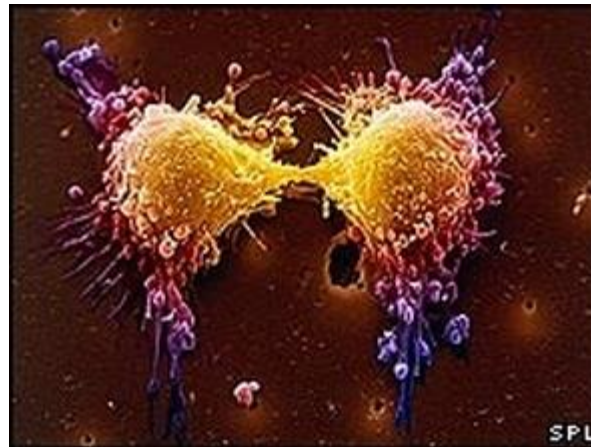


CHOIX D'UN MODELE : LES CELLULES ANIMALES EN CULTURE



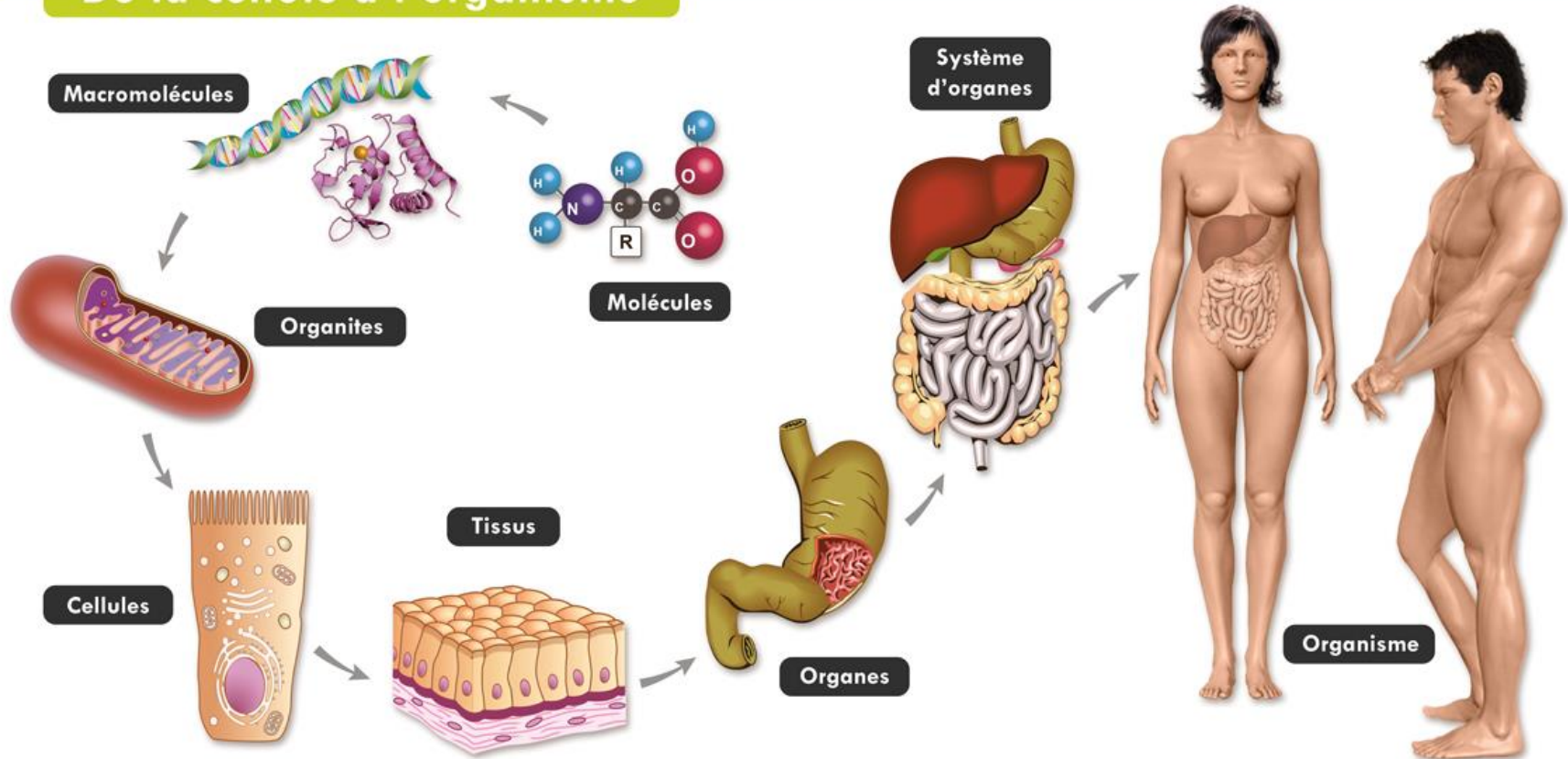
Sophie PINEL
CRAN UMR 7039



sophie.pinel@univ-lorraine.fr

(≠ biologie végétale, microbiologie)

De la cellule à l'organisme



Réalisation : Université de Bordeaux - Département Technologies de l'Informatique et de la Communication

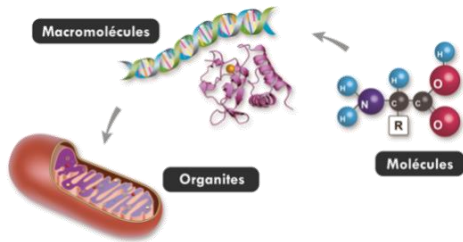


Différents degrés de complexité modélisés



Fractions cellulaires isolées

(Fractions subcellulaires, macromolécules)

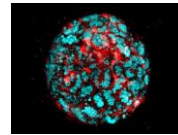
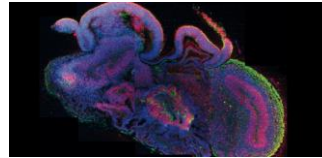


Cellules

Cellules

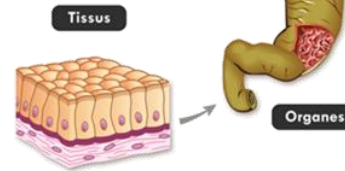
Plus petite unité biologique
structurale et fonctionnelle
capable de se reproduire de
façon autonome

Homogénéité,
contrôle des propriétés



Organoïdes / Tumoroïdes

Tissus Organe isolé



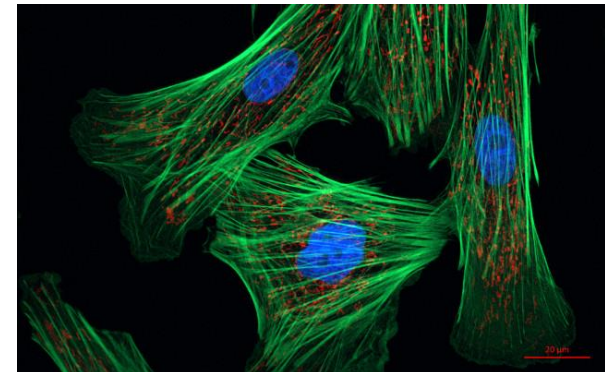
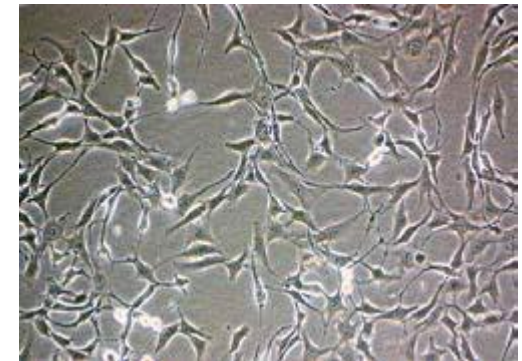
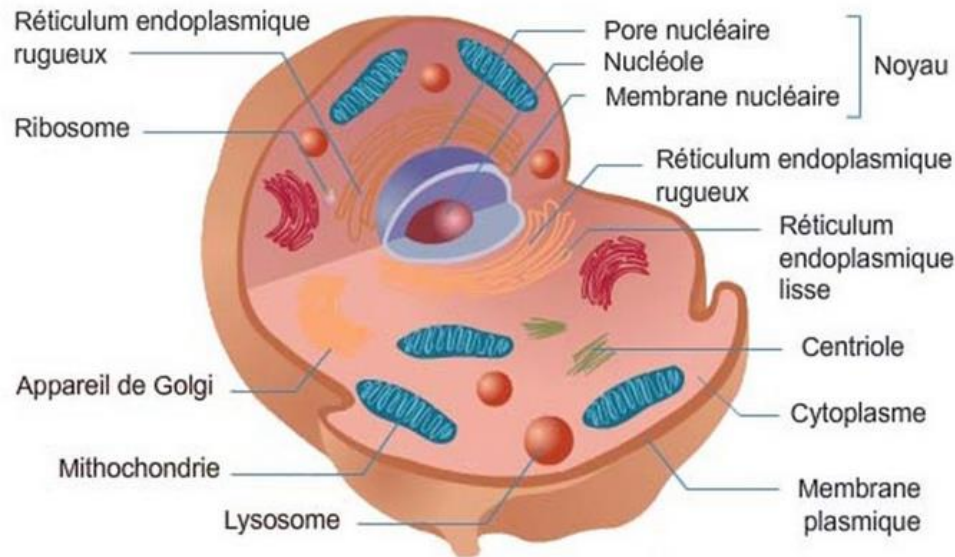
Organisme entier

Phénomènes globaux
Relations intersystèmes
Hétérogénéité inter-individus



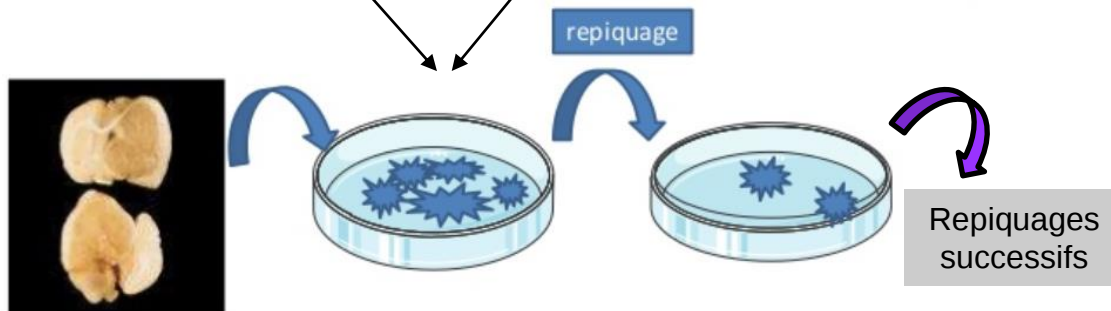
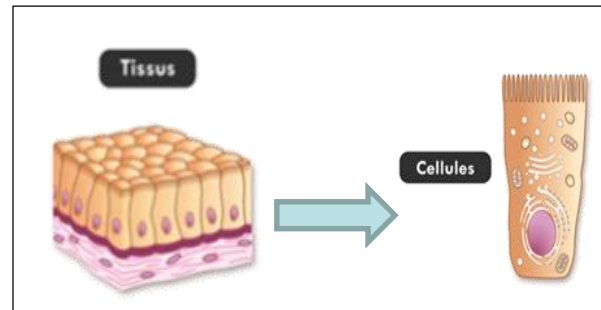
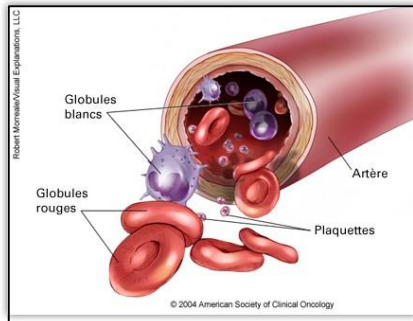
La cellule animale

- plus petite unité vivante autonome;
- entretient des relations avec son milieu externe où elle prélève ses éléments nutritifs;
- utilise ces éléments nutritifs pour croître, se régénérer et se multiplier



En biologie, la culture cellulaire désigne un ensemble de techniques utilisées pour faire croître des cellules en dehors de leur milieu d'origine (ex: organisme) dans un but d'expérimentations scientifiques ou de fécondation in vitro.

✓ Isolement et purification à partir d'un liquide ou d'un tissu biologique



→ **Lignées établies**
commercialisables après
caractérisations

✓ Achat auprès d'un organisme certifié

ATCC[®]
American Type Culture Collection



Monoclonal avec
caractéristiques définies,
qualité contrôlée mais
onéreux



Echanges entre laboratoires
Qualité non garantie : risques
de contamination ++



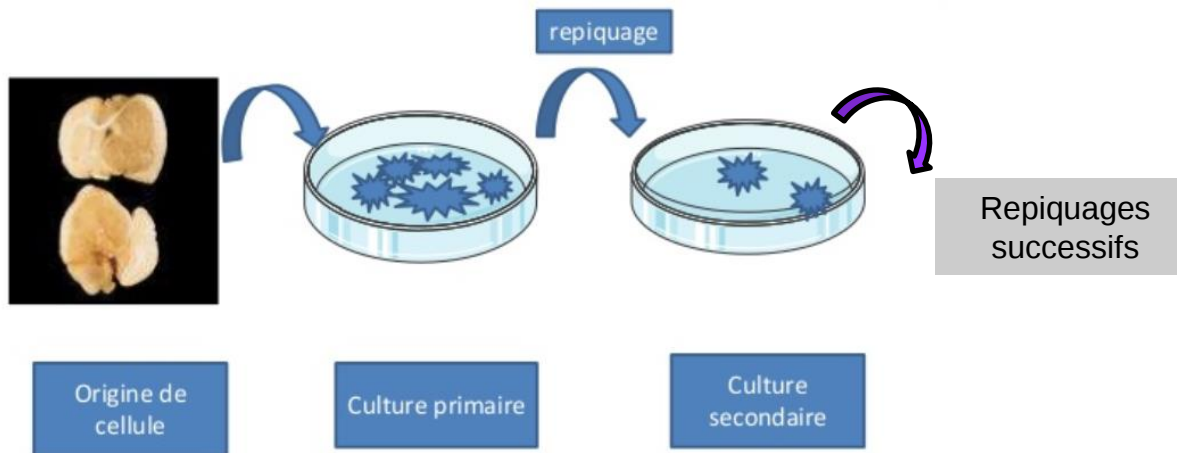
1. CULTURES PRIMAIRES – CULTURES SECONDAIRES

Cultures primaires

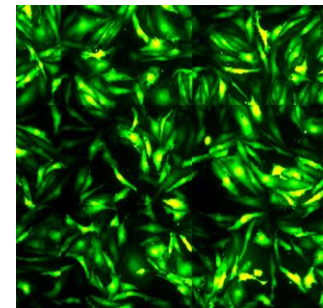
Cellules qui proviennent directement d'un liquide ou d'un tissu biologique, d'un organe, d'une tumeur ou d'un embryon et qui sont mises en culture : *on travaille directement dessus !*

Cultures secondaires

Cellules obtenues par repiquage / ré-ensemencement de lignées établies



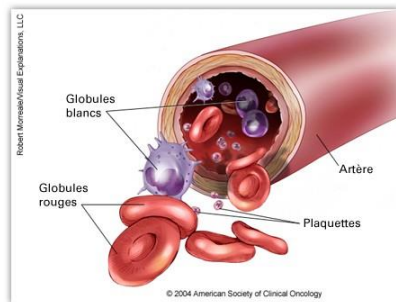
Expression de la GFP



Les cultures secondaires peuvent être génétiquement modifiées afin qu'elles expriment un phénotype particulier.

2. OBTENTION DES CULTURES PRIMAIRES & SECONDAIRES

➤ Isolement à partir d'un liquide biologique ➡ Cellules circulantes



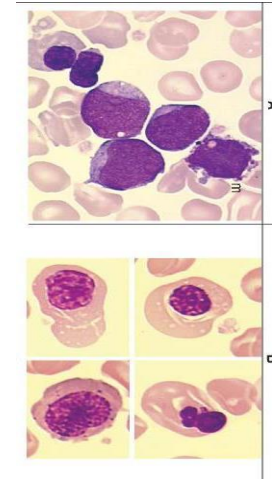
Exemples :

Sang : lymphocytes, cellules souches, cellules leucémiques

Liquide céphalo-rachidien (LCR)

Liquide pleural, liquide d'ascite : cellules tumorales

Urine...



Prélèvement simple : prise de sang, ponction lombaire, ...

Isolement et Purification : pression de sélection, centrifugation sur gradient de densité, ou trieur de cellules

Mise en culture => Cellules en suspension dans le milieu de culture (avec ou sans agitation)

➡ Cellules indépendantes vis-à-vis de l'ancrage

Cellules capables de survivre et de se multiplier en suspension

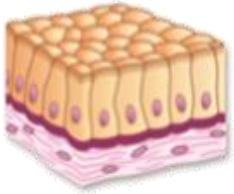


Repiquage : Quand la concentration cellulaire est trop élevée, on divise et on dilue

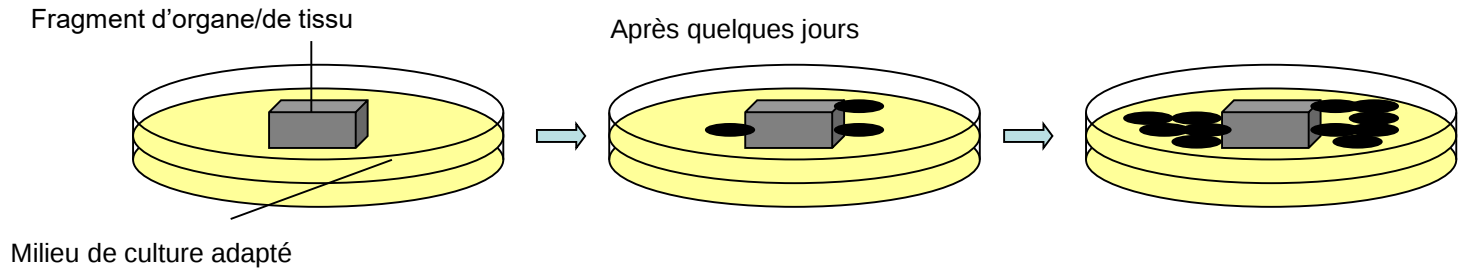
Tissus

➤ Isolement à partir d'un organe ou d'un tissu ➡ Cellules adhérentes

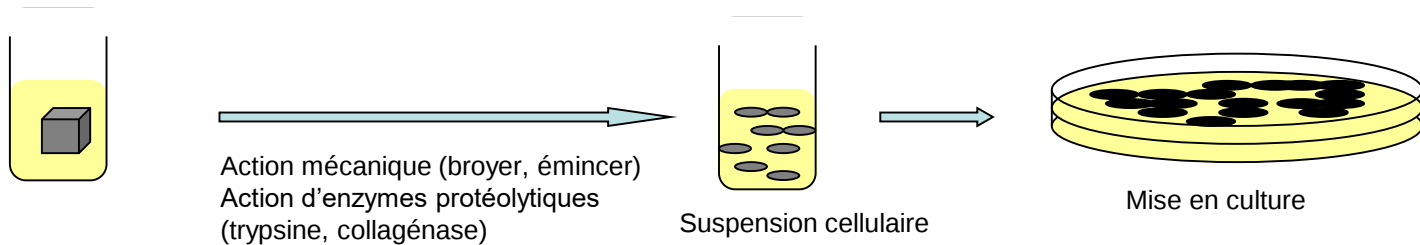
Difficulté variable selon le tissu d'origine (tissus embryonnaires << cerveaux adultes)



Culture d'explants (ex: culture de peau)



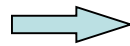
Dissociation mécanique et enzymatique



Prélèvements : biopsie, pièce opératoire...

Isolement et Purification : complexe +++

Plusieurs types cellulaires
(populations dominantes)



Purifier pour obtenir un
système monoclonal

Méthodes de clonage

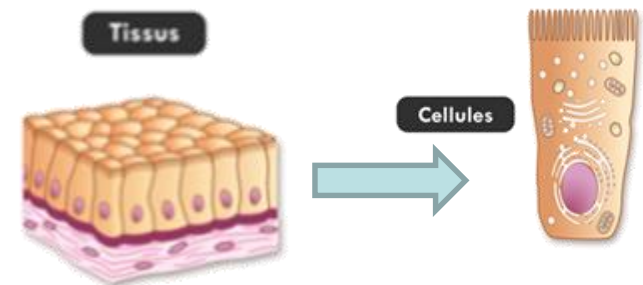
Méthodes de séparation
physique

(centrifugation sur gradient de
densité, cytométrie de flux,
séparation par billes magnétiques)

Mise en culture => Cellules adhérentes

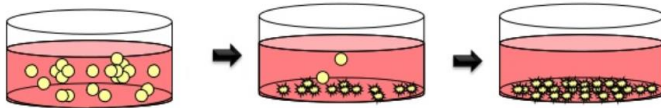
➡ Dépendance vis-à-vis de l'ancrage

= Nécessité d'être attachées entre elles et/ou ancrées sur un support adéquat pour survivre et se multiplier



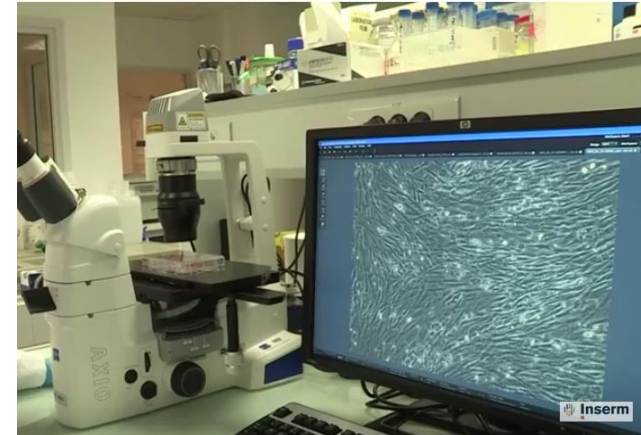
Cultures de cellules en monocouche (2D)

Ensemencement dans des boîtes de culture : les cellules adhèrent au fond, puis se divisent, se placent les unes à côté des autres jusqu'à former un tapis cellulaire.



→ Boîte de Pétri, Flacon de culture, Plaques multipuits

Repiquage : Quand le tapis cellulaire est proche de la confluence, TRYPSINATION



Cultures tridimensionnelles (3D) = sphères, organoïdes, tumoroïdes

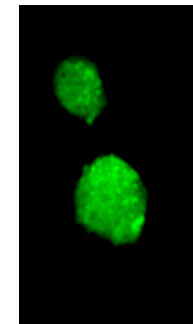
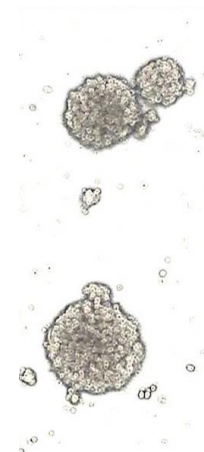
Cellules mises en culture en suspension dans le milieu

Et

(i) maintenues sous agitation lente

ou (ii) maintenues sur support anti-adhésion (ex : agarose)

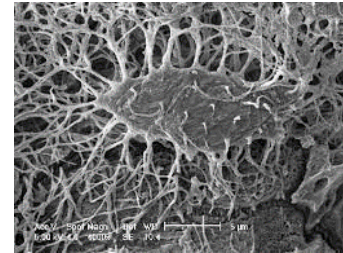
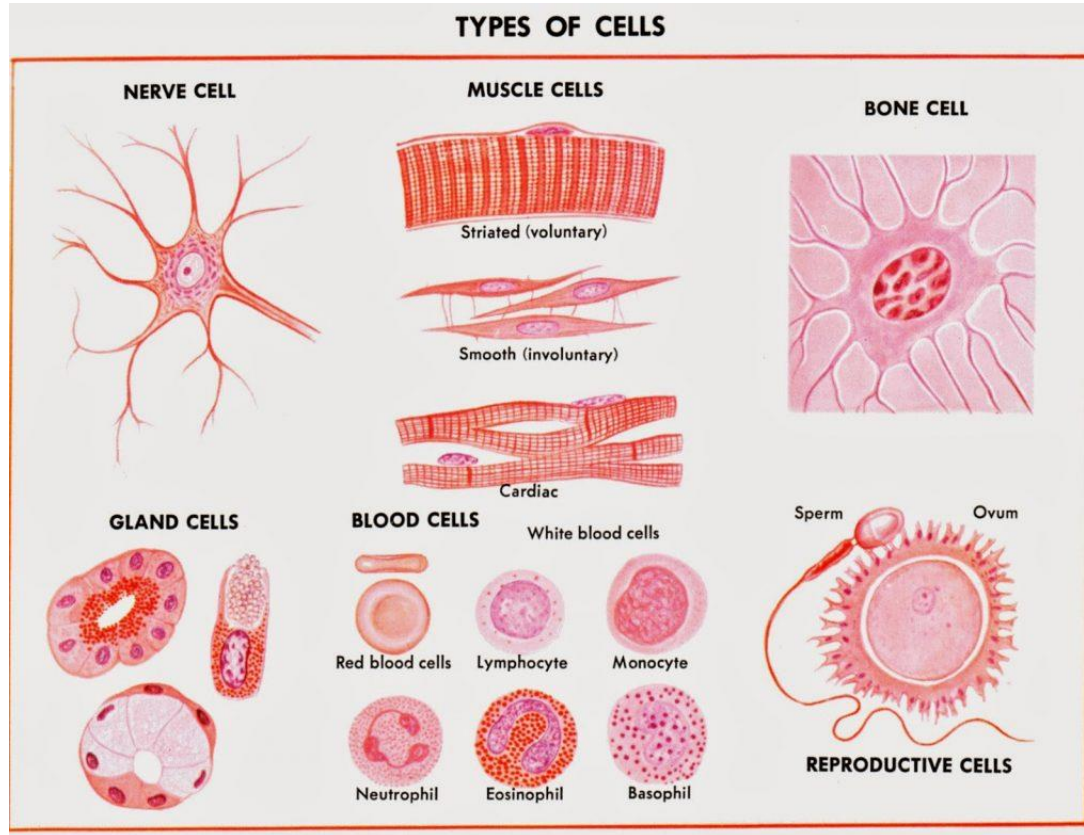
afin de favoriser l'accrochage des cellules entre elles :
formation **d'amas sphériques** au sein desquels les cellules se divisent.



1. Cellules différenciées présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles proches du système dont elles dérivent



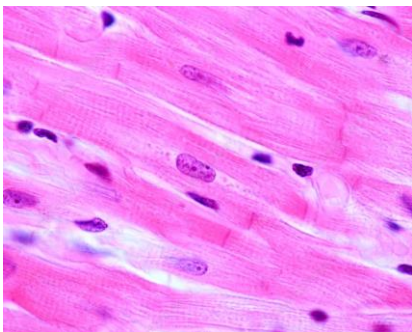
Neurone



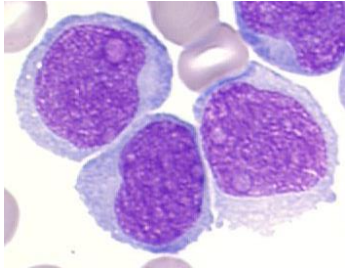
Ostéocyte



Ovule



Cardiomyocyte

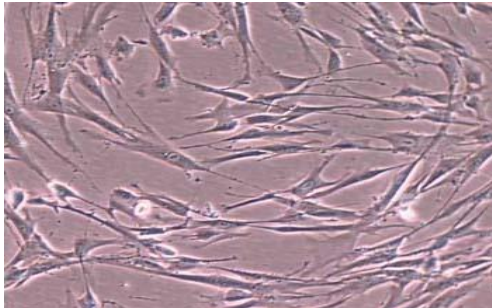
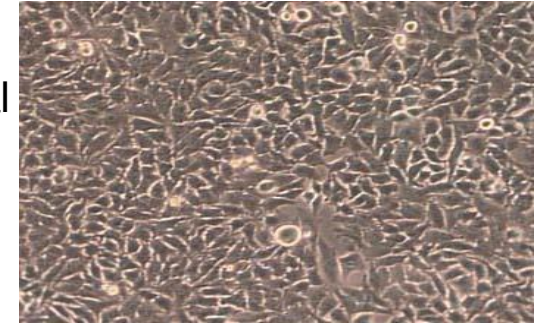


Cellules de type lymphoblastique

En suspension,
forme sphérique

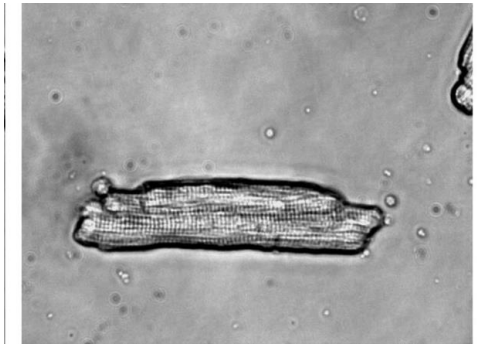
Cellules de type épithélial

Ancrage indispensable,
polygonales, et aplaties,
très serrées



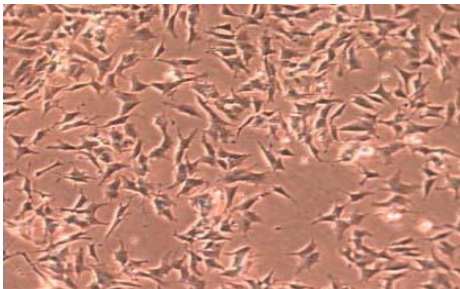
Cellules de type fibroblastique

Ancrage indispensable,
allongées et bipolaires,
filaments



Cardiomyocytes (cellules cardiaques)

Ancrage indispensables,
un corps rectangulaire
strié

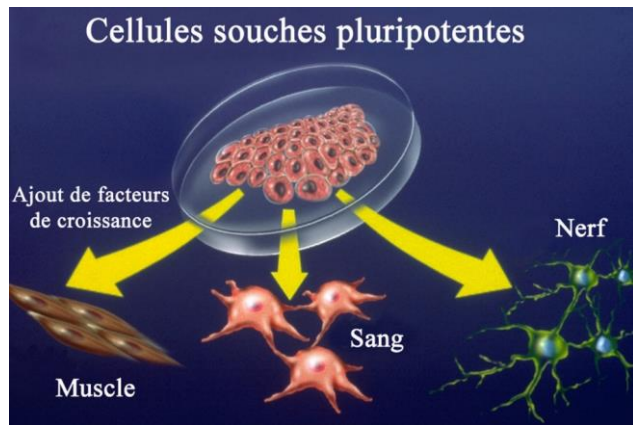


Cellules de type neuronal

Ancrage indispensable,
un corps central et
départ de dendrites

2. Cellules souches

Cellules indifférenciées, capables de s'autorenouveler, de se multiplier à l'infini en culture et de se différencier en d'autres types cellulaires spécialisés



Selon des protocoles de culture adaptés, on cherche à conserver leurs propriétés de pluripotence (cellules indifférenciées) ou à induire une différenciation contrôlée

Cellules souches totipotentes cellules issues d'un embryon (murin) jusqu'au 4^{ème} jour après fécondation et capables, après différenciation, de reconstituer un organisme entier

Cellules souches pluripotentes : cellules issues d'un embryon (murin) au stade blastocyste (5-7j après fécondation) et capables, après différenciation, de reconstituer toutes les cellules de l'organisme sauf quelques-unes

Cellules souches multipotentes capables, après différenciation, de reconstituer différents types de cellules appartenant tous à un lignage spécifique

Ex : cellules souches hématopoïétiques, cellules souches neurales, cellules souches mésenchymateuses, etc.

Cellules pluripotentes induites (iPS) cellules différenciées adultes que l'on reprogramme pour redonner des cellules souches pluripotentes

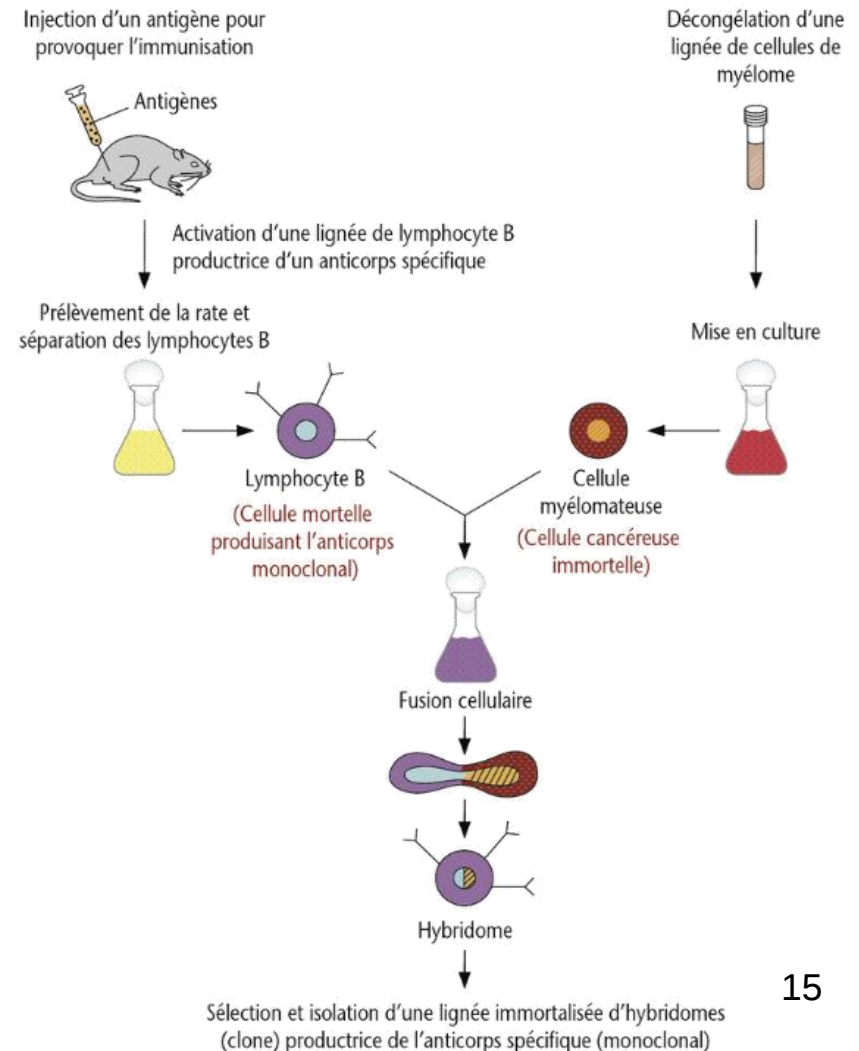
➡ Etudes du développement embryonnaire, thérapie cellulaire, médecine régénérative +/- clonage

3. Hybridomes

Cellules hybrides obtenues par fusion de deux cellules appartenant à des types différents mais apparentés pour combiner les propriétés des 2 types cellulaires

Ex : Lymphocyte B issu de la rate capable de produire un anticorps défini
+
Cellules de myélome se divisant très rapidement et possédant toute la machinerie pour produire des anticorps mais ne l'utilisant pas
=
Hybridome capable de produire un très grande quantité de l'anticorps désiré

⇒ Intérêt industriel, diagnostique et clinique

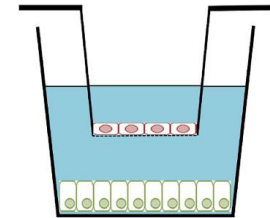
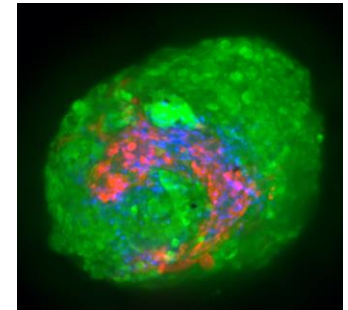


4. Co-cultures

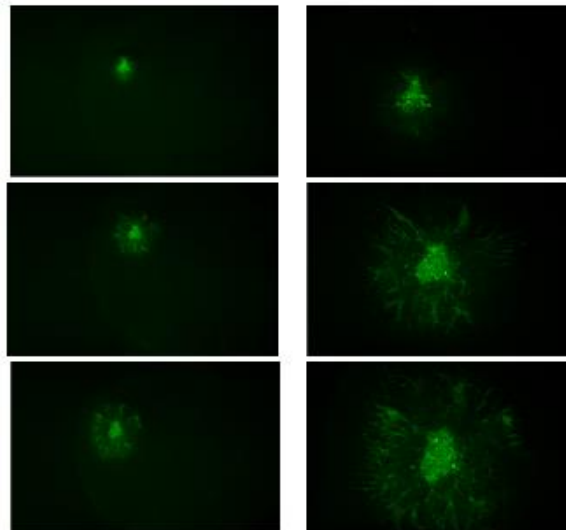
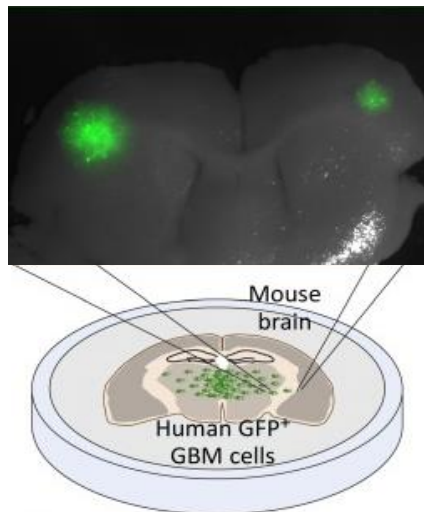
Mise en culture de différents sous-types cellulaires afin de prendre en compte la complexité des interactions au sein d'un tissu.

Interactions directes : toutes les sous-populations sont dans le même compartiment. ➡ *Organoïdes, tumoroïdes*

Interactions indirectes : les sous-populations sont mises en culture dans des compartiments séparés.



5. Cultures organotypiques



Exemple :
Coupe de cerveau de souris dans lequel on a implanté un sphéroïde U87-GFP

1. Les différentes phases de la croissance d'une culture de cellules adhérentes en monocouche

ENSEMENCEMENT



repiquage / ré-ensemencement
des cultures cellulaires



Phase de latence

*Phase de croissance
exponentielle*

*Phase de
ralentissement*

Phase stationnaire

Phase de déclin.



~ Confluence



1

2

3

4

5

2. Cultures finies – Cultures continues

2.1. Cultures finies Cultures cellulaires à durée de vie limitée

Après X repiquages (env. 30 à 60 mitoses/divisions), division cellulaire stoppée, sénescence (= vieillissement cellulaire) et « désintégration » cellulaire

Exemple : Cellules somatiques issues de tissus normaux

- (+) : Grande stabilité génétique, cellules conservant leurs propriétés fonctionnelles, adaptées pour les études de différenciation
- (-) : Nombre de générations limité, difficile à mettre en oeuvre

2.2. Cultures continues Cellules en cultures capables de se diviser indéfiniment

Cellules ayant des propriétés d'IMMORTALITE

Immortalité innée : cellules souches

Immortalité acquise : CELLULES TRANSFORMEES / TUMORALES



Cultures de cellules tumorales obtenues par cultures primaires puis secondaires à partir d'une tumeur animale ou humaine

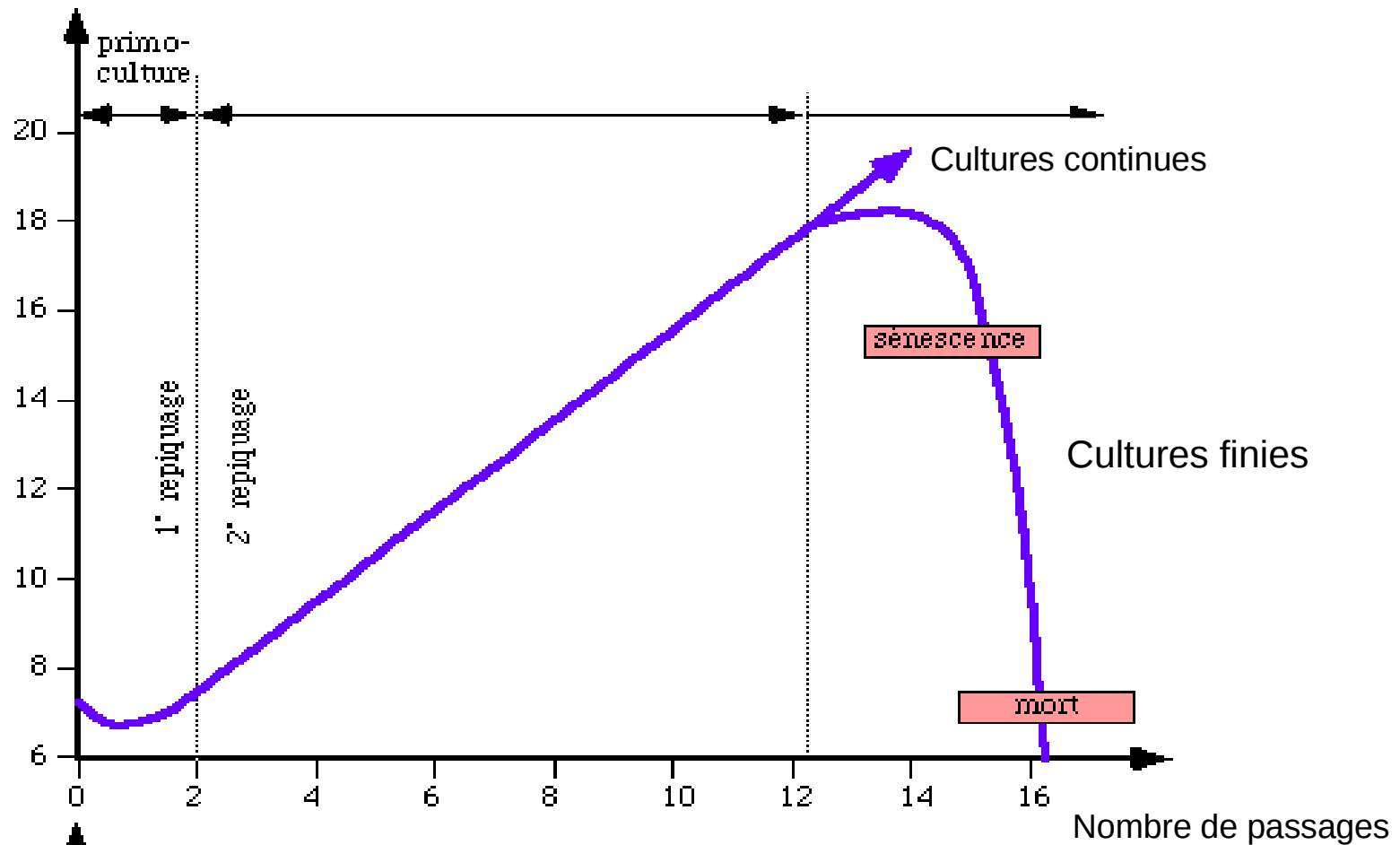


Cultures primaires puis secondaires à partir d'un tissu normal : transformation *in vitro* (agents chimiques, radiations, virus)

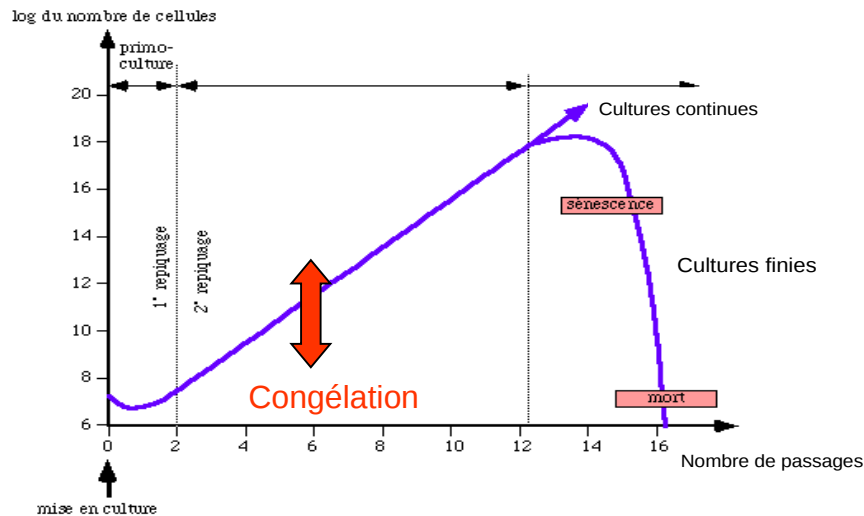
- (+) : Culture illimitée dans le temps, manipulation plus facile et croissance plus rapide
- (-) : instabilité génomique, pertes des propriétés morphologiques et fonctionnelles initiales

2.3. Cultures finies – Cultures continues en schéma

log du nombre de cellules



2.4. Cryoconservation des cultures cellulaires



Conditions requises :

Pour congélation

Cryoconservateur (DMSO, glycérol),
Azote liquide : descente progressive en T°,

Pour remise en culture

décongélation rapide à 37°C + lavage



Cellules peuvent être congelées

- Éviter les passages trop nombreux = vieillissement de la population cellulaire
- Permet d'interrompre l'activité



1. Eviter les contaminations

1.1. Contaminations chimiques

Endotoxines, résidus plastiques, ions métalliques, traces d'agents nettoyants/désinfectants, etc...

↳ Effets invisibles, produits difficiles à détecter

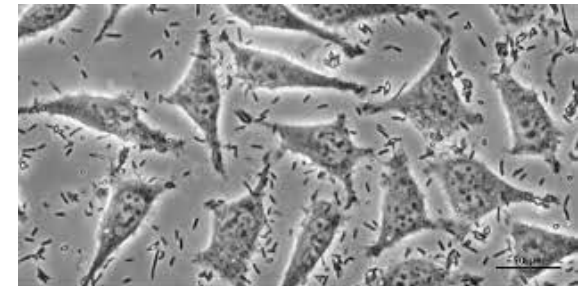
1.2. Contaminations biologiques

- Contaminations croisées : mélange de deux lignées cellulaires différentes
- Levures, bactéries, champignons → Effets généralement visibles, facile à détecter

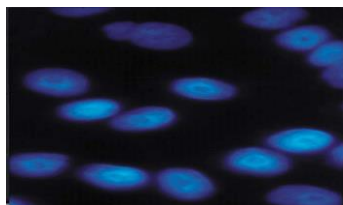
↳ Modification du pH et de la turbidité du milieu

- Virus, mycoplasmes

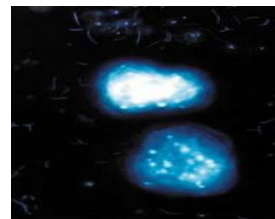
↳ Effets invisibles, détection possible par analyse spécifique



Détection de mycoplasmes : marquage de l'ADN des cellules avec du Hoechst



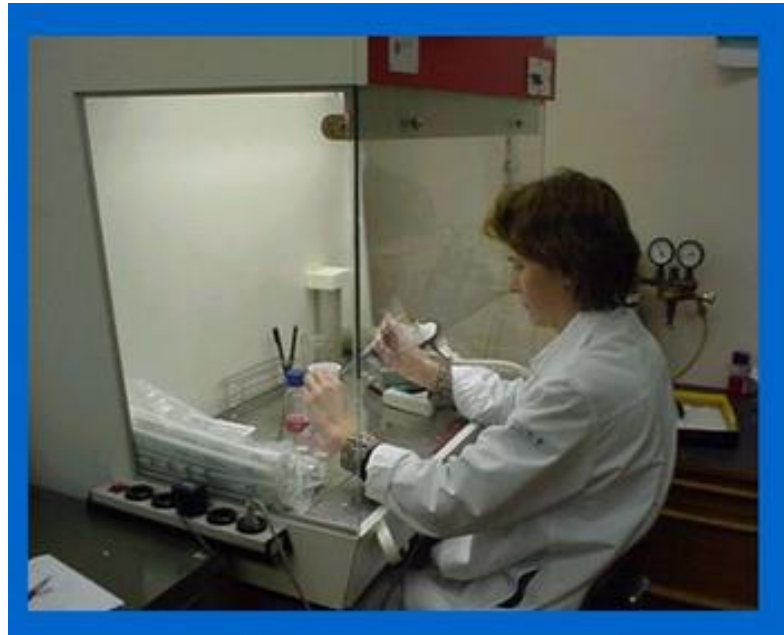
Négatif



Positif

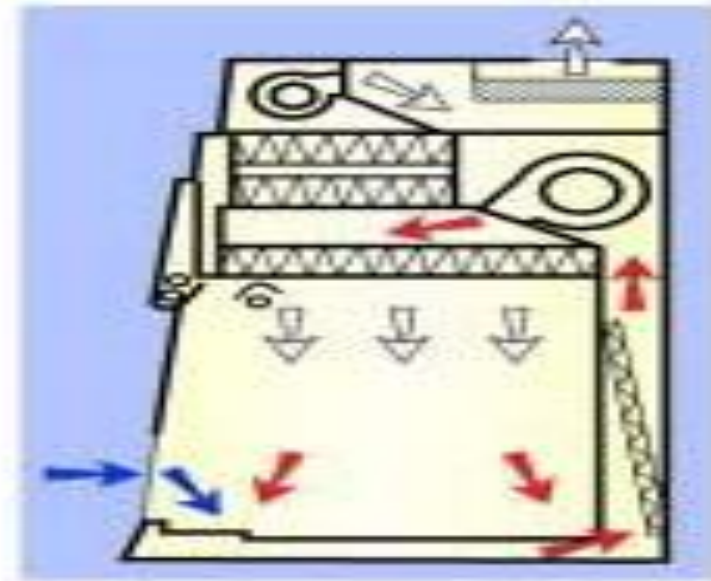
1.3. Moyens de lutte contre les contaminations biologiques

- Environnement et surfaces propres
- Consommable utilisé adapté (fournisseur certifié)
- Equipement, récipients plastiques et verrerie propres et stérilisés
- Milieux de culture stériles
- Usage d'antibiotiques, d'antifongiques



Maintenir la stérilité des cultures et des milieux

**HOTTE A FLUX LAMINAIRE VERTICAL
ou
POSTE DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE**



→ Air ambiant
→ Air contaminé
→ Air stérile

Class II

- Filtre HEPA (high efficiency particule air)
- Protection des cultures, milieux, plastiques
- Protection de l'environnement
- Protection du manipulateur (vitre à l'avant))
- Lampe UV

2. Trouver les conditions de culture optimales

2.1. Critères de jugement

Environnement optimal

les cellules ne meurent pas
les cellules se multiplient

au minimum

les cellules reproduisent *in vitro* les fonctions
physiologiques ou biochimiques connues *in vivo*
(ex: *sécrétion d'hormones spécifiques*)

Les critères d'évaluation

Morphologie des cellules

Viabilité cellulaire

Vitesse /Taux de croissance

Microscope inversé, bleu trypan,
numération

Expression de fonctions spécifiques



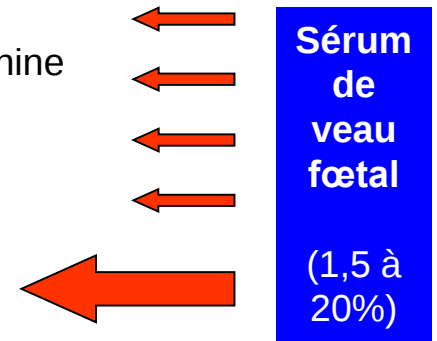
2.2. Paramètres de l'environnement à contrôler

2.2.1. Le milieu de culture

Milieux complexes qui doivent apporter tous les éléments nutritifs nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules animales



- **Eau**
- **Ions minéraux** nombreux et variés en concentration adéquate (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$)
- **Source de carbone et d'énergie** : le plus souvent glucose, pyruvate
- **Éléments de constitution** :
 - acide aminés essentiels : tryptophane, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine, leucine isoleucine, histidine, arginine
 - acide aminés non essentiels : cystéine, glycine, tyrosine + glutamine
 - acides gras, cholestérol : métabolisme lipidique
 - vitamines + cofacteurs,
 - riboses et désoxyriboses : synthèse des acides nucléiques
- **Facteurs de croissances** divers (FGF, EGF, PDGF, IL-2, etc...)



Sauf pour cellules souches

+ Compléments variables : acides aminés, vitamines et cofacteurs +/- apports spécifiques si nécessaire
(ex : prolactine pour cellules épithéliales mammaires)

+ Lutte contre les contaminations :

Antibiotiques +/- antifongiques

(ex: pénicilline G, streptomycine, +/- amphotéricine B)

➤ Les paramètres physico-chimiques

pH compris entre 7,0 et 7,4 en général $\Rightarrow$ Système tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$,

Osmolarité avoisinant celle de l'environnement physiologique (300 mOsm/L pour cellules humaines $\neq$ cellules d'amphibiens)

$\Rightarrow$ Rôle des ions, contrôlent les mouvements d'eau et de substances entre milieux extra- et intra-cellulaire

Température : dépend de l'origine des cellules (37°C pour les cellules de mammifères mais 21°C pour cellules d'amphibien)

Hygrométrie : 80% d'humidité $\Rightarrow$ Eviter évaporation du milieu

Echanges gazeux : O_2 et CO_2

$\Rightarrow$ **INCUBATEUR A CO_2**

Contrôle de la température, hygrométrie, 5% de CO_2



3. Le repiquage hebdomadaire et l'ensemencement pour les expériences

3.1. Cultures en suspension

↳ simple dilution dans du milieu « frais »

3.2. Cultures de cellules adhérentes

↳ « TRYPSINATION » avant d'atteindre la confluence !

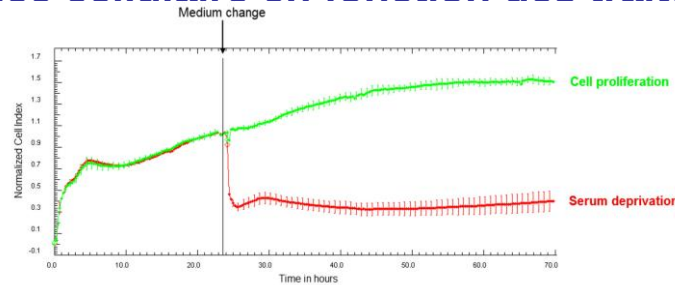
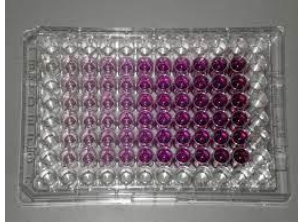
- Elimination du « milieu appauvri » et rinçage des cellules avec un tampon phosphate
- Exposition des cellules à la trypsine → « *décollement* » des cellules
Trypsine = peptidase qui digère les protéines qui lient les cellules entre elles et les cellules à leur support
- Inhibition de l'action de la trypsine par ajout de milieu+SVF
- Centrifugation pour obtenir un culot cellulaire : élimination du surnageant (trypsine + milieu)
- Dilution du culot dans du milieu frais → numération cellulaire
- Ré-ensemencement à plus faible concentration

Entretien

Expériences d'intérêt²⁷

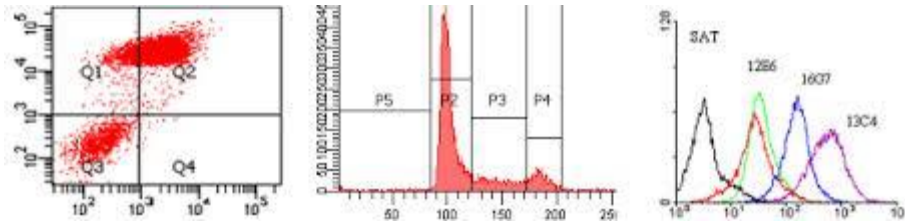
4. Les expériences d'intérêt les plus fréquentes

4.1. Suivre la croissance cellulaire en fonction des traitements



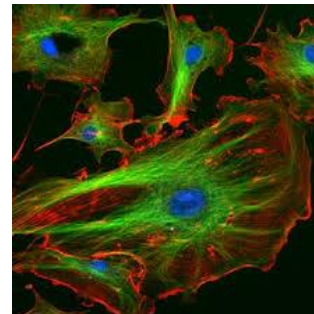
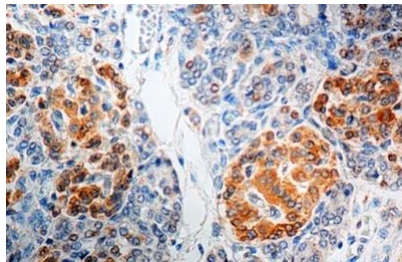
Comptage cellulaire,
Tests d'activité métabolique
Suivi en temps réel (impédance, imagerie
optique)...

4.2. Dénombrer en fonction de caractéristiques précises



Cytométrie en flux

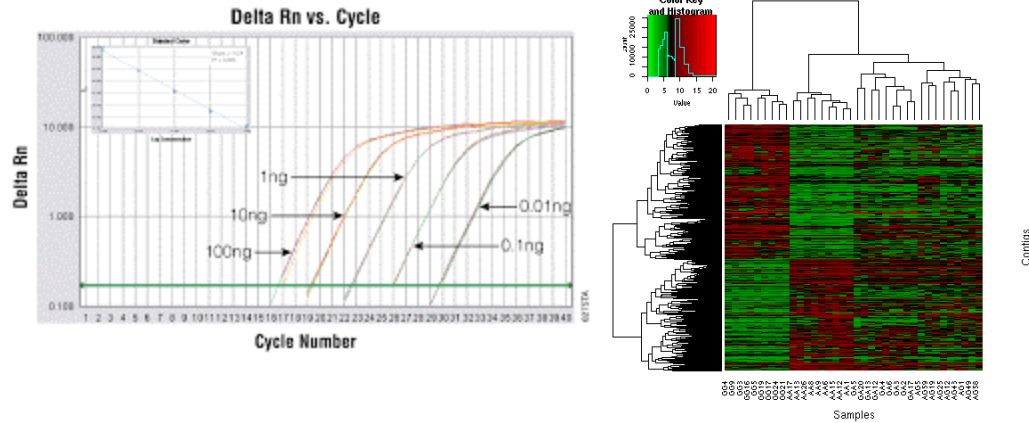
4.3. Mettre en évidence des structures ou des marqueurs



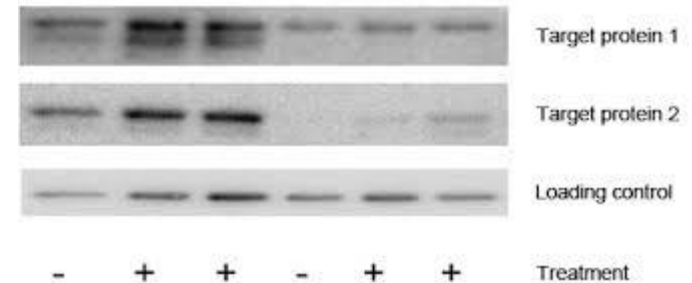
Immunocytochimie,
Immunocytofluorescence

4.4. Extraire des fractions subcellulaires

Extraction d'ADN ou d'ARN suivi d'une analyse
par qPCR ou « omique »

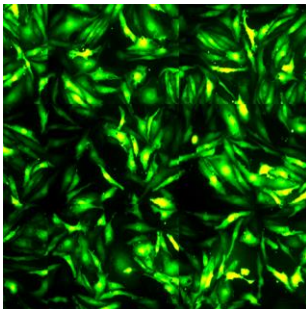


Extraction de protéines suivi
d'une analyse par Western-blot



4.5. Transformer un type cellulaire en un autre

Expression de la GFP



1. Modèle d'étude pour étudier les processus physiologiques aux échelles cellulaire et moléculaire

Etude des processus biochimiques des cellules : métabolisme cellulaire, division cellulaire, fluidité membranaire

Etude des liens entre génome, transcriptome et protéome

Etude du processus de vieillissement cellulaire

Etc.

2. Modèle d'étude pour étudier les processus pathologiques aux échelles cellulaire et moléculaire

Cancérologie	Différence entre cellules normales et tumorales Etude des agents transformants = cancérigènes
Virologie	Etude des mécanismes d'infection par les virus Etude de la réplication et des propriétés des virus
Cardiologie	Etude de la contractilité des cardiomyocytes

3. Matériel de base pour la médecine régénératrice

Préparation de greffons

Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques
Greffes de peau

4. Applications industrielles

Production d'anticorps monoclonaux (diagnostic, clinique, recherche)

Production de protéines de synthèse (insuline, facteur de croissance)

Production de virus en grande quantité pour préparation des vaccins

Tests pharmacologiques et toxicologiques