

5. Milieux de culture des cellules immunitaires

1. Définition

Le **milieu de culture cellulaire** est un liquide nutritif qui permet aux cellules de **survivre, se multiplier et fonctionner in vitro**.

Il apporte : de l'énergie, des **nutriments essentiels** et des **facteurs nécessaires au cycle cellulaire**

Il est principalement composé de : acides aminés, sels minéraux, glucose et sérum (source d'hormones et de facteurs d'adhésion)

2. Rôle du milieu de culture

Le milieu de culture permet de :

- maintenir la **croissance et la viabilité** des cellules
- assurer des **conditions physiologiques stables** (pH, pression osmotique)
- limiter les **contaminations** lorsqu'il est manipulé correctement

3. Principaux milieux utilisés

➤ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

- pH : 7,4 – 7,6
- Adapté aux **cellules adhérentes** (fibroblastes, macrophages, cellules épithéliales)
- Riche en glucose → cellules **métaboliquement actives**

➤ RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium)

- pH : $\approx 8,0$
- Adapté aux **cellules en suspension** (lymphocytes, PBMC, monocytes)

4. Préparation d'un milieu complet

Un milieu de base (DMEM ou RPMI) devient **milieu complet** après :

- ajout de **10 % de sérum fœtal bovin (FBS)**

5. Choix du milieu selon le type cellulaire

- Cellules en suspension (lymphocytes, PBMC) → RPMI-1640
- Monocytes → RPMI-1640
- Macrophages → DMEM
- Cellules adhérentes métaboliquement actives → DMEM (souvent high glucose)

6. Types de cultures cellulaires

Les cultures cellulaires peuvent être classées **selon leur origine et leur degré de manipulation** en **trois grands types** : Culture primaire, Culture secondaire et Lignée cellulaire

A. Culture primaire

Définition

La **culture primaire** est une culture obtenue **directement à partir d'un tissu animal ou humain**.

Les cellules sont isolées par :

- des **méthodes enzymatiques** (trypsine, collagénase)
- ou des **méthodes mécaniques** (dissection, explant)

Les cellules **conservent les caractéristiques du tissu d'origine**, mais présentent :

- une **croissance lente**
- une **durée de vie courte**

Types de cellules en culture primaire

1. **Cellules adhérentes** : Nécessitent un support pour se fixer, Exemples : fibroblastes, cellules épithéliales
2. **Cellules en suspension** : Prolifèrent librement dans le milieu, Exemple : lymphocytes

Méthodes d'obtention

Méthode	Principe	Inconvénient
Dissection (explant)	Fragment de tissu placé dans le milieu	Croissance lente (~30 jours)
Enzymatique	Utilisation de trypsine ou collagénase	Risque de dégradation cellulaire

B. Culture secondaire

Définition

La **culture secondaire** est obtenue après le **repiquage (subculture)** d'une culture primaire.
Les cellules **conservent les propriétés du tissu d'origine**, mais leur **capacité de division reste limitée**.

Réalisée :

- Lorsque les **cellules adhérentes atteignent la confluence**
- Ou lorsque la **densité cellulaire devient trop élevée**

Méthode

- Détachement des cellules par :
 - enzymes (trypsine, EDTA)
 - ou grattage mécanique
- Puis **ensemencement dans de nouveaux flacons**

C. Lignée cellulaire

Définition

Une **lignée cellulaire** est une culture dérivée d'une culture primaire ou secondaire, capable de se diviser :

- un **nombre limité de fois** (lignée finie)
- ou **indéfiniment** (lignée continue)

Elle se caractérise par :

- une **croissance rapide**
- une population **homogène**

Exemples

- **HeLa** : cellules cancéreuses humaines
- **3T3** : fibroblastes murins

Types de lignées cellulaires

- **Lignées finies** : durée de vie limitée, Exemple : fibroblastes humains
- **Lignées continues** : cellules immortalisées
 - naturellement (tumeurs)
 - ou artificiellement (virus, agents chimiques)

Différences entre les types de cultures

Caractéristique	Culture primaire	Culture secondaire	Lignée cellulaire
Origine	Tissu d'origine	Repiquage primaire	Subculture / immortalisation
Durée de vie	Courte	Moyenne	Limitée ou illimitée
Croissance	Lente	Modérée	Rapide et homogène

Utilisation	Modèle proche du tissu réel	Expérimentation	Recherche, production, vaccins
-------------	-----------------------------	-----------------	--------------------------------

Nomenclature et croissance cellulaire

- **Passage (subculture)** : transfert des cellules vers un nouveau récipient
- **Confluence** : surface de culture entièrement recouverte par les cellules

Courbe de croissance cellulaire

1. **Phase de latence (lag)** : adaptation des cellules
2. **Phase exponentielle (log)** : croissance rapide
3. **Phase stationnaire** : arrêt de la prolifération (confluence)

À retenir

- Culture primaire → la plus proche du tissu réel
- Lignée cellulaire → la plus utilisée en recherche
- La confluence détermine le moment du repiquage

7. Modes de culture cellulaire

7.1. Définitions

A. Culture en suspension

Les **cellules en suspension** se développent **librement dans le milieu de culture**, sans nécessité de surface solide. Elles proviennent généralement : du **sang**, de la **rate** ou de la **moelle osseuse**

Exemples : monocytes, lymphocytes, cellules tumorales hématologiques.

Avantages et inconvénients

Avantages	Inconvénients
Volume de culture facilement augmentable	Observation microscopique plus difficile
Pas besoin de trypsinisation	Densité cellulaire critique
Idéales pour production massive	Risque d'agrégats cellulaires

B. Culture de cellules adhérentes

Les **cellules adhérentes** ont besoin d'une **surface solide** pour s'attacher et se multiplier. Elles proviennent de **tissus solides** comme : foie, rein, peau

Exemples : macrophages, fibroblastes.

Caractéristiques :

- forme étalée
- croissance en **monocouche**
- dépendance à l'adhésion (intégrines, fibronectine)

Avantages et inconvénients

Avantages	Inconvénients
Observation facile au microscope	Nombre limité (surface du flacon)
Idéales pour études morphologiques	Stress lors du détachement
Repiquage facile à la confluence	Peu adaptées aux grandes productions

7.2. Ensemencement et repiquage des cultures

A. Cellules en suspension

1. Resuspendre doucement la culture pour homogénéiser
2. Compter les cellules (Bleu de Trypan)
3. Ajuster la densité cellulaire dans un nouveau flacon avec milieu frais

Densité optimale :

- Minimum : 2×10^5 cellules/mL → en dessous : croissance lente
- Maximum : 10^6 à 2×10^6 cellules/mL → au-delà : stress métabolique

Remarque :

- Pas de trypsine
- Repiquage par **simple dilution**

B. Cellules adhérentes

1. Détacher les cellules avec **trypsine/EDTA**
2. Neutraliser la trypsine avec un milieu contenant du sérum
3. Compter les cellules
4. Calculer la densité d'ensemencement
5. Ajouter la suspension cellulaire dans un nouveau flacon
6. Incuber **24 h sans agitation** pour permettre l'adhésion

Remarque :

- Densité trop faible → mauvaise adhésion
- Densité trop élevée → stress et confluence rapide

8. Besoins nutritifs des cellules en culture

A. Milieux synthétiques

Les milieux de culture sont formulés pour répondre aux **besoins métaboliques des cellules**, avec un pH et une osmolarité contrôlés.

Besoins nutritifs	Rôle
Sels minéraux (NaCl, KCl, CaCl ₂)	Maintien de l'osmolarité
Glucose	Source d'énergie
Acides aminés	Synthèse des protéines
Vitamines (B, C...)	Cofacteurs enzymatiques
Sérum (FBS)	Protéines et facteurs de croissance

B. Facteurs de croissance

Les **facteurs de croissance** sont des **cytokines ou hormones** ajoutées au milieu pour stimuler : la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Facteur	Rôle biologique
IL-2	Activation et prolifération des lymphocytes T
M-CSF	Différenciation monocytes → macrophages
GM-CSF	Différenciation monocytes/macrophages → cellules dendritiques

9. Contrôles fonctionnels des cellules en culture

L'évaluation de la **qualité d'une culture cellulaire** repose sur :

1. Morphologie cellulaire

- Premier indicateur observable au microscope
- Une morphologie anormale (forme, adhérence, organisation) indique: stress cellulaire, milieu inadapté, contamination

2. Vitesse de croissance

- Évaluée par comptage cellulaire

- Reflète la qualité : du milieu, du sérum et du substrat
 - Utilisée pour : mesurer la survie cellulaire et tester la **cytotoxicité** de substances in vitro

9.1. Contrôles lors de la mise en route d'une culture

Au démarrage, il faut vérifier :

- **Conditions d'asepsie** présence des antibiotiques / antifongiques
- **Viabilité cellulaire** : test au **Bleu de Trypan**
 - cellules vivantes : transparentes
 - cellules mortes : bleues

9.2. Contrôles de routine

Pendant l'entretien normal de la culture :

- **Morphologie et adhérence** (microscope)
- **Milieu de culture** : renouvellement tous les **2 à 3 jours**
le rouge de phénol devient jaune si $\text{pH} < 6,6$

9.3. Techniques générales d'entretien

- **Changement du milieu**
 - **Cellules adhérentes** : aspiration directe du milieu
 - **Cellules en suspension** : centrifugation puis remplacement du milieu
 - À confluence : détachement des cellules adhérentes à la **trypsine**
- **Conservation des cellules (cryoconservation)**
 - Congélation longue durée : **azote liquide** à -196 °C

10. Contrôle de contamination des cultures cellulaires

La contamination est **fréquente** et peut fausser les résultats expérimentaux.

10.1. Types de contaminations

Type	Signes observés
Bactéries	Milieu trouble, $\text{pH} \downarrow$
Levures	Milieu trouble, pH stable puis $\uparrow$
Champignons	Milieu clair, filaments (hyphes), $\text{pH} \uparrow$
Cross-contamination	Contamination par une autre lignée (ex. HeLa)

10.2. Origines des contaminations

- **Matériel** : hottes, incubateurs, filtres mal entretenus
- **Manipulations** : mauvaises pratiques, lignées contaminées

11. Intérêts et applications de la culture cellulaire en immunologie

1. Intérêts de la culture cellulaire

La culture cellulaire permet de :

- étudier le **comportement des cellules** in vitro
- analyser les **interactions cellule-cellule**
 - tester l'effet de différentes substances : cytokines, extraits végétaux, médicaments
- **réduire l'expérimentation animale**

2. Principales cellules immunitaires étudiées

En immunologie, les cellules les plus utilisées en culture sont :

- **Lymphocytes T** (CD4⁺, CD8⁺)
- **Lymphocytes B**
- **Monocytes / Macrophages**
- **Cellules dendritiques**
- **Cellules NK**

3. Exemples expérimentaux en immunologie

Quelques applications courantes :

- **Activation des lymphocytes T**
- **Différenciation des monocytes en macrophages** → M-CSF
- **Différenciation des monocytes en cellules dendritiques** → GM-CSF + IL-4

8. Immunothérapies

La culture cellulaire est indispensable pour :

- la production d'**anticorps monoclonaux**
- la technologie des **hybridomes**