

# Technique de culture cellulaire et de fractionnement tissulaire et cellulaire

---

## Objectif :

- Des cultures cellulaires :
  - comprendre le fonctionnement cellulaire
  - aider au diagnostic (aberrations chromosomiques, anomalies métaboliques)
  - créer des outils thérapeutiques (production de protéines comme les anticorps ou les cytokines, thérapie cellulaire pour réparer les tissus, pour les greffes d'organes)
- Fractionnement tissulaire ou cellulaire :
  - désorganiser les cellules
  - isoler les organites et les macromolécules (sous forme pure)

## A – Cultures cellulaires

### I – Isolement des cellules

Il existe 2 grandes sources de cellules :

- les cellules isolées dans les liquides biologiques (ex : sang). Elles sont déjà dissociées (en suspension de cellules libres). La seule opération nécessaire est de séparer les différents types cellulaires
- les cellules d'organe (en cohésion entre elles et avec la matrice extra-cellulaire). Il faudra alors les dissocier pour obtenir une suspension de cellules dissociées, puis les séparer.

Pour obtenir des cellules eucaryotes animales, 3 étapes :

- dissociation (si organes)
- séparation des différents types cellulaires
- mise en culture dans un milieu approprié

### 1 – Dissociation des cellules à partir d'un tissu

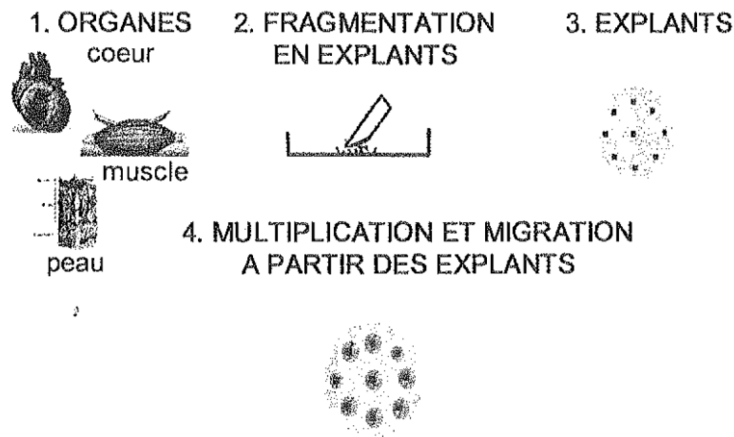
#### a – Par dissection

Des organes sont fragmentés en morceaux de 1 à 4 mm<sup>3</sup>. Ces morceaux s'appellent des explants, ils sont ensuite placés dans des flacons de culture dans un milieu approprié. A partir de ces explants les cellules vont se multiplier et migrer. A la fin de l'opération, la boîte ou le flacon de culture est entièrement rempli de cellules.

Les inconvénients :

- la lenteur pour remplir un flacon de culture entièrement (peut durer plusieurs semaines)
- le flacon de culture peut être envahi par des cellules non désirées

## Dissociation par dissection



### b – Par dissociation enzymatique

Les tissus sont mis en contact avec des enzymes protéolytiques (trypsine, collagénase, pronase). Ces enzymes vont digérer la trame qui entoure les cellules (la matrice extra-cellulaire). C'est une méthode très utilisée car très rapide.

L'inconvénient :

- les cellules peuvent être altérées par ces enzymes.

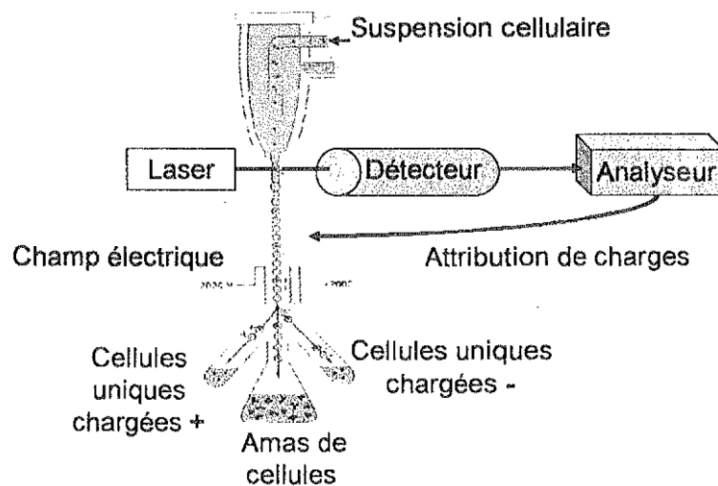
### c – Par dissociation mécanique

La dissociation mécanique ne s'adresse qu'aux tissus mous comme les tissus nerveux, par exemple c'est une technique utilisée pour obtenir des astrocytes à partir de cerveaux d'embryons de souris. C'est une technique extrêmement simple, les tissus sont dilacérés à la pipette par des cycles d'aspiration et de refoulement.

## 2 – Séparation des différents types cellulaires

Elle peut se faire par différentes méthodes :

- Par centrifugation : séparation en fonction de la taille et de la densité des cellules.
- Par une technique basée sur la capacité d'adhérence de certaines cellules à différents supports. Cette capacité est variable selon les types cellulaires.  
Les supports utilisés sont :
  - le verre
  - le plastique
  - des matrices recouvertes d'anticorps spécifiquement dirigés vers certains types cellulaires
- Par cytométrie en flux, ou trieur de cellules. Les cellules spécifiques sont reconnues par un anticorps couplé à des agents fluorescents (fluorochromes). Seules les cellules désirées seront fluorescentes. Le cytomètre en flux est un appareil très efficace, il permet de trier plusieurs milliers de cellules par seconde.



## II – Différents types de culture

### 1 – Cultures de cellules en suspension ou culture de cellules adhérentes

#### Les cultures de cellules en suspension :

- ces cellules ne nécessitent pas de support pour survivre ou se multiplier
- cela ne concerne que certains types de cellules :
  - cellules sanguines
  - cellules immortelles

#### Les cultures de cellules adhérentes :

- cas le plus fréquent
- ces cellules ont besoin d'un support pour survivre ou se multiplier
- les supports sont variables :
  - verre
  - plastique traité
  - plastique recouvert de matrice extra-cellulaire

Ces cellules adhérentes vont former une monocouche au fond des récipients de culture. Ces récipients présentent des formes très variables. On peut trouver des boîtes de pétri, des plaques multipuits où les cellules sont réparties dans chacun des puits ce qui permet d'effectuer des traitements différents dans chacun des puits, ou des flasks.

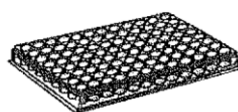
#### Monocouche de cellules



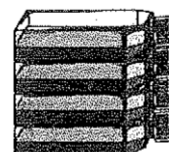
#### Flacons de culture



Boîte de Petri



Plaques multipuits

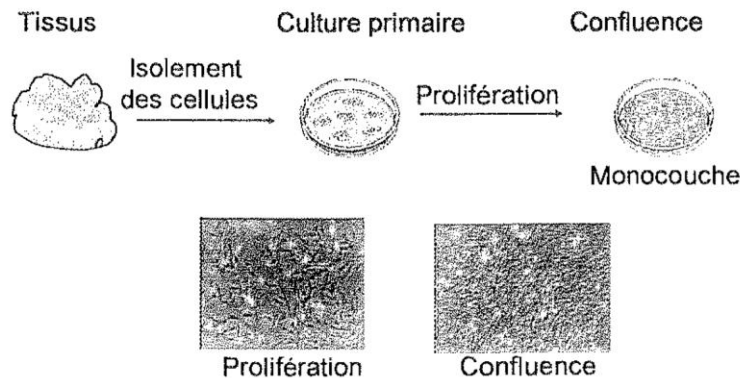


Flasks

## 2 – Cultures primaires ou lignées cellulaires

### Culture primaire :

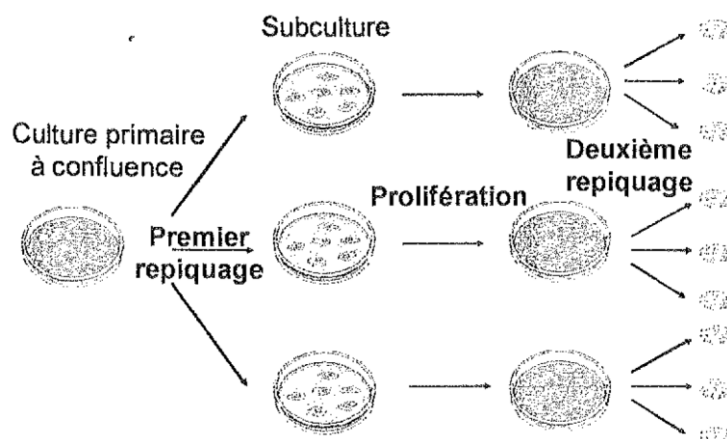
Les cellules des cultures primaires sont directement prélevées dans les tissus par dissociation et séparation, elles sont ensuite mises en culture dans un milieu approprié et certains types de cellules sont capables de se multiplier. On aura alors une prolifération de la culture jusqu'à ce que les cellules viennent à se toucher. A ce moment là les cellules vont arrêter de se multiplier : il y a inhibition de contact. Lorsque les cellules auront envahi toute la boîte, on dit que la culture est à confluence (les cellules se trouvent sous forme monocouche).



Lorsque les cultures sont à confluence, il est impératif de prélever des cellules et de les répartir dans différents flacons de culture si on souhaite prolonger la culture. Cette opération s'appelle le repiquage (ou passage). A partir du premier repiquage, on ne parle plus de culture primaire mais de subculture.

Les caractéristiques des cellules issues de culture primaire :

- elles ont toutes une durée de vie limitée
- elles nécessitent l'attachement au support pour pouvoir survivre
- elles présentent la propriété d'inhibition de contact
- elles ont un caractère non-tumoral.



**Lignées cellulaires :**

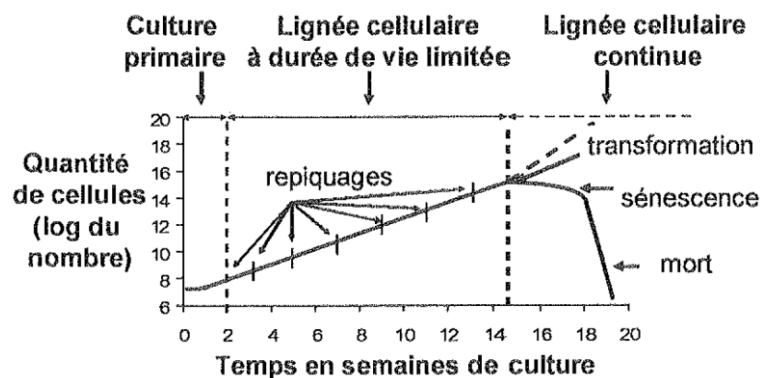
Les lignées cellulaires sont obtenues après plusieurs repiquages.

Les caractéristiques des cellules issues de lignées cellulaires :

- elles ont toutes la même capacité à se multiplier (même vitesse de multiplication), qui est élevée
- elles ont toutes les mêmes caractéristiques de type cellulaire : elles présentent une grande homogénéité contrairement aux cellules issues de culture primaire.

Il y a 2 types de lignées cellulaires :

- à durée de vie limitée (cas le plus fréquent)
- continues

**Lignées cellulaires à durée de vie limitée :**

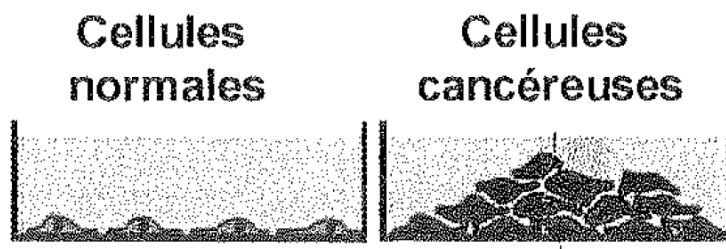
Au bout d'un certain nombre de repiquage (20 à 80), les cellules arrêtent de se multiplier (sénescence) et finissent par mourir.

**Lignées cellulaires continues :**

Elles ne s'arrêtent pas de se multiplier, on dit que ces cellules sont immortelles. Cette propriété est acquise suite à des mutations spontanées ou bien par manipulation génétique. Cette étape s'appelle la transformation.

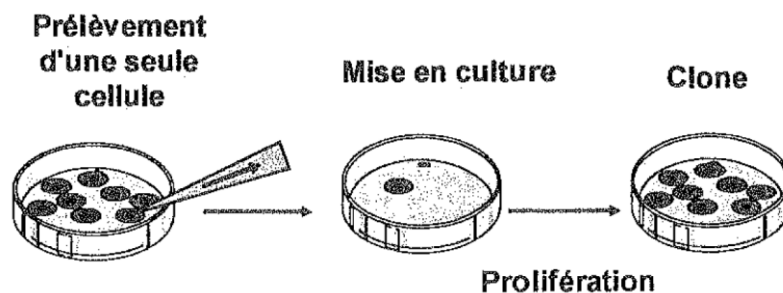
Caractéristiques des cellules issues de lignées cellulaires continues :

- perte de l'inhibition de contact (dans la boîte de culture, les cellules vont se chevaucher)
- perte de la dépendance du support (elles seront capables de se multiplier en suspension)
- ces cellules se rapprochent des caractéristiques des cellules tumorales.



### 3 – Les clones de cellules

Les clones de cellules peuvent être obtenus à partir d'une seule cellule. A partir d'une culture cellulaire, une seule cellule est isolée, elle va se multiplier, et on finira par obtenir une culture de cellules présentant le même patrimoine génétique. C'est donc une culture homogène, encore plus homogène qu'une lignée homogène. Les clones de cellules sont très utilisées pour faire des cultures de lignées mutantes dépourvues de certains gènes et donc de certaines protéines, très intéressant pour étudier les fonctions de certaines protéines.



### III – Rôle des conditions de culture

Pour avoir une bonne culture cellulaire il faut donner à la cellule un environnement in-vitro aussi proche que possible de celui qu'elles avaient in-vivo.

Il faut utiliser un **milieu de culture stérile** de façon à éviter la contamination par des bactéries. Le milieu de culture doit donc contenir :

- des constituants minéraux
- des substances énergétiques (le plus souvent du glucose)
- des acides aminés
- des vitamines

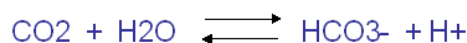
On rajoute très souvent du **sérum** à 10 ou 20%. Il va apporter des substances très importantes pour la division cellulaire comme :

- |  |   |                             |   |  |
|--|---|-----------------------------|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- des hormones</li> <li>- des vitamines</li> <li>- des facteurs de croissance</li> <li>- de la fibronectine (élément de la matrice extra-cellulaire)</li> </ul> | } | pour la division cellulaire | } | pour favoriser l'adhérence des cellules au support |
|--|---|-----------------------------|---|--|

Le **maintient du pH** est aussi très important :

- $7,2 < \text{pH} < 7,4$

**Systèmes tampons** : le bicarbonate va être apporté par le milieu de culture, le  $\text{CO}_2$  par celui présent dans l'atmosphère. L'enceinte va être à une température régulée pour que la **température soit à 38 degrés**.



Une cuve sera remplie d'eau pour **saturer l'atmosphère en eau** pour éviter l'évaporation des cellules de culture.

## B – Fractionnement tissulaire ou cellulaire

Le fractionnement cellulaire ou tissulaire permet de séparer les organites des tissus ou des cellules isolées. Cette séparation devra en même temps préserver la fonction des organites. Deux étapes pour obtenir les organites :

- briser les tissus ou les cellules de façon à libérer les organites : c'est l'homogénéisation
- isoler les organites sous une forme pure : c'est l'isolement.

### I – L'homogénéisation

Le matériel est brisé dans un milieu liquide d'homogénéisation. L'ensemble = l'homogénat. Les membranes des organites vont subir au cours de l'homogénéisation un clivage en fragments mais très rapidement ces fragments vont se recoller pour former des vésicules closes (ou microsomes quand on parle du réticulum endoplasmique).

#### 1 – Techniques mécaniques

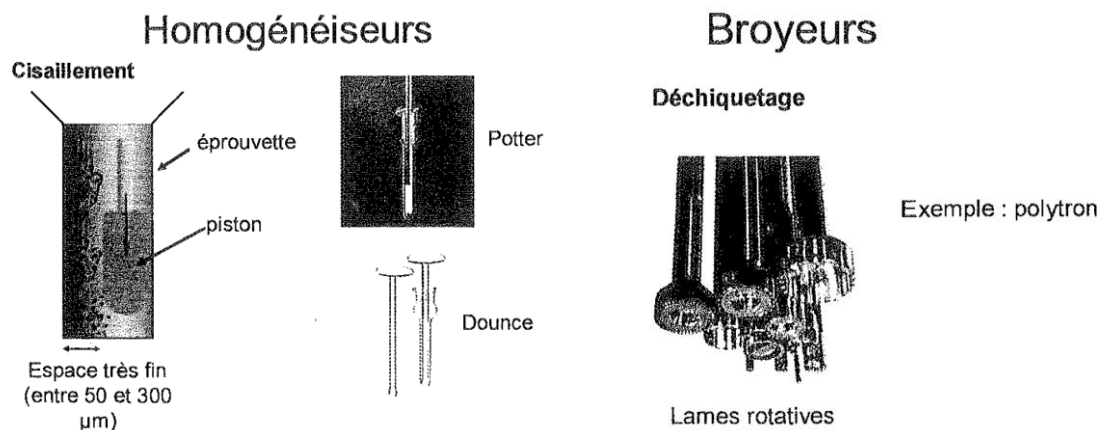
Ce sont les techniques les plus utilisées

##### a – Broyage

2 systèmes :

- homogénéiseurs destinés à la fois aux tissus et aux cellules isolées
- broyeurs qui ne concernent que les tissus.

**Les homogénéiseurs** : on applique un cisaillement au matériel biologique en le faisant passer au travers d'un espace très fin (entre 50 et 300  $\mu\text{m}$ ). Cet espace très fin est obtenu par un piston à l'intérieur d'une éprouvette. 2 exemples : le Potter (éprouvette en verre, tige en métal) et le Dounce (tige et éprouvette en verre)



**Le broyeur** permet le déchiquetage des tissus grâce à des lames rotatives qui tournent à grande vitesse (ex : le polytron). C'est une méthode plus destructrice pour les organites que les homogénéiseurs.

### b – Sonication

Uniquement pour les cellules isolées

Elle nécessite une suspension de cellule et une tige métallique qui émet des ultrasons qui vont provoquer la lyse des cellules. L'inconvénient est l'échauffement provoqué par la sonication.

### c – Congélation-décongélation

Uniquement pour les cellules isolées

Ce sont des cycles de congélation-décongélation à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ce sont des techniques plus destructrices pour les organites.

## 2 – Techniques chimiques ou enzymatiques

Ces techniques sont plus difficiles à contrôler donc moins utilisées.

### a – Choc osmotique

Valable uniquement pour les cellules isolées.

On place les cellules dans une solution très faiblement concentrée. L'eau va entrer dans les cellules, celles-ci vont gonfler jusqu'à éclater. Les inconvénients : beaucoup d'organites sont endommagés.

### b – Utilisation d'enzymes

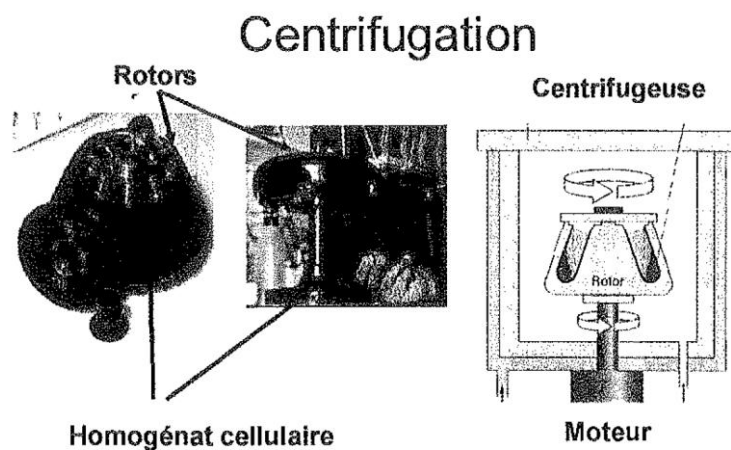
Comme les lipases, les protéases, les glucanases. C'est une technique qui peut être utilisée en complément sur des tissus très résistants (ex : le cœur).

### c – Détergents

Ils vont désorganiser les lipides membranaires et favoriser la rupture des membranes.

## II – Isolement des organites

A partir de l'homogénéisation soit des tissus soit des cellules isolées, on obtient un homogénat qui consiste en une suspension d'organites. Ces organites sont différents par leur taille, leur masse et leur densité. Ces propriétés sont utilisées pour les séparer par centrifugation.





## 1 – Définitions

### a – Vitesse de déplacement des particules dans un tube

Cette vitesse de déplacement est proportionnelle à :

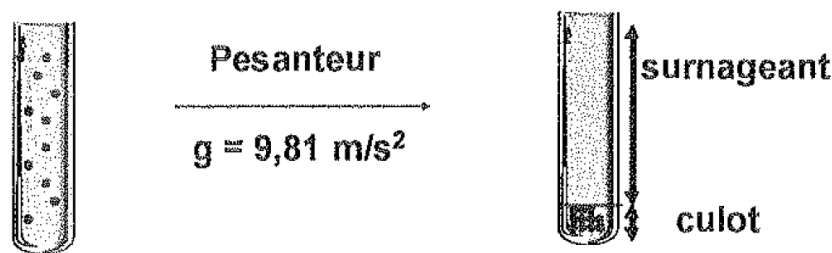
- l'accélération imposée à la particule
- la masse de la particule
- la différence de densité entre la particule et le milieu

Elle est inversement proportionnelle à la friction. La friction dépend de :

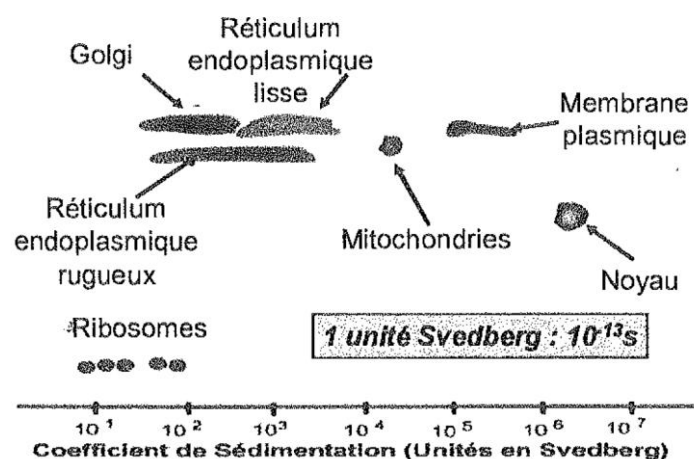
- la taille des particules
- la forme des particules

### b – Sédimentation ou décantation

**La sédimentation** a lieu quand on soumet des particules à la simple accélération de la Terre (pesanteur) :  $1g = 9,81 \text{ N/m}$ . Elle permet d'obtenir le rassemblement des grosses particules au fond du tube (ex : cellules entières), c'est le culot. Au dessus se trouve le surnageant.



La sédimentation va permettre de déterminer des vitesses spécifiques de sédimentation qui représentent la combinaison de la masse, de la densité et de la morphologie des particules. Les vitesses de sédimentation sont représentées par le coefficient de sédimentation, en unités Svedberg ( $=10^{-13}s$ ).



Ce coefficient dépend de la densité et de la forme des particules. Si la densité de la particule est élevée ou si la forme génère peu de frictions, ce coefficient sera élevé. Donc la vitesse de sédimentation sera élevée (les particules tomberont vite au fond du tube).

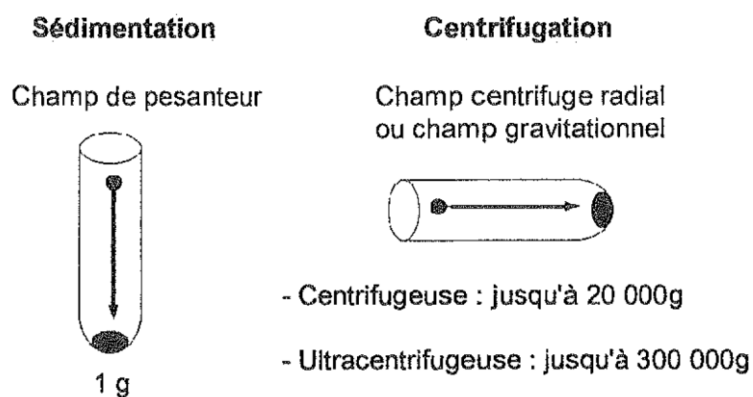
Le noyau possède une vitesse de sédimentation élevée parce qu'il a une densité élevée. La membrane plasmique possède également un coefficient de sédimentation élevé car sa forme génère peu de frictions.

La vitesse de sédimentation des organites reste beaucoup trop faible pour pouvoir les isoler de cette façon : il faut augmenter l'accélération grâce à la centrifugation qui permet d'augmenter la vitesse de déplacement des particules.

### c – Centrifugation

La sédimentation subit un champ de pesanteur dont la direction est verticale. L'accélération est donc de 1g (= accélération de la terre).

Pour la centrifugation, on parle de champ centrifuge radial ou champ gravitationnel. Il permet d'augmenter l'accélération.



Il existe deux types de matériel :

- les centrifugeuses qui vont jusqu'à 20 000g
- les ultracentrifugeuses qui vont jusqu'à 300 000g.

Les vitesses sont exprimées en g ou RPM (rotations par minute).

## 2 – Centrifugation différentielle

Elle utilise une partie des propriétés des particules. La vitesse de déplacement des particules dépend de l'accélération imposée à la particule. Elle dépend également de la taille et de la forme des particules. Plus les organites sont grands, plus vite ils migrent au fond du tube. Plus ils sont allongés et plus ils migrent lentement du fait de la friction. Le principe de la centrifugation différentielle est de réaliser plusieurs centrifugations avec une augmentation progressive de l'accélération.

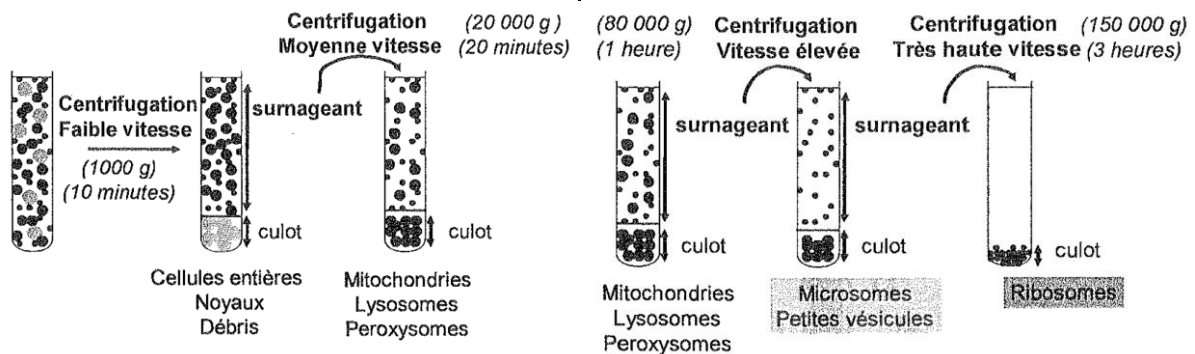
La première étape est de réaliser une centrifugation à faible vitesse (1000g pendant 10 min), seules les particules ayant une masse élevée tomberont dans le culot. Il ne contiendra que des cellules entières, des noyaux et des débris cellulaires.

La deuxième centrifugation est effectuée avec le surnageant à vitesse moyenne (20 000g pendant 20min) et on obtient les mitochondries, les lysosomes et les peroxysomes.

On reprend le surnageant et on le soumet à 80 000g pendant 1h : on obtient les microsomes, les petites vésicules.

Puis le surnageant est soumis à 150 000g pendant 3h pour récupérer les ribosomes.

Faible vitesse (1000g pendant 10 minutes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cellules entières</li> <li>- noyaux</li> <li>- débris cellulaires</li> </ul>
Vitesse moyenne (20 000g pendant 20 minutes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mitochondries</li> <li>- lysosomes</li> <li>- peroxysomes</li> </ul>
Grande vitesse (80 000g pendant 1 heure)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- microsomes</li> <li>- petites vésicules</li> </ul>
Ultra-grande vitesse (150 000g pendant 3 heures)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ribosomes</li> </ul>



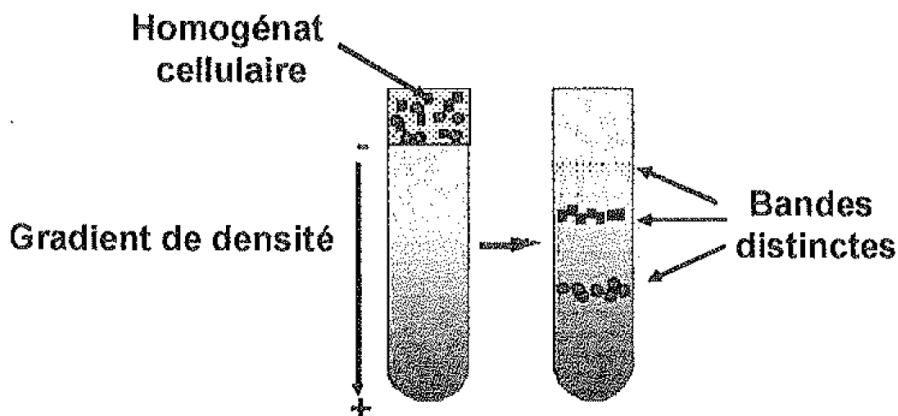
La mise en œuvre de la centrifugation différentielle est simple mais c'est une séparation grossière et qui n'est valable que pour des particules présentant des grandes différences de taille.

### 3 – Centrifugation en gradient de densité

Une autre propriété peut être utilisée : la vitesse de déplacement des particules dépend de la différence de densité entre la particule et le milieu.

La suspension d'organites est placée en haut d'un milieu dont la concentration augmente du haut vers le bas du tube. Cette variation de concentration dans le tube s'appelle le gradient de densité, composé par diverses substances :

- le saccharose (séparation des organites)
- le Métrizamide® (séparation des organites)
- le chlorure de césium (séparation de macromolécules comme les acides nucléiques)
- Ficoll® et Percoll® (séparation des différents types cellulaires)



Au cours de la centrifugation, les particules les plus denses migrent vers le bas.

Inconvénient : temps de centrifugation beaucoup plus long (18 à 24h de centrifugation) mais la séparation est beaucoup plus fine.

**Conclusion :**

A partir des tissus, on peut obtenir des cultures de cellules voire des organites. Cela permet l'étude de leur fonctionnement, l'aide au diagnostic ou un outil thérapeutique. Mais pour cela il faut faire des observations en microscopie et cela grâce au marquage.