

## Techniques de culture cellulaire

### Quelques points de repère dans le développement de la culture tissulaire et cellulaire

#### ☉ Début 20<sup>ème</sup>

- Des cellules embryonnaires de poulet peuvent être maintenues en vie dans une solution saline hors du corps de l'animal

- Culture de moelle épinière d'amphibien dans un caillot de lymphe: preuve que les axones sont produits sous forme d'extension de cellules nerveuses isolées

#### ☉ 1940 - 1960

- Développement des milieux de culture

- Première lignée cellulaire humaine: lignée HeLa

#### ☉ 1970 – 2000 : Premières applications

- Mise au point des hybridomes et des anticorps monoclonaux

- Production de cellules transfectées à l'échelle industrielle et de biomolécules (protéines recombinantes)

#### ☉ 2000 +:

- Culture de cellules souches embryonnaires

- Développement de l'ingénierie cellulaire et tissulaire, de la thérapie cellulaire

### Généralités

La Culture cellulaire ou culture *in vitro* est un ensemble de techniques qui combinent l'asepsie à un environnement parfaitement contrôlé (milieu défini) pour faire croître des cellules hors de leur organisme(ex-vivo)ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique. Ces méthodes s'appliquent aux plantes, aux cellules animales mais aussi aux tissus et bien entendu à des cellules plus ou moins isolées

### Formes/tissus

☉ Épithéliales/endothéliales(membranes)

☉ Fibroblastes (tissus connectifs)

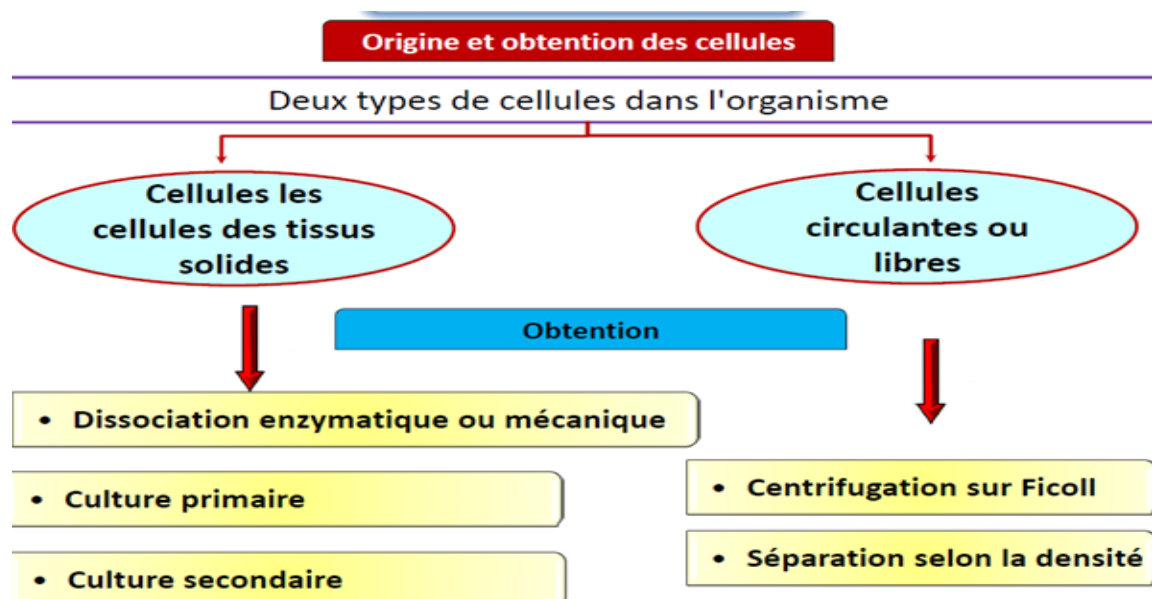
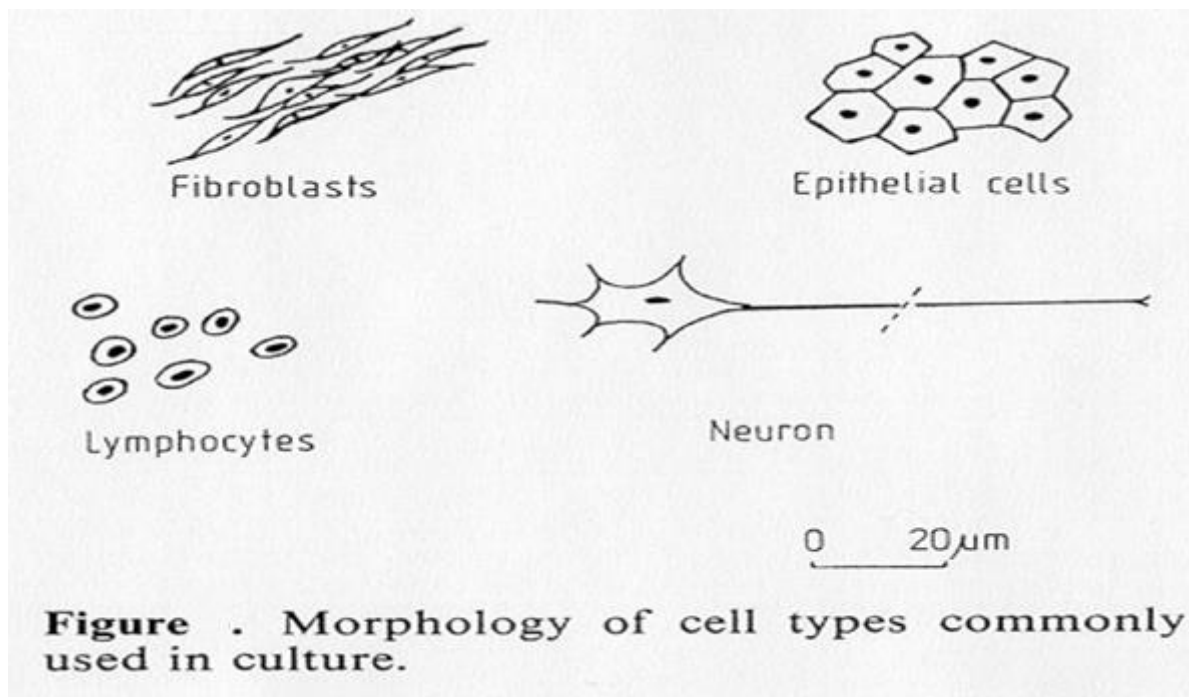
☉ Myoblastes (muscles)

☉ Neurones (syst. nerveux)

☉ Hépatocytes (foie)

☉ Erythrocytes (sang)

⊙ Lymphocytes (syst. immunitaire)



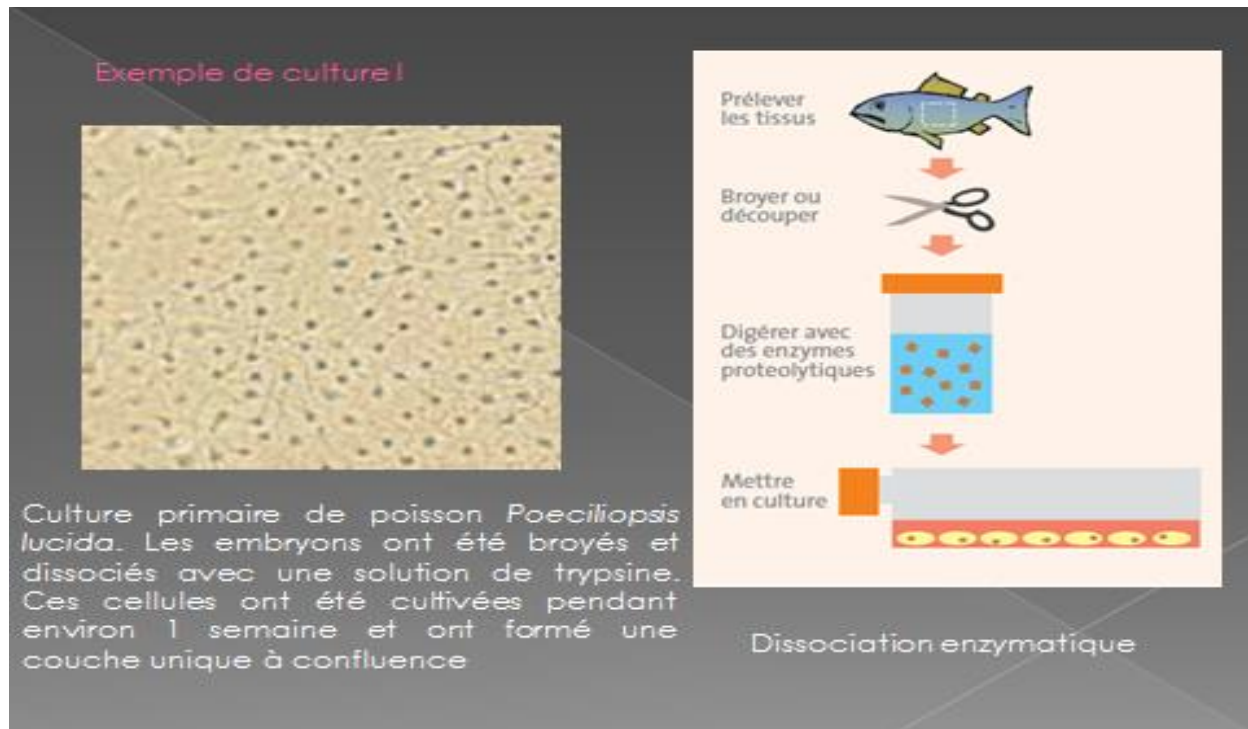
### Types de culture cellulaire

➤ **Culture Primaire ou Primoculture**

La culture primaire est la mise en culture des cellules de l'organe ou du prélèvement. Les cellules récupérées par des techniques de dissociation cellulaire sont placées dans des milieux à fin de proliférer.

Les cultures primaires sont issues de la multiplication de cellules (souvent de nature embryonnaire) prélevées directement dans les organismes, après que leurs tissus aient été dissociés par des enzymes appropriées (protéases).

La multiplication de ces cellules s'arrête lorsque la surface du milieu est couverte: c'est l'inhibition de contact.



### ➤ Culture secondaire

Les cultures secondaires résultent du repiquage de cellules issues de cultures primaires, après dilution et ensemencement dans du milieu nutritif neuf. Ces cultures sont à terme condamnées à mourir, comme celles de l'organisme de départ, après environ 50 à 100 divisions: on parle de souches cellulaires.

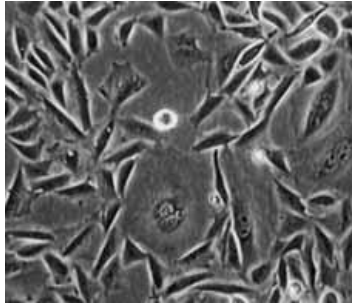
### ➤ Lignées cellulaires ou cellules immortelles

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division (entretien *in vitro* par repiquages successifs). Il s'agit en général de cellules cancéreuses, cellules prélevées sur une tumeur au départ, ou cellules rendues immortelles (transformation = cancérisation) par traitement mutagène chimique ou physique ou par utilisation de virus oncogènes.

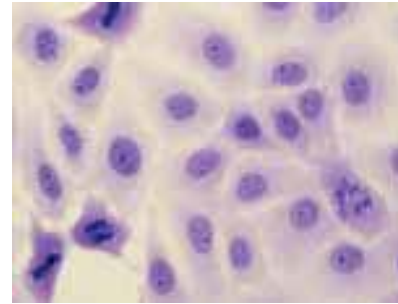
- ⊙ prélevées chez un patient (comme les cellules HeLa);
- ⊙ transformées artificiellement par un virus oncogène (c.à.d. un gène immortalisant tel que T de SV40);
- ⊙ mutées pour des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (comme par exemple la protéine p53).

Une lignée peut être :

- à durée de vie limitée: Certaines lignées cellulaires finissent par arrêter de se diviser et montrent des signes de vieillissement. Ces lignées sont appelées finies, on observe une dégénérescence des cellules au bout d'un certain nombre de repiquages.
- à durée de vie illimitée, elle est alors appelée lignée continue.
- ◎ Parmi les lignées cellulaires immortalisées, on distingue enfin des lignées dites transformées, qui induisent des tumeurs si on injecte leurs cellules à des animaux sains.



Cellules CHO-K1 - une lignée cellulaire continue (transformée) largement utilisée dérivée de tissus d'ovaires de hamsters chinois adultes en 1957.



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

### *Deux types principaux de culture cellulaire*

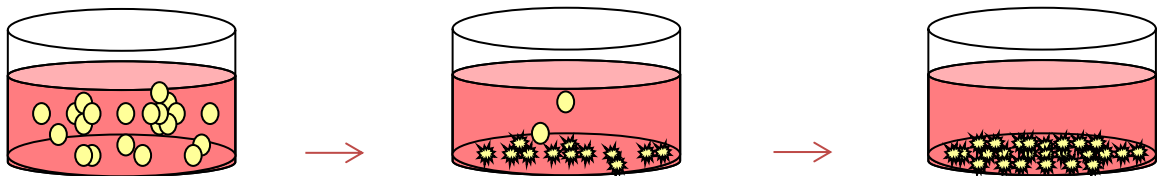
**i) Culture de cellules en suspension** (lymphocytes, moelle osseuse, certains types de tumeurs comme les tumeurs à petites cellules rondes...) : les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension



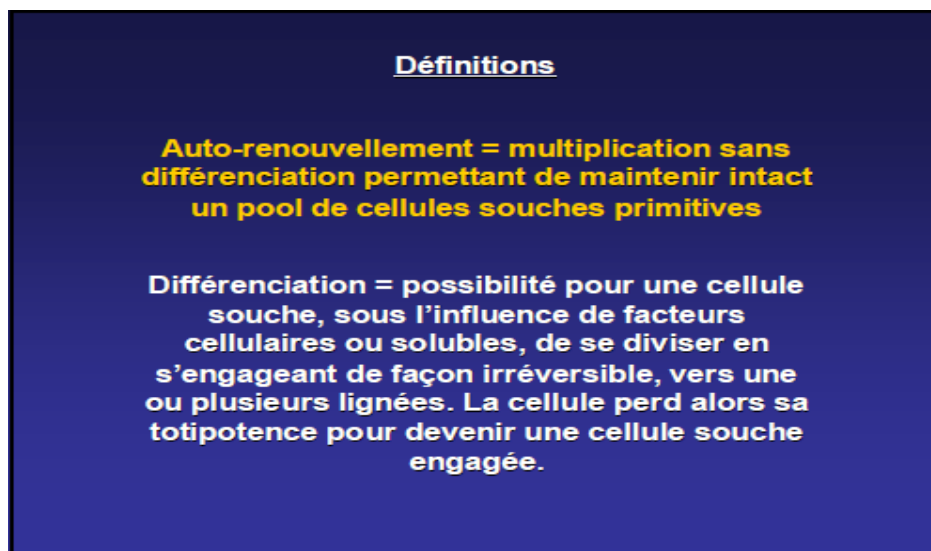
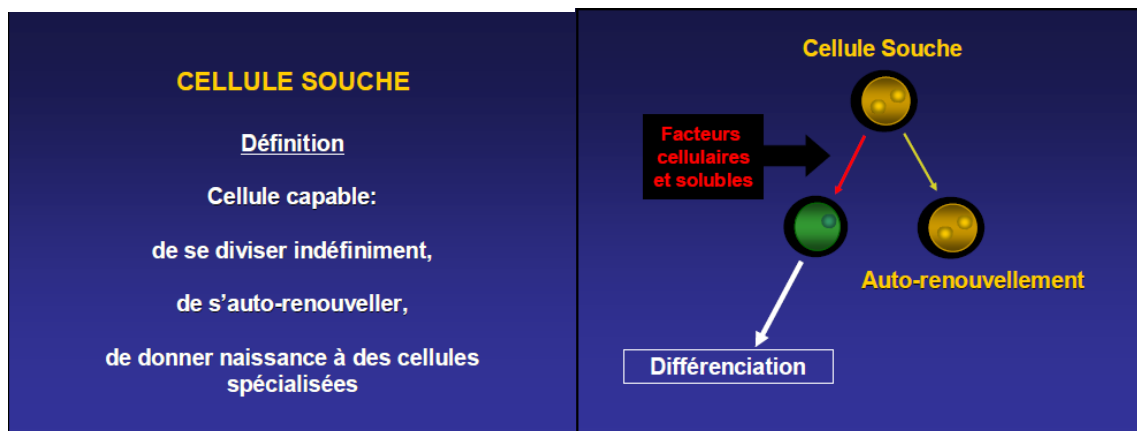
**ii) Culture sur support** : adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture

\*culture clonale « in-situ »

\*culture panmictique



## Concept de cellule souche et détermination de la différenciation



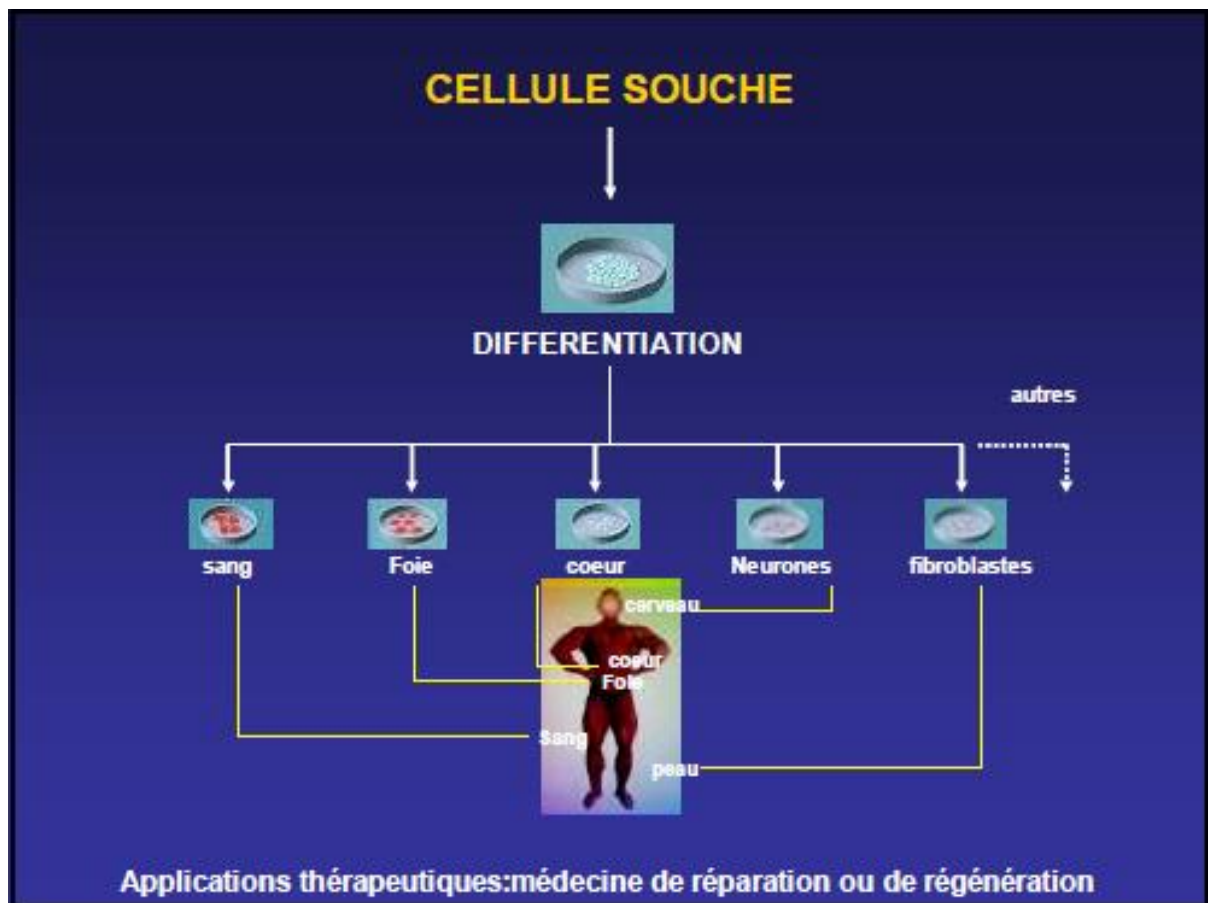
### ☉ Les cellules souches

Ce sont des cellules de l'embryon ou de certains tissus de l'adulte ayant la faculté de se diviser indéfiniment et donnant, à chaque division, une cellule identique à elle-même et une cellule qui donnera à son tour des cellules spécialisées. Les cellules souches peuvent ainsi engendrer tous les types cellulaires de l'organisme, leur utilisation a donné naissance à de nombreuses applications dans la biotechnologie et le domaine médical.

Les cellules souches (CS) sont des cellules dites « **immatures** » et « **indifférenciées** ». Par conséquent, elles sont capables, dans un environnement donné, de **se différencier** en cellules ou organes spécialisés, voire d'engendrer un organisme entier. Ces cellules sont également douées d'une propriété **d'autorenouvellement**, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se multiplier à l'identique, notamment en culture *in vitro*.

Ainsi, les CS peuvent se diviser de façon symétrique, donnant naissance à deux cellules indifférenciées, ou bien de façon asymétrique, en générant une cellule spécialisée et une

cellule immature. Ces stratégies permettent de conserver un stock de cellules immatures tout au long de la vie.



## Définitions

**Cellule souche totipotente** = capable de s'auto-renouveler et se différencier.

Rare, quiescente

Assure le maintien du stock des cellules souches

Assure la production de cellules différenciées

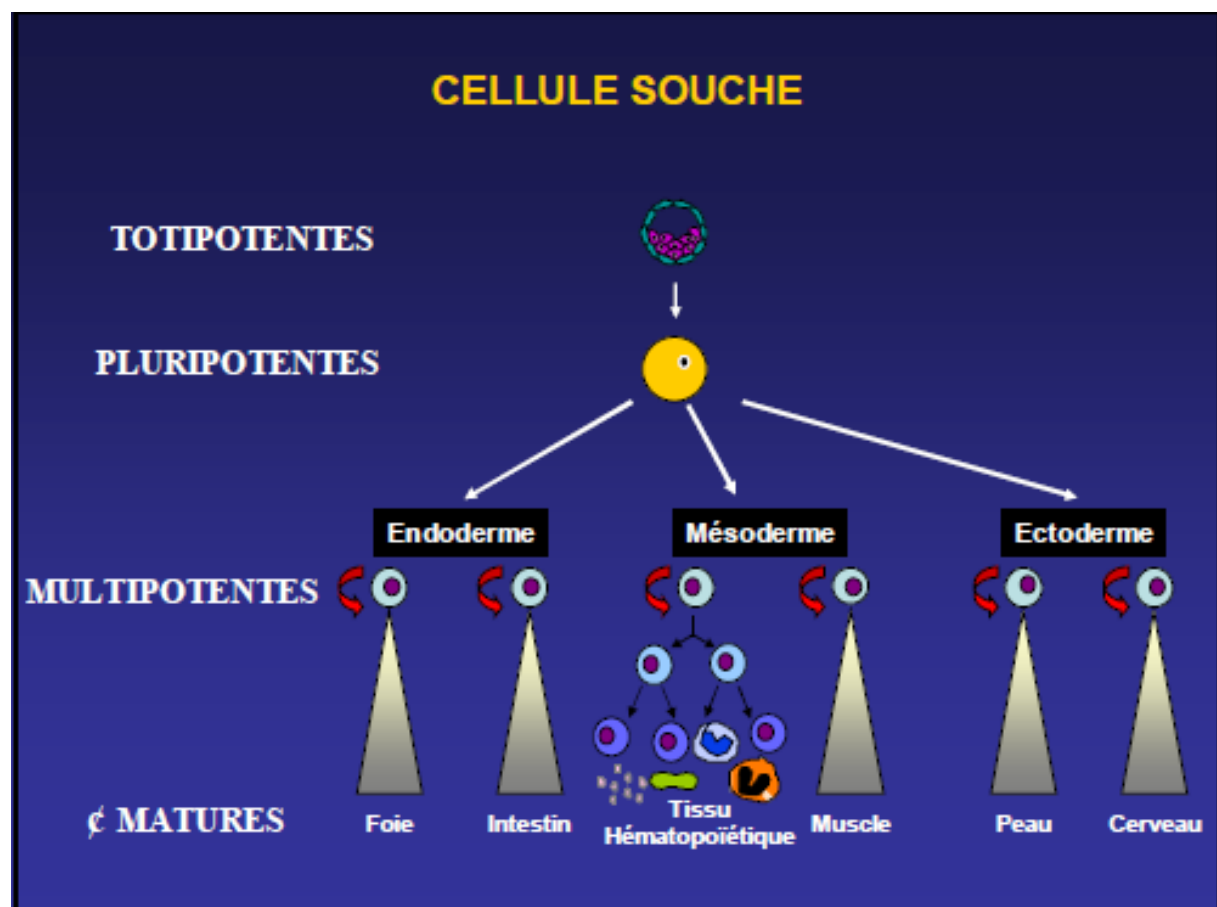
**Cellule souche pluripotente** = perte progressive des capacités d'auto-renouvellement au fur et à mesure de la différenciation.

Peu nombreuses

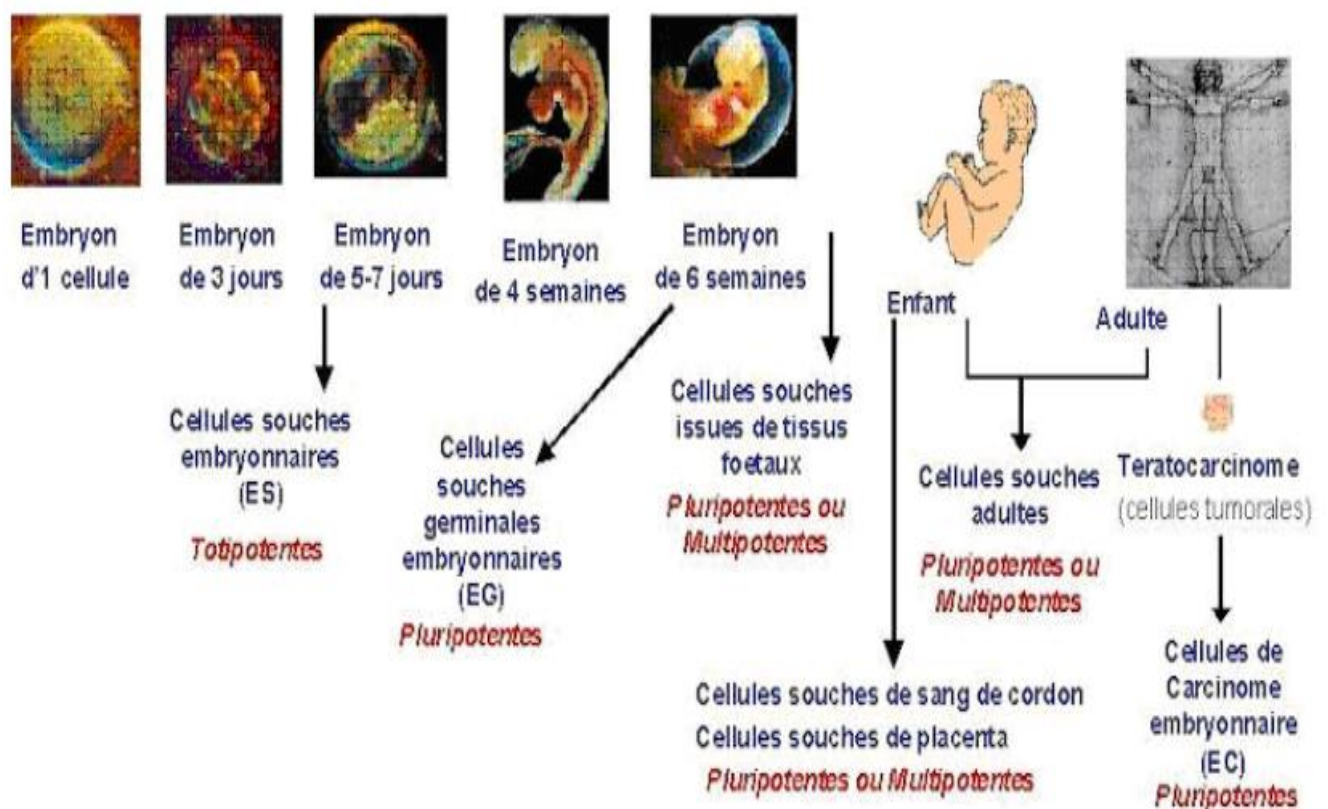
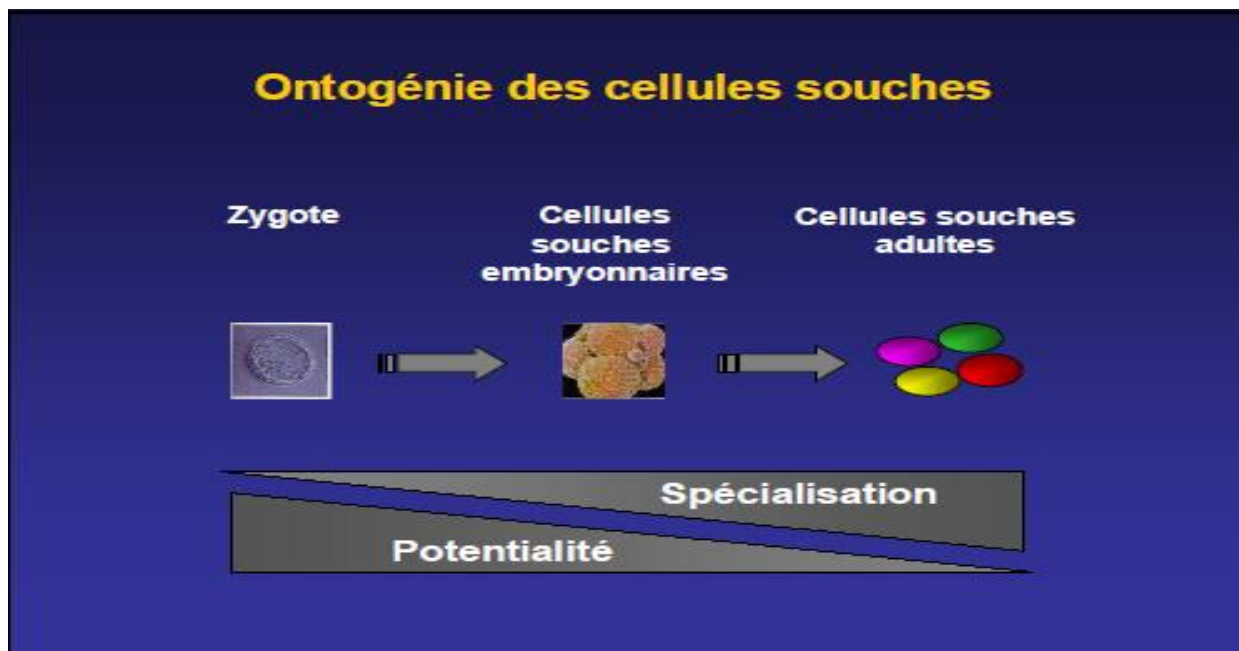
Non identifiables morphologiquement

**Cellule multipotente** = n'est plus une cellule souche, incapable de s'auto-renouveler. Caractérisée par la multiplication et la maturation cellulaire.

Identifiable morphologiquement









La **différenciation** cellulaire est le processus par lequel une cellule peu ou pas différenciée acquiert les caractéristiques d'un type cellulaire sur le plan morphologique et fonctionnel.

Les cellules différenciées : sont caractérisées par une structure cellulaire particulière (cellule épithéliale, musculaire, neurone..), une production spécifique (hormone, enzymes ; hémoglobine) et une fonction cellulaire spécifique (contractio musculaire, transport de gaz, communication nerveuse...).

Les cellules d'un organisme donné sont caractérisées par des états de différenciation différents mais possèdent le même le génome : c'est l'expression de gènes spécifiques qui explique la différence.

Une cellule capable de se différencier en:

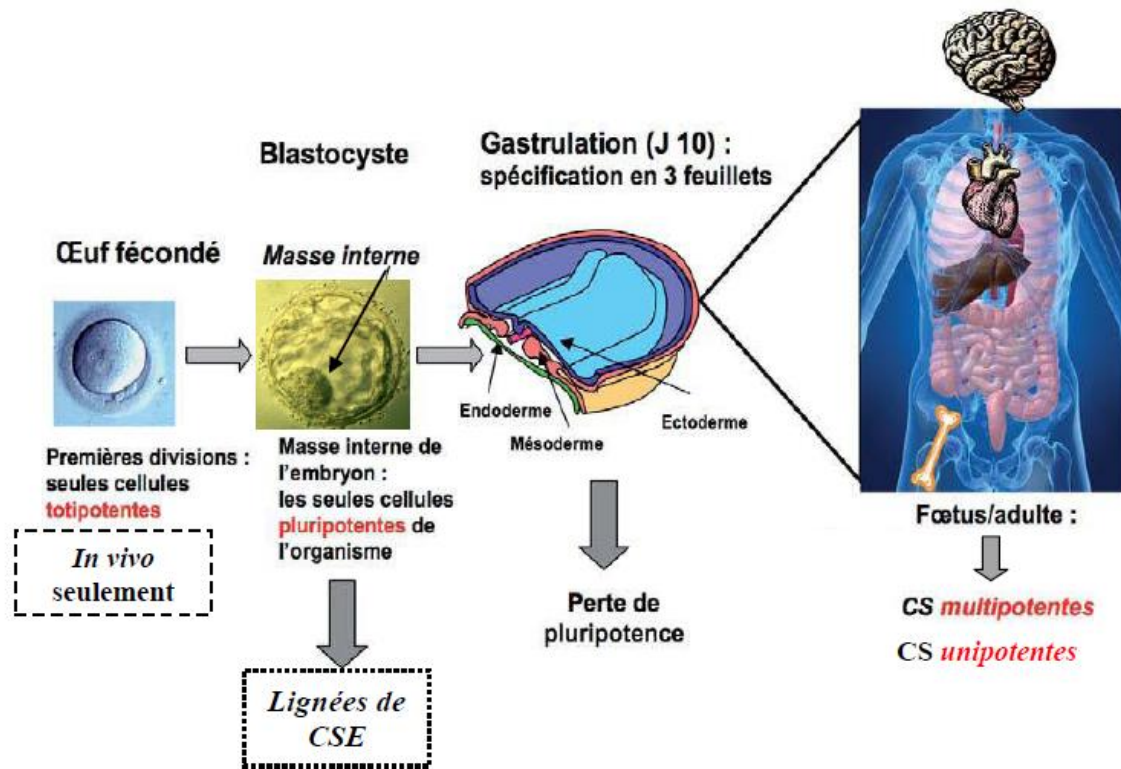
- En tous les types cellulaires d'un organisme si elle est totipotente: (zygote et très jeunes cellules embryonnaires)
- En plusieurs types de cellules : cellules pluripotentes ou cellules souches
- Peut s'auto-renouveler
- Spécialisée : cellules souches hématopoïétiques, de l'épiderme ...

## LES DIFFERENTES CELLULES SOUCHES

**Il existe 3 grands types de cellules souches**  
**cellules souches embryonnaires**  
**cellules souches fœtales**  
**cellules souches adultes**

- ☉ Au cours de l'embryogénèse et à partir du cinquième jour, l'embryon s'organise en territoires spécialisés, ayant chacun un destin propre : il s'agit du stade blastocyste du développement embryonnaire. Les cellules qui formeront les tissus embryonnaires se regroupent pour former la masse interne du blastocyste au sein d'une cavité bordée par une membrane externe, le trophoblaste. Ce dernier donnera le placenta et les annexes extra embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires sont directement issues de cette masse cellulaire interne.

- Le génome de ces cellules est organisé de façon à coder l'information nécessaire pour former tous les tissus de l'organisme (pluripotence). Ensuite, les cellules de cette masse interne se spécialisent à leur tour et délimitent trois feuillets :
- l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (processus de gastrulation). Chacun est à l'origine de certains des futurs tissus de l'organisme.



**Figure.** Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire.

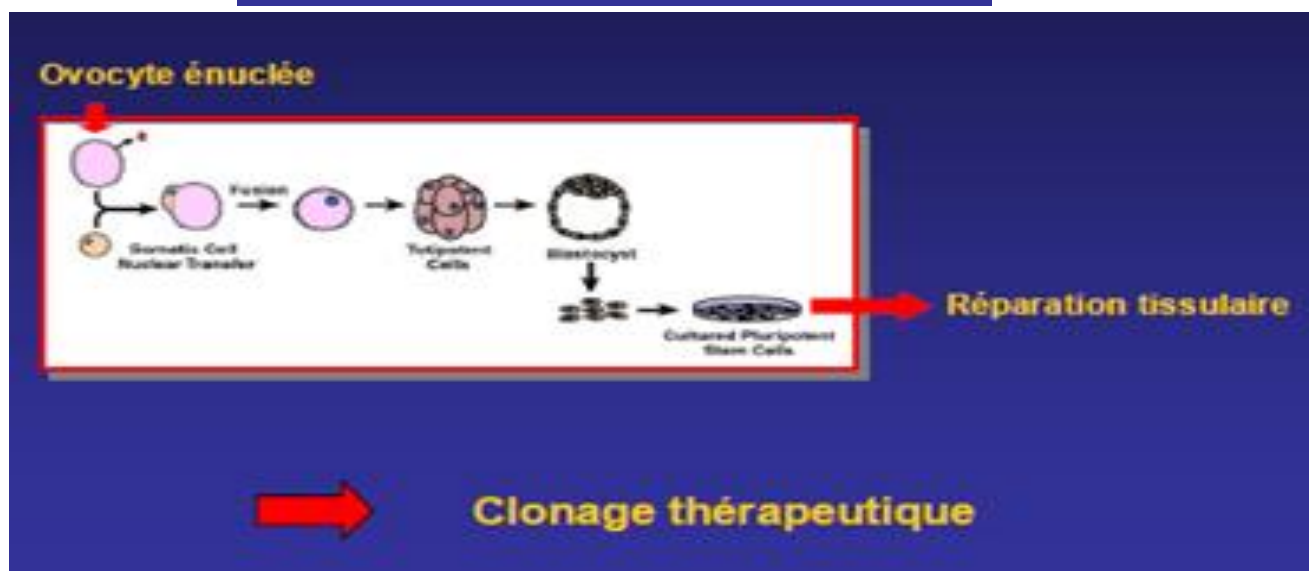
- In vivo*, la pluripotence des cellules souches embryonnaires n'existe que pendant une courte durée. La progression du développement embryonnaire conduit inéluctablement à la spécialisation de ces cellules.
- Cette situation est donc très différente des conditions *in vitro*, où l'objectif est de maintenir les propriétés de pluripotence des cellules afin d'en tirer parti en thérapeutique.

C'est la raison pour laquelle, les chercheurs ont développé des lignées de cellules souches embryonnaires capables de proliférer de façon illimitée en culture tout en conservant leur caractère pluripotent.

#### Mode d'obtention des cellules souches embryonnaires

- En France, la création d'embryons à des fins de recherche est interdite par la loi.

- ⊙ Les CSE proviennent d'embryons surnuméraires créés dans le cadre d'une fécondation *in vitro* et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Les cellules de la masse interne du blastocyste sont extraites puis mises en coculture avec des cellules nourricières (fibroblastes) et en présence de facteurs de croissance. Ainsi, les CSE acquièrent la capacité de proliférer indéfiniment à l'identique, en inhibant leur évolution naturelle de différenciation qui survient normalement *in vivo*. De cette façon, sont créées des lignées immortelles de CSE humaines pluripotentes.
- ⊙ Environ 600 lignées de CSE humaines ont été validées dans le monde, dont une cinquantaine est régulièrement utilisée par la majorité des laboratoires travaillant dans ce domaine.



## Intérêts des cellules souches embryonnaires

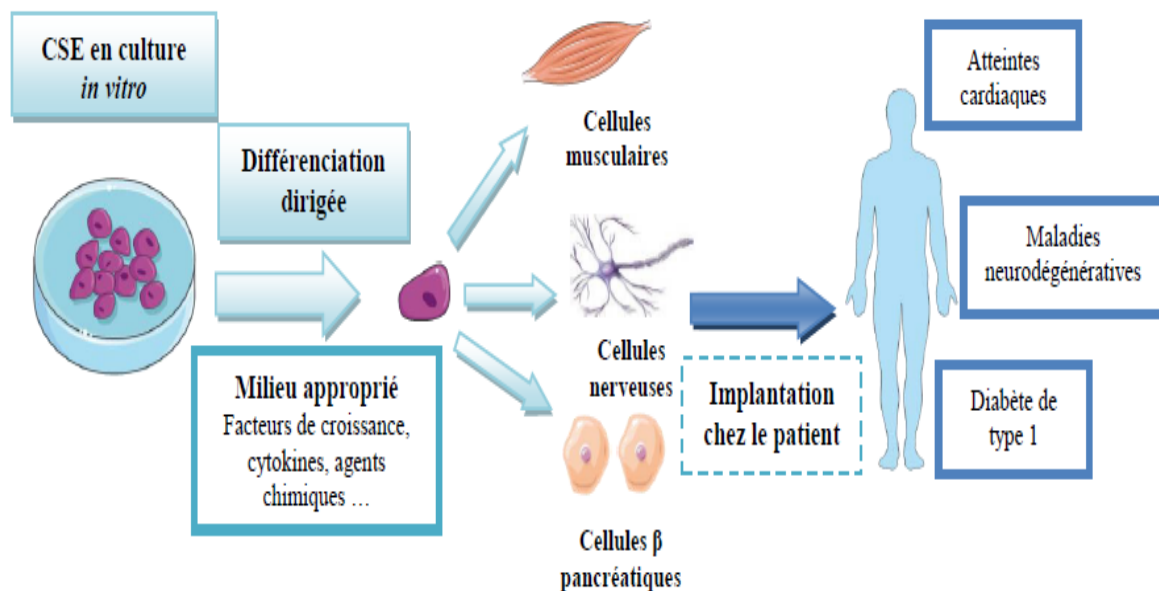
### a. La thérapie cellulaire et la médecine régénératrice

Grâce à leur grande capacité de proliférer *in vitro* et à leur capacité de s'autorenouveler indéfiniment, les CSE humaines constituent une source cellulaire potentiellement illimitée et facilement accessible (caractéristique idéale pour produire des banques de cellules). Ainsi, ces

cellules offrirait la perspective d'un produit de thérapie cellulaire allogénique immédiatement disponible.

Leur propriété de pluripotence permet à ces cellules de pouvoir se différencier vers tous les types de cellules de l'organisme. En culture *in vitro*, les CSE humaines peuvent se différencier, entre autres, en cardiomyocytes, en neurones, en kératinocytes ou encore en cellules  $\beta$  pancréatiques sécrétant de l'insuline.

- Ces cellules spécialisées pourraient ensuite constituer un traitement intéressant dans le cadre d'une médecine régénératrice. Des pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie de Huntington), des atteintes cardiaques (infarctus du myocarde), des atteintes cutanées (grands brûlés) ou le diabète de type 1, pourraient ainsi, être traités par des cellules spécialisées directement dérivées de ces cellules souches pluripotentes



**Figure.** Utilisation potentielle des CSE humaines comme produit de thérapie cellulaire à des fins de médecine régénératrice.

### ***b. Modèles cellulaires en recherche pharmacologique***

Outre l'intérêt évident que représentent les CSE humaines en thérapie cellulaire, ces dernières constituent un outil idéal de modélisation cellulaire pour la recherche. Le modèle cellulaire une fois défini (cellules musculaires, cellules nerveuses, etc.), permettrait de tester *in vitro* une grande quantité de molécules sur ce modèle (criblage à haute densité), d'évaluer la toxicité d'un produit ou encore d'identifier un médicament potentiel. Ces expérimentations constitueraient une alternative intéressante aux modèles animaux. Les lignées de CSE mutées, obtenues après un diagnostic préimplantatoire, seraient très utiles à la modélisation de certaines maladies génétiques (la mucoviscidose par exemple) et par conséquent, au criblage de molécules thérapeutiques.

### *c. Génomique fonctionnelle*

Enfin, les CSE humaines permettraient d'étudier la fonction des gènes humains et en particulier tous les gènes du développement qui représentent une grande partie des gènes humains non encore caractérisés.

## **Cellules souches fœtales**

**Issues de tissus fœtaux à un stade beaucoup plus tardif (5-9 semaines) que le stade de blastocyste embryonnaire**

**Isolées à partir de fœtus résultant d'avortements**

**Deux classes distinctes:**

- **Cellules somatiques fœtales** avec 2 tissus particulièrement importants dans une perspective thérapeutique
  - cellules souches du système nerveux central (maladie de Parkinson ou de Huntington)
  - hépatocytes fœtaux (transplantation)

**Cellules germinales**, caractéristiques similaires à celles des cellules ES, mais génome moins stable

## **Cellules souches adultes**

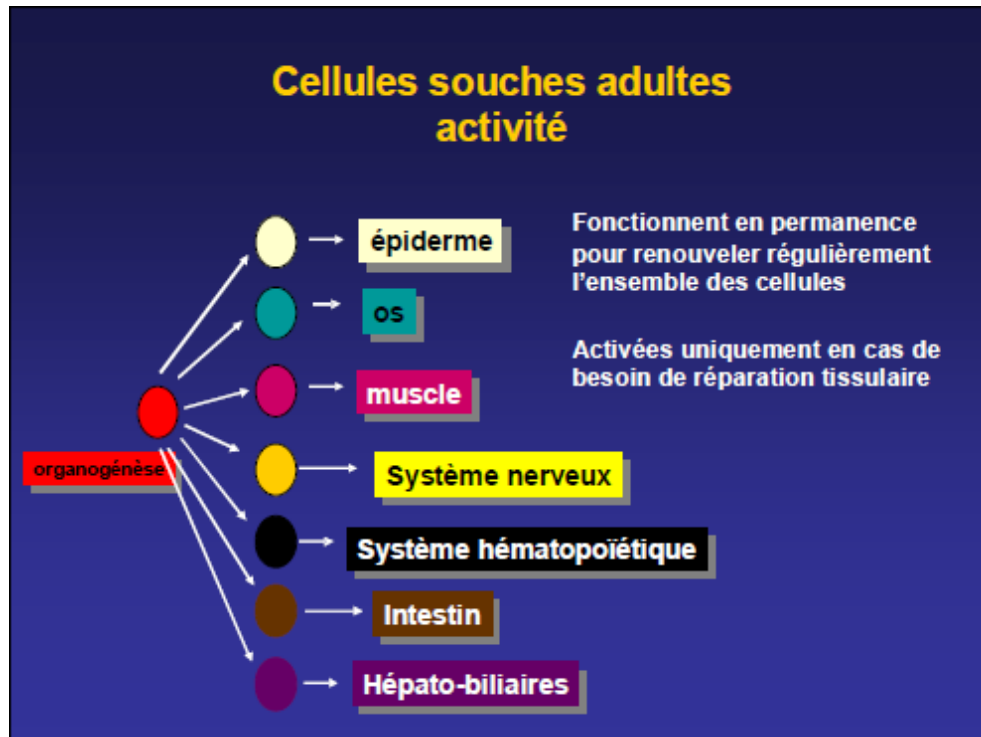
**Fonctions:**

- **donner naissance aux cellules matures d'un tissu donné (= homéostasie)**
- **réparer un tissu donné en cas de dommages**

**Auto-renouvellement  
(= réservoir de cellules  
Souches)**

**Différenciation  
(= acquisition des  
caractéristiques du tissu  
à réparer)**





### Cellules souches adultes caractéristiques

A la différence des ES, elles ne sont pas totipotentes et sont généralement programmées pour un tissu donné.

Elles ne se multiplient pas à l'infini à l'état indifférencié

Elles sont très hétérogènes, compte tenu de la diversité des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent

Certaines sont pluripotentes comme les cellules souches hématopoïétiques qui produisent toutes les lignées sanguines et s'auto-renouvellent

Certaines sont multipotentes comme les cellules souches nerveuses qui produisent les neurones mais également les cellules accessoires du système nerveux (astrocytes, oligodendrocytes)

Certaines sont unipotentes et ne produisent qu'un seul type de cellules comme les cellules « souches » de l'épiderme qui ne produisent que les kératinocytes



## **Cellules souches adultes caractéristiques**

**Capacités de mise en culture et de prolifération différentes selon le type de cellules souches adultes:**



## **Les points importants**

**Les cellules souches embryonnaires sont totipotentes puisqu'elles peuvent produire tous les feuilletts embryonnaires et les tissus qui en dérivent, ainsi que les cellules germinales.**

**Elles peuvent être cultivées au laboratoire à l'infini tout en conservant leur caractère de totipotence et en gardant un génome intact.**

**Les tissus fœtaux contiennent des cellules souches dont l'utilisation est très limitée par l'accessibilité aux tissus.**

**Les cellules souches adultes assurent le maintien de l'homéostasie d'un organe ou d'un tissu en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion. Elles ont perdu les capacités de totipotence.**

## Milieux & matériels de culture cellulaire

### A. Besoins nutritifs

Toutes les cellules, qu'elles soient eucaryotes (animales, végétales, fongiques) ou procaryotes (bactéries), ont des besoins nutritifs plus ou moins nombreux.

Dans le cadre de la culture d'organismes unicellulaires (bactéries, levures), ces exigences sont la plupart du temps limitées. En revanche, dans le cadre de la culture de cellules eucaryotes supérieures, les besoins nutritifs sont plus nombreux :

- ⊙ **eau** : indispensable à la vie ;
- ⊙ **éléments de construction** :
  - macroéléments organiques ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) : C, H, O, N, P, S
  - macroéléments ioniques = ions minéraux ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) : phosphates, sulfates, nitrates,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ...
  - oligoéléments ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ , I-...
- ⊙ **énergie** : venant de l'oxydation des molécules organiques ou minérales,
- ⊙ **facteurs de croissance** : acides aminés particuliers, vitamines, hormones...

### B. Milieux de culture

Préparations qui contiennent **toutes les substances nutritives** (sels minéraux, acides aminés, lipides, glucides, vitamines) nécessaires aux cellules, en quantités suffisantes et dans des **conditions de vie favorables**. Cela implique une composition qui répond aux besoins nutritifs des cellules étudiées, mais également de présenter des conditions optimales de croissance (pH, force ionique...).

#### B.1. Caractéristiques

Les milieux de culture pour cellules eucaryotes doivent assurer :

- la **nutrition et le support des cellules** : ils peuvent être liquides ou gélifiés (présence d'agarose entre 5 et 15  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ;
- un **pH optimal** (pH entre 7,2 et 7,4 pour les cellules animales) : système tampon  $\text{CO}_2$ /hydrogénocarbonate (avec une étuve dont le taux de  $\text{CO}_2$  est contrôlé), ou tampon organique (HEPES par exemple) ;
- la **tonicité** : milieu isotonique au fluide extracellulaire des animaux, et atmosphère saturée en vapeur d'eau (pour éviter l'évaporation qui conduirait à une augmentation de l'osmolarité) ;
- l'**asepsie** : le milieu doit être stérile, on y ajoute des antibiotiques à 1 %.

#### B.2. Composition et préparation

Il existe différentes compositions, mais qui assurent toutes les besoins nutritifs des cellules qu'on y cultive. Les milieux sont en général composés comme suit :

- une base minimale = **milieu minimum**, contenant les éléments indispensables, de composition parfaitement maîtrisée (synthétique) : solution saline tamponnée, acides aminés, substrat énergétique, vitamines, coenzymes et éventuellement nucléotides. ex : MEM, DMEM, RPMI, HAM...
- un additif complexe (la plupart des cellules ne se contentant pas de ce milieu minimum) : le **sérum** (sérum de veau foetal SVF, ou sérum de veau nouveau-né SVNN), à raison de 5 à 10 % (V/V) en général, et dont le rôle est multiple : adhérence, apport d'oligo-éléments et de facteurs de croissance cellulaires, inhibition de la trypsine... Après ajout de sérum, dont la composition peut varier d'un lot à l'autre, le milieu est dit semi-synthétique. Lors de la croissance contrôlée de certaines lignées cellulaires, on doit parfaitement maîtriser la composition du milieu : on remplace alors le SVF/SVNN par des **substituts totalement synthétiques**.

### B.3. Stérilisation

Elle est nécessaire, avant utilisation, pour éliminer toute forme de vie (y compris les spores bactériennes). Elle se fait par différents moyens physiques : **filtration** (pour les molécules fragiles), **irradiation**, **autoclavage**.

#### C. Conditions de culture

##### ☉ Température

Elle est en général de 37 °C pour les cellules animales, maintenue par un appareillage de type **étuve**.

##### ☉ pH

Le pH est maintenu relativement constant grâce au **système tampon**, qui utilise notamment le CO<sub>2</sub> de l'atmosphère de culture. Il sera aux alentours de 7,2-7,4 pour les cellules animales.

- ☉ L'indicateur coloré (rouge de phénol) est important : rouge si basique (contamination fongique), jaune si acide (contamination bactérienne ou mort cellulaire), rose pour un pH normal.

##### ☉ Système tampon CO<sub>2</sub> /hydrogénocarbonate

Un tampon est constitué par l'association d'un acide faible et d'un sel de base forte, ou d'une base faible et d'un sel d'acide fort, et qui **empêche ou limite la variation de pH d'une solution** lorsqu'on lui ajoute un acide ou une base forte.

Le système **CO<sub>2</sub>/hydrogénocarbonate** est un tampon naturel du sang et du liquide interstitiel (mais pas le seul). Malgré leur pK<sub>a</sub> de 6,10, les hydrogénocarbonates sont efficaces car ils sont fortement concentrés dans le sang et le CO<sub>2</sub> s'échange avec l'atmosphère : on parle de système tampon « ouvert ».

- ⊙ En culture cellulaire, le CO<sub>2</sub> de l'atmosphère de culture se dissout partiellement dans l'eau du milieu pour former un acide et un couple tampon, selon l'équilibre suivant :



- ⊙ **Atmosphère (gaz et hygrométrie)**

- ⊙ En général, on utilise une **pression de CO<sub>2</sub>** (pression partielle  $p\text{CO}_2 = 5-15 \%$ , exprimée en % de pression totale). En outre, l'air doit être **humide** (84-85 %), ce qui évite l'évaporation du milieu. Certains types cellulaires nécessitent également une atmosphère enrichie en N<sub>2</sub>.

#### D. Matériel et équipement

Un matériel spécifique et un équipement adaptés sont attendus pour ces cultures.

- ⊙ **Contenants (flacons, flasks, boîtes, plaques multipuits, tubes...)**

On regarde la nature du support, la présence de bouchons à filtre (assurant les échanges gazeux dans le cadre d'un système de culture semi-clos), la surface de contact avec l'air, la surface d'adhérence...

La nature du support est très importante pour les cultures stationnaires : il peut s'agir de verre, de plastique, ou même de supports organiques (collagène, fibronectine...).

- ⊙ • **Enceintes thermostatées** Il peut s'agir d'étuves à CO<sub>2</sub> (cellules animales), dans lesquelles on contrôle également un cycle de température. 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.

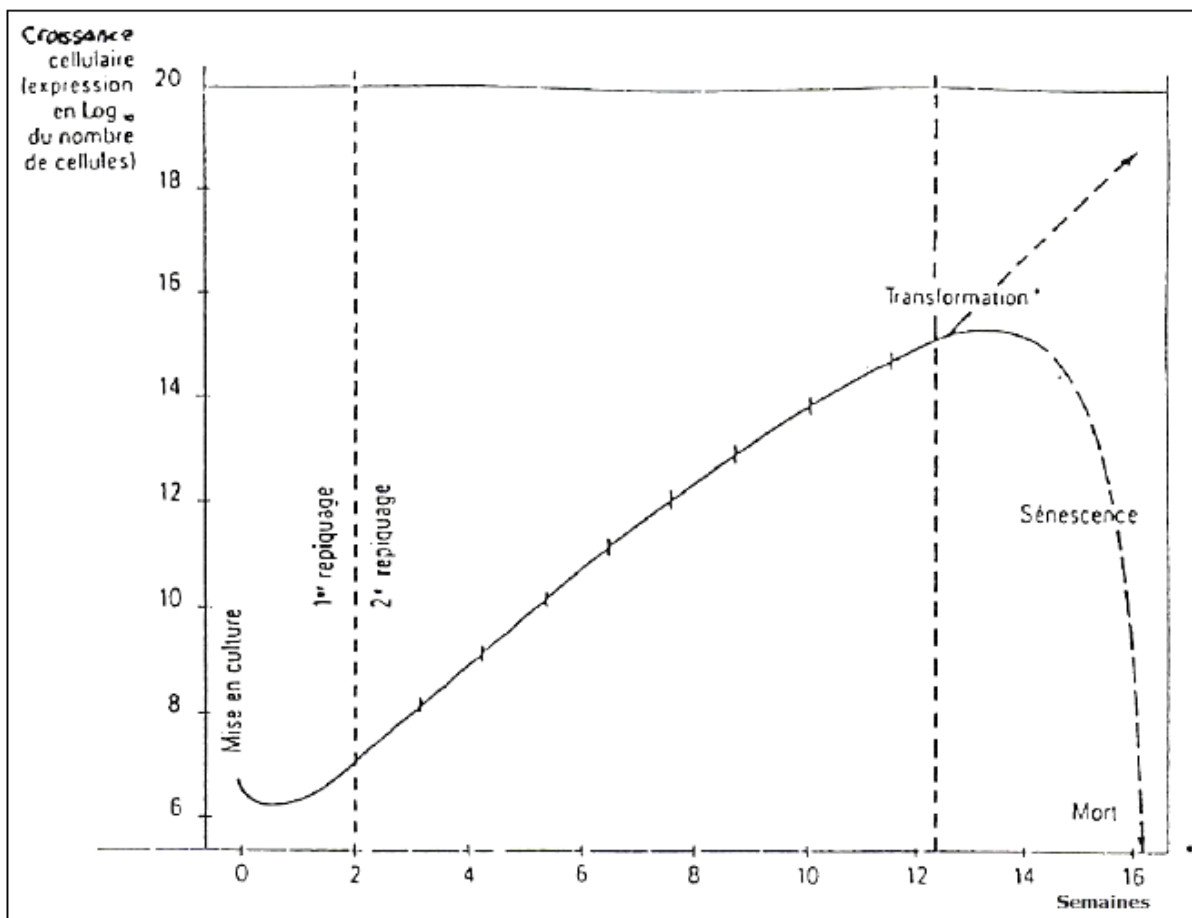
- ⊙ • **Hottes à flux laminaire**

- ⊙ Elles assurent la stérilité des manipulations sur les cellules en culture, en préservant la surface de travail de l'arrivée de tout micro-organisme ou autre contaminant porté par des poussières. Un flux d'air vertical continu et filtré joue le rôle de barrière. Le travail sous hotte doit être précis et minutieux, afin de ne pas être vecteur de contaminations.

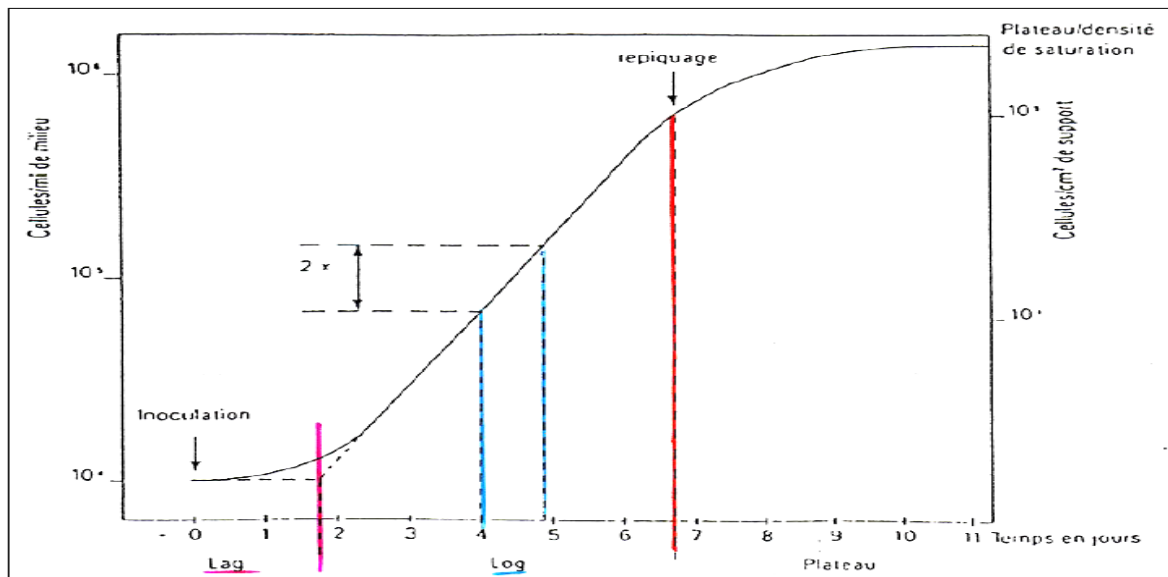
- ⊙ **Cytoculteurs (bioréacteurs cellulaires)**

Dans le cadre de production d'un métabolite par une culture cellulaire donnée, les flasks ne suffisent en général plus, de par leur volume limité. On utilise alors des bioréacteurs pour cellules eucaryotes, sortes d'enceintes complexes de volume plus important, permettant alors le contrôle et la régulation de nombreux paramètres de façon précise (température, pH, agitation, oxygénation...). Ils conviennent bien pour des cultures en suspension à grande échelle. On peut les utiliser :

- ⊙ en **système clos** = **culture discontinue** = **batch** : le milieu n'est pas renouvelé au cours de la culture, l'appauvrissement en éléments nutritifs et l'accumulation de déchets aboutissent à la fin de la croissance cellulaire ;
- ⊙ en **système semi-clos** = **culture discontinue renouvelée** = **fed-batch** : du milieu frais (ou des gaz) est ajouté régulièrement au milieu (perfusion), dans la limite du volume du cytotqueur ;
- ⊙ en **système ouvert** = **culture continue** : l'ajout continu de milieu frais (et de gaz appropriés) et l'élimination des déchets assurent une culture sur la durée et donc une plus grande production du métabolite d'intérêt ; l'étape délicate reste alors la purification de ce produit, sans oublier de conserver la stérilité du procédé.



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



### 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.

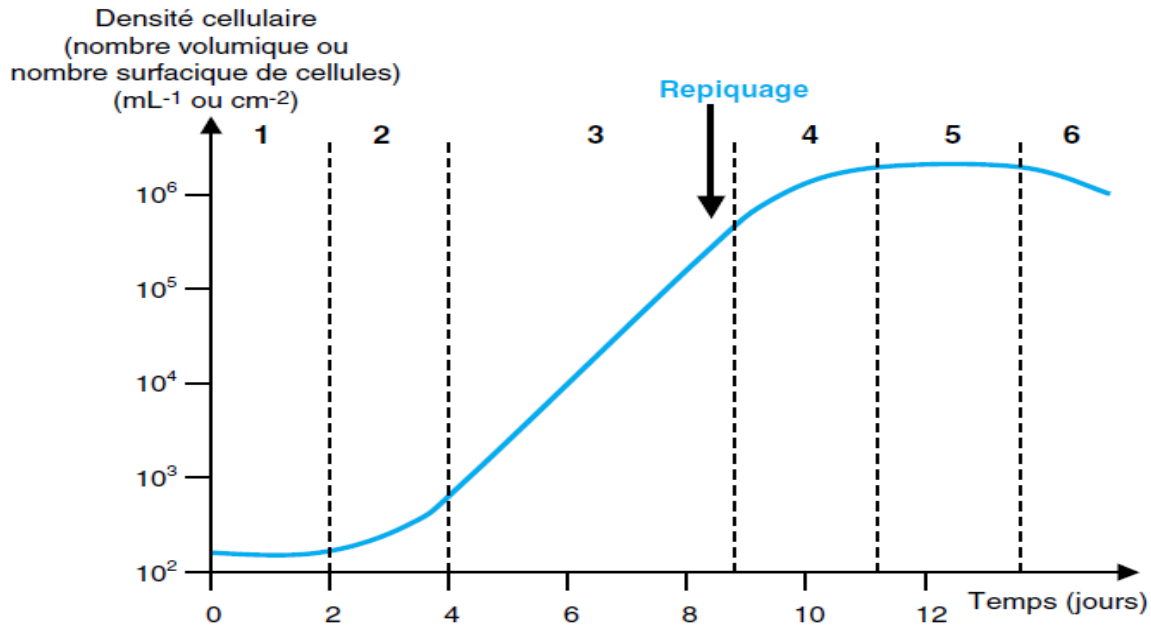
### Évolution d'une lignée cellulaire

La croissance d'une lignée cellulaire présente plusieurs **phases**, caractérisées notamment par la **vitesse spécifique de croissance  $\mu$**  (voir tableau).

Quand la « densité cellulaire » (nombre volumique de cellules en mL<sup>-1</sup>, nombre surfacique de cellules en cm<sup>-2</sup>) devient trop importante et que les cellules recouvrent entièrement la surface de culture (cas de cellules adhérentes), on parle de **confluence** : il se produit alors une **inhibition de contact** qui se traduit par la phase de plateau (voire la phase de décélération) observée ci-dessous. Les lignées cancéreuses ont en général perdu cette inhibition de contact, et prolifèrent de manière non contrôlée avec un nombre de passages infini.

La courbe permet de déterminer le temps de doublement, ou temps de génération, ou encore temps de division cellulaire.





### Changement de milieu et repiquage

On peut éviter les deux dernières phases de la courbe de croissance en **changeant le milieu** (ajout de milieu neuf par exemple), ou en **repiquant** la culture à temps (passage).

En effet, la croissance cellulaire entraîne une consommation des substrats, et l'accumulation de déchets métaboliques qui acidifient le milieu et peuvent aboutir à la mort cellulaire. De plus, l'augmentation de la « densité » cellulaire entraîne l'arrêt de la croissance, et même la mort (nombre surfacique de cellules maximal  $\approx 10^5$  à  $10^6$  cm<sup>-2</sup> en général).

Les indices de cet état sont le **jaunissement du milieu** (indicateur de pH) et la **modification morphologique** des cellules (arrondissement, décollement...).

#### • Changement de milieu

Pour les cellules adhérentes non encore confluentes, on peut se contenter de changer le milieu appauvri par du milieu neuf : les cellules continuent de se multiplier.

#### • Repiquage ou passage

La périodicité du repiquage dépend du type cellulaire et de la vitesse de croissance. Il s'agit cette fois de changer le milieu et le contenant, en transférant les cellules dans un contenant plus grand ou en les diluant pour que la croissance continue. Les étapes sont les suivantes (**travailler stérilement**) :

- **élimination de l'ancien milieu** : aspiration à la pipette ;
- **lavage des cellules** (au PBS par exemple) : élimination des traces de SVF qui inhibent l'activité trypsique ;

- **décollement des cellules = trypsination** : utilisation de trypsine, une protéase qui rompt les liaisons cellules/support pour les décoller du support, en présence d'EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétate) qui chélate les cations divalents normalement nécessaires aux intégrines pour l'adhésion ;
- **ajout de milieu complet avec SVF** : il contient de l'antitrypsine qui arrête l'action de la trypsine, et permet de remettre les cellules en suspension ;
- **numération cellulaire** (et test de viabilité cellulaire) : afin de déterminer la concentration cellulaire et de diluer correctement la culture (*cf.* fiche 3) ;
- **inoculation** d'un nouveau flask de culture : ajout d'une quantité définie de cellules dans un volume défini de milieu, sur une surface définie.

#### ➤ **Conservation**

Les lignées cellulaires sont initialement issues d'explants, c'est-à-dire de tissus animaux ou végétaux dissociés ou broyés : on obtient alors une **culture primaire**, qu'il est possible de repiquer pour obtenir une ou des **cultures secondaires**.

Dans le cas de cellules normales (non transformées), le nombre de passage est limité, et il devient difficile de conserver longtemps ce genre de cultures.

Pour les cellules transformées en revanche, le nombre de passage est théoriquement infini, puisqu'elles sont immortelles. Cependant, la multiplicité des repiquages peut aboutir à un changement phénotypique des cellules, et on peut avoir besoin de conserver des échantillons des différents passages.

Il existe différentes techniques de conservation des cellules eucaryotes.

#### • **Conservation par le froid**

Les cellules peuvent être conservées en azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pendant de longues périodes, à condition d'avoir été correctement congelées et dans une solution cryoprotectrice appropriée (DMSO par exemple). On utilise pour cela des cryotubes en plastique spécial, qui résistent à cette température. La congélation se fait en général en deux étapes :

- **congélation progressive jusqu'à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,**
- **puis congélation rapide après immersion dans l'azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).**

La revivification des cultures est une étape délicate, car :

- le retour à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  doit être rapide (bain thermostaté),
- le DMSO doit être rapidement éliminé par lavage-centrifugation (le DMSO est toxique à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### • **Conservation sur milieu pauvre**

Comme pour les bactéries, on peut utiliser des milieux pauvres pour la conservation des lignées cellulaires. L'avantage est qu'il est plus facile de faire repartir une telle culture que de repartir d'une culture congelée. L'inconvénient est que la conservation n'est pas forcément optimale, puisque les cellules continuent de se multiplier, à un rythme très ralenti.

## ☉ **Contrôles fonctionnels des cellules en culture**

Deux caractéristiques sont à considérer:

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

Selon que l'on débute une culture ou qu'on est en culture de routine, les paramètres de contrôle diffèrent.

## ☉ **Les contrôles réalisés lors de la mise en route d'une culture**

On vérifie les conditions d'asepsie lors de la dissection et on augmente la dose d'antibiotique et fongique si nécessaire. On vérifie l'état des cellules recueillies par le bleu de trypan.

- ☉ 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.

## ☉ **Les contrôles de routine**

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**

En ce qui concerne les cellules adhérentes, le changement du milieu usé s'effectue par aspiration.

Les cellules en suspension sont tant qu'à eux, soumis à une centrifugation à 800 jets.

Lorsque la population cellulaire est confluente, on rince le milieu avec une solution EBSS (solutions salines équilibrées) 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 des cellules est indispensable pour les cellules à durée de vie limitée et pour les cellules difficiles à entretenir. Elle se fait par cryoconservation. La conservation de longue durée se réalise dans de l'azote liquide à  $-180^{\circ}\text{C}$ . 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 conservation de court durée se réalise à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La décongélation des cellules se fait de manière rapide, en plaçant celles-ci sous une ampoule dégageant une température de  $37^{\circ}\text{C}$ .

### ● L'évolution des cellules en culture

Les cellules in-vitro présentent 2 propriétés fondamentales qui sont: la capacité proliférative et leur fonction différenciée. Ces propriétés ont tendance à évoluer de manière très différente quelle que soit la méthode de culture employée. 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 différenciation peut être visible morphologiquement.

Notons que certains types cellulaires révèlent leur fonction spécifique que lorsqu'ils sont cultivés en vie ralentie. Pour cela, on procède à un appauvrissement progressif du milieu ou on utilise une substance inhibitrice de la division cellulaire.

### ● Le comptage cellulaire

C'est une étape obligatoire, parfois fastidieuse mais incontournable en culture cellulaire. Elle permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur sa culture cellulaire à un temps T.

#### ● Principe du comptage cellulaire

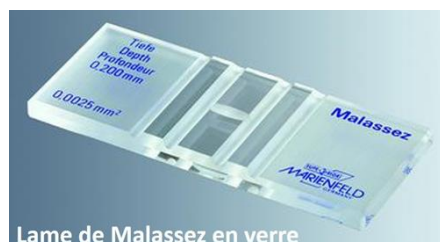
Le comptage ou numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide.

On exprime le résultat d'un comptage en concentration cellulaire, c'est à dire en unité d'événements par unité de volume (par ex. nombre de cellules / ml). Le comptage cellulaire s'effectue toujours sur une partie de l'échantillon et jamais sur sa totalité.

Pour cela un échantillon défini de la solution totale est prélevé puis le nombre d'événements

présents est compté. Le nombre obtenu est extrapolé au volume total pour estimer la concentration.

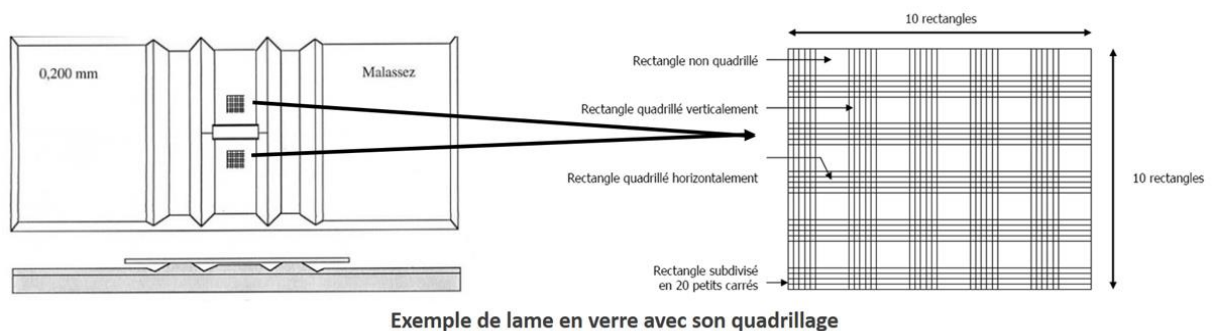
- ⊙ La numération cellulaire peut se faire soit par un **comptage manuel au microscope**, soit par un **comptage automatisé** avec des équipements dédiés.
- ⊙ Selon la nature de l'échantillon (lysate de broyage d'organes, suspension d'une culture cellulaire, extrait de sang de patients, etc ...), le principe du comptage est identique mais avec les compteurs automatisés des optimisations sont nécessaires pour éviter de sur ou sous-exprimer la concentration cellulaire.
- ⊙ En complément, nous verrons qu'il est possible de combiner le comptage avec la viabilité des cellules.
- ⊙ **Le comptage manuel**
- ⊙ Le comptage manuel est le comptage le plus répandu dans les laboratoires, car il est rapide et très facile à mettre en œuvre (nécessite peu de matériel). C'est l'utilisateur lui-même qui choisit de compter ou non certaines cellules. Pour ce comptage manuel, l'expérimentateur a besoin :
  - ⊙ D'une lame porte objet, généralement en verre épais, dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu et comportant un quadrillage
  - ⊙ D'une pipette
  - ⊙ D'un microscope
  - ⊙ De tampon PBS pour les dilutions
  - ⊙ D'une solution à compter
- ⊙ Les lames utilisées pour le comptage manuel sont des lames spécifiques, en verre ou en plastique. Généralement, les lames en verre sont les plus utilisées. Ces lames sont en forme de porte-objet de 30 x 70 mm et de 4 mm d'épaisseur comme montré ci-dessous:



Lame de Malassez en verre

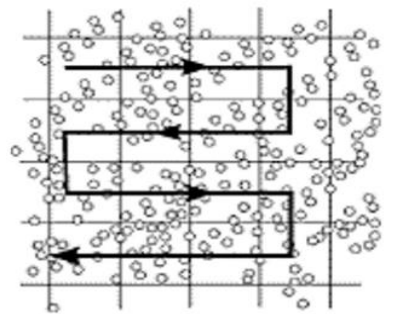
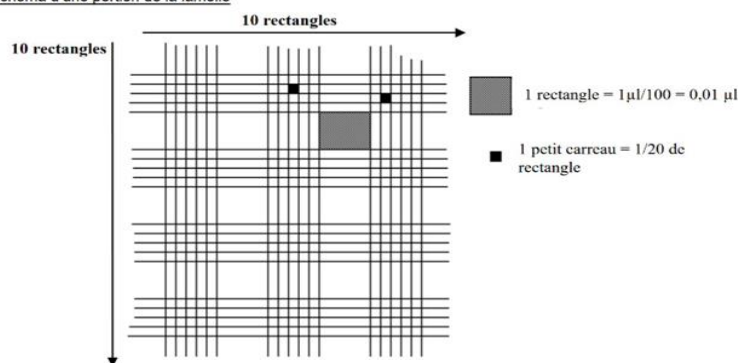
La partie centrale possède un quadrillage différent selon le type de lame (Par ex : Malassez, Neubauer, Bürker, Fuchs Rosenthal, Thoma, ou Bürker Türk) :

- ⊙ **Les lames Malassez** : généralement utilisées pour le comptage d'échantillons à forte densité cellulaire, tel que le sang. Ces lames permettent le comptage d'une majorité d'échantillons et sont donc les plus répandues en laboratoire.
- ⊙ **Les lames Neubauer** : dédiées au comptage d'érythrocytes et de thrombocytes
- ⊙ **Les lames Bürker** : utilisées pour le comptage de leucocytes
- ⊙ **Les lames Fuchs Rosenthal** : ont une surface bien plus grande que les autres lames, et sont adaptées pour le comptage d'échantillons tel que le liquide céphalorachidien.
- ⊙ **Les lames Thoma** : plutôt réservées pour le comptage d'hématies et de leucocytes
- ⊙ **Les lames Bürker Türk** : sont une combinaison des lames Bürker et Thoma



La lame la plus répandue en laboratoire est la lame de Malassez. Elle est gravée de 100 rectangles, eux-mêmes recoupés en 25 rectangles qui sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1  $\mu$ l.

Schéma d'une portion de la lamelle



- ⊙ Pour réaliser le comptage, un volume d'échantillon de la solution à compter (en général entre 10 et 20  $\mu$ l) est déposé entre la lame et la lamelle au niveau du quadrillage (étalement de l'échantillon par capillarité entre la lame et la lamelle).
- ⊙ Cas d'une culture de cellules adhérentes : pour obtenir la concentration il est nécessaire de décoller au préalable les cellules en ajoutant de la trypsine pour obtenir une suspension cellulaire à partir de laquelle le comptage sera fait.



- La gamme de concentration pour ce type de comptage se situe entre 250 000 et 2 500 000 cellules/ml :
  - Au-dessus de cette concentration, le risque d'erreur augmente de façon significative
  - En-dessous de cette gamme, l'extrapolation est faite sur une quantité de cellules trop faible pour être fiable
 La concentration optimale lue avec cette méthode est de 1 million de cellules/ml.
- En fonction de la confluence des cellules dans la suspension cellulaire, il est recommandé de faire une dilution avant le comptage. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution dans le calcul de la concentration totale de la suspension cellulaire.
- Une fois la lame chargée, elle est observée sous le microscope. Après la mise au point, on compte le nombre d'événements sur au moins 4 ou 5 carrés du quadrillage. Le but est de compter environ 100 cellules.
- Après le comptage, il suffit alors d'extrapoler pour déduire la concentration totale de l'échantillon/suspension cellulaire :  
Formule de calcul pour obtenir la concentration cellulaire :

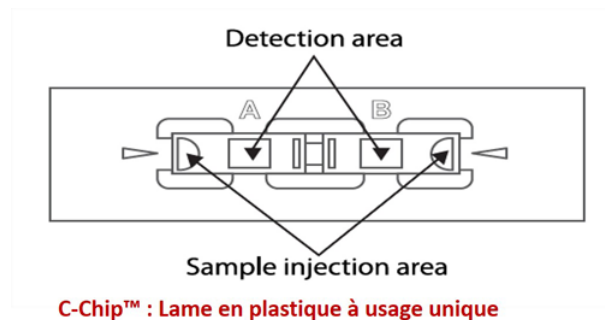
$$\text{Concentration (cel/ml)} = \text{Quantité de cellules} / \text{Volume (en ml)}$$

- Formule de calcul modifiée appliquée aux lames de comptage :

$$\text{Concentration} = (\text{Quantité de cellules} \times 10\,000) / (\text{Quantité de cadres} \times \text{dilution})$$

Comme dans toute expérience, il est important de faire des réplicas.

- Ce type de comptage manuel, bien que fastidieux, est économique et facile à mettre en place dans un laboratoire. Cependant, après le comptage il est essentiel de nettoyer les lames en verre pour éviter toutes contaminations croisées.
- Pour pallier ce risque de contamination, des **lames en plastique à usage unique** ont été développées : [les hémocytomètres C-Chip™](#)  
Ces lames en plastique comportent 2 chambres de dépôt avec chacune 2 quadrillages permettant d'effectuer 2 comptages à partir d'une seule lame.



### ☉ Combiner une étude de viabilité cellulaire à son comptage

Il est possible de vérifier **la viabilité de sa suspension cellulaire**, aussi bien avec une lame en verre réutilisable ou en plastique à usage unique.

Pour cela, on utilise une solution commerciale de bleu de trypan de 0,4%. Le bleu de trypan, aussi appelé bleu diamine ou bleu de Niagara est un colorant vital dérivé de la ditoluidine (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>) qui a été synthétisé pour la première fois par le chimiste allemand Paul Ehrlich en 1904.

Ce produit est utilisé en laboratoire pour colorer les cellules mortes en bleu foncé, car il pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes dont la membrane plasmique est devenue perméable. L'ajout du bleu de trypan dans une solution marque uniquement les cellules mortes, les cellules vivantes restent intactes. Ainsi, il est possible de déterminer dans une suspension cellulaire la proportion de cellules vivantes et mortes et donc d'en déduire la viabilité cellulaire.

- ☉ Il est recommandé et important d'utiliser une solution de **bleu de trypan** préparée extemporanément avant une série de comptage. Pour cela, une solution commerciale de bleu de trypan 0,4% est diluée pour obtenir une solution à 0,2%, puis filtrée sur un filtre 0,2 µm pour éliminer les précipités. Enfin, l'échantillon cellulaire est mélangé avec la solution de bleu de trypan 0,2% selon un ratio de 1:1
- ☉ Pour déterminer la viabilité cellulaire d'une solution, ce mélange est donc déposé sur la lame de comptage et observé au microscope. Les cellules marquées au bleu de trypan ainsi que les cellules non marquées sont comptées. A partir d'un même échantillon, on obtient donc la viabilité (c'est-à-dire le nombre de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules mortes) et la concentration cellulaire.
- ☉ Bien que la méthode de comptage manuelle soit facile et économique, elle a ses limites. En effet, les résultats peuvent varier d'un utilisateur à l'autre. Cette méthode de comptage peut donc être controversée car le comptage est peu reproductible d'une lame à une autre et/ou d'un utilisateur à un autre. Cela nécessite aussi la présence d'un microscope partagé dans la salle de culture, ce qui n'est pas toujours le cas dans tous les laboratoires.

### ☉ Le comptage automatisé

Pour garantir une reproductibilité de comptage, réduire la variabilité des résultats liés à l'utilisateur et gagner du temps, des systèmes de comptage automatisés ont été développés depuis quelques années.

Ces systèmes sont plus ou moins complexes et plus ou moins précis selon les modèles, mais ils fonctionnent tous sur un même principe : un échantillon de volume connu, une détection des cellules et un calcul de la concentration finale.

**Compteur de cellules portatif**

Ce type de compteur ressemble à une pipette et est basé sur le principe Coulter.

**☉ Compteurs automatisés**

- ☉ Des compteurs automatisés disponibles sur le marché utilisent une lecture de cellules en bleu de trypan, ils possèdent une caméra CCD, un logiciel de traitement des résultats et certains sont équipés d'un portoir de tubes (comptage haut-débit). L'échantillon est aspiré ainsi que le bleu de trypan, puis le mélange est injecté dans le système fluide et passe à travers une cellule qui permet de capter une image de la suspension cellulaire. L'acquisition porte sur une centaine d'images qui déterminent le nombre de cellules, la concentration et la viabilité de l'échantillon. Les données obtenues sont des résultats numériques, des histogrammes de distribution des tailles de cellules et des images des cellules. Le fait de visualiser les cellules post-comptage permet de s'assurer que le dispositif n'a pas compté de faux positifs ou des débris cellulaires. En plus des données quantitatives, l'utilisateur a accès à des données qualitatives, essentielles et complémentaires pour la suite de ses expériences.
- ☉ Pour ces compteurs, le volume d'échantillon utilisé peut être important (environ 500  $\mu$ l) auquel il faut ajouter le volume mort et le volume de nettoyage du système fluide.  
Ce dispositif est donc gourmand en tampon et en échantillon, d'autant plus que le volume utilisée d'une suspension cellulaire n'est pas ré-utilisable après le comptage.
- ☉ De plus, le volume de comptage utilisé et la fluide exigent des étapes contraignantes de nettoyage pour écarter tout risque de contamination croisée.

## Test de cytotoxicité

### Les cellules cibles

Deux grandes possibilités existent :

- **les lignées cellulaires établies** qui n'ont rien à voir avec les cellules cibles rencontrées en clinique. Par contre elles sont faciles à cultiver et sont disponibles partout dans le monde.
- **les cellules de culture primaire** qui ont l'avantage d'être plus proches de la cellule cible. Ces cellules présentent comme inconvénient d'avoir une durée de vie limitée car elles se différencient après quelques multiplications.

### Les critères d'évaluation de la cytotoxicité

Deux possibilités existent :

- **Test de toxicité basale**, valable sur toutes les cellules. Il répond à la question : la cellule est-elle vivante ou non (Exemple : bleu trypan), ou mieux : la cellule est vivante mais ses fonctions cellulaires sont-elles intactes ? (Exemple : étude de la fonction mitochondriale par le test du MTT).
- **Test de toxicité spécifique** valable sur les cultures primaires. Il répond à la question : la cellule remplit-elle la fonction pour laquelle elle existe.

### Déroulement d'un test de cytotoxicité

Un test se déroule classiquement en **3 phases** :

1) Après inoculation des cellules, on laisse une phase d'équilibre de manière à stabiliser la population avant l'introduction de la drogue.

2) On ajoute la drogue à tester. Souvent les premières expérimentations sont réalisées avec une gamme de cette substance de manière à établir une courbe - dose réponse - afin de vérifier le comportement des cellules.

La durée de l'exposition est variable en fonction de la drogue et/ou de ce que l'on souhaite mesurer :

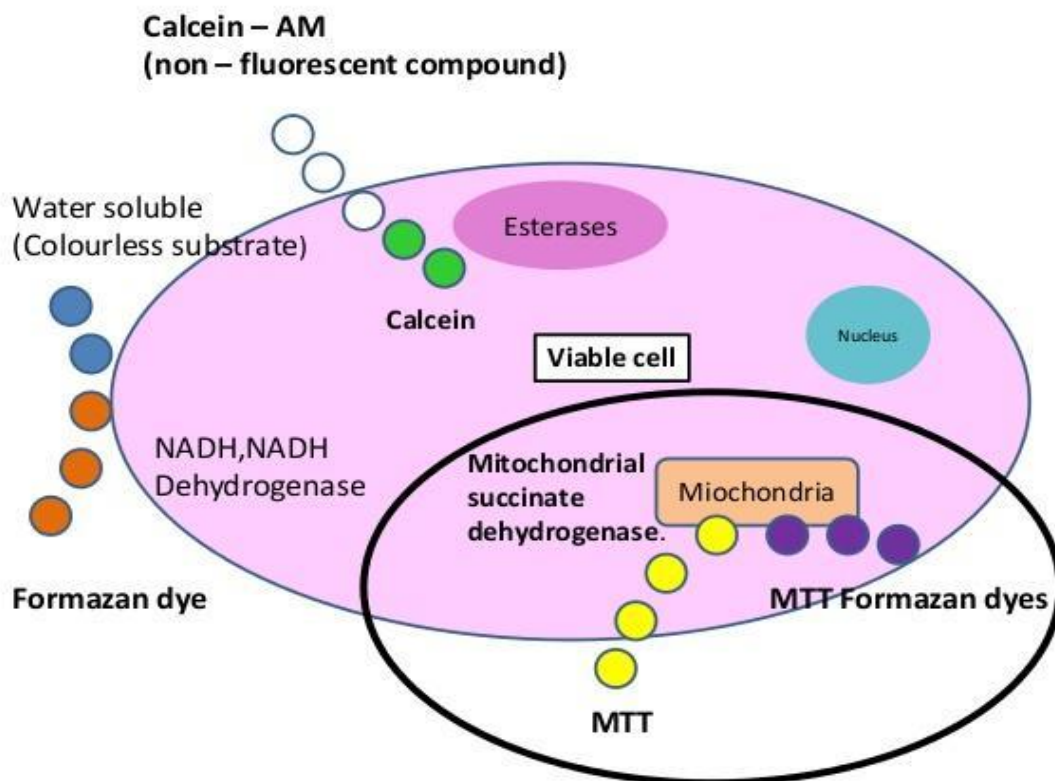
→ **Contact bref** pour mettre en évidence un effet nécrotique immédiat.

→ **Contact long** (jusqu'à plusieurs jours) pour mettre en évidence une inhibition de la prolifération.

3) Des mesures de viabilité ou de cytotoxicité de cellules habituellement sont déterminées à la fin de la période d'exposition.

### 1-Test de MTT

- Test basé sur la mesure d'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Dans les cellules vivantes, la succinate déshydrogénase transforme le succinate en fumarate.
- Cette réaction d'oxydation peut être couplée à une réduction du MTT (jaune) en formazan (bleu-violet) dont la couleur est appréciée par spectrophotométrie à 560 nm
- L'intensité de la couleur est proportionnelle à l'activité de la succinate déshydrogénase, elle-même proportionnelle à la viabilité cellulaire.



19

### 2-Test de Bleu de Trypan

Ce colorant d'exclusion pénètre dans toutes les cellules mais seules les cellules mortes le retiennent et se colorent en bleu, les cellules vivantes apparaissent brillantes.

### 3-Test de Rouge Neutre

Colorant vital rouge neutre s'accumule au niveau des lysosomes. Les cellules mortes ne retiennent pas le colorant et ne seront pas colorées.

### 4-Test ATP

La méthode utilise la luciférase, enzyme purifiée de la luciole qui catalyse la réaction suivante:



- On évalue la viabilité cellulaire par la mesure de l'ATP présent à un instant donnée dans la culture cellulaire.
- Quelques minutes après avoir perdu l'intégrité de leurs membranes, les cellules perdent leur faculté de synthétiser de l'ATP, les ATPases endogènes hydrolysant alors les restes d'ATP encore présents : la concentration en ATP s'effondre précipitamment.

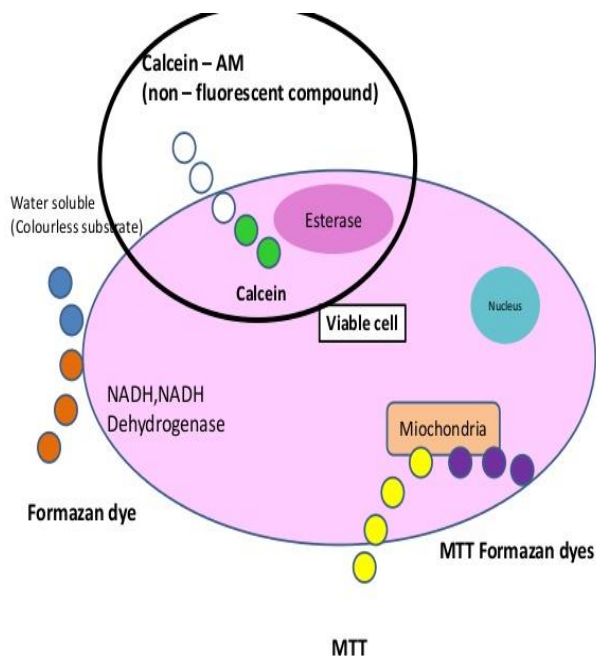
### 5-Test Lactate Déshydrogénase

La **LDH** est une enzyme cytosolique catalysant en présence de NADH ; la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique. Lors d'une atteinte membranaire, l'enzyme est relarguée dans le milieu extracellulaire.

La comparaison de l'activité de cette enzyme dans le milieu extracellulaire par rapport à celle mesurée dans le compartiment intracellulaire, reflète le degré de cytolyse d'une culture cellulaire.

### 6-Test de calcein-AM

Les calcéines sont des sondes fluorescentes pour le marquage du cytoplasme de cellules vivantes. Les formes AM sont perméables à la cellule.



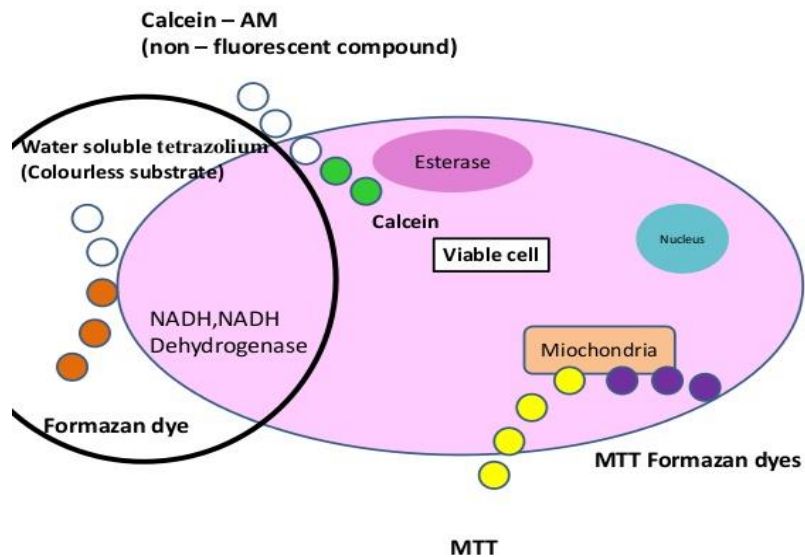
### 7-Test de WST-1

Le **WST-1** en sel de tétrazolium est clivé en formazan par un mécanisme cellulaire complexe qui se produit principalement à la surface.



- Cette bioréduction est surtout dépendante de la production par glycolyse du NAD(P)H dans les cellules viables.

- Par conséquent, la quantité de colorant formazan formé est directement corrélée au nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture.



27

### ☉ **Les techniques d'obtention des cellules:**

On distingue 2 types de cellules:

Les cellules libres et circulantes comme les cellules du sang

- ☉ Les cellules en cohésion les unes avec les autres, constituant un tissu.
- ☉ Les techniques d'obtention de ces 2 classes de cellules sont différentes. Les cellules circulantes sont obtenues par prélèvement et centrifugation.
- ☉ Les cellules organisées en tissus nécessitent la mise en œuvre de techniques plus originales qui peuvent être divisées en 2 groupes: la méthode par dissection et la méthode par digestion enzymatique.
- ☉ **La méthode par dissection:**  
Cette méthode est la plus ancienne. Elle a permis aux précurseurs de la culture de tissu d'obtenir les premières cellules in-vitro.
- ☉ **La méthode de Carrel** consiste à prélever un morceau de tissu qui est réduit en un très petit rectangle et déposé à la surface d'un mélange de 2 gouttes de plasma de coq et de 2 gouttes d'extrait embryonnaire à 50%. Après un séjour de 24H à l'étuve, on voit migrer les premières cellules à partir de l'explant.
- ☉ **La méthode de dissection** consiste à couper en fragment d'environ 1 à 4 mm<sup>3</sup> le tissu que l'on réduit encore à l'aide de pince. Ces fragments sont ensuite placés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier. Cette méthode s'appelle également **la méthode des explants**.
- ☉ **La méthode Jensen:** Cette technique est plus rarement utilisée. Les fragments de tissus de 1 mm<sup>3</sup> sont placés sur un disque de papier filtre qui repose sur un support métallique dans une boîte de pétri. Les cellules qui prolifèrent à partir du fragment du tissu traversent les pores du papier et se fixent au fond de la boîte. Cette technique donne l'avantage d'une séparation constante entre l'explant et les cellules migrantes évitant l'étape délicate de l'élimination de l'explant lorsqu'une couche subconfluente est obtenue.
- ☉ **La méthode mécanique:** Cette technique s'applique pour des tissus mous comme le thymus, la rate. Elle consiste à frotter le tissu sur une grille puis de filtrer et centrifuger. On peut également dilacérer les tissus à l'aide d'une pipette en verre en pipetant et refoulant les tissus.
- ☉ **La méthode par digestion enzymatique**  
Les enzymes utilisées sont des enzymes protéolytiques qui digèrent la trame protéique qui entoure les cellules. on utilise souvent **la trypsine** à une concentration de 0,5 à 2,5 g/l dans une solution saline.

### ☉ Les avantages et les inconvénients de ces méthodes

La méthode par dissection est souvent utilisée quand le tissu à mettre en culture est très petit. Le temps nécessaire pour avoir des couches cellulaires confluentes est relativement long (environ 30 jours).

La méthode enzymatique est beaucoup plus rapide avec un bon rendement mais certaines cellules à membrane fragile peuvent être lésées par cette méthode.

### ☉ Analyse structurale et ultra-structurale

#### ☉ Méthodes et techniques d'observations des cellules

L'observation des cellules est délicate du fait de leurs très petites tailles, et nécessite un certain nombre d'appareillages dont les microscopes. On distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes optiques et les microscopes électroniques.

##### a) Microscopes optiques

Les **microscopes optiques** (à lumière ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées. Les microscopes optiques utilisent de la lumière visible et la qualité de l'image dépend du pouvoir séparateur qui donne la résolution du microscope limitée par la longueur d'onde de la radiation lumineuse. On obtient donc un grossissement x1000.

### ☉ les microscopes optiques à fluorescence

La lumière reçue par l'œil ne traverse pas l'objet ; ici on utilise des molécules fluorescentes appelées des fluorochromes, qui sont utilisés comme colorant. La lumière excite les fluorochromes qui réémettent dans des plus grandes longueurs d'ondes c'est-à-dire dans des énergies plus basses.

Dans ce type de microscope on utilise des filtres qui permettent la formation d'une lumière monochromatique qui éclairera l'échantillon. Les microscopes optiques à fluorescence nécessitent des cellules fixées, des coupes minces et entraînent malheureusement des superpositions d'images.

Les microscopes optiques à fluorescence sont souvent équipés de **microscopie confocale** qui remédie à la superposition d'images, en étudiant la cellule plan par plan.

##### b) Microscopes électroniques

Les **microscopes électroniques** utilisent des faisceaux d'électrons qui sont chargés, possèdent une masse et se comportent comme une onde. Plus les électrons sont accélérés plus les longueurs d'onde diminuent et plus la résolution augmente. Ces électrons possèdent des compartiments possédant un vide parfait afin de maintenir rectiligne les faisceaux d'électrons, et des lentilles électromagnétiques qui forment un

condensateur. On obtient ici un grossissement  $\times 100\ 000$ . Les microscopes électroniques nécessitent la déshydratation de l'échantillon et donc la mort des cellules et du fait du faible pouvoir pénétrant des électrons les échantillons doivent être sous forme de coupes ultra fines et donc soumis à des inclusions.

**Le microscope électronique** confirme les structures observées par le microscope optique mais son intérêt est de pouvoir déterminer les inclusions cytoplasmiques. Au microscope électronique on ne parle plus de structure cellulaire mais d'**ultrastructure** cellulaire. Les inclusions sont alors appelées **organites cytoplasmiques**.

Deux types de ME:

**ME à Transmission (MET):** observation de coupes. PR = 0,2nm et Grossissement = 500 000

**ME à Balayage (MEB):** observation de la surface de la préparation. Grossissement = 100 000

- ⊙ la microscopie en transmission : MET l'observation de l'échantillon en transparence, c'est une technique basée sur le principe de diffraction des électrons et pouvant atteindre un grandissement de 1000000 la limite de résolution dépend de la longueur d'onde des électrons, (tensions d'accélération) qui est de l'ordre de quelques en angström : structure fine de la cellule.
- ⊙ La microscopie électronique à balayage : MEB le faisceau électronique est réfléchi par la surface de l'échantillon au lieu de la traversée comme dans la MET l'échantillon est balayé par un faisceau convergent électrons qui est émis ensuite, détecté et converti en images sur un écran. Son application principale et dans l'observation des structures dont les tailles varient entre celles des cellules isolées essaient de petits organismes.
- ⊙ **Préparation**
- ⊙ L'objet à observer doit laisser passer les photons.
- ⊙ L'objet doit donc être coupé très fin (5 à 10  $\mu\text{m}$ ) pour être translucide
- ⊙ L'objet doit donc être durci pour être découpé proprement et fixé dans les conditions les plus proches du vivant pour ne pas s'autodétruire.

**a. La fixation:** l'objet est plongé dans une solution d'**aldéhydes** ou de **sels oxygénés de métaux lourds**.

**b. Le durcissement:** par congélation, polymérisation (irréversible) ou inclusion en **paraffine** (réversible, nécessite une **déshydratation** préalable: l'objet est plongé dans des bains d'alcool de degrés croissants, qui prend la place de l'eau).

**c. La coupe:** au **microtome**, recueillie sur une lame porte objet.

**d. La coloration:** dépend des besoins de contraste de l'observateur, nécessite une **réhydratation** (bains d'alcool de degrés décroissants).

☉ Deux types de colorants:

- Les **colorants signalétiques** ou topographiques: ils agissent par affinité physico-chimique (colorants basiques pour la mise en évidence des zones acides (*basophiles*) et colorants acides pour la mise en évidence des zones basiques (*acidophiles*)) et permettent l'observation de la forme de la cellule et des organites volumineux. Ex: *Hématoxyline (basique), éosine (acide)*. Ils sont souvent associés!

- Les **colorants cyto/histochimiques** ils colorent une substance de manière spécifique. Ex: *Réaction P.A.S., Feulgen, anticorps marqués, phalloïdine...*

**e. L'observation:** à sec ou en immersion.

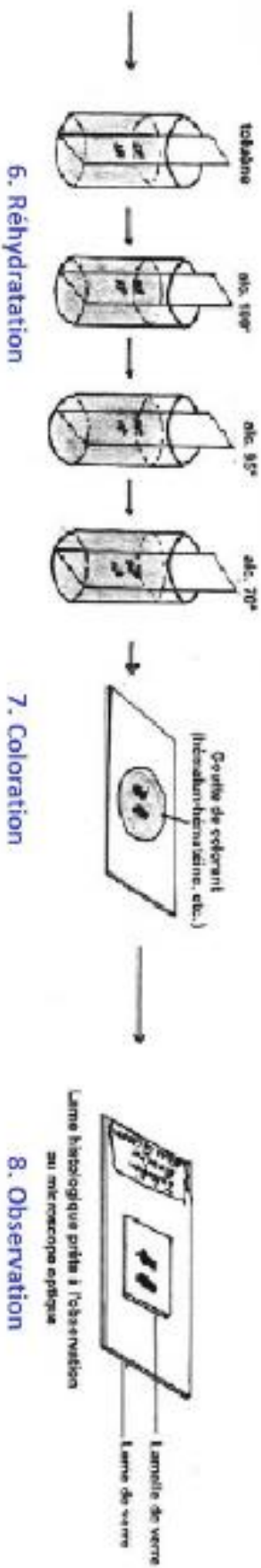
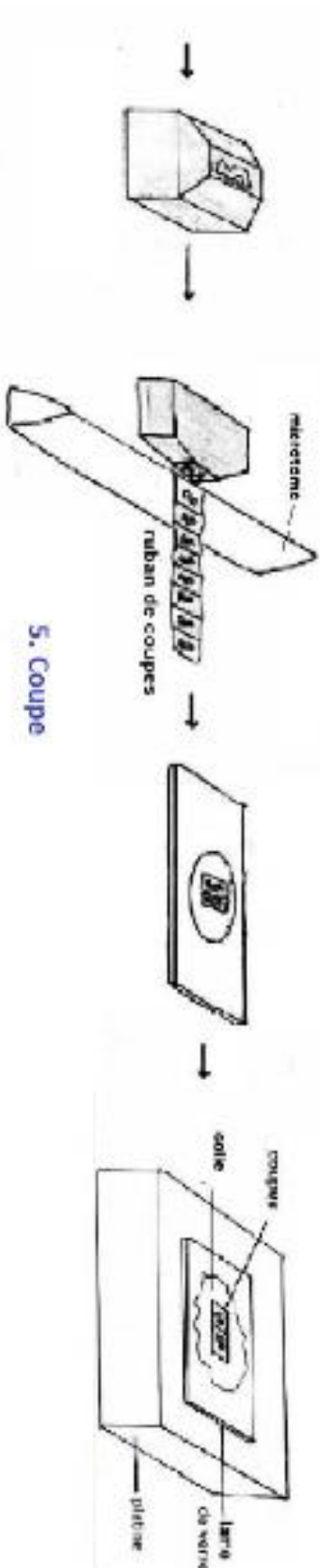
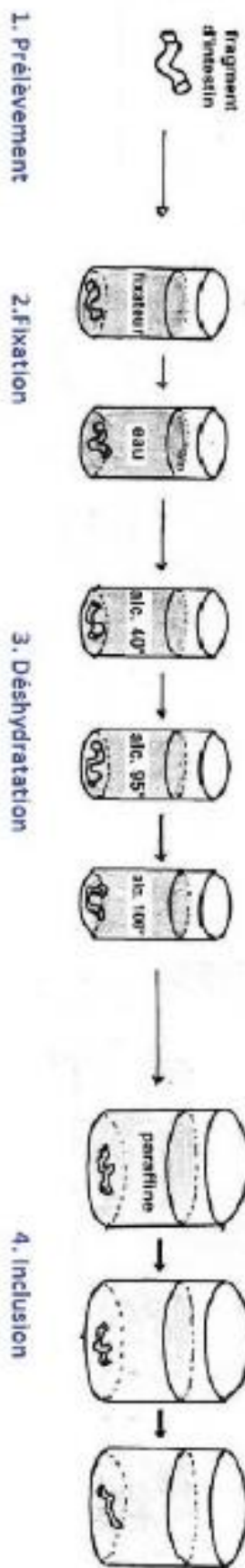
☉ Cas particuliers:

- **Extemporanees et coupes à congélation: pas de fixation!** Les échantillons sont congelés directement au CO<sub>2</sub> dans un cryostat et découpés en tranches épaisses ( $\geq 15 \mu\text{m}$ ), puis colorés et observés rapidement lors d'une opération chirurgicale (examen anatomopathologique per opératoire), ou pour étudier l'activité enzymatique (examen cyto histo enzymologique).

- **Frottis de cellules:** les cellules sont étalées directement sur la lame après dessiccation et coloration (**fixation non systématique**)

- **Observation de cellules vivantes:** nécessite un *microscope inversé* (plus près de l'échantillon qu'un microscope standard) ou *à contraste de phase*, et l'utilisation de colorants non toxiques ou vitaux (ex: *vert Janus B qui colore les mitochondries*).

# Récapitulons:





## ☉ Les méthodes de fractionnement subcellulaire

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

### 1) Homogénéisation

Le but de l'homogénéisation est de rompre la membrane plasmique (ou la paroi pour les cellules végétales et fongiques). Pour se faire on met les cellules en suspension dans un tampon de pH et de force ionique connus.

L'**homogénéiseur** est un tube de verre dans lequel on place la préparation puis un piston en verre. La cellule passera entre le tube de verre et le piston, sera ainsi comprimée et éclatera, libérant son contenu dans le tampon.

On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées **microsomes**.

### 2) Purification

#### a) Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. Pour se faire on centrifuge l'homogénat à différentes vitesses ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé :

- ☉ A 600g, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- ☉ A 15 000g, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.
- ☉ A 100 000g (ultracentrifugation), on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.
- ☉ A 200 000g, on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

#### b) Centrifugation par gradient préformé

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au-dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera.

La **vitesse de sédimentation** dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** en unité **Svedberg (S)**.

## Bibliographie

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.

Laustriat D, Gide J, Hechard C, Peschanski M. 2009. [Embryonic stem cells in pharmacology]. *Med Sci (Paris)* 25 Spec No 2:32-38.

Coulombel L. 2010. Cellules souches: un seul nom pour de multiples entités. *Revue Francophone des Laboratoires* 427:29-39.

Cézard F. 2013. *Biotechnologies en 27 fiches - 2e édition: Rappels de cours et exercices corrigés*. Dunod.