

L'ESSENTIEL DE

# BIOTECHNOLOGIES BTS



TOUT EN FICHES

L'ESSENTIEL DE  
**BIOTECHNOLOGIES BTS**

**Fabien CÉZARD**

Professeur en CPGE au lycée Pierre-Gilles de Gennes/ENCPB.

**DUNOD**

La précédente édition de cet ouvrage est parue dans la collection Express BTS. Une autre version de cet ouvrage a été publiée dans la même collection sous le titre *Biotechnologies*.

<p>Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.</p> <p>Le Code de la propriété intellectuelle du 1<sup>er</sup> juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique s'est généralisée dans les établissements</p>	<p>d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.</p> <p>Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).</p>
--	--



© Dunod, 2009, 2013, 2019  
11 rue Paul Bert, 92240 Malakoff  
ISBN 978-2-10-079603-8  
[www.dunod.com](http://www.dunod.com)

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

# Préface

Alors que s'engage la réforme du lycée à l'horizon de 2021, l'enseignement des biotechnologies renouvelle sa promesse d'être une discipline formatrice par la double dimension qu'elle propose, d'articuler des concepts scientifiques et technologiques. Celle-ci garantit aux lycéens et étudiants qui veulent faire de la biologie aujourd'hui, une formation riche les projetant vers l'avenir. En effet, les biotechnologies étant en constante évolution, de nouvelles découvertes liées aux potentialités du vivant permettent de produire de nouveaux outils technologiques qui vont, à leur tour, faire avancer la recherche en biologie.

Dans cet ouvrage consacré aux étudiants de cursus scientifiques et technologiques, les concepts-clés sont mis en exergue et la structure en fiche permet de décrypter rapidement les éléments essentiels. Cette nouvelle édition présente de nouvelles technologies et de nouvelles illustrations, qui viennent éclairer certains points. Il est un outil précieux d'appropriation des concepts et de renforcement des compétences liées à la pratique expérimentale.

Focalisé sur les grands principes qui fondent des techniques les plus couramment enseignées dans différentes formations du supérieur (BTS de biologie appliquée, CPGE TB ou BCPST, DUT de génie biologique, L1-L2) ce manuel permet également d'exploiter les résultats expérimentaux. De nombreux liens sont faits entre les différentes fiches qui montrent les interconnexions entre les principes et méthodes, et permettent à l'étudiant d'avoir une vision globale sur l'ensemble des biotechnologies.

Dix années après la première édition, l'ouvrage *Biotechnologies* de Fabien Cézard, professeur agrégé de Biochimie-Génie Biologique, s'avère rigoureux, explicite et concis. Ces fiches seront appréciées dans cette forme éditoriale riche et diversifiée qui facilite l'appropriation des concepts, ainsi que leur mobilisation dans les exercices proposés.

Caroline Bonnefoy,  
Inspectrice Générale de l'Éducation Nationale

# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	8
<b>Fiche 1.</b> Molécules & solutions	9

## **Partie 1 : Culture cellulaire et entretien des cellules eucaryotes**

<b>Fiche 2.</b> Milieux & matériels de culture cellulaire	16
<b>Fiche 3.</b> Entretien des lignées cellulaires	21
<b>Fiche 4.</b> Quantification des cellules vivantes	25

## **Partie 2 : Techniques immunologiques**

<b>Fiche 5.</b> Agglutination immunologique	33
<b>Fiche 6.</b> Précipitation immunologique	37
<b>Fiche 7.</b> Neutralisation immunologique	42
<b>Fiche 8.</b> Immunomarquage par immunofluorescence	46
<b>Fiche 9.</b> Immunodosage (1) : radio-immunologie et immunoenzymologie	52
<b>Fiche 10.</b> Immunodosage (2) : améliorations	59

## **Partie 3 : Techniques enzymatiques**

<b>Fiche 11.</b> Catalyse enzymatique	66
<b>Fiche 12.</b> Inhibitions enzymatiques	75
<b>Fiche 13.</b> Activité catalytique	81
<b>Fiche 14.</b> Dosage enzymatique de substrats	86
<b>Fiche 15.</b> Allostérie (enzymatique)	90

## Partie 4 : Séparation et purification des biomolécules

<b>Fiche 16.</b>	Fractionnement subcellulaire (1) : préparation des extraits cellulaires	104
<b>Fiche 17.</b>	Fractionnement subcellulaire (2) : centrifugations	108
<b>Fiche 18.</b>	Purification des protéines par précipitation	118
<b>Fiche 19.</b>	Dialyse à l'équilibre	127
<b>Fiche 20.</b>	Chromatographie (1) : notions générales	138
<b>Fiche 21.</b>	Chromatographie (2) : liquide-liquide basse pression	148
<b>Fiche 22.</b>	Chromatographie (3) : liquide-solide basse pression	153
<b>Fiche 23.</b>	Chromatographie (4) : améliorations	165
<b>Fiche 24.</b>	Bilan sur la purification d'une protéine	176
<b>Fiche 25.</b>	Extraction et purification des acides nucléiques	184
<b>Fiche 26.</b>	Électrophorèse (1) : séparation des acides nucléiques et des protéines	195
<b>Fiche 27.</b>	Électrophorèse (2) : améliorations	206

## Partie 5 : Analyse des acides nucléiques et des protéines

<b>Fiche 28.</b>	Dénaturation et hybridation des acides nucléiques	212
<b>Fiche 29.</b>	Amplification d'acides nucléiques (1) : PCR en point final	218
<b>Fiche 30.</b>	Amplification d'acides nucléiques (2) : PCR en temps réel	228
<b>Fiche 31.</b>	Détection des acides nucléiques et des protéines : les « blots »	236
<b>Fiche 32.</b>	Séquençage des acides nucléiques (1) : techniques historiques	241
<b>Fiche 33.</b>	Séquençage des acides nucléiques (2) : améliorations	247
<b>Index</b>		259

# Avant-propos

Cette troisième édition a été revue sur de nombreux points :

- réécriture et modifications de certaines fiches, avec notamment l'introduction de nouvelles illustrations plus explicites, ainsi que l'ajout de nouvelles techniques de pointe ;
- des précisions et des corrections ;
- de nouveaux exercices pour certaines fiches, et une réécriture de certains autres (notamment de leur correction) ;
- six fiches supplémentaires : généralités sur les molécules et les propriétés des solutions, améliorations des techniques d'immunodosage, allostérie enzymatique, dialyse à l'équilibre, et deux fiches sur le séquençage des acides nucléiques.

Un grand merci à Christine Benayoun, Claudine Walther, Élisabeth Mathieu, Florian Sonthonnax et Alexandra Bénévant pour leurs idées, leurs conseils et leurs relectures.

## 1. Liaisons et interactions en biologie

Les molécules se forment par **liaison d'atomes** et peuvent interagir entre elles. Les liaisons ont plusieurs rôles :

- **formation** des molécules : acquisition d'une **configuration** ;
- **structuration** des molécules : acquisition de leur **conformation** ;
- **interactions** intermoléculaires.

### ■ Liaison forte = liaison covalente

**Très stable** ( $\sim 500 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), elle relie les atomes au sein des molécules par mise en commun d'électrons (2 en cas de liaison simple, 4 en cas de liaison double) = **doublet liant**.

#### PROPRIÉTÉS DES LIAISONS COVALENTES

- **Distance faible** entre les deux atomes liés (les atomes se trouvent à une distance correspondant à la somme de leurs *rayons atomiques*).
- **Forte énergie de liaison** : coûteuses à fabriquer, difficiles à rompre.
- **Fortement directionnelles** : elles imposent des angles et des positions définies dans l'espace (de par les gênes stériques des atomes mis en liaison), et conditionnent par conséquent la *configuration* d'une molécule.
- **Stables en conditions cellulaires** : elles ne sont en général créées et rompues que par des réactions catalysées par des enzymes.

Lorsque deux atomes présentant des électronégativités très différentes sont liés l'un à l'autre, les électrons de liaisons sont plus attirés par l'atome le plus électronégatif : la **liaison est alors polarisée**, les atomes impliqués portent des charges partielles positives ( $\delta^+$ ) ou négatives ( $\delta^-$ ). Les deux charges opposées partielles forment un **dipôle électrique**, qui peut être **permanent** ou **induit**.

Parmi les éléments courants chez les êtres vivants, l'oxygène est le plus fortement électronégatif. Ainsi, les doubles liaisons  $\text{C}=\text{O}$  sont les plus polarisées.

**Liaison (covalente) de coordination**

Liaison covalente dans laquelle les deux électrons partagés proviennent du même atome (donc pas de « mise en commun » de deux électrons).

## « Liaisons » faibles = interactions non covalentes

**Relativement instables (de 2 à 50 kJ · mol<sup>-1</sup>)**, les « liaisons » faibles interviennent dans la conformation des molécules, les interactions intermoléculaires et les structures dynamiques.

Ce ne sont pas de vraies « liaisons » : il convient mieux de parler d'*interactions* ou de *forces*.

**PROPRIÉTÉS DES « LIAISONS » FAIBLES**

- **Distance plus grande** entre les deux atomes (les couches électroniques sont séparées).
- **Faible énergie de liaison** (20 à 100 fois moins que la covalente).
- **Plus ou moins directionnelles**.
- **Plus ou moins stables en conditions cellulaires** : leur stabilité dépend surtout de leur nombre et elles sont facilement réversibles.

Liaison ionique = interaction électrostatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entre des <b>groupes ionisés</b> : atomes présentant une forte différence d'électronégativité.</li> <li>• <b>Échange</b> (<i>mais pas de mise en commun</i>) <b>d'un électron</b> (ou plus) de l'atome le moins électronégatif vers le plus électronégatif.</li> <li>• Non directionnelle : les charges électriques sont régulièrement réparties autour des atomes.</li> <li>• Ex : attraction entre <math>\text{COO}^-</math> et <math>\text{NH}_3^+</math>, répulsion entre phosphates, cohésion d'un cristal de sel (NaCl)...</li> <li>• L'ionisation des groupes <b>dépend du pH cellulaire</b> : elle peut donc être modifiée en fonction du pH.</li> </ul>
Liaison H = interaction hydrogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entre un atome d'hydrogène engagée dans une liaison covalente polarisée (porteur d'une <b>charge partielle <math>\delta^+</math></b>) et un atome électronégatif (généralement O ou N), lui aussi engagé dans une liaison covalente polarisée (porteur d'une charge <b>partielle <math>\delta^-</math></b>).</li> <li>• « <b>Partage</b> » <b>d'un H</b> entre le donneur et l'accepteur : « pont hydrogène ».</li> <li>• <b>Directionnelle</b> : plus forte quand les trois atomes sont alignés (donneur de H/H/accepteur de H).</li> <li>• Non permanente, c'est-à-dire <b>très labile</b> : faible durée de vie.</li> </ul>

<b>Force de Van der Waals (VdW)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liaison de type électrostatique entre dipôles opposés, permanents ou induits provoqués par la distribution asymétrique des électrons autour du noyau atomique : attraction des atomes jusqu'à une certaine distance, <b>sans chevauchement des nuages électroniques</b> (donc pas de mise en commun d'e<sup>-</sup>).</li> <li>• Représente l'attraction électrostatique entre le noyau d'un atome et les électrons d'un autre atome</li> <li>• Les atomes sont en « <b>contact de Van der Waals</b> » : cela impose une certaine distance (rayon de VdW).</li> <li>• <b>Non spécifique</b> : concerne tous les atomes dès lors qu'ils sont à 3-4 Å l'un de l'autre.</li> </ul>
<b>Interaction hydrophobe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interaction qui ne peut être envisagée <b>qu'en rapport avec les propriétés de solvant de l'eau vis-à-vis des molécules hydrophobes ou apolaires</b> : l'eau contraint les résidus hydrophobes à se regrouper pour minimiser leur contact avec l'eau (provoquant des ruptures sur le réseau des liaisons H entre molécules d'eau) → minimisation de l'énergie du système.</li> <li>• Les molécules hydrophobes sont alors maintenues ensemble par des « interactions hydrophobes » (qui sont en fait des forces de Van Der Waals entre dipôles transitoires), même si leur attraction se fait en réalité « par défaut », résultant d'une répulsion de l'eau et de l'impossibilité pour ces molécules d'établir des liaisons H avec l'eau.</li> </ul>

### ■ Importance biologique des « liaisons » faibles

Par un **effet cumulatif dû à leur répétition**, ce sont les interactions faibles qui donnent aux molécules complexes leur cohésion dans une **forme spatiale spécifique** (*conformation*) et **souvent malléable** :

- « liaisons » H : structure stable de l'ADN avec dénaturation possible (et nécessaire pour la réplication, la transcription, la réparation...), structures secondaires des protéines... ;
- forces de VdW et interactions hydrophobes : repliement des protéines, formation des bicouches lipidiques (membranes biologiques)... ;
- interactions ioniques : activation d'enzymes (ex : protéase à sérine active).

Cette **conformation** est **indispensable à l'expression de leur fonction** : son altération par la rupture de l'ensemble des liaisons faibles se traduit par la perte de la fonction. La molécule est alors **dénaturée** (ex : protéines, ADN...).

Au contraire des liaisons covalentes, ces différentes interactions faibles (toutes catégories confondues) offrent la possibilité d'**interactions réversibles** : elles assurent les **associations moléculaires temporaires et dynamiques** indispensables aux phénomènes biologiques de reconnaissance (ex : hormone/récepteur, antigène/anticorps...) ou de catalyse (ex : enzyme/substrat).

Le fonctionnement des systèmes biologiques implique donc à la fois :

- des **liaisons fortes**  $\Leftrightarrow$  **structure stable** des molécules ;
- des **liaisons faibles**  $\Leftrightarrow$  **structure dynamique** des molécules.

### UTILISER LE VOCABULAIRE ADAPTÉ

« **Dégrader** » une molécule : détruire sa configuration = casser des liaisons covalentes (par exemple par hydrolyse, réaction redox...).

« **Dénaturer** » une molécule : détruire sa conformation = casser des liaisons faibles (par exemple par chauffage modéré, modification pH, FI...).

### Bilan : caractéristiques des liaisons et interactions

	Covalente	Ionique	H	VdW	Hydrophobe
Mise en commun d'e <sup>-</sup>	✓	✗	✗	✗	✗
Énergie [kJ · mol <sup>-1</sup> ]	<b>500</b> (200-900)	<b>50</b> (20-100)	<b>20</b> (1-40)	<b>2</b> (1-10)	<b>10</b> (5-15)
Distance [pm]	100-150	250-300	150-200*	300-500**	~ 200
Directionnelle	✓ <i>fortement</i>	✗	✓ <i>fortement</i>	✗	✗

\* entre le H et l'accepteur d'H, mais 300-400 pm entre le donneur et l'accepteur de H.

\*\* la distance optimale dépend des atomes (rayon de VdW) mais est supérieure à la distance d'une liaison covalente.

## 2. Quelques propriétés des solutions

### ■ Pression osmotique $\pi$

C'est la force exercée par une solution mise en présence du solvant pur (l'eau) duquel elle est séparée par une membrane semi-perméable (laissant passer l'eau mais pas les solutés) : elle est **proportionnelle à la concentration des solutés**.

En s'inspirant de la loi des gaz parfaits, Van t'Hoff (1886) établit une formule de calcul pour une solution peu concentrée :

$$\pi = R \cdot T \cdot \sum c$$

$\pi$  : pression osmotique de la solution en Pa (1 Pa = 1 N · m<sup>-2</sup>).

$\sum c$  : somme des concentrations molaires des espèces en solution en mol · m<sup>-3</sup>, **tenant compte de l'ensemble des espèces présentes en solution**.

$R$  : constante des gaz parfaits = 8,31 J · K<sup>-1</sup> · mol<sup>-1</sup> (1 J = 1 N · m).

$T$  : température absolue en K.

**NB 1 : potentiel osmotique =  $\Psi_O = -\pi$ .**

**NB 2 :** le potentiel osmotique est une composante du **potentiel hydrique  $\Psi$** , qui gouverne les mouvements de l'eau (*elle se déplace selon les potentiels hydriques décroissants*) :

$$\Psi = \Psi_H + \Psi_O + \Psi_m = \Psi_P - \pi$$

(avec  $\Psi_H$  = potentiel hydrostatique ;  $\Psi_m$  = potentiel matriciel  $\approx 0$ ).

Dans un liquide biologique, une part non négligeable de la pression osmotique est due à la pression exercée par les seules protéines = **pression oncotique**.

Pour une cellule présente dans un milieu liquide, celui-ci est avant tout caractérisé par sa pression osmotique (**hypo-**, **iso-** ou **hypertonique**). Dans ce cas, l'osmose ne concerne que l'eau.

## Force ionique (FI)

Elle dépend de la concentration et de la charge des espèces en solution. Pour les solutions aqueuses peu concentrées :

$$FI = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot z_i^2$$

**FI** : force ionique en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

$c_i$  : concentration molaire de l'ion  $i$ .

$z_i$  : charge de l'ion  $i$ .

La FI conditionne les équilibres de dissociation des sels, et surtout la **solubilité et la mobilité des protéines en solution** (précipitations cf. fiche 18, chromatographies cf. fiche 22, électrophorèses cf. fiche 26). Elle est également très importante dans la **constitution des tampons** utilisés en biochimie.

### EXEMPLE

FI d'une solution  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de chlorure de calcium.

On a :  $\text{CaCl}_2 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + 2 \text{Cl}^-$ .

D'où :  $FI = 0,5 \times (0,01 \times 2^2 + 0,02 \times 1^2) = 0,03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

## Pouvoir tampon (PT)

C'est la capacité d'une solution à **conserver une valeur stable de pH** (empêche ou limite les variations de pH) lorsque des acides ou des bases lui sont ajoutés. En première approche simplificatrice, le pouvoir tampon est évalué par :

$$PT = \frac{\Delta V}{\Delta \text{pH}}$$

$\Delta V$  : variation perturbatrice (ajout d'un volume d'acide ou de base).

$\Delta \text{pH}$  : variation de pH engendrée.

Les systèmes tampons sont des solutions contenant en concentrations voisines un acide faible (**AH**) et le sel de sa base forte conjuguée (**A<sup>-</sup>**), ou une base faible (**B**) et son sel d'acide fort conjugué (**BH<sup>+</sup>**). Parmi les sels minéraux, deux systèmes tampons participent généralement au maintien du pH des milieux liquidiens :

Système	Localisation	Équation
<b>Hydrogéo-carbonates*</b> $pK_a = 6,3$	Liquides extracellulaires (liquide interstitiel, plasma)	$H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3$ $\rightleftharpoons H_2O + CO_2$
<b>Phosphates**</b> $pK_a = 7,3$	Liquide intracellulaire (cytosol)	$H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^- + H^+$

\* Ce tampon est aussi celui utilisé dans les systèmes de culture cellulaire pour cellules eucaryotes, en équilibre avec l'atmosphère à 5 % de  $CO_2$  (cf. fiche 2). D'autres tampons sont aussi utilisés, comme le tampon HEPES.

\*\* Ce tampon est aussi souvent utilisé dans les milieux de culture microbiens.

### SYSTÈME TAMPON $CO_2$ /HYDROGÉNOCARBONATE

Le système  $CO_2$ /hydrogénocarbonate est un tampon naturel du sang et du liquide interstitiel (mais pas le seul). Malgré leur  $pK_a$  de 6,30, les hydrogéo-carbonates sont efficaces car ils sont fortement concentrés dans le sang et le  $CO_2$  s'échange avec l'atmosphère : on parle de système tampon « ouvert ».

En culture cellulaire, le  $CO_2$  de l'atmosphère de culture se dissout partiellement dans l'eau du milieu pour former un acide et un couple tampon, selon l'équilibre suivant :



**Rappel : équation d'Henderson-Hasselbach** appliquée au couple ci-dessus

$$pH = pK_a + \log \frac{[BASE]}{[ACIDE]} = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

## 1. Besoins nutritifs et types trophiques

Toutes les cellules, qu'elles soient eucaryotes (animales, végétales, fongiques) ou procaryotes (bactéries), ont des besoins nutritifs plus ou moins nombreux.

Dans le cadre de la culture d'organismes unicellulaires (bactéries, levures), ces exigences sont la plupart du temps limitées. En revanche, dans le cadre de la culture de cellules eucaryotes supérieures, les besoins nutritifs sont plus nombreux :

- **eau** : indispensable à la vie ;
- **éléments de construction** :
  - macroéléments organiques ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) : C, H, O, N, P, S
  - macroéléments ioniques = ions minéraux ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) : phosphates, sulfates, nitrates,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ...
  - oligoéléments ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{I}^-$ ...
- **énergie** : venant de l'oxydation des molécules organiques ou minérales, ou de la lumière (photons) ;
- **facteurs de croissance** : acides aminés particuliers, vitamines, hormones...

### **Remarques :**

- Les cellules végétales faisant la photosynthèse n'ont pas forcément besoin de carbone organique pour se développer : elles peuvent se contenter de  $\text{CO}_2$  (= carbone minéral).
- L'oxydation des molécules organiques lors du catabolisme peut être complète ou incomplète, et peut concerner une ou plusieurs sources organiques.
- Les cellules n'ayant aucune exigence en facteurs de croissance sont rares dans le cas des cellules eucaryotes.

Les types trophiques (correspondant aux sources en carbone, énergie, électrons, et facteurs de croissance) sont rappelés dans le tableau suivant :

Source de carbone		Source d'énergie		Source d'électrons		Facteurs de croissance	
CO <sub>2</sub>	Autotrophe	Lumière	Phototrophe	Minérale	Lithotrophe	Non exigeant	Prototrophe
Organique	Hétérotrophe	Oxydation	Chimiotrophe	Organique	Organotrophe	Exigeant	Auxotrophe

## 2. Milieux de culture

Préparations qui contiennent **toutes les substances nutritives** (sels minéraux, acides aminés, lipides, glucides, vitamines) nécessaires aux cellules, en quantités suffisantes et dans des **conditions de vie favorables**.

Cela implique une composition qui répond aux besoins nutritifs des cellules étudiées, mais également de présenter des conditions optimales de croissance (pH, force ionique, température...).

### ■ Caractéristiques

Les milieux de culture pour cellules eucaryotes doivent assurer :

- la **nutrition et le support des cellules** : ils peuvent être liquides ou gélifiés (présence d'agarose entre 5 et 15 g · L<sup>-1</sup>) ;
- un **pH optimal** (pH entre 7,2 et 7,4 pour les cellules animales) : système tampon CO<sub>2</sub>/hydrogénocarbonate (avec une étuve dont le taux de CO<sub>2</sub> est contrôlé), ou tampon organique (HEPES par exemple : tampon zwitterionique qui a une meilleure capacité à maintenir un pH physiologique dans les cultures cellulaires) ;
- la **tonicité** : milieu isotonique au fluide extracellulaire des animaux, et atmosphère saturée en vapeur d'eau (pour éviter l'évaporation qui conduirait à une augmentation de l'osmolarité) ;
- l'**asepsie** : le milieu doit être stérile, on y ajoute des antibiotiques à 1 %.

### ■ Composition et préparation

Il existe différentes compositions, mais qui assurent toutes les besoins nutritifs des cellules qu'on y cultive. Les milieux sont en général composés comme suit :

- une base minimale = **milieu minimum**, contenant les éléments indispensables, de composition parfaitement maîtrisée (synthétique) :

solution saline tamponnée, acides aminés, substrat énergétique, vitamines, coenzymes et éventuellement nucléotides. ex : MEM, DMEM, RPMI, HAM...

- un additif complexe (la plupart des cellules ne se contentant pas de ce milieu minimum) : le **sérum** (sérum de veau foetal SVF, ou sérum de veau nouveau-né SVNN), à raison de 5 à 10 % (*V/V*) en général, et dont le rôle est multiple : adhérence, apport d'oligo-éléments et de facteurs de croissance cellulaires, inhibition de la trypsine... Après ajout de sérum, dont la composition peut varier d'un lot à l'autre, le milieu est dit **semi-synthétique**. Lors de la croissance contrôlée de certaines lignées cellulaires, on doit parfaitement maîtriser la composition du milieu : on remplace alors le SVF/SVNN par des **substituts totalement synthétiques**.

### ■ Stérilisation

Elle est nécessaire, avant utilisation, pour éliminer toute forme de vie (y compris les spores bactériennes). Elle se fait par différents moyens physiques : **filtration** (pour les molécules fragiles), **irradiation**, **autoclavage**.

## 3. Conditions de culture

### ■ Température

Elle est en général de 37 °C pour les cellules animales, maintenue par un appareillage de type **étuve**.

Elle est plutôt de 22-25 °C pour les cellules végétales en **serre thermos-tatée** (avec parfois un cycle journalier de températures).

### ■ pH

Le pH est maintenu relativement constant grâce au **système tampon** (cf. fiche 1), qui utilise notamment le CO<sub>2</sub> de l'atmosphère de culture.

Il sera aux alentours de 7,2-7,4 pour les cellules animales, mais légèrement plus acide (5,5-6) pour les cellules végétales.

L'indicateur coloré (rouge de phénol) est important : rouge si basique (contamination fongique), jaune si acide (contamination bactérienne ou mort cellulaire), rose pour un pH normal.

### ■ Atmosphère (gaz et hygrométrie)

En général, on utilise une **pression de CO<sub>2</sub>** (pression partielle  $p\text{CO}_2 = 5-15\%$ , exprimée en % de pression totale). En outre, l'air doit être **humide** (84-85 %), ce qui évite l'évaporation du milieu. Certains types cellulaires nécessitent également une atmosphère enrichie en N<sub>2</sub>.

### ■ Lumière

Pour les cellules végétales, on peut contrôler l'illumination des cultures, en utilisant une serre dont le **cycle lumineux** est défini, en intensité et en durée (photopériode mimant l'alternance jour/nuit).

## 4. Matériel et équipement

Un matériel spécifique et un équipement adaptés sont attendus pour ces cultures.

### ■ Contenants (flacons, flasks, boîtes, plaques multipuits, tubes...)

On regarde la nature du support, la présence de bouchons à filtre (assurant les échanges gazeux dans le cadre d'un système de culture semi-clos), la surface de contact avec l'air, la surface d'adhérence...

La nature du support est très importante pour les cultures stationnaires : il peut s'agir de verre, de plastique, ou même de supports organiques (collagène, fibronectine...).

### ■ Enceintes thermostatées et/ou éclairées

Il peut s'agir d'étuves à CO<sub>2</sub> (cellules animales) ou de serres (cellules végétales), dans lesquelles on contrôle également un cycle de température et d'illumination.

### ■ Hottes à flux laminaire

Elles assurent la stérilité des manipulations sur les cellules en culture, en préservant la surface de travail de l'arrivée de tout micro-organisme ou autre contaminant porté par des poussières. Un flux d'air vertical continu et filtré joue le rôle de barrière.

Le travail sous hotte doit être précis et minutieux, afin de ne pas être vecteur de contaminations.

### ■ Cytoculteurs (bioréacteurs cellulaires)

Dans le cadre de production d'un métabolite par une culture cellulaire donnée, les flasks ne suffisent en général plus, de par leur volume limité. On utilise alors des bioréacteurs pour cellules eucaryotes, sortes d'enceintes complexes de volume plus important, permettant alors le contrôle et la régulation de nombreux paramètres de façon précise (température, pH, agitation, oxygénation...). Ils conviennent bien pour des cultures en suspension à grande échelle. On peut les utiliser :

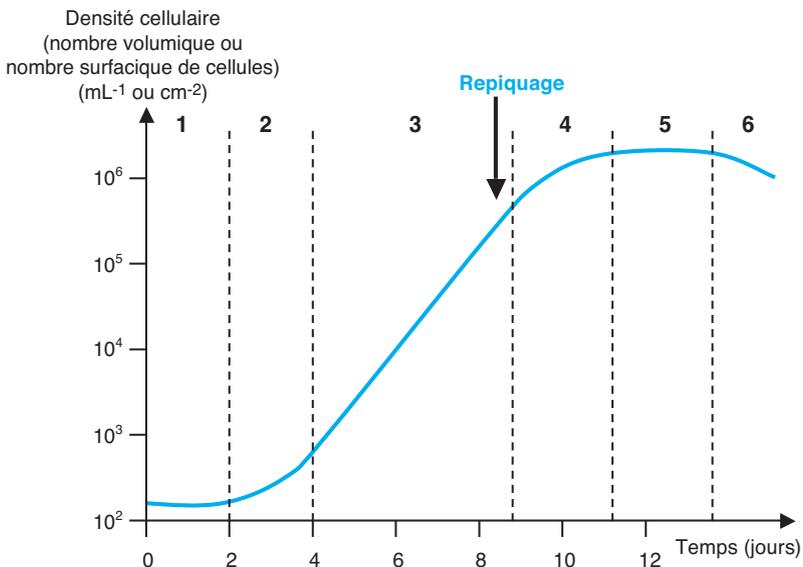
- en **système clos = culture discontinue = *batch*** : le milieu n'est pas renouvelé au cours de la culture, l'appauvrissement en éléments nutritifs et l'accumulation de déchets aboutissent à la fin de la croissance cellulaire ;
- en **système semi-clos = culture discontinue alimentée = *fed-batch*** : du milieu frais (ou des gaz) est ajouté régulièrement au milieu (perfusion), dans la limite du volume du cytotacteur ;
- en **système ouvert = culture continue renouvelée** : l'ajout continu de milieu frais (et de gaz appropriés) et l'élimination des déchets assurent une culture sur la durée et donc une plus grande production du métabolite d'intérêt ; l'étape délicate reste alors la purification de ce produit, sans oublier de conserver la stérilité du procédé.

## 1. Évolution d'une lignée cellulaire

La croissance d'une lignée cellulaire présente plusieurs **phases**, caractérisées notamment par la **vitesse spécifique de croissance**  $\mu$  ou  $Q_x$  (voir tableau).

Quand la « densité cellulaire » (nombre volumique de cellules en  $\text{mL}^{-1}$ , nombre surfacique de cellules en  $\text{cm}^{-2}$ ) devient trop importante et que les cellules recouvrent entièrement la surface de culture (cas de cellules adhérentes), on parle de **confluence** : il se produit alors une **inhibition de contact** qui se traduit par la phase de plateau (voire la phase de décélération) observée ci-dessous. Les lignées cancéreuses ont en général perdu cette inhibition de contact, et prolifèrent de manière non contrôlée avec un nombre de passages infini.

La courbe permet de déterminer le temps de doublement, ou temps de génération, ou encore temps de division cellulaire (voir exercice).



Phases	Phénomènes	$\mu$
<b>1 Adaptation (latence)</b>	Courte durée en général : les cellules se fixent au plastique, réorganisent leur cytosquelette et s'étalent	Nulle
<b>2 Accélération</b>	Les cellules commencent à se multiplier	Augmente
<b>3 Croissance exponentielle</b>	Croissance rapide et importante, dont la vitesse peut être ralentie artificiellement (milieu pauvre sans sérum, moins de passages, température réduite...)	Maximale et constante
<b>4 Décélération</b>	Courte ; certaines cellules meurent, le milieu s'étant appauvri et/ou devenant hostile (déchets)	Diminue
<b>5 Stationnaire</b>	Équilibre entre morts et multiplications cellulaires	Nulle
<b>6 Déclin</b>	Plus de morts que de multiplications, le milieu devenu trop toxique (déchets) et trop peu nutritif (carences)	Négative

## 2. Changement de milieu et repiquage

On peut éviter les deux dernières phases de la courbe de croissance en **changeant le milieu** (ajout de milieu neuf par exemple), ou en **repiquant** la culture à temps (passage). En effet, la croissance cellulaire entraîne une consommation des substrats, et l'accumulation de déchets métaboliques qui acidifient le milieu et peuvent aboutir à la mort cellulaire. De plus, l'augmentation de la « densité » cellulaire entraîne l'arrêt de la croissance, et même la mort (nombre surfacique de cellules maximal  $\approx 10^5$  à  $10^6 \text{ cm}^{-2}$  en général).

Les indices de cet état sont le **jaunissement du milieu** (indicateur de pH) et la **modification morphologique** des cellules (arrondissement, décollement...).

### ■ Changement de milieu

Pour les cellules adhérentes non encore confluentes, on peut se contenter de changer le milieu appauvri par du milieu neuf : les cellules continuent de se multiplier.

## ■ Repiquage ou passage

La périodicité du repiquage dépend du type cellulaire et de la vitesse de croissance. Il s'agit cette fois de changer le milieu et le contenant, en transférant les cellules dans un contenant plus grand ou en les diluant pour que la croissance continue. Les étapes sont les suivantes (**travailler stérilement** sous hotte (cf. fiche 3)) :

- **élimination de l'ancien milieu** : aspiration à la pipette ;
- **lavage des cellules** (au PBS par exemple) : élimination des traces de SVF qui inhibent l'activité tryptique ;
- **décollement des cellules = trypsination** : utilisation de trypsine, une protéase qui rompt les liaisons cellules/support pour les décoller du support, en présence d'EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétate) qui chélate les cations divalents normalement nécessaires aux intégrines pour l'adhésion ;
- **ajout de milieu complet avec SVF** : il contient de l'antitrypsine qui arrête l'action de la trypsine, et permet de remettre les cellules en suspension ;
- **numération cellulaire** (et test de viabilité cellulaire) : afin de déterminer la concentration cellulaire et de diluer correctement la culture (cf. fiche 4) ;
- **inoculation** d'un nouveau flask de culture : ajout d'une quantité définie de cellules dans un volume défini de milieu, sur une surface définie.

## 3. Conservation

Les lignées cellulaires sont initialement issues d'explants, c'est-à-dire de tissus animaux ou végétaux dissociés ou broyés : on obtient alors une **culture primaire**, qu'il est possible de repiquer pour obtenir une ou des **cultures secondaires**.

Dans le cas de cellules normales (non transformées), le nombre de passage est limité, et il devient difficile de conserver longtemps ce genre de cultures.

Pour les cellules transformées en revanche, le nombre de passage est théoriquement infini, puisqu'elles sont immortelles. Cependant, la multiplicité des repiquages peut aboutir à un changement phénotypique des cellules, et on peut avoir besoin de conserver des échantillons des différents passages.

Il existe différentes techniques de conservation des cellules eucaryotes.

### ■ Conservation par le froid

Les cellules peuvent être conservées en azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pendant de longues périodes, à condition d'avoir été correctement congelées et dans une solution cryoprotectrice appropriée (DMSO par exemple). On utilise pour cela des cryotubes en plastique spécial, qui résistent à cette température. La congélation se fait en général en deux étapes :

- congélation progressive jusqu'à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- puis congélation rapide après immersion dans l'azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

La revivification des cultures est une étape délicate, car :

- le retour à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  doit être rapide (bain thermostaté),
- le DMSO doit être rapidement éliminé par lavage-centrifugation (le DMSO est toxique à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### ■ Conservation sur milieu pauvre

Comme pour les bactéries, on peut utiliser des milieux pauvres pour la conservation des lignées cellulaires. L'avantage est qu'il est plus facile de faire repartir une telle culture que de repartir d'une culture congelée. L'inconvénient est que la conservation n'est pas forcément optimale, puisque les cellules continuent de se multiplier, à un rythme très ralenti.