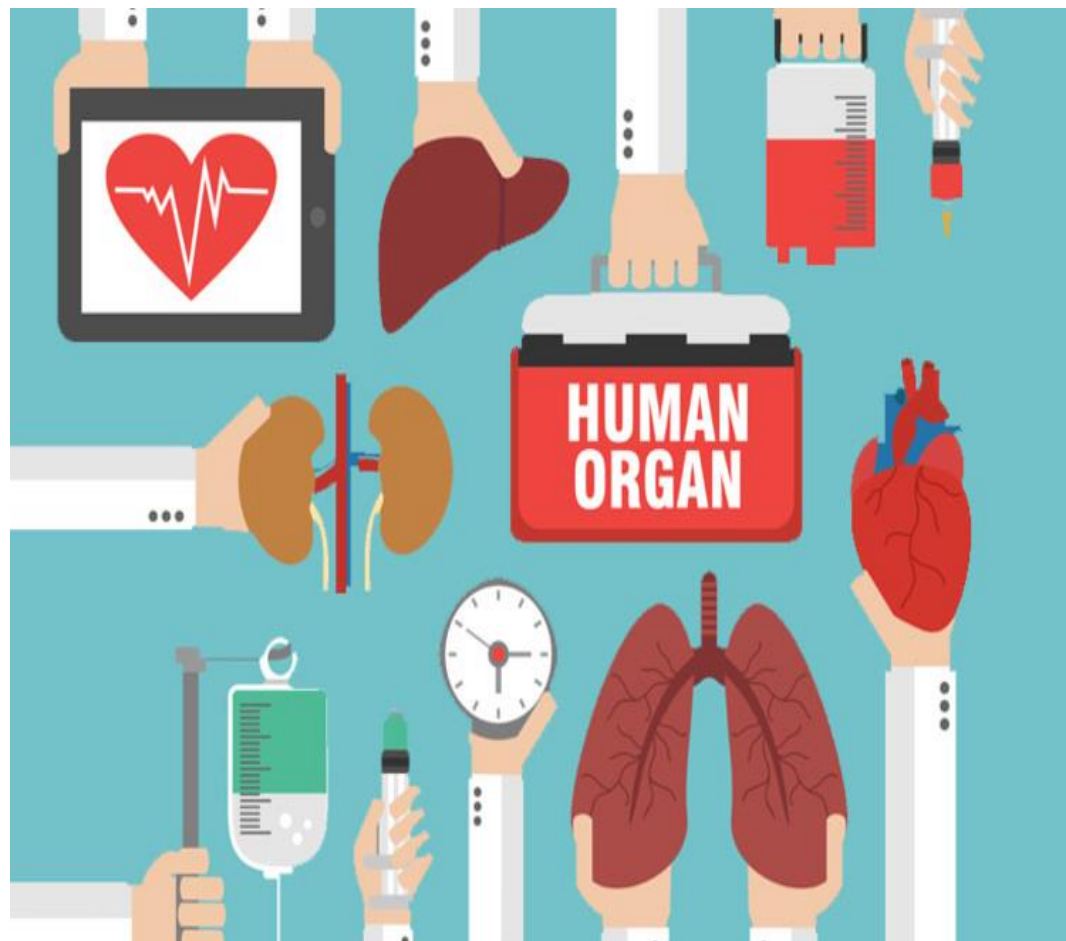
Recherche et Développement en Biotechnologie

Cours 2 : Culture et Ingénierie des Cellules et Tissus

À l'heure actuelle, la dégénérescence de tissus et la défaillance d'organes représentent la moitié des coûts de santé dans le monde.

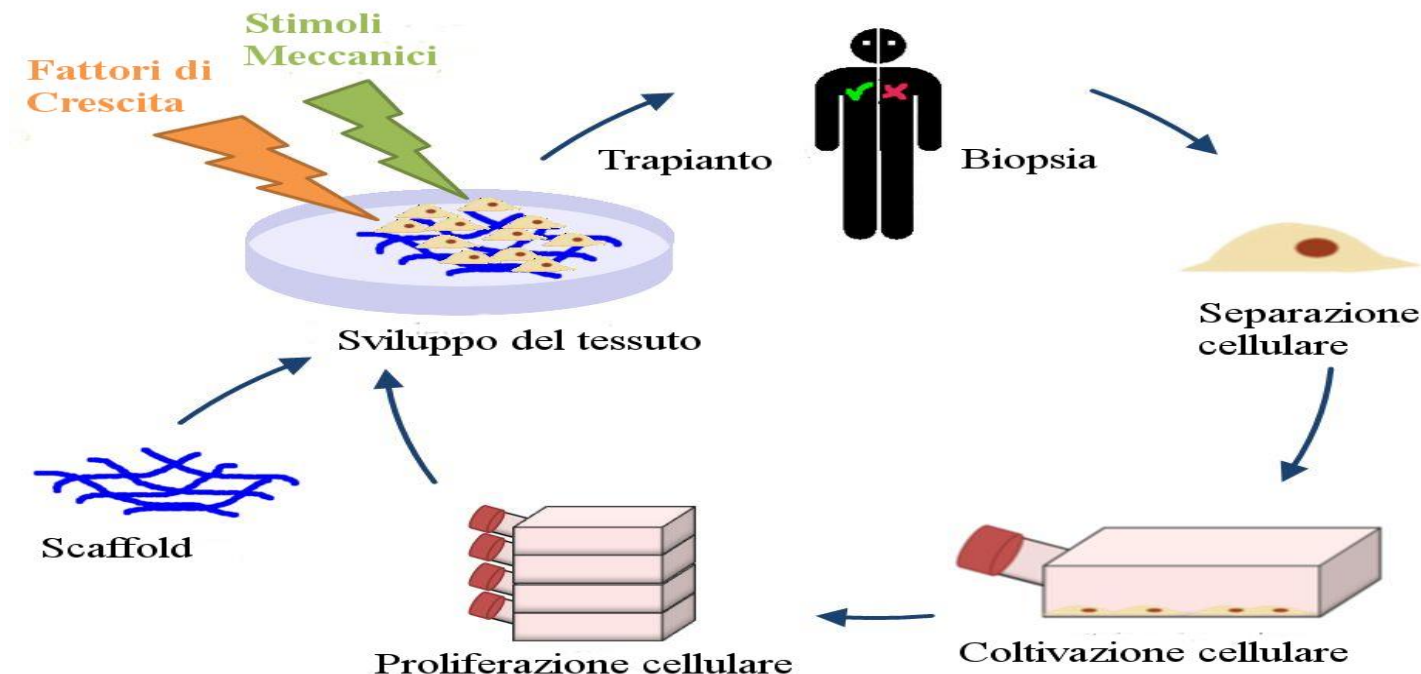


Bien que les greffes soient communément employées comme solution aux défaillances d'organes, de nombreux patients en attente d'une greffe ne la recevront pas à temps. Il n'y a pas, jusqu'ici, de solution à long terme à ce problème.



Le génie tissulaire émerge comme solution potentielle et (ou) comme solution de rechange à d'autres thérapies, suscite l'intérêt de plusieurs sources universitaires et industrielles.

Le génie tissulaire vise à aider le corps à régénérer des fonctions plutôt que de masquer les symptômes comme c'est le cas de nombreuses thérapies aujourd'hui



Culture cellulaire

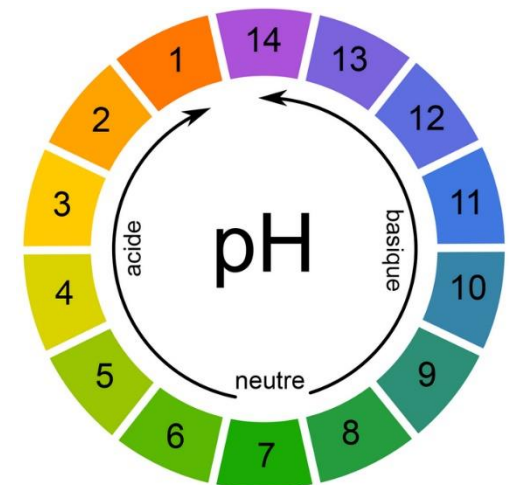
La culture cellulaire est une technique consistant à maintenir, multiplier et observer des cellules animales ou végétales en dehors de leur organisme d'origine, dans un environnement artificiel strictement contrôlé.

Elle permet l'étude des processus biologiques fondamentaux (division, différenciation, métabolisme, signalisation), la production de biomolécules (enzymes, anticorps, vaccins) et la modélisation de maladies humaines. Les progrès en culture cellulaire ont rendu possible la création de modèles physiologiques complexes tels que les organoïdes, qui reproduisent des structures tissulaires en 3D.

Conditions générales

La culture cellulaire exige des conditions environnementales précises afin de maintenir la survie, la croissance et la différenciation des cellules.

Les principaux paramètres incluent le **pH**, généralement maintenu entre **7,2 et 7,4**, et régulé par le **tampon bicarbonate/CO₂**. La **température** optimale est de **37°C** pour les cellules de mammifères, reproduisant les conditions physiologiques internes.



L'atmosphère est enrichie à **5 % de CO₂**, contrôlée par un incubateur à humidité saturée (95 %).

L'humidité évite l'évaporation du milieu et stabilise la pression osmotique.

Tout le système repose sur un **environnement strictement aseptique**, obtenu grâce à des hottes à flux laminaire et des pratiques de stérilité rigoureuses.



Types de cellules

On distingue deux grandes catégories de cellules en culture :
les cellules primaires et les lignées continues.

Les **cellules primaires** sont directement isolées d'un tissu vivant. Elles conservent les caractéristiques physiologiques du tissu d'origine, ce qui les rend précieuses pour des études proches de l'*in vivo*. Cependant, leur durée de vie est limitée (quelques passages).

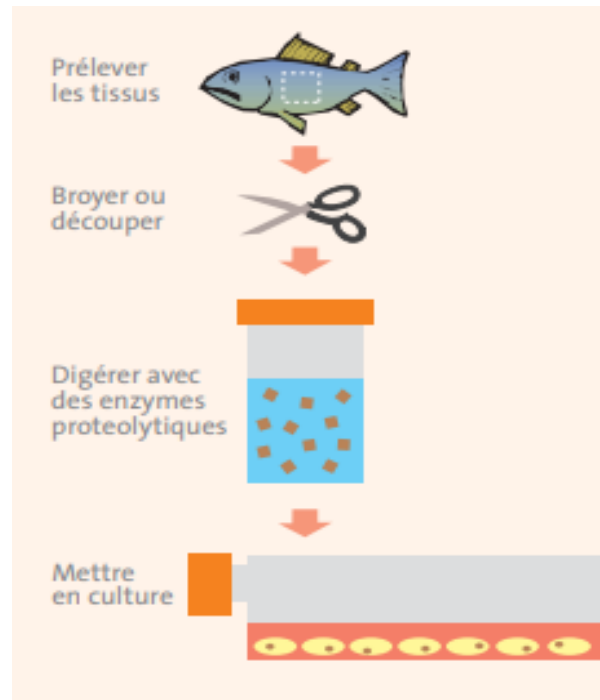
Il existe deux méthodes de base pour faire cela.

Dans la première, pour les Cultures d'explants, de petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture en verre ou en plastique traité et baignés dans du milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture ou le substrat où elles commencent à se diviser et proliférer.

Repiquage

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes

Dans la deuxième, 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 qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser. Cette méthode est appelée Dissociation enzymatique



Cellules adultes

Cellules embryonnaires

Animal euthanasié

Biopsie

Embryon de
mammifère

Embryon
d'oiseau

Acquisition

**Isolement
du tissu**

Dissection grossière

**Dissection et
désagrégation**

Désagrégation
enzymatique

Désagrégation
mécanique

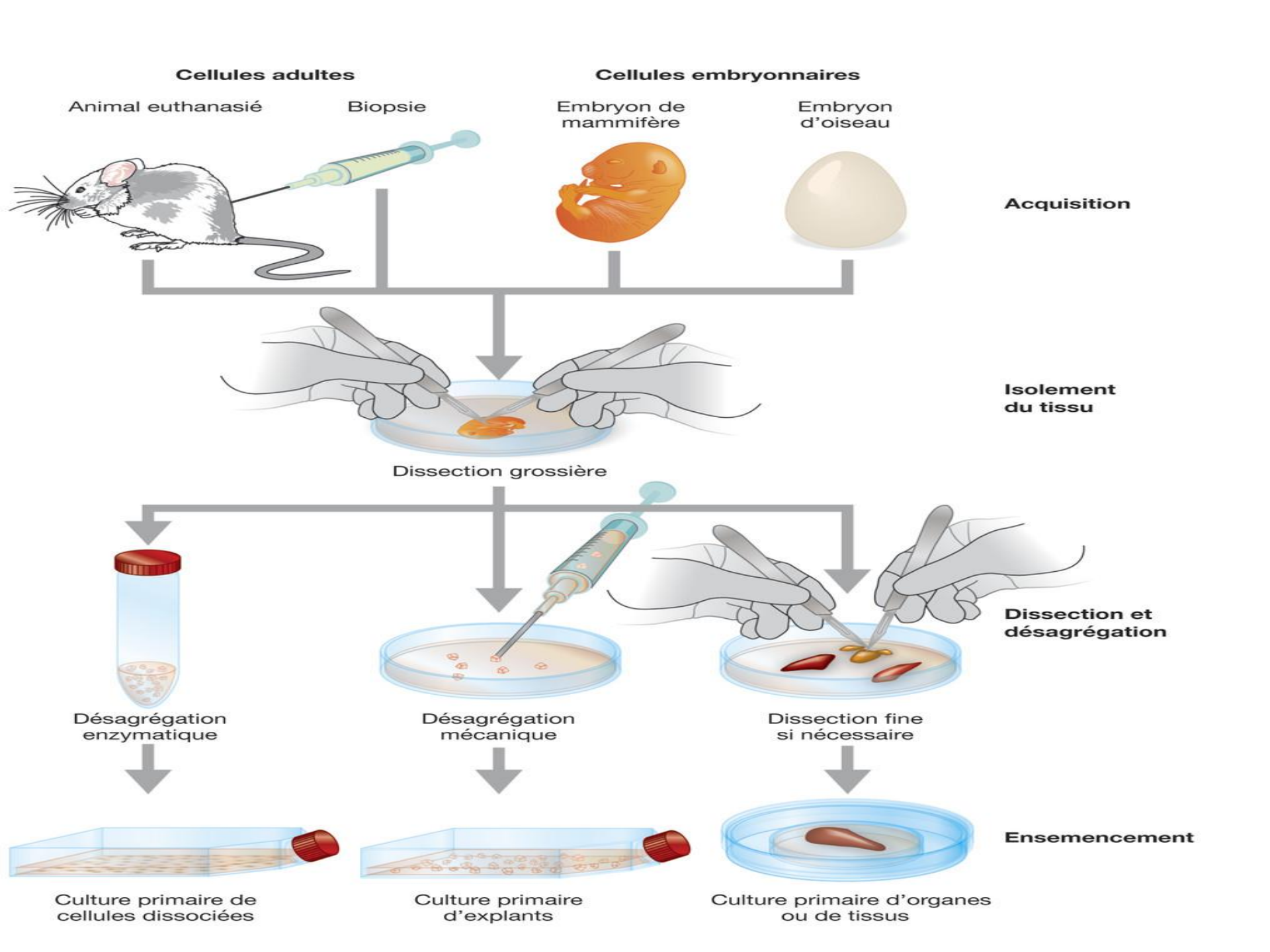
Dissection fine
si nécessaire

Ensemencement

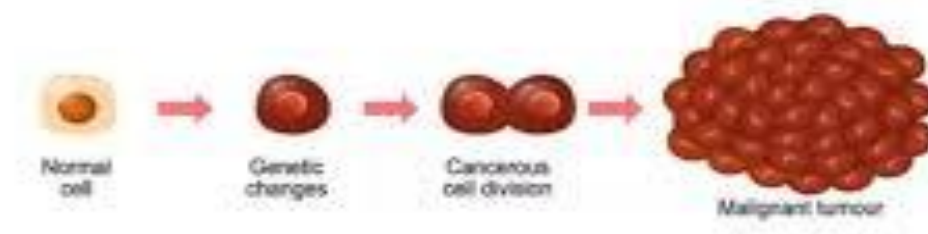
Culture primaire de
cellules dissociées

Culture primaire
d'explants

Culture primaire d'organes
ou de tissus



Les **lignées continues**, quant à elles, proviennent de cellules immortalisées naturellement (ex. : HeLa) ou par transformation artificielle. Elles présentent une capacité de prolifération illimitée et sont plus faciles à manipuler, mais elles peuvent s'éloigner du comportement physiologique initial. Le choix du type cellulaire dépend donc des **objectifs de recherche** : fidélité biologique ou stabilité expérimentale.



3. La culture de tissus végétaux

La culture de tissus végétaux est possible par une technique appelée, la culture *in vitro*.

C'est une technique qui permet la régénération d'une plante entière à partir de cellules ou de fragments de tissus végétaux mis dans un milieu nutritif approprié (stérile et contrôlé).

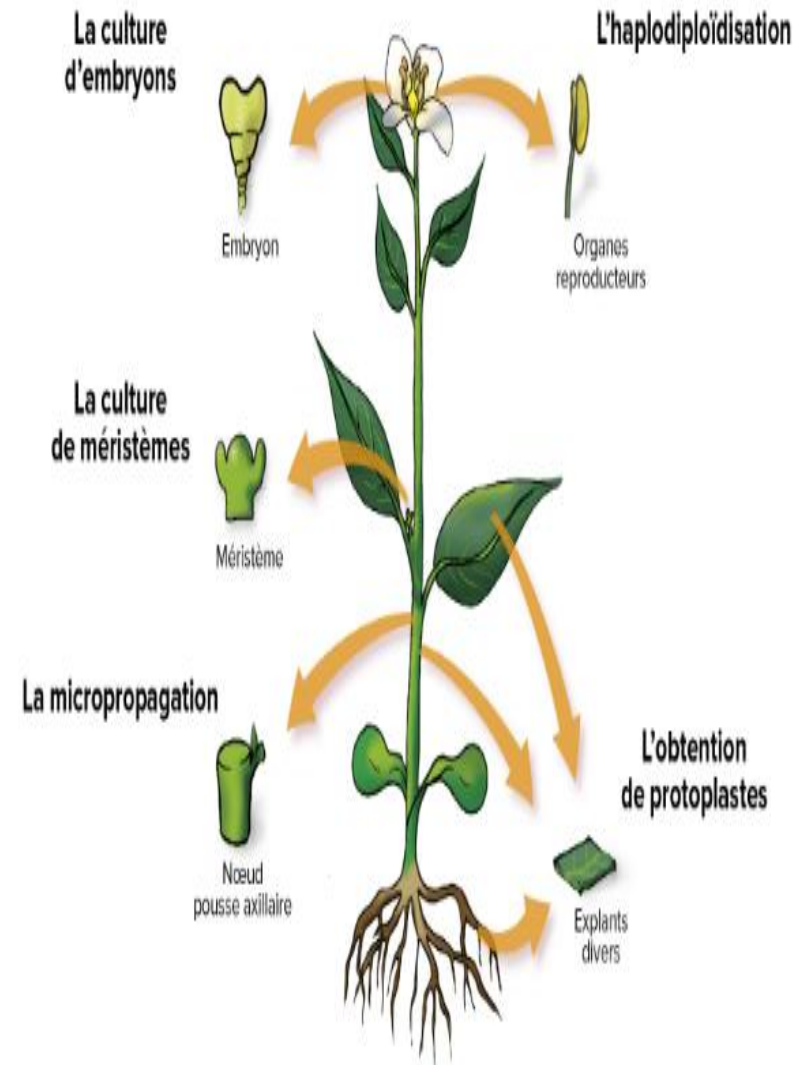


La plante obtenue ressemble parfaitement, sur le plan morphologique et génétique, à la plante dont on a prélevé cellules ou fragment de tissu. On parle alors d'un clone.



La micro-propagation

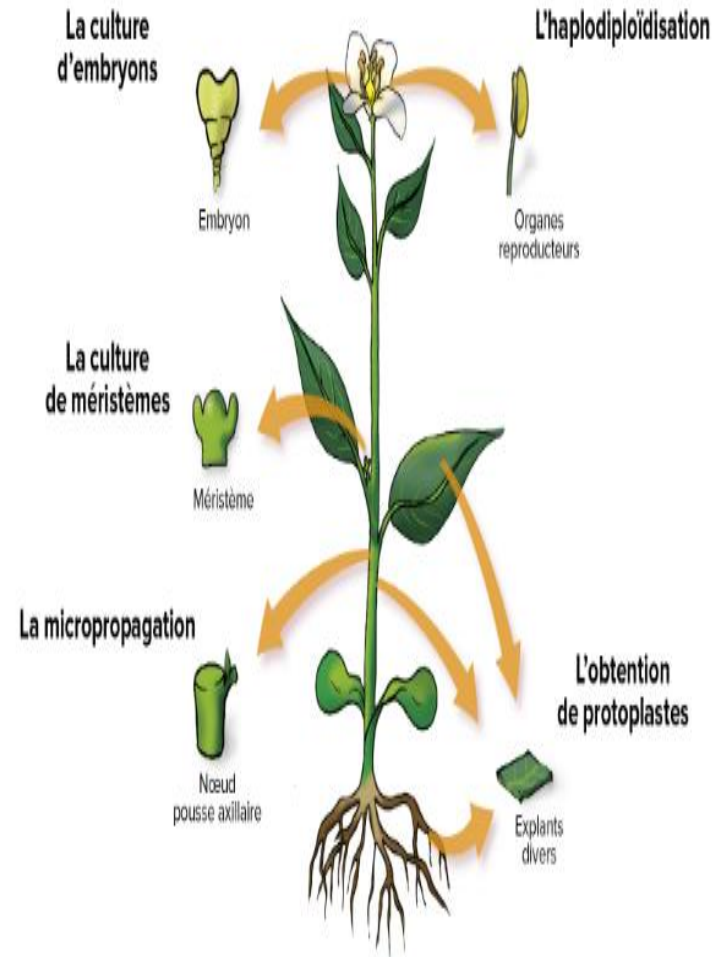
Elle permet de reproduire un individu et le multiplier en très grand nombre, à partir de cellules ou d'un fragment d'organe. Elle se réalise par exemple à partir de nœuds, de pousses axillaires et s'apparente au bouturage des jardiniers. Mis en culture, ces tissus se développent et donnent une plante entière grâce à l'usage séquentiel de milieux nutritifs adaptés.



L'obtention de protoplastes

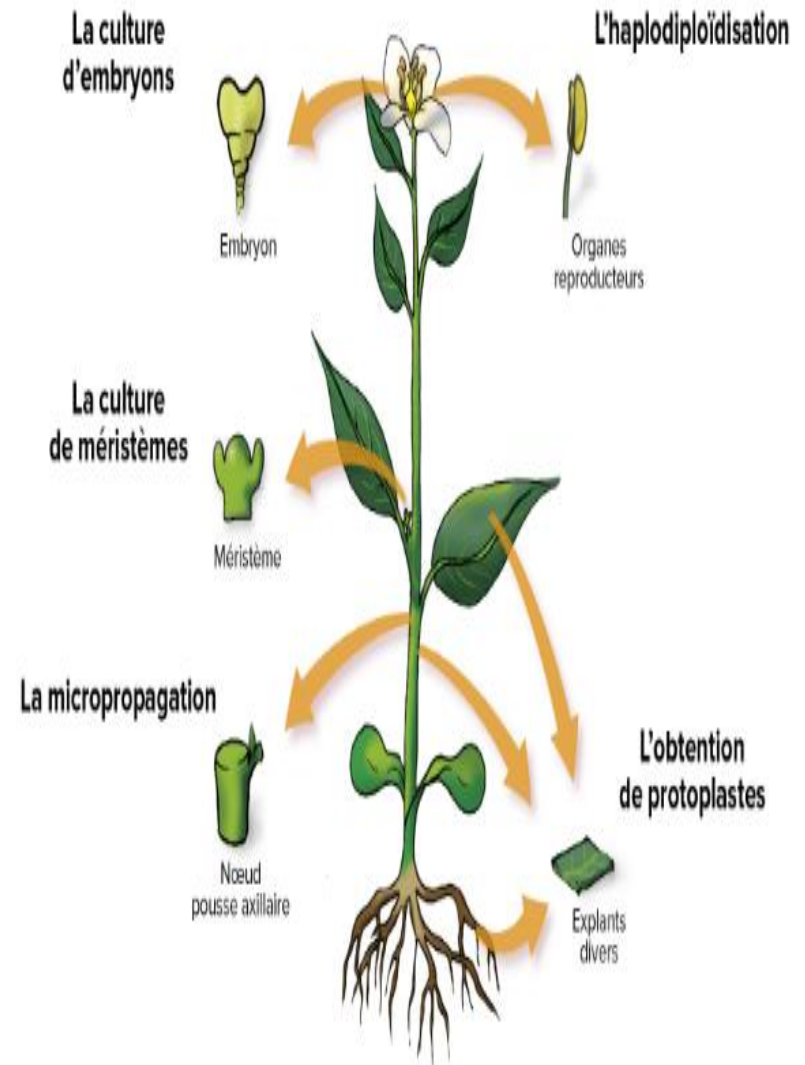
Les protoplastes sont des cellules débarrassées de la paroi pectocellulosique par hydrolyse enzymatique. Ils peuvent être obtenus à partir de différents tissus d'une plante, de préférence des limbes de jeunes feuilles. Limités seulement par la membrane cytoplasmique, les protoplastes peuvent fusionner ce qui permet de créer de nouvelles variétés, d'introduire des caractères à hérédité cytoplasmique. Des plantes transgéniques peuvent être obtenues à partir de protoplastes transformés par électroporation.

Des applications de la culture *in vitro*



La culture de méristèmes

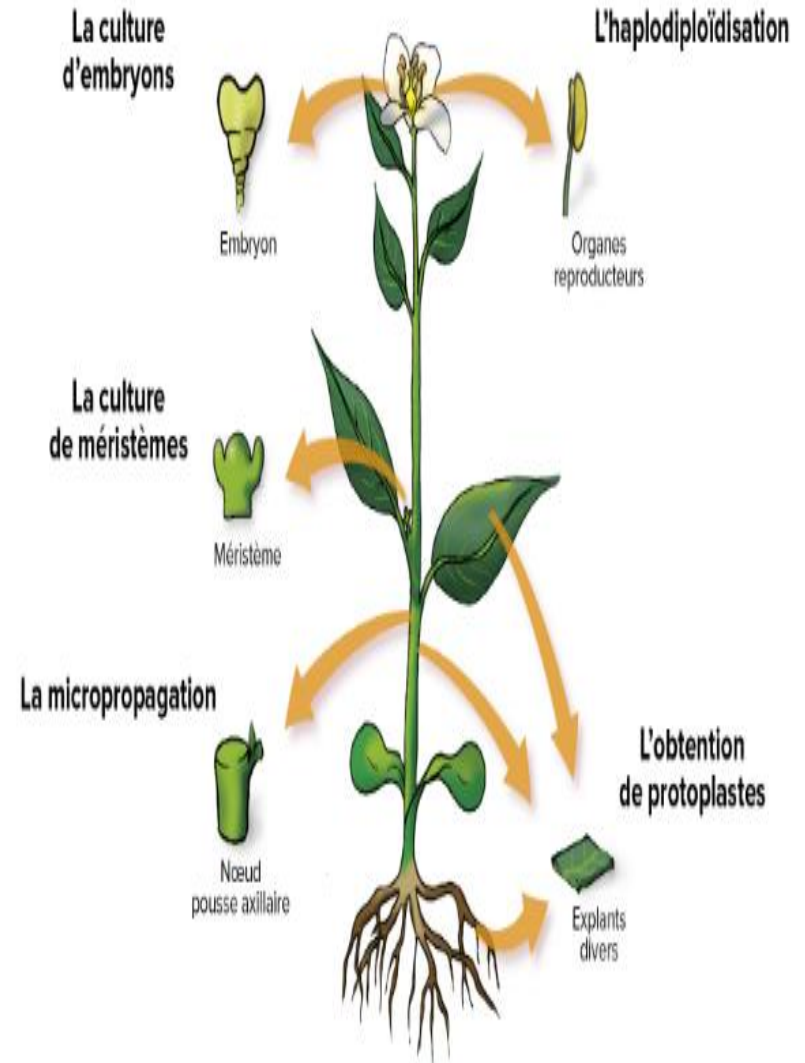
Les méristèmes sont formés de cellules non différenciées, à l'origine de tous les tissus de la plante. L'intérêt des méristèmes réside dans le fait que ce sont des structures indemnes de virus. Leur culture va permettre de régénérer des plantes saines.



L'obtention d'embryons somatiques

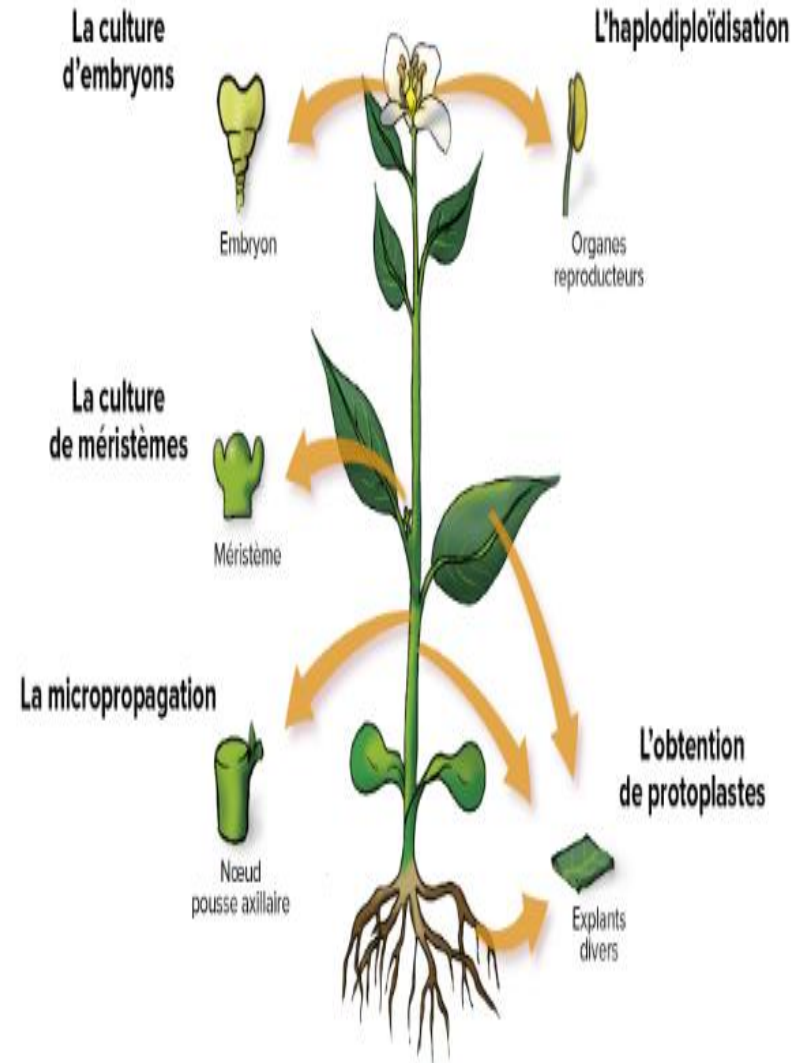
L'embryogénèse somatique est la production d'embryons à partir de cellules non germinales (par exemple cellules méristématiques) soumises à un traitement hormonal. Après cette induction, il se produit une multiplication des cellules suivie d'une différenciation progressive des embryons en culture.

Des applications de la culture *in vitro*



Le sauvetage des embryons

Les embryons obtenus après la fécondation peuvent être prélevés, mis en culture *in vitro* et donner un nouvel individu. Le sauvetage d'embryons consiste à prélever un embryon précocement, à le cultiver *in vitro*, soit pour accélérer les cycles végétatifs, soit parce qu'il ne pourrait pas se développer dans les tissus maternels, par exemple lorsqu'il résulte d'un croisement interspécifique.



Les objectifs de ce type de clonage sont :

D'une part de produire en quantité et dans des délais courts, des plantes d'intérêt agronomique, forestière ou horticole issues des cycles de sélection et amélioration.

D'autre part la reproduction de plantes qui présentent des difficultés ou des obstacles à la reproduction naturelle.

Les techniques de la culture *in vitro* des tissus végétaux sont utilisés en Algérie pour la multiplication de cultivars de palmier dattier résistants au bayoud, une maladie d'origine fongique qui détruit les palmeraies Algériennes.

Un des premiers symptômes externes typiques d'une attaque de Bayoud est un dessèchement et un blanchiment unilatéral d'une ou plusieurs palmes



4. La culture de cellules animales

La culture cellulaire animale est une technique de laboratoire qui consiste à prélever, isoler et maintenir des cellules animales vivantes dans un milieu artificiel, en dehors de l'organisme dont elles proviennent, afin de les étudier, multiplier ou utiliser pour diverses applications biologiques et biomédicales.



Applications principales :

- Recherche en biologie cellulaire et moléculaire
- Études toxicologiques et pharmacologiques
- Production de vaccins et anticorps monoclonaux
- Tests de cytotoxicité et génomique fonctionnelle
- Études sur la cancérogenèse et la différenciation cellulaire



Milieux de culture

Le milieu de culture est l'élément vital des cellules en culture. Il fournit les nutriments nécessaires à leur croissance : glucose, acides aminés, vitamines, sels minéraux et facteurs de croissance.

Les milieux les plus courants sont le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI-1640, MEM, et Ham's F-12, chacun adapté à des lignées spécifiques.

Le milieu est souvent enrichi de 10 % de sérum fœtal bovin (FBS), qui apporte des hormones, protéines et facteurs mitogènes.

Des antibiotiques (pénicilline/streptomycine) et des antifongiques peuvent être ajoutés pour éviter les contaminations microbiennes.

Le choix du milieu dépend des besoins métaboliques propres à chaque lignée cellulaire.

Matériel de base

Un laboratoire de culture cellulaire doit disposer d'équipements spécialisés garantissant des conditions stériles et contrôlées.

Les principaux appareils incluent :

- La hotte à flux laminaire, assurant une protection du manipulateur et du matériel.
- L'incubateur à CO₂, maintenant température, humidité et atmosphère gazeuse.
- Le microscope inversé, pour observer la morphologie et la confluence des cellules.
- Les pipettes automatiques, flacons stériles, boîtes de culture, et congélateurs à -80°C pour la conservation.

Le bon entretien de ces équipements est indispensable pour la reproductibilité expérimentale.

Cryoconservation

Pour préserver des lignées sur le long terme, les cellules sont stockées par cryoconservation.

Elles sont mélangées à un agent cryoprotecteur, typiquement le DMSO (diméthylsulfoxyde), puis refroidies lentement jusqu'à -80°C avant d'être transférées dans l'azote liquide (-196°C).

Ce refroidissement progressif empêche la formation de cristaux de glace intracellulaires destructeurs.

La décongélation doit être rapide (bain-marie à 37°C) suivie d'un rinçage pour éliminer le DMSO.

Cette technique garantit la stabilité génétique et la disponibilité continue des lignées.

Détection de contamination

Les contaminations sont la principale menace des cultures cellulaires. Elles peuvent être bactériennes, fongiques ou dues à des mycoplasmes, microorganismes indétectables à l'œil nu.

Les signes de contamination incluent la turbidité du milieu, la mousse, ou une morphologie cellulaire anormale.

La vérification s'effectue par observation microscopique et par tests spécifiques de détection des mycoplasmes (PCR ou colorations à l'ADN fluorescent).

Une contamination impose la destruction immédiate des cultures pour éviter la propagation.

Contrôle de la viabilité

La viabilité cellulaire reflète la santé et la fonctionnalité des cellules.

Les tests les plus utilisés sont :

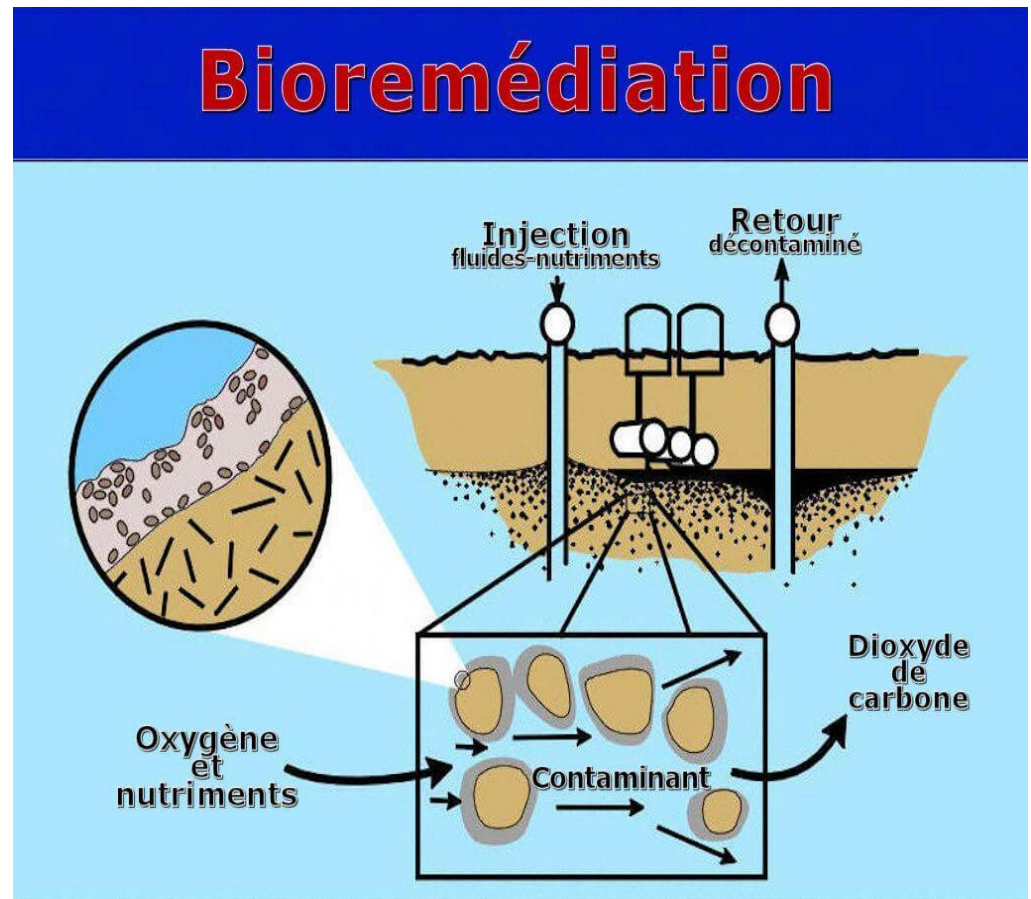
- Trypan Blue, qui colore uniquement les cellules mortes.
- MTT, mesurant l'activité métabolique mitochondriale.
- LDH, qui quantifie la libération d'enzyme en cas de lyse cellulaire.

Ces tests permettent d'évaluer l'effet de toxines, de médicaments ou de conditions expérimentales sur les cellules.

La fiabilité des résultats dépend d'un protocole rigoureux et de témoins appropriés.

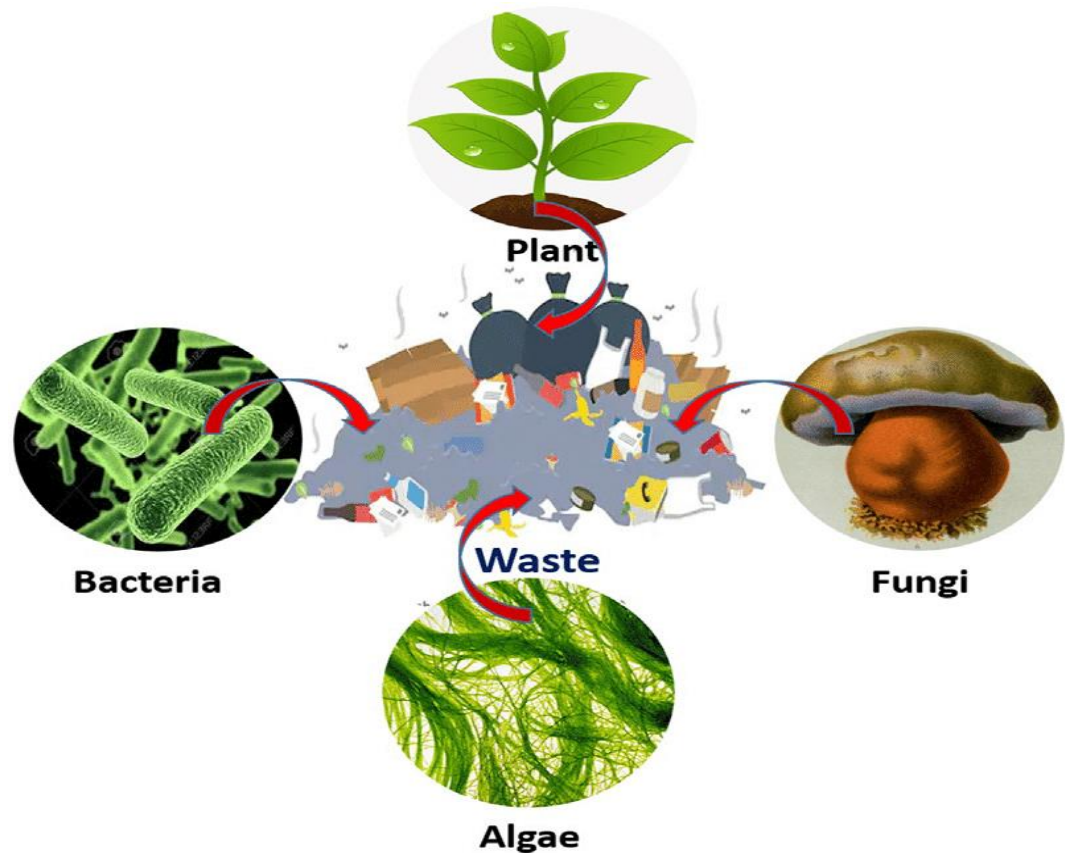
La biorémédiation

C'est une technique de gestion des déchets par l'utilisation d'organismes pour supprimer ou neutraliser les polluants ou contaminants à partir d'un site contaminé.



La manipulation génétique a permis d'obtenir des microorganismes et des enzymes spécifiques de dégradation et de métabolisation des produits résiduels toxiques.

L'utilisation de microorganismes ou d'enzymes constitue une technique moins polluante et des déchets plus biodégradables.



Quelques exemples de techniques de biorémediation :

- Obtention de méthane et de gaz à partir de déchets solides urbains.
- Digestion de déchets végétaux via bactéries, épurateurs biologiques.
- Dégradation des hydrocarbures par les microorganismes

Modifier des gènes dans les cellules vivantes n'est pas une chose facile



Edition génomique

Est une technique de génie génétique reposant sur la modification de génome d'un organisme, elle consiste à l'utilisation de **nucléase artificiel** afin d'introduire des cassures double brin à une position précise du génome.



Edition génomique

Cette coupure permet de modifier la séquence d'ADN à cet endroit par l'inactivation de ce gène ou d'insérer un nouveau ou de remplacer un gène par une autre version, et cela soit par de délétion ou insertion d'une séquence d'intérêt.



Qu'est-ce que le système CRISPR-Cas9 d'ingénierie/édition du génome ?

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) est venue détrôner toutes les autres approches, et ce pour quatre raisons : précision, rapidité, fiabilité, faible coût.

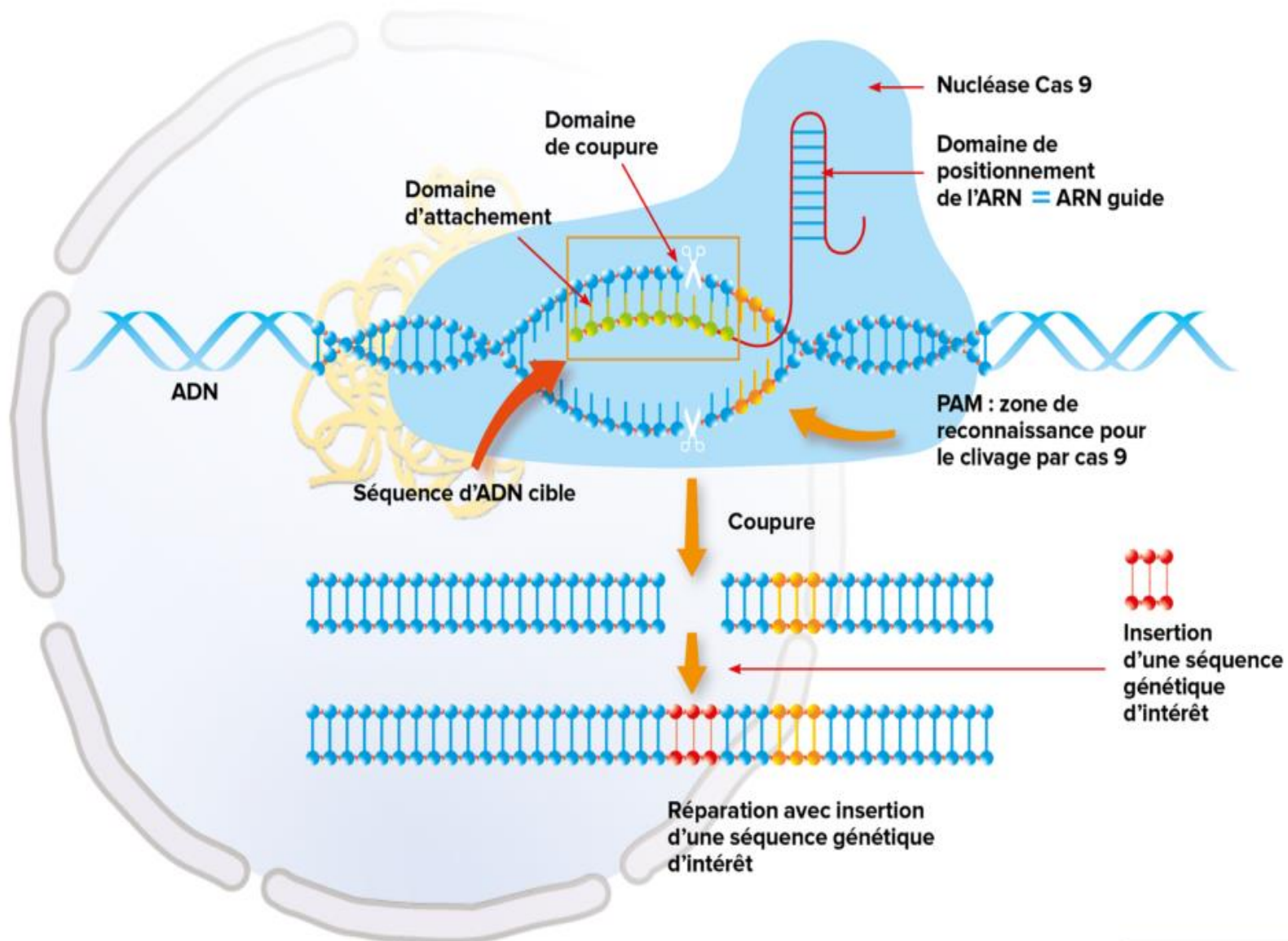


CRISPR-Cas9 est en quelque sorte un ciseau moléculaire capable d'induire une cassure double brin de l'ADN en un site choisi du génome.

Il faut pour ce faire d'une part **le ciseau**, une **enzyme nucléase** qui coupe les deux brins d'ADN, ici **Cas9**, et un **guide**, qui reconnaît la séquence à couper, ici il s'agit d'un **ARN-guide**, homologue à la séquence que l'on veut cibler .

En résumé, la nucléase Cas9, guidée par son ARN guide (gARN) se lie au locus génomique de choix qui doit se situer à proximité d'un motif de reconnaissance appelé **PAM**. Cas9 crée alors une cassure double brin.

Retouche génomique par le système CRISPR - Cas 9



Les systèmes de réparation de l'ADN existants dans toutes les cellules, permettront d'apporter des modifications de l'ADN au site de cassure (insertion, mutation, délétion).

Si l'idée initiale est d'invalider l'expression du gène, il suffit en général de laisser les systèmes de réparation faire. La cassure est mal réparée et le gène « réparé » sera inefficace.

Si l'objectif est de corriger une mutation préexistante, il faudra que la réparation rétablisse une séquence « normale » après la cassure du gène muté, et pour cela, on introduit une séquence-guide et la cellule répare la cassure en copiant la séquence « normale » que l'on aura introduite.

Application de l'édition génomique :

Permet l'étude de gène en l'inactivant spécifiquement par l'induction des mutations ou bien de crée de nouvelle ligne cellulaire exprimant un transgène choisi.

La création de nouveau modèles animaux notamment pour étudiée des maladies génétiques humaines.

La correction de la mutation dans les cellules de patient afin de combattre et guérir une maladie génétique

L'édition génomique fera partie également de future thérapie par la possibilité de modifier les cellules extraite de patient pour corriger les mutations responsable de la maladie mais avant pouvoir de réinjecter ces cellules aux patient il faut en effet vérifier la faisabilité chez l'animal et entrer en essai clinique chez l'Homme

La thérapie transgénique

Cette thérapie utilise des cellules génétiquement modifiées (cellules transgéniques)

La thérapie génique a été initialement conçue comme une approche thérapeutique destinées aux maladies monogéniques (liée à la dysfonction d'un seul gène), délivrant aux cellules un gène « sain » capable de suppléer le gène « malade ». Aujourd'hui, les modalités et les indications se révèlent beaucoup plus larges, avec 65% des essais cliniques qui concernent le traitement de cancers.

Cette première stratégie consiste à importer la copie d'un gène fonctionnel dans une cellule cible, pour qu'elle s'y exprime et aboutisse à la production de la protéine qui fait défaut.

Selon les indications, ce travail peut être effectué :

in vivo directement dans l'organisme le patient

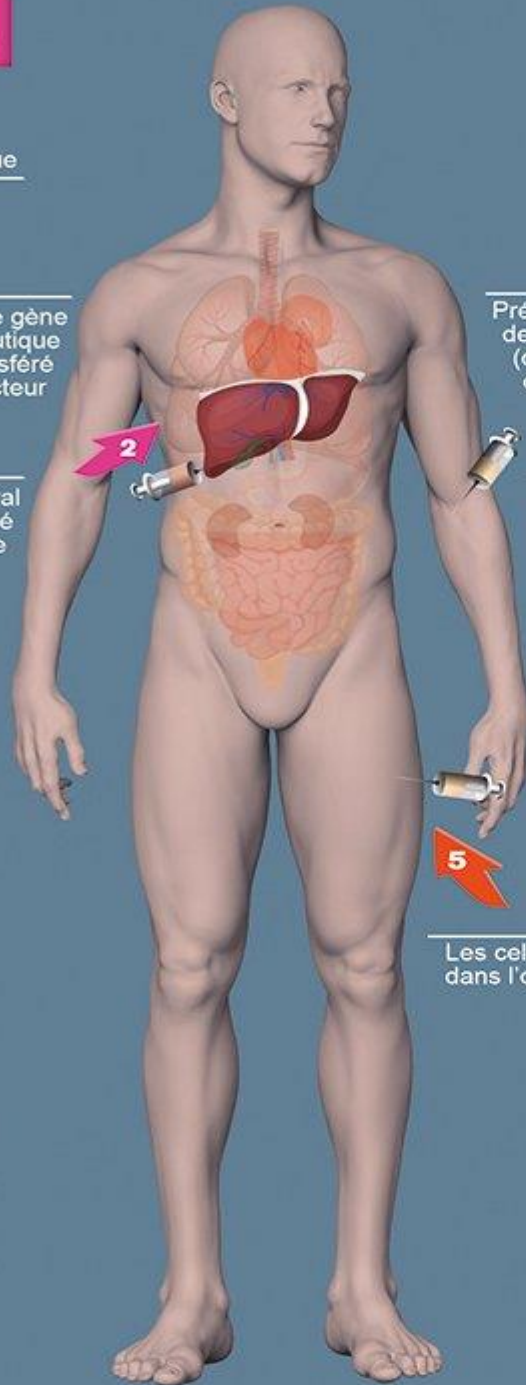
ex vivo, afin de modifier génétiquement les cellules en laboratoire avant de les réinjecter au malade

Modification des cellules *IN VIVO*



1 Le gène thérapeutique est transféré dans un vecteur

Le vecteur viral est directement injecté dans l'organe cible



Prélèvement de cellules souches (dans le sang ou la moelle osseuse)



1 Vecteur viral



3 Le vecteur viral pénètre dans les cellules prélevées chez le patient



4 Les cellules se multiplient et expriment le gène thérapeutique

5 Les cellules sont réinjectées dans l'organisme du patient

Travailler *ex vivo* permet de mieux contrôler les étapes, d'utiliser moins de vecteurs et d'éviter la dispersion du traitement dans des organes non ciblés. Cette solution est la plus souvent utilisée pour le traitement des maladies sanguines, car il est possible de prélever les cellules à corriger par une simple prise de sang.

Pour d'autres maladies, telles que des maladies musculaires, respiratoires, oculaires, cardiaques ou encore neurologiques, le transfert du gène se fait *in vivo*, par injection du gène vectorisé directement dans l'organisme ou dans l'organe à traiter, comme un médicament.

Les débuts de la thérapie génique ont été marqués par quelques accidents liés à l'utilisation de vecteurs viraux. Ceux-ci ont entraîné des réactions inflammatoires incontrôlables ou provoqué des cancers liés à l'intégration du gène thérapeutique à proximité d'oncogènes.

Bien que rares, ces accidents ont incité les chercheurs à mieux comprendre le fonctionnement de ces vecteurs viraux et la façon dont ils intègrent leur ADN dans les chromosomes de l'hôte. Surtout, de nouvelles générations de vecteurs sécurisés ont été mises au point.