

Table des matières

Module 1

Éléments fondamentaux en culture cellulaire 2

Chapitre 1 Introduction à la culture cellulaire 4

1.1 Histoire de la culture cellulaire 5

1.1.1 Événements marquants en culture cellulaire animale 6

1.1.2 Événements marquants en culture cellulaire végétale 8

1.2 Définition et conditions de la culture cellulaire 9

1.2.1 Absence de compétition 9

1.2.2 Nutriments et déchets métaboliques 9

1.2.3 Environnement contrôlé 10

1.3 Applications de la culture cellulaire 10

1.3.1 Applications de la culture cellulaire animale 10

1.3.2 Applications de la culture cellulaire végétale 10

1.4 Avantages et inconvénients de la culture cellulaire 11

1.5 Types de cultures cellulaires 12

1.5.1 Culture cellulaire animale 13

Culture primaire d'explants 13

Culture de cellules dissociées 14

Culture d'organes 14

Cultures histiotypique et organotypique 14

1.5.2 Culture cellulaire végétale 14

Exercices 14

Chapitre 2 Notions de biologie cellulaire 16

2.1 Anatomie et physiologie 17

2.1.1 Niveaux d'organisation 17

2.1.2 Comparaison des cellules animales et végétales 17

2.1.3 Tissus et organes 17

Tissus et organes animaux 18

Tissus et organes végétaux 18

2.2 Biologie cellulaire et moléculaire 25

2.2.1 Adhérence 25

Molécules d'adhérence 25

Jonctions intercellulaires 26

Cytosquelette 27

Matrice extracellulaire 28

Migration cellulaire 30

2.2.2 Prolifération 31

Cycle cellulaire 31

Régulation 32

Mitose et méiose 34

Mort cellulaire 36

2.2.3	Différenciation.....	37
	Spécialisation	37
	Dédifférenciation	38
2.2.4	Communication.....	39
	Hormones et facteurs de croissance et de régulation.....	39
	Régulateurs de croissance	40
	Autres régulateurs.....	40
2.2.5	Métabolisme énergétique.....	40
	Hétérotrophie	40
	Autotrophie.....	44
2.2.6	Biosynthèse.....	44
	Synthèse des protéines	45
	Synthèse des lipides.....	45
	Synthèse des glucides	46
2.3	Environnement <i>in vitro</i>	46
2.3.1	Nature du support.....	46
2.3.2	Composition du milieu de culture	46
2.3.3	Composition de la phase gazeuse.....	47
2.3.4	Température	47
2.3.5	Concentration et densité cellulaires.....	47
2.3.6	Photopériode	47
	Exercices.....	48
Chapitre 3 Laboratoire		49
3.1	Sécurité	50
3.1.1	Groupes de risque.....	50
3.1.2	Niveaux de confinement	50
3.1.3	Évaluation du risque.....	52
3.2	Équipement	53
3.2.1	Équipement courant.....	53
	Équipement pour la préparation des milieux de culture et autres solutions de produits chimiques	53
	Équipement pour la manipulation des liquides	54
	Équipement pour utilisations variées	54
3.2.2	Équipement spécialisé.....	57
	Équipement pour l'observation des cellules	57
	Équipement pour la manipulation des cellules	59
	Équipement pour le comptage cellulaire	62
	Équipement pour la croissance des cellules	64
	Équipement pour la conservation des cellules	66
	Équipement spécialisé pour utilisations variées	66
3.3	Matériel	66
3.3.1	Matériel courant	66
3.3.2	Matériel spécialisé	67
	Matériel pour la manipulation des cellules	67
	Contenants pour les cellules en croissance	68
3.4	Aménagement	71
	Exercices.....	73

Chapitre 4 Contamination et aseptie	75
4.1 Contaminants	76
4.1.1 Contaminants physiques	76
Température.....	76
Lumière.....	76
Radiations.....	76
Vibrations.....	76
4.1.2 Contaminants chimiques	76
Ions métalliques.....	77
Endotoxines.....	77
Radicaux libres.....	77
Résidus et impuretés.....	77
4.1.3 Contaminants biologiques	80
Virus et prions.....	81
Mycoplasmes.....	82
Bactéries.....	82
Mycètes.....	82
Protozoaires.....	86
Invertébrés.....	86
Autres types cellulaires.....	86
4.2 Méthodes de stérilisation et de désinfection	87
4.2.1 Méthodes physiques de stérilisation	87
Méthode de stérilisation par la chaleur.....	87
Méthode de stérilisation par la microfiltration.....	88
Méthode de stérilisation par l'irradiation.....	88
4.2.2 Méthodes chimiques de stérilisation et de désinfection	89
Méthode de stérilisation par des gaz toxiques.....	89
Méthode de désinfection par des désinfectants liquides.....	89
Méthode de désinfection par des antibiotiques.....	92
4.3 Contrôle de la contamination	93
4.3.1 Principes de base	93
Exercices	96
Chapitre 5 Milieux de culture	98
5.1 Composition des milieux de culture	
des cellules animales	99
5.1.1 Milieux de base	104
Éléments essentiels des milieux de culture des cellules animales.....	104
Éléments facultatifs des milieux de culture des cellules animales.....	106
5.1.2 Utilisation du sérum dans le milieu	107
Composition du sérum.....	107
Avantages et inconvénients de l'utilisation du sérum.....	108
5.1.3 Milieu sans sérum	108
5.2 Composition des milieux de culture	
des cellules végétales	109
5.2.1 Éléments essentiels des milieux de culture	
de cellules végétales.....	112
5.2.2 Éléments facultatifs des milieux de culture de cellules végétales	114
Régulateurs de croissance.....	114
Vitamines.....	115

Agent gélifiant	115
Autres éléments parfois ajoutés.....	115
5.3 Fonctions des milieux de culture	118
5.3.1 Contrôle du pH	118
5.3.2 Maintien de la pression osmotique	118
5.4 Choix du milieu	119
5.4.1 Choix des milieux de culture de cellules animales	119
5.4.2 Choix des milieux de culture de cellules végétales	123
5.5 Préparation des milieux de culture	125
5.5.1 Préparation de milieux de culture de cellules animales.....	126
5.5.2 Préparation de milieux de culture de cellules végétales	126
Exercices	131
Chapitre 6 Analyse de la croissance	134
6.1 Courbe de croissance	135
6.1.1 Phases de croissance	136
Phase de latence	136
Phase de croissance exponentielle	136
Phase plateau.....	137
Phase de déclin.....	137
6.1.2 Paramètres mesurables à partir de la courbe de croissance	137
Durée de la phase de latence	137
Concentration et densité d'ensemencement	137
Concentration à saturation et densité de saturation	138
Intervalle des transferts et rapport de division	138
Taux de croissance et temps de doublement de la population	139
6.2 Détermination de l'âge	139
6.2.1 Nombre de passages	140
6.2.2 Nombre de générations	141
6.2.3 Paramètres mesurables à partir de l'âge d'une lignée.....	142
Taux de croissance.....	142
Temps de doublement de la population.....	142
6.3 Méthodes d'évaluation de la croissance	143
6.3.1 Méthodes directes par comptage des cellules	143
Hématimètre.....	143
Compteur électronique de noyaux	148
Compteur électronique de particules.....	149
6.3.2 Méthodes indirectes.....	150
Masse humide et masse sèche	150
Volume des cellules compactées.....	150
Quantité d'ADN.....	150
Quantité de protéines.....	152
Synthèses des acides nucléiques ou des protéines.....	152
Quantité de glucose	152
6.3.3 Mesure de l'efficacité des cultures cellulaires animales adhérentes	152
Efficacité de l'adhérence cellulaire.....	152
Efficacité à former des colonies	153
Exercices	153

Chapitre 7	Banques de lignées, caractérisation et conservation	157
7.1	Banques de lignées	158
7.1.1	Grandes collections de lignées cellulaires	159
7.1.2	Diversité et sélection	160
7.1.3	Acquisition	164
7.1.4	Production de banques de lignées cellulaires	164
7.1.5	Nomenclature des lignées cellulaires	166
7.2	Caractérisation et validation des lignées cellulaires	167
7.2.1	Morphologie cellulaire	171
7.2.2	Analyse chromosomique ou du caryotype	171
7.2.3	Empreinte d'ADN	172
7.2.4	Séquençage de l'ADN	173
7.2.5	Expression des ARNm et des protéines	173
7.2.6	Immunologie	174
7.2.7	Isoenzymes	175
7.3	Conservation	176
7.3.1	Cryoconservation	177
	Méthode	178
	Congélation	178
	Conservation à -80°C	186
	Congélation sans sérum	186
	Décongélation	186
	Gestion des stocks	191
7.3.2	Ralentissement de la croissance	193
	Entreposage au frais	194
	Entreposage à basse pression et entreposage à faible teneur en oxygène	194
7.3.3	Transport et distribution des cellules	195
Exercices		195

Module 2

Éléments spécifiques en culture cellulaire animale 198

Chapitre 8 Méthodes courantes de culture cellulaire animale 200

8.1	Culture primaire de cellules animales	201
8.1.1	Établissement d'une culture primaire	201
	Acquisition du matériel ou de l'échantillon	201
	Isolement du tissu ou des cellules	203
	Dissection et désagrégation	204
	Ensemencement et culture	208
8.1.2	Conditions de culture	209
	Choix du milieu de culture	209
	Sélection contre certains types cellulaires	209
	Autres facteurs favorisant la croissance	209
8.1.3	Évolution de la culture	211
8.2	Culture de lignées cellulaires animales	211
8.2.1	Sénescence et télomères	211
8.2.2	Lignées cellulaires continues	213
	Établissement de lignées transformées et immortalisation	215
	Propriétés des lignées transformées	216

8.2.3	Sélection d'une lignée cellulaire	216
8.2.4	Ensemencement des cultures	217
8.2.5	Entretien des cultures	217
	Évaluation de la morphologie cellulaire	217
	Renouvellement du milieu	218
	Passage	218
	Particularités de la culture de cellules en monocouche	219
	Particularités de la culture de cellules en suspension	220
8.3	Clonage	221
8.3.1	Applications	222
8.3.2	Conditions requises pour la croissance à faible densité	222
8.3.3	Méthode de clonage	223
	Clonage de cellules adhérentes et en suspension	225
	Clonage de cellules en suspension seulement	227
	Isolement des clones	227
8.4	Problèmes associés à la culture cellulaire animale et leurs solutions	229
8.4.1	Contamination	229
	Contamination croisée	229
	Contamination microbienne	229
	Contamination chimique	230
8.4.2	Croissance ralentie	230
8.4.3	Différenciation cellulaire	231
8.4.4	Adhérence	231
8.4.5	Granulosité et morphologie	231
8.4.6	Viabilité	232
	Exercices	232
Chapitre 9 Méthodes avancées de culture cellulaire animale : cellules d'insectes, cellules souches, sphéroïdes, agrégats et production à grande échelle		
9.1	Cellules d'insectes et autres types de cellules	236
9.1.1	Organismes utilisés	236
9.1.2	Conditions de culture	236
9.2	Cellules souches	238
9.2.1	Définition	238
9.2.2	Plasticité cellulaire	239
	Cellules souches unipotentes	240
	Cellules souches multipotentes	240
	Cellules souches pluripotentes	240
	Cellules souches totipotentes	241
	Limites de la classification par plasticité cellulaire	242
9.2.3	Origines et types de cellules souches	242
	Cellules souches embryonnaires	243
	Cellules souches fœtales	245
	Cellules souches amniotiques	245
	Cellules souches adultes	245
	Cellules souches pluripotentes induites	245
	Cellules souches obtenues par transfert de noyaux	246
9.2.4	Conditions de culture de cellules souches	246

Conditions de culture de cellules souches embryonnaires	247
Conditions de culture de cellules souches adultes	248
9.2.5 Applications de la culture des cellules souches	249
Thérapie cellulaire	249
Thérapie génique	249
Génie tissulaire	249
Clonage à visée thérapeutique ou reproductive	250
Élaboration de nouveaux médicaments	251
Production de viande <i>in vitro</i>	251
9.3 Sphéroïdes et agrégats	251
9.3.1 Types d'agrégats	251
9.3.2 Applications de la culture des sphéroïdes et des agrégats	252
9.3.3 Production d'agrégats	253
9.4 Production à grande échelle et bioréacteurs	255
9.4.1 Types de culture à grande échelle	256
9.4.2 Mise à l'échelle de cultures	256
9.4.3 Systèmes de production à moyenne et à grande échelle	257
Cellules en suspension	257
Types de bioréacteurs pour les cellules en suspension	258
Cellules adhérentes	263
Types de bioréacteurs pour les cellules adhérentes	264
9.4.4 Modes de production des cultures à moyenne et à grande échelle	267
9.4.5 Conditions de culture	268
9.4.6 Exemple de culture de cellules adhérentes sur microporteurs	270
Exercices	271
Chapitre 10 Méthodes avancées de culture cellulaire animale :	
transformation génétique, hybridomes et génie tissulaire	273
10.1 Transformation génétique de cellules animales	274
10.1.1 Principes de transformation génétique	275
Sélection, isolement et amplification du matériel génétique	275
Insertion du matériel génétique dans un vecteur	277
Transfert du matériel génétique et intégration dans le génome	278
Sélection des cellules transfectées	278
Évaluation de l'expression des gènes	278
10.1.2 Méthodes directes de transformation génétique	278
Méthodes biochimiques	279
Méthodes physiques	284
10.1.3 Méthodes indirectes de transformation génétique	285
Infection par un rétrovirus	285
Infection par un baculovirus	286
10.2 Production et culture d'hybridomes	287
10.2.1 Anticorps monoclonaux	287
Applications des anticorps monoclonaux	288
10.2.2 Production d'anticorps monoclonaux	288
Immunisation	288
Fusion cellulaire	290
Sélection des cellules hybrides	290
Sélection des cellules produisant l'anticorps d'intérêt	291
10.2.3 Problèmes associés à l'utilisation d'anticorps monoclonaux produits	
par des hybridomes	291

10.3 Génie tissulaire	292
10.3.1 Échafaudage	294
Forme et composition d'un échafaudage	294
Autres facteurs à considérer	294
10.3.2 Systèmes de culture	295
Gels et éponges	295
Fibres creuses	295
Chambre rotative	296
Culture sur filtres	296
Encapsulation dans l'alginate	296
10.3.3 Cellules utilisées	298
10.3.4 Applications et défis du génie tissulaire	299
Culture de peau	299
Culture de vaisseaux sanguins	300
Culture de cornée	300
Culture d'organes plus complexes	300
Exercices	303
Module 3	
Éléments spécifiques en culture cellulaire végétale	304
Chapitre 11 Méthodes courantes de culture cellulaire végétale	306
11.1 Culture primaire de cellules végétales	307
11.1.1 Sources de cellules végétales	307
11.1.2 Sélection du matériel végétal	311
11.1.3 Préparation et désinfection	311
11.1.4 Conditions de culture	312
11.1.5 Acclimatation	313
11.2 Callogenèse	313
11.2.1 Induction de la callogenèse	314
Étapes	315
Méthode	315
11.2.2 Suspensions cellulaires	316
11.2.3 Applications de la callogenèse	317
11.3 Organogenèse et régénération	319
11.3.1 Définitions de l'organogenèse et de la régénération	319
11.3.2 Induction de l'organogenèse et de la régénération	320
Étapes	320
Méthode	321
11.3.3 Facteurs à considérer pour la régénération	321
11.3.4 Applications de l'organogenèse et de la régénération	322
11.4 Micropropagation	323
11.4.1 Méthodes de micropropagation	323
Micropropagation par bourgeonnement axillaire	326
Micropropagation par régénération d'organes adventifs sur explants	329
Micropropagation par régénération d'organes adventifs sur cals ou par production d'embryons somatiques	329
11.4.2 Applications de la micropropagation	332
Production de plantes sans maladies	332
Avantages et limitations de la micropropagation	333

11.5 Embryogenèse somatique	335
11.5.1 Définition de l'embryogenèse somatique.	336
11.5.2 Induction de l'embryogenèse et conditions de culture	337
11.5.3 Problèmes relatifs à l'embryogenèse somatique.	339
11.5.4 Applications de l'embryogenèse somatique	339
Production de graines artificielles	339
Cryopréservation	341
Transformation génétique	341
11.6 Culture de protoplastes.	342
11.6.1 Définition d'un protoplaste	342
11.6.2 Production et culture de protoplastes	343
11.6.3 Régénération des protoplastes	344
11.6.4 Applications de la culture de protoplastes	345
Modifications génétiques	346
Stimulation de l'expression du métabolisme secondaire	349
11.7 Problèmes associés à la culture cellulaire végétale.	350
11.7.1 Variations somaclonales.	350
Types de variations somaclonales	351
Facteurs influant sur l'apparition de variations somaclonales.	351
Applications des variations somaclonales	352
11.7.2 Chimères	352
Types de chimères	353
Production de chimères	354
Maintien de chimères	354
11.7.3 Brunissement du milieu.	355
11.7.4 Hyperhydratation	355
11.7.5 Perte de diversité génétique liée à la monoculture	355
Exercices	356
Chapitre 12 Méthodes avancées de culture cellulaire végétale	359
12.1 Transformation génétique de cellules végétales	360
12.1.1 Méthodes de transformation génétique	361
Transfert direct du matériel génétique	365
Transfert indirect du matériel génétique	366
12.1.2 Applications de la transformation génétique	371
12.1.3 Bénéfices et risques potentiels de la transformation génétique	371
Avantages de la transformation génétique	372
Risques associés à la transformation génétique	373
12.2 Embryons zygotiques.	373
12.2.1 Embryogenèse	373
12.2.2 Méthodes et conditions de culture des embryons zygotiques.	378
Matériel végétal utilisé pour la culture d'embryons zygotiques.	378
Méthode de culture des embryons zygotiques	378
Développement <i>in vitro</i> de l'embryon zygotique	379
12.2.3 Applications des embryons zygotiques	380
12.3 Haplodiploïdisation.	380
12.3.1 Ploïdie	380
12.3.2 Production d'haploïdes	382
Production d'haploïdes <i>in vivo</i>	382
Production d'haploïdes <i>in vitro</i>	383

12.3.3	Doublement d'haploïdes	385
12.3.4	Problèmes associés à l'haplodiploïdisation	386
12.3.5	Applications de l'haplodiploïdisation	386
	Production d'hybrides chez l'asperge	386
	Production de melons sans graines	386
12.4	Production de métabolites secondaires et culture en bioréacteur	387
12.4.1	Métabolisme secondaire des végétaux	388
	Types de cultures cellulaires adaptés à la production de métabolites	388
	Induction du métabolisme secondaire	388
12.4.2	Culture en bioréacteur	390
	Propriétés des cellules en bioréacteur	390
	Types de cultures végétales en bioréacteur	392
	Design des bioréacteurs	394
	Modes de production de métabolites secondaires en bioréacteur	395
12.4.3	Induction de cultures végétales produisant des métabolites secondaires en bioréacteur	396
	Préculture	396
	Préparation du bioréacteur	397
	Ensemencement et suivi de la croissance	397
	Récolte des produits recherchés	397
12.4.4	Autres applications de la culture de cellules végétales à grande échelle	397
	Conception de médicaments	397
	Biotransformation	398
	Production d'enzymes	398
	Production de protéines recombinantes et de vaccins	398
	Micropropagation	398
	Exercices	398
	 Module 4	
	Expérimentation	400
	 Chapitre 13 Projets en culture cellulaire animale	402
13.1	Projet 1: Courbe de croissance	403
13.1.1	Mise en situation	403
13.1.2	Aperçu des étapes	403
13.1.3	Description des étapes	403
	Étape 1: Ensemencement des cellules	403
	Étape 2: Analyse de la croissance par des comptages cellulaires	403
	Étape 3: Renouvellement du milieu de culture	404
	Étape 4: Courbe de croissance	404
13.2	Projet 2: Cytotoxicité	404
13.2.1	Mise en situation	404
13.2.2	Aperçu des étapes	404
13.2.3	Description des étapes	405
	Étape 1: Traitement des cellules à l'agent cytotoxique	405
	Étape 2: Culture des cellules à faible densité	406
	Étape 3: Coloration et comptage des clones	406
	Étape 4: Analyse des résultats	406

13.3	Projet 3: Transfection à l'aide de liposomes	
	cationiques	406
13.3.1	Mise en situation	406
13.3.2	Aperçu des étapes	409
13.3.3	Description des étapes	409
	Étape 1: Culture et préparation des cellules	409
	Étape 2: Transfection transitoire	409
	Étape 3: Vérification de l'expression de la luciférase	409
Chapitre 14	Projets en culture cellulaire végétale	411
14.1	Projet 1: Conservation de lignées cellulaires végétales	412
14.1.1	Mise en situation	412
14.1.2	Aperçu des étapes	412
14.1.3	Description des étapes	412
	Étape 1: Préparation du milieu de culture	412
	Étape 2: Désinfection et ensemencement du matériel végétal	412
	Étape 3: Ensemencement des plantules	414
	Étape 4: Repiquage des explants/plantules/cals sur des milieux frais	414
	Étape 5: Suivi du développement des cals	415
14.2	Projet 2: Culture en suspension de cellules végétales	416
14.2.1	Mise en situation	416
14.2.2	Aperçu des étapes	416
14.2.3	Description des étapes	416
	Étape 1: Préparation du milieu de culture	416
	Étape 2: Ensemencement des suspensions cellulaires	416
	Étape 3: Renouvellement du milieu liquide	417
	Étape 4: Suivi du développement des suspensions	417
14.3	Projet 3: Courbe de croissance	417
14.3.1	Mise en situation	417
14.3.2	Aperçu des étapes	418
14.3.3	Description des étapes	418
	Étape 1: Préparation du milieu de culture	418
	Étape 2: Ensemencement des plantules ou des cals	418
	Étape 3: Analyse de la croissance par la mesure de la masse humide et de la masse sèche	418
	Étape 4: Établissement de la courbe de croissance	418
14.4	Projet 4: Régulation hormonale	418
14.4.1	Mise en situation	419
14.4.2	Aperçu des étapes	419
14.4.3	Description des étapes	419
	Étape 1: Préparation du milieu de culture	419
	Étape 2: Ensemencement des plantules	420
	Étape 3: Repiquage des cals ou des plantules dans un milieu frais	420
	Étape 4: Suivi de la croissance et du développement	420
	Étape 5: Analyse de la croissance par la mesure de la masse humide et de la masse sèche	420
14.5	Projet 5: Embryogenèse somatique	420
14.5.1	Mise en situation	420
14.5.2	Aperçu des étapes	421
14.5.3	Description des étapes	421
	Étape 1: Préparation du milieu de culture	421
	Étape 2: Ensemencement des suspensions cellulaires dans le milieu A liquide	421

Étape 3: Repiquage des suspensions cellulaires dans le milieu B liquide.	421
Étape 4: Suivi du développement des embryons somatiques.	422
Étape 5: Ensemencement des embryons dans le milieu B solide.	422
Étape 6: Mise en terre des embryons.	422
14.6 Projet 6: Transformation génétique.	422
14.6.1 Mise en situation.	422
14.6.2 Aperçu des étapes.	423
14.6.3 Description des étapes.	423
Étape 1: Préparation du milieu de culture.	423
Étape 2: Préparation du matériel végétal.	423
Étape 3: Culture de l'agrobactérie <i>Sinorhizobium meliloti</i>	424
Étape 4: Transformation du matériel végétal.	424
Étape 5: Sélection du matériel végétal transformé et élimination des bactéries.	424
Étape 6: Repiquage des plantules dans un milieu de croissance.	424
Étape 7: Suivi et analyse de la transformation.	424
Corrigé des exercices.	427
Glossaire.	458
Médiagraphie.	476
Recettes.	493
Index des mots clés.	498

Liste des figures, des tableaux, des protocoles

Liste des figures

Figure 1.1	Quatre types de cultures cellulaires animales	13
Figure 1.2	Quatre types de cultures cellulaires végétales	15
Figure 2.1	Développement de l'embryon et formation des feuillets embryonnaires chez l'humain	19
Figure 2.2	Organisation générale d'une angiosperme (plante à fleur)	22
Figure 2.3	Graines des eudicotylédones et des monocotylédones	23
Figure 2.4	Trois types de tissus végétaux	23
Figure 2.5	Processus d'adhérence des cellules animales en culture impliquant la présence de trois types de molécules d'adhérence	26
Figure 2.6	Molécules d'adhérence	27
Figure 2.7	Jonctions intercellulaires dans les tissus animaux	28
Figure 2.8	Protéines motrices et cytosquelette	29
Figure 2.9	Matrice extracellulaire (MEC)	30
Figure 2.10	Cycle cellulaire et régulation par trois points de contrôle	31
Figure 2.11	Inhibition de contact et point d'ancrage	33
Figure 2.12	Démonstration du rôle du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) dans la stimulation de la division cellulaire	34
Figure 2.13	Mitose et méiose	35
Figure 2.14	Changements cellulaires au cours du processus de l'apoptose	37
Figure 2.15	Développement des animaux et des végétaux	38
Figure 2.16	Types de signaux cellulaires	39
Figure 2.17	Comparaison de la structure chimique de certains régulateurs de croissance végétaux et animaux	41
Figure 2.18	Aperçu de la respiration cellulaire aérobie et de la fermentation lactique	42
Figure 2.19	Voies cataboliques de divers nutriments	43
Figure 2.20	Différents types de cultures cellulaires végétales	44
Figure 3.1	Microscope à lumière inversée	58
Figure 3.2	Hotte à flux laminaire horizontal	59
Figure 3.3	Disposition du matériel dans une hotte à flux laminaire horizontal	60
Figure 3.4	Hotte à flux laminaire vertical ou enceinte de sécurité biologique (ESB) de classe II	61
Figure 3.5	Enceinte de sécurité biologique de classe III	62
Figure 3.6	Disposition du matériel dans une enceinte de sécurité biologique de classe II	63
Figure 3.7	Stérilisateurs de table	63
Figure 3.8	Hématimètre	64
Figure 3.9	Bioréacteurs en verre et en sac plastique	65
Figure 3.10	Contenants utilisés en culture cellulaire animale	69
Figure 3.11	Contenants utilisés en culture cellulaire végétale	69
Figure 3.12	Flacons roulants et flacons réacteurs avec agitateurs	71
Figure 3.13	Aménagement d'un laboratoire de culture cellulaire	72
Figure 4.1	Comparaison des tailles de différents contaminants biologiques	80
Figure 4.2	Cultures cellulaires végétales contaminées par des bactéries, des levures et des moisissures	82

Figure 4.3	Cultures cellulaires animales contaminées par des bactéries et des levures	86
Figure 4.4	Gel d'agarose	97
Figure 5.1	Comparaison entre les divers modes opératoires de production en bioréacteur, la biomasse et le substrat	122
Figure 6.1	Quatre phases sur une courbe de croissance cellulaire	136
Figure 6.2	Cycles des passages et paramètres de croissance	139
Figure 6.3	Relation entre le nombre de passages et le nombre de générations	140
Figure 6.4	Méthode de comptage avec un hématimètre	145
Figure 6.5	Compteur de noyaux	148
Figure 6.6	Compteur électronique de type Coulter (Beckman Coulter ^{MD})	149
Figure 6.7	Cellules placées sur un hématimètre	154
Figure 6.8	Courbes de croissance	155
Figure 6.9	Extrait du cahier de laboratoire de Marc Camirand-Forand Le Septième, étudiant en biotechnologies	155
Figure 7.1	Procédure d'acquisition de nouvelles lignées cellulaires	165
Figure 7.2	Morphologie de la lignée cellulaire NIH-3T3 (numéro ATCC: CRL-1658)	171
Figure 7.3	Caryotype normal humain obtenu par la coloration au Giemsa	172
Figure 7.4	Minisatellites	173
Figure 7.5	Analyse de l'ARNm par la méthode de buvardage de northern	174
Figure 7.6	Schématisation de la méthode ELISA	175
Figure 7.7	Zymogrammes	176
Figure 7.8	Températures physiologiques normales d'une variété d'organismes vivants	177
Figure 7.9	Procédure de vitrification de cellules nucléaires d'orange	179
Figure 7.10	Procédure de cryoconservation de méristèmes apicaux caulinaires de caféier (<i>Coffea sp.</i>) par encapsulation et déshydratation	180
Figure 7.11	Contenants utilisés pour la cryoconservation	185
Figure 7.12	Impact de la vitesse de refroidissement sur le taux de survie des cellules après leur décongélation	187
Figure 7.13	Contenant d'azote liquide destiné à la conservation de cellules	188
Figure 7.14	Exemple d'une fiche d'information sur des lignées cellulaires congelées	191
Figure 7.15	Exemple d'une fiche d'information sur une lignée cellulaire	192
Figure 7.16	Place de la congélation et de la décongélation dans les étapes de la culture cellulaire	193
Figure 8.1	Étapes menant à l'établissement d'une culture primaire	202
Figure 8.2	Types cellulaires les plus fréquemment cultivés	203
Figure 8.3	Culture de cellules souches à l'aide d'une couche nourricière	210
Figure 8.4	Inhibition de contact	212
Figure 8.5	Croissance de cellules embryonnaires humaines normales et transformées au cours de multiples passages	212
Figure 8.6	Régulation de la division cellulaire et télomères	214
Figure 8.7	Télomères et télomérase	215
Figure 8.8	Schéma de concepts entourant la nomenclature des lignées cellulaires	215
Figure 8.9	L'observation de la morphologie de deux lignées cellulaires communes	218
Figure 8.10	Anneaux de clonage	228
Figure 8.11	Confettis pour le clonage cellulaire	228
Figure 9.1	Établissement d'une culture primaire de cellules embryonnaires d'insectes	237
Figure 9.2	Cellules souches et spermatogenèse	239
Figure 9.3	Types de cellules souches, plasticité et origine	240
Figure 9.4	Différenciation des tissus embryonnaires	241
Figure 9.5	Plasticité des cellules souches selon le stade de développement	242
Figure 9.6	Isolement de cellules souches embryonnaires par immunochirurgie	243

Figure 9.7	Établissement d'une culture de cellules souches embryonnaires et différenciation	244
Figure 9.8	Méthode d'obtention de cellules souches pluripotentes induites	246
Figure 9.9	Méthode d'obtention et de culture d'un corps embryotaire à partir de cellules souches embryonnaires	247
Figure 9.10	Sélection des cellules souches épithéliales par leur hétérogénéité proliférative	248
Figure 9.11	Méthodes de thérapie génique	250
Figure 9.12	Comparaison entre l'organisation cellulaire et la diffusion des éléments essentiels dans un sphéroïde et dans une tumeur	253
Figure 9.13	Méthodes de production d'agrégats	254
Figure 9.14	Culture en flacon réacteur avec agitateur	257
Figure 9.15	Paramètres contrôlés par un bioréacteur avec agitation mécanique	258
Figure 9.16	Bioréacteur avec agitation pneumatique	259
Figure 9.17	Bioréacteur en sac plastique	260
Figure 9.18	Bioréacteur à perfusion	260
Figure 9.19	Bioréacteur à lit fluidisé	261
Figure 9.20	Bioréacteur à lit fixe	262
Figure 9.21	Microporteurs	262
Figure 9.22	Stratégies de mise à l'échelle pour la culture de cellules adhérentes	263
Figure 9.23	Flacon roulant, support à rouleaux et support à tambours	264
Figure 9.24	Propagateur multisurface de cellules adhérentes Nunc Cell Factory ^{MD}	265
Figure 9.25	Bioréacteur BelloCell ^{MD}	266
Figure 9.26	Modes opératoires de production en bioréacteur	268
Figure 9.27	Effet de cisaillement causé par les bulles d'air	269
Figure 10.1	Étapes générales de transfection de cellules animales	275
Figure 10.2	Cellules animales transfectées avec le gène codant pour la protéine à fluorescence verte (GFP)	276
Figure 10.3	Aperçu d'un vecteur d'expression typique destiné aux cellules animales	277
Figure 10.4	Transfection par des liposomes ou lipofection	281
Figure 10.5	Fusil à gènes	284
Figure 10.6	Micro-injection d'ADN dans une cellule animale	285
Figure 10.7	Cycle de réplication d'un rétrovirus infectant une cellule eucaryote	286
Figure 10.8	Anticorps monoclonaux et polyclonaux	288
Figure 10.9	Processus de production d'anticorps monoclonaux <i>in vitro</i>	289
Figure 10.10	Cultures histotypique et organotypique	293
Figure 10.11	Types d'échafaudages et composition de la matrice	295
Figure 10.12	Chambre rotative	296
Figure 10.13	Culture sur filtres	297
Figure 10.14	Utilisation de l'encapsulation pour acheminer des produits cellulaires <i>in vivo</i>	298
Figure 10.15	Jalons dans l'histoire du développement de la peau artificielle	299
Figure 10.16	Processus de génie tissulaire menant à la formation de vaisseaux sanguins artificiels	301
Figure 11.1	Totipotence et culture cellulaire végétale	308
Figure 11.2	Parties d'une plante utilisées pour l'obtention d'explants	309
Figure 11.3	Voies de culture cellulaire	310
Figure 11.4	Cyclophysie, topophysie et périphysie	312
Figure 11.5	Cals dans la nature	314
Figure 11.6	Culture de cellules végétales sur un milieu solide favorisant la croissance de cals <i>in vitro</i>	315
Figure 11.7	Culture de cellules végétales en suspension dans un milieu liquide	316
Figure 11.8	Formation de tiges et de racines sur des cals de plantes	319
Figure 11.9	Contrôle de l'organogenèse par différents rapports hormonaux	320
Figure 11.10	Régénération de plantes à partir de cals	322

Figure 11.11	Exemples de propagation végétative	324
Figure 11.12	Exemple d'une méthode de micropropagation	325
Figure 11.13	Quatre méthodes de micropropagation	326
Figure 11.14	Micropropagation par boutures à nœuds simples.	327
Figure 11.15	Micropropagation par les bourgeons axillaires.	328
Figure 11.16	Embryons adventifs ou somatiques chez <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	329
Figure 11.17	Micropropagation par régénération d'organes adventifs sur des explants.	330
Figure 11.18	Micropropagation par régénération d'organes adventifs sur cals ou par production d'embryons somatiques	331
Figure 11.19	Culture de méristèmes	333
Figure 11.20	Étapes de l'excision du méristème d'ail	335
Figure 11.21	Exemple de graines artificielles	335
Figure 11.22	Étapes de l'embryogenèse zygotique d'une eudicotylédone typique	336
Figure 11.23	Étapes de l'embryogenèse somatique	337
Figure 11.24	Embryogenèse somatique à partir de différents tissus	338
Figure 11.25	Plantules de carotte issues de l'embryogenèse somatique	339
Figure 11.26	Méthode de production de graines artificielles.	341
Figure 11.27	Protoplastes	342
Figure 11.28	Isolement mécanique de protoplastes.	344
Figure 11.29	Obtention de protoplastes par digestion enzymatique	345
Figure 11.30	Types d'hybrides issus de la fusion de protoplastes.	346
Figure 11.31	Méthodes de fusion des protoplastes	347
Figure 11.32	Production, fusion et culture de protoplastes.	348
Figure 11.33	Stérilité mâle cytoplasmique	349
Figure 11.34	Exemples de variations somaclonales	350
Figure 11.35	Causes de modifications génétiques entraînant des variations somaclonales.	351
Figure 11.36	Chimère donnant un feuillage panaché à la violette africaine	352
Figure 11.37	Types de chimères	353
Figure 11.38	Couches du méristème apical caulinaire et leur production.	354
Figure 12.1	Histoire de la culture du maïs	361
Figure 12.2	Méthodes d'introduction de nouveaux caractères	362
Figure 12.3	Amélioration génétique et transformation génétique.	363
Figure 12.4	Étapes de la transformation génétique.	364
Figure 12.5	Quelques méthodes de transfert direct	365
Figure 12.6	Exemple d'une tumeur causée par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	367
Figure 12.7	Plasmide Ti d'une agrobactérie.	368
Figure 12.8	Étapes menant à l'activation du transfert de gènes par une agrobactérie.	369
Figure 12.9	Principe de la transformation avec une agrobactérie.	370
Figure 12.10	Obtention d'une plante génétiquement modifiée	372
Figure 12.11	Formation des gamétophytes chez les eudicotylédones	374
Figure 12.12	Double fécondation et développement d'un embryon zygotique chez les eudicotylédones	375
Figure 12.13	Accélération de la germination par la culture d'embryons zygotiques immatures	376
Figure 12.14	Sauvetage d'embryons non viables par la culture d'embryons zygotiques immatures	377
Figure 12.15	Principe de l'haplodiploïdisation d'après l'exemple de l'aubergine	381
Figure 12.16	Fixation plus rapide du matériel génétique par l'haplodiploïdisation	382
Figure 12.17	Obtention d'haploïdes à partir d'organes femelles.	383
Figure 12.18	Obtention d'haploïdes à partir d'organes mâles	384
Figure 12.19	Culture d'anthers d'orge commune	385
Figure 12.20	Principe de la production de melon sans graines	387

Figure 12.21	Exemple d'une voie métabolique menant à la production de la nicotine ou de la scopolamine	391
Figure 12.22	Types de bioréacteurs	393
Figure 12.23	Modèles d'agitateurs utilisés dans les bioréacteurs avec agitation mécanique	394
Figure 12.24	Ports d'échantillonnage utilisés pour les cellules végétales	395
Figure 13.1	Essai de cytotoxicité sur des cellules adhérentes à l'aide d'un test clonogénique	405
Figure 13.2	Exemple d'une courbe de survie	407
Figure 13.3	Différentes formes de courbes de survie	407
Figure 13.4	Principe de la réaction de la luciférase	408
Figure 13.5	Carte de restriction du vecteur pGL3-Control ^{MD} distribué par Promega	408

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Comparaison sommaire des plateformes d'expression de protéines recombinantes en bioréacteur en grande quantité	7
Tableau 1.2	Avantages et inconvénients de l'utilisation des plateformes d'expression de protéines recombinantes	11
Tableau 2.1	Comparaison entre les organismes animaux et végétaux	16
Tableau 2.2	Classification et fonctions des tissus animaux	20
Tableau 2.3	Classification et fonctions des tissus végétaux	24
Tableau 3.1	Caractéristiques des agents pathogènes associés aux quatre groupes de risque	51
Tableau 3.2	Caractéristiques des niveaux de confinement	52
Tableau 3.3	Températures de conservation, durées de conservation et mode de stérilisation des principaux produits chimiques utilisés en culture cellulaire	55
Tableau 3.4	Formats et volumes des contenants de culture cellulaire animale et végétale	70
Tableau 4.1	Principales sources de contamination	81
Tableau 4.2	Produits chimiques utilisés dans la préparation des réactions de PCR pour la détection de mycoplasmes	84
Tableau 4.3	Préparation d'un mélange réactionnel de PCR pour la détection de mycoplasmes	84
Tableau 4.4	Méthodes de stérilisation par la chaleur recommandées pour divers objets de laboratoire	87
Tableau 4.5	Désinfectants liquides utilisés avec les méthodes chimiques de stérilisation et de désinfection avec leur concentration effective, la durée du traitement, les utilisations principales ainsi que leurs effets sur les microorganismes	89
Tableau 4.6	Antibiotiques couramment utilisés pour éliminer ou contrôler les contaminants biologiques	93
Tableau 5.1	Composition des milieux de culture de cellules animales les plus courants	100
Tableau 5.2	Composition des milieux de culture de cellules végétales les plus courants	110
Tableau 5.3	Principaux régulateurs de croissance utilisés en culture cellulaire végétale et leurs fonctions	116
Tableau 5.4	Lignées cellulaires animales et milieux bien adaptés à leur culture	120
Tableau 5.5	Espèces végétales et milieux bien adaptés à leur culture	123
Tableau 5.6	Composition des solutions mères utilisées dans la préparation de milieu MS	129
Tableau 7.1	Description de l'information fournie par l'ATCC pour une lignée cellulaire: exemple de la lignée 3T3-Swiss albino	162
Tableau 7.2	Exemples de lignées cellulaires de souris, <i>Mus musculus</i> , chez ATCC, ainsi que leurs désignations courantes	163
Tableau 7.3	Définition des désignations utilisées à l'ATCC	164
Tableau 7.4	Exemples de lignées cellulaires fréquemment utilisées	166
Tableau 7.5	Caractéristiques de la lignée HeLa	168
Tableau 7.6	Information requise pour obtenir l'approbation par les organismes de régulation gouvernementaux	170

Tableau 7.7	Comparaison des méthodes utilisées pour la confirmation de l'authenticité d'une lignée cellulaire	170
Tableau 7.8	Exemples de traitements de précongélation et de congélation avec des cryoprotectants utilisés dans le cas des suspensions cellulaires végétales	184
Tableau 7.9	Quelques exemples de lignées cellulaires végétales conservées au frais (entre 1 et 9 °C)	194
Tableau 8.1	Exemple de formulaire d'enregistrement de données pour l'établissement de cultures primaires	208
Tableau 8.2	Relation entre la densité d'ensemencement et l'efficacité à former des colonies	225
Tableau 9.1	Systèmes de production selon les types de culture et les volumes ou surfaces cultivables utilisés	256
Tableau 9.2	Comparaison des modes de production en bioréacteur	269
Tableau 10.1	Comparaison des systèmes d'expression de protéines recombinantes	274
Tableau 10.2	Comparaison des méthodes de transfection couramment utilisées	279
Tableau 10.3	Lignées de cellules myélomateuses de rongeurs et humaines fréquemment utilisées	290
Tableau 14.1	Formulaire d'enregistrement des données sur les lignées végétales	413
Tableau 14.2	Suivi des repiquages d'une lignée cellulaire végétale	414
Tableau 14.3	Milieux de culture à préparer à différentes concentrations de régulateurs de croissance	419

Liste des protocoles

Protocole 4.1	Nettoyage et stérilisation du matériel réutilisable	77
Protocole 4.2	Nettoyage et désinfection d'un incubateur	79
Protocole 4.3	Détection de mycoplasmes par PCR	83
Protocole 4.4	Désinfection et ensemencement du matériel végétal	90
Protocole 4.5	Travail aseptique sous une enceinte de sécurité biologique	94
Protocole 5.1	Préparation de milieux de culture de cellules animales	127
Protocole 5.2	Préparation de solutions mères utilisées dans la fabrication de milieux de culture de cellules végétales	128
Protocole 5.3	Préparation des milieux de culture de cellules végétales	130
Protocole 6.1	Comptage de cellules animales et végétales avec un hématimètre	146
Protocole 6.2	Mesure de la masse humide et de la masse sèche des cellules	151
Protocole 7.1	Congélation de cellules animales	181
Protocole 7.2	Congélation de cellules végétales	183
Protocole 7.3	Décongélation de cellules animales	188
Protocole 7.4	Décongélation de cellules végétales	190
Protocole 8.1	Désagrégation mécanique de tissus mous animaux	205
Protocole 8.2	Culture primaire d'embryons de poulet	206
Protocole 8.3	Renouvellement du milieu de culture d'une lignée cellulaire animale en monocouche	219
Protocole 8.4	Passage d'une culture de cellules animales en monocouche	220
Protocole 8.5	Détermination de l'efficacité à former des colonies	223
Protocole 8.6	Clonage de cellules animales par la technique du <i>spotting</i>	226
Protocole 10.1	Transfection transitoire de cellules animales	282
Protocole 11.1	Ensemencement des suspensions cellulaires végétales	317
Protocole 11.2	Renouvellement du milieu de culture des suspensions cellulaires végétales	318
Protocole 11.3	Culture de méristèmes d'ail	334
Protocole 11.4	Production d'embryons somatiques de carottes	340
Protocole 12.1	Culture d'embryons zygotiques de maïs	379
Protocole 13.1	Mesure de l'activité de la luciférase	410
Protocole 14.1	Transformation génétique de plantules à l'aide d'une agrobactérie	425