

# CULTURE CELLULAIRE

**A : INTRODUCTION**

**B : CONDITIONS NÉCESSAIRES POUR LA CULTURE CELLULAIRE**

1 : LES BESOINS NUTRITIFS

2 : LES BESOINS EN SÉRUM

3 : LES BESOINS CELLULAIRES PHYSIOLOGIQUES

4 : LE MATÉRIEL NÉCESSAIRE

**C : LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE CULTURE**

**D : NOTIONS SUR LES CULTURES PRIMAIRES, SECONDAIRES, DE LIGNÉES ET DE CLONES**

1 : LES CULTURES PRIMAIRES

a. Isolement des cellules

b. Différents modes de séparation cellulaire

2 : LES CULTURES SECONDAIRES

3 : LES LIGNÉES CELLULAIRES PÉRENNISÉES

**E : METHODE DE CLONAGE CELLULAIRE**

**F : CRYOCONSERVATION DES CELLULES**

**G : TRANSFECTION DE GÈNES DANS DES CELLULES EUCARYOTES**

1 : LES PLASMIDES

2 : LES DIFFÉRENTES MÉTHODES POUR FAIRE ENTRER UN GÈNE DANS UNE CELLULE EUCARYOTE

3 : TRANSFECTION TRANSITOIRE - TRANSFECTION STABLE

## A : INTRODUCTION

- L'évolution des techniques de culture cellulaire à permis une avancée importante dans le domaine de la biologie depuis les années 40
- Actuellement les cellules vivantes sont des outils biologiques de choix dans de nombreux domaines :

- On sait cultiver des cellules d'origine végétale ou animale de différentes sources
- Les cellules peuvent être manipulées facilement
- Les cellules peuvent être congelées tout en gardant leur potentiel de division et leur patrimoine génétique
- Source continue homogène de cellules utilisables dans différents domaines : recherche, santé, cosmétique...
- Les cellules permettent de minimiser l'utilisation d'animaux de laboratoire

- Exemples d'utilisations dans le domaine de la santé:



Grefe de peau



Fécondation in vitro



Grefe de moelle osseuse



Thérapie cellulaire



...

- La culture cellulaire c'est quoi ?
  - ☛ **Maintenir et multiplier des cellules en dehors de l'organisme**
- Quels sont les conditions pour faire de la culture cellulaire ?
  - ☛ **Créer un environnement proche de l'environnement naturel**
- Que faut-il pour faire de la culture cellulaire ?
  - ☛ **Pour chaque type cellulaire connaître son environnement afin d'identifier:**

**LES BESOINS NUTRITIFS**

**LES CONTRAINTES PHYSIOLOGIQUES**

# B : CONDITIONS NECESSAIRES POUR LA CULTURE CELLULAIRE

## 1 : LES BESOINS NUTRITIFS

Mise au point de milieux de culture adaptés pour maintenir la survie et la prolifération des cellules en dehors de l'organisme

Eléments nécessaires à tous les types cellulaires

➤ Sels+Sucres+Acides Aminés+Vitamines

= Milieux Commerciaux de Base

## Milieu de base nécessaire à toutes les cellules eucaryotes

- ✓ SELS : Na; Cl; K; P; Mg
  - ☛ maintien du potentiel membranaire
  - ☛ maintien de la balance osmotique
  - ☛ cofacteurs pour des réactions biochimiques
- ✓ OLIGO-ELEMENTS : fer, zinc ...
- ✓ SUCRES : Sucres en C6
  - ☛ source d'énergie
- ✓ ACIDES AMINES : arg, cys, glut, hist ...
  - ☛ Acides Aminés essentiels à la croissance cellulaire
- ✓ VITAMINES : VitB, Biotine, Acide folique, Nicotinamine
- ✓ Choline et Inositol

## 2 : LES BESOINS EN SÉRUM

Le milieu de base assure la survie à court terme des cellules en culture

Nécessité d'ajouter un complément à ces cellules

### • **Sérum de Veau Fœtal**

#### ■ **Rôles d'apport d'éléments du sérum**

- ✓ Sels minéraux; nutriments; oligo-éléments; vitamines; cholestérol; acides gras...
- ✓ Des facteurs d'attachement : fibronectine, laminine
- ✓ Des hormones et des facteurs de croissance : insuline, PDGF, EGF, FGF
- ✓ Des protéines diverses permettant le transport de minéraux, de lipides ou d'hormones



## ■ Avantages du sérum

- ☛ Agent mitogène important (division cellulaire (=multiplication cellulaire))
- ☛ Protecteur contre différents paramètres physiques : viscosité, choc, osmolarité
- ☛ Protecteur contre différents paramètres chimiques : ex : inhibiteurs de protéases

## ■ Inconvénients du sérum

- ☛ Composition pas bien déterminée
- ☛ Variabilité
- ☛ Difficultés d'approvisionnement
- ☛ Possibilité de présence de virus et de pathogènes
- ☛ Présence d'immunoglobulines

### 3 : LES BESOINS CELLULAIRES PHYSIOLOGIQUES

**Température** : le nombre de division cellulaire augmente avec la température avec une valeur supérieure limite où elle devient inhibitrice

➤ **cellules humaines : 37°C**

**pH** : la limite de pH pour laquelle la cellule présente une croissance optimale est étroite

➤ **cellules humaines : pH 7,2- pH 7,4**

**CO<sub>2</sub>** : le CO<sub>2</sub> et le bicarbonate sont nécessaires à la croissance cellulaire

Equilibre bicarbonate/acide carbonique obtenu avec le CO<sub>2</sub> en phase gazeuse

Cultive les cellules dans une atmosphère ouverte contrôlée en permanence

➤ **cellules humaines : présence de 5% de CO<sub>2</sub>**

## Tampon :

- ☛ En présence d'HEPES, permet d'éviter les variations de pH brutales

## Osmolarité

- ☛ Ajustée avec du Na Cl

**Humidité** : proche de la saturation, évite les variations de pression osmotique dues à des évaporations du milieu de culture

La culture de cellules humaines se fait dans des incubateurs humidifiés, réglés à 37°C, avec un apport de CO<sub>2</sub>

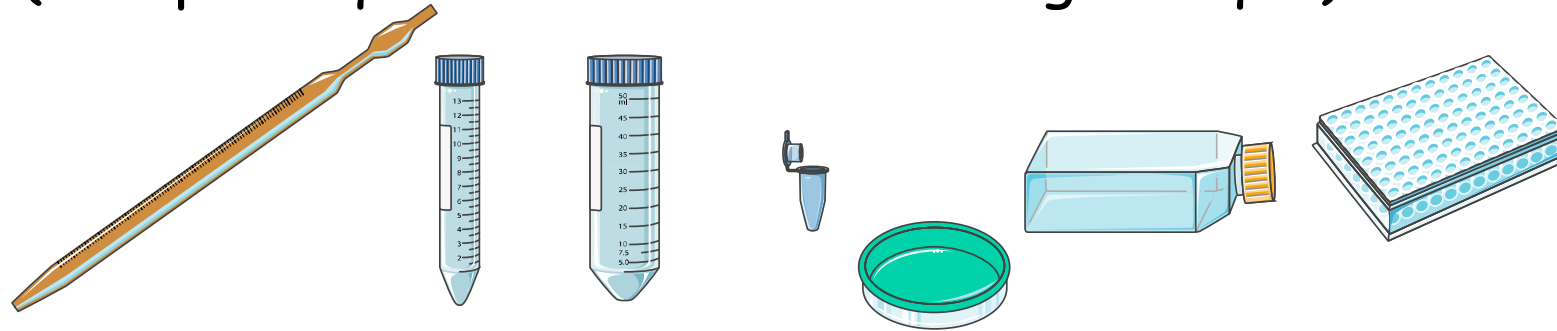
## 4 : LE MATÉRIEL NÉCESSAIRE

Du matériel spécifique pour la manipulation et la culture des cellules

### ✧ Manipulation

#### ☛ Consommables stériles :

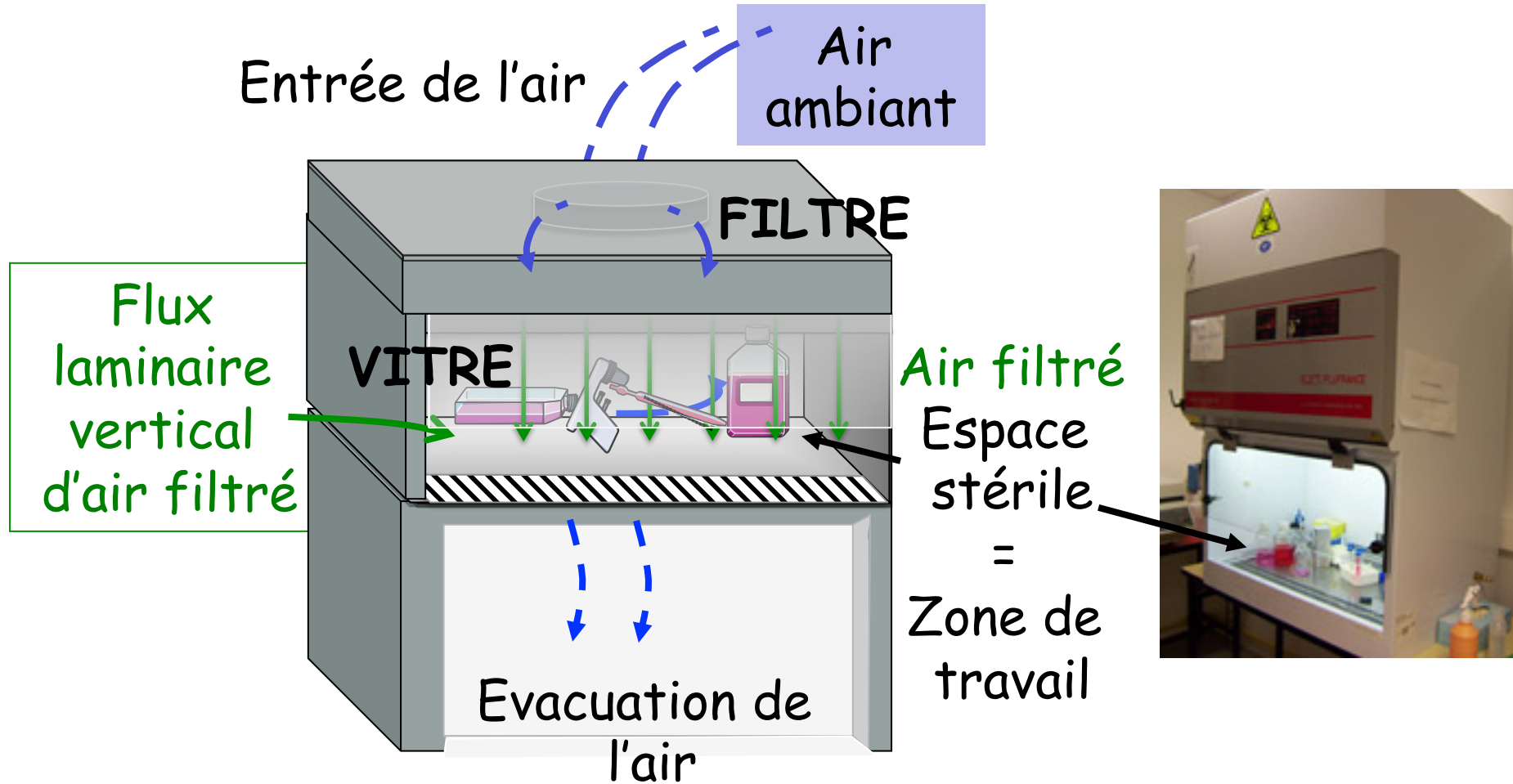
Manipulation avec du matériel stérile (irradiation)  
(ex : plastiques commerciaux à usage unique)



Milieu commerciaux et sérums filtrés sur  $0,2\mu\text{m}$   
(élimine les bactéries)



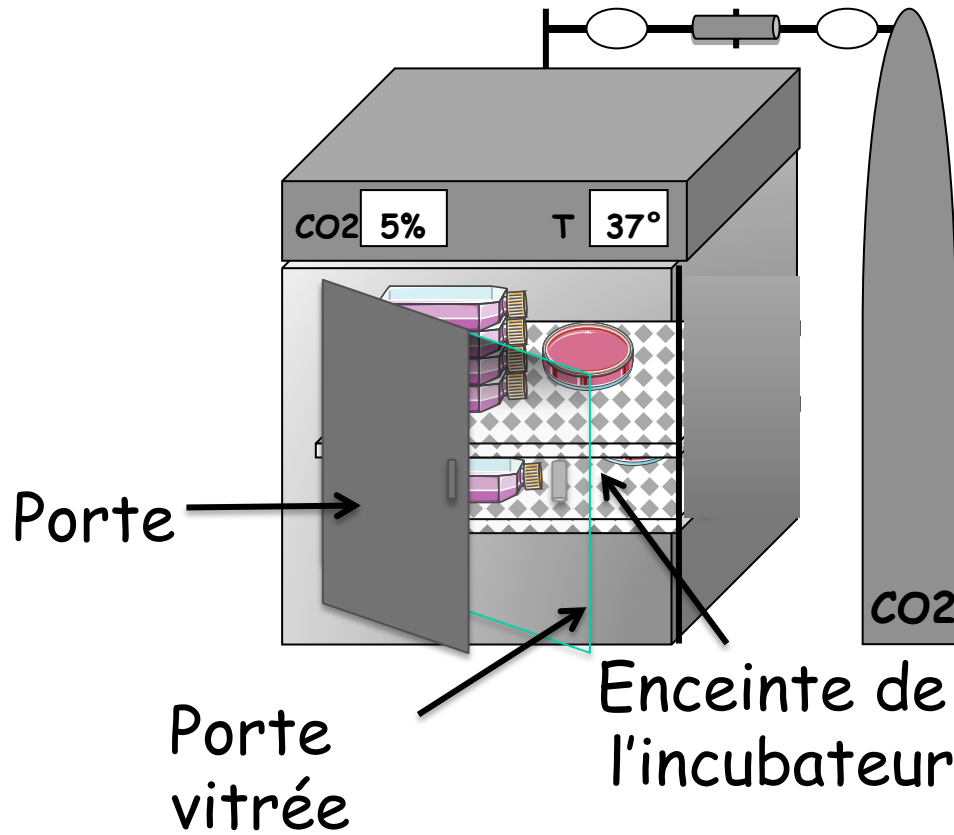
☛ **Hottes stériles** : Manipulation sous des hottes à flux laminaire, l'entrée de l'air est filtré



## ✧ Culture

### ☛ Incubateurs

- Température constante et homogène (37°C)
- Humidité 90-95%
- Pression partielle en oxygène proche des conditions naturelles
- Teneur en CO<sub>2</sub> (5%) suffisante pour maintenir le pH constant



L'incubateur  
est connecté  
à une  
bombe de  
CO2



Chaque type cellulaire d'origine différente aura des besoins qui lui seront plus spécifiques pour sa division et sa croissance.

Exemples :

✓ des facteurs de croissance particuliers

✓ des taux de glucose plus importants

✓ des facteurs d'attachement ...

additionnés au milieu de culture standard



# C : LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE CULTURE

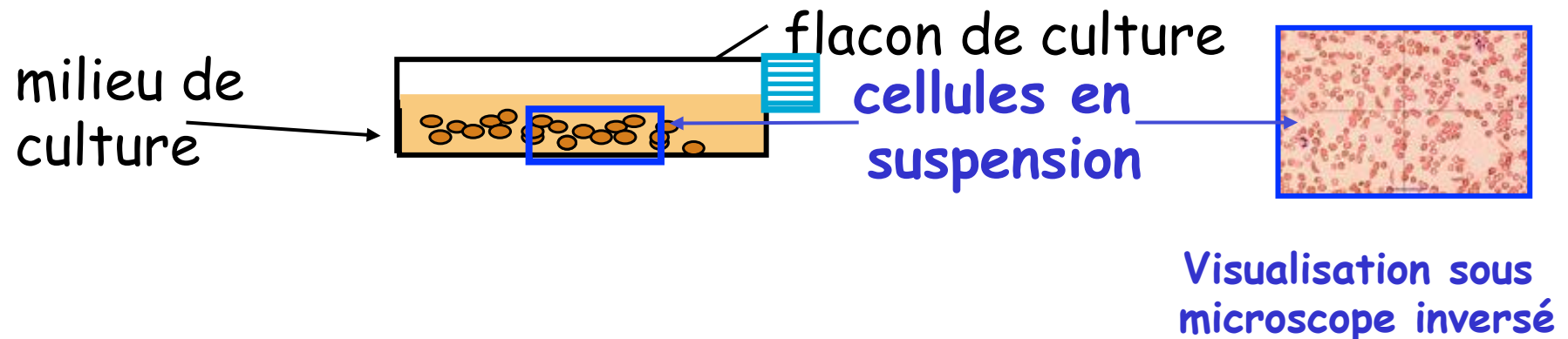


Les systèmes de culture vont dépendre du type cellulaire

✓ Cellules ne nécessitant pas de facteurs d'attachement

**culture en suspension dans le milieu adapté :**

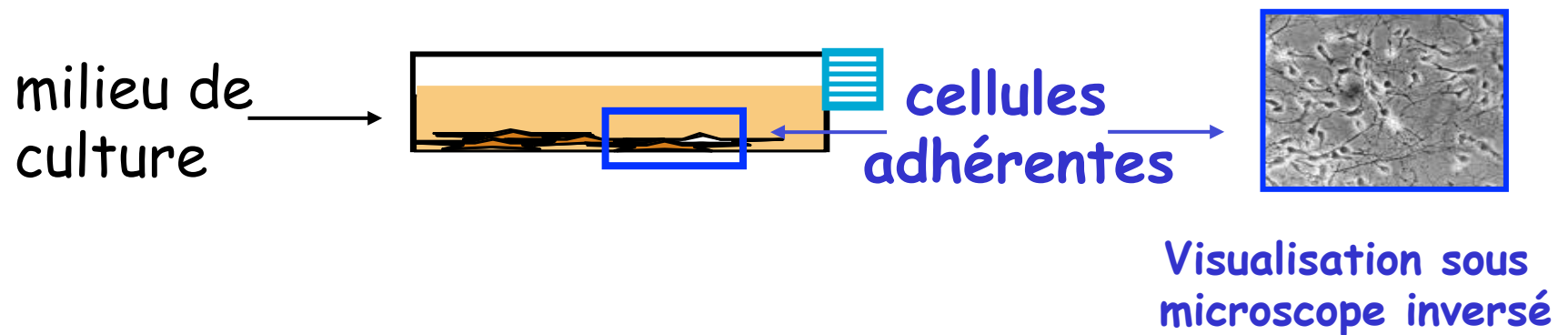
☛ cellules en suspension (ex : cellules sanguines)



✓ Cellules nécessitant des facteurs d'attachement

**culture sur un support dans le milieu adapté :**

☛ cellules adhérentes, majorité des cellules (ex : fibroblastes)



Molécules impliquées dans l'adhérence dans les tissus :

**Des protéines membranaires** : **les intégrines** qui font le relais entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (formation de points focaux d'adhérence).

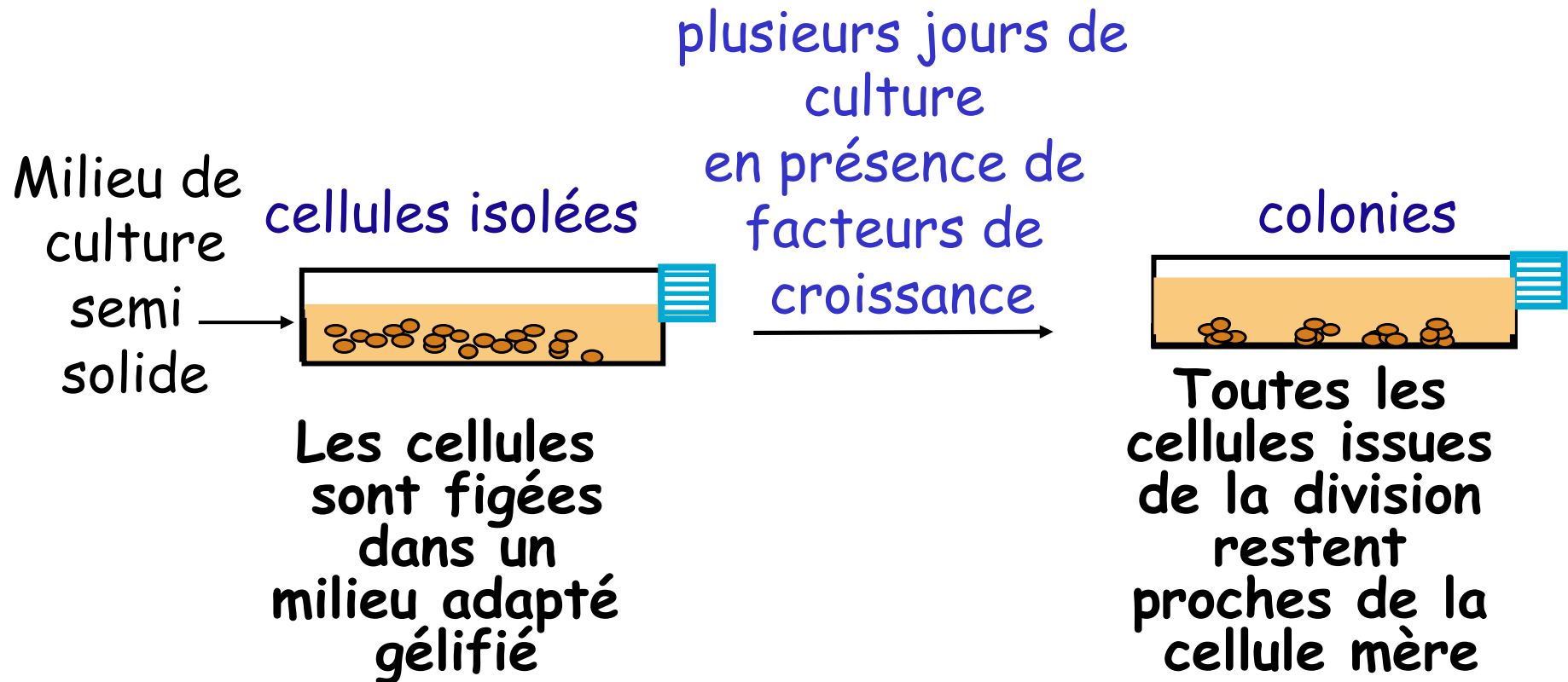
**Les composants de la matrice extracellulaire**, **glycosaminoglycanes**, **protéoglycanes** et des protéines type **collagène**, **fibronectine**, **laminine**.

Molécules impliquées dans l'adhérence in vitro :

Cet ancrage dépend des **facteurs d'attachement** cités ci-dessus qui seront synthétisés par les cellules et apportés dans le milieu de culture.

Il dépend également de la **nature du support** utilisé, ils sont en général en plastique, **polystyrène**, traité physiquement pour exposer **des charges négatives**.

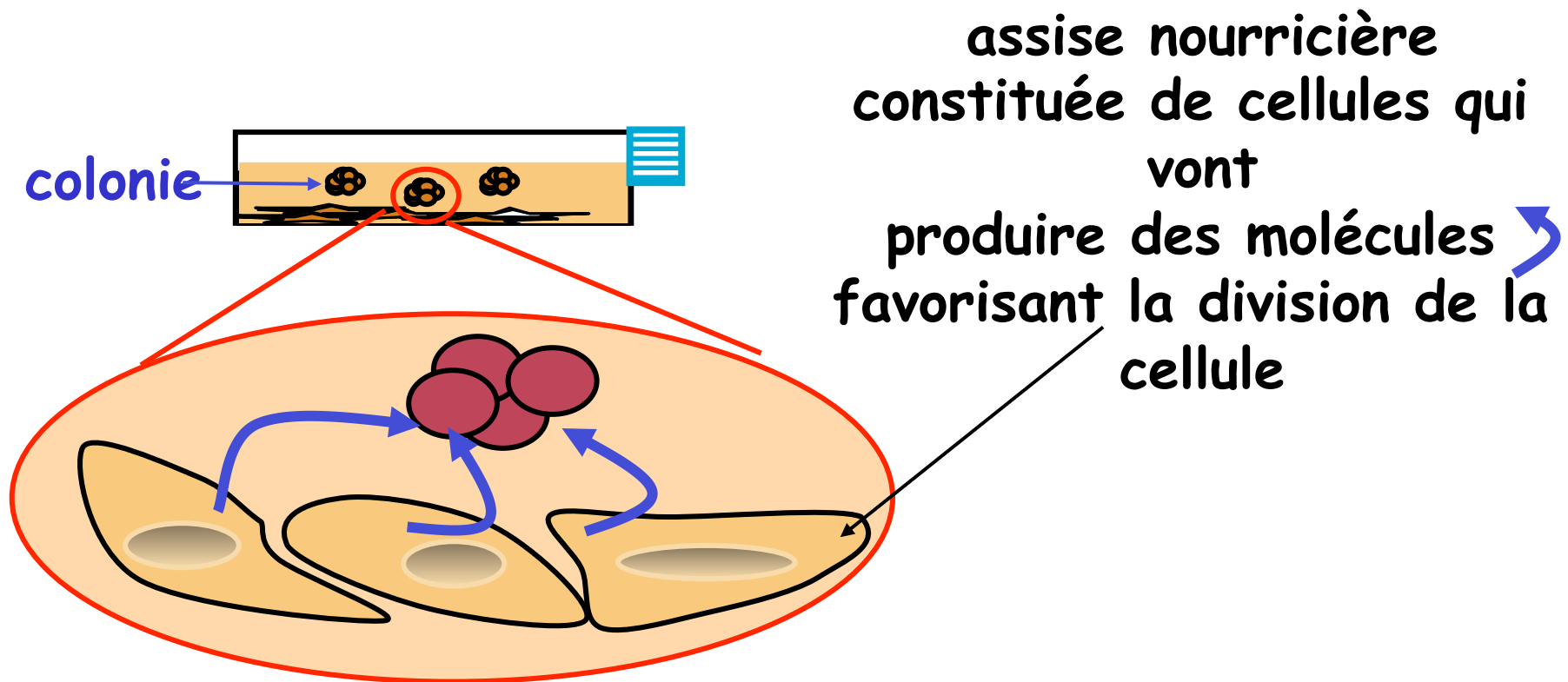
- ✓ Cellules nécessitant une configuration en trois dimensions culture en milieu semi solide (agar, méthylcellulose) :
  - cellules en suspension (ex : cellules sanguines, de la moelle osseuse)



- ✓ Cellules nécessitant une configuration en trois dimensions plus des facteurs produits par d'autres types cellulaires

**culture en milieu semi solide sur une assise nourricière :**

- cellules en suspension (ex : cellules de la moelle osseuse)



## D : NOTIONS SUR LES CULTURES PRIMAIRES, SECONDAIRES, LES LIGNÉES ET LES CLONES CELLULAIRES

Différents outils cellulaires peuvent être utilisés :

- les cultures primaires
- les cultures secondaires (durée de vie limitée)
- les lignées transformées (durée de vie illimitée)

# 1 : LES CULTURES PRIMAIRES

**Définition : Cellules cultivées directement après isolement à partir d'un tissu ou d'un organe**

## **a. Isolement des cellules**

La 1<sup>ère</sup> étape implique des procédures afin d'isoler et d'individualiser les cellules d'intérêt



## Isolement des cellules

Cellules  
circulantes

- Prélèvement sanguin
- Ponction du Liquide Céphalorachidien LCR

Cellules organisées  
en tissus

- Biopsie
- Dissection

Dissociation des cellules :  
mécanique et/ou chimique

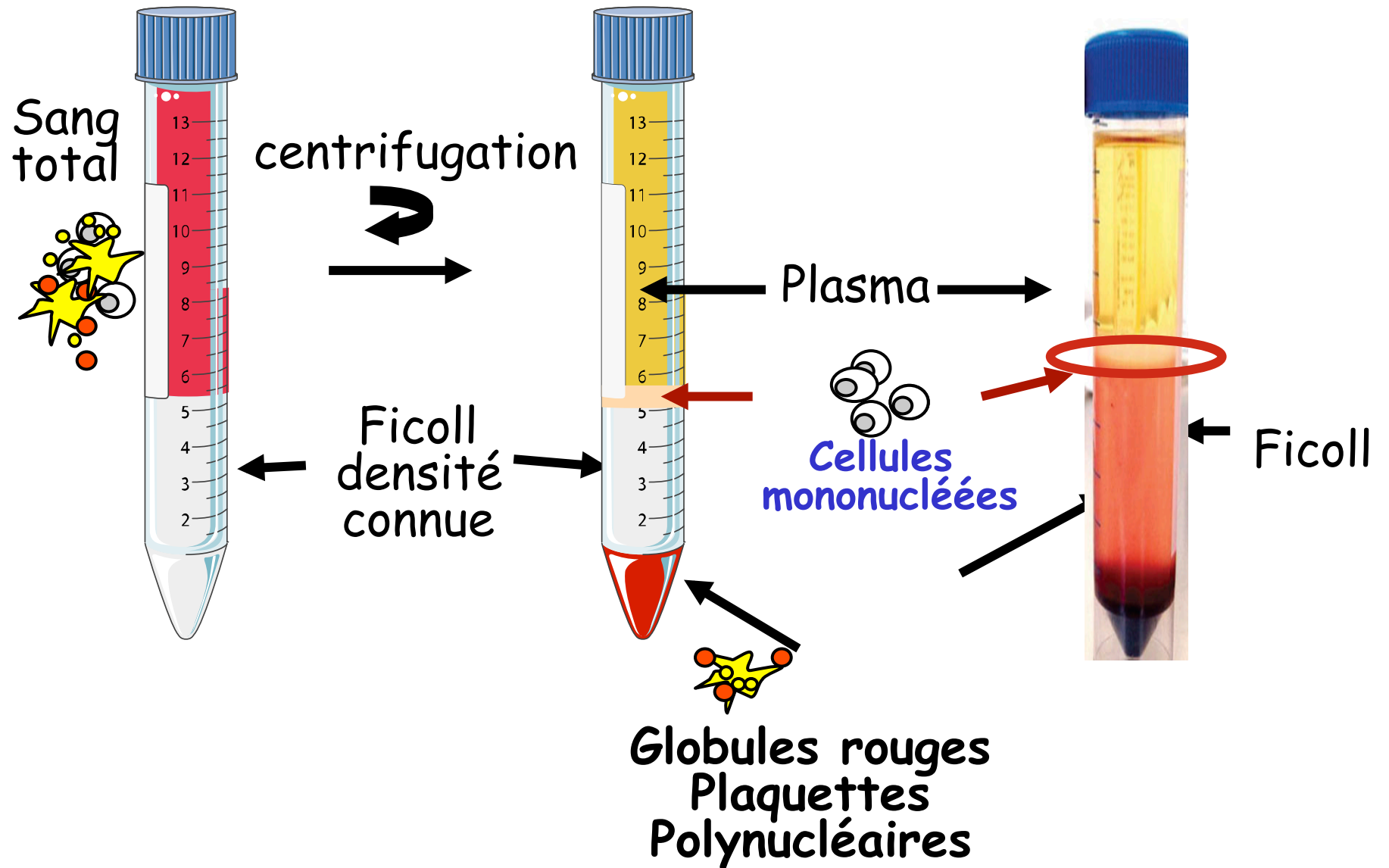
Donne une population de cellules  
hétérogène,  
d'où la nécessité d'étapes de séparation  
des différentes populations cellulaire

## b. Différents modes de séparation cellulaire

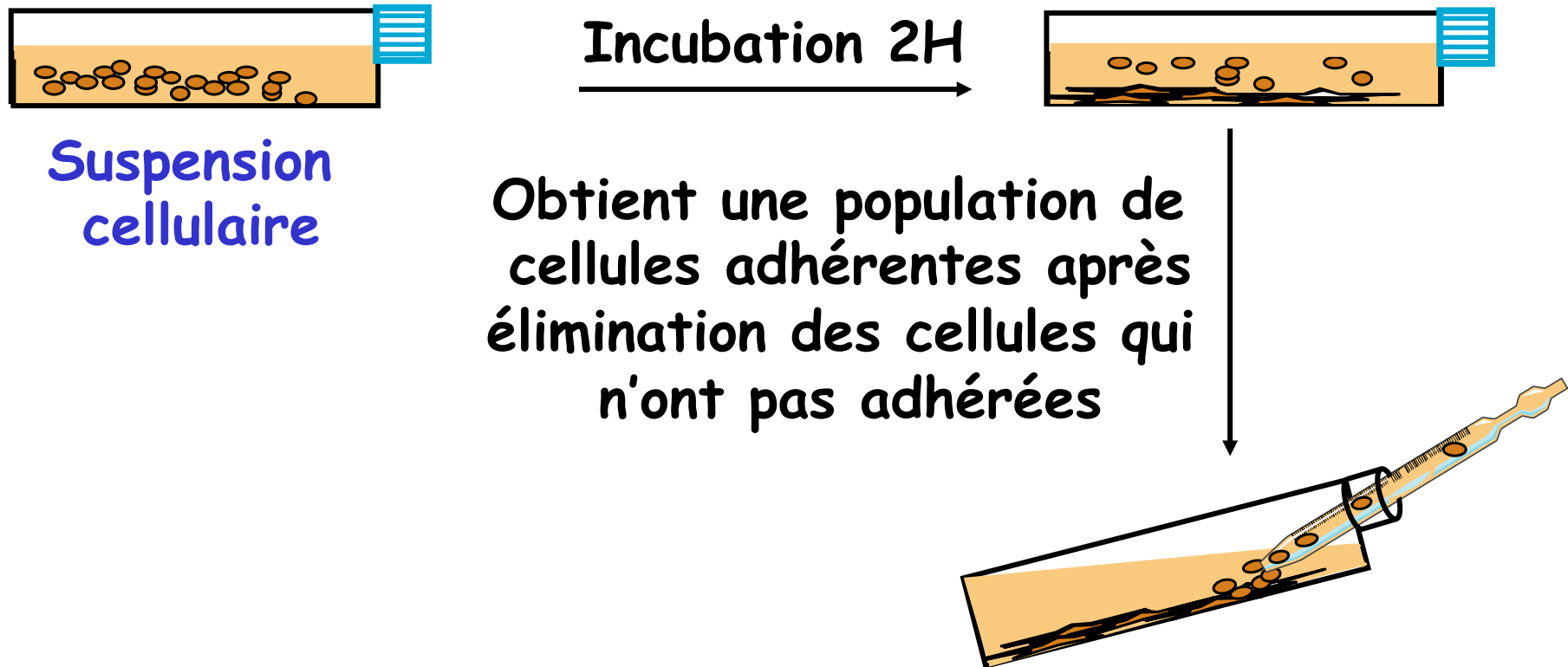
### ➤ *Séparation sur des paramètres physiques*

- gradient de densité : des cellules différentes peuvent avoir des densités différentes

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



- adhérence : certaines types cellulaires adhèrent naturellement à un support

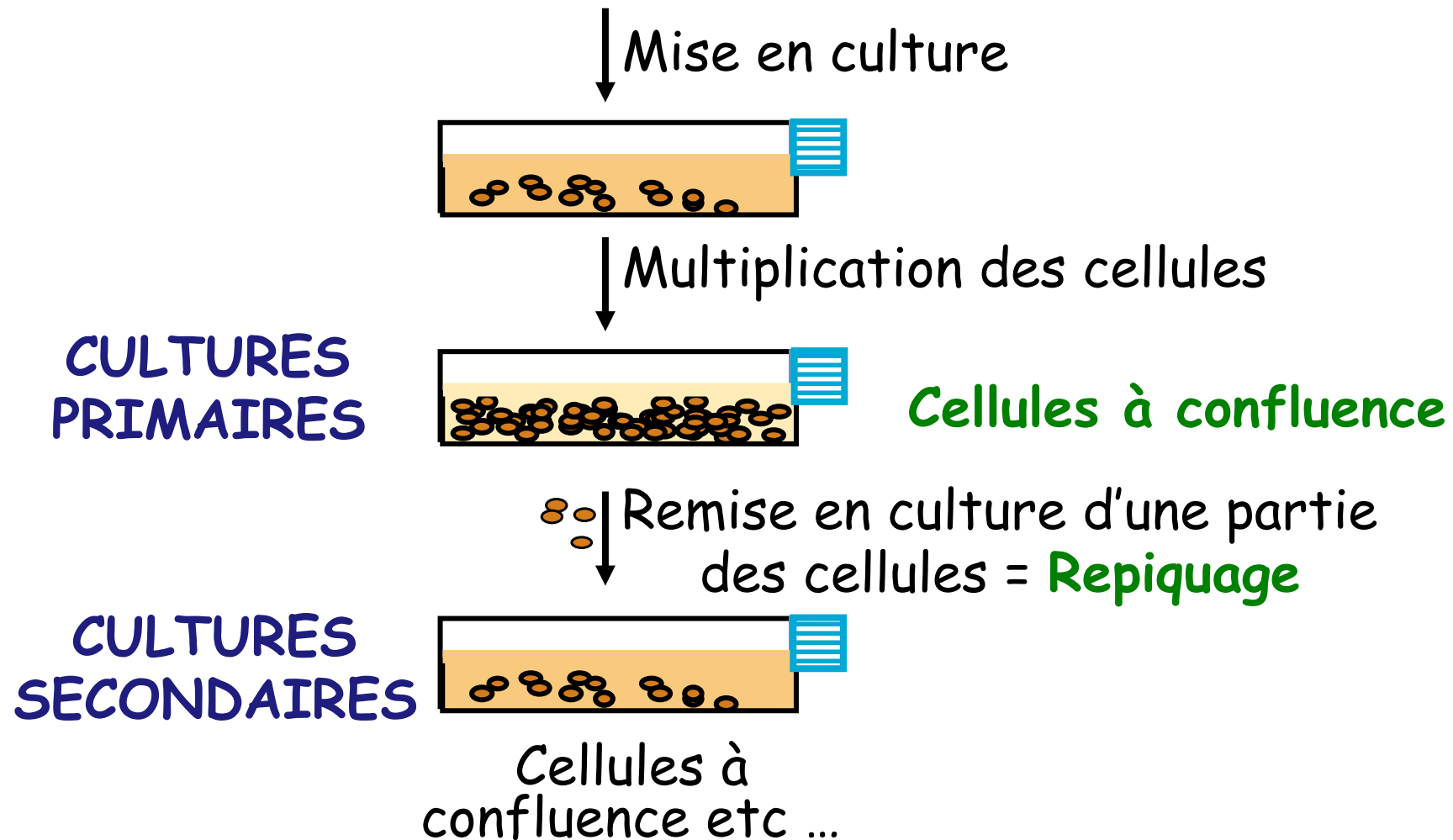


- ❑ *Séparation à l'aide de marqueurs spécifiques*
- ❑ *Enrichissement d'une population à l'aide de facteurs de croissance spécifiques*

## 2 : LES CULTURES SECONDAIRES

*Les cultures secondaires sont dérivées de cultures primaires*

Ex : Cellules circulantes : culture de cellules en suspension



Ex : Cellules organisées en tissus : culture de cellules adhérentes

↓ Mise en culture

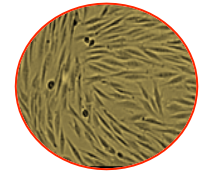


↓ Multiplication des cellules

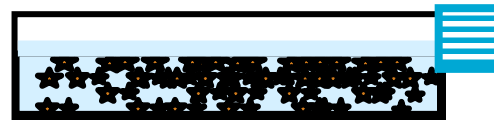
**CULTURES  
PRIMAIRES**



**Cellules à confluence**

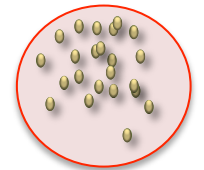


↓ Décollement des cellules



★ ★ ★  
↓ Remise en culture d'une partie  
des cellules = **Repiquage**

**CULTURES  
SECONDAIRES**

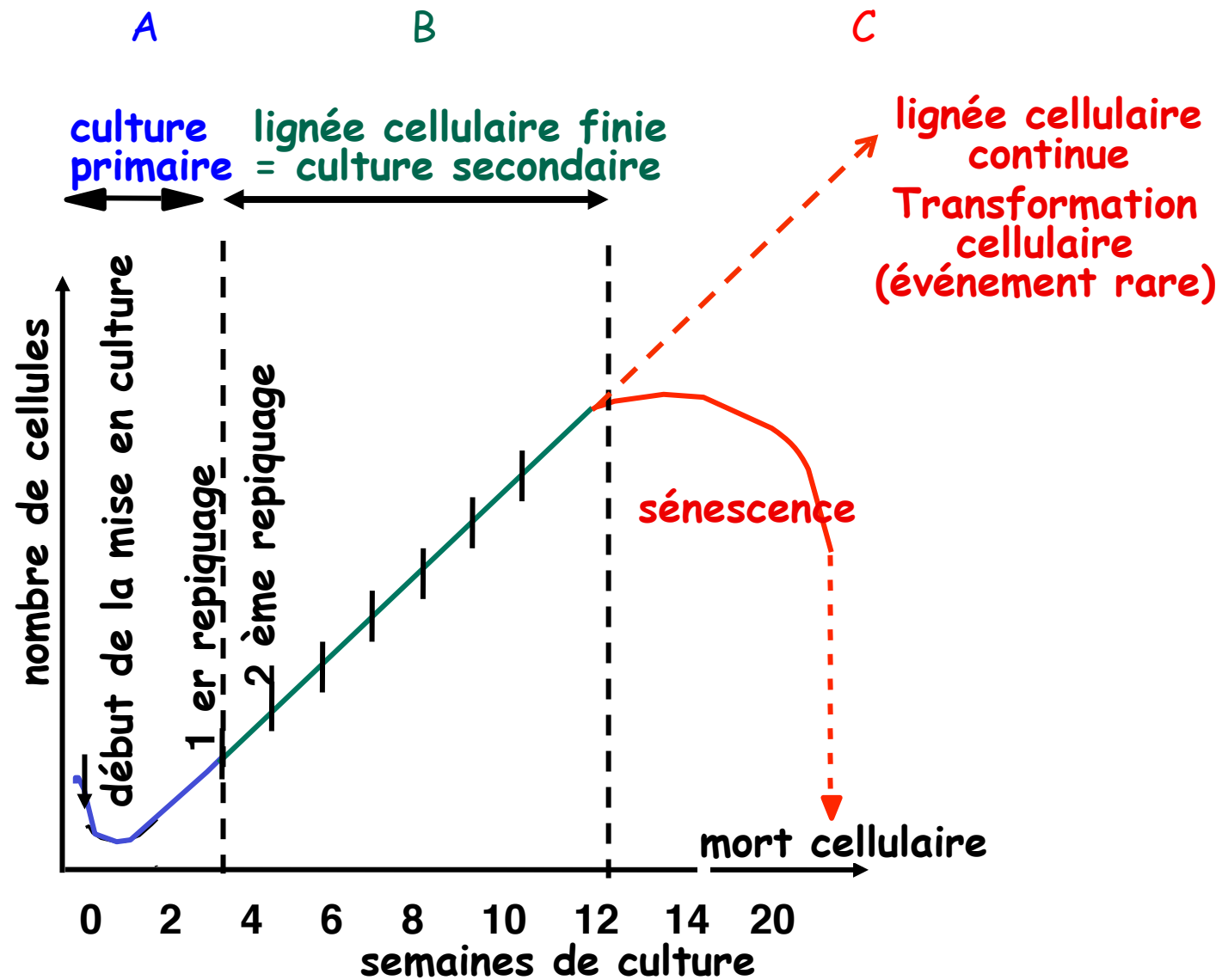


## *D'une manière générale les cultures de cellules évoluent en trois phases*

A : culture primaire ➔ les cellules mettent plusieurs jours pour se multiplier

B : culture secondaire ➔ les cellules se multiplient plus vite (adaptation)

C : la multiplication des cellules ralentie (sénescence) ➔ puis les cellules déclinent (mort cellulaire)



Durée de vie limitée d'où l'intérêt de pérenniser les cellules



## 3 : LES LIGNÉES CELLULAIRES PÉRENNISÉES

### ➤ Quelques caractéristiques

- Cellules qui se divisent indéfiniment
- Pouvoir multiplicatif important
- Peuvent avoir un nombre de chromosomes anormal (souvent hétéroploidie)
- Morphologie souvent différente des cellules normales

Acquisition par les cellules de nouvelles propriétés les rendant immortelles=modifications génétiques

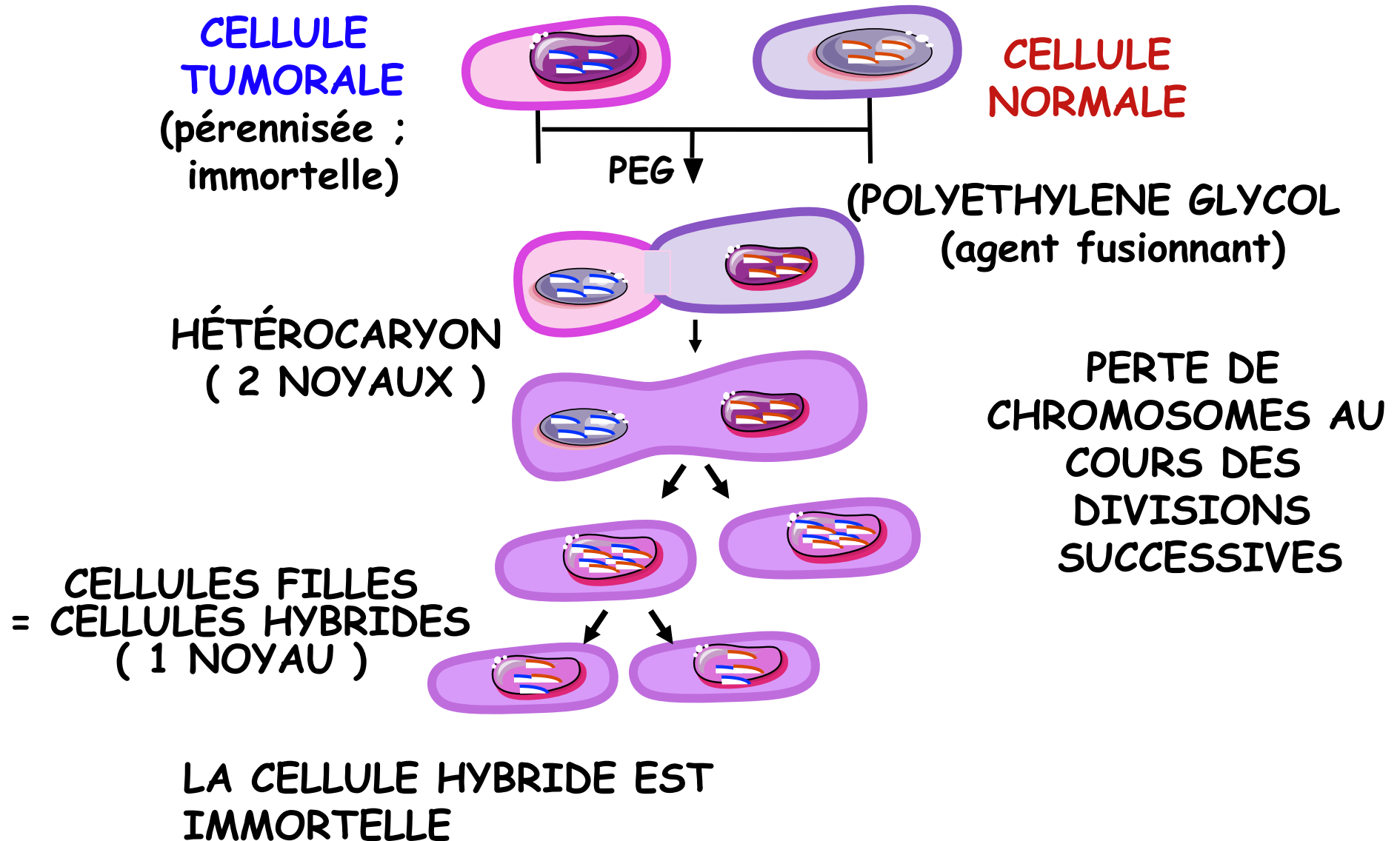
- **Obtention de lignées pérennisées : plusieurs possibilités**
  - événement spontané à partir de cultures primaires (événement rare)
  - à partir d'un prélèvement de tumeur (les cellules tumorales sont déjà pérennisées)
  - par fusion cellulaire (ex : hybridomes)
  - induction par des virus transformants (virus SV40 ou virus EBV), agents chimiques ou physiques

**Cellules différentes mais encore utilisables pour de nombreuses manipulations ➤ gardent leurs spécificités cellulaires**

- **Existe des banques de cellules ex : ATCC (American Type Culture Collection)**

➤ **ex : immortalisation par fusion membranaire**

**Utilise la capacité des membranes cellulaires à fusionner :**



## E : METHODE DE CLONAGE CELLULAIRE

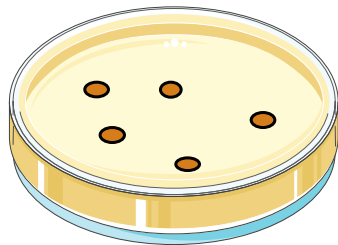
Clone : population cellulaire issue de la division cellulaire, par mitose, d'une cellule unique

Toutes les cellules d'un clone sont identiques

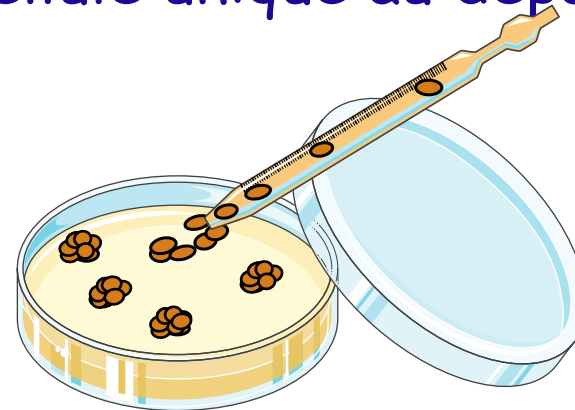
**Existe différentes méthodes pour obtenir des clones :**

➤ clonage par micromanipulation à partir de colonies obtenues en milieu semi solide

Chaque colonie provient d'une cellule unique au départ



plusieurs jours de culture  
en présence de  
facteurs de croissance

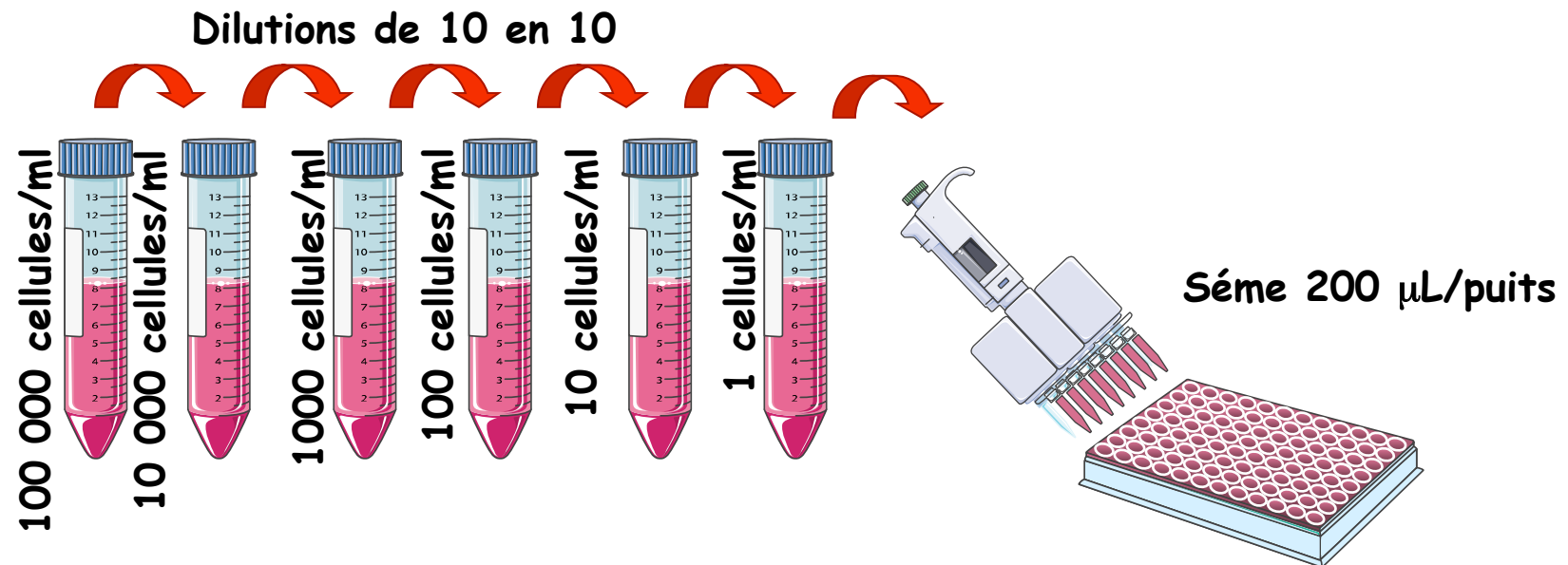


**Repiquage d'une  
colonie = 1 clone**

➤ clonage par dilution limite :

➤ La population cellulaire diluée de manière sériée, afin d'obtenir une concentration cellulaire faible

➤ Pour avoir au départ de la culture une seule cellule par puits dans une plaque de culture




➤ clonage par tri cellulaire : cytomètre de flux

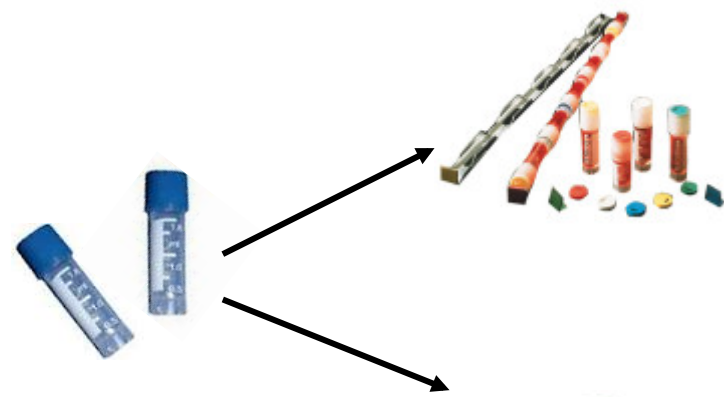
# F : CRYOCONSERVATION DES CELLULES

## ➤ Congélation

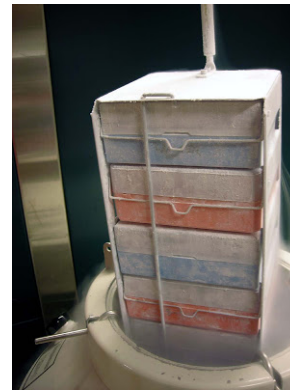
Le but est de maintenir intact la cellule et ses organites tout en arrêtant net son activité biologique pour une conservation à long terme

- ❖ Utilise des agents cryoprotecteurs
  - empêche la formation de cristaux à l'intérieure de la cellule :  
ex : DMSO (= Diméthylsulfoxide), glycérol
- ❖ Permet de descendre rapidement la température à  $-80^{\circ}\text{C}$
- ❖ Les cellules sont conservées dans des cryotubes 
- ❖ Conservation pendant plusieurs années dans de l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ )

❖ Conservation pendant plusieurs années dans de l'azote liquide (-196°C)



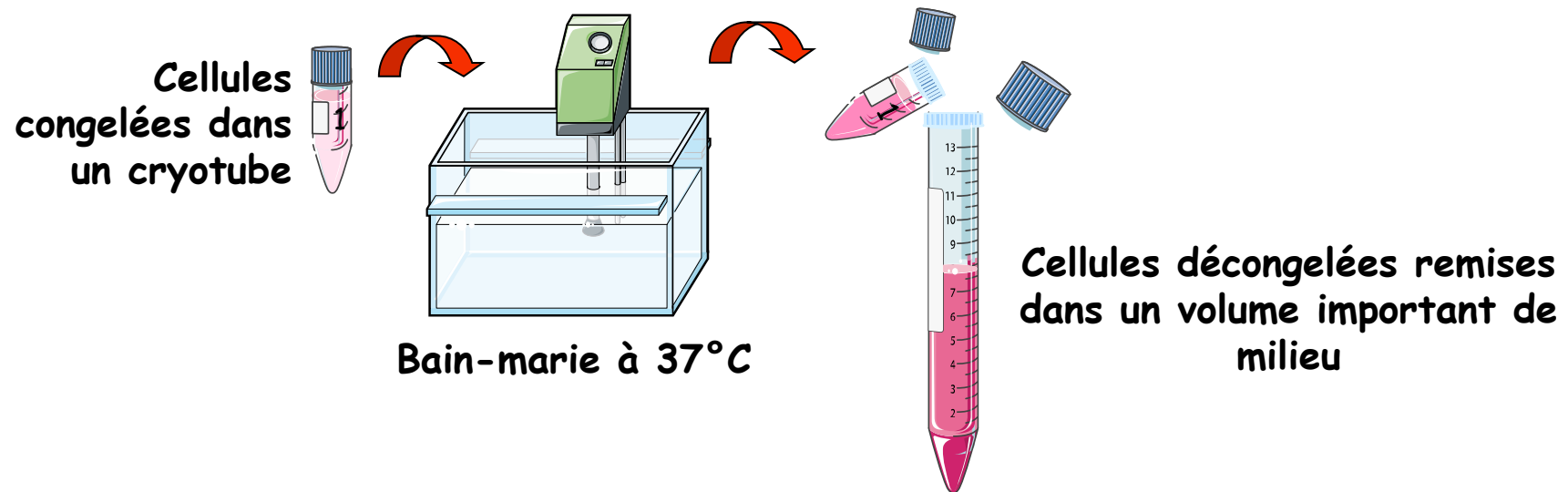
**cryotubes**



**Container à azote**

## ➤ Décongélation

Obtenir après décongélation  
une population cellulaire intacte avec un faible  
pourcentage de mort cellulaire



- ❖ Laisser le moins longtemps possible les cellules en présence de l'agent cryoprotecteur ➔ toxique à température ambiante



## G : TRANSFECTION DE GÈNES DANS DES CELLULES EUCARYOTES

- ✧ La transfection c'est l'introduction d'un gène (ADN) étranger dans une cellule
- ✧ La transfection a pour but de faire exprimer à la cellule ce gène et par conséquent la protéine

- ✧ Pour transférer des gènes dans les cellules eucaryotes on utilise soit des plasmides soit des virus modifiés ➔ des vecteurs
- ✧ Le vecteur permettra l'expression du gène dans le noyau et aussi si nécessaire d'incorporer ce gène dans le génome de la cellule transfectée
- ✧ Pour transférer un gène dans une cellule eucaryote nous avons besoin :
  - D'un vecteur contenant le gène d'intérêt
  - D'une cellule hôte
  - D'une technique permettant de faire entrer le vecteur dans la cellule (passage de la bicouche lipidique et de la double membrane du noyau)

## 1 : LES PLASMIDES

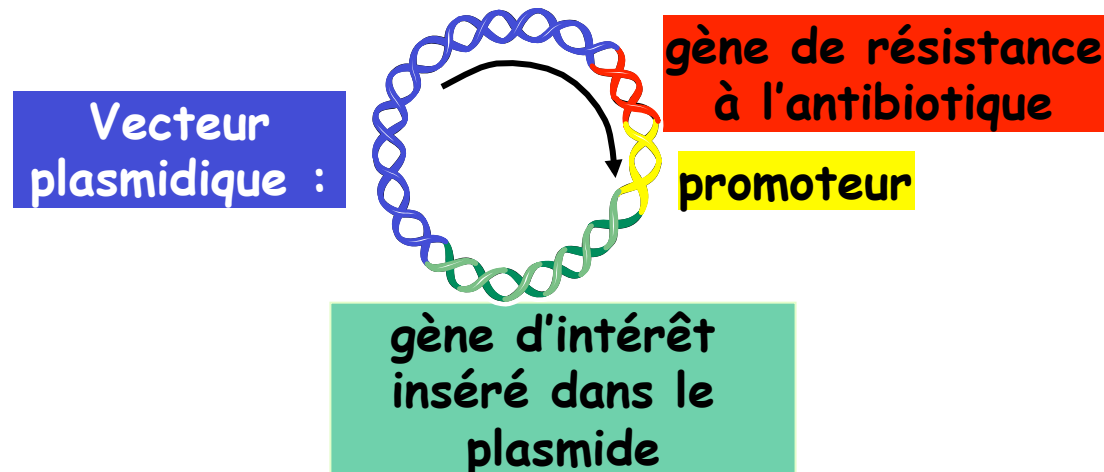
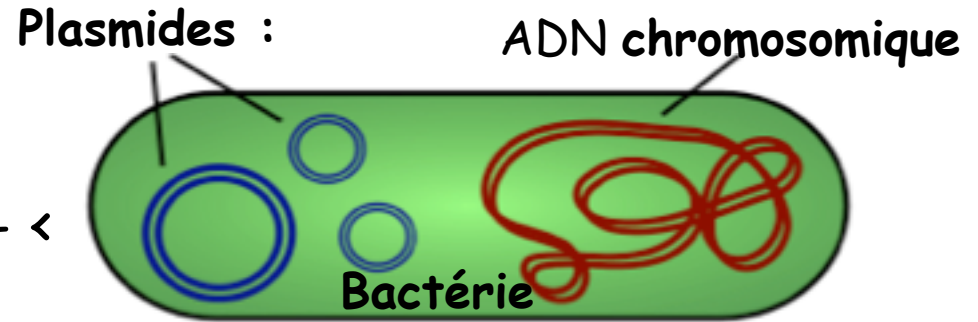
✓ Plasmides :

- ADN bicaténaire- circulaire- <
- Réplication épisomale

- Plusieurs centaines de plasmides par cellule de bactérie, indépendant du génome

✓ Plasmide modifié ou vecteur plasmidique :

- Sites d'insertion pour insérer le gène d'intérêt
- Présence d'un gène de résistance à un antibiotique (facultatif)



## 2 : LES DIFFÉRENTES MÉTHODES POUR FAIRE ENTRER UN GÈNE DANS UNE CELLULE EUCARYOTE

- GRÂCE À UN PLASMIDE : FORCE LE SYSTÈME POUR FAIRE RENTRER LE PLASMIDE DANS LA CELLULE

1. INFECTION PAR UN VIRUS MODIFIÉ

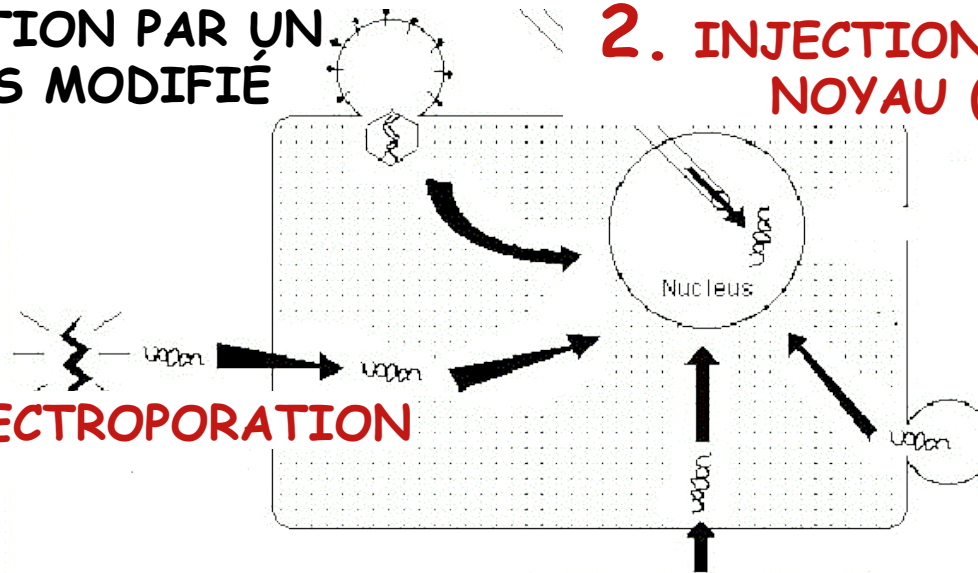
2. INJECTION DIRECTE DANS LE NOYAU (MICROPIPETTE)

6. PAR ÉLECTROPORATION

3. FUSION PAR DES LIPOSOMES

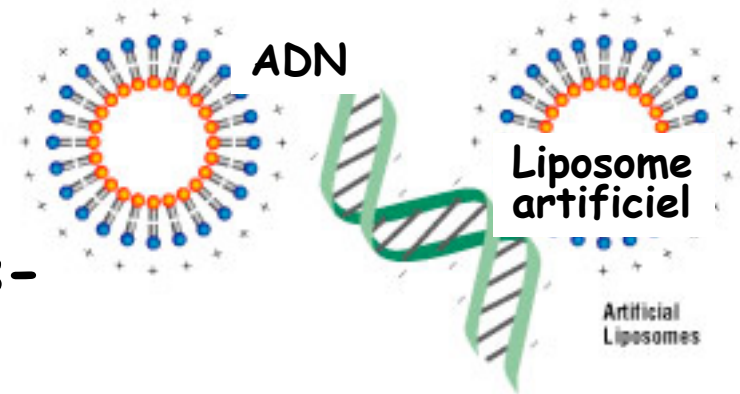
4. PRÉCIPITATION AU PHOSPHATE DE CALCIUM ou

5. COMPLEXE AVEC LE DEAE DEXTRAN



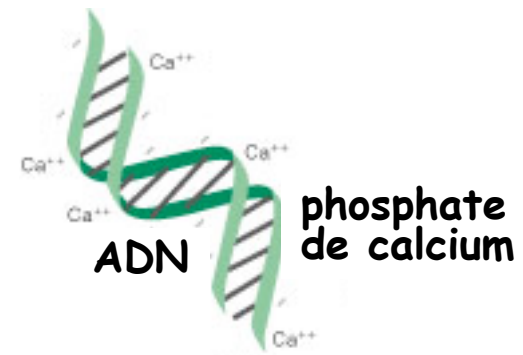
### 3. FUSION PAR DES LIPOSOMES

Lipides cationiques : utilisés pour créer des membranes artificielles sous forme de vésicules : liposomes. Ces membranes se fixent sur le plasmide et les **complexes plasmides-liposomes adhèrent et fusionnent** avec les charges négatives de la membrane plasmique.



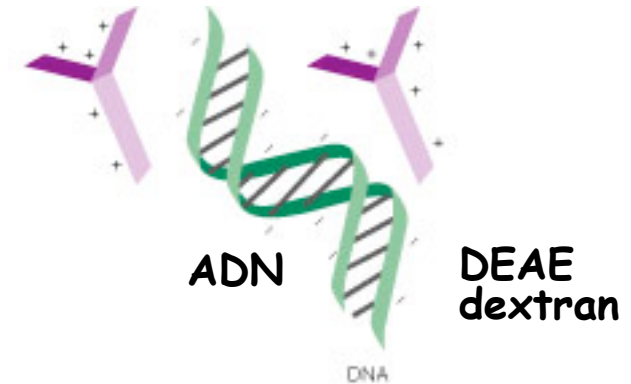
### 4. PRÉCIPITATION AU PHOSPHATE DE CALCIUM

Le phosphate de calcium forme un précipité avec le plasmide, s'attache à la membrane cellulaire et le **précipité est absorbé par endocytose**.



## 5. COMPLEXE AVEC LE DEAE DEXTRAN

Le DEAE dextran par ses charges positives se fixe aux charges négatives du plasmide et l'agrégat formé se fixe aux charges négatives de la membrane plasmique. **Entrée dans la cellule par endocytose.**



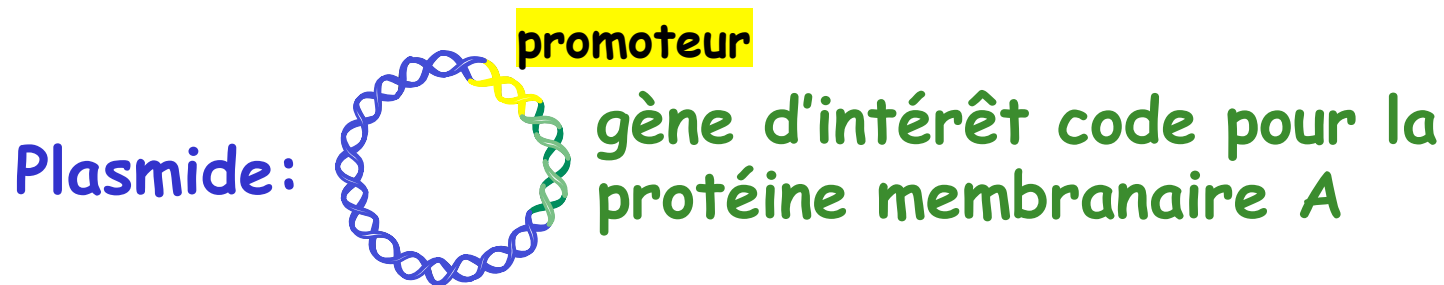
## 6. PAR ÉLECTROPORATION

Application d'un bref pulse électrique à haut voltage créant temporairement **des pores** dans la membrane plasmique de quelques nanomètres de diamètre. **Entrée du plasmide directement dans le cytoplasme.**

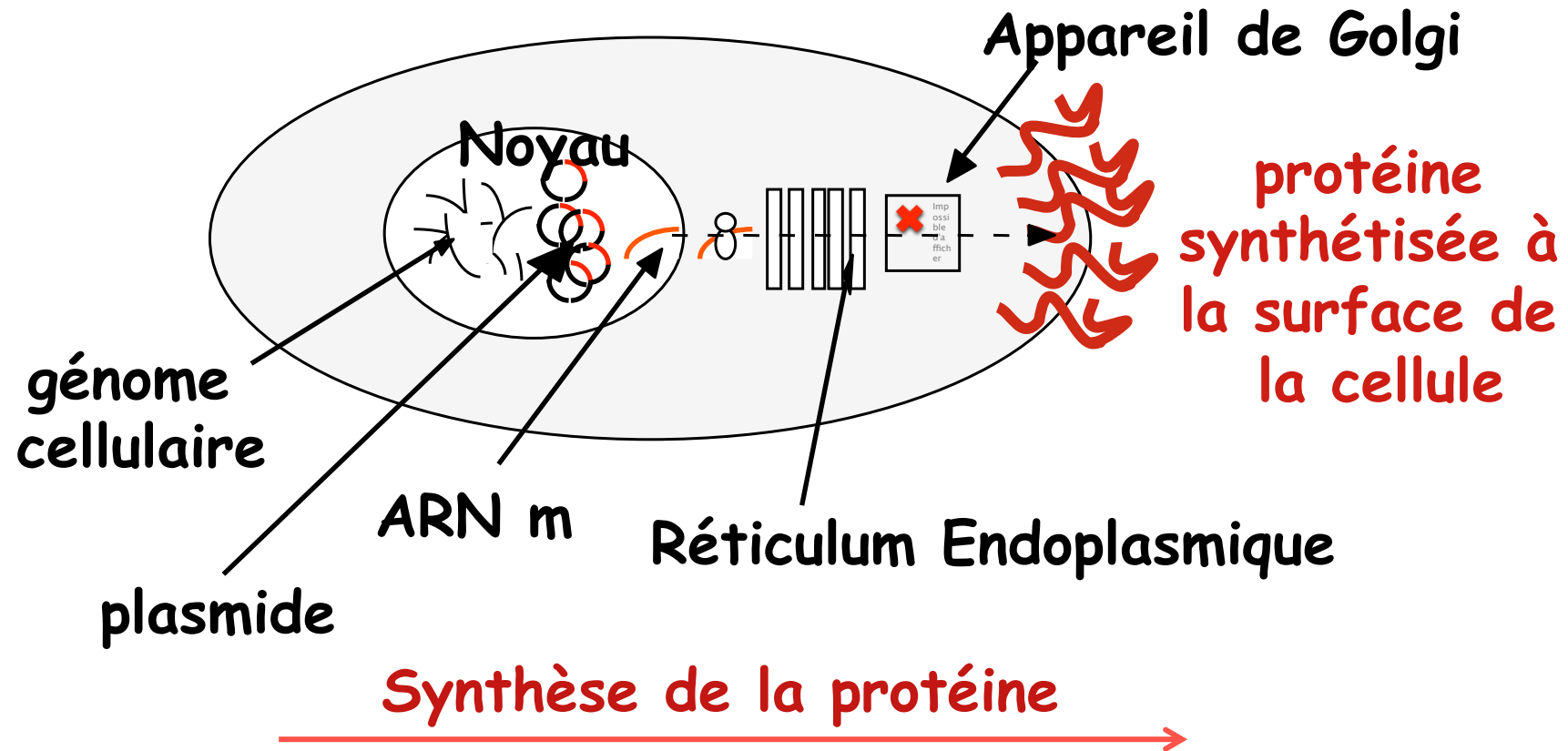
### 3 : TRANSFECTION TRANSITOIRE -TRANSFECTION STABLE

#### ➤ TRANSFECTION TRANSITOIRE

- ✓ Exemple : transfection d'une cellule avec un gène qui code pour une protéine membranaire A.
- ✓ La protéine A est absente de la cellule normale
- ✓ Utilisation d'un plasmide dans lequel a été inséré le gène d'intérêt



# Cellule eucaryote transfectée avec le plasmide :



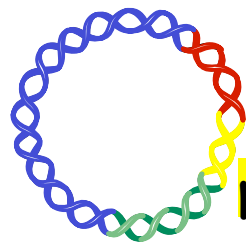
Expression de la protéine après 24-48 heures  
perte du plasmide pendant les divisions cellulaires  
• perte de l'expression de la protéine après 72-96 heures



## ➤ TRANSFECTION STABLE

- ✓ Exemple : transfection d'une cellule avec un gène qui code pour une protéine membranaire A.
- ✓ La protéine A est absente de la cellule normale
- ✓ Utilisation d'un plasmide dans lequel a été inséré le gène d'intérêt, et un gène de résistance à un antibiotique

Plasmide:

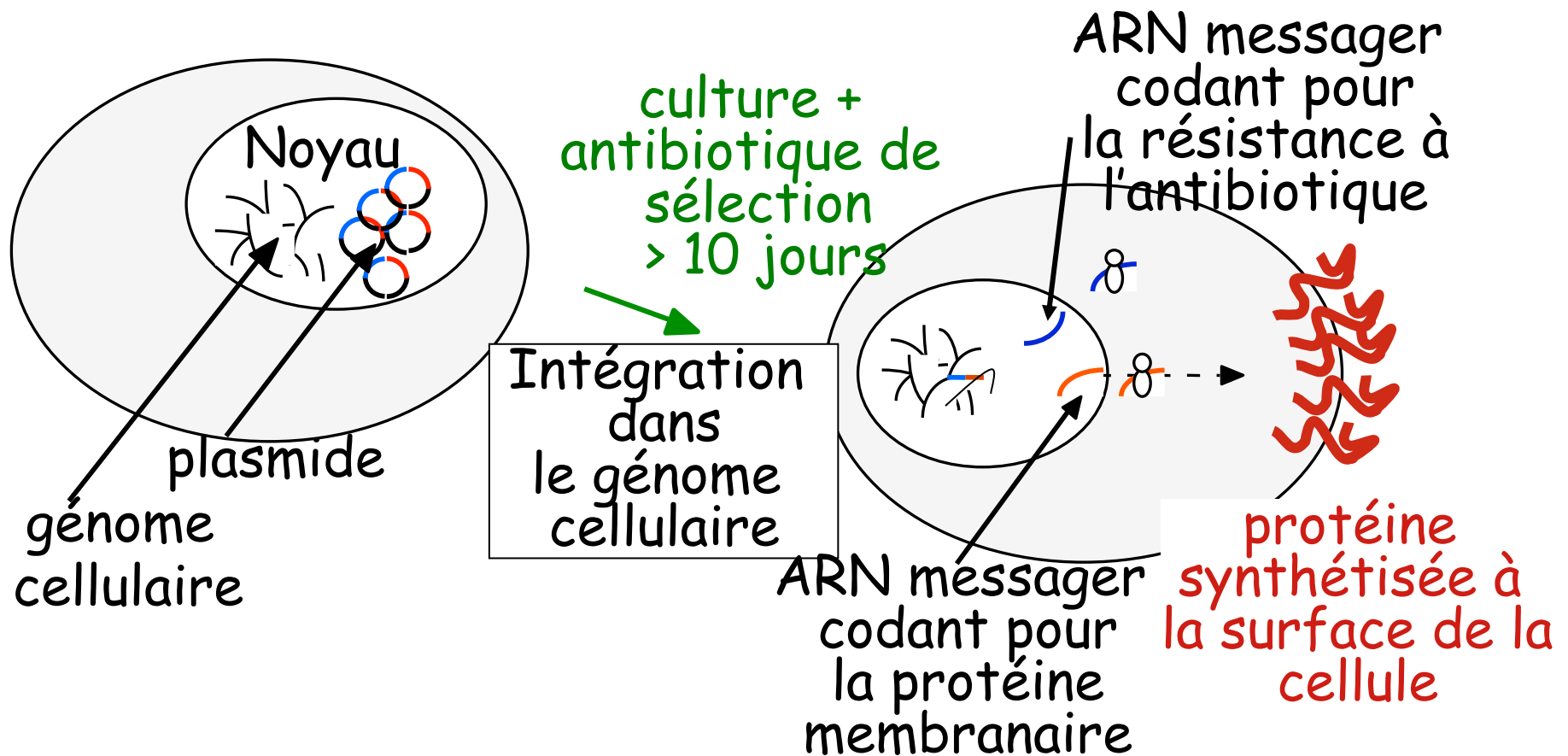


gène de résistance : code pour une protéine permettant de résister (survivre) en présence d'antibiotique

promoteur

gène d'intérêt : code pour la protéine membranaire A

# Cellule eucaryote transfectée avec le plasmide :

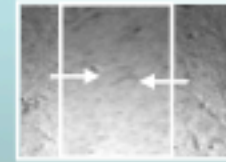


Mort des cellules n'ayant pas incorporé le gène de résistance à l'antibiotique. Expression permanente de la protéine dans la cellule → la protéine fait partie de la cellule  
→ les cellules issues de cette cellule transfectée exprimeront la protéine

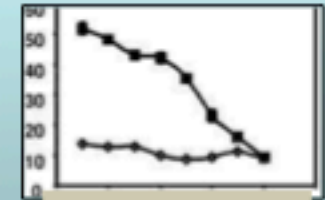
**Fécondation  
in vitro**



**Tests fonctionnels**

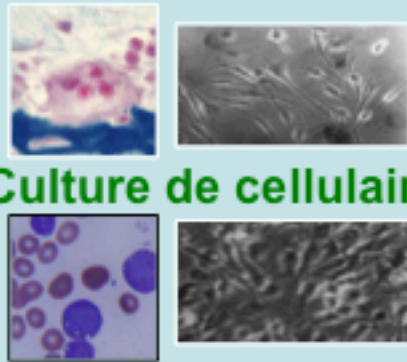


Migration

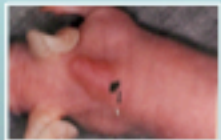


Prolifération

**Culture de cellulaire**



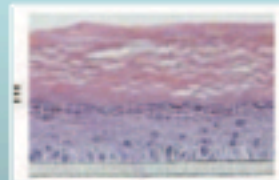
**Modèles  
in vivo**



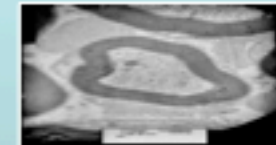
**Microdissection  
laser**



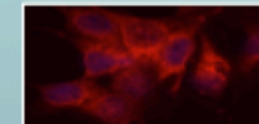
**Cultures en 3D,  
peau reconstruite**



**Analyses  
cellulaires**



Microscopie  
électronique



Microscopie à  
fluorescence