

**Basic paper**

---

QU'EST-CE



QUE

**LA CULTURE  
CELLULAIRE**

**ET COMMENT FONCTIONNE  
LA MÉTHODE 2D ?**

# Sommaire

1. **Qu'est-ce que la culture cellulaire ?**
2. **Quels types de cellules sont utilisées pour les cultures cellulaires ?**
  - a. Fibroblastes
  - b. Cellules épithéliales
  - c. Cellules endothéliales
  - d. Cellules souches
3. **Quelles sont les différentes méthodes de culture cellulaire ?**
4. **Quel matériel faut-il pour une culture cellulaire ?**
  - a. Température/CO<sub>2</sub>/Humidité
  - b. Nutriments et milieu de culture
  - c. Récipients de culture et hotte à flux laminaire
5. **Analyse des problèmes : les problèmes possibles et les solutions**
  - a. Mycoplasmes
  - b. Contamination microbienne
  - c. Contamination croisée



## 1. Qu'est-ce que la culture cellulaire ?

---

La culture cellulaire consiste à faire croître des cellules végétales ou animales en dehors de leur organisme dans des conditions contrôlées. La culture cellulaire est très appréciée, car les cellules de mammifères permettent par exemple de réduire ou d'éviter totalement les essais sur les animaux. Les cellules animales permettent également de produire rapidement et facilement certaines hormones importantes pour l'homme comme l'insuline. Enfin, dans la recherche médicale, la culture cellulaire a permis d'apprendre beaucoup de choses sur le comportement des cellules cancéreuses. De nombreuses raisons

expliquent donc pourquoi de plus en plus de chercheurs optent pour la culture cellulaire.

Cet article général présente uniquement une petite partie de ce champ de recherche et constitue une première plongée dans cet univers passionnant. Les prochains chapitres présentent les différents types de cultures cellulaires, les différentes formes de cellules, le principal matériel ainsi que les problèmes qui peuvent survenir dans la culture cellulaire.

## 2. Quels types de cellules sont utilisées pour les cultures cellulaires ?

Il existe de nombreux organismes différents dont les cellules peuvent être isolées et multipliées. Nous nous limitons ici à quatre formes de cellules animales qui sont utilisées dans pratiquement tous les laboratoires de culture cellulaire.

### a. Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules que l'on trouve dans le tissu conjonctif. Le tissu conjonctif lâche a pour fonction de combler les espaces vides. Il entoure les nerfs et les tissus et sert de soutien. Les fibroblastes constituent la substance intercellulaire et sont particulièrement actifs dans la forme de base du tissu conjonctif. Leur principale fonction est la formation de tissu cicatriciel dans les zones de tissu abîmées. Les fibroblastes se présentent sous forme fusiforme ou étoilée et leurs prolongements cytoplasmiques leur permettent d'établir des liens mécaniques et de communication.

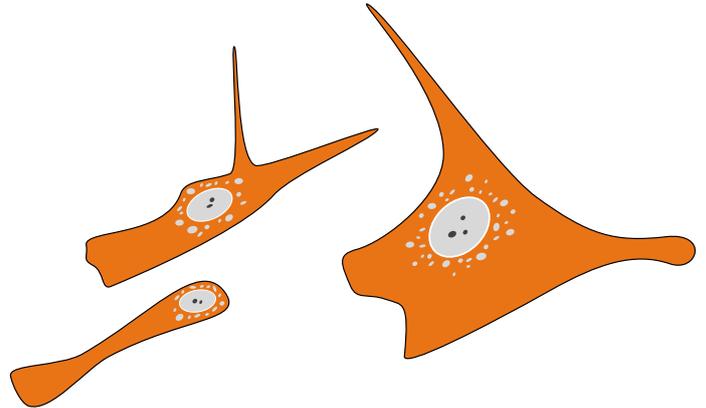


Fig. 1 : Fibroblaste d'un embryon de souris

### b. Cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont un groupe de cellules qui est séparé du tissu conjonctif et qui ne contient pas de vaisseaux sanguins. Les cellules épithéliales ont principalement en commun la polarité. La polarité signifie ici que les cellules épithéliales disposent d'un pôle extérieur (apical) (peau ou surface des organes) et d'un pôle orienté vers l'intérieur (basal).

Les cellules de l'épithélium peuvent être monocouches ou multicouches. Le côté basal est en outre relié aux tissus qui se trouvent en dessous. Les cellules épithéliales ont des fonctions variées dans le corps comme la protection mécanique par la résistance à la déchirure de la peau, la sécrétion ou l'absorption des nutriments par les tissus de l'intestin. Il existe évidemment des différences morphologiques entre les différentes cellules épithéliales. Pour faire simple, elles peuvent être divisées en deux formes : les épithéliums monocouches et les épithéliums multicouches.

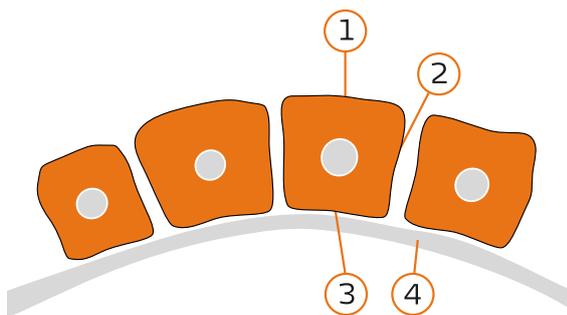


Fig. 2 : Polarité d'une cellule épithéliale par rapport à la surface : 1) Pôle apical (orienté vers le milieu extérieur), 2) Surface latérale, 3) Pôle basal (orienté vers le milieu intérieur), 4) Membrane basale

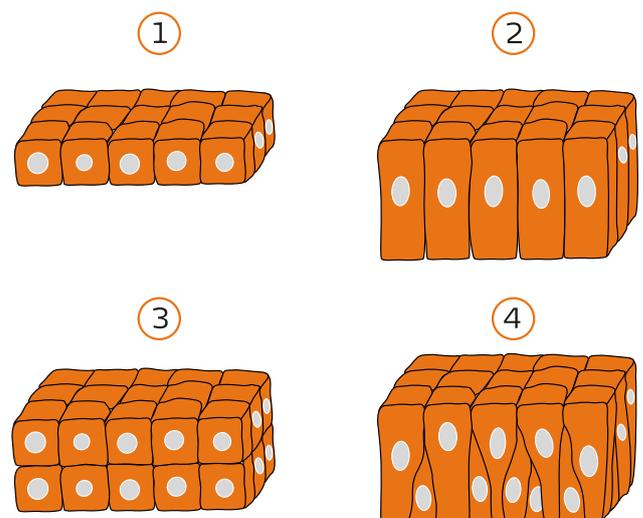
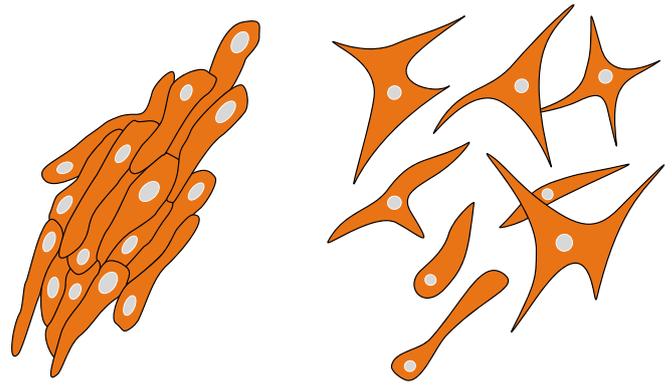


Fig. 3 : Différentes formes de cellules épithéliales : 1) Épithélium cubique, 2) Épithélium cylindrique, 3) Épithélium isoprismatique multicouche, 4) Épithélium multicouche

### c. Cellules endothéliales

Ces cellules forment une enveloppe autour des vaisseaux sanguins. Elles forment une sorte de barrière par rapport aux tissus adjacents. En formant cette « frontière », les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le métabolisme. Certaines fonctions importantes sont par exemple la production de substances pour la régulation de la pression sanguine (monoxyde d'azote) ou la régulation du métabolisme entre le sang et les tissus. Étant donné que les cellules endothéliales prolifèrent en amas cellulaires et forment une sorte de tissu entre elles, leur forme est déterminée par le degré de confluence. Le degré de confluence décrit la couverture totale d'une surface par une lignée cellulaire adhérente (voir chapitre 3). Avant de recouvrir à 100 % une surface, ces cellules font donc plutôt penser à des fibroblastes.

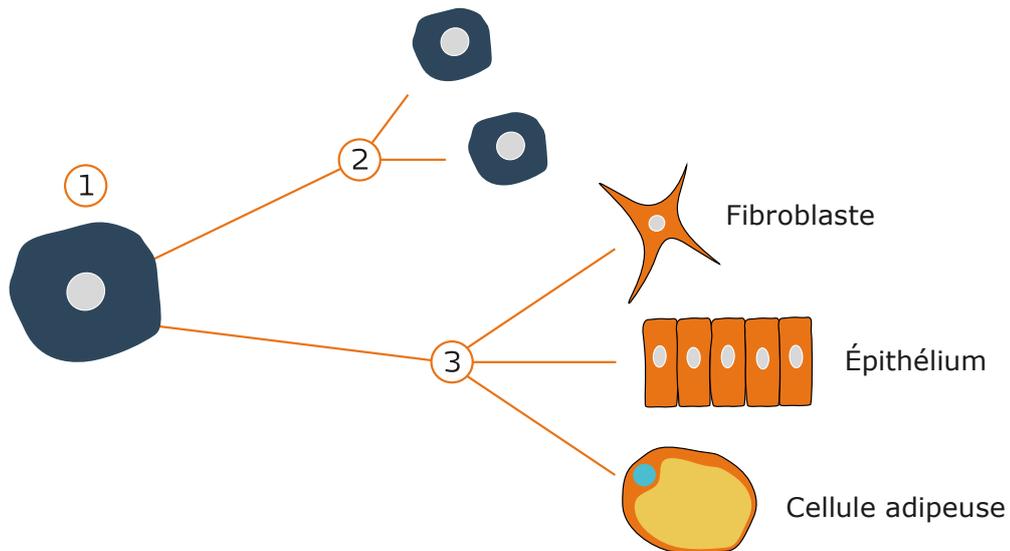


**Fig. 4 :** Degré de confluence des cellules : 1) 100 % de confluence (100 % de couverture d'une surface) ; 2) 50 % de confluence (50 % de confluence d'une surface)

### d. Cellules souches

Les cellules souches sont un groupe cellulaire très intéressant qui fait l'objet de nombreux débats et qui actuellement est principalement utilisé dans la recherche. Les cellules souches ont la capacité de se différencier en différentes cellules ou en différents types de tissus en fonction de leur environnement. On distingue ainsi les

cellules souches embryonnaires (potentiellement n'importe quel tissu) et les cellules souches adultes (tissus différenciés). De plus, les cellules souches peuvent former des cellules filles génétiquement identiques, qui en fonction de leur milieu biologique, peuvent ensuite évoluer en différents types de tissus/cellules.



**Fig. 5 :** Division cellulaire asymétrique d'une cellule souche (1) avec formation de cellules filles identiques (2), et de types cellulaires différenciés (3), ici fibroblastes, épithélium et cellule adipeuse

### 3. Quelles sont les différentes méthodes de culture cellulaire ?

Avant de commencer une culture cellulaire, il faut déterminer le type de culture cellulaire que l'on souhaite effectuer et sous quelle forme les cellules choisies se développeront. Pour cela, il faut distinguer différents types de cultures cellulaires.

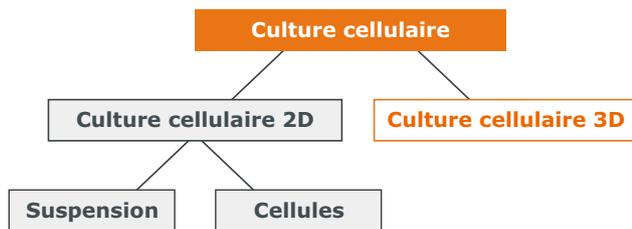


Fig. 6 : Méthodes de culture cellulaire

La culture cellulaire 2D est la méthode la plus fréquemment utilisée dans de nombreux laboratoires. Comme représentée dans le graphique ci-dessus, celle-ci peut s'effectuer de deux façons. La physiologie de la cellule détermine plus ou moins si la culture est effectuée en suspension ou avec des cellules adhérentes. Dans la culture en suspension, les cellules flottent librement dans le milieu de culture alors que dans la culture avec cellules adhérentes, les cellules adhèrent et prolifèrent en une couche (monocouche) sur la surface du récipient de culture.

Dans la culture cellulaire 3D, les cellules sont cultivées dans des structures tridimensionnelles semblables aux organes du corps. La culture cellulaire 3D tient compte de la structure et de l'orientation des tissus. La culture cellulaire tridimensionnelle est un sujet très particulier qui doit faire l'objet d'une analyse séparée. Cette introduction se concentre sur la culture cellulaire 2D.

### 4. Quel matériel faut-il pour une culture cellulaire ?

Pour le savoir, il faut d'abord étudier le corps humain. Pour vivre, les êtres humains ont besoin de nutriments (sous la forme de différents aliments), d'eau, de températures modérées et occasionnellement de mouvement. Tout ceci s'applique plus ou moins aussi à la culture cellulaire. Ce qui change, c'est évidemment que pour la culture cellulaire, le corps humain doit être remplacé par un environnement artificiel. Il faut donner à la cellule tout ce dont elle a besoin pour se développer correctement et pour survivre. Dans la suite, nous allons discuter des paramètres qui sont importants pour une culture cellulaire réussie.



#### a. Température/CO<sub>2</sub>/Humidité

La plupart des mammifères dont les cellules sont cultivées en laboratoire ont une température corporelle d'env. 37 °C. Pour que la cellule n'arrête pas de grandir, il est important d'utiliser un incubateur qui simule exactement cette température ambiante et qui la maintient de manière stable durant une longue période. Le pH de l'environnement de la cellule est également un facteur important qui doit être pris en compte. De nombreuses cellules de mammifères utilisées ont besoin d'un pH compris entre 7,0 et 7,4. Ici aussi, un incubateur avec apport de CO<sub>2</sub> (5 % Vol. – 20 % Vol.) permet d'assurer un environnement optimal. Étant donné que les cellules sont cultivées dans un milieu de culture et que celui-ci ne doit pas s'évaporer, il est important que l'appareil assure une humidité élevée de l'air (env. 95 %).



Fig. 7 : Section du panneau de commande de l'incubateur avec paramètres

## b. Nutriments et milieu de culture

Les bons nutriments ainsi que le choix d'un milieu de culture adapté sont des facteurs importants pour cultiver avec succès des cellules de mammifères. En principe, les milieux de culture sont composés de sources de carbone comme le glucose, de sources d'azote, de phosphate ainsi que d'oxygène. On y ajoute aussi souvent des vitamines, des hormones de croissance et des minéraux. Les laboratoires de culture cellulaire utilisent souvent des milieux de culture de différentes catégories. Lorsque des lignées cellulaires ont par exemple seulement besoin de certains composants pour leur croissance, on utilise des milieux de culture synthétiques qui présentent une

concentration préalablement définie de ces composants. D'un autre côté, les laboratoires utilisent également des milieux de culture complexes qui contiennent des composants organiques, comme des peptones. Il n'existe cependant pas de milieu de culture universel et il faut toujours effectuer une recherche approfondie sur la lignée cellulaire et utiliser les milieux de culture conseillés par la banque de stockage de cellules. Cela évite de commettre des erreurs. Le tableau suivant présente une sélection de milieux de culture avec les lignées cellulaires correspondantes :

Tab. 1: Milieux de culture courants pour la culture de cellules de mammifères

Lignée cellulaire	Organisme	Milieu de culture
CHO-K1 (cellules épithéliales)	Souris	F-12 avec 10 % FKS
HeLa (cellules épithéliales)	Homme	MEM avec 10 % FKS et NEAA
CV-1 (fibroblastes)	Singe	MEM avec 10 % FKS
HUVEC (endothélium)	Homme	F-12K et 10 % FKS et 100 µg/ml héparine

## c. Récipients de culture/agitateurs et hotte à flux laminaire

Il existe de très nombreux récipients de culture. L'utilisateur peut donc choisir le récipient en fonction de la tâche ou de la routine de culture cellulaire. Les récipients les plus utilisés pour les cultures de cellules adhérentes sont les flacons de culture cellulaire (flacons T) qui sont souvent composés de polystyrène et dont la surface a été rendue hydrophile par un traitement chimique. Il existe également des bouchons à visser avec ou sans membrane perméable aux gaz. L'utilisateur doit savoir si la culture cellulaire a besoin de CO<sub>2</sub> pour sa croissance.

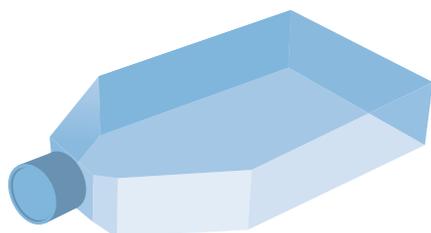


Fig. 8 : Flacon de culture cellulaire (flacon T)

Pour cultiver des cellules en suspension, il faut utiliser des Erlenmeyer stériles dont le verre possède des propriétés hydrophiles. Il existe différents types d'Erlenmeyer. Dans le domaine de la culture cellulaire, elles se différencient principalement par leur fermeture. En fonction des besoins, elles sont fermées par un bouchon stérile avec un capuchon métallique stérile ou par un bouchon à visser. Les images suivantes présentent des exemples de différents Erlenmeyers.

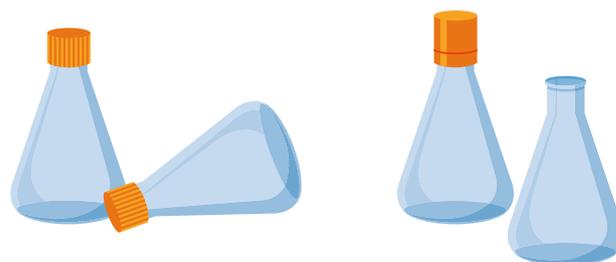
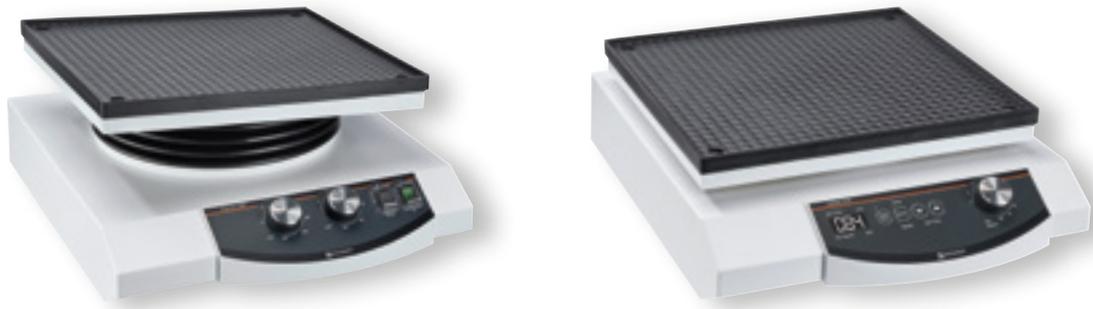


Fig. 9: Erlenmeyer avec bouchon à visser (à gauche) et avec capuchon métallique stérile (à droite)

Pour une culture de cellules en suspension, il faut également tenir compte du fait que les cellules doivent être bougées afin qu'elles puissent accéder aux nutriments nécessaires. En fonction de la stabilité de la lignée cellulaire utilisée, on peut donc utiliser un agitateur orbital ou oscillant.

Les agitateurs orbitaux conviennent particulièrement aux cultures en suspension avec de grands volumes. La possibilité de régler la vitesse de rotation à un niveau élevé, dont dispose la plupart des appareils, permet au milieu de culture et aux cellules d'être mélangés et d'assurer une croissance correcte avec un apport suffisant de nutriments. Il faut noter ici que les agitateurs orbitaux sont plutôt utilisés pour les lignées cellulaires moins sensibles, car les vitesses de rotation élevées avec un rayon important entraînent des tourbillons puissants.

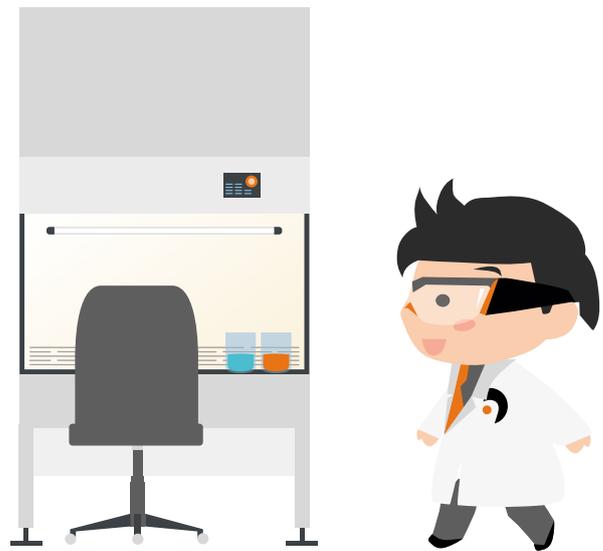
Pour envelopper en douceur les cellules de mammifères sensibles, il est préférable d'utiliser un agitateur oscillant. Le mouvement associé à une très faible vitesse de rotation s'effectue dans trois directions. La suspension reste ainsi en mouvement sans « stresser » les cellules.



**Fig. 10** : Polymax 1040 (à gauche) : agitateur oscillant avec mouvement doux et vitesse de rotation de 2 - 50 tr/min. ; Unimax 1010 (à droite) : agitateur orbital pour un apport optimal en nutriments aux cultures en suspension moins sensibles

Les hottes à flux laminaire sont le B.A.-BA pour n'importe quel laboratoire de culture cellulaire. Il existe différents modèles en fonction des besoins et de la classification des laboratoires. La classification s'effectue en fonction de l'évacuation et de l'apport ainsi que de la filtration des flux d'air.

Les hottes à flux laminaire de classe I ont uniquement un flux d'air vertical. L'air ambiant est aspiré par une ouverture qui se trouve au-dessus de la table. Cette classe ne convient donc pas vraiment aux routines de culture cellulaire. Les hottes à flux laminaire de classe II conviennent déjà un peu mieux, car le flux d'air est filtré et l'utilisateur est protégé contre les aérosols qui s'échappent par un rideau d'air. Les hottes à flux laminaire de classe III sont quant à elles totalement fermées et fonctionnent avec un système de dépression. L'utilisateur peut seulement utiliser le compartiment de travail par le biais de deux gants intégrés. Ces hottes à flux laminaire sont surtout utilisées pour la préparation de médicaments.



**Fig. 11** : Hotte à flux laminaire

## 5. Analyse des problèmes : les problèmes possibles et les solutions

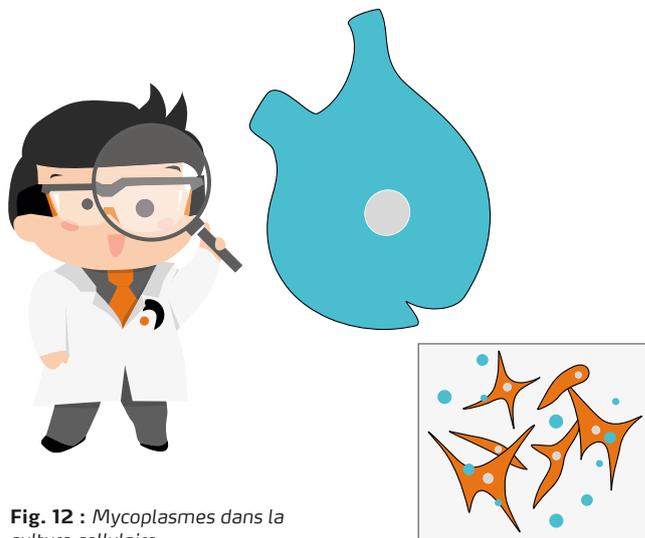
Après avoir longuement parlé des appareils, des différents types de cellules et de l'importance des milieux de culture, l'expérience de culture cellulaire peut commencer.

Malheureusement, une préparation minutieuse des expériences et de la méthode de travail n'empêche pas les problèmes. Différents types de problèmes peuvent survenir pendant la culture cellulaire, par exemple la contamination microbienne, la contamination par des mycoplasmes, une croissance ralentie en raison de facteurs physiques, etc. et la liste n'est pas exhaustive. Nous allons ici présenter trois des problèmes les plus fréquents et les solutions pour éviter les contaminations.

### a. Mycoplasmes

Les mycoplasmes font partie des bactéries et sont des parasites que l'on trouve chez les vertébrés. Ce qui les différencie cependant d'autres procaryotes, c'est qu'ils ne possèdent pas de paroi cellulaire. Ils sont également beaucoup plus petits que leurs cousins et peuvent traverser les filtres stériles ce qui en fait un problème important dans la culture cellulaire. Malheureusement, la plupart du temps, la présence de mycoplasmes est seulement détectable lorsque la culture en est entièrement recouverte, car à un stade précoce, les mycoplasmes ne peuvent pas être identifiés par microscopie optique.

Quelles mesures doivent être prises pour éviter une telle contamination ? Étant donné que les mycoplasmes sont des bactéries, de nombreux antibiotiques peuvent être utilisés pour le traitement, comme la gentamicine, la tétracycline-HCl. Comme l'homme est la plus importante cause de contamination par mycoplasmes, car ils sont souvent présents dans les sinus nasaux supérieurs, il faut toujours veiller à travailler proprement. Si la contamination a malgré tout eu lieu, il existe d'autres solutions que les antibiotiques pour en venir à bout. Ces solutions fonctionnent différemment, par exemple en inhibant la prolifération, en dissolvant la membrane cellulaire ou en inhibant l'activité des ribosomes. L'important est d'effectuer une réaction en chaîne par polymérase après le traitement pour s'assurer qu'il n'y a plus de mycoplasmes dans la culture.



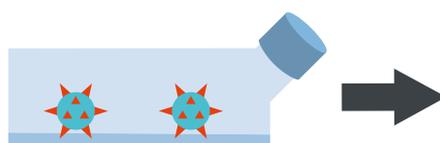
**Fig. 12 :** Mycoplasmes dans la culture cellulaire

### b. Contamination microbienne

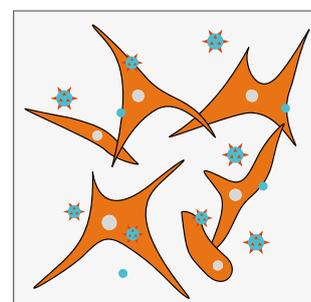
Outre les mycoplasmes, d'autres bactéries peuvent bien évidemment aussi contaminer une culture cellulaire. Pour cette forme de contamination, il n'est pas très important de savoir de quelles bactéries il s'agit. Tout comme pour la contamination par mycoplasmes, de nombreux antibiotiques permettent de venir à bout de la contamination. Avant de les ajouter « sauvagement » au milieu de culture, il est cependant conseillé de savoir de quelles bactéries il s'agit pour pouvoir agir de manière ciblée. Ici aussi, l'hygiène corporelle au travail est extrêmement importante, car de nombreux germes sont présents sur la peau comme les staphylocoques ou les streptocoques. Cela aide aussi de maintenir un environnement de travail propre et de veiller à la désinfection.

### c. Contamination croisée

On parle de contamination croisée, lorsqu'une autre lignée cellulaire se mélange à la lignée cellulaire d'origine en raison de méthodes de travail non stériles. L'exemple le plus connu de contamination croisée passée inaperçue est la lignée cellulaire HeLa. Celle-ci est malheureusement apparue par le mélange avec d'autres lignées cellulaires fréquemment utilisées. Comment détecter une contamination croisée ? Les techniques de biologie moléculaire comme le profilage ou les empreintes génétiques peuvent être particulièrement utiles ici. Lorsqu'une contamination croisée est détectée par une de ces méthodes, il n'y a malheureusement pas d'autre solution que de jeter la culture.



**Fig. 13 :** Contamination microbienne d'une culture cellulaire



## Résumé

Le chemin peut être long pour passer d'une cellule ou d'un tissu isolé à une expérience de culture cellulaire réussie. Même si la culture cellulaire présente de nombreux obstacles, cela vaut la peine d'approfondir ce champ de recherche intéressant. Ne serait-ce que parce que la culture

cellulaire permet d'en apprendre plus sur les processus intercellulaires ou sur l'apparition des cellules tumorales, elle est extrêmement intéressante pour les chercheurs et les futurs scientifiques.

### Sources :

- S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*, 2011, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2573-7>
- L.M/H.L/S.Gä, *Lexikon der Biologie: Zellkultur*; [www.spektrum.de/lexikon/biologie/zellkultur/71584](http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/zellkultur/71584), (Aufruf: 11/07/2022)
- Glossar; Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung; [www.helmholtz-hzi.de/de/wissen/glossar/entry/zellkultur/](http://www.helmholtz-hzi.de/de/wissen/glossar/entry/zellkultur/); (Aufruf: 11/07/2022)
- InCelligence: 3D-Zellkultur: Übersicht und Neuigkeiten; [www.incelligence.de/zellkultur/3d-zellkultur](http://www.incelligence.de/zellkultur/3d-zellkultur) (Aufruf: 11/07/2022)

# VOUS AVEZ D'AUTRES QUESTIONS

## Contactez-nous :

**Heidolph Instruments GmbH & Co. KG**

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