



Technique de culture cellulaire

Réalisé par Dr. Brihoum Hadjer

2020/2021

Objectifs de l'enseignement:

Cette matière vise à initier l'étudiant aux techniques de cultures cellulaires et aux modèles animaux élaborés pour pouvoir analyser *in vitro* et *in vivo* les effets de nouvelles molécules pharmacologiques ou toxiques et d'en évaluer les modulations

Pré-requis

Des connaissances en:

- 1. microscopie
- 2. Morphologie cellulaire
- 3. Physiologie des grandes fonctions



Acquises en licence pharmacologie sont recommandées pour aborder cette matière.

Contenu de la matière:

- Chapitre I: culture cellulaire
- Chapitre II: analyse structurales et ultra-structurales

Travail Personnel:

- Exposés

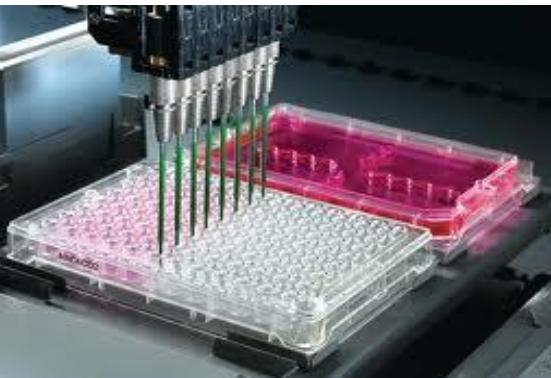
Chapitre I: Partie 1

Introduction:

- **La culture cellulaire** est devenue un des outils majeurs utilisés aujourd'hui dans les sciences de la vie. La culture des cellules animale en dehors de l'organisme permet l'observation des cellules vivantes dans des conditions favorables.
- De plus, une culture cellulaire représente un système expérimental beaucoup plus simple qu'un animal entier et elle fournit un système qui peut être étudié dans **des conditions soigneusement contrôlées**.

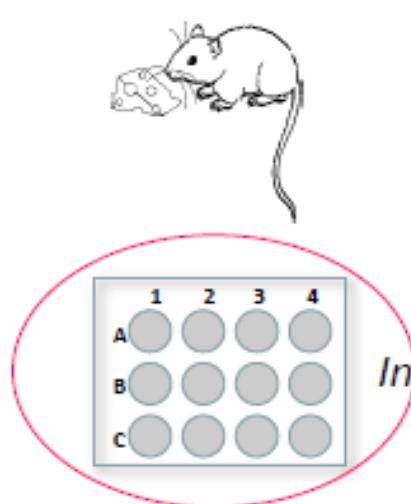


En biologie, **la culture cellulaire** désigne un ensemble de techniques utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme (ex-vivo) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique.



Evaluation de la toxicité

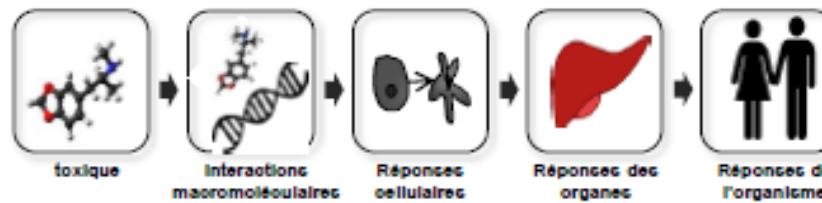
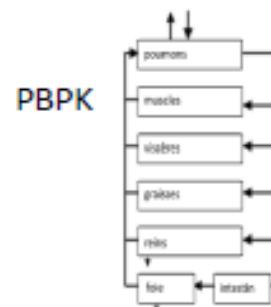
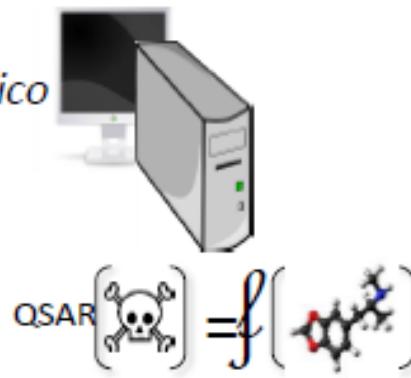
Approches expérimentales



In vivo

In vitro

Modélisation



Problèmes de l'expérimentation chez l'animal :

- Problèmes éthiques :

Réduction ou interdiction de l'expérimentation animale

- Cout, durée :

Pas suffisant de substances évaluées

- Extrapolation à l'homme:

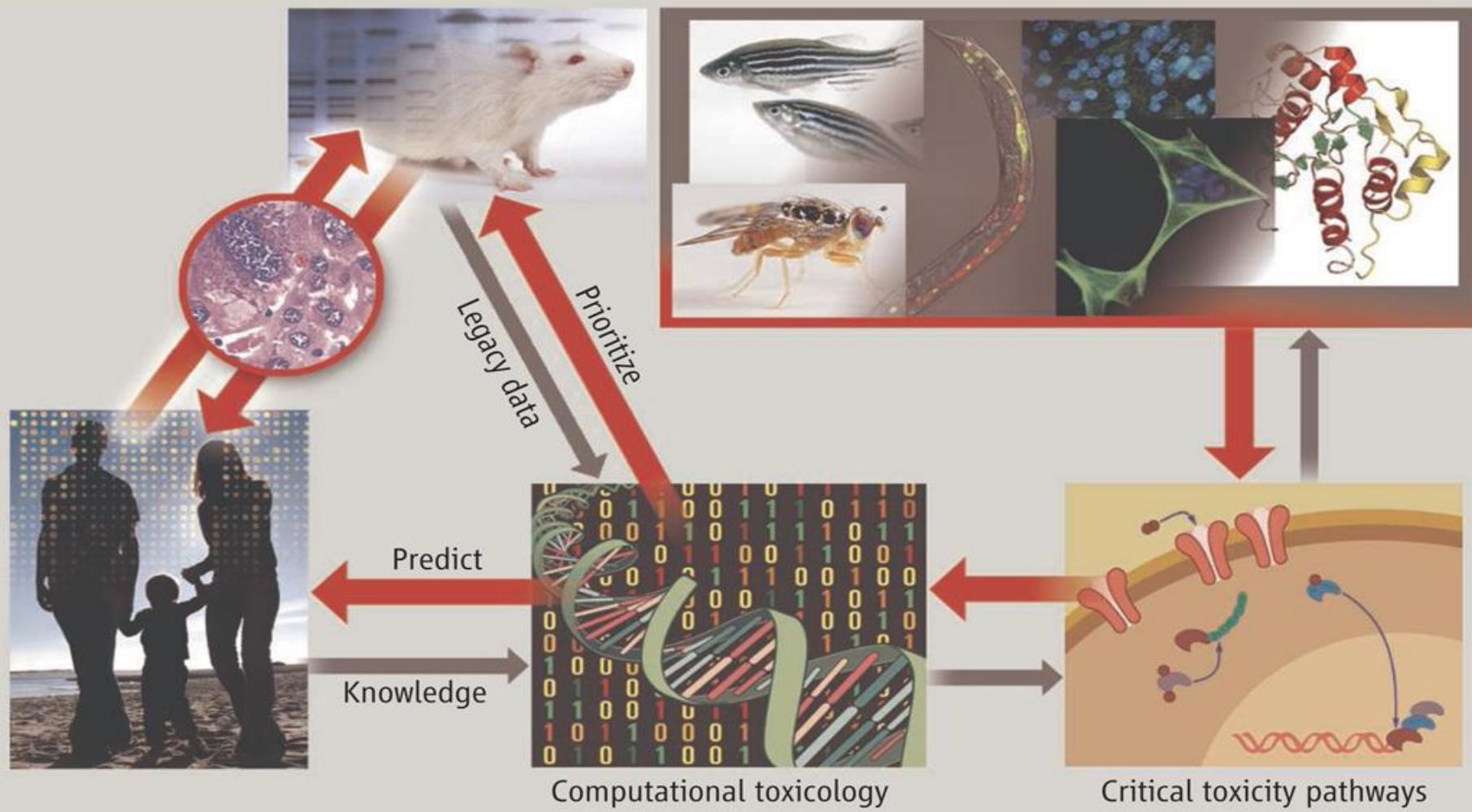
Prédictivité?

Human experience
1–3 studies/year

Standard rodent toxicological tests
10–100/year

Alternative animal models
100–10,000/year

Biochemical- and cell-based in vitro assays
>10,000/day



Les 3 R (Russel and Burch, 1959)

- La règle **des 3 R**, créé par W.M.S. Russell et R.L. Burch, est un principe de bioéthique élaboré en 1959 visant à la protection animale dans le cadre de la recherche scientifique. Ce concept a été progressivement adopté par diverses institutions pour fixer des lignes de conduite pour l'expérimentation animale et comprenant les points suivants :



Rafine : raffiner

Espèces moins sensible

Réduire douleur et détresse

Techniques exploratoires non invasives



Reduce : réduire

Réduire le nombre d'animaux

Partage banque de donnée



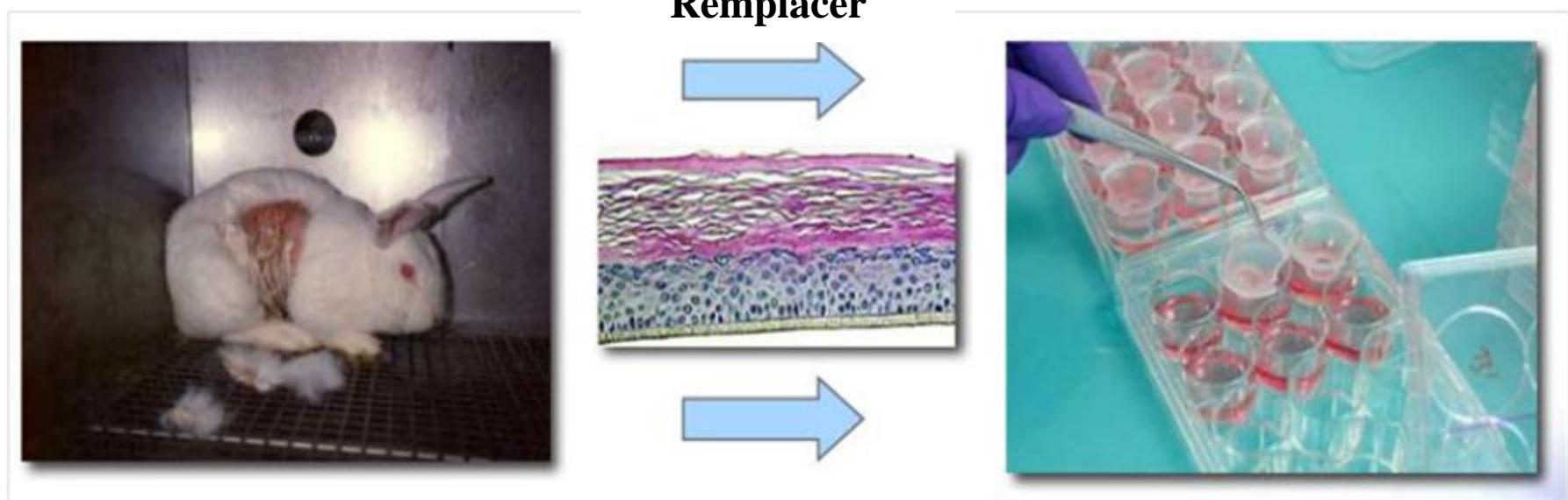
Replace : remplacement

Etude *in vitro* (tissus, cellules, molécules)

Etude *in silico* (modélisation)

Etude de chimie analytique

Les cultures cellulaires en alternative à l'expérimentation animale:



- Facilité de mise en œuvre (études à haut débit)
- Moindre coût (animaux)
- Etude des mécanismes d'action
- Utilisation de cellules humaines: plus de barrières inter-espèces

C'est quoi une culture cellulaire?

- C'est une technique de laboratoire pour faire vivre des cellules *in vitro*;
- C'est le prélèvement de cellules, d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance;
- Le but est de multiplier des cellules et de les maintenir vivantes pour les utiliser.



À quoi servent les cultures de cellules?

1) *Systèmes de modèles:*

Pour étudier :

- ✓ la biologie et la biochimie cellulaires de base,
- ✓ les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies,
- ✓ les effets des médicaments sur les cellules,
- ✓ le processus et le déclenchement du vieillissement
- ✓ les études nutritionnelles.

2. *Essais de toxicité:*

Seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux, les cellules en culture sont largement utilisées pour étudier les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules.

3. *Recherche sur le cancer:*

- ✓ Les cellules cancéreuses cultivées servent également de système de test pour déterminer les médicaments et méthodes adaptées pour détruire sélectivement certains types de cancers.

- ✓ Il est possible, en utilisant des produits chimiques, virus et rayonnements, de convertir les cellules cultivées normales en cellules cancéreuses et d'étudier les mécanismes conduisant à ce changement.

4. Virologie:

- ✓ La culture des virus pour la production de vaccins (contre la polio, la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole) via la production à grande échelle de virus (la réPLICATION) dans les cultures cellulaires (à la place des animaux)
- ✓ Aussi pour étudier comment se développent un virus et infecte les organismes.

5. La cellule comme usine de production:

- La production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des protéines présentant une valeur médicale ou commerciale (les anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc.)
- L'utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes. La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce.
- Des tests sont en cours sur des organes artificiels comme le pancréas, le foie et les reins. Une réserve potentielle de cellules et tissus de remplacement peut ressortir de travaux en cours réalisés avec des cellules souches adultes et embryonnaires (sont des cellules qui ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires différents).

6. *Génie génétique:*

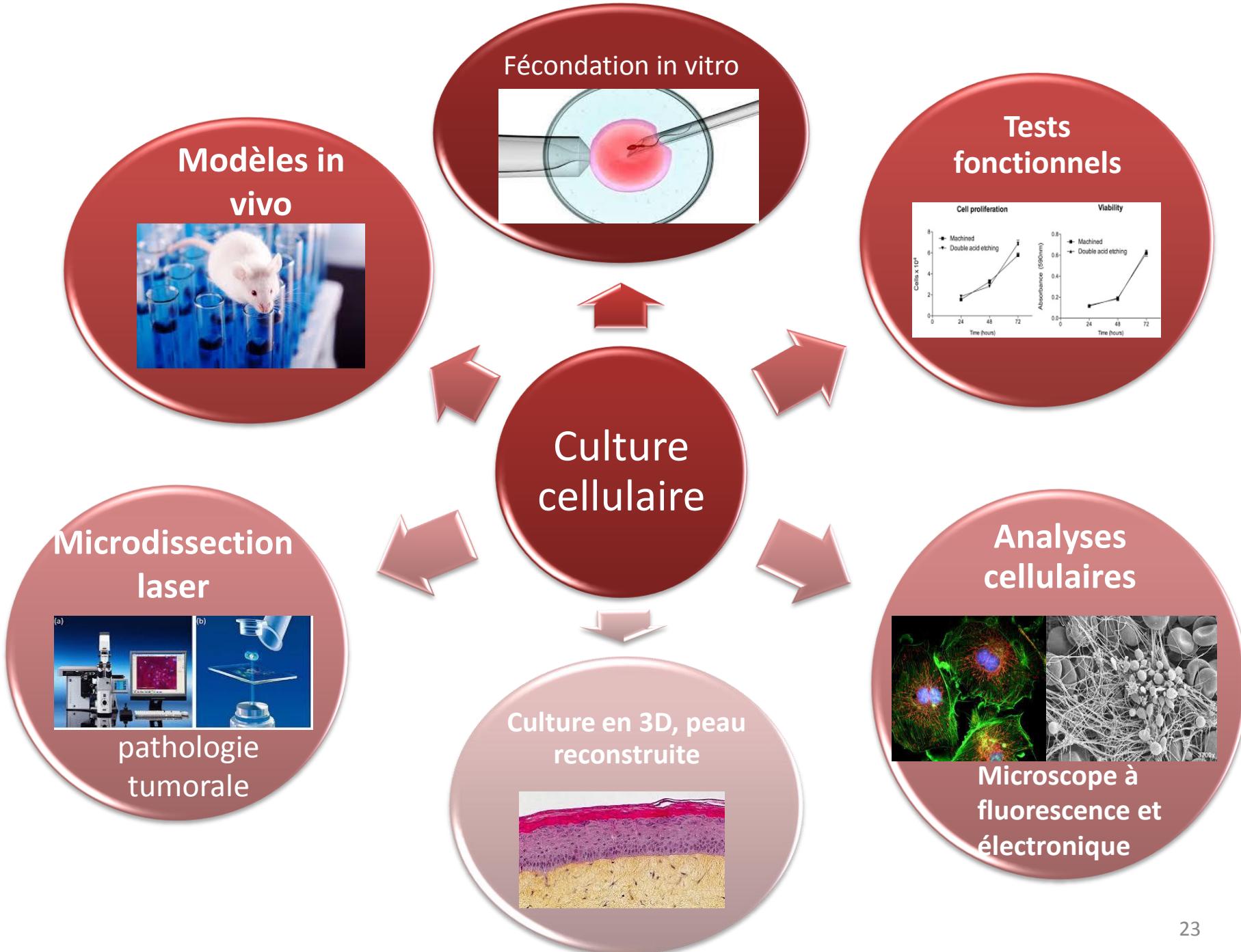
La capacité de transfacter ou de reprogrammer les cellules en culture par du nouveau matériel génétique (ADN et gènes) et donc la production des nouvelles protéines en grande quantité dans les cellules en culture pour les étudier.

7. *La thérapie génique:*

La capacité de modifier génétiquement des cellules a également conduit à leur utilisation en thérapie génique, exemple d'un gène manquant ou endommagé qui peut être remplacé par un gène fonctionnel.

8. Découverte de médicaments:

Les tests basés sur des cellules cultivés comme les tests de cytotoxicité, mais également pour le criblage à haut débit (HTS) de composés pouvant présenter une utilité potentielle comme médicament ont une grande importance dans l'industrie pharmaceutique.



Evénements historiques dans le développement de la culture cellulaire :

- Bien que la culture de cellules animales ait été réussie pour la première fois par Ross Harrison en 1907, il a fallu attendre la fin des années 1940 et le début des années 1950 pour voir apparaître plusieurs développements qui ont rendu la culture cellulaire largement disponible comme outil pour les scientifiques.

1878 : Claude Bernard proposa que les systèmes physiologiques d'un organisme puissent être maintenus dans un système vivant après la mort d'un organisme.

1885 : Roux montrait que les cellules embryonnaires de poulet pouvaient être maintenues en vie dans une solution saline hors du corps de l'animal.

1903 : Jolly observa la division cellulaire des leucocytes de salamandres *in vitro*.

1907 : Harrison cultiva des cellules nerveuses de grenouille dans un caillot lymphatique (caillot ou coagulum ou thrombus : Masse molle, semi-solide, formée par la coagulation d'un liquide, tel que le sang, la lymphe, le lait, etc. Ce terme s'applique plus particulièrement au sang, et observa la croissance des fibres nerveuses *in vitro* pendant plusieurs semaines. Il fut considéré par certains comme le père de la culture cellulaire.

Années 1940 : L'utilisation des antibiotiques pénicilline et streptomycine dans le milieu de culture diminue le problème de la contamination en culture cellulaire.

Tout d'abord, le développement des antibiotiques a permis d'éviter plus facilement de nombreux problèmes de contamination qui empoisonnaient jusqu'alors les essais de culture. Ensuite se sont développées des techniques, telles que l'utilisation de trypsine pour retirer les cellules des récipients de culture, nécessaires pour obtenir des lignées cellulaires cultivées en continu (comme les cellules HeLa).

1948 : Earle isola des *fibroblastes L* de souris qui formèrent des clones à partir de cellules individuelles. **Fischer** développa un milieu chimiquement défini, CMRL 1066.

1952 : Gey établit une lignée cellulaire continue à partir d'un carcinome cervical humain connu sous le nom de cellules *HeLa (Helen Lane)*. **Dulbecco** misa au point un essai sur plaque pour les virus animaux en utilisant des monocouches confluentes de cellules cultivées.

1955 : Eagle étudia les besoins nutritionnels de cellules sélectionnées en culture et a établi le premier milieu chimiquement défini largement utilisé.

Enfin, à l'aide de ces lignées cellulaires, les scientifiques ont pu développer des milieux de culture cellulaire standardisés chimiquement définis facilitant énormément la culture de cellules. Ces trois points combinés ont permis à de nombreux autres chercheurs d'utiliser la culture de cellules, tissus et organes dans leur recherche.

- Pendant les années 1960 et 1970, la commercialisation de cette technologie a eu un impact supplémentaire sur la culture cellulaire, impact qui continue de nos jours. Les entreprises, comme **Corning**, ont commencé à développer et vendre des produits pour la culture en verre et en plastique à usage unique, et ont amélioré les matériaux et produits de filtration, les milieux de culture tissulaire liquides et en poudre, et les hottes à flux laminaire. Le résultat de tout ceci et des autres développements technologiques continus a été une augmentation croissante du nombre de laboratoires et d'industries utilisant aujourd'hui les cultures de cellules.

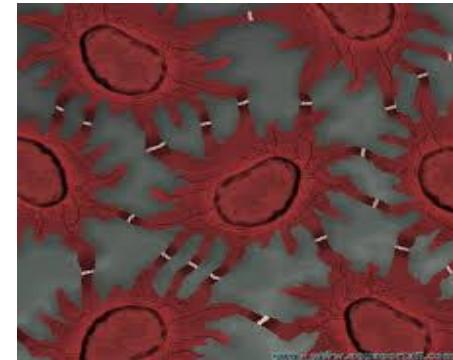
Différents types de cellules :

Les cellules cultivées sont généralement décrites d'après leurs **morphologies** (forme et apparence) ou leurs **caractéristiques** fonctionnelles.

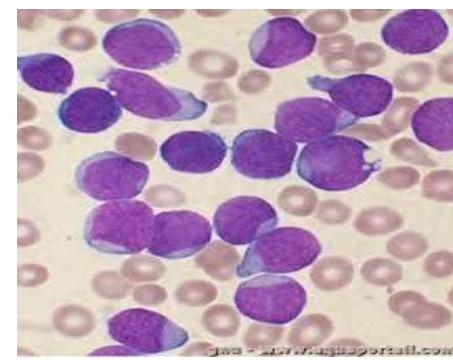
1. La morphologie des cellules :

Il existe trois morphologies de base:

1.1. Type épithelial: ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent plates et de forme polygonale.



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



1.3. Type fibroblaste: ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent allongées et bipolaires.



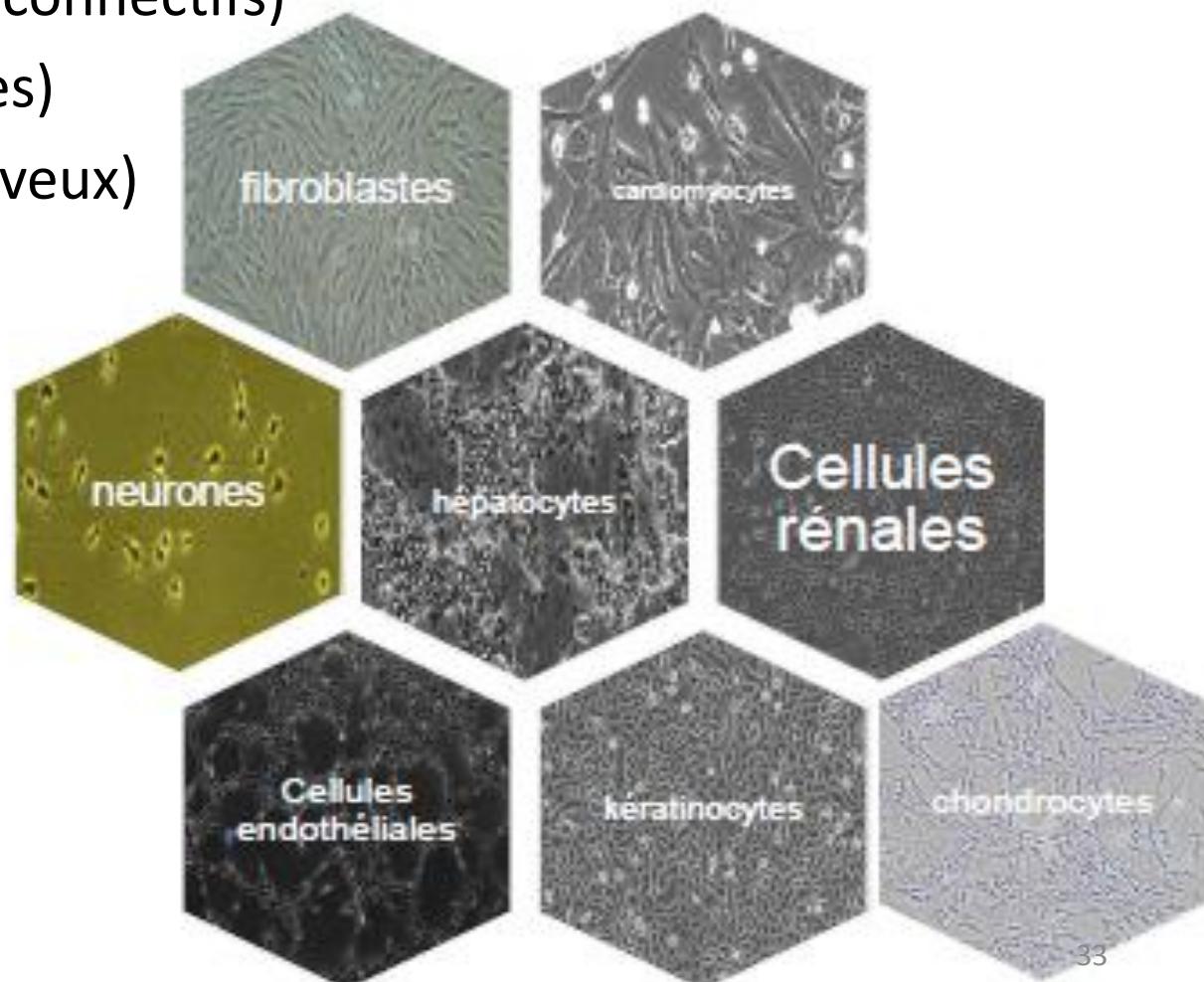
2. Caractéristiques fonctionnelles des cellules :

- Les caractéristiques des cellules cultivées sont le résultat de leur origine (foie, cœur, etc.) et de leur faculté d'adaptation aux conditions de culture.
- Des marqueurs biochimiques peuvent être utilisés pour déterminer si les cellules sont toujours porteuses des fonctions spécialisées qui sont les leurs *in vivo* (par exemple, des cellules hépatiques secrétant de l'albumine). Des marqueurs morphologiques ou ultra-structuraux peuvent également être examinés (par exemple les cellules du cœur battantes).

- **les lignées finies dite « normale »:** qui se prolifèrent pendant un certains nombres de passages puis cessent de se diviser. Ils sont sensibles au phénomène de sénescence cellulaire qui se manifeste par une apoptose des cellules.
- **les lignées continues :** Ces lignées prolifèrent sans arrêt, et sont donc immortelles; car elles ont perdu quelques maillons du contrôle du cycle cellulaire.
- **les lignées transformées :** Certaines lignées continues peuvent perdre leur propriété d'adhérence et sont capables de donner des tumeurs lorsqu'elles sont injectées chez un animal. Elles sont dites des lignées transformées ou des lignées de cellules cancéreuses

Formes des cellules selon le tissu les plus utilisés dans la culture cellulaire:

- Epithéliale /endothéliales (membranes)
- Fibroblastes (tissus connectifs)
- Myoblastes (muscles)
- Neurones (syst. nerveux)
- Hepatocytes (foie)
- Erythrocytes (sang)
- Lymphocytes (syst. immunitaire)



Avantage de la culture cellulaire :

- Matériel en grande quantité
- Conservation des caractéristiques du tissu initial
- Homogénéité des cellules
- Contrôle de l'environnement et de traitements appliqués
- Modèle pour l'étude de la physiologie cellulaire
- Pour la production de:
 - Vaccins
 - Protéines thérapeutiques (anticorps, agents immunologiques, Hormones)
 - Tissus
 - Vecteurs viraux
 - Cellules souches

- Étude du comportement cellulaire sans les variations qui surviennent chez l'animal.
- Le contrôle de l'environnement de croissance conduit à l'uniformité de l'échantillon.
- Les caractéristiques des cellules peuvent être maintenues sur plusieurs générations, conduisant à une bonne reproductibilité entre les expériences.
- Les cultures peuvent être exposées à des réactifs, par ex. produits chimiques radioactifs ou médicaments à des concentrations définies.
- Enfin, il évite les problèmes juridiques, moraux et éthiques de l'expérimentation animale.

Les types des cultures cellulaires :

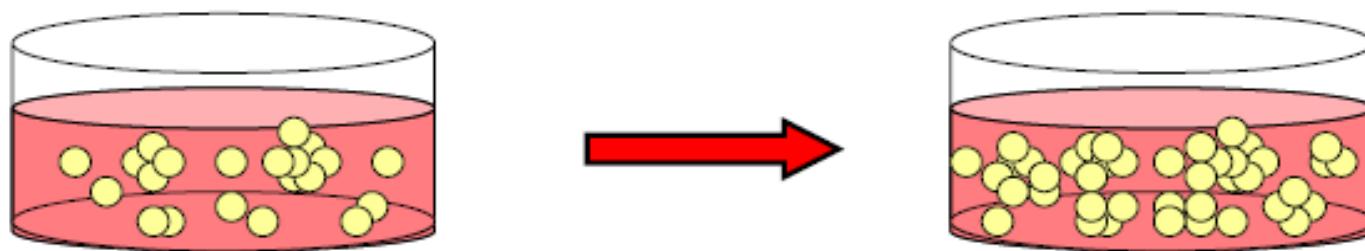
-  **1. Selon le comportement des cellules en culture et leurs obtention**
-  **2. Selon le stade de culture**
-  **3. Selon le nombre des cellules en culture**

1. Selon le comportement des cellules en culture et leurs obtention:

La culture des cellules peut être réalisée suivant deux procédés différents qui se basent sur l'aptitude des cellules de flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture en suspension) ou de s'adhérer à un substrat (flacon de culture) en verre ou en plastique (système de culture en monocouche):

a- Les cellules circulantes (culture en suspension) :

- Au sein de ces cultures, les cellules ne sont pas adhérentes à un support mais sont en suspension dans un milieu qui est avec ou sans constante agitation, évitant ainsi que les cellules ne se déposent et se développent sur le récipient (Exemple: Sang, moelle osseuse, liquides physiologiques)



- Dans cette situation, les cellules sont généralement cultivées dans :
 - Des flacons spinner (rotation magnétique) ou dans des erlenmeyers agités dans lesquels, les cellules sont activement gardées en suspension dans le milieu.

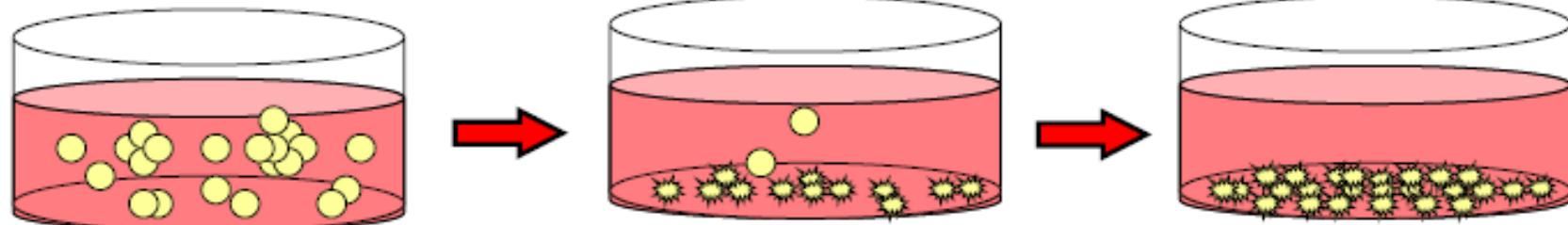


➤ Des récipients de culture stationnaires comme les flacons T et les bouteilles dans lesquels, bien qu'elles ne soient pas maintenues en agitation, les cellules sont incapables de se fixer fermement au substrat.



b- Les cellules adhérentes à partir de tissus ou d'organes (**Cultures en monocouches ou culture stationnaire**):

- Cette méthode de culture repose sur la propriété des cellules à avoir une affinité particulière pour un type de substrat, leur permettant ainsi d'y adhérer et de s'y développer. donc les cellules nécessitent d'être attachées entre elles et ancrées sur un support pour survivre



- Les cellules sont généralement cultivées dans des boîtes, flacons T, flacons roulants ou en plaques multipuits traités pour la culture de cellules
- Il existe plusieurs types de support permettant la croissance cellulaire: le plus souvent en polystyrène, ils peuvent également recouverts de diverses substances physiologiques favorisant le développement des cellules.
- Le polycarbonate, le polytétrafluoroéthylène, ou encore le polyvinyle sont également couramment utilisés.

L'utilisation d'un tel substrat nécessite:

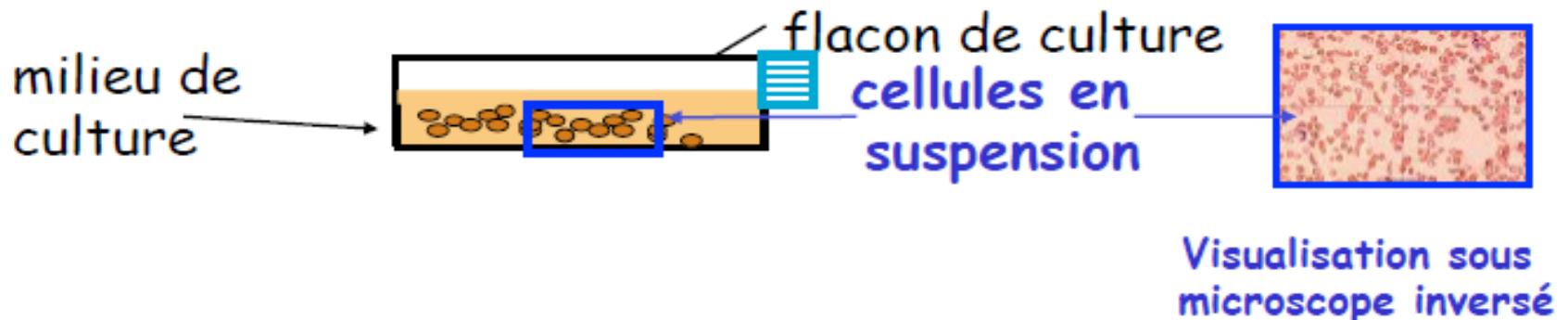
- une charge de surface
- composants de la matrice-extracellulaire comme la fibronectine, le collagène, ou encore la laminine
- sérum
- milieu conditionné par des cellules productrices de matrice-extracellulaire

Il existe trois systèmes différents de culture en monocouche:

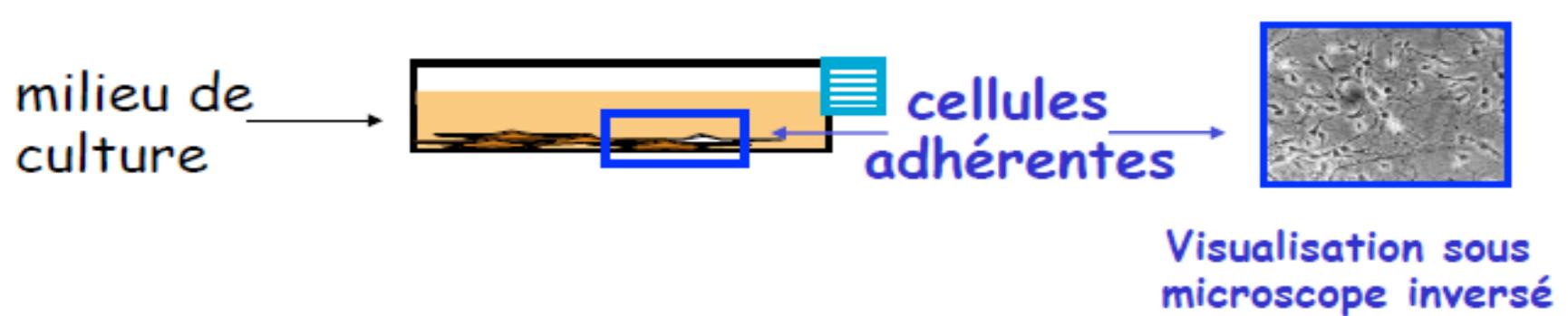
- Les systèmes clos
- Les systèmes semi-clos
- Les systèmes ouverts ou de perfusion:
chambre de culture de type Pomerat, Rose ou Sykes et Moore.

- a) **Les systèmes clos** où les flacons sont placés dans des étuves classiques de type bactériologique. Si aucun renouvellement du milieu n'est effectué, on observe un appauvrissement des facteurs nutritifs avec modification du pH et de l'environnement gazeux, particulièrement néfastes pour la culture surtout si le tampon utilisé est le tampon bicarbonate.
- b) **Les systèmes semi-clos** constitués de boîtes de Pétri ou microplaques placées dans des étuves permettant un renouvellement permanent de l'atmosphère gazeuse (95% air, 5% CO₂). Ce système permet une meilleure régulation du pH et de l'environnement gazeux.
- c) **Les systèmes ouverts ou de perfusion:** chambre de culture de type Pomerat, Rose ou Sykes et Moore. Ces systèmes ne sont utilisables que pour un petit nombre de cellules et pour des études nécessitant une observation en microscopie photonique.

Cellules en suspension :



Cellules adhérentes :



2. Selon le stade de culture :

- Culture cellulaire
- ✓ Culture primaire
 - ✓ Culture secondaire
 - ✓ Culture de lignées cellulaires

1- Culture primaire :

- Les cultures primaires sont faites par les cellules qui ont été isolées d'un tissu et qui prolifèrent dans les conditions appropriées donc lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent.
- Ces cellules maintiennent la plupart des fonctionnalités des tissus dont ils dérivent.

a. Récolte et acheminement de l'échantillon de tissu primaire :

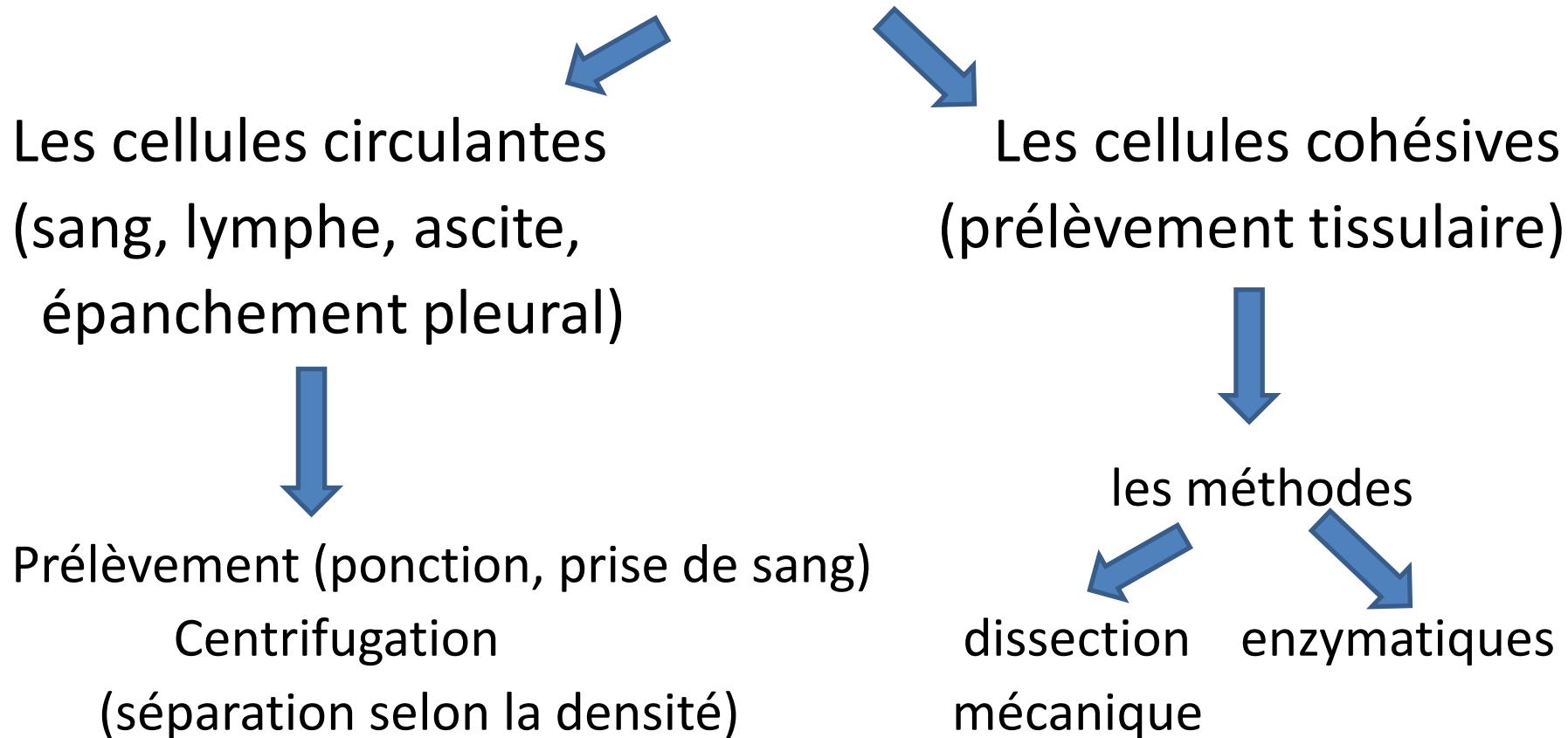
- Les échantillons {
 - exérèse chirurgicale (animal vivant)
 - autopsie d'un animal décédé
- La nature du tissu {
 - fragment tissulaire solide
 - suspension cellulaire
- Les échantillons (au labo) {
 - une analyse histologique
 - en salle de culture

- En salle de culture toutes les manipulations sont réalisées selon des conditions d'asepsie strictes et sous **hotte à flux laminaire**. Le prélèvement destiné à la mise en culture est alors lavé à l'aide d'une solution **tampon PBS** (Phosphate Buffered Saline), dans le but de ne récupérer que du tissu viable en éliminant les fragments nécrotiques et le sang. Il est ensuite disséqué en fragments de 5mm à l'aide d'une lame de bistouri stérile pour la mise en culture.

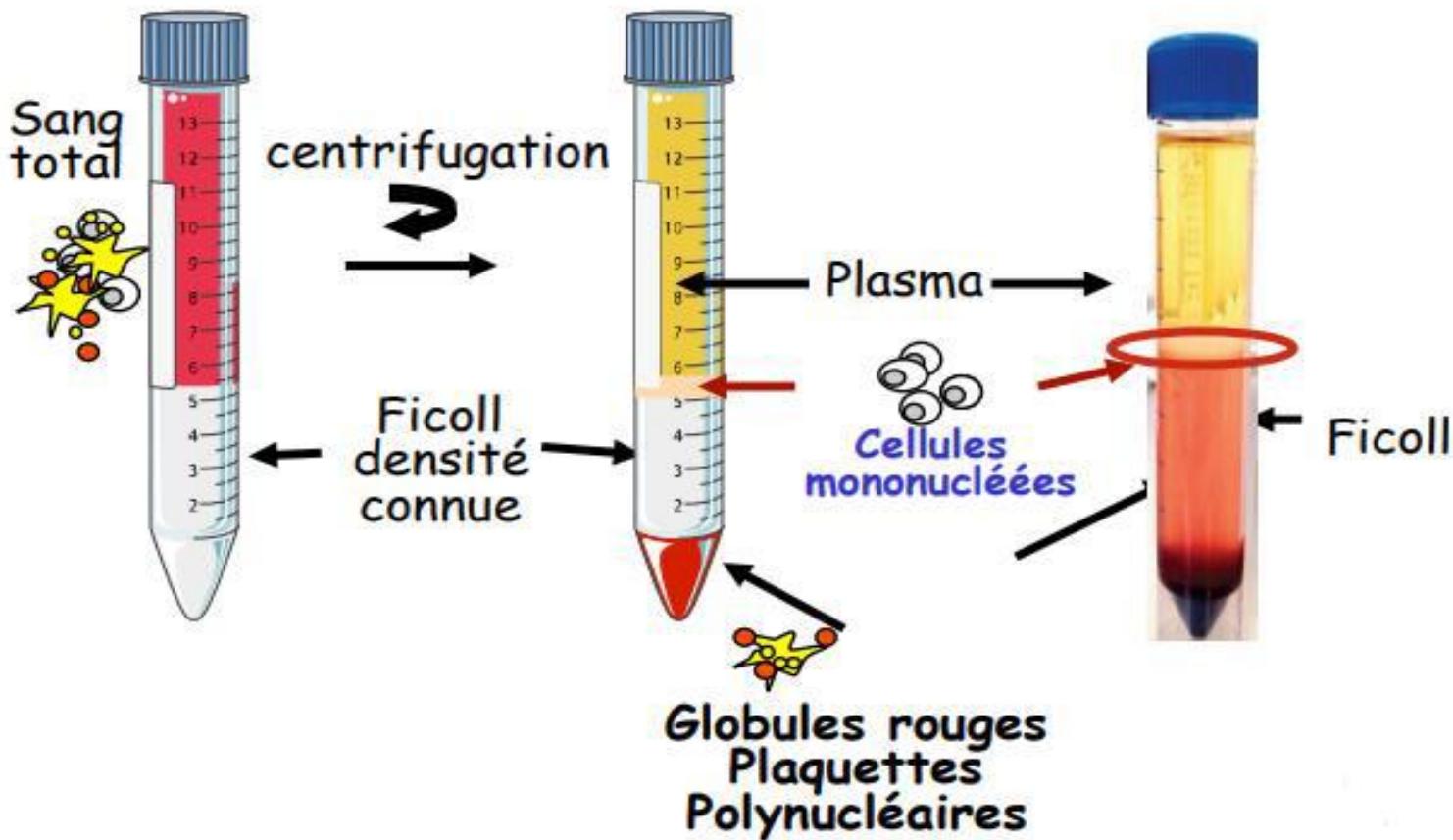
b. Obtention des cellules :

La nature tissulaire de l'échantillon prélevé a un impact sur l'efficacité et la rapidité de la mise en culture.

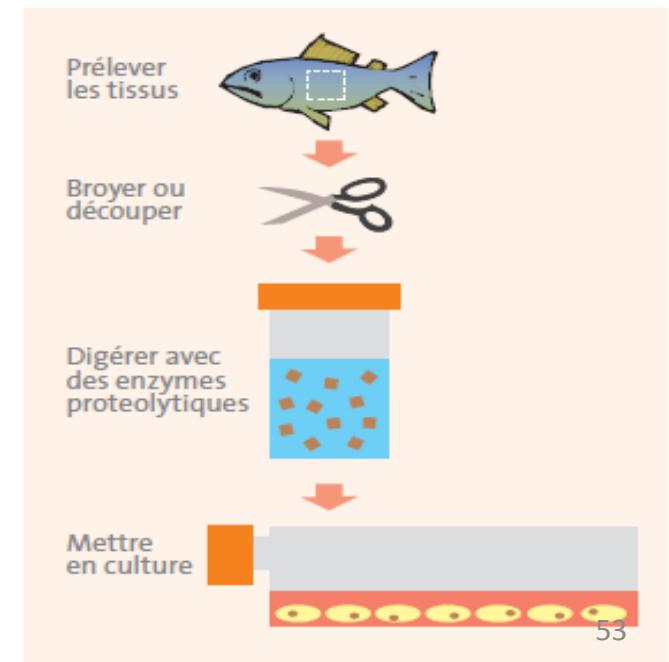
Types de cellules



- Ex : Ficoll sur du sang total, les cellules mononucléées se retrouvent à l'interface du ficoll et du plasma après centrifugation.

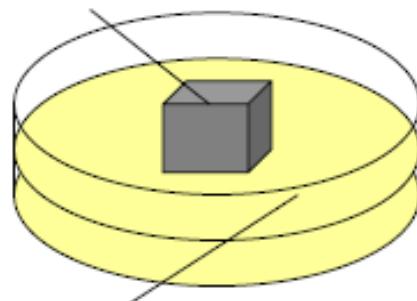


- Plusieurs méthodes de dissection peuvent être utilisées:
 - ❖ La méthode de dissection *sensu stricto*
 - ❖ La méthode de Jensen
 - ❖ La méthode mécanique pour les tissus mous
 - ❖ La méthode de Carrel
- Utilisation pour méthode enzymatique de:
 - ❖ La trypsine ou la collagénase,
la hyaluronidase, l'élastase,
la dispase ou encore la papaïne

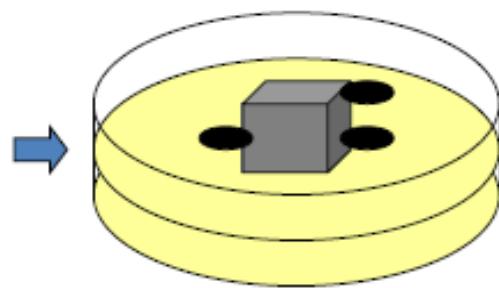


Culture primaire

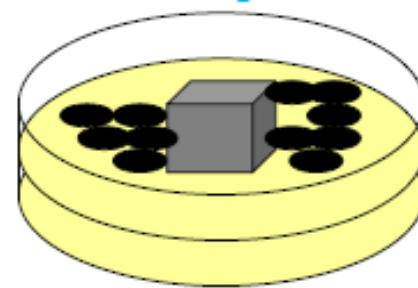
Fragment d'organe
ou de tissu



Après quelques jours

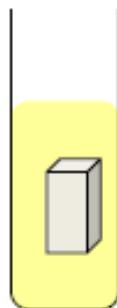


Culture primaire

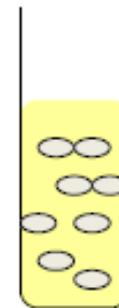


Milieu de culture adapté

Dissociation mécanique et enzymatique

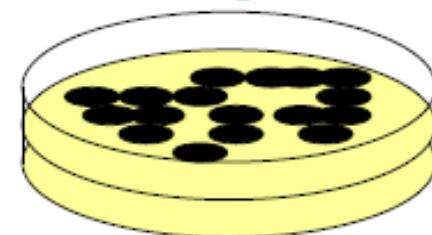


Action mécanique (broyer, émincer)
Action d'enzymes protéolytiques
(trypsine, collagénase)



Suspension cellulaire

Culture primaire



Mise en culture

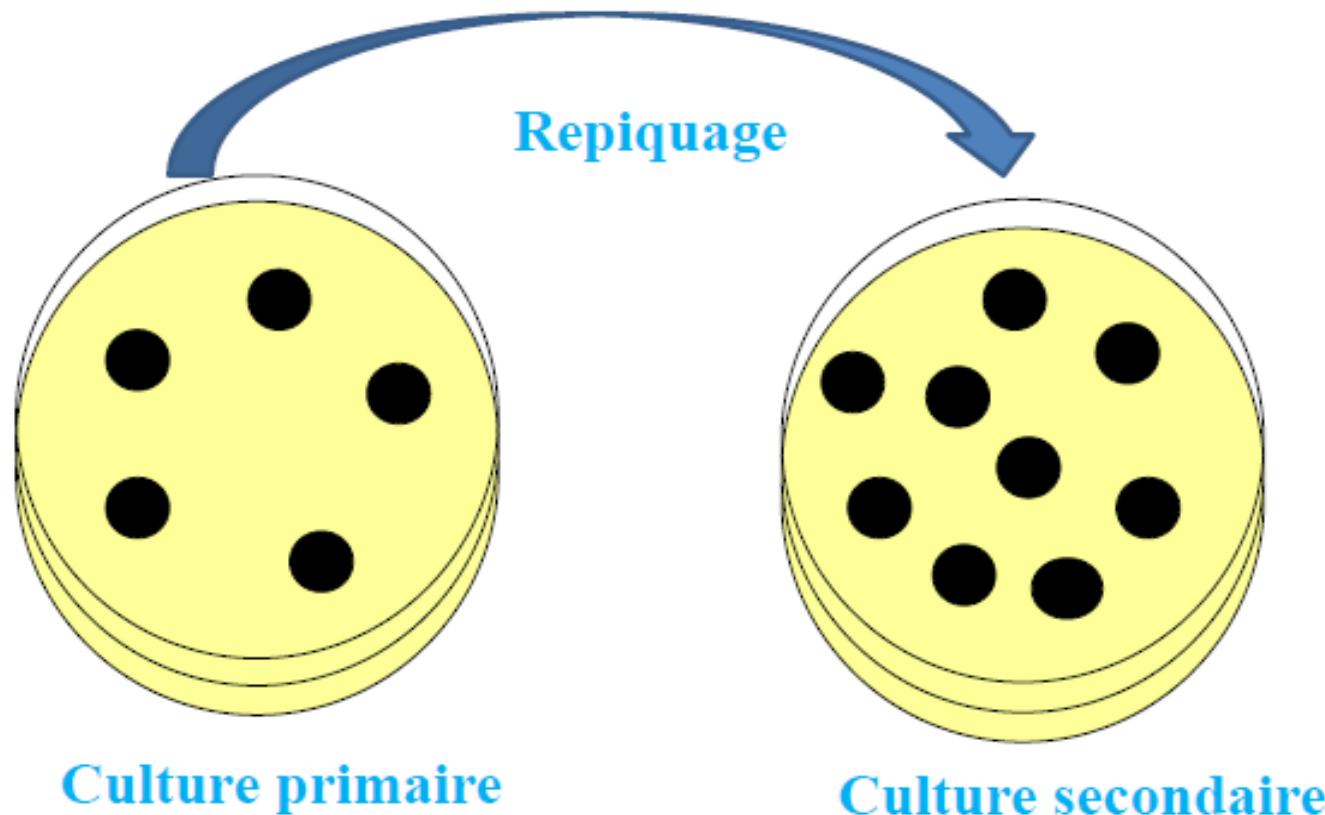
2- Culture secondaire :

- 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.
- Avec des enzymes ou par grattage
- Une fois libérées, les cellules en suspension peuvent être divisées et placées dans de nouveaux récipients de culture.

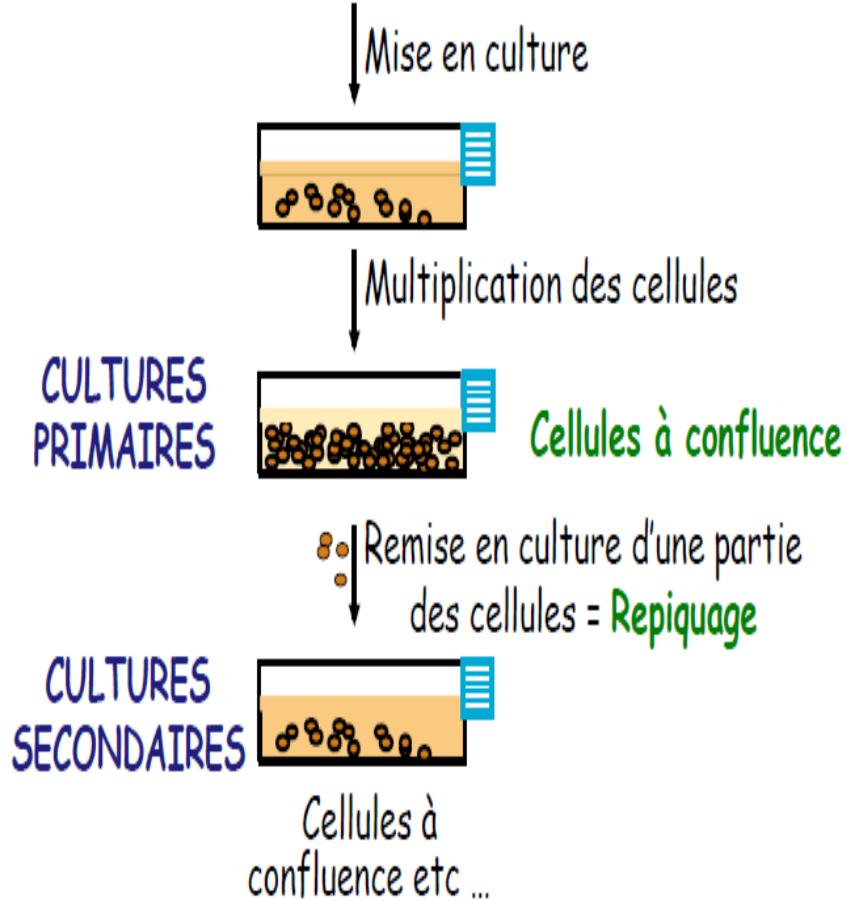
- Donc les cellules secondaires sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour ensemencer d'autres cultures et ainsi de suite. Peut être passé de 50 à 100 fois avant qu'ils atteignent la sénescence, devenir ce qu'on appelle **la culture diploïde**.

- Lorsqu'un surplus de cellules est disponible, il est possible de les traiter avec **des agents cryoprotecteurs** adaptés, comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le glycérol, de les congeler délicatement puis de les stocker à des **températures cryogéniques** (en dessous de -130°C) jusqu'à ce qu'on en ait besoin

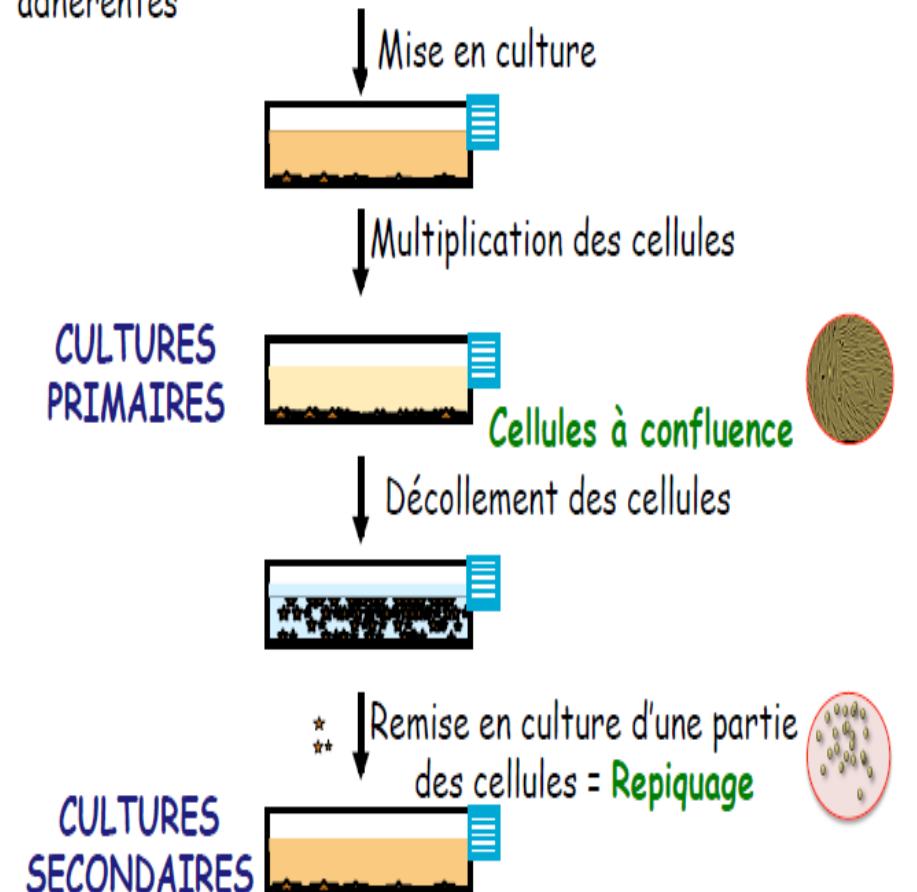
Culture secondaire



Ex : Cellules circulantes : culture de cellules en suspension



Ex : Cellules organisées en tissus : culture de cellules adhérentes

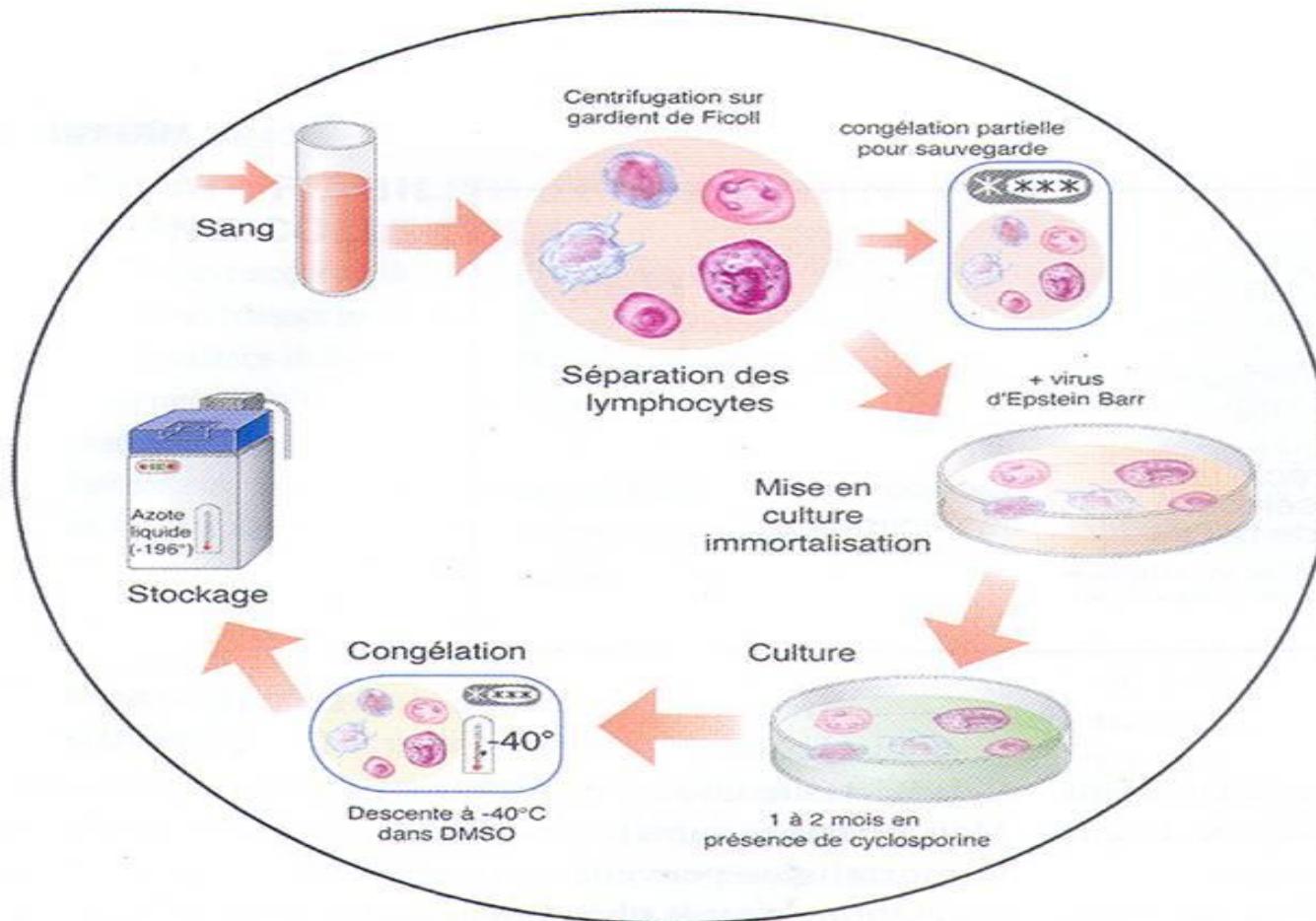


3- Lignée cellulaire

- Les lignées cellulaires sont issues du développement de cultures primaires qui au fur et à mesure du temps et des repiquages, perdent leur hétérogénéité pour permettre l'émergence d'un type cellulaire. Il est important de souligner que le terme ***sensu stricto*** de lignée cellulaire est attribué à la culture dès lors que la culture primaire subie son premier repiquage.
- Elles sont le plus souvent constituées de cellules tumorales ou de cellules «transformées», chimiquement ou via un virus oncogène, et possèdent la caractéristique de pouvoir se diviser de façon **illimitée**.

- Les lignées cellulaires finies: présentent une dégénérescence des cellules au bout d'un certain nombre de repiquages. Elles ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (**limite de Hayfklick**).
- Les lignées continues: à durée de vie illimitée. Elles peuvent être répliquées en série au cours de nombreuses fois (presque infini) sans perdre la capacité de croître.
- Malgré leur composition homogène, ces lignées doivent conserver les propriétés morphologiques, phénotypiques et génotypiques de la tumeur originelle, et ainsi pouvoir représenter une source renouvelable de matériel cellulaire pour les différentes études, malgré les mitoses successives subies par ces cellules

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules qui ont subi des modifications génétiques qui permettent leur croissance indéfinie (une capacité illimitée de division) elles proviennent de tumeurs spontanées ou de cellules transformées par immortalisation (cellules saines rendues "immortelles" artificiellement).



Avantages

Les cultures cellulaires ont beaucoup d'avantages :

- Ils sont relativement bon marché et ne nécessitent pas investissements d'espace importants.
- Les cellules sont faciles à entretenir, et ils peuvent se développer rapidement à densité élevée.
- Il est facile de travailler avec les cellules et nous pouvons concevoir des expériences avec plusieurs répliques pour des utilisations différentes.
- Les lignées cellulaires continues peuvent être passé un nombre illimité de fois, puisqu'ils sont devenus presque immortels.
- Ils peuvent être congelés et décongelés plusieurs fois, tel que mentionné précédemment.

Désavantages

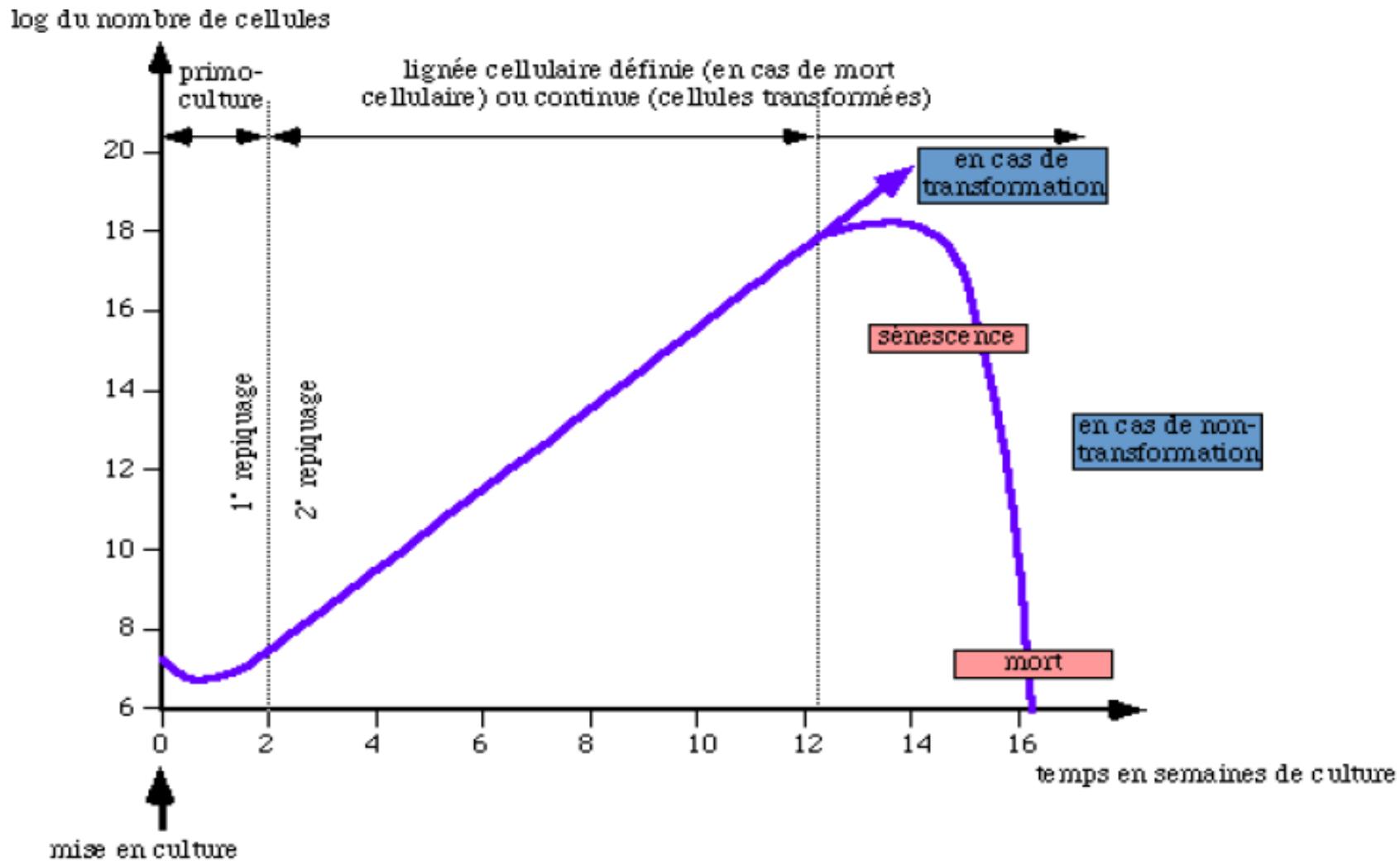
En raison de ces avantages, ils ont beaucoup d'applications, mais ils ne sont pas recommandés pour la production de vaccins, Puisqu'ils ont une origine tumorale elles constituent un danger, le cas échéant ces cellules atteindrait l'hôte.

En outre, contrairement à la culture primaire, qui retiennent la plupart des fonctionnalités des tissus dont ils dérivent, les lignées cellulaires continues sont accumulent des mutations que les distinguer des tissus originaux. Pour cette raison, les virus pourraient infecter pas eux.

Évolution d'une lignée cellulaire

- Entre chaque repiquage, les lignées cellulaires possèdent une courbe de croissance très caractéristique divisée en plusieurs phases bien distinctes caractérisées notamment par la **vitesse spécifique de croissance μ** :
- La phase de latence ou «lag phase»;
- La phase exponentielle ou «log phase»;
- La phase de plateau, ou «plateau phase».

Phases	Phénomènes	μ
1 Adaptation (latence)	Courte durée en général : les cellules se fixent au plastique, réorganisent leur cytosquelette et s'étalent	Nulle
2 Accélération	Les cellules commencent à se multiplier	Augmente
3 Croissance exponentielle	Croissance rapide et importante, dont la vitesse peut être ralenti artificiellement (milieu pauvre sans sérum, moins de passages, température réduite...)	Maximale et constante
4 Décélération	Courte ; certaines cellules meurent, le milieu s'étant appauvri et/ou devenant hostile (déchets)	Diminue
5 Stationnaire	Équilibre entre morts et multiplications cellulaires	Nulle
6 Déclin	Plus de morts que de multiplications, le milieu devenu trop toxique (déchets) et trop peu nutritif (carences)	Négative



Evolution d'une culture de cellules au cours du temps

Les différents Types cellulaires et établissement de lignées à partir de cultures primaires :

La grande particularité des cultures cellulaires issues de tissus primaires est leur composition très complexe en populations cellulaires. En effet, en plus des **cellules tumorales**, de nombreux autres types cellulaires peuvent être présents tels que des **cellules hématopoïétiques** ou des **fibroblastes**.

1. Les cellules non tumorales :

Classiquement on définit une cellule non tumorale en culture cellulaire selon deux critères essentiels: **la capacité proliférative et les fonctions différenciées.**

- a) **Prolifération cellulaire:** le potentiel mitotique.
- b) **Différenciation:** un phénomène de dédifférenciation très caractéristique s'observe au cours de la culture caractérisée par une modification et une disparition des fonctions différenciées. Ce phénomène s'observe aussi bien sur la structure des cellules, avec, par exemple, une perte de la polarité, ou encore des villosités pour les cultures d'entérocytes, mais aussi une perte de leur fonctionnalité.

2. Les cellules tumorales :

- Parmi les différences entre les caractéristiques des cellules normales et celles des cellules tumorales, quatre avantages sont très importants à souligner du fait de leur influence sur les conditions de mise en culture:
 1. Les cellules tumorales possèdent tout d'abord la capacité de pouvoir sécréter de façon autocrine leurs propres facteurs de croissance leur conférant un contrôle autonome de leur croissance. Ainsi cette fonctionnalité permet à la fois de rendre les cellules moins dépendantes du milieu de culture et de sa composition, mais aussi de réduire le taux de sérum utilisé permettant ainsi de diminuer le risque de contamination par les fibroblastes.

2. Egalement, les lignées cellulaires sont également capables de se diviser de façon infinie avec une durée de vie illimitée. Cette propriété permet une purification progressive de la population cellulaire de la culture par disparition des autres types cellulaires non immortels au fil du temps.
3. Le troisième avantage de ces cultures est leur facilité à proliférer en suspension par rapport aux cellules non tumorales faisant de la nature du substrat et de leur capacité d'adhérence des facteurs moins importants sur la réussite de la culture.

4. Enfin la pathogénie de nombreux cancers, ainsi que la preuve d'efficacité de molécules thérapeutiques ont pu, grâce à la propriété de pouvoir engendrer la formation d'un tissu tumoral après greffe de celle-ci au sein d'un organisme vivant hétérologue ou homologue, être comprises et maîtrisées.

3. Les fibroblastes :

- Les fibroblastes sont des cellules issues du tissu conjonctif, amenées de façon fortuite au sein de la culture cellulaire lors du prélèvement du tissu primaire. Ils constituent le contaminant cellulaire le plus courant au sein des cultures primaires. Ils possèdent la capacité d'adhérer facilement au substrat et de proliférer beaucoup plus rapidement que les cellules tumorales.
- Cet envahissement peut entraîner un appauvrissement des nutriments du milieu cellulaire au dépend des cellules tumorales, c'est pour ça qu'il est important de savoir les éliminer et prévenir leur prolifération.

3. Selon le nombre des cellules en culture

Les cultures peuvent être classées en **Cultures pures** et **Co-cultures** en se basant sur le nombre initial de cellules mis en culture:

a- **Cultures pures:**

Après la préparation et la stérilisation afin d'éliminer tous les micro-organismes, un milieu de culture peut être inoculé et incubé dans des conditions favorisant la multiplication cellulaire.

Au laboratoire, l'inoculation sera généralement réalisée à partir d'une culture pure, une culture contenant seulement un seul type cellulaire.

b- Co-cultures:

Les co-cultures consistent, comme leur nom l'indique, à cultiver ensemble deux ou plusieurs types cellulaires. Elles permettent donc de reconstituer de manière simplifiée les échanges existant ou sein des tissus *in vivo* entre plusieurs partenaires.

Les différents types cellulaires peuvent être mélangés au moment de l'ensemencement.

Exemple d'une co-culture : « fibroblastes-cellules épithéliales », ces dernières sont ensemencées sur une monocouche de fibroblastes confluents

Mode de culture cellulaire :

Le milieu de culture des éléments nutritifs et des facteurs d'environnements optimaux forme une base de réalisation des différents modes de culture cellulaire. les cultures, suivant ce principe, peuvent être réalisées en mode discontinue (BATCH) ou continues (FED-BATCH)

a- **Cultures discontinues**

- Ce type de culture constitue un système clos : il s'effectue en flacons ou en bioréacteurs avec un milieu favorable à la croissance dans des conditions environnementales (température pH, potentiel redox... etc.) convenable pour l'organisme.
- Les cellules cultivées par cette méthode forment une population qui ne reste dans un état de croissance équilibrée que pendant un faible nombre de générations. Normalement, il n'y a pas d'addition d'éléments au milieu et la culture se développe jusqu'à ce qu'il y ait carence en un nutriment essentiel ou jusqu'à ce qu'une modification importante de l'environnement (changement de pH, accumulation d'un produit toxique) bloque la croissance.

Donc dans ce cas, le cycle de développement n'est pas une propriété des cellules mais le résultat d'une croissance dans un **lieu limité en nutriments**.

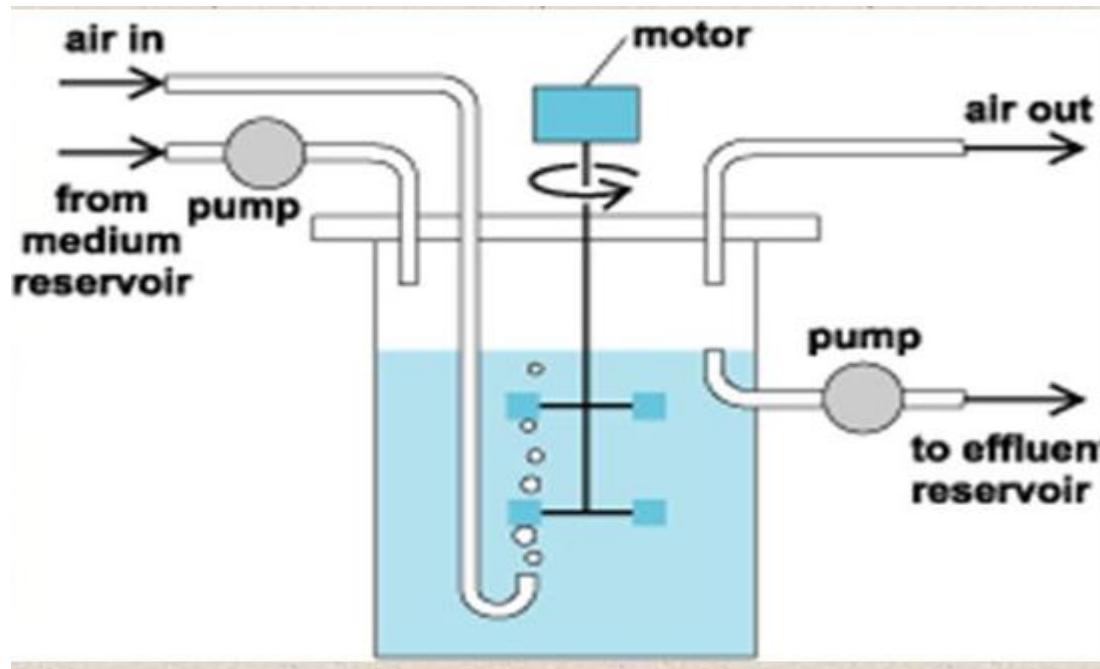
b- Cultures continues

Dans le cadre d'une culture continue, les cultures sont maintenues dans des conditions bien définies, contrôlées, constantes et pendant des périodes assez longues. C'est notamment le cas de l'étude des processus physiologiques tels que la synthèse d'enzyme, pour lesquels la possibilité d'obtenir de croissance est très utile.

C'est un système ouvert où les cellules sont maintenue dans un état de croissance équilibrée et optimale. Cette situation est stabilisée par le renouvellement permanent du milieu de culture, assurant un apport régulier de milieu nutritif qui est compensé par le retrait simultané du même volume de culture et son remplacement par un milieu frais.

Les cultures continues peuvent être menées dans :

- ❖ ***Le chémostat*** : Dans lequel un facteur nutritif limitant est ajouté à un taux constant



- ❖ ***Le turbidostat*** : Dans lequel la densité des cellules est maintenue constante en ajoutant du milieu frais selon les besoins

Différence entre Chemostat et Turbidostat

Le milieu frais est ajouté en continu au chemostat au même rythme que les produits sont retirés, tandis que le milieu frais est automatiquement ajouté au turbidostat en maintenant une turbidité constante..

Similarités:

- Chemostat et turbidostat sont deux types de cultures continues.
- Les deux sont des systèmes ouverts.
- Un milieu frais est ajouté à la culture tout en retirant les produits tout au long du processus. Par conséquent, les deux systèmes maintiennent un volume constant.
- Les deux cultures affichent une croissance stable.