

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE FERHAT ABBAS - SETIF 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



Polycopié

Préparé par : Dr. NAMOUNE Imane

Intitulé

**Techniques de culture, d'Analyses de cellule et
Applications en Santé**



Ce polycopié est destiné aux étudiants de:

1^{ère} année Master Biotechnologie et Santé

Année universitaire : 2025/2026

AVANT-PROPOS

Enseignante à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, au Département de Biotechnologie de l'Université de Sétif 1 depuis le 03 septembre 2023, j'ai assuré un ensemble varié d'enseignements couvrant plusieurs modules. J'ai ainsi été chargée de cours magistraux, de travaux dirigés (TD) et de travaux pratiques (TP) dans les matières suivantes : Techniques de culture, Analyses cellulaires et applications en santé, Ingénierie des protéines, Sciences de la vie et impacts socio-économiques, Biologie végétale et Enzymologie.

Dans le cadre de la préparation de mon habilitation universitaire en vue de l'accès au grade de Maître de Conférences A, j'ai choisi de présenter un polycopié portant sur le module **« Techniques de culture, d'analyses de cellules et applications en santé »**.

Ce module constitue une unité fondamentale du programme de première année Master « Biotechnologie et Santé » à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biotechnologie, Université de Sétif 1. Il représente également un prérequis essentiel pour les enseignements de deuxième année Master recherche, ainsi que pour la réalisation des travaux de mémoire de fin d'études et, à plus long terme, des travaux doctoraux. En effet, la maîtrise des techniques de culture cellulaire permet à l'étudiant de développer des compétences indispensables pour la conduite de projets de recherche expérimentale.

Ce cours vise à développer chez les étudiants un ensemble de compétences scientifiques et techniques, notamment :

- Être capable de réaliser une culture cellulaire avec succès en laboratoire ;
- Maîtriser la manipulation et la culture de différents types cellulaires en fonction de leur origine, des objectifs de recherche et de la nature des travaux ;
- Identifier et résoudre les problèmes rencontrés lors des manipulations, et choisir les méthodes les plus adaptées aux objectifs scientifiques.

L'étudiant développera progressivement ces compétences en mobilisant des connaissances théoriques, des savoir-faire techniques et un savoir-être professionnel rigoureux.

À l'issue de cet enseignement, l'étudiant sera capable de :

❖ **En termes de connaissances :**

- Maîtriser la terminologie et les notions fondamentales de la culture cellulaire, facilitant ainsi l'acquisition de connaissances plus avancées.

❖ **En termes de savoir-faire :**

- Manipuler et entretenir des cultures cellulaires ;
- Assurer le passage de cultures primaires à des cultures secondaires ;
- Appliquer des protocoles adaptés au type cellulaire et aux objectifs de recherche, notamment en préparant correctement les milieux de culture.

❖ **En termes de savoir-être :**

- Respecter les exigences liées à la culture cellulaire, notamment les conditions de stérilité et d'asepsie ;
- Faire face aux difficultés expérimentales, en particulier les risques de contamination.

Enfin, cet enseignement est structuré autour de cinq axes principaux :

- I. Généralités sur la culture cellulaire ;
- II. Techniques de culture cellulaire ;
- III. Équipements et conditions de la culture cellulaire ;
- IV. Méthodes d'étude des cellules en culture ;
- V. Outils de transfert génétique et systèmes d'expression des protéines recombinantes.

Le programme de la présente matière est comme suit :

SOMMAIRE

Chapitre I

1. Introduction.....	01
1.1. Définition de la culture cellulaire.....	01
1.2. Événements historiques dans le développement de la culture cellulaire.....	02
2. Avantages et inconvénients de la culture cellulaire.....	04
2.1. Avantages de la culture cellulaire.....	04
2.2. Inconvénients de la culture cellulaire.....	04
3. Applications de la culture cellulaire en santé.....	05
4. Types de cellules cultivées.....	06
5. Statuts physiologiques des cellules <i>in vitro</i>	07

Chapitre II

1. Introduction.....	11
2. Origine et obtention des cellules.....	11
2.1. Origine des cellules.....	11
2.2. Obtention de cellules.....	11
2.2.1. Culture primaire.....	11
2.2.2. Culture secondaire.....	14
2.2.3. Acheter ou emprunter.....	16
3. Lignées cellulaires.....	16
3.1. Lignées cellulaires finies.....	17
3.2. Lignées cellulaires immortalisées.....	17
3.2.1. Exemples des lignées cellulaires immortalisées.....	19
4. Croissance des cellules en culture cellulaire.....	21
4.1. Croissance des cellules en culture normale.....	21
4.2. Croissance des cellules en lignées cellulaires immortalisée.....	23
5. Méthodes de culture.....	24
5.1. Culture stationnaire ou monocouche.....	24
5.2. Cultures cellulaires en suspension.....	26

Chapitre III

1. Introduction.....	28
2. Infrastructures et équipements.....	28
2.1. Hotte.....	28
2.2. Incubateurs.....	30
2.3. Centrifugeuses.....	30
2.4. Réfrigérateurs et congélateurs.....	31
2.5. Microscopes.....	31
2.6. Congélateur d'azote liquide.....	32
2.7. Contenants de culture tissulaire.....	33
3. Conditions de la culture cellulaire.....	34
3.1. Paramètres physico-chimiques.....	35
3.2. Milieu de culture.....	35
3.2.1. Les milieux empiriques.....	36
3.2.2. Les milieux définis.....	37

Chapitre IV

1. Introduction.....	48
2. Méthodes d'évaluation de la viabilité cellulaire.....	48
2.1. Méthodes basées sur l'activité métabolique.....	49
2.2. Méthodes basées sur l'accumulation de colorants.....	50
3. Méthodes d'évaluation de la cytotoxicité.....	51
3.1. Méthodes basées sur l'intégrité membranaire.....	51
3.1.1. Méthodes utilisant l'exclusion de colorants vitaux.....	51
3.2. Méthodes basées sur la libération d'enzymes.....	52
3.2.1. Test de la lactate déshydrogénase (LDH).....	52
4. Méthodes combinées (viabilité / cytotoxicité).....	53
4.1. Test base sur le double marquage fluorescent.....	53
4.2. Tests basés sur l'activité protéasique.....	54
5. Méthodes d'étude de la prolifération cellulaire.....	55
5.1. Dénombrement cellulaire.....	55
5.2. Quantification des acides nucléiques.....	56
5.3. Incorporation d'un précurseur de l'ADN.....	56
6. Analyse du cycle cellulaire.....	57
7. Méthodes d'étude de la génotoxicité.....	58

Chapitre V

I. Construction d'un système d'expression.....	63
I. 1. Introduction.....	63
I.2. Mécanismes de transfert de matériel génétique.....	63
I.2.1. La transformation.....	63
I.2.1.1. Mise en évidence.....	63
I.2.2. Exigences de la transformation.....	65
I.2.2.3. Mécanisme de la transformation bactérienne.....	66
I.2.2.4. Conséquences de la transformation bactérienne.....	67
I. 2.2. La transduction.....	68
I.2.2.1. Mise en évidence.....	68
I.2.2.2. Exigences de la transduction.....	69
I.2.2.3. Types de transduction.....	69
I.2.2.4. Conséquences biologiques.....	71
I.2.3. La transfection.....	71
I.2.3.1. Définition.....	71
I.2.3.2. Méthodes de transfert directe de gène.....	72
II. Systèmes d'expression.....	79
II.1. Introduction.....	79
II.2. Production en cellules procaryotes.....	80
II.3. Systèmes d'expression eucaryotes.....	84
II.3.1. Production dans les eucaryotes inférieurs.....	84
II.3.2. Production dans les eucaryotes supérieurs.....	85
II.3.3. Production dans les plantes.....	93

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1. Différentes sources de cellules.....	01
Figure 2. Types de cellules cultivées.....	07

Chapitre II

Figure 1. Culture d'un explant.....	12
Figure 2. Dissociation mécanique et enzymatique.....	14
Figure 3. Culture secondaire.....	14
Figure 4. Culture cellulaire primaire et secondaire.....	15
Figure 5. Passage de la culture primaire à la culture secondaire.....	16
Figure 6. Immortalisation cellulaire par fusion membranaire induite par le PEG.....	18
Figure 7. Immortalisation cellulaire par un agent oncogène.....	18
Figure 8. Durée de vie limitée des lignées cellulaires finies et immortalisées.....	24
Figure 9. Culture de cellules sur support.....	25
Figure 10. Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse,.....	26

Chapitre III

Figure 1. Hotte à flux laminaire vertical HEPA.....	29
Figure 2. Hotte de type II ou poste de sécurité microbiologique (PSM).....	29
Figure 3. Model d'un incubateur à CO ₂	30
Figure 4. Centrifugeuse.....	31
Figure 5. Microscope inversé.....	32
Figure 6. Congélateur d'azote liquide.....	33
Figure 7. Types de contenants utilisés en culture cellulaire <i>in vitro</i>	33
Figure 8. Stérilisation du matériel par un autoclave (à droite) Stérilisation des milieux par un Filtre à membrane de 0,22 µm assemblé dans un porte-filtre (à gauche).....	34
Figure 9. Les pipettes avec une certaine forme d'aide à l'aspiration sont pratiques pour transférer de plus grands volumes.....	34
Figure 10. Les variations de couleur du rouge de phénol en fonction du pH.....	36
Figure 11. Les milieux de cultures les plus utilisés.....	40
Figure 12. Contaminations microbiennes dans les cultures de cellules de mammifères.....	41

Figure 13. Cellules de mélanome natif infectées par le mycoplasme.....	43
Figure 14. Fibroblastes humains normaux (en forme d'orbite) contaminés de façon croisée par Hela.....	44

Chapitre IV

Figure 1. Accumulation du rouge neutre dans les lysosomes des cellules vivante.....	50
Figure 2. Principe du test lactate déshydrogénase (LDH).....	53
Figure 3. Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes par le test calcéine-acetomethoxyl (AM) + iodure de propidium.....	54
Figure 4. Test de viabilité/cytotoxicité.....	55
Figure 5. Dénombrement cellulaire.....	55
Figure 6. Principe de quantification des acides nucléiques avec le Cyquant GR.....	56
Figure 7. Principe de détection fluorimétrique basé sur l'incorporation de l'EdU.....	57
Figure 8. Les quatre phases successives d'un cycle cellulaire standard d'une cellule eucaryote.....	58
Figure 9. Principe du test comète.....	59

Chapitre V

Figure 1. Expérience de transformation de Griffith.....	65
Figure 2. Étapes de la transformation.....	67
Figure 3. Transduction généralisée.....	70
Figure 4. Transduction spécialisée.....	71
Figure 5. Principales méthodes d'introduction de substances dans une cellule eucaryote.....	72
Figure 6. Transfert de gènes par l'intermédiaire de liposomes.....	75
Figure 7. Transfert de gène par à un champ électrique.....	75
Figure 8. Schéma du canon à particules.....	77
Figure 9. Dispositif permettant la micro-injection d'ADN dans des protoplastes végétaux.....	78
Figure 10. Vecteur d'expression typique destiné aux cellules animales.....	86
Figure 11. Structure et différentes formes du baculovirus, en particulier le <i>Multicapsid nucleopolyhedrovirus</i>	89
Figure 12. Expression localisée et transitoire de la protéine d'intérêt par la technique d'agro-infiltration.....	96

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre II

Tableau 1. Lignées cellulaires immortalisées les plus utilisées en recherche biomédicale.....	21
--	-----------

Chapitre III

Tableau 1. Caractéristiques des milieux standards en culture cellulaire animale.....	40
Tableau 2. Bonnes pratiques de biosécurité en laboratoire de culture cellulaire.....	46

Chapitre IV

Tableau 1. Tableau comparatif des tests de viabilité cellulaire MTT, XTT et WST-1.....	49
Tableau 2. Comparaison entre le bleu de trypan et l'iodure de propidium (PI).....	52

Chapitre V

Tableau 1. Exemples de protéines recombinante thérapeutiques produites dans différents systèmes d'expression.....	80
Tableau 2. Protéines recombinantes en phase cliniques produites par des animaux transgéniques.....	92
Tableau 3. Comparaison des différents systèmes d'expression de protéines recombinantes.....	95

Chapitre I

Généralités sur la culture cellulaire

1. Introduction

La culture cellulaire est devenue un des outils majeurs utilisés aujourd'hui dans les sciences de la vie. En effet, les cellules en culture constituent un matériel d'étude très important. Grâce aux avantages qu'elles offrent, les cellules continuent à être précieuses pour la recherche fondamentale et pour les applications directes. Les scientifiques ont mis au point le procédé de culture cellulaire pour cultiver des micro-organismes en dehors de leur milieu d'origine, dans des conditions contrôlées. Plusieurs types de cellules peuvent être cultivés : des micro-organismes unicellulaires (bactéries, levures, etc.) et des cellules provenant d'organismes pluricellulaires (végétaux et animaux). Mais en pratique, il se réfère à la culture de cellules dérivées de **cellules animales** (**Figure. 1**). Actuellement, les progrès technologiques jouent un rôle primordial pour relever les nouveaux défis complexes, et la manière dont les cellules sont cultivées in vitro.

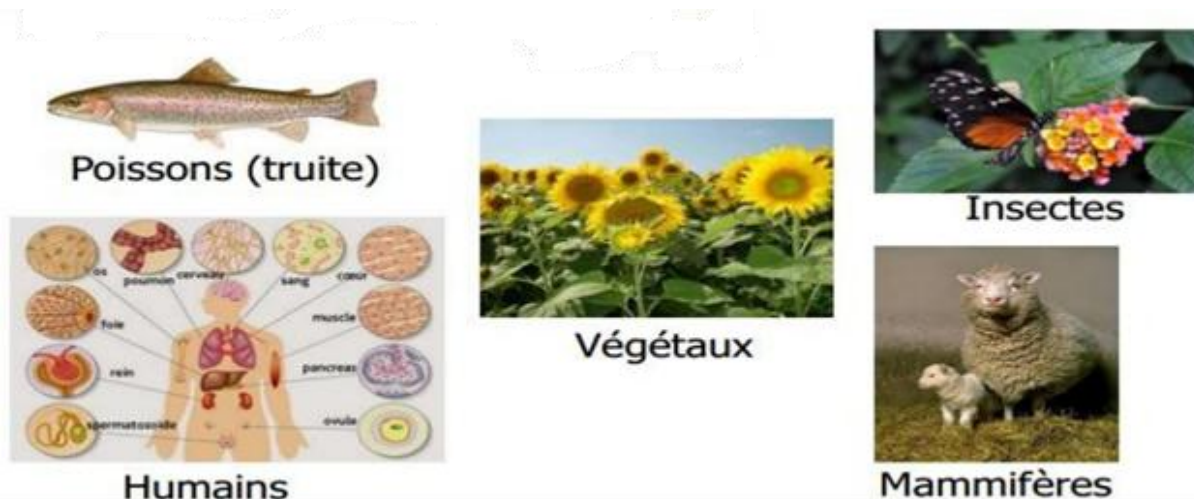


Figure 1. Les différentes sources de cellules

1.1. Définition de la culture cellulaire

Culture cellulaire : Qu'est-ce?

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.

1.2. 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.

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

1948 : Earle isola des fibroblastes L de souris qui formèrent des clones à partir de cellules individuelles.

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

1980: Régulation de la croissance des gènes et contrôle de la croissance.

1983 : Immortalisation cellulaire par SV40.

1990: Culture à l'échelle industrielle de cellules transfectées, pour la production de produits pharmaceutiques.

2000: Human genome project : génomique protéomique, déficiences génétiques et défauts d'expression.

2007: Reprogrammation de cellules adultes en cellules souches pluripotentes (iPS).

2010: L'Institut National des Sciences et Techniques Industrielles Avancées (AIST, JAPON) et Kawasaki Heavy Industries ont présenté le premier robot (dit R-CPX, pour Robotized - Cell Processing eXpert system) capable de cultiver conjointement des cellules venant de plusieurs personnes.

Depuis les années 2010, l'émergence des systèmes de culture tridimensionnelle (3D), notamment basés sur des matrices de type gel, a permis des avancées majeures dans la culture de structures pluricellulaires. Ces technologies ont notamment favorisé le développement des **organoïdes**, modèles cellulaires complexes reproduisant certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles des organes **in vitro**.

- **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 trypsine pour éliminer les cellules adhérentes à la sous-culture plus loin du récipient de culture.
- **Le troisième** était l'utilisation d'un milieu de culture chimiquement défini.

2. Avantages et inconvénients de la culture cellulaire

2.1. Avantages de la culture cellulaire

➤ **Contrôle de l'environnement**

La culture cellulaire permet de contrôler précisément les conditions de culture, comme la température, le pH, et la composition du milieu nutritif, ce qui conduit à une uniformité des cellules et réduit les variations inhérentes aux organismes entiers.

➤ **Reproductibilité**

En maintenant des conditions contrôlées, les caractéristiques des cellules peuvent être conservées sur plusieurs générations, assurant une meilleure reproductibilité entre les expériences et les laboratoires.

➤ **Exposition à des stimuli contrôlés**

Les cultures cellulaires peuvent être exposées à des réactifs spécifiques, comme des produits chimiques ou des médicaments, à des concentrations bien définies, ce qui n'est pas possible avec un organisme animal entier.

➤ **Éthique et morale dans la culture cellulaire**

L'utilisation de cultures cellulaires évite les problèmes juridiques, moraux et éthiques associés à l'expérimentation sur les animaux.

2.2. Inconvénients de la culture cellulaire

- Devoir développer des techniques standardisées afin de maintenir des cellules reproductibles saines pour les expériences.
- Prendre 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.

3. Applications de la culture cellulaire en santé

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.

➤ Systèmes de modèles

Les domaines où la technologie de culture cellulaire joue actuellement un rôle majeur pour étudier :

- La biologie cellulaire fondamentale,
- Les interactions entre agents pathogènes et cellules,
- Les effets des médicaments sur les cellules,
- Le processus et le déclenchement du vieillissement et les études nutritionnelles.

➤ Essais de toxicité

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.

➤ Recherche sur le cancer

Étudier la fonction de divers produits chimiques, virus et rayonnements pour convertir des 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.

➤ 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.

➤ La cellule comme usine de production

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, l'hépatite B, etc.

- 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. Pour la greffe de moelle osseuse et la fécondation in vitro.

➤ **Génie génétique**

La capacité de transfecter ou de reprogrammer des cellules en culture par l'introduction de matériel génétique exogène (ADN) constitue un outil central en biologie moléculaire. Elle permet non seulement d'analyser avec précision les effets de l'expression génique sur le fonctionnement cellulaire, mais également de produire efficacement des protéines recombinantes en grande quantité. Parmi les systèmes d'expression disponibles, les cellules d'insectes, utilisées en association avec des baculovirus génétiquement modifiés, se distinguent par leur grande efficacité et leur aptitude à synthétiser des protéines complexes. Elles représentent ainsi de véritables plateformes de production, largement exploitées en recherche fondamentale et en biotechnologie.

4. **Types de cellules cultivées**

Les cellules cultivées sont généralement classées selon leur morphologie (forme et aspect) ainsi que leurs caractéristiques fonctionnelles. On distingue principalement trois types morphologiques :

➤ **Cellules de type épithélial :**

Ces cellules adhèrent à un substrat et présentent une forme plate et polygonale. Elles forment souvent des monocouches organisées, rappelant les tissus épithéliaux.

➤ **Cellules de type lymphoblastique :**

Ces cellules ne s'attachent pas au substrat et se développent en suspension. Elles ont une forme généralement sphérique et sont typiques de certaines cellules sanguines ou immunitaires.

➤ **Cellules de type fibroblastique :**

Ces cellules adhèrent au support de culture et présentent une morphologie allongée, fusiforme ou bipolaire. Elles sont souvent associées aux tissus conjonctifs.

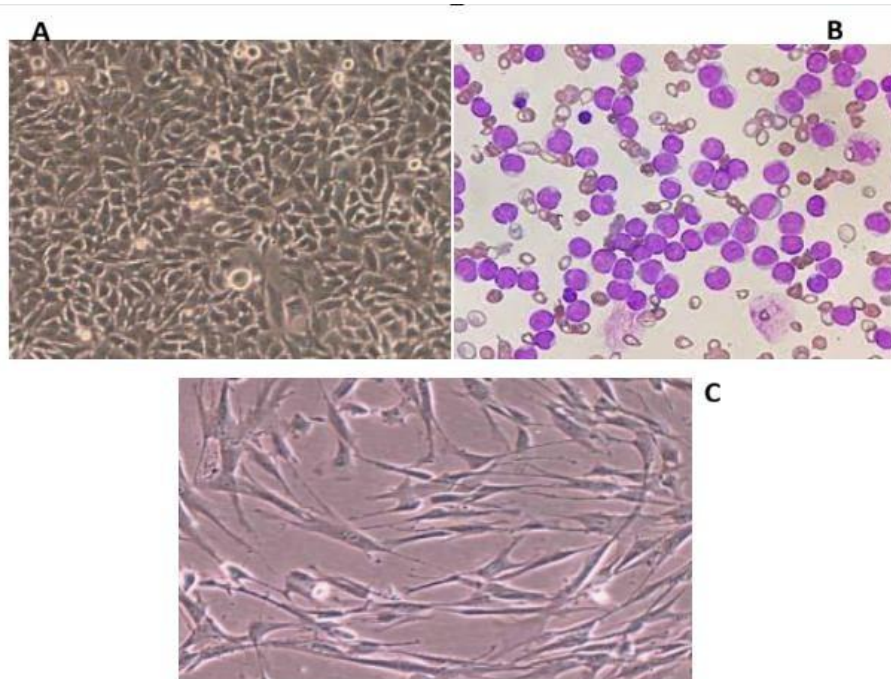


Figure 2. Types de cellules cultivées A: Cellules épithéliale, B:Cellules lymphoblastique, C: Cellules fibroblastique

5. Statuts physiologiques des cellules *in vitro*

➤ Cellules normales

En culture cellulaire, on appelle cellules normales, des cellules qui ne diffèrent en aucune façon de celles trouvées dans un organisme sain et intact. Par définition, des cellules normales présentent les caractéristiques suivantes :

- **elles ont un caryotype euploïde**, normal, ne comportant aucune anomalie chromosomique de nombre ou de structure visualisable par cytogénétique,
- **elles subissent la sénescence** ou vieillissement cellulaire après un nombre fini de divisions ; un nombre plus ou moins important, qui diffère d'un type cellulaire à un autre.

➤ Cellules transformées

En culture cellulaire, on appelle cellules transformées des cellules qui possèdent les propriétés des cellules cancéreuses *in vivo*. Elles s'opposent en tous points aux cellules normales. On peut considérer comme cellules transformées des cellules capables de :

- **provoquer l'apparition de tumeurs malignes** quand elles sont greffées à des hôtes appropriés,

- **avoir une multiplication indépendante de l'ancrage** : très souvent les cellules transformées peuvent se multiplier sans être obligées d'adhérer à un support solide. Elles peuvent former des colonies quand on les cultive en suspension dans de l'agarose nutritive semi-molle,
- **perdre la propriété de l'inhibition de contact** : les cellules transformées cultivées en monocouche continuent à se multiplier quand elles ont atteint la confluence, état dans laquelle la totalité de la surface de culture est remplie ; les cellules normales ne le peuvent pas et cessent de se diviser dans ces conditions.

➤ **Cellules non-transformées**

On donne le nom de « cellule non-transformée » à celles qui n'ont aucune des propriétés des cellules manifestement malignes. Il n'est pas facile de tracer la frontière entre le monde des cellules transformées et celui des cellules non-transformées. En effet, ces dernières présentent des propriétés intermédiaires entre cellules normales et cellules transformées. Cela suggère que la transformation cancéreuse est un processus multi-étapes dans lequel le statut « non-transformée » est une étape intermédiaire avant la transformation. Ce terme s'applique aux cellules aneuploïdes et immortelles qui se multiplient indéfiniment en culture : caractéristiques des cellules transformées, mais elles ont une multiplication dépendante de l'ancrage et présentent le phénomène d'inhibition de contact : caractéristiques des cellules normales. Ces cellules acquièrent plus facilement des propriétés de cellules transformées après exposition à des cancérogènes. Elles ne provoquent pas de tumeurs même lorsqu'on les greffe à des souris « nude » avec une déficience congénitale du thymus.

Références bibliographiques

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York: Garland Science; 2015.
2. Aschner M, Costa LG, editors. *Cell culture techniques*. New York: Springer; 2019.
3. Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. 7th ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2016.
4. Jedrzejczak-Silicka M. History of cell culture. In: Gowder SJT, editor. *New insights into cell culture technology*. InTech; 2017.
5. Littlewood T. Cell biology aspects of safety in cell culture. In: Stacey G, Doyle A, Hambleton P, editors. *Safety in cell and tissue culture*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1998; 26–48.
6. Mather JP, Roberts PE. *Introduction to cell and tissue culture: Theory and technique*. New York: Plenum Press; 1998.
7. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16–26.
8. Stacey G, Doyle A, Hambleton P. *Safety in cell and tissue culture*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1998.
9. Swain P. Basic techniques and limitations in establishing cell culture: a mini review. *Adv Anim Vet Sci*. 2014;2(4):1–10.

Chapitre II

Techniques de culture cellulaire

1. Introduction

La culture cellulaire est une technique fondamentale en biologie cellulaire et en biotechnologie, permettant de maintenir et de faire proliférer des cellules *in vitro* dans des conditions contrôlées. Elle constitue un outil essentiel pour l'étude des mécanismes cellulaires, l'analyse fonctionnelle des gènes, ainsi que pour de nombreuses applications en recherche biomédicale et en production biologique.

La réussite d'une culture cellulaire dépend de plusieurs facteurs, notamment l'origine des cellules, les méthodes d'isolement, les conditions de culture et les techniques de maintenance.

2. Origine et obtention des cellules

2.1. Origine des cellules

Au sein d'un organisme vivant, il existe deux types de cellules :

- **Cellules en suspensions** (Les cellules circulantes ou libres) : Les cellules hématopoïétiques telles que certaines cellules du sang sont des cellules à développement rapide et faciles à prélever sur un animal ou un humain. Les cellules du sang sont faciles à prélever : une prise de sang sur anticoagulant (type héparine/EDTA) permettra d'en récupérer des quantités plus ou moins importantes selon le volume de sang. Les cellules circulantes sont ensuite récupérées par centrifugation sur ficoll (séparation selon la densité).
- **Cellules adhérentes** (Les cellules organisées en tissu) : Les cellules d'intérêt peuvent aussi faire partie d'un organe, qu'il va falloir dissocier. Les méthodes diffèrent selon les organes et les cellules à en extraire, mais généralement, il faut détruire l'architecture de l'organe, mécaniquement par dissection ou enzymatiquement, puis séparer les cellules d'intérêt des cellules gênantes.

2.2. Obtention de cellules

2.2.1. Culture primaire

Lorsque des cellules sont prélevées chirurgicalement à partir d'un organisme et mises en culture dans des conditions appropriées, elles adhèrent au support, entrent en division et prolifèrent progressivement. Ce processus est appelé culture primaire ou primoculture. La phase initiale de multiplication cellulaire peut nécessiter plusieurs jours avant d'atteindre une croissance significative.

Il existe deux principales méthodes permettant d'initier une culture primaire (1) :

a) 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.

- **Méthode de Carrel** : La méthode de Carrel est une technique d'explantation utilisée pour initier des cultures primaires. Elle consiste à prélever un fragment de tissu, qui est ensuite découpé en très petits morceaux de forme rectangulaire. Ces fragments sont déposés à la surface d'un milieu constitué d'un mélange de deux gouttes de plasma de coq et de deux gouttes d'extrait embryonnaire à 50 %. Après une incubation d'environ 24 heures à l'étuve, les premières cellules commencent à migrer à partir de l'explant vers le support de culture, marquant ainsi le début de la prolifération cellulaire.
- **Méthode de dissection (méthode des explants)** : La méthode de dissection, également appelée méthode des explants, consiste à fragmenter le tissu en petits morceaux d'environ 1 à 4 mm³, qui sont ensuite réduits davantage à l'aide de pinces fines. Ces fragments sont déposés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif approprié. Les cellules migrent progressivement à partir des différents explants, s'attachent au support de culture, puis entrent en prolifération. Cette technique permet ainsi d'obtenir une culture primaire à partir de la croissance cellulaire issue des fragments tissulaires (**Figure. 1**).

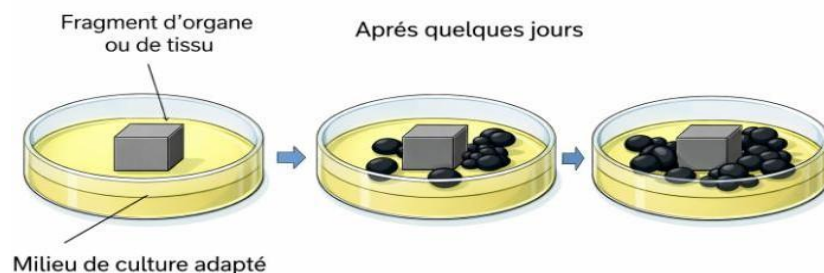


Figure 1. Culture d'un explant.

- **La méthode de Jensen** : est une technique de culture d'explants relativement peu utilisée. Elle consiste à déposer des fragments tissulaires de petite taille (environ 1 mm³) sur un disque de papier filtre, lui-même placé sur un support métallique dans une boîte de Pétri. Les cellules issues de la prolifération du tissu migrent à travers les pores du papier filtre et viennent se fixer au fond de la boîte. Cette approche présente l'avantage de maintenir une séparation constante entre l'explant et les cellules migrantes, ce qui permet d'éviter l'étape délicate consistant à éliminer l'explant lorsque la culture atteint un stade subconfluent.

- **La méthode mécanique:** est couramment utilisée pour la dissociation des tissus mous, notamment le thymus et la rate. Elle repose sur une désagrégation physique du tissu afin d'obtenir une suspension cellulaire. Le tissu est d'abord fragmenté par frottement sur une grille adaptée, permettant la libération des cellules. La suspension obtenue est ensuite filtrée afin d'éliminer les débris tissulaires, puis soumise à une centrifugation pour récupérer les cellules. Par ailleurs, une dissociation complémentaire peut être réalisée par dilacération à l'aide d'une pipette en verre, en effectuant des cycles répétés d'aspiration et de refoulement, ce qui favorise la dispersion cellulaire.

b) Méthode enzymatique

Les enzymes utilisées pour la dissociation cellulaire à partir des tissus sont principalement des enzymes protéolytiques, telles que la trypsine et la collagénase. Elles dégradent la matrice extracellulaire, essentiellement constituée de protéines, qui assure la cohésion entre les cellules. Ce processus permet d'obtenir une suspension de cellules individuelles, qui sont ensuite mises en culture dans un milieu nutritif approprié afin de favoriser leur survie, leur croissance et leur prolifération.

Le protocole expérimental comprend les étapes suivantes :

- Dissection du tissu dans une solution saline afin de préserver l'intégrité cellulaire ;
- Lavage du tissu pour éliminer les résidus sanguins et les cellules mortes ;
- Traitement enzymatique par addition de trypsine sous agitation lente à 37 °C ;
- Inactivation de la trypsine par dilution dans un milieu de culture supplémenté en sérum, suivie d'une centrifugation à 4 °C ;
- Resuspension du culot cellulaire dans un milieu de culture approprié.

Pour les tissus riches en collagène, la collagénase, seule ou en association avec la trypsine (mélange trypsine–collagénase), est généralement utilisée afin d'assurer une dissociation efficace de la matrice extracellulaire (**Figure 2**).

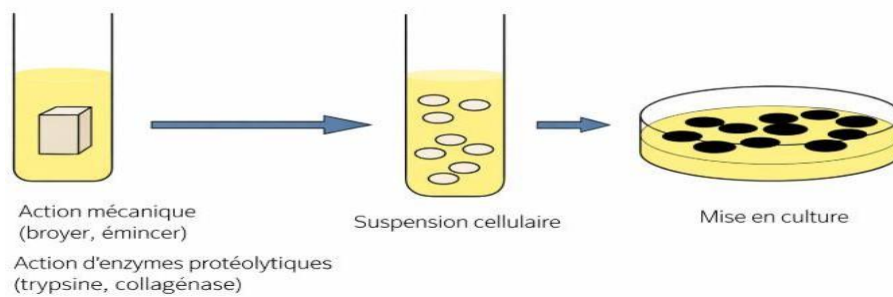


Figure 2. Dissociation mécanique et enzymatique.

C/ Avantages et inconvénients de ces méthodes.

La méthode par dissection est généralement utilisée lorsque le tissu destiné à la culture est de très petite taille. Elle permet d'isoler directement des fragments tissulaires pour leur mise en culture. Cependant, l'obtention de couches cellulaires confluentes par cette approche est relativement longue, nécessitant environ 30 jours de culture.

En comparaison, la méthode enzymatique est plus rapide et offre un meilleur rendement cellulaire. Elle repose sur l'utilisation d'enzymes permettant la dissociation des cellules. Toutefois, elle peut entraîner des dommages sur certaines cellules dont la membrane est particulièrement fragile.

2.2.2. Culture secondaire

Les cellules issues de la culture primaire peuvent être utilisées pour ensemer de nouvelles cultures, appelées **cultures secondaires (Figure 3)**. Les cellules ainsi obtenues conservent les caractéristiques du tissu d'origine, tout en présentant un nombre limité de divisions. Il est également observé que ces cellules peuvent se multiplier plus rapidement au cours du temps, en raison d'un phénomène d'adaptation au milieu de culture.

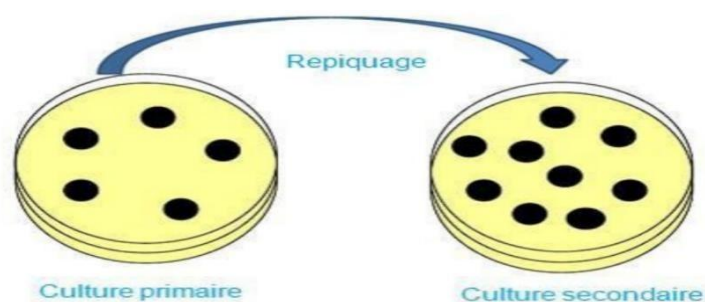


Figure 3. Culture secondaire (repiquage).

Lorsque les cellules en culture primaire atteignent la confluence et recouvrent entièrement la surface du substrat de culture, il est nécessaire de les repiquer afin de leur fournir un nouvel espace permettant de maintenir une croissance continue (**Figure 4**).

Cette étape consiste généralement à détacher les cellules du substrat le plus délicatement possible à l'aide d'enzymes. Ces enzymes, similaires à celles utilisées pour l'établissement de la culture primaire, permettent de rompre les liaisons protéiques assurant l'adhérence des cellules au support. Pour certaines lignées cellulaires, la récolte peut également être réalisée par simple grattage doux du fond du récipient de culture. Après détachement, les cellules mises en suspension sont réparties dans de nouveaux récipients afin de poursuivre leur culture.

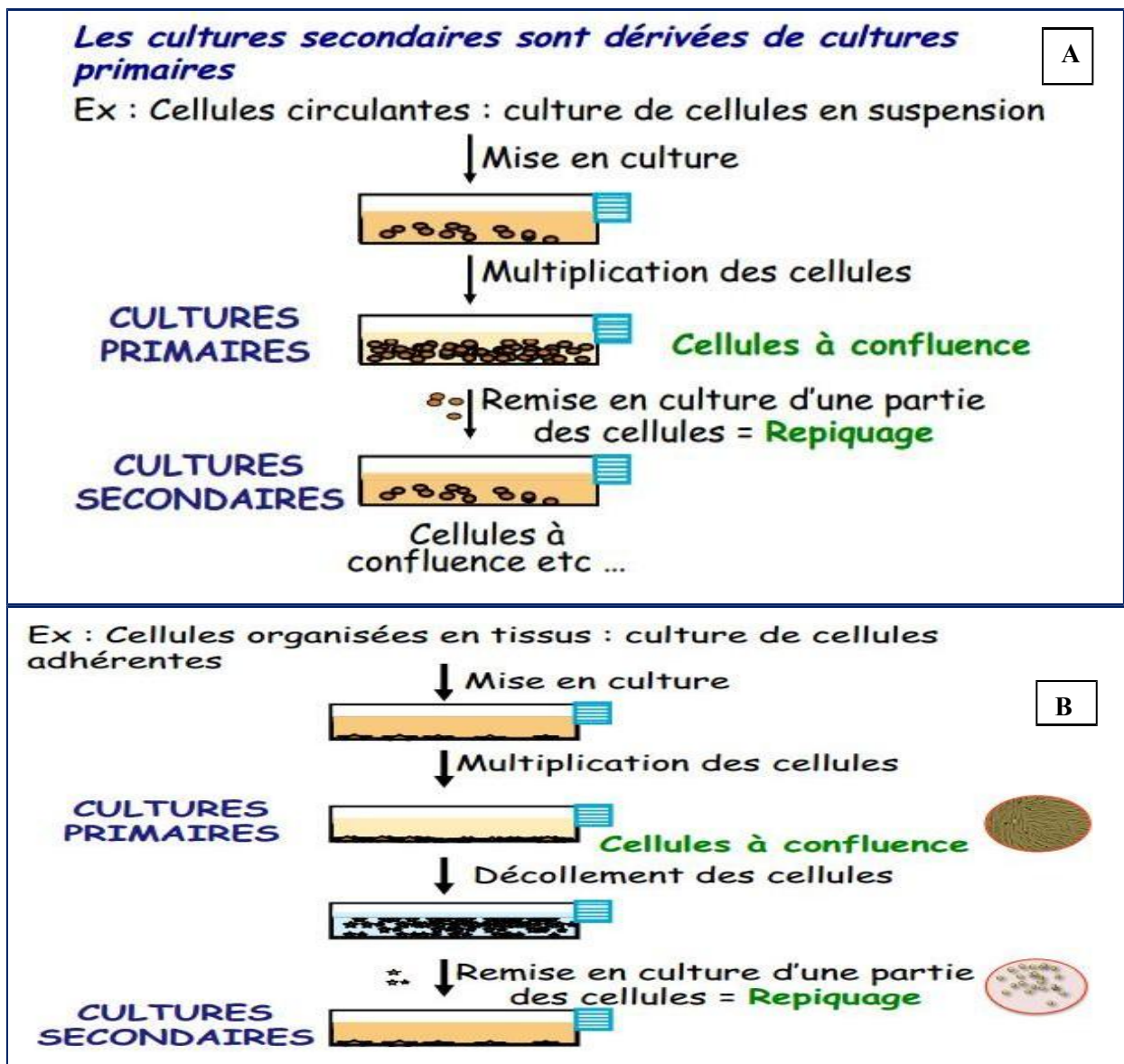


Figure 4. Culture cellulaire primaire et secondaire ; (A) pour cellules circulantes, (B) pour cellules adhérentes

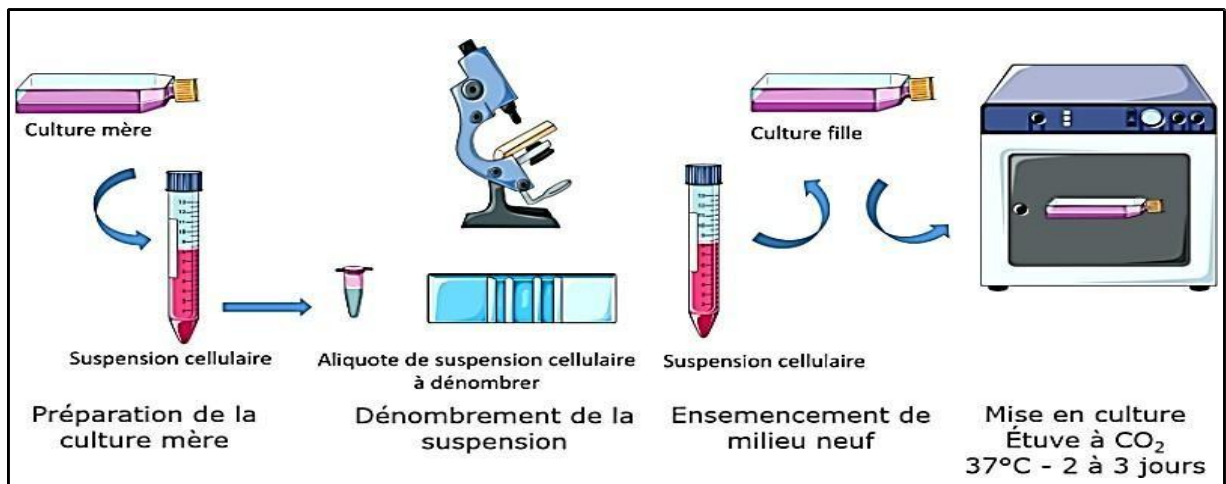


Figure 5. Passage de la culture primaire à la culture secondaire : étapes clés de la sous-culture cellulaire.

2.2.3. Acheter ou emprunter

Une alternative à l'établissement de cultures cellulaires primaires consiste à acquérir des cultures cellulaires déjà établies auprès d'organismes spécialisés tels que l'*American Type Culture Collection* (ATCC) ou le *Coriell Institute for Medical Research*. Ces deux institutions à but non lucratif fournissent des lignées cellulaires de haute qualité, rigoureusement testées afin de garantir leur authenticité et leur fiabilité.

Plus fréquemment, les chercheurs obtiennent des lignées cellulaires par transfert ou échange entre laboratoires. Toutefois, cette pratique présente un inconvénient majeur : il existe un risque élevé que les cellules ainsi obtenues ne permettent pas d'obtenir des cultures saines et exploitables.

Ce problème est généralement lié à des mélanges antérieurs de lignées cellulaires, à des contaminations croisées entre différentes lignées, ou encore à des contaminations par des micro-organismes.

3. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont largement utilisées en recherche biologique. Actuellement, plusieurs types de lignées cellulaires, telles que les lignées cancéreuses, hépatiques ou rénales, sont disponibles commercialement pour des applications scientifiques. Elles sont obtenues à partir de cultures cellulaires primaires par passages successifs.

Le passage correspond à un processus de sous-culture au cours duquel les cellules sont régulièrement repiquées afin de constituer une lignée cellulaire stable. Ces lignées peuvent être cultivées en systèmes bidimensionnels ou tridimensionnels et maintenues sous forme de cultures continues.

Les lignées cellulaires sont généralement classées en trois catégories :

3.1. Lignées cellulaires finies

Les lignées cellulaires finies sont caractérisées par un nombre limité de passages (environ 20 à 30). À l'issue de cette capacité de division, les cellules entrent en phase de sénescence. Elles sont relativement faciles à manipuler, mais leur durée de vie en culture est limitée. Les lignées finies sont constituées de cellules normales.

3.2. Lignées cellulaires immortalisées

Les lignées cellulaires continues, ou immortalisées, résultent de la transformation de cellules en culture, généralement sous l'action d'agents oncogènes ou de gènes immortalisants (par exemple le virus SV40 ou le virus Epstein-Barr). Ce processus permet d'obtenir des cellules capables de se diviser indéfiniment, en échappant à la sénescence cellulaire normale.

Ces lignées ne possèdent pas de nombre défini de passages et peuvent proliférer de manière illimitée. Elles constituent des modèles très utilisés en biochimie et en biologie cellulaire. Elles peuvent être issues de **cellules cancéreuses**, de **cellules en cours de transformation tumorale**, ou de **cellules normales rendues "immortalisées" en laboratoire par des procédés contrôlés** soit :

- **Par fusion cellulaire** (ex: hybridome): immortalisation par fusion membranaire entre une cellule normale et une cellule immortelle (**Figure 6**).
- **Par des virus transformant** dits oncogènes (Virus SV40 ou EBV), agents chimiques ou physiques (**Figure 7**).

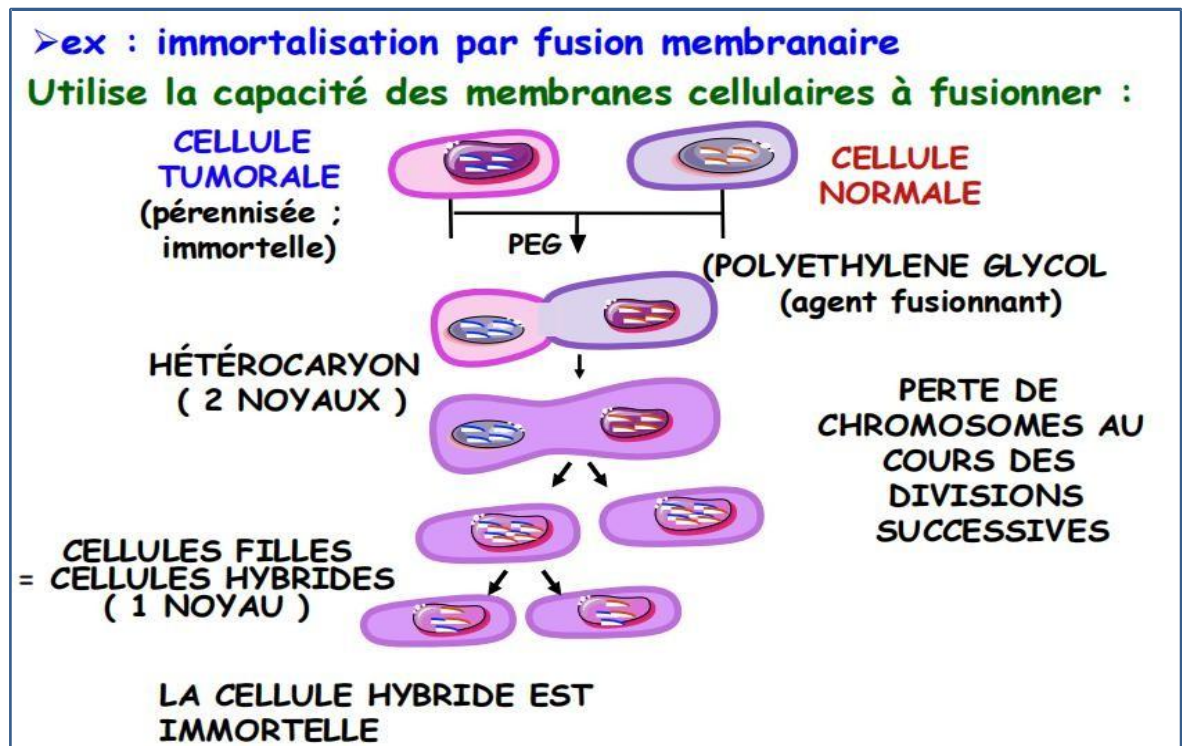


Figure 6. Immortalisation cellulaire par fusion membranaire induite par le PEG,

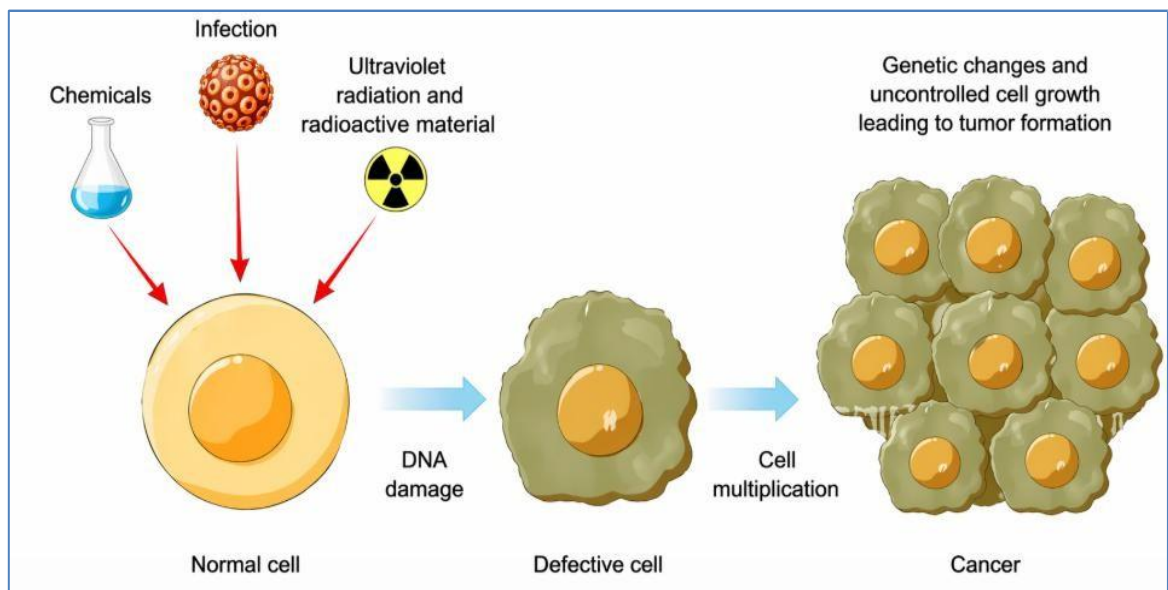


Figure 7. Immortalisation cellulaire par un agent encogène.

3.2.1. Exemples des lignées cellulaires immortalisées

- **La lignée cellulaire HeLa** est une lignée immortalisée largement utilisée en biologie, issue de cellules tumorales du col de l'utérus prélevées en 1951 chez Henrietta Lacks. Ces cellules possèdent une capacité unique de prolifération indéfinie in vitro, contrairement aux cellules normales limitées par la sénescence, en raison notamment d'une forte activité de la télomérase, d'importantes altérations génétiques et de la présence du Human papillomavirus impliqué dans la transformation cancéreuse. Les cellules HeLa se distinguent par une croissance rapide, une grande robustesse, une adhérence au support de culture et un caryotype anormal (aneuploïdie), ce qui explique leur large utilisation en recherche biomédicale, notamment dans le développement du vaccin contre la poliomyélite par Jonas Salk, ainsi que dans les études en cancérologie, virologie, génétique et pharmacologie. Toutefois, leur nature cancéreuse limite leur représentativité des cellules normales, elles présentent un risque de contamination croisée d'autres cultures et leur utilisation soulève des questions éthiques liées à l'absence de consentement initial.
- **La lignée cellulaire Jurkat E6.1** est une lignée immortalisée de lymphocytes T humains, dérivée de la lignée parentale Jurkat initialement isolée en 1976 à partir du sang périphérique d'un adolescent atteint de leucémie lymphoblastique aiguë. Cette lignée clonée, obtenue à partir de sous-clones appelés Jurkat-FHCRC, constitue un modèle majeur en immunologie cellulaire. Les cellules Jurkat E6.1 expriment des récepteurs des lymphocytes T (TCR) et sont particulièrement utilisées pour étudier l'activation lymphocytaire, notamment la production d'IL-2 après stimulation par des anticorps monoclonaux ou des lectines, ainsi que dans la recherche en immuno-oncologie et sur les infections virales comme le VIH, en raison de l'expression du récepteur CD4. D'un point de vue morphologique, ces cellules présentent un aspect sphérique typique des cellules en suspension, avec un diamètre généralement compris entre 10 et 16 μm , et correspondent à des lymphoblastes caractérisés par une augmentation du volume nucléaire, du cytoplasme et de l'activité biosynthétique. Sur le plan génétique, les cellules Jurkat E6.1 sont pseudodiploïdes avec un caryotype modal proche de 46 chromosomes, bien qu'elles présentent des anomalies chromosomiques telles que des délétions des chromosomes 2 et 18. Comparées à la lignée Jurkat parentale, les cellules Jurkat E6.1 représentent un clone plus homogène et stable, largement utilisé comme modèle expérimental pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'immunité et des pathologies associées.

- **Les cellules 3T3**, en particulier la lignée NIH/3T3, sont des fibroblastes murins établis à partir d'embryons de souris NIH Swiss et constituent un modèle fondamental en biologie cellulaire et moléculaire. Elles ont été développées en 1962 par Howard Green et George Todaro, et leur nom « 3T3 » fait référence à une méthode de culture spécifique consistant à ensemercer 3×10^5 cellules tous les 3 jours. Morphologiquement, ce sont des cellules adhérentes de type fibroblastique, présentant une forme allongée et fusiforme, capables de croître en monocouche et faciles à maintenir en culture. Elles se distinguent par une forte capacité de prolifération et une grande sensibilité à la transformation cellulaire, notamment par des virus oncogènes, ce qui en fait un modèle de choix pour les études sur le cancer, en particulier les mécanismes de transformation et d'oncogenèse. Les cellules NIH/3T3 sont également largement utilisées en biologie moléculaire pour l'analyse de l'expression génique, du cycle cellulaire et des voies de signalisation, ainsi que pour les expériences de transfection d'ADN. Par ailleurs, leur capacité à produire des composants de la matrice extracellulaire les rend utiles pour l'étude de l'organisation tissulaire. Bien qu'elles soient initialement dérivées de tissus normaux, ces cellules acquièrent un caractère immortalisé après de nombreux passages en culture, ce qui explique leur stabilité et leur utilisation extensive en recherche.

- **La lignée cellulaire de fibroblastes COS-7** sont une lignée de fibroblastes rénaux dérivés du singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*), largement utilisées en recherche biomédicale en raison de leur grande efficacité de transfection et de leur capacité à produire des protéines recombinantes. Elles proviennent de la lignée CV-1 transformée par une forme défectueuse du virus SV40, ce qui leur confère l'expression de l'antigène T et la capacité de répliquer des plasmides contenant l'origine SV40. Morphologiquement, les cellules COS-7 sont adhérentes, de type fibroblastique, avec une forme allongée, et elles se développent en monocouche avec un temps de doublement d'environ 30 à 48 heures. Grâce à ces propriétés, elles sont particulièrement adaptées à l'expression transitoire de gènes, aux études de virologie, à l'analyse de la signalisation cellulaire, à l'imagerie (notamment du cytosquelette comme l'actine) et aux tests de toxicité. Leur forte compatibilité avec des méthodes de transfection telles que la Lipofectamine facilite une expression rapide et efficace des gènes d'intérêt. Enfin, en raison de leur transformation virale, elles sont classées en niveau de biosécurité 2 (BSL-2), ce qui nécessite des précautions spécifiques en laboratoire.

- **Les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney)**, également appelées cellules HEK 293, sont une lignée cellulaire immortalisée dérivée de cellules HEK isolées d'un fœtus femelle dans les années 1970. sont une lignée cellulaire immortalisée dérivée de reins de fœtus humain dans

les années 1970, largement utilisée en recherche biomédicale et en biotechnologie en raison de leur croissance rapide, de leur facilité de culture et de leur excellente capacité de transfection. Elles ont été obtenues après transformation par insertion de fragments d'adénovirus de type 5, ce qui leur confère des propriétés favorables à l'expression de gènes exogènes. Bien qu'initialement considérées comme d'origine rénale, certaines études suggèrent une origine neuronale. Les cellules HEK 293, ainsi que leurs dérivés comme 293T ou 293F, peuvent être cultivées en monocouche adhérente ou adaptées à des cultures en suspension pour la production à grande échelle. Elles sont largement utilisées pour l'expression de protéines recombinantes, la production de vecteurs viraux (notamment adénovirus et lentivirus) et des applications en thérapie génique et en développement de vaccins. Malgré leur origine humaine et leur transformation, elles ne sont pas considérées comme malignes dans des conditions standards de culture, bien qu'elles présentent un potentiel tumorigène.

Tableau 1. Lignées cellulaires immortalisées les plus utilisées en recherche biomédicale

Lignée cellulaire	Espèce	Origine tissulaire	Applications principales
HeLa	Humain	C ^{pl} de l'utérus (cancer)	Études en cancérologie, virologie, biologie cellulaire
HEK293	Humain	Rein embryonnaire	Transfection, production de vecteurs viraux
CHO	Hamster chinois	Ovaire	Production de protéines recombinantes, biotechnologie
A549	Humain	Poumon (cancer)	Modèle du cancer pulmonaire, toxicologie respiratoire
MCF-7	Humain	Sein (cancer)	Modèle du cancer du sein, études hormonales
Vero	Singe africain	Rein	Virologie, culture de virus, production de vaccins

4. Croissance des cellules en culture cellulaire

4.1. Croissance des cellules en culture normale

La croissance des cellules en culture in vitro ne suit pas un rythme linéaire. Elle évolue selon une courbe sigmoïde caractéristique, influencée par les conditions du milieu (nutriments, pH, oxygène, espace disponible) ainsi que par les propriétés intrinsèques des cellules. On distingue généralement **quatre phases successives** :

A. Phase d'adaptation (phase de latence ou phase Lag)

Cette phase correspond à la période suivant l'ensemencement des cellules dans un nouveau milieu de culture.

- Les cellules ne se divisent pas immédiatement.
- Elles subissent une **phase d'adaptation métabolique** afin de s'ajuster aux nouvelles conditions physico-chimiques du milieu.
- Les cellules réorganisent leur cytosquelette, rétablissent leurs jonctions d'adhérence et s'attachent correctement au substrat.
- Une activité intense de **synthèse de macromolécules (ADN, ARN, protéines)** peut être observée, bien que la division cellulaire reste faible.
- La durée de cette phase dépend du type cellulaire, de la qualité du milieu et de l'état physiologique des cellules (cellules jeunes ou âgées).

B. Phase de croissance exponentielle (phase Log)

C'est la phase de croissance active et rapide. Cette phase est la plus importante pour les expériences nécessitant des cellules en pleine activité (biologie moléculaire, tests de toxicité, production de protéines, etc.).

- Les cellules se divisent à un taux constant et élevé.
- La population cellulaire augmente de manière exponentielle.
- Le temps de génération est stable et caractéristique de chaque type cellulaire.
- Le métabolisme est très actif : forte consommation de glucose, d'acides aminés et de facteurs de croissance.
- Les cellules présentent une morphologie homogène et un bon état physiologique.

C. Phase stationnaire (phase plateau)

Cette phase correspond à un état d'équilibre dynamique. Cette phase indique que la culture atteint sa capacité maximale.

- Le nombre total de cellules devient constant.
- Le taux de division cellulaire est équivalent au taux de mort cellulaire.
- Plusieurs facteurs limitants apparaissent :
 - épuisement des nutriments essentiels,
 - accumulation de déchets métaboliques (lactate, ammonium),
 - diminution du pH du milieu,
 - limitation de l'espace de croissance (phénomène d'inhibition de contact).

- Les cellules peuvent entrer dans un état de quiescence (arrêt temporaire du cycle cellulaire).

D. Phase de déclin

Lorsque les conditions deviennent défavorables, la culture entre en phase de déclin.

- Les cellules cessent progressivement de se diviser.
- La mortalité cellulaire augmente (apoptose et nécrose).
- Les nutriments sont fortement épuisés et les déchets deviennent toxiques.
- Le stress cellulaire augmente (stress oxydatif, déséquilibre ionique).
- On observe une diminution progressive de la viabilité cellulaire.
- Cette phase marque la fin de la culture si aucun repiquage n'est effectué.

4.2. Croissance des cellules en lignées cellulaires immortalisée

Les lignées cellulaires immortalisée, telles que les cellules HeLa, présentent un comportement de croissance différent des cellules normales en raison de leur capacité de prolifération prolongée ou illimitée. On distingue généralement **trois phases successives** :

A. Phase Lag (adaptation)

- Les cellules s'adaptent au nouveau milieu après repiquage.
- Elles s'attachent au substrat et s'étalent progressivement.
- Cette phase s'accompagne d'une reprise active du métabolisme cellulaire :
 - synthèse d'ADN pour préparer la division,
 - production d'ARN et de protéines structurales et enzymatiques.
- La durée est généralement plus courte que dans les cultures primaires.

B. Phase exponentielle (Log)

- Les cellules entrent dans une phase de prolifération rapide et continue.
- Le taux de division est élevé et constant.
- Le temps de doublement est stable et souvent court pour les lignées tumorales.
- Les cellules consomment intensivement les nutriments et nécessitent des changements fréquents de milieu.
- Cette phase est idéale pour les expériences nécessitant une grande quantité de cellules.

C. Phase plateau (stationnaire prolongée)

Contrairement aux cellules normales, les lignées cellulaires immortalisées :

- ne subissent pas rapidement la sénescence,
- maintiennent une capacité de division élevée sur de nombreux passages.

Cependant :

- une saturation peut apparaître due à la densité cellulaire élevée,
 - des limitations nutritionnelles ou métaboliques peuvent ralentir temporairement la croissance.
- Ainsi, même en phase plateau, ces cellules peuvent être repiquées et relancer leur croissance de manière quasi indéfinie.

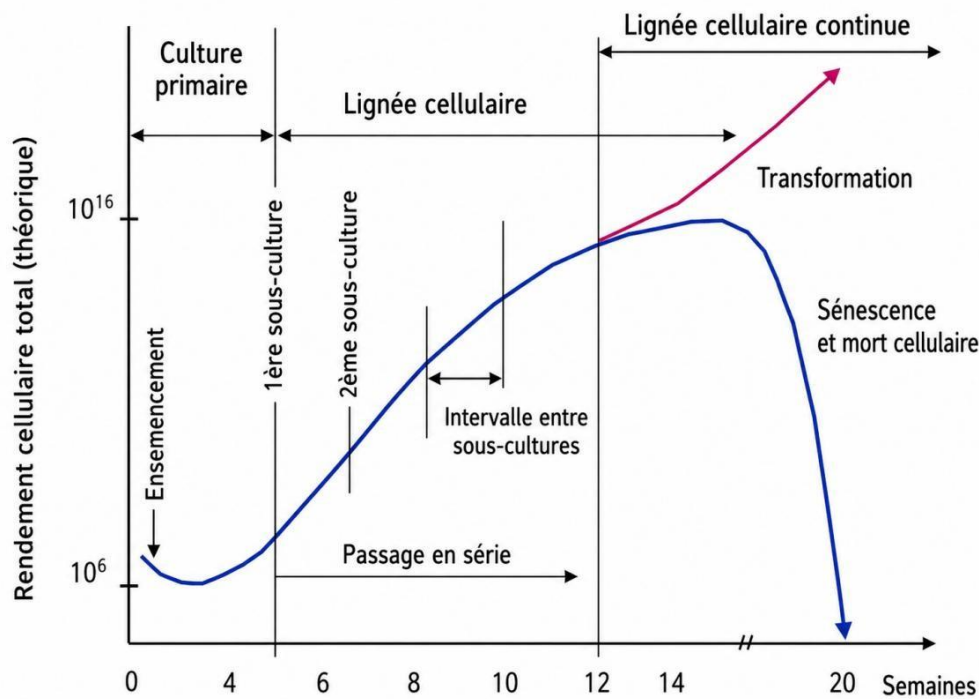


Figure 8. Durée de vie limitée des lignées cellulaires finies et immortalisées.

5. Méthodes de culture

Les différentes techniques de culture *in vitro* actuellement utilisées peuvent être classées en deux grandes catégories principales : la **culture cellulaire adhérente (ou stationnaire)** et la **culture cellulaire en suspension**.

5.1. Culture stationnaire ou monocouche

La majorité des cellules dérivées de vertébrés, à l'exception de certaines lignées hématopoïétiques, nécessitent un support ou un ancrage pour assurer leur croissance. Elles requièrent donc une surface de culture appropriée favorisant leur adhésion, leur étalement et leur prolifération. Ces cellules sont généralement cultivées en monocouche bidimensionnelle (2D) sur des supports

spécialement traités pour la culture tissulaire. Le principe de cette technique repose sur l'affinité des cellules pour leur substrat (**Figure 9**), lequel peut être constitué de verre ou de plastique modifié afin d'améliorer les propriétés d'adhésion cellulaire.

Afin d'optimiser la croissance et le maintien des fonctions physiologiques des cellules normales, ces surfaces peuvent être recouvertes de molécules de la matrice extracellulaire ou de facteurs d'adhérence, tels que le collagène, la gélatine, la fibronectine ou la laminine.

Selon les besoins expérimentaux, les cellules peuvent être cultivées dans des boîtes à micropuits de différentes tailles ou sur des microporteurs (microbilles), parfois recouverts de substrats physiologiques favorisant l'adhésion cellulaire. Les microporteurs sont particulièrement utilisés pour la culture à grande échelle des cellules adhérentes. Ils se présentent sous forme de petites billes, généralement constituées de dextrane, de gélatine ou d'autres polymères, offrant une surface d'attachement adaptée aux cellules. Ces microbilles sont placées dans des bioréacteurs soumis à une agitation douce et continue, permettant de maintenir les microporteurs en suspension tout en assurant un bon apport en nutriments et en oxygène. Les cellules adhèrent à leur surface et s'y multiplient, ce qui permet d'augmenter considérablement la surface de culture dans un volume réduit. Les cultures adhérentes nécessitent des repiquages réguliers, effectués par dissociation enzymatique ou mécanique des cellules. Leur observation et leur suivi sont facilités par l'utilisation du microscope inversé. Cependant, leur croissance reste rapidement limitée par la surface de culture disponible, ce qui restreint le rendement en biomasse ou en produits cellulaires, notamment dans les applications à grande échelle.

Les cultures cellulaires adhérentes sont principalement utilisées en cytologie pour l'étude des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules, ainsi que pour la production limitée de composés biologiques. Elles trouvent également de nombreuses applications en recherche fondamentale. Toutefois, ces systèmes présentent plusieurs limites, notamment un risque de modification ou de perte du phénotype cellulaire au fil des passages. De plus, ils ne reproduisent pas fidèlement les conditions *in vivo* et ne permettent pas de reconstituer les interactions cellulaires tridimensionnelles caractéristiques des tissus vivants.

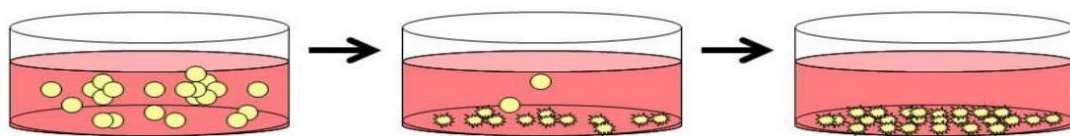


Figure 9. Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture.

5.2. Cultures cellulaires en suspension

Les cellules cultivées en suspension se développent dans un environnement tridimensionnel et sont maintenues dans des flacons de culture non traités, empêchant leur adhésion au support (**Figure 10**). À grande échelle, ces cultures sont soumises à une agitation continue, assurant un échange optimal des gaz et des nutriments, généralement à l'aide d'agitateurs magnétiques, de systèmes orbitaux ou de bioréacteurs agités. À plus petite échelle, elles peuvent être réalisées dans des plaques à faible adhérence, souvent recouvertes de surfaces anti-adhésives (par exemple, plaques BIOFLOAT™), favorisant l'agrégation cellulaire et les interactions cellule-cellule.

Les cultures en suspension sont particulièrement adaptées aux cellules non adhérentes, telles que les cellules hématopoïétiques. Elles présentent l'avantage d'être simples à entretenir, ne nécessitant pas de dissociation enzymatique ou mécanique lors des passages. Toutefois, un contrôle rigoureux de la densité cellulaire et de la viabilité est essentiel afin de maintenir une croissance optimale, les cultures étant généralement diluées périodiquement pour rester en phase exponentielle.

Ces systèmes sont particulièrement appropriés pour les productions à grande échelle, car la croissance cellulaire dépend directement de la densité cellulaire dans le milieu, paramètre facilement ajustable. Ils offrent également des avantages économiques et techniques, en raison de leur simplicité de mise en œuvre et de leur bonne homogénéité. Ainsi, les cultures en suspension sont largement utilisées en industrie pour la production de biomolécules, telles que les vaccins, les enzymes et les protéines recombinantes, notamment dans des procédés de type batch.

Enfin, à plus petite échelle, ces cultures constituent également des modèles pertinents pour les approches tridimensionnelles (3D), car elles favorisent des interactions cellule-cellule et une organisation structurale plus proche des conditions *in vivo*. Elles représentent ainsi des outils essentiels en recherche physiopathologique et en criblage pharmacologique, permettant d'obtenir des données biologiquement plus pertinentes et transposables.

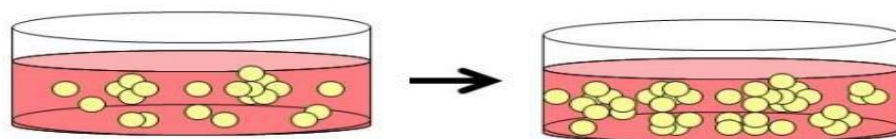


Figure 10. Culture de cellule en suspension.

Références bibliographiques

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York: Garland Science; 2015.
2. Cacciamali A, Villa R, Dotti S. 3D cell cultures: evolution of an ancient tool for new applications. *Front Physiol*. 2022;13:836480.
3. Castiaux AD, et al. Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems. *Anal Methods*. 2019;11:3332–3346.
4. Cuesta-Gomez N, et al. Suspension culture improves iPSC expansion and pluripotency phenotype. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):154.
5. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 7th ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2016.
6. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JRW, Meredith J, Stacey G, Thraves P, Vias M. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1021–1046.
7. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981;23(1):175–182.
8. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211–224.
9. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci*. 2020;7:33.
10. Masters JRW. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):315–319.
11. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839–845.
12. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmüller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(3):443–450.
13. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16–26.
14. Segeritz CP, Vallier L. Cell culture. In: *Basic science methods for clinical researchers*. Elsevier; 2017. p. 151–172.
15. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187–200.
16. Wang X, Li Y, Zhang Z, Liu J. Recent advances in 3D cell culture models in cancer drug development. *J Cancer Res Ther*. 2025;23(1):45–58.

Chapitre III

Équipements et Conditions de la culture cellulaire

1. Introduction

La maîtrise de la culture des cellules *in vitro* a profondément transformé les approches en biologie et en biotechnologie modernes. En reproduisant des conditions proches de celles de l'organisme, elle permet de maintenir et d'exploiter des cellules en dehors de leur contexte naturel, tout en assurant un contrôle précis de leur environnement. Cette approche occupe aujourd'hui une place centrale dans de nombreuses investigations scientifiques, allant de l'étude des fonctions cellulaires à la mise au point de procédés de production de biomolécules d'intérêt, ainsi qu'à diverses applications médicales et industrielles.

La mise en œuvre de cette technique repose sur l'utilisation d'un matériel spécifique garantissant des manipulations précises, stériles et adaptées à la fragilité des cellules. Elle nécessite également le respect rigoureux des conditions d'asepsie afin de prévenir toute contamination microbienne susceptible d'altérer la viabilité cellulaire et de compromettre la fiabilité des résultats expérimentaux. Par ailleurs, la réussite de la culture cellulaire dépend de l'utilisation de milieux de culture spécialement formulés, apportant les nutriments essentiels, les facteurs de croissance et les conditions physico-chimiques nécessaires au développement optimal des cellules *in vitro*.

2. Infrastructures et équipement

2.1. Hotte

Le meilleur moyen pour travailler stérilement est d'utiliser une hotte à flux laminaire. Le principe physique est d'obtenir une laminarité des filets d'air filtrés, ceux-ci devant s'écouler en filets rectilignes, parallèles, verticaux de même vitesse et même sens. On obtient ainsi un apport d'air filtré sur le plan de travail. L'ensemble du volume de travail est balayé d'une façon parfaitement laminaire et donc homogène par de l'air filtré. Le flux laminaire crée un bouclier qui interdit aux particules extérieures d'entrer dans l'enceinte.

Ils existent deux types de hottes :

- **Hotte de type I:** La manipulation est parfaitement protégée par les flux d'air qui l'enrobent. Ce type d'appareil dirige un flux laminaire vertical à travers un filtre absolu (HEPA). En revanche, le manipulateur n'est pas protégé car une partie du flux d'air vertical (20%) sort de l'enceinte à l'avant de la hotte mais 80% sont recyclés (**Figure 1**).



Figure 1. Hotte à flux laminaire vertical HEPA.

Le PSM

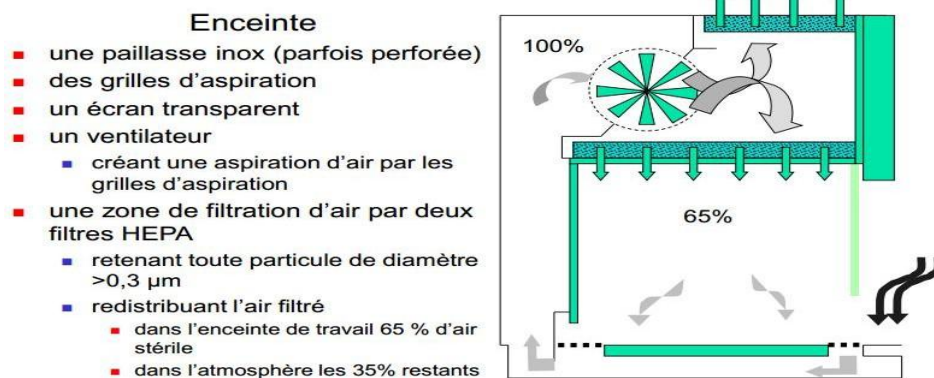


Figure 2. Hotte de type II ou poste de sécurité microbiologique (PSM).

- **Hotte de type II** ou poste de sécurité microbiologique (PSM) (**Figure 2**) : la manipulation, le produit et l'environnement sont parfaitement protégés. Le flux d'air est repris par la base du panneau arrière pour recyclage (70%) et évacuation vers l'extérieur (30%) après passage par un filtre HEPA sur le haut de la hotte. La protection de l'environnement est assurée par un filtre absolu placé sur la sortie en partie haute et celle du manipulateur par un flux d'air entrant en façade avant qui compense celui rejeté à l'extérieur. Pour l'utilisation de matériel à risque (lignées cellulaires de primates et d'humains, lignées produisant des virus), il faut utiliser des hottes PSM de type II. Il ne faut rien poser sur le trouvant à l'entrée de la hotte, ni boucher les grilles se trouvant à l'arrière de manière à ne pas perturber le flux d'air.

2.2. Incubateurs

Il s'agit d'incubateurs à CO₂ à jaquette d'eau et chauffage de porte. Le chauffage de porte permet d'éviter la condensation de la porte interne. La jaquette d'eau étanche permet de minimiser l'évaporation d'eau. 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 (**Figure 3**).



Figure 3. Model d'un incubateur à CO₂

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 (**Figure 4**).



Figure 4. Centrifugeuse

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.

2.5. Microscopes

Un simple microscope inversé (**Figure 5**) 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.



Figure 5. Microscope inversé

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 $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ jusqu'à -50°C puis maintenues à -196°C immergées dans du N_2 liquide (dans des ampoules de verre scellées) ou sur la surface liquide dans la phase gazeuse (ampoules à bouchon à vis) (**Figure 6**).



Figure 6. Congélateur d'azote liquide

2.7. Contenants de culture tissulaire

Une grande variété de matériel de culture tissulaire est disponible, le plus couramment utilisé étant le polystyrène traité pour la culture cellulaire. Bien que tous les supports de culture soient conçus pour permettre une croissance cellulaire adéquate, il est indispensable, lors de l'utilisation d'un nouveau fournisseur ou d'un nouveau type de récipient, de vérifier que les cellules s'y développent correctement.

Les cellules peuvent être cultivées dans des boîtes de Pétri ou des flacons de culture (par exemple 25 cm² ou 75 cm²). Ces derniers présentent un avantage supplémentaire : ils peuvent être gazés puis hermétiquement fermés, ce qui permet de maintenir les conditions de culture sans recourir à un incubateur à CO₂. Cette propriété s'avère particulièrement utile en cas de défaillance des incubateurs.

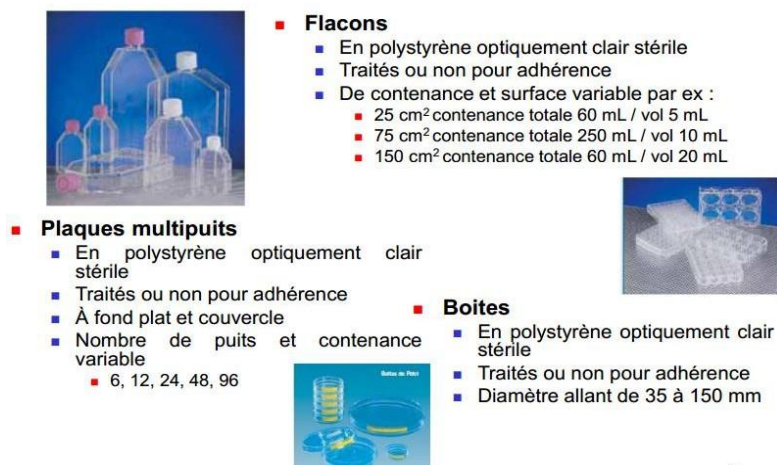


Figure 7. Types de contenants utilisés en culture cellulaire in vitro

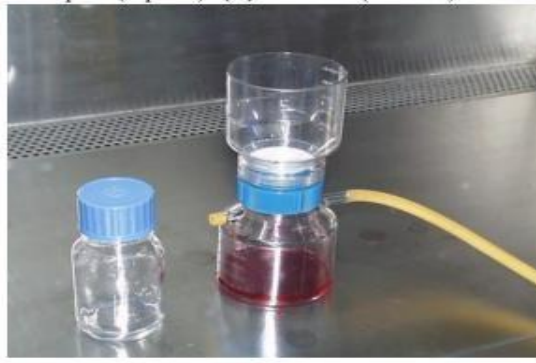


Figure 8. Stérilisation du matériel par un autoclave (à droite) Stérilisation des milieux par un Filtre à membrane de 0,22 µm assemblé dans un porte-filtre (à gauche)

Pipetus



Channel Micropipettes



Cônes pour micropipettes

Figure 9. Les pipettes avec une certaine forme d'aide à l'aspiration sont pratiques pour transférer de plus grands volumes.

3. Conditions de la culture cellulaire

Un environnement heureux permet aux cellules de faire plus que juste survivre en culture. Généralement, cela signifie un environnement qui, au minimum, permet aux cellules d'augmenter en nombre par division cellulaire. Pour obtenir cet environnement, il est important de fournir aux cellules certaines conditions, en respectant certains paramètres physico-chimiques nécessaires à la culture cellulaire: en utilisant un incubateur. Ces paramètres physico-chimiques sont : rapport en milieu de culture Oxygène / CO₂ ; Température ; pH et Osmolarité. En addition, la culture cellulaire exige un milieu de culture adéquat et des conditions de stérilité stricte.

3.1. Paramètres physico-chimiques

➤ Oxygène

La teneur optimale en oxygène varie selon le type cellulaire: la majorité des cellules se cultivent en normoxie c'est à dire avec une teneur de 21% d'oxygène ambiant. L'hyperoxie devient toxique pour les cellules au-delà de 50%, à l'inverse de l'hypoxie qui peut être bénéfique dans certains cas, notamment chez les cellules embryonnaires qui présentent une augmentation de leur capacité proliférative sous faible tension en oxygène (5%).

➤ CO₂

Cette concentration est particulièrement importante lorsque le système tampon bicarbonate est utilisé. Elle est alors maintenue à 5% de l'air ambiant. Le taux de CO₂ intervient également au niveau de la prolifération cellulaire, dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

➤ Température

La température est généralement réglée sur la même valeur que la température corporelle de l'hôte à partir duquel les cellules ont été obtenues (36° à 37°C chez les mammifères). Cette plage de température est généralement maintenue à l'aide d'étuves soigneusement étalonnées et fréquemment contrôlées.

➤ Osmolarité

L'atmosphère doit être saturée en vapeur d'eau pour limiter les phénomènes d'évaporation. Donc l'atmosphère de l'incubateur doit être saturée en vapeur d'eau, pour cela on « inonde » le plancher de l'étuve. Ce phénomène d'évaporation est responsable d'une augmentation de l'osmolarité dans le milieu de culture et donc de la concentration en sel, entraînant alors une lyse cellulaire par appel d'eau à l'extérieur de la cellule. L'osmolarité du milieu doit être maintenue autour de 270 milliosmoles pour la majorité des cultures cellulaires avec une saturation en vapeur d'eau se situant autour de 84 à 85%.

➤ PH

Le pH optimal ne sera pas le même selon le type de cellules cultivées, et va dépendre de l'organisme à partir duquel elles sont issues. C'est ainsi que pour les cellules de mammifère, il a été établi qu'il doit se situer dans les normes sanguines soit entre 7,2 et 7,4.

3.2. Milieu de culture

Le milieu de culture est le facteur le plus important et le plus complexe à gérer pour rendre les cellules "heureuses" et permettre la prolifération des cellules (divisions cellulaires). En plus de satisfaire aux besoins nutritionnels des cellules, le milieu de culture doit également posséder tous les

facteurs de croissance nécessaires et contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que le pH et l'osmolarité, et fournir les gaz essentiels (O_2 et CO_2). On distingue 2 principaux types de milieux :

3.2.1. Les milieux empiriques

Les milieux empiriques sont constitués principalement :

a) Milieu synthétique de base

- Sels minéraux : donnent une osmolarité identique à celle du sérum physiologique (Na^+ , K^+ , Cl^-),
- Source de carbone et d'énergie : la substance énergétique fondamentale est généralement le glucose à la concentration de 1 g/L, concentration semblable à celle du sérum humain)
- Source d'azote : comme les acides aminés qui sont des sous-unités constitutives des protéines.
- Source d'acide gras
- Vitamines : cofacteurs d'enzymes ou précurseurs pour la synthèse de molécules.
- Système tampon : Permet la régulation du pH. On a deux possibilités,
 - ✓ utilisation du couple (bicarbonate de sodium, dioxyde de carbone), $NaHCO_3$ apporté dans le milieu et 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).

Pour suivre les variations de pH du milieu, on ajoute dans le milieu un indicateur de pH le rouge de phénol.

- Rouge de phénol : Permet de visualiser les variations du pH, adapté car zone de virage située à la valeur du pH à réguler. En effet, à pH faible (acide), le rouge de phénol rend le milieu jaune alors qu'à des pH élevés (alcalin) le milieu tourne au violet. Pour un pH adéquat de 7,4 : Le milieu est rouge orangée

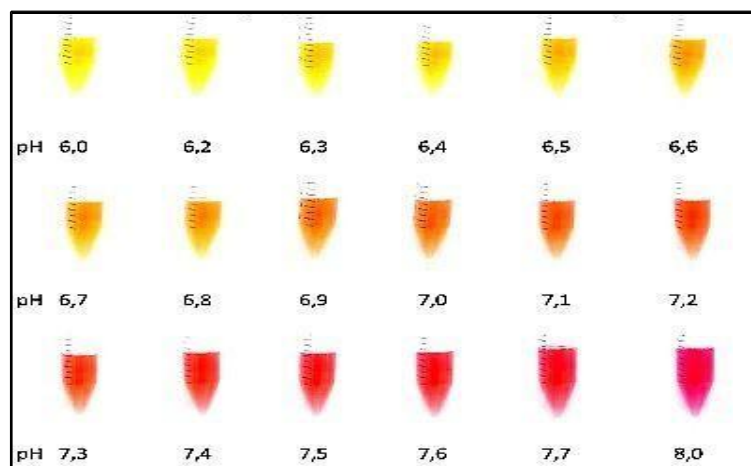


Figure 10. Les variations de couleur du rouge de phénol en fonction du pH

b) Compléments à ajoutés extemporanément et dans des conditions strictement stériles

- **Sérum** : 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 utilise généralement du sérum de veau fœtal (SVF) ayant les meilleures performances. Apportant : des facteurs de croissance, protéines d'adhésion protéines de transport, oligo-éléments et des inhibiteurs comme l'alpha 1 antitrypsine (neutralisation de l'action enzymatique de la trypsine).
- **Mélanges d'antibiotiques** aux taux final de 1% : pénicilline G, streptomycine, amphotéricine B (antifongique)

3.2.2. Les milieux définis

Devant la faible reproductibilité de certains résultats, les chercheurs ont évolué vers la mise au point de milieux **dépourvus de sérum**, enrichis en facteurs (Hormones, facteurs de croissance, facteurs d'attachement, protéines de transport, et les substances lipidiques) rigoureusement contrôlés. Ces milieux sont appelés milieux définis. Ces milieux, bien adaptés à la culture cellulaire, peuvent être adaptés à la production, cependant ils sont chers car tous les constituants sont hautement purifiés.

a) Hormones

Insuline : (Utilisée à la concentration de 5 à 10 $\mu\text{g/mL}$) 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.

b) Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance se classent plutôt comme étant des substances paracrines ou autocrines (si le médiateur agit à courte distance en diffusant vers sa cible, c'est une substance paracrine ou autocrine si la cible est une cellule de même type que la cellule), appelés de façon plus générale, médiateurs chimiques locaux. Leur action sur les cellules est déclenchée par la formation d'un complexe spécifique à 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 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. Il existe plusieurs facteurs de croissance notamment :

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

c) Les facteurs d'attachements

Les supports sont tapissés avec un substrat protéique constituant 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, par exemple Poly-L-lysine et Collagène.

d) Protéines de transport

➤ Albumine sérique bovine (BSA)

L'albumine peut être utilisée à une concentration maximale de 5g/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 H₂O₂, fixation de toxines).

➤ Transferrine

Elle est utilisée en concentration de 1 à 100 mg/L. Son premier rôle est de transporter le fer, mais elle permet également de détoxifier d'autres métaux.

e) 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. L'éthanolamine (10-20 µM) est requise dans la formulation de la plupart des milieux.

➤ Avantages et inconvénients des milieux définis

- La croissance cellulaire et la productivité sont optimisées.
- La reproductibilité est garantie.
- La grande difficulté réside dans la nécessité de développer et d'optimiser les milieux sans sérum, pour les différents types de cellules utilisés.

3.2.3. Préparation d'un milieu de culture (protocole standards)

- ✓ Récupérez les boîtes et les flacons spécifiques à la culture cellulaire. Elles ont été traitées par rayon X afin de les rendre stériles.
- ✓ Procurez -vous un milieu de culture synthétique quelconque. Il est composé principalement d'un liquide physiologique pour éviter aux cellules d'éclater.
- ✓ Prenez du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) qui est le milieu le plus couramment utilisé.
- ✓ Ajoutez-y des vitamines, de glucose et des acides aminés essentiels.
- ✓ Ajoutez un indicateur de pH, par exemple le rouge de phénol. Il colore votre milieu en rouge lorsque votre pH est physiologique. Quand vous observez une perte de coloration, refaites un milieu et transférez vos cellules dans celui-ci, car cela indique une variation de pH et on a un fort risque de mort cellulaire.
- ✓ Mettez du SVF (sérum de veau fœtal), il apporte les facteurs de croissances nécessaires à un bon développement cellulaire.
- ✓ N'oubliez pas les antibiotiques. En général, de la pénicilline et de la streptomycine suffisent. Ils empêchent simplement une infection de votre culture par des bactéries ou champignons, au cas où vos manipulations ne sont pas soignées.
- ✓ Tout ce mélange donne un certain pH à votre milieu qu'il faut stabiliser en ajoutant du tampon Hepés.
- ✓ A partir de ce moment-là seulement, placez la souche cellulaire dans votre milieu et incubez à 37°C sous 5% de CO₂.
- ✓ Réglez l'incubateur pour obtenir ces paramètres particuliers. Evitez de l'ouvrir régulièrement afin de ne pas favoriser les contaminations ainsi que la perte de CO₂.

3.2.4. Les milieux de culture les plus utilisés:

Tableau 1. Caractéristiques des milieux standards en culture cellulaire animale

Milieu	Composition principale	Type de cellules	Présence de sérum	Applications courantes	Avantages / Inconvénients
MEM	Sels, AA essentiels, vitamines, glucose (faible), bicarbonate	Cellules adhérentes (fibroblastes, neurones, cellules épithéliales)	Oui - généralement 10% FBS	Culture de fibroblastes primaires, cellules épithéliales	+ Simple et économique - Moins nutritif, croissance plus lente
DMEM	Sels, AA + vitamines (4x MEM), glucose (1-4,5 g/L), bicarbonate	Adhérentes et quelques en suspension (HeLa, COS-7, etc.)	Oui - souvent 10% FBS	Lignées adhérentes (HeLa, 293, PC12), neurones, cellules souches, etc.	+ Riche, supporte croissance rapide - Acidification rapide, plus coûteux
RPMI-1640	AA + vitamines enrichis, glucose, bicarbonate	Suspension : lymphocytes, hybridomes, cellules sanguines	Oui - 5 à 10% FBS	Cultures hématopoïétiques, cellules immunitaires	+ Bon tampon, adapté à la suspension - Moins adapté aux cellules adhérentes
DMEM/F12	DMEM + Ham's F12 (AA, vitamines, insuline, transferrine, etc.)	Large spectre (adhérentes/suspension, primaires, organoïdes)	Réduit ou sans FBS possible	Cellules primaires, organoïdes, cellules souches, épithéliales	+ Très complet, possible sans sérum - Coût élevé, formulation plus complexe
IMDM	DMEM modifié (sélénium, +vitamines, KNO ₃ à la place de Fe(NO ₃) ₃)	Haute densité : lymphoblastes, hybridomes, macrophages	Oui - généralement 10% FBS	Lignées proliférantes (Jurkat, COS-7), cultures denses	+ Très nutritif, bon pour forte prolifération - Plus cher, dépendant du FBS

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Gibco™ media

DMEM



Ham's F12



RPMI 1640



Figure 11. Les milieux de cultures les plus utilisés

3.3. Conditions de stérilité

La contamination en culture cellulaire constitue l'un des problèmes majeurs en biologie cellulaire *in vitro*. Elle correspond à l'introduction involontaire d'agents biologiques ou chimiques dans un système de culture normalement stérile.

Ces contaminants peuvent altérer le comportement des cellules, modifier leur métabolisme, induire des changements morphologiques, perturber le cycle cellulaire et entraîner leur mort. Même si l'utilisation d'antibiotiques ou de procédures de décontamination peut réduire certains risques, ces méthodes peuvent également induire un stress cellulaire.

3.3.1. Types de contaminations

a) Contaminants biologiques

➤ Bactéries, levures et champignons

Ces micro-organismes sont les contaminants les plus fréquents et souvent les plus rapidement détectables. Leur prolifération entraîne des modifications visibles du milieu de culture, telles qu'une turbidité accrue, un changement de couleur (lié à une variation du pH) et une détérioration rapide de la viabilité cellulaire. Une observation microscopique est toujours nécessaire pour confirmer la nature de la contamination.

- **Bactéries** : Elles provoquent une multiplication très rapide, une turbidité du milieu, une diminution du pH et une forte compétition nutritionnelle.
- **Levures** : Elles provoquent une turbidité modérée, bourgeonnement et des variations faibles du pH
- **Champignons filamenteux** : Elles provoquent la formation de mycélium visible, la sécrétion d'enzymes dégradantes et une altération rapide du milieu et une augmentation du pH.

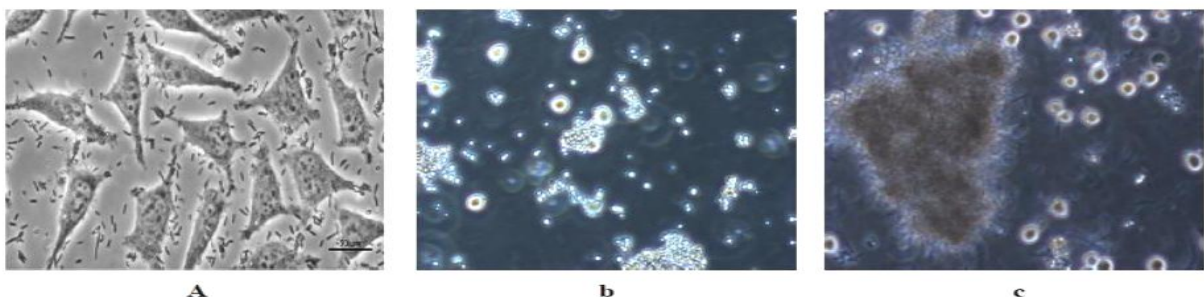


Figure 12. Contaminations microbiennes dans les cultures de cellules de mammifères.
a :contamination bactérienne ; b : contamination par levures et c : contamination fongique.

➤ **Virus**

Les virus sont des contaminants invisibles au microscope optique en raison de leur très petite taille. Leur présence se manifeste généralement par un effet cytopathique (destruction des cellules, formation de vacuoles, syncytia, ou détachement cellulaire). Les cultures primaires humaines sont particulièrement vulnérables aux virus pathogènes tels que HIV, hépatite B ou Epstein-Barr virus (EBV). Le sérum d'origine animale utilisé dans les milieux de culture peut également être une source de virus bovins latents.

➤ **Protozoaires**

Ces organismes unicellulaires (comme les amibes) peuvent parfois contaminer les cultures, notamment via la poussière, l'air, les tissus ou un environnement mal entretenu. Certains protozoaires forment des spores résistantes et provoquent une cytotoxicité rapide, détruisant les cellules en moins de dix jours.

➤ **Les mycoplasmes**

Les mycoplasmes représentent les contaminants les plus pernicious et dévastateurs des cultures cellulaires. Ces micro-organismes dépourvus de paroi sont de très petite taille et passent aisément à travers les filtres stérilisants classiques. Ils ne produisent aucun signe visible dans le milieu de culture, ce qui rend leur détection difficile. Les effets se manifestent par une croissance ralentie, une altération du métabolisme cellulaire et une perte de reproductibilité expérimentale. On estime que plus de 20 % des cultures cellulaires dans le monde sont infectées par des mycoplasmes. Il existe plusieurs façons de tester indirectement les contaminations par les mycoplasmes, notamment les kits PCR et les tests ELISA, mais le test le plus recommandé est la coloration au fluorochrome de l'ADN13. Dans ce test, les cellules sont fixées et colorées de manière à ce que l'ADN devienne fluorescent sous l'effet de la lumière UV. La comparaison avec des lames de contrôle positives et négatives permet d'identifier la contamination par les mycoplasmes.

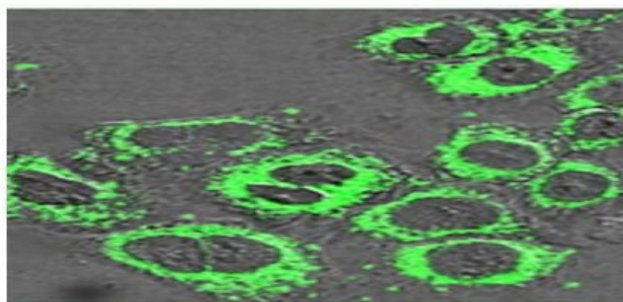


Figure 13. Cellules de mélanome natif infectées par le mycoplasme.

b) Contaminants chimiques

Les contaminants chimiques en culture cellulaire regroupent l'ensemble des substances non biologiques susceptibles d'altérer la croissance, la viabilité et les fonctions des cellules sans provoquer de contamination microbienne visible. Ils peuvent provenir de multiples sources, notamment les milieux de culture, les sérums et suppléments biologiques, l'eau mal purifiée, les matériaux plastiques ou verrerie, ainsi que les produits de nettoyage et les conditions de l'incubateur à CO₂. Parmi les principaux contaminants chimiques, on distingue les ions métalliques (Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺), qui peuvent catalyser la formation de radicaux libres et induire un stress oxydatif responsable de dommages cellulaires et d'inhibition enzymatique. Les endotoxines bactériennes (lipopolysaccharides) constituent également un facteur critique, car elles peuvent activer des réponses inflammatoires, perturber l'expression génique et induire l'apoptose même à très faibles concentrations. Les résidus de détergents et de désinfectants peuvent quant à eux altérer les membranes cellulaires, provoquer une lyse cellulaire et inhiber l'adhérence au substrat. De plus, les radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) entraînent des dommages oxydatifs sur l'ADN, les protéines et les lipides membranaires, accélérant ainsi le vieillissement cellulaire et la sénescence. Les matériaux plastiques de culture peuvent également libérer des composés toxiques ou adsorber des protéines essentielles, réduisant ainsi la disponibilité des facteurs de croissance. Enfin, des déséquilibres dans les conditions de l'incubateur, notamment les variations de pH liées au CO₂, peuvent perturber fortement le métabolisme cellulaire. Ainsi, bien que souvent invisibles, les contaminants chimiques représentent une source majeure de variabilité expérimentale et nécessitent un contrôle rigoureux des réactifs, des équipements et des conditions de culture afin de garantir la fiabilité des résultats scientifiques.

C) Cross-contamination

La contamination croisée en culture cellulaire survient lorsque plusieurs lignées cellulaires sont

manipulées simultanément ou successivement dans un même environnement de travail, notamment sous une même hotte de culture. Dans ce cas, des cellules issues d'une lignée peuvent être

transférées accidentellement vers une autre culture et proliférer de manière préférentielle, entraînant progressivement la substitution complète de la lignée initialement établie. Ce phénomène est particulièrement problématique car il conduit à une perte d'identité cellulaire et à une altération irréversible du matériel biologique. Le cas le plus emblématique est celui des cellules HeLa, connues pour leur forte capacité proliférative et leur aptitude à coloniser d'autres cultures cellulaires. En raison de leur robustesse, elles ont été impliquées dans de nombreux cas de remplacement involontaire de lignées cellulaires humaines. Des études ont ainsi montré qu'une proportion significative des cultures cellulaires humaines, estimée à environ 25 %, serait contaminée ou mal authentifiée, souvent à cause de cellules HeLa ou d'autres lignées envahissantes. Cette situation constitue un problème majeur en recherche biomédicale, car elle compromet la validité, la reproductibilité et l'interprétation des résultats expérimentaux.

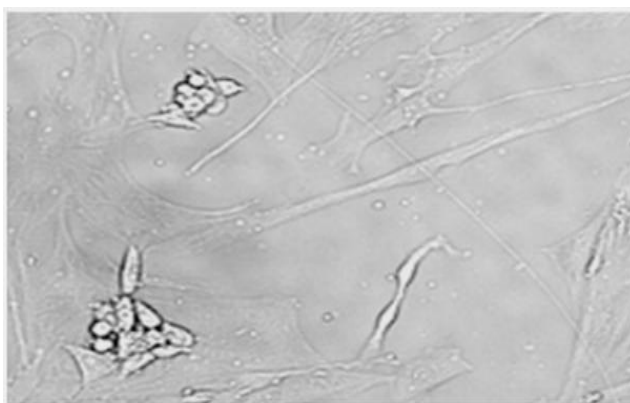


Figure 14. Fibroblastes humains normaux (en forme d'orbite) contaminés de façon croisée par HeLa (colonies de cellules).

3.3.2. Techniques d'asepsie

Des techniques d'asepsie permettent d'éliminer de telles contaminations. Il faut donc établir des règles de conduite strictes dans les salles de culture surtout si beaucoup de personnes sont susceptibles d'utiliser le même espace de travail. En effet, si les règles ne sont pas respectées, la contamination qui est partie d'une ou de deux cultures, peut s'étendre à plusieurs lignées, voire à tout le stock de lignées.

Pour éviter toute contamination, l'air dans les hottes et parfois dans les salles est filtré par des filtres HEPA, qui éliminent 99,97% des particules $\geq 0,3 \mu\text{m}$. Les salles doivent être maintenues propres, ventilées, et nettoyées quotidiennement. Les surfaces (paillasse, poignées, équipements) doivent être désinfectées avec de l'alcool ou un détergent antibactérien pour maintenir un niveau de propreté conforme aux normes ISO (souvent ISO 7 pour le local, ISO 5 à l'intérieur de la hotte).

L'opérateur aussi joue un rôle crucial dans la prévention des contaminations. Le port d'équipements de protection individuelle (EPI) est obligatoire : blouse stérile, gants sans poudre changés fréquemment, masque et parfois lunettes. Les mains et les gants doivent être régulièrement désinfectés à l'alcool à 70%. Il est impératif d'adopter une gestuelle aseptique : ne jamais passer les mains au-dessus des cultures ouvertes, limiter les mouvements brusques, et désinfecter tout objet entrant dans la hotte à flux laminaire.

Les incubateurs à CO_2 nécessitent un nettoyage hebdomadaire rigoureux, incluant les plateaux, les récipients d'eau et les surfaces internes, afin de prévenir la prolifération bactérienne et fongique. Les pipettes réutilisables doivent être stérilisées en autoclave pour garantir leur asepsie, tandis que les pointes de pipettes doivent être stériles et à usage unique afin d'éviter toute contamination croisée. Par ailleurs, les milieux de culture qui ne peuvent pas être stérilisés par autoclave doivent impérativement être filtrés à l'aide de filtres de $0,2 \mu\text{m}$, une méthode efficace pour éliminer les contaminants microbiens.

L'application prometteuse des techniques de culture cellulaire nécessite la gestion des risques potentiels liés aux agents infectieux hébergés par les cellules en culture, mais aussi le contrôle des réactifs qui peuvent être toxiques, corrosifs ou mutagènes. Ces risques potentiels peuvent mettre en danger la santé du personnel de laboratoire en cas d'introduction dans l'organisme (par exemple, par contact de la peau et des muqueuses avec des solides, des liquides ou des aérosols) et menacer l'environnement en cas de manipulation inappropriée. Ce qui justifie la nécessité des laboratoires de culture respectant des normes environnementales strictes.

Selon les recommandations de l'ACDP (*Advisory Committee on Dangerous Pathogens*) avant de

commencer toute culture cellulaire, il est donc nécessaire de s'assurer de réduire, voire d'éliminer, l'exposition aux agents potentiellement dangereux afin de minimiser l'infection, la pathogénicité, les réactions allergiques et le contact avec les toxines libérées. Cela peut être réalisé par une formation rigoureuse du personnel de laboratoire et la mise en œuvre de pratiques standardisées de culture cellulaire (**Tableau 2**), qui doivent être revues et révisées régulièrement par les membres du laboratoire et le comité de sécurité.

Tableau 2. Bonnes pratiques de biosécurité en laboratoire de culture cellulaire

Chaque travailleur de laboratoire est responsable de sa propre santé et sécurité ainsi que de celle des autres pouvant être affectés par les travaux effectués dans le laboratoire de culture cellulaire.
L'équipement de protection individuelle (EPI) doit être porté en entrant dans le laboratoire de culture cellulaire et retiré en quittant ou en contaminant l'EPI. Lors de la manipulation d'agents dangereux, les gants potentiellement contaminés doivent être retirés immédiatement et éliminés comme déchets biologiques. Se laver les mains.
L'exposition de la peau par des chaussures ouvertes, des pantalons courts ou des jupes n'est pas recommandée.
Il est interdit de consommer de la nourriture, des boissons, de stocker des produits alimentaires, de fumer, d'appliquer des cosmétiques ou de manipuler des lentilles de contact dans le laboratoire de culture cellulaire.
Les téléphones portables ne doivent pas être utilisés pendant le travail dans le laboratoire de culture cellulaire.
Les vêtements amples (ex. : écharpes, colliers pendants) doivent être retirés avant de commencer le travail et les cheveux doivent être attachés.
Le laboratoire de culture cellulaire doit être maintenu propre et désinfecté régulièrement (ex. : incubateurs, hottes à flux laminaire et surfaces de travail).
Tous les outils de laboratoire en contact avec des agents potentiellement infectieux ou dangereux doivent être décontaminés avant et après utilisation. Les matériaux infectieux ou dangereux doivent être décontaminés et éliminés selon la voie recommandée.
Les objets tranchants (ex. : pointes de pipette) doivent être éliminés immédiatement dans des boîtes spéciales pour objets tranchants.
Les mains doivent être lavées avant de quitter le laboratoire de culture cellulaire.
Le responsable de la sécurité du laboratoire doit être informé en cas d'exposition ou de déversement d'agents infectieux ou dangereux afin de proposer une stratégie adaptée pour le confinement et la décontamination.

Références bibliographiques

1. Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP). *Guidance on the safe use of cell cultures*. UK Health and Safety Executive; 2015.
2. Çelik -Uzuner S, Uzuner U. An extensive method for maintenance of sterility in mammalian cell culture laboratory routine. *Challenges*. 2017;8(2):26.
3. Côté RJ. Aseptic technique for cell culture. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001;Chapter 1:Unit 1.3.
4. Davis JM. Basic techniques and media, the maintenance of cell lines, and safety. In: *Animal cell culture*. Wiley; 2011. p. 91–151.
5. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002;39:75–90.
6. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 7th ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2016.
7. Lyapun IN. Biological aspects of cell culture security in vitro. *Mol Genet Microbiol Virol*. 2021;36(3):119–124.
8. Merten OW. Virus contaminations of cell cultures – a biotechnological view. *Cytotechnology*. 2002;39:91–116.
9. Roth JS, et al. Keeping it clean: the cell culture quality control experience at the National Center for Advancing Translational Sciences. *SLAS Discov*. 2020;25(5):491–497.

Chapitre IV

Méthodes d'étude des cellules en culture

1. Introduction

L'étude de l'état physiologique des cellules constitue un enjeu central en biologie cellulaire, en toxicologie, en pharmacologie et en biotechnologie. En culture cellulaire, les cellules sont continuellement soumises à diverses conditions expérimentales (agents chimiques, facteurs physiques, modifications du milieu), susceptibles d'affecter leur survie, leur métabolisme, leur capacité de prolifération ainsi que l'intégrité de leur matériel génétique.

Dans ce contexte, l'évaluation de la viabilité cellulaire ne se limite pas à une simple distinction entre cellules vivantes et cellules mortes. Elle repose sur une analyse intégrée de plusieurs paramètres biologiques, incluant :

- l'activité métabolique,
- l'intégrité de la membrane plasmique,
- la capacité de prolifération,
- et la stabilité du génome.

Les méthodes développées pour étudier ces paramètres reposent sur des principes complémentaires. Certaines approches mesurent l'activité enzymatique ou énergétique des cellules, considérée comme un marqueur indirect de leur viabilité. D'autres s'appuient sur la perméabilité membranaire pour identifier les cellules mortes, ou encore sur la synthèse d'ADN pour évaluer la prolifération cellulaire. Enfin, des techniques plus avancées permettent d'analyser les altérations de l'ADN et les perturbations du cycle cellulaire.

2. Méthodes d'évaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est corrélée de manière approximative à la viabilité cellulaire au sein d'une population donnée. Les tests de viabilité cellulaire ont pour objectif d'évaluer les activités biologiques associées au maintien des fonctions cellulaires et à la survie. De manière générale, ces méthodes reposent sur la détection de biomarqueurs métaboliques tels que l'ATP, la réduction de coenzymes (NADH/NADPH) ou l'activité enzymatique, ainsi que sur l'utilisation de colorants vitaux sélectivement incorporés ou exclus par les cellules vivantes.

Un certain nombre de ces tests permettent d'estimer indirectement le nombre de cellules viables via la métabolisation de substrats colorimétriques ou fluorimétriques par des cellules métaboliquement actives, ou encore par l'accumulation sélective de colorants vitaux. Ces

activités métaboliques, caractéristiques des cellules vivantes, sont généralement considérées comme proportionnelles au nombre de cellules viables.

Ces méthodes sont le plus souvent réalisées en plaques multipuits, ce qui permet une analyse rapide et à haut débit. Elles reposent sur l'utilisation de substrats chromogéniques ou fluorogéniques, et la viabilité cellulaire est déterminée par mesure de l'absorbance ou de la fluorescence, en comparant des cultures témoins à des cultures soumises à différentes conditions expérimentales.

2.1. Méthodes basées sur l'activité métabolique

➤ Tests aux sels de tétrazolium

Plusieurs tests colorimétriques sont basés sur la réduction de réactifs colorés, notamment les sels de tétrazolium, par les déshydrogénases des cellules viables. Parmi les plus utilisés figurent le MTT, le XTT et le WST-1, qui constituent des indicateurs fiables de l'activité mitochondriale, car ils sont principalement réduits par les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale. MTT assay, XTT assay et WST-1 assay sont largement employés pour estimer la viabilité cellulaire de manière indirecte (**Tableau 1**).

Tableau 1. Tableau comparatif des tests de viabilité cellulaire MTT, XTT et WST-1.

Caractéristique 	MTT	XTT	WST-1
Solubilité du Formazan	Non (cristaux)	Oui	Oui
Étape de solubilisation	Oui	Non	Non
Sensibilité	Modérée	Élevée	Très élevée
Toxicité cellulaire	Élevée	Faible	Très faible
Temps d'incubation	1-4 heures	2-4 heures	0.5-4 heures

➤ Test à la résazurine

La résazurine, un composé bleu, non fluorescent, soluble, stable et non toxique, est également utilisée dans les tests de viabilité. Elle est réduite en résorufine, un produit rose fluorescent, permettant ainsi une quantification sensible et rapide de l'activité métabolique cellulaire.

➤ Dosage de l'ATP

Le dosage de l'ATP constitue un autre indicateur majeur de l'état énergétique des cellules.

Les cellules non viables perdent leur capacité à synthétiser l'ATP et présentent une dégradation rapide de celui-ci sous l'action d'ATPases endogènes.

Enfin, le système luciférine–luciférase, dépendant de l'ATP, permet de générer un signal de bioluminescence proportionnel à la quantité d'ATP présente. Cette méthode, très sensible, est largement utilisée pour l'évaluation quantitative de la viabilité cellulaire.

2.2. Méthodes basées sur l'accumulation de colorants

➤ Test au rouge neutre

Le rouge neutre est un colorant vital faiblement cationique qui traverse facilement la membrane plasmique, puis s'accumule dans les lysosomes où il se fixe aux sites anioniques de la matrice lysosomale. Cette accumulation est caractéristique des cellules viables, alors qu'elle n'est pas maintenue dans les cellules non viables (**Figure 2**).

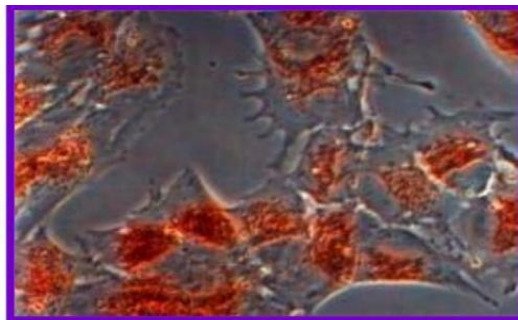


Figure 1. Accumulation du rouge neutre dans les lysosomes des cellules vivantes.

L'évaluation de l'incorporation du rouge neutre par les cellules vivantes s'effectue après fixation des cellules au formaldéhyde, suivie de l'extraction du colorant à l'aide d'un mélange acide acétique–éthanol. La quantité extraite est ensuite mesurée par spectrophotométrie, permettant une estimation de la viabilité cellulaire.

Cependant, ces tests présentent certaines limites. En effet, ils ne permettent pas de distinguer les cellules proliférantes des cellules quiescentes. Par conséquent, pour une interprétation correcte des résultats, il est recommandé de réaliser ces essais sur des périodes relativement courtes ou sur des cellules ayant quitté la phase exponentielle de croissance. Dans le cas contraire, une diminution du biomarqueur métabolique observée dans les cultures traitées pourrait être interprétée à tort comme une baisse de viabilité, alors qu'elle peut simplement refléter un effet cytostatique lié à une

inhibition de la prolifération cellulaire.

3. Méthodes d'évaluation de la cytotoxicité

3.1. Méthodes basées sur l'intégrité membranaire

Les tests de cytotoxicité permettent de détecter la perte d'intégrité de la membrane plasmique, un événement caractéristique de la mort cellulaire. Deux approches principales sont utilisées :

- l'utilisation de colorants dits d'exclusion, qui ne pénètrent que dans les cellules mortes ;
- la mesure de la libération d'enzymes cytosoliques dans le milieu extracellulaire.

3.1.1. Méthodes utilisant l'exclusion de colorants vitaux

Deux colorants sont couramment employés pour identifier les cellules mortes : le bleu de trypan, observé en microscopie optique, et l'iodure de propidium, utilisé en microscopie à fluorescence (Tableau 2).

- **Le bleu de trypan** est largement utilisé en culture cellulaire pour évaluer la viabilité cellulaire. Ce colorant est exclu activement par les cellules vivantes, tandis qu'il diffuse à travers la membrane des cellules mortes, qui apparaissent alors colorées en bleu au microscope. La détermination du taux de mortalité cellulaire repose sur un comptage des cellules, généralement réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez. Toutefois, cette méthode présente certaines limites : elle est relativement lente et sa fiabilité peut varier en fonction de l'opérateur.
- **L'iodure de propidium** est un fluorochrome non perméant qui ne traverse que les membranes plasmiques altérées des cellules mortes. Une fois à l'intérieur, il s'intercale de manière non spécifique dans l'ADN, généralement entre 4 à 5 paires de bases. Ainsi, seules les cellules mortes présentent une fluorescence rouge nucléaire, détectable par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux, permettant une analyse quantitative sur un grand nombre de cellules. Pour le dénombrement cellulaire, une étape de trypsinisation est souvent nécessaire. Celle-ci doit être réalisée avec précaution afin d'éviter toute altération artificielle des membranes plasmiques, susceptible d'entraîner des faux positifs.

Tableau 2. Comparaison entre le bleu de trypan et l'iodure de propidium (PI)

Critère	Bleu de trypan	Iodure de propidium (PI)
Principe	Colorant d'exclusion : pénètre uniquement dans les cellules non viables	Colorant intercalant de l'ADN : entre dans les cellules à membrane plasmique altérée
Méthode de détection	Microscopie optique en champ clair	Microscopie à fluorescence / cytométrie en flux
Signal observé	Cellules mortes colorées en bleu	Fluorescence rouge des cellules non viables
Spécificité	Distinction basique vivantes/mortes	Haute sensibilité ; détecte précisément la perte d'intégrité membranaire
Quantification	Comptage manuel (chambre de Malassez/hémocytomètre)	Quantification automatisée (cytométrie en flux)
Rapidité	Méthode relativement lente	Méthode rapide (surtout en cytométrie en flux)
Précision	Dépend de l'opérateur	Reproductibilité et précision élevées
Applications	Évaluation routinière de la viabilité cellulaire	Apoptose, cycle cellulaire, analyses par cytométrie
Limites	Faible sensibilité, subjectivité, faible débit	Nécessite un équipement de fluorescence, coût élevé

3.2. Méthodes basées sur la libération d'enzymes

En cas d'altération de l'intégrité de la membrane plasmique, des enzymes intracellulaires sont libérées dans le milieu extracellulaire. La détection de leur activité enzymatique constitue ainsi un indicateur de cytotoxicité.

3.2.1. Test de la lactate déshydrogénase (LDH)

Le test le plus couramment utilisé est celui de la LDH, une enzyme cytosolique stable qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate, avec production concomitante de NADH (**Figure 2**). La mesure de l'activité de la LDH dans le milieu de culture permet d'estimer le nombre de cellules lysées. Ce test présente l'avantage d'être non destructif, puisqu'il repose uniquement sur le prélèvement du surnageant de culture, ce qui permet de réaliser d'autres analyses complémentaires sur les mêmes cellules. Cependant, certaines limites doivent être prises en compte, notamment la diminution spontanée de l'activité enzymatique due à la dégradation naturelle de la LDH sous l'effet de facteurs tels que le pH ou les conditions de culture.

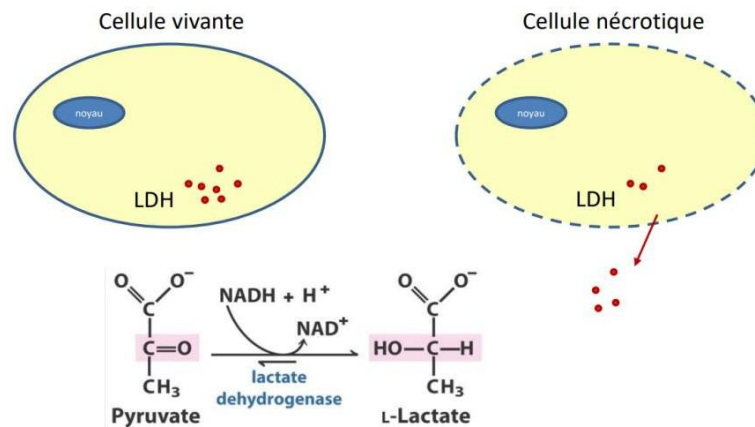


Figure 2. Principe du test lactate déshydrogénase (LDH).

4. Méthodes combinées (viabilité / cytotoxicité)

La discrimination entre cellules vivantes et cellules mortes repose sur l'utilisation combinée de colorants permettant d'évaluer simultanément l'activité métabolique des cellules viables et la perte d'intégrité membranaire des cellules mortes.

4.1. Test base sur le double marquage fluorescent (Association calcéine-AM / iodure de propidium)

La calcéine-AM (acétoxyméthyl ester) est une molécule non fluorescente et perméante qui diffuse librement à travers la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur des cellules vivantes, elle est hydrolysée par les estérases intracellulaires en calcéine, une molécule fluorescente verte qui reste piégée dans le cytoplasme. Ainsi, les cellules viables émettent une fluorescence verte. En parallèle, l'iodure de propidium, non perméant, pénètre uniquement dans les cellules mortes présentant une membrane altérée et s'intercale dans l'ADN, produisant une fluorescence rouge (**Figure 3**).

Cette double coloration permet une distinction nette :

- cellules vivantes : fluorescence verte
- cellules mortes : fluorescence rouge

La détection et la quantification peuvent être réalisées par microscopie à fluorescence, cytométrie en flux ou à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence. Ce test est particulièrement efficace pour distinguer rapidement les cellules viables des cellules nécrotiques ou en fin d'apoptose.

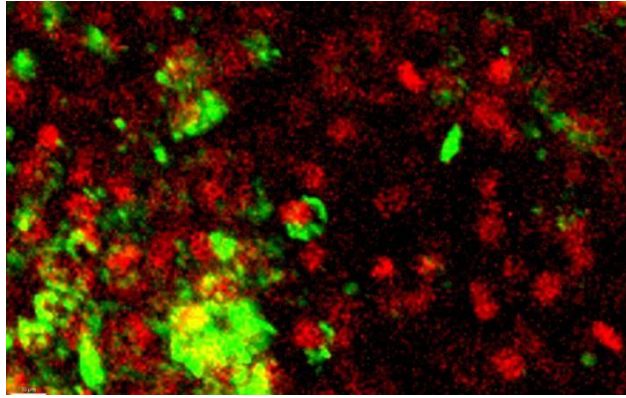


Figure 3. Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes par le test calceïne-acetomethoxyl (AM) + iodure de propidium

4.2. Tests basés sur l'activité protéasique

Une autre approche repose sur la détection simultanée de deux activités protéasiques distinctes à l'aide de substrats peptidiques couplés à des fluorophores, appliqués conjointement :

- Un premier substrat, perméant, permet de détecter l'activité de protéases intracellulaires spécifiques des cellules vivantes, générant un signal fluorescent. Cette activité disparaît lorsque la membrane plasmique est altérée.
- Un second substrat, non perméant, détecte l'activité des protéases extracellulaires libérées par les cellules mortes, produisant un signal fluorescent distinct.

Cette approche permet une évaluation simultanée et fiable de la viabilité et de la cytotoxicité cellulaire.

➤ Exemple : test de viabilité/cytotoxicité CytoTox-Glo™ (Promega)

Ce test repose sur l'utilisation de substrats peptidiques fluorescents sensibles aux protéases :

- **Détection des cellules mortes :**

Le kit utilise un substrat non perméant contenant un peptide spécifique des protéases libérées uniquement lorsque la membrane plasmique est rompue. Les cellules mortes libèrent ces protéases, qui clivent le substrat et génèrent un signal lumineux/fluorescent.

- **Détection des cellules vivantes (viables) :**

En parallèle, des substrats perméants peuvent être utilisés pour mesurer l'activité protéasique intracellulaire des cellules intactes, reflétant leur activité métabolique.

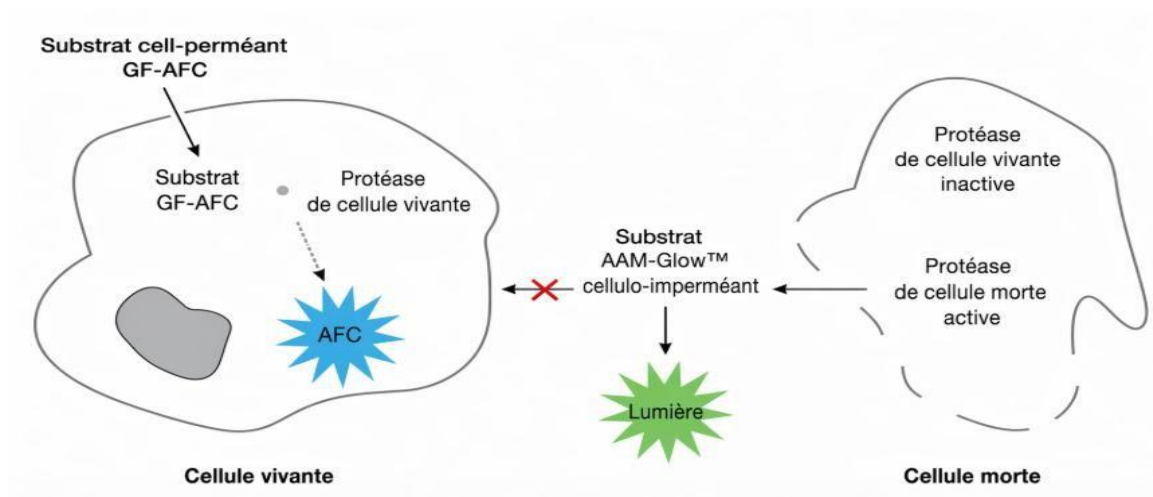


Figure 4. test de viabilité/cytotoxicité CytoTox-Glo™

5. Méthodes d'étude de la prolifération cellulaire

5.1. Dénombrement cellulaire

La méthode la plus simple pour évaluer la croissance cellulaire consiste à effectuer un dénombrement cellulaire (**Figure 5**). Le comptage peut être réalisé manuellement à l'aide d'un hémocytomètre quadrillé. Bien que cette technique soit simple et peu coûteuse, elle reste relativement lente et sa fiabilité dépend fortement de l'opérateur.

Des compteurs automatiques peuvent également être utilisés. Ces systèmes reposent généralement sur la microscopie, parfois couplée à la fluorescence, ainsi que sur une détection par caméra, permettant un comptage plus rapide, reproductible et précis des cellules.

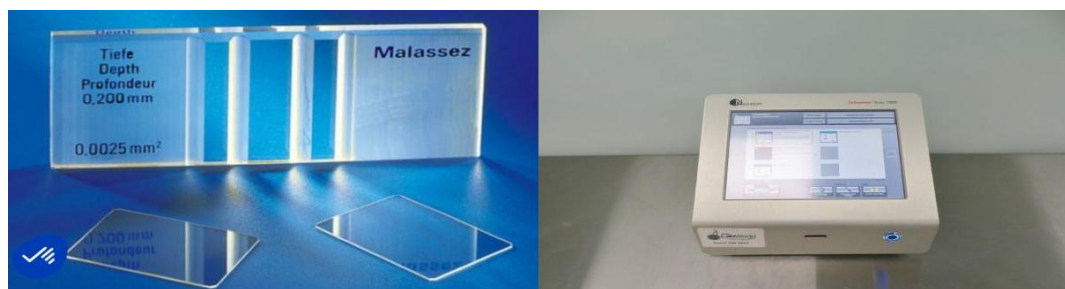


Figure 5. Dénombrement cellulaire : méthode manuelle à l'aide d'une lame de Malassez (à gauche) et comptage automatisé à l'aide d'un compteur de cellules (à droite).

5.2. Quantification des acides nucléiques

Le CyQUANT GR est un fluorochrome spécifique des acides nucléiques permettant une quantification rapide et simple du nombre de cellules. En se liant à l'ADN et à l'ARN, il génère un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'acides nucléiques présents, et donc au nombre de cellules (**Figure 6**).

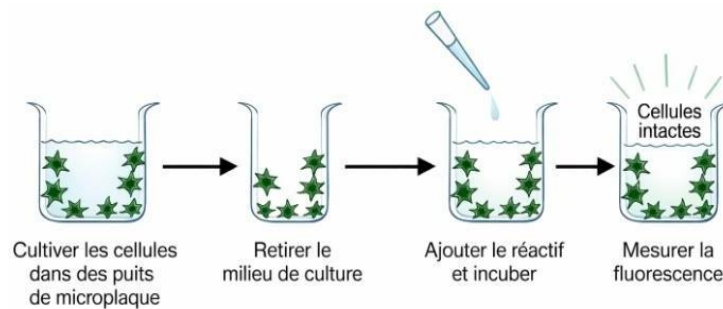


Figure 6. Principe du quantification des acides nucléiques avec le Cyquant GR.

Ce marqueur présente l'avantage d'offrir une grande sensibilité et une bonne stabilité après liaison aux acides nucléiques. Il est généralement utilisé sur des cellules préalablement congelées, ce qui permet leur perméabilisation. En présence d'un tampon de lyse, cette étape facilite l'accès du colorant aux acides nucléiques .

5.3. Incorporation d'un précurseur de l'ADN

Le paramètre le plus pertinent pour analyser la prolifération cellulaire est la mesure de la synthèse d'ADN, marqueur spécifique de la réplication. Des précurseurs de l'ADN marqués sont couramment utilisés, tels que la tritiée thymidine (^3H -thymidine), la bromodésoxyuridine (BrdU) et l'éthynyldésoxyuridine (EdU). Lors de la synthèse de l'ADN, ces analogues sont incorporés à

la place de la thymidine naturelle.

La détection de la ^3H -thymidine repose sur la mesure de la radioactivité, offrant une très grande sensibilité. Toutefois, l'utilisation de radioéléments constitue un inconvénient majeur. C'est pourquoi la BrdU et l'EdU sont aujourd'hui préférées.

Pour la BrdU, la détection nécessite l'utilisation d'anticorps anti-BrdU, ce qui implique une étape préalable de dénaturation de l'ADN afin de permettre l'accès de l'anticorps à l'antigène. En revanche, la détection de l'EdU repose sur une chimie « click », c'est-à-dire une réaction de

covalence catalysée par le cuivre entre le groupement azide d'un fluorochrome et la fonction alkyne de l'EdU. Cette méthode est compatible avec la cytométrie en flux (**Figure 7**).

Quel que soit le précurseur utilisé, lorsque l'étude est réalisée sur des cellules non synchronisées, donc réparties dans différentes phases du cycle cellulaire, il est nécessaire de définir précisément la durée et le moment d'exposition au marqueur.

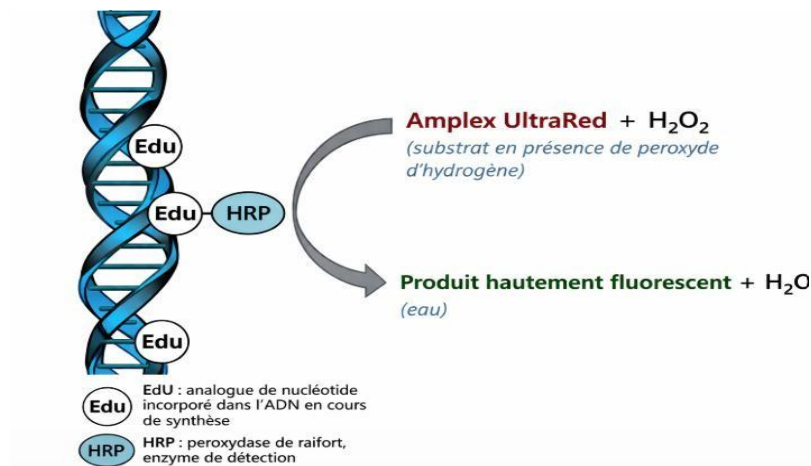


Figure 7. Principe de détection fluorimétrique basé sur l'incorporation de l'EdU.

6. Analyse du cycle cellulaire

Pour une analyse plus approfondie de l'effet d'une substance sur le cycle cellulaire, il est possible d'étudier la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle (**Figure 8**).

Cette analyse est généralement réalisée par cytométrie en flux sur des cellules dont l'ADN est marqué à l'iodure de propidium.

Les cellules en phase G0/G1 présentent une intensité de fluorescence environ deux fois plus faible que celles en phase G2/M, tandis que les cellules en phase S montrent une intensité intermédiaire, reflétant leur contenu en ADN en cours de réplication .

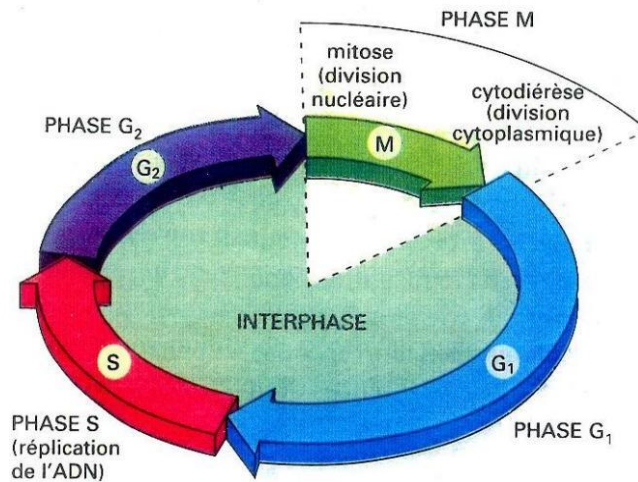


Figure 8. Les quatre phases successives d'un cycle cellulaire standard d'une cellule eucaryote.

7. Méthodes d'étude de la génotoxicité (test des comètes)

L'évaluation de la génotoxicité permet de détecter différents types d'altérations du matériel génétique, notamment les mutations géniques, les cassures et aberrations chromosomiques (clastogénicité), ainsi que les anomalies du nombre de chromosomes telles que les gains ou pertes chromosomiques (aneuploïdie).

Le test des comètes, également appelé électrophorèse sur gel de cellules individuelles, est une technique sensible et polyvalente permettant de mesurer les dommages à l'ADN au niveau de cellules uniques (**Figure 9**). Initialement développé pour étudier les variations des lésions de l'ADN et les capacités de réparation dans des populations de cellules de mammifères, il est aujourd'hui largement utilisé dans divers domaines tels que la toxicologie, la surveillance environnementale et la recherche en cancérologie.

Ce test permet la détection d'un large spectre de lésions de l'ADN, allant des cassures simple brin aux dommages plus complexes, incluant les cassures double brin et certains types de liaisons croisées. Grâce à sa sensibilité et sa simplicité de mise en œuvre, il constitue un outil de référence pour l'étude de la génotoxicité et des mécanismes de réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

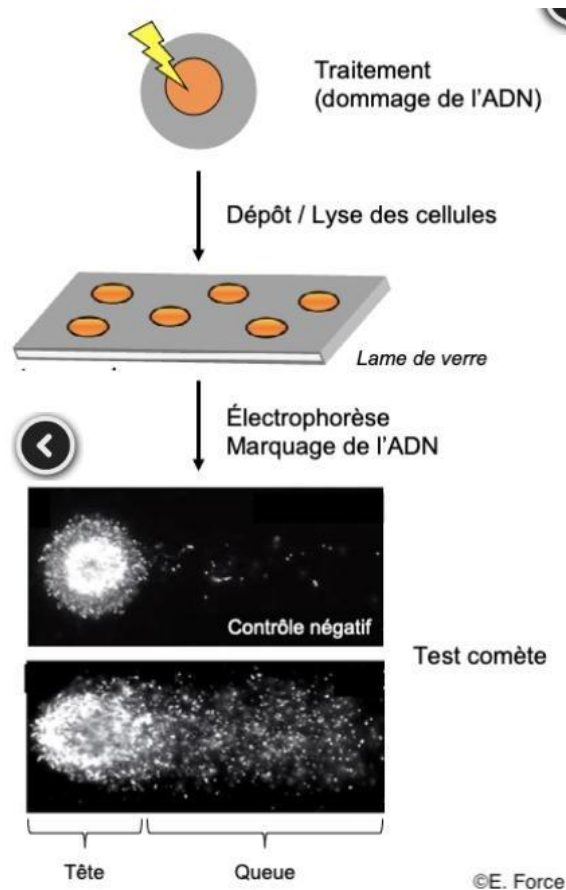


Figure 9. Principe du test comète .

➤ Avantages

- Cette technique permet de quantifier d'une part les dommages causés à l'ADN par divers agents toxiques et d'autre part la réparation des dommages dans les cellules eucaryotes ainsi que dans quelques cellules procaryotes in-vivo et in-vitro.
- Technique non invasive.
- Technique sensible (détection d'environ 0,2 à 2 coupures par 10^9 daltons).
- Les résultats sont obtenus en quelques heures par rapport aux techniques conventionnelles.
- 50 à 100 cellules sont comptées par échantillon par comptage manuel ou en utilisant un logiciel.

➤ Inconvénients

- Le débit de cette technique est bas, car une électrophorèse correspond à un type cellulaire / un agent toxique / une concentration.
- Les résultats ne peuvent être comparés que s'ils proviennent d'électrophorèses réalisées ensembles.

➤ **Exemples d'application:**

- Evaluation des produits chimiques génotoxiques in vivo et in vitro.
- Etude sur la réparation de l'ADN (réparation par excision; Strand Break Repair).
- Etude sur les dommages causés à l'ADN (cassure simple brin; sites alcali-labile; réticulation de l'ADN).
- En éco-toxicologie: test utilisé pour surveiller des sols et étudier la toxicologie aquatique.
- Evaluation des polluants génotoxiques provenant de sites de déchets dangereux.
- Epidémiologie de l'homme:
 - Banque de sang.
 - Suivi de la radio et chimio-thérapie chez les patients cancéreux.
 - Banque de sperme.

Références bibliographiques

1. Baeza-Squiban A, Andréau K. Viabilité, cytotoxicité, génotoxicité. In: Barlovatz-Meimon G, Ronot X, editors. *Culture de cellules animales*. 3e éd. Paris: Lavoisier; 2014. p. 139–152.
2. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127–152.
3. Burlinson B. The in vitro and in vivo comet assays. In: *Methods in Molecular Biology*. 2012;817:143–163.
4. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in cultures of mammalian cells. *J Immunol Methods*. 1988;115(1):61–69.
5. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci*. 2020;7:33.
6. Johnson S, Nguyen V, Coder D. Assessment of cell viability. *Curr Protoc Cytom*. 2013;64:9.2.1–9.2.26.
7. Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods*. 2001;254:85–98.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
9. Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem*. 2007;366:197–206.
10. Plumb JA. Cell sensitivity assays: clonogenic assay. In: Langdon SP, editor. *Methods in Molecular Medicine: Cancer cell culture: Methods and protocols*. Totowa (NJ): Humana Press; 2004. p. 159–164.
11. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: Langdon SP, editor. *Methods in Molecular Medicine: Cancer cell culture: Methods and protocols*. Totowa (NJ): Humana Press; 2004. p. 165–170.
12. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability. *J Immunol Methods*. 1991;142(2):257–265.
13. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184–191.
14. Sumantran VM. Cellular chemosensitivity assays: an overview. In: Cree IA, editor. *Cancer cell culture: Methods and protocols*. Totowa (NJ): Humana Press; 2011. p. 219–236.

Chapitre V :

**Outils de transfert génétique et systèmes
d'expression des protéines recombinantes**

I. Construction d'un système d'expression

I. 1. Introduction

La production de protéines recombinantes constitue aujourd'hui un pilier central de la biotechnologie moderne, notamment dans les domaines de la recherche fondamentale, de l'industrie pharmaceutique et de la biotechnologie industrielle. Cette production repose sur l'utilisation de systèmes d'expression capables de diriger la synthèse d'une protéine d'intérêt à partir d'un gène cloné.

La construction d'un système d'expression consiste à assembler un ensemble d'éléments génétiques et biologiques permettant l'expression contrôlée et efficace d'un gène dans un organisme hôte. Ce processus implique le choix d'un vecteur approprié, d'un promoteur adapté, ainsi que d'un hôte d'expression performant (bactéries, levures, cellules animales ou végétales). L'objectif est d'optimiser à la fois le rendement, la stabilité et, dans certains cas, les modifications post-traductionnelles de la protéine produite.

Cependant, la mise en place d'un tel système soulève plusieurs défis, notamment liés à la compatibilité entre le gène, le vecteur et l'hôte, ainsi qu'à la régulation fine de l'expression génique. Ainsi, la compréhension des principes de construction d'un système d'expression est essentielle pour maîtriser la production de protéines recombinantes à des fins académiques et industrielles.

I.2. Mécanismes de transfert de matériel génétique

I.2.1. La Transformation

I.2.1.1. Mise en évidence

Le phénomène de transformation bactérienne a été mis en évidence pour la première fois en 1928 par Frederick Griffith lors de ses expériences sur *Streptococcus pneumoniae*, un pathogène responsable de pneumonies (**Figure 1**). Griffith étudiait deux phénotypes bactériens distincts : les souches smooth (S), entourées d'une capsule polysaccharidique conférant un aspect lisse et une forte virulence, et les souches rough (R), dépourvues de capsule et donc non pathogènes, car rapidement éliminées par le système immunitaire de l'hôte.

Dans son protocole expérimental, Griffith injecta à des souris différentes combinaisons bactériennes :

- des bactéries S vivantes → mort des souris

- des bactéries R vivantes → survie
- des bactéries S tuées par la chaleur → survie
- un mélange de bactéries R vivantes + S tuées → mort des souris

L'observation clé fut la récupération de bactéries S vivantes à partir des souris infectées par le mélange. Cela impliquait que les bactéries R avaient acquis de manière stable la capacité à synthétiser une capsule, donc à devenir virulentes. Griffith proposa alors l'existence d'un « principe transformant », capable de transférer une information héréditaire entre bactéries, sans toutefois en identifier la nature chimique.

Sur le plan mécanistique, ce phénomène implique l'absorption d'ADN exogène par des bactéries dites compétentes, suivie de son intégration dans le génome par recombinaison homologue. Chez *S. pneumoniae*, cette compétence est un état physiologique régulé, impliquant des systèmes spécifiques de transport de l'ADN et des nucléases qui permettent l'entrée d'un simple brin d'ADN dans la cellule, où il peut ensuite s'apparier avec des séquences homologues.

La nature moléculaire du principe transformant fut élucidée en 1944 par Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarty. Dans une série d'expériences rigoureuses, ils préparèrent des extraits purifiés de pneumocoques S et les soumirent à des traitements enzymatiques spécifiques :

- protéases → dégradation des protéines
- ribonucléases (RNase) → dégradation de l'ARN
- désoxyribonucléases (DNase) → dégradation de l'ADN

Les résultats montrèrent que :

- la transformation persistait après destruction des protéines et de l'ARN
- mais était complètement abolie après traitement à la DNase

Ces observations démontraient de manière directe que l'ADN est le support du principe transformant, et donc de l'information génétique. Cette conclusion était révolutionnaire, car à l'époque, les protéines en raison de leur complexité structurale étaient largement considérées comme les meilleures candidates pour porter l'hérédité.

Les travaux d'Avery et de ses collaborateurs furent initialement accueillis avec prudence, mais ils constituèrent une étape déterminante vers l'établissement du rôle central de l'ADN, qui sera définitivement confirmé par les expériences de Hershey et Chase (1952) sur les bactériophages, puis par la découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick en 1953.

Ainsi, la transformation bactérienne représente non seulement un mécanisme naturel de transfert horizontal de gènes, jouant un rôle majeur dans l'évolution bactérienne (acquisition de virulence, résistance aux antibiotiques), mais aussi une preuve fondatrice que l'ADN constitue le support moléculaire de l'hérédité, marquant l'émergence de la biologie moléculaire moderne.

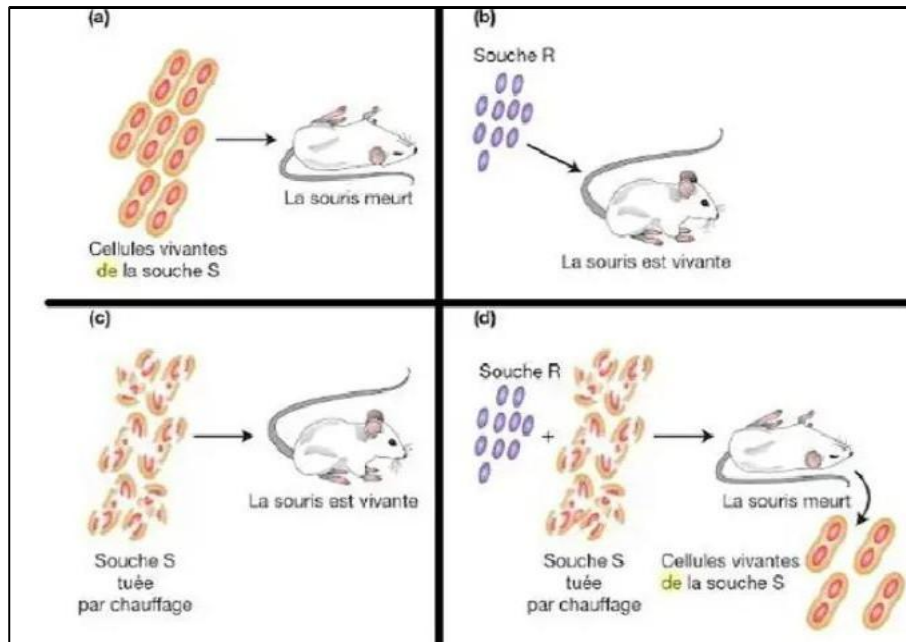


Figure 1. Expérience de transformation de Griffith.

I.2.2.2. Exigences de la transformation

La transformation bactérienne repose sur l'acquisition et l'intégration d'un ADN exogène nu, appelé exogénote, dans le génome de la cellule réceptrice, ou endogénote. Pour être biologiquement actif, cet ADN doit généralement être bicaténaire (double brin), condition essentielle à sa stabilité et à son intégration efficace.

Dans le cas de l'ADN chromosomique, l'incorporation de l'exogénote se fait principalement par recombinaison homologue, nécessitant une homologie de séquence suffisante avec le génome de la cellule hôte. La taille des fragments d'ADN joue un rôle déterminant dans l'efficacité de ce processus : chez de nombreuses bactéries, les fragments transformants présentent une longueur optimale comprise entre 8,5 et 12 kb, ce qui favorise leur stabilité et leur intégration. Dans le cas particulier des plasmides, l'ADN exogène peut être maintenu de manière autonome dans la cellule sous forme extrachromosomique, sans nécessiter de recombinaison, à condition de posséder une origine de répllication fonctionnelle compatible avec l'hôte. Un facteur clé de la transformation naturelle est l'état de compétence des cellules réceptrices. La compétence

correspond à un état physiologique transitoire durant lequel la bactérie est capable de capturer et internaliser l'ADN extracellulaire. Cet état est finement régulé et dépend de signaux environnementaux (densité cellulaire, stress, nutriments).

Le mécanisme de compétence diffère selon le type de bactérie :

- Chez les bactéries **Gram positives**, l'ADN est généralement internalisé sous forme de **simple brin**, après dégradation partielle d'un des deux brins au niveau de la membrane.
 - Chez les bactéries **Gram négatives**, des systèmes plus complexes impliquant la membrane externe, le périplasme et des protéines spécifiques permettent le transport de l'ADN, souvent avec une reconnaissance de séquences particulières.

Ainsi, la transformation bactérienne est un processus hautement contrôlé, dépendant à la fois des propriétés de l'ADN exogène (structure, taille, homologie) et de l'état physiologique de la cellule réceptrice.

I.2.2.3. Mécanisme de la transformation bactérienne

Lorsque les conditions optimales sont réunies notamment la présence d'un ADN transformant fonctionnel et l'état de compétence des bactéries réceptrices le transfert de matériel génétique peut avoir lieu. Bien que le mécanisme général soit conservé, il existe des variations selon les espèces bactériennes, en particulier entre bactéries Gram positives et Gram négatives, en raison des structures de leur enveloppe cellulaire.

Le processus de transformation peut être décomposé en trois étapes principales (**Figure 2**) :

➤ **Fixation (adsorption de l'ADN)**

La rencontre entre les fragments d'ADN exogène et les cellules réceptrices se fait de manière aléatoire. L'ADN, initialement sous forme bicaténaire (double brin), se fixe à la surface des bactéries compétentes grâce à des récepteurs membranaires spécifiques. Chaque cellule peut posséder environ 30 à 80 sites de liaison, permettant l'attachement de multiples fragments d'ADN. Cette étape constitue une phase essentielle de reconnaissance et de sélection de l'ADN exogène.

➤ **Pénétration (internalisation de l'ADN)**

L'entrée de l'ADN dans la cellule implique un système enzymatique associé à la membrane. Une endonucléase membranaire intervient en clivant l'un des deux brins de l'ADN bicaténaire. Ainsi,

un seul brin simple (ADN simple brin) est internalisé dans le cytoplasme, tandis que l'autre brin est dégradé à l'extérieur ou au niveau de la membrane. Ce mécanisme est couplé à une activité de translocation, assurant le passage de l'ADN à travers les structures membranaires.

➤ **Intégration (recombinaison génétique)**

Une fois à l'intérieur de la cellule, l'ADN simple brin s'intègre au génome bactérien par recombinaison homologue, nécessitant une homologie de séquence avec l'ADN du receveur. Ce processus implique un échange de brins avec l'ADN chromosomique, conduisant à la formation d'un hétéroduplex (ADN hybride composé d'un brin parental et d'un brin exogène). La région recombinée est ensuite stabilisée lors des cycles de réplication suivants, permettant l'expression du nouveau caractère acquis.

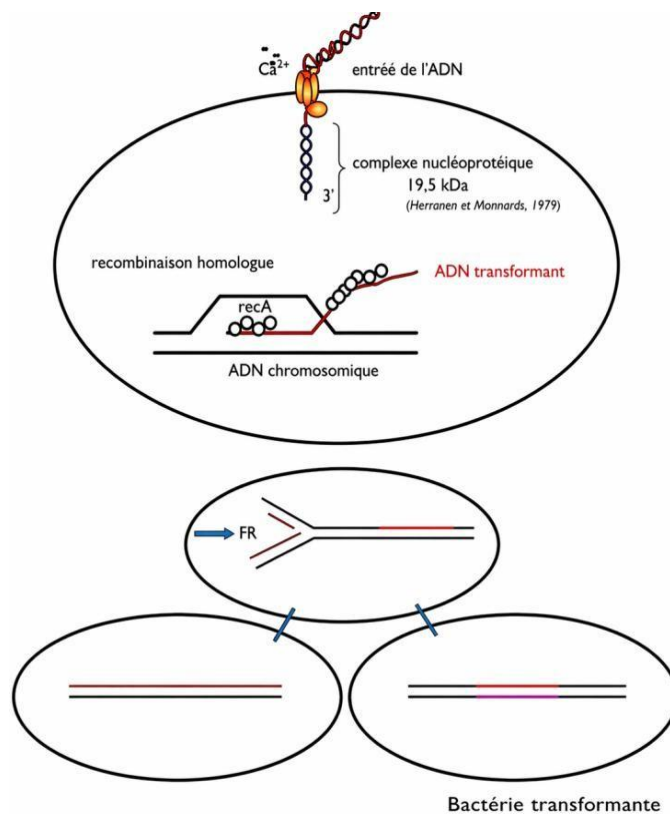


Figure 2. Les étapes de la transformation.

I.2.2.4. Conséquences de la transformation bactérienne

La transformation bactérienne constitue un processus fondamental en biologie, avec des implications majeures à la fois conceptuelles, expérimentales et appliquées :

- **Démonstration du rôle de l'ADN comme support de l'hérédité**
La mise en évidence de la transformation a permis d'établir que l'ADN, et non les protéines, constitue le support moléculaire de l'information génétique, notamment grâce aux travaux de Frederick Griffith et de Oswald Avery et ses collaborateurs.
- **Avancées en génétique bactérienne**
Ce mécanisme a permis l'élaboration des premières cartes génétiques partielles chez les bactéries, facilitant l'étude de gènes impliqués dans des phénotypes clés tels que la virulence et la résistance aux antibiotiques.
- **Outil central du génie génétique**
La transformation est devenue une technique de base en biologie moléculaire, largement utilisée pour le clonage de gènes. Elle permet l'introduction d'ADN recombinant dans des bactéries, notamment chez *Escherichia coli*, souvent rendues artificiellement compétentes (par traitement chimique ou électroporation).
- **Rôle dans la variabilité génétique et l'évolution bactérienne**
La transformation participe activement au transfert horizontal de gènes, contribuant à la diversité génétique des populations bactériennes.
- **Implication dans la variation antigénique et la pathogénicité**
Ce mécanisme est impliqué dans la variation antigénique chez certaines bactéries pathogènes comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.
- **Émergence de résistances aux antibiotiques**
La transformation joue également un rôle clé dans l'acquisition de gènes de résistance chez des bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis*, contribuant ainsi à un enjeu majeur de santé publique.

I. 2.2. La Transduction

I.2.2.1. Mise en évidence

La transduction est un transfert génétique par l'intermédiaire d'un virus (bactériophage) qui est le vecteur de l'exogénote (matériel génétique du donneur).

Le phénomène a été mis en évidence en 1951 par Zinder et Lederberg chez *Salmonella typhimurium*. Ces auteurs cherchaient à obtenir des recombinants prototrophes à partir de mutants auxotrophes issus de différentes souches de *Salmonella*. Ils ont ainsi découvert un mécanisme distinct de la conjugaison, appelé par la suite transduction.

Deux souches auxotrophes ont été utilisées : la souche 2A, nécessitant l'histidine, et la souche 22A, nécessitant le tryptophane. Les deux souches étaient cultivées dans un dispositif en U séparé à sa base par une membrane en verre fritté, empêchant le passage des bactéries mais permettant celui des bactériophages. Cette configuration a permis d'obtenir des recombinants.

La transduction correspond à un mécanisme de transfert de gènes d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse via un bactériophage.

Certains bactériophages, comme le phage P22 chez *Salmonella*, lors de leur cycle lytique, provoquent la fragmentation du génome bactérien. Des fragments d'ADN bactérien peuvent alors être empaquetés dans des capsides virales à la place de l'ADN phagique. Ces phages dits transducteurs sont capables d'infecter une bactérie receveuse et de lui transférer ce fragment d'ADN bactérien, lequel peut ensuite s'intégrer au génome de l'hôte par recombinaison homologue.

I.2.2.2. Exigences de la transduction

La transduction nécessite principalement :

- la présence d'un phage transducteur capable d'emporter de l'ADN bactérien
- une bactérie réceptrice sensible à l'infection par ce phage
- une homologie génétique suffisante permettant l'intégration de l'ADN transféré

I.2.2.3. Types de transduction

La capside d'un bactériophage peut servir de vecteur pour véhiculer des gènes bactériens d'une bactérie à une autre. On distingue :

➤ La transduction généralisée

N'importe quel gène bactérien a théoriquement, la même probabilité d'être transduit (**Figure 3**) .

Au cours de l'infection, le phage se fixe à la paroi de la cellule bactérienne donneuse et injecte son ADN dans la bactérie. L'ADN de phage sert de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ADN viral. Il dirige également la synthèse de la capside protéique du phage. Pendant ce temps le chromosome bactérien est fragmenté par des enzymes virales, il arrive que, durant l'assemblage des phages, quelques fragments d'ADN bactériens soient enfermés par erreur à l'intérieur de la capside protéique des bactériophages. Certaines

particules virales ainsi formées contiennent alors de l'ADN bactérien plutôt que l'ADN phagique. Quand les particules virales libérées infectent par la suite une nouvelle population de bactéries, il y a à l'occasion transfert de gènes bactériens à des cellules receveuses.

La transduction de l'ADN cellulaire par un virus peut avoir pour conséquence la recombinaison de l'ADN de la cellule hôte donneuse et de celui de la cellule hôte receveuse. Le processus de la transduction généralisée est typique des bactériophages tels que le phage P1 de *E. coli* et le phage P22 de *Salmonella*.

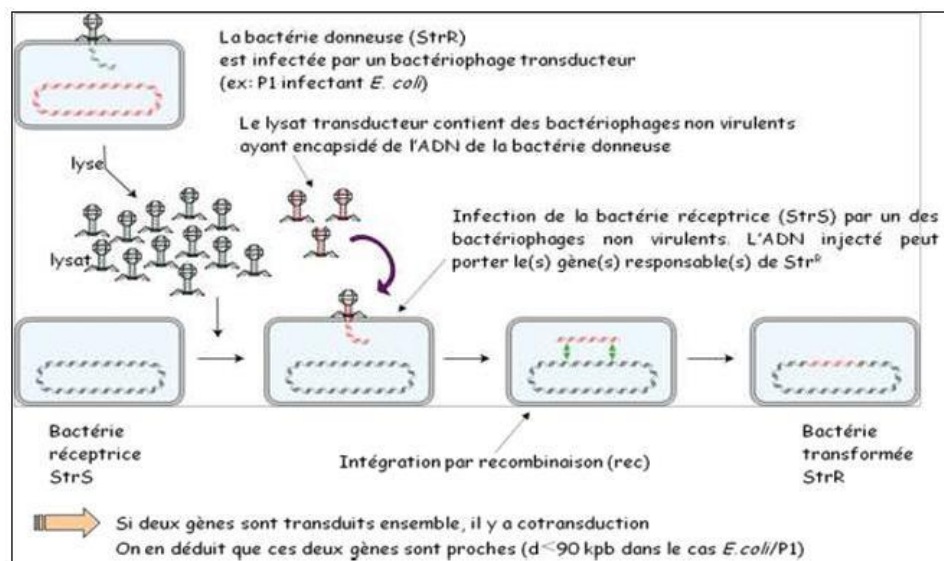


Figure 3. La transduction généralisée

➤ La transduction spécialisée

Pour un phage donné et pour une espèce bactérienne donnée, ce sont toujours les mêmes gènes qui sont transduits; exemple: phage λ et gène *gal*: cette spécificité dépend du site spécifique d'intégration du prophage dans le chromosome bactérien pendant le cycle lysogène. Lorsque le phage λ se fixe comme un prophage en point précis du chromosome, situé près du locus *Gal*. Des échanges peuvent survenir entre phage et la partie du chromosome proche du site de fixation. Lorsque le prophage se transforme en bactériophage virulent et se multiplie, certains virus seront porteurs de matériel génétique de l'hôte (**Figure 4**).

Certains des bactériophages formés qui portent des gènes bactériens peuvent avoir perdu un ou plusieurs de leurs propres gènes: ils sont dits défectifs (λ_d). Un tel bactériophage porteur de gène bactérien *gal* sera dit λ_{dgal} . Les bactériophages porteurs d'exogénote (matériel génétique issu d'une autre cellule) pourront le transmettre à la bactérie qu'ils infectent. Ce

transfert est rare, sa fréquence est de 10^{-5} (transduction à basse fréquence). Lorsque un tel bactériophage devient prophage, la bactérie infectée devient partiellement diploïde: avec le bactériophage λ , le gène *gal* peut être transmis à une bactérie *Gla*⁻ avec la formation un hétérozygote *gal*⁺/*gal*⁻.

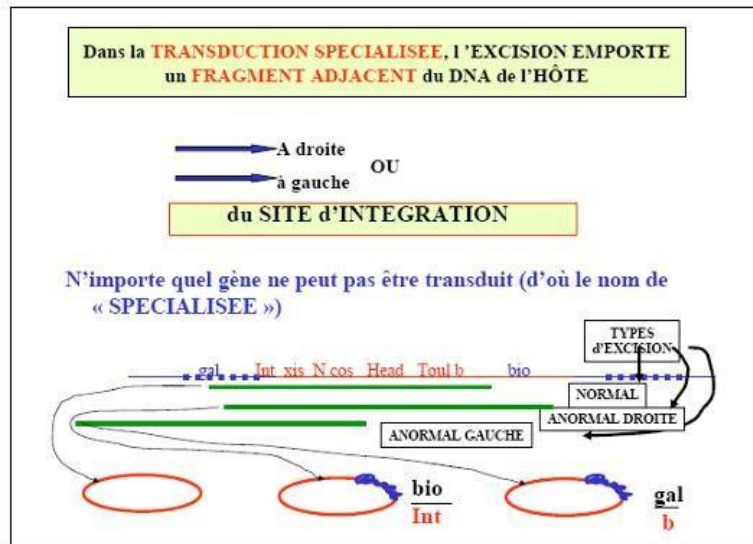


Figure 4. La transduction Spécialisée

I.2.2.4. Conséquences biologiques

La transduction permet le transfert de nombreux caractères génétiques, tels que :

- la fermentation de substrats
- la résistance aux antibiotiques
- la synthèse d'antigènes
- la virulence bactérienne

Elle constitue ainsi un mécanisme clé de diversité génétique et d'évolution bactérienne.

I.2.3. La transfection

I.2.3.1. Définition

La transfection est un processus de transfert de gènes correspondant à l'introduction artificielle de matériel génétique exogène (ADN ou ARN) dans des cellules eucaryotes, sans recours à un vecteur viral, contrairement à la transduction. Ce phénomène, analogue à la transformation bactérienne mais historiquement non désigné ainsi chez les cellules animales en raison de son association à des altérations phénotypiques pouvant évoquer un état précancéreux, permet d'étudier la fonction des gènes et l'expression des protéines dans un

contexte cellulaire donné. L'acide nucléique introduit peut être exprimé de manière transitoire, sans réplication, ou de façon stable après intégration dans le génome de la cellule hôte. La transfection repose généralement sur l'ouverture transitoire de pores membranaires ou sur l'utilisation de systèmes facilitant le passage de molécules chargées négativement à travers la membrane plasmique également chargée négativement. Ainsi, des méthodes chimiques (phosphate de calcium, DEAE-dextran), biologiques ou des réactifs à base de lipides cationiques permettent de neutraliser ou d'inverser la charge de l'ADN et de favoriser sa pénétration, notamment grâce à des propriétés fusogènes. Par ailleurs, des techniques physiques telles que la micro-injection ou l'électroporation permettent d'introduire directement le matériel génétique dans le cytoplasme. Les cellules ainsi préparées à accepter un ADN étranger sont qualifiées de cellules compétentes (**Figure 5**).

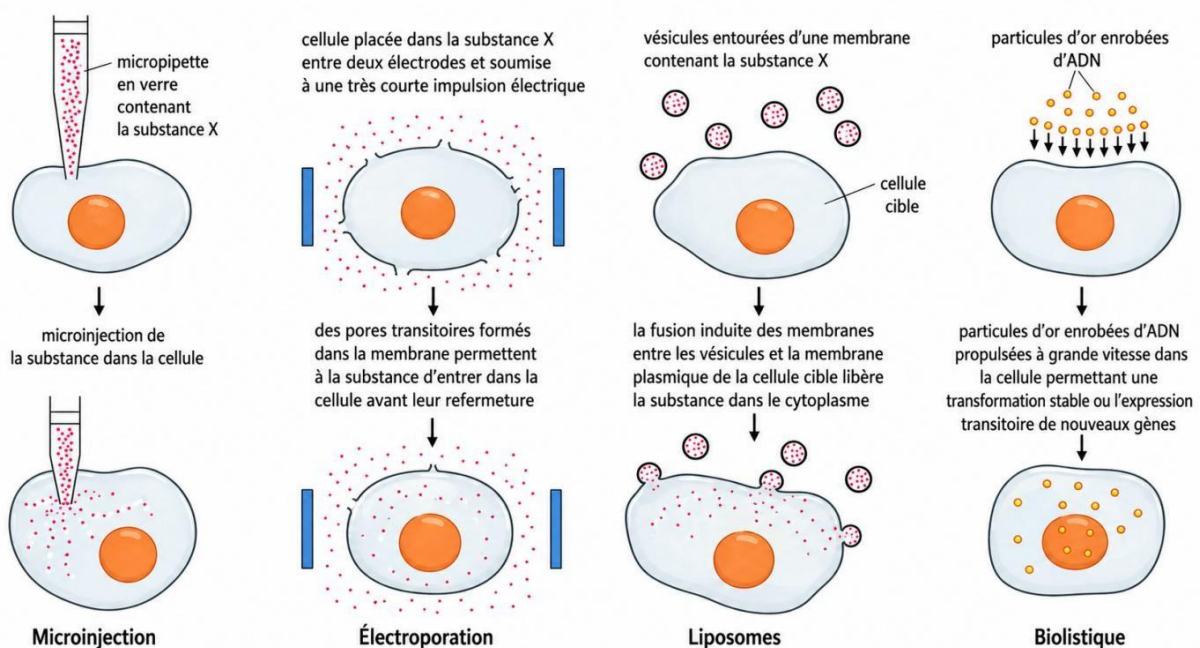


Figure 5. Principales méthodes d'introduction de substances dans une cellule eucaryote.

I.2.3.2. Méthodes de transfert directe de gène

➤ Transfection par le PEG

La transfection par le polyéthylène glycol (PEG) est une méthode chimique de transfert direct de gènes largement utilisée, notamment chez les cellules végétales et les protoplastes. Le PEG est un polymère non toxique de haut poids moléculaire qui induit une déstabilisation

réversible de la membrane plasmique, facilitant ainsi l'entrée de l'ADN exogène dans la cellule. Cette technique a permis des applications importantes en biotechnologie végétale, comme l'obtention de plantes transgéniques, notamment du maïs résistant à des herbicides tels que le glufosinate, et elle est également employée chez d'autres espèces comme la betterave.

➤ **Transfection par phosphate de calcium**

La transfection par phosphate de calcium est une méthode chimique classique de transfert de gènes, décrite en 1977 par S. Bacchetti et F. L. Graham, et largement utilisée en biologie cellulaire pour son faible coût et sa simplicité. Elle repose sur la formation d'un précipité insoluble de phosphate de calcium lorsque l'ADN est mélangé à une solution de chlorure de calcium puis ajouté à une solution saline tamponnée au HEPES (HeBS) contenant des ions phosphate, dans des conditions de pH strictement contrôlées (environ 7,05–7,12). L'ADN s'adsorbe à la surface de ces microcristaux, formant des complexes qui sont ensuite déposés sur des cellules en culture, généralement en monocouche.

L'entrée de l'ADN dans les cellules s'effectue principalement par endocytose du précipité, bien que le mécanisme exact ne soit pas totalement élucidé. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle clé en neutralisant les charges négatives de l'ADN et de la membrane plasmique, facilitant ainsi l'interaction et l'internalisation. Une fois internalisé, l'ADN peut être libéré dans le cytoplasme puis atteindre le noyau, où il peut être exprimé de manière transitoire ou s'intégrer plus rarement dans le génome cellulaire pour une expression stable.

Cependant, cette méthode présente plusieurs limites : son efficacité est variable et dépend fortement de paramètres expérimentaux tels que le pH, la concentration en ADN, la taille et la densité du précipité, ainsi que le type cellulaire utilisé (elle est plus efficace avec certaines lignées comme les cellules HEK293). De plus, le précipité peut être cytotoxique s'il est mal contrôlé, entraînant une diminution de la viabilité cellulaire. Malgré ces inconvénients, la transfection au phosphate de calcium reste une méthode de référence, notamment pour des applications nécessitant de grandes quantités d'ADN ou dans des contextes où le coût est un facteur limitant.

➤ **Transfection par le DEAE-Dextran**

La transfection par le DEAE-dextran est une méthode chimique de transfert direct de gènes reposant sur l'utilisation du diéthylaminoéthyl-dextran (DEAE-dextran), un polymère cationique capable de se lier électrostatiquement à l'ADN chargé négativement. Cette interaction permet la formation de complexes ADN-polymère qui adhèrent à la membrane plasmique et facilitent l'entrée de l'ADN dans la cellule, principalement par endocytose. Afin d'augmenter l'efficacité de la transfection, cette méthode est souvent associée à un traitement au choc osmotique (par exemple avec du DMSO ou du glycérol), favorisant la libération de l'ADN dans le cytoplasme.

La transfection par DEAE-dextran est rapide, simple et peu coûteuse, mais elle présente certaines limites, notamment une efficacité variable selon le type cellulaire et une cytotoxicité potentielle à forte concentration. De plus, elle conduit généralement à une expression transitoire du gène introduit, car l'ADN ne s'intègre que rarement dans le génome de la cellule hôte. Cette technique est donc principalement utilisée pour des études d'expression génique à court terme.

➤ **Technique des liposomes**

La technique des liposomes, également appelée lipotransfection ou lipofection, est une méthode chimique de transfert direct de gènes reposant sur l'utilisation de vésicules sphériques constituées de bicouches lipidiques ou phospholipidiques, similaires aux membranes plasmiques. Ces liposomes encapsulent les fragments d'ADN à transférer, formant des complexes capables d'interagir avec la membrane cellulaire. Ils peuvent fusionner spontanément avec la membrane plasmique, ou sous l'effet de certains agents comme le PEG, notamment dans le cas de protoplastes végétaux issus de cultures cellulaires. Cette fusion permet la libération de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule (**Figure 6**). Toutefois, une partie de cet ADN est dégradée par des nucléases intracellulaires, tandis qu'une fraction seulement atteint le noyau où elle peut être exprimée de manière transitoire ou, plus rarement, s'intégrer au génome cellulaire, conduisant à la formation d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Cette méthode est appréciée pour sa relative efficacité et sa faible toxicité, bien que son rendement dépende du type cellulaire et des conditions expérimentales.

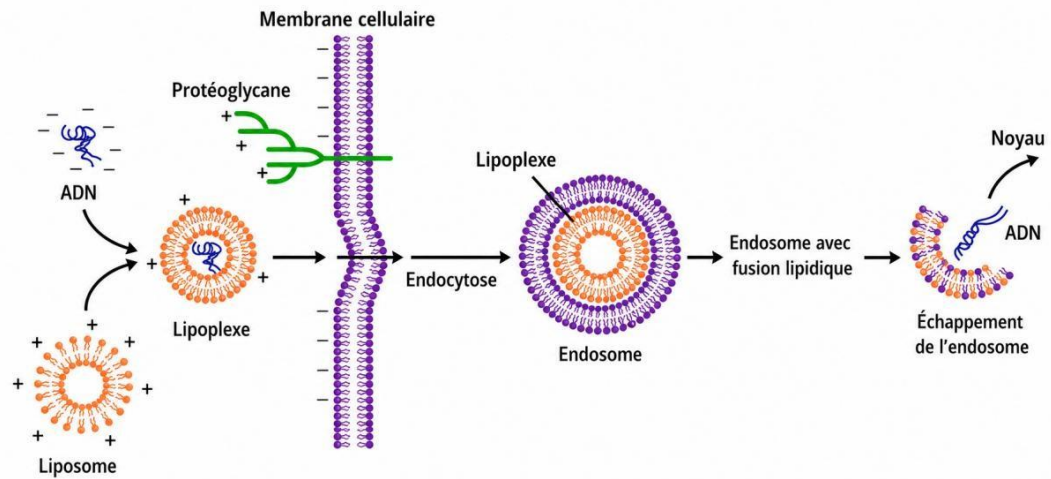


Figure 6. Transfert de gènes par l'intermédiaire de liposomes.

➤ L'électroporation

L'électroporation est une méthode physique de transfert direct de gènes qui consiste à appliquer de brèves impulsions électriques à des cellul

es afin de perméabiliser temporairement leur membrane plasmique (**Figure 7**). Sous l'effet de ce champ électrique, des pores transitoires se forment dans la bicouche lipidique, permettant l'entrée de molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN) normalement incapables de traverser la membrane. Une fois l'impulsion terminée, la membrane se referme progressivement, emprisonnant le matériel génétique à l'intérieur de la cellule. Cette technique est largement utilisée en biologie moléculaire et en biotechnologie en raison de sa rapidité, de sa grande efficacité et de sa compatibilité avec de nombreux types cellulaires, y compris les cellules animales, végétales et bactériennes. Cependant, elle peut entraîner une cytotoxicité si les paramètres électriques optimisés.

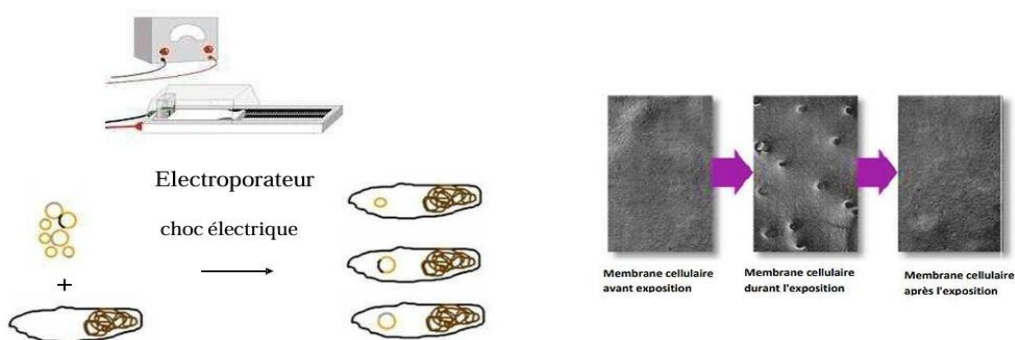


Figure 7. Transfert de gène par à un champ électrique

➤ **Biolistique ou canon à ADN**

La méthode de transfection biolistique, ou « canon à ADN », est une technique de transfert direct de gènes développée afin d'introduire de l'ADN dans des cellules entières sans recourir à la préparation de protoplastes, ce qui permet de contourner les difficultés de régénération rencontrées chez certaines espèces végétales. Elle est également applicable aux cellules animales, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, notamment en thérapie génique (**Figure 8**).

Son principe repose sur la propulsion mécanique de micro-particules inertes (principalement en or ou en tungstène, d'environ 1 µm de diamètre) sur lesquelles l'ADN d'intérêt est préalablement précipité. Ces microprojectiles sont accélérés à très haute vitesse par un système de propulsion utilisant soit une décharge de poudre, soit une détente de gaz sous pression, le plus souvent de l'hélium. Ils sont ensuite projetés à travers les barrières tissulaires ou cellulaires. Après l'impact, le macro-projectile est arrêté afin d'éviter la destruction des cellules, tandis que certaines microbilles pénètrent dans les cellules et délivrent l'ADN.

Une fois à l'intérieur, l'ADN doit atteindre le noyau cellulaire, où il peut s'exprimer de manière transitoire ou s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, conduisant à la production de cellules ou de plantes transgéniques. Cette technique a notamment permis l'obtention de nombreuses plantes transgéniques chez des espèces auparavant réfractaires, telles que le maïs et le blé, après culture des explants sur milieu sélectif.

La biolistique présente plusieurs avantages majeurs par rapport aux autres méthodes de transfection : elle ne nécessite pas de cellules en division rapide, permet la co-transfection de plusieurs plasmides simultanément, et peut être appliquée à des tissus complexes ou *in vivo*, y compris des cellules difficiles à transfecter comme les neurones. Elle est également considérée comme plus sûre que les méthodes virales, avec une toxicité relativement faible et un coût de réactifs modéré. De plus, elle permet d'atteindre des couches cellulaires profondes des tissus.

Cependant, son principal inconvénient reste le coût élevé des équipements (canon à ADN) et certaines limitations liées aux dommages mécaniques potentiels sur les cellules. Malgré cela, la transfection biolistique constitue une technique puissante et polyvalente, ayant fortement contribué aux progrès de la biotechnologie végétale et de la thérapie génique.

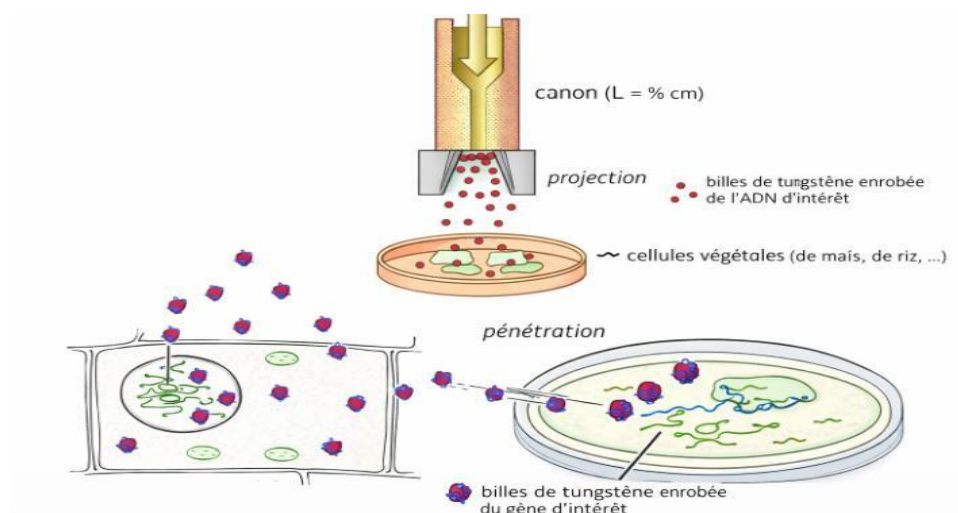


Figure 8. Schéma du canon à particules.

➤ Agrobiolistique

L'agrobiolistique est une technique hybride de transfert de gènes qui combine la biolistique et la transformation indirecte par les agrobactéries. Elle a été développée dans le but d'améliorer l'efficacité de la transformation génétique chez des espèces végétales peu sensibles aux méthodes classiques, en particulier celles difficilement accessibles par la biolistique seule ou par l'infection bactérienne seule. Dans cette approche, le canon à ADN est utilisé non pas uniquement pour introduire le matériel génétique, mais surtout pour provoquer des microblessures au niveau des tissus végétaux. Ces lésions facilitent ensuite l'invasion des cellules par des agrobactéries porteuses du gène d'intérêt, augmentant ainsi significativement le rendement de transformation. L'association des deux techniques permet donc de tirer profit de la capacité naturelle des agrobactéries à transférer l'ADN tout en améliorant leur accès aux cellules grâce à l'action mécanique de la biolistique.

➤ La micro-injection

La micro-injection est une technique de transfert direct de gènes qui repose sur l'introduction mécanique d'acides nucléiques directement dans une cellule à l'aide d'une micropipette fine, permettant ainsi de contourner les barrières membranaires (**Figure 9**). Le matériel cellulaire le plus favorable à cette approche est le protoplaste, c'est-à-dire une cellule végétale isolée dont la paroi a été totalement éliminée par digestion enzymatique. Cette préparation débute par la dissociation des cellules grâce à la pectinase, qui hydrolyse les composants pectiques de la lamelle moyenne, suivie d'un traitement par la cellulase, parfois combiné à d'autres enzymes, afin de dissoudre complètement la paroi cellulaire.

Afin de préserver l'intégrité des protoplastes après la suppression de la paroi, le milieu est soigneusement ajusté en pression osmotique à l'aide de sels ou de mannitol, évitant ainsi leur éclatement. Une fois les cellules préparées, la micro-injection permet d'introduire directement l'ADN dans le cytoplasme, voire dans le noyau. Cependant, cette technique présente une difficulté majeure liée au repérage du noyau, souvent rendu complexe par la présence de chloroplastes et par la grande vacuole centrale qui repousse le noyau en périphérie. Malgré ces contraintes, la micro-injection reste une méthode précise et efficace pour des études ciblées d'expression génique au niveau cellulaire.

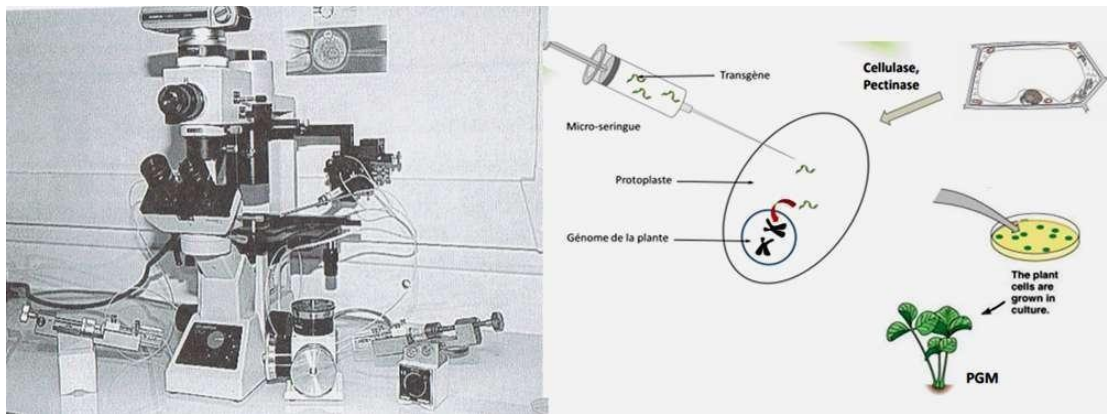


Figure 9. Dispositif permettant la micro-injection d'ADN dans des protoplastes végétaux .

II. Systèmes d'expression

II.1. Introduction

Les systèmes d'expression correspondent à l'ensemble des stratégies, des outils moléculaires et des types cellulaires utilisés en biotechnologie pour assurer la production de protéines recombinantes. Ces protéines d'intérêt sont obtenues à partir d'un gène préalablement isolé, cloné dans un vecteur d'expression, puis introduit dans une cellule ou un organisme hôte capable de le transcrire et de le traduire.

On distingue principalement deux grandes catégories de systèmes d'expression : les systèmes procaryotes, représentés essentiellement par les bactéries comme *Escherichia coli*, et les systèmes eucaryotes, incluant les levures, les cellules d'insectes, les cellules de mammifères, ainsi que les organismes végétaux et algues. Le choix entre ces systèmes dépend fortement de la complexité de la protéine à produire. En effet, certaines protéines nécessitent des modifications post-traductionnelles spécifiques (glycosylation, repliement, formation de ponts disulfure) qui ne peuvent être correctement réalisées que dans des cellules eucaryotes.

Le choix du système d'expression repose sur plusieurs critères essentiels. Parmi ceux-ci figurent les caractéristiques intrinsèques de la protéine (taille, structure tridimensionnelle, stabilité, activité biologique), les capacités de l'hôte (vitesse de croissance, rendement d'expression, capacité de modification post-traductionnelle), ainsi que des considérations économiques (coût des milieux de culture, facilité de mise à l'échelle) et temporelles (durée nécessaire entre le clonage du gène et l'obtention de la protéine fonctionnelle). À cela s'ajoutent également les contraintes réglementaires, particulièrement importantes dans le cadre de la production de protéines thérapeutiques destinées à un usage clinique.

Ainsi, les systèmes d'expression constituent des outils fondamentaux en biotechnologie moderne. Ils sont largement utilisés en recherche fondamentale pour l'étude de la structure et de la fonction des protéines, dans le développement de vaccins, ainsi que dans la production industrielle de biomédicaments tels que les anticorps monoclonaux, les hormones recombinantes ou les enzymes thérapeutiques.

Tableau 1. Exemples de protéines recombinantes thérapeutiques produites dans différents systèmes d'expression.

Nom commercial	Société	Catégorie	Système d'expression	Indication	AMM (1)
Humulin®	Eli Lilly	Insuline	<i>E. coli</i>	Diabète	1982
RECOMBIVAX HB®	Merck	Vaccin Recombinant	Levures (<i>S. cerevisiae</i>)	Prévention de l'hépatite B	1986
Activase®	Genentech	Activateur tissulaire du plasminogène (tPA)	Cellules animales (CHO)	Infarctus du myocarde	1987
Concert™	Dow AgroSciences	Vaccin	Plantes (non-nicotine tabacco)	Maladie de Newcastle chez les volailles	2006
ATryn®	GTC Biotherapeutic	Antithrombine III	Animaux transgéniques (chèvre)	Thromboses	2006
Cervarix®	GSK	Vaccin contre le papillomavirus	Cellules d'insecte	Cancer du col de l'utérus	2007

(1) AMM : autorisation de mise sur le marché.

II.2. Production en cellules procaryotes

II.2.1. Systèmes d'expression bactérien

Les systèmes bactériens sont souvent qualifiés, à juste titre, de véritables « usines à protéines » ou bioréacteurs bactériens, en raison de leur capacité à produire rapidement de grandes quantités de protéines recombinantes. Toutefois, les protéines ainsi obtenues doivent subir des étapes rigoureuses de purification afin d'atteindre un degré de pureté élevé (généralement supérieur à 95 %), indispensable aussi bien pour leur commercialisation à grande échelle que pour l'étude de leurs propriétés structurales et fonctionnelles en laboratoire de recherche.

II.2.1.1. Espèces utilisées

➤ *Escherichia coli*

En 1973, Cohen et Boyer réussissent à introduire des gènes d'un amphibien dans la bactérie *E. coli* et obtiennent ainsi le premier organisme transgénique. Elle constitue l'un des organismes les plus utilisés pour la production de protéines recombinantes. Son emploi en tant qu'« usine cellulaire » est aujourd'hui bien maîtrisé, ce qui en fait la plateforme d'expression la plus populaire en biotechnologie. Cette popularité s'explique par la disponibilité d'un grand nombre d'outils et de protocoles moléculaires, ainsi que par l'existence d'un vaste choix de plasmides d'expression, de souches génétiquement modifiées et de stratégies de culture adaptées à la production à grande échelle de protéines hétérologues.

➤ Avantages de l'utilisation d'*E. coli*

- **Croissance rapide :**

En conditions optimales (milieu glucose-sels), le temps de doublement est d'environ

20 minutes. Une culture peut ainsi atteindre la phase stationnaire en quelques heures. Toutefois, l'expression de protéines recombinantes peut imposer une charge métabolique et ralentir la croissance.

- **Culture à haute densité cellulaire :**

E. coli peut atteindre des densités cellulaires élevées. Des techniques spécifiques de culture à haute densité ont été développées pour optimiser la production, même en présence d'une expression recombinante.

- **Milieux de culture économiques :**

Les milieux utilisés sont simples, peu coûteux et faciles à préparer à partir de composants disponibles.

- **Facilité de transformation génétique :**

L'introduction d'ADN exogène est rapide et efficace, facilitant les manipulations génétiques.

- **Bonne caractérisation :**

La biologie, la génétique et la physiologie d'*E. coli* sont très bien connues.

- **Adaptation à la production industrielle :**

Cette bactérie est facilement cultivable à grande échelle.

- **Grande disponibilité d'outils moléculaires :**

De nombreux vecteurs plasmidiques permettent l'insertion et l'expression de gènes étrangers.

- **Rendement élevé :**

Les protéines recombinantes peuvent représenter plus de 20 % des protéines totales, avec des niveaux d'expression pouvant atteindre plusieurs grammes par litre.

➤ **Inconvénients**

- **Absence de certaines modifications post-traductionnelles :**

E. coli ne possède pas les mécanismes nécessaires pour assurer certaines modifications (ex : glycosylation).

- **Problèmes de repliement des protéines :**

Certaines protéines ne prennent pas leur conformation tridimensionnelle native en raison du manque de chaperonnes spécifiques.

- **Formation de corps d'inclusion :**

Les protéines recombinantes sont souvent accumulées sous forme d'agrégats insolubles.

- **Récupération difficile des protéines actives :**

Les étapes de dénaturation et de renaturation peuvent réduire l'activité biologique des protéines.

➤ ***Caulobacter crescentus***

Caulobacter crescentus est une bactérie procaryote Gram négatif qui constitue un système d'expression alternatif à *Escherichia coli*. Elle est particulièrement intéressante en biotechnologie en raison de sa capacité à sécréter naturellement des protéines dans le milieu extracellulaire, ce qui facilite leur récupération et leur purification.

Cette bactérie possède un cycle cellulaire bien caractérisé, avec une différenciation en deux types cellulaires distincts (cellule mobile et cellule fixée), ce qui en fait également un modèle d'étude en biologie cellulaire. Sur le plan biotechnologique, *C. crescentus* est capable de produire et d'exporter des protéines recombinantes sous forme soluble, limitant ainsi la formation de corps d'inclusion souvent observée chez *E. coli*.

Parmi ses avantages, on note une meilleure capacité de repliement de certaines protéines et la possibilité de sécrétion directe dans le milieu de culture, simplifiant les étapes de purification. Cependant, son utilisation reste moins répandue en raison d'un rendement généralement inférieur à celui d'*E. coli*, d'un nombre plus limité d'outils moléculaires disponibles et d'une maîtrise technique encore moins développée.

Ainsi, *Caulobacter crescentus* représente une alternative prometteuse pour la production de protéines recombinantes, notamment lorsque la solubilité et la sécrétion des protéines constituent des critères déterminants.

➤ ***Les Bacillus***

Les bactéries du genre *Bacillus*, notamment *Bacillus subtilis*, constituent des systèmes d'expression procaryotes largement utilisés en biotechnologie. Ces microorganismes Gram positifs sont particulièrement intéressants pour la production de protéines recombinantes destinées à être sécrétées dans le milieu extracellulaire.

L'un des principaux atouts des *Bacillus* réside dans leur capacité naturelle à exporter efficacement les protéines hors de la cellule, ce qui facilite grandement les étapes de récupération et de purification. De plus, contrairement à *Escherichia coli*, ces bactéries produisent peu ou pas d'endotoxines, ce qui représente un avantage important pour les applications pharmaceutiques et alimentaires. Elles sont également capables de produire des protéines sous forme soluble, réduisant ainsi la formation de corps d'inclusion.

Les *Bacillus* présentent aussi une bonne capacité de croissance en milieux simples et peu coûteux, ainsi qu'une adaptation favorable à la production industrielle à grande échelle. De nombreux vecteurs d'expression et souches optimisées ont été développés pour améliorer leur rendement.

Cependant, ces systèmes présentent certaines limites. Les protéines sécrétées peuvent être dégradées par des protéases extracellulaires produites par la bactérie. De plus, le niveau d'expression peut être parfois inférieur à celui observé chez *E. coli*, et les outils génétiques disponibles restent moins diversifiés. Enfin, comme les autres procaryotes, les *Bacillus* ne réalisent pas certaines modifications post-traductionnelles propres aux cellules eucaryotes.

Ainsi, les bactéries du genre *Bacillus* représentent une alternative intéressante aux systèmes classiques, notamment pour la production de protéines sécrétées et dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique.

➤ *Ralstonia eutropha*

Ralstonia eutropha (également connue sous le nom de *Cupriavidus necator*) est une bactérie Gram négatif utilisée comme système d'expression bactérien alternatif en biotechnologie. Elle est particulièrement connue pour sa capacité à accumuler des polymères de type polyhydroxyalcanoates (PHA), ce qui en fait un microorganisme d'intérêt industriel.

Dans le domaine de l'expression recombinante, *R. eutropha* est utilisée pour la production de protéines hétérologues grâce à sa forte robustesse métabolique et à sa capacité à croître sur des substrats variés, y compris des sources de carbone bon marché ou industrielles. Elle présente également une bonne stabilité génétique et peut atteindre des densités cellulaires élevées, ce qui favorise une production efficace de biomolécules.

Un avantage important de ce système est sa capacité à exprimer certaines protéines dans un environnement cellulaire relativement stable, avec une tolérance intéressante à des conditions de culture variées. De plus, elle est étudiée pour des applications combinant production de protéines et bioproduction durable.

Cependant, l'utilisation de *R. eutropha* reste encore limitée par rapport à des systèmes plus classiques comme *Escherichia coli*. Les outils moléculaires disponibles sont moins développés, les protocoles d'expression sont moins standardisés, et les niveaux de production de protéines recombinantes sont parfois inférieurs. Son exploitation à grande échelle nécessite encore des optimisations importantes.

Ainsi, *Ralstonia eutropha* représente un système prometteur mais encore émergent, particulièrement intéressant dans les approches de biotechnologie durable et de production intégrée.

II.3. Systèmes d'expression eucaryotes

II.3.1. Production dans les eucaryotes inférieurs

➤ Les levures

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a longtemps été l'eucaryote microbien de référence dans le développement de la technologie de l'ADN recombinant. Elle est encore largement utilisée aujourd'hui pour l'étude de l'expression génique ainsi que pour la production de protéines recombinantes. Cependant, d'autres espèces de levures ont été développées afin d'améliorer certains paramètres tels que la vitesse de croissance, le rendement en protéines hétérologues et les capacités de fermentation à grande échelle.

Parmi ces levures alternatives, on peut citer *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* (aujourd'hui appelée *Komagataella phaffii*), *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*. Ces organismes présentent plusieurs avantages communs avec les systèmes bactériens, notamment une croissance rapide, la possibilité d'être cultivés sur des milieux relativement peu coûteux, ainsi que la disponibilité de nombreux vecteurs d'expression et souches mutantes adaptées à différentes applications biotechnologiques. Dans certains cas, les procédés de fermentation à grande échelle peuvent être plus complexes que ceux des bactéries. Toutefois, ces difficultés peuvent généralement être surmontées grâce à une optimisation rigoureuse des conditions de culture et à un contrôle précis des paramètres de fermentation.

Un exemple particulièrement important est celui de *Pichia pastoris*, capable d'atteindre des rendements élevés en protéines recombinantes, pouvant aller jusqu'à environ 12 g/L, soit 10 à 100 fois plus que ceux obtenus avec *S. cerevisiae*. Cette levure peut croître sur le méthanol comme seule source de carbone. Dans ce système, l'expression est contrôlée par le promoteur de l'alcool oxydase (AOX1), une enzyme fortement induite en présence de méthanol et représentant une grande proportion des protéines cellulaires. L'utilisation de ce promoteur permet d'obtenir une expression très élevée de protéines hétérologues.

Ainsi, les systèmes d'expression de levures représentent un compromis intéressant entre les systèmes bactériens et les systèmes eucaryotes, combinant facilité de culture et capacité à effectuer certaines modifications post-traductionnelles.

➤ Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux constituent des systèmes d'expression eucaryotes importants en biotechnologie, utilisés pour la production de protéines recombinantes et d'enzymes à usage industriel. Parmi les genres les plus exploités figurent *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Penicillium*, qui sont naturellement capables de sécréter de grandes quantités de protéines dans le milieu extracellulaire.

L'un des principaux avantages de ces organismes réside dans leur forte capacité de sécrétion, ce qui facilite considérablement la récupération et la purification des protéines produites. De plus, ils possèdent une machinerie eucaryote leur permettant d'effectuer certaines modifications post-traductionnelles, notamment le repliement des protéines et certaines glycosylations, bien que celles-ci puissent différer de celles observées chez les cellules de mammifères.

Les champignons filamenteux sont également adaptés à la culture industrielle, car ils peuvent croître sur des substrats peu coûteux et dans des conditions de fermentation à grande échelle. Ils sont ainsi largement utilisés pour la production d'enzymes industrielles (cellulases, protéases, amylases) et de certaines protéines recombinantes.

Cependant, leur utilisation présente aussi des limites. Leur croissance sous forme de mycélium peut entraîner des problèmes de viscosité du milieu de culture, rendant les fermentations plus difficiles à contrôler. De plus, les outils génétiques disponibles restent moins développés que ceux des levures ou de *Escherichia coli*, et les niveaux d'expression peuvent être variables selon les espèces.

Ainsi, les champignons filamenteux représentent une plateforme eucaryote efficace et largement utilisée pour la production de protéines sécrétées et d'enzymes à grande échelle, notamment dans les secteurs industriel et biotechnologique.

II.3.2. Production dans les eucaryotes supérieurs

Afin de pallier l'échec de la production de protéines complexes comme les anticorps monoclonaux fonctionnelles dans des bactéries, levures ou champignons filamenteux, la communauté scientifique s'est tournée peu à peu vers la production en cellules eucaryotes supérieures.

➤ Les cellules animales

L'émergence de la culture de cellules animales a marqué une étape essentielle dans le développement des systèmes d'expression eucaryotes pour la production de protéines recombinantes thérapeutiques. Elle débute notamment avec la production du tPA (tissue Plasminogen Activator, Activase®) par la société Genentech en 1987, considéré comme l'un des premiers biopharmaceutiques produits à grande échelle en cellules de mammifères. Depuis, ce secteur a connu une expansion majeure, avec un marché mondial dépassant les 20 milliards de dollars par an, représentant environ 60 à 70 % des protéines thérapeutiques actuellement disponibles.

La production repose principalement sur les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), qui constituent le système industriel de référence. D'autres lignées cellulaires sont également utilisées, notamment les cellules BHK (Baby Hamster Kidney), les cellules de myélome de souris telles que NSO et Sp2/0 (utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux), les cellules humaines HEK-293 issues de rein embryonnaire, les cellules HeLa dérivées de carcinome cervical, ainsi que certaines cellules rétiniennes humaines.

Des stratégies avancées sont utilisées pour améliorer la productivité, notamment le contrôle de la prolifération cellulaire, la régulation de l'apoptose, ainsi que l'amélioration des vecteurs d'expression.

Des travaux complémentaires portent sur l'optimisation des milieux de culture, la modulation de l'expression des gènes endogènes, ainsi que sur l'amélioration de la qualité des protéines produites.

Une tendance récente concerne également le renforcement de la sécurité sanitaire par le remplacement des composants d'origine animale par des alternatives végétales ou synthétiques, afin de réduire les risques de contamination.

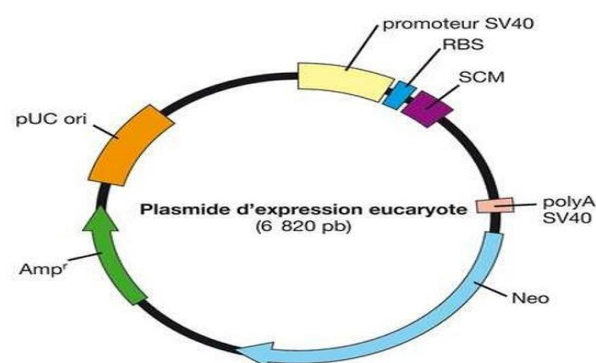


Figure 10. Vecteur d'expression typique destiné aux cellules animales

● Avantages

- Les cellules animales peuvent être cultivées à grande échelle en bioréacteurs, ce qui permet la production industrielle de protéines recombinantes.
- Les cellules CHO produisent des protéines complexes, de haut poids moléculaire, correctement repliées et présentant des modifications post-traductionnelles très proches de celles des protéines humaines.
- Leur physiologie est bien connue, ce qui facilite les études et l'optimisation des procédés de production.
- Des améliorations biotechnologiques (vecteurs d'expression plus performants, contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose) permettent d'augmenter la productivité et la qualité des protéines.
- L'optimisation des milieux de culture et le contrôle de l'expression des gènes endogènes sont activement étudiés.
- Une tendance actuelle consiste à remplacer les composants d'origine animale par des alternatives végétales afin de réduire les risques de contamination et améliorer la sécurité sanitaire.

● Inconvénients

- Les rendements en protéines recombinantes restent relativement faibles (environ 5 à 10 mg/L), comparés aux systèmes bactériens ou levuriaux.
- Les cellules animales sont très exigeantes sur le plan nutritionnel, ce qui rend leur culture délicate, complexe et coûteuse.
- Les installations industrielles de production sont très onéreuses, avec des investissements pouvant atteindre environ 200 millions de dollars pour une capacité annuelle d'environ 200 kg d'anticorps.

➤ Cellules d'insectes

La production de protéines recombinantes en cellules d'insectes infectées par un vecteur dérivé du baculovirus s'est également démocratisée (**Figure 11**). Les baculovirus sont non pathogènes pour l'homme et les cellules d'insectes présentent l'avantage de pouvoir produire naturellement des protéines complexes glycosylées de par leur machinerie cellulaire élaborée (9). De plus, les cellules d'insectes possèdent une forte activité protéasique pouvant

influencer le traitement des protéines recombinantes. Par exemple, il a été montré que les cellules High Five™ expriment des protéases actives, facilitant la maturation des protéines recombinantes via des mécanismes de clivage appropriés.

Le système d'expression dans la lignée Sf9 de *Spodoptera frugiperda* infectées par un baculovirus permet également une bonne expression de protéines au profil de glycosylation proche de celui des cellules de mammifères et de sécréter la protéine directement dans le milieu de culture, facilitant l'étape d'extraction. Par ailleurs, les cellules d'insectes sont capables de produire des protéines recombinantes à des rendements équivalents à ceux des cellules de mammifères. De nombreuses glycoprotéines recombinantes, dont des anticorps biologiquement actifs, ont ainsi été produites dans ce système. C'est l'exemple du vaccin trivalent contre la grippe Flublok™ produit dans des cellules Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) et du vaccin bivalent contre le papillomavirus humain HPV 16/18 - Cervarix® - produit dans des cellules Hi-5. Cependant, le profil de glycosylation naturellement retrouvé chez les cellules d'insectes se caractérise par la présence de structures glycaniques simples de type oligomannose ou pauci-mannose, pouvant également porter des résidus α 1,3-fucose immunogènes pour l'homme.

Bien que certaines cellules d'insectes comme les cellules High Five™ aient permis de produire des immunoglobulines présentant des 23 résidus terminaux galactosylés, des approches d'humanisation génétique des voies de glycosylation sont ici encore nécessaires. Par ailleurs, l'étape d'infection lytique par le baculovirus recombinant constitue une limitation contraignante pour tout développement industriel, car celle-ci impose de disposer de larges stocks de virus et d'effectuer de nombreuses campagnes d'infection et de production. Enfin, l'activité protéasique des cellules d'insectes, bien que bénéfique pour le traitement des protéines recombinantes, peut avoir des effets délétères sur la qualité des protéines produites. En effet, ces protéases peuvent dégrader prématurément les protéines cibles, entraînant une altération de leur structure et de leur fonctionnalité, rendant leur utilisation pour des applications biologiques ou thérapeutiques problématique. Par ailleurs, des recherches montrent que cette activité protéasique peut entraîner la formation de produits secondaires ou de fragments de protéines qui ne sont pas souhaités, compliquant ainsi l'extraction et la purification des protéines d'intérêt et réduisant ainsi les rendements de production. Les chercheurs doivent donc souvent trouver des moyens de moduler ou d'inhiber l'activité protéasique pour garantir la stabilité des protéines recombinantes durant le processus de production. D'autres systèmes alternatifs ont été envisagés, tels que celui de la société

américaine Chesapeake PERL, qui infecte directement des larves d'insectes par voie orale par des vecteurs baculovirus et extrait la protéine recombinante des larves infectées. Ce système d'expression original a permis l'expression de fragments d'anticorps fonctionnels dans les larves *Trichoplusia ni*, avec un rendement supérieur à 1 gramme par kg de larves, mais l'application de cette technologie se restreint encore aux réactifs de recherche, une mise à l'échelle industrielle étant difficilement envisageable

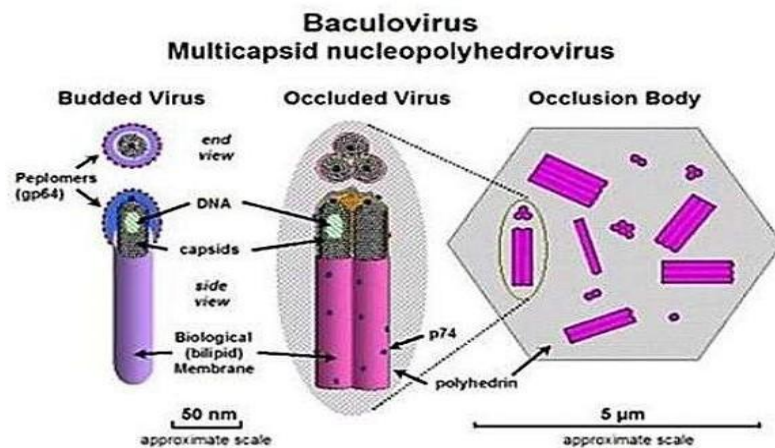


Figure 11. Structure et différentes formes du baculovirus, en particulier le *Multicapsid nucleopolyhedrovirus* (MNPV), largement utilisé comme système d'expression en biotechnologie .

➤ Les animaux transgéniques

De nombreuses sociétés de biotechnologies telles GTC Biotherapeutics (États-Unis) ou Pharming (Pays-Bas) ont investi activement depuis des années dans la technologie des animaux transgéniques pour la production de protéines thérapeutiques. En théorie, plusieurs sous-systèmes peuvent être utilisés pour la production de protéines recombinantes dans des animaux : le lait, le sang, le blanc d'œuf, le plasma séminal, l'urine et les glandes séricigènes ou encore l'hémolymphe de larve d'insecte. Pour des raisons de rendement mais aussi de 24 sécurité par rapport à l'animal, le sous-système le plus utilisé est le lait. L'intérêt de ce système pour la production d'anticorps monoclonaux fonctionnels a été démontré dans le lait de souris et de chèvres transgéniques, pour des rendements atteignant 1 gramme par litre de lait de chèvre. Ce système hôte présente également de nombreux avantages. Les animaux transgéniques peuvent permettre en théorie une production industrielle économiquement compétitive : ils produisent des

protéines à des rendements élevés, en particulier pour les gros animaux comme les vaches ou les chèvres. De plus, les animaux peuvent être élevés sur de longues périodes, permettant une production continue sans avoir à redémarrer un système de culture cellulaire. Les animaux transgéniques sont également capables de générer des protéines complexes nécessitant des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations, ce qui réduit leur potentiel immunogène pour l'homme. Par ailleurs, la purification des protéines recombinantes dans le lait n'est pas nécessairement complexe, ce qui simplifie le procédé de production. Malgré l'attractivité de ce système apportée par la qualité des protéines produites, cette plateforme présente aussi des inconvénients. Tout d'abord, la présence de résidus mannose ainsi que la présence, chez la chèvre, d'acides sialiques non humains N-glycosyl neuraminiques pourrait conférer une immunogénicité à ces anticorps. De plus, les coûts de mise en place pour la production de protéines recombinantes dans des animaux transgéniques sont très élevés, et il existe une variabilité inter-individus dans la quantité et la qualité de protéines produites, ce qui complique le procédé de production à grande échelle. Enfin, il existe un questionnement éthique important par rapport à la modification génétique d'animaux et les conséquences potentielles liées. En effet, les animaux peuvent pâtir de la présence d'un transgène étranger, ce qui soulève la question de leur souffrance potentielle. Si le développement commercial de produits thérapeutiques issus d'animaux transgéniques s'est longtemps heurté à une réticence des autorités réglementaires vis-à-vis des produits d'origine transgénique, l'approbation donnée en 2006 par l'Agence européenne du médicament (EMA), puis en février 2009 par la FDA, à GTC Biotherapeutics pour la mise sur le marché de ATryn®, une antithrombine 25 recombinante produite dans le lait de chèvres transgéniques, a constitué une étape majeure validant l'acceptation réglementaire de la technologie, et en a renforcé l'intérêt. Les progrès effectués dans les techniques de transfert de gènes aux animaux laissent à penser qu'il sera un jour possible de réduire presque totalement les risques de perturbation du génome que représente l'addition d'un gène étranger, même si les effets d'un transgène sur les générations futures ne seront pas totalement prévisibles. La production d'anticorps monoclonaux dans le blanc d'œuf de poules transgéniques a été également considérée comme une stratégie à fort potentiel. Comparativement à l'élevage d'animaux transgéniques (vaches, chèvres), la production dans le blanc d'œuf de poules offre une facilité de production : il existe des techniques d'élevage industrielles bien établies pour les poules transgéniques, et ce système offre une facilité de collecte puisque le blanc d'œuf est facilement accessible et peut être collecté sans nuire à l'animal, permettant une production en continu. De plus, cette solution représente une économie d'échelle, puisque les poules peuvent produire de grandes quantités

de blanc d'œuf, ce qui permet une production à grande échelle de protéines. Comme pour les cellules de mammifères, les protéines recombinantes produites dans le blanc d'œuf de poules transgéniques sont pourvues des modifications post-traductionnelles appropriées, se rapprochant du profil des protéines humaines. Enfin, les autorités réglementaires sont familières avec les produits de santé issus d'œufs de poules, puisque de nombreux vaccins sont produits depuis des décennies sur les œufs embryonnés, et sont donc plus favorables à leur utilisation que celle d'autres animaux transgéniques. Ainsi, en 2005, la société américaine Origen Therapeutics a réussi à démontrer la faisabilité de cette approche en générant des poules transgéniques exprimant un anticorps monoclonal anti-CD20 avec un rendement de production de 3 mg par œuf (39). Cet anticorps a présenté un profil de glycosylation similaire à celui des anticorps produits dans des cellules CHO, mais son activité ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) s'est avérée bien supérieure en raison du taux en résidus fucose remarquablement bas, propriété caractéristique des systèmes aviaires. Cependant, malgré ces résultats encourageants, la production d'anticorps dans le blanc d'œuf de poules transgéniques n'est pas encore pleinement exploitée. Les défis techniques, tels que l'obtention d'un taux satisfaisant de poules transgéniques, persistent. Bien que des avancées aient été réalisées dans l'isolement et la culture de cellules souches embryonnaires 26 aviaires, leur utilisation pour générer des animaux transgéniques reste un objectif à long terme.

Tableau 2. Protéines recombinantes en phase cliniques produites par des animaux transgéniques

Protéines	Espèces animales	Applications	Compagnies
Antithrombine III* [#]	Brebis	Thrombose, Embolie pulmonaire	GTC Biotherapeutics (USA)
tPA	Brebis	Thrombose	PPL Therapeutics (UK)
α -antitrypsine*	Chèvre	Emphysème, Cirrhose	PPL Therapeutics (UK)
Facteur IX*	Chèvre	Hémophilie b	PPL Therapeutics (UK)
Facteur VIII*	Chèvre Truie	Hémophilie a	PPL Therapeutics (UK)
Anticorps polyclonaux*	Vache	Vaccins	Hematech (USA)
Lactoferrine*	Vache	Bactéricide	Pharming Group (NED)
C1 inhibitor* ^Δ	Lapine	Angioedème héréditaire	Pharming Group (NED)
Calcitonine	Lapine	Ostéoporose, hypercalcémie	PPL Therapeutics (UK)

➤ Cellules aviaires

L'investissement constant dans les systèmes de mammifères a abouti au développement de matériels et de technologies de culture adaptés à des cellules capables de croître en suspension dans un milieu dépourvu de sérum animal. C'est le cas des cellules aviaires qui ont démontré leur intérêt pour la production d'anticorps recombinants. En effet, elles expriment efficacement et sécrètent des protéines humaines recombinantes qui présentent un profil de glycosylation proche du profil humain et pauvres en résidus fucose, ce qui est favorable à leur efficacité thérapeutique (activité ADCC renforcée pour les anticorps monoclonaux). De plus, les systèmes aviaires peuvent offrir une alternative plus sûre à certains systèmes de production, notamment en réduisant le risque de contamination par des pathogènes humains. La production dans ces cellules aviaires permet en conséquence de combiner plusieurs avantages : d'une part l'utilisation d'infrastructures et de procédés de production existants et bien maîtrisés, d'autre part une reconnaissance réglementaire conférée par les développements industriels en cours dans le domaine du vaccin ; et enfin une production de molécules recombinantes présentant un profil de glycosylation similaire à l'homme, avec l'avantage pour la production d'anticorps recombinants de présenter une activité biologique ADCC fortement accrue due aux caractéristiques intrinsèques du règne aviaire. Le modèle d'expression en cellules aviaires EB66® a ainsi été développé par la

société nantaise Vivalis pour la production de vaccins et de protéines humaines recombinantes. Vivalis a exploité avec succès les propriétés biologiques uniques des cellules souches embryonnaires de canard, combinant les caractéristiques des cellules souches (immortalité et stabilité génétique) et des cellules CHO (croissance en suspension à de hautes densités cellulaires, croissance en milieu sans sérum, modification génétique aisée). Valneva (résultat de la fusion de Vivalis et de son homologue autrichien Intercell) a ainsi accordé de nombreux accords de licence à la majorité des industriels du vaccin dans le monde, leur permettant d'utiliser la lignée EB66® pour la production en bioréacteurs de vaccins traditionnellement produits sur 27 des œufs embryonnés de poule, ce qui est le cas de nombreux vaccins humains et vétérinaires, notamment le vaccin contre la grippe Vaxigrip®. La technologie EB66® étant plus récente que l'utilisation des cellules de mammifères, l'optimisation des rendements de production reste un des derniers leviers à lever afin d'atteindre des productivités proches de celles obtenues avec les cellules CHO. Enfin, même si les cellules aviaires s'avèrent plus productives que les cellules de mammifères, leur production industrielle subira les mêmes contraintes en termes d'investissements initiaux, de montée en échelle et de délais de mise en service des outils de production.

II.3.3. Production dans les plantes

➤ Plantes transgéniques:

La production de biomolécules à partir de plantes est appelée “moléculture végétale” ou “agriculture moléculaire”, ou bien encore “molecular pharming” en anglais. L'utilisation de plantes transgéniques (tabac, luzerne, colza, maïs, riz, soja, pomme de terre, etc.) pour la production de protéines thérapeutiques complexes a longtemps été considérée comme une voie de fort potentiel technologique et économique. L'idée de produire des médicaments à partir de plantes a été proposée pour la première fois dans les années 1980, où les recherches sur la transformation des plantes ont débuté (tabac modifié par un gène de levure). Dès 1989, un anticorps monoclonal est produit dans les feuilles de *Nicotiana tabacum*, des productions ayant été également réalisées avec succès dans les graines de soja, de riz, de blé ou dans la laitue. En 1997, apparaît la première plante “humanisée”, tabac producteur d'hémoglobine humaine. Dès 1990, Sijmons et al. réalisent le premier essai de production de HSA (Human Serum Albumin) dans des cellules végétales.

La production de protéines recombinantes dans des plantes présente un avantage significatif : elle peut se faire sur de vastes surfaces cultivables, ce qui réduit considérablement les limitations liées à l'espace. L'utilisation de vastes terres cultivables en plein air appelées « open fields » permet de tirer parti des techniques agricoles traditionnelles tout en supprimant les défis associés à l'échelle de culture, comme ceux rencontrés avec les systèmes clos comme les bioréacteurs. Cette approche se traduit par une accessibilité croissante à la production de protéines 28 recombinantes, avec une adaptation facile à des systèmes de culture en plein air, favorisant ainsi une plus grande efficacité et des coûts potentiellement réduits. De plus, les techniques de l'agriculture industrielle offrent une grande flexibilité pour la montée en échelle, et les coûts associés y sont comparativement faibles. Le procédé de production s'apparente à de l'agriculture : la culture de plantes transformées nécessite un terrain favorable, des conditions environnementales contrôlées, un arrosage régulier et l'apport de nutriments relativement simples. L'abaissement des coûts de production est également lié à l'absence d'équipements industriels de pointe, contrairement aux cultures de cellules de mammifères par exemple qui nécessitent des bioréacteurs. D'autre part, les plantes sont aujourd'hui aisément modifiables génétiquement grâce à la technique éprouvée de transgénèse, et la conservation de clones producteurs est peu contraignante. Enfin, les plantes transgéniques offrent une totale sécurité par rapport au risque de transmission d'agents pathogènes (virus, prions), et sont exemptes d'endotoxines nocives pour l'homme, ce qui rend cette solution beaucoup plus attractive pour toutes les entreprises produisant des produits thérapeutiques à visée humaine. Cet avantage non négligeable facilite les étapes de contrôle de la qualité, et allège également le procédé de production puisque les étapes de réduction ou d'élimination des contaminants sont restreintes. Cependant, les protéines produites, stockées préférentiellement dans les feuilles ou les graines, peuvent être difficiles à extraire et à purifier, et les extraits peuvent contenir des substances (protéases, polyphénols) mal tolérées par l'homme. Les 29 cellules végétales étant des eucaryotes, elles disposent d'une machinerie cellulaire élaborée qui leur permet de réaliser des modifications post-traductionnelles très proches de celles des mammifères. Toutefois, des travaux ont révélé la présence dans les protéines recombinantes de structures glycaniques non humaines potentiellement immunogènes chez l'homme, dont des résidus xylose et α 1-3 fucose. De plus, les protéines produites sont dépourvues de terminaisons acide sialique et, comme chez les insectes, la glycosylation reste incomplète. Comme pour les levures ou les champignons filamenteux, des travaux d'humanisation de la machinerie de glycosylation ont été entrepris. Il est tout de même à noter que, dans le domaine des vaccins, le potentiel immunogène des

protéines recombinantes présentant une glycosylation végétale pourrait représenter un avantage, favorisant la réponse immunitaire cellulaire chez les sujets vaccinés.

Tableau 3. Comparaison des différents systèmes d'expression de protéines recombinantes

Points à considérer	Systèmes de production					
	Bactéries	Levures	Cellule d'insectes + baculovirus	Cellules animales (cellules CHO)	Plantes transgéniques	Animaux transgéniques
Niveau de production théorique	+++++	+++++	+++	+	+++++	+++++
Niveau de production pratique	++(+)	++(+)	+	+	++	++++
Coût d'investissement	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Coût de production	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Flexibilité	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservation	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Stabilité	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Délai pour la 1 ^{re} production	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++(+)
Augmentation	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Recueil	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Effets sur l'organisme	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++
Modifications post-traductionnelles	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Stabilité du produit	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Pathogènes contaminants	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Propriété intellectuelle	++++	+++	+++	++	+++	+++
Produits sur le marché	++++	+++	+++	+++++	+	+++

➤ Expression transitoire dans des plantes non-OGM

La production de protéines recombinantes par expression transitoire dans les plantes présente les avantages du monde végétal, sans les inconvénients des cultures d'OGM. Le cycle de production de quelques semaines est lancé au stade optimal de croissance de la plante, qui sera soumise à la technique 30 d'agro-infiltration (contamination par une bactérie phytopathogène porteuse du gène d'intérêt codant pour la protéine recombinante). Au bout d'une semaine, les plantes qui ont ainsi synthétisé et accumulé la molécule d'intérêt vont

subir le procédé d'extraction et de purification. L'expression est dite transitoire dans la mesure où le transgène n'est pas intégré au génome de la plante : elle n'est donc pas modifiée, et le transgène sera généralement perdu à la prochaine mitose. Si cette technique présente l'avantage de ne pas utiliser de plantes génétiquement modifiées, elle présente en revanche le désavantage de devoir cultiver de nouvelles plantes pour chaque nouveau cycle de production. De plus, l'expression transitoire dans des feuilles de plante apporte un rendement peu élevé : la capacité de stockage des protéines dans les feuilles est limitée ; il faut donc de grandes quantités de plantes afin d'obtenir des quantités de protéines. Par ailleurs, le procédé de purification est complexifié par la présence de protéines contaminantes, dont la chlorophylle, qu'il faut écarter afin de purifier seulement la protéine d'intérêt. Un des autres désavantages est que la production par expression transitoire doit s'effectuer hors-sol afin de pouvoir soumettre les plantes à la technique de l'agroinfiltration, ce qui ne permet pas d'envisager des productions de grandes cultures. Cependant, d'excellents résultats en termes de productivité permettent de produire des quantités importantes de protéines recombinantes sur des surfaces de quelques milliers de m², rapidement et à faible coût, avec un investissement industriel limité.

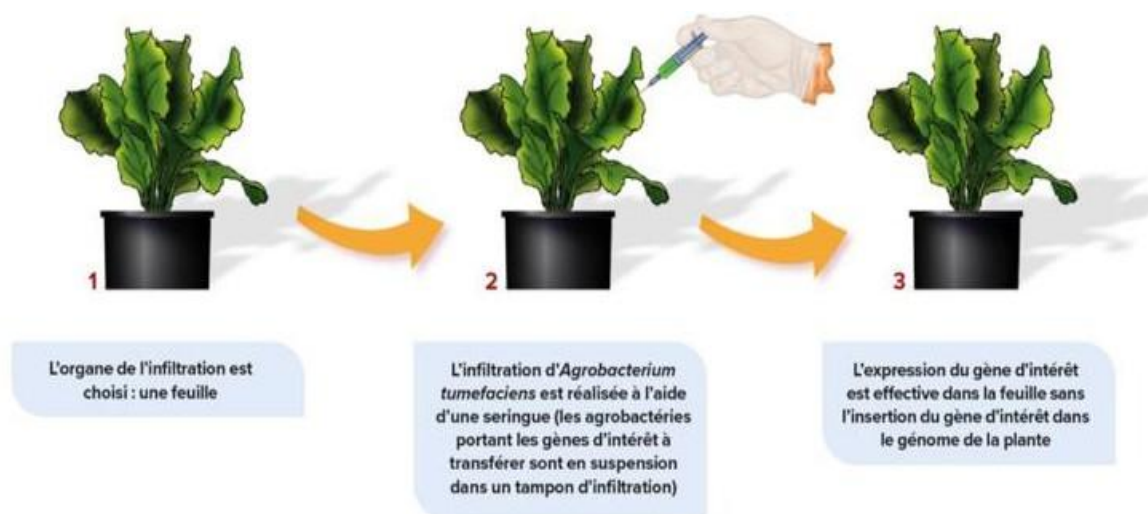


Figure 12. Expression localisée et transitoire de la protéine d'intérêt par la technique d'agroinfiltration.

➤ Micro-algues

Les micro-algues, réservoir inexploité de molécules thérapeutiques, suscitent depuis des décennies l'intérêt et la curiosité des chercheurs. Depuis une quinzaine d'années, leur utilisation comme système d'expression de protéines recombinantes est explorée. Qu'il

s'agisse d'espèces procaryotes (cyanobactéries) ou eucaryotes, photo-autotrophes ou hétérotrophes, le challenge pour leur production en masse est technologique. En effet, la production de protéines thérapeutiques nécessite que les micro-algues puissent se développer en culture monospécifique et confinée, c'est-à-dire en système clos. La mise au point de photobioréacteurs tubulaires requiert des investissements industriels importants pour des espèces à faible taux de croissance (temps de doublement minimum de 2 jours, contre 20 minutes pour certaines bactéries). Les progrès technologiques en termes de conception de bioréacteurs de type poches à usage unique pourraient cependant ouvrir de nouvelles perspectives, bien que les volumes utiles en soient limités à quelques centaines de litres. La production de protéines recombinantes par des micro-algues hétérotrophes en fermenteur, quant à elle, ne pourrait concurrencer les technologies hautement maîtrisées à partir de micro-organismes industriels que sont les bactéries et levures.

L'extraction et la purification de protéines de la biomasse microalgale constituent, elles aussi, un défi. En effet, les espèces de micro-algues fortement productrices de protéines ne les sécrètent pas dans le milieu ; en revanche, elles sécrètent des polyssacharides en très grande quantité, ce qui de toute façon rendrait complexe la purification d'éventuelles molécules sécrétées, du fait, entre autres, de problèmes de viscosité. L'extraction de protéines intracellulaires, quant à elle, reste également complexe, les cellules micro-algales étant le plus souvent difficiles à éclater et les contenus cellulaires très chargés. Certaines Rhodophycées (algues rouges) sont par exemple capables d'accumuler des pigments protéiques (phycobiliprotéines) représentant jusqu'à 15 % de la matière sèche, ce qui rend complexes les opérations d'extraction/purification.

Du fait de ces obstacles technologiques, les micro-algues continuent d'apparaître plus comme des réservoirs génétiques et moléculaires pour la *drug discovery* que comme des modèles d'expression de molécules recombinantes.

➤ **Expression stable dans des plantes OGM en environnement confiné**

Une des possibilités pour la production de biomolécules d'intérêt dans des plantes est la culture de plantes transgéniques en environnement confiné (serre fermée ou chambre de culture). Les plantes sont ici des OGM, c'est-à-dire qu'elles ont intégré de façon stable le transgène codant pour la protéine d'intérêt dans leur génome. Après transformation, ces plantes sont cultivées dans des enceintes closes, pour certaines autonomes, dans lesquelles les conditions de culture sont contrôlées (température, luminosité, hygrométrie) et optimisées pour la plante cultivée. Ces enceintes disposent de systèmes d'irrigation sur mesure, pour lesquels il est possible d'adapter précisément la quantité et la qualité des nutriments apportés. Cette stratégie présente des avantages certains ; le premier étant le contrôle total des conditions environnementales ce qui permet la réduction du temps de croissance de la plante. De plus, cette méthode de production assure une haute qualité des graines, puisqu'elles ne sont pas en contact avec des pesticides et que les plantes ne sont pas exposées aux ravageurs et pathogènes naturellement présents dans la nature. En revanche, la culture en environnement confiné affecte sérieusement les coûts de production dû à l'entretien du matériel et à l'énergie consommée afin d'apporter les conditions environnementales nécessaires aux plantes.

Références bibliographiques

1. Campeau-Péloquin A, Roy S, Chabot G. *Vecteurs d'expression en cellules animales*. CCDMD; 2019.
2. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(11):3240–3244.
3. Cox MMJ. Innovations in the insect cell expression system for industrial recombinant vaccine antigen production. *Vaccines*. 2021;9(12):1504.
4. Dong J, et al. Optimization of hepatocyte culture media factors by DOE methodology. *Cytotechnology*. 2008;57(3):251–261.
5. Dumas J, Robert B. Bioproduction de protéines thérapeutiques : revue et perspectives. *Med Sci (Paris)*. 2009;25:18–26.
6. Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. Making recombinant proteins in animals. *Trends Biotechnol*. 2003;21(9):394–399.
7. Harvey AJ, et al. Expression of recombinant proteins in eggs of transgenic chickens. *Nat Biotechnol*. 2002;20(4):396–399.
8. Houdebine LM. Antibody manufacture in transgenic animals. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(6):625–629.
9. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Rev Sci Tech*. 2018;37(1):131–139.
10. Kollewe C. Production of recombinant proteins in insect cells. *Am J Biochem Biotechnol*. 2013;9(3):255–271.
11. Lillico SG, et al. Oviduct-specific expression of therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(6):1771–1776.
12. Olivier S, Mehtali M. Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. *Med Sci (Paris)*. 2009;25(12):1163–1168.
13. Rech E, et al. Recombinant proteins in plants. *BMC Proc*. 2014;8(4):O1.
14. Rohrmann GF. *Baculovirus molecular biology*. 4th ed. Bethesda (MD): NCBI Bookshelf; 2019.
15. Royer C, et al. Recombinant protein production in silkworms. *Transgenic Res*. 2005;14(4):463–472.

16. Samuelsen AI, et al. Expression of fire genes in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 1998;118(1):51–58.
17. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol.* 2018;36:1136–1145.
18. Weidle UH, Lenz H, Brem G. Expression of monoclonal antibodies in transgenic animals. *Gene.* 1991;98(2):185–191.