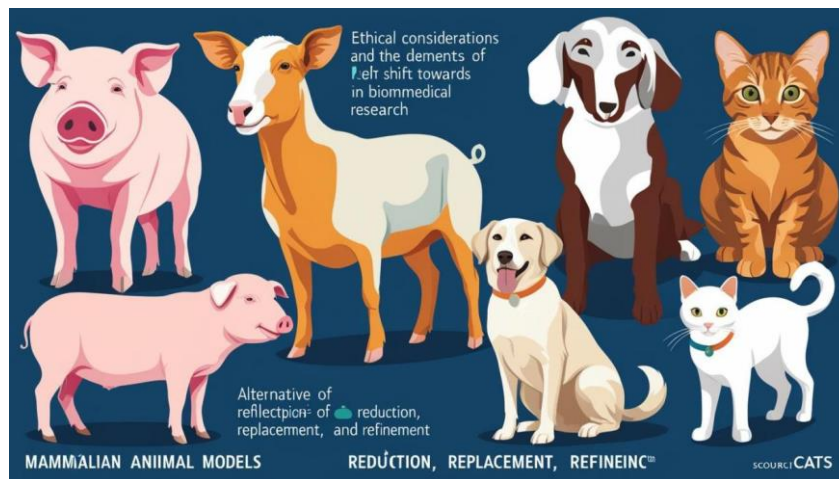


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE FERHAT ABBAS - SETIFI FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE  
ET DE LA VIE

Département de Biochimie



**Support de cours :**  
*Techniques de culture cellulaire et modèles  
d'expérimentation animale*



**Niveau : 1<sup>ere</sup> ANNEE master Biochimie Appliqué**

**Dr. Derafa Ismahane**

**2025-2026**

## **Sommaire**

### ***Chapitre 1***

#### ***Expérimentation animale***

1.1 Définition et rôle dans la recherche biomédicale .....	1
1.2 Domaines d'application : pharmacologie, toxicologie, vaccinologie, physiologie .....	2
1.3 Types d'expérimentation : aiguë, subaiguë, chronique .....	6
1.4 Principes des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) .....	9
1.5 Contrôle de la douleur et du stress animal .....	11

### ***Chapitre 2***

#### ***Les différents modèles d'expérimentation animale***

2.1 Modèles rongeurs : souris, rats, cobayes (atouts et limites).....	14
2.2 Modèles non rongeurs : lapins, poissons-zèbres, primates.....	14
2.3 Modèles transgéniques et knock-out .....	16
2.4 Choix du modèle en fonction de l'objectif de recherche .....	16
2.5 Limitations des modèles animaux et transposition à l'homme .....	18
2.6 Exemple d'applications : cancérologie, neurologie, infectiologie .....	18

### ***Chapitre 3***

#### ***Éthique et législation***

3.1 Histoire de l'éthique animale en expérimentation .....	21
3.2 Comité d'éthique et autorisation de protocoles .....	22
3.3 Formation et certification du personnel (ex. : FELASA en Europe) .....	24
3.4 Règles d'hébergement, d'alimentation, d'enrichissement .....	27
3.5 Dilemmes éthiques et alternatives aux modèles animaux .....	28

### ***Chapitre 4***

#### ***Technique de culture cellulaire (généralités)***

4.1 Evénements historiques dans le développement de la culture cellulaire .....	30
4.2 Matériel de base et environnement stérile (hottes à flux laminaire, incubateurs...) .....	32
4.3 Milieux de culture : composition, types, additifs (FBS, antibiotiques...) .....	37
4.4 Conditions optimales de culture : température, CO <sub>2</sub> , humidité .....	44
4.5 Passages cellulaires, congélation et décongélation .....	46

## ***Chapitre 5***

### ***Culture des cellules animales***

5.1 Types de lignées cellulaires : adhérentes, en suspension, primaires vs immortalisées .....	49
5.2 Exemples de lignées : HeLa, Caco-2, HepG2, CHO, Vero .....	55
5.3 Techniques d'ensemencement, de comptage et de viabilité (trypan blue, MTT) .....	59
5.4 Tests d'activité biologique : cytotoxicité, apoptose, prolifération .....	61
5.3 Transfection et manipulation génétique des cellules .....	65
5.6 Applications : vaccinologie, tests pharmacologiques, médecine régénérative .....	66

## ***Chapitre 6***

### ***Culture végétale***

6.1 Principes de base de la culture in vitro végétale .....	69
6.2 Explants utilisés : méristèmes, feuilles, tiges, racines .....	71
6.3 Milieux de culture : MS (Murashige & Skoog), hormones végétales (auxines, cytokinines) .....	72
6.4 Techniques de micropropagation, organogenèse, embryogenèse somatique.....	74

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les rongeurs comme modèles incontournables en recherche biomédicale.....	14
<b>Figure 2</b> : Modèles animaux et considérations éthiques en recherche biomédicale.....	15
<b>Figure 3</b> : Modèles non-mammifères.....	15
<b>Figure 4</b> : Primates non humains utilisés comme modèles animaux expérimentaux.....	17
<b>Figure 5</b> : Poste de sécurité microbiologique.....	33
<b>Figure 6</b> . Culture d'un explant. ....	30
<b>Figure 7</b> . Dissociation mécanique et enzymatique.....	50
<b>Figure 8</b> . Principe de la cytométrie en flux et du tri cellulaire.....	51
<b>Figure 9</b> . Immortalisation des cellules B avec le virus d'Epstein-Barr. ....	53
<b>Figure 10</b> . Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture. ....	58
<b>Figure 11</b> . Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, ...). Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension.....	58
<b>Figure 12</b> . Test au MTT .....	60
<b>Figure 13</b> . Principe du test d'accumulation du rouge neutre.....	60
<b>Figure 14</b> . Test du bleu de trypan. ....	61
<b>Figure 15</b> : Test de la lactate déshydrogénase (LDH).....	62
<b>Figure 16</b> . Dénombrement des cellules manuel par lame de Malassez (à droite) et automatisé par un compteur automatique (à gauche).....	64
<b>Figure 17</b> . Quantification des acides nucléiques le Cyquant GR. Le colorant CyQUANT® GR a été incubé avec du lysat cellulaire et a présenté une forte fluorescence verte lorsqu'il est lié à des acides nucléiques cellulaires. ....	64
<b>Figure18</b> : Schéma de la régénération d'une plant.....	74
<b>Figure 19</b> : Méristème de tige et de racine.....	75
<b>Figure 20</b> : Schématisation du microbouturage .....	76
<b>Figure21</b> : représentation schématique des principales phases du développement d'embryon somatique .....	81

## Liste des Tableaux

<b>Tableau1.</b> Exemples des lignées cellulaires tumorales humaines.....	55
<b>Tableau 2 :</b> Milieu MS.....	73

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les rongeurs comme modèles incontournables en recherche biomédicale.....	14
<b>Figure 2</b> : Modèles animaux et considérations éthiques en recherche biomédicale.....	15
<b>Figure 3</b> : Modèles non-mammifères.....	15
<b>Figure 4</b> : Primates non humains utilisés comme modèles animaux expérimentaux.....	17
<b>Figure 5</b> : Poste de sécurité microbiologique.....	33
<b>Figure 6</b> . Culture d'un explant. ....	30
<b>Figure 7</b> . Dissociation mécanique et enzymatique.....	50
<b>Figure 8</b> . Principe de la cytométrie en flux et du tri cellulaire.....	51
<b>Figure 9</b> . Immortalisation des cellules B avec le virus d'Epstein-Barr. ....	53
<b>Figure 10</b> . Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture. ....	58
<b>Figure 11</b> . Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, ...). Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension.....	58
<b>Figure 12</b> . Test au MTT .....	60
<b>Figure 13</b> . Principe du test d'accumulation du rouge neutre.....	60
<b>Figure 14</b> . Test du bleu de trypan. ....	61
<b>Figure 15</b> : Test de la lactate déshydrogénase (LDH).....	62
<b>Figure 16</b> . Dénombrement des cellules manuel par lame de Malassez (à droite) et automatisé par un compteur automatique (à gauche).....	64
<b>Figure 17</b> . Quantification des acides nucléiques le Cyquant GR. Le colorant CyQUANT® GR a été incubé avec du lysat cellulaire et a présenté une forte fluorescence verte lorsqu'il est lié à des acides nucléiques cellulaires. ....	64
<b>Figure18</b> : Schéma de la régénération d'une plant.....	74
<b>Figure 19</b> : Méristème de tige et de racine.....	75
<b>Figure 20</b> : Schématisation du microbouturage .....	76
<b>Figure21</b> : représentation schématique des principales phases du développement d'embryon somatique .....	81

## **Chapitre 1: Expérimentation animale**

Depuis la nuit des temps, l'homme s'est servi de l'animal pour répondre à ses besoins dans différents domaines. Il l'a domestiqué et a fait de lui son meilleur compagnon (chat et chien), animal de traction et labour (bœuf), animal de loisir (cheval), source de nourriture pour subvenir à ses besoins nutritionnelles (toutes espèces comestibles, bovine ovine caprine...etc). En outre, l'utilité de l'animal ne se limite pas à ces domaines précités mais il a rendu un grand service à l'humanité notamment dans la recherche scientifique, plus particulièrement le domaine médical. L'animal occupe une place irremplaçable dans l'avancée des sciences expérimentales notamment la biologie fondamentale, les sciences pharmacologiques et médicales. Grâce à l'animal de laboratoire, l'homme a pu comprendre et expliquer la complexité de certains phénomènes physiologiques ayant lieu dans son propre organisme, d'induire et traiter certaines maladies. Pour cela, l'homme ne peut s'en passer de l'animal non seulement pour répondre à ses besoins nutritionnels mais plutôt pour satisfaire sa curiosité scientifique de découverte et d'exploration pour le traitement de certaines maladies menaçant l'humanité entre autre le cancer sous toutes ses formes et le SIDA.

### **1.1. Définition et rôle de l'expérimentation animale**

L'expérimentation animale consiste à toute manipulation pratique réalisée sur l'animal vertébré vivant selon un protocole validé par le comité scientifique visant l'étude d'un paramètre quelconque, la mise en évidence d'une molécule...etc. tandis que, les expériences menées sur les invertébrés, les formes embryonnaires des vertébrés ovipares ou encore les expériences qui consistent au suivi du comportement des animaux qui ne leur occasionnent aucune souffrance ou douleur ne rentrent pas dans le cadre de l'expérimentation animale.

L'expérimentation animale joue un rôle crucial dans la recherche biomédicale en fournissant des modèles vivants pour étudier les maladies, développer des médicaments et des vaccins, et tester l'innocuité et l'efficacité des traitements avant leur application sur l'homme. Elle permet de décrypter les mécanismes biologiques fondamentaux, de comprendre la progression des maladies et de développer de nouvelles thérapies, rendant possibles des avancées majeures dans des domaines comme l'oncologie, les maladies cardiovasculaires et la thérapie génique.

### 1. 1.1. Comprendre les maladies et leurs mécanismes

**Modèles de maladies:** Les animaux, comme les rongeurs, sont utilisés pour reproduire des maladies humaines et étudier leur développement, offrant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents, comme l'ont démontré les études sur le cancer, les troubles neurologiques ou les maladies cardiaques.

**Compréhension du corps humain:** L'étude de l'anatomie, de la physiologie et du métabolisme des animaux permet de comprendre des fonctions fondamentales du corps humain.

### 1.1.2. Développement de nouveaux traitements

**Médicaments et vaccins:** L'expérimentation animale a été essentielle pour le développement de nombreux traitements, notamment des antibiotiques, de l'insuline, de l'héparine et des vaccins contre des maladies comme la rage.

**Procédures médicales:** Des techniques chirurgicales et des greffes d'organes ont également été développées grâce à la recherche animale.

**Sécurité et efficacité:** Les animaux servent à vérifier la sécurité et l'efficacité des nouvelles thérapies avant qu'elles ne soient testées sur les humains, même si certains résultats peuvent nécessiter une interprétation prudente en raison des différences inter-espèces.

## 1.2 .Domaines d'application

### 1.2.1. Pharmacologie

L'expérimentation animale en pharmacologie sert à évaluer l'innocuité et l'efficacité des nouveaux médicaments, à comprendre les mécanismes des maladies et à tester des thérapies avant les essais sur l'homme. Des modèles animaux (souris, rats, lapins) sont utilisés car ils partagent de nombreuses caractéristiques physiologiques avec les humains, permettant l'étude de la sécurité, de la toxicité et des effets secondaires des traitements dans un système biologique complexe.

#### 1.2.1.1. Applications clés de l'expérimentation animale en pharmacologie :

**Évaluation de l'innocuité et de la toxicité:** Les tests permettent de découvrir les dangers potentiels d'un nouveau médicament en surveillant les effets secondaires et en examinant les organes des animaux après administration de fortes doses.

**Compréhension des mécanismes d'action:** Elle aide à étudier comment les médicaments interagissent avec le corps, comment ils sont métabolisés et éliminés, ainsi qu'à comprendre les processus physiologiques et physiopathologiques.

**Développement de nouvelles thérapies:** L'expérimentation animale est indispensable pour développer des concepts thérapeutiques innovants et démontrer leur validité, y compris pour des maladies complexes.

**Tests sur des systèmes complexes:** Ces modèles sont essentiels pour tester des médicaments sur des organismes vivants entiers, ce qui est nécessaire pour comprendre les effets à l'échelle du système biologique.

### 1.2.2. Toxicologie

L'expérimentation animale en toxicologie sert à évaluer l'innocuité de substances (médicaments, produits chimiques, cosmétiques) et à prédire leurs effets indésirables avant leur utilisation par l'homme. Les chercheurs étudient la relation dose-réponse pour déterminer les concentrations toxiques et les doses bénéfiques, en examinant des effets potentiels à long terme sur les organes et le fonctionnement du corps. Ces études réglementées, principalement sur des souris et des rats, sont cruciales pour la sécurité des produits et le développement de nouveaux traitements, bien que des méthodes alternatives sont de plus en plus utilisées pour réduire, remplacer et affiner (les "3R") le recours aux animaux.

#### 1.2.2.1. Applications principales de l'expérimentation animale en toxicologie :

**Évaluation de la sécurité des médicaments :** Déterminer si un médicament est sûr pour être testé sur l'homme en évaluant sa toxicité aiguë et chronique chez l'animal.

**Identification des effets indésirables :** Surveiller les réactions des animaux aux substances, comme l'apparition d'effets secondaires, et examiner les organes à la recherche de signes de dommages.

**Définition du rapport bénéfice-risque :** Établir les doses qui sont efficaces et celles qui sont toxiques pour aider à définir les doses sûres pour les êtres humains.

**Étude des mécanismes de toxicité :** Comprendre comment les substances affectent les processus biologiques fondamentaux du corps, ce qui peut aider à développer des thérapies et des méthodes de prévention.

### 1.2.2.2.Méthodologie et pratique :

**Tests standardisés** :Les études peuvent inclure l'administration de fortes doses d'une substance à deux espèces animales différentes pendant une période définie (par exemple, 30 ou 90 jours).

**Modèles animaux spécifiques** :Des animaux comme les souris et les rats sont souvent utilisés pour leurs caractéristiques génétiques ou physiologiques, tels que l'immunodéficience chez certaines souris pour étudier les greffes.

**Examen post-étude** :Après la période d'expérimentation, les pathologistes examinent les organes des animaux pour détecter tout signe de toxicité.

### 1.2.3. Vaccinologie

L'expérimentation animale est fondamentale en vaccinologie pour tester l'innocuité, l'efficacité et la réponse immunitaire des vaccins avant leur utilisation chez l'homme, en considérant l'organisme entier et sa complexité. Elle permet de développer des vaccins en évaluant leur action et les effets secondaires dans un système vivant complexe que les méthodes alternatives in vitro ou informatiques ne peuvent reproduire, malgré les progrès de ces dernières. Les souris, lapins, rats et poissons sont les animaux les plus couramment utilisés pour ces études.

#### 1.2.3.1.Rôles de l'expérimentation animale en vaccinologie

##### *Les tests d'innocuité*

Les tests d'innocuité en vaccinologie sont un processus rigoureux qui évalue la sécurité d'un vaccin avant son utilisation humaine, impliquant des tests en laboratoire sur des animaux, puis des essais cliniques sur des volontaires humains. Ces tests permettent d'identifier d'éventuels effets secondaires, de confirmer qu'un vaccin est sans danger et qu'il provoque une réponse immunitaire. La vaccinologie étudie l'innocuité à la fois pendant le développement du vaccin et après sa mise sur le marché, à travers des systèmes de surveillance continue.

##### *Tests d'efficacité*

Les tests d'efficacité des vaccins impliquent des **essais cliniques rigoureux**, où l'on compare un groupe des animaux vaccinées à un groupe de contrôle recevant un placebo pour mesurer la diminution du risque de maladie. Ces essais se déroulent en plusieurs phases, évaluant d'abord la tolérance et l'immunogénicité (phases 1 et 2), puis l'efficacité et la sécurité à grande

échelle (phase 3). Après l'approbation, des méthodes de surveillance continue et d'études post-commercialisation, comme les études cas-témoins, permettent d'évaluer l'efficacité en conditions réelles.

**Essais cliniques contrôlés :** Ce sont des essais randomisés et contrôlés qui constituent le principal moyen d'évaluer l'efficacité avant l'autorisation.

- ✓ **Phase 1 :** Évalue la tolérance du vaccin et la production d'anticorps sur un petit groupe d'adultes en bonne santé.
- ✓ **Phase 2 :** Implique un groupe plus large pour étudier la tolérance et déterminer le schéma de vaccination (nombre de doses, etc.).
- ✓ **Phase 3 :** Teste l'efficacité et la tolérance sur plusieurs milliers de personnes, en comparant le taux de maladie dans le groupe vacciné à celui du groupe recevant un placebo.

L'efficacité est exprimée en pourcentage, indiquant la réduction du risque de maladie chez les personnes vaccinées par rapport à celles non vaccinées.

**Exemple :** Une efficacité de 80% signifie que le risque de contracter la maladie est inférieur dans le groupe vacciné par rapport au groupe placebo.

### ***Tests d'interférence***

Une attention particulière doit être portée à la possibilité d'interférences entre deux vaccins différents venant d'un même fabricant dans un même récipient/en dose combinée ou dont l'administration à un même animal est recommandée à un intervalle de 2 semaines. L'innocuité et l'efficacité de ces associations doivent être évaluées. Ces études sont alors souvent appelées « Etudes sur l'absence d'interférences » ; elles devraient évaluer l'interférence de X sur Y ainsi que celle de Y sur X. Dans certains cas, il est possible de les définir sérologiquement.

#### **1.2.4. Physiologie**

L'expérimentation animale en physiologie permet de comprendre le fonctionnement des organismes vivants et de développer de nouveaux traitements médicaux en étudiant l'action des médicaments, les mécanismes de maladies et le comportement, car l'organisme est étudié dans sa complexité, notamment pour le métabolisme et le développement. Elle a abouti à des thérapies pour le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires, le VIH et le

développement de vaccins, mais reste complémentaire aux méthodes alternatives in vitro et in silico. L'expérimentation animale est encadrée par une réglementation stricte qui vise à assurer le bien-être des animaux et à appliquer la règle des 3R : Remplacer, Réduire, Raffiner.

#### **1.2.4.1. Applications concrètes de l'expérimentation animale en physiologie :**

**Développement de thérapies médicales :** La plupart des médicaments, comme la pénicilline, l'insuline, les vaccins (y compris pour la COVID-19) et les traitements contre le cancer et le VIH, ont été développés grâce à des études sur des animaux.

**Étude du fonctionnement des organismes vivants :** Elle permet de comprendre les mécanismes physiologiques, le métabolisme, le comportement et le développement embryonnaire des êtres vivants.

**Modélisation de maladies :** Elle aide à étudier les maladies génétiques et infectieuses, ainsi que des troubles neurologiques, pour trouver de nouveaux traitements et améliorer la santé humaine et vétérinaire.

**Conception de dispositifs médicaux :** Des implants et d'autres dispositifs médicaux ont bénéficié de la recherche animale.

**Amélioration du bien-être animal :** La recherche peut également porter sur l'amélioration des conditions d'élevage et du bien-être des animaux, en étudiant leur comportement dans leur environnement naturel.

### **1.3. Types d'expérimentation animale**

Les types d'expérimentation animale se distinguent par la durée de l'exposition et la fréquence d'administration des substances ou des procédures : aiguë pour une seule administration sur moins de 24 heures, subaiguë pour une exposition répétée sur une période de moins d'un mois, et chronique pour des expositions répétées sur une durée de plus de trois mois, voire de plus de 28 jours dans certains contextes.

#### **1.3.1. Expérimentation aiguë**

L'expérimentation animale aiguë, souvent controversée, consiste à utiliser des animaux de laboratoire pour étudier et évaluer des effets rapides et immédiats de substances ou de procédés, par exemple la toxicité aiguë d'un produit. Ces procédures, soumises à une

réglementation stricte telle que la directive européenne 2010/63/UE, visent à comprendre les réactions des organismes vivants tout en étant guidées par le principe des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer), qui promeut des méthodes alternatives pour minimiser l'utilisation et la souffrance des animaux. Expérimentation aiguë est pour :

**1.3.1.1. Comprendre les réactions immédiates :** L'expérimentation aiguë vise à observer les effets immédiats et les réponses rapides d'un animal à une substance, un agent pathogène ou un stimulus.

**1.3.1.2. Tests de toxicité aiguë :** Un des usages courants est d'évaluer la toxicité d'une nouvelle substance chimique ou pharmaceutique en observant ses effets sur une courte période.

**1.3.1.3. Études de la douleur :** Des tests comme l'épreuve de la plaque chaude ou le test de l'immersion de la queue dans l'eau chaude permettent de mesurer la réaction d'un animal à la douleur aiguë et d'évaluer l'efficacité d'un analgésique.

**1.3.1.4. Applications médicales :** Historiquement, ces méthodes ont contribué à des découvertes majeures, comme la mise au point d'antibiotiques, de vaccins, et le développement de techniques chirurgicales et d'implants, bien que la pertinence actuelle de ces approches soit débattue.

### **1.3.2. Expérimentation subaiguë**

L'expérimentation animale subaiguë désigne un protocole de recherche où la période de stress ou de souffrance de l'animal se situe entre une courte durée et la chronicité, généralement sur plusieurs jours. La qualification "subaiguë" est liée au degré de gravité de l'expérience et aux contraintes imposées à l'animal, qui sont évaluées avant et pendant la procédure pour déterminer si l'animal souffre au-delà de seuils prédéfinis.

#### ***Critères d'évaluation :***

***Signes cliniques :*** Les changements de comportement ou les symptômes physiologiques observés chez l'animal sont pris en compte.

***Impact des contraintes :*** L'estimation a priori de l'impact des contraintes sur le bien-être de l'animal est cruciale pour déterminer le degré de gravité.

Exemples de procédures subaiguës :

- Des procédures impliquant des phases d'inanition ou de déshydratation de plus de 48 heures chez les rats.
- Des protocoles qui imposent des contraintes ou des expérimentations sur plusieurs jours, par exemple pour étudier la réponse de l'organisme à de nouveaux agents pathogènes ou substances

### 1.3.3. Expérimentation subchronique

L'« expérimentation subchronique », ou étude de toxicité subchronique, évalue les effets nocifs d'une substance sur des animaux d'expérience par une exposition répétée sur une période modérée, typiquement entre 28 et 90 jours. Ces études, qui constituent un intermédiaire entre les tests de toxicité aiguë et chronique, permettent d'identifier des seuils sans effet nocif et d'observer des altérations physiologiques, biochimiques ou histopathologiques induites par la substance.

#### 1.3.3.1. Objectifs de l'expérimentation subchronique

**Détection des effets néfastes** : Identifier les dangers potentiels d'une substance après des expositions répétées.

**Détermination des niveaux sans effet (DSENO)** : Établir les doses administrées en dessous desquelles aucun effet toxique n'est observé sur la santé.

**Identification des organes cibles** : Mettre en évidence les organes ou les systèmes les plus affectés par l'exposition à la substance.

Pendant l'étude, on observe de nombreux indicateurs :

- ✓ **Mortalité**: et signes de toxicité générale.
- ✓ **Comportement**, consommation de nourriture et d'eau.
- ✓ **Poids corporel**: des animaux.
- ✓ **Analyses biochimiques**: du sang, hématologie, coagulation, et analyse d'urine.
- ✓ **Examen histopathologique**: et poids des organes.

(souvent comprise dans le terme « subaiguë » ou distincte dans certaines classifications)

### 1.3.4. Expérimentation chronique

L'expérimentation animale chronique se réfère à des études de longue durée sur des animaux pour évaluer les effets de substances ou d'environnements sur leur santé et leur bien-être, avec l'objectif de comprendre et de traiter des maladies. Bien que des méthodes alternatives comme les organoïdes et les modèles informatiques se développent, l'expérimentation animale reste indispensable pour étudier des organismes complexes dans leur ensemble, particulièrement pour les effets à long terme qui sont difficiles à reproduire sur des modèles plus simples.

#### 1.3.4.1. Objectifs

**Utilisation d'animaux** : L'expérimentation animale consiste à utiliser des animaux **vivants** comme modèles pour étudier la physiologie, les maladies ou pour tester l'innocuité et l'efficacité de produits.

**Études chroniques** : Elles se distinguent par leur durée, car elles visent à observer les effets d'une exposition sur une longue période, par opposition aux expériences aiguës.

**Recherches** : Ces études sont cruciales pour l'étude du comportement, des maladies infectieuses ou génétiques, et pour le développement de traitements.

Limites et alternatives

**Complexité de l'organisme** : Les modèles animaux sont souvent nécessaires pour comprendre les interactions complexes au sein d'un organisme entier, ce que ne peuvent pas toujours reproduire des méthodes alternatives.

**Développement des alternatives** : Des progrès sont réalisés dans l'utilisation de cultures cellulaires, d'organoïdes (organes en laboratoire) et de modèles informatiques pour les tests sur des systèmes plus simples.

**Évaluation de la toxicité chronique** : Malgré les progrès, l'évaluation des effets chroniques et systémiques sur la santé reste un défi pour les méthodes alternatives, ce qui souligne la persistance du besoin d'expérimentation animale dans certains domaines.

## 1.4 Principes des 3R

La règle des 3 R regroupe les trois concepts qui ont pour but la diminution du degré de contraintes auxquelles est confronté l'animal lors de l'expérimentation. Les concepts sont les suivants : Remplacer, Réduire et Raffiner.

**1.4.1. Remplacement** : ce concept consiste à la recherche d'alternative à l'utilisation de l'animal à fin de réduire sa souffrance au cours de l'expérimentation. Les chercheurs doivent se poser la question, est ce qu'on ne peut pas se passer de l'utilisation de l'animal et le remplacer par une autre étude ou technique ? Effectivement, certaines études ont épargné à l'animal sa souffrance, tel que la cellule sanguine qui a servi comme modèle de membrane biologique, les cultures cellulaires et les peaux artificielles qui ont servi comme champ d'application de certains produits cosmétiques et de tester leur irritabilité sans devoir recourir à l'utilisation de l'animal. Induction de l'ischémie cérébrale sur des cellules en culture afin d'épargner la douleur que provoque un AVC à un animal. Toutefois, le recours aux cellules isolées a ses limites d'utilisation car la réaction d'une cellule isolée à un traitement n'est pas identique à ce qu'elle est dans un organisme entier. Ce qui fait que nous ne pouvons pas nous en passer totalement de l'animal dans nos recherches. - si l'utilisation de l'animal est jugée indispensable, c'est le deuxième principe qui s'impose à savoir la réduction.

**1.4.2. Réduction** : c'est réduire aussi peu que possible le nombre d'animaux à utiliser sans que ce soit fait au détriment de la fiabilité du résultat et de sa pertinence statistique. Selon ce principe, le chercheur doit avoir recours à certaines méthodes et techniques qui lui permettent de faire le suivi d'un nombre réduit d'animaux au lieu de procéder à l'intervention chirurgicale ou encore le sacrifice de l'animal. Les méthodes les plus utilisées sont : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par ordinateur (scanner), le traçage par des éléments radioactifs. Ces méthodes permettent de réduire jusqu'à 80% le nombre d'animaux utilisés. La contrainte que peut rencontrer ce principe c'est l'absence de matériel et équipement spécifique adapté à l'animal.

**1.4.3. Raffinement** : ce principe consiste à réduire au maximum possible la contrainte infligée aux animaux. Réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété de l'animal avant, durant et après l'expérience. Le raffinement s'applique non seulement dans le cadre de réduire la contrainte de l'expérience pour l'animal pour aussi pour la fiabilité du résultat scientifique, car un organisme animal soumis à un stress d'un degré intense ou pendant une longue période ne fonctionne pas normalement et aura des réactions qui peuvent conduire à des résultats erronés. Les méthodes utilisées pour réduire ces contraintes sont les analgésiques et anesthésiques qui permettent le déroulement de l'expérience sous une moindre douleur ressentie et contrainte. Toutefois, en expérimentation animale, ce n'est pas uniquement la

manipulation qui pose des contraintes de stress à l'animal mais aussi les conditions de sa détention. En effet, dans le cas des rongeurs qui vivent en groupes sociaux la séparation leur cause un grand stress et anxiété, alors leur détention en groupe réduit ces situations ; ou encore les conditions d'élevage. Comme le rongeur est un animal qui est appelé à vivre sa vie dans une cage, il est recommandé de lui fournir un certain confort pour réduire son stress. En effet, des études réalisées sur des rongeurs élevés dans des cages nues ont montré que ces animaux présentent des troubles de comportement suite à une altération de leur développement cérébral. A cet effet, l'enrichissement de la cage par de la litière ainsi que certains dispositifs lui permettant de grimper semble être utile à fin de réduire son stress. Les comités d'éthique responsables de la protection des animaux ont pour objectif d'autoriser la réalisation des protocoles expérimentaux jugés utiles d'avoir recours aux animaux de laboratoire mais de veiller aussi à la diminution au maximum possible la contrainte animale en appliquant les principe de la règle des 3R.

### **1.5. Contrôle de la douleur et du stress animal**

La reconnaissance de la douleur dépend de l'existence de voies intactes entre les récepteurs de la douleur et le thalamus et le cortex cérébral, ainsi que d'un cortex cérébral et de structures sous-corticales fonctionnels. Ainsi, tout moyen qui rend le cortex cérébral non fonctionnel, comme l'hypoxie ou la dépression médicamenteuse, empêche la douleur. Dans ce cas, les stimuli qui provoquent des réflexes nerveux moteurs pouvant être douloureux pour l'animal conscient ne le sont pas pour l'animal inconscient. Des stimuli tout aussi douloureux administrés à des animaux chimiquement paralysés par le curare ou la succinylcholine ne provoqueront pas de réflexe moteur simplement à cause de la paralysie, mais causeront de la douleur à cause de l'état conscient. Il est donc possible que des animaux inconscients ne ressentent aucune douleur mais réagissent à certains stimuli, et que des animaux paralysés ressentent la douleur mais ne puissent pas réagir

La mise en œuvre de techniques d'anesthésie et de gestion de la douleur chez les animaux expérimentaux est essentielle pour respecter les principes éthiques des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) et minimiser la souffrance et le stress des animaux. Voici quelques pratiques élémentaires :

**1.5.1 Choix de l'anesthésique adapté :** La sélection de l'anesthésique doit tenir compte de l'espèce, de l'âge, du poids et de l'état de santé de l'animal, ainsi que de la nature et de la durée de la procédure expérimentale. Les agents anesthésiques couramment utilisés incluent les anesthésiques gazeux (ex. l'isoflurane ou le sévoflurane) et les anesthésiques injectables (ex. la kétamine associée à un sédatif tel que le midazolam). Une évaluation préalable des effets secondaires potentiels et une titration précise des doses sont nécessaires pour éviter une sous- ou sur-anesthésie.

**1.5.2. Surveillance continue pendant l'anesthésie :** La surveillance des paramètres physiologiques (fréquence cardiaque, saturation en oxygène, température corporelle, etc.) est cruciale pour détecter rapidement toute complication. L'utilisation d'équipements de monitoring (oxymètres de pouls, électrocardiographes) permet d'ajuster l'anesthésie en temps réel et d'assurer la sécurité de l'animal.

**1.5.3. Analgésie préventive et post-opératoire :** L'administration d'analgésiques (comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les opioïdes ou les anesthésiques locaux) avant une procédure invasive réduit la sensibilisation centrale à la douleur et minimise l'inconfort post-opératoire. Un plan de gestion de la douleur doit être établi pour chaque procédure, incluant des évaluations régulières de la douleur à l'aide d'échelles validées (comme l'échelle de grimace chez les rongeurs).

**1.5.4. Techniques alternatives et complémentaires :** L'utilisation de techniques non invasives ou peu invasives (imagerie médicale, prélèvements sanguins par micro-méthodes) réduit le besoin d'anesthésie générale. Des approches complémentaires, comme l'acupuncture ou la cryoanalgésie, peuvent être envisagées pour certaines espèces et procédures.

**1.5.5. Formation et compétences du personnel :** Le personnel impliqué dans les procédures expérimentales doit être formé aux techniques d'anesthésie, de gestion de la douleur et de reconnaissance des signes de stress ou de souffrance chez les animaux. Une collaboration étroite avec des vétérinaires spécialisés en médecine expérimentale est essentielle pour optimiser les protocoles et garantir le bien-être animal.

**1.5.6. Enrichissement de l'environnement et réduction du stress :** En plus de la gestion de la douleur, l'enrichissement de l'environnement (structures de jeu, cachettes, interactions

sociales) et la réduction des facteurs de stress (bruit, manipulations brutales) contribuent à améliorer le bien-être global des animaux.

En combinant ces techniques, les chercheurs peuvent non seulement respecter les normes éthiques, mais aussi améliorer la qualité des données scientifiques en réduisant les biais liés au stress ou à la douleur des animaux. Les méthodes et les résultats des rapports précliniques publiés dans la revue *Pain* au cours des années 1980, 1990, 2000, 2010 et 2016-2020 (506 articles) ont été codés pour une variété de termes, y compris « espèce animale », « sexe » et « souche de rongeur ». La revue *Pain* a été choisie comme revue représentative pour cette analyse ; cependant

il est reconnu que la restriction de l'analyse à une seule revue peut avoir des implications sur la généralisation des résultats à l'ensemble de la littérature sur la douleur. L'inclusion a également été limitée aux études utilisant des modèles de douleur inductibles et mesurant les comportements d'animaux non humains éveillés

## Chapitre 2 : Les différents modèles d'expérimentation animale

Dans un cadre de recherche biologique, les animaux sont utilisés pour étudier un large éventail de phénomènes biologiques, dont voici les principaux modèles :

### 2.1. Les modèles de rongeurs

Ils ont traditionnellement été utilisés pour évaluer la toxicité des produits chimiques alimentaires, mais cette approche est coûteuse, prend du temps et soulève également des problèmes éthiques. Les murins (Souris, rats, lapins) sont les animaux les plus utilisés en recherche biomédicale, notamment pour étudier la génétique, les maladies infectieuses, les troubles neurodégénératifs, etc (Figure 1).

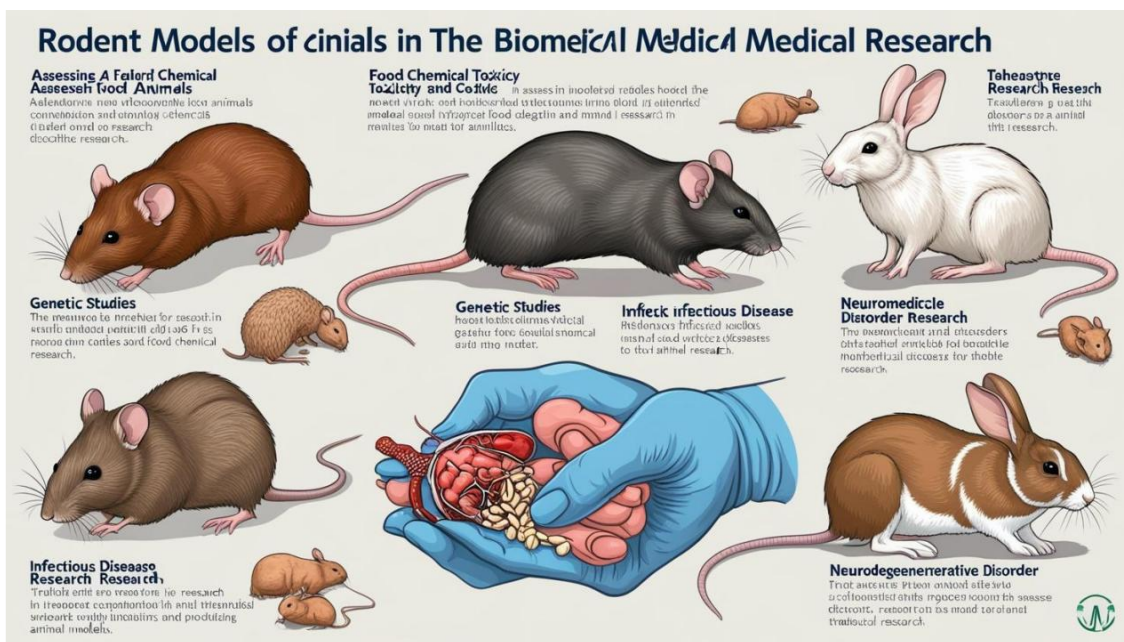
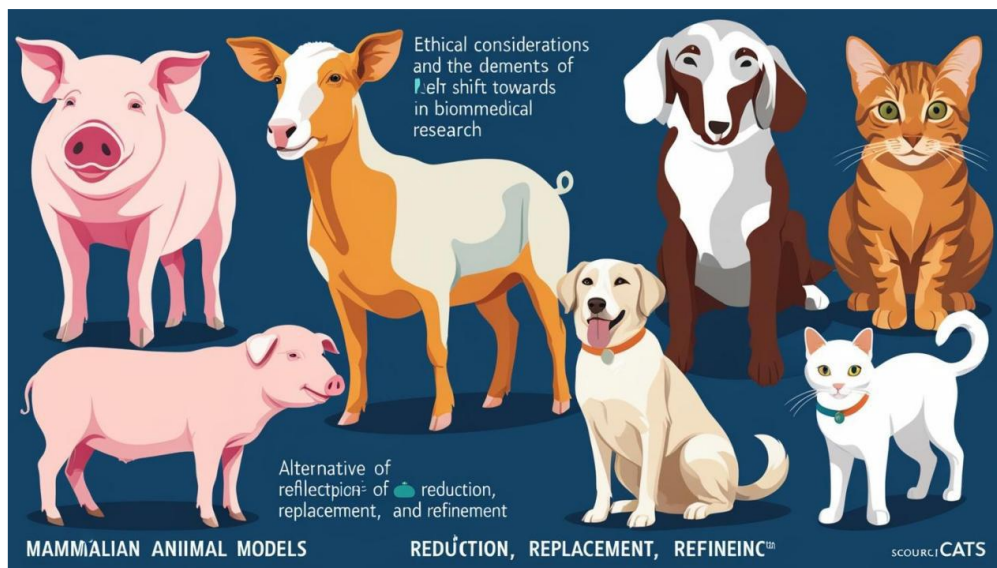


Figure 1 : Les rongeurs comme modèles incontournables en recherche biomédicale.

### 2.2 Modèles non rongeurs

**2.2.1. Modèles mammifères** : Les animaux tels que le porc, le mouton, le chien et le chat ont servi de base à la recherche biomédicale au cours des dernières décennies. Néanmoins, ces modèles sont coûteux, laborieux, pouvant donner des résultats qui ne sont pas toujours

transposables à la situation humaine. Plus récemment, ces modèles ont donné lieu à d'importants dilemmes sociaux et éthiques. Par conséquent, la perspective de changements dans le scénario scientifique global et le principe des trois R (réduction, remplacement et raffinement) ont contribué au développement des méthodes alternatives innovantes à l'utilisation de mammifères (**Figure 2**)



**Figure 2** : Modèles animaux et considérations éthiques en recherche biomédicale

**2.2.2. Modèles non-mammifères** : Les modèles non mammifères tels que *Danio rerio* (poisson-zèbre), *Artemia salina* (crevette saumâtre), *Gallus gallus domesticus* (poule), *Caenorhabditis elegans* (ver rond), *Drosophila melanogaster* (mouche des fruits), *Galleria mellonella* (grande fausse teigne), utilisés pour des études génétiques et comportementales, se sont révélés adaptés à l'étude de la toxicité des risques alimentaires (**Figure 3**). Leurs avantages sont notamment leur faible coût, leur cycle de vie court, leur adaptabilité au criblage à haut débit et leur adhésion aux principes des 3R (remplacement, réduction et raffinement).

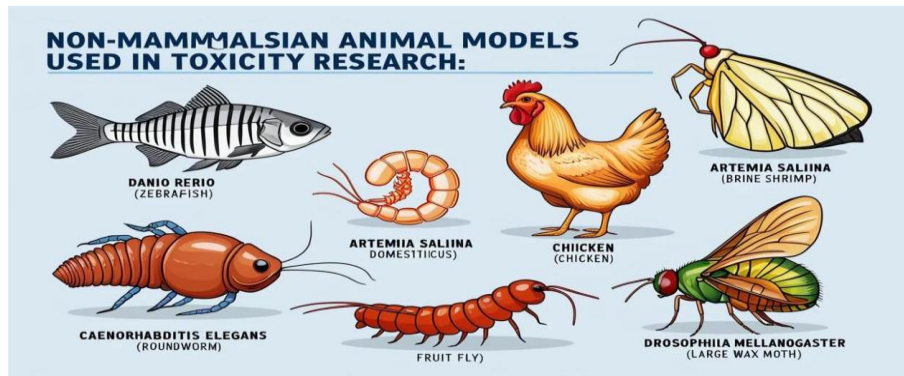


Figure 3 : Modèles non-mammifères

**2.2.3. Primates non humains (PNH):** L'utilisation de modèles animaux, en particulier les primates non humains (PNH), dans la recherche biomédicale est un sujet complexe et souvent controversé. Coûteux à élever et à maintenir en captivité, leur utilisation nécessite des infrastructures spécialisées et un personnel qualifié, ce qui limite leur accessibilité. Les macaques, les babouins et les chimpanzés, sont largement utilisés en raison de leur proximité génétique, physiologique et comportementale avec les humains. Les PNH partagent environ 90 à 98 % de leur ADN avec les humains, selon les espèces. Cette similarité en fait des modèles précieux pour étudier des maladies humaines, développer des thérapies et comprendre les mécanismes biologiques fondamentaux. Les caractéristiques des PNH font d'eux des modèles indispensables pour certaines recherches, notamment en :

**2.2.3. 1. Neurosciences :** Les maladies neurodégénératives (ex. La maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson), les troubles psychiatriques (ex. dépression et la schizophrénie), ou encore la psychologie comparée,

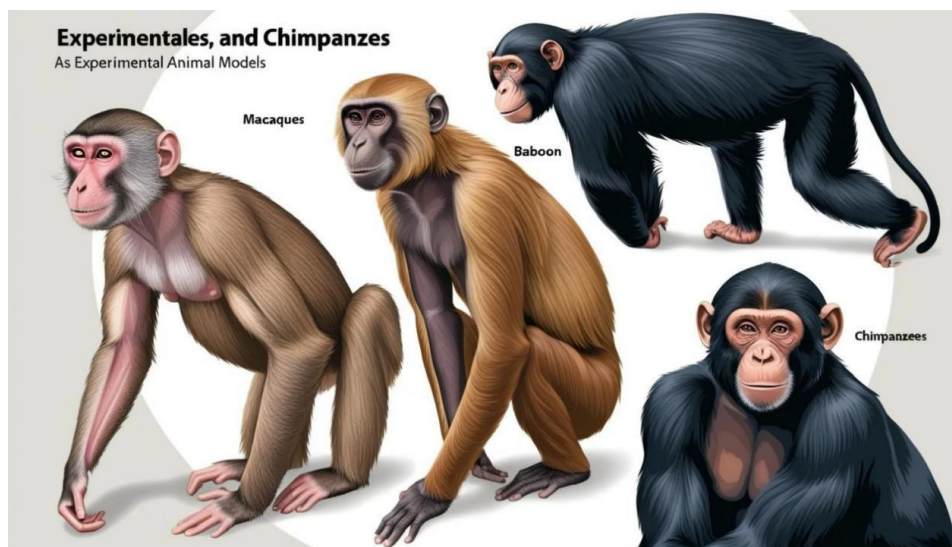
**2.2.3.2. Maladies infectieuses :** Le VIH (SIDA), la tuberculose, le paludisme et plus récemment, le COVID-19.

**2.2.3.3. Développement de médicaments :** Avant les essais cliniques humains, les médicaments sont souvent testés sur des PNH pour évaluer leur efficacité et leur toxicité. (ex. traitements contre le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies auto-immunes).

**2.2.3. 4. Thérapies géniques et cellulaires :** Les PNH sont indispensables pour développer et tester des thérapies innovantes, telles que les thérapies géniques pour les maladies rares ou les greffes de cellules souches.

## 2.3 Modèles transgéniques et knock-out

Groupe particulier de modèles expérimentaux dont on a manipulé le code génétique pour provoquer une maladie. Dans le génome des animaux génétiquement modifiés, on a inséré un ADN étranger, ou bien certains gènes ont été remplacés ou neutralisés, Ces modèles permettent l'étude du fondement génétique de certaines maladies, la susceptibilité ou la résistance à celles-ci



**Figure 4** : Primates non humains utilisés comme modèles animaux expérimentaux.

## 2.4 Choix du modèle en fonction de l'objectif de recherche

Le choix d'un modèle animal dépend de l'objectif de la recherche, de la question scientifique posée, et doit être fait en tenant compte de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Il faut choisir l'espèce la plus appropriée par ses similarités physiologiques et pathologiques avec l'homme, sa taille, son cycle de vie, la disponibilité d'outils génétiques, et la capacité à fournir le type de données nécessaires. Le modèle doit aussi être justifié éthiquement, et d'autres options comme les cultures cellulaires ou les modèles informatiques doivent être envisagées en priorité. Les critères de sélection des animaux pour l'expérimentation animale peuvent varier en fonction de l'étude en question, mais voici quelques critères couramment utilisés :

**2.4 .1Question scientifique** : Le modèle doit être capable de reproduire le phénomène ou la maladie étudié chez l'homme.

**2.4.2. Similarités biologiques :** Il faut rechercher des similarités physiologiques, pharmacologiques (pharmacocinétique, pharmacodynamie) et pathologiques avec l'homme

**2.4 .3. Cycle de vie et reproduction :** Le cycle de vie et la durée de gestation doivent être compatibles avec le temps nécessaire à l'étude.

**2.4 .4. Facilité d'élevage et taille :** L'espèce doit pouvoir être élevée dans un environnement standardisé, et sa taille doit être compatible avec les installations de laboratoire disponibles

**2.4.5. Outils disponibles :** La disponibilité d'outils biotechnologiques, génétiques et d'outils expérimentaux est cruciale.

## **2.5. Limitations des modèles animaux et transposition à l'homme**

Les modèles animaux présentent des limitations majeures pour l'étude des maladies humaines, principalement dues à des différences physiologiques, métaboliques et génétiques fondamentales entre espèces qui rendent la transposition des résultats à l'homme difficile et peu fiable. Cette transposition échoue fréquemment, entraînant un gaspillage de ressources et un retard dans le développement de traitements efficaces, car les molécules et thérapies efficaces chez l'animal échouent souvent lors des essais cliniques sur l'homme.

**2.5.1. Différences physiologiques et métaboliques :** L'anatomie, le métabolisme et la physiologie varient considérablement entre les espèces, ce qui affecte la façon dont les maladies se manifestent et les traitements sont traités.

**2.5.2. Différences génétiques :** Les variations génétiques sous-jacentes, notamment dans les gènes régulateurs, entraînent des différences fondamentales entre les espèces, rendant l'animal non pertinent pour certaines études humaines.

**2.5.3 .Échec fréquent de la transposition :** Les traitements prometteurs chez l'animal échouent très souvent chez l'homme, un problème qui persiste depuis des décennies, comme le montrent les taux élevés d'échec des médicaments en essais cliniques.

**2.5.4. Gaspillage de ressources :** Les expérimentations infructueuses gaspillent des ressources financières, du temps et des efforts qui auraient pu être investis dans des méthodes plus pertinentes pour l'homme.

**2.5.5. Prédiction de l'efficacité et de la sécurité :** Les modèles animaux sont de mauvais prédicteurs de l'efficacité et de la sécurité des médicaments chez l'homme, car ils ne reflètent pas adéquatement la complexité du système biologique humain.

**2.5.6. Développement de thérapies :** L'échec répété des traitements issus de modèles animaux retarde le développement de thérapies efficaces pour des maladies comme l'Alzheimer ou le cancer.

**2.5.7. Recherche de nouveaux traitements :** Les limites de la transposition incitent à rechercher de nouvelles méthodes d'étude qui pourraient être plus représentatives de la physiologie humaine.

## **2.6 Exemple d'applications : oncologie, neurologie, infectiologie**

Les modèles animaux sont cruciaux en recherche médicale, par exemple, en oncologie pour étudier le développement du cancer et tester des thérapies, en neurologie pour comprendre des maladies comme les accidents vasculaires cérébraux à l'aide de modèles basés sur des rongeurs ou des gerbilles, et en infectiologie pour développer des vaccins et des antibiotiques grâce à des modèles de maladies infectieuses, comme le VIH sur des modèles humanisés de souris. Les souris et les rats sont les modèles les plus courants, mais d'autres animaux sont aussi utilisés pour des applications spécifiques.

### **2.6.1. Oncologie**

✓ **Compréhension du cancer :** Les modèles animaux, comme la souris, permettent d'étudier les bases génétiques du cancer, le rôle de mutations spécifiques et l'évolution de la maladie.

✓ **Test de traitements :** Ils servent à évaluer l'efficacité et la sécurité de nouveaux médicaments anticancéreux avant les essais sur l'homme.

✓ **Étude des métastases :** Des cellules de cancer peuvent être injectées chez des souris pour induire des métastases et étudier l'efficacité de thérapies à base de nanoparticules par exemple.

### **2.6.2. Neurologie**

**Accidents vasculaires cérébraux (AVC) :** L'anatomie cérébrale de certaines espèces, comme les gerbilles, aide à comprendre les mécanismes des AVC.

**Troubles neurodégénératifs :** Des modèles animaux sont utilisés pour étudier des maladies comme l'Alzheimer ou les troubles du spectre autistique et leurs origines neurologiques.

**Développement de thérapies :** La recherche sur ces modèles vise à développer de nouvelles thérapies et interventions pour ces maladies.

Infectiologie

**Découverte d'antibiotiques et vaccins** : L'expérimentation animale a permis la découverte de médicaments essentiels, comme des antibiotiques, et le développement de vaccins.

### **2.6 .3.Modèles de maladies infectieuses**

**VIH** : Des modèles de souris humanisées (modèle RAG-hu) sont utilisés pour étudier les infections par le VIH.

**Parvovirus de la souris (MPV)** : Ce modèle est utilisé pour étudier l'effet des parvovirus sur le système immunitaire et la recherche sur le cancer.

**Toxoplasmose** : Des souris sont utilisées pour diagnostiquer et étudier la toxoplasmose congénitale à partir d'échantillons humains.

**Diagnostic** : Des animaux peuvent être utilisés pour développer de nouveaux tests diagnostiques, par exemple, grâce à l'odorat des chiens pour le diagnostic précoce de maladies comme la tuberculose.

## Chapitre 3 : Éthique et législation

L'éthique concerne les principes moraux du bien et du mal, tandis que la législation est l'ensemble des règles imposées et sanctionnées par l'État. Si les lois peuvent s'inspirer de l'éthique pour encadrer les pratiques, l'éthique va au-delà du strict cadre légal, visant un idéal de conduite qui n'est pas toujours couvert par la loi. Les deux concepts, bien que distincts, sont souvent liés, car les valeurs éthiques peuvent guider l'élaboration des normes juridiques pour protéger les individus et la société.

### 3.1. Histoire de l'éthique animale en expérimentation

L'histoire de l'éthique animale dans l'expérimentation est passée de l'ignorance des souffrances animales à une réglementation stricte, marquée par des étapes clés comme le premier acte de protection des animaux au Royaume-Uni en 1876, la formulation des 3R par Russell et Burch en 1959 pour réduire, raffiner et remplacer les tests, et les directives européennes des années 1980 et 2010 encadrant l'usage des animaux et promouvant les alternatives. Ces évolutions ont été influencées par des débats philosophiques, le développement des méthodes alternatives, et l'action d'organisations de protection animale, menant à une sensibilisation croissante et à une responsabilité morale accrue des chercheurs.

#### 3.1.1 Les débuts et la prise de conscience (Antiquité – XIXe siècle)

**Antiquité** : Les premières dissections animales remontent à l'Antiquité (vers le IV<sup>e</sup> siècle) avec des figures comme Alcméon de Croton, Hérophile et Aristote, sans conscience éthique particulière.

**XVII<sup>e</sup> et XVIII<sup>e</sup> siècles** : Des philosophes comme Jeremy Bentham commencent à questionner la souffrance animale, mais la pratique reste tolérée si elle sert le progrès médical.

**XIX<sup>e</sup> siècle** : Le physiologiste Marshall Hall propose des recommandations pour améliorer le bien-être animal en 1835. Une première loi de protection des animaux domestiques est votée au Royaume-Uni en 1876, marquant un tournant réglementaire.

### 3.1.2. formalisation des principes éthiques (XXe siècle)

**1959** : Les scientifiques W.M.S. Russell et R.L. Burch introduisent la règle des « 3R » : Réduire le nombre d'animaux, Raffiner les méthodes pour minimiser la souffrance, et Remplacer l'utilisation d'animaux par des méthodes alternatives comme les cultures cellulaires ou les simulations informatiques.

**1978** : Le terme « méthodes alternatives » est introduit par David Smyth, désignant les techniques ne faisant pas appel aux animaux vivants.

**1975** : La publication de « La Libération animale » par Peter Singer popularise les arguments utilitaristes sur les droits des animaux, influençant le débat éthique.

**1980s-1990s** : L'Europe met en place des réglementations pour harmoniser les législations nationales, notamment avec la Directive 86/609/EEC, et la France crée ses premiers comités d'éthique.

### 3.1.3. L'encadrement moderne et les évolutions récentes

**2010** : Une nouvelle directive européenne (2010/63/UE) renforce la protection des animaux et promeut les méthodes alternatives.

**Cadre réglementaire actuel** : L'expérimentation est aujourd'hui encadrée par des lois nationales et européennes, qui s'appuient sur des principes comme les 3R et requièrent l'avis des comités d'éthique avant toute expérimentation.

**Responsabilité morale** : La recherche animale implique désormais une responsabilité morale de chaque personne impliquée, reconnaissant les animaux comme des êtres sensibles et doués de conscience.

### 3.2. Comité d'éthique et autorisation de protocoles

Un comité d'éthique est une instance pluridisciplinaire qui évalue et approuve les protocoles de recherche, notamment ceux impliquant des sujets humains ou des animaux, afin de protéger leur bien-être, leur sécurité et leurs droits, tout en faisant avancer la recherche. L'autorisation d'un tel comité est un avis écrit et formel, souvent conditionnant le début et le financement de la recherche, et peut être requise par les chercheurs, les institutions, les instances de financement et les organismes de réglementation.

### 3.2.1. rôle du comité d'éthique

**Évaluation éthique** : Le comité examine de manière collégiale et pluridisciplinaire les aspects éthiques des protocoles de recherche.

**Protection des participants** : Il veille au respect de la dignité, de l'intégrité et des droits des volontaires humains, en évaluant les modalités d'information, de consentement, de recueil et de conservation des données.

**Surveillance de la recherche** : Il assure un suivi des recherches en cours pour garantir la protection continue des participants.

**Défense de l'institution** : La présence et l'avis du comité permettent de protéger l'institution contre les litiges potentiels liés aux recherches.

**Conseil** : Le comité peut être sollicité pour un avis sur la conception de nouveaux protocoles ou des problématiques spécifiques.

### 3.2.2. Processus de demande d'autorisation

**Préparation du dossier** : Le chercheur doit soumettre un dossier comprenant, entre autres, le protocole de recherche, la lettre d'information et le formulaire de consentement pour les participants humains.

**Soumission en ligne** : Le dossier est déposé sur une plateforme dédiée du comité d'éthique.

**Évaluation du comité** : Les dossiers sont évalués lors de réunions pluridisciplinaires.

**Communication de l'avis** : Le comité émet un avis écrit, favorable ou défavorable, communiqué aux demandeurs et aux autorités compétentes.

**Archivage** : Les dossiers et les décisions sont archivés par le comité.

### 3.2.3 .Différents types de comités

**Comités d'éthique de la recherche (CER)** : Évaluent les protocoles impliquant des personnes humaines.

**Comités d'éthique en expérimentation animale (CEEA)** : Les Comités d'Éthique en Expérimentation Animale (CEEA) sont des organismes chargés d'évaluer les protocoles de recherche impliquant des animaux, le ministère de la recherche doit donner son autorisation après avis favorable du CEEA. Leurs missions incluent la réflexion sur la faisabilité scientifique,

éthique et sociétale de l'expérimentation, la recherche de méthodes alternatives et l'application des principes des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pour minimiser la souffrance animale .

**Comités d'éthique cliniques** : Conseillent sur des problématiques éthiques liées aux soins et traitements aux usagers.

**Comités de protection des personnes (CPP)** : En France, ces comités sont la référence pour les recherches impliquant des personnes humaines et sont liés aux comités d'éthique universitaires.

### **3.3. Formation et certification du personnel (ex. : FELASA en Europe)**

L'expérimentation animale est un cadre éthique et législatif strict qui impose une formation et une certification obligatoires pour tout personnel manipulant des animaux, en accord avec le principe des "3R" (Réduire, Raffiner, Remplacer) et sous la supervision de comités d'éthique. La formation couvre les aspects éthiques, législatifs, physiologiques et de bien-être animal, et les établissements doivent être agréés et respecter des conditions d'hébergement strictes.

En Europe, la FELASA (Fédération Européenne des Associations en Sciences des Animaux de Laboratoire) est un organisme qui accrédite des formations en expérimentation animale, lesquelles sont exigées par la législation européenne et nationale pour garantir la compétence du personnel et le bien-être animal. La formation est obligatoire pour les personnels manipulant des animaux et se concentre sur les principes éthiques (les 3Rs : Remplacer, Réduire, Raffiner), la réglementation, et la connaissance des espèces pour assurer des pratiques responsables.

#### **3.3.1. Cadre Éthique et Législatif**

**Devoir moral** : L'expérimentation animale repose sur le devoir de respect envers les animaux, considérés comme des êtres sensibles souffrant de douleur.

**Principes des 3R** : Les chercheurs doivent suivre les principes de Réduction, Raffinement et Remplacement des expérimentations sur animaux.

**Comités d'Éthique** : Des comités d'éthique en expérimentation animale (CEEA) évaluent les projets et veillent au respect des règles.

**Agréments** : Les établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux doivent obtenir un agrément des autorités compétentes, après inspection et avis d'une commission d'éthique.

Formation et Certification du Personnel

**Obligation réglementaire** : La formation est une exigence européenne et française pour toute personne utilisant des animaux vivants à des fins scientifiques.

**Contenu de la formation** : La formation inclut des connaissances de base (législation, éthique) et des modules spécifiques au groupe d'espèces concerné (anatomie, physiologie, comportement).

**Niveaux de certification** : Des certifications peuvent être obtenues, par exemple au niveau de "Concepteur de projet" ou d'"Applicateur de procédures expérimentales".

### 3.3.2.Législation

La première loi en matière de protection animale a vu le jour en France le 25 juillet 1791, l'animal est protégé mais en tant que propriété. Elle sera suivie par la loi Grammont, votée en 1850 qui promulgue la protection animale contre les mauvais traitements en public, mais elle relève plus du domaine contraventionnel que de la véritable protection animale et concerne surtout la maltraitance des chevaux par leur cocher. Ce n'est qu'en 1976 qu'apparaît une loi octroyant à l'animal un statut « d'être sensible » et non plus « d'objet » (loi n°76-629, du 10 juillet 1976, JO 13/07/76,4203-6).

La première loi intéressant spécifiquement l'animal de laboratoire apparaît quant à elle en 1985. Il s'agit de la « convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou d'autres fins scientifiques » (conseil de l'Europe, 20 septembre 1985). Elle sera suivie d'une directive donnant la ligne de conduite à suivre pour traduire cette loi en droit national (CEE 86-609, annexes I et II). Cela a abouti, en France, au décret 87-848 du 19 octobre 1987 et à ses arrêtés d'application qui règlementent :

- la fourniture des animaux aux laboratoires agréés.
- les conditions d'attribution des autorisations d'expérimentation sur des animaux.
- les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale (EEA).

Ce texte sera complété par le décret 2001-464 du 29 mai 2001(5), précisant les champs d'action de l'expérimentation animale, et qui responsabilise le chercheur : autorisation de protocole, formation spécifique, recours à l'anesthésie pour les interventions douloureuses...

La réglementation actuellement en vigueur en France (art R 214-87 à R 214-137 du code rural) a été mise à jour par le décret 2013-118 et cinq arrêtés, en date du 1er février 2013 et publiés le 7 février 2013, en application de la directive européenne 2010/63/UE et est sous la responsabilité du ministère de l'agriculture. Elle établit les règles suivantes :

-La réglementation protège les animaux vertébrés, leurs formes larvaires ou fœtales évoluées et les céphalopodes. Sont donc concernés les mammifères, poissons, oiseaux mais pas les insectes. L'usage des primates non humains est restreint et celui des grands singes est interdit.

- Les animaux doivent provenir d'élevages ou de fournisseurs agréés. Les animaux d'espèces domestiques errants ne peuvent pas être utilisés sauf exigence sanitaire particulière et sur dérogation.

- Une expérience sur animaux n'est licite que si elle est nécessaire et irremplaçable et que si elle relève de la recherche en santé humaine ou animale, de la protection de l'environnement ou de l'enseignement supérieur ou professionnel ou d'enquêtes médico-légales. Les principes de remplacement (par une méthode ne nécessitant pas 11 d'animaux), de réduction (par la diminution du nombre d'animaux au strict minimum) et de raffinement (par le choix des méthodes les plus douces) doivent être respectés.

-Les expériences douloureuses doivent être pratiquées sous anesthésie sauf dérogation documentée. La mort comme donnée d'observation de l'expérience, doit être évitée autant que possible.

- Tout établissement éleveur, fournisseur ou utilisateur doit être agréé (conformité des installations et de la formation du personnel). L'agrément est accordé pour 6 ans. Un vétérinaire et une structure du bien-être des animaux (SBEA) doivent être désignés. Des inspections régulières sont réalisées. Une commission nationale de l'expérimentation animale composée de 20 membres (ministères, recherche publique et privée, associations de protection animale, professionnels de la recherche) donne des avis et fait des propositions.

-Un comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale établit le bilan annuel national d'activité des comités d'éthique et formule des recommandations. Il est composé de 14 membres (ministères, professionnels, médecin, vétérinaire, philosophe, juriste, sociologue, associations de protection animale).

- Cette directive européenne est complétée par la « charte portant sur l'éthique de l'expérimentation animale », qui prône le respect de l'animal et le recours aux méthodes ou

techniques qui visent à réduire au maximum les atteintes aux animaux et donc l'application de la règle des 3R, et la mise en place des comités d'éthique. Elle propose surtout aux chercheurs d'adopter une démarche éthique dans leurs pratiques.

### **3.4. Règles d'hébergement, d'alimentation, d'enrichissement**

Les règles d'hébergement, d'alimentation et d'enrichissement des animaux expérimentaux sont encadrées par la loi et les principes éthiques des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), visant à garantir le respect des animaux et la validité des expériences. L'hébergement doit être adapté à chaque espèce, offrant de l'espace, des lieux de repos, de cachette et la possibilité d'interactions sociales pour les espèces sociales. L'alimentation doit être équilibrée et adaptée aux besoins physiologiques de l'animal. L'enrichissement environnemental est une exigence pour répondre aux besoins comportementaux et physiologiques, avec des objets, structures et activités qui stimulent l'animal.

#### **3.4.1. Règles d'Hébergement**

**Adaptation à l'espèce:** L'espace, le type de litière et les matériaux utilisés doivent être adaptés aux espèces.

**Espace:** Les animaux ont besoin d'espace pour se déplacer, se cacher, se reposer et faire de l'exercice.

**Cachètes:** Des endroits pour se cacher sont nécessaires pour les animaux, qu'ils vivent en groupe ou seuls, pour se sentir en sécurité.

**Environnement social:** Les animaux d'espèces sociales doivent être hébergés en groupe, comme les lapins, pour satisfaire leurs besoins sociaux.

**Confort et hygiène:** La propreté des lieux d'hébergement est essentielle, avec des dispositifs de nettoyage efficaces.

#### **3.5.2. Règles d'Alimentation**

**Équilibre nutritionnel:** L'alimentation doit être formulée pour être complète et équilibrée, et adaptée aux besoins spécifiques de l'animal.

**Adaptation à l'espèce:** Le régime alimentaire doit correspondre au régime naturel de l'espèce (herbivore, carnivore, omnivore).

**Rationnement adapté:** L'utilisation de régimes rationnés peut améliorer le bien-être et les performances, à condition d'être correctement formulée.

Enrichissement du Milieu

**Enrichissement comportemental :** L'enrichissement vise à stimuler les animaux, leur permettre d'exprimer leurs comportements naturels et réduire le stress.

**Objets et structures :** Des objets variés comme des balles, des plateformes ou des structures pour grimper peuvent être introduits dans la cage pour stimuler l'activité physique et mentale.

**Stimulation sensorielle :** L'enrichissement peut inclure des éléments qui stimulent les sens des animaux, comme des odeurs spécifiques ou des sons doux.

### **3.5. Dilemmes éthiques et alternatives aux modèles animaux**

Les dilemmes éthiques autour des modèles animaux soulèvent des questions sur la souffrance animale, leur consentement et leur pertinence scientifique, motivant le développement d'alternatives comme les cultures cellulaires (in vitro), les organoïdes (mini-organes), et les simulations informatiques (in silico). Ces méthodes, promues par la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), visent à minimiser l'utilisation des animaux, à améliorer leurs conditions, et à trouver des substituts fiables pour la recherche biomédicale.

#### **3.5.1. Dilemmes éthiques des modèles animaux**

**Souffrance animale:** L'expérimentation animale peut infliger douleur, souffrance et stress aux animaux, qui sont des êtres sensibles.

**Manque de consentement:** Les animaux ne peuvent pas donner leur consentement éclairé à être utilisés pour des expériences.

**Pertinence scientifique limitée:** Les modèles animaux ne sont pas toujours fiables pour prédire les effets sur l'homme, car il existe des différences physiologiques significatives entre les espèces. Par exemple, des substances toxiques pour un animal ne le seront pas forcément pour l'homme, et vice-versa.

### 3.5.2. Alternatives aux modèles animaux ( chapitre 5 livre d'expérimentation animale

Les alternatives modernes permettent de remplacer, réduire, ou affiner (la règle des 3R) les expérimentations animales :

**Approches *in vitro***: Ces méthodes utilisent des systèmes biologiques en dehors d'un organisme vivant.

**Cultures cellulaires et de tissus** : Permettent d'étudier les effets de substances sur des cellules humaines.

**Organoïdes** : De petits organes artificiels en 3D, cultivés à partir de cellules souches, qui imitent la structure et la fonction d'organes réels.

**Approches *in silico***: Elles font appel à des modèles informatiques et mathématiques.

**Simulations numériques** : Permettent de modéliser les processus biologiques et les interactions chimiques sans recourir à des animaux.

**Modèles animaux ciblés**: Des animaux génétiquement modifiés peuvent être plus pertinents pour des études spécifiques, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés et augmentant la fiabilité des résultats.

## Chapitre 4 : Technique de culture cellulaire (généralités)

La culture cellulaire est le processus par lequel les cellules procaryotes, eucaryotes ou végétales sont cultivées dans des conditions contrôlées. Mais en pratique, il se réfère à la culture de cellules dérivées de cellules animales.

La culture cellulaire est une technique de laboratoire permettant de faire vivre *in vitro* des cellules, de diverses natures et d'origines, d'en modifier les propriétés ou d'augmenter leur nombre, afin d'en disposer en grande quantité pour ce qu'on veut en faire. La culture cellulaire n'est pas une fin en soi, mais un outil indispensable à la biologie cellulaire eucaryote. Il s'agit d'obtenir un type de cellule vivante, de trouver un moyen de le faire survivre dans les conditions artificielles du laboratoire, au mieux de la faire proliférer, tout en maintenant des conditions de stress acceptables. Les conditions et les propriétés du milieu de culture sont pour cela capitales. La culture cellulaire a été entreprise avec succès par Ross Harrison en 1907. Roux en 1885, pour la première fois maintenu des cellules embryonnaires de poulet dans une culture cellulaire.

### 4.1. Événements historiques dans le développement de la culture cellulaire

**1878 : Claude Bernard** proposa que les systèmes physiologiques d'un organisme puissent être maintenus dans un système vivant après la mort d'un organisme.

**1885 : Roux** montrait que les cellules embryonnaires de poulet pouvaient être maintenues en vie dans une solution saline hors du corps de l'animal.

**1903 : Jolly** observa la division cellulaire des leucocytes de salamandres *in vitro*.

**1907 : Harrison** cultiva des cellules nerveuses de grenouille dans un caillot lymphatique (caillot ou coagulum ou thrombus : Masse molle, semi-solide, formée par la coagulation d'un liquide, tel que le sang, la lymphe, le lait, etc. Ce terme s'applique plus particulièrement au sang. et observa la croissance des fibres nerveuses *in vitro* pendant plusieurs semaines. Il fut considéré par certains comme le père de la culture cellulaire.

**1910 : Burrows** réussit à cultiver à long terme des cellules embryonnaires de poulet dans des caillots de plasma. Il fit une observation détaillée de la mitose.

**1911 : Lewis et Lewis** mettent au point les premiers milieux liquides composés d'eau de mer, de sérum, d'extrait d'embryon, de sels et de peptones. Ils observèrent une croissance monocouche limitée.

**1913 : Carrel** introduit des techniques aseptiques strictes pour que les cellules puissent être cultivées pendant de longues périodes.

**1916 : Rous et Jones** introduisent l'enzyme protéolytique *trypsine* pour la sous-culture des cellules adhérentes.

**1923 : Carrel et Baker** développent «*Carrel*» ou «*T-flask*» en tant que premier récipient de culture cellulaire spécifiquement conçu. Ils utilisèrent l'évaluation microscopique des cellules en culture.

**1927 : Carrel et Rivera** produisent le premier vaccin viral - *la vaccine*.

**Années 1940:** L'utilisation des antibiotiques *pénicilline* et *streptomycine* dans le milieu de culture diminue le problème de la contamination en culture cellulaire.

**1948 : Earle** isole des *fibroblastes L* de souris qui forment des clones à partir de cellules individuelles.

**Fischer** développa un milieu chimiquement défini, CMRL 1066.

**1952 : Gey** établit une lignée cellulaire continue à partir d'un carcinome cervical humain connu sous le nom de *cellules HeLa (Helen Lane)*. **Dulbecco** mit au point un essai sur plaque pour les virus animaux en utilisant des monocouches confluentes de cellules cultivées.

**1955 : Eagle** étudia les besoins nutritionnels de cellules sélectionnées en culture et a établi le premier milieu chimiquement défini largement utilisé.

**1961: Hayflick et Moorhead** isolent des fibroblastes humains (WI-38) et montrent qu'ils ont une durée de vie limitée en culture.

**1965 : Ham** introduit le premier milieu sans sérum capable de supporter la croissance de certaines cellules.

**1965 : Harris et Watkins** furent capables de fusionner des cellules humaines et de souris en utilisant un virus.

**1978 : Sato** établit la base pour le développement de milieux sans sérum à partir de cocktails d'hormones et de facteurs de croissance.

#### 4.1.1 Développements majeurs dans la technologie de culture cellulaire

- Le premier développement a été l'utilisation d'antibiotiques qui inhibe la croissance des contaminants.
- Deuxièmement, l'utilisation de la trypsine pour éliminer les cellules adhérentes à la sousculture plus loin du récipient de culture.
- Le troisième était l'utilisation d'un milieu de culture chimiquement défini.

#### 4.1.2. Avantages de la culture cellulaire

- Étude du comportement cellulaire sans les variations qui surviennent chez l'animal.
- Le contrôle de l'environnement de croissance conduit à l'uniformité de l'échantillon.
- Les caractéristiques des cellules peuvent être maintenues sur plusieurs générations, conduisant à une bonne reproductibilité entre les expériences.
- Les cultures peuvent être exposées à des réactifs, par ex. produits chimiques radioactifs ou médicaments à des concentrations définies.
- Enfin, il évite les problèmes juridiques, moraux et éthiques de l'expérimentation animale.

#### 4.1.3. Inconvénients de la culture cellulaire

- Devoir développer des techniques standardisées afin de maintenir des cellules reproductibles saines pour les expériences.
- Prend le temps d'apprendre la technique aseptique.
- La quantité de matériel est limitée.
- La différenciation et la sélection peuvent se produire et de nombreux mécanismes cellulaires d'origine peuvent être perdus.

#### 4.2. Matériel de base et environnement stérile

La culture cellulaire se base sur l'utilisation d'outils, que sont :

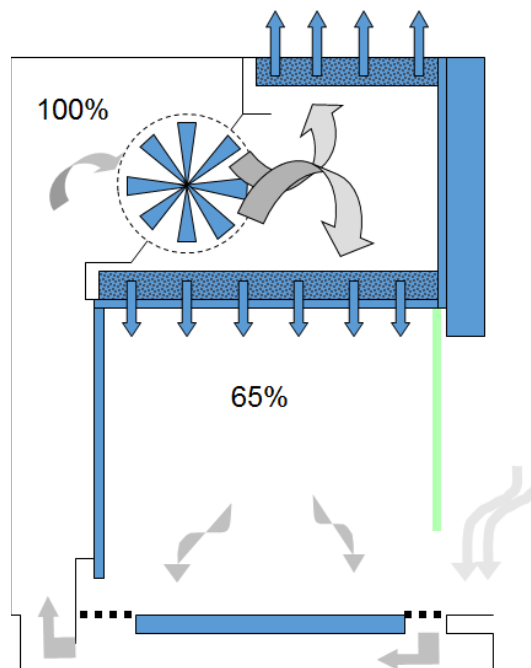
- un endroit *stérile* et le restant, pour manipuler les cellules sans les *contaminer* (*poste de sécurité microbiologique ou Hotte stérile*).
- un endroit remplissant les conditions nécessaires à la vie des cellules : un *incubateur*.
- du *milieu de culture*, qui varient selon le type de cellule et ce que l'on veut en faire. D'autres matériels sont également utiles :
- un réfrigérateur (+4 °C) pour stocker les milieux de culture.
- un *milieu de congélation*

- un congélateur (-80 °C, ou un congélateur à azote liquide) pour stocker les cellules congelées.
- Une centrifugeuse réfrigérée
- Un microscope.

#### 4.2.1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) (Hotte à flux laminaire)

Une enceinte destinée à assurer la protection de l'utilisateur et de l'environnement contre les dangers liés aux aérosols

- une paillasse inox (parfois perforée)
- des grilles d'aspiration
- un écran transparent
- un ventilateur créant une aspiration d'air par les grilles d'aspiration
- une zone de filtration d'air par deux filtres HEPA retenant toute particule de diamètre  $>0,3 \mu\text{m}$  redistribuant l'air filtré dans l'enceinte de travail 65 % d'air stérile dans l'atmosphère les 35% restants



**Figure 5 :** Poste de sécurité microbiologique.

### ***Entretien***

- ✓ Le plan de travail doit être propre et rangé de manière à ne pas perturber le flux d'air.
- ✓ Il faut nettoyer le plan de travail avec de l'éthanol à 70% avant et après chaque manipulation. Ne jamais utiliser d'eau de javel.
- ✓ Tout matériel disposé sous la hotte doit être propre.
- ✓ Il faut enlever les plateaux de la hotte 1X/ semaine et bien nettoyer le fond de la hotte (détergent 7X, eau, puis éthanol à 70%).
- ✓ En fin de journée, on peut installer les UV ou laisser fonctionner la hotte en ½ vitesse (suivant la position des UV, ils n'atteignent pas toujours toutes les parties de la hotte d'où l'intérêt du fonctionnement en ½ vitesse).
- ✓ Les filtres des hottes sont vérifiés 1X/ an.

### **4.2.2. Incubateurs**

Les incubateurs fonctionnent à 37°C et à 5% de dioxyde de carbone pour maintenir le pH du milieu à un pH correct. Ils ont tous des compteurs pour enregistrer la température et le niveau de gaz. Il y a des alarmes pour indiquer quand elles s'écartent des paramètres réglés.

### ***Entretien***

- ✓ Le nettoyage de l'incubateur doit être fait impérativement 1X/mois.
- ✓ Il existe un réel risque de contamination bactérienne ou de champignon dû au taux d'humidité dans l'incubateur (présence du bac d'humidification).
- ✓ Si vous constatez une contamination dans vos cultures, il faut impérativement nettoyer l'incubateur même si l'incubateur a été nettoyé récemment.
- ✓ N'utilisez pas de substances fortement alcalines ou caustiques.
- ✓ N'utilisez pas d'hypochlorite de sodium (eau de Javel). L'appareil pourrait se dégrader et rouiller.
- ✓ On peut utiliser un détergent neutre de type 7X. Le rinçage se fait ensuite à l'eau déminéralisée. La surface nettoyée est désinfectée avec de l'éthanol à 70%.
- ✓ Avant de démarrer le nettoyage, mettre la consigne de CO<sub>2</sub> à 0% et clamber l'arrivée de CO<sub>2</sub> à l'arrière de l'appareil.
- ✓ Ne jamais arrêter l'appareil en intervenant sur l'interrupteur principal.

- ✓ Videz le bac d'humidification. Brossez-le et rincez.
- ✓ Enlevez les plateaux. Nettoyez-les avec du détergent 7X, rincez avec de l'eau déminéralisée et désinfectez avec de l'alcool à 70%. Laissez sécher et enveloppez-les dans un sac autoclave puis autoclavez.
- ✓ Enlevez le ventilateur en tirant vers le bas. Nettoyez et désinfectez le ventilateur, le bouchon en néoprène (qui ferme l'orifice qui sert à mettre en place des éventuels appareils de mesure), et le pourtour de la sonde.
- ✓ Désinfectez le capteur (sonde à CO<sub>2</sub>) en prenant soin de ne pas le saturer.
- ✓ Nettoyez les joints de porte, la porte vitrée et la porte extérieure.
- ✓ Remplacez les plaques d'habillage dans l'ordre suivant après avoir remis le ventilateur en place: la paroi pleine à droite, la colonne transversale et la paroi avec une encoche dans le bas à gauche.
- ✓ Remplissez le bac d'humidification avec de l'eau déminéralisée et mettez-le en place.
- ✓ Il est conseillé de nettoyer le bac 2X/ mois pour éviter des contaminations microbiennes.
- ✓ Il faut prévoir un jeu de plateaux

#### 4.2.3. Centrifugeuses

Il y a des centrifugeuses dans chaque zone de culture cellulaire qui sont réfrigérées. Les cellules humaines doivent être centrifugées dans des rotors scellés. 100 x g est assez dur pour sédimenter les cellules, des forces g plus élevées peuvent endommager les cellules.

#### 4.2.4. Réfrigérateurs et congélateurs

Les deux éléments sont très importants pour le stockage de milieux liquides à 4 ° C et pour des enzymes (par exemple, la trypsine) et certains composants de milieu (par exemple, la glutamine et le sérum) à -20 ° C. Un réfrigérateur ou une chambre froide est nécessaire pour stocker les milieux et les tampons. Un congélateur sera nécessaire pour conserver des stocks pré-aliquotes de sérum, de nutriments et d'antibiotiques. Les réactifs peuvent être conservés à une température de -20 ° C mais si les cellules doivent être conservées, il peut être nécessaire de fournir de l'azote liquide ou un congélateur à -70 ° C.

#### 4.2.5. Microscopes

Un simple microscope inversé est essentiel pour que les cultures puissent être examinées dans les flacons et des plaques. Il est essentiel de pouvoir reconnaître les changements

morphologiques dans les cultures car ceux-ci peuvent être la première indication de la détérioration d'une culture. Un microscope optique très simple avec un grossissement x 100 suffira pour les numérations cellulaires de routine dans un hémocytomètre, bien qu'un microscope de bien meilleure qualité soit nécessaire pour l'analyse chromosomique ou l'autoradiographie.

#### 4.2.6. Congélateur d'azote liquide

Invariablement, pour les lignées cellulaires continues et finies, les échantillons de cultures devront être congelés pour le stockage. Il est important de maintenir la continuité dans les cellules afin de prévenir la dérive génétique et de prévenir la perte de la lignée cellulaire due à la contamination et à d'autres

problèmes. La procédure de congélation des cellules est générale pour toutes les cellules en culture. Ils doivent être congelés en phase de croissance exponentielle avec un conservateur approprié, habituellement du **diméthylsulfoxyde (DMSO)**. Les cellules sont congelées lentement à 1 ° C / min jusqu'à -50 ° C puis maintenues à -196 °C immergées dans du N2 liquide (dans des ampoules de verre scellées) ou sur la surface liquide dans la phase gazeuse (ampoules à bouchon à vis).

#### 4.2.7. Contenants de culture tissulaire

Une variété de matériel de culture de tissus est disponible, la plus commune étant spécialement le **polystyrène traité**. Bien que tous les plastiques de culture de tissus devraient soutenir la croissance cellulaire adéquatement, il est essentiel lors de l'utilisation d'un nouveau fournisseur ou type de plat pour s'assurer que les cultures y poussent très bien.

Les cellules peuvent être maintenues dans des boîtes de Pétri ou des flacons (25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>) qui ont l'avantage supplémentaire que les flacons peuvent être gazés et ensuite scellés de sorte qu'un incubateur à CO<sub>2</sub> n'a pas besoin d'être utilisé. Ceci est particulièrement utile si les incubateurs échouent.

- ✓ Il faut enlever toute trace de marqueur et toute étiquette.
- ✓ Les bouteilles vides doivent être rincées à l'eau et trempées dans le bac prévu à cet effet. Ces bouteilles doivent être trempées totalement, fond en bas et goulot vers le haut en éliminant toutes les bulles d'air.
- ✓ Ces bacs sont nettoyés 1 fois par semaine par les responsables des pièces de culture délocalisées.

✓ De la propreté de ces bacs dépendra la propreté des bouteilles utilisées pour la préparation des milieux de culture.

### 4.3. Milieux de culture : composition, types, additifs

Les milieux de culture *doivent reproduire aussi fidèlement* que possible les *conditions* de l'environnement que les cellules trouvaient *in vivo*. Ils doivent donc être à la fois :

- vecteur d'éléments nutritifs,
- contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que pH et osmolarité
- et permettre la prolifération des cellules (divisions cellulaires).

Un milieu de culture peut consister :

- en l'association d'un milieu synthétique de base + sérum (le plus performant étant le sérum de veau foetal)
- ou un milieu de culture peut-être un milieu défini = milieu synthétique sans sérum.

#### 4.3.1. Milieux synthétiques de base

Les *milieux de base* sont tous *synthétiques*, de *composition plus ou moins complexe*, ils portent généralement le nom du chercheur qui les a mis au point : Eagle, Parker, Ham, Dulbecco, Grace, ... 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.

##### 4.3.1.1. Milieu synthétique de base : nature des constituants

###### *Sels minéraux*

7 ions sont indispensables Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (*carbonate*). Certains milieux contiennent aussi des métaux à l'état de traces comme le fer, le cuivre, le cobalt, le sélénium.

###### *Acides aminés*

a.a. essentiels : 8 chez l'homme (Ileu, Leu, Lys, Meth, Phé, Thréo, Trp, Val). autres a.a. dont la capacité de synthèse a été perdue lors du passage *in vitro* : au moins cinq autres Gln, Tyr, Cys, Arg et His.

**NB :**

Cas particulier de la glutamine (Gln) qui est indispensable pour quasiment toutes les cellules de mammifères en culture : cet acide aminé n'est pas stable en solution même à 4°C, il faut donc le rajouter au milieu lors d'une longue conservation du stock (il existe formule milieu sans Gln notée w/o Gln, il faudra donc ajouter la Gln à chaque 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.

**Vitamines :** Les besoins sont variables suivant les types cellulaires. Selon Eagle, 8 vitamines sont indispensables : choline, acide folique, thiamine, pyridoxal, riboflavine, acide nicotinique, inositol, acide panthoténique.

**Glucose :** la substance énergétique fondamentale est généralement le glucose à la concentration de 1 g/L, concentration semblable à celle du sérum humain). Le glucose est quelquefois substitué par d'autres oses tels que le galactose, le mannose ou le fructose. Dans les milieux riches on peut trouver des acides cétoniques tels que l'  $\alpha$ -cétoglutarate ou le pyruvate.

**Rouge de phénol :** indicateur coloré dont la zone de virage est située aux pH de 7,2-7,6.

**Système tampon,** on a deux possibilités :

- utilisation du couple (bicarbonate de sodium, dioxyde de carbone),  $\text{NaHCO}_3$  apporté dans le milieu et  $\text{CO}_2$  (à 5 %) dans l'atmosphère de l'étuve. - utilisation d'une molécule organique tampon dans le milieu, l'HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique).

#### 4.3.1.2. Milieu synthétique de base : rôles des constituants

##### **Sels minéraux**

- Servent de cofacteurs d'enzymes,
- jouent un rôle dans la pression osmotique,
- le potentiel de membrane,
- les communications (second messenger  $\text{Ca}^{++}$ ),
- les transports (ion cotransporté  $\text{Na}^+$  par exemple),
- la régulation du pH,

-attachement des cellules (notamment le  $\text{Ca}^{++}$ ), entrent dans la constitution de certaines molécules (groupement prosthétique, phosphate ou autres), ...

**Acides aminés** : Sous-unités constitutives des protéines.

**Vitamines** : Cofacteurs d'enzymes ou précurseurs pour la synthèse de molécules.

**Glucose** : Source d'énergie (catabolisme énergétique) et source de carbone (anabolisme).

**Rouge de phénol** : Permet de visualiser les variations du pH, adapté car zone de virage située à la valeur du pH à réguler.

**Système tampon** : Permet la régulation du pH : régulation obligatoire pour les cellules de mammifères notamment qui sont issues d'un organisme où règne l'homéostasie.

#### 4.3.2. Sérum

Mises en culture en présence d'un milieu synthétique de base tel que nous venons de le décrire, la plupart des cellules ne sont généralement aptes qu'à la survie. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, 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 plus souvent de l'ordre de 5 à 10 %.

On peut utiliser des sérums d'origine humaine ou animale, d'individus jeunes, sachant que l'effet cytoestimulant global du sérum est inversement proportionnel à l'âge du donneur. le SVF, on peut citer aussi le liquide amniotique enrichi en certains constituants. Les plus fréquemment retrouvés sont

: le sérum de veau, le sérum de veau nouveau-né, le sérum de veau foetal (SVF), ce dernier ayant les

meilleures performances. Il existe actuellement des mélanges permettant de remplacer. Le sérum est un mélange de composition extrêmement complexe qui contient, entre autres, un grand nombre de substances libérées par toutes sortes de types cellulaires de l'organisme donneur.

##### 4.3.2.1. Sérum de veau foetal : constituants et rôles

La nature de certains de ses constituants sera évoquée ultérieurement dans le paragraphe sur les milieux définis.

**Facteurs de croissance et des hormones** : Facteurs de croissance = peptides impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (messagers chimiques), ils ont un effet mitogène et permettent la prolifération cellulaire.

Hormones = messagers nécessaires à la mise en place de certaines fonctions cellulaires.

**Facteurs d'attachement :** Glycoprotéines qui favorisent l'adhérence des cellules (c'est important surtout en début de culture car les cellules sont peu nombreuses et conditionnent mal le milieu de culture).

**Eléments qui assurent une protection des cellules** Ils augmentent la viabilité.

**Propriété nutritive :** Riche en nombreux oligoéléments.

#### **4.6.2.2. Avantages et inconvénient de l'utilisation du sérum de veau foetal**

La présence de sérum peut être, toutefois, un facteur limitant. En effet :

##### **Avantages**

- Apport des facteurs de croissance permettant la prolifération cellulaire.
- Apport d'hormones.
- Apport de facteurs d'attachement contribuant à la bonne adhérence indispensable à la division cellulaire.
- Rôle protecteur : augmente la viabilité cellulaire et la stabilité des produits cellulaires.
- Propriétés nutritives (nombreux métabolites, ions, oligoéléments et lipides en solution).
- Pouvoir tampon.
- Apport de protéines de transport (transportent des substances de faible poids moléculaire, fer et acides gras par exemple).
- Pouvoir détoxifiant : absorbe et neutralise les toxines.

##### **Inconvénients**

- Composition non définie.
- Variabilité de lot à lot.
- 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.
- Teneur élevée en protéines donc problème d'interférences lors de la purification des protéines d'intérêt synthétisées par les cellules (ex : protéines recombinantes, protéines avec application thérapeutique).
- Approvisionnement variable donc variabilité des prix.
- Favorise préférentiellement la croissance des fibroblastes dans des cultures primaires (par rapport aux autres types de cellules).

**NB :**

*Le sérum présente l'avantage d'apporter des inhibiteurs de protéases, l'a2-macroglobuline et l'a1- antitrypsine, qui inactivent la trypsine que l'on utilise en routine pour le repiquage des cultures.*

### **4.3.3. Milieux définis ou milieux synthétiques sans sérum**

Devant la faible reproductibilité de certains résultats, les chercheurs ont évolué vers la mise au point de milieux dépourvus de sérum, enrichis en facteurs rigoureusement contrôlés. Ces milieux sont appelés milieux définis. Différents constituants définis sont additionnés à des concentrations définies à un milieu synthétique de base riche (type HAM F12 ou MCDB 104). L'addition de ces substances varie en fonction des exigences du type cellulaire cultivé.

#### **4.3.3.1. Nature des constituants ajoutés à un milieu de base riche**

##### ***Hormones***

-L'insuline (Utilisée à la concentration de 5 à 10 µg/mL). C'est une substance importante pour certaines lignées cellulaires. Cependant elle n'est pas très stable dans les milieux sans sérum, c'est pourquoi on peut admettre que pour beaucoup de cellules elle ne joue un rôle important qu'en début de culture. Elle serait inutile *lorsque les cellules sont en pleine croissance*. L'insuline peut être remplacée par :

- l'IGF (*Insuline-like Growth Factor*)
- Hydrocortisone
- Progestérone
- Oestradiol
- Hormone de croissance
- Somatomédine
- Hormone parathyroïde.

##### ***Facteurs de croissance***

Les facteurs de croissance se classent plutôt comme étant des substances *paracrines* ou *autocrines*, appelés de façon plus générale, **médiateurs chimiques locaux**. Leur action sur les cellules est déclenchée par la formation d'un complexe spécifique avec un récepteur et il en résulte alors :

- soit une augmentation de la taille de la cellule,
- soit une augmentation de la population cellulaire,
- soit une induction ou un blocage d'une étape de différenciation.

Les facteurs de croissance sont des *polypeptides* dont la majorité d'entre eux sont actuellement produits par recombinaison et donc disponibles en quantité suffisante.

Toutefois, un milieu sans sérum et contenant ces facteurs devient très onéreux. Un tel milieu n'est utilisable que pour la recherche, mais rarement pour la production.

- EGF (*Epidermal Growth Factor*)
- FGF (*Fibroblast Growth Factor*)
- NGF (*Nerve Growth Factor*)
- PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor* = *facteurs de croissance des cellules endothéliales d'origine plaquettaire*)
- TGF (*Transforming Growth Factor*)
- Différents interférons
- Différentes interleukines

### **Facteurs d'attachement**

Les supports tapissés (« coatés ») avec un substrat protéique constituent des surfaces de choix pour la culture des cellules dont l'adhésion est difficile. Ils favorisent aussi la différenciation des cellules cultivées. Certains facteurs d'attachement peuvent aussi être introduits en solution dans le milieu de culture.

**Poly-L-lysine** : c'est une molécule synthétique présentant de nombreuses charges positives. La poly-lysine amplifie l'interaction électrostatique entre les ions négatifs de la membrane cellulaire et les ions positifs de la surface cellulaire présents dans les facteurs de fixation de la surface de la culture. Une fois adsorbée en surface des cellules, elle augmente le nombre de sites chargés positivement disponibles pour la fixation des cellules au support plastique chargé négativement.

**Collagène** : glycoprotéine fibreuse dont le rôle peut être comparé à une armature. C'est une protéine structurale, les molécules de collagène jouent le rôle de câble entre les cellules de notre corps et c'est la protéine la plus abondante de l'organisme (notion de « colle »). Il est sécrété par les cellules des tissus conjonctifs.

**Fibronectine** : glycoprotéine qui contribue à l'organisation de la matrice extracellulaire et à l'adhésion cellulaire. *In vivo*, c'est une molécule-clé pour l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (les récepteurs de la fibronectine sont notamment les intégrines). La

fibronectine est également un facteur limitant la prolifération tumorale. Les cellules métastatiques n'ont pas de fibronectine qui se lie à leur membrane.

**Laminines** : famille de glycoprotéines qui forment le constituant majeur de la lame basale, en dehors du collagène. La lame basale est un assemblage de protéines et glycoprotéines extracellulaires sur lequel reposent les cellules épithéliales. Elle permet l'adhérence de la cellule épithéliale au tissu conjonctif sous-jacent. Les molécules constitutives de la lame basale sont sécrétées par les cellules épithéliales.

**Gélatine** : Elle est obtenue par l'ébullition prolongée de la peau animale, des os et des tissus conjonctifs. Elle est constituée à environ 98-99 % (en poids à sec) de protéines. Elle est utilisée comme agent collant.

### **Protéines de transport**

Albumine sérique bovine (BSA ou *SAB en anglais*) peut être utilisée à une concentration maximale de 5g/L (souvent 0,1-1 g/L). Elle remplit différentes fonctions dont celle d'être le transporteur de substances lipophiles (acides gras, éléments de trace, hormones et vitamines liposolubles), mais aussi de permettre la détoxification du milieu (transport de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fixation de toxines).

L'albumine peut être remplacée par le PEG-20000 (Polyethylene glycol), la Pluronic F68 ou le TWEEN 85, qui peuvent aussi protéger les cellules contre les effets du cisaillement.

Le dextrane et les cyclodextrines peuvent remplacer l'albumine pour leur potentiel d'absorption des lipides, ce qui permet d'approvisionner les cellules en ces substances.

**Transferrine** : Elle est utilisée en concentration de 1 à 100 mg/L. Son premier rôle est de transporter le fer (d'où son nom), mais elle permet également de détoxifier d'autres métaux. La transferrine peut être remplacée par du fer (Fe<sup>++</sup> ou Fe<sup>+++</sup>), complexé par le citrate, la glycylglycine ou d'autres acides organiques.

### **Antioxydants**

Le rôle des antioxydants est très important lors de cultures menées en milieu sans sérum. Ils doivent inactiver les peroxydes générés au cours de la croissance, une fonction normalement assurée par le sérum.

- On utilise du b-mercaptoéthanol (environ 10 $\mu$ M), du Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (10-60 nM ; *le Se est essentiel pour l'activité de la glutathion peroxydase*), du glutathion, les vitamines E et C, du pyruvate, etc.

### ***Substances lipidiques***

- Les substances lipidiques sont essentielles pour les cellules car elles contiennent les précurseurs de la synthèse des prostaglandines, nécessaires pour certaines cellules particulières, et sont incorporées après d'éventuelles modifications dans les membranes cellulaires. Classiquement, elles sont ajoutées après formation de complexes avec la BSA, mais plus récemment aussi avec la dextrane ou les dérivés de dextrine

## **4.4. Conditions optimales de culture : température, CO<sub>2</sub>, humidité**

La surveillance de paramètres tels que la température, l'humidité et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est d'une importance capitale dans le domaine de la culture cellulaire. Cette pratique est bien plus qu'une simple mesure de routine ; elle constitue un pilier fondamental pour assurer des conditions optimales de croissance et de développement des cellules en laboratoire.

### **4.4.1. la température**

La température constitue l'un des paramètres les plus critiques dans tout environnement de culture cellulaire. Son maintien constant est impératif pour assurer la viabilité cellulaire optimale ainsi que le bon déroulement des processus métaboliques essentiels. En effet, les cellules sont sensibles aux variations de température et toute fluctuation peut entraîner des conséquences néfastes sur leur physiologie et leur fonctionnement.

Maintenir une température constante est essentiel pour garantir des conditions stables et reproductibles favorables à la croissance cellulaire. Les cellules sont souvent cultivées à des températures spécifiques qui correspondent à leur environnement physiologique naturel. Des écarts par rapport à cette plage de température optimale peuvent entraîner un stress cellulaire, compromettant ainsi la survie et la fonction des cellules.

La température joue un rôle déterminant dans la régulation des processus biologiques fondamentaux au sein des cellules, y compris la synthèse des protéines, la division cellulaire et le métabolisme énergétique. Des variations de température peuvent perturber ces processus, entraînant une altération de la viabilité cellulaire, une diminution de la croissance et une altération de la fonction cellulaire.

#### **4.4.2. L'humidité,**

L'humidité constitue un autre paramètre critique à surveiller dans les environnements de culture cellulaire, jouant un rôle essentiel dans la qualité de l'air des incubateurs et les conditions de croissance des cellules.

##### ***Quelle est la relation entre l'humidité et la qualité de l'air dans les incubateurs ?***

L'humidité relative de l'air dans les incubateurs influence directement la qualité de l'environnement de culture. Un niveau d'humidité adéquat est nécessaire pour maintenir la stabilité des conditions de culture, en évitant notamment le dessèchement des milieux de culture et des cellules elles-mêmes. De plus, une humidité appropriée peut contribuer à prévenir la contamination microbologique en maintenant un environnement inhospitalier pour les agents pathogènes.

L'humidité joue un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la morphologie. Des niveaux d'humidité inappropriés peuvent perturber l'homéostasie cellulaire, entraînant une diminution de la viabilité cellulaire, une altération de la croissance et une modification de la morphologie des cellules. Une humidité optimale favorise également la stabilité du pH dans les milieux de culture, contribuant ainsi à maintenir des conditions favorables à la croissance cellulaire.

#### **4.4.3. Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)**

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est un élément essentiel dans la culture cellulaire, jouant un rôle fondamental dans divers aspects de la physiologie cellulaire et des processus de culture.

Le CO<sub>2</sub> est impliqué dans de nombreuses réactions cellulaires, notamment la photosynthèse chez les organismes autotrophes et la respiration cellulaire, qui produit du CO<sub>2</sub> comme sous-produit chez les organismes hétérotrophes. Dans les cultures cellulaires, le CO<sub>2</sub> est utilisé comme source de carbone pour la synthèse de biomolécules telles que les glucides, les lipides et les acides aminés, indispensables à la croissance et à la survie des cellules.

##### ***Quel est l'impact sur la régulation du pH et la croissance cellulaire ?***

Le CO<sub>2</sub> joue un rôle crucial dans le maintien du pH optimal du milieu de culture. En se dissolvant dans le milieu, le CO<sub>2</sub> forme de l'acide carbonique, qui agit comme un tampon pour maintenir le pH du milieu de culture dans une plage appropriée pour la croissance cellulaire. Un équilibre adéquat du CO<sub>2</sub> dans le milieu est donc essentiel pour assurer des conditions de pH stables, favorisant ainsi la croissance et la viabilité des cellules en culture.

Le contrôle précis du CO<sub>2</sub> est particulièrement crucial dans des domaines tels que la production d'anticorps, où des cultures cellulaires de haute densité sont nécessaires pour obtenir des rendements élevés en protéines recombinantes. De même, en ingénierie tissulaire, la fourniture adéquate de CO<sub>2</sub> est essentielle pour maintenir des conditions de culture optimales et favoriser la différenciation et la maturation des tissus en développement.

#### **4.5.5. Passages cellulaires, congélation et décongélation**

##### **4.5.1 Passages cellulaires**

Les passages cellulaires, aussi appelés sous-cultures, sont la procédure par laquelle des cellules provenant d'une culture existante sont divisées et transférées dans de nouveaux milieux de culture pour en démarrer de nouvelles. Cette étape est essentielle pour maintenir la santé et le bon fonctionnement des cultures cellulaires en fournissant aux cellules des nutriments frais et de l'espace, permettant ainsi leur expansion et prolongeant leur durée de vie.

##### *Pourquoi effectuer des passages cellulaires ?*

**4.5.1.1 Expansion cellulaire :** Pour obtenir un plus grand nombre de cellules à partir d'une culture initiale.

**4.5.1 .2.Maintien de la santé cellulaire :** Pour éviter que les cellules ne souffrent d'inhibition de contact (réduction de la prolifération due à la surpopulation) et d'épuisement des nutriments, qui peuvent entraîner une dégradation de la culture.

**4.5.1 .3.Production de lignées cellulaires :** Pour continuer à utiliser des cellules spécifiques pour la recherche et d'autres applications.

##### **4.5.2 Cryoconservation**

Les cellules sont cryoconservées afin d'éviter toutes pertes par contamination, de minimiser le changement génétique dans des lignées cellulaires continues, et d'éviter le vieillissement et la transformation dans des lignées cellulaires finies. Avant de la cryoconservation, les cellules doivent être caractérisées et vérifiées pour la contamination. Il ya plusieurs milieux communs utilisés pour congeler les cellules. Il est possible de les traiter avec des agents cryoprotecteurs adaptés, comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le glycérol, de les congeler délicatement puis de les stocker à des températures cryogéniques (en dessous de -130°C) jusqu'à ce qu'on en ait besoin.

Pour un milieu contenant du sérum, les constituants peuvent être les suivants :

- ❖ Milieu complet contenant 10% de glycérol.
- ❖ Milieu complet contenant 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde).
- ❖ Milieu conditionné de cellules de 50% avec 50% de milieu frais avec 10% de glycérol ou 10% de DMSO

Les milieux de cryoconservation consistent généralement d'un milieu de base, cryoprotecteur, et une source de protéines. Le cryoprotecteur et les protéines protègent les cellules du stress du processus de la congélation-décongélation. Un milieu exempt de sérum a généralement peu ou pas de protéine ; mais on peut encore l'utiliser comme une base pour un milieu de cryoconservation.

#### **4.5.3 Décongélation**

Alors que le refroidissement des cellules doit être progressif, c'est l'inverse pour la décongélation des cellules. La décongélation rapide réduit la formation de cristaux de glace qui endommagent l'intérieur des cellules lorsqu'elles se réhydratent. Placez votre récipient dans de l'eau chaude et remuez-le doucement jusqu'à ce qu'il soit complètement décongelé. Pour la plupart des cultures cellulaires, une décongélation pendant 60 à 90 secondes à 37 °C permet d'obtenir les meilleurs résultats.

Retirez les agents cryoprotecteurs des cellules aussi rapidement et délicatement que possible afin d'éviter tout dommage résultant d'une exposition prolongée à ces agents. La méthode de retrait des agents cryoprotecteurs dépend du type d'agent et du type de cellule. Les cellules sensibles aux agents cryoprotecteurs nécessitent une centrifugation légère pour retirer l'agent. Si le cryoprotecteur est du glycérol, les cellules peuvent être endommagées par l'ajout soudain d'un grand volume de médium frais à la suspension cellulaire décongelée. Au lieu de cela, faites passer les cellules conservées au glycérol par plusieurs dilutions par étapes pour donner aux cellules le temps de s'ajuster. Utilisez des volumes égaux de milieux chauds toutes les 10 minutes.

## Chapitre 5

### Culture des cellules animales

Les cellules cultivées sont généralement décrites d'après leur morphologie (forme et apparence) ou leurs caractéristiques fonctionnelles. Il existe trois morphologies de base :

-Type épithélial : ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent plates et de forme polygonale.

-Type lymphoblaste : ces cellules ne se fixent pas normalement à un substrat mais restent en suspension avec une forme sphérique.

-Type fibroblaste : ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent allongées et bipolaires.

Les conditions de culture jouent un rôle important dans la détermination de la forme et que de nombreuses cultures de cellules sont capables de présenter plusieurs morphologies.

À l'aide de techniques de fusion cellulaire, il est également possible d'obtenir des cellules hybrides en fusionnant des cellules provenant de deux parents différents. Elles peuvent présenter des caractéristiques de l'un des parents ou des deux parents.

Les caractéristiques des cellules cultivées sont le résultat de leur origine et de leur faculté d'adaptation aux conditions de culture. Des marqueurs biochimiques peuvent être utilisés pour déterminer si les cellules sont toujours porteuses des fonctions spécialisées qui sont les leurs *in vivo*. Des marqueurs morphologiques ou ultra-structuraux peuvent également être examinés. Ces caractéristiques sont fréquemment perdues ou modifiées en conséquence du placement des cellules dans un environnement artificiel.

Certaines lignées cellulaires finissent par arrêter de se diviser et montrer des signes de vieillissement. Ces lignées sont appelées finies. D'autres lignées cellulaires sont, ou deviennent, immortelles ; elles peuvent continuer à se diviser indéfiniment et sont appelées lignées cellulaires continues.

Lorsqu'une lignée cellulaire finie "normale" devient immortelle, elle a subi un changement fondamental irréversible ou "transformation". Ceci peut se produire spontanément ou peut être provoqué en utilisant intentionnellement des produits, des rayonnements ou des virus. Les cellules transformées poussent généralement plus vite et plus facilement, peuvent souvent présenter des chromosomes supplémentaires ou anormaux et peuvent fréquemment être cultivées en suspension. Les cellules possédant le nombre normal de chromosomes sont

appelées cellules diploïdes ; celles qui possèdent un nombre de chromosomes différents de la norme sont appelées aneuploïdes. Si les cellules forment des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des animaux, elles sont considérées comme étant néoplasiquement transformées.

Au sein d'un organisme vivant, il existe deux types de cellules : les cellules libres ou circulantes et celles qui vivent en cohésion les unes avec les autres et constituent un tissu.

-Les cellules circulantes sont obtenues par prélèvement suivi de centrifugation.

-Les cellules organisées en tissu doivent être isolées soit par des méthodes de dissection, soit par des méthodes enzymatiques (action d'enzymes protéolytiques).

### **5.1. Types de lignées cellulaires**

Les lignées cellulaires sont issues du développement de cultures primaires qui au fur et à mesure du temps et des repiquages, perdent leur hétérogénéité pour permettre l'émergence d'un type cellulaire. Il est important de souligner que le terme *sensu stricto* de lignée cellulaire est attribué à la culture dès lors que la culture primaire subie son premier repiquage. Elles sont le plus souvent constituées de cellules tumorales ou de cellules "transformées" (immortalisées), chimiquement ou via un virus oncogène, et possèdent la caractéristique de pouvoir se diviser de façon illimitée.

On distingue les lignées cellulaires finies qui présentent une dégénérescence des cellules au bout d'un certain nombre de repiquages, et des lignées continues à durée de vie illimitée.

Malgré leur composition homogène, ces lignées cellulaires doivent conserver les propriétés morphologiques, phénotypiques et génotypiques de la tumeur originelle, et ainsi pouvoir représenter une source renouvelable de matériel cellulaire pour les différentes études, malgré les mitoses successives subies par ces cellules.

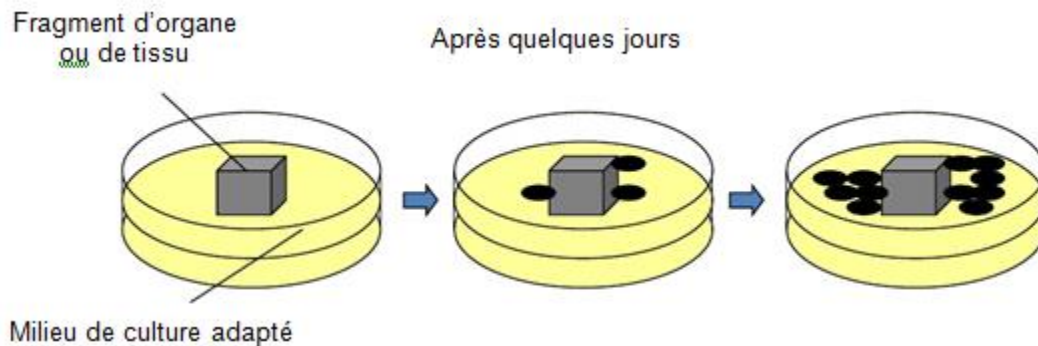
Classiquement on a trois grands types majeurs de lignées cellulaires : les lignées primaires, les cellules "immortalisées" et les cellules tumorales. Cependant aucun outil n'est parfait, il y a toujours des avantages et des inconvénients.

#### **5.1.1. Cultures primaires**

Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une culture primaire. Il existe deux méthodes de base pour faire cela.

### 5.1.1. 1.Méthode par dissection

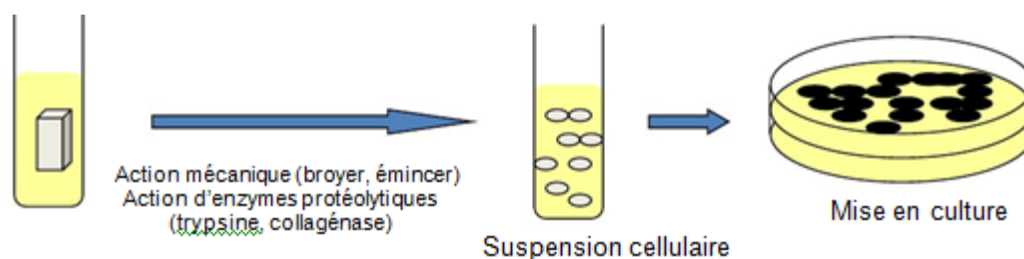
Cette méthode est la plus ancienne. Elle a permis aux précurseurs de la culture de tissu d'obtenir les premières cellules *in vitro* (**Figure 6**).



**Figure 6.** Culture d'un explant.

### 5.1.1. 2.Dissociation enzymatique

Dans la deuxième (**Figure 7**), méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que la trypsine ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser.



**Figure 7.** Dissociation mécanique et enzymatique.

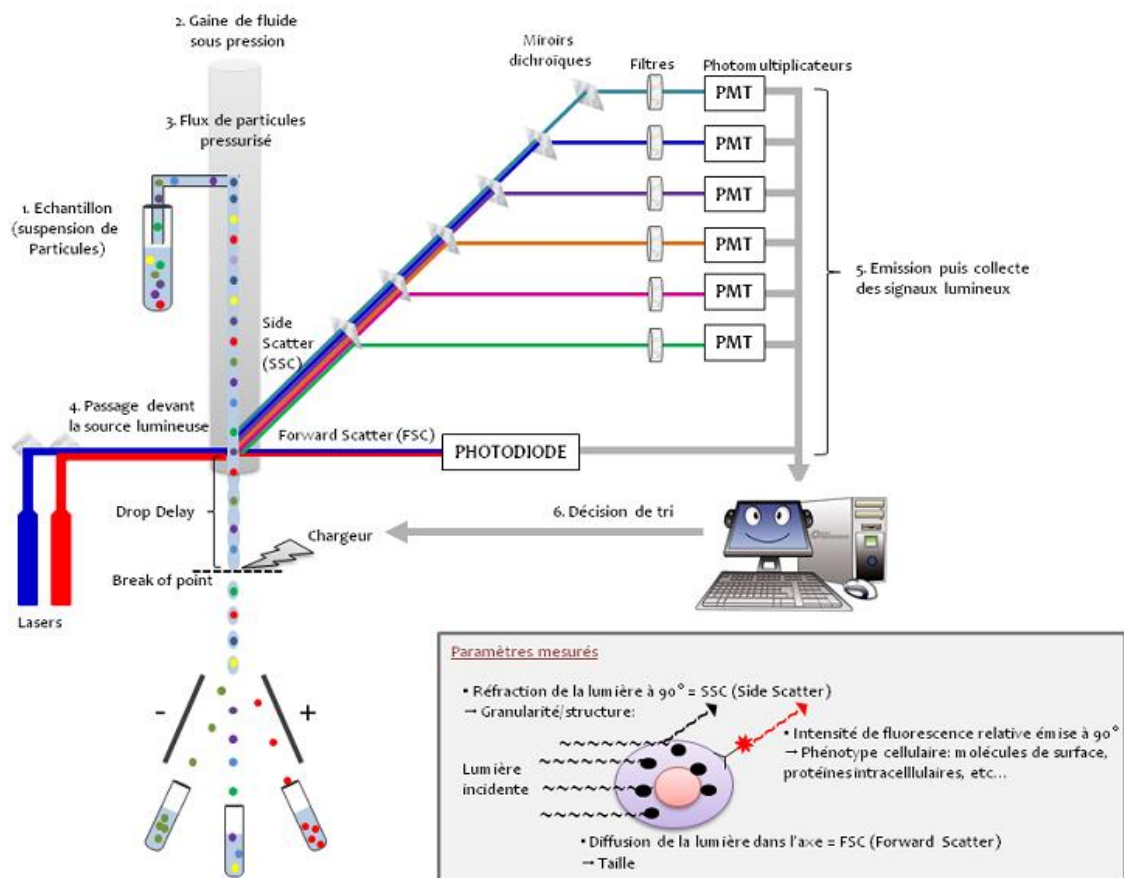
#### **Avantages**

-Proche de la "réalité" de la vie d'une cellule.

-Les lignées primaires présentent un grand avantage puisque c'est ce qui est le plus proche de la réalité. C'est pour ça que malgré que ce soit pénible d'en obtenir, on va essayer d'avoir accès à ce type de cellule.

**Inconvénients**

- Matériel en faible quantité.
- Mélange de différents types cellulaires.
- Ces cellules ne peuvent être maintenues en culture au mieux que pendant quelques générations.
- Evidemment le gros souci c'est qu'on est sur du prélèvement de tissu donc on va avoir plein de types cellulaires qui sont mélangés et il va falloir séparer tout ça : tri cellulaire (figure 1). On a du matériel en très faible quantité donc il faut absolument avoir planifier le travail et tout avoir en miniaturisation pour surtout ne pas perdre de matériel et optimiser le matériel.



**Figure 8.** Principe de la cytométrie en flux et du tri cellulaire.

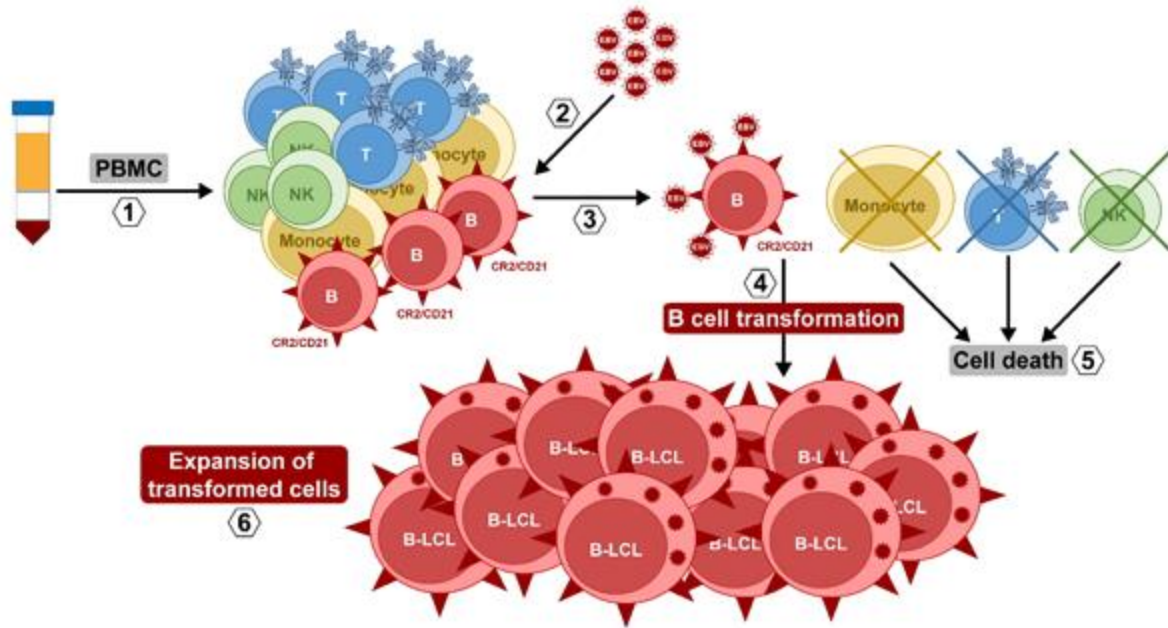
Quand on travaille sur la peau, par exemple, cela va être relativement facile de différencier les mélanocytes et les keratinocytes. Les keratinocytes se multiplient énormément donc à partir

du moment où on met de la peau sur une boîte de culture, ce sont les kératinocytes qui se développent et le reste finit par être dilué, perdu... On a donc simplement autant de kératinocytes que l'on veut. Pour les mélanocytes on se sert de leur propriété intrinsèque. Ils sont très résistants à l'apoptose car ce sont des cellules qui produisent de la mélanine et qui forment la dernière couche de la peau qui est irradiée... Donc on met un peu d'agent toxique qui induit l'apoptose à faible dose, tout va mourir et ne restera en vie que les mélanocytes.

Pour le sang, il y a aussi des choses très simples, on fait un prélèvement de sang qu'on fait passer sur un ficoll qui va tout simplement séparer le plasma, les globules rouges, et le buffy coat qui contient un mélange de tous les lymphocytes blancs (lymphocytes T, lymphocytes B, monocyte/macrophage, neutrophiles). On peut les récupérer tout simplement en prélevant ces phases. Mais évidemment dans le buffy coat, on ne peut pas faire de séparation, pour toutes ces cellules il faudra automatiquement passer par du tri cellulaire. Les monocytes/macrophages sont assez simples à récupérer car les monocytes sont les seules cellules adhérentes du buffy coat donc les seules cellules qui adhèrent à la boîte sont les monocytes.

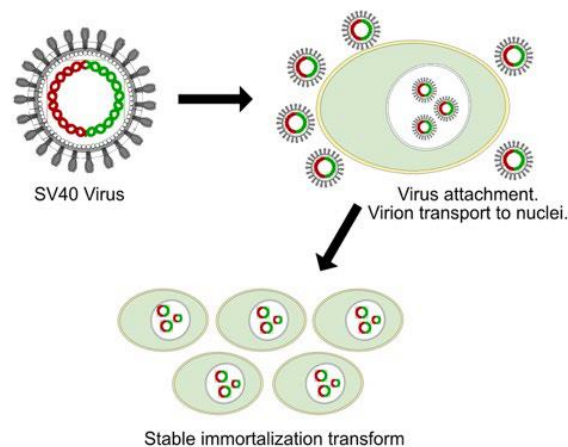
### **5.1.2. Cellules immortalisées**

Ces lignées ne sont évidemment pas des toutes immortelles mais on prolonge un petit peu leur vie, c'est tout ce qu'on est capable de faire. Cela n'existe que pour deux types de cellules : lymphocytes B (figure 2) et fibroblastes (figure 3). Dans ces cellules-là, on va les infecter avec des virus pour les lymphocytes B, on les infecte avec le virus Epstein Barr Virus (EBV) et pour les fibroblastes on les infecte avec le virus Simian Virus (SV40) exclusivement. L'EBV possède un récepteur sur les lymphocytes B et ne peut infecter que les lymphocytes B et c'est la même chose pour SV40 qui n'a son récepteur que sur les fibroblastes.



**Figure 9.** Immortalisation des cellules B avec le virus d'Epstein-Barr.

(1) Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par gradient de densité. (2) Ajout du surnageant de culture B95-8 contenant le virus EBV. (3) Les virus EBV infectent spécifiquement les cellules B par le biais du récepteur CR2 / CD21. (4) Une fois à l'intérieur, l'EBV transforme les lymphocytes B en lignées cellulaires B-lymphoblastoïdes (B-LCL), tandis que le reste des PBMC non infectées meurent (5). (6) Lorsqu'ils sont transformés / immortalisés, les B-LCL prolifèrent et se développent



Pour l'instant on ne sait immortaliser ces lignées là car on dispose de ces deux virus mais ils sont tellement tropiques et ils ont une telle spécificité tissulaire qu'on ne sait faire marcher ça que sur ces deux lignées.

Les virus vont introduire des gènes qui vont permettre à la cellule de se diviser un petit peu plus et surtout de résister à l'apoptose.

Le principe c'est que ces cellules ne sont évidemment pas immortelles mais simplement elles vont résister un tout petit peu mieux à la mort cellulaire et elles vont proliférer un tout petit peu plus rapidement que les autres cellules de culture primaires.

Du coup, on augmente le nombre de génération de ces cellules d'un facteur 3-4 ce qui est un gros avantage. Les cellules "immortalisées" ne sont pas immortelles, mais leur nombre de doublings est augmenté par rapport à une culture primaire : Fibroblaste primaire : 10-12 générations. Fibroblaste humain immortalisé : 30-40 générations.

#### *Avantages*

- On dispose de plus de matériel.

- Ces cellules sont peu différentes d'une culture primaire.

On a évidemment un petit peu plus de matériel cellulaire et c'est relativement peu différent qu'une culture primaire (par rapport aux lignées tumorales).

#### *Inconvénients*

-Seuls deux types cellulaires sont disponibles sous cette forme.

-On introduit des gènes à effet prolifératif et anti-apoptotique, modifiant donc ces activités cellulaires.

-On ne sait faire ça réellement bien que sur deux types cellulaires, les lymphocytes B et les fibroblastes, ça qui limite le nombre d'analyses.

### **5.1.3. Cellules tumorales**

Les cellules tumorales sont des cellules anormales qui se multiplient de manière incontrôlée pour former une tumeur. Elles résultent de mutations génétiques et peuvent être malignes (cancéreuses) ou bénignes (non cancéreuses). Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur métabolisme altéré, leur capacité à échapper au système immunitaire et à se propager dans le corps via des métastases.

#### *Avantages*

-Ces cellule-là permettent d'accéder quasiment à tout puisqu'il existe des cancers de quasiment tous les types de cellules (**Table 1**).

-De plus les cellules vont se diviser de manière extrêmement rapide avec très peu d'apoptose et souvent les cellules réexpriment la télomérase ce qui va faire qu'elles ne sont plus sensibles à la sénescence, soit elles entrent en sénescence mais elles ne le sentent pas, soit elles limitent la sénescence. Du coup c'est des cellules qu'on peut garder X temps en culture.

### ***Inconvénients***

-Les cellules tumorales ont souvent acquis beaucoup de mutations et sont donc extrêmement trompeuses sur le phénotype observé. Il faut donc toujours garder en tête que ce sont des cellules tumorales et du coup ce sont des lignées qui vont continuer à accumuler des mutations et il est évident qu'elles ne vont pas se comporter de manière normale.

-Cependant on utilise quand même ces lignées car une lignée tumorale se divise en 24h, une lignée immortalisée en 2-3 jours et une lignée primaire qui marche bien, qui est jeune, c'est une semaine puis toutes les 2 à 3 semaines.

**Tableau1.**Exemples des lignées cellulaires tumorales humaines.

<b>Histotype</b>	<b>CellLine</b>	<b>Species</b>
<b>Adrenal</b>	NCI-H295R	Human
<b>Bladder</b>	SW780	Human
<b>Brain</b>	BT142 D54- Luc LN-827(pMMP-LucNeo) U-251-Luc-mCh- PuroU-87 MG-Luc	Human
<b>Cervical</b>	He La KB	Human
<b>Colon</b>	COLO2 05DLD- 1HCT- 116HT- 29	Human

	SW-480S W-620	
<b>Epidermoid</b>	A-431	Human
<b>Epithelial</b>	HEK293	Human
<b>Erythroleukemia</b>	HEL	Human
<b>Esophageal</b>	OE33	Human
<b>Fibroblast</b>	Hs895. T NHDF TE353. Sk TE 354.T	Human
<b>Gastric</b>	GIST-T1NCI - N87S NU-5	Human
<b>Head and Neck [squamous cell carcinoma]</b>	CAL 27 FaDu	Human
<b>Leukemia [Acute Promyelocytic]</b>	HL-60	Human
<b>Liver</b>	Hep3B2.1-7 HepG2	Human
<b>Lung [Adenosquamous]</b>	NCI-H596	Human
<b>Lung [Anaplastic Carcinoma]</b>	Calu-6	Human
<b>Lung [Bronchioalveolar]</b>	NCI-H322M	Human
<b>Lung [SCLC]</b>	DMS114 NCI-H446	Human

	SHP-77	
<b>Lymphoma[B-Cell]</b>	DB DB/ M2 GRANTA-519	Human
<b>Mammary/Breast</b>	BT- 20 HCC 70M CF-7 MDA-MB-231	Human

#### 5.1.4. Méthodes de culture

Deux systèmes de base de culture cellulaire sont utilisés pour cultiver des cellules. Ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un substrat de verre ou de plastique traité (systèmes de culture monocouche) ou à flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture en suspension).

##### 5.1.4.1. Culture stationnaire ou monocouche

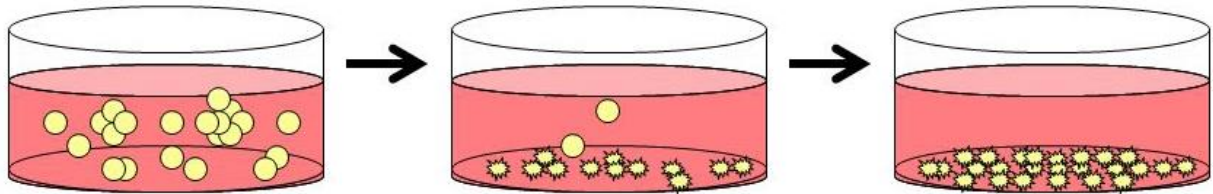
Ce type de culture (**Figure 10**) est basé sur l'affinité des cellules pour un support. Celui-ci peut-être du verre ou du plastique. Il peut être recouvert ou non de collagène, de gélatine ou encore d'éléments de la matrice extra cellulaire comme la fibronectine, la laminine ou une combinaison de ces composants.

Les cellules peuvent aussi former une monocouche sur des billes ou micro-porteurs. Ces derniers peuvent être aussi recouverts d'un substrat. Plusieurs systèmes de maintien des cellules existent :

**-Les systèmes clos** : flacons placés dans des étuves bactériologiques et dont le milieu n'est pas changé.

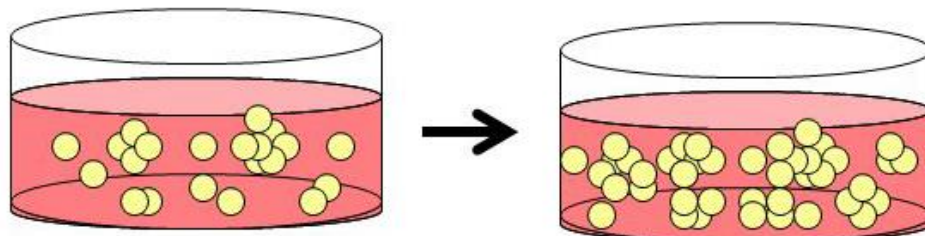
**-Les systèmes semi-clos** : les boîtes de Pétri ou flacons placés dans des étuves spéciales dont l'atmosphère est contrôlée par l'arrivée permanente d'un mélange gazeux composé de 95% d'air et de 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C.

-*Les systèmes ouverts ou systèmes de perfusion* : les chambres de Rosé, de Pomerat ou autre, utilisées surtout pour des études nécessitant une observation longue au microscope, par exemple : la micro-cinématographie.



**Figure 10.** Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture.

✓ dans des récipients de culture stationnaires comme les flacons T et les bouteilles dans lesquels, bien qu'elles ne soient pas maintenues en agitation, les cellules sont incapables de se fixer fermement au substrat.



**Figure 11.** Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, ...). Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension.

De nombreuses lignées cellulaires, surtout celles dérivées de tissus normaux, sont considérées comme adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat leur convenant.

Certaines lignées cellulaires qui ne sont plus considérées comme normales (fréquemment désignées par cellules transformées) sont souvent capables de croître soit fixées à un substrat soit en flottant librement en suspension ; elles sont en suspension. De plus, certaines cellules normales, comme celles trouvées dans le sang, ne se fixent pas normalement aux substrats et poussent toujours en suspension.

### 5.3 Techniques d'ensemencement, de comptage et de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire peut être définie comme le nombre de cellules vivantes dans une population cellulaire. Les tests de viabilité cellulaire ont pour objectif de mesurer des activités liées au maintien cellulaire et à la survie.

Typiquement, on suit des biomarqueurs métaboliques comme l'ATP ou l'activité enzymatique par des tests d'inclusion de colorant par les cellules vivantes. Un certain nombre d'entre eux déterminent le nombre de cellules vivantes grâce à la métabolisation de substrat colorés par les cellules métaboliquement active ou bien grâce à l'accumulation de colorants vitaux. Ces activités métaboliques ou l'accumulation de colorant étant spécifiques des cellules vivantes, elles sont considérées comme étant directement proportionnelles au nombre de cellules viables.

-Réalisé en plaque multi-puits, ce qui permet des mesures rapides à grande échelle.

-Repose sur l'utilisation de colorants ou de fluorochrome ; la viabilité cellulaire est évaluée par une mesure de l'absorbance en comparant du culture témoins à des culture dont les conditions de culture sont différentes.

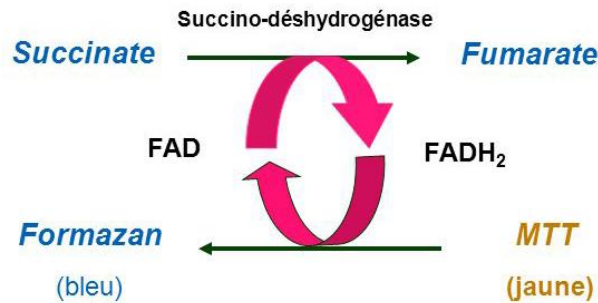
#### 5.3.1. Mesures des atteintes métaboliques

Il existe une série de tests colorimétriques dont le principe repose sur la réduction de réactifs colorés, des sels de tetrazolium, par déshydrogénases des cellules viables. Trois sels sont couramment utilisés : MTT (figure 1), XTT, WST-1 ; test représentatif de l'activité mitochondriale car ils sont réduits en grande partie par la chaîne respiratoire.

La résazurine de couleur bleu-non fluorescent (soluble, stable, non toxique) devient rose – fluorescent pour des mesures en contenu.

Le taux d'ATP peut également être analysé et donc une indication sur les capacités énergétiques de la cellule : les cellules non viables perdent non seulement la capacité de synthétiser l'ATP mais contiennent également des ATPases endogènes qui dégradent rapidement l'ATP existant. La luciférine plus la luciférase dont l'activité ATP dépendante va générer un signal de luminescence

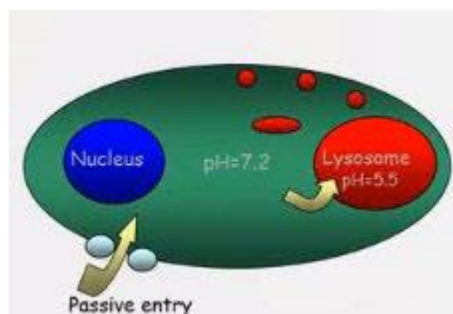
**Principe : une indication sur l'activité mitochondriale**



**Figure 12.** Test au MTT

### 5.3.2. Test d'accumulation du rouge neutre

Le rouge neutre est un colorant vital faiblement cationique qui diffuse facilement au travers la membrane plasmique, puis qui s'accumule dans les lysosomes où il se lie aux sites anioniques de la matrice lysosomale. La séquestration du rouge neutre dans les lysosomes ne se maintient pas dans les cellules non viables (**Figure 13**).



**Figure 13.** Principe du test d'accumulation du rouge neutre.

L'évaluation du taux d'incorporation du rouge neutre par les cellules viables se fait après fixation des cellules au formaldéhyde puis extraction du rouge neutre avec un mélange d'acide acétique-éthanol et quantification par spectroscopie.

La limite de ces tests de viabilité cellulaire est qu'ils ne permettent pas de différencier les cellules proliférantes des cellules quiescentes. Aussi pour une interprétation correcte de ces tests, il est préférable de les réaliser sur une durée assez courte ou bien sur des cellules qui ne sont plus en phase exponentielle de croissance.

## 5.4. Tests d'activité biologique : cytotoxicité, apoptose, prolifération

### 5.4.1. Cytotoxicité

La cytotoxicité est la capacité d'une substance, d'un médicament ou d'une cellule immunitaire à détruire les cellules vivantes. Elle joue deux rôles essentiels : le traitement du cancer et la défense contre les cellules anormales. Les tests de cytotoxicité détectent la perte d'intégrité membranaire associée à la mort cellulaire.

#### 5.4.1.1. Test de : bleu de trypan

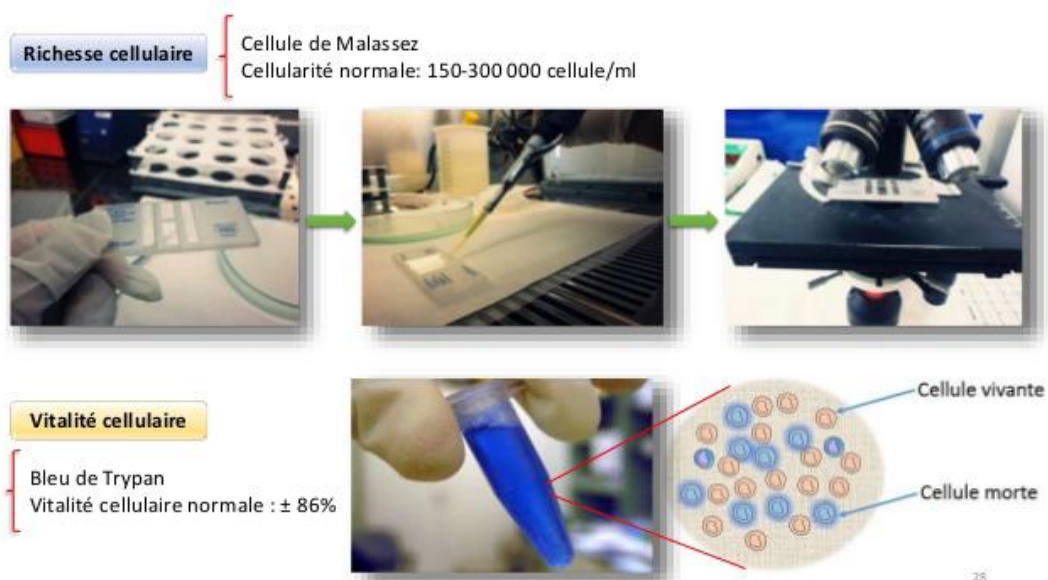
Deux molécules sont fréquemment utilisées pour identifier les cellules mortes : bleu de trypan (microscopie optique en visible) et iodure de propidium (microscope optique à fluorescence). Le bleu de trypan (**Figure 14**) est utilisé couramment en culture cellulaire pour évaluer la viabilité cellulaire.

-Ce colorant est activement expulsé des cellules vivantes alors qu'il diffuse dans les cellules mortes qui prennent alors une coloration bleue identifiable au microscope.

-La détermination du taux de mortalité se fait par comptage cellulaire en cellule de Malassez.

-Peu rapide, la fiabilité peut varier selon le manipulateur.

En effet, si une prolifération se poursuit chez le témoin, une diminution du biomarqueur métabolique dans les cultures traitées pourrait être interprétée comme une baisse de viabilité alors qu'elle peut être liée à un effet cytostatique.



**Figure 14.** Test du bleu de trypan.

### 5.4.1.2. Test de Iodure de propidium

Iodure de propidium est un fluorochrome non perméant qui ne diffuse qu'au travers des membranes plasmiques perméabilisées des cellules mortes ou' il s'intercale de manière non spécifique toutes les 4à5 paires de base de l'ADN. Seules les cellules mortes présentent donc une fluorescence rouge de leur noyau détectable soit par microscopie de fluorescence soit par cytométrie en flux pour une analyse quantitative sur un nombre important de cellule. Pour le dénombrement, une étape de trypsination avec soin afin de ne pas altérer les membranes (faux positifs).

### 5.4.1.3. Test de la lactate déshydrogénase (LDH).

En cas d'altérations de l'intégrité membranaire, des enzymes intracellulaires sont libérées dans le milieu extracellulaire ou' la détection de leur activité signe une cytotoxicité. Le test le plus connu est le test de la lactate déshydrogénase (LDH) : enzyme cytosolique stable qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate avec production concomitante de NADH (Figure 15).

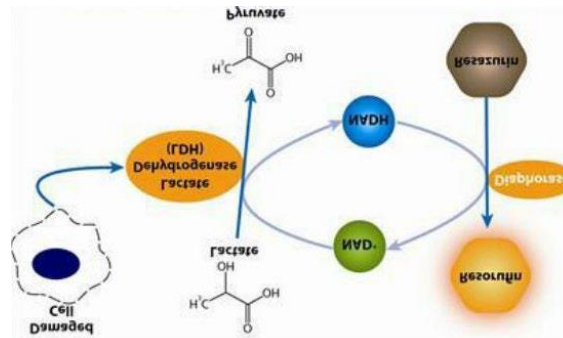


Figure 15 : Test de la lactate déshydrogénase (LDH).

### 5.4.2 .Apoptose

Il existe plusieurs méthodes permettant de détecter l'apoptose (mort cellulaire programmée). Parmi les plus couramment utilisées le test à l'Annexine V, qui permet d'évaluer l'inversion de la membrane plasmique. En effet, dans les cellules normales, la phosphatidylsérine est localisée sur la face interne de la membrane, tandis que dans les cellules apoptotiques, elle est exposée à la surface externe. D'autres approches reposent sur l'analyse de l'activité enzymatique, notamment celle des caspases (Caspase), des protéases clés impliquées dans le processus apoptotique.

Parmi les tests additionnels, on retrouve la mesure de la libération du cytochrome c à partir des mitochondries ainsi que le test TUNEL, qui permet de détecter la fragmentation de l'ADN, un marqueur caractéristique de l'apoptose.

#### **5.4.2.1. Méthodes couramment employées :**

**Test à l'Annexine V :** Cette méthode permet de détecter précocement l'inversion de la membrane plasmique au cours du processus apoptotique. L'exposition de la phosphatidylsérine à la surface externe de la cellule constitue un indicateur précoce de la mort cellulaire programmée.

**Tests des caspases :** Les caspases sont des enzymes protéolytiques activées de manière séquentielle durant l'apoptose. La mesure de l'activité des caspases-3 et -7 est couramment utilisée comme marqueur biochimique de la mort cellulaire programmée.

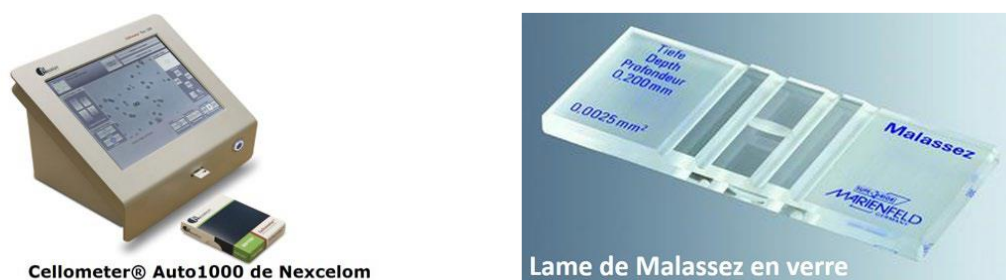
**Test TUNEL :** Ce test repose sur la détection des fragments d'ADN résultant de la dégradation du matériel génétique dans les cellules en cours d'apoptose, constituant ainsi un outil sensible pour l'identification de la fragmentation nucléaire.

#### **5.4.3. Prolifération**

Dans la mesure du possible, il est préférable de réaliser les tests de viabilité cellulaire sur des cellules non cyclantes afin de s'assurer que l'effet observé est bien lié à la mort cellulaire et non à une atteinte de la prolifération cellulaire. Sinon, il convient d'évaluer en parallèle la prolifération cellulaire qui est définie par la mesure des cellules se divisent dans une population.

##### **5.4.3.1. Dénombrement des cellules**

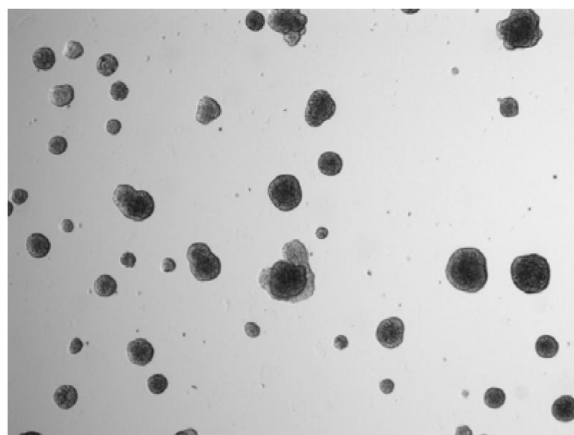
La méthode la plus simple pour évaluer la croissance est de réaliser un dénombrement (**Figure 16**). Comptage sur un hémocytomètre quadrille : manuelle, peu rapide et moyennement fiable puisqu'il dépend de l'opérateur. Compteurs automatiques : microscope à fluorescence et une détection par caméra.



**Figure 16.** Dénombrement des cellules manuel par lame de Malassez (à droite) et automatisé par un compteur automatique (à gauche).

#### 5.4.3.2. Quantification des acides nucléiques

Le Cyquant GR est un indicateur fluorescent du contenu en acide nucléique qui permet une quantification rapide aisée du nombre de cellule. Il présente l'avantage de se liant aux acides nucléiques de présenter une plus grande stabilité. Il est appliqué sur des cellules qui ont été congelées pour les perméabilisées en présence du tampon de lyse afin de faciliter l'accès du colorant à l'acide nucléique (**Figure 17**).



**Figure 17.** Quantification des acides nucléiques le Cyquant GR. Le colorant CyQUANT® GR a été incubé avec du lysat cellulaire et a présenté une forte fluorescence verte lorsqu'il est lié à des acides nucléiques cellulaires.

Bien que le contenu en acide nucléique par cellule change au cours de temps, le contenu net dans une culture asynchrone reste constant. Les conditions exponentielles conduisent à un arrêt des cellules en des points spécifiques du cycle

### 5.4.3.3. Incorporation d'un précurseur de l'ADN

Le paramètre le plus important pour analyser la prolifération est la mesure de la synthèse d'ADN comme marqueur spécifique de la réplication.

Des précurseurs marqués de l'ADN sont utilisés tels que 3Hthymidine, bromodésoxyridine (BrdU), éthynyl-désoxyridine (EdU).

Lors de la synthèse d'ADN, ces précurseurs sont incorporés à la place de la thymidine. L'incorporation est détectée par la mesure de la radioactivité (une grande sensibilité). Inconvénient : la manipulation de radio-éléments. C'est la raison pour laquelle BrdU et EdU sont utilisés en préférence.

**BrdU** : la détection nécessite l'utilisation d'anticorps anti-BrdU et donc une étape préalable de dénaturation de l'ADN pour permettre à l'anticorps d'interagir avec le BrdU.

**EdU** : la détection est basée sur la chimie clic c.à.d. une réaction de covalence catalysée par le cuivre : azide, fluorochrome et alkylène et la moitié éthynyle de EdU => cytométrie en flux.

Que soit le précurseur choisi, si l'étude est réalisée sur des cellules non synchronisées et qui sont donc dans les différentes phases de cycle => déterminer la durée et le moment d'application.

## 5.5. Transfection et manipulation génétique des cellules

La transfection est l'introduction de matériel génétique (comme l'ADN ou l'ARN) dans des cellules eucaryotes, souvent à l'aide de méthodes chimiques, physiques ou biologiques. Le but est de modifier la cellule pour exprimer un gène d'intérêt, étudier des processus cellulaires ou pour des applications de thérapie génique. Les méthodes physiques incluent l'électroporation ou la microinjection, tandis que la lipofection est une méthode chimique courante.

### 5.5.1. Étapes de la transfection

**5.5.1.1. Préparation du matériel génétique** : Le gène d'intérêt est généralement inséré dans un vecteur, comme un plasmide d'ADN, avant d'être introduit dans la cellule.

**5.5.1.2.Complexation** : Le matériel génétique est complexé avec un réactif de transfection (par exemple, des lipides cationiques en lipofection).

**5.5.1.3. Entrée dans la cellule** : La cellule absorbe le complexe par des méthodes comme l'endocytose (lipofection), l'électroporation ou la microinjection.

**5.5.1.3.Libération et expression** : Le matériel génétique est libéré dans le cytoplasme et, s'il s'agit d'ADN, doit ensuite entrer dans le noyau pour être transcrit en ARN messager, puis traduit en protéine.

## **5.5.2.Types de transfection**

**5.5.2.1.Transfection transitoire** : Le matériel génétique est exprimé pendant une courte période et n'est pas intégré au génome de la cellule.

**5.5.2.2.Transfection stable** : Le matériel génétique est intégré dans le génome de la cellule, ce qui permet une expression à long terme.

## **5.5.3.Méthodes de transfection**

**5.5.3.1.Lipofection** : Le matériel génétique est complexé avec des lipides cationiques, formant des liposomes qui sont ensuite absorbés par la cellule.

**5.5.3.2.Électroporation** : Une brève impulsion électrique est appliquée aux cellules pour dépolariiser la membrane et créer des pores temporaires.

**5.5.3.3. Précipitation au phosphate de calcium** : L'ADN est précipité avec du phosphate de calcium, formant des particules qui adhèrent à la membrane et sont absorbées par la cellule.

**5.5.3.4.Microinjection** : Un tube capillaire très fin est utilisé pour injecter directement le matériel génétique dans le noyau de la cellule.

**5.5.3.5.Bactériophage** : Utilise un virus pour transporter le matériel génétique dans la cellule.

## **5.6. Applications de la culture cellulaire animale**

La culture cellulaire est devenue un des outils majeurs utilisés en biologie cellulaire et moléculaire. Certains des domaines importants dans lesquels la culture cellulaire joue actuellement un rôle majeur sont brièvement décrits ci-dessous.

### 5.6.1. Systèmes de modèles

Les cultures cellulaires fournissent de bons systèmes de modèles pour étudier :

- ✓ La biologie et la biochimie cellulaires de base.
- ✓ Les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies.
- ✓ Les effets des médicaments sur les cellules.
- ✓ Le processus et le déclenchement du vieillissement.
- ✓ Les études nutritionnelles.

### 5.6.2. Tests de toxicité

Les cellules en culture sont largement utilisées seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux pour étudier les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules. Les cultures de cellules dérivées du foie et des reins sont particulièrement importantes.

### 5.6.3. Recherche sur le cancer

Les cellules normales et les cellules cancéreuses pouvant toutes deux être cultivées, les différences de base entre elles peuvent être étudiées de près. De plus, il est possible, en utilisant des produits chimiques, virus et rayonnements, de convertir les cellules cultivées normales en cellules cancéreuses. Ceci permet ainsi d'étudier les mécanismes conduisant à ce changement.

Les cellules cancéreuses cultivées servent également de système de test pour déterminer les médicaments et méthodes adaptées pour détruire sélectivement certains types de cancers.

### 5.6.4. Virologie

Une des utilisations les plus précoces et les plus importantes des cultures cellulaires a été la réplication de virus dans les cultures cellulaires (à la place des animaux) pour les utiliser dans la production de vaccins. Les cultures cellulaires sont également largement utilisées en détection clinique et isolement de virus, ainsi qu'en recherche fondamentale pour étudier comment ils se développent et infectent les organismes.

### **6.6.5. La cellule comme usine de production**

Alors que les cellules cultivées peuvent être utilisées pour produire de nombreux produits importants, trois domaines se sont montrés plus intéressants. Le premier est la production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de vaccins.

Ceci comprend les vaccins contre la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole. Le deuxième est la production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des protéines présentant une valeur médicale ou commerciale. Ceci inclut les anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc. Le troisième est l'utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes. La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce. Toutefois, des tests sont en cours sur des organes artificiels comme le pancréas, le foie et les reins. Une réserve potentielle de cellules et tissus de remplacement peut ressortir de travaux en cours réalisés avec des cellules souches adultes et embryonnaires. Ce sont des cellules qui ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Apprendre à contrôler le développement de ces cellules représente un espoir pour de nouvelles approches de traitements pour une large variété de pathologies.

### **5.6.6. Génie génétique**

La capacité de transférer ou de reprogrammer les cellules en culture par du nouveau matériel génétique (ADN et gènes) a fourni un outil précieux aux biologistes moléculaires désireux d'étudier les effets cellulaires de l'expression de ces gènes (nouvelles protéines).

Ces techniques peuvent également être utilisées pour produire ces nouvelles protéines en grande quantité dans les cellules en culture pour les étudier. Les cellules d'insectes sont largement utilisées comme usines cellulaires miniatures pour exprimer des quantités substantielles de protéines qu'elles fabriquent après avoir été infectées par des baculovirus génétiquement modifiés.

## Chapitre 6 : Culture végétale

De très nombreux ouvrages ont traité de la culture *in vitro* au cours de la deuxième moitié de ce siècle décrivant toutes les méthodes déployées aussi bien dans le domaine animal que végétal. C'est une méthode de culture des plantes en condition aseptiques en utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés. La multiplication végétative par culture *in vitro* (aussi appelé micropropagation) est donc une technique visant à régénérer une plante entière à partir de cellules ou de tissus végétaux en milieu nutritif, en utilisant des techniques modernes de culture cellulaires.

### 6.1. Principes de base de la culture *in vitro* végétale

#### 6.1.1. La multiplication

La croissance des plantes se fait en plusieurs étapes qui permettent le développement d'une graine en une plante capable de se reproduire. Pour cela, il faut d'abord une prolifération cellulaire par mitose qui se réalise au niveau de tissus spécialisés : les méristèmes (= zone de prolifération cellulaire). Ils sont situés :

- méristèmes primaires: apex des racines, extrémité des tiges, **bourgeons** apicaux,
- méristèmes secondaires: dans les tissus plus anciens responsables de l'épaississement des tissus. Une fois la croissance réalisée, il y a différenciation de cellules qui serviront les unes à la circulation des sèves (phloème, xylème), les autres à la photosynthèse (feuilles), à la nutrition (racines). C'est donc un phénomène complexe qui dépend de facteurs externes et internes.

#### 6.1.2. Les substances de croissance (Les phytohormones)

Le développement végétal est régulé par des facteurs de croissance qui, par leur action à distance du lieu de production sont appelés PHYTOHORMONES. Ces substances peuvent agir en synergie ou en antagonisme.

Les hormones végétales ou phytohormones sont impliquées à tous les stades de la vie d'une plante depuis la pollinisation provoquant la fécondation et le développement de l'embryon zygotique, tout au long du développement de celui-ci en plante adulte jusqu'au contrôle de la floraison, de la fructification et de la sénescence. Les mêmes phytohormones ne font pas que

diriger les processus de croissance et de développement: elles sont pour cela obligatoirement impliquées dans des mécanismes spécifiques de division, d'élongation et de différenciation cellulaire, mais aussi nécessairement dans les métabolismes primaire et secondaire.

Les phytohormones sont d'une importance capitale dans le contrôle des cultures *in vitro* de cellules, tissus, organes ou plantes entières, c'est-à-dire dans l'orientation qu'on veut leur donner : maintien en vie, croissance, initiation d'une organogenèse spécifique (production d'organes tels que pousses feuillées, racines, embryons somatiques\*), multiplication d'organes ou de plantules, etc... Elles sont également largement utilisées pour le contrôle de la production de métabolites secondaires d'intérêts divers.

### 6.1.3. La totipotence cellulaire

Une cellule est dite totipotente quand elle a la capacité de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée et de se structurer en formant un organisme pluricellulaire. En effet, les cellules végétales, prélevées sur un organe quelconque d'une plante, possèdent la capacité de régénérer un individu complet identique à la plante mère. C'est la totipotence des cellules végétales. Elle repose sur l'aptitude à la dédifférenciation : les cellules peuvent redevenir des cellules simples, non spécialisées et se différencier ensuite pour donner à nouveau les différents types de cellules spécialisées. Grâce à la totipotence, l'arbre et d'autres plantes, mis en milieu stérile, sont techniquement immortels.

La totipotence débute par la formation de cals : amas de cellules indifférenciées qui permet de régénérer un individu entier génétiquement identique à la plante mère. Pour cela, il faut que les explants soient placés dans des conditions appropriées.

La culture *in vitro* ou culture de tissus se définit comme l'ensemble des techniques qui permettent de faire croître en milieu artificiel (en éprouvette) des cellules spécialisés, ce qui représente une grande variété de tissus.

Par opposition à la culture en terre ou dans des substrats imbibés de solution nutritive, la culture *in vitro* se fait en laboratoire à l'abri de toute contamination cryptogamique, dans des récipients qui peuvent être tant des tubes à essai que des bocaux à conserve. Ces récipients sont placés dans un endroit où l'intensité de la lumière, la durée de l'illumination, la température et l'hygrométrie sont constamment contrôlées.

Afin de mieux comprendre la culture *in vitro* des tissus végétaux, il faut posséder quelques

notions sur la reproduction des végétaux. La reproduction chez les végétaux peut se faire de 2 manières : - la multiplication sexuée, à l'aide d'échanges génétiques : gamètes mâles X gamètes femelles = graine - la multiplication asexuée comme par bouturage où un seul petit fragment de tige ou de feuille peut redonner après développement, une plante entière. C'est précisément ce type de multiplication végétative qui est mis en pratique dans la culture *in vitro* de manière accéléré à l'abri de toutes contaminations par des bactéries ou par des champignons.

La culture *in vitro* végétale est possible parce que les cellules végétales présentent la potentialité de reproduire des individus complets identiques à la plante sur laquelle les cellules ont été prélevées. Cette propriété a été baptisée «totipotence cellulaire». La cellule animale présente aussi cette capacité mais à un degré moindre. Toutes les cellules d'un même organisme renferment dans leur noyau exactement les mêmes chromosomes, l'information génétique pour reconstruire l'organisme entier. Ce message héréditaire représente toutes les potentialités de l'individu. Cependant, à un moment donné de la vie embryonnaire, un choix va se faire, dans un groupe de cellules données, destiné à former un organe ayant une forme et une fonction précise. Une grande partie du message héréditaire va être mise en sommeil, dans un autre groupe, destiné à une autre fonction, c'est une autre partie du message qui sera occultée.

Le développement à partir d'une cellule simple va se faire par de nombreuses divisions cellulaires (mitose) et par le blocage ou le déblocage de certains gènes, les cellules orienteront leur développement vers une voie particulière qui formera soit un tissu, soit un organe ou autres éléments nécessaires à la future plante.

## **6.2 . Explants utilisés : méristèmes, feuilles, tiges, racines**

L'explant est une petite partie ou fragment du plante-mère, qui est mis en culture dans l'éprouvette. L'état sanitaire de cette plante conditionne la nature de l'explant.

- Si le plant-mère est malade, virosée, alors il faudra prélever un explant constitué de cellules méristématiques. Ce type d'explant est appelé indifférencier.
- Si le plant-mère est en santé, alors d'autres types d'explant pourront être prélevés, c'est explants sont appelés différenciés.

Cependant, il est important de noter que d'autres facteurs vont conditionner les réactions de

l'explant, l'âge ou le stade physiologique du plant-mère, la structure, la taille et l'emplacement de l'explant lui-même. En effet, des explants différents prélevés sur une même plante donnent des résultats différents sur un milieu identique.

L'explant peut être prélevé sur n'importe quelle partie du plant-mère à condition de renfermer des tissus vivants et de tenir compte de l'état du plant. Il y a plusieurs sortes d'explants :

-Les explants indifférenciés sont prélevés à l'apex de tige, de racine, de bourgeons, de nœuds,

-Les explants différenciés sont prélevés sur la tige, la feuille, la racine. Ces explants sont des structures constituées de cellules très spécialisées qui devront se déspecialiser avant de pouvoir régénérer la plante entière.

### 6.3. Le milieu de culture

Le milieu de culture est important pour la croissance. Il est le plus souvent une solution aqueuse rendue semi-solide ou moyen de gélose (agar). Remplaçant le sol et suppléant la plante, il doit contenir différents éléments. Très généralement il est composé d'une base comprenant des sucres (énergie), des éléments minéraux divers, des régulateurs de croissance, des vitamines, des composés organiques (acides aminés, polypeptides, ...).

La concentration de ces composés peut varier d'une espèce à l'autre, mais ces variations n'ont qu'une incidence faible sur les réactions des cellules. Les facteurs essentiels sont les régulateurs de croissance qui stimuleront la multiplication cellulaire et orienteront la morphogénèse.

Dans le milieu de culture, on retrouve des substances qui sont : - soit endogènes, c'est-à-dire qu'elles sont produits par la plante ;

-soit exogènes, c'est-à-dire des substances de synthèse ou artificiel mais dont l'effet est similaire.

Dans 70% des cultures, le milieu Murashige et Skoog (MS) est utilisé comme milieu de base pour tout type de culture in vitro. Ce milieu est essentiellement conseillé pour le déclenchement de l'organogénèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons, il s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux. Le milieu de Murashige et Skoog est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et par

une concentration élevée en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) dont 1/3 apporté sous forme réduite (ions  $\text{NH}_4^+$ ). Le rapport nitrate/ammonium, dans ce milieu est très favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique .

**Tableau 2 :** Milieu MS (Murashige et Skoog) 1962

Constituant	Solution mère (mg par litre)	Volume à ajouter (ml par litre)	Concentration finale (mg par litre)
<b>Macro-éléments 20X</b>		<b>50 ml</b>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	33 000		1 650
$\text{KNO}_3$	38 000		1 900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	8 800		440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7 400		370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 400		170
<b>Micro-éléments 100X</b>		<b>10 ml</b>	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 230		22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	860		8.6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	620		6.2
KI	83		0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	25		0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2.5		0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2.5		0.025
<b>Fer 100 X</b>		<b>10 ml</b>	
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	3 730		37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 780		27.8
<b>Acides aminée et vitamines 10 X</b>		<b>10 ml</b>	
Glycine	20 mg pour 100 L		2.0
Ac. Nicotinique	5 mg pour 100 L		0.5
Pyridoxine – HCl	5 mg pour 100 L		0.5
Thiamine – HCl	1 mg pour 100 L		0.1

<b>Sucres</b>			
Myo-inositol			100
Sucrose			30 000
<b>Agar</b>			10 000

## 6.4 Techniques de micropropagation, organogénèse, embryogénèse somatique

### 6.4 .1.Micropropagation

Les plantes se multiplient par multiplication végétative, ce dernier est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. La micropropagation in vitro apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé. La micropropagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une bonne garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours de repiquages successifs. Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforesteries .Elle a pour objectif de produire en grande quantité des cultivars d'intérêt horticole, sylvicole, ou agronomique qui viennent d'être créés ou découverts ou qui ont toujours un intérêt.

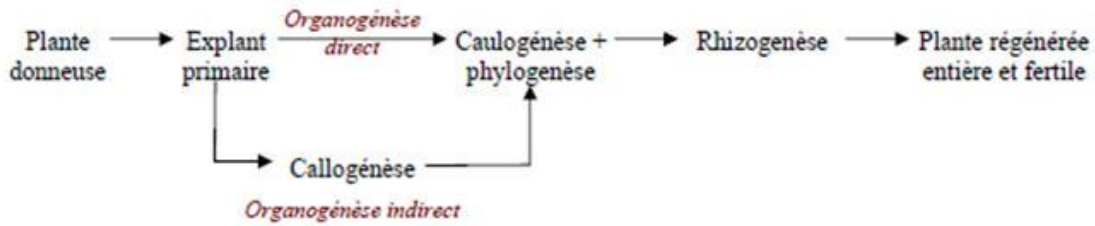
#### 6 .4.1.1 Organogénèse

L'organogénèse consiste à la néoformation d'organes, souvent ce terme est utilisé pour décrire la formation de bourgeons mais il s'applique également à des racines. Elle est la base fondamentale de la multiplication végétative qui s'appuie sur la formation de nouveaux méristèmes et peut être réalisée

soit par :

-La voie directe, qui conduit à la morphogénèse directe de tiges (caulogénèse) ou de racines (rhizogénèse) donnant ainsi naissance à des plantules viables, qui peuvent être acclimatées progressivement au milieu naturel.

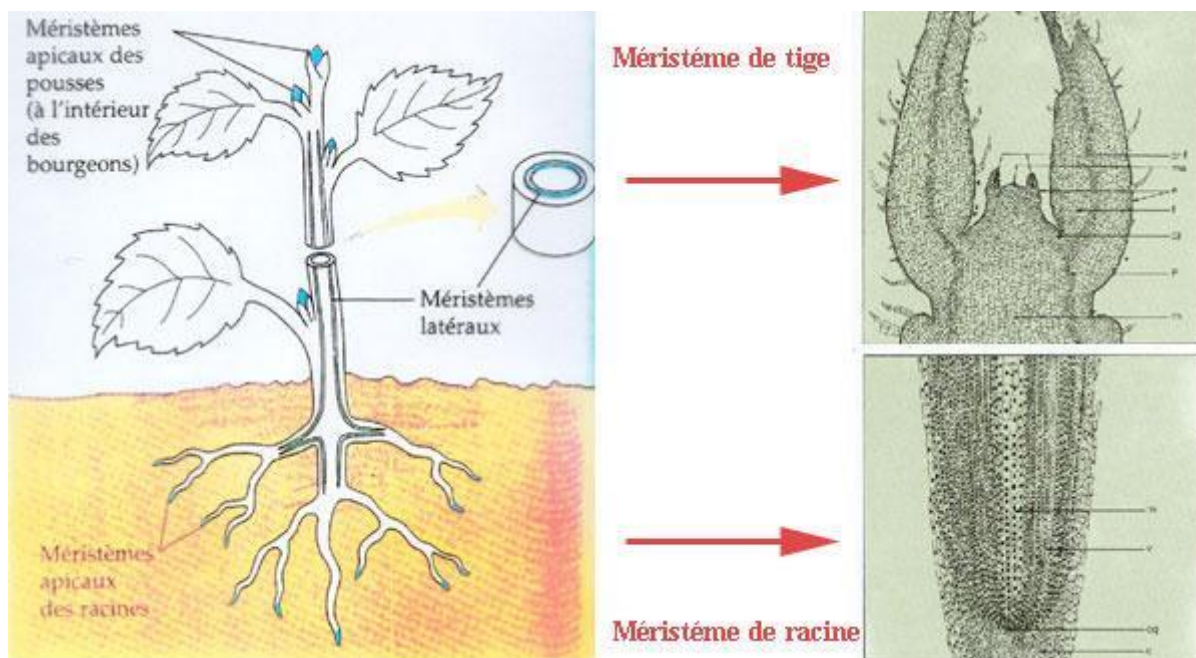
-La voie indirecte, qui passe d'abord par une callogénèse (la néoformation d'un cal, tissu cellulaire indifférencié) et dont l'organogénèse, suite à des repiquages, apparaît plus tardivement.



**Figure18** : Schéma de la régénération d'une plante

#### 6.4.1.2. Culture de méristème

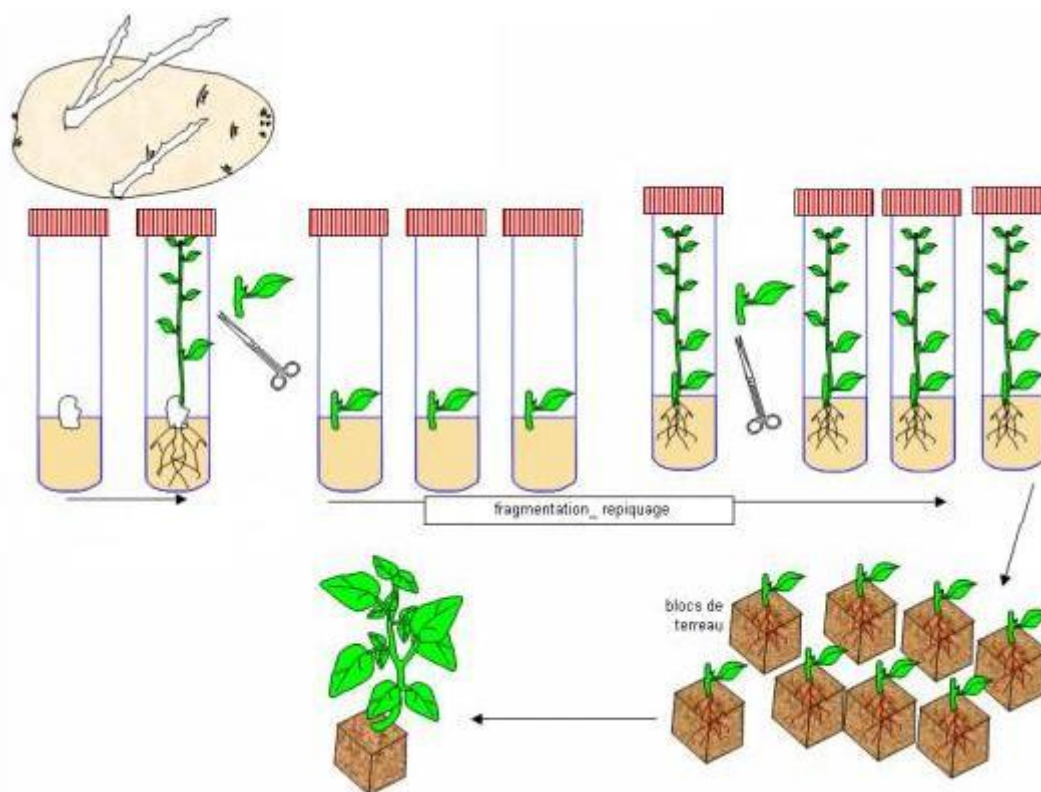
Culture de méristème Cette méthode consiste à prélever le cœur d'un bourgeon ou l'extrémité d'une racine où se trouve le méristème, zone de cellules qui se divisent activement pour assurer la croissance de la plante. Cette région est toujours dépourvue de virus, de bactéries ou de champignons, même chez les plantes contaminées. Cette méthode permet donc de créer des plants sains et a assuré le sauvetage de variétés entières des espèces tels que le Pélargonium, le dahlia, le chrysanthème, la pomme de terre, l'artichaut, le fraisier, framboisier. Contrairement aux techniques bouturages, marcottage,... car cette voie favorise la transmission des virus à la descendance disparition.



**Figure 19** : Méristème de tige et de racine.

### 6.4.1.3. Microbouturage

Le micro bouturage est la technique la plus répandue pour produire en un minimum de temps un maximum de plantes. L'explant sera repiqué sur un milieu permettant son développement en nouvelle plante qui se sera enracinée. Cette technique passe cependant par plusieurs étapes qui doivent être réalisées de manière la plus stérile possible. Le microbouturage est un mode de multiplication conforme qui accélère le fonctionnement normal des bourgeons formés sur une plante. La prolifération des méristèmes préexistants peut être réalisée en utilisant trois types d'explants: méristème, apex ou nœuds (unique ou multiple). Ils sont cultivés pour régénérer des pousses multiples sans passer par une phase cal. De nombreuses espèces ont été régénérées via le microbouturage.



**Figure 20 :** Schématisation du microbouturage .

#### *Principales étapes de microbouturage*

- L'établissement de la culture aseptique.
- La multiplication : on cherche le maximum d'unités de propagation dans un minimum de temps.

- Le changement de milieu de la plante : apport de nouvel élément indispensable au développement de la plante fille
- L'enracinement : c'est l'étape la plus délicate. On cherche à différencier des initiaux racinaires et provoquer leur développement.
- L'acclimatation en serre (10 à 60 jours) : on maintient une humidité très élevée au début, qu'on baisse progressivement jusqu'à atteindre l'humidité ambiante

### **Stade 1 : Conditionnement des plants mères**

Dans la description de cette technique on passe souvent sous silence le stade 1 qui contribue pourtant pour beaucoup au succès des stades suivants. Ce stade 1 réfère au conditionnement du plant mère. En effet, le plant mère devrait être dépourvu de carences minérales et en pleine turgescence donc sans stress hydrique important. Au mieux et dans presque tous les cas, le plant devrait être en croissance active, donc mis en culture en dehors de sa période de dormance. Ceci limite dans le calendrier de production, les dates préférables de mises en culture pour le stade d'initiation. Mais, une fois *in vitro*, ces plants pourront être multipliés à l'année longue. Aussi les plants mère choisis le seront en fonction de leur état sanitaire. Des plants infestés d'insectes peuvent apporter des problèmes de taille à toute une chambre de culture.

### **Stade 2 : Établissement d'une culture aseptique**

La littérature fournit souvent les premières informations essentielles au départ d'une culture. On trouve dans les livres ou revues spécialisés le détail des formulations (recettes) de milieux nutritifs convenant à de très nombreuses espèces végétales. Généralement les auteurs précisent aussi le protocole de désinfection de surface des explants ainsi qu'une description de l'explant mis en culture. Ce stade est de première importance puisqu'il comporte de nombreux facteurs critiques : Le choix du plant mère; Le choix du fragment végétal à mettre en culture; Une stérilisation de surface adéquate garantissant la survie de l'explant tout en assurant l'asepsie; · La découpe de l'explant et sa position sur la gélose; Le choix du milieu de culture qu'il est parfois nécessaire d'ajuster légèrement par la suite suivant la réponse de l'explant; · La qualité du travail en asepsie de la technicienne ou du technicien. Dans plus de 50 % des cas, les premiers essais de mise en culture sont très satisfaisants et demandent très peu ou pas d'ajustements. Pour certains autres cas, la difficulté réside dans la désinfection des végétaux, pour d'autres dans

l'ajustement de l'équilibre hormonal. Mais selon tous les auteurs, théoriquement tous les végétaux quels que soient leur espèce ou leur cultivar, peuvent être cultivés *in vitro*. Les explants les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en bourgeons ou en zones méristématiques potentielles. Ils varient selon les espèces :

Les feuilles (ex. Ficus, Saintpaulia, Bégonia...), les tiges (asperge, colza...);

Les bourgeons (fraisier, vigne, lilas,...);

Inflorescences (chou-fleur, gerbera, hosta, poireau ...).

La multiplication à partir de la croissance de bourgeons axillaires offre les meilleures chances de conserver les caractéristiques de l'espèce ou de la variété. En effet, cette technique ne fait qu'accélérer le fonctionnement normal des méristèmes de bourgeons déjà présents sur la plante. Par contre, on diminue les chances d'une stabilité génétique en provoquant l'apparition de bourgeons nouveaux (la plupart du temps à partir d'un cal, en des endroits inhabituels tels les feuilles, les tiges, les racines).

### **Stade 3 : La multiplication des tiges**

Cette étape s'effectue au repiquage des plantules obtenues au stade précédent. On veut ici accroître le nombre de plants d'un facteur de 4 à 5 à chaque cycle chez les ligneux, et d'un facteur de 4 à 12 chez les herbacées. Le milieu nutritif utilisé est souvent identique à celui du premier, bien qu'une différence parfois mineure s'observe dans la balance hormonale (équilibre auxine-cytokinine). Au stade de la multiplication, les cytokinines sont généralement présentes en plus grande concentration dans le milieu que les auxines. Ceci s'explique d'un point de vue physiologique par le fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale donc stimulent la croissance de nouvelles tiges. Encore une fois, la littérature fournie généralement les informations nécessaires nous permettant de fixer notre choix sur une formulation appropriée. La vitesse de croissance des plantes *in vitro* se module à celle *in situ*. Si l'espèce mise en culture est à croissance lente, on peut s'attendre à observer une croissance lente dans les tubes.

### **Stade 4 : La rhizogénèse (enracinement)**

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. Il arrive parfois que des espèces présentent un système racinaire plus ou moins développé au stade de la multiplication. Dans ce cas, il serait avantageux de faire des

essais pour le passage immédiat en acclimatation. On économise ainsi temps et argent s'il nous est possible de passer outre cette étape (ex. Bégonia, Saintpaulia, fougère). Toutefois, si ce stade s'avère nécessaire, le milieu de culture varie quelque peu des milieux précédents. Les sels minéraux et les vitamines demeurent généralement les mêmes. Mais dans le cas du rosier par exemple, on suggère de diminuer la concentration des sels minéraux de moitié. La différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines. Des tiges très feuillées et bien pourvues de bourgeons s'enracineront assez facilement dans un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. Les jeunes feuilles et les bourgeons sont des sites naturels de production d'auxine et à l'image des boutures traditionnelles, ces jeunes plantules sauront s'enraciner d'elles-mêmes. Par contre, certaines espèces exigent l'apport d'auxines afin de stimuler l'initiation de leurs racines. Cette auxine est souvent fournie sous forme d'AIA.

### **Stade 5 : L'acclimatation**

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à adapter progressivement les microplantules aux conditions qui prévalent dans la serre ou à l'extérieur. Après avoir éliminé la gélose de la base des plants, ils sont transférés dans un substrat horticole. Les parties aériennes sont ensuite recouvertes de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine les 100 % d'humidité relative. Les stomates de ces jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de transpiration de manière continue. Les risques de dessèchement sont très élevés. Aussi doit-on attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement.

#### **6.4.1.4. Embryogénèse somatique**

L'embryogénèse somatique est une forme de multiplication végétative permettant d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. Cette technique consiste alors à provoquer l'apparition d'embryons à partir des tissus végétaux mis en culture *in vitro* qui provoquent de nombreuses divisions cellulaires. Cette embryogénèse somatique génère alors des embryons dans ces divisions cellulaires ou dans les cals, c'est-à-dire un amas de cellules indifférenciées (qui ont été dédifférenciées sur l'explant de la plante mère avec le phénomène de totipotence végétale. Sous certaines conditions, les

cultures cellulaires s'organisent ensuite en nombreux petits massifs à structure bipolaire nommés embryons somatiques (avec un méristème de tige et un méristème de racine). Comme les embryons zygotiques (présents dans les graines), les embryons somatiques, obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation), se développent en un nombre illimité de plantes génétiquement identiques. C'est actuellement la technique la plus performante pour la multiplication végétative des conifères. Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés « embryons somatiques ». Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogenèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie. Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques. Dans d'autres cas, certaines cellules saprophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi l'embryons nucellaires. Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus. Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée, selon certains auteurs comme aux embryons obtenus à partir de culture de tissus *in-vitro* du sporophyte.

#### 4.4.2.2. Types d'embryogénèse somatique

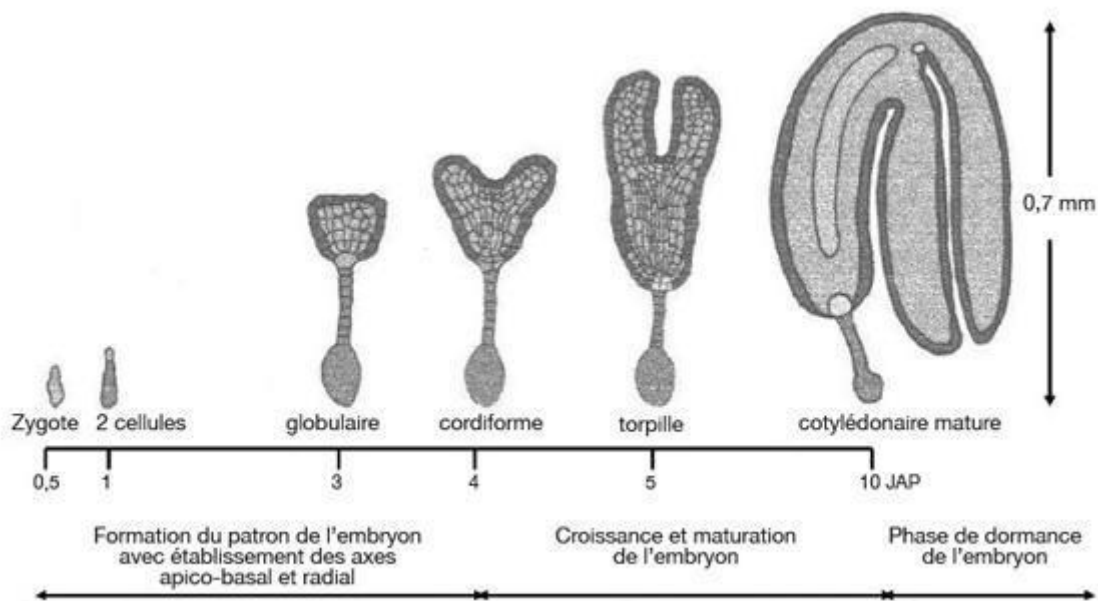
Il y'a deux types de l'embryogenèse somatique :

***Embryogenèse somatique directe*** : dans ce processus, les embryons somatiques se développent directement à partir des explants initiaux mis en culture sans qu'il y ait formation de cal. Ce processus est cependant rarement observé.

***Embryogenèse somatique indirecte*** : c'est un processus beaucoup plus fréquent et au cours duquel la formation d'embryons nécessite une callogénèse, caractérisée par une activité cellulaire élevée. Dans ce modèle, la formation d'embryons se fait à partir de cal.

### 6.2.3. Principales étapes de l'embryogénèse somatique

- Initiation des cultures embryogénies par culture de l'explant initial sur un milieu contenant des régulateurs de croissance surtout l'auxine avec souvent des cytokinines.
- Prolifération des cultures embryogénèse sur milieu solide contenant une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente. Pour La propagation à grande échelle, il est souvent préférable d'établir des suspensions cellulaires
- Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la formation des embryons et le début du développement.
- Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant de MS.
- Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.



**Figure21:** représentation schématique des principales phases du développement d'embryon somatique .

**Références bibliographique**

- Adolphe M. (1988). Base des méthodes de culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales: Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 1-8.
- Andrew Worth, Michael Balls et Robert Combes, *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*, Elsevier Science, 2019, 352 p. (ISBN 9780128136980)
- Anita Guerrini, *Experimenting with Humans and Animals : From Aristotle to CRISPR*, Baltimore, Johns Hopkins University Press, 2022, 216 p. (ISBN 9781421444055)
- Audrey Jouglà, *Profession : animal de laboratoire*, Paris, Éditions Autrement, 2015, 249 p. (ISBN 978-2-7467-4070-9, lire en ligne)
- Baeza-Squiban A. et Andréau K. (2014). Viabilité, cytotoxicité, génotoxicité. In Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 139-152.
- Berridge M.V., Herst P.M. et Tan A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology : new insights into their cellular reduction. *BiotechnolAnnuRev* 11:127-152.
- Burlinson B. (2012). The in vitro and in vivo comet assays. *Methods Mol Biol* 817:143-163.
- Cezard F. (2013). Milieux et matériels de culture cellulaire. In : *Biotechnologies en 27 fiches*. 2e édition. Paris : DUNOD. P. 5-11.
- Curtet-Benitski S. et Filiputti-Gilquin A.-L. (2014). Bonnes pratiques de culture cellulaire. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 118-127.
- Francelyne Marano, Philippe Hubert, Laure Geoffroy et Hervé Juin, *Quelles alternatives en expérimentation animale ?*, Quæ, 2020, 186 p. (ISBN 9782759231874).
- Freshney R.I. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, chapitre 12 : primary culture. 5e édition. John Wiley & Sons, Inc. P. 175-197.
- Froger B. et Adolphe M. (1988). Besoins nutritifs des cellules en culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales : Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 9-15.

- Georges Chapouthier et Françoise Tristani-Potteaux, *Le chercheur et la souris : la science à l'épreuve de l'animalité*, Paris, CNRS Éditions, 2013, 208 p. (ISBN 978-2-271-07818-6).
- Henri Barbe, *Trafiquants de chien*, Paris, FenniXX, 1996, 240 p. (ISBN 9782402178525),
- Houdebine, L. M. (2009). Les applications des animaux génétiquement modifiés (AGM). *Journal de la Société de Biologie*, 203(4), 323-328.
- Jean-Baptiste Jeangène Vilmer, *L'éthique animale*, Paris, Presses universitaires de France, coll. « Éthique et philosophie morale », 2008, 304 p. (ISBN 978-2-13-056242-9).
- Jean-Pierre Marguénaud, *Expérimentation animale, entre droit et liberté*, Versailles, Quae, 2011, 80 p. (ISBN 9782759209491, présentation en ligne
- Jean-Yves Bory, *La douleur des bêtes : La polémique sur la vivisection au XIXe siècle en France*, Rennes, Presses Universitaires de Rennes, 2013, 309 p. (ISBN 9782753527973
- Johnson S., Nguyen V. et Coder D. (2013). Assessment of cell viability. *Curr Protoc Cytom* 64: 9.2.1-9.2.26.
- Jones L.J., Gray M., Yue S.T., Haugland R.P. et Singer V.L. (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254:85-98.
- Langdon S.P. (2004). Basic Principles of Cancer Cell Culture. In : *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 3-15.
- Langdon S.P. (2004). Cell Culture Contamination : An Overview. In : *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 309-317.
- Laurent Bègue-Shankland, *Face aux animaux : Nos émotions, nos préjugés, nos ambivalences*, Paris/61-Lonrai, Odile Jacob, 2022, 339 p. (ISBN 9782415001841,
- Macleod K.G. et Langdon S.P. (2004). Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In : *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 17-29.

- Mather J.P. et Roberts P.E. (1998). Introduction to Cell and Tissue Culture : Theory and Technique. Chapitre 2,3,4 et 7. New York et London : Plenum Press. 241 pages.
- Niles A.L., Moravec R.A., EricHesselberth P., Scurria M.A., Daily W.J. et Riss T.L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem* 366:197-206.
- Philippeos C., Hughes R.D., Dhawan A. et Mitry R.R. (2012). Introduction to cell culture, chapter 1. In Mitry R.R. et Hughes R.D. *Human Cell Culture Protocols*, volume 806, *Methods in Molecular Biology*. P. 1-13.
- Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O, « Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, nos 14–15, 2011, p. 1300–31 (PMID 21893135, PMCID 7103316, DOI 10.1016/j.addr.2011.08.002)
- Plumb J.A. (2004). Cell Sensitivity Assays : Clonogenic assay. In : Longdson S.P. *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 159-164.
- Plumb J.A. (2004). Cell Sensitivity Assays : The MTT Assays. In : Longdson S.P. *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 165-170.
- Rick Bogle (trad. de l'anglais par Nicolas Marty), *On fonctionne tous de la même manière : L'utilisation des animaux à l'Université de Wisconsin-Madison* [« "We All Operate in the Same Way" – The Use of Animals at the University of Wisconsin-Madison »], Auto-édition, Bookelis, 2021, 660 p. (ISBN 979-10-359-3356-2,
- Robert M. Baird (dir.) et Stuart E. Rosenbaum (dir.), *Animal Experimentation : The Moral Issues*, Prometheus Books, 1991, 182 p. (ISBN 978-0-879-75667-3).
- Roland Cash, *L'expérimentation animale en question : Accélérer la transition vers une recherche sans animaux*, Paris, Éditions Matériologiques, 2022, 293 p. (ISBN 978-2-37361-357-5
- Ronot X., KadriM. et Martel-Frchet V. (2014). Cryopréservation des cellules. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. *Culture de cellules animales*. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 128-136.

-Ryan J.A. (2007). Introduction à la culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences).

-Ryan J.A. (2007). Les bonnes pratiques de culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences).

-Sigma Aldrich (2016). Fundamental techniques in cell culture. Handbook. 3e édition. 80 pages.

-Sumantran V. M. (2011). Cellular Chemosensitivity Assays : An overview, In : CREE I.A.(ed), Cancer Cell Culture : Methods and Protocol, Methods in Molecular Biology, volume 731.2e édition.Totowa :Humana Press Inc. P. 219-236.