

2.1- Généralités sur les cultures cellulaires

Une culture de cellules est un procédé de laboratoire utilisé pour le maintien en survie des cellules *in vitro*. Cette technique facilite la manipulation des cellules cultivées, mais d'une manière moindre comparativement aux cultures des bactéries et des levures. Ce procédé de culture *in vitro* offre au biologiste la possibilité d'étudier la prolifération cellulaire, d'effectuer des manipulations génétiques nécessaires à la compréhension de l'effet de la substance et de la fonction des gènes...etc (Cooper, 1999).

Cette technique permet aux cellules de conserver le plus souvent certaines caractéristiques différenciées de leur tissu d'origine telles que : la morphologie et les processus métaboliques.....etc (Callen, 2005).

2.2- Différents types de cultures cellulaires

Les cellules cultivées sont généralement décrites d'après leur morphologie (forme et apparence) ou leurs caractéristiques fonctionnelles. De ce fait, elles peuvent être classées suivants différents critères :

2.2.1- Critères de la morphologie des cellules

Sur le plan morphologique, il est à distinguer (Ryan, 2007) :

a- Cellules épithéliales : ces cellules sont attachées au substrat et apparaissent plates et de forme polygonale.

b- Cellules lymphoblastiques : ces cellules ne se fixent pas normalement au substrat mais restent en suspension avec une forme sphérique.

c- Cellules fibroblastiques : ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent allongées et bipolaires.

2.2.2- Critères du comportement des cellules en culture

La culture des cellules *in vitro* peut être réalisée suivant deux procédés différents qui se basent sur l'aptitude des cellules de s'adhérer à un substrat (flacon de culture) en verre ou en plastique (système de culture en monocouche) ou de flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture en suspension) (Ryan, 2007) :

a- Cultures en monocouches

Les cellules sont généralement cultivées dans des boîtes, flacons T, flacons roulants ou en plaques multipuits traités pour la culture de cellules. Le choix du support est en fonction du nombre de cellules obtenues, de la nature de l'environnement de culture, du coût et des préférences personnelles (Ryan, 2007).

b- Cultures en suspension

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 (Ryan, 2007).

2.2.3- Critères du stade de culture

D'un autre point de vue, en fonction du stade de culture, il est lieu de distinguer trois principaux types de cultures cellulaires :

a- Cultures primaires

Une culture primaire est établie par inoculation aseptique de cellules prélevées directement à partir de tissu animal ou végétal. Sa réalisation peut suivre deux chemins différents:

a.1- Culture d'explant: De petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture en verre ou en plastique traité et renfermant le milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture (substrat) où elles commencent à se diviser et à se prolifère (Ryan, 2007)

a.2- Culture par digestion enzymatique: C'est la technique la plus utilisée. Le processus de dispersion cellulaire est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion ; telles que la trypsine ou la colagénase à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture et incubées à la température adéquate (Madigan et Martinko, 2007).

Les cellules d'une culture primaire poussent habituellement jusqu'à ce qu'elles couvrent complètement la surface de la boîte de culture (Cooper, 1999).

Les cultures primaires sont généralement hétérogènes et ont un faible taux de croissance. Toutefois, elles sont toujours préférées aux lignées cellulaires continues car elles sont les types cellulaires les plus représentables dans le tissu (Sinha et Kumar, 2008).

Inhibition de contact

Les cellules normales cultivées se multiplient rapidement. En quelques jours, la totalité du milieu est recouverte, les mitoses s'arrêtent et les cellules meurent. Ce mécanisme décrit sous le nom d'inhibition de contact dépend de la transmission de signaux entre les cellules cultivées. Toutes les cellules issues de la multiplication d'une seule cellule constituent un clone, elles possèdent toutes le même patrimoine génétique. Les cellules cancéreuses ont perdu l'inhibition de contact. L'arrêt des divisions et leur mort sont conditionnés uniquement par l'appauvrissement du milieu de culture (Maillet, 2006).

Dans ces conditions, la cinétique de croissance est exprimée par une courbe caractéristique (**Fig. 3**) qui rend compte de l'évolution de la concentration cellulaire exprimée en nombre de cellules par unité de volume du milieu de culture en fonction du temps. Cette cinétique se déroule en plusieurs étapes consécutives (Bousseboua, 2002).

b- Cultures secondaires

Lorsque les cultures dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture, une culture secondaire s'avère nécessaire on passage car la culture devient incapable de pousser pendant une durée longue à cause de divers facteurs tels que: l'épuisement des éléments nutritifs, l'accumulation des métabolites et l'inhibition de contact. Les cellules sont repiquées après dilution etensemencées sur plusieurs boîtes équivalentes dans des milieux nutritifs neufs et avec une densité moindre (Bassaglia, 2001; 2004).

Le prélèvement des cellules adhérentes se fait aussi par digestion enzymatique. D'abord, la monocouche confluente de la culture primaire est rincée deux fois par le tampon phosphate (PBS) puis traité par la trypsine (TVGS) afin de rompre les liaisons protéiques liant les cellules.

De repiquage en repiquage, il est possible de conserver des cellules pendant une longue durée (**Fig. 4**), et de cette manière les cellules forment alors une lignée cellulaire (Bassaglia, 2001; 2004).

c- Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires dérivent des cultures secondaires suite à l'acquisition des cellules la propriété de se multiplier indéfiniment. Ces cellules immortelles sont devenues ainsi à des mutations spontanées (ponctuelles ou réarrangements chromosomiques). Les lignées de ce type sont relativement faciles à obtenir chez les rongeurs (lignées dite 3T3) des cellules de souris. Ce n'est pas le cas pour les lignées d'origine humaine, elles peuvent être préparées à partir des souris aussi artificiellement obtenue grâce à des agents physique ou chimique

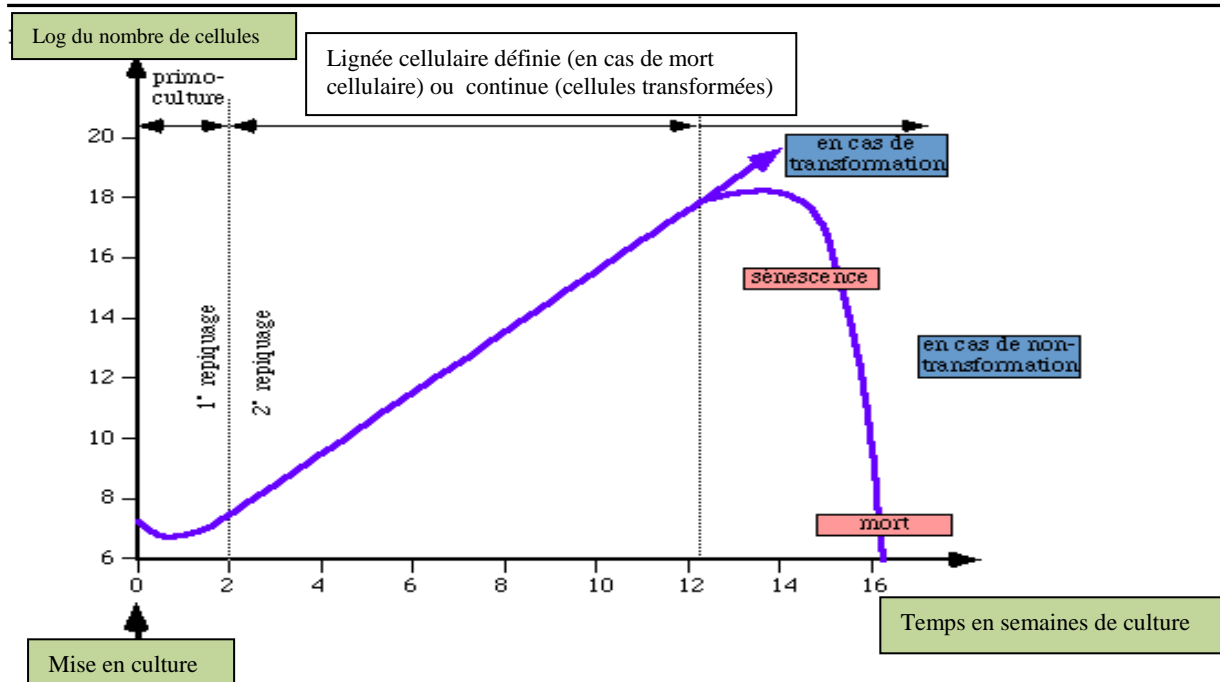


Figure 3: Courbe de croissance des cellules en culture (Freshney, 2005).

La cinétique de croissance des cellules en culture est caractérisée par 03 phases :

- Phase I :** Phase de latence, ou d'adaptation, pendant laquelle la vitesse de croissance est nulle.
- Phase II :** Phase exponentielle, le taux de croissance augmente jusqu'à devenir constant.
- Phase III :** Dans la phase stationnaire la croissance s'arrête. Les lignées cellulaires entrent dans le phénomène de sénescence ensuite la mort. En cas de transformation, elle continue la croissance.

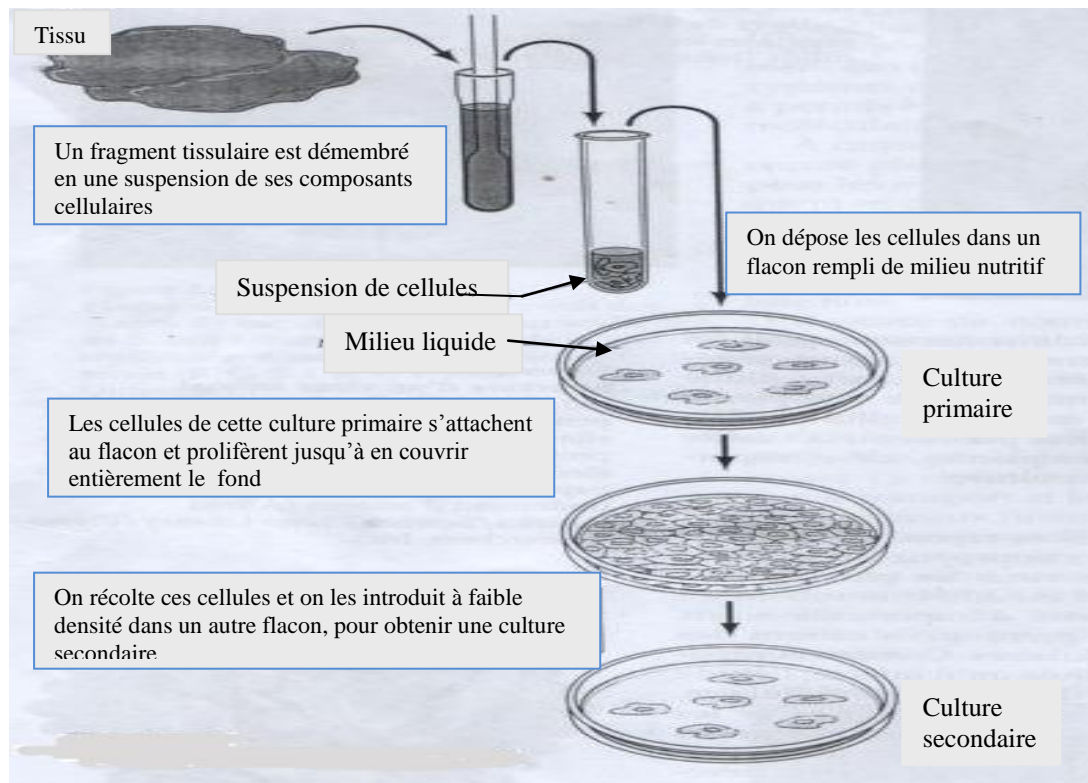


Figure 4 : Schéma simplifié des étapes de la réalisation d'une culture de cellule animale (Cooper, 1999).

mutagènes, et des virus ou bien par des manipulations génétiques (transfection d'ADN purifié) (Callen, 2005).

Parmi les lignées cellulaires, il est lieu de distinguer :

* **les lignées finies** : 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 (Bassaglia, 2001; 2004).

* **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 (Bassaglia, 2001; 2004).

2.2.4- Critère du nombre des cellules en culture

En se basant sur le nombre initial de cellules mis en culture, les cultures peuvent être classées en :

a- Cultures pures

Une fois qu'un milieu de culture a été préparé et stérilisé afin d'éliminer tous les micro-organismes, il 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 (Madigane et Martinko, 2007).

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 au sein des tissus *in vivo* entre plusieurs partenaires. Les différents types cellulaires peuvent être mélangés au moment de l'ensemencement. Plus classiquement, par exemple dans le cas des co-cultures fibroblastes-cellules épithéliales, ces dernières sontensemencées sur une monocouche de fibroblastes confluentes.

Les co-cultures sont parfois indispensables, car elles peuvent favoriser grandement la différenciation de certains types cellulaires en culture (Meimon et Adolphe, 2003).

2.3- Modes de cultures cellulaires

Les cultures cellulaires peuvent être réalisées selon différents modes de culture. Tous basés sur le principe de réunir dans un milieu de culture des éléments nutritifs et des facteurs

d'environnements optimaux pour la croissance de la cellule considérée. Suivant ce principe, les cultures peuvent être réalisées en mode discontinue (BATCH) ou continues (FED-BATCH) (Perry et *al.*, 2004).

a- Cultures discontinues

Les cultures discontinues constituent un système clos. Ce sont les cultures en flacons ou en bioréacteurs avec un milieu favorable à la croissance dans des conditions environnementales (température pH, potentiel redox) convenable pour l'organisme.

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 (Perry et *al.*, 2004).

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. Cet état d'équilibre s'étend du début de la phase de croissance jusqu'au milieu de la phase exponentielle (Perry et *al.*, 2004).

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 (Gourgaud et Sanglier, 1992).

b- Cultures continues

De nombreuses études nécessitent le maintien des cultures 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. Ceci n'est possible que dans le cadre d'une culture continue (Madigan et Martinko, 2007).

C'est un système ouvert dans lequel la population cellulaire est 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 (Bousseboua, 2002).

Les cultures continues peuvent être menées dans :

Le chémostat : Dans lequel un facteur nutritif limitant est ajouté à un taux constant (**Fig. 5a**)

Le turbidostat : Dans lequel la densité des cellules est maintenue constante en ajoutant du milieu frais selon les besoins (**Fig. 5b**) (Gourgaud et Sanglier, 1992).

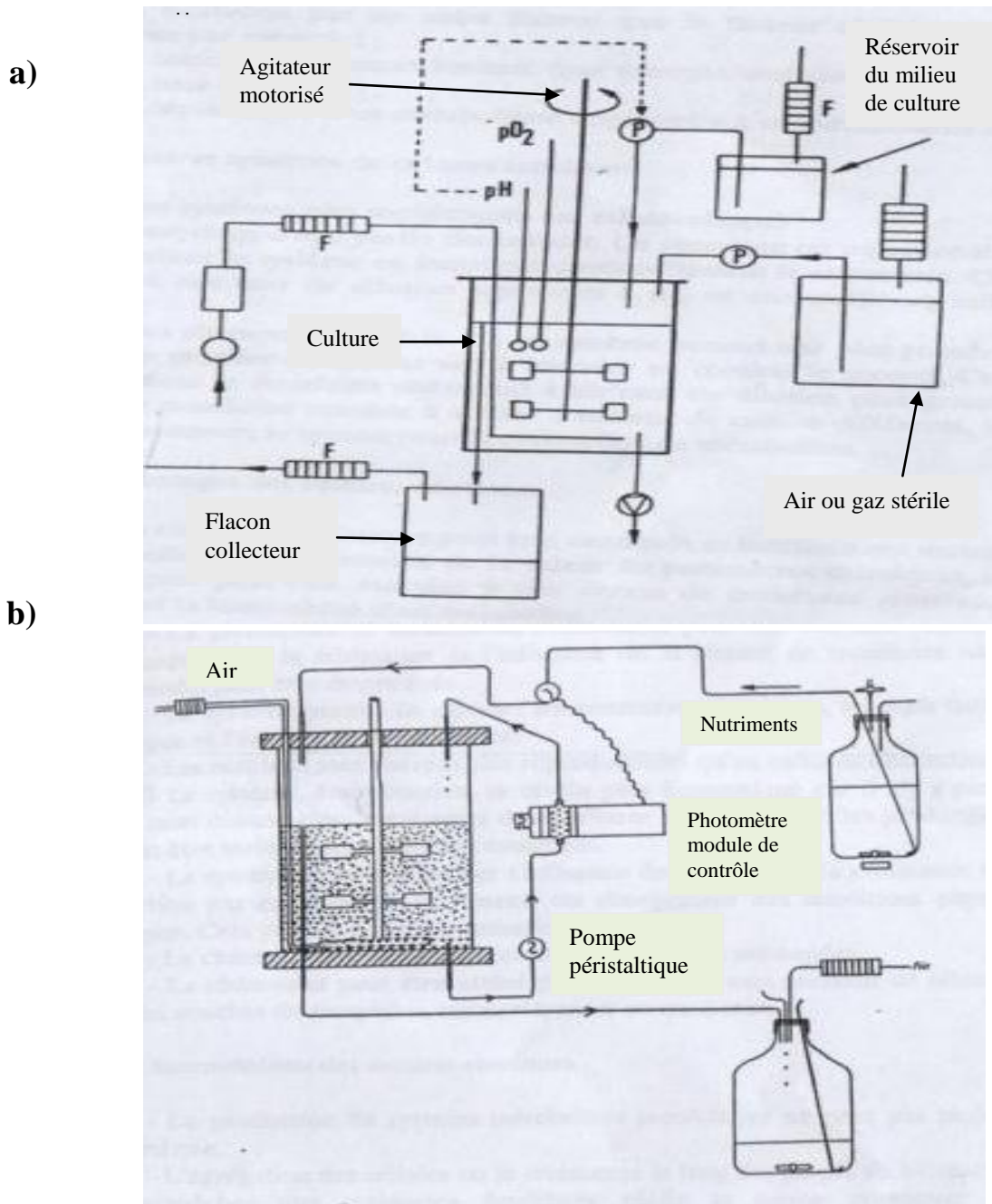


Figure5: Schémas simplifiés des cultures continues en chémostat (a) et turbidostat (b) (Gourgaud et Sanglier, 1992).

a) La densité de la population est contrôlée par la concentration en substrat limitant dans le réservoir de milieu neuf, alors que le taux de croissance est contrôlé par le débit du milieu neuf (Madigan et Mrtinco, 2007).

b) L'apport du milieu nutritif n'est pas fixe. Il est constamment ajusté par un mécanisme automatique, basé sur la mesure continue de la densité optique de la culture. Le débit de renouvellement du milieu est donc régulé, de manière à maintenir constante la densité cellulaire (Bousseboua, 2002).

2.4- Milieux de cultures

Le milieu de culture est une préparation nutritive destinée à la croissance des cellules au laboratoire (Tortora et *al.*, 2003).

La mise au point du milieu de culture n'a pas été simple. Les premiers milieux de culture utilisés étaient des mélanges très peu définis de sérum sanguin et d'extrait embryonnaire variés (Callen, 2005).

Après une remarquable étude systématique des composants nécessaires, Eagle, en 1955 a proposé un milieu minimum convenable pour les cellules de mammifères reconnu actuellement par le milieu minimum d'Eagle (Eagle Essential Medium) (**Tableau III**). La composition de ce milieu sert toujours de base aux milieux de cultures actuels (Perry et *al.*, 2004).

Les milieux usuels de culture de cellules sont à base de solution saline additionnée d'un grand nombre de molécules organiques: sucres, acides amines, vitamines, sels minéraux...etc. En raison du caractère hétérotrophe des cellules, les milieux doivent aussi contenir des extraits de sérum (de veau, par exemple), qui apportent une très faible concentration de facteurs de croissance indispensables à la multiplication cellules (**Tableau IV**) (Callen, 2005). Par conséquent, il existe deux sortes de milieux de culture :

a- Milieux Sans sérum

Plusieurs avantages sont liés à l'emploi de milieu à des doses peu élevées en sérum (0.28 à 1.5%) ou sans sérum (Gourgaud et Sanglier, 1992) :

- Augmentation de la reproductibilité ;
- Facilite le changement d'échelles (passage à des Bioréacteurs de plus grande capacité) ;
- Risque diminuée de contaminations ;
- Prix moins élevé surtout en comparaison au prix du sérum de veau fœtal ;
- Purification facile de la protéine recherchée
- Faible interférence dans le testes biologiques ;
- Elimination de la cytotoxicité du sérum ;
- Prévention de la croissance excessive des fibroblastes dans les cultures primaires ;
- Conditions sélectives pour un type de cellules différenciées et fonctionnelles ;
- Possibilité de découverte de nouvelles substances régulatrices produites par les cellules.

Cependant, ces mêmes milieux peuvent présenter certains nombres d'inconvénient à savoir :

Tableau III: composition d'un milieu de culture pour cellules de mammifères (Cooper, 1999).

<i>Acides aminés (mM)</i>		<i>Vitamines (mM)</i>		<i>Autres composants</i>	
Arginine	0,1	Biotine	10 ⁻³	Glucose	5mM
Cystine	0,05	Choline	10 ⁻³	Pénicilline	0,005%
Glutamine	2,0	Acide Folique	10 ⁻³	Streptomycine	0,005%
Histidine	0,05	Nicotinamide	10 ⁻³	Rouge phénol	0,0005%
Isoleucine	0,2	Pantothénate	10 ⁻³		
Leucine	0,2	Pyridoxal	10 ⁻³		
Lysine	0,2	Thiamine	10 ⁻³		
Méthionine	0,05	Riboflavine	10 ⁻⁴		
Phénylalanine	0,1				
Thréonine	0,2	Sels inorganiques (mM)			
Tryptophane	0,02	NaCl	100		
Tyrosine	0,1	KCl	5		
Valine	0,2	NaH ₂ PO ₄	1		
		NaHCO ₃	20		
		CaCl ₂	1		
		MgCl ₂	0,5		

Les acides aminés sont sous la forme L, leur concentration varie de 0,1 à 0,2 mM. pour les vitamines elles n'excèdent pas 1 µM. Les deux antibiotiques, pénicilline et streptomycine, empêchent la croissance d'éventuelles bactéries contaminants. Le rouge de phénol sert d'indicateur de pH. Les cultures se font dans des flacons en verre ou en plastique permettant l'attachement de cellules. Les flacons sont placés à 37°C dans une atmosphère contenant généralement 5% de CO₂.

Tableau IV : Quelques facteurs de croissance et mitogènes (Freshney, 2005).

<i>Nom et synonyme</i>	<i>Abréviations</i>	<i>PM(Kd)</i>	<i>Source</i>	<i>Fonction</i>
Facteur de croissance des fibroblastes -1	FGF-1	13 h	Cerveau de bovin, pituitaire	Mitogène pour cellules endothéliales
Facteur de croissance des astroglies	AGF-1	14	Cerveau	Mitogène des astroglies
Cachectine	TNF-α	17	Monocytes	Catabolique
Toxine de Cholera	CT	80-90	<i>Cholera Bacillus</i>	Mitogène pour cellules épithéliales normales
Erythropoïétine	EPO	34-39g	Cellule Juxtaglomerulaire de reins	Progéniture erythroïde de prolifération et de différenciation
Facteur de croissance, Urogastrone	EGF	6	Gland salivaire	Transport active, synthèse d'ADN, d'ARN, et de protéines
Facteur de croissance des fibroblaste-4	FGF-4	14h	Embryons, tumeurs	Mitogène, morphogène, angiogénique

- Bien qu'un milieu sans sérum soit souvent moins coûteux, dans certains cas, l'addition d'hormones de facteurs de croissance et d'adhésion peut se révéler aussi coûteux que le sérum.
- Les milieux sans sérum sont souvent spécifiques pour une lignée cellulaire et il est donc nécessaire de développer et de fabriquer un milieu pour chaque type de lignée.

b- Milieux avec Sérum

Les composants majeurs du sérum sont des protéines auxquelles s'ajoutent divers facteurs de croissance, des hormones, des lipides, des acides gras, des facteurs d'adhésion mais aussi certains inhibiteurs (**Tableau V**). La plupart des lignées cellulaires requièrent un milieu avec sérum. Toutefois, certaines lignées sont adaptées à des milieux sans sérum. Les sérums les plus couramment utilisés sont le sérum de veau fœtal, les sérums bovins, équins et humains. Ils sont empiriquement sélectionnés en fonction de la lignée cellulaire (Gourgaud et Sanglier, 1992).

Par ailleurs, afin d'éviter la contamination des cellules par les microorganismes (bactéries, virus, champignons...etc), l'addition d'un antibiotique s'avère nécessaire.

La liste de certains antibiotiques utilisés dans les cultures cellulaires est résumée dans le **Tableau VII**.

Tableau V : Les constituants du sérum (Frechney, 2005).

<i>Constituants</i>	<i>Gamme de concentration</i>
Protéines et polypeptides	40-80 mg /mL
Albumine	20-50 mg /mL
Fetuline	10-20 mg /mL
Febronectine	1-10 µg/ml
Globuline	1-15 mg /mL
Protéase inhibiteur : α1- Antitrypsine, α2-Macroglobuline	0,5-2,5 mg /mL
Transferrine	2-4 mg /mL
Facteurs de croissances	
EGF, PDGF, IGF-1 et 2, FGF, IL-1, IL-6	1-100 ng/mL
Amino acides	0,01-1,0 µM
Lipides	2-10 mg /mL
Cholestérol	10 µM
Acides gras	0,1-1,0 µM
Acide Linoléique	0,01-0,1 µM
Phospholipides	0,7-3,0 mg /mL
Charbohydrates	1,0-2,0 mg /mL
Glucose	0,6-1,2 mg /mL
Hixosamine	6-1,2 mg /mL
Acide lactique	0,5-2 mg /mL
Acide pyruvique	2-10 µg/ml
Polyamines	
Putrescine, Spermidine	0,1-1,0 µM
Urée	170-300 µg/ml
Inorganiques	0,14-0,16 M
Calcium	4-7 mM
Chloride	100 µM
Fer	10-50 µM
Potassium	5-15 mM
Phosphate	2-5 mM
Sélénium	0,01µM
Sodium	135-155 mM
Zinc	0,1-1,0 µM
Hormones	0,1-200 nM
Hydrocortisone	10-200 nM
Insuline	1-100 ng/mL
Thriiodotyronine	20 nM
Thyroxine	100 nM
Vitamines	10 ng-10 µg/mL
Vitamine A	10-100 ng/mL
Acide folique	5-20 ng/mL

Tableau VI: Antibiotiques utilisées dans la culture cellulaire (Freshney, 2005).

<i>Antibiotique</i>	<i>Concentration, µg/mL</i>		<i>Activité vis-à-vis</i>
	<i>Travail</i>	<i>Cytotoxicité</i>	
Amphotéricine B (Fungisone)	2,5	30	Champignons, Levures
Ampicilline	2,5		Bactéries, gram+ et gram-
Ciprofloxacine	100		Mycoplasme
Erythromycine	50	300	Mycoplasme
Gentamycine Gentamicine	50	300 ou plus	Bactéries, gram+ et gram- ; Mycoplasme
Kanamycine	100	10 mg /mL	Bactéries, gram+ et gram- ; Mycoplasme
MRA (ICN)	0,5		Mycoplasme
Néomycine	50	3,000	Bactéries, gram+ et gram-
Nystatine	50		Champignons, Levures
Pénicilline-G	100 U/mL	10,000 U/mL	Bactéries, gram+
Polymixine B	50	1 mg/mL	Bactéries, gram-
Streptomycine SO ₄	100	20 mg/mL	Bactéries, gram+ et gram-
Tétracycline	10	35	Bactéries, gram+ et gram-
Tylosine	10	300	Mycoplasme

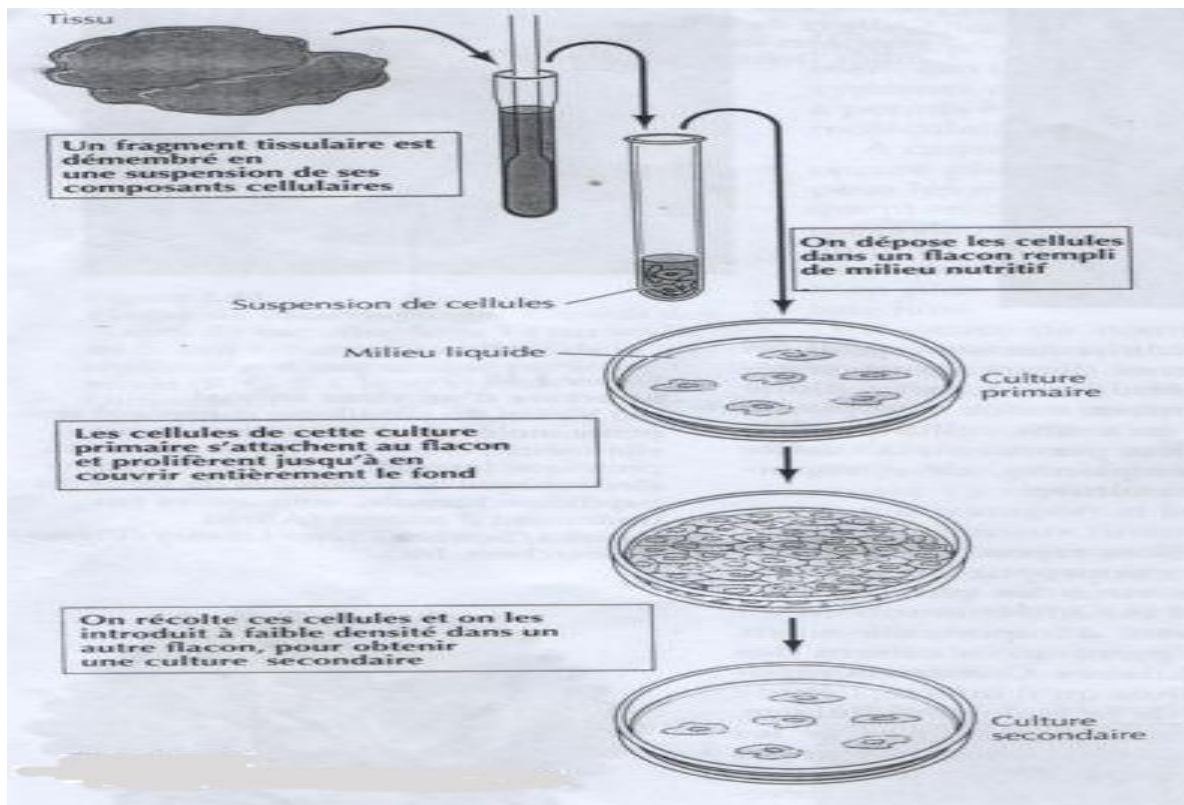


Figure : Culture de cellules animale

