

Basic paper

QU'EST-CE QUE

**UNE CULTURE CELLULAIRE 3D
ET COMMENT FONCTIONNE
LA MÉTHODE 3D?**

Contenu

1. Introduction
2. Qu'est-ce qu'est une culture cellulaire 3D exactement?
 - a. La matrice extracellulaire
 - b. Les organoïdes et les sphéroïdes
3. Quels formats y a-t-il pour les cultures cellulaires 3D ?
Méthodes pour la formation de sphéroïdes
 - a. Culture de culots
 - b. Goutte suspendue
 - c. Formation de sphéroïdes dans des plaques multipuits
4. Procédé basé sur les échafaudages
 - a. Matrices préfabriquées
 - b. Hydrogels
 - c. Tissus de cellules



1. Introduction

La culture cellulaire est un domaine de recherche important qui attire de plus en plus l'attention. Ici, les cellules animales servent de base pour les recherches différentes ainsi que pour l'examen et l'effet de nouveaux médicaments sur la cellule. En outre, il est possible de réduire considérablement les essais sur les animaux. De différentes approches peuvent également être adoptées pour la culture cellulaire. Dans la culture cellulaire 2D, les cellules animales sont cultivées soit dans une culture en suspension (dans le milieu) soit comme cellules adhérentes (monocouche sur une

surface). Avec une culture cellulaire 2D, on peut cependant atteindre certaines limites car de nombreuses interactions, surtout entre les cellules, sont négligées. Pour éviter ces restrictions, on peut envisager d'utiliser la culture cellulaire 3D. Le contexte dans lequel on utilise la culture cellulaire 3D est en fait relativement simple. Puisque le monde et tous les organismes sont structurés en trois dimensions, il n'est que logique d'appliquer cette structure également à la culture cellulaire.

Avec la culture cellulaire 3D, l'environnement naturel d'un organe ou organisme peut être calqué mieux. Cela a également un effet positif sur les résultats des recherches car les interactions des agents actifs dans une culture cellulaire 3D (par exemple) peuvent être observées et calquées mieux.

Dans cet article général, l'accent est mis sur le sujet « culture cellulaire 3D »

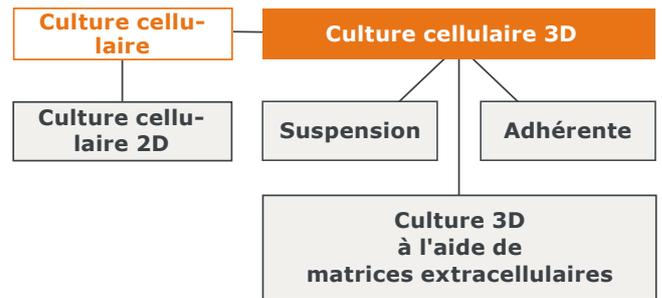


Fig. 1 : Méthodes de la culture cellulaire 3D

2. Qu'est-ce qui est une culture cellulaire 3D exactement?

Comme mentionné brièvement, la forme la plus naturelle d'amas de cellules et d'organes est celle en trois dimensions. Il est alors avantageux, dans le cas où l'on doit créer de mieux conditions *in vivo* de les calquer. Mais qu'est-ce qui est exactement nécessaire pour la culture en 3D et qu'est-ce qui la différencie généralement de la culture cellulaire bidimensionnelle classique ? La culture cellulaire 2D est limitée car cette forme de culture cellulaire ne peut simuler qu'une partie des situations *in vivo* des amas de cellules. Cela est dû au fait que dans la culture cellulaire 2D conventionnelle, les cellules se dé-

veloppent en monocouches sur une surface. Le développement s'arrête dès que les cellules s'approchent « trop » à l'intérieur de l'amas de cellules et que la surface entière du récipient est couverte. Pour une approche tridimensionnelle et en fonction des exigences, on a besoin d'un échafaudage extracellulaire ou bien d'une matrice qui permet à l'amas de cellules de se développer dans toutes les directions. Les cultures de sphéroïdes ou d'organoïdes sont d'autres possibilités pour comprendre encore mieux la formation de tumeurs et l'effet de médicaments.

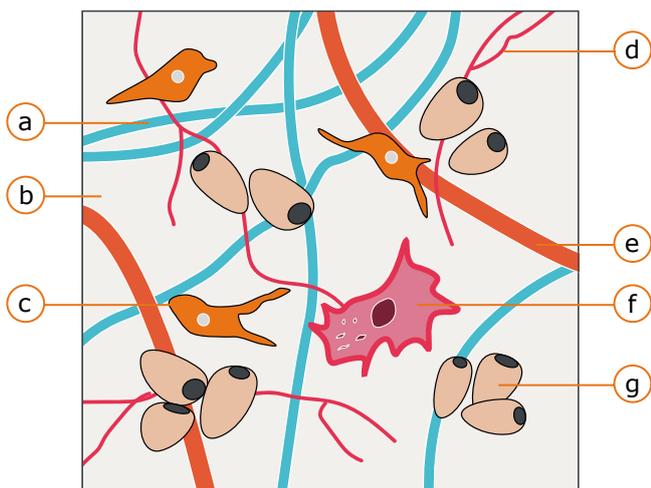


Fig. 2 : Exemple de structure d'une matrice extracellulaire avec a : fibre de collagène; b : substance de base; c : cellule mésenchymateuse; d : fibre élastique; e : vaisseaux sanguins; f : macrophage; g : cellule adipeuse

a. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) existe dans les tissus animaux et constitue la partie tissulaire qui se trouve entre les cellules dans l'espace intercellulaire. Les fonctions principales sont par exemple d'assurer la teneur d'eau des tissus, d'effectuer la transduction du signal dans les tissus et d'affecter les processus de cicatrisation.

Il s'agit fondamentalement de la totalité de tous les macromolécules qui se trouvent dans les tissus et les organes à l'extérieur de la membrane plasmique des cellules. La fonction de base est la fixation des cellules. Ici, il faut tenir compte du fait qu'il ne s'agit pas d'une structure ambiante rigide. La MEC et les cellules sont en équilibre les uns avec les autres. La majorité des composants de la MEC est produite dans les cellules, séparément fixés à travers d'autres liaisons et ensuite éliminés à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule correspondante.

La structure de la MEC peut être divisée en deux groupes: Substance de base et fibres.

En fonction de la technique de culture pour laquelle le chercheur se décide, il est important de comprendre les interactions des cellules avec la matrice extracellulaire.

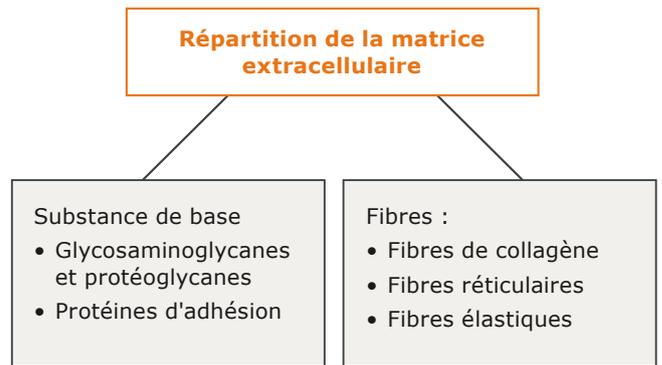


Fig. 3 : Répartition de la matrice extracellulaire

b. Organoïdes, sphéroïdes

Les organoïdes ou sphéroïdes peuvent également être cultivés sans matrice extracellulaire; ils peuvent donc être traités de manière plus simple et plus rapide dans le laboratoire. Pour comprendre la différence des deux formes, on va les examiner de plus près dans ce chapitre.

Sphéroïdes

Les sphéroïdes sont des agrégats cellulaires qui peuvent être obtenus par agrégation ou organisation de milliers de cellules en une sphère en 3D. Les sphéroïdes sont utilisés de préférence dans la recherche sur les tumeurs. Les sphéroïdes peuvent être générés de types de cellules différents, par exemple de corps embryoïdes, d'hépatocytes, de tissu tumoral et de cellules mammaires (cancer du sein). A l'intérieur des sphéroïdes, les cellules produisent une répartition hétérogène par interaction avec la MEC ou avec les cellules entre elles.

De plus, un gradient métabolique se produit dans la « sphère cellulaire », ce qui signifie que les cellules absorbent la majorité des nutriments en dehors de la cellule et forment une espèce de « zone de repos » à l'intérieur de la cellule. Ce comportement a également pu être observé pour les tumeurs in vivo, la culture de sphéroïdes convient donc particulièrement pour la recherche sur les tumeurs. En outre, les sphéroïdes sont utilisés pour le screening dans l'efficacité et la toxicité des médicaments.

Organoïdes

Les organoïdes sont des sphéroïdes perfectionnés qui possèdent les fonctions d'organes spécifiques. Contrairement aux sphéroïdes, les organoïdes sont des tissus complexes qui sont constitués de plusieurs cellules. Comme débouché pour la culture d'organoïdes, on utilise des cellules pluripotentes. Ce sont les cellules souches qui peuvent évoluer de manière complètement indifférenciée qu'on appelle pluripotentes. La validité d'essais pharmacologiques et toxicologiques peut être améliorée par la culture d'organoïdes car ils reflètent mieux la situation in vivo.

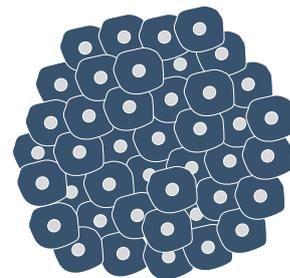


Fig. 4 : Sphéroïde

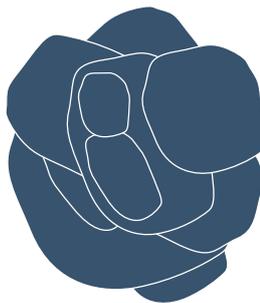


Fig. 5 : Organoïde

3. Quels formats y a-t-il quant aux cultures cellulaires 3D?

Le format utilisé pour la culture dépend du résultat souhaité et de la lignée cellulaire utilisée. Si l'on veut observer les interactions de nouveaux agents actifs avec les tumeurs, on choisirait plutôt la culture de sphéroïdes. Si, de l'autre côté, on étudie les interactions complexes de plusieurs cellules, le choix se porte sur les cultures cel-

lulaire soutenant l'échafaudage. Par la suite, on décrit des méthodes différentes à l'aide desquelles on peut produire des sphéroïdes facilement. En plus, on examine de différentes possibilités pour la culture cellulaire 3D soutenant l'échafaudage.

Méthode pour la formation de sphéroïdes

a. Culture de culots

Une méthode toute simple pour former des sphéroïdes ou bien d'utiliser la culture des sphéroïdes est la culture des culots. On utilise la force centrifuge pour collecter les cellules en suspension en tant que culot dans le fond conique du récipient utilisé. Les interactions entre cellules soutiennent la formation de sphéroïdes. Un inconvénient de cette méthode est cependant que les cellules individuelles peuvent être endommagées par les forces centrifuges appliquées.

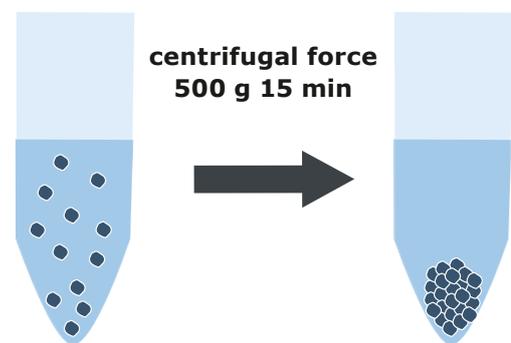


Fig. 6 : Formation de sphéroïdes à l'aide de l'utilisation de la gravité lors de la centrifugation

b. Goutte suspendue

La forme de culture de la goutte suspendue utilise la tension de surface du milieu. La culture en suspension est appliquée sous forme de goutte sur une surface, de préférence sur le couvercle d'une boîte de Petri, la construction est ensuite abattue sur une boîte de Petri. Souvent, on verse un peu de liquide (par ex. solution tamponnée au phosphate) dans la boîte de Petri pour éviter que les gouttes dessèchent durant la période de culture.

La goutte reste coincée au couvercle « à l'envers » par la tension de surface. La gravité oblige les cellules à se placer à l'extrémité inférieure de la goutte. Ainsi, elles peuvent de nouveau s'organiser en un sphéroïde par les interactions entre cellules. Puisqu'on peut contrôler la concentration de la culture en suspension utilisée et des échantillons qui sont appliqués, on peut former des sphéroïdes avec un nombre de cellules uniforme. Ainsi, on obtient une certaine reproductibilité dans chaque expérience.



Fig. 7 : Méthode de la goutte suspendue; cellules en suspension appliquées en gouttes sur couvercle de boîte de Petri. En renversant le couvercle, les cellules peuvent s'organiser en sphéroïdes au bas de la goutte.

c. Formation de sphéroïdes dans des plaques multipuits

La formation de sphéroïdes dans des plaques multipuits conçues spécialement à cette fin, est tout aussi simple. Les cavités sont telles qu'elles ont des creux coniques afin que les sphéroïdes puissent se former par la géométrie définie. Ici aussi, c'est la gravité qui permet aux cellules de se retrouver plus facilement et de pouvoir

s'organiser en agrégat. La bonne chose de cette méthode est qu'en tant que chercheur, on n'a pas besoin de s'écarter du protocole existant déjà fait car on ne doit que mettre la suspension de cellules dans la plaque multipuits.

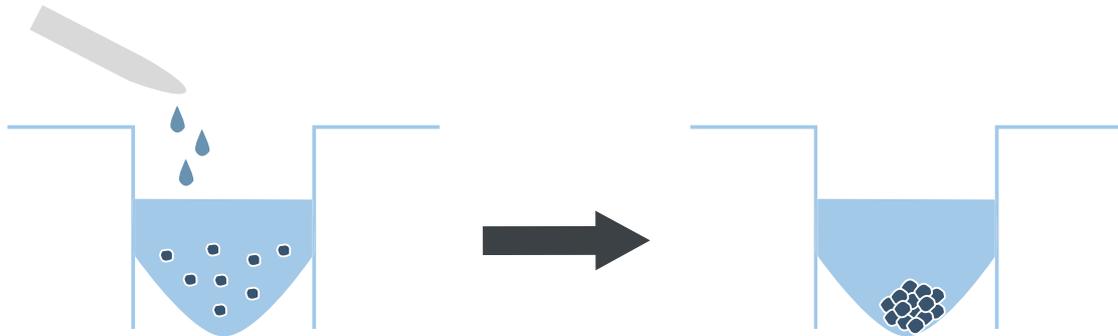


Fig. 8 : Plaques multipuits avec cavités coniques

4. Procédé basé sur échafaudage

Outre la formation de sphéroïdes ou d'organoïdes, il y a également la possibilité de faire croître les cellules de manière tridimensionnelle à l'aide d'échafaudages. Ces échafaudages sont calqués sur la matrice extracellulaire. En fonction du matériel utilisé pour l'échafaudage, on doit en plus veiller aux facteurs de croissance et aux protéines utilisés pour la croissance. De plus, il est important de connaître la taille des pores du matériau correspondant. Ceci est principalement dû au fait qu'il est fondamentalement intéressant de savoir comment les cellules s'en-

castrent dans la matrice correspondante et quel comportement les cellules adoptent par rapport à la croissance dans l'échafaudage correspondant. Il y a de différentes approches pour réaliser une matrice extracellulaire. Voici quelques exemples:

- Matrices préfabriquées
- Hydrogels
- Tissus de cellules

a. Matrices préfabriquées

Ici, la composition de la matrice peut être adaptée complètement à la cellule correspondante. La production peut être réalisée à travers plusieurs processus: Séparation des polymérase, lyophilisation ou impression 3D. Beaucoup de ces modes de production exercent une forte pression sur les cellules ou les oligo-éléments dans le matériau sont erronés. Cependant, il y a déjà des approches relativement nouvelles pour éviter cela en utili-

sant des fibrines extrêmement biocompatibles. Par l'utilisation des fibrines, la croissance des cellules utilisées dans les matrices préfabriquées a pu être améliorée considérablement. Par conséquent, on devrait tenir compte de l'utilisation de protéines supplémentaires, stabilisantes et bénéfiques pour les cellules quand on choisit cette forme de matrice.

b. Hydrogels

Les hydrogels sont très avantageux car ils ont une structure très similaire aux tissus. Le composant principal de ces hydrogels sont les biopolymères. Un grand avantage des hydrogels est qu'ils peuvent varier avec la structure des cellules afin qu'il y ait plus d'espace pour les interactions internes et la bioactivité. Il faut surtout tenir compte de la manière dont les structures cellulaires développées doivent être retirées de l'hydrogel à la fin de l'expérience. La recherche est aujourd'hui tellement avancée que les biopolymères enzymatiquement dégradables peuvent être utilisés.

c. Tissus de cellules

Cette approche est souvent utilisée pour la croissance d'organes ou de tissus complexes. Au lieu d'échafaudages très complexes qui doivent être imprimés en 3D auparavant, plusieurs couches de cellules sont empilées les uns sur les autres. Cette approche a montré qu'il n'est pas toujours nécessaire d'utiliser des échafaudages très complexes pour la culture cellulaire 3D ou la production de tissus.

Résumé

Finalement, le choix de la culture cellulaire 3D dépend fortement du projet de recherche correspondant. Généralement, la culture de sphéroïdes convient mieux pour la recherche de tumeurs car les sphéroïdes présentent une physiologie similaire. L'inconvénient ici est qu'on ne peut pas observer d'interaction avec la matrice extracellulaire. Si alors le résultat final souhaité est l'observation de mécanismes cellulaires complexes et de la physiologie cellulaire dans son ensemble, on peut opter pour la possibilité

de culture à travers les matrices artificielles extracellulaires. Cette approche adopte la reproduction de l'environnement naturel et fait croître les cellules en amas de telle manière comme c'est le cas pour les organismes animaux ou humains.

Sources :

- <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/extrazellulaere-matrix/4008> (28.09.2022)
- Habanjar, Ola; Diab-Assaf, Mona; Caldefie-Chezet, Florence; Delort, Laetitia; 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22
- Duval, Kayla; Grover, Hannah; Han, Li-Hsin; Mou, Yongchao; Pegoraro, Adrian F.; Fredberg, Jeffery; Chen-Zi; Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture, *Physiology*, July 2017, 32(4), p. 266-277
- <https://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v133.php> (28/09/2022)



**VOUS AVEZ
D'AUTRES QUESTIONS**

Contactez-nous:

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

+49 9122 9920-0
redaktion@heidolph.de
www.heidolph.com