

# CULTURE DE CELLULES ANIMALES

## 1. INTRODUCTION

Ce sont des **cultures *in vitro* de cellules, de tissus et d'organe** (cf def) dans un milieu artificiel, c'est à dire, de composition connue et sans variation dues au métabolisme. Ces techniques récentes sont liées au développement des biotechnologies. Elles ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques, des mécanisme biochimiques sans avoir recours à l'expérimentation *in vivo*. Exemples d'application :

- Étude du mécanisme d'infection par un virus tel que le HIV
- Étude de la différenciation cellulaires et des mécanismes des cancers.
- Pharmacotoxicologie: test de substances pharmacologique-ment active sur des cellules.
- Biotechnologie: production de substances par les cellules, telle que l'insuline, des hormone, des vaccins...

Ces techniques sont délicates car les cellules animales sont fragiles (pas de paroi) et malgré les conditions stériles sous lesquelles on se place pour manipuler, les contamination sont fréquentes (bactéries, champignons et surtout levure).

## 2. CULTURE DE CELLULES

### 2.1. Origine et obtention des cellules

On distingue 2 types de cellules dans l'organisme:

- les cellules circulantes ou libres, telles que les cellules sanguines.
- Les cellules des tissus solides.

Les premières sont récupérées facilement par centrifugation différentielle, alors que les secondes peuvent être récupérées selon 2 procédés :

- migration cellulaires à partir **d'expiant**
- dissociation du tissu avec libération des cellules

La culture de cellules obtenues à partir d'organe ou de tissu est appelée **primoculture** ou **culture primaire**.

### 2.2. Évolution des cellules en culture

#### 2.2.1. Courbe de croissance d'une population cellulaire

Figure 1: On distingue 3 périodes: phase d'adaptation  
phase exponentielle  
phase stationnaire

Lorsque les cellules arrivent à confluence elles arrêtent de se diviser : inhibition de contact. Il faut alors procéder à un **repiquage** ou **passage**, c'est à dire, redistribuer les cellules dans plusieurs flacons ou bien en jeter une partie et rajouter du milieu neuf : de cette façon les cellules disposent de nouveaux éléments nutritifs et de place pour adhérer. A partir du premier repiquage on parle de **lignée cellulaire**.

Par ailleurs, lorsque les cellules sont mises dans un milieu de culture, il s'opère une sélection entre les cellules viables et les cellules mortes (dans le cas de cellules qui adhèrent au support, les cellules viables se fixent sur le support alors que les mortes restent dans le milieu de culture.

D'autre part, il existe une compétition entre les cellules viables. Celles qui prolifèrent le plus vite envahissent la boîte jusqu'à faire disparaître les autres types cellulaires. On observe des changements de la culture dans le temps.

#### 2.2.2. Longévité d'une culture cellulaire

On rencontre 2 cas (Fig2 et 3):

- Cultures normales ou définies: les cellules ne se multiplient que pendant un nombre limité de générations (30 à 50 repiquages) puis meurent: leur vie et leur mort est programmée.

On observe alors une diminution de leur vitesse de prolifération, phase de sénescence.

- Culture continue ou lignées transformées ou immortelles. La vitesse de multiplication ne diminue pas, ce qui permet un nombre de repiquage indéfini. Les cellules constituant ces cultures :

- perdent l'inhibition de contact et se cultivent en amas ou multicouche

- changent de morphologie (s'arrondissent)
- les cellules adhérentes perdent leur besoin d'ancrage et peuvent être cultivées en suspension.

### **2.3. Besoins nutritifs des cellules** (cf poly)

## **3. CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES ANIMALES**

### **3.1. Les milieux de culture**

#### **3.1.1. Composition**

On distingue 2 principaux types de milieu:

- les milieux empiriques composés
  - d'une base (sels minéraux, glucose, aa, vit, tampon, indicateur de pH : rouge de phénol)
  - de sérum de 2 à 20 % du volume. On utilise généralement du sérum de veau fœtal. Il apporte des facteurs favorisant la multiplication cellulaire: facteurs de croissance, protéines d'adhésion, protéines de transport, oligoéléments. Il augmente les capacités des tampon et possède une action protectrice sur les cellules en agitation. Il contient des inhibiteurs de protéases (inactive la trypsine utilisées lors de repiquage).
  - ATB : pénicilline, streptomycine
  - des antifongiques.

- les milieux définis: ils contiennent les mêmes constituants que les milieux empiriques mais tout est quantifié. Ces milieux, bien adaptés à la culture cellulaire, peuvent être adaptés à la production, Cependant ils sont chers car tous les constituants sont hautement purifiés.

La majorité des cellules survive dans un intervalle de pH compris entre 6,8 et 7,6. Toutes modifications du pH extracellulaire entraîne un blocage métabolique. Le pH du milieu de culture, doit donc être maintenu constant d'où l'utilisation de systèmes tampon dans les milieux de culture.

Le tampon le plus employé est le tampon bicarbonate qui fonctionne de la façon suivante :



La production de  $\text{H}^+$  par le métabolisme cellulaire déplace l'équilibre vers la formation de  $\text{CO}_2$ , c'est pourquoi on utilise ces milieux en atmosphère régulée à 5% de  $\text{CO}_2$  de façon à maintenir un équilibre entre  $\text{CO}_2$  et  $\text{HCO}_3^-$ .

On utilise parfois un autre tampon dont le pKa, 7,55, est plus proche du pH optimal de culture (pH > 6,8) que celui du tampon bicarbonate (pKa = 6,1): le tampon HEPES.

Pour suivre les variations de pH du milieu, on ajoute dans le milieu un indicateur de pH le rouge de phénol.



#### **3.1.2. Exemples de milieux de culture** cf poly

### **3.2. Le matériel**

#### **3.2.1. Les locaux**

La culture cellulaire nécessite des conditions de stérilité absolues, toute contamination microbienne entraîne la lyse des cellules. De plus lorsque l'on fait de la production, le produit obtenu doit être stérile. C'est pourquoi on manipule dans des salles réservées à cet effet, isolées par des sas et dans laquelle les mouvements sont réduits.

On utilise de hottes à flux laminaires équipées de système de filtration d'air et permet d'obtenir une zone de manipulation stérile. Utilisation des hottes cf poly.

#### **3.2.2. Le support**

On utilise des supports pour les cellules adhérentes :

boîte stériles en polystyrène: elles ne présentent pas ce toxicité pour les cellules et permettent d'observer parfaitement les cellules en microscopie optique. On peut aussi utiliser des lames de verre ou des microplaques.

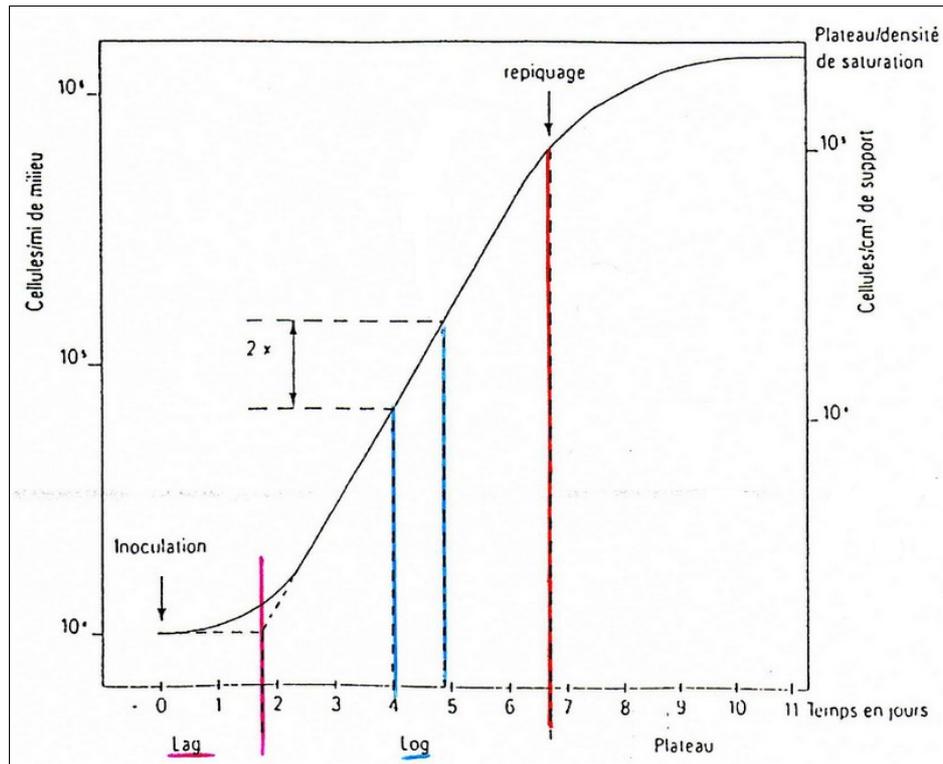
Les cellules non adhérentes sont cultivées dans les mêmes conditions mais se développent en suspension.

### 3.2.3. Les étuves d'incubation

Les cellules sont cultivées dans des étuves thermostatées (37 °C pour les cellules de mammifères), avec 5% de CO<sub>2</sub> sous forme gazeuse. Ces étuves doivent être décontaminées régulièrement.

| <b>Besoins nutritifs des cellules</b> |  |  |
|---------------------------------------|--|--|
| <b>Eau</b>                            |  |  |
| <b>Sels minéraux</b>                  | Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup><br><br>Cu, Zn, Co, Fe                                 | Maintien de la PO<br>Cofacteurs enzymatiques<br>Rôle de facteurs d'adhésion (Ca <sup>2+</sup> )<br>Oligoéléments                 |
| <b>Source d'énergie</b>               | glucose<br>glutamine   | principale source d'énergie<br>in vitro elle alimente la<br>néoglucogénèse   |
| <b>Acides aminés</b>                  | Gln, Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val,<br>Met, Ileu, Tyr, Cys, Arg, His  | Indispensables car ils ne peuvent pas<br>être synthétisés in vitro   |
| <b>Vitamines</b>                      | Coenzyme   | précurseur des bases puriques et<br>pyrimidiques   |
| <b>Facteurs de croissance</b>         | cf cours   | Hypertrophie (augmentation de taille)<br>hyperplasie (augmentation de la<br>population cellulaire)<br>différenciation cellulaire |
| <b>Facteurs d'adhésion</b>            | glycoprotéines calcium<br>dépendante ou non: fibronectine<br>(fibroblaste) chondronectine<br>(chondrocytes) collagène (toutes<br>les cellules) | Adhésion des cellules au support   |
| <b>Protéines de transport</b>         | Albumine<br>transferrine   | transport des AG<br>transport du fer   |

## CYCLE DE CROISSANCE D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE (TYPE HeLa) EN CULTURE



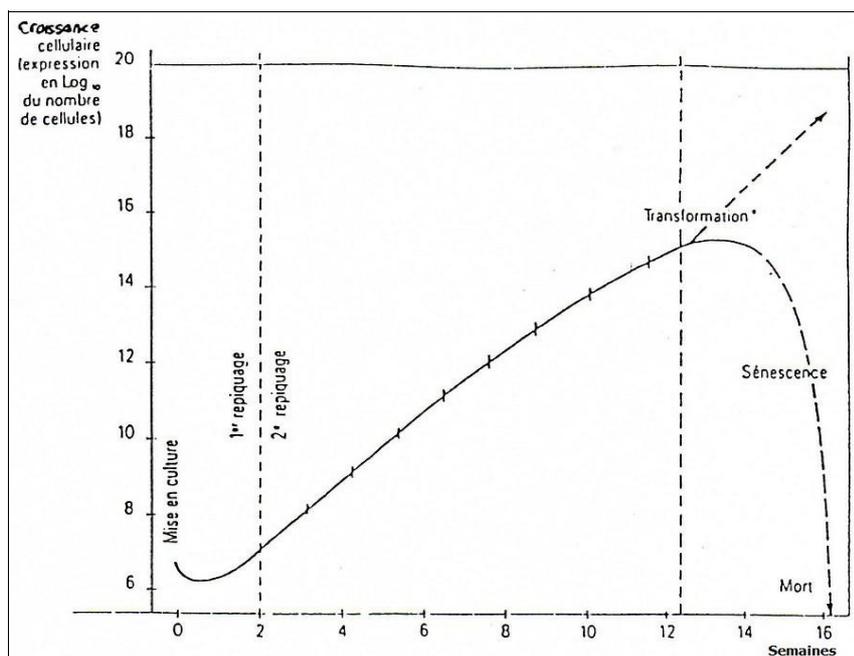
**Phase Lag:** période d'adaptation au milieu. La cellule reconstitue son squelette, s'attache au substrat, s'étale. Il y a des synthèses d'ADN et de protéines.

**Phase Log:** phase de croissance exponentielle (90 à 100% de croissance).

**Phase plateau:** la confluence Intervient vers la fin de la phase Log et la culture devient ensuite stationnaire (0-10% de croissance). Les cellules perdent leur mobilité, s'orientent les unes par rapport aux autres (Inhibition de contact).

Les cellules épithéliales et endothéliales non transformées cessent de croître dès la confluence atteinte. Certaines cellules d'embryons de peau, les fibroblastes expriment des inhibitions de contact mais continuent à croître en s'organisant en couches superposées. Les cellules transformées atteignent des plateaux élevés. Ayant perdu leur dépendance vis-à-vis d'un support, elles peuvent souvent être cultivées en suspension.

## EVOLUTION D'UNE CULTURE DE CELLULES AU COURS DU TEMPS



# Terminologie en Culture Cellulaire

## **Culture de tissus**

La culture de tissus a rapport à l'étude des cellules, des tissus et des organes conservés ou développés *in vitro* pendant plus de 24 heures.

Culture de cellules. Étude de la croissance des cellules *in vitro*, y compris la culture des mono-cellules. Dans les cultures de cellules, ces dernières ne sont plus organisées en tissus.

Culture d'organes. La conservation ou le développement de tissus, de primordia d'organes, de tout ou partie d'un organe *in vitro* de façon à pouvoir différencier et conserver la structure et les fonctions.

Culture de tissus. Conservation de fragment de tissus *in vitro*, dans des conditions qui ne sont pas nécessairement prévues pour la conservation de l'architecture des tissus.

## **Explants**

Fragments excisés d'un tissu ou d'un organe utilisés pour initier une culture *in vitro*.

## **Mono-couche**

Couche unique de cellules se développant sur une surface.

## **Culture en suspension**

Type de culture permettant à des cellules de se multiplier alors qu'elles sont en suspension dans un bouillon.

## **Culture primaire**

Culture initiée à partir de cellules, de tissus ou d'organes prélevés directement sur un organisme. Ceci ne comprend pas les cultures initiées à partir d'explants de tumeurs développés par injection de cellules cultivées dans des animaux. De telles cultures peuvent être considérées comme primaires jusqu'au premier repiquage. Elle devient alors une lignée cellulaire.

## **Lignée cellulaire**

Une lignée cellulaire provient d'une culture primaire au moment du premier repiquage. L'expression "lignée cellulaire" signifie que les cultures qui en proviennent se composent de nombreux lignages de cellules qui étaient présentes à l'origine dans la culture primaire.

## **Passage**

Ce synonyme de repiquage peut également indiquer le passage des cellules d'un récipient de culture à un autre. Lorsque l'on utilise ce terme, il faut donc spécifier ce qui fait l'objet du passage car les spécialistes des questions virales utilisent ce terme pour décrire le transfert de fluides surnageants plutôt que de cellules.

## **Nombre de repiquages**

Nombre de fois que des cellules ont été soumises à des repiquages c'est-à-dire transplantées d'un récipient de culture à un autre.

## **Intervalle de repiquages**

Intervalle entre deux repiquages consécutifs des cellules. Cette expression n'a aucun rapport avec le terme "temps de génération".

## **Temps de génération**

Intervalle entre deux divisions consécutives d'une cellule. Cette expression n'est pas synonyme de "temps de doublement de la population".

## **Temps de doublement de la population**

Cette expression se rapporte à un ensemble complet de cellules et indique l'intervalle pendant lequel, par exemple, le nombre de cellules est passé de  $1 \cdot 10^6$  à  $2 \cdot 10^6$ . Cette expression n'est pas synonyme de "temps de génération de cellules".

### **Rendement absolu d'inoculation**

Pourcentage de cellules individuelles qui donnent naissance à des colonies après inoculation dans des récipients de culture. On doit toujours indiquer le nombre total de cellules utilisées pour l'inoculation, le type de récipient de culture et les caractéristiques de l'environnement (température du milieu, systèmes fermés ou ouverts, atmosphère CO<sub>2</sub>. Etc.).

### **Rendement relatif d'inoculation**

Pourcentage de cellules inoculées qui donnent naissance à des colonies par rapport à un témoin pour lequel on doit toujours indiquer le rendement absolu d'inoculation.

### **Fibroblastes**

Cellules en forme de fuseau ou de forme irrégulière qui sont, comme leur nom l'indique, responsables de la formation des fibres. Dans les cultures de cellules, de nombreux autres types cellulaires, ne peuvent être, sur le plan morphologique, distingués des fibroblastes. Dans les cultures d'organes et de tissus dans lesquelles les rapports entre cellules sont conservés, on peut identifier les fibroblastes à l'aide de critères histologiques acceptés.

### **Cellules de type fibroblaste**

Dans les cultures cellulaires, divers types cellulaires présentent des morphologies similaires. Les cellules qui prennent des formes irrégulières ou des formes de fuseaux sont souvent qualifiées de fibroblastes. D'une manière générale, on ne connaît ni la dérivation de ces cellules ni leur capacité à produire des fibres. Il est donc plus approprié de les appeler "cellules de type fibroblaste".

### **Cellules épithéliales**

Il s'agit de cellules, apposées les unes aux autres et formant un tissu continu semblable à de la mosaïque avec très peu de substances intercellulaires comme on en voit dans des cultures *in vitro*, de tissus ou d'organes.

### **Cellules de type épithéliales**

Dans les cultures de cellules, les cellules épithéliales peuvent prendre diverses formes mais ont tendance à se constituer en tissu de cellules polygonales serrées.

Toutefois, le degré de cohésion de ces cellules peut varier. Lorsque le seul critère d'identification de telles cellules est l'adhérence, il est préférable de les désigner par l'expression "cellules de type épithélial".

### **Altération des cultures**

Cette expression indique un changement persistant des propriétés du comportement d'une culture, par exemple: morphologie altérée, constitution en chromosomes, sensibilité aux virus, besoins nutritionnels, capacité de prolifération, malignité, etc. Ce terme doit toujours être suivi de la description précise du changement qui a eu lieu dans la culture. L'expression « transformation de la culture » doit être réservée aux changements induits dans les cellules par l'introduction de nouveaux corps génétiques. La nature et la source de ces corps doivent également être spécifiées.

### **Tumorigénicité**

Il n'existe aucun critère de détermination de la tumorigénicité des cellules qui ne sont observées qu'*in vitro*. La tumorigénicité des cellules peut être déterminée par le comportement de ces cellules chez les animaux.

### **Toxicité**

Le terme "toxicité", lorsqu'il est utilisé pour décrire un effet observé dans des cultures, n'a de signification que lorsque l'effet lui-même est également décrit, par exemple, la toxicité démontrée par une morphologie altérée des cellules, par l'impossibilité des cellules à se fixer aux surfaces, par des changements dans le taux de croissance des cellules, par la mort des cellules etc.

## LIGNEES CELLULAIRES

- BHK 21:** Cellules de reins de hamster doré, créées en 1966 par I.A. Macpherson et M.G.P. Stoker.
- VERO:** Lignée cellulaire de rein de singe vert d'Afrique poussant en monocouche établie par Yasumura et Kawakita., en 1963.
- COS-1:** Cellules de singe vert d'Afrique transformées par un mutant déficient du virus SV 40 établi en 1981 par Y. Gluzman, Cold Spring Harbor.
- NIH/3T3:** Lignée continue de cellules fibroblastiques de souris Swiss albinos.
- 8C81 ou CC81 :** Lignée continue de cellules de chat infectées non productivement par le MSV.
- FLK/BLV:** Cellules embryonnaires de rein infectées par le BLV.
- BHK 21-1E6:** Clone cellulaire dérivant de la lignée BHK 21 après transfection du plasmide LTR(HTLV-I)  $\beta$ -galactosidase et du plasmide pVVI par DEAE dextran, par B. Guillemain *et al.*
- XC:** Lignée cellulaire d'une tumeur développée par un rat après injection intramusculaire du virus sarcomatogène de Roux, établie par Sinkovic *et al.*, en 1961.
- K.WILDE:** Cellules NIH/3T3 cotransfectées par les plasmides pMMulv-SV-nls-LacZ et R 1.7. Cette lignée produit chroniquement le Mu1V et des pseudotypes Mu1V/lacZ

# Manipulation en culture cellulaire

## **1. Préparation de la manipulation**

- entrée par le sas: sas toujours fermé en entrant ou en sortant de la salle de culture cellulaire
- blouse réservée à l'usage unique de la culture cellulaire
- lavage des mains et avant bras avant toute manipulation (savon puis alcool)
- éviter de parler en salle de culture cellulaire

## **2. Préparation de la hôte avant manipulation**

- réglage du flux de la hôte
- désinfection de la paillasse
- organisation de la paillasse: principe similaire à celui de microbiologie. De plus, tout le matériel nécessaire (et minimum pour ne pas encombrer la paillasse) pour la manipulation doit être présent avant le début de la manipulation.

## **3. Manipulation sous la hôte**

### 3.1. Gestes

- travailler à bonne distance du bord de la paillasse
- ouverture des bouchons: après ouverture, le bouchon doit être posé à l'envers, éloigné de la zone de travail
- éviter tout passage de sources de contamination (ex: mains) au-dessus d'un récipient ouvert
- manipuler les pipettes stériles en évitant tout contact avec des objets non stériles (mains, extérieur de bouchons, paillasse...)

### 3.2. Gestions du matériel à usage unique

- jeter les emballages immédiatement dans la poubelle classique
- jeter le matériel souillé dans le bac de désinfection
- garder un minimum de matériel pour ne pas gêner le flux

### 3.3. Décontamination paillasse

- réaliser une décontamination de la paillasse dès que nécessaire (gouttes de produits sur paillasse, fin de manipulation)

### 3.4. Autres remarques

- prélever en inclinant le flacon
- préchauffer tous les milieux à 37° C pour éviter les chocs thermiques
- prendre l'habitude d'aliqoter les différents produits utilisés (évite de contaminer une trop grande quantité de produit)