

# Culture des cellules animales

## Plan du cours

- 1. Définitions**
  - Primoculture et culture secondaire
  - Lignée cellulaire
  - Adhérence
  - Culture en monocouche
  - Passage
  - Transformation cellulaire
- 2. Composition des milieux de culture**
  - 2.1. Milieu synthétique de base
    - Nature des constituants
    - Rôles des constituants
  - 2.2. Sérum de veau fœtal
    - Constituants et rôles
    - Avantages et inconvénients du SVF
  - 2.3. Milieu défini (ou milieu synthétique)
    - Nature des constituants ajoutés à un milieu de base riche
    - Avantages et inconvénients des milieux définis
- 3. Environnement physico-chimique**
  - 3.1. Les différents facteurs à considérer : oxygène, température, pH et osmolarité
  - 3.2. La régulation du pH
    - Les deux systèmes utilisés : le couple (NaHCO<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>) et l'HEPES
    - L'indicateur coloré
- 4. Le repiquage ou passage des cellules adhérentes**
- 5. La culture à grande échelle des cellules animales**
- 6. Les applications de la culture in vitro des cellules animales**

## 1. Définitions

- ❖ **Primoculture ou culture primaire = culture dérivant de cellules directement prélevées sur un organisme.**

Une primoculture peut être considérée comme telle jusqu'à son premier repiquage. Les cellules peuvent dans certains cas se diviser, mais pour de nombreux types cellulaires, il s'agira seulement d'un maintien en survie.

- ❖ **Culture secondaire = culture obtenue par repiquage à partir d'une culture primaire (ou d'une autre culture secondaire).**

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

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

Une lignée peut être :

- **à durée de vie limitée** : on observe une dégénérescence des cellules au bout d'un certain nombre de repiquages.
- **à durée de vie illimitée**, elle est alors appelée **lignée continue**.

- ❖ **Adhérence :**

L'adhérence à un support est indispensable à la prolifération de la plupart des types cellulaires issus des mammifères, exception faite des cellules circulantes et de certaines cellules transformées.

- Dans les tissus la nature des molécules impliquées dans l'adhérence sont :
  - Des **protéines membranaires** appelées 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 (acide hyaluronique),

protéoglycanes (aggrégan, perlécan, syndécan ...) et des protéines (collagène, fibronectine, laminine, ténaïcine, vitronectine ...).

- *In vitro* l'**ancrage des cellules est indispensable à leur prolifération**. 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**.

#### ❖ **Culture en monocouche**

La culture en monocouche est la technique de base pour la culture de cellules adhérentes. Elle est réalisée sur plastique, en **réipients présentant une surface plane** (flacon, boîte, microplaque à fond plat) et consiste en une **culture statique** (sans agitation).

Les cellules se divisent jusqu'à former un tapis qui recouvre l'ensemble de la surface disponible, ce stade est appelé **confluence**.

**NB** : L'arrivée à **confluence s'accompagne souvent d'un arrêt de la prolifération**, soit à cause de signaux transmis par les jonctions cellule-cellule qui produisent une **inhibition de contact**, soit parce que la **quantité de milieu présente ne peut plus subvenir aux besoins de la population** cellulaire en augmentation. Dans un flacon plat offrant une **surface de 25 cm<sup>2</sup>** les cellules sont recouvertes de **5 mL de milieu de culture**.

#### ❖ **Passage = repiquage = subculture**

Lorsque le tapis de culture (ou monocouche) arrive à confluence il faut décoller les cellules du support, les disperser et les réensemencer à une densité plus faible dans un nouveau récipient de culture. Cette opération est appelée repiquage. La dispersion des cellules peut être réalisée par grattage du tapis, ou plus classiquement par utilisation d'un mélange de trypsine et d'EDTA (dans ce dernier cas on parle de trypsination).

#### ❖ **Transformation cellulaire**

Acquisition de l'immortalité (très différent de la transformation en génie génétique). Elle peut être spontanée (apparition de variants immortels suite à des mutations) ou provoquée par l'emploi de mutagènes chimiques ou physiques (radiations) ou de virus oncogènes. Les cellules cancéreuses sont des cellules transformées.

## 2. Composition des milieux de culture

Les milieux de culture **doivent reproduire aussi fidèlement** que possible les **conditions** de l'environnement que les cellules trouvaient **in vivo**.

Ils doivent donc être à la fois :

- vecteur d'éléments nutritifs,
- contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que pH et osmolarité
- et permettre la prolifération des cellules (divisions cellulaires).

Un milieu de culture peut consister :

- en l'association d'un milieu synthétique de base + sérum (le plus performant étant le sérum de veau fœtal) ;
- ou un milieu de culture peut-être un milieu défini = milieu synthétique sans sérum.

### 2.1. Milieux synthétiques de base

Les **milieux de base sont tous synthétiques**, de **composition plus ou moins complexe**, ils portent généralement le nom du chercheur qui les a mis au point : **Eagle, Parker, Ham, Dulbecco, Grace, ...**

On les désigne également par l'appellation MEM = **Milieu Essentiel Minimum**

Ces milieux sont **dits de base car ils assurent seulement la survie des cellules in vitro**.

La **prolifération** et l'**expression des différentes fonctions cellulaires** en culture **nécessitent l'addition d'une certaine concentration de sérum** au milieu synthétique de base.

→ Milieu synthétique de base : nature des constituants

- **Sels minéraux** : 7 ions sont indispensables  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  (carbonate). Certains milieux contiennent aussi des métaux à l'état de traces comme le fer, le cuivre, le cobalt, le sélénium.
  - **Acides aminés** :
    - **a.a. essentiels** : 8 chez l'homme (Ileu, Leu, Lys, Meth, Phé, Thréo, Trp, Val).
    - autres **a.a. dont la capacité de synthèse a été perdue lors du passage in vitro** : au moins cinq autres Gln, Tyr, Cys, Arg et His.
- NB** : Cas particulier de la **glutamine** (Gln) qui est indispensable pour quasiment toutes les cellules de mammifères en culture : cet acide aminé n'est pas stable en solution même à 4°C, il faut donc le rajouter au milieu lors d'une longue conservation du stock (il existe formule milieu sans Gln notée w/o Gln, il faudra donc ajouter la Gln à chaque utilisation). La Gln sert de **précurseur pour la synthèse des purines, des pyrimidines**, des sucres aminés et de quelques acides aminés. Une carence en glutamine peut conduire à un arrêt de la croissance cellulaire dû à une inhibition de la synthèse de l'ADN
- **Vitamines** : Les besoins sont variables suivant les types cellulaires. Selon Eagle, 8 vitamines sont indispensables : **choline, acide folique, thiamine, pyridoxal, riboflavine, acide nicotinique, inositol, acide panthoténique**.
  - **Glucose** : la substance énergétique fondamentale est généralement le glucose à la concentration de 1 g/L, concentration semblable à celle du sérum humain). Le glucose est quelquefois substitué par d'autres oses tels que le **galactose, le mannose ou le fructose**. Dans les milieux riches on peut trouver des acides cétoniques tels que l' **αcétoglutarate ou le pyruvate**.
  - **Rouge de phénol** : indicateur coloré dont la zone de virage est située aux pH de 7,2-7,6.
  - **Système tampon, on a deux possibilités** :
    - utilisation du **couple (bicarbonate de sodium, dioxyde de carbone)**,  $\text{NaHCO}_3$  apporté dans le milieu et  $\text{CO}_2$  (à 5 %) dans l'atmosphère de l'étuve.
    - utilisation d'une **molécule organique tampon** dans le milieu, l'**HEPES**.

→ Milieu synthétique de base : rôles des constituants

- ★ **Sels minéraux**  
Servent de cofacteurs d'enzymes, jouent un rôle dans la pression osmotique, le potentiel de membrane, les communications (second messenger  $\text{Ca}^{++}$ ), les transports (ion cotransporté  $\text{Na}^+$  par exemple), la régulation du pH, attachement des cellules (notamment le  $\text{Ca}^{++}$ ), entrent dans la constitution de certaines molécules (groupement prosthétique, phosphate ou autres), ...
- ★ **Acides aminés**  
Sous-unités constitutives des protéines.
- ★ **Vitamines**  
Cofacteurs d'enzymes ou précurseurs pour la synthèse de molécules.
- ★ **Glucose**  
Source d'énergie (catabolisme énergétique) et source de carbone (anabolisme).
- ★ **Rouge de phénol**  
Permet de visualiser les variations du pH, adapté car zone de virage située à la valeur du pH à réguler.
- ★ **Système tampon**  
Permet la régulation du pH : régulation obligatoire pour les cellules de mammifères notamment qui sont issues d'un organisme où règne l'homéostasie.

*NB : L'homéostasie est la capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures.*

## 2.2. Sérum

Mises en culture en présence d'un milieu synthétique de base tel que nous venons de le décrire, la plupart des cellules ne sont généralement aptes qu'à la survie. **Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fournis par le sérum.**

Le pourcentage de sérum additionné au milieu de base varie, selon le type cellulaire, **de 2 à 20 %, le plus souvent de l'ordre de 5 à 10 %.**

On peut utiliser des sérums d'origine humaine ou animale, d'individus jeunes, sachant que **l'effet cytoestimulant global du sérum est inversement proportionnel à l'âge du donneur.**

Les plus fréquemment retrouvés sont : le sérum de veau, le sérum de veau nouveau-né, le sérum de veau fœtal (SVF), ce dernier ayant les meilleures performances. Il existe actuellement des mélanges permettant de remplacer le SVF, on peut citer aussi le liquide amniotique enrichi en certains constituants.

Le sérum est un **mélange de composition extrêmement complexe** qui contient, entre autres, un grand nombre de substances libérées par toutes sortes de types cellulaires de l'organisme donneur.

### → Sérum de veau fœtal : constituants et rôles

La nature de certains de ses constituants sera évoquée ultérieurement dans le paragraphe sur les milieux définis.

**★ Facteurs de croissance et des hormones :**

- Facteurs de croissance = peptides impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (messagers chimiques), ils ont un effet mitogène et permettent la prolifération cellulaire.
- Hormones = messagers nécessaires à la mise en place de certaines fonctions cellulaires

**★ Facteurs d'attachement :**

glycoprotéines qui favorisent l'adhérence des cellules (c'est important surtout en début de culture car les cellules sont peu nombreuses et conditionnent mal le milieu de culture).

**★ Eléments qui assurent une protection des cellules :**

ils augmentent la viabilité.

**★ Propriété nutritive :**

Riche en nombreux oligoéléments.

### → Avantages et inconvénient de l'utilisation du sérum de veau fœtal

La présence de sérum peut être, toutefois, un facteur limitant. En effet :

UTILISATION DU SERUM DE VEAU FOETAL	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Apport facteurs de croissance permettant la prolifération cellulaire</li> <li>* Apport d'hormones</li> <li>* Apport de facteurs d'attachement contribuant à la bonne adhérence indispensable à la division cellulaire</li> <li>* Rôle protecteur : augmente la viabilité cellulaire et la stabilité des produits cellulaires</li> <li>* Propriétés nutritives (nombreux métabolites, ions, oligoéléments et lipides en solution)</li> <li>* Pouvoir tampon</li> <li>* Apport de protéines de transport (transportent des substances de faible poids moléculaire, fer et acides gras par exemple)</li> <li>* Pouvoir détoxifiant : absorbe et neutralise les toxines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Composition non définie</li> <li>* Variabilité de lot à lot</li> <li>* Problèmes d'innocuité : il s'agit d'un produit biologique qui même prélevé stérilement et stérilisé par filtration peut renfermer des virus, des toxines, des prions, des mycoplasmes</li> <li>* Teneur élevée en protéines donc problème d'interférences lors de la purification des protéines d'intérêt synthétisées par les cellules (ex : protéines recombinantes, protéines avec application thérapeutique)</li> <li>* Approvisionnement variable donc variabilité des prix</li> <li>* Favorise préférentiellement la croissance des fibroblastes dans des cultures primaires (par rapport aux autres types de cellules)</li> </ul>

*NB : Le sérum semble jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, lors de la culture à long terme.*

***NB** : Le sérum présente l'avantage d'apporter des inhibiteurs de protéases, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et l' $\alpha$ 1-antitrypsine, qui inactivent la trypsine que l'on utilise en routine pour le repiquage des cultures.*

### 2.3. Milieux définis ou milieux synthétiques sans sérum

Devant la faible reproductibilité de certains résultats, les chercheurs ont évolué vers la mise au point de milieux dépourvus de sérum, enrichis en facteurs rigoureusement contrôlés. Ces milieux sont appelés milieux définis.

Différents **constituants définis** sont **additionnés à des concentrations définies à un milieu synthétique de base riche** (type HAM F12 ou MCDB 104). L'addition de ces substances varie en fonction des exigences du type cellulaire cultivé.

→ Nature des constituants ajoutés à un milieu de base riche

#### \* Hormones :

- Insuline :  
(Utilisée à la concentration de 5 à 10  $\mu$ g/mL). C'est une substance importante pour certaines lignées cellulaires. Cependant elle n'est **pas très stable dans les milieux sans sérum**, c'est pourquoi on peut admettre que pour beaucoup de cellules elle **ne joue un rôle important qu'en début de culture**. Elle serait inutile **lorsque les cellules sont en pleine croissance**. L'insuline **peut être remplacée par l'IGF (Insuline-like Growth Factor)**.
- Hydrocortisone
- Progestérone
- Oestradiol
- Hormone de croissance
- Somatomédine
- Hormone parathyroïde

#### \* Facteurs de croissance :

Les facteurs de croissance se classent plutôt comme étant des substances paracrines ou autocrines, appelés de façon plus générale, médiateurs chimiques locaux. Leur action sur les cellules est déclenchée par la formation d'un complexe spécifique avec un récepteur et il en résulte alors soit une augmentation de la taille de la cellule, soit une augmentation de la population cellulaire, soit une induction ou un blocage d'une étape de différenciation.

Les facteurs de croissance sont des **polypeptides** dont la majorité d'entre eux sont **actuellement produits par recombinaison** et donc disponibles en quantité suffisante. Toutefois, **un milieu sans sérum et contenant ces facteurs devient très onéreux**. Un tel milieu n'est **utilisable** que pour la recherche, mais **rarement pour la production**.

- EGF (*Epidermal Growth Factor*)
- FGF (*Fibroblast Growth Factor*)
- NGF (*Nerve Growth Factor*)
- PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor* = *facteurs de croissance des cellules endothéliales d'origine plaquettaire*)
- TGF (*Transforming Growth Factor*)
- Différents interférons
- Différentes interleukines

#### \* Facteurs d'attachement :

→ Les supports tapissés (« coatés ») avec un substrat protéique constituent des surfaces de choix pour la culture des cellules dont l'adhésion est difficile. Ils favorisent aussi la différenciation des cellules cultivées. Certains facteurs d'attachement peuvent aussi être introduits en solution dans le milieu de culture.

- **Poly-L-lysine** : c'est une molécule synthétique présentant de nombreuses charges positives. La poly-lysine amplifie l'interaction électrostatique entre les ions négatifs de la membrane cellulaire et les ions positifs de la surface cellulaire présents dans les facteurs de fixation de la surface de la culture. Une fois **adsorbée en surface des cellules, elle augmente le nombre de sites chargés positivement disponibles pour la fixation des cellules au support plastique chargé négativement.**

- **Collagène** : **glycoprotéine** fibreuse dont le rôle peut être comparé à une **armature**. C'est une protéine structurale, les molécules de collagène jouent le rôle de câble entre les cellules de notre corps et c'est la protéine la plus abondante de l'organisme (notion de « colle »). Il est sécrété par les cellules des **tissus conjonctifs**.

- **Fibronectine** : glycoprotéine qui contribue à l'organisation de la matrice extracellulaire et à l'adhésion cellulaire. In vivo c'est une molécule-clé pour l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (les récepteurs de la fibronectine sont notamment les intégrines). *La fibronectine est également un facteur limitant la prolifération tumorale. Les cellules métastatiques n'ont pas de fibronectine qui se lie à leur membrane.*

- **Laminines** : famille de glycoprotéines qui forment le constituant majeur de la **lame basale**, en dehors du **collagène**. *La lame basale est un assemblage de **protéines** et **glycoprotéines** extracellulaires sur lequel reposent les **cellules épithéliales**. Elle permet l'adhérence de la cellule épithéliale au **tissu conjonctif** sous-jacent. Les molécules constitutives de la lame basale sont **sécrétées** par les cellules épithéliales.*

- **Gélatine** : Elle est obtenue par l'ébullition prolongée de la peau animale, des os et des tissus conjonctifs. Elle est constituée à environ 98-99 % (en poids à sec) de protéines. Elle est utilisée comme agent collant.

#### \* **Protéines de transport** :

- **Albumine sérique bovine** (BSA ou *SAB en anglais*)

L'albumine peut être utilisée à une concentration maximale de 5g/L (souvent 0,1-1 g/L). Elle remplit différentes fonctions dont celle d'être le **transporteur de substances lipophiles** (acides gras, éléments de trace, hormones et vitamines liposolubles), mais aussi de permettre la **détoxification du milieu** (transport de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fixation de toxines).

**L'albumine peut être remplacée par le PEG-20000, la Pluronic F68 ou le TWEEN 85, qui peuvent aussi protéger les cellules contre les effets du cisaillement.** Le dextrane et les cyclodextrines peuvent remplacer l'albumine pour leur potentiel d'absorption des lipides, ce qui permet d'approvisionner les cellules en ces substances.

- **Transferrine**

Elle est utilisée en concentration de 1 à 100 mg/L. Son **premier rôle est de transporter le fer** (d'où son nom), mais elle **permet également de détoxifier d'autres métaux**. La transferrine **peut être remplacée par du fer** (Fe<sup>++</sup> ou Fe<sup>+++</sup>), **complexé par le citrate**, la glycyglycine ou d'autres acides organiques.

#### \* **Antioxydants** :

Le rôle des antioxydants est très **important lors de cultures menées en milieu sans sérum**. Ils **doivent inactiver les peroxydes générés au cours de la croissance, une fonction normalement assurée par le sérum**.

On utilise du **β-mercaptoéthanol** (environ 10μM), du **Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>** (10-60 nM ; *le Se est essentiel pour l'activité de la glutathion peroxydase*), du **glutathion**, les **vitamines E et C**, du **pyruvate**, etc.

#### \* **Substances lipidiques** :

Les substances lipidiques sont essentielles pour les cellules car elles **contiennent les précurseurs de la synthèse des prostaglandines**, nécessaires pour certaines cellules particulières, **et sont incorporées après d'éventuelles modifications dans les membranes cellulaires**.

L'**éthanolamine** (10-20 μM) est requise dans la formulation de la plupart des milieux, *l'inositol ne l'étant que dans quelques cas seulement*.

Il existe une **longue liste d'acides gras, plus ou moins saturés**, qui sont essentiels pour certaines lignées cellulaires, par exemple, **acide lipoïque, acide linoléique**.

De plus, selon les cellules, il est nécessaire d'ajouter des **hormones, comme les dérivés du cholestérol, l'hydrocortisone ou des analogues plus stables (la dexaméthasone)**, etc. Par définition ces substances sont lipophiles, sauf l'éthanolamine et l'inositol.

Classiquement, elles sont ajoutées après formation de complexes avec la BSA, mais plus récemment aussi avec la dextrane ou les dérivés de dextrine.

\* **Facteurs divers :**

- Métaux à l'état de trace : L'importance de ces minéraux ne cesse de grandir, en particulier dans la culture en milieu défini. Citons par exemple le **sélénium**, composant de l'enzyme glutathion-peroxydase ; cette enzyme intervient dans la dégradation des peroxydes toxiques métabolisés par la cellule au cours de la culture.

- Putrescine : La putrescine (1,4-diaminobutane) est le produit de la décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase. C'est une diamine. Les polyamines ajoutées aux cellules en culture induisent la synthèse d'une protéine qui inhibe l'ornithine décarboxylase. L'ornithine (acide 2,5-diaminopentanoïque) est un acide aminé. Cet acide aminé n'est pas codé par le code génétique. À ce titre, il n'entre pas dans la composition des protéines. C'est l'un des produits de l'action de l'arginase dihydrolase sur la L-arginine pour former l'urée.

- Acide ascorbique (= vitamine C) : la vitamine C joue un rôle important dans le maintien du potentiel d'oxydo-réduction, mais ses différentes fonctions sont difficiles à évaluer car elle s'oxyde rapidement dans les milieux de culture et sa demi-vie est très brève. *La vitamine B12 et la vitamine E (tocophérol) sont rarement présentes.*

- Précurseurs des acides nucléiques comme la thymine, l'uridine, adénosine. Les avis sont partagés quant à la réelle utilité de ces molécules car les cellules semblent capables de synthétiser ces précurseurs d'acides nucléiques à partir de vitamines comme l'acide folique.

\* **Substances non définies :**

Les substances non définies, comme les **peptones**, la Primatone RL, etc., sont **utilisées** sous forme dialysée ou non dialysée **pour améliorer les milieux avec ou sans sérum**. Elles **apportent des acides aminés, des acides gras, des sels, des oligopeptides, etc.** L'avantage est qu'un milieu sans sérum contenant ces substances peut être plus facilement utilisé qu'un milieu sans ces ajouts. L'inconvénient est qu'**un milieu amélioré par ces substances n'est plus défini**.

→ Avantages et inconvénients des milieux définis

Les avantages du milieu défini sont évidents :

- la croissance cellulaire et la productivité sont optimisées,
- la reproductibilité est garantie,
- parfois, le prix du milieu peut même être réduit (si pas trop d'addition de facteurs de croissance).

**La grande difficulté réside dans la nécessité de développer et d'optimiser les milieux sans sérum, pour les différents types de cellules utilisés, en effet leur emploi est dédié.**

De plus, ces milieux doivent être optimisés non seulement pour la lignée cellulaire, mais **aussi pour les conditions de culture**. En effet, les cellules sont généralement moins exigeantes dans les systèmes de culture à haute densité cellulaire, un phénomène qui reflète la production autocrine de facteurs de croissance, alors qu'à basse densité, ces facteurs sont trop dilués.

UTILISATION DES MILIEUX SANS SERUM = MILIEUX DEFINIS	
Avantages	Inconvénients
* Qualité constante * Environnement cellulaire défini * Satisfaction optimale des critères d'innocuité * Simplification des étapes de purification de protéines produites par la culture cellulaire * Approvisionnement constant	* Emploi pouvant nécessiter une adaptation des cellules * Emploi souvent limité quant aux types cellulaires et aux applications * Moins bonne viabilité cellulaire à densité élevée * Moins bonne protection des cellules et des produits * Pas nécessairement moins chers que les milieux supplémentés en sérum de veau fœtal

### 3. Environnement physico-chimique

#### 3.1. Les différents facteurs à considérer : oxygène, température, pH et osmolarité

**Oxygène** : Les **cellules animales sont aérobies strictes**, l'apport d'oxygène est donc indispensable. Il est présent dans l'air atmosphérique pour les cultures statiques placées en étuve ou apporté par injection d'air pour les cultures conduites en bioréacteur.

**NB** : En culture monocouche en flacon plat, culture statique, apport oxygène par air ambiant et on doit :

- dévisser le bouchon des flacons
- la hauteur de milieu au dessus du tapis ne doit pas être élevée pour que le transfert de l'oxygène aux cellules se fasse correctement en effet  $O_2$  se dissout peu dans l'eau (cette faible hauteur conditionne le volume de milieu utilisable dans un flacon de culture).

**Température** : Les cellules doivent être placées à la température qui correspond à celle de l'organisme dont elles sont issues. La **régulation de la température est obligatoire** (enceinte thermostatée ou bioréacteur équipé d'un système de régulation de la température).

**pH** : Les cellules doivent être placées au pH qui correspond à celle de l'organisme dont elles sont issues. La **régulation du pH est obligatoire** pour les cellules de mammifères. Elle peut être assurée par deux systèmes :

- soit apport d'une molécule tampon dans le milieu de culture ;
- soit apport de bicarbonate de sodium dans le milieu et apport de  $CO_2$  gazeux dans l'atmosphère de l'étuve ou par injection dans un bioréacteur.

**Osmolarité** : Afin de prévenir l'**augmentation de l'osmolarité du milieu due à l'évaporation**, l'atmosphère de l'incubateur doit être saturée en vapeur d'eau, pour cela on « inonde » le plancher de l'étuve. En effet en culture monocouche, l'épaisseur du milieu est faible et l'évaporation à  $37^\circ C$  n'est pas négligeable.

#### 3.2. La régulation du pH

→ Les deux systèmes utilisés : le couple ( $NaHCO_3^-$ ,  $CO_2$ ) et l'HEPES

☆ Intervention du couple ( $HCO_3^-/CO_2$ ) dans la régulation du pH

Dans le système tampon ( $HCO_3^-/CO_2$ ) le **bicarbonate de sodium est en solution dans le milieu de culture** et il est en équilibre avec un **pourcentage de 5 % en  $CO_2$  dans l'atmosphère ambiante de culture**. Son utilisation implique de disposer d'une **étuve à  $CO_2$** .

Le **pKa** de ce système tampon est de **6,3**.

Le fonctionnement de ce système tampon est illustré ci-dessous :

Aux pH situés aux alentours de 7 pendant la culture, l'équilibre chimique entre les formes acide et basique du couple régulateur du pH est le suivant :  $CO_2 + 2H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H_3O^+$

L'acide carbonique  $H_2CO_3$  est un produit très instable donc on peut proposer l'équation simplifiée suivante :

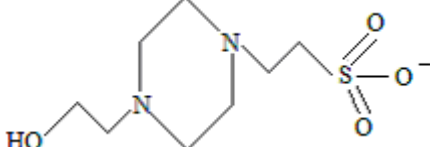


- Le métabolisme cellulaire (respiration donc dégagement de  $CO_2$ ) entraîne une acidification du milieu selon cette équation,
- si on supplémente le milieu en bicarbonate de sodium  $NaHCO_3$  (c'est-à-dire  $HCO_3^-$ ) on déplace l'équilibre et on limite l'acidification,
- il faut aussi évoquer le fait qu'à  $37^\circ C$  l'ion  $HCO_3^-$  est volatil et que sa désorption entraîne une basification du milieu selon la même équation,
- Dans cette situation, le bicarbonate s'épuiserait dans le milieu, il faut donc le régénérer et c'est le rôle de l'apport du  $CO_2$ . Toujours selon la même équation chimique, le  $CO_2$  apporté peut être converti en ion bicarbonate  $HCO_3^-$ . L'enrichissement en  $CO_2$  à 5 % dans l'atmosphère de l'étuve permet donc de maintenir le tampon carbonate.

☆ Intervention de l'HEPES dans la régulation du pH



Il s'agit d'une molécule organique tampon possédant un groupement fonctionnel capable de capter ou de libérer un proton.

	<p>acide[(hydroxyéthyl-2)-4-pipérazinyl-1]-2-éthane sulfonique</p> <p><math>C_8H_{18}N_2O_4S</math>, <i>free acid</i> ; MM = 238,3</p> <p><math>C_8H_{18}N_2O_4SNa</math> <i>sodium salt</i></p>
---	--

Le pKa de l'HEPES est de 7,55.

### ☆ Comparaison des deux systèmes tampon utilisables

	<b>Le couple <math>NaHCO_3 / CO_2</math></b> (bicarbonate dans le milieu et gaz carbonique atmosphérique à 5 %)	<b>La molécule organique tampon HEPES</b> (en solution dans le milieu de culture)
<b>Equipement</b>	Nécessite un équipement particulier = étuve à $CO_2$	Pas d'équipement particulier
<b>Efficacité</b>	pKa = 6,3 il est éloigné de la valeur du pH à réguler (pH ~7) moins bon pouvoir tampon	pKa = 7,3 il est proche de la valeur du pH à réguler (pH ~7) bon pouvoir tampon
<b>Risque de toxicité</b>	Pas de toxicité cellulaire	Toxicité éventuelle à l'égard de certaines cellules

### → L'indicateur coloré : rouge de phénol

\* L'indicateur coloré révèle à tout moment l'ordre de la valeur du pH de la suspension et par là même, grossièrement, l'état de la culture.

\* Le rouge de phénol est un **bon indicateur coloré** pour suivre l'évolution du pH au cours de la culture car, avec un pKa de 7,2-7,6, sa **zone de virage se situe juste à la valeur du pH que l'on veut maintenir**. Le rouge de phénol, qui **vire du violet au jaune des pH alcalins aux pH acides**, à pH 7 il confère une **coloration rouge orangé aux milieux de culture**.

\* Un **milieu correctement régulé** devra présenter une **coloration rouge-orangée**.

→ Une coloration **rouge violacée** est le signe d'un pH trop basique. C'est le signe d'une **mortalité** cellulaire, les cellules lysées libèrent des protéines qui alcalinisent le milieu.

→ Une coloration **jaune** celui d'une acidification importante. Cette acidification s'observe lorsque le **nombre de cellules devient trop important**, elle est due à la dissolution du gaz carbonique produit lors de la respiration des cellules.

Un milieu jaunissant implique un **repiquage obligatoire** des cellules.

→ Si l'**acidification du milieu s'accompagne d'une opacification** c'est alors le signe d'une **contamination bactérienne**.

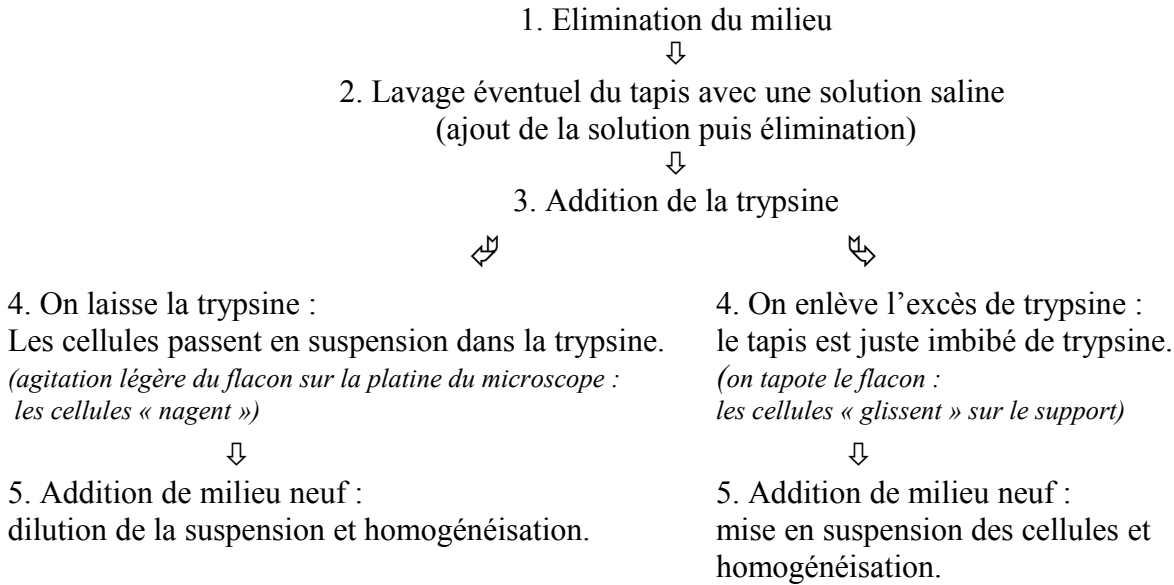
## 4. Le repiquage ou passage

### 4.1. Passage par trypsination

- La **trypsine est une protéase** (EC 3.4.21.4) qui catalyse le clivage de la liaison peptidique entre un acide aminé basique (lysine ou arginine) et un acide aminé de radical indifférent. Elle est généralement isolée du pancréas (bovin ou porcin). La trypsine ne requiert pas la présence d'ions spécifiques ou de cofacteurs. Elle sera donc utilisable en solution saline.
- Elle permet d'hydrolyser les protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire et provoque ainsi le détachement des cellules du support. Son temps d'action doit être limité pour ne pas risquer d'altérer les membranes cellulaires.
- La trypsine est **préparée dans une solution d'EDTA** qui est un chélateur d'ions divalents. En effet, les ions  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$  sont impliqués dans l'adhérence. Leur chélation contribue donc aussi au détachement des cellules.

- Le **détachement des cellules est suivi au microscope inversé** et se traduit par un changement de morphologie des cellules qui deviennent sphériques. Les cellules ne sont plus immobilisées et cela se traduit par un passage en suspension transitoire des cellules.
- L'action de la **trypsine est arrêtée par dilution avec du milieu neuf** et par **l'intervention d'inhibiteurs contenus dans le sérum de veau fœtal** ( $\alpha$ 2macroglobuline et  $\alpha$ 1antitrypsine), *l'inhibiteur isolé du germe de soja est aussi très utilisé.*

**Repiquage par trypsination : Il existe deux protocoles d'utilisation de la trypsine**



**4.2. Utilisation de racloir**

Les racloirs sont conditionnés individuellement sous emballage stérile.

Leur utilisation est **simple et rapide**.

Toutefois, la **viabilité cellulaire est moins bien préservée** qu'avec la trypsine bien gérée.

La formation d'**amas cellulaires** peut être responsable d'une **hétérogénéité des cultures subséquentes**.

L'utilisation du racloir est plutôt réservée à la récupération de cellules qui vont être lysées pour des études ultérieures et donc non remises en culture.

**5. La culture à grande échelle des cellules animales**

*\* Voir images jointes*

<b>« Scaling-up solutions »</b>		
Flacon plat à étages	→ cellules adhérentes	
Bouteille (« roller »)		
Flacon cylindrique avec agitation magnétique (« spinner »)	→ cellules en suspension	
Bioréacteur	fibres creuses	→ cellules adhérentes
	microsupports	
	classique	→ cellules en suspension

**6. Applications de la culture des cellules animales**

- **Obtention de matériel biologique cellulaire pour des études en recherche fondamentale**
- **Remplacement des organismes animaux pour limiter l'expérimentation animale**
  - Etudes physiologiques (recherche fondamentale ou appliquée)
  - Test de cytotoxicité en pharmacologie ou cosmétologie par exemple
- **Production de métabolites divers**  
(hormones, interférons, interleukines, facteurs de croissance, anticorps monoclonaux ...)
- **Culture de tissus ou d'organes**
  - Etudes physiologiques (recherche fondamentale ou appliquée)
  - Chirurgie réparatrice (peau, muscle, foie, vaisseaux sanguins, .... et peut-être un jour neurones)
- **Production de vaccins viraux**

### **RISQUE BIOLOGIQUE :**

#### **Les mesures qui doivent être mises en œuvre pour le niveau de confinement 2**

##### **→ Conception du laboratoire**

- pictogramme
- laboratoire séparé par une porte
- accès réglementé

##### **→ Aménagements internes**

- P.S.M. (II) ;
- vêtement de protection restant au laboratoire
- lavabos à commande non manuelle
- résistance des surfaces à l'eau pour les sols
- surfaces paillasse résistante aux acides, alcalis, solvants et désinfectants
- présence d'un autoclave à proximité
- centrifugeuse si tubes étanches

##### **→ Pratiques opératoires**

- utilisation de gants pour tous les gestes à risque
- minimiser les aérosols
- pipetage mécanique
- décontamination quotidienne des paillasses
- inactivation du matériel contaminé, des déchets avant sortie
- stockage des agents biologiques en lieu sûr
- utilisation de conteneurs spécifiques pour aiguilles, objets tranchants ou coupants souillés