
Cultures cellulaires
L3 Biochimie

SAHLA MAHLA



Dr.

Dr AIT ARAB-DJERABA Z

Année universitaire 2020-2021

Introduction générale :

« Jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, on pensait que la vie ne pouvait exister que dans un organisme complexe. Les travaux de Louis Pasteur ont profondément modifié notre vision du monde. Il a réussi à faire accepter la notion d'une vie à l'échelle microscopique. Le précurseur le plus célèbre dans le domaine de la culture cellulaire, fut l'embryologiste allemand Wilhem Roux. Il est en effet parvenu à maintenir de la moelle d'embryon de poulet *in vitro*. Puis en 1907 et 1910, ce furent les expériences de l'Américain Ross Harrison et surtout du Français Alexis Carrel, qui firent émerger la notion de cultures cellulaires vivantes *in vitro* » ;(Adolphe, 2015).

Mais en réalité, ce n'est qu'en 1952, grâce aux travaux d'Aron Moscona, que le concept de la culture cellulaire est né officiellement. Ce biologiste Américain, eut l'idée de soumettre un fragment d'embryon de poulet à l'action d'une enzyme, la trypsine ; obtenant ainsi des cellules isolées *in vitro* qui étaient capables de se multiplier. C'est la naissance d'une nouvelle discipline « la culture cellulaire ».

Plusieurs périodes clés ont caractérisé la culture cellulaire :

- 1885-1900 : période d'initiation ou des précurseurs. Roux met en culture des cellules d'embryons de poulet dans une solution saline
- 1907-1940 : période de la culture de tissus, initiée par Harrison et développée par Carrel. Ces deux chercheurs ont apporté des améliorations au niveau des règles d'asepsie en plus des études sur les besoins nutritionnels.
- 1952 : période de la naissance de la culture cellulaire ; caractérisée par la libération des cellules à partir des tissus, connue sous le nom de « Trypsination des tissus »
- 1955 : Eagle détermine les besoins nutritifs des cellules en culture
- 1955-1965 : décennie de propagation des souches cellulaires
- 1975 : période des premières lignées hybridomes productrices d'anticorps
- 1990 : période de production des anticorps monoclonaux
- 1998 : période des premières lignées de cellules embryonnaires souches humaines mises en culture
- 2003 : naissance de la culture cellulaire en 3D par Bissel et collaborateurs.

Définition :

La culture des cellules animales appartient à un ensemble de technologies intitulées : la culture de tissus. Nous pouvons distinguer trois aspects : la culture d'organes, de tissus et enfin la culture cellulaire. Les deux premiers aspects correspondent au maintien en dehors de l'organisme, de tissus d'une manière qui permettrait la conservation des fonctions spécifiques de chaque tissu. La culture cellulaire, quant à elle, correspond au maintien en dehors de l'organisme de cellules non organisées en tissus ; mais capables de se diviser et d'exprimer *in vitro* des métabolismes ainsi que des fonctions spécifiques.

Pour résumer « *La culture cellulaire, c'est le maintien de la plus petite unité de vie autonome en dehors d'un organisme vivant* », (Adolphe, 2015).

Applications de la culture cellulaire :

Les techniques récentes de la culture cellulaire sont liées au développement des biotechnologies. Elles ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques, des mécanismes biochimiques en diminuant ainsi le recours à l'expérimentation *in vivo*. Les exemples des applications de la culture cellulaire sont nombreux. Dans le domaine de la biologie cellulaire, la culture cellulaire permet d'étudier les phénomènes physiologiques tels que la 'division, différenciation et vieillissement cellulaire', et physiopathologiques tel que le cancer. Dans le domaine de la santé, elle permet de diagnostiquer des maladies virales et d'étudier des mécanismes d'infection par un virus. Tester des molécules pharmacologiquement actives sur des cellules ou lignées cellulaires, constitue un grand pas dans le domaine de pharmacotoxicologie. Il faut souligner le rôle important que joue cette discipline dans le domaine des biotechnologies par la production de molécules à usage thérapeutique, tels que l'insuline, les hormones, les vaccins et les cytokines.

Quelques définitions importantes:

- ✓ Une culture primaire (primo-culture) : c'est une culture dérivant de cellules, de tissus ou d'organes prélevés directement sur un organisme.
- ✓ Repiquage ou passage : c'est le transfert des cellules d'un flacon de culture à un ou plusieurs flacons.
- ✓ La lignée cellulaire : dérive d'une primo-culture au moment du premier repiquage
- ✓ La souche : dérivée d'une primo-culture ou d'une lignée cellulaire par sélection ou par clonage de cellules possédant des propriétés ou des marqueurs spécifiques.
- ✓ Clone cellulaire : c'est une population de cellules dérivant d'une seule cellule par division.
- ✓ Un hybridome: c'est une cellule résultant de la fusion *in vitro* d'une lignée maligne de plasmocytes, capable de se multiplier indéfiniment et de lymphocytes B provenant de la rate d'un animal préalablement immunisé par des injections successives d'un antigène.

« Chapitre 1: Les méthodes de culture »

Introduction :

Au sein d'un organisme vivant, deux types de cellules peuvent être distingués. Les cellules libres ou circulantes telles que les cellules du sang et les cellules en cohésion les unes avec les autres constituant un tissu. Les méthodes d'obtention et de culture de ces deux types cellulaires diffèrent. En effet, les cellules circulantes sont obtenues par des techniques habituelles de prélèvement suivies de centrifugations différentielles. Quant à l'isolement des cellules organisées en tissus, il met en œuvre des techniques plus originales et plus complexes (méthodes fondées sur la dissection et les méthodes enzymatiques).

1. Les méthodes d'obtention :

➤ Séparation des cellules :

- ✓ Les cellules circulantes telles que les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs)

Les techniques de séparation des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs), à partir de sang total, ont été développées depuis plus d'une quarantaine d'années. Ces techniques ont pour but d'isoler les lymphocytes et les monocytes.

Les leucocytes issus du sang périphérique sont constitués de polynucléaires et de cellules mononucléaires incluant lymphocytes et monocytes. La séparation des PBMCs à partir de sang total, se fait sur gradient de densité en utilisant le Ficoll qui reste la technique la plus utilisée. Le principe de cette technique est basé sur la différence de densité entre les types cellulaires du sang figuré. Le Ficoll dont la densité est de 1,077 permet de séparer les PBMCs des autres cellules (Fig.1).

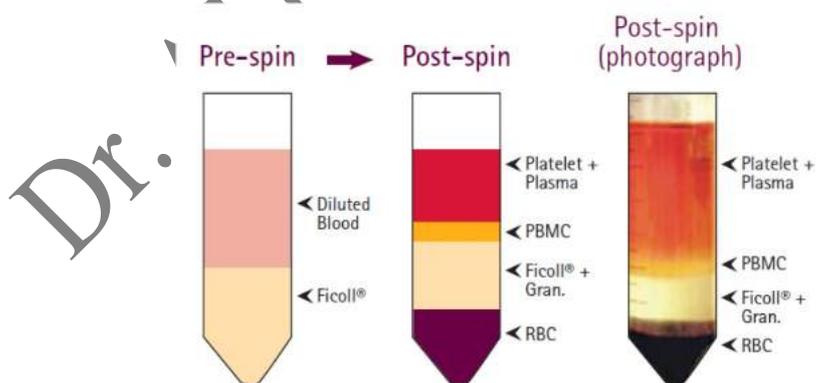


Figure 1 : séparation des PBMCs sur Ficoll-hypaque

✓ Les cellules en cohésion (adhérentes) :

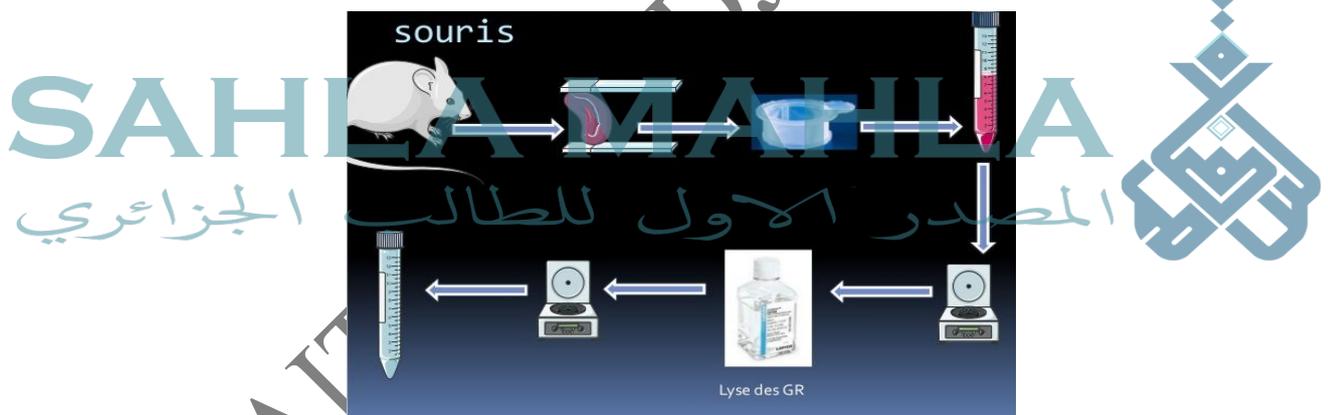
Lorsque les cellules s'organisant en tissus sont prélevées d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles adhèrent au support, se divisent et prolifèrent. Deux méthodes de base peuvent être utilisées pour l'obtention de ces cellules.

- a. Les méthodes de dissection : ce sont les méthodes les plus anciennes, puisque c'est avec ces techniques que tous les précurseurs de la culture de tissus obtinrent les premières cellules *in vitro*.

-La méthode des explants : consiste à couper le tissu en fragments d'environ 1 à 4 mm³. Ces fragments seront encore réduits à l'aide d'une pince et placés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier.

Il faut noter que pour proliférer et migrer les cellules en cohésion doivent adhérer au support. L'adhésion est le facteur décisif du démarrage de la culture cellulaire. Il est donc nécessaire de mettre les explants dans un flacon ne contenant qu'un très faible volume du milieu nutritif afin d'éviter la flottaison des cellules. En effet, ce phénomène conduirait à l'incapacité de migration cellulaire à partir des explants isolés. Il faut alors attendre quelques heures, pour que l'explant adhère au support, pour rajouter la quantité convenable du milieu.

-La méthode mécanique : c'est une technique utilisée pour les organes mous comme le thymus, et la rate. Elle consiste à dissocier mécaniquement et délicatement les cellules.



- b. Les méthodes enzymatiques :

Les enzymes utilisées sont des enzymes protéolytiques telles que la trypsine ou la collagénase, qui digèrent la trame protéique entourant les cellules. La trypsine est utilisée à une concentration de 0,5 à 2,5 g/L dans une solution saline de Hanks ou dans un tampon PBS sans Mg⁺² et Ca⁺². La trypsination est réalisée sous agitation lente pendant 3 à 5min afin de ne pas léser la membrane cellulaire. Il faut ensuite procéder à une inactivation de la trypsine par des lavages avec du milieu de culture additionné de sérum de veau fœtal ou un inhibiteur trypsique de Soja. Après centrifugation, les culots cellulaires sont dispersés dans un milieu de culture, puis filtrés afin d'éliminer les amas cellulaires avant la mise en culture.

➤ Purification des cellules :

- ✓ Par adhérence à un support : deux types d'adhérence peuvent être considérés :

-L'adhérence non spécifique : c'est l'exemple des monocytes qui ont la propriété d'adhérer au plastique, ce qui permet de les éliminer des suspensions cellulaires en incubant celles-ci dans des boîtes de cultures en plastique. Après un temps d'incubation des PBMCs (de 1h30 à 2h), les cellules subissent deux lavages avec du PBS, ainsi les cellules non adhérentes sont éliminées ; seuls les monocytes restent fixés sur les plaques de culture (Fig.2).

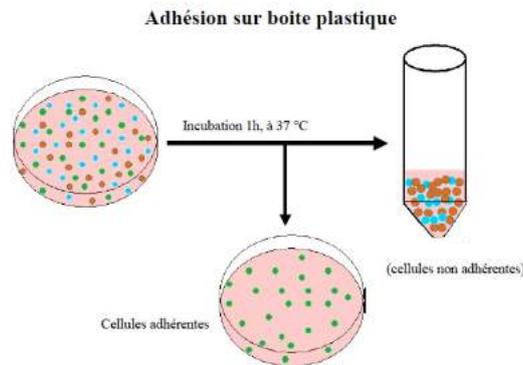
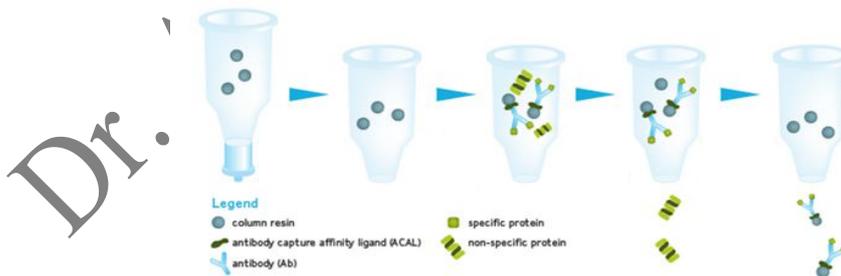


Figure 2 : Purification des monocytes du sang périphérique

-L'adhérence spécifique (chromatographie d'affinité): la purification des cellules est basée sur l'interaction entre un récepteur exprimé à la surface d'une cellule (CD14/monocytes) et son ligand (Anti-CD14) immobilisé au préalable sur la résine de la colonne de chromatographie. Après élution, toutes les cellules sont éliminées à l'exception des cellules d'intérêt.

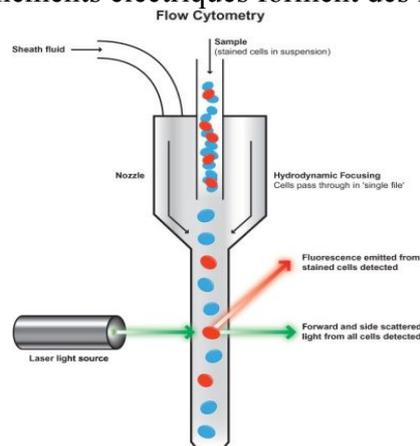


- ✓ Par immuno-marquage :

- La cytométrie en flux :

Cette technique fait appel au trieur de cellule par fluorescence «FACS » capable de séparer un seul type cellulaire dans un mélange de plusieurs types cellulaires. Dans cette technique, les cellules sont isolées selon leur taille relative, leur granularité (présence de granulations cytoplasmiques) et l'expression de marqueur(s) spécifique(s) à leur surface.

Pour ce faire, les cellules sont marquées spécifiquement à l'aide d'anticorps couplés à des molécules fluorescentes (FITC: émet une fluorescence de couleur verte). Les cellules sont par la suite entraînées, une à une, dans un flux liquide et défilent à grande vitesse devant une source lumineuse, le plus souvent un rayon laser. Chaque cellule va dévier le faisceau lumineux et cette déviation va renseigner sur les caractéristiques des cellules. Les signaux de diffusion et de fluorescence sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques, traités par un système informatique. Chaque cellule est ainsi transformée en un événement électrique avec plusieurs coordonnées (taille, granularité, fluorescence 1, fluorescence 2...). Ces événements électriques forment des nuages de points.



- Le tri cellulaire par billes magnétiques :

La séparation cellulaire par billes magnétiques a de nombreux avantages par rapport aux autres techniques de séparation. Les particules magnétiques présentent l'avantage d'être des « surfaces mobiles » que l'on peut manipuler en maîtrisant les propriétés d'un champ magnétique. Comparée aux autres techniques de séparation cellulaire, cette technique est simple et rapide. En effet, le tri par billes magnétiques permet de purifier une sous-population cellulaire avec une bonne efficacité, et d'obtenir plusieurs centaines de millions de cellules en une dizaine de minutes (Ghiringhelli *et* Schmitt., 2004).

Le principe du tri par billes magnétiques repose sur un marquage de la sous-population à isoler (ou à éliminer) par un anticorps spécifique couplé à une bille magnétique. Après marquage avec cet anticorps spécifique, les cellules sont introduites dans une colonne qui traverse le champ magnétique créé par un aimant. Les cellules qui sont marquées sont retenues sur la colonne par cet aimant, alors que les cellules non marquées sont éluées et récupérées dans un premier tube à essai. Les cellules marquées par les billes sont ensuite récupérées par gravité après avoir retiré l'aimant dans le deuxième tube (Figure 3) ; (Ghiringhelli *et* Schmitt., 2004).

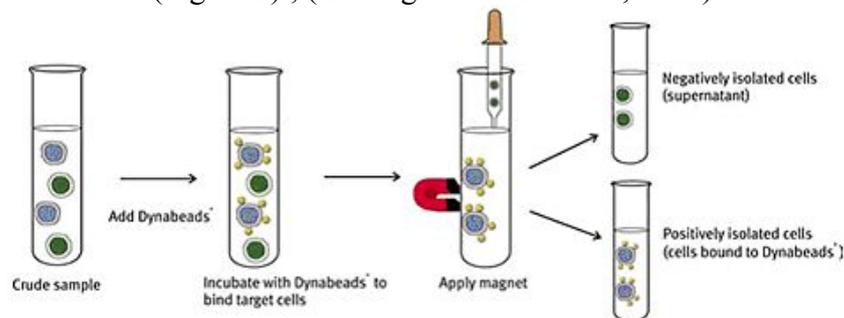


Figure 3 : Principe du tri cellulaire par les billes magnétiques (Ghiringhelli *et* Schmitt., 2004)

2. Les méthodes de culture:

a. Matériel utilisé :

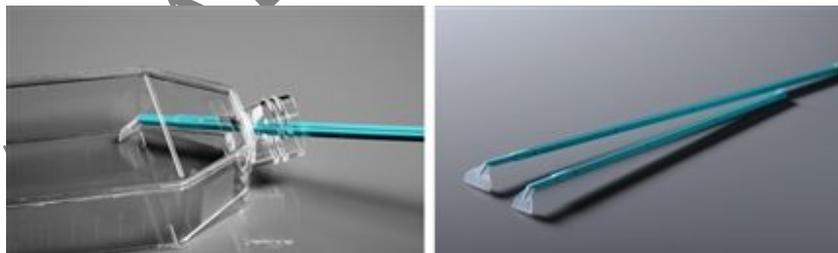
La fabrication de supports pour la culture cellulaire fait appel à des matières premières spécifiques.

✓ Le consommable :

- ❖ Les flacons T (Flasks) : les flacons se déclinent sous différentes formes et tailles. Pour les cultures des cellules adhérentes, les surfaces des flacons sont prétraitées afin d'améliorer l'adhésion et la prolifération. Ces flacons sont non traités pour les cellules en suspension.



- ❖ Les Grattoirs : idéals pour la récolte manuelle des cellules dans des flacons, ils facilitent les travaux de récolte et de grattage. Une simple rotation sur le manche du grattoir permet de changer de direction et une légère pression sur le manche permet d'améliorer l'angle de grattage. Le design du grattoir permet de minimiser l'accumulation de la suspension cellulaire au niveau de la lame.



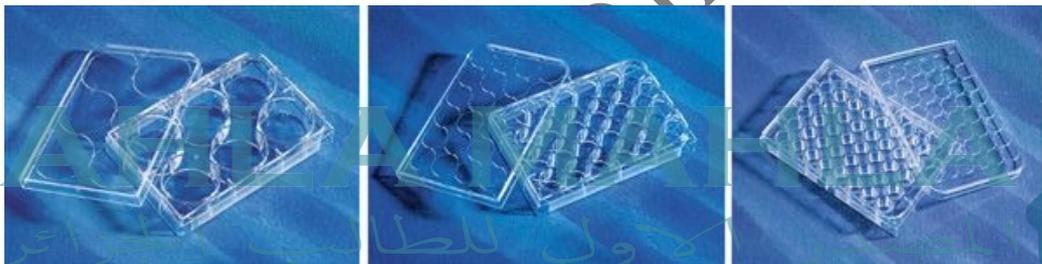
- ❖ Flacons Spinner : dans lesquels les cellules sont activement gardées en suspension dans le milieu. L'agitation est optimisée (même à basse vitesse) par la taille et la hauteur de la pale. L'aimant incorporé permet une rotation régulière



- ❖ Les rollers : ces flacons à surface plissée permettent de doubler la surface de culture. De plus, la rotation des rollers dans les incubateurs à CO₂ permet un apport continu du milieu de culture à toutes les cellules. Leur utilisation augmente la survie des cellules suite à la cryoconservation et permet une meilleure reproductibilité et uniformité de l'attachement des cellules.

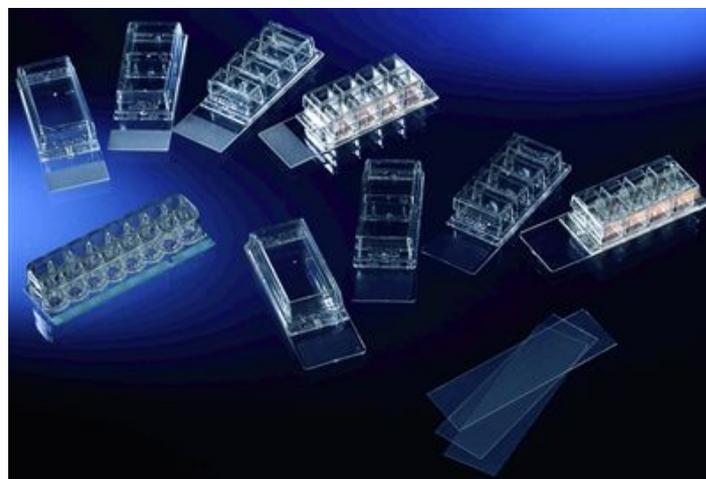


- ❖ Les plaques multipuits (microplaques) : elles peuvent être avec surface hydrophile (surface traitée) pour une meilleure adhérence cellulaire ou avec surface hydrophobe pour cultures en suspension et cellules hybridomes. Elles sont caractérisées par une haute transparence et leur couvercle qui permet un échange de gaz optimal avec une évaporation très faible.



Microplaques à 6, 12, et 48 puits

- ❖ Chambre de culture sur lame de microscope : les cavités pour lames éliminent le besoin de transfert de cellules avant la visualisation/coloration. La structure supérieure peut être enlevée quand la culture est complète. Idéale pour test viral et de mycoplasme, les études de chromosome, de toxicité et l'immuno-cytologie.



- ❖ Tubes pour culture cellulaire (Cryotubes) : sont disponibles en différentes tailles pour congeler les cellules permettant une conservation à long terme.



- ❖ Appareillage et équipements:
 - ✓ Agitateurs pour spinners :



- ✓ Incubateur à CO₂



- Incubateur agitateur



✓ Appareils à rollers



Etuve pour appareils à rollers



✓ Hotte à flux laminaire: elle assure la stérilité des manipulations sur les cellules en culture, en préservant la surface de travail de l'arrivée de tout micro-organisme ou autre contaminant porté par des poussières. Un flux d'air vertical continu et filtré joue le rôle de barrière. Le travail sous hotte doit être précis et minutieux, afin de ne pas être vecteur de contaminations.



✓ Système de filtration (sous vide) pour les milieux de culture :



b. Les méthodes de culture : comme pour les méthodes d'obtention, les méthodes de culture des cellules circulantes diffèrent de celles des cellules en cohésion.

➤ Les méthodes en suspension :

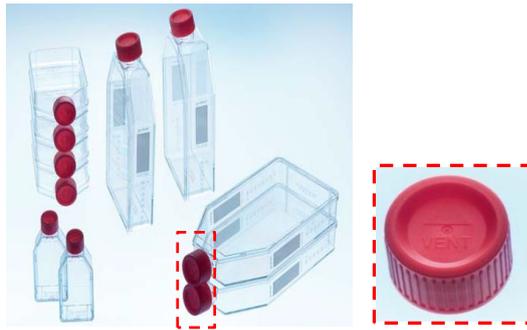
Le but de ces méthodes est d'éviter l'adhésion des cellules au support et d'empêcher l'agrégation cellulaire. Les cellules sont mises en culture dans des microplaques en plastique non traité et stérile. Il existe un autre type de système permettant le maintien des cellules en suspension ; il s'agit des cultures agitées. Ce système est composé de barreaux magnétiques siliconés « Spinner ». Toutes ces données ont contribué à la conception d'appareils d'agitation très perfectionnés « Cytoculteurs » utilisés à l'échelle industrielle. Ces derniers sont utilisés dans le cadre de production d'un métabolite par une culture cellulaire donnée, où les flasks ne suffisent en général plus, de par leur volume limité.



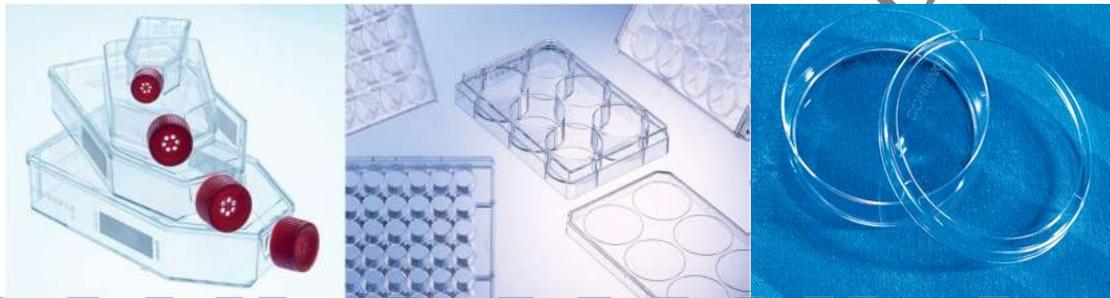
➤ Les méthodes stationnaires : le principe général de ces méthodes est lié à l'affinité des cellules pour un support. La nature de ce dernier est donc très importante. Actuellement, les matières plastiques traitées par un support physiologique (collagène, fibronectine, protéoglycane) sont utilisées permettant l'adhésion des cellules. Les cellules adhérentes nécessitent également un bon substrat pour la fixation et la croissance. Le verre et les plastiques spécialement traités (pour rendre hydrophile ou mouillable la surface normalement hydrophobe des plastiques) sont les substrats les plus communément utilisés. Cependant, des facteurs d'adhérence, comme le collagène, la gélatine, la fibronectine et la laminine, peuvent être utilisés pour recouvrir les substrats afin d'améliorer la croissance et la fonction des cellules.

Tous les contenants (récipients) de culture (pour les cellules en suspension ou adhérentes) qui ont été cités, peuvent être divisés en trois systèmes :

- Système clos : fait appel à des boîtes fermées placées dans des étuves bactériologiques. Dans ce type de système, l'environnement gazeux et le pH seront modifiés si le milieu n'est pas renouvelé. Ce type de système est utilisé pour les cellules résistantes comme les lignées amniotiques.



- Système semi-clos : fait appel aux boîtes Pétri, microplaques, les flacons à bouchons ventilés, qui sont placés dans des incubateurs à CO₂ où l'atmosphère est régulée avec une arrivée constante d'un mélange gazeux composé de 95% d'air et de vapeur d'eau et de 5%CO₂. Ce système est le plus utilisé et le mieux adapté à la culture cellulaire, car il y a une meilleure régulation de l'environnement gazeux et du pH.



Flacons à bouchons ventilés

Microplaques

Boîtes Pétri

- Système ouvert : est utilisé pour de petites quantités de cellules. Il s'agit des chambres de culture. Ce type de système est utilisé pour des études nécessitant une observation au microscope particulièrement « microcinématographie ».

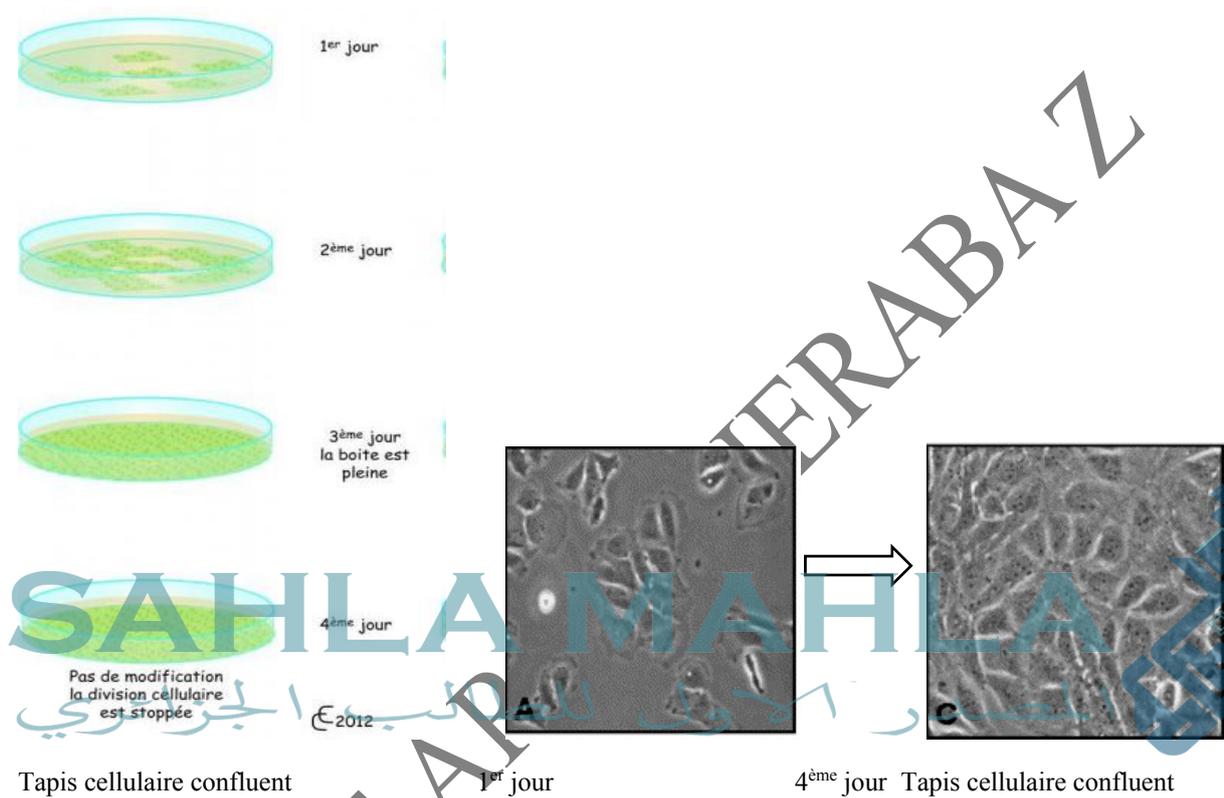
3. Les méthodes d'entretien :

Une fois les méthodes de culture connues, il est nécessaire d'envisager également des techniques d'entretien. Elles sont de deux ordres :

La première est le changement du milieu de culture. Elle consiste simplement à changer le milieu appauvri et à le remplacer par du milieu frais.

Le repiquage ou le passage, est comme le changement du milieu, une opération à pratiquer régulièrement pour l'entretien d'une culture cellulaire *in vitro*. La plupart des cellules cultivées *in vitro* adhèrent au support et entre elles. Une fois mises en culture, elles prolifèrent jusqu'à former un tapis unicellulaire confluent (couvrant toute la surface du support), moment où leur multiplication s'arrête. A ce moment, il faut procéder au repiquage des cellules, c'est à dire leur transfert dans de nouveaux contenants neufs et dont toute la surface est libre. Cette opération nécessite donc le détachement des cellules de leur support et leur séparation les unes des autres soit par grattage mécanique soit par action enzymatique. Les enzymes les plus

utilisées sont la trypsine et la collagénase. L'action de la trypsine est inhibée par les ions calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}) et par le sérum de veau fœtal (SVF). Donc, avant de faire agir la trypsine, il faut éliminer toute trace de Ca^{2+} , Mg^{2+} et de SVF par simple lavage avec du PBS. Une fois que les cellules aient été individualisées, il faut que l'action de la trypsine soit arrêtée par addition de SVF avant que les cellules ne soient abîmées. Il faut donc contrôler l'action de la trypsine en stoppant son activité dès que le tapis cellulaire s'est individualisé du support.



« Chapitre 2: Besoins nutritifs des cellules en culture »

Les milieux de culture doivent être vecteurs d'éléments nutritifs et contribuer au maintien des constantes physico-chimiques (pH, osmolarité).

1. Composants des milieux de culture :

Un milieu de culture typique est composé d'un complément d'acides aminés, vitamines, sels minéraux, glucose et de sérum comme source de facteurs de croissance, hormones, et facteurs d'adhésion. De plus, le milieu de culture permet le maintien du pH et de l'osmolarité du système de culture. Un milieu de culture doit contenir tous les facteurs responsables du maintien de toutes les fonctions cellulaires.

Nous pouvons distinguer deux principaux types de milieux :

- ✓ Les milieux artificiels ou synthétiques de base: leur composition est plus ou moins complexe, ils portent généralement le nom du chercheur qui les a mis au point : Eagle, Dulbecco, ... 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. Ces milieux doivent être additionnés également d'ATB empêchant la contamination bactérienne.



source <http://www.nobelprize.org/>

Dulbecco, un des pionniers de la culture cellulaire vers les années 50 et le milieu qui porte son nom (DMEM)

- ✓ Les milieux définis : les composés de ces milieux sont connus de manière précise. Ces milieux sont généralement formulés spécifiquement pour supporter la culture d'un seul type cellulaire et incorporent des quantités définies de facteurs de croissance et des hormones purifiés, lipoprotéines et autres protéines normalement fournies par le sérum. Cependant ces milieux coutent chers car tous les constituants sont hautement purifiés.

Pour résumer, un milieu de culture est composé d'un milieu de base et d'additifs.

a. Composition du milieu de base :

- Les sels minéraux : Ils aident à maintenir l'équilibre osmotique des cellules et à réguler le potentiel membranaire en apportant des ions sodium, potassium et calcium. Ils sont aussi des cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques. Sept ions sont indispensables (Na^+ , K^+ , PO_4^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , CO_3^{2-}).
- Les oligo-éléments : doivent être apportés à l'état de trace. Il s'agit des métaux lourds (le cuivre, le cobalt, le sélénium, cadmium), dont le rôle est la dégradation des peroxydes toxiques ainsi que le maintien de la fonctionnalité des enzymes.
- Les acides aminés : sont les composants des protéines, leur présence dans les milieux de culture est indispensable. Chez l'homme huit acides aminés sont essentiels (Ileu, Leu, Lys, Meth, Phe, Thr, Trp, Val) et doivent être apportés par le milieu car les cellules sont incapables de les synthétiser. Lors du passage *in vitro*, la synthèse de certains acides aminés a été perdue, ils doivent aussi être apportés par le milieu (Tyr, Arg, His, Cys).

La L-glutamine est un acide aminé instable qui, avec le temps, est converti en une forme non utilisable par les cellules. Elle doit donc être ajoutée au milieu juste avant l'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.

- Les molécules énergétiques : la molécule énergétique fondamentale est généralement le glucose (à une concentration de 1 g/L, concentration semblable à celle du sérum humain). Il peut être substitué par d'autres oses tels que le galactose, le mannose ou le fructose.
- Les vitamines : ce sont des molécules organiques, sans valeur énergétique propre, nécessaires en quantités minimes (fractions de microgramme à quelques milligrammes), au maintien de la croissance et du métabolisme. Les besoins sont variables suivant les types cellulaires. Les vitamines du groupe B sont le plus souvent ajoutées pour stimuler la croissance. En effet, selon Eagle, 8 vitamines sont indispensables : choline, acide folique (B9), thiamine (B1), pyridoxal (B6), riboflavine (B2), acide nicotinique (B3), inositol, acide panthoténique (B5).

b. Les additifs

➤ Le sérum : Afin que les cellules puissent se diviser et se différencier il faut leur apporter hormones, facteurs de croissance, et protéines ; 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 sérum le plus utilisé est le sérum de veau fœtal (SVF), ce dernier ayant les meilleures performances. Le sérum est un mélange de composition extrêmement complexe assurant l'apport de facteurs de croissance et hormones, impliqués dans la promotion de la croissance et des fonctions spécifiques des cellules.

Ceci dit, le sérum constitue un facteur limitant d'une part, par les concentrations d'hormones et de facteurs de croissance qui peuvent varier d'un sérum à un autre. D'autre part, ils présentent des 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. C'est pour cette raison que les chercheurs ont recours aux milieux définis.

➤ Les ATB : sont utilisés afin de contrôler la croissance des contaminants bactériens et fongiques.

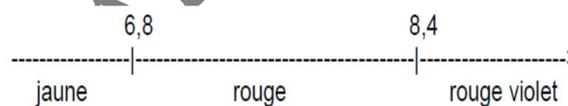
2. *Maintien des constantes physicochimiques :*

En plus d'apporter les éléments nécessaires à la survie des cellules, le milieu de culture joue un rôle dans le maintien des constantes physico-chimiques. En effets, plusieurs paramètres sont à prendre en considération pour assurer un bon déroulement des cultures cellulaires à savoir le pH, l'osmolarité, l'environnement gazeux ainsi que la température.

a. Le pH :

Les cellules doivent être placées dans un milieu où le pH correspond à celui de l'organisme dont elles sont issues. Afin de suivre la variation du pH, chaque milieu de culture doit contenir un indicateur de pH, il s'agit du rouge de phénol. Les cellules en croissance libèrent des métabolites qui vont acidifier le milieu de culture. A pH acide, le rouge de phénol change de couleur et va virer du violet au jaune. Un milieu correctement régulé devra présenter une coloration rouge-orangée. Une coloration rouge violacée est le signe d'un pH trop basique ; traduisant une mortalité cellulaire (les cellules lysées libèrent des protéines qui alcalinisent le milieu). Une coloration jaune implique 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. Il est donc nécessaire d'observer la culture au microscope, afin d'exclure une probable contamination.

المصدر الاول لطالب الجزائري



Yellow  Red

Il est clair que toute modification du pH du milieu de culture entraîne un blocage métabolique ainsi qu'une toxicité cellulaire, c'est pour cette raison que la régulation du pH tout au long de la culture cellulaire est obligatoire. Cette régulation du pH est assurée par l'utilisation de système tampon dans le milieu de culture tel que le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) maintenu en équilibre avec 5% de CO_2 . Son utilisation implique de disposer d'une étuve à CO_2 .

b. L'environnement gazeux :

Les cellules doivent être placées dans une atmosphère constituée de 5% CO₂ et de 95% d'air. En plus de son rôle dans le maintien du pH, le CO₂ intervient dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

c. L'osmolarité :

L'osmolarité (pression osmotique) du milieu de culture est importante car elle aide à réguler le flux de molécules qui entrent et sortent de la cellule. Elle est contrôlée par l'addition de sels dans le milieu de culture. L'évaporation du milieu de culture dans les contenants de culture ouverts (boîtes, flacons étuvés...) conduit rapidement à une augmentation de l'osmolarité, entraînant un stress, une dégradation ou la mort des cellules. Pour les systèmes de culture ouverts (non scellés), les étuves à niveau d'humidité élevé sont essentielles pour réduire l'évaporation.

d. La température :

La régulation de la température est obligatoire (enceinte thermostatée ou bioréacteur équipé d'un système de régulation de la température). Les cellules doivent être mises dans un milieu où la température est identique à celle de l'hôte à partir duquel elles ont été obtenues.

❖ Exemples de milieux de base:

Les milieux de base les plus communément utilisés incluent les milieux suivants et sont présentés en détails par Sigma, ATCC, et Life Technologies.

➤ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM):

EMEM a été parmi les premiers à être utilisé et a été formulé par Harry Eagle à partir d'un milieu de base plus simple (BME).

➤ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM):

La caractéristique du DMEM est qu'il contient quatre fois plus la concentration d'acides aminés et de vitamines qu'EMEM. Ne contenant ni protéines, ni lipides ni facteurs de croissance, le DMEM doit être complété avec du SVF à 10%.

➤ Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640):

Le RPMI-1640 a été développé au Roswell Park Memorial Institute, New York en 1966. Il s'agit d'une modification d'un autre milieu de culture le McCoy's 5A.

Exemple : composition détaillée du RPMI-1640 selon Sigma

COMPONENT	R0883 [1×] g/L
Inorganic Salts	
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	0.1
MgSO ₄ (anhydrous)	0.04884
KCl	0.4
NaHCO ₃	2
NaCl	6
Na ₂ HPO ₄ (Anhydrous)	0.8
Amino Acids	
L-Alanyl-L-Glutamine	-
L-Arginine • HCl	0.2
L-Asparagine • H ₂ O	-
L-Asparagine	0.05
L-Aspartic Acid	0.02
L-Cystine • 2HCl • H ₂ O	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02
L-Glutamine	-
Glycine	0.01
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.05
L-Lysine • HCl	0.04
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Serine	0.03
L-Threonine	0.02
L-Tryptophan	0.005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	-
L-Tyrosine	0.02184
L-Valine	0.02
Vitamins	
D-Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.003
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
p-Aminobenzoic Acid	0.001
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.00025
Pyridoxine • HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamine • HCl	0.001
Vitamin B ₁₂	0.000005
Other	
D-Glucose	2
Glutathione (reduced)	0.001
Phenol Red • Na	0.0053
ADD	
L-Glutamine	0.3
NaHCO ₃	-

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للكتاب الجزائري



Dr. AIT

« Chapitre 3: Contrôles fonctionnels et contrôle des contaminations des cellules en culture »

A. Contrôles fonctionnels :

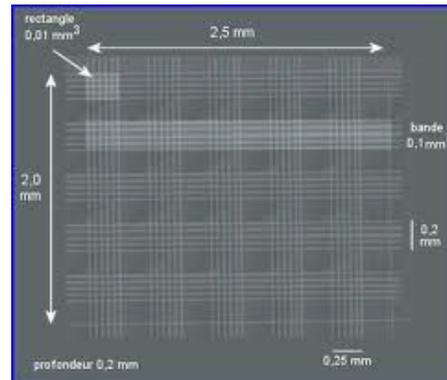
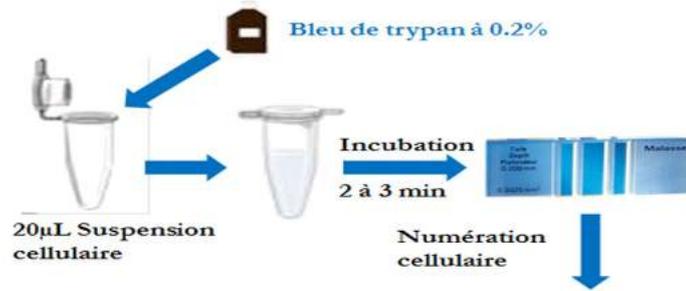
Les caractéristiques des cellules mises en culture sont le résultat de leur origine (sang, foie, cœur...) et de leur faculté d'adaptation aux conditions de culture. L'objectif de la culture cellulaire est de préserver les fonctions spécifiques de cellules tout en assurant leur prolifération. Pour ce faire, les cultures cellulaires doivent être contrôlées en permanence.

1. Contrôles de mise en route (de démarrage):

Ce type de contrôle doit être effectué avant de mettre les cellules en culture. Il consiste à assurer des conditions d'asepsie d'obtention et de dissection des cellules, en ajoutant la quantité adéquate d'ATB dans la solution de rinçage. Un test de viabilité au bleu de trypan doit être effectué, permettant de situer l'état de départ des cellules. Les cellules mortes doivent être éliminées par centrifugation. Il faut aussi comparer la croissance des cellules en fonction du ou des supports utilisés, ceci nous renvoie à établir une courbe de croissance des cellules en fonction du support et de choisir le plus adapté et le plus approprié. Enfin, il faut vérifier la morphologie des cellules par microscopie à phase inversée.

➤ Principe du test de viabilité au bleu de trypan :

La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Le bleu de trypan est un colorant qui a tendance à pénétrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue. Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues.



2. Contrôles de routine :

Ces contrôles sont effectués une fois la culture est lancée, dans le but de maintenir en vie les cellules. Ils reposent sur le changement du milieu, dont la fréquence dépend du type cellulaire. En règle générale, le milieu doit être changé tous les 2 à 3 jours.

Le renouvellement du milieu doit se faire quand les cellules ne sont plus en phase de prolifération car elles continuent à métaboliser des molécules qui sont néfastes à leur survie. La question qui se pose alors, est quand et comment changer le milieu de culture ?

Le paramètre à contrôler est le pH. Les cellules vivantes exigent un pH neutre, à pH < 6.5 la viabilité des cellules est menacée. La modification du pH est indiquée par le rouge de phénol. C'est la forte concentration cellulaire qui tend à acidifier le pH du milieu. Le contrôle de l'état de confluence des cellules doit être effectué tous les 2 jours.

B. Contrôle des contaminations :

Aucun problème de culture cellulaire n'est aussi universel que la perte d'une culture suite à une contamination. Tous les laboratoires et tous les chercheurs l'ont expérimenté à maintes reprises. Les contaminations peuvent être biologiques ou chimiques, visibles ou non, destructives ou bénignes en apparence; mais dans tous les cas elles affectent l'utilisation des cellules et la qualité des résultats.

1. Origines des contaminations :

Les contaminations rencontrées au cours des cultures cellulaires peuvent être d'origine diverse. Elles peuvent provenir de l'air, de l'eau utilisée dans la préparation des solutions, des mains du manipulateur, du milieu de culture, du matériel utilisé, du sérum et mêmes des cellules elles-mêmes.

2. Types de contaminations :

➤ La contamination chimique :

La contamination chimique est la plus difficile à détecter car elle est due à la présence de produits non vivants. Ce type de contamination regroupe les endotoxines, les ions métalliques et autres impuretés retrouvées dans le milieu, le sérum ou dans l'eau utilisée. La qualité du plastique utilisée est très importante. L'exposition prolongée à la lumière, du milieu de culture, contenant HEPES, tryptophane et riboflavine mène à la photodégradation de toutes ces molécules et la libération de radicaux libres et peroxyde d'hydrogène dans le milieu qui s'avèrent très toxiques pour les cellules en culture. A tous ces éléments s'ajoutent, les traces de détergents chimiques qui sont invisibles, résidu de germicides ou pesticides utilisés lorsqu'on désinfecte les incubateurs, comptoirs ou autres instruments, impureté de CO₂ de l'incubateur.

➤ La contamination biologique :

Les contaminants biologiques sous forme de levures à croissance rapide, bactéries et champignons ont un effet visible sur la culture (changement de turbidité ou de pH du milieu) et sont ainsi plus faciles à détecter (surtout en absence d'ATB dans le milieu de culture). Cependant, deux autres formes de contaminations biologiques, les mycoplasmes et les virus, ne sont pas faciles à détecter visuellement et nécessitent généralement des méthodes de détection spécifiques.

3. Contrôles macroscopique et microscopique des contaminations:

Le virage de la couleur du milieu de culture accompagné d'une opacification traduit une contamination. Les levures, comme les bactéries, ne collent pas aux cellules, elles flottent en suspension. En effet, elles poussent rapidement et troublent le milieu de culture. Généralement, la présence de bactéries acidifie le milieu, tandis que celle des levures le rend plus basique. Enfin, au microscope, les levures sont plus grandes que les bactéries, mais toutes les deux donneront un aspect de « sable » au champ de vision (Figure 1).

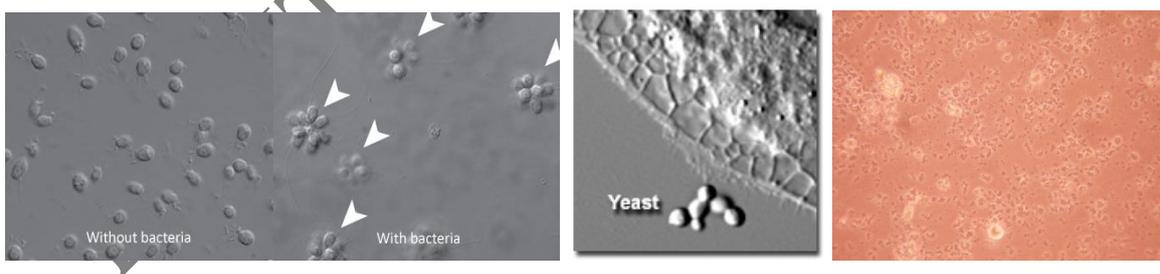


Figure 1

Les virus sont trop petits pour être détectables à moins d'utiliser des méthodes plus pointues (PCR et ELISA). Les virus sont souvent spécifiques à certaines espèces ou à certains tissus. Plusieurs donnent un effet cytotoxique (mort des cellules). Le contrôle microscopique consiste aussi à vérifier le phénotype cellulaire accompagné d'un comptage des cellules.

4. Contrôle des mycoplasmes :

La contamination par les mycoplasmes est la plus fréquente et insidieuse des contaminations. Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi, adhérant fortement aux cellules (Figure 2), pouvant provenir d'un composant du milieu ou bien d'un manipulateur. Grâce à la variation de la structure et de l'expression de leurs protéines de surface, ces bactéries peuvent s'adapter facilement à leur environnement. Les mycoplasmes utilisent à leur profit certains composants du milieu, telle l'arginine, ce qui, par carence, provoque une lente dégénérescence des cellules. Il est donc indispensable de procéder à un contrôle régulier des cultures cellulaires, cette contamination étant indétectable visuellement.

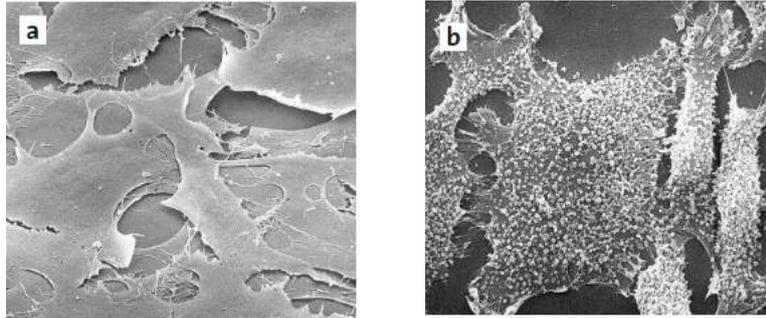


Figure 2 : a : cellules non contaminées ; b : cellules contaminées par les mycoplasmes

La détection peut se faire par mise en évidence directe sur Gélose A7 Mycoplasma. C'est une gélose sélective qui favorise le développement des mycoplasmes. Elle possède aussi des antibiotiques qui inhibent la croissance des bactéries Gram+ et Gram-, ainsi que certaines levures. Des trousse de détection des mycoplasmes sont commercialisées, utilisant différentes méthodes telles que la coloration de l'ADN (Figure3), Elisa et PCR.

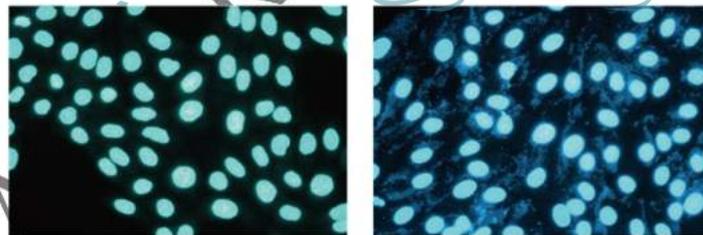


Figure 3 : mise en évidence de la contamination des cellules par la coloration de l'ADN (a : cellules non contaminées, b : cellules contaminées)

Il est difficile de traiter efficacement l'infection à mycoplasmes tout en respectant la viabilité cellulaire et la seule prévention est une asepsie rigoureuse. Il est fortement conseillé, quand on reçoit une nouvelle lignée, de lui faire subir une quarantaine avec recherche de mycoplasmes, avant de la manipuler dans le même poste de sécurité microbiologique que les autres lignées (Thouvenot *et al.*, 2004).

5. Prévention des contaminations :

Qu'ils soient visibles ou non, destructeurs ou non, les contaminants agissent sur la croissance, altèrent les caractéristiques et les fonctions cellulaires et influent sur la qualité des résultats. Parfois, certains agents ne sont pas toxiques individuellement mais peuvent le devenir, soit par leur forte concentration ou combinés avec un autre agent.

Il existe deux conditions majeures pour éviter les contaminations. Premièrement, un entraînement correct à la mise en œuvre de techniques de bonne asepsie de la part du chercheur ou du manipulateur. Deuxièmement, un équipement, matériel en plastique jetable et des milieux correctement conçus, conditionnés et stérilisés. L'utilisation soigneuse et sélective (limitée) d'antibiotiques conçus pour être utilisés en culture cellulaire peut également aider à éviter les pertes de cultures consécutives à une contamination biologique. Il faut cependant insister sur le fait que l'utilisation fréquente d'ATB contribue à l'apparition de microorganismes résistants menant ainsi à des infections latentes et évolutives qui peuvent subsister longtemps avant d'être détectées d'où la nécessité d'alterner les ATB.

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Dr. AIT ARAB-DJERABAN

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

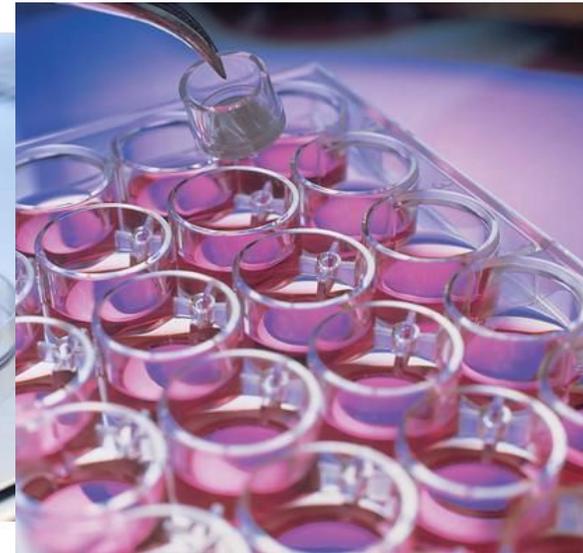
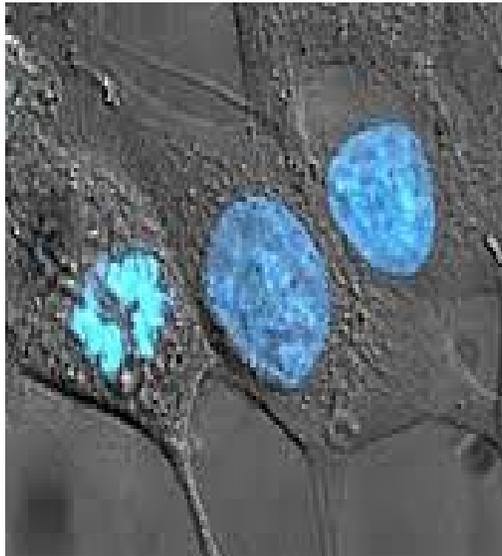
Faculté des Sciences Biologiques

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري
L3 Biochimie

« TD Cultures cellulaires »



Dr. AIT ARAB-DJERABA Z
2020-2021

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

TD3: Série d'exercices



1. Ces dernières années, les vitamines ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la recherche, notamment par leurs propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices. Afin d'étudier l'effet de la vitamine A au cours de la maladie de Behçet, des chercheurs ont mis en culture les PBMCs de patients porteurs de cette maladie en présence de concentrations croissantes d'acide rétinoïque (métabolite actif de la vitamine A).

-En justifiant votre réponse, citez une méthode simple permettant l'obtention des PBMCs.

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري

Séparation des PBMCs à partir de sang total sur Ficoll-hypaque 1.077. Méthode rapide et pas trop chère avec rendement efficace comparé aux méthodes de Cytométrie en Flux et billes magnétiques qui sont très chères et complexes.

-Citez une méthode de purification des lymphocytes à partir des PBMCs.

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Purification par immuno-marquage (cytométrie en flux ou billes magnétiques) justifiant votre réponse, citez une méthode simple permettant l'obtention des PBMCs.

-2. Afin de mettre en culture les PBMCs, les chercheurs ont utilisé du RPMI-1640 additionné de sérum de veau foetal.

-A quoi correspond ce milieu et quel est le rôle du RPMI-1640 ?

Le RPMI-1640 additionné de sérum de veau foetal constitue un milieu de culture. Le RPMI-1640 correspond au milieu de base assurant uniquement la survie des cellules.

En sachant que les chercheurs ont préparé 1L de milieu de culture, contenant 950mL de milieu de base, quel serait le pourcentage du sérum dans ce milieu ?

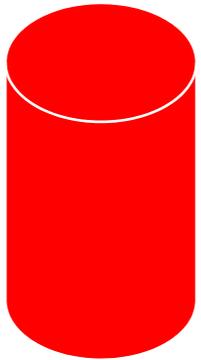
Milieu de culture = Milieu de Base + Additifs

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



(Sérum)



V Milieu de base = 950mL

V sérum=?

Vt milieu de culture = 1L

1000mL **→** **100%**

50mL (1000-950) **→** **% sérum**

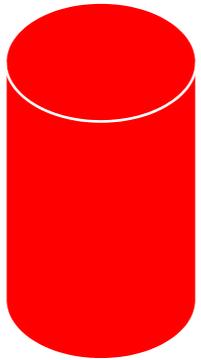
% sérum=5

3/ Les chercheurs ont acheté de la Gln à 50mM. En sachant que cet Ac.Am doit être utilisé à 1%, calculez son volume et sa concentration molaire dans le milieu de culture cité dans la question 2. Dans ce cas, quel est le volume du milieu de base utilisé ?

Calcul du volume de la Gln

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



%Gln = 1%

Vt milieu de culture = 1L

Vt 1000mL → 100%

V Gln ? → 1%

V Gln = 10mL

Calcul de la concentration molaire de la Gln dans le milieu

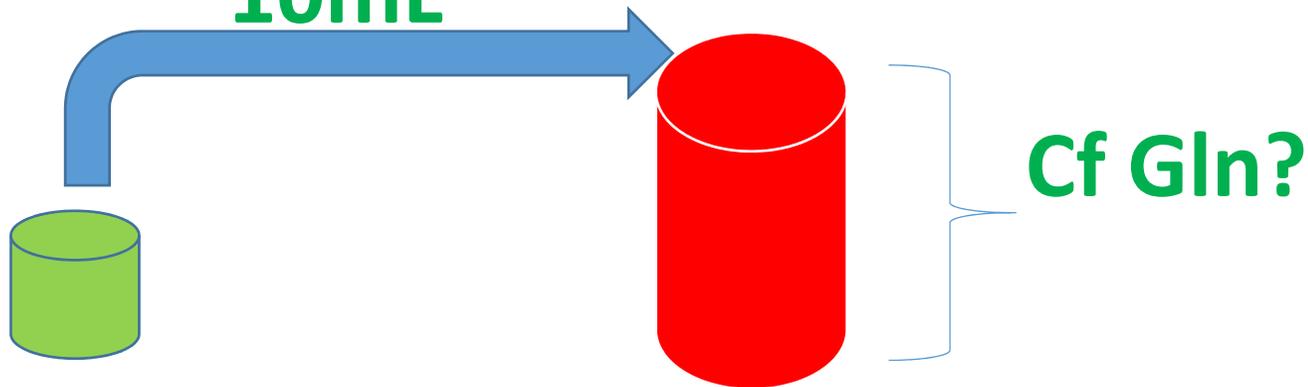
SAMIHA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



V_i Gln

10mL



C_f Gln?

C_i Gln
50mM

V_f milieu de culture
1000mL

Calcul de la concentration molaire de la Gln

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Pour la CM de la Gln, il faut appliquer la loi de dilution

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

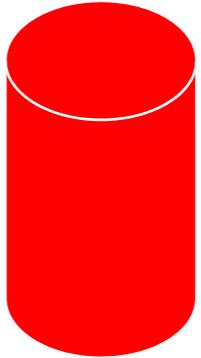
$$50\text{mM} \cdot 10\text{mL} = C_f \cdot 1000\text{mL}$$

$$C_f \text{ Gln} = 0,5\text{mM}$$

$$V \text{ Milieu de culture} = V \text{ Milieu de Base} + V \text{ S\u00e9rum} + V \text{ Gln}$$

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



$V \text{ Milieu de base} = ?$

$V \text{ s\u00e9rum} = 50\text{mL}$

$V \text{ Gln} = 10\text{mL}$

$V_t \text{ milieu de culture} = 1\text{L}$

$V \text{ milieu de base} = 1000 - 50 - 10$

$V \text{ milieu de base} = 940\text{mL}$

Chapitre 4 : Conservation et transport des cellules

A. La conservation des cellules

Comme toutes les cellules, celles mises en cultures subissent des modifications liées au vieillissement cellulaire physiologique ou induites par les facteurs extérieurs, pouvant mener à leur évolution ou perte (Ryan, 2004). C'est en bloquant l'horloge biologique des cultures cellulaires que la conservation par le froid dite « cryoconservation » permet de réduire tous ces problèmes. Ce concept est né grâce aux travaux de *Polge* et *Smith* en 1949 (Polge et Smith, 1949).

1. Les avantages de la cryoconservation des cellules :

Le premier avantage concernant la cryoconservation c'est probablement le fait qu'en dessous d'une température de -130°C , les cultures ne subissent aucune modification décelable. De plus, lorsque les cellules sont correctement conservées, les maintenir *in vitro* devient plus simple et moins délicat mais surtout moins coûteux et exigera moins de temps et d'effort (Ryan, 2004).

2. Les principes de la congélation des cellules :

Avant d'aborder les étapes clés de la cryoconservation des cellules, il faut tout d'abord comprendre comment fonctionnent les protocoles de congélations et quels sont les mécanismes cellulaires impliqués durant ces processus.

Le refroidissement dans l'intervalle « température ambiante- 0°C » ralentit le métabolisme cellulaire, menant à une interruption du transport actif et de la pompe ionique. Cette interruption n'endommage généralement pas la cellule si le milieu de culture est équilibré sur le plan de l'osmolarité. Lorsque le refroidissement se poursuit (0°C à -20°C), deux cas de figure peuvent être rencontrés (Figure 1). Le premier cas concerne le processus de refroidissement lent, où des cristaux de glace se forment dans l'environnement extracellulaire, menant ainsi à une augmentation de la concentration du milieu de culture en solutés. A ce moment, les cellules libèrent l'eau vers le milieu extracellulaire, partiellement congelé, ce qui initialise le processus de déshydratation et de rétrécissement cellulaires. Il est très important de noter qu'une déshydratation, même partielle, s'avère nuisible pour la majorité des cellules.

Le deuxième cas de figure, concerne le processus de refroidissement rapide. Des cristaux de glace intracellulaires se forment avant la fin du processus de déshydratation cellulaire, menant à la rupture des membranes et des organelles cellulaires entraînant ainsi, la mort de la cellule pendant le processus de décongélation (Ryan, 2004).

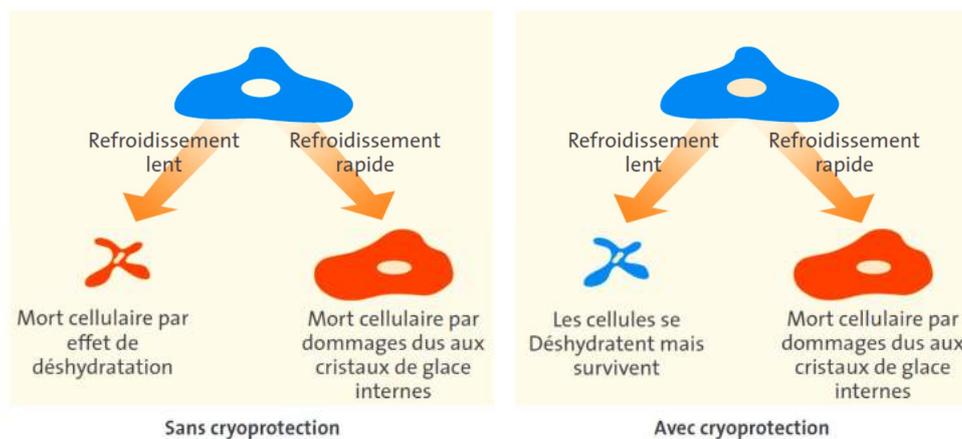


Figure 1 : Effets des vitesses de congélation sur les cellules (Ryan, 2004)

Le recours aux agents « Cryoprotecteurs » est indispensable pour une bonne conservation des cellules. Ceci dit, ils peuvent empêcher seulement la survenue des dommages suite à la congélation lente.

Afin d'assurer une bonne conservation cellulaire, il faut absolument choisir la vitesse optimale de refroidissement ainsi que la température finale de conservation. Les recherches et toutes les expériences menées en ce sens, ont permis de constater que, pour être conservées à long, voire très long terme, les cellules devraient être congelées à -130°C en présence de cryoprotecteur. Certaines cellules sont très fragiles et pourraient donc nécessiter des températures encore plus basses (-196°C).

3. Les agents cryoprotecteurs :

Les agents cryoprotecteurs s'avèrent donc indispensables pour minimiser voir prévenir les effets délétères associés à la congélation lente. C'est en diminuant le point de congélation de la solution extracellulaire que les agents cryoprotecteurs ralentissent la cinétique de sortie d'eau intracellulaire et évitent ainsi à la cellule d'atteindre son volume minimal critique (Figure 2 ; Ryan, 2004)).

On constate en effet, qu'en présence de 1 % de DMSO (agent cryoprotecteur), une solution saline isotonique (9 g/l) atteindra la concentration de 50 g/l de NaCl à la température de -5°C . En présence de 5 % de DMSO, cette concentration serait obtenue à -20°C , tandis qu'elle ne serait atteinte qu'à -50°C si la concentration de cryoprotecteur était portée à 10 %. A cette température les dénaturations protéiques sont manifestement moins importantes.

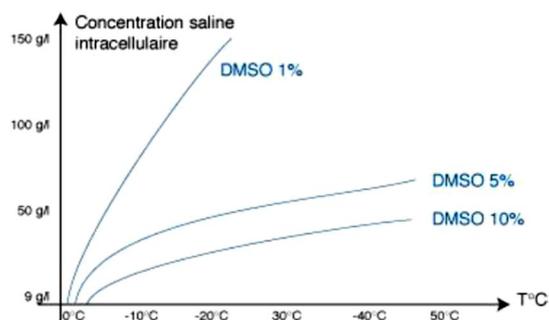


Figure 2 : Effet de la concentration de DMSO sur la concentration saline pendant la congélation

Il existe plusieurs molécules chimiques cryoprotectrices, dont l'acétamide de méthyle, le méthanol, l'éthylène glycol et la polyvinylpyrrolidone. Ceci dit le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le glycérol sont les plus fréquemment utilisés. Le DMSO est en général utilisé à une concentration finale de 5 à 15% (v/v), alors que le glycérol est rajouté à 5 et 20% (v/v). Pouvant être toxiques et quelquefois tumorigènes, les cryoprotecteurs doivent être immédiatement retirés lors de la décongélation. Les solutions de conservation peuvent varier d'un laboratoire à un autre et d'un type cellulaire à un autre. En effet, de meilleurs résultats peuvent être obtenus avec des solutions contenant 50 à 90% de sérum et 5% DMSO. Ces solutions s'avèrent d'ailleurs meilleurs pour certaines lignées cellulaires trop sensibles, à savoir les hybridomes. D'autres chercheurs utilisent la solution standard contenant 0-40% milieu de culture, 50 à 90 % de sérum et 10% de DMSO (Martin 1994).

Afin d'assurer une bonne congélation des cellules, le cryoprotecteur doit être rajouté au milieu de culture neuf (sans cellules) immédiatement avant de congeler les cellules. 0.1ml de cette solution est mélangé avec 0.9 ml de suspension cellulaire récoltée pour obtenir l'inoculum à congeler (Martin 1994, Ryan, 2004).

4. Les contenants de conservation :

Le choix du récipient de conservation est une étape critique et délicate, du fait des températures extrêmement basses. En effet, de nombreux matériaux sont sensibles à ces températures et peuvent se briser ou se casser facilement pendant le stockage ou la décongélation. C'est pour cette raison qu'il faut suivre les recommandations du fabricant du récipient avant de le choisir et de l'utiliser. En générale, les contenants utilisés pour la cryoconservation sont des tubes en polypropylène à bouchon vissant, disponibles en différentes tailles (capacité de 1 à 5 mL), (Figure 3).



Figure 3 : Tubes cryogènes

5. La vitesse de refroidissement et la conservation cryogénique :

Afin de conserver les échantillons et d'assurer un bon pourcentage de viabilité cellulaire, il est impératif d'assurer un refroidissement lent et bien maîtrisé. C'est pour cette raison qu'il est conseillé d'utiliser des systèmes de congélation programmés assurant une diminution de la température de 1°C à 3°C/min qui conviendrait à la plupart des cultures cellulaires animales (HAS, 2009 ; Ryan, 2004) .

6. La décongélation et le rétablissement :

L'étape de décongélation peut s'avérer très dangereuse pour le manipulateur et néfaste pour les cellules, si les bonnes consignes ne sont pas suivies. Avant de retirer les tubes des cryoconservateurs à azote liquide, il faut impérativement porter un écran facial complet et des cryogants pour se protéger contre une éventuelle explosion de tubes. La décongélation doit être brutale et rapide, en transférant les tubes directement dans un bain marie réglé à +37°C. L'agent cryoprotecteur doit être éliminé par centrifugation des tubes contenant la suspension cellulaire, avant de les mettre en culture car il peut être toxique à +37°C. Le surnageant contenant l'agent cryoprotecteur est éliminé et remplacé par un milieu de culture neuf. Les cellules subissent deux lavages par du milieu de culture neuf ; la suspension cellulaire peut alors être transférée dans un contenant de culture approprié et incubée normalement. La viabilité cellulaire doit être contrôlée.

Dr. B. Le transport des cellules

Quel que soit la nature du matériel biologique (prélèvement sanguins, liquide biologique, biopsies, cellules souches hématopoïétiques...), son transport est une étape sensible et critique. En effet, quand le transport est mal maîtrisé ou assuré par du personnel non qualifié et non formé, il peut aboutir à la perte ou à l'altération de la qualité d'échantillons le plus souvent rares et uniques (ANSM, 2012).

Les échantillons transportés peuvent être frais ou congelés et les modalités de transport diffèrent d'un cas à l'autre.

1. Le transport des échantillons congelés :

Les échantillons biologiques congelés doivent être transportés sans rupture de la chaîne du froid, dans une boîte refroidie et saturée en vapeur d'azote ou dans de la carboglace (HAS,

2009). Celle-ci n'offre l'avantage de libérer, ni eau, ni aucun résidu pouvant altérer le matériel biologique et l'emballage tout en assurant une grande quantité de frigories. Dans ce cas, il est impératif de le mentionner sur l'emballage tertiaire (Figure 4) car certains pays refusent le transport avec de la carboglace.

2. Le transport des échantillons frais :

Dans ce cas, les prélèvements frais doivent subir un suivi régulier et permanent de leur température de conservation et ce, en utilisant des indicateurs de températures hautement sensibles. Ces échantillons sont suivis depuis leur prélèvement jusqu'au moment de leur réception dans le laboratoire.

3. La règle du triple emballage :

Quel que soit la nature de l'échantillon à transporter, elle doit se faire dans des colis conçu spécialement et assurant à la fois la qualité du produit mais également les conditions de sécurité sanitaire. Le transport du matériel biologique se fait dans un système à triple emballage (Figure 4). L'emballage primaire, pouvant être un tube, un flacon ou une poche ; doit être clos et étanche dès la fin du prélèvement. Ce conditionnement primaire est placé dans un conditionnement secondaire (étui résistant en plastique épais) étanche et hermétique. Le tout est placé dans le conditionnement tertiaire (récipient de transport) résistant et isotherme. Dans le cas où on a recours à la carboglace, celle-ci doit être placée entre l'emballage secondaire et l'emballage tertiaire (Fleury, 2005).

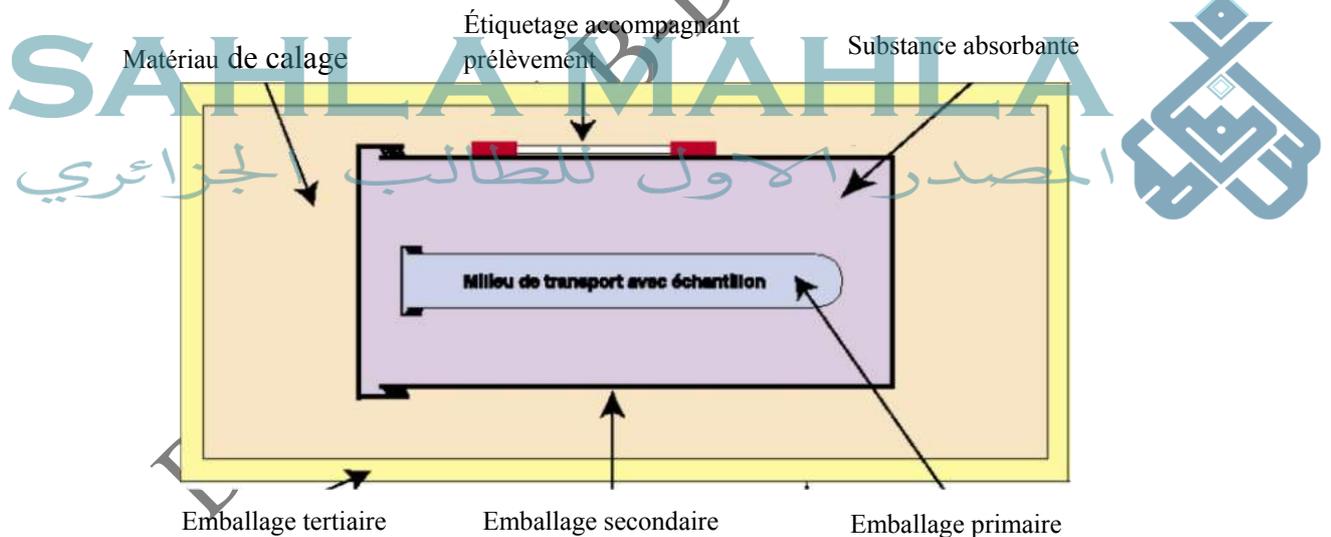


Figure 4 : Système de transport des échantillons (Fleury, 2005)

Quel que soit la nature du matériel biologique, la personne responsable de son transport doit être suffisamment qualifiée et formée afin d'éviter tout acte de négligence pouvant engendrer la perte des échantillons. La durée de transport du prélèvement depuis le centre de recueil et son lieu d'utilisation doit être la plus courte possible. Une fiche de suivi portant toute les données nécessaires doit accompagner chaque prélèvement, afin d'assurer sa traçabilité (Figure 4).