



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Salah Bounider de Constantine 3

Faculté de Médecine

Département de Pharmacie



**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de
Docteur en Pharmacie**

***NOTIONS ET PROCEDURES
DE BASE EN CULTURE CELLULAIRE***

Réalisé par :

Boumardas Farouk Abdallah

Boulemkahel Serine Ferial

Achouri Aya Fatima

Boulkroune Amani Rihem

Encadré par : Dr. BERERHI .Z MAHU en pharmacologie

Les membres du jury :

Président du jury : Dr. Derouiche .M.T MAHU en pharmacologie

Examineur : Dr. Benabdallah-Khoudja .A MAHU en pharmacie galénique

Année universitaire : 2023-2024

Table des matières

<i>Liste des figures</i>	<i>IX</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>XI</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>XII</i>
<i>Liste des annexes</i>	<i>XIV</i>
<i>Revue de la littérature</i>	<i>1</i>
<i>Introduction et objectifs</i>	<i>3</i>
<i>Avant-propos : Rappel historique et raisons éthiques de développement des méthodes alternatives</i>	<i>4</i>
<i>Chapitre I : Définition des concepts et domaines d'application de la culture cellulaire.</i>	<i>8</i>
I.1 Définition des concepts	8
I.2 Les statuts physiologiques des cellules	10
I.3 La biologie des cellules en culture	16
I.4 Les principaux domaines d'application de la culture cellulaire	22
<i>Chapitre II : Exigences d'un Laboratoire de culture cellulaire.</i>	<i>31</i>
II.1. Exigences liées à la conception d'un laboratoire de culture cellulaire	31
II.2. Matériel et équipement	41
<i>Chapitre III : Exigences des cellules en culture.</i>	<i>68</i>
III.1. Le développement des milieux	68
III.2. Les propriétés physicochimiques	68
III.3. Les solutions salines équilibrées (Balanced Salt Solutions ou BSS)	69
III.4. Les milieux complets	69
III.5. Les sérums	71
III.6. Les milieux sans sérum	72
III.7. Évolution des milieux de cultures	72
<i>Chapitre IV : les bonnes pratiques en culture cellulaire.</i>	<i>75</i>
IV.1. La sécurité au laboratoire	75
IV.2. L'évaluation des risques	75
IV.3. Les procédures standards de fonctionnement	75
IV.4. Les règles de sécurité	75
IV. 5. La sécurité générale	75
IV.6. La bioéthique	81
IV.7. L'assurance qualité	81
IV.8. La validation	81

IV.9. L'authentification	82
IV.10. La provenance	82
IV.11. La contamination	82
<i>Chapitre V : Les procédures de manipulation de base en culture cellulaire.</i>	<i>84</i>
V.1. Les techniques d'asepsie	84
V.2. La culture primaire (primoculture)	88
V.3. La subculture et lignées cellulaires	91
V.4. La cryoconservation des cellules	94
<i>Partie pratique</i>	<i>97</i>
<i>I. Les objectifs</i>	<i>97</i>
II. Les principales procédures de manipulation en culture cellulaire	98
II.1. Les procédures soulignant les techniques aseptiques	98
protocole II.1.1 Les techniques aseptiques dans un flux laminaire vertical	98
Protocole II.1.2 Le travail sur la paillasse	103
II.2. Les procédures qui concernent la préparation et la stérilisation	106
Protocole II.2.1 Préparation et stérilisation de la verrerie	106
Protocole II.2.2 Préparation et stérilisation des pipettes en verre	109
Protocole II.2.3. Préparation et stérilisation de l'eau ultrapure (UPW)	111
Protocole II.2.4. Préparation et stérilisation de D-PBSA	114
Protocole II.2.5. Préparation du milieu à partir de poudre	116
Protocole II.2.6. Filtration stérile avec un petit filtre en ligne (small in-line filter)	118
Protocole II.2.7. La dialyse du sérum	122
II.3. Les procédures liées aux préparations des milieux définis et des suppléments	124
Protocole II.3.1 Préparation des standards de pH	124
II.4. Les techniques correspondant à la culture primaire	125
Protocole II.4.2. Les biopsies humaines	129
Protocole II.4.3. La désagrégation des tissus avec la trypsine chaude	131
Protocole II.4.4 Désagrégation des tissus avec la trypsine froide	134
Protocole II.4.5 La désagrégation tissulaire avec la collagénase	137
Protocole II.4.6 L'enrichissement des cellules viables	140
II.5. Les procédures qui concernent la subculture	142
Protocole II.5.1 La subculture des cellules en monocouche	142
II.6. Les procédures qui concernent la caractérisation des cellules	146
Protocole II.6.1 L'utilisation du microscope inversé	146
Protocole II.6.2. Coloration avec GIMSA	148

Protocole II.6.3. La coloration avec le cristal violet	150
II.7. Cryopréservation des cellules	150
Protocole II.7.1 Le comptage des cellules par Hémocytomètre	150
Protocole II.7.2. Comptage électronique des cellules par résistance électrique	155
II.8. Les procédures liées à la Contamination	158
Protocole II.8.1 Le nettoyage des incubateurs	158
Protocole II.8.2 Détection des mycoplasmes par fluorescence	160
Protocole II.8.3. La détection des mycoplasmes par PCR	162
Protocole II.8.4 Eradication de la contamination microbienne	168
II.9. Procédures relatives aux tests de viabilité	170
Protocole II.9.1 Estimation de la viabilité par exclusion du colorant	170
Protocole II.9.2 L'estimation de la viabilité par la rétention du colorant	171
III. Solutions aux principaux problèmes qui peuvent être rencontrés lors de la manipulation	173
<i>Conclusion</i>	175
<i>Références bibliographiques</i>	176
<i>Résumé</i>	181

Résumé

Les progrès en pharmacologie encouragent l'adoption de méthodes alternatives à l'expérimentation animale, notamment la culture cellulaire *in vitro*, et sont soutenus par des institutions prestigieuses telles que le JOHN HOPKINS CENTER aux États-Unis et le FRAME au Royaume-Uni. Notre mémoire se concentre sur l'établissement de procédures de manipulation pour garantir le bon fonctionnement des unités de culture cellulaire, en mettant l'accent sur la résolution des problèmes potentiels rencontrés.

Le premier chapitre explore la culture cellulaire en définissant ses termes et en examinant la biologie des cellules en culture, ainsi que ses principales applications. Le deuxième chapitre aborde les normes essentielles pour la conception des laboratoires de culture cellulaire, incluant les techniques d'asepsie et de stérilité et le contrôle environnemental et décrit le matériel nécessaire pour le laboratoire de culture cellulaire. L'importance des milieux de culture dans la fourniture de nutriments et le maintien des conditions optimales pour la croissance cellulaire sont détaillées dans le troisième chapitre. Enfin, les derniers chapitres traitent les bonnes pratiques en culture cellulaire et les procédures de manipulation de base nécessaires au bon fonctionnement des unités.

Dans la partie pratique nous avons pu établir les procédures fondamentales pour garantir le bon fonctionnement d'une nouvelle unité de culture cellulaire, et déterminer également les solutions aux problèmes courants qui peuvent survenir lors de la manipulation.

En conclusion, notre mémoire offre une description détaillée des principes fondamentaux de la culture cellulaire, fournissant ainsi un guide complet pour établir un bon laboratoire de culture cellulaire.

Mots clé : méthodes alternatives, culture cellulaire, stérilité, milieux de culture, bonnes pratiques en culture cellulaire, procédures de manipulation.

Abstract

Progress in pharmacology is encouraging the adoption of alternative methods to animal experimentation, notably in vitro cell culture, supported by prestigious institutions such as the JOHN HOPKINS CENTER in the United States and the FRAME in the United Kingdom. Our thesis focuses on establishing manipulation procedures to ensure the proper functioning of cell culture units, with an emphasis on resolving potential issues encountered.

The first chapter explores cell culture by defining its terms and examining the biology of cultured cells, as well as its primary applications. The second chapter addresses essential standards for designing cell culture laboratories, including aseptic and sterile techniques, environmental control, and describes the necessary equipment for the cell culture laboratory. The importance of culture media in providing nutrients and maintaining optimal conditions for cell growth is detailed in the third chapter. Finally, the last chapters cover good practices in cell culture and the basic manipulation procedures necessary for the proper functioning of the units.

In the practical part, we have been able to establish fundamental procedures to ensure the proper functioning of a new cell culture unit, and determine solutions to common problems that may arise during manipulation.

In conclusion, our thesis provides a detailed description of the fundamental principles of cell culture, thereby offering a comprehensive guide to establishing a good cell culture laboratory.

Keywords: alternative methods, cell culture, sterility, culture media, good practices in cell culture, manipulation procedures.