

# CHAPITRE 1 MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



## Cours 1:

## « Culture Cellulaire Générale »

Pr A. Ait-Lounis Master BI 2018

# I- Introduction à la culture cellulaire

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- 1-Historique de la culture cellulaire
- 2-Culture tissulaire, culture d'organe et culture cellulaire
- 3- Pourquoi faire pousser les cellules animales en culture?
- 4- Les avantages et inconvénient de la culture cellulaire
- 5- Exercice :évaluation



## 1- Histoire de la culture cellulaire

In 1907,  
**Ross Harrison**

Découvert comment pousser les organes à l'extérieur de leur environnement. Cultiver les cellules nerveuse de la grenouille avec la technique « *culture en gouttes pendantes* »

Pendant cette période, « culture cellulaire" était une curiosité, il a fallu attendre la fin des années 1940 et le début des années 1950 pour voir apparaître plusieurs développements qui ont rendu la culture cellulaire largement disponible comme outil pour les scientifiques.

# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



1907

**Harrison**

nerve

outgrowth



**1913-1923**

**Carrel**

Condition

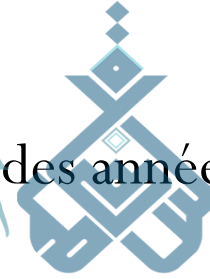
aseptique

- L'amélioration des techniques d'obtention des tissus.
- L'élaboration des règles d'aseptie.
- L'étude des besoins nutritionnels.

# ➤ The early history of cell culture

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



le début des années 1950

1907  
Harrison

1952 Gey  
Lignée HeLa

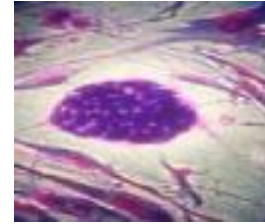
année '50 et  
'60 Dulbecco,  
Green

1913-1923  
Carrel

1955  
Eagle  
"milieu de  
culture »



# ➤ The early history of cell culture



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

1907  
**Harrison**  
nerve  
outgrowth

1952 **Gey**  
Established  
HeLa cells

Late '50s and  
'60s  
**Stoker,**  
**Dulbecco,**  
**Green**  
viral  
transformation

1964  
**Littlefield**  
somatic cell  
hybrids

1976  
**Sato**  
hormones  
and growth  
factors  
required in  
SF medium

1986  
**Martin and  
Evans**  
Mouse ES  
cells

1885  
**Roux**  
cells can  
live outside  
the body

1913  
**Carrel**  
aseptic  
conditions



1955  
**Eagle**  
"defined"  
medium

1961  
**Hayflick  
and  
Moorhead**  
Finite  
number of  
divisions

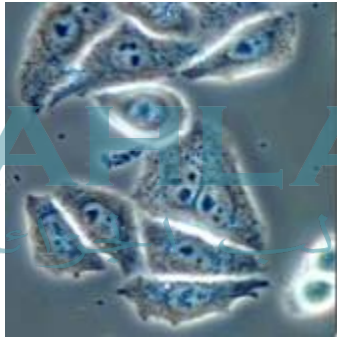
1965  
**Ham**  
clonal  
growth of  
mammalian  
cells

1977  
**Wigler and  
Axel**  
transfections

1998  
**Thomson  
and  
Gearhart**  
human ES  
cells

# ➤ The early history of cell culture

1907  
**Harrison**  
nerve  
outgrowth

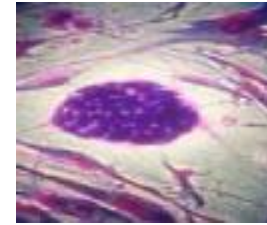


1952 **Gey**  
Established  
HeLa cells

Late '50s and  
'60s  
**Stoker,**  
**Dulbecco,**  
**Green**  
viral  
transformation

1964  
**Littlefield**  
somatic cell  
hybrids

1976  
**Sato**  
hormones  
and growth  
factors  
required in  
SF medium



1986  
**Martin and**  
**Evans**  
Mouse ES  
cells

1885  
**Roux**  
cells can  
live outside  
the body

1913  
**Carrel**  
aseptic  
conditions



1955  
**Eagle**  
"defined"  
medium

1961  
**Hayflick**  
**and**  
**Moorhead**  
Finite  
number of  
divisions

1965  
**Ham**  
clonal  
growth of  
mammalian  
cells

1977  
**Wigler and**  
**Axel**  
transfections

1998  
**Thomson**  
**and**  
**Gearhart**  
human ES  
cells

## 2-Culture de tissu, d'organe et cellulaire.

### « culture d'organe »

le maintien en dehors de l'organisme, d'organes ayant conservé leur structure et leur fonction (coeur perfusé).

Une partie ou la totalité de l'organe peut être cultivé in vitro

### « culture de tissu »

le maintien en dehors de l'organisme, des tissus de manière à conserver les fonctions spécifiques de chaque tissu.

### « culture cellulaire »

le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capable de se diviser in-vitro et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques



## 3- À quoi servent les cultures de cellules in vitro?

### 3-1 Systèmes de modèles

Les cultures cellulaires fournissent de bons systèmes de modèles pour étudier:

- 1) La biologie et la biochimie cellulaires de base,
- 2) les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies,
- 3) les effets des médicaments sur les cellules,
- 4) Le processus et le déclenchement du vieillissement
- 5) les études nutritionnelles.

SAHILA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



### *3-2 Tests de toxicité:*

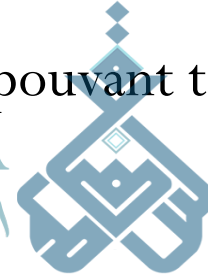
Les cellules en culture sont largement utilisées seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux pour étudier:

- 1) Les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules.
- 2) Les cultures de cellules dérivées du foie et des reins sont particulièrement importantes.

### *3-3 Recherche sur le cancer*

Les cellules normales et les cellules cancéreuses pouvant toutes deux être cultivées:

المصدر الاول للطالب الجزائري



- 1) En utilisant des produits chimiques, virus et rayonnements, de convertir les cellules cultivées normales en cellules cancéreuses. Ceci permet ainsi d'étudier les mécanismes conduisant à ce changement.
- 2) Les cellules cancéreuses cultivées servent également de système de test pour déterminer les médicaments et méthodes adaptées pour détruire sélectivement certains types de cancers.

### 3-4 Virologie

- 1) Une des utilisations les plus précoces et les plus importantes des cultures cellulaires a été la réplication de virus dans les cultures cellulaires (à la place des animaux) pour les utiliser dans la production de vaccins.
- 2) Les cultures cellulaires sont également largement utilisées en détection clinique et isolement de virus
- 3) En recherche fondamentale pour étudier comment ils se développent et infectent les organismes.

### *3-5 La cellule comme usine de production*

- 1) La production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de vaccins.  
(les vaccins contre la polio, la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole)
- 2) la production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des protéines présentant une valeur médicale ou commerciale. Ceci inclut les anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc.
- 3) l'utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes. La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce.

### 3-6 Génie génétique

- 1) La capacité de transférer ou de reprogrammer les cellules en culture par du nouveau matériel génétique (ADN et gènes) a fourni un outil précieux aux biologistes moléculaires désireux d'étudier les effets cellulaires de l'expression de ces gènes (nouvelles protéines).
- 2) Ces techniques peuvent également être utilisées pour produire ces nouvelles protéines en grande quantité dans les cellules en culture pour les étudier.
- 3) Les cellules d'insectes sont largement utilisées comme usines cellulaires miniatures pour exprimer des quantités substantielles de protéines qu'elles fabriquent après avoir été infectées par des baculovirus génétiquement modifiés.

### *3-7 Thérapie génique*

La capacité de modifier génétiquement des cellules a également conduit à leur utilisation en thérapie génique.

المصدر الأول للطالب الجزائري

Les cellules peuvent être prélevées sur un patient souffrant d'une déficience dans un gène fonctionnel, et le gène manquant ou endommagé peut alors être remplacé.

Les cellules sont cultivées un moment puis réimplantées dans le patient.

Une approche alternative consiste à placer le gène manquant dans un vecteur viral puis "d'infecter" le patient par le virus en espérant que le gène manquant sera exprimé dans les cellules du patient.



## 4- Avantages et inconvénients de la culture cellulaire

### Avantages

1. contrôle des paramètres physico-chimique (pH. température. Pression osmotique . O<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub>, etc.)
2. Contrôle des conditions physiologiques (constitution du milieu , etc.)
3. Homogénéité du type cellulaire (obtenu après plusieurs passage)
4. Economique car ne nécessite pas des gros moyens comme pour *in vivo*..
5. Légale et éthiquement accepté

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري





## Inconvénients

1. Expertise: matériels stérile, contamination bactérienne
2. Quantité: 10-100 g de cellules
3. Dédifférenciation et Sélection: après plusieurs passage de croissance continu, les caractéristiques des cellules peuvent changer comparé à la lignée initiale
4. Instabilité: problème majeur pour plusieurs lignées cellulaires continues

## Points majeurs du développement de la culture cellulaire

1) le développement des antibiotiques a permis d'éviter plus facilement de nombreux problèmes de contamination qui empoisonnaient jusqu'alors les essais de culture.

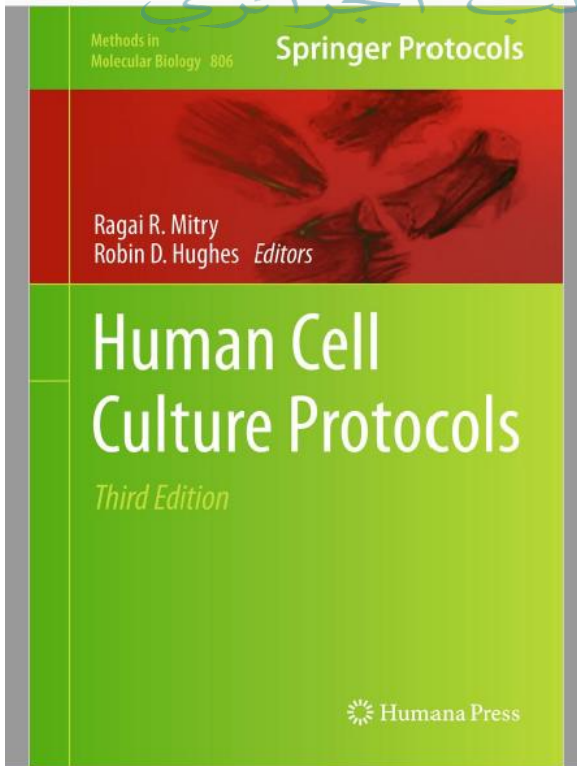
2) l'utilisation de trypsine pour retirer les cellules des récipients de culture, nécessaires pour obtenir des lignées cellulaires cultivées en continu (comme les cellules HeLa)

3) développer des milieux de culture cellulaire standardisés chimiquement définis facilitant énormément la culture de cellules.

# Ouvrage de référence de la culture cellulaire

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



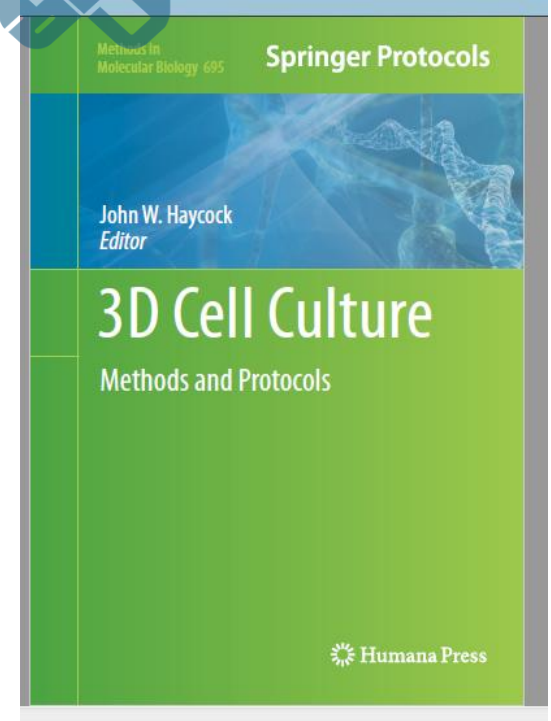
## Epithelial Cell Culture Protocols

Second Edition

Edited by

Scott H. Randell and M. Leslie Fulcher

*Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center,  
The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA*



# SAHLA MAHLA

## CHAPITRE 1

المصدر الأول للطلاب الجزائريين



## Cours 2: « Cultures primaires »

Pr A. Ait-Lounis- Master BI-CAA –  
version révisée 2018

# Plan

1- Origine et obtention cellulaire

2- Principe de la culture primaire

3- Isolement des tissus de souris ou biopsie humaine;

4- Conditions de la culture primaire

4.1 culture d'explants

1. désagrégation enzymatique

2. trypsine à chaud

3. Trypsine à froid

4.2 isolement d'un type cellulaire précis

5- Potentiel prolifératif des cellules normales

5- Culture primaire résumé



# 1. Origine et obtention des cellules

On distingue 2 types de cellules dans l'organisme

-les **cellules circulantes ou libres**, telles que les cellules sanguines,

Les premières sont récupérées facilement par centrifugation différentielle,

-les **cellules des tissus solides**, peuvent être récupérées selon 2 procédés :

-migration cellulaires à partir **d'explant**


-dissociation du tissu avec libération des cellules.

La culture de cellules obtenues à partir d'organe ou de tissu est appelée **primoculture ou culture primaire**.

## 2- Principes de la culture primaire

- Cultures de cellules isoler de leur tissu d'origine
- Obtenues soit par migration à partir d'un explant, soit par dissociation d'un tissu (type cellulaire particulier)
  - ✓ À partir d'explant, on récupère les fibroblastes car se sont des Cellules qui adhèrent et migrent ;
  - ✓ A partir d'un tissu: disperser et isoler les cellules à partir tissu séparer et sélectionner le type cellulaire d'intérêt.

## 2-1 Etapes nécessaire avant la mise en culture

- SAHLA MAHLA
- المصدر الأول للطالب الجزائري
- 
- Extraction du tissu
    - Passage de l'état tissu compact en tissu dissocié
    - Désagrégation mécanique ou enzymatique du tissu pour produire des cellules en suspension.
    - les cellules normales (pas transformées) ont besoin de s'attacher à une surface plate afin de survivre et de proliférer.
    - Les cellules transformées généralement prolifèrent en suspension.
  - Dissection/désagrégation (digestion)
  - Mise en culture des cellules dans des flasques.



## 2.2 Conditions nécessaire pour la mise en culture

- Enlever les tissus nécrotiques et les tissus gras lors de la dissection.
- Couper le tissus finement afin d'éviter l'endommagement
- La concentration des cellules extraite des tissus doit être très élevée afin d'arriver à sauvegarder les cellules
- Milieu riche (Ham's F12) est nécessaire afin de maintenir les cellules en bonne état (éviter les milieux simple comme Eagle's MEM) (détails chapitre : milieux de culture)
- Sérum de veau foetal est meilleur que celui de cheval
- Le choix du milieu est important selon le type cellulaire
- Tissu embryonnaire:
  - Dissocie rapidement et contient plus de cellules vivantes. Les cellules embryonnaires prolifèrent plus rapidement que les tissus adulte.

### 3. Isolement des tissus

SAHLA MAHLA



- **Préparation du tissu**

- Nettoyer/stériliser avec 70% ETOH
- Enlever le tissu aseptiquement
  - La dissection de tissu ne se fait jamais dans la salle de culture

- **Tissus issus d'animaux ou de prélèvement humain**

- Nécessite de prendre des autorisations
  - Manipulation des tissus humain labo2

## Embryons de souris

- Source importante pour la culture des cellules fibroblastique indifférenciés.

## Embryons de poulet

- À cause de la taille facile à disséquer
  - Contient essentiellement des cellules mésenchymateuses
    - Test de Prolifération
    - Source importante pour la multiplication virale
- Organes sont plus visibles
  - Les organes sont plus grands facilitent la dissection
- Probablement nécessite une autorisation? (selon les pays?)

# Biopsie humaine

- Présente un problème sérieux et mise en place laborieuse
- Nécessite une autorisation
  - Soit de l'hôpital ou de la comité éthique
  - Attendre que le chirurgie opère
  - Donneur ou le patient
- Tissus provient de biopsie
- Ne convient pas toujours à nos conditions de culture
  - Prélèvement et la conservation est fastidieuse
  - Nécessité d'une fiche technique détaillé du tissus (âge, sexe)
  - Notification de la date d'arrivé

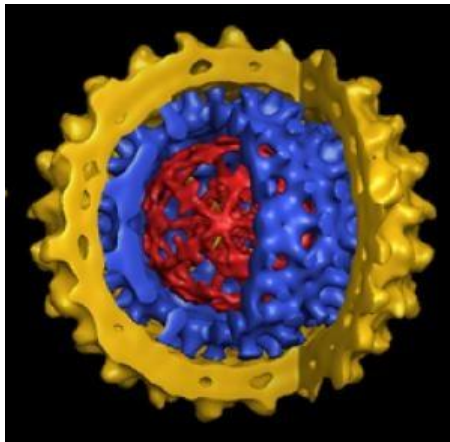
SAHLA MAHLA  
المصدر الأول للطالب الجزائري



- Note de sécurité

- Matériel humain est manipulé dans le labo de sécurité 2
- Vérifier que le patient à bien subit les tests pour les pathogènes dangereux pour l'homme comme :

○ **Hepatitis** المصدر الاول للعدوى الجزائري

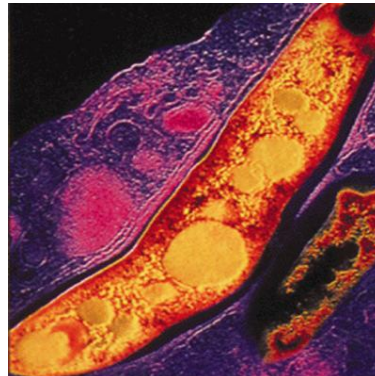


○ **HIV**



*Mycobacterium tuberculosis*

○ **TB**



## 4. Conditions de la culture primaire

### Techniques de dissociation tissulaires pour la culture primaire

المصدر الاول للطالب الجزائري



- Techniques mécaniques
  - Implique dissection
    - avec ou sans macération
  - S'applique sur les tissus mous (pancréas, thymus,..)
- désagrégation enzymatiques
- Association des deux procédés et le plus souvent utilisés

## 3.1 Culture d'Explant

● Méthode de base pour la culture tissulaire

● Fragmentation tissulaire المصدر الاول للتأليف البيولوجي



- Prélèvement du sang plasmatique
- Etaler sur une lamelle
- Inverser la lamelle et la déposer sur une lame
  - Examiner avec le conventionnel microscope
- Pratique pour une petite quantité de cellules
- Inconvénient:
  - Faible capacité d'attachement pour beaucoup de tissus

# désagrégation enzymatique

contacte Cellule-cellule via une variétés de glycopeptides

SAHLA MAHLA

- molécules d'adhésion cellulaire ou CAMs

المصدر الأول للطالب الجزائري

- $\text{Ca}^{++}$  indispensable à l'intégrité des jonctions cellulaires

Et des jonctions cellule-matrice (cadherines)

Dissocier les jonctions Cellule-cellule via une variétés de chélateurs

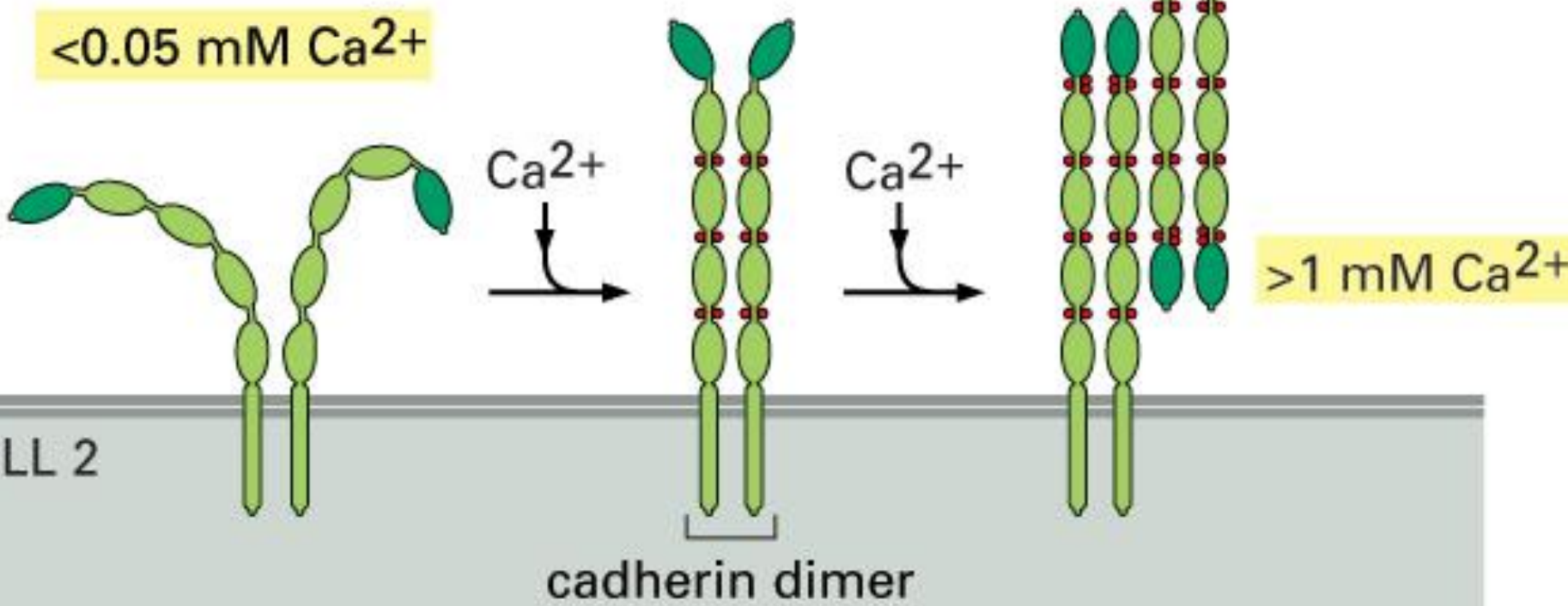
- Les agents chélateurs : EDTA/EGTA



- Effet du calcium extra-cellulaire sur les domaines extra-cellulaires des molécules de cadhérine

SAHLA MAHLA

CELL 1 المصدر الاول للطالب الجزائري



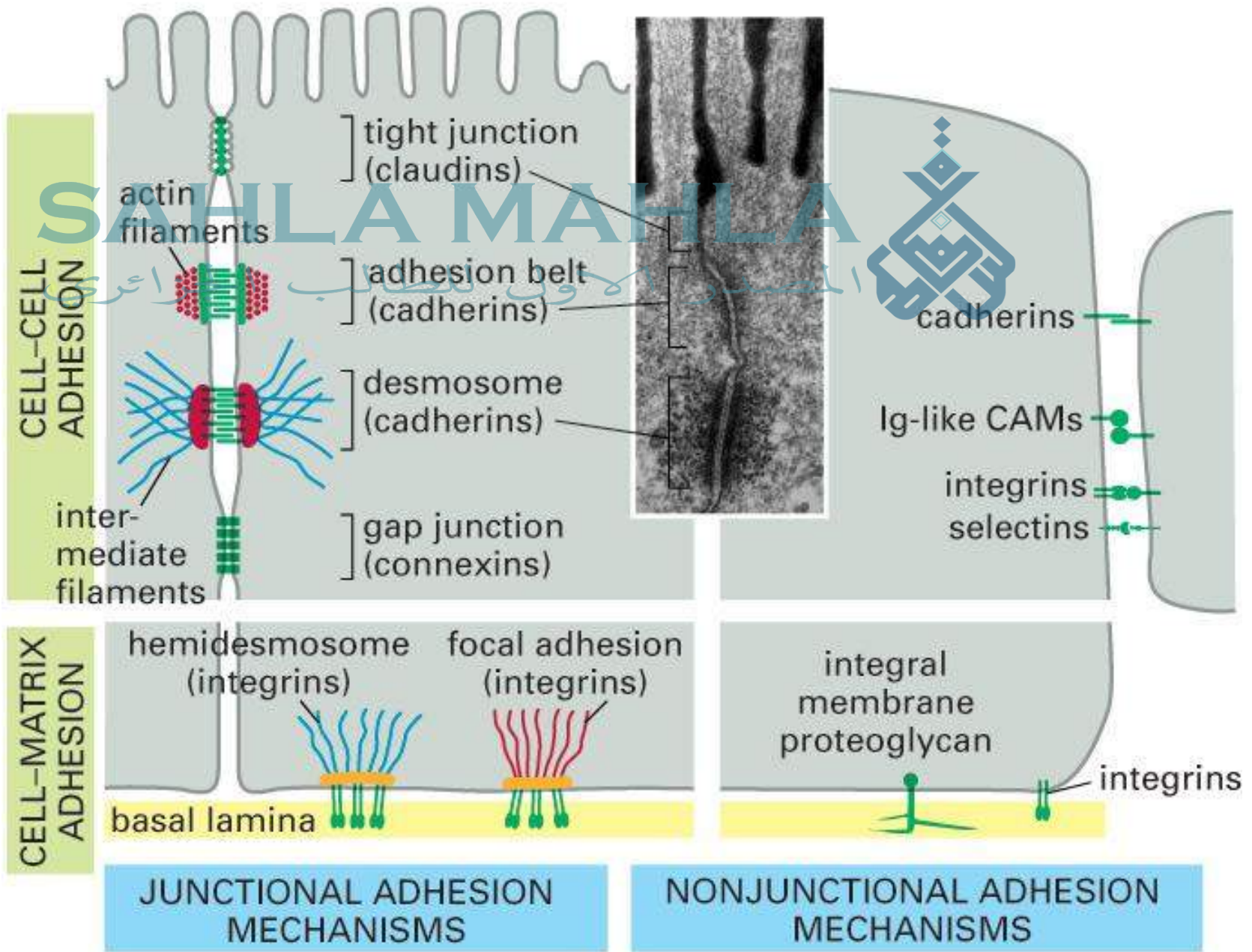


Figure 19-32. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Integrines

- Se lie au domaine arginine-glycine-aspartic acid (RGD) au niveau de la matrice extracellulaire
- Contient également le domaine  $\text{Ca}^{++}$
- Affecté par la déplétion du  $\text{Ca}^{++}$

## Fibronectine et laminine

- Composant de la matrice de base
- Sensible à la Protease

## dissocier les jonctions cellule-cellule et cellule- matrice extracellulaire

SAHLA MAHLA



- Les enzymes les plus utilisées sont la trypsine, trypsine/EDTA et la collagénase.
- La trypsine (+- EDTA) enzyme universelle en culture
- La collagénase dépendante du  $\text{Ca}^+$  pour être active, choisie pour digérer les tissus riches en collagène (tissus conjonctifs ou le foie)
  - Rajouter d'autres protéases pour augmenter l'efficacité
  - Enlever la trypsine pour augmenter la viabilité

# Utilisation d'approche mécanique et enzymatique

empêche:

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- Sélection par migration
- Une sélection positive des cellules qui représentent la majorité de la fraction tissulaire

## digestion enzymatique du tissu embryonnaire

SAHLA MAHLA



- Les cellules se dispersent facilement
- Donne une bonne répartition des cellules prolifératives
- La difficulté de digestion devient de plus en plus difficile avec l'âge à cause :
  - L'état de différenciation
  - Augmentation du tissu fibreux et de la matrice extracellulaire.
  - Réduction des cellules indifférenciées
- Difficultés de désagrégation peuvent être due à :
  - Trypsinisation ou agitation
  - -endommager les tissus fragile
  - -cellules tumorales

# désagrégation enzymatique par la Trypsine

- Pure
  - moins toxique
  - Plus prévisible
- brut
  - plus efficace
    - D'autres protéases peuvent être présents
- En pratique
  - Tester une petite quantité pour vérifier la viabilité



# Trypsine à chaud

- À 37°C
  - Dissocier les cellules grâce à la trypsine (soit bain-marie ou incubateur 37°C)
  - Enlever la trypsine par
    - Centrifugation
    - Neutralisation avec le un milieu qui contient du sérum
- Application
  - Désagrégation d'une grande quantité de tissu dans un temps records, tissus embryonnaire souris et de poulet
- Ne fonctionne pas
  - Tissus adultes, riche en tissus fibreux
    - Agitation mécanique est déconseillé pour les cellules fragile comme: cellules épithéliale



## Trypsinisation à froid

- Permet une pénétration de l'enzyme avec une faible activité
  - 4°C pour 6-18 heures
- Résultats:
  - Augmentation du taux de survie cellulaire
  - Préservation d'une variété
- Convenient
  - No stirring
  - No centrifugation
  - May be done overnight

## 4.2 Isolement d'un type cellulaire

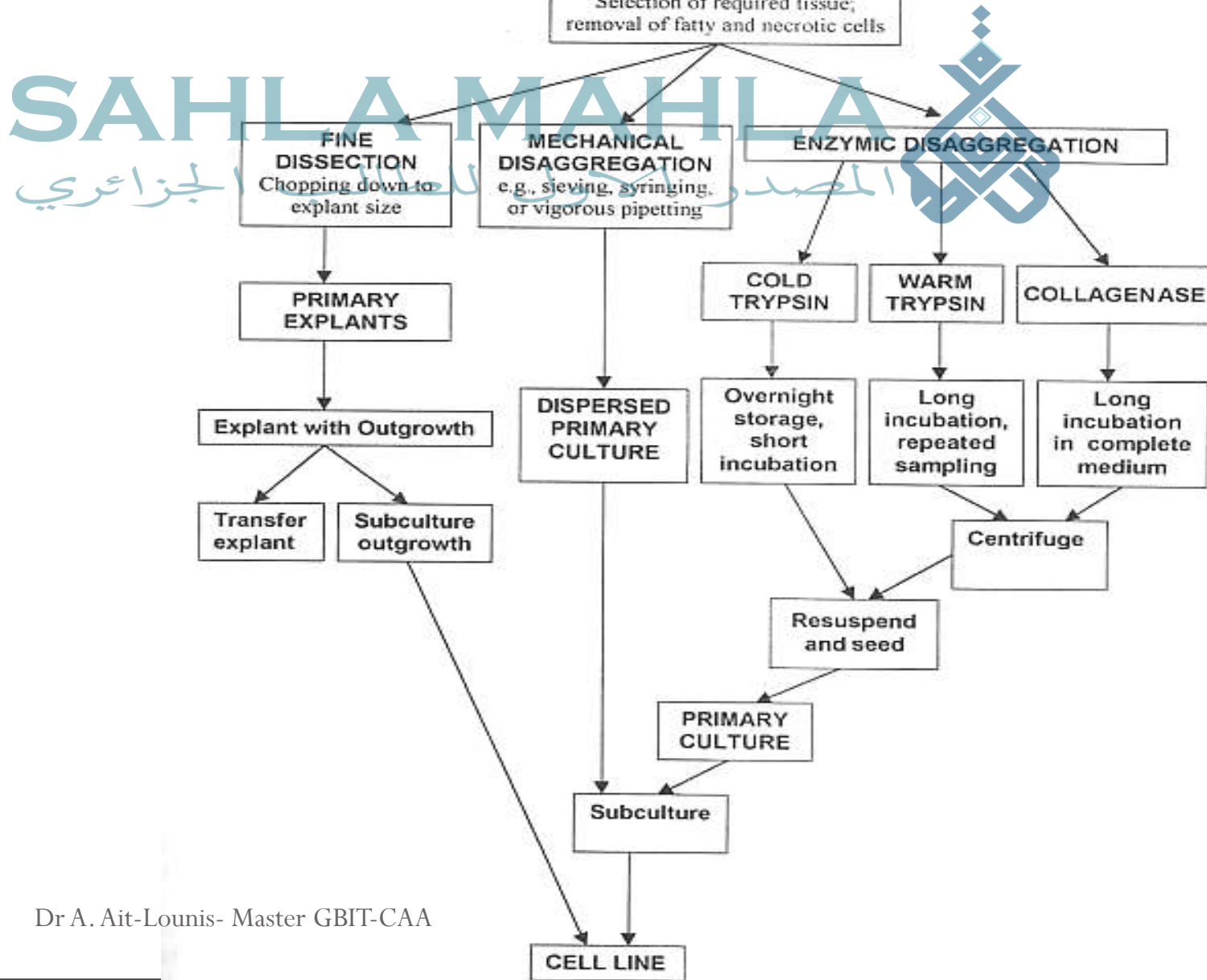
- méthodes d'enrichissements (pas sélection parfaite)
- Des différences de propriétés physico-chimiques (taille, densité) Permettent de séparer différents types cellulaires par centrifugation
- Une protéine spécifique peut être reconnue par des anticorps couplés à un support (billes) qui forment une surface d'affinité sur laquelle les cellules d'intérêt sont retenues.
- Une protéine spécifique peut être reconnue par des anticorps Fluorescents et les cellules sont séparées à l'aide d'un trieur de cellules.

# 5- Potentiel prolifératif des cellules normales

- En primoculture, les cellules ayant une capacité proliférative suffisante se divisent jusqu'à former un tapis « **confluence** »
- Les signaux transmis par les jonctions cellule-cellule entraînent l'arrêt de prolifération : « **inhibition de contact** »
- Les cellules peuvent reprendre leurs divisions à condition d'être décollée et réensemencées dans un nouveau flasque de culture :  
« **passage ou subculture** »
- Pour les cellules normales , le nombre de passages est limité et une Capacité proliférative limitée : « **lignée cellulaire à durée de vie Limitée** ».

## 6- Résumé

- les modèles de primoculture sont le plus souvent pertinents.
- Préparation est lourde et manque de reproductibilité
- La capacité de prolifération et de stabilité du phénotype varient d'un type cellulaire à l'autre
- La durée exploitables peut être limitante
- Certains organe dont l'organisation est complexe se prête mal à l'isolement d'un type cellulaires particulier, du fait de l'hétérogénéité des types cellulaires qui les composent et ou du nombre restreint de cellule dont ils sont constitués.



## References:

Book: **Animal Cell Culture and Technology-**

M. Butler-Chapter I- Editor: The Basics

Chapter 2 p 11-19



Book: **Culture of Animals cells: a manual of basic technique,**

Fifth edition, by R. Ian Freshney

Chapter 12 p175-197

**El Zein, L; Ait-Lounis A. et al. J Cell Sci 2009;122:3180-3189**

**Jechlinger M et al. Genes Dev. 2009;23:1677-1688**

## **CHAPITRE 3**

# **« cultures secondaires et lignées continues »**

# Plan

## 1- Différents types de cultures cellulaires *in vitro*

المصدر الاول للطالب الجزائري

1.1- sources

1.2- formes

1.3- morphologie

## 2- Cultures secondaires

## 3- Lignées continues

## 4- Courbe de croissance en culture

## 5- Glossaire



# 1- Différents types de cultures cellulaires

---

- **Culture primaire:** Culture initiale de cellules qui viennent d'être prélevées d'un tissu. Différenciée. Généralement à attachement obligatoire.
- **Culture secondaire:** Propagation d'une culture primaire. Création d'une lignée cellulaire. Peut être cultivé en suspension. Peut être indifférencié. Durée de vie limitée (3-30 divisions).
- **Lignée immortelle ou stable.** Lignée cellulaire transformée. Peut être cultivée en suspension. Durée de vie illimitée.

# 1.1 Sources

SAHLA MAHLA



المصدر الأول للطالب الجزائري

- Insectes
- Poissons
- Mammifères
- Humains

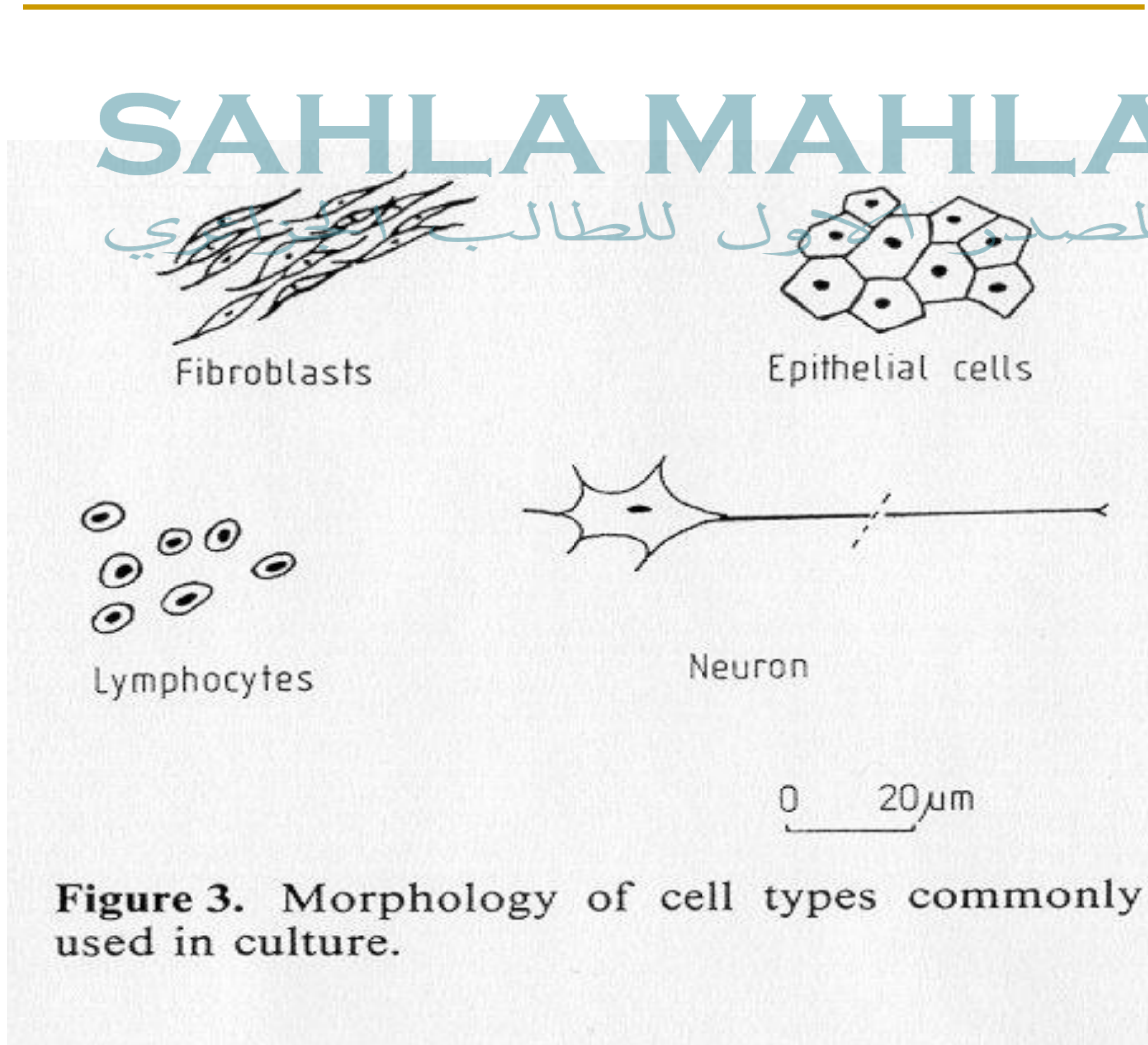
## 1.2 Formes / tissus

SAHLA MAHLA



- المصدر الأول للطالب الجزائري
- Epithéliales / endothéliales (membranes)
  - Fibroblastes (tissus connectifs)
  - Myoblastes (muscles)
  - Neurones (syst. nerveux)
  - Hepatocytes (foie)
  - Erythrocytes (sang)
  - Lymphocytes (syst. immunitaire)

# 1.2 Formes...



➤ Un fibroblaste est une cellule fusiforme à cytoplasme parfois étoilé, longue de 20 à 30  $\mu\text{m}$  et large de 5 à 10  $\mu\text{m}$

➤ Les **épithélia** sont des tissus constitués de cellules étroitement juxtaposées

# 1.3 Morphologie de culture

---

Morphologiquement les cultures de cellules prennent un de deux formes :

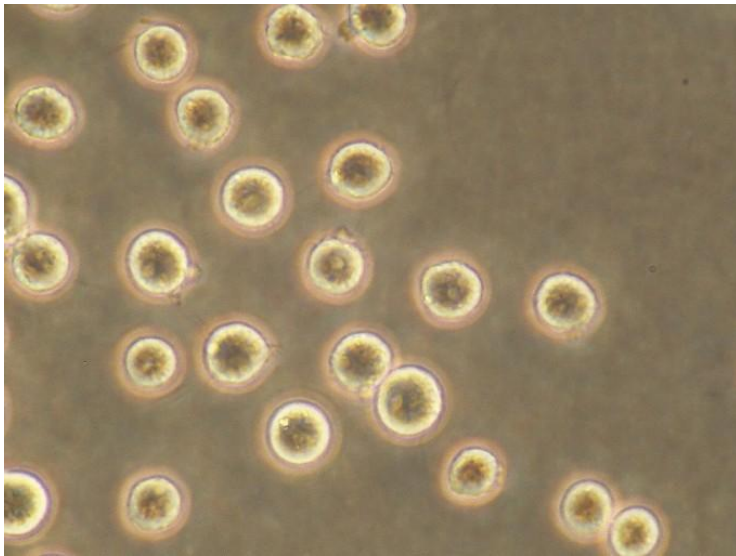
- en suspension (comme cellules ou petits blocs de libre-flottement)
- adhérente (comme couche unitaire qui est fixée dans la fiole de culture)

La forme prise par une variété de cellule reflète le tissu dont c'était par exemple des variétés de cellule dérivées du sang (leucémie, lymphome) tendent à se développer en suspension tandis que les cellules dérivées du tissu plein (poumons, rein) tendent à se développer comme couches unitaires.

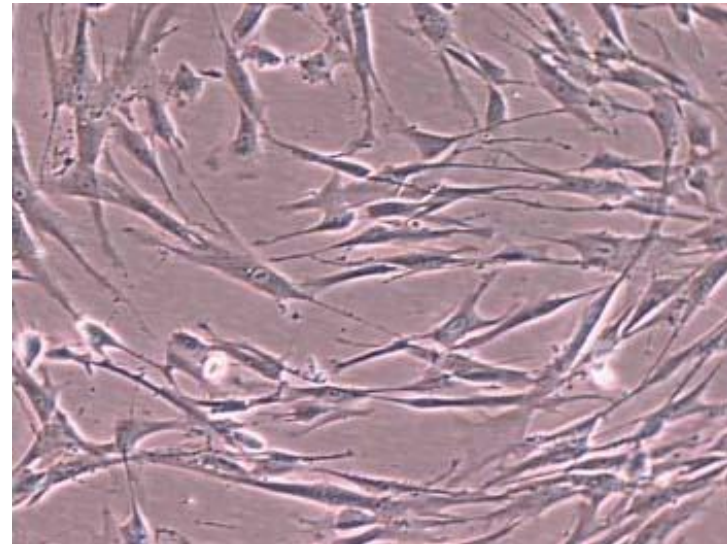
Des variétés de cellule jointes peuvent être classifiées comme endothéliales comme BAE-1, épithélial comme hela, neuronal comme SH-SY5Y ou fibroblastes tels que MRC-5 et leur morphologie reflètent le tissu d'origine-

# 1.3 Morphologie de culture (suite)

**SAHLA MAHLA**  
en suspension adhérente



**HL-60**

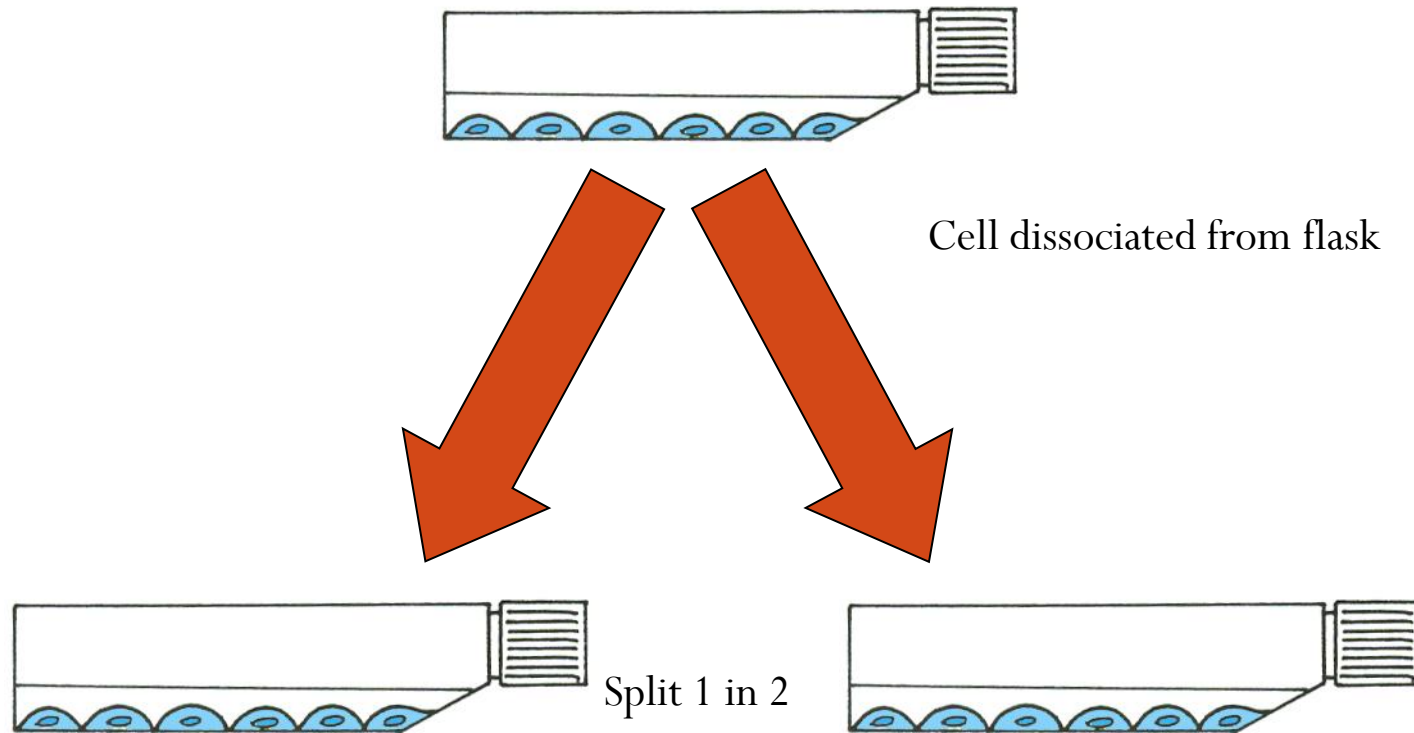


**MRC5**

## 2. Culture secondaire

---

➤ Culture primaire peut être dissociée par la trypsine et donner naissance à de nouvelles cultures dites secondaires qui peuvent à leur tour être entretenues par passages.



## 2. Culture secondaire

---

➤ Le nombre de passage est limité :

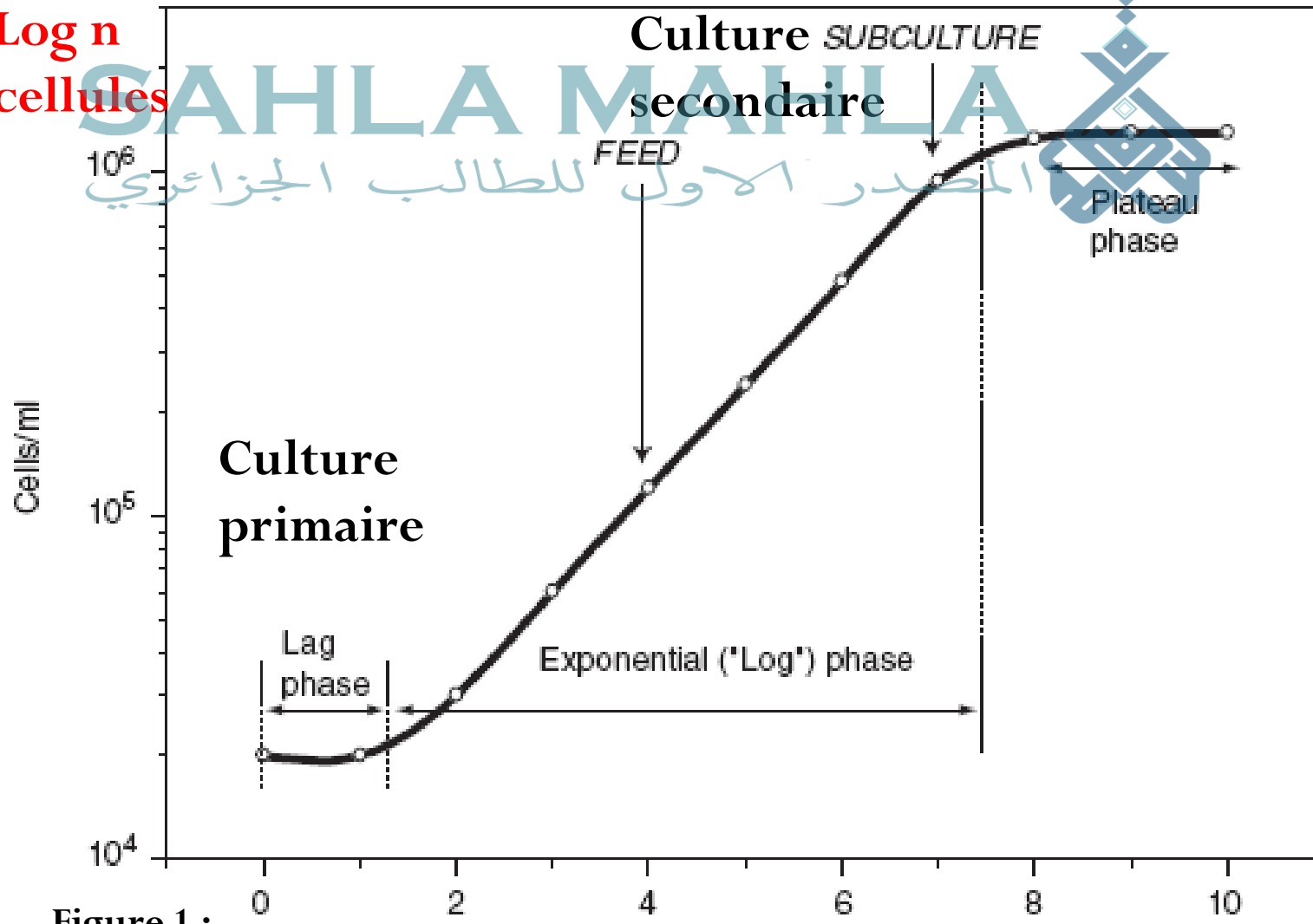
- deux à trois pour les cellules épithéloïdes,
- une cinquantaine pour les cellules fibroblastiques embryonnaires.

- Ces dernières qui conservent tous les caractères des cellules normales constituent des souches diploïdes (ou semi continues), telles que les cellules MRC5 (fibroblastes pulmonaires d'embryons humains).



# Cycle de croissance d'une lignée cellulaire en culture *in vitro*

Log n  
cellules



temps  
en semaine

Figure 1 :

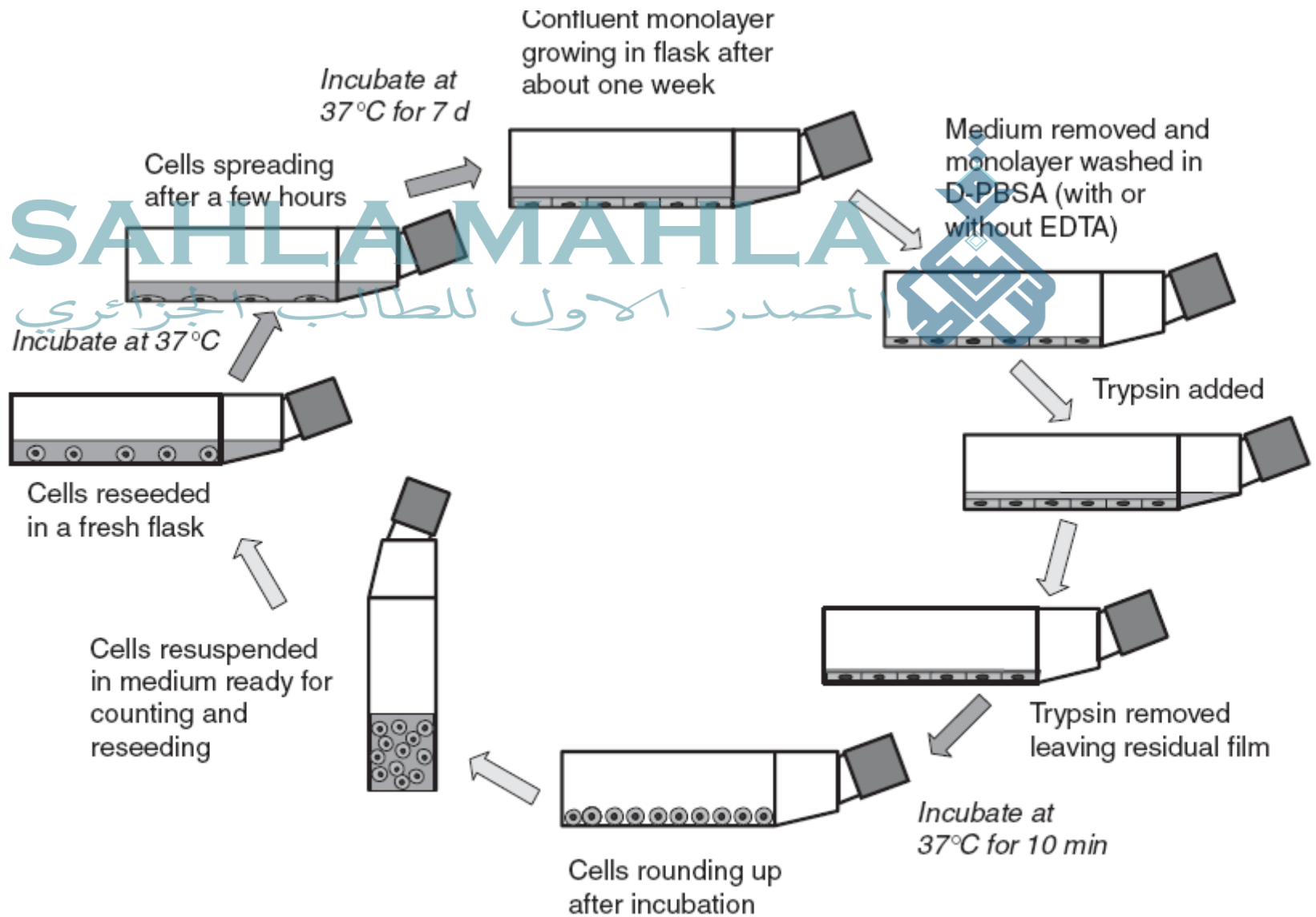
# Courbe de croissance d'une population cellulaire

Figure 1 : On distingue 3 périodes : phase d'adaptation ; phase exponentielle ; phase stationnaire.

Lorsque les cellules arrivent à confluence elles arrêtent de se diviser : inhibition de contact. Il faut alors procéder à un **repiquage** ou **passage**, c'est à dire, **redistribuer les cellules dans plusieurs flacons ou bien** en jeter une partie et rajouter du milieu neuf : de cette façon les cellules disposent de nouveaux éléments nutritifs et de place pour adhérer. A partir du premier repiquage on parle de **lignée cellulaire**.

Par ailleurs, lorsque les cellules sont mises dans un milieu de culture, il s'opère une sélection entre les cellules viables et les cellules mortes (dans le cas de cellules qui adhèrent au support, les cellules viables se fixent sur le support alors que les mortes restent dans le milieu de culture.

D'autre part, il existe une compétition entre les cellules viables. Celles qui prolifèrent le plus vite envahissent la boîte jusqu'à faire disparaître les autres types cellulaires. On observe des changements de la culture dans le temps.



**Fig. 13.3. Subculture of Monolayer.** Stages in the subculture and growth cycle of monolayer cells after trypsinization (see also Plates 4, 5).

# 3. Lignées continues

---

➤ Caractérisées par leur capacité de prolifération infinie in vitro:

SAHLA MAHLA

- Lignées établies à partir de certains **tissus tumoraux**

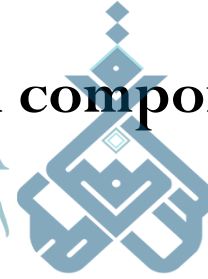
- Lignées établies **spontanément** en culture à partir de cellules normales ayant échappé à la sénescence.

- Lignées **immortalisées ou transformées** à partir de cellules normales à l'aide de divers agents physiques ou chimiques, ou surtout par l'expression et la surexpression d'oncogènes viraux ou cellulaire.

# 3.1 Caractéristiques des lignées continues

Altérations des paramètres de croissance et du comportement des cellules transformées:

المصدر الاول للطالب الجزائري



- Elles continuent à se diviser alors que les cellules normales ne se divisent plus;
- Diminution des besoins en facteurs de croissance;
- Perte de la capacité d'arrêt de croissance;
- Perte de la dépendance de l'ancrage pour survivre;
- Changement de morphologie
- Perte d'inhibition de contact.

# SAHLA MAHLA

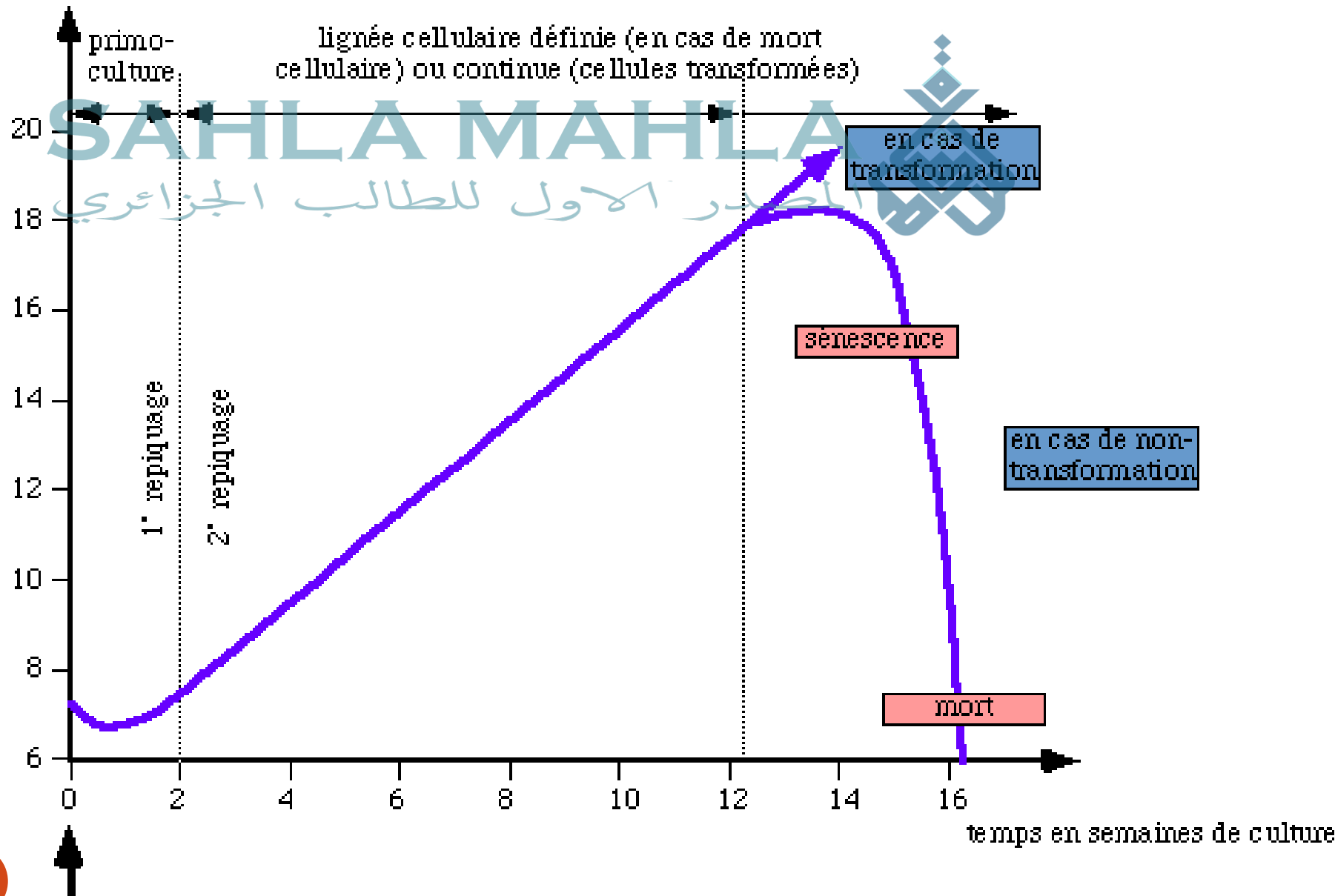
المعهد الوطني للبحوث الجزيئية والمخبرية

## Altérations de la surface cellulaire ( répertoire des récepteurs de surface; glycosylation;)

- Altérations du cytosquelette;
- Synthèse de facteurs de croissance;
- Sécrétion d'enzymes protéolytiques;
- Altérations du profil d'expression génétique;

# 4. Cycle de croissance d'une lignée cellulaire

log du nombre de cellules



On rencontre 2 cas (fig2 ) :

- **Cultures normales ou définies** : les cellules ne se multiplient que pendant un nombre limité de générations (30 à 50 repiquages) puis meurent : leur vie et leur mort est programmée. On observe alors une diminution de leur vitesse de prolifération, phase de sénescence.

- **Culture continue ou lignées transformées ou immortelles**. La vitesse de multiplication ne diminue pas, ce qui permet un nombre de repiquage indéfini. Les cellules constituant ces cultures :

- perdent l'inhibition de contact et se cultivent en amas ou multicouche
- changent de morphologie (s'arrondissent)
- les cellules adhérentes perdent leur besoin d'ancrage et peuvent être cultivées en suspension.



# Culture continue

## Phase de latence

pas de division cellulaire

dépend du type cellulaire, du milieu de culture, de la densité cellulaire

## Phase exponentielle

Phase de division cellulaire

Temps de doublement selon le type cellulaire (4h à 48h)

## Phase stationnaire

Epuisement du milieu = arrêt de la prolifération

## Poursuite de la croissance cellulaire (repiquage)

ou mort cellulaire

SAHLA MAHLA



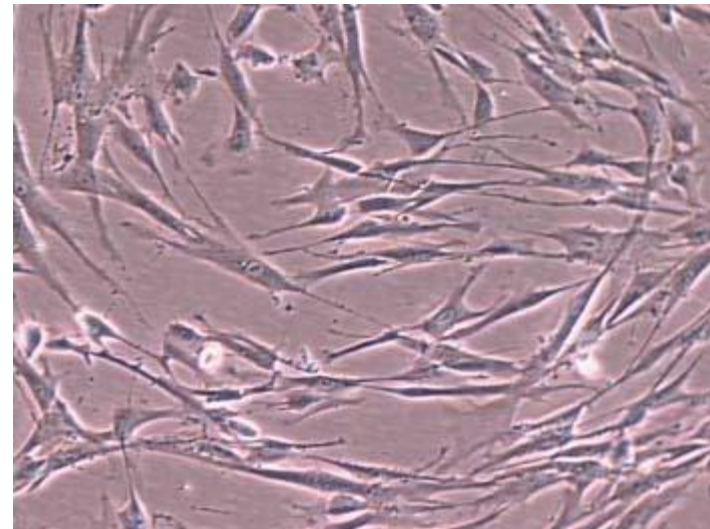
المصدر الأول للطالب الجزائري

**TABLE 13.1. Commonly Used Cell Lines**

Cell line	Morphology	Origin	Species	Age	Ploidy	Characteristics	Reference
<div style="border: 2px solid red; padding: 2px; display: inline-block;">Finite, from Normal Tissue</div>							
IMR-90	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Nichols et al., 1977
MRC-5	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Jacobs, 1970
MRC-9	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Jacobs, et al., 1979
WI-38	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection	Hayflick & Moorhead, 1961

# Human Fetal Lung Fibroblast Cells (MRC-5 Line)

- Elles sont obtenues à partir de cellules de rein embryonnaires humaines ou de fibroblastes embryonnaires humain de poumon (MRC-5, WI-38).
- Ces lignées sont importantes dans le diagnostic des HSV, CMV, VZV, adénovirus et entérovirus.



## Continuous, from Normal Tissue

293	Epithelial	Kidney	Human	Embryonic	Aneuploid	Readily transfected.
3T3-A31	Fibroblast		Mouse BALB/c	Embryonic	Aneuploid	Contact inhibited; readily transformed
3T3-L1	Fibroblast		Mouse Swiss	Embryonic	Aneuploid	Adipose differentiation
BEAS-2B	Epithelial	Lung	Human	Adult		
BHK21-C13	Fibroblast	Kidney	Syrian hamster	Newborn	Aneuploid	Transformable by polyoma Produce IGF-2 Myotubes Neurophysin; vasopressin
BRL 3A	Epithelial	Liver	Rat	Newborn		Simple karyotype
C2	Fibroblastoid	Skeletal muscle	Mouse	Embryonic		
C7	Epithelioid	Hypothalamus	Mouse			
CHO-K1	Fibroblast	Ovary	Chinese hamster	Adult	Diploid	
COS-1, COS-7	Epithelioid	Kidney	Pig	Adult		Good hosts for DNA transfection
CPAE	Endothelial	Pulmonary- artery endothelium	Cow	Adult	Diploid	Factor VIII, Angiotensin II converting enzyme
HaCaT	Epithelial	Keratinocytes	Human	Adult	Diploid	Cornification
L6	Fibroblastoid	Skeletal muscle	Rat	Embryonic		Myotubes
LLC-PKI	Epithelial	Kidney	Pig	Adult	Diploid	Na <sup>+</sup> -dependent glucose uptake
MDCK	Epithelial	Kidney	Dog	Adult	Diploid	Domes, transport

## Continuous, from Neoplastic Tissue

A2780	Epithelial	Ovary	Human	Adult	Aneuploid	Chemosensitive with resistant variants
A549	Epithelial	Lung	Human	Adult	Aneuploid	Synthesizes surfactant
A9	Fibroblast	Subcutaneous	Mouse	Adult	Aneuploid	Derived from L929; Lacks HGPRT.
B16	Fibroblastoid	Melanoma	Mouse	Adult	Aneuploid	Melanin
C1300	Neuronal	Neuroblastoma	Rat	Adult	Aneuploid	Neurites
C6	Fibroblastoid	Glioma	Rat	Newborn	Aneuploid	Glial fibrillary acidic protein, GPDH

**TABLE 13.1. Commonly Used Cell Lines (Continued)**

Cell line	Morphology	Origin	Species	Age	Ploidy	Characteristics
Caco-2	Epithelial	Colon	Human	Adult	Aneuploid	Transports ions and amino acids
EB-3	Lymphocytic	Peripheral blood	Human	Juvenile	Diploid	EB virus +ve
Friend	Suspension	Spleen	Mouse	Adult	Aneuploid	Hemoglobin
GH1, GH2, GH3	Epithelioid	Pituitary tumor	Rat	Adult	Aneuploid	Growth hormone
H4-11-E-C3	Epithelial	Hepatoma	Rat	Adult	Aneuploid	Tyrosine aminotransferase
HeLa	Epithelial	Cervix	Human	Adult	Aneuploid	G6PD Type A
HeLa-S3	Epithelial	Cervix	Human	Adult	Aneuploid	High plating efficiency; will grow well in suspension
HEP-G2	Epithelioid	Hepatoma	Human	Adult	Aneuploid	Retains some microsomal metabolizing enzymes
HL-60	Suspension	Myeloid leukemia	Human	Adult	Aneuploid	Phagocytosis
HT-29	Epithelial	Colon	Human	Adult	Aneuploid	Neotetrazolium Blue reduction
K-562	Suspension	Myeloid leukemia	Human	Adult	Aneuploid	Differentiation inducible with NaBt
L1210	Lymphocytic		Mouse	Adult	Aneuploid	Hemoglobin
						Rapidly growing; suspension

# 4. Procédure de dissociation cellulaire

Procedure	Pretreatment	Dissociation agent	Medium	Applicable to
Shake-off	None	Gentle mechanical shaking, rocking, or vigorous pipetting	Culture medium	Mitotic or other loosely adherent cells
Scraping	None	Cell scraper	Culture medium	Cell lines for which proteases are to be avoided (e.g., receptor or cell surface protein analysis); can damage some cells and rarely gives a single-cell suspension
Trypsin* alone	Remove medium completely	0.01–0.5% Crude trypsin; usually 0.25%	D-PBSA, CMF, or saline citrate	Most continuous cell lines
Prewash + trypsin	D-PBSA	0.25% Crude trypsin	D-PBSA	Some strongly adherent continuous cell lines and many early-passage cells
Prewash + trypsin	1 mM EDTA in D-PBSA	0.25% Crude trypsin	D-PBSA	Strongly adherent early-passage cell lines
Prewash + trypsin	1 mM EDTA in D-PBSA	0.25% Crude trypsin	D-PBSA + 1 mM EDTA	Many epithelial cells, but some can be sensitive to EDTA; EGTA can be used
Trypsin + collagenase	1 mM EDTA in D-PBSA	0.25% Crude trypsin; 200 U/mL crude collagenase	D-PBSA + 1 mM EDTA	Dense cultures and multilayers, particularly with fibroblasts
Dispase	None	0.1–1.0 mg/mL Dispase	Culture medium	Removal of epithelium in sheets (does not dissociate epithelium)
Pronase	None	0.1–1.0 mg/mL Pronase	Culture medium	Provision of good single-cell suspensions, but may be harmful to some cells
DNase	D-PBSA or 1 mM EDTA in D-PBSA	2–10 µg/mL crystalline DNase	Culture medium	Use of other dissociation agents which damage cells and release DNA

## Lignées humaines:

HeLa, issue d'un cancer du col de l'utérus.

U2OS, issue d'un ostéosarcome.

Caco-2, issue d'un cancer du colon.

HT29, issue d'un cancer du colon.

HEK-293 issue de tissu épithélial du rein.

MCF-7, issue de cancer du sein.

Jurkat, issue de lymphome de Lymphocyte T.

Lignées de singe:

Vero, lignée épithéliale de rein de singe vert.

## Lignées de chiens:

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), extraites d'un rein de chien.

## Lignées de souris :

3T3, fibroblastes spontanément immortalisés. Une lignée historique ayant permis de définir le concept d'immortalisation cellulaire, prouvant que des cellules peuvent dépasser la définition de la limite de Hayflick.

NIH-3T3, issue de fibroblaste embryonique.

AtT20, issu de tumeur hypophysaire corticotrope.

## Lignées de rats :

GH3, issue de tumeur hypophysaire somatotrope.

PC12, issu d'un phéochromocytome.

Lignées d'insectes:

Sf9

Sf21, issue d'ovaire.

S2, issue d'embryon de drosophile



# Chapitre 4-

SATIHA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



## « Transformation et Immortalisation »

# Plan

- 1) INTRODUCTION
- 2) METHODES D'IMMORTALISATION INDUITE
  - 2-1 Les agents de l'immortalisation
  - 2-2 Prolifération cellulaire et intégration
  - 2-3 Ciblage cellulaire et régulation
  - 2-4 Mécanismes génétiques et moléculaires:
- 3) IMMORTALISATION SPONTANÉE (EXP DE L'EPITHELIUM GASTRO-INTESTINAL)
- 4) L'INTÉRÊT DES LIGNÉES PERMANENTES

# Introduction

- L'immortalisation cellulaire consiste à établir des lignées permanentes capables de proliférer pendant un temps illimité en culture.
- Cette capacité de prolifération peut conduire au pouvoir tumoral chez la souris athymique ou à la croissance en milieu semi-solide: l'immortalisation est alors associée à la transformation cancéreuse.
- Il s'agit donc de produire des lignées issues de différents tissus chez l'homme ou l'animal: épithélium, mésenchyme, muscle, cellules hématopoïétiques, endothéliales, neurales, gliales

- Le matériel de départ est prélevé chez un sujet sain. En effet, nous considérons ici les prélèvements exempts de tout caractère néoplasique ou prénéoplasique.\*

\* (comme les adénocarcinomes, les adénomes sporadiques et les prélèvements effectués chez des sujets porteurs de maladies génétiques familiales conduisant à la néoplasie, par exemple les gènes APC, MSH2 dans le cas des cancers coliques ([Cancer Res. 50: 4724, 1990](#)), le syndrome de Li et Fraumeni conduisant à des cancers multiples ([Oncogene 6:183,1991](#)).

# Introduction

---

- L'immortalisation est acquise quand la lignée cellulaire est capable de dépasser 50-60 doublements et de franchir les phénomènes associés à la perte de la capacité de proliférer, à la sénescence

(Mol. Cell. Biol. 9: 3088, 1989; Oncogene 8: 1407, 1993).

- Certaines cellules fibroblastiques ou épithéliales normales peuvent être maintenues en culture et acceptent un nombre important de passages et de doublements, tout en conservant certains phénotypes des cellules primaires de départ, à l'instar des cellules épithéliales mammaires humaines (*In vitro* 28: 716, 1992).

- Dans ce dernier cas, il s'agit de lignées transitoires capables d'entreprendre un nombre relativement constant de divisions, selon une programmation génétique interne

## Caractéristique Transformation cellulaire:

- acquisition de caractères propres à la cellule maligne
- Autonomie de croissance
- Perte de l'inhibition de contact
- Indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et des interactions avec la Matrice Extra Cellulaire
- Tumorigénicité chez la souris nude

# 2- Méthodes d'immortalisation induite

## 2-1 Les agents de l'immortalisation:

Différentes méthodes permettent d'obtenir des lignées permanentes: 

- Immortalisation spontanée en culture
- Transformation tumorale par des carcinogènes en culture ou *in vivo*  
furane, 1,2-diméthylhydrazine, azozymOthane, N- méthyl-N'-nitro  
N-nitrosoguanidine:
  - Gastroenterology 95: 343, 198B; Cancer Res. 39: 5141,1979; Cancer Res. 49:1236,1989; Cancer Res.51:5752,1991; Cancer Res. 53:4182, 1993),
  - Exposition à des radiations (UV: Cancer Res. 45: 250, 1985),
  - Fusion cellulaire ou transfert cellulaire résident ou au contraire de réprimer un anti-oncogène (P53, RB) ou encore d'introduire dans la cellule des séquences possédant un pouvoir oncogénique. (chromosomes: Methods Enzymol- 151: 313, 1987; cDNA, éléments génétiques en orientations sens ou anti-



➤ **Fusion cellulaire ou transfert :**

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Induire l'activation d'un protooncogène cellulaire résident ou encore d'introduire dans la cellule des séquences possédant un pouvoir oncogénique:

- Ces éléments oncogénétiques sont

- les séquences grand T des virus Simiens SV40

- du polyome,

- v-myc, v-ras,

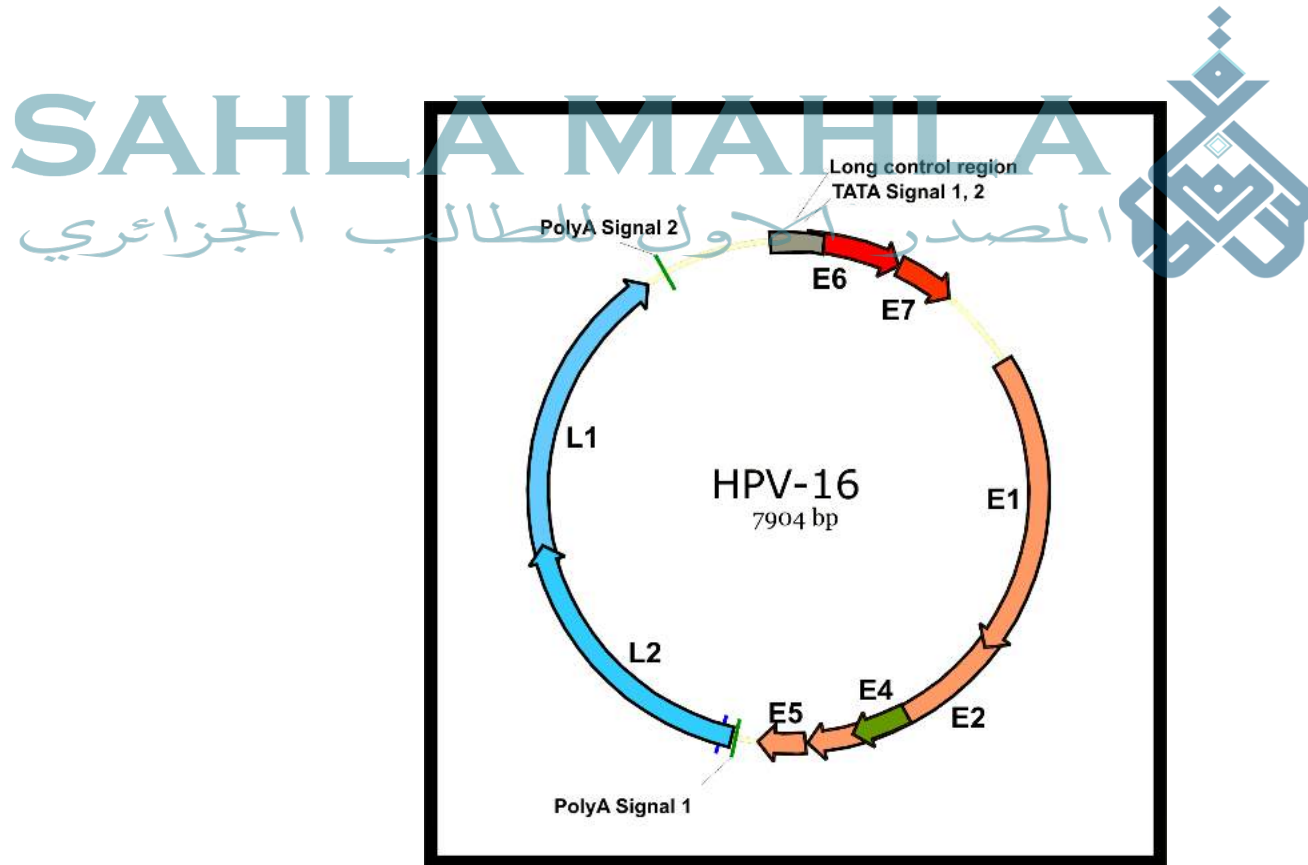
- la région précoce , E1A de l'adénovirus 2

- les gènes E6 et E7 des papillomavirus humains

HPV16 et 18 ou bovin, le BPV

PNAS 80: 4354, 1983; PNAS 86: 187, 1989; Science 227: 1 174, 1985;  
Cancer Res. 51: 5370, 1991; BBA 1 155:1 1 1 , 1993; EMBO 12: 1847,  
1993).

# Papillomavirus (HPV)



Le génome des papillomavirus est une molécule d'ADN double brin circulaire d'environ 8 kb

- code protéines précoces (E) régulatrices...
- code protéines tardives (L) -> capsid

Dr A. Ait-Lounis- Master GBIT-CAA

- SAHLA MAHLA
- المصدر الأول للطلاب الجزائري
- Ces éléments oncogénétiques introduits
    - dans des plasmides
    - des vecteurs rétroviraux
    - des rétrovirus recombinants



➤ sont d'origine virale

• Existe relativement peu d'exemples décrivant l'immortalisation par des oncogènes cellulaires (cellules sanguines: Mol. Cell. Biol. 13: 5670, 1993).

المصدر الأول للطالب الجزائري



• Certains virus sauvages sont capables de produire l'immortalisation cellulaire: SV40, le virus Epstein- Barr EBV (lymphocytes B) , l' H PV (Oncogene 7: 619, 1992; J. Virol. 66: 3409, 1992).

• Le récepteur conduisant à l'internalisation du SV40 dans les cellules épithéliales serait localisé au niveau de la membrane apicale (Mol. Cell. Biol. 8: 3391, 1988).

## 2-2 Prolifération cellulaire et intégration:

➤ Le caractère permanent des lignées immortalisées nécessite l'intégration et l'expression stable du DNA exogène dans le génome de la cellule hôte.

➤ Cette intégration stable du transgène nécessite des cellules en division (cellules germinatives, cellules souches hématopoïétiques ou intestinales par exemple).

➤ L'intégration transitoire de type épisomale ou linéaire dans le noyau (dans le cas de plasmides ou de l'adénovirus recombinant) peut cependant induire quelques doublements dans des cellules qui ne se divisent pas *a priori*, permettant ainsi l'insertion secondaire de séquences intégrées. D'autres manipulations favorisent l'entrée dans le cycle cellulaire *in vivo* et *in vitro*.

## 2-3 Ciblage cellulaire et régulation:

➤ La production d'animaux transgéniques permet d'insérer et d'analyser la fonction de promoteurs constitutifs ou régulables dirigeant l'expression de gènes rapporteurs (Lac Z, CAT, luciférase,...) de manière spécifique, limitée à quelques tissus, ou ubiquitaire.

Cette technologie est de toute première importance

- pour étudier l'expression transitoire d'un promoteur,
- de la filiation cellulaire pendant le développement embryonnaire, foetal et postnatal,
- ou l'expression de gènes (cDNAs) présentant une activité fonctionnelle pour la cellule hôte ou l'animal entier (oncogènes, hormones, récepteurs).


## ➤ Dans le cas de la production de lignées intestinales immortalisées

المصدر الأول للطالب الجزائري  
-il est possible d'envisager l'expression d'éléments oncogénique dirigés par des promoteurs dont l'expression cible l'épithélium digestif selon.

-une spécificité absolue ou relative (villine, protéine de liaison des acides gras FABP de type L (expression: foie et intestin) ou I (intestin), sucrase-isomaltase, proglucagon, glucokinase, elastase 1,..

-(PNAS 85: 9611, 1988; JBC 264: 8419, 1989; JBC 267: 10705, - 1992; Am. J. Physiol. 265: G526, 1993; Mol. Cell. Biol. 14: 2048, 1994; JBC 269: 3641, 1994).



SAHLA MAHLA   
المصدر الأول للطالب الجزائري

➤ Des travaux récents décrivent l'immortalisation conditionnelle de cellules épithéliales du côlon et de l'intestin grêle à partir d'une souris transgénique exprimant un mutant thermosensible du TSV40 placé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire dirigeant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité H-2Kb (PNAS 90: 587, 1993).

• Ce promoteur est régulé par l'interféron  $\gamma$  (PNAS 88: 5096, 1991).

## 2-4 Mécanismes génétiques et moléculaires:

Les mécanismes conduisant à l'immortalisation cellulaire après transfert de séquences oncogéniques sont (complexes et diversifiés):

\*les événements précoces qui conduisent à la transition entre la cellule primaire en division et l'apparition de cellules possédant un haut pouvoir prolifératif en culture

\*\*les événements plus tardifs conduisant à des anomalies cytogénétiques, des translocations chromosomiques et à l'activation fortuite ou spécifique de facteurs de transcription, phénomènes également observés lors de l'évolution de lignées tumorales issues de cancers sporadiques (*Nature* 316: 636, 1985; *J. Cell. Biol.* 42: 13, 1990; *Mol. Cell. Biol.* 12: 2273, 1992; *Cell* 66:619, 1991; *J. Virol.* 68: 787, 1994).

➤ En ce qui concerne le grand T du SV40, E1A, les gènes E6 et E7 de l'HPV, les oncoprotéines correspondantes interagissent avec les anti-oncogènes cellulaires p53 et Rb capables de réguler négativement le cycle cellulaire.

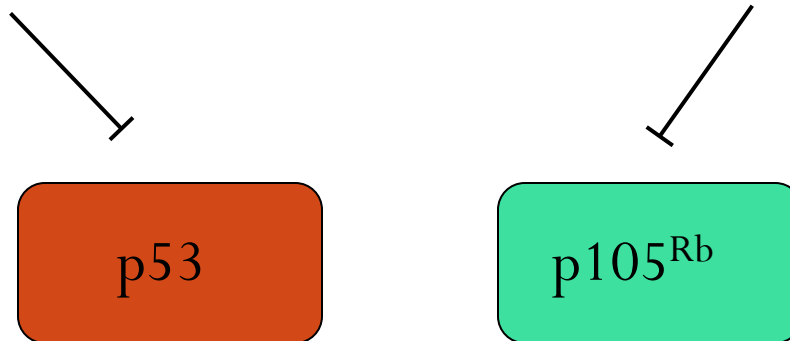
➤ Ces oncogènes viraux neutralisent ou activent différents systèmes de régulation de la prolifération cellulaire au niveau cytoplasmique et nucléaire (phosphorylations, facteurs de transcription: AP2, facteur de 43 kDa, ...).

➤ D'autres propriétés moléculaires ont été décrites pour SV40LT (facteur de transcription, hélicase, interaction avec la tubuline, le facteur de transcription E2F, la DNA polymérase  $\alpha$ , HSP 73 kDa, phosphatase A2, modulation des niveaux d'expression de la cycline A et de la kinase p34Cdc2: J. Virol. 64: 4858, 1990; J. Natl. Cancer Inst. 82: No5, March 7, 1990; J. Virol. 65: 2098, 1991; J. Virol. 66:3979, 1992; PNAS 89: 4549, 1992; Biomed. Res. 13:169, 1992; Mol. Cell. Biol. 13: 961, 1993; Oncogene 8:2987, 1993).

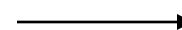
# Virus à ADN oncogènes

T (SV40)  
E1b (adeno)  
E6 (papilloma)

T (SV40)  
E1a (adeno)  
E7 (papilloma)



Cycle cellulaire



*Immortalisation*  
*Transformation*  
*cellulaire*

## 3- Immortalisation spontanée.

### 3-1 Immortalisation de l'épithélium gastro-intestinal

- L'immortalisation spontanée de cellules primaires normales dérivées de l'épithélium intestinal a été décrite chez le rat: RIE, IEC, IRD (J. Cell Biol. 80: 248, 1979; Exp. Cell Res. 143: 427, 1983; FEBS Letters-306: 1, 1992) ou l'homme (J. Natl. Cancer Inst. 69: 1271, 1982).
- Les conditions de culture (densité à confluence, nombre de doublements, fréquence des passages, trypsine,...) mais aussi l'espèce animale considérée influent de manière importante sur l'immortalisation et la transformation tumorale dite spontanée (J. Cell BioL 106: 761, 1988; PNAS 86: 1860, 1989).
- Cette progression spontanée constitue cependant un événement relativement exceptionnel chez l'homme et rare chez l'animal de laboratoire.

**p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts.**

D M Harvey and A J Levine *Genes & Dev.* 1991. 5: 2375-2385

- (1) deletion of at least the first 6 exons of both p53 alleles;
- (2) expression of a single p53 mRNA encoding a stop codon at amino acid position 173;
- (3) no detectable p53 mRNA; and
- (4) greatly diminished expression of p53 mRNA.

These findings indicate that p53 alteration commonly occurs in spontaneously immortalized BALB/c mouse embryo fibroblasts passaged on a 3T3 schedule and, therefore, may be an important event for the immortalization process.

Chez l'homme et le poulet, on ne voit presque jamais apparaître dans les cultures des cellules immortelles.

En revanche, les cellules de divers rongeurs s'immortalisent spontanément à une fréquence qui n'est pas négligeable

# 5- L'INTÉRÊT DES LIGNÉES PERMANENTES

➤ L'intérêt est essentiellement illustré par des études fondamentales- et pharmacologiques

- de la prolifération cellulaire
- facteurs de croissance, récepteurs, signalisation membranaire,
- cytoplasmique et nucléaire (PKC, TGFp, EGF, FGF, insuline, CD1),
- cycle cellulaire,
- inhibiteurs et inducteurs de ces voies de signalisation,
- découverte des cibles moléculaires des oncogènes cellulaires et viraux

➤ Une autre application réside dans l'établissement de lignées immortalisées :

**SAHLA MAHLA**



--à partir de prélèvements effectués chez des patients atteints de maladies génétiques, comme la mucoviscidose, la maladie d'Anderson.

--Ces tentatives permettent de palier la rareté du matériel prélevé à partir de biopsies contraignantes,

--d'éviter la répétition de ces prélèvements et de contourner ainsi les limitations éthiques.



- Il est possible de produire des quantités importantes de cellules capables de retenir en culture l'expression du défaut génétique et moléculaire que l'on peut caractériser et contrecarrer dans le cadre de la thérapie génique ou pharmacologique
- de lignées intestinales (CFI-3) et trachéales (CFT) après transfection de cellules épithéliales isolées chez des foetus humains de contrôle ou atteints de différents mutations dans le gène CFfR de la mucoviscidose (JBC 266: 21239, 1991; Eur. J. Clin. Invest. 23: 151, 1993).

➤ Les techniques d'immortalisation cellulaire permettent d'établir des lignées permanentes à partir de segments distincts du tractus digestif, ou d'espèces animales qui ne produisent pas de cancers digestifs spontanément (J. Immunol. Methods 166: 63, 1993).

--La plupart des modèles de cellules épithéliales digestives en culture proviennent de lignées issues de cancers spontanés ou chimio-induits.

--Les cancers du tube digestif, les formations tumorales sont essentiellement localisées au niveau de l'oesophage, gastrique et colorectal.

--Le duodénum et le jejuno-iléum ne sont que très rarement atteints.

➤ Dans le cadre des biotechnologies et de la pharmacologie, de nombreuses autres applications peuvent être proposées:

- La production de facteurs de croissance,
- d'hormones digestives capables de moduler l'homéostasie du glucose ou la sécrétion acide (par exemple),
- la caractérisation de carcinogènes d'origine alimentaire ou circulants,
- passage intracellulaire ou paracellulaire des médicaments,
- analyse de la biosynthèse et de la sécrétion des mucines ou des peptides en trèfles associés (trefoil peptides: JBC 268: 6694, 1993; Am. J. Physiol. 265: G205, 1993) qui semblent jouer un rôle clé dans la cytoprotection et la réparation de la muqueuse agressée dans les maladies inflammatoires (Crohn, colites) ou l'ulcère,
- la production de cellules immortalisées à partir du mésenchyme intestinal (applications pour caractériser les facteurs de différenciation, le rôle du mésenchyme dans la cancérogénèse).

SAHLA MAHLA

الجزائري

المصدر الأول للطلاب  
CHAPITRE 5:



# Les méthodes d'observation des cellules.

1

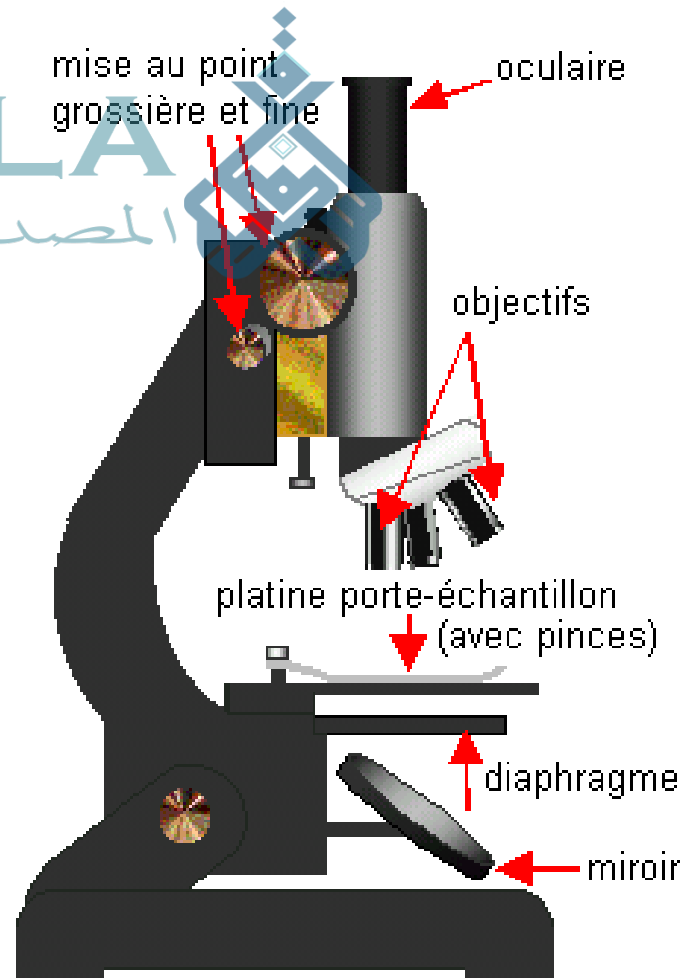
Pr Ait-Lounis A

Cours Culture Cellulaire et Application

Master BI révisé 2018

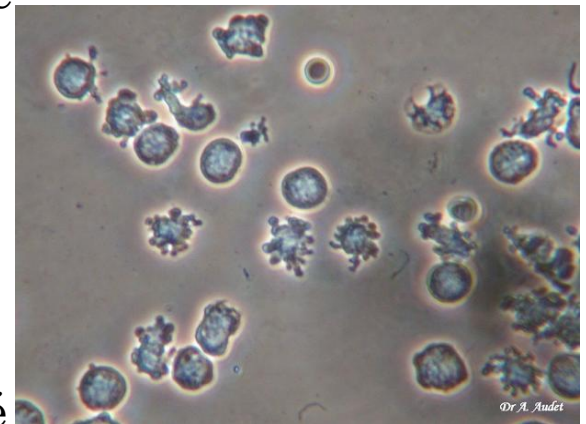
# 1- MICROSCOPES

- **1.1 Microscope optique ou photonique en lumière transmise**
  - Permet d'étudier les cellules fixées et colorées.
  - L'objet éclairé en lumière transmise est examiné à travers un système optique comprend un objectif et un oculaire
  - La limite de résolution est de 200nm et de ce fait il permet de discriminer la forme des cellules animales et végétales; Mitochondries et chloroplastes; bactéries et noyaux des eucaryotes.



## ○ 1.2 Microscope à contraste de phase

- Un microscope à contraste de phase (ou en contraste de phase) est un microscope optique.
- Imaginé en 1930 par le Hollandais Frits Zernike (1888-1966), il permet d'étudier des cellules vivantes, sans devoir leur infliger une coloration, et a valu à son concepteur le prix Nobel 1953.
- Deux dispositifs, appelés anneaux de phase, sont placés l'un dans le condensateur (le système optique qui focalise la lumière sur l'objet) et l'autre dans l'objectif. Quand le bord d'une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux filtrent ces rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure.
- « A l'observation, on voit une image essentiellement en noir et blanc où les différentes structures apparaissent bordées de blanc d'un côté et de noir de l'autre, induisant une impression (fausse) de relief »



### ○ 1.3 Microscope à Fluorescence

- Un **microscope à fluorescence** est un microscope optique basé sur la déviation d'un flux de particules non chargées, les photons.
- La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la **lumière** après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.
- Le fluorochrome est fixé par covalence à une protéine dont on souhaite connaître la localisation dans la cellule.
- Colorant fluorescent DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) permet de colorer spécifiquement de l'ADN

fluorophore	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
DAPI	345	455
texasRed	589	615
Cy5	650	670

# Principe du microscope en fluorescence

1- Lumière traverse **un filtre d'excitation** :

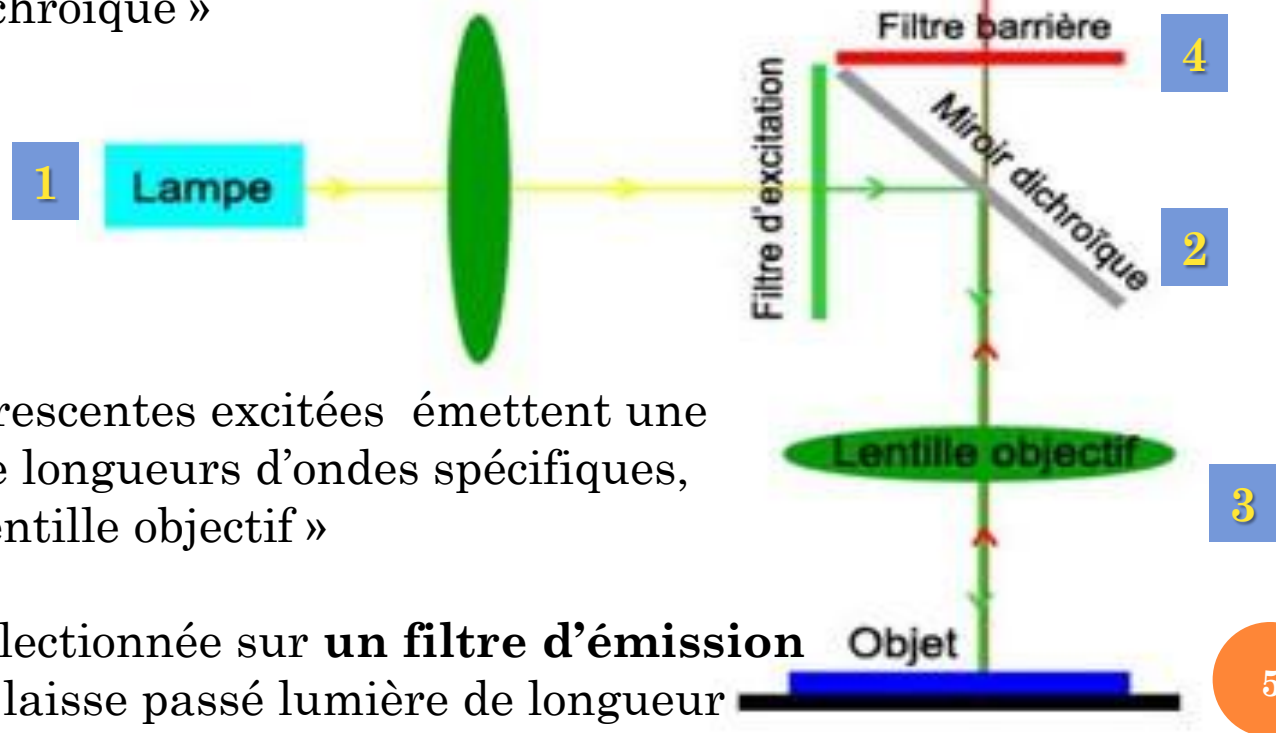
Exp: DAPI filtre laisse passé lumière de longueur d'onde comprise entre 340-350 nm

2- Longueur d'onde réfléchiée en direction l'échantillon par « miroir dichroïque »

3- Molécules fluorescentes excitées émettent une lumière visible de longueurs d'ondes spécifiques, concentré par « lentille objectif »

4- Lumière est sélectionnée sur **un filtre d'émission**

Exp : DAPI filtre laisse passé lumière de longueur d'onde comprise entre 450-460 nm





## ○ 1.4 Microscope à Confocal

- Un **microscope confocal** est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ appelées « sections optiques ».
- Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchie ou en fluorescence. La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière. On parle alors de **microscope confocal à balayage laser** — **CLSM** (en anglais CLSM pour *confocal laser scanning microscope*).
- L'emploi d'une source lumineuse cohérente (laser) ainsi que la taille réduite du champ éclairé permettent d'obtenir une résolution latérale légèrement meilleure (180-160 nm) à celle attendue pour un microscope optique conventionnel (200 nm). La résolution en *Z* (profondeur) est de l'ordre de 600 nm en microscopie confocale.

### ○ 1.5 Microscope électronique à transmission (MET)

- Un **microscope électronique à transmission** utilise, à la place de la lumière (rayonnement photonique), un rayonnement électronique.
- Le pouvoir séparateur du ME peut être théoriquement 40 000 fois supérieur à celui de microscope optique

### ○ 1.5 La videomicroscopie

- La videomicroscopie est une technique de microscopie utilisant une caméra et un système

# 2- LES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

## ○ 2.1 Marquage de l'anticorps

Afin de visualiser les complexes antigène-anticorps, on associe à l'anticorps un révélateur :

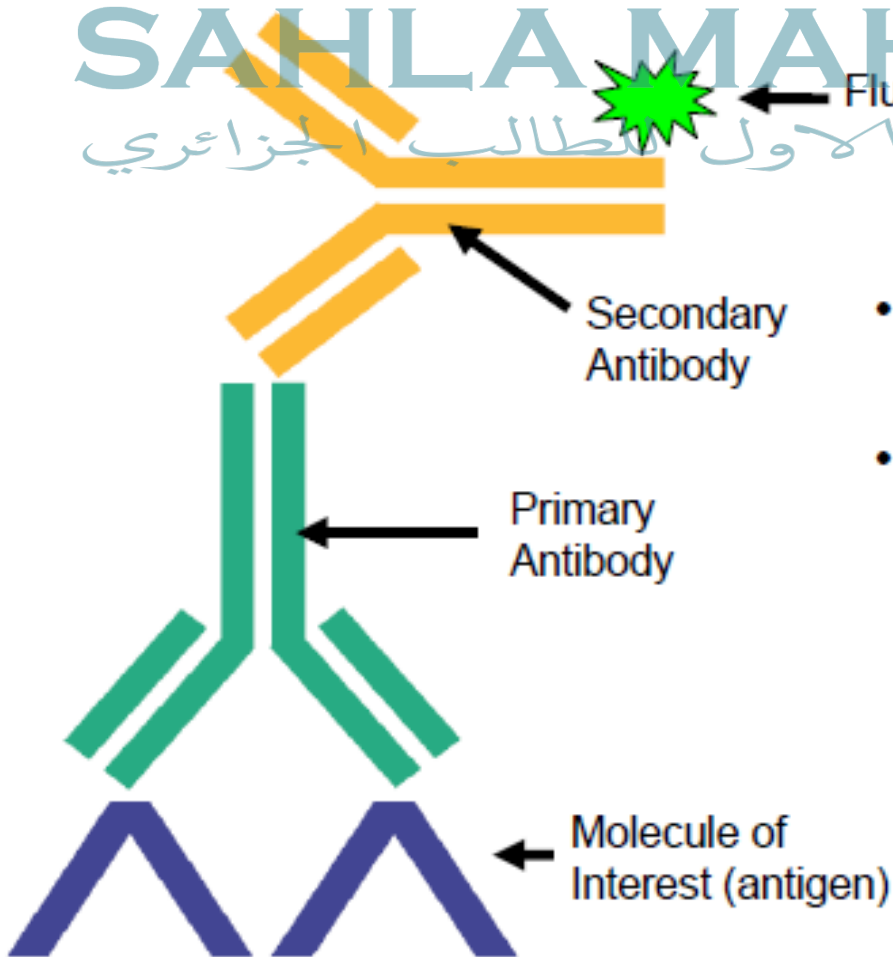
- une substance fluorescente (exp fluorescence: **technique d'immunofluorescence**)
- Une enzyme (péroxydase du raifort, phosphatase alcaline). La visualisation du marqueur se fait par production de précipité coloré par l'enzyme : **technique d'immunoenzymologique**
- Marqueurs métalliques (ferritine, colloïdal) utilisés en microscopie électronique

- **2.2 Technique d'immunofluorescence**
- **Préparation des échantillons:**
  - **Fixation** : fixateurs comme paraformaldehyde (4%)
  - **Perméabilisation**: afin d'assurer l'immunolocalisation de l'antigènes protégés par des membranes, traitement par Triton x100
  - **Marquages**: Permet de visualiser la présence d'une protéine spécifique dans des cellules ou dans des coupes à l'aide d'anticorps marqués avec des fluorophores émettant à des longueurs d'ondes spécifiques .

# Immunofluorescence

SAHLA MAHLA

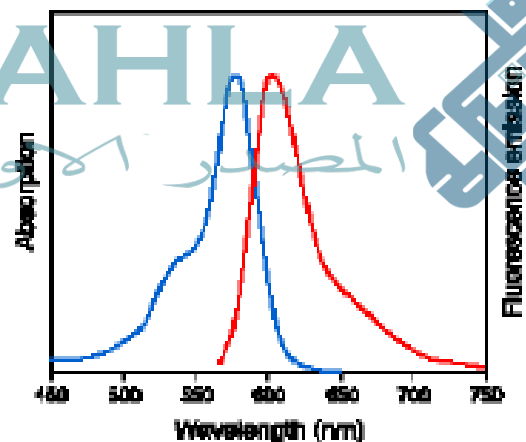
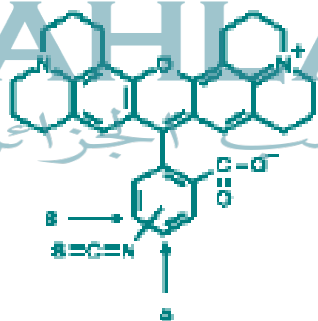
المصدر الأول للطالب الجزائري



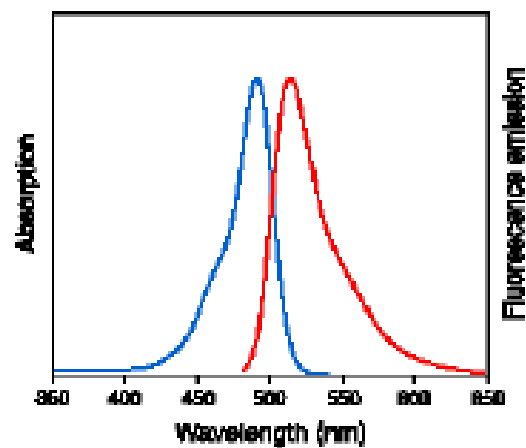
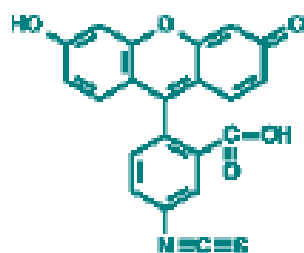
- **Basic idea:** attach a **fluorochrome** to the secondary antibody
- The molecule of interest is considered to be wherever fluorescence is detected

# Fluorochromes

## Rhodamine



## Fluorescein



**Definition fluorochrome:** est une substance chimique capable d'émettre la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatique conjugués.

المصدر الاول للطالب الجزائري



## Les Fluorochromes

### Fluorescéine;

substance chimique complexe composée de deux molécules de phénols liées à un cycle pyrane lui-même relié à un acide benzoïque.

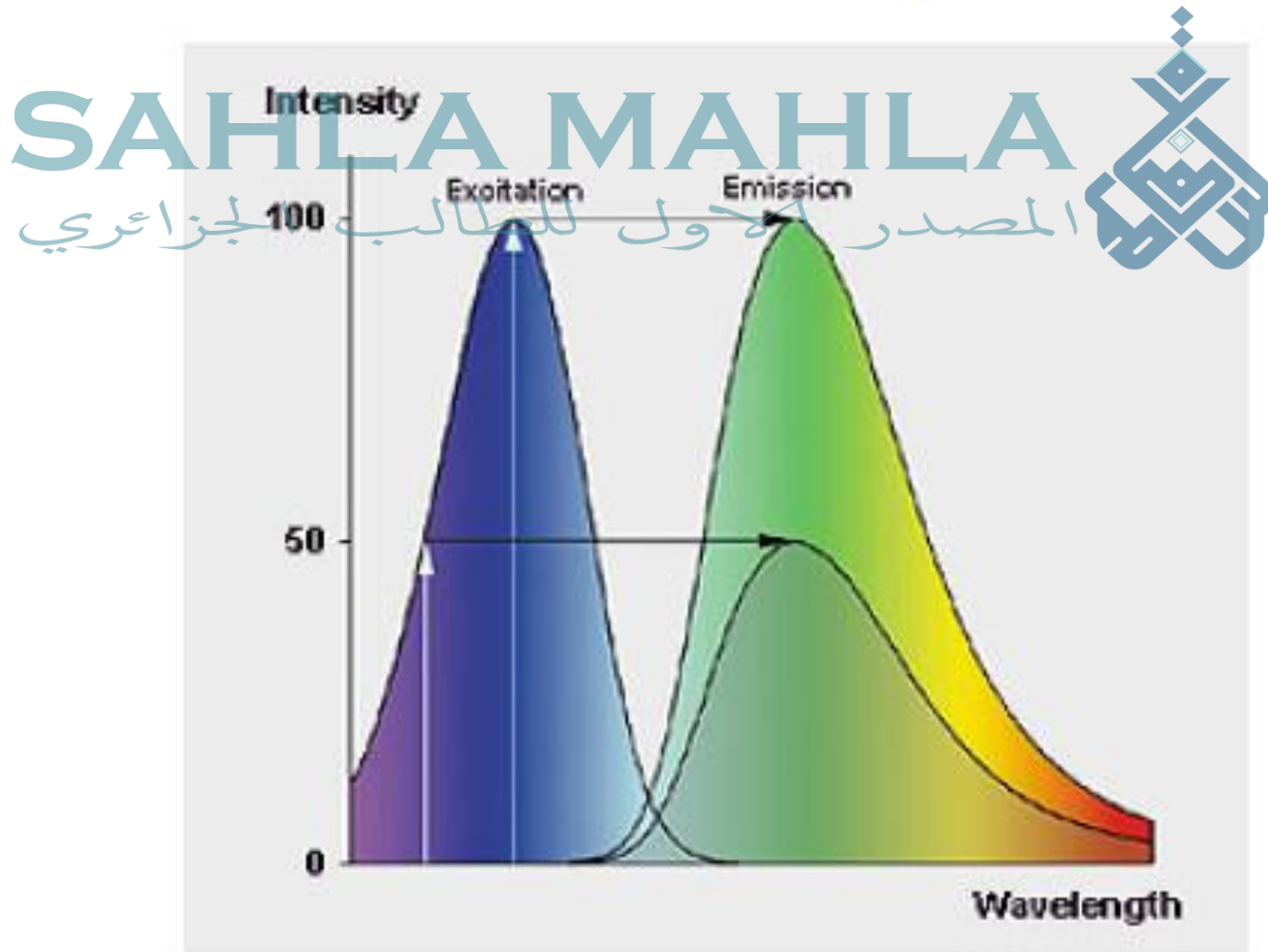
### Texas red:

Derive chlorure de sulfonyle de lasulforhodamine

### Rhodamine

Composés organiques heterotricycliques fluorescent

# Fluorescence spectra



Excitation efficiency and emission intensity as a function of excitation wavelength



# Fluorochromes

Probe	Ex (nm)	Em (nm)
Hydroxycoumarin	325	386
Aminocoumarin	350	445
Methoxycoumarin	360	410
Cascade Blue	375;400	423
Lucifer yellow	425	528
NBD	466	539
R-Phycoerythrin (PE)	480;565	578
PE-Cy5 conjugates	480;565;650	670
PE-Cy7 conjugates	480;565;743	767
Red 613	480;565	613
Fluorescein	495	519
BODIPY-FL	503	512
Cy3	512;552	565,615
TRITC	547	572
X-Rhodamine	570	576
Lissamine Rhodamine B	570	590
PerCP	490	675
Texas Red	589	615
Cy5	625-650	670
Cy7	743	767
Allophycocyanin (APC)	650	660
TruRed	490,675	695
APC-Cy7 conjugates	650;755	767



+ Alexa...

# CHAPITRE 6: MÉTABOLISME CELLULAIRE ET BESOIN NUTRITIF

1

**Ait-Lounis A**  
**cours CCA**  
**master BI révisé 2018**

# L'environnement de cellules

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- 1 Introduction
- 2 Exemples des différents medias
- 3 Constituants de base des médias
- 4 Contaminations
- 5 Matériel et instruments

# 1. Introduction

- Les cellules cultivées exigent un environnement stérile et un approvisionnement en aliments pour la croissance.
- l'environnement de culture devrait être stable en termes de pH et température.
- Des solutions salines à l'origine équilibrées ont été pour l'usage dans le travail avec les cellules mammifères primaires.
- Celles-ci ont été depuis modifiées et enrichies avec des acides aminés, les vitamines, les acides gras et les lipides.

## 2. Exemples des différents médias de culture

Type de supports	Exemples	Utilisations
<b>Solutions salines équilibrées</b>	<b>PBS</b> (Dulbecco's phosphate buffered saline) <b>HBSS</b> (Hansk's balanced salt solution) <b>EBSS</b>	Lavage Dilution Culture cellulaire
<b>Médias basiques</b>	<b>MEM</b> (Eagle's minimal essentiel medium)	Cultures primaires et diploïdes.
	<b>DMEM</b> (Dulbecco's modified Eagles's Medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Culture cellules embryonnaire souris</li> <li>• Majorité lignées</li> <li>• Cellule foie, cellules endotheliale</li> </ul>
	<b>GMEM</b>	Glasgows a modifié MEM a été défini pour les cellules BHK-21

<p><b>Médias complexes</b></p>	<p>RPMI 1640</p>	<p>Pour les cellules leucémiques humaines. hybridomes</p>
<p>SAHLAMAH الجزائري</p>	<p><b>Iscove's modified DMEM (IMDM)</b> Modification enrichie encore de DMEM qui supporte la croissance à haute densité</p>	<p>Lymphocyte B Tissue Moelle osseuse Lymphocyte T Macrophage précurseur</p>
	<p><b>Leibovitz L-15</b> Conçu pour des environnements de CO2 libre</p>	<p>Lignée Hep-2 Explant embryonnaire (cellules primaire) Culture virus Culture cellules neural</p>
	<p>Comité technique 100 Milieu de l'insecte de la grâce Milieu de l'insecte de Schneider</p>	<p>Conçu pour cultiver des cellules d'insecte</p>

**Médias sans  
sérum**

CHO

Pour l'usage dans des applications sans sérum.

Jambon F10 et dérivés  
Jambon F12  
DMEM/F12

NOTE : Ces médias doivent être complétés avec d'autres facteurs tels que l'insuline, la transferrine et le facteur de croissance épidermique. Ces médias sont habituellement HEPES protégés

**Cellules d'insecte**

Sf-900 II SFM, SF  
Insect-Medium-2

Spécifiquement conçu pour l'usage avec des cellules de l'insecte Sf9

# Le Minimum Essential Medium

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	Molarity (mM)
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	30	0.400
L-Alanyl-Glutamine	217	862	3.97
L-Arginine hydrochloride	211	84	0.398
L-Cystine	313	48	0.153
L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	210	42	0.200
L-Isoleucine	131	105	0.802
L-Leucine	131	105	0.802
L-Lysine hydrochloride	183	146	0.798
L-Methionine	149	30	0.201
L-Phenylalanine	165	66	0.400
L-Serine	105	42	0.400
L-Threonine	119	95	0.798
L-Tryptophan	204	16	0.0784
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	104	0.398
L-Valine	117	94	0.803
<b>Vitamins</b>			
Choline chloride	140	4	0.0286
D-Calcium pantothenate	477	4	0.00839
Folic Acid	441	4	0.00907
i-Inositol	180	7.2	0.0400
Niacinamide	122	4	0.0328
Pyridoxal hydrochloride	204	4	0.0196
Riboflavin	376	0.4	0.00106
Thiamine hydrochloride	337	4	0.0119

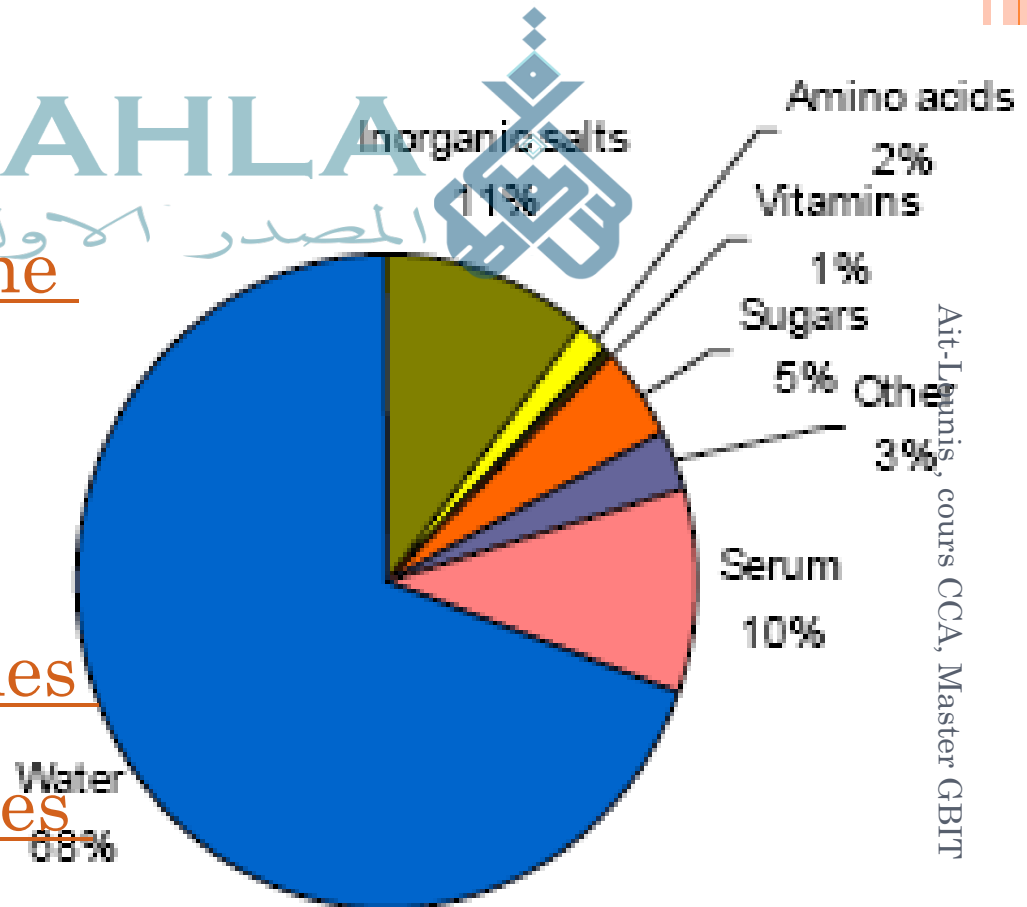
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	111	200	1.80
Ferric Nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	404	0.1	0.000248
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	3700	44.05
Sodium Chloride (NaCl)	58	6400	110.34
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	138	125	0.906
<b>Other Components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25.00
Phenol Red	376.4	15	0.0399

\*Note



### 3. Constituants de base des médias

- Sels inorganiques
- Hydrates de carbone
- Acides aminés
- Vitamines
- Acides gras et lipides
- Protéines et peptides
- Sérum



## 3.1 Sels anorganiques

•Résumé dans le tableau (MEM)utilisés dans la composition chimique des milieux.

•maintenir l'équilibre osmotique (290-320 mOsm/kg) et de maintenir le pH à 6.9-7.8.

•à aider à régler le potentiel de membrane par la fourniture d'ions de sodium, de potassium et de calcium.

-Ces derniers sont exigés dans la matrice de cellules pour l'attachement de cellules et comme cofacteurs d'enzymes.

## 3.2 Systèmes d'amortissement

- La plupart des cellules exigent des conditions de pH dans la gamme 7.2 - 7.4
- Les fibroblastes préfèrent un pH plus élevé (7.4 - 7.7) tandis que, les variétés de cellule transformées continues exigent des états plus acides pH (7.0 -7.4)
- Des cultures utilisant les systèmes normaux de bicarbonate/amortissement de CO<sub>2</sub> doivent être maintenues dans une atmosphère du CO<sub>2</sub> 5-10% en air habituellement fourni dans un incubateur de CO<sub>2</sub>. le bicarbonate/CO<sub>2</sub> est coût bas, non-toxique et fournit également d'autres indemnités chimiques aux cellules.
- HEPES, a le pouvoir tampon supérieur dans la gamme 7.2 de pH - 7.4 mais est relativement cher et peut être toxiques à quelques types de cellules à des concentrations plus élevées.

- La plupart des milieux de culture commerciaux incluent **le rouge de phénol** comme indicateur de pH de sorte que le statut de pH du milieu soit constamment indiqué par la couleur. Habituellement le milieu de culture devrait être changé/complété le niveau si la couleur tourne jaune (acide) ou pourpre (alcalin).

**Violet: pH 7,8**



**jaune: pH 6,5**

**Rouge: pH 7,4**

**Orange: pH 7**

- Le pH intracellulaire est aux alentours de 7.35 à 7.40

- Si le pH augmente: diminution de la prolifération vers 7.7, arrêt de la croissance vers 8.0 à 8.5 et mort cellulaire vers 8.5 à 9

- Si le pH diminue: les cellules sont moins sensibles qu'à une augmentation de Ph. Ralentissement de la croissance si pH est inférieur à 7 et arrêt de la croissance vers 6.5 puis mort de la cellules vers 6

### 3.3 Hydrates de carbone

• La source d'énergie principale est dérivée des hydrates de carbone généralement sous forme de sucres.

• Les sucres principaux utilisés sont glucose et le galactose. Cependant quelques médias contiennent le maltose ou le fructose.

• La concentration du sucre varie des médias basiques contenant 1g/l à 4.5g/l dans encore plus de médias complexes.

• Les médias contenant la concentration plus élevée des sucres diminue le pH, forte oxydation intracellulaire de glucose due formation radicaux libre

## 3.4 Vitamines

- Les vitamines sont des précurseurs pour de nombreux cofacteurs.
- Beaucoup de vitamines de groupe B de vitamines particulièrement sont nécessaires pour la croissance de cellules et la prolifération et pour quelques lignes la présence de B12 est essentielle.
- Quelques médias également ont augmenté des niveaux des vitamines A et E.
- Les vitamines utilisées généralement dans les médias incluent la riboflavine, la thiamine et la biotine.

## 3.5 Protéines et peptides

• Ce sont particulièrement importants dans des médias sans sérum.

• Les protéines et les peptides les plus communs incluent l'albumine, la transferrine, le fibronectin et le fetuin et sont employés pour remplacer ceux normalement actuels par l'addition du sérum au milieu.



## 3.6 Oligoéléments

• des oligoéléments tels que des intermédiaires de zinc, d'en cuivre, de sélénium et d'acide tricarboxylique.

• Le sélénium aide à détoxifier et les aides à enlever les radicaux en l'absence d'oxygène.

## 3.7 Sérum

- Le sérum est un mélange complexe des albumines, des facteurs de croissance et des inhibiteurs de croissance et est probablement l'un des composants les plus importants du milieu de culture.
- Le sérum le plus utilisé généralement est sérum de bœuf foetal
- D'autres types de sérum sont disponibles incluant le sérum nouveau-né de veau et le sérum de cheval.
- La qualité, le type et la concentration de sérum peuvent tout affecter la croissance des cellules et il est donc important d'examiner des séries de sérum pour que leur capacité supporte la croissance des cellules.

- Le sérum peut également **augmenter le pouvoir tampon** des cultures qui peuvent être importantes pour les cellules de croissance lente ou où la densité de ensemencement est basse (par exemple clonage de cellules expérimentales).
- Il aide également à se **protéger contre les dommages** mécaniques qui peuvent se produire dans les cultures remuées ou tout en à l'aide d'un racleur de cellules.
- En outre le sérum **peut lier et neutraliser des toxines**.
- Cependant, le sérum est sujet à la variation de groupe-groupe qui rend l'étalonnage des protocoles de production difficile.
- Il y a également un risque de contamination lié à l'utilisation du sérum. Ces risques peuvent être réduits au minimum en obtenant le sérum d'une source honorable puisque les fournisseurs de grandes quantités de sérum exécutent une batterie des essais de contrôle de qualité et fournissent un certificat d'analyse le sérum.

•En particulier le sérum est examiné pour la présence du virus viral bovin de diarrhée (BVDV) et du mycoplasma.

•L'inactivation thermique du sérum (incubation à 56°C pendant 30 minutes) pour décomplémenter le sérum (pour éliminer toute source non contrôlée de complément )

•Cependant l'utilisation courante du sérum inactivé par chaleur n'est pas une condition absolue pour la culture de cellules. L'utilisation du sérum a également une implication de coût non seulement en termes de formulation moyenne mais également en traitant en aval.

## Besoins nutritifs des cellules

<b>Eau</b>		
<b>Sels minéraux</b>	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup>	Maintien de la PO Cofacteurs enzymatiques Rôle de facteurs d'adhésion ( Ca <sup>2+</sup> )
	Cu, Zn, Co, Fe	Oligoélément
<b>Source d'énergie</b>	glucose glutamine	Principale source d'énergie <i>in vitro</i> elle alimente la néoglucogénèse
<b>Acides aminés</b>	Gln, Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, lieu, Tyr, Cys, Arg, His	Indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés <i>in vitro</i>
<b>Vitamines</b>		Coenzyme Précurseur des bases puriques et pyrimidiques
<b>Facteurs de croissance</b>	cf cours	Hypertrophie (augmentation de taille) Hyperplasie (augmentation de la population cellulaire) Différenciation cellulaire
<b>Facteurs d'adhésion</b>	glycoprotéines calcium dépendante ou non fibronectine (fibroblaste) chondronectine (chondrocytes) collagène (toutes les cellules)	Adhésion des cellules au support
<b>Protéines de transport</b>	Albumine Transferrine	Transport des AG Transport du fer

**Table 1.** Major serum components and profile of fetal calf serum (Lindl and Bauer, ref. 12)

Component	Average concentration per litre
Na <sup>+</sup>	137 meq
K <sup>+</sup>	11 meq
Cl <sup>-</sup>	103 meq
Fe <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , VO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> <sup>6-</sup>	µg to ng
SeO <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	26 µg
Ca <sup>2+</sup>	136 mg
Inorganic phosphorous	100 mg
Glucose	1250 mg
Nitrogen (urea)	160 mg
Total protein	38 g
Albumin	23 g
α-2-Macroglobulin	3 g
Fibronectin	35 mg
Uric acid	29 mg
Creatinine	31 mg
Haemoglobin	113 mg
Bilirubin (total)	4 mg
Alkaline phosphatase	255 U
Lactate dehydrogenase	860 U
Insulin	0.4 µg
TSH (thyroid stim. hormone)	1.2 µg
FSH (follicle stim. hormone)	9.5 µg
Bovine growth hormone	39 µg
Prolactin	17 µg
T <sub>3</sub> (triiodothyronine)	1.2 µg
Cholesterol	310 µg
Cortisone	0.5 µg
Testosterone	0.4 µg
Progesterone	80 ng
Prostaglandin E	6 µg
Prostaglandin F	12 µg
Vitamin A	90 µg
Vitamin E	1 mg
Endotoxin	0.35 µg

**Table 2.** Further serum components essential for cell survival and growth *in vitro*

**Proteins**

Fibronectin

α<sub>2</sub>-Macroglobulin

Fetuin

Transferrin

**Growth factors**

Insulin-like growth factors I and II (IGF)

Somatomedin A and C

Multiplication stimulating activity

Platelet-derived growth factor (PDGF)

Epidermal growth factor (EGF)

Fibroblast growth factor (FGF)

Endothelial cell growth factor (ECGF)

**Amines**

Amino acids

Polyamines (spermine, spermidine)

**Peptide**

Glutathione

**Lipids**

Linoleic acid

Phospholipids

## 3.8 Antibiotiques

**Table 1.2.3** Some Antibiotics Used in Culture Media and Their Microbial Targets

	Antibiotic	Concentration	Microbial targets
	Amphotericin B	2.5 µg/ml	Yeast and other fungi
<i>Beta-lactamine</i>	Ampicillin	100 µg/ml	Gram-positive and -negative bacteria
	Chloramphenicol	5 µg/ml	Gram-negative bacteria
	Gentamicin	50 µg/ml	Gram-positive and -negative bacteria, mycoplasma
	Kanamycin	100 µg/ml	Gram-positive and -negative bacteria, mycoplasma
<i>Beta-lactamine</i>	Penicillin G	100 IU/ml	Gram-positive bacteria
<i>Aminoside</i>	Streptomycin	100 µg/ml	Gram-positive and -negative bacteria
	Tetracycline	10 µg/ml	Gram-positive and -negative bacteria, mycoplasma

Current Protocols in Cell Biology

Antibiotiques doivent:

Éliminer complètement le contaminant microbien

Ne doivent pas affecter la viabilité ou le métabolisme des cellules

Compatible avec les autres éléments du milieu

Large spectre d'action

## 4. Contaminations

### Contaminants biologiques

Bactéries

Levures/moisissures

Virus

Mycoplasmes

### Contaminants chimiques

Endotoxines

Qualité du plastique

Reste de détergent

Trace d'aluminium

Résidus désinfectants

### Contamination croisée

Autres cellules





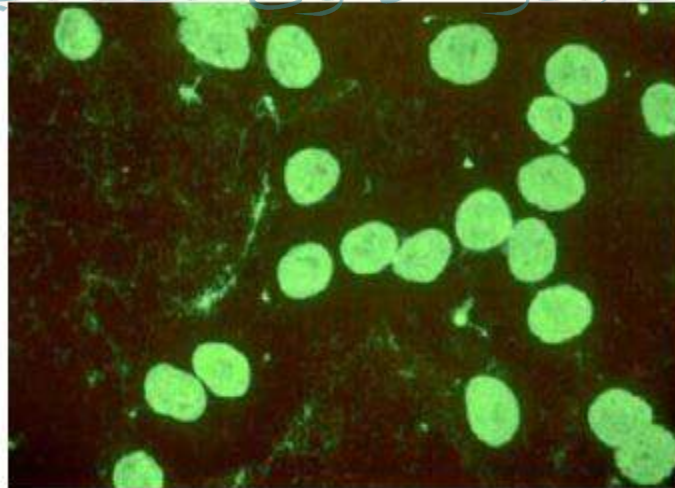
## 4.1 Contamination bactérienne et fongique

- La contamination bactérienne est généralement évidente à l'oeil nu et est détectée par une augmentation soudaine du changement de turbidité et de couleur du milieu de culture comme résultat d'un changement de pH.
- La culture de cellules peut survivre pendant une courte période mais les cellules mourront par la suite.
- L'observation microscopique quotidienne des cultures assurera le dépistage précoce de la contamination et permettra à l'action appropriée d'être prise dès que les premiers signes de la contamination deviendront évidents .
- En outre des essais spécifiques pour la détection des bactéries et des mycètes devraient être employés en tant qu'élément d'une routine et d'une procédure de dépistage régulière de contrôle de qualité

## 4.2 Contamination mycoplasme

Micro-organisme procaryote de type bactérien, dépourvu de paroi rigide (possédant une simple membrane) et capable de multiplication autonome.

المصدر الأول للطلاب الجزائري



80% des mycoplasmes sont résistants à la gentamicine  
15% des mycoplasmes sont résistants au ciprofloxacine  
28% des mycoplasmes sont résistants à la lincomycine  
21% des mycoplasmes sont résistants à la Tyrosine

- Les effets de l'infection de mycoplasma sont plus insidieux que ceux des bactéries et des mycètes induisant plusieurs effets de long terme.

SAHLA MAHLA



- **Ceux-ci incluent :**
  - Taux de croissance réduit
  - Changements morphologiques
  - Aberrations de chromosome

- Cependant, en dépit de ces effets bien documentés la présence du mycoplasma n'est pas souvent examinée.

- La majorité de variétés de cellule sont positive pour le mycoplasma.

- La contamination de mycoplasma est difficile de détecter exiger l'utilisation des techniques spécifiques.

## 4.3 Contamination virale

- Quelques variétés de cellule contiennent les virus endogènes et sécrètent des particules de virus ou des antigènes viraux (lignée transformée par EBV).
- Cependant, le sérum de boeuf est une source potentielle de contamination virale bovine du virus de diarrhée (BVDV).
- L'utilisation du sérum infecté mènera à la contamination des variétés de cellule avec le virus.
- La contamination des variétés de cellule avec BVDV peut causer de légers changements de taux de croissance mais les fournisseurs du sérum doivent garantir la qualité.

## Ce qui à faire en cas de la contamination

- En cas de contamination soit due aux bactéries, aux mycètes ou au mycoplasma, la ligne de conduite recommandée est de jeter la culture et de continuer le travail avec des stocks.
- Les infections virales sont impossibles pratiquement à enlever des cultures puisqu'elles ne réagissent pas au traitement antibiotique.

## Technique Aseptique pour culture cellulaire

Hygiène: cheveux attaches

Se laver les mains avant après. Port de gants blouse

Ethanol 70% mais attention à la perméabilité

La peau contient naturellement des bactéries et des champignons qui adorent les milieux de culture

Tout ce qui est en contact avec la culture doit être stérile flasques pipettes

Environnement: PSM poste de sécurité microbiologique

Nettoyage des hottes:

TFD7 ou RBS détergent désinfectant

Eau

Ethanol

Nettoyer les flacons à mettre sous la hotte



## 5. Matériel et instruments

### 5.1. Hottes a flux laminaire

Verticale: hotte de type I

-Le principe physique est d'obtenir une laminarité des filets d'air filtrés,

Ceux-ci devant s'écouler en filets Rectilignes, parallèles, verticaux

De même sens. On obtient ainsi un apport d'air filtré sur le plan de travail.



-L'ensemble du volume de travail est balayé d'une façon Parfaitement laminaire et donc homogène par de l'air filtré

-Le flux laminaire crée un bouclier qui interdit aux particules Extérieures d'entrer dans l'enceinte.

## 5.2. Hottes de type II

-L'utilisation du matériel a risque  
Comme les lignées produisant  
Des virus.

-La manipulation, le produit, et  
L'environnement sont parfaitement  
protégés

-La protection de l'environnement est assurée par un filtre  
Absolu (High Efficiency Particule Air) placé sur la sortie en  
partie haute et celle du manipulateur par un flux d'air entrant  
En façade avant qui compense celui rejeté à l'extérieur.

-Il ne faut pas poser sur les grilles se trouvant à l'entrée de la hotte, ni  
boucher les grilles se trouvant à l'arrière de manière à ne pas perturber  
le flux d'air.



OPI R&D : Culture cellulaire en zone contrôlée



## 5.3. Incubateurs

- Il s'agit d'incubateurs à CO<sub>2</sub> à jaquette d'eau (minimiser L'évaporation' et chauffage de porte pour éviter la Condensation.
- Il existe un risque de contamination bactérienne ou fongiques due au taux d'humidité dans l'incubateur.
- N'utiliser pas de substances fortement alcalines ou caustiques et d'hypochlorite de sodium (eau de javel'
- La valeur finale du CO<sub>2</sub> se trouvant à l'intérieur de la chambre en fonction de la température, l'humidité et le CO<sub>2</sub> injecté.



## 5.4. Humidité

- Le taux d'humidité requis est apporté par le bac d'humidification situé dans le bas de l'incubateur.
- Les ouvertures fréquentes entraînent une perte d'humidité dans la chambre.
- Le niveau d'eau dans le réservoir doit être vérifié
- Il est important que le niveau du réservoir ou bac reste relativement constant car des variations extrêmes ou des assèchements font varier le taux de CO<sub>2</sub> dans la chambre.

## Matériel et instruments

### Microscope inversé à contraste de phase

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطلاب الجزائري



SAHLA MAHLA



المصدر الأول للطالب الجزائري

## CHAPITRE 7:

**1. PRODUCTION DES MILIEUX DE CULTURES**

**2. CONGÉLATION-DÉCONGÉLATION**

**3. NUMÉRATION**

1

**Ait-Lounis A**  
**cours CCA**  
**master BI 2018**

# 1.1 Introduction

- Les besoins des cellules sont couverts par les milieux de culture, qui doivent reproduire aussi fidèlement que possible *in vitro* les Conditions d'environnement que la cellule trouve *in vivo*.
- Classiquement, la formulation des milieux de culture comprend Des acides aminés, des vitamines, des sels minéraux (Cf chapitre 5):

\* **Les acides aminés** interviennent dans la synthèse des protéines Structurelles et fonctionnelles; dans la régulation des systèmes Enzymatiques, dans la régulation des synthèses d'ADN et d'ARN, donc dans le maintien du cycle cellulaire. On notera le rôle majeur **L.Glutamine** qui entre dans le cycle de Krebs.

\* **Vitamines:** choline, acide folique, pyridoxal, riboflavine, thiamine, Acide nicotinamique, inositol et acide pantothénique, ou acide ascorbique qui joue un rôle important dans le maintien des potentiels d'oxydo-réduction.

\* **La substance énergétique** est le D-glucose (1 à 4,5 g/l)

## 1.2. Production des milieux

### Milieux secs :

- Les pesées des différents composants sont réalisées dans une zone Spécialisée à environnement contrôlé pour la température et l'hygrométrie.
- Les mélanges sont broyés afin d'obtenir une poudre fine. Le produit Final est placé en 40ème pendant la durée des contrôles de qualité.

### Milieux liquides :

- La qualité de l'eau utilisée pour la fabrication des milieux est Essentielle.
- L'eau est désionisée par passage sur résine échangeuse d'ions (cette étape permet d'eau débarrassée de ses impuretés , sels et gaz dissous. Cette eau est ensuite tri-distillée (afin d'éliminer les endotoxines) et Conservée à une température de 85 C en système circulant clos.
- La qualité d'eau est contrôlé en permanence pour leur pH, conductivité Et le taux d'endotoxines

## Contrôles physico chimiques:

- **pH:** mesuré avec un pH- mètre étalonné avec des solutions standards
- **Osmolarité :** mesuré par l'abaissement du point cryoscopique

## Contrôles microbiennes :

- Pour vérifier que les milieux sont en mesure de permettre la Croissance d'un petit nombre d'organismes et qu'il n'y a pas d'effet inhibiteur du milieu.

## Contrôles biochimiques :

- La composition en acides aminés est contrôlée par HPLC pour les milieux liquides.

## 1.3. Traitement et préparation des sérums

- Le sérum est un liquide biologique obtenu par coagulation complète du sang et séparation du culot cellulaire utilisé comme complément
- Les protéines sanguines (hémoglobine, albumine, globuline, fibronectine qui favorise l'attachement, alpha-2 microglobuline qui inhibe la trypsine.
- polypeptides issus du processus de coagulation sont aussi représentés tel le PDGF libéré par les plaquettes qui est le facteur de croissance principal présent dans le sérum.
- Les sérums peuvent aussi contenir des substances inhibant la prolifération cellulaire: l'inactivation par la chaleur (56C), appelée décomplémentation, supprime l'action cytotoxique des immunoglobulines et du complément sans détruire les facteurs de croissances.
- La qualité d'un sérum varie donc en fonction des organismes donneurs(âge, sexe, nutrition, état sanitaire...) et de son traitement.



## Collecte:

➤ La qualité des sérums est déterminée par les conditions de collecte qui doivent associer rigueur et vitesse d'exécution. Les sérums sont collectés selon deux méthodes :

- ✓ Abattoir : Sérums collectés sur des animaux en bonne santé, par exemple le sérum de veau foetal est collecté par ponction cardiaque aseptique; la coagulation complète et la séparation du sérum par centrifugation à 4C.
- ✓ Animaux donneurs: Sang prélevé par ponction veineuse aseptique sur du troupeau en bonne santé.

## Traitement:

- Les sérums bruts passent sur des filtres de porosité décroissante jusqu'à une filtration stérilisante à 0.2-0,1 um selon les sérums
- L'ensemble des opérations de filtration et d'embouteillage est exécuté dans des salles sous pression positive.
- Le produit final est placé en 40ème pendant la durée des contrôles de qualité (3 semaines).

## Traitements spéciaux:

- **Décomplémentation** : sérum à 56 C pendant 30 min
- **Irradiation** : inactivation des virus,
- **Osmolarité** : mesurée par l'abaissement au point cryoscopique
- **Stabilité** : mesurée par variation de la densité optique du sérum après 3 cycles de congélation-décongélation. Un autre test sur la tenue du sérum à 37C pendant 5 jours.

## Contrôles microbiologiques:

- **Stérilité Bactérienne et fongique**
- **Recherche de Mycoplasmes** : par PCR, avec des primers spécifiques
- **Recherche des virus bovins** : par PCR ou par immunofluorescence (antiserum spécifique pour BVD)

# Caractéristique biochimique:

pH	7.0-7.5
Osmolarité	280-340mOsmol/kg
Endotoxine	< 30 EU/ml
Protéine total	3 - 4,5 g/dl
Albumine	1,7 – 3,4 g/dl
IgG	< 250 ug/ml
Hemoglobine	< 20 mg/dl
Mycoplasme	Pas détecté
Test négative pour Virus	PI-3, BVD-AB, BVD-V, BHV-I
Stérilité	Testé
stockage	-20 C

# 2.1. Congélation des cellules

## Procédure

1. Trypsiner les cellules (cf. chapitre )
2. Compter les cellules au bleu trypan
3. Centrifuger 5 min. à 1500 rpm
4. Préparer sur la glace le milieu de congélation (50% SVF-10% DMSO\*-40% DMEM), le filtrer sur 0.22  $\mu\text{m}$
5. Resuspendre les cellules à raison de  $5 \cdot 10^6$  cellules/0,5ml dans du milieu de congélation (pour une bonne congélation il faut que les cellules soient bien resuspendues et dissociées sinon le rendement en sera affecté lors de la décongélation.) et répartir dans des cryotubes.
6. Mettre les cellules à  $+4^\circ\text{C}$  quelques minutes pendant ce temps référencer les tubes de congélation :

<b>Passage</b>
<b>Concentration cellulaire</b>
<b>Nom du manipulateur</b>
<b>Date</b>



7. Laisser refroidir les cryotubes 1 heures  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un container de congélation



(Congèle les cellules à la vitesse idéale de  $-1^{\circ}\text{C}$  par minute et leur assure une cryoconservation correcte et une bonne viabilité lors de la décongélation).

8. Transférer les cryotubes dans la boîte à congélation dans un potoir en polystyrène à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures (la congélation doit être lente, le polystyrène ralentit la congélation)

9. Le lendemain, transférer les cryotubes dans l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ )



10. Noter sur le classeur de congélation l'emplacement du tube avec les références correspondantes et noter sur la fiche de stock prévus à cet effet.

## 2.2. Décongélation des cellules

### Procédure

1. Décongeler rapidement les cellules en les plongeant dans un bain-marie à 37°C.
  2. Transférer le contenu du cryotube dans un tube de 15 ml contenant 10 ml de DMEM- froid
  3. Rincer le tube et faire quelques allers-retours avec la pipette en aspirant refoulant (afin d'homogénéiser la suspension et diluer le DMSO qui est toxique.)
  4. Centrifuger 5 min à 1400 rpm
  5. Re-suspendre les cellules dans 5 ml de DMEM (aspirations et refoulements)
  6. Etaler 5 ml dans un flasque de 25 cm<sup>2</sup>
  7. Laisser 1 jour à 37°C puis changer le milieu 1 fois par jour\*
  8. Faire un passage en fonction de la confluence
- \*(Pour changer le milieu le lendemain de la décongélation : Préchauffer le milieu DMEM à 37°)

# 3. Numération cellulaire

## Principe

- La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en **nombre de cellules par litre**.
- La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération).

## Technique de numération cellulaire

### 1-Dilution préalable

Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, lorsque la suspension est trop concentrée (grand nombre de cellules par unité de volume), il est difficile de compter les cellules.

### 2-Utilisation de la cellule de numération

Il existe deux grands types principaux de cellules de numération :

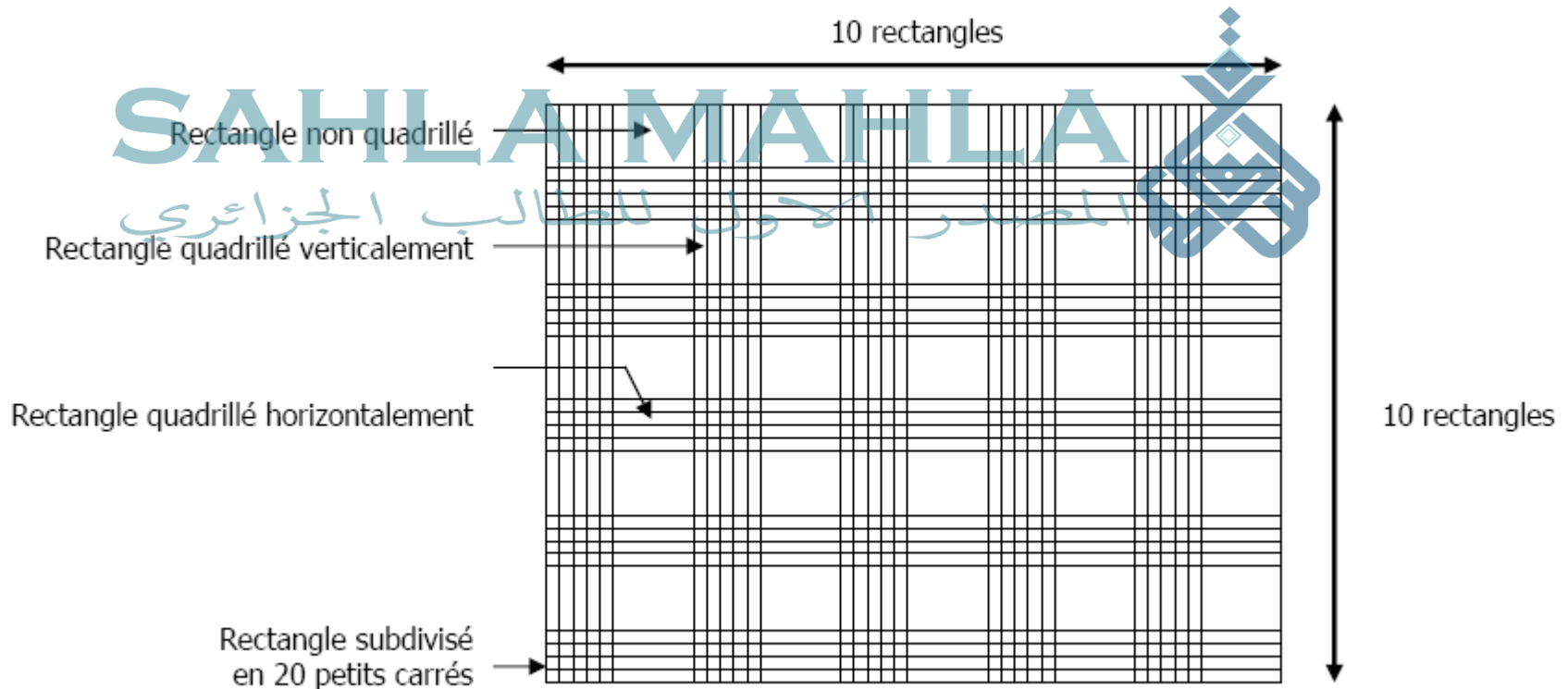
- Cellule de Thoma.
- Cellule de Malassez (la plus courante).

## La cellule de Malassez :

- hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution.
- Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés.
- pour dénombrer les cellules, on place une lamelle de verre sur la cellule de Malassez, sur laquelle on dépose entre 10 et 15  $\mu\text{l}$  de cellules en suspension.
- Après avoir attendu quelques minutes pour que les cellules sédimentent, on peut compter le nombre de cellules dans 20 carrés (quadrillés).



La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

→ le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$

→ chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit  $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

# La cellule de Malassez

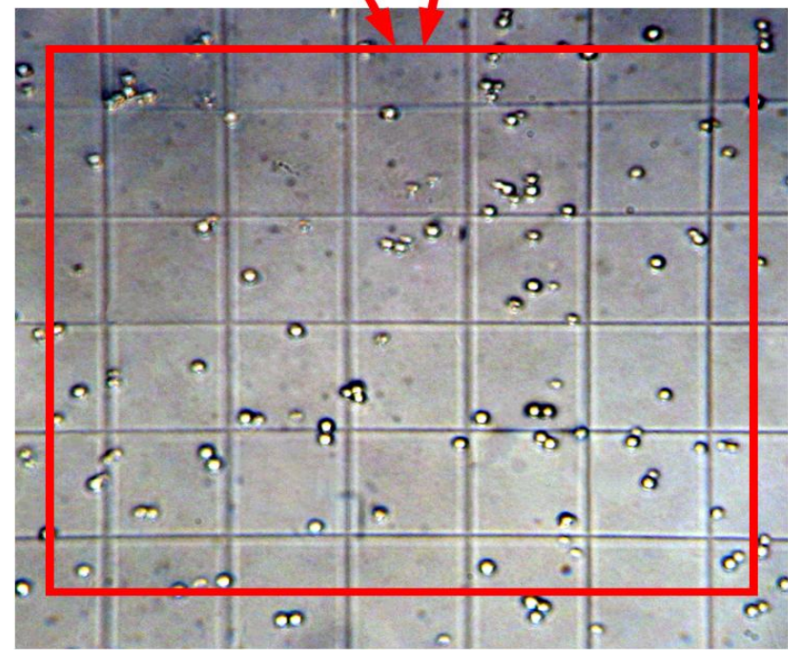
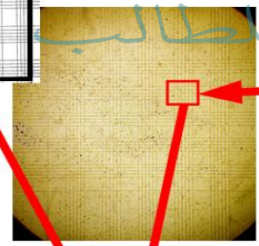
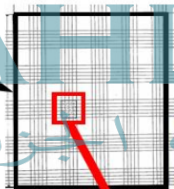
## DILUTION

Maxi 5 à 10 levures par petit carré



ICI DILUTION AU 1/10<sup>ème</sup>

100 grands carrés subdivisés en 20 petits carrés chacun



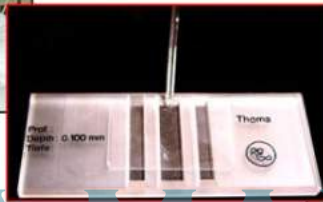
- ❖ 56 cellules pour 20 petits carrés
- ❖ soit  $56 \times 100 = 5600$  cellules/mm<sup>3</sup>
- ❖ soit  $5600 \times 1000$  cellules/ml
- ❖ soit  $5600000 \times 10$  (dilution)
- ❖ N= 56 000 000 cellules/ml

## DILUTION

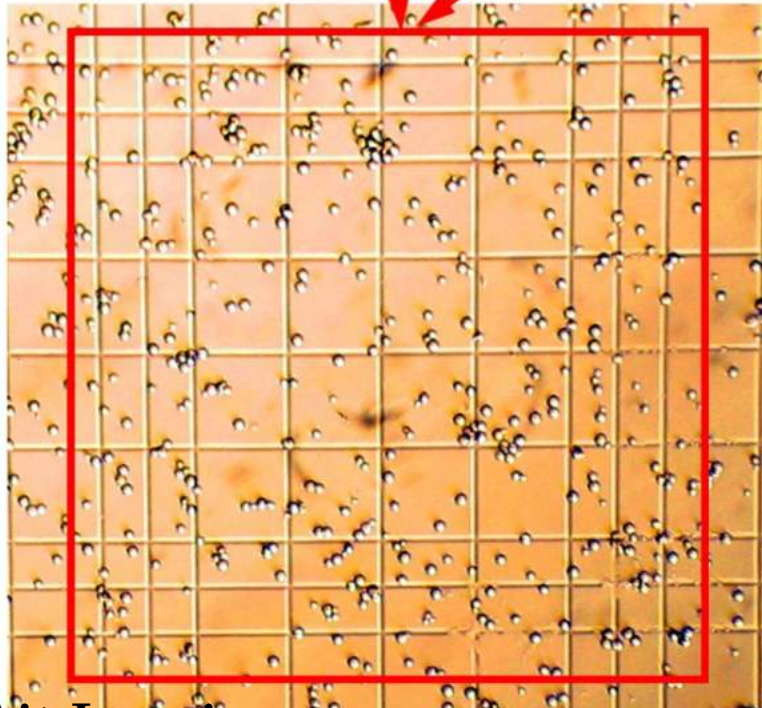
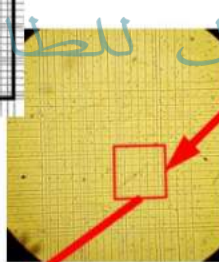
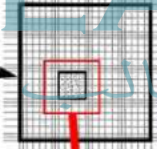
Maxi 5 à 10 levures  
par petit carré



ICI DILUTION  
AU 1/4 ème



16 grands carrés  
subdivisés en 16  
petits carrés chacun



## La cellule de Thoma



- ❖ 116 cellules pour 16 petits carrés
- ❖ soit  $116 \times 16 \times 10 = 18560$  cellules/mm<sup>3</sup>
- ❖ soit  $18560 \times 1000$  cellules/ml
- ❖ soit  $18560000 \times 4$  (dilution)
- ❖ **74 000 000** cellules/ml

## 4. Bonne pratique en culture cellulaire



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري







# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري





# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري





# SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



