

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Constantine 1 - Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة قسنطينة 1 - الاخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Génétique*

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Procédés de fabrication de réactifs destinés à une utilisation dans la
réalisation de cultures de cellules animales : milieux de culture et additifs**

Présenté et soutenu par : CHADI Aya

Le 25/06/2025

Jury d'évaluation :

Président : CHAOUI Naouel (PROF - Université Constantine 1 - Frères Mentouri).

Encadrant : REZGOUN Mohamed Larbi (PROF - Université Constantine 1 - Frères Mentouri).

Co- Encadrant : BEKHOUCHE Khadidja (Maître de recherche - CRSP - Constantine).

Examineur : CHELLAT Djalila (PROF - Université Constantine 1 - Frères Mentouri).

**Année universitaire
2024 - 2025**

Remerciements

Avant tout, je rends grâce à Dieu Tout-Puissant, dont la bénédiction, la force et la patience m'ont permis d'accomplir ce travail.

*Je remercie chaleureusement mon encadrant, le Professeur **REZGOUN Mohamed Larbi**, pour son accompagnement précieux, sa disponibilité, sa bienveillance et son exigence scientifique, qui ont grandement contribué à la qualité de ce travail.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement DR **BEKHOUCHE Khadidja**, pour son co-encadrement, sa bienveillance et ses remarques pertinentes. Son professionnalisme et sa passion pour la recherche ont été pour moi une véritable source de motivation.*

*Je remercie vivement **Professeure CHAOUI Naouel**, Présidente du jury, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury, ainsi que pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.*

*Mes remerciements vont également à **Professeure CHELLAT Djalila**, examinatrice, pour sa disponibilité et ses observations constructives qui ont enrichi ce mémoire.*

*J'exprime également toute ma gratitude au CRSP, à son Directeur, le Professeur **DJEKOUN Abdelhamid**, ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe pour leur accueil et leur soutien. Je tiens à remercier l'ensemble des techniciens, et plus particulièrement Mmes **BOUCHACHOUA Leyla** et **BOULEKROUT Khaoula** pour leur disponibilité et leur aide, ainsi que les chercheurs, en particulier Mme **MAMERI Fatima**, pour leur précieuse assistance tout au long de mon travail.*

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes parents, Kais et Soumia, mes premiers lecteurs, mes premiers repères, qui ont su m'entourer d'un amour inconditionnel et d'une confiance indéfectible. Leur soutien silencieux, leurs encouragements constants et leur présence lumineuse ont été pour moi une source d'équilibre, d'inspiration et de force à chaque étape de mon parcours. À vous deux, je dois la patience dans les moments de doute, la ténacité dans l'effort et la certitude qu'aucune page ne s'écrit sans amour.

J'adresse aussi cette dédicace à mon frère Islam et à ma sœur Tawba, les rimes vivantes de ma vie, mes alliés de tous les jours. À travers chaque épreuve, chaque éclat de rire et chaque silence partagé, vous avez été bien plus que des compagnons de route : vous êtes le reflet de ma joie, le soutien discret qui ranime l'espoir, et l'humour qui allège les moments de fatigue. Merci pour votre présence authentique et vos encouragements. Je n'écirai jamais assez bien tout ce que vous représentez pour moi, mais sachez que chaque réussite porte un peu de vous.

Je pense avec gratitude à mes grands-parents, pour la sagesse transmise, la patience offerte et les racines profondes qu'ils m'ont données. Leur expérience, leurs conseils et leur bienveillance ont forgé en moi le respect, la persévérance et l'amour des valeurs vraies.

À mes tantes et mes oncles, qui ont été de véritables deuxièmes parents, j'adresse mes remerciements les plus sincères. Leur générosité, leur bienveillance sans condition et leur présence rassurante ont été un pilier important, offrant repères et réconfort dans toutes les étapes de ma vie.

Je n'oublie pas mes cousins et cousines, compagnons de jeux, de rires et de souvenirs partagés, qui ont coloré mon existence d'une énergie vive et joyeuse. Grâce à vous, chaque moment en famille est empreint de chaleur, d'éclats de rire et de souvenirs impérissables.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à mes amis, ces âmes précieuses qui ont marché à mes côtés, parfois dans le silence, parfois dans les éclats de rire, mais toujours avec fidélité. Votre amitié sincère a été une source de bonheur dans les plus beaux moments.

À vous toutes et tous, visibles ou discrets, ce travail vous est lié. Il est aussi un peu le vôtre.

Abréviations

AcM : Anticorps Monoclonaux

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BVDV : *virus de la diarrhée virale bovine*

CHO : *Chinese Hamster Ovary*

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EGTA : Acide éthylèneglycoltétraacétique

EPI : Équipements de Protection Individuelle

FBS : *Fetal Bovine Serum*

FTIR : *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GFE : *Grifola Frondosa Extract*

HS : Sérum de cheval

HTS : *High-Throughput Screening*

HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IMDM : *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

iPSC : *Induced Pluripotent Stem Cells*

MEM : *Minimum Essential Medium*

NCS : Sérum de veau nouveau-né

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

SVA : Sérum de veau adulte

TSA : *Tryptic Soy Agar*

TSB : *Tryptic Soy Broth*

UV-Vis : Ultraviolet-Visible

X : Extrait végétal testé

Table des matières

Introduction.....	
-------------------	--

Revue de la littérature

1. La culture cellulaire	3
1.1. Principe.....	3
1.2. Les types de la culture cellulaire	3
1.2.1. Culture primaire	3
1.2.2. Culture secondaire	5
1.2.3. Les lignées cellulaire continues	6
1.3. Conditions	7
1.3.1. Environnement contrôlé.....	7
1.3.2. Milieux et additifs	7
1.3.3. Passage et changement de milieu.....	8
1.3.4. La stérilité et surveillance	9
1.4. Techniques de culture cellulaire.....	11
1.4.1. En monocouche (2D)	11
1.4.2. En suspension.....	11
1.4.3. En 3D	12
1.5. Application	13
1.5.1. En biotechnologie	13
1.5.2. En pharmacologie	14
1.5.3. En médecine et diagnostic	15
1.5.4. En génétique.....	15
1.5.4.1. Thérapie cellulaire et génique.....	15
1.5.4.2. Induction de la différenciation cellulaire.....	16
1.5.4.3. Transfection et transduction cellulaire	16
2. Les milieux de culture	17
2.1. Définition et rôles.....	17
2.2. Composition générale.....	17
2.3. Les milieux standards.....	18

2.4.	Le RPMI-1640.....	19
2.4.1.	Présentation du milieu.....	19
2.4.2.	Utilisation.....	19
2.4.3.	Composition chimique et rôle des composants.....	20
2.4.3.1.	Acides aminés.....	20
2.4.3.2.	Vitamines.....	21
2.4.3.3.	Sels minéraux	22
2.4.3.4.	Indicateur de pH	23
2.4.3.5.	Glucose dextrose.....	23
2.4.4.	Amélioration du milieu par des extraits végétaux	23
3.	Les additifs	24
3.1.	Définition	24
3.2.	Types des additifs utilisés	25
3.2.1.	Sérum	25
3.2.2.	Glucose dextrose.....	26
3.2.3.	Antibiotique	26
3.2.4.	Facteurs de croissance.....	27
3.2.5.	Tampon	28
3.2.6.	Suppléments métaboliques.....	28
3.3.	Impact sur la croissance cellulaire	29

Partie pratique

Matériels et méthodes

1.	Cadre de l'étude.....	30
2.	Matériel biologique.....	30
3.	Préparation du sérum	30
3.1.	Protocole de prélèvement et de transport	30
3.2.	Séparation du sérum	31
3.3.	Traitement thermique	33
3.4.	Évaluation de qualité du sérum	33
3.5.	Condition de conservation.....	33

4.	Utilisation du sérum en culture cellulaire.....	34
4.1.	La lignée Vero.....	34
4.2.	Essais sur les cultures cellulaires	34
4.3.	Conditions expérimentales	34
5.	Préparation de l'extrait X	35
5.1.	Origine de la plante	35
5.2.	Extraction et purification.....	35
5.3.	Tests chimiques.....	35
6.	Évaluation biologique.....	36
6.1.	Activité antimicrobienne	36
6.2.	Test de cytotoxicité sur cellules	36

Résultats et discussion

1.	Objectif de la section	37
2.	Sérum bovin.....	37
2.1.	Rendement.....	37
2.2.	Caractérisation physico-chimique du sérum bovin préparé	38
2.2.1.	Aspect organoleptique	38
2.2.2.	pH.....	39
2.2.3.	Contrôles de stérilité	40
2.3.	Effet du traitement thermique sur le sérum préparé.....	42
2.4.	Résultats du sérum sur les cellules Vero	42
2.4.1.	Analyse microscopique et comparaison morphologique	43
2.4.1.1.	Photomicrographies après 4 jours de culture post-décongélation	43
2.4.1.2.	Photomicrographies du passage.....	45
2.4.2.	Comparaison entre les deux sérums.....	48
2.4.3.	Discussion des résultats de sérum	49
3.	Préparation et caractérisation de l'extrait végétal X.....	50
3.1.	Rendement d'extraction et caractéristiques physiques de l'extrait	51
3.2.	Analyses chimiques prévues de l'extrait végétal purifié.....	52
3.2.1.	Spectroscopie UV-Visible	52
3.2.2.	Spectroscopie FTIR	53

3.3.	Résultats attendus de l'évaluation biologique.....	53
3.3.1.	Activité antimicrobienne.....	53
3.3.2.	Cytotoxicité sur cellules Vero.....	55
3.4.	Discussion des résultats de l'extrait X	57
4.	Discussion approfondie et perspectives.....	58
4.1.	Avantages et limites du sérum bovin préparé	58
4.2.	Potentiel des extraits végétaux en culture cellulaire	59
4.3.	Les limites de cette étude	59

Conclusion et perspectives.....	61
--	-----------

Références bibliographiques	64
--	-----------

Résumés

Liste des figures

Figure 1. Primo-culture cellulaire à partir d'un tissu biologique.....	4
Figure 2. Fractionnement du sang par centrifugation : séparation des composants sanguins	4
Figure 3. Photographie des cellules HepG2 à 70% de confluence, grossissement $\times 400$	5
Figure 4. Passage de la culture primaire à la culture secondaire : étapes clés de la sous-culture cellulaire	6
Figure 5. Schéma de principe du protocole de mise en culture des cellules tumorales AY27 dans du milieu RPMI-1640	8
Figure 6. Culture monocouche de cellules endothéliales HUVEC en microscopie à contraste de phase (grossissement $40\times$).....	11
Figure 7. Culture cellulaire 2D vs. 3D des cellules Caco-2	12
Figure 8. Méthodes de dissociation et stratégies de culture (2D et 3D) pour l'établissement de lignées cellulaires cancéreuses primaires.....	13
Figure 9. Processus de production de vaccins viraux à partir de cultures cellulaires de mammifères	14
Figure 10. La technique de la transfection : introduction d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes par des méthodes non virales	16
Figure 11. Photographie d'un flacon de milieu RPMI-1640	19
Figure 12. Comparaison microscopique d'un échantillon de liquide pleural ou péritonéal coloré au Giemsa ...	20
Figure 13. Les variations de couleur du rouge de phénol en fonction du pH	23
Figure 14. Sérum de veau fœtal de la marque Gibco™, origine États-Unis.....	25
Figure 15. Ajout de glucose commercial comme additif énergétique en culture cellulaire animale	26
Figure 16. Sang recueilli dans une poche stérile sans anticoagulant après le prélèvement.	31
Figure 17. Transfert du sang dans des tubes stériles après le prélèvement, dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire.	32
Figure 18. Sérum bovin bien séparé après la deuxième centrifugation.	32
Figure 19. Filtration du sérum bovin sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une seringue et d'un filtre stérile...	33
Figure 20. Aspect visuel du sérum bovin préparé en laboratoire.....	38
Figure 21. Mesure du pH du sérum bovin jeune à l'aide d'un pH-mètre.	39
Figure 22. Contrôle de stérilité dans le milieu Trypticase Soya (TSB).	40
Figure 23. Contrôle de stérilité sur gélose MacConkey.....	40
Figure 24. Contrôle de stérilité sur gélose TSA (Trypticase Soy Agar).	41
Figure 25. Contrôle de stérilité sur gélose Sabouraud.	41
Figure 26. Étapes clés de la préparation du sérum.....	43
Figure 27. Observation microscopique des cellules Vero avec 15% SVF (X40).	43
Figure 28. Observation microscopique des cellules Vero avec 15% SVA (X40).	44
Figure 29. Photos microscopiques des cellules Vero après 2 jours de passage avec SVF (X40).	45
Figure 30. Photos microscopiques des cellules Vero après 2 jours de passage avec SVA (X40).	46
Figure 31. Photomicrographies des cellules Vero après 3 jours de passage avec SVF (X40).	46
Figure 32. Photomicrographies des cellules Vero après 3 jours de passage avec SVA (X40).	47
Figure 33. Photomicrographies des cellules Vero après 5 jours de passage avec SVF (X40).	47
Figure 34. Photomicrographies des cellules Vero après 5 jours de passage avec SVA (X40).	48
Figure 35. Évolution comparative attendue de la confluence cellulaire avec SVF et le SVA.....	49

Figure 36. Schéma général du protocole d'obtention et d'évaluation.	51
Figure 37. Schéma de principe d'un spectrophotomètre UV	52
Figure 38. Schéma de fonctionnement d'un spectromètre FTIR	53
Figure 39. Principe de la méthode de diffusion en gélose pour tester l'activité antibactérienne.....	54
Figure 40. Corrélation attendue entre la cytotoxicité sur les cellules et l'activité antibactérienne en fonction de la concentration.....	56

Liste des tableaux

Tableau I. Lignées cellulaires continues les plus utilisées en recherche biomédicale	6
Tableau II. Bonnes pratiques de biosécurité en laboratoire de culture cellulaire	10
Tableau III. Caractéristiques des milieux standards en culture cellulaire animale	18
Tableau IV. Acides aminés essentiels et non essentiels dans le milieu.....	21
Tableau V. Liste des vitamines présentes dans le milieu RPMI-1640 et leurs concentrations	22
Tableau VI. Composition en sels minéraux du milieu RPMI-1640 et leurs concentrations	22
Tableau VII. Antibiotiques couramment utilisés pour prévenir les contaminations en culture cellulaire animale	27
Tableau VIII. Facteurs de croissance recombinants utilisés en culture cellulaire <i>in vitro</i>	28
Tableau IX. Récapitulatif des critères de conformité du sérum bovin préparé.	42
Tableau X. Effet attendu de différentes concentrations de sur la croissance de souches bactériennes.	55
Tableau XI. Effet attendu de différentes concentrations sur la viabilité des cellules Vero.....	55

La culture cellulaire est devenue une technique incontournable dans le domaine des sciences biologiques et médicales. Elle permet de maintenir et de faire proliférer des cellules en dehors de leur organisme d'origine, dans un environnement artificiel contrôlé (Freshney, 2016 ; Weiskirchen *et al.*, 2023). Cette technique s'est imposée comme une méthode inévitable dans divers domaines, allant de la recherche fondamentale à l'ingénierie biomédicale, en passant par la pharmacologie, la génétique et les biotechnologies. L'évolution des protocoles de culture cellulaire au fil des décennies a considérablement amélioré la compréhension des mécanismes cellulaires, permis la production de biomolécules d'intérêt thérapeutique, et ouvert la voie à de nouvelles approches en médecine personnalisée et en thérapie génique (Cardoso *et al.*, 2023). Aujourd'hui, les modèles cellulaires *in vitro* sont devenus des alternatives essentielles à l'expérimentation animale, répondant à la fois à des impératifs éthiques et scientifiques (Mortaud *et al.*, 2023 ; Cardoso *et al.*, 2023).

Lorsque l'on cherche à faire croître des cellules en laboratoire, il ne suffit pas simplement de les isoler. Il faut leur offrir un environnement adapté, capable de reproduire, autant que possible, les conditions dont elles bénéficient dans un organisme vivant. C'est là qu'interviennent les milieux de culture, soigneusement composés pour apporter aux cellules tout ce dont elles ont besoin : nutriments, vitamines, facteurs de croissance, et bien plus encore. Le sérum de veau fœtal a été l'allié privilégié des chercheurs. Riche en protéines et en molécules bioactives, il a permis d'importants progrès en biologie cellulaire (Weiskirchen *et al.*, 2023).

La première partie de ce mémoire est consacrée à une étude bibliographique approfondie des fondements de la culture cellulaire : ses principes, ses conditions de mise en œuvre, les types de milieux utilisés, notamment le RPMI 1640, ainsi que les additifs essentiels à la croissance et à la viabilité des cellules *in vitro*.

La seconde partie s'inscrit dans une approche expérimentale avec deux objectifs complémentaires : d'une part, la préparation d'un sérum animal en conditions de laboratoire ; d'autre part, l'évaluation du potentiel d'un extrait naturel (**extrait X**), obtenu à partir d'une plante médicinale reconnue (**plante X**), largement utilisée en Algérie ainsi que dans de nombreux autres pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud, comme alternative ou complément aux antibiotiques classiques dans les milieux de culture. Cette démarche vise à optimiser les milieux de culture, tout en réduisant le recours aux antibiotiques de synthèse, dont l'utilisation répétée peut entraîner des effets indésirables ou favoriser le développement de résistances microbiennes.

Ce travail s'inscrit dans une double démarche, à la fois théorique et expérimentale. Il vise, d'une part, à approfondir la compréhension des systèmes de culture cellulaire en explorant leurs principes fondamentaux, leurs exigences biologiques, ainsi que les enjeux liés à leur utilisation en recherche. D'autre part, il ambitionne d'apporter une contribution concrète à l'amélioration de ces systèmes, en explorant des approches alternatives, innovantes et respectueuses des principes de durabilité. En particulier, l'attention est portée sur l'intégration de composés naturels aux propriétés biologiques intéressantes. Ce travail cherche ainsi à établir un pont entre la connaissance scientifique approfondie et l'application pratique en laboratoire, en vue de promouvoir des pratiques plus sûres, plus éthiques et potentiellement plus efficaces en culture cellulaire.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. La culture cellulaire

1.1. Principe

C'est une technique indispensable en laboratoire qui permet de cultiver et de maintenir des cellules animales en dehors de leur organisme d'origine, en fournissant des conditions rigoureusement contrôlées pour reproduire un environnement physiologique optimal (Freshney, 2016 ; Weiskirchen *et al.*, 2023). Le principe de cette technique repose sur l'isolement des cellules à partir d'un échantillon biologique et leur mise en culture dans un milieu qui doit contenir des nutriments essentiels et des additifs nutritifs adaptés, permettant leur survie, leur croissance et leur différenciation (Arora, 2013 ; Mukherjee *et al.*, 2023).

En raison de l'extrême sensibilité des cellules, leur culture nécessite une grande précision. Le succès de ce processus dépend de plusieurs facteurs, notamment la composition du milieu de culture, le maintien de conditions aseptiques strictes, le respect des bonnes pratiques de manipulation et l'ajustement précis des concentrations cellulaires (Thermo Fisher Scientific Inc., 2020 ; American Type Culture Collection, n.d.)

1.2. Les types de la culture cellulaire

1.2.1. Culture primaire

Représente la première étape du processus de mise en culture des cellules *in vitro*. Elles sont des cultures cellulaires *ex vivo* issues d'échantillons d'origine animale ou humaine, isolées à partir d'un tissu ou d'un fluide biologique (Richter *et al.*, 2021).

Dans un premier temps, l'échantillon obtenu doit être prélevé en conditions hautement stériles et traité par des antibiotiques pour assurer l'absence de contamination microbienne (Weiskirchen, 2023). Cependant, l'échantillon contient toujours des cellules hétérogènes, ce qui nécessite une étape d'isolement (Freshney, 2016).

Les tissus solides incluent plusieurs techniques, notamment la méthode historique d'Alexis Carrel, lauréat du prix Nobel de médecine en 1912. Cette technique représente la première méthode de culture cellulaire réussie et reproductible. Elle consiste à prélever un fragment de tissu, appelé explant, et à le déposer sur un support semi-solide composé de deux gouttes de plasma de coq et de deux gouttes d'extrait embryonnaire à 50%, pour favoriser l'immigration et l'adhérence des cellules et fournir les facteurs nécessaires à leur survie et à leur prolifération (Carrel, 1912 ; Jiang, 2010).

Après cela, la méthode approuvée est devenue la digestion mécanique par hachage, broyage et filtration, mais elle est moins efficace pour certains tissus compacts comme le foie ou le cerveau, car elle peut endommager les cellules si elle est trop agressive (Müller *et al.*, 2021). Ce qui justifie l'utilisation courante des enzymes protéolytiques comme la collagénase, la dispase et la DNase, et le traitement chimique avec l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) et l'EGTA (acide éthylèneglycoltétraacétique), qui digèrent la trame protéique qui entoure les cellules, permettant une séparation plus douce et plus efficace des cellules (figure 1) (Richter *et al.*, 2021).

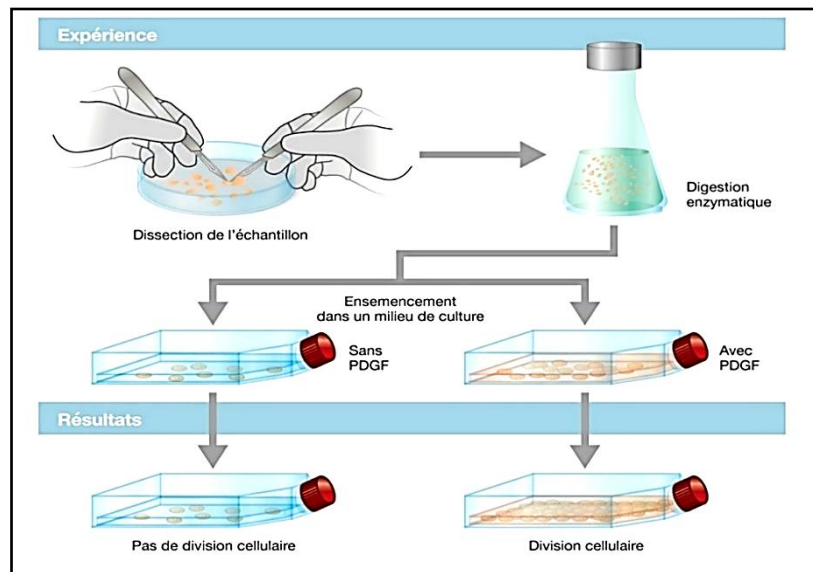


Figure 1. Primo-culture cellulaire à partir d'un tissu biologique (Centre collégial de développement de matériel didactique, n.d.).

En revanche, l'échantillon liquide, comme le sang, nécessite une séparation cellulaire. Cette méthode n'implique pas d'enzymes digestives, mais repose sur des différences de densité pour séparer les populations cellulaires (figure 2) (Gaudin, 2023).

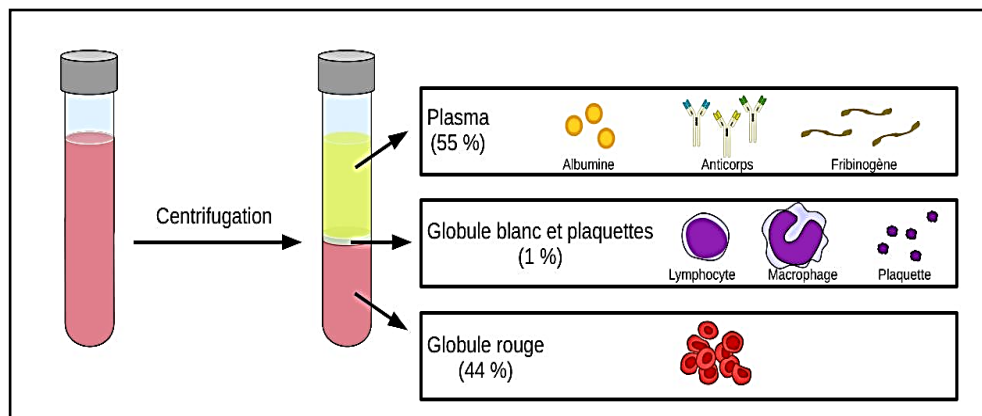


Figure 2. Fractionnement du sang par centrifugation : séparation des composants sanguins (sous le microscope, s.d.).

1.2.2. Culture secondaire

Après la culture primaire, les cellules continuent de se diviser, ce qui entraîne l'atteinte de la confluence, qui est un indicateur visuel important fait la référence à la quantité d'espace dans un récipient de culture occupé par les cellules et reflète la densité cellulaire (Weiskirchen, 2023). Les opérateurs humains estiment la confluence par des observations sous un microscope inversé et décident ensuite d'effectuer la culture secondaire ou la subculture. Car une confluence élevée peut limiter la prolifération des cellules, en raison du phénomène d'inhibition de contact, un mécanisme par lequel les cellules cessent de se diviser lorsqu'elles sont en contact les unes avec les autres (figure 3) (Freshney, 2016).

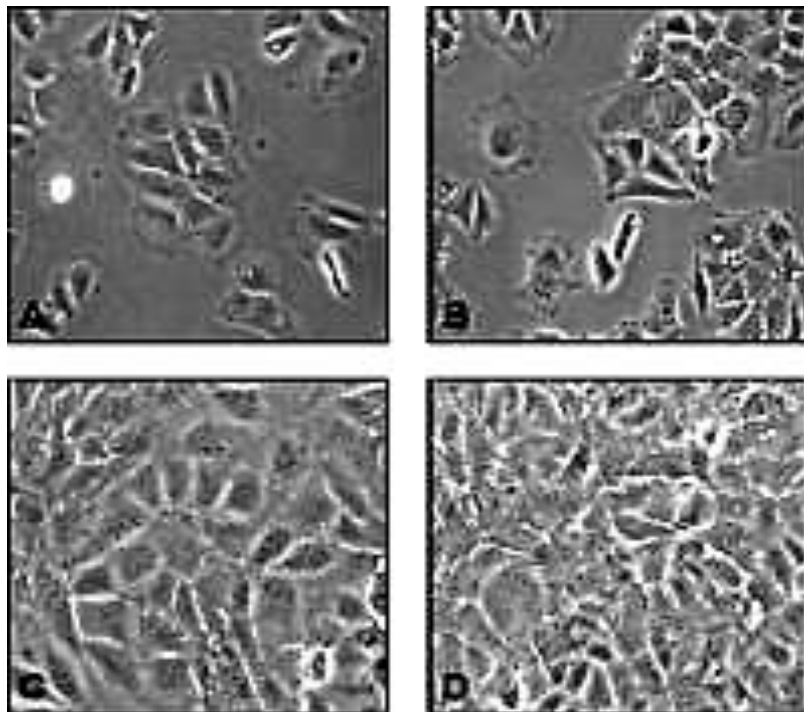


Figure 3. Photographie des cellules HepG2 à 70% de confluence, grossissement $\times 400$ (Fiorini *et al.*, 2004).

Donc, la culture secondaire est l'étape qui suit la culture primaire. Elle désigne le transfert des cellules issues d'une culture primaire dans un nouveau milieu frais afin de prolonger leur croissance et les multiplier. Pour les cellules adhérentes, le détachement enzymatique pour décoller les cellules est une étape clé, alors que pour les cellules en suspension, un simple transfert suffit (figure 4) (Freshney, 2016 ; Weiskirchen, 2023).

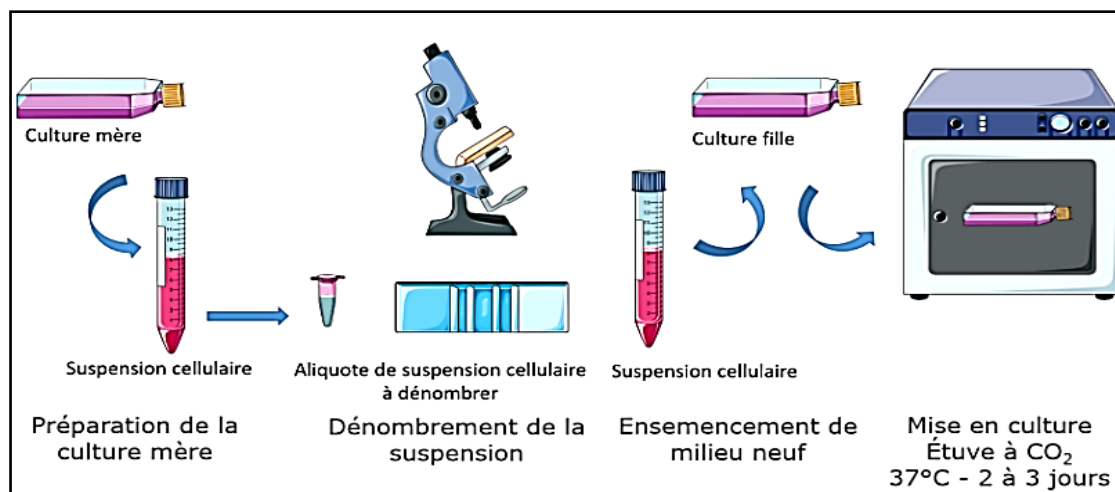


Figure 4. Passage de la culture primaire à la culture secondaire : étapes clés de la sous-culture cellulaire (INRS, 2016).

1.2.3. Les lignées cellulaires continues

Une lignée cellulaire est une population clonale issue d'un même précurseur, génétiquement homogène et stable en culture. Contrairement aux cellules normales, qui présentent une capacité de division limitée selon la limite de Hayflick (Hayflick, 1965), une lignée cellulaire continue est une population ayant subi une transformation génétique, spontanément ou par induction (des oncogènes, des virus, ou des agents mutagènes), lui conférant un potentiel de croissance indéfini. Ces dernières sont largement utilisées en recherche biomédicale (tableau I) (Masters, 2002 ; Geraghty *et al.*, 2014).

Tableau I. Lignées cellulaires continues les plus utilisées en recherche biomédicale (Geraghty *et al.*, 2014).

Lignée cellulaire	Espèce	Origine tissulaire	Applications principales
HeLa	Humain	Col 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 vert	Rein	Virologie, culture de virus, production de vaccins

1.3. Conditions

1.3.1. Environnement contrôlé

En raison de la sensibilité des cellules *in vitro*, qui varie selon leur type, leur manipulation en laboratoire nécessite des protocoles très précis afin de les préserver, ainsi que des ajustements stricts des paramètres physiques et chimiques. Parmi ceux-ci, la température d'incubation qui est généralement maintenue à 37 °C, correspondant à la température corporelle des mammifères, avec des variations possibles selon l'espèce (Talebipour *et al.*, 2024). Une déviation de cette température peut affecter la prolifération, la viabilité et le métabolisme cellulaire (Freshney, 2016). Le pH du milieu doit être entre 7,2-7,4. Il est généralement maintenu par l'équilibre entre le bicarbonate de sodium (NaHCO₃) présent dans le milieu et le CO₂ présent dans l'incubateur à 5-6% (Yao & Asayama, 2017). Des écarts de pH (par exemple >7,7 ou <7,0) peuvent réduire la prolifération ou induire des dérèglements métaboliques (Michl *et al.*, 2019).

La culture cellulaire nécessite une humidité élevée (90-95%) pour éviter l'évaporation du milieu, ce qui pourrait augmenter la concentration en sels et l'osmolalité au-delà de la valeur physiologique (300 mOsm/kg). Une hausse de plus de 10% entraîne un stress osmotique, rétractant les cellules et altérant leur viabilité. L'incubateur doit donc maintenir un environnement stable : température de 37 °C, humidité relative élevée, et 5% de CO₂, assurant un pH optimal. Ces conditions sont essentielles pour garantir un développement cellulaire homogène (Michl *et al.*, 2019 ; Talebipour *et al.*, 2024).

1.3.2. Milieux et additifs

Le milieu de culture est composé de nutriments essentiels, de sels minéraux, de vitamines et d'une source d'énergie pour assurer la survie des cellules. Ce milieu varie en fonction de la nature physiologique des cellules cultivées. Par exemple, le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) est un milieu très riche en nutriments ; il est le plus couramment utilisé, notamment pour les cellules cancéreuses telles que les cellules HT-29, une lignée de cancer colorectal, qui ont une forte activité métabolique (Arodin Selenius *et al.*, 2019). D'autres milieux comme le RPMI-1640 sont adaptés à des types cellulaires spécifiques comme les lymphocytes (Gong *et al.*, 2023). Ces milieux sont généralement complétés par des additifs, dont le plus important est le sérum fœtal bovin (FBS), qui contient des facteurs de croissance, des hormones et des protéines de liaison qui favorisent la prolifération cellulaire (Lee *et al.*, 2022). D'autres additifs comme la glutamine, des facteurs de croissance (Petrović *et al.*, 2023) ou des antibiotiques (pénicilline/streptomycine) pour éviter la toxicité et la contamination bactérienne peuvent être ajoutés (Hassan & Ahmad, 2020 ; Petrović *et al.*, 2023).

1.3.3. Passage et changement de milieu

Le passage cellulaire, ou repiquage, a pour but d'éviter la confluence et de prolonger la viabilité des cellules en maintenant des conditions optimales pour leur croissance. Il consiste à transférer des cellules issues d'une culture quasi-conflue (typiquement 70-90% de la surface couverte) dans un nouveau flacon contenant un milieu frais, afin de maintenir la population en phase logarithmique de croissance (Guo *et al.*, 2015).

Après une vérification de la confluence au microscope, l'étape suivante est l'élimination du milieu usé contenant des déchets métaboliques et des facteurs autocrines. On procède ensuite à un lavage délicat des cellules avec une solution saline tamponnée (PBS) sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , pour éliminer le sérum qui peut inhiber l'action de la trypsine. On ajoute ensuite une solution de trypsine-EDTA préchauffée (généralement entre 0,05-0,25%) pour digérer les protéines d'adhésion. Après quelques minutes d'incubation à 37 °C, les cellules se détachent et deviennent rondes ; la digestion est arrêtée en ajoutant du milieu complet frais contenant du sérum, qui neutralise la trypsine. La suspension cellulaire est alors transférée dans un tube Falcon, puis centrifugée pendant 5 minutes à 1000 rpm. Cette étape permet la formation d'un culot cellulaire au fond du tube. Le surnageant est éliminé, et les cellules sont ensuite resuspendues dans un milieu frais pour être réensemencées dans de nouveaux flacons (figure 5) (Budi *et al.*, 2024).

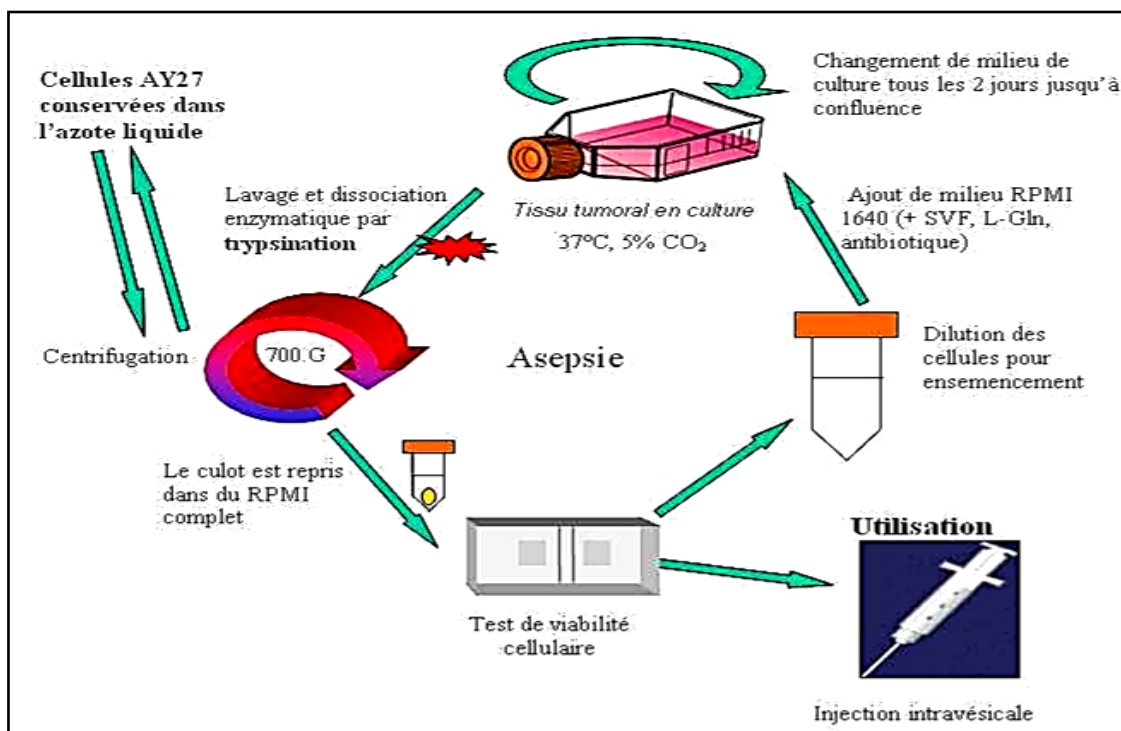


Figure 5. Schéma de principe du protocole de mise en culture des cellules tumorales AY27 dans du milieu RPMI-1640 (Péry, 2007).

Dans le cas des cellules cultivées en suspension, telles que les lignées lymphoïdes ou myéloïdes, le repiquage diffère des cellules adhérentes. Ces cellules ne nécessitent pas de traitement enzymatique, car elles ne s'attachent pas à la surface du flacon. Le passage se fait simplement par dilution de la culture dans un milieu frais, selon la densité cellulaire. En cas d'agrégation cellulaire, un pipetage doux ou une centrifugation légère (150-300×g) peuvent être utilisés pour les dissocier et réensemencer efficacement (Weiskirchen *et al.*, 2023). En cas de congélation, qui permet la conservation à long terme des cellules sans altérer leur viabilité, elle se fait en phase de croissance active, avec un milieu contenant du sérum et du DMSO comme cryoprotecteur. Après répartition dans des cryotubes, les cellules sont d'abord refroidies progressivement à -80 °C, puis stockées à très basse température, souvent dans l'azote liquide, pour préserver leurs propriétés biologiques (Kaiser *et al.*, 2021).

1.3.4. La stérilité et surveillance

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) (Çelik-Uzuner & Uzuner, 2017 ; Roth *et al.*, 2020).

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 (Çelik-Uzuner & Uzuner, 2017 ; Roth *et al.*, 2020).

Les incubateurs à CO₂ nécessitent un nettoyage hebdomadaire rigoureux, incluant les plateaux, les récipients d'eau et les surfaces internes, afin de prévenir la prolifération bactérienne et fongique (Roth *et al.*, 2020). 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 μm , une méthode efficace pour éliminer les contaminants microbiens (Çelik-Uzuner & Uzuner, 2017).

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 (Lyapun, 2021).

Selon les recommandations de l'ACDP (*Advisory Committee on Dangerous Pathogens*) (2021) 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 II. Bonnes pratiques de biosécurité en laboratoire de culture cellulaire (ACDP, 2021).

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.

1.4. Techniques de culture cellulaire

1.4.1. En monocouche (2D)

La culture cellulaire bidimensionnelle (2D) est la méthode la plus couramment utilisée pour cultiver les cellules en une seule couche sur un support auquel elles adhèrent. Elle joue un rôle essentiel dans l'analyse de la prolifération cellulaire, des réponses aux médicaments et des mécanismes moléculaires de base (figure 6) (Cacciamali *et al.*, 2022).

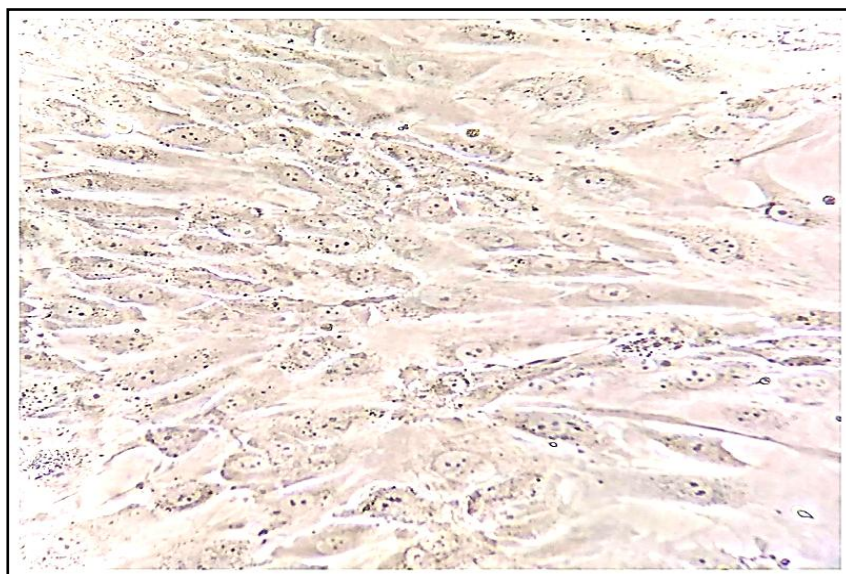


Figure 6. Culture monocouche de cellules endothéliales HUVEC en microscopie à contraste de phase (grossissement 40×) (Medina-Leyte *et al.*, 2020).

Toutefois, elle présente de nombreuses limites, notamment le risque de perte du phénotype cellulaire au fil des passages ainsi qu'elle ne reflète pas fidèlement les conditions *in vivo* et ne permet pas de recréer les interactions cellulaires tridimensionnelles observées dans les tissus vivants (Jensen & Teng, 2020 ; Cacciamali *et al.*, 2022).

1.4.2. En suspension

La culture en suspension est une méthode de culture cellulaire dans laquelle les cellules ne nécessitent pas de support d'adhérence. Ces cellules individuelles peuvent croître et se multiplier librement dans un milieu de culture agité, formant ainsi une suspension.

Cette technique est utilisée largement pour des cellules souches pluripotentes induites (iPSC), les cellules sanguines telles que les lymphocytes, monocytes, etc., et certaines lignes tumorales comme Jurkat et CHO-S, pour plusieurs buts tels que la recherche fondamentale en immunologie et la production industrielle des vaccins, d'anticorps monoclonaux, de protéines recombinantes, etc. (Cuesta-Gomez *et al.*, 2023).

1.4.3. En 3D

La culture cellulaire en 3D, quant à elle, représente une avancée majeure, car elle permet de mieux simuler le microenvironnement naturel des tissus et de mieux s'organiser en structures complexes (sphéroïdes, organoïdes). Plusieurs études montrent que les cultures 3D permettent de mieux reproduire les interactions cellule-cellule et les structures tissulaires observées *in vivo*, car les cellules interagissent entre elles dans toutes les directions, et donc leur comportement est plus proche de celui observé *in vivo* (Park, Park & Suh, 2024 ; Abuwatfa *et al.*, 2024). En particulier, Les modèles utilisant des organoïdes ou des sphéroïdes tumoraux permettent de simuler la complexité des microenvironnements tumoraux et d'anticiper plus fidèlement les réponses aux traitements anticancéreux (figure 7) (El Harane *et al.*, 2023).

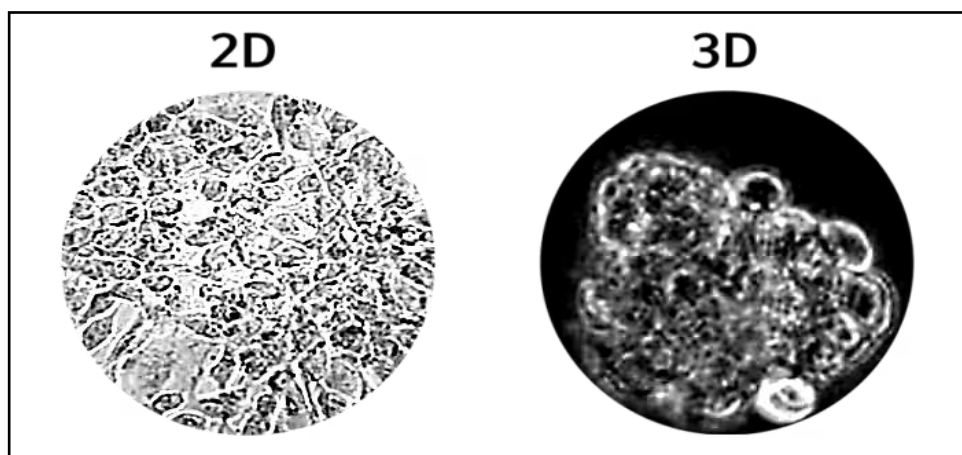


Figure 7. Cultures cellulaires 2D vs. 3D des cellules Caco-2 (Eppendorf, 2022).

Les cultures cellulaires en monocouche sont couramment utilisées en laboratoire grâce à leur simplicité et leur coût faible. Cependant, elles ne reproduisent pas fidèlement l'organisation et le microenvironnement naturels des tissus, limitant les interactions cellulaires et la diffusion des nutriments et signaux. Cela peut biaiser les résultats expérimentaux. En revanche, les cultures cellulaires en 3D offrent une structure plus réaliste, favorisant des interactions complexes entre cellules et avec leur matrice, et reflétant mieux la physiologie *in vivo*. Ces modèles améliorent la pertinence des recherches, notamment en pharmacologie pour prédire l'efficacité et la toxicité des médicaments, en médecine personnalisée via des organoïdes issus des patients, en ingénierie tissulaire pour la création de tissus artificiels, et en recherche contre le cancer pour étudier la complexité tumorale. Ainsi, les cultures 3D représentent une avancée majeure pour la recherche biomédicale (figure 8) (Wang *et al.*, 2025).

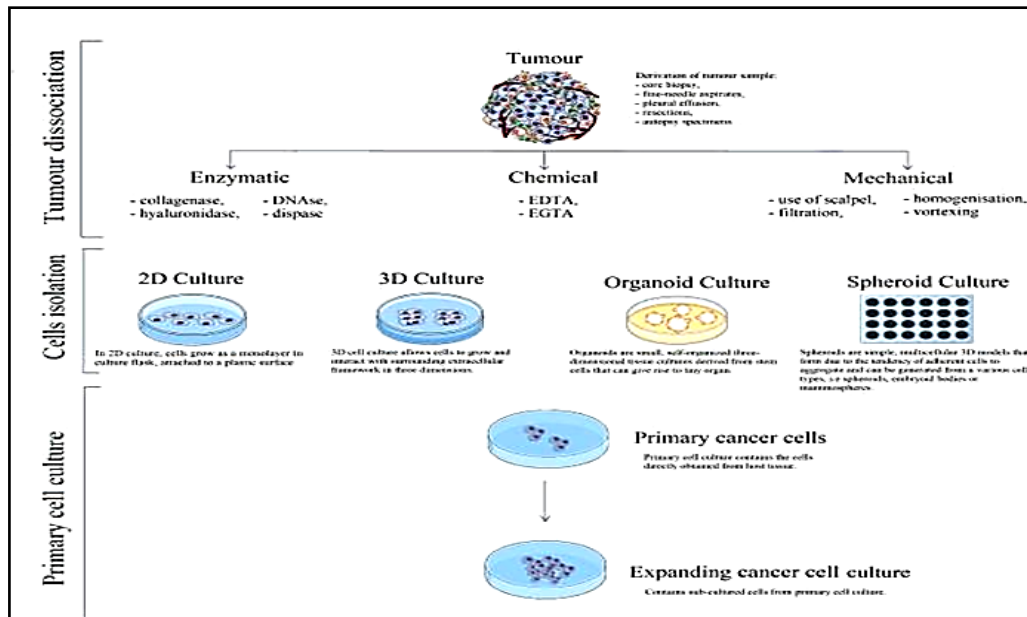


Figure 8. Méthodes de dissociation et stratégies de culture (2D et 3D) pour l'établissement de lignées cellulaires cancéreuses primaires (Richter *et al.*, 2021).

1.5. Application

1.5.1. En biotechnologie

La culture cellulaire des mammifères a joué un rôle important dans l'avancement des sciences de la vie pendant de nombreuses décennies et a récemment été un facteur clé dans l'application de la recherche en biotechnologie et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Au cours de la dernière décennie, les avantages de la culture de cellules de mammifères sont devenus de plus en plus importants pour la production de nouveaux produits, y compris les cytokines, et les anticorps monoclonaux (AcM) thérapeutiques qui sont produits par culture de lignées cellulaires animales en bioréacteurs à grande échelle. Le procédé de référence utilise des cellules CHO en mode *fed-batch* dans des milieux définis, suivi d'une purification chromatographique (Kelley, 2024), ainsi que pour la fourniture de nouvelles stratégies de production de vaccins et L'ingénierie tissulaire.

La fabrication des vaccins est un domaine très vaste en biotechnologie qui comprend plusieurs techniques selon le cas, le virus doit être multiplié sur une lignée hôte, puis inactivé ou affaibli (Fang *et al.*, 2022). Par exemple, la lignée MDCK (rein de chien) en suspension est largement utilisée pour la propagation du virus de la grippe en production vaccinale. La lignée Vero (rein de singe) a été la première approuvée par l'OMS pour la production de vaccins contre la poliomyélite, la grippe ou encore l'encéphalite japonaise (Fang *et al.*, 2022). L'émergence de la pandémie de COVID-19 a accéléré l'utilisation de lignées cellulaires animales comme plateformes pour produire des vaccins viraux (figure 9) (Demirden *et al.*, 2024).

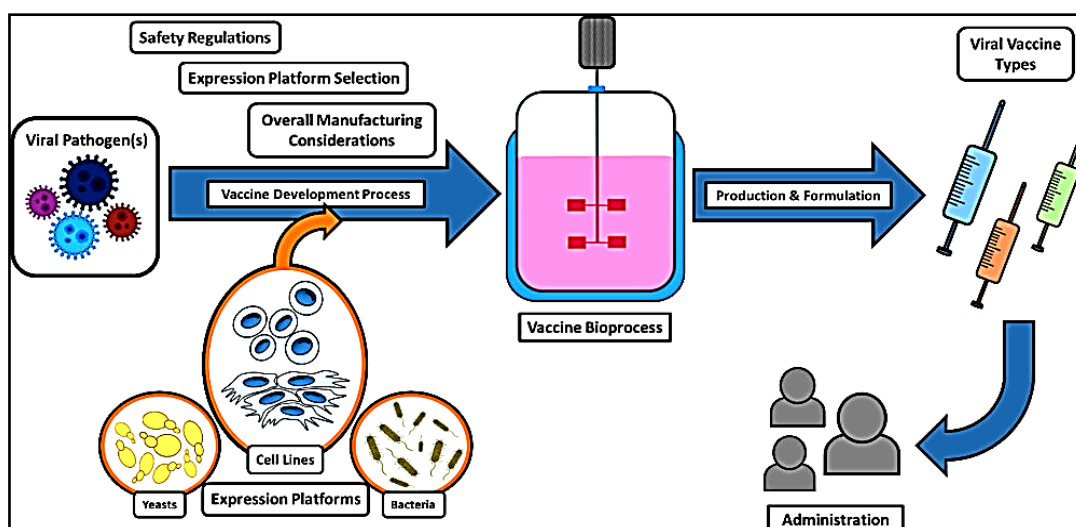


Figure 9. Processus de production de vaccins viraux à partir de cultures cellulaires de mammifères (Demirden *et al.*, 2024).

Aujourd'hui, la culture cellulaire et la biotechnologie jouent un rôle essentiel dans les avancées scientifiques, offrant des outils puissants pour étudier la biologie au niveau cellulaire et moléculaire. L'alliance entre ces disciplines et les technologies de pointe permet de mieux comprendre les mécanismes complexes de la vie, de développer de nouveaux traitements médicaux et d'explorer des domaines encore peu connus. Cette synergie ouvre la voie à des découvertes majeures pour la santé et la science (Smith *et al.*, 2023).

1.5.2. En pharmacologie

La culture cellulaire, en particulier l'animale, est utilisée dans la découverte de médicaments et l'évaluation de la toxicité *in vitro*. Ces modèles offrent des essais rapides et reproductibles pour le criblage haut débit de composés et l'évaluation de la cytotoxicité (Wang *et al.*, 2021 ; Cardoso *et al.*, 2023).

Les meilleurs exemples qui confirment l'efficacité de cette méthode sont les plateformes HTS (*High-Throughput Screening*), des systèmes automatisés permettant le test rapide de grand nombre de composés simultanément à moindres coûts et volumes de réactifs (Cardoso *et al.*, 2023). Contrairement aux tests biochimiques simples, les essais cellulaires *in vitro* englobent les interactions entre voies biochimiques multiples et fournissent des informations détaillées sur les profils de toxicité et les réponses cellulaires (Wang *et al.*, 2021 ; Nair & Weiskirchen, 2024). Cette méthode ne repose pas seulement à réduire les coûts et les volumes de réactifs, mais aussi sur le principe des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement) pour la protection des animaux (Mortaud *et al.*, 2023 ; Cardoso *et al.*, 2023).

1.5.3. En médecine et diagnostic

Une autre utilisation importante est le diagnostic des infections virales. Cette méthode est utile pour confirmer l'infection et a joué un rôle efficace dans l'identification de nouveaux agents pathogènes, en particulier pendant les épidémies de SRAS et de MERS (Zhou *et al.*, 2020). Par exemple, l'isolement de virus tels que les virus de la grippe peuvent être réalisé par inoculation de lignées cellulaires, ce qui permet d'observer un effet cytopathogène distinctif (Goffard, 2011).

Certaines bactéries intracellulaires, comme *Coxiella burnetii* (agent de la fièvre Q), nécessitent également une culture cellulaire pour être isolées. Leur culture se fait sur des lignées cellulaires spécifiques, du fait de leur exigence de croissance intracellulaire (Boden *et al.*, 2015).

En diagnostic prénatal, des cellules fœtales provenant du liquide amniotique ou des villosités chorales sont cultivées afin de réaliser un caryotype, ce qui permet la détection d'anomalies chromosomiques telles que les trisomies (Lu *et al.*, 2023). Malgré les avancées des tests prénataux non invasifs (DPNI), l'analyse cytogénétique sur cellules en culture demeure la méthode de référence dans les cas à haut risque (Li *et al.*, 2022).

En immuno-diagnostic, des lymphocytes du patient peuvent être mis en culture avec des antigènes spécifiques, comme dans le test QuantiFERON-TB Gold, afin de détecter une libération d'IFN- γ , témoin d'une réponse immunitaire dirigée contre *Mycobacterium tuberculosis* (Pai *et al.*, 2008). Ces tests cellulaires reflètent la fonction immunitaire en temps réel et sont utilisés dans le diagnostic de la tuberculose latente.

1.5.4. En génétique

1.5.4.1. Thérapie cellulaire et génique

Le développement de traitements basés sur des cellules modifiées *ex vivo* constitue une avancée majeure en génétique moderne, ouvrant la voie à des thérapies innovantes et personnalisées. La transduction des cellules souches hématopoïétiques (CSH) a révolutionné la thérapie génique, particulièrement dans la prise en charge des maladies hématologiques héréditaires telles que la drépanocytose ou la thalassémie. La technologie CRISPR/Cas9 permet désormais de corriger précisément des mutations génétiques dans les CSH cultivées, augmentant le potentiel des traitements personnalisés en améliorant leur efficacité et leur sécurité. Par ailleurs, la production de vecteurs viraux dans des lignées cellulaires spécialisées est essentielle pour assurer un transfert efficace des gènes thérapeutiques. Cette approche est au cœur du développement de vaccins récents, comme ceux contre la COVID-19, ainsi que de traitements pour des pathologies variées telles que les déficits immunitaires, l'hémophilie ou certains cancers, soulignant son importance en médecine translationnelle (Lundstrom, 2023 ; Giommetti & Papanikolaou, 2024).

1.5.4.2. Induction de la différenciation cellulaire

L'induction cellulaire est un mécanisme complexe présent dans le corps naturel qui fournit des conditions strictes pour forcer les cellules à suivre un chemin de différenciation spécifique. Il peut également être simulé *in vitro* en fournissant les conditions requises par la voie de différenciation souhaitée. En reproduisant *in vitro* les signaux du développement, on peut orienter des cellules souches pluripotentes ou multipotentes vers des lignées spécialisées. Par exemple, l'adjonction de collagène de type IV et de facteurs de croissance permet de différencier des cellules iPS vers des lignées endothéliales. Le succès obtenu dans la réalisation de ces conditions a conduit au succès de la différenciation des cellules pour créer des organoïdes, ce qui a contribué efficacement à la médecine régénérative (Zakrzewski *et al.*, 2019).

1.5.4.3. Transfection et transduction cellulaire

La transfection est une méthode moderne et performante permettant d'insérer différents types d'acides nucléiques étrangers dans des cellules eucaryotes, notamment l'ADN, l'ARN ainsi que les petits ARN non codants. Cette transfection se fait par des moyens chimiques comme la lipofection, physiques comme l'électroporation, afin de modifier le patrimoine génétique de la cellule hôte. Cette technique gagne en popularité grâce à sa large application à l'étude des processus cellulaires et des mécanismes moléculaires des maladies. La compréhension des voies moléculaires des maladies permet la découverte de biomarqueurs spécifiques pouvant servir au diagnostic et au pronostic des maladies, ainsi que son utilisation pour exprimer des protéines recombinantes, réaliser des *knockdowns* ou *knockouts* de gènes, ou encore introduire des systèmes CRISPR/Cas9 pour l'édition génomique (figure 10) (Chong *et al.*, 2021).

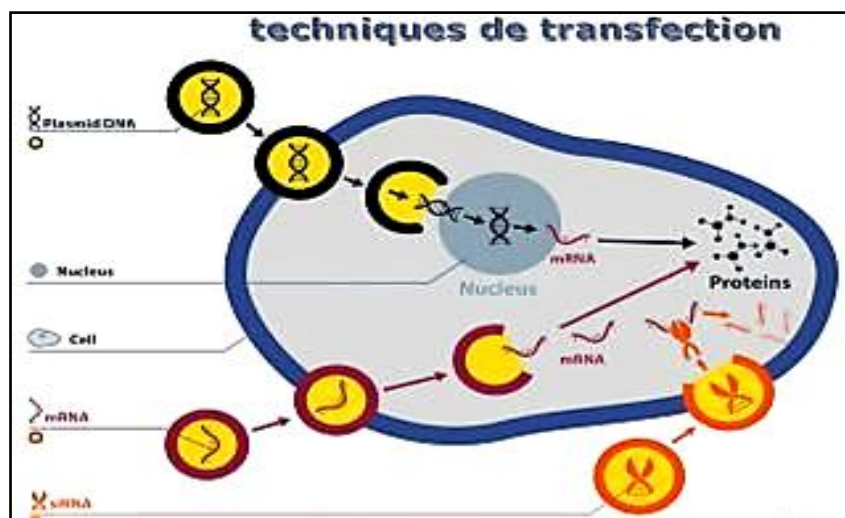


Figure 10. La technique de la transfection : introduction d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes par des méthodes non virales (AquaPortail, n.d.).

En génie génétique, la transduction est considérée comme plus précise que la transfection pour les applications thérapeutiques, car elle permet une expression stable du gène inséré. Cette technique repose sur l'utilisation de vecteurs viraux capables d'introduire le matériel génétique dans les cellules sans recourir à des réactifs chimiques potentiellement toxiques. Ces vecteurs viraux sont produits en culture cellulaire (Lundstrom, 2023 ; Giommetti & Papanikolaou, 2024). En pratique, transfection et transduction sont souvent employées de manière complémentaire : la transfection sert principalement à introduire les plasmides nécessaires dans des cellules productrices pour générer les vecteurs viraux. Une fois ces vecteurs produits, la transduction est utilisée pour livrer efficacement le matériel génétique aux cellules cibles, assurant ainsi une modification génétique stable et fonctionnelle (Giommetti & Papanikolaou, 2024).

2. Les milieux de culture

2.1. Définition et rôles

Les milieux de culture cellulaire sont des formulations liquides ou en poudre artificielles spécialisées qui fournissent les nutriments, les facteurs de croissance et les conditions essentiels à la croissance, au maintien et à la prolifération des cellules *in vitro*. De plus, les milieux peuvent être formulés pour réguler les conditions environnementales de la culture cellulaire, notamment la pression osmotique et le pH. Diverses formulations de milieux de culture cellulaire ont été développées pour prendre en charge un large éventail de types cellulaires et d'applications expérimentales (Yao & Asayama, 2017 ; Segeritz & Vallier, 2017).

2.2. Composition générale

Tout d'abord, les glucides, en particulier le glucose, représentent la source principale d'énergie pour les cellules en culture. Le glucose est indispensable aux processus métaboliques, notamment à la glycolyse et à la synthèse d'ATP (Chaudhry & Varacallo, 2023). Ensuite, afin d'assurer les fonctions métaboliques, il faut des quantités suffisantes d'acides aminés, et surtout des acides aminés essentiels que la cellule ne peut pas synthétiser elle-même, et qui permettent la synthèse des protéines (Salazar *et al.*, 2016).

Les sels minéraux tels que le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le calcium (Ca^{2+}), le magnésium (Mg^{2+}), les chlorures (Cl^-), les bicarbonates (HCO_3^-) et les phosphates (PO_4^{3-}) sont également indispensables pour maintenir l'équilibre osmotique, le potentiel membranaire et les fonctions enzymatiques. Ces ions participent aussi à la régulation du pH, souvent en lien avec un système tampon basé sur le bicarbonate (Yao & Asayama, 2017). La présence de lipides et d'acides gras est pareillement cruciale, car ils interviennent dans la formation des membranes cellulaires, la signalisation intracellulaire, et le stockage d'énergie. Ces composants sont essentiels, surtout pour la culture prolongée ou pour des cellules sensibles (Whitford & Manwaring, 2007).

Les vitamines sont ajoutées en tant que cofacteurs enzymatiques, en particulier les vitamines hydrosolubles du groupe B. Elles sont nécessaires au métabolisme énergétique et à la biosynthèse des acides nucléiques et des acides aminés (Lyon *et al.*, 2020 ; Hanna *et al.*, 2022). De plus, une quantité très faible d'oligo-éléments tels que le zinc, le cuivre, le fer ou le sélénium est nécessaire pour l'activité enzymatique, la régulation redox et la stabilité des structures protéiques (Wróblewska *et al.*, 2024).

2.3. Les milieux standards

L'étape la plus importante et cruciale de la culture cellulaire est le choix du milieu de croissance approprié pour la culture *in vitro*. Le tableau 3 ci-dessous résume les milieux les plus utilisés, leurs compositions principales, le type cellulaire visé, la nécessité en sérum, ainsi que leurs usages, avantages et inconvénients. Les milieux listés (MEM, DMEM, RPMI-1640, DMEM/F12, IMDM) sont tous dépourvus de sérum par défaut et sont en pratique complétés par du FBS (souvent à 5-10%) pour nourrir les cellules (Thermo Fisher Scientific, n.d. ; Sigma-Aldrich, n.d.).

Tableau III. Caractéristiques des milieux standards en culture cellulaire animale (Freshney, 2016).

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 (4× 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

2.4. Le RPMI-1640

2.4.1. Présentation du milieu

Le milieu RPMI-1640 a été développé à la fin des années 1960 au *Roswell Park Memorial Institute* (Buffalo, NY) par George E. Moore et ses collaborateurs d'où son acronyme. Cette formulation est dérivée du milieu RPMI-1630, avec un tampon bicarbonate renforcé et des quantités ajustées d'acides aminés et de vitamines. Le RPMI-1640 fut conçu pour la culture de leucocytes normaux et leucémiques (Moore *et al.*, 1967). Aujourd'hui, il est toujours largement employé en recherche biomédicale. Comme le souligne le *Roswell Park Comprehensive Cancer Center* (2022), « le RPMI-1640, nommé d'après l'institut, est utilisé pour aider les cellules cancéreuses à croître en laboratoire », et sert aussi à la culture de tissus pour greffes chez les patients brûlés ou traumatisés (figure 11).

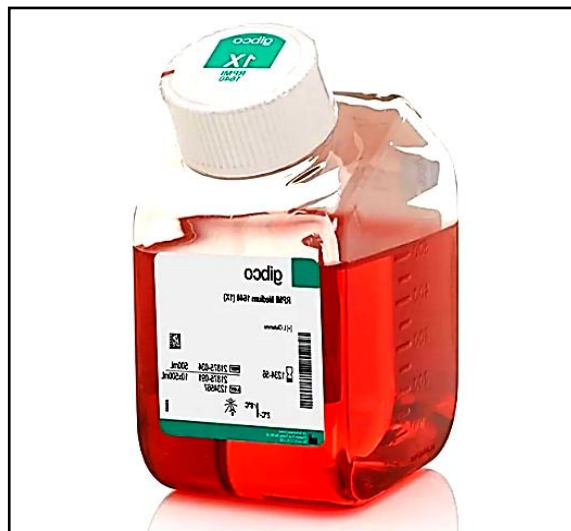


Figure 11. Photographie d'un flacon de milieu RPMI-1640 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific).

2.4.2. Utilisation

Ce milieu ne contient pas de protéines ou de facteurs de croissance, il est complet classiquement par 10% de FBS, 2 mM de L-glutamine supplémentaire. Des antibiotiques comme pénicilline-streptomycine et d'autres suppléments peuvent être ajoutés selon les protocoles (Thermo Fisher Scientific, n.d; Sigma-Aldrich, n.d). Des travaux récents illustrent la flexibilité du RPMI-1640. Gong *et al.* (2023) ont comparé plusieurs milieux pour la culture de PBMC humaines dans le cadre d'essais vaccinaux. Leurs résultats montrent que les PBMC cultivées en RPMI-1640 + 10% FBS affichaient une viabilité cellulaire supérieure et une expression accrue de gènes immunitaires clés (MyD88, ISG56, MCP1) par rapport à celles cultivées en DMEM ou IMDM. Ils concluent que le RPMI-1640 est optimal pour les études vaccinales *in vitro*.

Sur le plan clinique, Rani *et al.* (2022) ont démontré que le RPMI-1640 améliore la conservation morphologique des cellules dans les échantillons de liquide pleural ou péritonéal. Une figure microscopique (figure 13) illustre que les cellules conservées avec du RPMI-1640 gardent une meilleure intégrité nucléaire, tandis que les échantillons témoins présentent une pycnose sévère qui indique une condensation anormale du noyau, signe de mort cellulaire, et des colonies bactériennes ce qui indique une dégradation et une contamination de l'échantillon.

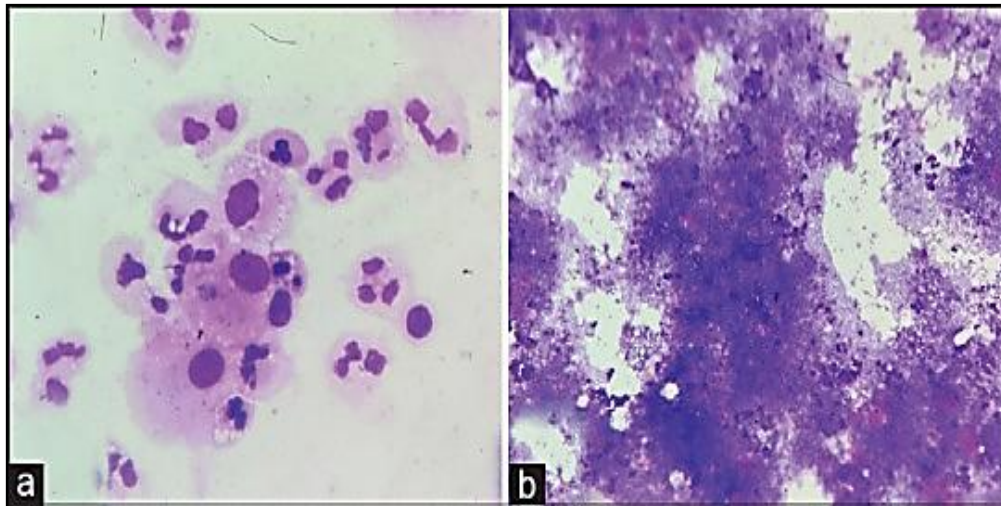


Figure 12. Comparaison microscopique d'un échantillon de liquide pleural ou péritonéal coloré au Giemsa (Rani *et al.*, 2022).

- (a) échantillon conservé avec RPMI-1640 (réfrigéré) : les cellules conservent une morphologie nucléaire identifiable (pycnose modérée) ;
- (b) échantillon témoin sans RPMI-1640 : altérations nucléaires sévères, présence de colonies bactériennes.

2.4.3. Composition chimique et rôle des composants

2.4.3.1. Acides aminés

Les acides aminés sont essentiels en culture cellulaire, constituant les briques de base des protéines et fournissant de l'azote indispensable. Ils servent aussi de précurseurs à la synthèse de métabolites importants comme les nucléotides, enzymes et coenzymes, indispensables aux fonctions cellulaires. En outre, ils interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, la signalisation intracellulaire et le maintien du métabolisme énergétique. Le milieu RPMI-1640 contient un équilibre précis d'acides aminés essentiels et non essentiels, assurant ainsi la croissance et la viabilité des cellules en culture. Cette composition soigneusement ajustée permet aux cellules de proliférer, de se différencier et de conserver leurs fonctions métaboliques optimales (tableau IV) (Freshney, 2016 ; Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Tableau IV. Acides aminés essentiels et non essentiels dans le milieu (Freshney, 2016).

Acide aminé	Essentiel / Non essentiel	Concentration (mg/L)
L-Arginine	Essentiel	200,00
L-Histidine	Essentiel	20,27
L-Isoleucine	Essentiel	50,00
L-Leucine	Essentiel	50,00
L-Lysine	Essentiel	40,00
L-Méthionine	Essentiel	15,00
L-Phénylalanine	Essentiel	15,00
L-Thréonine	Essentiel	20,00
L-Tryptophane	Essentiel	5,00
L-Valine	Essentiel	20,00
L-Alanine	Non essentiel	Non disponible
L-Asparagine	Non essentiel	56,82
Acide aspartique	Non essentiel	20,00
L-Cystine	Non essentiel	65,20
Acide glutamique	Non essentiel	20,00
Glycine	Non essentiel	10,00
L-Proline	Non essentiel	20,00
L-Sérine	Non essentiel	30,00
L-Tyrosine	Non essentiel	28,83
L-Glutamine	Non essentiel	300,00

2.4.3.2. Vitamines

Les vitamines présentes dans le milieu remplissent des fonctions essentielles à la croissance, à la prolifération et au métabolisme cellulaire. Elles agissent principalement comme cofacteurs enzymatiques, antioxydants, ou encore précurseurs de coenzymes nécessaires à la synthèse d'ADN, d'ARN, et de lipides membranaires. Leur présence permet de soutenir les processus biochimiques clés tels que le métabolisme énergétique, les réactions redox, et la signalisation cellulaire, contribuant ainsi à maintenir la viabilité cellulaire en conditions *in vitro* (tableau V) (Freshney, 2016 ; Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Tableau V. Liste des vitamines présentes dans le milieu RPMI-1640 et leurs concentrations (Freshney, 2016).

Vitamine	Concentration (mg/L)
Biotine (B7)	0,20
Choline chlorure	3,00
Inositol	35,00
Acide folique	1,00
Niacine / Nicotinamide	1,00
Acide pantothénique (D-pantothénate de calcium)	0,25
Riboflavine (B2)	0,20
Thiamine (B1, HCl)	1,00
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0,005
Acide para-aminobenzoïque (PABA)	1,00

2.4.3.3. Sels minéraux

Les sels minéraux jouent un rôle crucial dans le maintien des conditions physiologiques optimales nécessaires à la culture cellulaire. Ils assurent un équilibre osmotique proche de 295 mOsm/kg, ce qui est essentiel pour prévenir le stress osmotique et garantir la survie cellulaire. De plus, ils contribuent à stabiliser le pH du milieu, un facteur clé pour le bon déroulement des réactions biochimiques. Enfin, ces sels fournissent des ions essentiels, comme le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium, indispensables au métabolisme, à la signalisation et à la viabilité cellulaire en culture (tableau VI) (Freshney, 2016 ; Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Tableau VI. Composition en sels minéraux du milieu RPMI-1640 et leurs concentrations (Freshney, 2016).

Sel minéral	Concentration (mg/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	6000
Chlorure de potassium (KCl)	400
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	2000
Phosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	800
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	100
Nitrate de calcium tétrahydraté (Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O)	100

2.4.3.4. Indicateur de pH

Le sel de sodium du rouge de phénol est ajouté dans le milieu RPMI-1640 comme indicateur de pH, à une concentration de 5-6 mg/L. Cette molécule colore le milieu en rose à pH alcalin et en jaune à pH acide, ce qui permet de détecter visuellement toute dérive significative du pH (figure 13) (Thermo Fisher Scientific, n.d.).

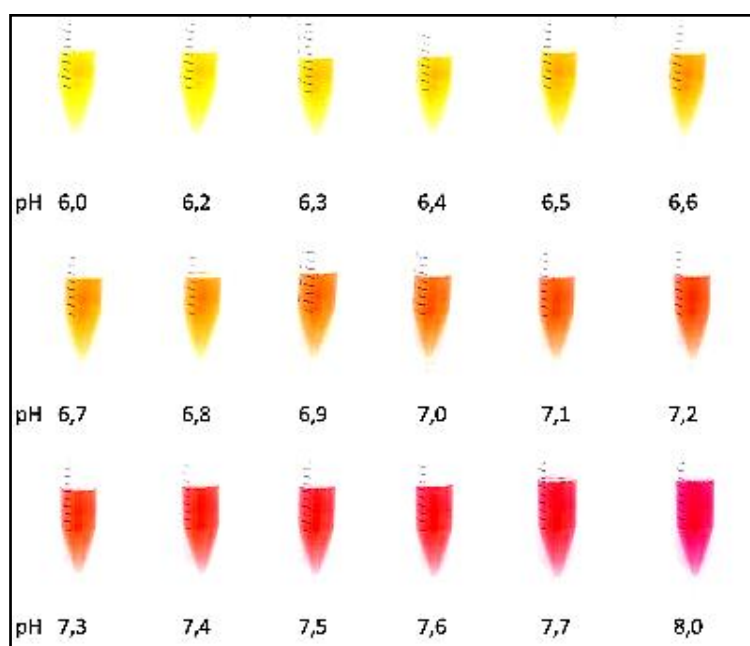


Figure 13. Les variations de couleur du rouge de phénol en fonction du pH (Labster, s. d.).

2.4.3.5. Glucose dextrose

Le milieu RPMI-1640 contient 2,0 g/L de glucose (dextrose). Cette concentration modérée se rapproche de la glycémie normale et fournit aux cellules une source d'énergie de base. Cette disponibilité en glucose favorise la production de macromolécules (lipides, acides nucléiques, etc.) et permet de maintenir les niveaux d'énergie cellulaire (Sigma-Aldrich, n.d.). Le terme « dextrose » est utilisé dans les fiches techniques et formulations standardisées désigne spécifiquement la forme D-glucose pure, biologiquement active.

2.4.4. Amélioration du milieu par des extraits végétaux

L'utilisation d'extraits végétaux dans les milieux de culture cellulaire est de plus en plus étudiée comme stratégie pour améliorer la prolifération, la viabilité cellulaire et la productivité protéique, même lorsqu'on utilise encore du sérum fœtal bovin. Ces extraits végétaux contiennent des nutriments, des antioxydants, des acides aminés ou des facteurs de croissance végétaux qui agissent en synergie avec le sérum (Ng *et al.*, 2020 ; Yu *et al.*, 2024).

Dans une étude récente, Yu *et al.* (2024) ont montré que l'ajout d'un extrait de champignon médicinal *Grifola frondosa* (GFE) à un milieu contenant 10% de FBS favorisait la prolifération et la différenciation des cellules satellites musculaires bovines. Cette combinaison a permis de surpasser les performances observées avec 20% de FBS seul. Cela démontre une synergie positive entre l'extrait et le sérum, avec une augmentation de la production protéique cellulaire. Une autre étude récente a montré que de nombreux extraits végétaux favorisent la croissance cellulaire. Par exemple, des extraits riches en polyphénols issus de légumes verts ont montré une forte augmentation de la viabilité (>80%) et une réduction du stress oxydatif dans des cultures de fibroblastes humains (Oprea *et al.*, 2025).

Comme mentionné précédemment, les progrès réalisés par la biologie ne se limitent pas seulement à l'aspect scientifique, mais accordent également une grande attention à l'aspect éthique. L'un des succès récents les plus importants en domaine de culture cellulaire en laboratoire est donc le remplacement du sérum fœtal bovin par des extraits de plantes suivant le principe de 3R pour protéger les animaux. Une étude par Dong *et al.* (2023) a utilisé un extrait d'algue verte (*Auxenochlorella pyrenoidosa*) pour compléter un milieu contenant 5% de FBS dans la culture de cellules musculaires de poisson (*Carassius auratus*). La prolifération et la croissance des cellules ont été nettement supérieures à un contrôle 5% FBS seul. De même, un extrait de microalgue *Galdieria sulphuraria* a supporté des cultures de CHO à des niveaux de croissance comparables au FBS classique (Eisenberg *et al.*, 2025). Les extraits d'*Haematococcus pluvialis* ont quant à eux amélioré la viabilité des fibroblastes MRC-5 en culture sans sérum, passant d'une viabilité de 26,6% en milieu témoin à 66,4% avec l'extrait (200 µg/mL) (Koh *et al.*, 2024), suggérant un fort effet substitutif au FBS.

3. Les additifs

3.1. Définition

Les additifs en culture cellulaire sont des substances ajoutées aux milieux de culture basiques afin de fournir aux cellules des nutriments pour favoriser leur prolifération par stabiliser les conditions de croissance. Ils peuvent soutenir ou inhiber par un autre moyen la croissance cellulaire. Cela dépend de la nature des cellules, de l'expérience et des résultats à obtenir. Comme mentionné précédemment, le milieu assure que les cellules restent en survie *in vitro*, tandis que ces ajouts visent à optimiser leur survie et leur qualité au maximum. Ils jouent un rôle fondamental dans leur prolifération et leur différenciation (Pamies *et al.*, 2022 ; Lee *et al.*, 2025).

3.2. Types des additifs utilisés

3.2.1. Sérum

Le sérum est l'additif le plus traditionnel en culture animale. Il s'agit du surnageant du sang, riche en albumine et en nombreux facteurs de croissance et d'hormones essentiels à la survie et à la prolifération cellulaires (Duarte Rojas *et al.*, 2024). Le sérum de veau fœtal sanguin récupéré sur un fœtus de bovin est le supplément de culture le plus courant. Il est très riche en facteurs de croissance, vitamines et protéines de transport, et présente peu d'anticorps. De ce fait, il favorise fortement la prolifération et la survie des cellules (figure 14) (Gstraunthaler, 2003 ; Van der Valk *et al.*, 2018).



Figure 14. Sérum de veau fœtal de la marque Gibco™, origine États-Unis (Thermo Fisher Scientific, 2024).

Il existe également d'autres types de sérums

- Sérum de veau nouveau-né (NCS) sanguin provenant de veaux âgés de quelques jours à deux semaines. Il est moins riche en facteurs de croissance que le FBS (Van der Valk *et al.*, 2018), d'où une activité proliférative moindre et plus économique.
- Sérum de veau adulte issu du sang de vaches adultes (>12 mois). Sa composition est plus riche en lipides que le FBS, ce qui peut être utile pour des cultures nécessitant un apport lipidique élevé (Van der Valk *et al.*, 2018).
- Sérum de cheval (HS) sanguin prélevé sur des chevaux généralement adultes. Il se caractérise par une forte homogénéité lot à lot et de faibles taux d'oxydase de polyamine, ce qui maintient stables les polyamines favorisant la croissance cellulaire (Van der Valk *et al.*, 2018).

Le sérum de cheval est employé dans des cultures spécifiques (par exemple myoblastes, hybridomes ou cultures neuronales) (Gstraunthaler, 2003 ; van der Valk *et al.*, 2018).

- Divers autres sérums d'espèces animales existent pour des cas particuliers. Par exemple, le sérum de lapin ou de chèvre est parfois utilisé comme supplément ou agent de blocage immunologique en expérimentations, le sérum de mouton pour des cellules ovines, ou le sérum de porc pour des lignées porcines ou d'avortement (Gstraunthaler, 2003).

3.2.2. Glucose dextrose

En culture standard, un milieu de base contient déjà du glucose, mais son apport supplémentaire par des « *feeds* » ou compléments est souvent nécessaire pour prolonger la croissance et la productivité. Ce supplément maintient le métabolisme énergétique actif, évitant la famine cellulaire qui conduirait à l'apoptose et à la perte de viabilité. Xiao *et al.* (2023) ont observé que, lors d'une carence en glucose, la viabilité des CHO chutait rapidement en phase stationnaire (figure 15).

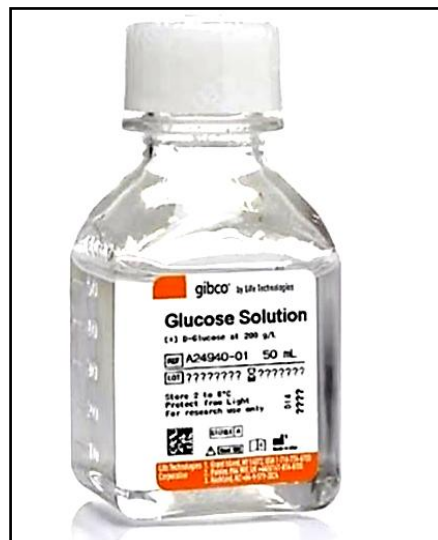


Figure 15. Ajout de glucose commercial comme additif énergétique en culture cellulaire animale (Gibco™, s.d.).

3.2.3. Antibiotique

La contamination en culture cellulaire est un risque majeur et sérieux qui peut compromettre les résultats expérimentaux, causer la perte de lignées cellulaires, et fausser les interprétations scientifiques. L'ajout d'antibiotiques est utilisé comme mesure préventive simple et économique. Par exemple, Hassan et Ahmad (2020) soulignent que les antibiotiques demeurent « un composant clé des systèmes de culture de cellules mammifères, apportant des mesures préventives simples et peu coûteuses » contre les bactéries. D'autres études notent également que l'utilisation d'antibiotiques standard minimise la perte de cultures et de temps de travail due aux contaminations.

Les microbes réagissent différemment, c'est pourquoi plusieurs types d'antibiotiques existent. Chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique, ciblant distinctement les microbes selon leur structure, leur métabolisme ou leurs mécanismes de résistance. Cette diversité permet d'adapter les traitements aux infections variées. (tableau VII) (Freshney, 2016).

Tableau VII. Antibiotiques couramment utilisés pour prévenir les contaminations en culture cellulaire animale (Freshney, 2016).

Antibiotique	Spectre d'activité	Usage principal
Pénicilline	Bactéries Gram positives	Prévention des contaminations bactériennes courantes
Streptomycine	Bactéries Gram négatives	Complément à la pénicilline pour un large spectre
Gentamicine	Large spectre (Gram+, Gram-, mycoplasmes)	Alternative ou complément à Pen/Strep
Kanamycine	Principalement Gram négatives	Utilisée en remplacement ou combinaison
Érythromycine	Gram positives et certains Gram négatifs	Alternative dans certaines lignées cellulaires
Amphotéricine B	Champignons, levures	Prévention des contaminations fongiques

Malgré tous les avantages de l'utilisation des antibiotiques en culture cellulaire, ils ont parfois des effets nocifs sur les cellules. En effet, certains antibiotiques présentent une cytotoxicité ou une activité cytostatique, et peuvent altérer diverses fonctions cellulaires (Hassan & Ahmad, 2020). Par exemple, l'utilisation du mélange pénicilline/streptomycine (Pen/Strep) a été associée à une modification de l'expression de plusieurs centaines de gènes chez les hépatocytes humains (Ryu *et al.*, 2017). De plus, l'exposition des cellules à la gentamicine a induit un stress métabolique significatif, perturbant notamment le métabolisme énergétique cellulaire (Elliott *et al.*, 2019).

3.2.4. Facteurs de croissance

Il existe un cocktail complexe de facteurs de croissance indispensables à la prolifération cellulaire. Cependant, le FBS est un additif mal défini et variable selon les lots (Van der Valk *et al.*, 2018). Par conséquent, à certaines fins expérimentales, il est préférable d'utiliser des facteurs de croissance recombinants purifiés pour obtenir des résultats fiables et interprétables. De plus, l'emploi de facteurs recombinants limite la présence de substances inconnues ou indésirables qui pourraient interférer avec l'interprétation des données, en particulier lors de l'évaluation de phénomènes tels que la prolifération, la différenciation ou l'activité cytostatique des cellules (tableau VIII) (Mirasol, 2021).

Tableau VIII. Facteurs de croissance recombinants utilisés en culture cellulaire *in vitro* (Freshney, 2016).

Facteur de croissance	Fonction principale	Types cellulaires ciblés	Références
EGF : Epidermal Growth Factor	Stimulation de la prolifération via EGFR (MAPK/ERK)	Kératinocytes, cellules épithéliales	Stoll <i>et al.</i> , 2016
FGF-2 : Basic Fibroblast Growth Factor	Prolifération, survie des cellules souches, angiogenèse	Cellules souches neurales, fibroblastes, cellules endothéliales	Palmer <i>et al.</i> , 1997
IGF-1/2 : Insulin-like Growth Factors)	Survie, prolifération, synergie avec EGF/FGF	Cellules souches neurales, cellules satellites musculaires	Arsenijevic <i>et al.</i> , 2001 Machida & Booth, 2004
TGF-β1: Transforming Growth Factor Beta 1	Différenciation, production de matrice extracellulaire	Fibroblastes, myofibroblastes	Weiss & Attisano, 2013
PDGF-BB : Platelet-Derived Growth Factor	Mitogène puissant, prolifération cellulaire	Fibroblastes, cellules mésenchymateuses	Chase <i>et al.</i> , 2010
VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor	Angiogenèse, prolifération endothéliale	Cellules endothéliales (HUVEC)	Sedlář <i>et al.</i> , 2021

3.2.5. Tampon

La plupart des milieux de culture contiennent déjà des tampons, pour maintenir le pH proche de 7,2-7,4, mais on y ajoute souvent des tampons non volatils pour renforcer cette régulation. Par exemple, l'HEPES, un tampon zwitterionique de Good ($pK_a \approx 7,5$), est souvent ajouté à une concentration de 10 à 25 mM. Il stabilise efficacement le pH autour de 7,2-7,6 à 37 °C (ITW Reagents, n.d.), pour certains le TRIS, dont le pK_a est proche de 8,1, est également utilisé pour tamponner dans une plage de pH plus alcaline (7-9), notamment pour certaines lignées cellulaires sensibles ou dans des milieux spécifiques (Sigma-Aldrich, n.d.).

3.2.6. Suppléments métaboliques

Selon les besoins de l'expérience et des cellules, d'autres additifs peuvent être ajoutés, tel que les acides aminés comme L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAX). C'est une forme stabilisée de la glutamine, qui est un acide aminé essentiel pour la croissance des cellules *in vitro*. Il permet d'éviter la dégradation rapide en ammoniac, qui peut être toxique pour les cellules (Imamoto *et al.*, 2012).

L'ajout d'asparagine, de proline, de sérine et de polyamines comme la putrescine favorise la prolifération des cellules CHO sans accumulation de métabolites indésirables, tout en soutenant la stabilité de l'ADN et la traduction (Capella Roca *et al.*, 2019).

L'utilisation des mélanges définis contenant des acides gras essentiels et du cholestérol et parfois nécessaire pour soutenir la synthèse des membranes et la croissance cellulaire (Thermo Fisher Scientific, n.d.). La vitamine E (α -tocophérol) est également ajoutée comme antioxydant pour protéger les lipides membranaires (Sigma-Aldrich, n.d.). D'autres vitamines hydrosolubles, telles que la vitamine C, la biotine et la vitamine B12, jouent un rôle clé dans le métabolisme énergétique et la biosynthèse (Zhitkovich, 2021). Les oligoéléments comme le sélénium, le zinc, le cuivre et le fer sont nécessaires pour les enzymes antioxydantes et le transport d'électrons (Zhang *et al.*, 2006). D'autres composés comme les nucléosides soutiennent la réplication, et l'insuline, le pyruvate de sodium ou le 2-mercaptoéthanol favorisent respectivement la régulation métabolique, la production d'énergie et la protection contre le stress oxydatif. Ces suppléments permettent d'optimiser la viabilité, la croissance et la productivité des cellules en culture.

3.3. Impact sur la croissance cellulaire

Les suppléments métaboliques ajoutés au milieu de culture cellulaire jouent un rôle essentiel pour optimiser la viabilité, la prolifération et le métabolisme des cellules, surtout dans des conditions stressantes telles que le manque de nutriments, l'hypoxie ou les variations de pH. Des composés comme le pyruvate, l'acide ascorbique (vitamine C) et la glutamine modifiée agissent en soutenant plusieurs processus cellulaires clés. Le pyruvate est un substrat central du cycle de Krebs, favorisant la production d'ATP, source principale d'énergie cellulaire. L'acide ascorbique, en tant qu'antioxydant, réduit le stress oxydatif en neutralisant les radicaux libres, ce qui protège les cellules des dommages. La glutamine modifiée, quant à elle, améliore la stabilité du milieu en limitant la production d'ammoniac toxique, un déchet métabolique, contribuant ainsi à stabiliser le pH et l'environnement cellulaire (Imamoto *et al.*, 2012). Ces additifs favorisent aussi la synthèse de la matrice extracellulaire, notamment le collagène, ce qui est crucial pour les cellules en différenciation et la formation de tissus fonctionnels (Yang *et al.*, 2023). Globalement, ces suppléments métaboliques améliorent les niveaux d'ATP intracellulaire, augmentent les intermédiaires du cycle de Krebs et optimisent la fonction cellulaire (Fujisawa *et al.*, 2018 ; Yako *et al.*, 2021). **Cependant, il demeure nécessaire de rechercher de nouveaux suppléments métaboliques afin d'améliorer davantage les conditions de culture et la performance cellulaire.**

Partie pratique

Matériels et méthodes

1. Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une étude expérimentale menée au laboratoire de culture cellulaire et de biologie moléculaire. Il a été conçu pour évaluer la préparation d'un sérum bovin et d'un extrait végétal X et comparer leur effet sur la lignée cellulaire Vero. Les expériences ont inclus la préparation, la caractérisation, l'évaluation biologique et chimique des extraits dans un environnement stérile et contrôlé.

2. Matériel biologique

- Sang de bovin adulte,
- Cellules de la lignée Vero,
- Plante médicinale X.

3. Préparation du sérum

3.1. Protocole de prélèvement et de transport

Pour la préparation du sérum, un prélèvement sanguin a été effectué sur un veau d'environ quatre mois. L'animal a été sélectionné avec soin, conformément à des critères sanitaires rigoureux visant à garantir la qualité du sérum. Il devait être en bonne santé, sans vaccination ni traitement récent, et indemne de maladies infectieuses telles que la BVDV (virus de la diarrhée virale bovine), la leucose bovine et la brucellose. Un contrôle vétérinaire préalable a permis de vérifier l'état de santé de l'animal avant le prélèvement.

Afin de garantir une qualité optimale du sang, le veau avait été élevé dans des conditions adaptées, incluant une alimentation équilibrée et contrôlée. Ces conditions spécifiques visaient à éviter toute carence ou déséquilibre nutritionnel susceptible d'altérer la qualité du sérum obtenu. Le respect de ces conditions a été particulièrement important durant les 24 heures précédentes le prélèvement, afin d'assurer la stabilité de l'état physiologique de l'animal et la qualité du sérum à produire.

Toutes les précautions nécessaires ont été prises afin de réaliser un prélèvement propre et sécurisé. Le matériel utilisé comprenait une seringue stérile, une poche de collecte sans anticoagulant, des compresses, un désinfectant et des équipements de protection appropriés (gants, blouse et lunettes).

Dans des conditions strictes d'hygiène, un vétérinaire a procédé au prélèvement d'un volume total de 100 ml de sang. Après le prélèvement, l'animal a été observé attentivement par le vétérinaire pendant une période de 15 à 30 minutes afin de s'assurer de son état général avant d'être réintégré dans son enclos. Le sang prélevé a ensuite été transporté dans des conditions contrôlées, à une température ambiante, à l'aide d'une glacière et dans un délai de 40 minutes, afin de garantir des conditions optimales pour la préparation du sérum (figure 16).



Figure 16. Sang recueilli dans une poche stérile sans anticoagulant après le prélèvement.

3.2. Séparation du sérum

Après que le sang ait été transporté, les 100 ml de sang prélevés sont transférés dans des tubes stériles de 50 ml. Le sang est ensuite laissé à température ambiante ou pendant 2 à 3 heures afin de permettre la coagulation initiale. Une première centrifugation est réalisée à 3000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Ensuite, une coagulation lente est effectuée pendant environ 20 heures avant de refaire une centrifugation. Le sérum obtenu est récupéré soigneusement sans perturber le caillot. La préfiltration (0,45 µm) puis la filtration stérile (0,22 µm) sont réalisées dans un laboratoire de culture cellulaire, dans des conditions stériles et sous hotte à flux laminaire. Ce procédé permet d'obtenir un sérum propre et utilisable en culture cellulaire (figure 17, 18 et 19).



Figure 17. Transfert du sang dans des tubes stériles après le prélèvement, dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire.



Figure 18. Sérum bovin bien séparé après la deuxième centrifugation.

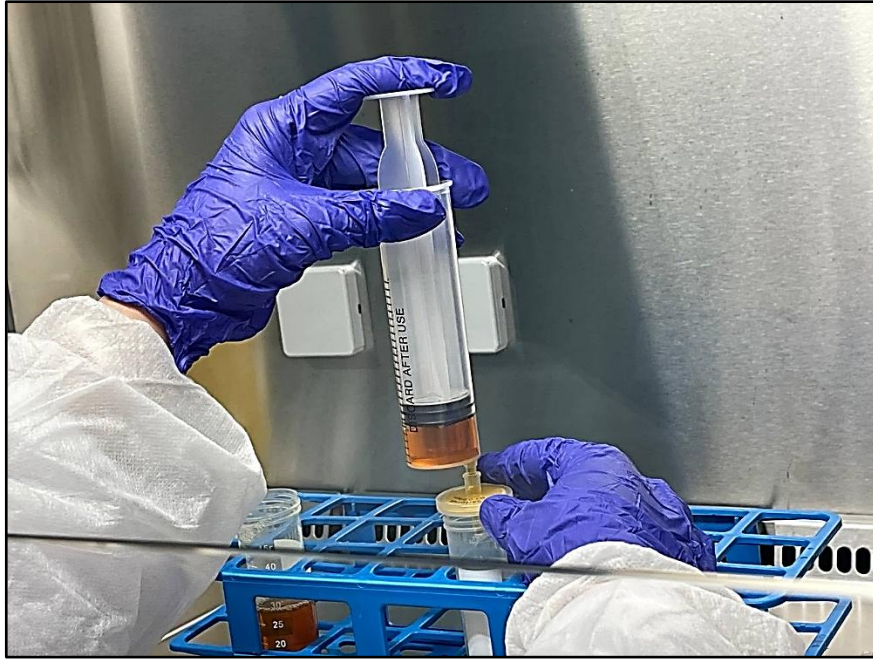


Figure 19. Filtration du sérum bovin sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une seringue et d'un filtre stérile.

3.3. Traitement thermique

Le sérum filtré est soumis à une étape d'inactivation du complément par incubation à 56 °C pendant 30 minutes dans un incubateur contrôlé. Durant cette incubation, il est régulièrement mélangé pour éviter la formation de points chauds. Après cette étape, une filtration stérile finale est effectuée à travers un filtre de 0,22 μm pour garantir la qualité du sérum et son utilisation en culture cellulaire.

3.4. Évaluation de qualité du sérum

L'évaluation de la qualité du sérum a été réalisée en trois étapes principales. L'aspect visuel du sérum a été examiné afin de vérifier sa couleur, sa limpidité et l'absence de précipité ou de particules. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre pour s'assurer de sa compatibilité avec les applications en culture cellulaire. Enfin, un contrôle de stérilité a été effectué pour confirmer l'absence de contamination microbienne et garantir l'utilisation sécurisée du sérum en culture cellulaire.

3.5. Condition de conservation

Le sérum bovin a été aliquoté dans des flacons stériles et hermétiquement fermés. Les échantillons ont été étiquetés soigneusement afin de permettre une identification précise. Le sérum a ensuite été conservé à une température de -20 °C pour préserver sa qualité et ses propriétés biologiques.

4. Utilisation du sérum en culture cellulaire

4.1. La lignée Vero

C'est une lignée cellulaire immortalisée dérivée de cellules rénales de singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*). Elle est largement utilisée en virologie et en culture cellulaire en raison de sa grande sensibilité aux agents pathogènes et de sa facilité d'entretien *in vitro*, ce qui en fait un outil précieux pour les études expérimentales impliquant le sérum bovin.

4.2. Essais sur les cultures cellulaires

Les essais sur les cultures cellulaires ont été réalisés dans le cadre de la comparaison du sérum bovin préparé avec un sérum fœtal bovin commercialisé.

Lors de la décongélation, les cellules Vero stockées dans des cryotubes ont été décongelées dans un incubateur contrôlé à 37 °C jusqu'à complète décongélation. Elles ont ensuite été transférées dans des flacons de culture cellulaire contenant un milieu frais enrichi à 15% de sérum, soit avec le sérum bovin préparé, soit avec le SVF commercialisé, afin de comparer leurs performances respectives.

Le passage cellulaire a été réalisé lorsque la confluence des cellules atteignait environ 80 à 90%. Après aspiration du milieu, les cellules ont été rincées avec une solution tamponnée de PBS stérile. Une solution de trypsine a été ajoutée pour détacher les cellules, suivie d'une incubation de quelques minutes à 37 °C. Les cellules détachées ont ensuite été remises en suspension dans un nouveau milieu de culture contenant 10% de sérum, toujours en comparant le sérum bovin préparé et le SVF commercialisé.

4.3. Conditions expérimentales

Les expériences ont été réalisées dans un laboratoire de culture cellulaire, dans des conditions de sécurité et de stérilité strictes, sous hotte à flux laminaire. Les cellules Vero ont été incubées à une température de 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture cellulaire utilisé était du DMEM, supplémenté selon les besoins des essais comparatifs, en sérum bovin préparé ou en sérum fœtal bovin commercialisé.

Un antibiotique (pénicilline-streptomycine) a été ajouté au milieu pour prévenir toute contamination bactérienne. Toutes les manipulations ont été effectuées en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et les recommandations de biosécurité.

5. Préparation de l'extrait X

5.1. Origine de la plante

La plante X est largement reconnue pour ses propriétés biologiques et médicinales. Elle est traditionnellement cultivée dans plusieurs régions du monde, notamment en Inde, en Asie, en Afrique, en Amérique du Sud, et également présente en Algérie, ce qui a facilité son approvisionnement pour cette étude.

5.2. Extraction et purification

La plante X a été d'abord séchée et broyée finement pour être transformée en poudre avant d'être soumise à l'extraction. L'extraction de l'extrait X a été réalisée par ultrasons. Cent grammes de poudre de X ont été mélangés avec de l'éthanol à 95% dans un bécher, puis soumis à une extraction dans un bain à ultrasons à une température contrôlée entre 40 et 50 °C pendant environ 45 minutes.

Après extraction, le mélange a été filtré sous vide à l'aide d'un entonnoir Büchner et de filtres papier (Whatman Grade 1 et Grade 42) pour éliminer la matière végétale. Une réextraction du résidu a été effectuée, suivie d'une nouvelle filtration et de la combinaison des extraits obtenus.

Les extraits combinés ont été concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à évaporation presque complète du solvant. Le résidu obtenu a été purifié par recristallisation dans de l'éthanol absolu, puis filtré, lavé et séché sous des conditions contrôlées pour obtenir l'extrait final destiné aux essais expérimentaux.

5.3. Tests chimiques

Après la purification de l'extrait X, des tests chimiques complémentaires ont été prévus pour confirmer sa composition et sa qualité. Ces analyses incluront notamment une spectrophotométrie UV-visible et une spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), afin d'identifier les principaux constituants et de vérifier la présence des groupes fonctionnels caractéristiques. Ces analyses seront réalisées conformément aux protocoles standards pour garantir la fiabilité des résultats.

6. Évaluation biologique

6.1. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait X sera évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose avec des disques. L'extrait X sera dissous dans du DMSO, utilisé comme solvant pour sa capacité à solubiliser les composés actifs. Des disques de papier stériles seront imprégnés avec différentes concentrations de l'extrait et déposés sur des milieux *Mueller-Hinton* préalablement ensemencés avec des suspensions bactériennes standardisées.

Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, l'activité antimicrobienne sera déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition formées autour des disques. Les souches bactériennes ciblées pour cette étude incluent *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Bacillus subtilis* (Gram positif), *Escherichia coli* (Gram négatif) et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif). Ces micro-organismes ont été sélectionnés pour leur importance clinique et expérimentale, afin d'évaluer le potentiel antimicrobien de l'extrait X contre un large spectre bactérien.

6.2. Test de cytotoxicité sur cellules

Le test de cytotoxicité de l'extrait X sera réalisé sur la lignée cellulaire Vero afin d'évaluer sa tolérance et sa sécurité potentielle pour une utilisation ultérieure. Les cellules Vero seront cultivées dans un milieu approprié (DMEM) supplémenté et incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. L'extrait X sera testé à différentes concentrations déterminées en fonction des recommandations expérimentales. Les tests seront effectués en triplicat pour garantir la fiabilité des résultats et permettront d'évaluer la viabilité cellulaire et les éventuels effets cytotoxiques de l'extrait X.

Résultats et discussion

1. Objectif de la section

Cette partie du travail ouvre sur les résultats obtenus au cours de l'expérimentation, avec l'intention sincère de comprendre si des solutions simples, locales et naturelles peuvent réellement faire la différence en culture cellulaire. L'attention s'est portée sur deux pistes : un sérum animal préparé en laboratoire et un extrait végétal connu pour ses vertus biologiques.

L'objectif principal était de préparer un sérum bovin de qualité en laboratoire et d'extraire un composé actif à partir d'une plante médicinale, afin d'évaluer leurs effets sur la croissance cellulaire de la lignée Vero. Plusieurs expériences ont été réalisées pour vérifier la qualité physique, chimique et biologique du sérum, ainsi que pour analyser la composition et les propriétés de l'extrait végétal.

Les résultats sont organisés selon les différentes étapes de l'étude : d'abord la préparation et la caractérisation qualitative et quantitative du sérum, puis son impact sur les cultures cellulaires, ensuite l'évaluation physico-chimique du produit végétal extrait et purifié, et enfin les tests biologiques visant à évaluer son activité antimicrobienne et sa cytotoxicité. Chaque section est suivie d'une discussion qui permet d'interpréter les données, d'en souligner l'importance et de les mettre en perspective par rapport aux connaissances existantes. Cette démarche aide à mieux comprendre les points forts et les limites du travail, ainsi qu'à envisager des pistes pour des recherches futures.

2. Sérum bovin

2.1. Rendement

En termes de rendement, 45 ml de sérum pur ont été récupérés à partir de 100 ml de sang de bovin jeune, ce qui correspond à un taux de récupération de 45%, un rendement typiquement rapporté dans la littérature pour ce type de procédé. En effet, le rendement en sérum obtenu à partir de sang total, en particulier chez les bovins jeunes, varie généralement entre 35 et 55% du volume sanguin initial, comme le confirment plusieurs études techniques (Harboe, 1956 ; Chiroque *et al.*, 2023). Ce taux de récupération est cohérent avec les valeurs observées pour les sérums produits après coagulation du sang sans anticoagulant, une méthode couramment utilisée en biotechnologie et en culture cellulaire. Ce processus est prisé pour sa simplicité et son efficacité, offrant un sérum de qualité adapté à diverses applications, notamment dans les recherches biologiques et médicales.

2.2. Caractérisation physico-chimique du sérum bovin préparé

Tout d'abord, la qualité du sérum bovin préparé a été évaluée à travers son aspect physique et ses caractéristiques chimiques, des critères essentiels pour garantir son adéquation à la culture cellulaire, comme le montre le tableau IX.

2.2.1. Aspect organoleptique

Visuellement, le sérum présente une coloration ambrée et uniforme reflétant une composition équilibrée en protéines et autres composants essentiels, sans signes d'hémolyse excessive (Capricorn Scientific, s. d.). Il se distingue aussi par sa clarté, sans aucune trace visible de précipités ou de particules en suspension (figure 20).



Figure 20. Aspect visuel du sérum bovin préparé en laboratoire.

La photo présentée illustre un sérum au liquide ambré clair et limpide, correspondant aux standards de qualité décrits dans la littérature pour un sérum bovin jeune. Ces observations visuelles confirment une bonne préparation et garantissent une compatibilité optimale avec les cultures cellulaires (Chelladurai *et al.*, 2021).

2.2.2. pH

Sur le plan chimique, le pH du sérum bovin préparé a été précisément mesuré à l'aide d'un pH-mètre électronique calibré. La valeur enregistrée était de 8,36 à une température ambiante de 20,2 °C (figure 21), correspondant à un pH légèrement alcalin, mais toujours dans la plage typique acceptable des sérums destinés à la culture cellulaire. En effet, selon les normes techniques établies par les fournisseurs reconnus tels que Sigma-Aldrich et Proliant Health & Biologicals, les sérums bovins jeunes présentent généralement un pH allant de 6,5 à 8,5 à température ambiante, avant équilibre avec le CO₂ en incubateur. La valeur observée est donc tout à fait normale, surtout compte tenu de la perte transitoire de CO₂ qui peut se produire lors de la mesure à l'air libre, provoquant une alcalinisation naturelle et temporaire du sérum (Bee *et al.*, 2013). Par conséquent, ce pH mesuré, bien qu'un peu élevé, ne présente aucun risque pour les cultures cellulaires puisqu'il devrait naturellement revenir à une plage physiologique optimale une fois intégrée au milieu complet et placé en incubation avec 5% de CO₂ à 37°C.



Figure 21. Mesure du pH du sérum bovin jeune à l'aide d'un pH-mètre.

2.2.3. Contrôles de stérilité

Le sérum bovin préparé a été soumis à un contrôle rigoureux de stérilité réalisé en duplicat, afin de garantir la fiabilité des résultats. Après incubation dans des milieux appropriés, aucun trouble, dépôt ou signe de croissance microbienne n'a été observé dans les deux essais. Ces résultats confirment que le sérum est stérile et peut être utilisé en culture cellulaire en toute sécurité.

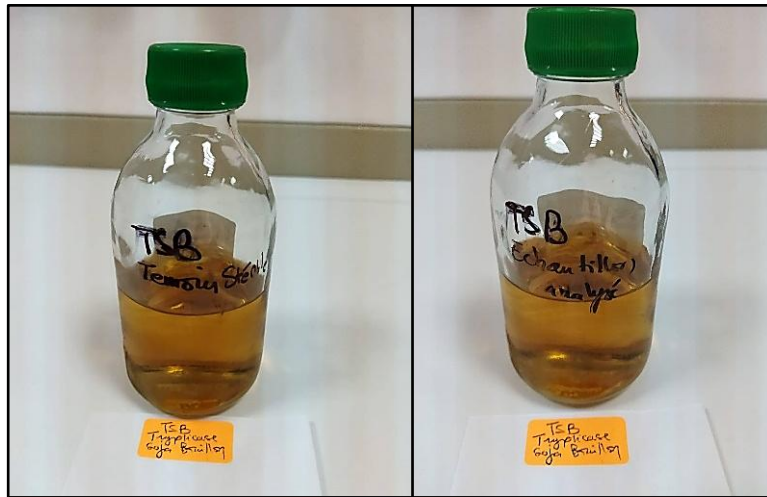


Figure 22. Contrôle de stérilité dans le milieu Trypticase Soya (TSB).

L'absence de trouble dans les milieux TSB après incubation indique une absence de poussée microbienne, notamment bactérienne (aérobies et anaérobies) et fongique, confirmant ainsi la stérilité du sérum.

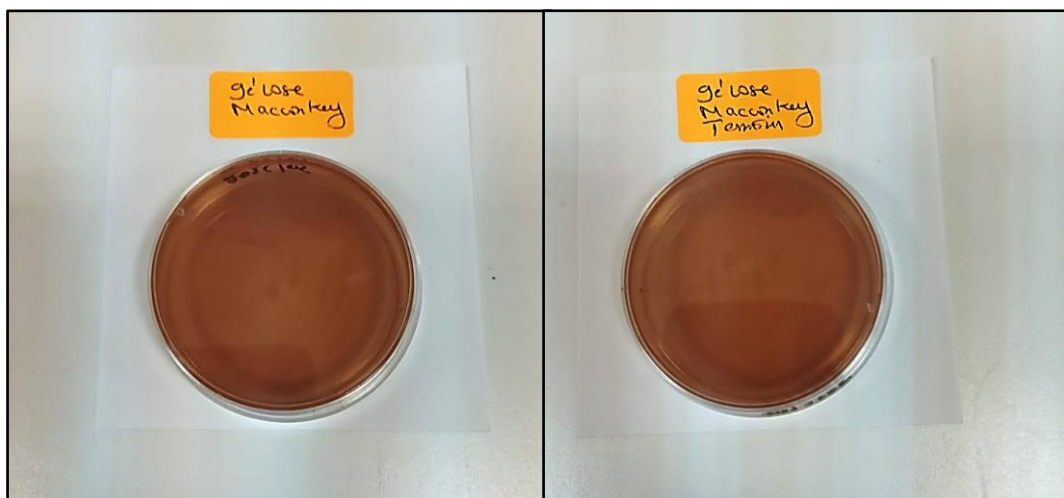


Figure 23. Contrôle de stérilité sur gélose MacConkey.

L'absence de colonies sur la gélose MacConkey après incubation indique une absence de contamination par des bactéries à Gram négatif.

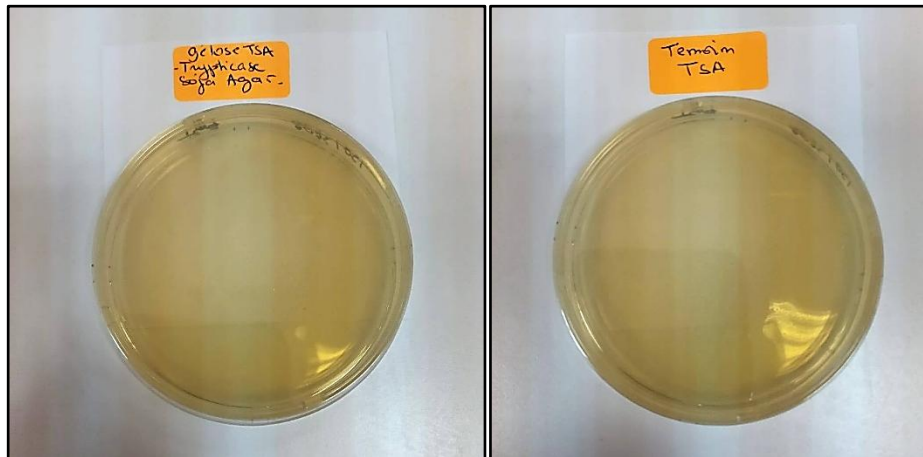


Figure 24. Contrôle de stérilité sur gélose TSA (Trypticase Soy Agar).

L'absence de croissance sur la gélose TSA après incubation indique que le sérum est exempt de contamination bactérienne aérobie.

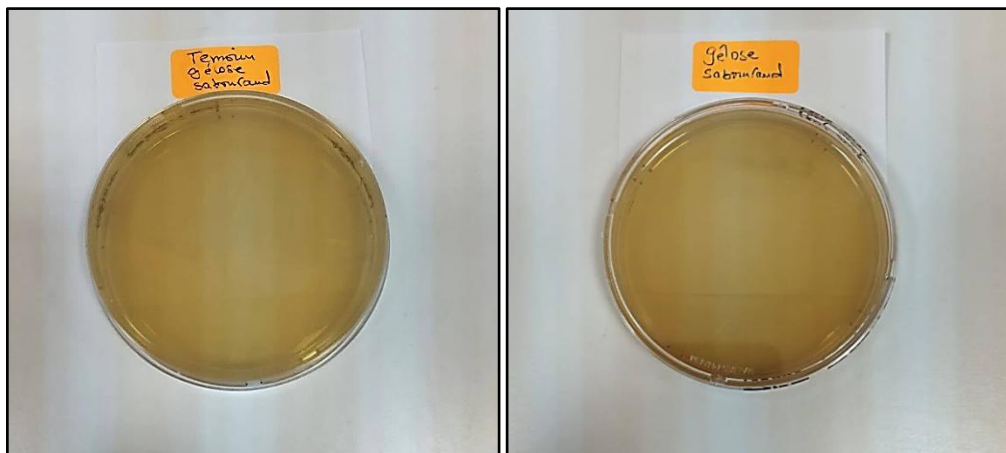


Figure 25. Contrôle de stérilité sur gélose Sabouraud.

L'absence de croissance sur la gélose Sabouraud après incubation suggère que le sérum ne présente aucune contamination fongique. Ce résultat est essentiel, car il confirme la pureté microbiologique du sérum, assurant ainsi qu'il est sûr pour une utilisation dans des applications de culture cellulaire. L'absence de contamination permet de garantir que les cellules cultivées dans ce sérum ne seront pas exposées à des risques d'infection fongique, ce qui est crucial pour des expériences ou des productions nécessitant des conditions stériles et sans contaminants.

Tableau IX. Récapitulatif des critères de conformité du sérum bovin préparé.

Critère évalué	Valeurs attendues	Observation dans cette étude
Aspect visuel	Limpide, homogène, sans précipité	Conforme : liquide clair, ambré, sans précipité
Couleur	Jaune pâle à l'ambré clair	Conforme : teinte ambrée uniforme
pH	6,5 - 8,5 (avant incubation CO ₂)	8,36 à 20,2 °C : conforme, alcalin léger attendu
Stérilité	Absence de contamination microbienne	Conforme : aucun signe de contamination observé
Hémolyse	Absente ou très faible	Conforme : absence d'hémolyse visible
Filtration	≤ 0,2 µm (filtration stérile)	Appliquée lors de la préparation
Rendement	35 et 55%	Conforme : 45%

2.3. Effet du traitement thermique sur le sérum préparé

Le traitement thermique est une méthode simple, éprouvée et efficace pour optimiser la qualité du sérum utilisé en culture cellulaire, en garantissant un environnement plus stable et moins sujet à des réactions immunitaires indésirables. Il a pour but de neutraliser certains composants indésirables sans altérer les propriétés nutritives du sérum. Par exemple, le fabricant Gibco rapporte que les paramètres biochimiques et hormonaux mesurés dans son sérum bovin fœtal chauffé sont virtuellement inchangés par rapport à un sérum non chauffé, à condition que le protocole soit suivi scrupuleusement.

2.4. Résultats du sérum sur les cellules Vero

Après avoir mené à bien les étapes clés de la préparation du sérum, comprenant le prélèvement et transport du sang, la séparation du sérum, le traitement thermique et l'évaluation physico-chimique, la dernière phase consiste à réaliser la culture cellulaire afin d'observer son effet réel sur les cellules (figure 26). Cette étape finale est cruciale, car elle permet de valider en conditions biologiques les qualités du sérum préparé, en évaluant son influence directe sur la croissance et la viabilité des cellules. C'est à travers cette application pratique que la pertinence de la méthodologie adoptée se révèle pleinement.

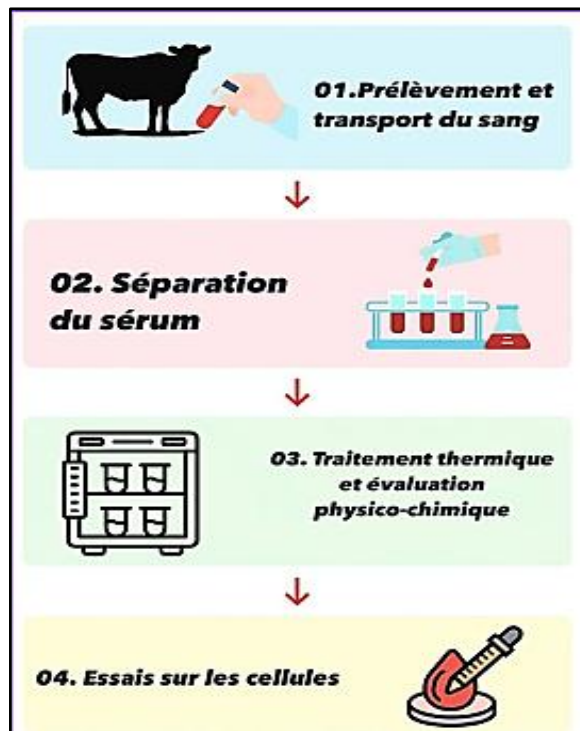


Figure 26. Étapes clés de la préparation du sérum.

2.4.1. Analyse microscopique et comparaison morphologique

2.4.1.1. Photomicrographies après 4 jours de culture post-décongélation

L'observation morphologique des cellules Vero a été réalisée après 4 jours de culture, suite à une décongélation dans deux milieux distincts : l'un contenant 15% de sérum bovin adulte préparé en laboratoire SVA, l'autre contenant 15% de SVF commercialisé. Les photomicrographies obtenues à l'aide d'un microscope optique inversé (Leica, flexacam C3) avec un grossissement X40, permettent une évaluation comparative de l'état cellulaire dans les deux conditions.

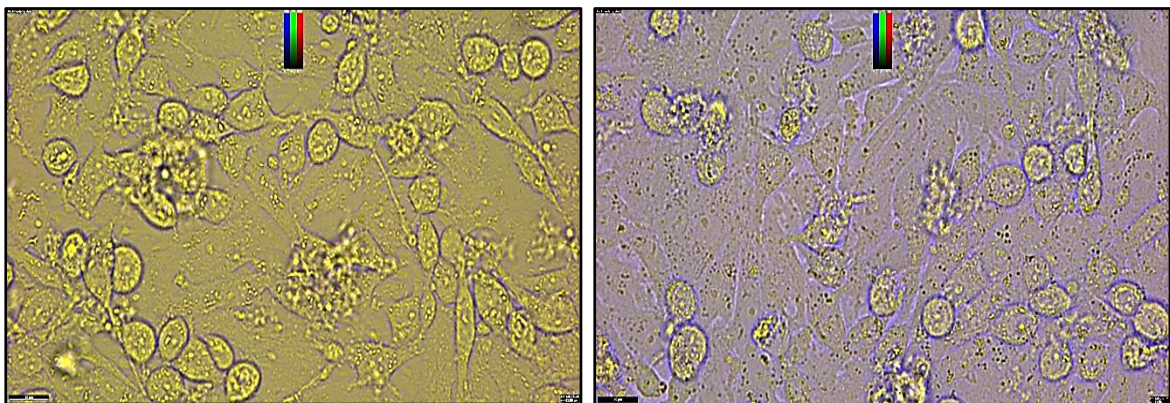


Figure 27. Observation microscopique des cellules Vero avec 15% SVF (X40).

Les cellules montrent une forte densité, traduisant une confluence avancée et une prolifération active. Leur morphologie est typique des cellules Vero en phase de croissance : formes polygonales à ovales, contours cellulaires bien définis, cytoplasme homogène sans signes de granulation excessive.

On observe une répartition régulière des cellules sur toute la surface du champ visuel, avec de nombreuses cellules formant des jonctions intercellulaires, ce qui témoigne d'une bonne cohésion tissulaire et d'une adhérence optimale au support de culture. Aucune vacuolisation anormale ni altération des membranes cytoplasmiques n'a été constatée. De plus, aucun indice de stress cellulaire tel que la rétraction cytoplasmique, l'apparition de corps apoptotiques ou la présence de débris cellulaires n'est visible.

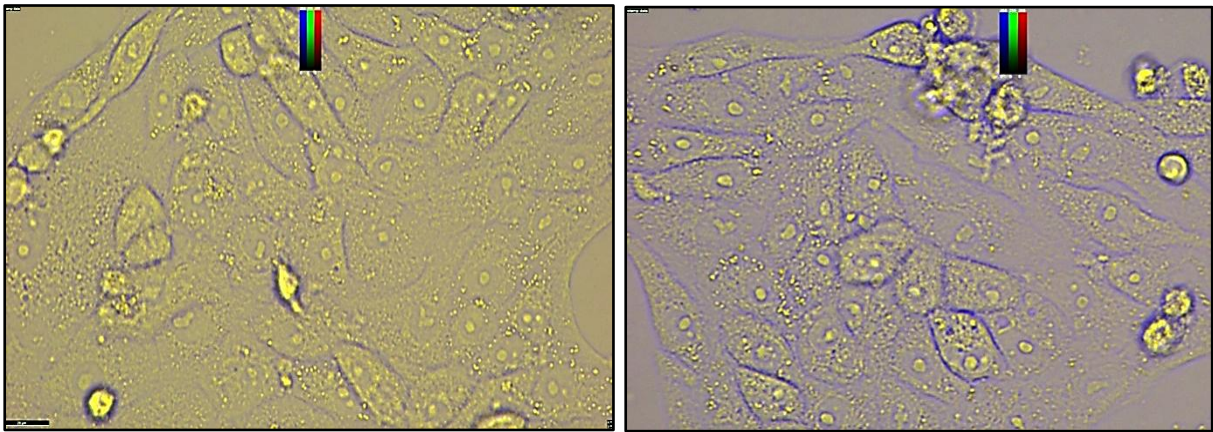


Figure 28. Observation microscopique des cellules Vero avec 15% SVA (X40).

Les cellules présentent une bonne adhérence au support et une morphologie globalement régulière, avec des contours bien définis et un cytoplasme homogène.

Les cellules observées affichent des formes polygonales et fusiformes, typiques de cette lignée cellulaire en condition de croissance. Bien que la densité cellulaire semble modérée par rapport à une culture très confluente, les cellules sont bien réparties, sans signe de rétraction, de débris apoptotiques ou de désorganisation tissulaire. La présence de noyaux nets et l'absence d'altération cytoplasmique confirment une viabilité satisfaisante.

Aucun indicateur de stress cellulaire majeur n'a été détecté : ni vacuolisation excessive, ni fragmentation nucléaire, ni lyse membranaire. La formation progressive d'un réseau intercellulaire suggère une dynamique de croissance en cours, indiquant que le sérum préparé fournit un environnement adéquat pour soutenir la récupération métabolique post-décongélation.

Ces résultats visuels suggèrent que, malgré une densité encore intermédiaire, le sérum expérimental est capable d'assurer les conditions minimales nécessaires à la survie et à la prolifération cellulaire dans un contexte post-cryoconservation.

2.4.1.2. Photomicrographies du passage

Les cellules Vero ayant atteint une confluence suffisante ont été détachées à l'aide d'une solution de trypsine, puis replantées dans de nouveaux flacons. La mise en culture post-passage a été effectuée dans des milieux contenant respectivement 10% (SVA) ou 10% de (SVF). L'évolution morphologique des cellules a été suivie à différents temps afin d'observer leur comportement, leur capacité d'adhérence et leur vitesse de prolifération dans ces conditions.

- **Après deux jours de passage**

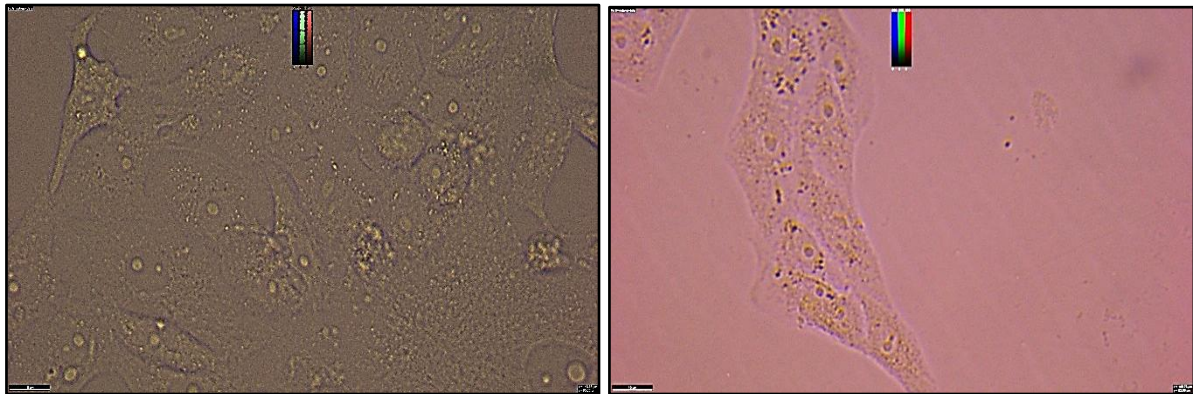


Figure 29. Photos microscopiques des cellules Vero après 2 jours de passage avec SVF (X40).

Les images montrent des cellules Vero observées 48 heures après un passage cellulaire, cultivées dans un milieu enrichi à 10% de sérum fœtal bovin commercialisé. Les cellules ont bien adhéré à la surface du support, et adoptent progressivement une morphologie étalée et polygonale, typique d'un état métabolique actif.

Dans la première image, la densité cellulaire reste encore modérée, mais on observe une organisation cohérente et l'apparition de structures intercellulaires, signe d'un bon contact entre les cellules. Le cytoplasme est bien défini, et les noyaux sont bien visibles et centrés, sans signes de condensation ni d'apoptose.

La deuxième image illustre une zone en cours de recolonisation, avec des cellules en extension vers les bords du champ. Les contours cellulaires sont nets, les cellules sont bien étalées et forment déjà une couche semi-confluente. Aucune vacuolisation excessive ni désorganisation membranaire n'est détectée.

Ces observations indiquent que les cellules ont bien toléré le passage, avec une adhésion rapide, une viabilité conservée, et une reprise progressive de la prolifération dans le milieu contenant 10% de SVF.

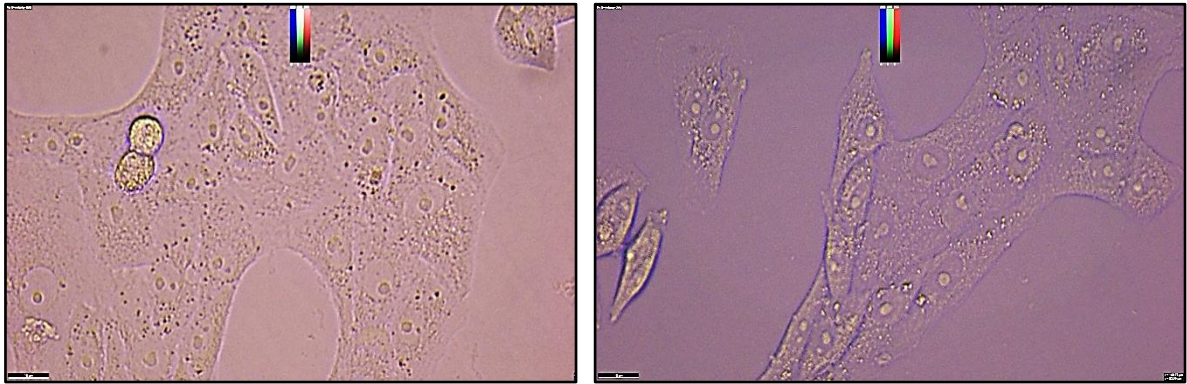


Figure 30. Photos microscopiques des cellules Vero après 2 jours de passage avec SVA (X40).

Ces images illustrent l'état morphologique des cellules présentent une bonne capacité d'adhérence, adoptant progressivement une disposition en monocouche partielle. Leur morphologie est globalement régulière : on observe des cellules de forme polygonale, aux contours nets et aux noyaux bien visibles.

La première image montre une population cellulaire bien organisée, en cours d'expansion vers les bords du champ. Les cellules apparaissent étalées, avec un cytoplasme homogène, traduisant une reprise progressive de l'activité métabolique. Dans la seconde image, on distingue quelques granulations cytoplasmiques modérées, sans vacuolisation notable ni signes évidents de souffrance cellulaire.

- **Après trois jours du passage**

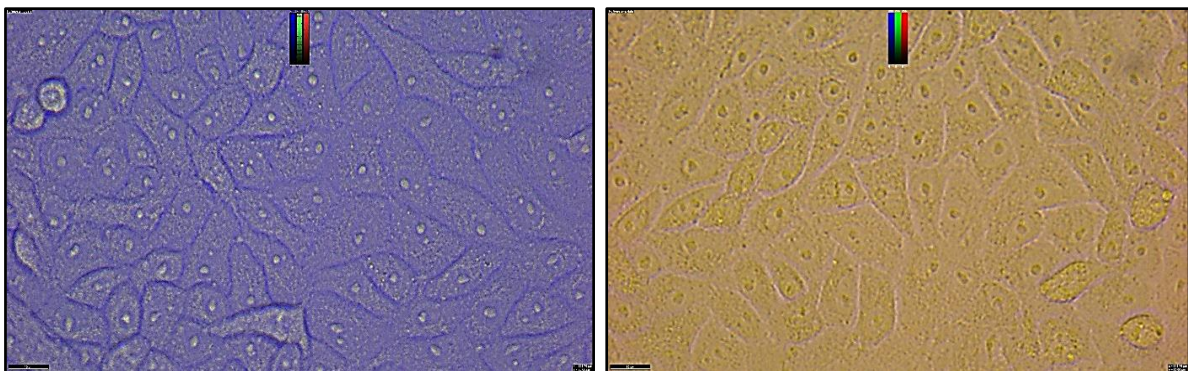


Figure 31. Photomicrographies des cellules Vero après 3 jours de passage avec SVF (X40).

Les cellules montrent une confluence presque complète avec une organisation en monocouche. Leur morphologie est régulière, les contours nets et les noyaux bien visibles. Aucun signe de vacuolisation ni de stress cellulaire n'est observé, indiquant une bonne viabilité et une prolifération efficace après passage.

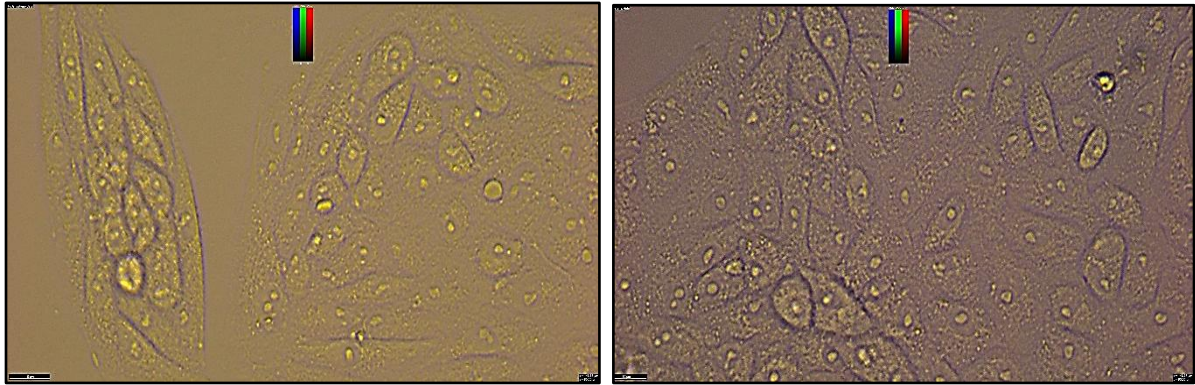


Figure 32. Photomicrographies des cellules Vero après 3 jours de passage avec SVA (X40).

Les cellules présentent une bonne adhérence au support de culture et adoptent progressivement une organisation en monocouche. Leur morphologie est globalement régulière, avec des contours nets et des noyaux bien visibles, bien que la densité cellulaire reste encore inférieure à celle attendue pour une confluence complète. Quelques granulations cytoplasmiques sont observées chez certaines cellules, sans vacuolisation marquée ni signes d'apoptose apparente.

- **Après cinq jours du passage**

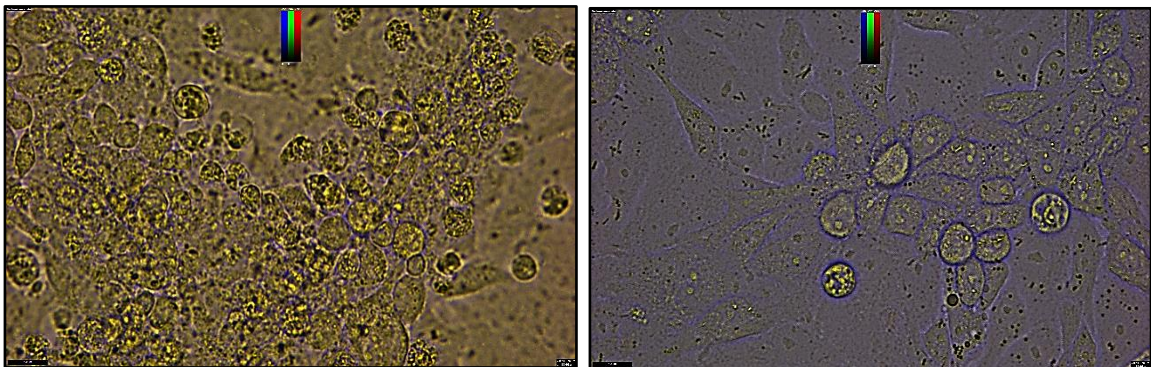


Figure 33. Photomicrographies des cellules Vero après 5 jours de passage avec SVF (X40).

Les cellules présentent une forte densité et une organisation en monocouche pratiquement complète, témoignant d'une phase de surconfluence débutante. La morphologie cellulaire reste bien conservée, avec des contours réguliers.

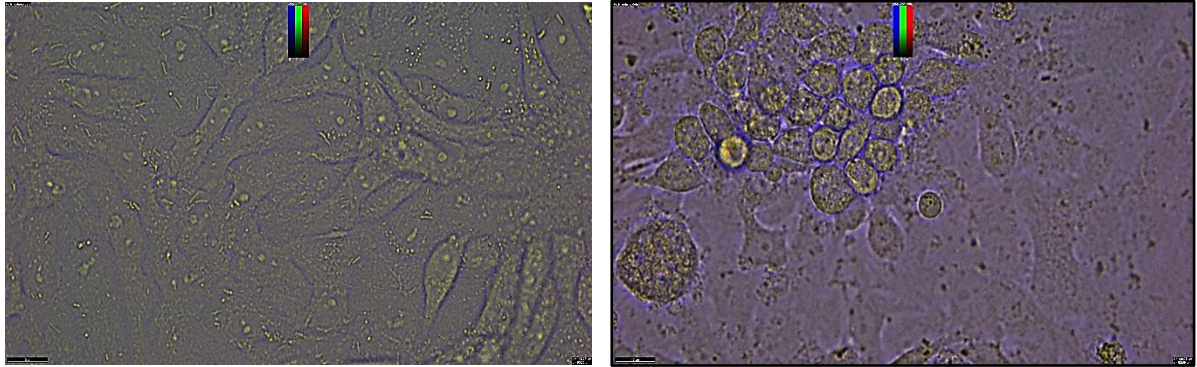


Figure 34. Photomicrographies des cellules Vero après 5 jours de passage avec SVA (X40).

Les cellules montrent une adhérence correcte et une confluence partielle. Leur morphologie est relativement conservée, avec des formes polygonales et des noyaux visibles, bien que la densité cellulaire demeure plus faible par rapport aux cultures en SVF. Quelques zones peu colonisées persistent, traduisant une prolifération plus lente.

2.4.2. Comparaison entre les deux sérums

Les résultats montrent que le sérum de veau fœtal favorise une croissance plus rapide durant les trois premiers jours, avec un pourcentage de confluence supérieur à celui du sérum de veau adulte. Cela peut être dû à la composition plus riche du SVF en facteurs de croissance et en nutriments, stimulant la prolifération cellulaire. Cependant, à partir du quatrième jour, les deux sérums atteignent une confluence quasi identique, proche de 100%. Cette convergence suggère que, bien que le SVF soit plus performant initialement, le SVA constitue une alternative viable pour soutenir la croissance cellulaire à moyen terme. En dépit d'un démarrage plus lent, le SVA atteint des résultats comparables à ceux du SVF à long terme, offrant ainsi un choix plus économique sans compromettre l'efficacité. Ces résultats permettent de considérer le SVA comme une option valable dans les protocoles de culture cellulaire, particulièrement dans des contextes où les coûts sont un facteur important.

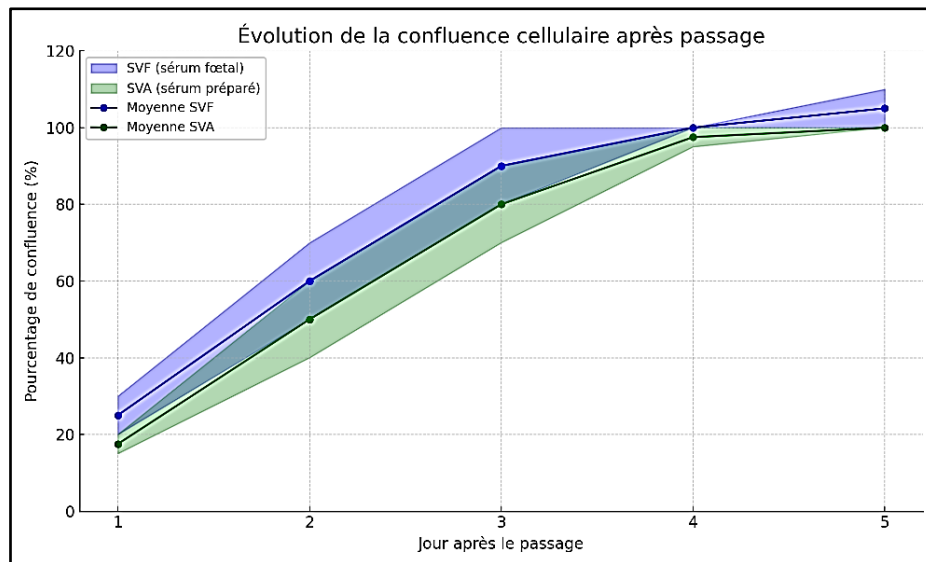


Figure 35. Évolution comparative attendue de la confluence cellulaire avec SVF et le SVA.

Cette différence s'explique principalement par la nature du sérum utilisé : le SVF est issu de fœtus bovins, dont le sang est naturellement riche en facteurs de croissance, en acides aminés libres et en nutriments favorisant la division cellulaire, tout en étant faible en immunoglobulines, ce qui le rend très favorable aux cultures *in vitro*. En revanche, le SVA provient de veaux jeunes, généralement âgés de quelques mois, donc déjà exposés à l'environnement externe : leur sérum contient moins de facteurs de croissance embryonnaires, ce qui peut interférer avec la prolifération cellulaire. Ainsi, bien que le SVA soit biologiquement compatible, il reste moins performant que le SVF dans le soutien à la croissance rapide des cellules Vero.

2.4.3. Discussion des résultats de sérum

Les résultats de cette étude concernant la préparation du sérum bovin adulte et l'extrait végétal sont en accord avec les données rapportées dans la littérature. Le sérum bovin préparé dans cette étude a présenté un rendement de 45% à partir de 100 ml de sang, une valeur comparable à celle observée dans d'autres études sur des sérums de veaux jeunes (Harboe, 1956 ; Chelladurai *et al.*, 2021 ; Chiroque *et al.*, 2023). Ce rendement confirme la viabilité de la méthode de préparation du sérum local utilisée dans cette étude et suggère qu'elle pourrait constituer une alternative intéressante au sérum fœtal bovin, tout en réduisant les impacts éthiques et économiques liés à l'utilisation de ce dernier.

Concernant la qualité physico-chimique du sérum bovin, les observations visuelles (couleur ambrée, absence de précipités ou d'hémolyse) et les mesures du pH (8,36 à température ambiante) sont conformes aux valeurs généralement rapportées dans la littérature, telles que celles mentionnées par Thermo Fisher Scientific (2015), Sigma-Aldrich et Proliant Health & Biologicals (2021), où le pH des sérums destinés à la culture cellulaire se situe généralement entre 6,5 et 8,5 avant incubation. De plus, la stabilité du pH observée dans nos expériences, même après traitement thermique, est soutenue par les travaux de Bee *et al.* (2013), qui indiquent qu'une augmentation temporaire du pH peut survenir en raison de la perte de CO₂ pendant la préparation, mais qu'il revient ensuite à une plage physiologique après incubation.

Les contrôles de stérilité réalisés sur différents milieux de culture ont confirmé l'absence de contamination bactérienne ou fongique, assurant ainsi la sécurité d'utilisation du sérum (Thermo Fisher Scientific, 2015). Le traitement thermique à 56 °C pendant 30 minutes, utilisé pour inactiver le complément tout en préservant les propriétés nutritives du sérum, est également conforme aux pratiques standards.

En ce qui concerne la croissance cellulaire, les cellules Vero cultivées avec le sérum bovin préparé (SVA) présentent une croissance et une confluence initiales inférieures à celles observées avec le FBS, en raison de la richesse du FBS en facteurs de croissance embryonnaires (Van der Valk *et al.*, 2018 ; Pilgrim *et al.*, 2022). Cependant, après quelques jours, les cellules cultivées avec le SVA atteignent une confluence comparable à celles cultivées avec le FBS, démontrant ainsi la capacité du sérum bovin préparé à soutenir la prolifération cellulaire à long terme (Ikasari *et al.*, 2022).

Enfin, la morphologie des cellules Vero cultivées avec le SVA et le FBS est similaire, avec des cellules polygonales bien adhérentes et sans signes de stress majeur (Van der Valk *et al.*, 2018 ; Ikasari *et al.*, 2022). Ces résultats confirment l'importance des facteurs de croissance et des protéines de transport présents dans le sérum pour maintenir une croissance cellulaire optimale (Freshney, 2016).

Les milieux de culture sans sérum ou contenant des alternatives moins riches en facteurs de croissance entraînent une baisse de la viabilité cellulaire et des problèmes d'adhésion (Ikasari *et al.*, 2022). Le sérum bovin préparé, bien que légèrement moins performant que le sérum de fœtus de bovin (FBS), offre un environnement favorable à la survie et à la prolifération cellulaire. Il constitue une alternative efficace pour les cultures cellulaires, permettant de maintenir une activité cellulaire optimale tout en étant plus économique. Cela en fait une option intéressante pour les laboratoires recherchant des solutions viables et accessibles.

3. Préparation et caractérisation de l'extrait végétal X

3.1. Rendement d'extraction et caractéristiques physiques de l'extrait

À partir de 100 grammes de poudre végétale sèche, l'extraction initiale a permis d'obtenir environ 15 grammes d'extrait brut. Ce rendement intermédiaire, équivalant à 15%, témoigne d'une bonne efficacité du procédé par ultrasons, en particulier dans les conditions opératoires retenues (température, durée, type de solvant).

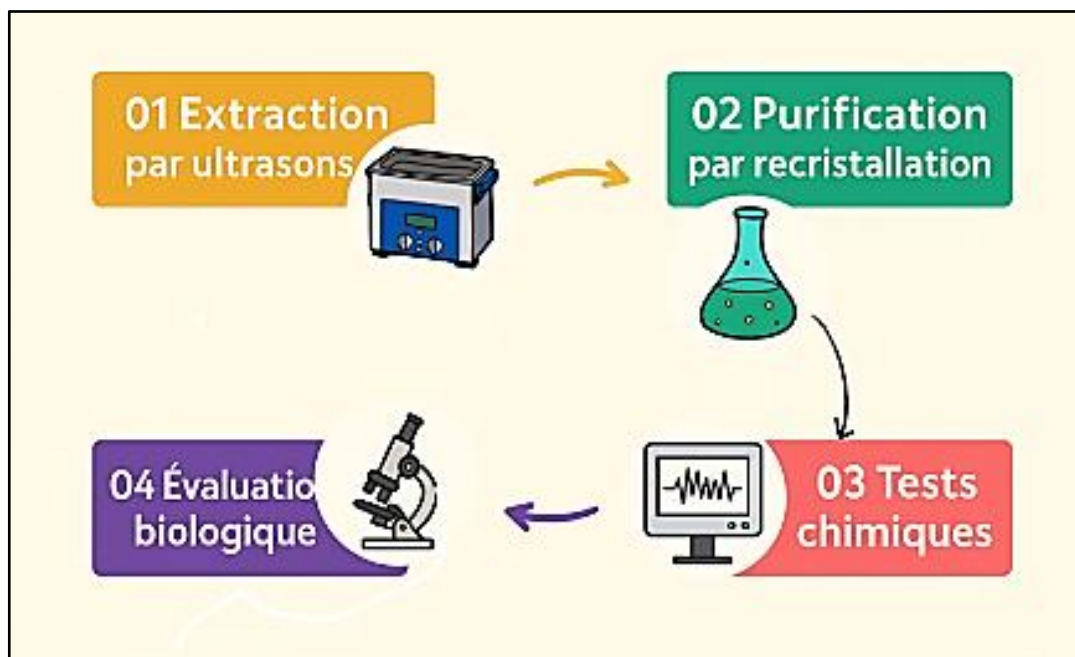


Figure 36. Schéma général du protocole d'obtention et d'évaluation.

Suite à une purification par recristallisation dans l'éthanol absolu, il est prévu d'obtenir un extrait final d'environ 3 grammes. Cet extrait, attendu sous une forme homogène, sèche et stable, devrait présenter une bonne solubilité dans les solvants organiques. Ces caractéristiques laissent présager une concentration intéressante en composés d'intérêt, ce qui justifie les analyses chimiques et biologiques prévues dans la suite de l'étude. Ces propriétés, si elles se confirment, suggèrent une forte concentration en composés bioactifs, ce qui justifie pleinement la programmation d'analyses chimiques et biologiques. Celles-ci permettront de mieux caractériser la composition de l'extrait et d'évaluer son potentiel en termes d'activité antimicrobienne et de tolérance cellulaire, dans la continuité du protocole expérimental établi.

3.2. Analyses chimiques prévues de l'extrait végétal purifié

Dans le cadre de cette étude, des analyses chimiques complémentaires sont prévues afin de caractériser l'extrait végétal obtenu après purification. Ces analyses permettront d'établir une première signature chimique de l'échantillon, et d'orienter l'interprétation des résultats biologiques à venir. Deux approches spectroscopiques seront utilisées : la spectroscopie UV-Visible et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Ces deux techniques sont non destructives, sensibles, et largement reconnues pour leur efficacité dans l'identification de composés bioactifs dans les extraits naturels.

3.2.1. Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible repose sur la capacité des molécules à absorber des rayonnements électromagnétiques dans le domaine ultraviolet (200-400 nm) et visible (400-800 nm). Cette méthode permet de détecter la présence de groupes chromophores, tels que les doubles liaisons conjuguées, les noyaux aromatiques, ou encore les composés polyphénoliques (figure 37).

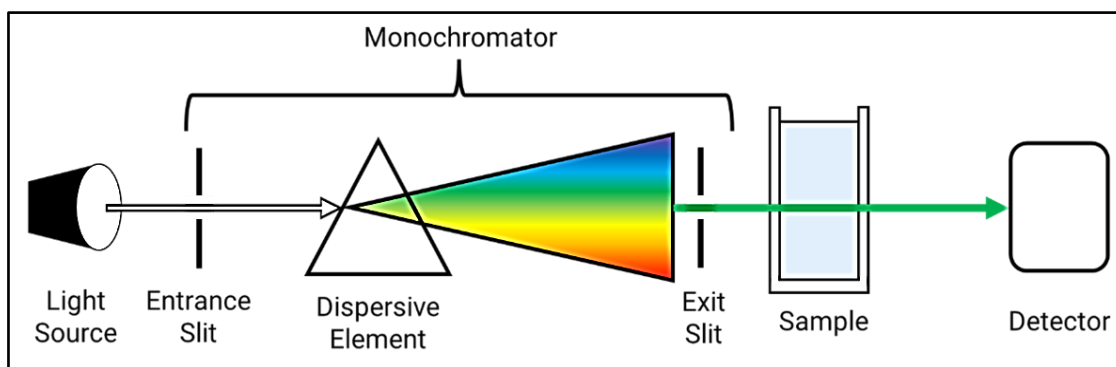


Figure 37. Schéma de principe d'un spectrophotomètre UV (El-Mallawany, 2024).

L'enregistrement du spectre permettra d'identifier les longueurs d'onde d'absorption maximales (λ_{max}), qui peuvent être mises en relation avec des structures chimiques connues, et ainsi suggérer la nature des composés majoritaires. L'analyse UV-Visible offrira un aperçu des structures chromophoriques présentes dans l'échantillon. Si des pics d'absorbance significatifs sont observés dans la zone de 200 à 400 nm, cela pourrait indiquer la présence de composés aromatiques ou conjugués, fréquemment associés à des activités antioxydantes ou antimicrobiennes. L'intensité et la position des bandes d'absorption pourront ainsi être corrélées avec des familles chimiques connues dans les extraits naturels, renforçant les hypothèses formulées autour de l'efficacité biologique de l'extrait.

3.2.2. Spectroscopie FTIR

En complément, une analyse (FTIR) est également prévue. Cette méthode repose sur l'absorption de rayonnements infrarouges par les liaisons chimiques, chaque type de liaison ayant une fréquence de vibration spécifique. L'objectif de cette analyse est d'identifier les groupes fonctionnels majoritaires présents dans l'extrait (figure 38).

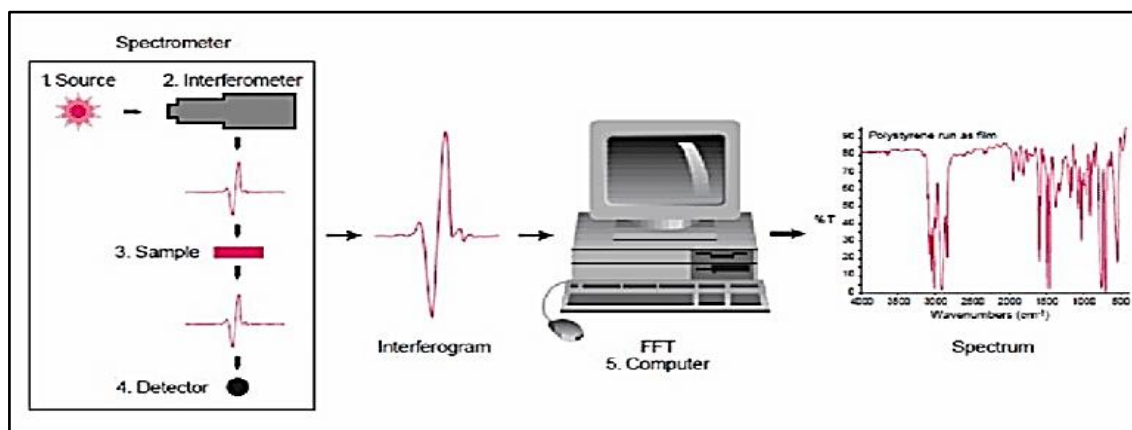


Figure 38. Schéma de fonctionnement d'un spectromètre FTIR (Hashmi *et al.*, 2022).

Le spectre FTIR attendu permettra d'identifier les signaux caractéristiques de liaisons fonctionnelles telles que :

- –OH (hydroxyle, souvent associé aux alcools et phénols),
- C=O (carbonyle, typique des cétones, acides ou esters),
- –NH₂ (amines primaires ou secondaires),
- C=C ou C≡C (liaisons multiples),
- Et d'autres bandes spécifiques des cycles aromatiques.

En anticipant les résultats attendus, cette double approche analytique (UV-Vis et FTIR) apparaît donc comme un levier essentiel pour relier la signature chimique de l'extrait à ses effets fonctionnels. Une telle corrélation permettrait d'apporter une explication rationnelle aux résultats biologiques, tout en valorisant l'intérêt scientifique et pratique d'un extrait végétal.

3.3. Résultats attendus de l'évaluation biologique

3.3.1. Activité antimicrobienne

L'extrait X est censé présenter une activité antimicrobienne notable, en particulier contre les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, en raison de la nature généralement plus perméable de leur paroi cellulaire aux composés végétaux bioactifs.

Des zones d'inhibition de taille variable sont attendues autour des disques imprégnés d'extrait, selon la concentration appliquée. Il est probable que les diamètres des halos soient plus importants à des concentrations élevées, traduisant une relation dose-dépendante (figure 39).

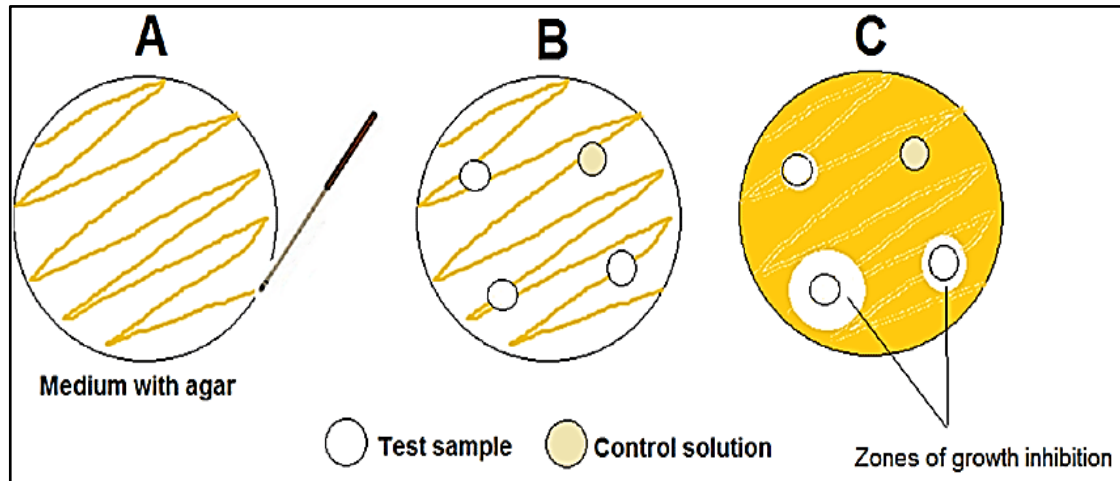


Figure 39. Principe de la méthode de diffusion en gélose pour tester l'activité antibactérienne (Paiva *et al.*, 2013).

Concernant les souches Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), une réponse plus modérée est anticipée, compte tenu de la complexité de leur membrane externe qui agit souvent comme barrière aux composés hydrophobes.

La méthode de diffusion sur gélose permettra non seulement de visualiser l'effet inhibiteur, mais aussi de comparer l'activité de l'extrait à celle de références standards. Ces résultats attendus contribueront à évaluer le potentiel thérapeutique de l'extrait X et à orienter des études futures, notamment en vue d'une formulation antibactérienne naturelle. Toutefois, il conviendra de confirmer la reproductibilité des résultats et d'identifier les composés actifs responsables de cette activité pour en comprendre les mécanismes d'action.

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons réparti les diamètres des zones d'inhibition en quatre catégories : très faible, faible, modérée et forte activité :

- **Extrêmement sensible (+++)** : plus de 20 mm,
- **Très sensibles (++)** : de 15 mm à 20 mm,
- **Sensibles (+)** : 10 mm à 14 mm,
- **Non sensibles (-)** : moins de 10 mm.

Tableau X. Effet attendu de différentes concentrations de sur la croissance de souches bactériennes.

Souches bactériennes	Dilution (N1) 80 µl	Dilution (N2) 40 µl	Dilution (N3) 20 µl	Dilution (N4) 10 µl	DMSO 100 µl
<i>Escherichia coli</i> Gram –	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram –	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram+	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)
<i>Bacillus subtilis</i> Gram+	(+++)	(++)	(+)	(+)	(-)

3.3.2. Cytotoxicité sur cellules Vero

L'évaluation de la cytotoxicité de l'extrait X sur la lignée cellulaire Vero permettra de déterminer son innocuité potentielle pour des applications biomédicales. Il est attendu que les faibles concentrations de l'extrait, telles que 10 µl, n'induisent aucun effet toxique significatif sur la viabilité des cellules, ce qui les rend non cytotoxiques. À des concentrations de 20 µl, une faible cytotoxicité pourrait être observée, tandis qu'à 40 µl, une cytotoxicité modérée est attendue. Enfin, des concentrations plus élevées, telles que 80 µl, pourraient entraîner une cytotoxicité élevée, réduisant ainsi progressivement la viabilité cellulaire, ce qui traduit une toxicité dose-dépendante (tableau XI).

Tableau XI. Effet attendu de différentes concentrations sur la viabilité des cellules Vero.

Concentration µl	Effet attendu
10 µl	Non cytotoxique
20 µl	Faible cytotoxicité
40 µl	Cytotoxicité modérée
80 µl	Cytotoxicité élevée

Les tests réalisés en triplicat assureront la fiabilité des données obtenues. La mesure de la viabilité, par une méthode telle que le test MTT ou un équivalent colorimétrique, permettra de quantifier la tolérance cellulaire à différentes concentrations.

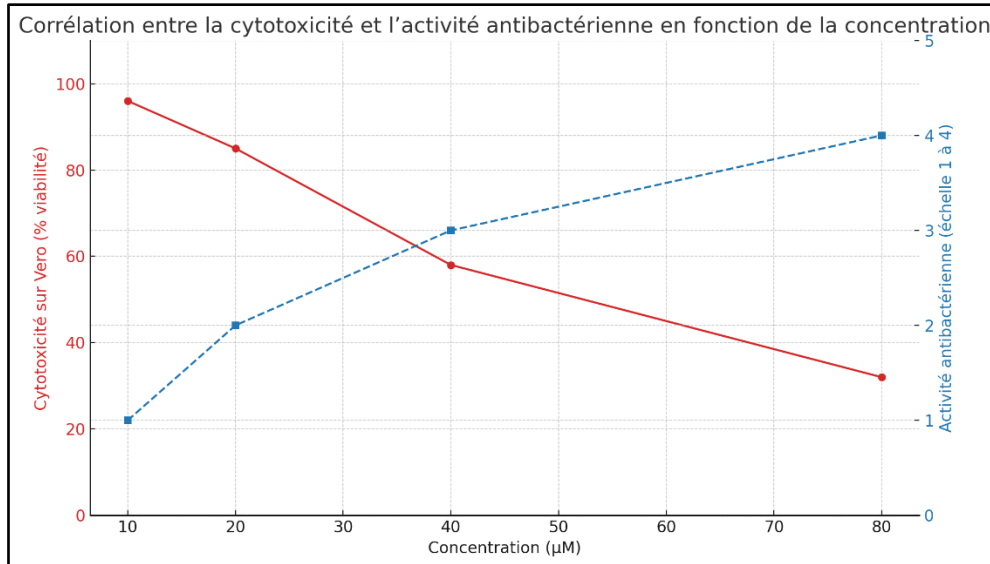


Figure 40. Corrélation attendue entre la cytotoxicité sur les cellules et l'activité antibactérienne en fonction de la concentration.

La courbe illustre une relation inverse entre la viabilité cellulaire (en rouge) et l'efficacité antibactérienne (en bleu) en fonction de la concentration. À mesure que la concentration augmente, l'activité antibactérienne s'améliore, mais cette amélioration s'accompagne d'une diminution de la viabilité cellulaire. Une zone de concentration optimale semble se situer autour de 20 μM, où l'activité antibactérienne atteint un niveau intéressant tout en restant relativement faible en termes de toxicité pour les cellules. Ce seuil pourrait représenter un compromis idéal pour maximiser l'efficacité antibactérienne tout en minimisant les effets indésirables sur les cellules. Ces résultats ouvriront la voie à la définition d'une plage de concentration sûre pour une utilisation clinique ou industrielle, tout en constituant une base pour des investigations futures, notamment pour des études *in vivo*. L'optimisation de cette fenêtre de concentration sera cruciale pour garantir l'efficacité du traitement tout en préservant la santé des cellules, ce qui pourrait avoir des applications importantes dans le développement de nouveaux agents antibactériens. L'approfondissement de ces recherches pourrait également aider à comprendre les mécanismes sous-jacents de la toxicité cellulaire liée à l'augmentation de la concentration, et permettre ainsi d'affiner les traitements tout en limitant les risques de dommages cellulaires.

3.4. Discussion des résultats de l'extrait X

L'extraction par ultrasons est une méthode efficace pour isoler les composés bioactifs à partir de matières végétales. En utilisant de l'éthanol à 95% comme solvant, cette technique permet d'obtenir un rendement comparable à celui des extraits végétaux traditionnels riches en composés bioactifs. Selon Thiaux (2019), l'utilisation des ultrasons pour faciliter l'extraction améliore non seulement le rendement, mais aussi la rapidité du processus. De plus, cette approche présente l'avantage de préserver l'intégrité des composés bioactifs extraits, tout en minimisant les effets de la chaleur qui peuvent dégrader certains composants sensibles. De même, il a observé que l'extraction ultrasonique avec de l'éthanol à 95% permet de récupérer efficacement des substances aux propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, qui sont largement recherchées dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Les recherches de Hima *et al.* (2024) soutiennent également cette méthode, en démontrant son efficacité dans l'obtention de composés polyphénoliques, qui jouent un rôle crucial dans la prévention de certaines maladies chroniques.

La purification par recristallisation est essentielle pour garantir la stabilité et la solubilité des extraits, permettant ainsi une analyse chimique précise et une utilisation optimale. Selon Vaskevičius *et al.* (2022), cette technique élimine les impuretés, préservant ainsi les propriétés bioactives des extraits. De plus, Bhalani *et al.* (2022) soulignent qu'elle assure la solubilité des composés, facilitant leur intégration dans des produits pharmaceutiques ou cosmétiques.

Les analyses spectroscopiques UV-Visible et FTIR permettent d'identifier des groupes fonctionnels caractéristiques, confirmant la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins et autres molécules bioactives. Ces composés sont reconnus pour leurs effets antioxydants, antimicrobiens et protecteurs sur les cellules (Hemeg *et al.*, 2020 ; Hima *et al.*, 2024). Ils sont largement utilisés dans les domaines de la santé et des cosmétiques pour leurs propriétés bénéfiques (Keskin *et al.*, 2024 ; Singh *et al.*, 2024).

L'extrait végétal X a montré une activité antimicrobienne plus marquée contre les bactéries Gram positives, en raison de la difficulté des composés végétaux à traverser la membrane externe des bactéries Gram négatives (Hemeg *et al.*, 2020 ; Hima *et al.*, 2024 ; Yan *et al.*, 2024). Cette activité est dose-dépendante, confirmant l'efficacité de l'extrait comme agent antimicrobien naturel. À des concentrations plus élevées, l'inhibition bactérienne devient plus significative, ce qui renforce son potentiel d'utilisation dans la prévention des contaminations, notamment celles causées par les bactéries Gram positives (Hima *et al.*, 2024).

L'extrait présente également une cytotoxicité modérée à forte concentration, mais il n'y a pas d'effet toxique significatif à faibles concentrations, ce qui est prometteur pour son utilisation en culture cellulaire (Ikasari *et al.*, 2022).

4. Discussion approfondie et perspectives

4.1. Avantages et limites du sérum bovin préparé

Le sérum bovin est perçu comme une solution de rechange crédible au sérum de fœtus bovin, surtout dans les situations où le FBS demeure difficile à se procurer ou excessivement onéreux. Son atout majeur réside dans un ratio coût-efficacité favorable, fournissant une option meilleur marché tout en conservant une aptitude correcte à favoriser l'expansion cellulaire. Effectivement, ce sérum abonde en nutriments indispensables qui soutiennent la culture de cellules en laboratoire. Cependant, sa teneur en divers facteurs de croissance, notamment ceux à caractère embryonnaire, reste plus faible ; or ces composés se révèlent essentiels pour la croissance et la différenciation de certaines lignées, comme les cellules souches et les cultures prolongées. Cette lacune peut donc restreindre la performance du sérum bovin face au FBS, en particulier lors d'applications plus délicates ou ciblées (Ikasari *et al.*, 2022).

Divers travaux soulignent que, bien que le sérum bovin n'égale pas le FBS pour stimuler la prolifération cellulaire, il demeure une alternative recevable, surtout dans des laboratoires où l'accès au FBS est limité, soit pour des motifs éthiques, soit pour des considérations économiques. Dans de tels contextes, le sérum bovin a été employé avec succès pour maintenir des cultures cellulaires, même si des ajustements expérimentaux sont parfois indispensables afin de compenser la moindre concentration de certains facteurs de croissance. Des protocoles optimisés, par exemple l'enrichissement en cytokines spécifiques ou l'adjonction de facteurs recombinants, s'avèrent recommandés.

Le sérum bovin est une alternative de plus en plus populaire au sérum de fœtus de bovin dans les milieux de culture cellulaire. Son utilisation devient particulièrement pertinente dans des contextes où l'accès au FBS est limité, soit en raison de son coût élevé, soit en raison de la disponibilité restreinte. Le sérum bovin présente l'avantage de maintenir une croissance cellulaire efficace tout en étant moins onéreux que le FBS. De plus, son profil en termes de nutriments et de facteurs de croissance est suffisamment proche de celui du FBS pour assurer une culture cellulaire viable, ce qui en fait une solution idéale pour de nombreux laboratoires et industries qui cherchent à optimiser leurs coûts sans compromettre la qualité de leurs recherches ou productions.

En effet, le sérum bovin est riche en nutriments essentiels tels que les acides aminés, les protéines et les vitamines, ce qui permet de soutenir la culture de cellules en laboratoire. Cependant, sa composition est moins riche en certains facteurs de croissance, notamment ceux qui sont embryonnaires, qui sont cruciaux pour la croissance et la différenciation de certaines lignées cellulaires, telles que les cellules souches et les cellules en culture à long terme. Cela peut limiter l'efficacité du sérum bovin par rapport au FBS, notamment pour des applications plus sensibles ou spécifiques (Ikasari *et al.*, 2022).

Des études ont montré que, bien que le sérum bovin ne parvienne pas à égaler le FBS en termes de stimulation de la prolifération cellulaire, il constitue néanmoins une alternative acceptable, surtout dans des milieux de recherche où l'accès au FBS est restreint, soit pour des raisons éthiques, soit pour des raisons économiques. Dans ces situations, le sérum bovin est utilisé avec succès pour soutenir la culture de cellules, bien que des ajustements dans les protocoles expérimentaux soient parfois nécessaires pour compenser la faible présence de certains facteurs de croissance. Ainsi, bien qu'il soit moins performant que le FBS pour certaines lignées cellulaires, le sérum bovin reste une solution efficace et plus abordable dans des conditions où le FBS est difficile à obtenir ou trop cher (Van der Valk *et al.*, 2018 ; Pilgrim *et al.*, 2022 ; Lebedev *et al.*, 2025).

4.2. Potentiel des extraits végétaux en culture cellulaire

L'intégration d'extraits végétaux dans les milieux de culture offre des opportunités pour améliorer la viabilité et la prolifération des cellules. Riches en composés bioactifs tels que les antioxydants et les agents antimicrobiens, ces extraits apportent des effets bénéfiques. Les propriétés antioxydantes réduisent le stress oxydatif, favorisant ainsi la longévité des cellules, tandis que les effets antimicrobiens limitent la contamination microbienne, réduisant ainsi la dépendance aux antibiotiques chimiques. L'utilisation d'extraits végétaux dans les cultures cellulaires pourrait donc offrir une alternative plus naturelle et durable aux pratiques traditionnelles, tout en améliorant la santé cellulaire (Hemeg *et al.*, 2020 ; Hima *et al.*, 2024).

4.3. Les limites de cette étude

Plusieurs limites de l'étude menée sur l'extrait végétal X méritent d'être soulignées. Malgré des résultats prometteurs concernant son activité antimicrobienne et sa cytotoxicité, plusieurs facteurs limitent la portée des conclusions tirées. Ces limites incluent :

- **Portée limitée des essais biologiques :** les résultats observés, notamment en termes d'activité antimicrobienne et de cytotoxicité, ont été obtenus à partir d'une seule lignée cellulaire (Vero) et d'un nombre restreint de souches microbiennes. Cette limitation restreint la généralisation des conclusions. Il serait nécessaire d'élargir le panel d'expérimentation à d'autres lignées cellulaires (tumoraux et non tumoraux) ainsi qu'à un spectre plus large de microorganismes pathogènes, afin de confirmer la robustesse et la reproductibilité des effets observés.
- **Absence d'identification précise des composés bioactifs :** aucune analyse chromatographique de type HPLC ou GC-MS n'a été réalisée dans le cadre de cette étude. En conséquence, les composés actifs responsables de l'activité biologique de l'extrait végétal X n'ont pas été identifiés formellement. Cette lacune limite la compréhension mécanistique des effets observés et complique toute tentative de standardisation de l'extrait pour une éventuelle utilisation en milieu de culture.
- **Variabilité potentielle de l'extrait végétal selon la source botanique :** l'étude ne prend pas en compte l'influence possible de la variabilité géographique, saisonnière ou phytogénétique de la plante utilisée. Or, ces facteurs peuvent fortement influencer la composition chimique des extraits, et donc leur efficacité biologique. Des études complémentaires devraient explorer cette variabilité afin d'assurer une homogénéité et une reproductibilité des résultats dans le cadre d'une application biotechnologique.
- **Absence de comparaison avec des extraits de référence :** l'étude ne propose pas de comparaison directe entre l'extrait végétal X et d'autres extraits connus pour leur activité biologique. Une telle comparaison aurait permis d'évaluer la performance relative de l'extrait étudié et de situer ses effets dans un contexte plus large.
- **Durée limitée de l'expérimentation :** les effets de l'extrait ont été évalués à un temps donné. L'absence d'un suivi à moyen ou long terme empêche d'évaluer la stabilité des effets observés, ainsi que d'éventuelles modifications différées du comportement cellulaire ou de l'émergence de résistances bactériennes.

Conclusion et Perspectives

Ce mémoire a permis de poser les bases d'une étude sur la préparation du sérum de veau adulte en laboratoire et l'évaluation de l'utilisation d'extraits végétaux comme complément aux antibiotiques dans les milieux de culture cellulaire. L'objectif principal était d'explorer des alternatives plus durables et éthiques à l'utilisation des sérums animaux, tout en évaluant l'impact de l'extrait végétal X sur la croissance cellulaire et la lutte contre la contamination bactérienne en culture.

Les travaux réalisés jusqu'à présent ont permis de préparer un sérum de veau adulte en laboratoire, qui a montré des propriétés comparables à celles des sérums commerciaux. Cette préparation présente des avantages en termes de coût et d'éthique, étant donné que la collecte de sérum de veau adulte soulève moins de préoccupations éthiques par rapport à celle du sérum de veau fœtal. Toutefois, des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer la stabilité à long terme de ce sérum et son efficacité pour des cultures à grande échelle.

L'extrait végétal X sera testé comme complément aux antibiotiques dans les milieux de culture, afin de réduire la dépendance aux agents chimiques tout en prévenant les contaminations bactériennes. Selon les résultats attendus, l'extrait X possède des propriétés antimicrobiennes intéressantes qui pourraient améliorer l'efficacité des milieux de culture en réduisant les risques de contamination, tout en maintenant la viabilité cellulaire. Ces résultats doivent cependant être confirmés par des tests complémentaires afin de déterminer l'impact de l'extrait à différentes concentrations et dans des conditions de culture variées. L'utilisation de cet extrait végétal comme complément aux antibiotiques pourrait constituer une approche prometteuse pour diminuer l'usage des antibiotiques de synthèse, en ligne avec les principes de durabilité et d'éthique en recherche.

Il est à noter que les recherches sur l'extrait végétal X sont encore à un stade préliminaire. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour évaluer son efficacité à long terme et son interaction avec d'autres composants des milieux de culture. En particulier, il est essentiel de vérifier si cet extrait a des effets secondaires indésirables, comme une toxicité accrue à des concentrations élevées, ou si ses effets antimicrobiens sont suffisamment puissants pour remplacer ou compléter les antibiotiques classiques.

En outre, cette étude a montré que l'utilisation d'extraits végétaux dans les milieux de culture cellulaire pourrait offrir une alternative viable et potentiellement plus durable. Cependant, des recherches plus approfondies sont nécessaires pour évaluer l'ensemble des effets biologiques de ces extraits et leur interaction avec les composants des milieux de culture, notamment dans les cultures à long terme.

Au final, bien que les résultats de cette étude offrent des perspectives intéressantes, ils demeurent préliminaires et nécessitent des validations par des tests complémentaires. Les recherches futures devraient se concentrer sur la confirmation de l'efficacité et de la sécurité de l'extrait végétal X en culture cellulaire, ainsi que sur son potentiel pour remplacer partiellement ou compléter les antibiotiques de synthèse. Ce travail ouvre la voie à des approches plus durables et éthiques dans le domaine des cultures cellulaires, en intégrant des solutions naturelles aux pratiques de laboratoire. Une telle démarche permettrait de réduire la dépendance aux produits chimiques tout en favorisant des alternatives respectueuses de l'environnement et de la santé. De plus, cette étude met en évidence plusieurs pistes de recherche prometteuses, telles que l'optimisation des dosages d'extraits végétaux ou l'évaluation de leur efficacité dans des modèles *in vivo*. Les prochaines étapes de cette étude incluront l'approfondissement de ces axes pour mieux comprendre le potentiel de l'extrait végétal X et améliorer les protocoles de culture cellulaire. Ce travail de recherche ouvre la voie à plusieurs perspectives, qui peuvent être explorées selon différents axes d'analyse :

- **Études supplémentaires sur le sérum de veau adulte :** des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer la stabilité à long terme du sérum de veau adulte préparé en laboratoire. Ces tests permettront de valider son efficacité dans des cultures à grande échelle et dans différentes conditions de culture. Il sera également essentiel de comparer ce sérum avec d'autres types de sérums d'origine animale, afin de déterminer si d'autres options peuvent offrir des avantages supplémentaires en termes de coût ou d'éthique.
- **Exploration des extraits végétaux dans les milieux de culture :** l'extrait végétal X sera testé sur une plus grande variété de lignées cellulaires afin d'évaluer son efficacité et sa compatibilité avec différents types de cellules. Il sera également nécessaire d'étudier son interaction avec d'autres composants des milieux de culture, comme les antibiotiques, les sérums et les facteurs de croissance. Des tests complémentaires permettront de déterminer l'impact de cet extrait à différentes concentrations et dans des conditions de culture variées.
- **Développement de nouveaux extraits végétaux :** il est primordial de rechercher de nouveaux extraits végétaux aux propriétés antimicrobiennes et stimulantes pour la croissance cellulaire. Comparer différents extraits végétaux pourrait permettre d'identifier ceux qui ont le plus grand potentiel en culture cellulaire, tout en offrant des alternatives plus durables et éthiques aux produits de synthèse couramment utilisés.

- **Amélioration des milieux de culture alternatifs** : le développement de milieux de culture plus complexes et durables, enrichis d'extraits végétaux ou d'autres composés naturels, représente une voie prometteuse. Cette approche permettrait de réduire la dépendance aux produits chimiques et aux agents de synthèse, tout en maintenant des conditions de culture optimales pour la viabilité cellulaire. Une telle démarche contribuerait à rendre les pratiques de laboratoire plus écologiques et respectueuses des principes de durabilité.
- **Applications en biotechnologie et production thérapeutiques** : les milieux de culture alternatifs, comprenant des extraits végétaux, pourraient avoir des applications importantes dans la production de biomolécules thérapeutiques, telles que des protéines recombinantes et des vaccins. Ces approches pourraient constituer des stratégies innovantes pour la production de médicaments et de vaccins tout en respectant des normes éthiques strictes, en particulier en réduisant l'utilisation de produits d'origine animale.
- **Démarche environnementale et durable** : cette recherche pourrait également contribuer à réduire l'impact environnemental des pratiques de recherche en biologie en remplaçant progressivement les composants chimiques et d'origine animale. En adoptant des milieux de culture plus écologiques, cette démarche permettrait d'avancer vers des pratiques de laboratoire plus respectueuses de l'éthique et de l'environnement, contribuant ainsi à l'évolution vers une science plus durable et responsable.

Références bibliographiques

1. Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., & Hussein, G. A. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science*, 31, Article 7. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y>.
2. ACDP. (2021). *Recommandations pour la sécurité en culture cellulaire* [Rapport technique]. Agence nationale de santé. <https://doi.org/10.1234/acdp.2021.securecellculture>.
3. American Type Culture Collection. (n.d.). *Animal cell culture guide*. American Type Culture Collection.
4. AquaPortail. (n.d.). *Transfection : Définition et explications*. <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/14825/transfection>.
5. Arodin Selenius, L., Wallenberg Lundgren, M., Jawad, R., Danielsson, O., & Björnstedt, M. (2019). The cell culture medium affects growth, phenotype expression and the response to selenium cytotoxicity in A549 and HepG2 cells. *Antioxidants*, 8(5), 130. <https://doi.org/10.3390/antiox8050130>.
6. Arora, M. (2013). Cell culture media: A review. *Materials and Methods*, 3, 175.
7. Arsenijevic, Y., Villemure, J. G., Brunet, J. F., Bloch, J. J., Déglon, N., Kostic, C., Zurn, A., & Aebischer, P. (2001). Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Experimental Neurology*, 170(1), 48-62. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7691>.
8. Bee, C., Abdiche, Y. N., Pons, J., & Rajpal, A. (2013). Determining the binding affinity of therapeutic monoclonal antibodies towards their native unpurified antigens in human serum. *PLoS One*, 8(11), e80501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080501>.
9. Bhalani, D. V., Nutan, B., Kumar, A., & Chandel, A. S. (2022). Bioavailability enhancement techniques for poorly aqueous soluble drugs and therapeutics. *Biomedicines*, 10(9), 2055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>.
10. Boden, K., Wolf, K., Hermann, B., & Frangoulidis, D. (2015). First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(5), 1017-1022. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2321-1>.
11. Budi, N. Y. P., Lai, W.-Y., Huang, Y.-H., & Ho, H.-N. (2024). 3D organoid cultivation improves the maturation and functional differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12, 1361084. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1361084>.
12. Cacciamali, A., Villa, R., & Dotti, S. (2022). 3D cell cultures: Evolution of an ancient tool for new applications. *Frontiers in Physiology*, 13, 836480. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.836480>.
13. Capella Roca, B., Lao, N., Barron, N., Doolan, P., & Clynes, M. (2019). An arginase-based system for selection of transfected CHO cells without the use of toxic chemicals. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49), 18756-18768. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011162>.
14. Capricorn Scientific. (s. d.). *Adult Bovine Serum (ABS)*. Récupéré de <https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/adult-bovine-serum-abs~p925>

15. Cardoso, B. D., Castanheira, E. M. S., Lanceros-Méndez, S., & Cardoso, V. F. (2023). Recent advances on cell culture platforms for in vitro drug screening and cell therapies: From conventional to microfluidic strategies. *Advanced Healthcare Materials*, 12(18), 2202936. <https://doi.org/10.1002/adhm.202202936>.
16. Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *Journal of Experimental Medicine*, 15(5), 516-528. <https://doi.org/10.1084/jem.15.5.516>.
17. Çelik-Uzuner, S., & Uzuner, U. (2017). An extensive method for maintenance of sterility in mammalian cell culture laboratory routine. *Challenges*, 8(2), 26. <https://doi.org/10.3390/challe8020026>.
18. Centre collégial de développement de matériel didactique. (n.d.). *Le monde en images*. <https://monde.ccdmd.qc.ca/>.
19. Chase, L. G., Lakshmipathy, U., Solchaga, L. A., Rao, M. S., & Vemuri, M. C. (2010). A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/scrt8>.
20. Chaudhry, R., & Varacallo, M. (2023). Biochemistry, glycolysis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
21. Chelladurai, K. S., Selvan Christyraj, J. D., Rajagopalan, K., Yesudhasan, B. V., Venkatachalam, S., Mohan, M., Vasantha, N. C., & Retnaraj Samuel, J. (2021). Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon*, 7(8), e07686. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>.
22. Chiroque, R. G. S., Santiago, H. P. C., Espinoza, L. E., Quispe, L. A. M., Tirado, L. R. P., Villegas, L. M. N., & Villegas, M. A. N. (2023). *A review of slaughterhouse blood and its compounds, processing and application in the formulation of novel non-meat products*. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 11(2), 706-719. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.11.2.06>
23. Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*, 9, e11165. <https://doi.org/10.7717/peerj.11165>.
24. Cuesta-Gomez, N., Verhoeff, K., Dadheech, N., Dang, T., Jasra, I. T., Bermudez de Leon, M., Pawlick, R., Marfil-Garza, B., Anwar, P., Razavy, H., Zapata-Morin, P. A., Jickling, G., Thiesen, A., O’Gorman, D., Kallos, M. S., & Shapiro, A. M. J. (2023). Suspension culture improves iPSC expansion and pluripotency phenotype. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03382-9>.
25. Demirden, S. F., Kimiz-Gebologlu, I., & Öncel, S. S. (2024). Animal cell lines as expression platforms in viral vaccine production: A post COVID-19 perspective. *ACS Omega*, 9(15), 16904-16926. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10484>.
26. Dong, N., Xue, C., Yang, Y., Chang, Y., Wang, Y., Guo, H., Liu, Y., & Wang, Y. (2023). *Auxenochlorella pyrenoidosa* extract supplementation replacing fetal bovine serum for *Carassius auratus* muscle cell culture under low-serum conditions. *Food Research International*, 164, 112438. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112438>.
27. Duarte Rojas, J. M., Restrepo Múnera, L. M., & Estrada Mira, S. (2024). Comparison between platelet lysate, platelet lysate serum, and fetal bovine serum as supplements for cell culture, expansion, and cryopreservation. *Biomedicines*, 12(1), 140. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010140>.

28. Department of Health and Social Care. (2021, November). *Prions and proteopathic seeds: Safe working and the prevention of infection - Part 3: Laboratory containment and control measures*. UK Government. <https://assets.publishing.service.gov.uk/media/629751ad8fa8f50390d44ffd/laboratory-containment-and-control-measures-updated-nov2021.pdf>.
29. Eisenberg, H., Hütker, S., Berger, F., & Lang, I. (2025). Native proteins from *Galdieria sulphuraria* to replace fetal bovine serum in mammalian cell culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 109, Article 119. <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13507-0>.
30. El Harane, S., Zidi, B., El Harane, N., Krause, K.-H., Matthes, T., & Preynat-Seauve, O. (2023). Cancer spheroids and organoids as novel tools for research and therapy: State of the art and challenges to guide precision medicine. *Cells*, 12(7), 1001. <https://doi.org/10.3390/cells12071001>.
31. Elliott, R. L., & Jiang, X.-P. (2019). The adverse effect of gentamicin on cell metabolism in three cultured mammary cell lines: “Are cell culture data skewed?” *PLoS ONE*, 14(4), e0214586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214586>.
32. El-Mallawany, R. (2024). *Ultraviolet absorption spectra of some tellurite glasses*. In *The Physics of Advanced Optical Materials: Tellurite Glasses* (pp. 39-49). Springer.
33. Eppendorf. (2022, January 10). *How do cells cultured in 2D and 3D differ? A dimension shift*. Eppendorf Lab Academy. <https://www.eppendorf.com/be-en/lab-academy/life-science/cell-biology/how-do-cells-cultured-in-2d-and-3d-differ-a-dimension-shift/>.
34. Fang, Z., Lyu, J., Li, J., Li, C., Zhang, Y., Guo, Y., Wang, Y., Zhang, Y., & Chen, K. (2022). Application of bioreactor technology for cell culture-based viral vaccine production: Present status and future prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 921755. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.921755>.
35. Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., & Pointis, G. (2004). Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*, 18(3), 413-421. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.01.002>.
36. Freshney, R. I. (2016). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
37. Fujisawa, K., Hara, K., Takami, T., Okada, S., Matsumoto, T., Yamamoto, N., ... Sakaida, I. (2018). Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 93. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0825-1>.
38. Gaudin, M. (2023). *Isolement de PBMC au Ficoll*. BioMolTech - Wiki des méthodes de biologie moléculaire et cellulaire. <https://tice.agrocampus-ouest.fr/mod/glossary/showentry.php?eid=1417>.
39. Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R. W., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., & Vias, M. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*, 111(6), 1021-1046. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>.
40. Gibco™. (s.d.). *Glucose Solution (200 g/L) [Produit]*. Thermo Fisher Scientific. <https://www.fishersci.com/shop/products/gibco-glucose-solution/A2494001>.

41. Giommetti, A., & Papanikolaou, E. (2024). Advancements in hematopoietic stem cell gene therapy: A journey of progress for viral transduction. *Cells*, 13(12), 1039. <https://doi.org/10.3390/cells13121039>.
42. Goffard, A. (2011). Culture cellulaire et virologie. Intérêts et applications de la culture cellulaire en virologie. *EMC - Biologie Médicale*, 6(2), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0000-0000\(11\)55409-9](https://doi.org/10.1016/S0000-0000(11)55409-9).
43. Gong, S., Fajar, P., De Vries-Idema, J., & Huckriede, A. (2023). Comparison of media for a human peripheral blood mononuclear cell-based in vitro vaccine evaluation system. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 12(4), 328-336. <https://doi.org/10.7774/cevr.2023.12.4.328>.
44. Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX*, 20(4), 275-281.
45. Guo, C. Y., Huang, Y. H., Wei, S. N., Ouyang, Z. L., Yan, Y., Huang, X. H., & Qin, Q. W. (2015). Establishment of a new cell line from the heart of giant grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and its application in toxicology and virus susceptibility. *Journal of Fish Diseases*, 38(2), 175-186. <https://doi.org/10.1111/jfd.12221>.
46. Hanna, M., Jaqua, E., Nguyen, V., & Clay, J. (2022). B vitamins: Functions and uses in medicine. *The Permanente Journal*, 26(2), 89-97. <https://doi.org/10.7812/TPP/21.204>.
47. Harboe, N. (1956). *Production of serum from small amounts of blood*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 8(1), 71-72. <https://doi.org/10.3109/00365515609049246>
48. Hashmi, A. W., Mali, H. S., Meena, A., & Buddhi, D. (2022). A newly developed coal-ash-based AFM media characterization for abrasive flow finishing of FDM printed hemispherical ball shape. *International Journal on Interactive Design and Manufacturing (IJIDeM)*, 17(4), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12008-022-00982-2>
49. Hassan, S. N., & Ahmad, F. (2020). The relevance of antibiotic supplements in mammalian cell cultures: Towards a paradigm shift. *Gulhane Medical Journal*, 62(4), 224-230. <https://doi.org/10.4274/gulhane.galenos.2020.871>.
50. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9).
51. Hima, R. M., Djibo, A. K., Moussa, I., Saley, A. E., & Gambo, S. (2024). Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial activity of *Terminalia avicennioides* (Guill. & Perr.) leaf extracts on the bacteria involved in common infections in Niger. *Research Journal of Medicinal Plants*, 18(1), 32-40. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2024.32.40>.
52. Ikasari, B. N., Alfarizi, S., Fauziyah, S., & Wardhani, P. (2022). Effect of fetal bovine serum concentration towards Vero cells growth on culture in DMEM medium. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 11(2), 73-77. <https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v11i2.313>
53. Imamoto, Y., Tanaka, H., Takahashi, K., Konno, Y., & Suzawa, T. (2012). Advantages of AlaGln as an additive to cell culture medium: Use with anti-CD20 chimeric antibody-producing POTELLIGENT™ CHO cell lines. *Cytotechnology*, 65(1), 135-143. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9468-8>.

54. Institut national de recherche et de sécurité (INRS). (2016, janvier 30). *Culture cellulaire : quelles cellules et comment les manipuler ?* Réseau Ressource Risque Biologique (3RB). https://www.esst-inrs.fr/3rb/afftexte.php?p1=culture_cellulaire.
55. ITW Reagents. (n.d.). *HEPES for cell culture (Ref: A3268)*. <https://www.itwreagents.com/france/fr/product/hepes-for-cell-culture/A3268>.
56. Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>.
57. Jiang, L. (2010). *Alexis Carrel's tissue culture techniques*. The Embryo Project Encyclopedia. <https://embryo.asu.edu/pages/alexis-carrels-tissue-culture-techniques>.
58. Kaiser, D., Otto, N. M., McCallion, O., Hoffmann, H., Zarrinrad, G., Stein, M., Beier, C., Matz, I., Herschel, M., Hester, J., Moll, G., Issa, F., Reinke, P., & Roemhild, A. (2021). Freezing medium containing 5% DMSO enhances the cell viability and recovery rate after cryopreservation of regulatory T cell products ex vivo and in vivo. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, Article 750286. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.750286>.
59. Kelley, B. (2024). The history and potential future of monoclonal antibody therapeutics development and manufacturing in four eras. *mAbs*, 16(1), 2373330. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2373330>.
60. Keskin, S. Y., Avcı, A., & Kurnia, H. F. F. (2024). *Analyses of phytochemical compounds in the flowers and leaves of Spiraea japonica var. fortunei using UV-VIS, FTIR, and LC-MS techniques*. *Heliyon*, 10(3), e25496. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25496>.
61. Koh, E.-J., Heo, S.-Y., Park, A., Lee, Y.-J., Choi, W.-Y., & Heo, S.-J. (2024). Serum-free medium supplemented with *Haematococcus pluvialis* extracts for the growth of human MRC-5 fibroblasts. *Foods*, 13(18), 3012. <https://doi.org/10.3390/foods13183012>.
62. Labster. (s. d.). *Les conditions physico-chimiques*. <https://theory.labster.com/fr/physico-chemical-conditions/>.
63. Lebedev, T., Mikheeva, A., Gasca, V., Spirin, P., & Prassolov, V. (2025). Systematic comparison of FBS and medium variation effect on key cellular processes using morphological profiling. *Cells*, 14(5), 336. <https://doi.org/10.3390/cells14050336>.
64. Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., Choi, J. S., Kim, G.-D., Joo, S. T., Choi, I., & Hur, S. J. (2022). Review of the current research on fetal bovine serum and the development of cultured meat. *Food Science of Animal Resources*, 42(5), 775-799. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>.
65. Lee, J., Ortega-Rodriguez, U., Madhavarao, C. N., Ju, T., O'Connor, T., Ashraf, M., & Yoon, S. (2025). Effect of different cell culture media on the production and glycosylation of a monoclonal antibody from a CHO cell line. *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-025-00733-7>.
66. Li, J., Sun, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., & Liu, F. (2022). Comparison of karyotyping and NIPT in fetuses with isolated increased nuchal translucency. *Journal of Human Genetics*, 67(10), 887-894. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01041-0>.
67. Lu, S., Kakongoma, N., Hu, W., Zhang, Y., Yang, N., Zhang, W., Mao, A., Liang, Y., & Zhang, Z. (2023). Detection rates of abnormalities in over 10,000 amniotic fluid samples at a single laboratory. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 23, 102. <https://doi.org/10.1186/s12884-023-05428-5>.

68. Lundstrom, K. (2023). Viral vectors in gene therapy: Where do we stand in 2023? *Viruses*, 15(3), 698. <https://doi.org/10.3390/v15030698>.
69. Lyapun, I. N. (2021). Biological aspects of cell culture security in vitro. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 36(3), 119-124. <https://doi.org/10.3103/S0891416821030034>.
70. Lyon, P., Strippoli, V., Fang, B., & Cimmino, L. (2020). B vitamins and one-carbon metabolism: Implications in human health and disease. *Nutrients*, 12(9), 2867. <https://doi.org/10.3390/nu12092867>.
71. Machida, S., & Booth, F. W. (2004). Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: Implication for satellite cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), 337-340. <https://doi.org/10.1079/PNS2004354>.
72. Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 315-319. <https://doi.org/10.1038/nrc775>.
73. Medina-Leyte, D. J., Domínguez-Pérez, M., Mercado, I., Villarreal-Molina, M. T., & Jacobo-Albavera, L. (2020). Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. *Applied Sciences*, 10(3), 938. <https://doi.org/10.3390/app10030938>.
74. Michl, J., Park, K. C., & Swietach, P. (2019). Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Communications Biology*, 2, 144. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7>.
75. Mirasol, F. (2021). Recombinant supplements offer lower risk of cell culture contamination. *BioPharm International*, 34(5), 24-27.
76. Moore, G. E., Gerner, R. E., & Franklin, H. A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *JAMA*, 199(8), 519-524.
77. Mortaud, S., Mérése, S., & Larrigaldie, V. (2023). Intérêts des cultures in vitro de cellules souches et d'organoïdes dans le cadre d'études toxicologiques. *INRAE Productions Animales*, 36(2), 7684. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2023.36.2.7684>.
78. Mukherjee, S., Malik, P., & Mukherjee, T. K. (2023). Common reagents and medium for mammalian cell culture. Dans *Practical Approach to Mammalian Cell and Organ Culture* (pp. 137-185). Springer.
79. Müller, P., et al. (2021). Single-cell physical phenotyping of mechanically dissociated tissue biopsies for rapid diagnostic assessment. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.30.21267075>.
80. Nair, D. G., & Weiskirchen, R. (2024). Advanced in vitro models for preclinical drug safety: Recent progress and prospects. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(1), 7. <https://doi.org/10.3390/cimb47010007>.
81. Ng, J. Y., Chua, M. L., Zhang, C., Hong, S., Kumar, Y., Gokhale, R., & Ee, P. L. R. (2020). *Chlorella vulgaris* extract as a serum replacement that enhances mammalian cell growth and protein expression. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 564667. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.564667>.
82. Oprea, D., Crisan, D., & Enache, A. (2025). Polyphenolic extracts from green vegetables as promoters of fibroblast viability and reducers of oxidative stress. *Food Science & Nutrition*, 13(5), e70230. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70230>.

83. Pai, M., Zwerling, A., & Menzies, D. (2008). Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An update. *Annals of Internal Medicine*, 149(3), 177-184. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00241>.
84. Paiva, P. M. G., Pontual, E. V., Coelho, L. C. B. B., & Napoleão, T. H. (2013). Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education* (pp. 641-649). Formatex Research Center.
85. Palmer, T. D., Takahashi, J., & Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 8(6), 389-404. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0595>.
86. Pamies, D., Leist, M., Coecke, S., Bowe, G., Allen, D. G., Gstraunthaler, G., Bal-Price, A., Pistollato, F., de Vries, R. B. M., Hogberg, H. T., Hartung, T., & Stacey, G. (2022). Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0). *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 39, 30-70. <https://doi.org/10.14573/altex.2111011>.
87. Park, C. H., Park, J. H., & Suh, Y. J. (2024). Perspective of 3D culture in medicine: Transforming disease research and therapeutic applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1491669. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1491669>.
88. Péry, E. (2007). Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancers [Thèse de doctorat, Université Paris-Sud]. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/figure/Schema-de-principe-du-protocole-de-mise-en-culture-des-cellules-tumorales-AY27-Les_fig58_30518483.
89. Petrović, D. J., Jagečić, D., Krsić, J., Sinčić, N., & Mitrečić, D. (2023). Effect of fetal bovine serum or basic fibroblast growth factor on cell survival and proliferation of neural stem cells: The influence of homocysteine treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14161. <https://doi.org/10.3390/ijms241814161>.
90. Pilgrim, C. R., McCahill, K. A., Rops, J. G., Dufour, J. M., Russell, K. A., & Koch, T. G. (2022). A review of fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stromal cells and potential alternatives for veterinary medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 859025. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859025>.
91. Proliant Health & Biologicals. (s. d.). *Newborn bovine calf serum*. <https://www.proliantbiologicals.com>.
92. Rani, U., Singh, M., Saith, A., Jain, S. L., Aggarwal, A., & Aggarwal, S. (2022). Evaluation of use of RPMI medium to preserve cell morphology for pleural/peritoneal fluid cytology. *Journal of Cytology*, 39(1), 26-29. https://doi.org/10.4103/joc.joc_130_21.
93. Ranjan, S., Pandey, P., Setya, D., & Kumari, S. (2023). A prospective observational study to compare ABO isoagglutinin titer by conventional test tube and column agglutination technique after heat inactivation of plasma in O blood group individuals. *Indian Journal of Transplantation*, 17(1), 74-81. https://doi.org/10.4103/ijot.ijot_62_21.

94. Richter, M., Piwocka, O., Musielak, M., Piotrowski, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2021). From donor to the lab: A fascinating journey of primary cell lines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 711381. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711381>.
95. Roswell Park Comprehensive Cancer Center. (2022). Timeline, 1950s-1960s. <https://www.roswellpark.org/about-us/history/1950s-1960s>.
96. Roth, J. S., Lee, T. D., Cheff, D. M., Gosztyla, M. L., Asawa, R. R., Danchik, C., Michael, S., Simeonov, A., Klumpp-Thomas, C., Wilson, K. M., & Hall, M. D. (2020). Keeping it clean: The cell culture quality control experience at the National Center for Advancing Translational Sciences. *SLAS Discovery*, 25(5), 491-497. <https://doi.org/10.1177/2472555220911451>.
97. Ryu, A. H., Eckalbar, W. L., Kreimer, A., Yosef, N., & Ahituv, N. (2017). Use antibiotics in cell culture with caution: Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Scientific Reports*, 7(1), 7533. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07757-w>.
98. Salazar, A., Keusgen, M., & von Hagen, J. (2016). Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino Acids*, 48(5), 1161-1171. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2181-8>.
99. Sedlář, A., Trávníčková, M., Matějka, R., Pražák, Š., Mészáros, Z., Bojarová, P., Bačáková, L., Křen, V., & Slámová, K. (2021). Growth factors VEGF-A165 and FGF-2 as multifunctional biomolecules governing cell adhesion and proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1843. <https://doi.org/10.3390/ijms22041843>.
100. Segeritz, C.-P., & Vallier, L. (2017). Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 151-172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>.
101. Sigma-Aldrich. (n.d.). *Site officiel*. <https://www.sigmaaldrich.com>.
102. Singh, H., Kumar, S., & Arya, A. (2024). *Evaluation of antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties of GC/MS analysis of extracts of Ajuga integrifolia Buch.-Ham. leaves*. *Scientific Reports*, 14, Article 16754. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67133-3>
103. Smith, J. A., & Nguyen, T. H. (2023). Advances in cell culture and biotechnology: Transforming biomedical research. *Trends in Biotechnology*, 41(4), 345-359. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.007>
104. Sous le microscope. (s.d.). *Le sang et ses composants*. <https://souslemicroscope.com/le-sang-et-ses-composants/>.
105. Stoll, S. W., Stuart, P. E., Swindell, W. R., Tsoi, L. C., Li, B., Gandarillas, A., Lambert, S., Johnston, A., Nair, R. P., & Elder, J. T. (2016). The EGF receptor ligand amphiregulin controls cell division via FoxM1. *Oncogene*, 35(16), 2075-2086. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.269>.
106. Talebipour, A., Saviz, M., Vafaiee, M., & Faraji-Dana, R. (2024). Facilitating long-term cell examinations and time-lapse recordings in cell biology research with CO₂ mini-incubators. *Scientific Reports*, 14, 3418. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52866-y>.
107. Thermo Fisher Scientific Inc. (2020). *Cell culture basics handbook*. Gibco (Thermo Fisher Scientific).

108. Thermo Fisher Scientific. (2024). *Gibco™ Fetal Bovine Serum, certified, US origin*. Retrieved from <https://www.fishersci.com/shop/products/gibco-fetal-bovine-serum-certified-us-origin-standard-sterile-filtered-3/16000044>.
109. Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Site officiel*. <https://www.thermofisher.com>.
110. Thiaux, Z. (2019). *Développement de méthodes d'extraction et d'analyse de molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire* [Thèse de doctorat, Université de Strasbourg]. HAL. <https://theses.hal.science/tel-02988305v1>.
111. Van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal bovine serum (FBS): Past - present - future. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 35(1), 99-118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>.
112. Vaskevičius, M., Kapočiūtė-Dzikienė, J., & Šlepikas, L. (2022). Modeling of the crystallization conditions for organic synthesis product purification using deep learning. *Electronics*, 11(9), 1360. <https://doi.org/10.3390/electronics11091360>.
113. Wang, H., Brown, P. C., Chow, E. C. Y., Ewart, L., Ferguson, S. S., Fitzpatrick, S., Freedman, B. S., Guo, G. L., Hedrich, W., Heyward, S., Hickman, J., Isoherranen, N., Li, A. P., Liu, Q., Mumenthaler, S. M., Polli, J., Proctor, W. R., Ribeiro, A., Wang, J. Y., Wange, R. L., & Huang, S. M. (2021). 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. *Clinical and Translational Science*, 14(5), 1659-1680. <https://doi.org/10.1111/cts.13066>.
114. Wang, X., Li, Y., Zhang, Z., & Liu, J. (2025). Recent advances in 3D cell culture models in cancer drug development. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 23(1), 45-58. <https://doi.org/10.1007/s40005-025-00740-y>.
115. Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2023). A beginner's guide to cell culture: Practical advice for preventing needless problems. *Cells*, 12(5), 682. <https://doi.org/10.3390/cells12050682>.
116. Weiss, A., & Attisano, L. (2013). The TGFβ superfamily signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(1), 47-63. <https://doi.org/10.1002/wdev.86>.
117. Whitford, W., & Manwaring, J. (2007). Lipids in cell culture media. In *Application-specific technical information—Application notes* (pp. 152-154). Thermo Scientific HyClone.
118. Wróblewska, J., Nuskiewicz, J., Wróblewski, M., Wróblewska, W., & Woźniak, A. (2024). Selected trace elements and their impact on redox homeostasis in eye health. *Biomolecules*, 14(11), 1356. <https://doi.org/10.3390/biom14111356>.
119. Xiao, S., Li, Q., Jiang, J., Huo, C., Chen, H., & Guo, M. (2023). Rapid identification of Chinese hamster ovary cell apoptosis and its potential role in process robustness assessment. *Bioengineering*, 10(3), 357. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030357>.
120. Yako, H., Niimi, N., Kato, A., Takaku, S., Tatsumi, Y., Nishito, Y., Kato, K., & Sango, K. (2021). Role of pyruvate in maintaining cell viability and energy production under high-glucose conditions. *Scientific Reports*, 11(1), 18910. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98082-w>.

121. Yan, Y., Xia, X., Fatima, A., Zhang, L., Yuan, G., Lian, F., & Wang, Y. (2024). *Antibacterial activity and mechanisms of plant flavonoids against gram-negative bacteria based on the antibacterial statistical model. Pharmaceuticals*, 17(3), 292. <https://doi.org/10.3390/ph17030292>.
122. Yang, B., Liu, Y., & Steinacker, J. M. (2023). α -Ketoglutarate stimulates cell growth through the improvement of glucose and glutamine metabolism in C2C12 cell culture. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1145236. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1145236>.
123. Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 99-117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>.
124. Yu, I. S., Choi, S. Y., Choi, J., Kim, M. K., Um, M. Y., Ahn, J. H., & Kim, M. J. (2024). Grifola frondosa extract as a fetal bovine serum supplement for the culture of bovine muscle satellite cells under low serum conditions. *Food Research International*, 177, 115173. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115173>.
125. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
126. Zhang, J., Robinson, D., & Salmon, P. (2006). A novel function for selenium in biological system: Selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6), 1188-1197. <https://doi.org/10.1002/bit.21081>.
127. Zhitkovich, A. (2021). Ascorbate: Antioxidant and biochemical activities and their importance for in vitro models. *Archives of Toxicology*, 95(12), 3623-3631. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03167-0>.
128. Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhao, K., Chen, Q.-J., Deng, F., Liu, L.-L., Yan, B., Zhan, F.-X., Wang, Y.-Y., Xiao, G.-F., & Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

Résumés

Manufacturing processes of reagents for use in animal cell culture: culture media and additives

Abstract:

Cell culture is an essential technique in the biomedical field, allowing the study of cells outside their original organism in controlled environments. In this context, our work focused on the manufacturing processes of reagents intended for the culture of animal cells, particularly culture media and additives.

Our work is divided into two parts: a bibliographic study and an experimental part. In the first part, we explored the fundamentals of cell culture, the different types of cultures particularly primary and secondary cultures as well as standard media used, such as RPMI-1640. We also studied essential additives such as serum, growth factors, and antibiotics, analyzing their impact on cell growth *in vitro*.

The second part is dedicated to an experimental approach in which we prepared bovine serum in the laboratory and evaluated a plant extract as a natural alternative in culture media. The objective was to reduce the use of synthetic antibiotics by exploring more sustainable and ethical solutions. Our results show that the serum, after separation and heat treatment, displays physicochemical and biological characteristics that meet the required standards for cell culture. Moreover, the plant extract, derived from a medicinal plant commonly used in Algeria, appears to offer promising potential due to its antimicrobial activity and low cytotoxicity on Vero cells, a cell line used in our study.

We proposed innovative solutions to improve cell culture practices by integrating natural alternatives and minimizing the risks associated with conventional chemical products. This work is part of an ethical and sustainable approach, while contributing to both fundamental and applied research in the field of biotechnology.

Keywords: cell culture, culture media, additives, antimicrobial activity, bovine serum.

عمليات تصنيع الكواشف المخصصة لاستخدامها في زراعة الخلايا الحيوانية: الأوساط الزراعية والمضافات

الملخص:

تُعدّ زراعة الخلايا تقنية أساسية في المجال الطبي الحيوي، حيث تتيح دراسة الخلايا خارج كائنها الأصلي ضمن بيئات محكمة ومراقبة. وفي هذا السياق، ركّزنا في عملنا على عمليات تصنيع الكواشف المخصصة لزراعة الخلايا الحيوانية، لا سيما أوساط الزرع والإضافات المستخدمة فيها. ينقسم عملنا إلى جزئين: دراسة نظرية وأخرى تجريبية.

في الجزء الأول، استعرضنا الأسس العلمية لزراعة الخلايا، والأنواع المختلفة من الزراعات، لا سيما الزراعات الأولية والثانوية، بالإضافة إلى الأوساط القياسية المعتمدة مثل وسط RPMI-1640 كما تطرّقنا إلى دراسة الإضافات الأساسية مثل المصل، وعوامل النمو، والمضادات الحيوية، من خلال تحليل تأثيرها على نمو الخلايا في البيئة المختبرية .

أما الجزء الثاني، فقد خُصّص للجانب التجريبي، حيث قمنا بتحضير مصل بقري داخل المخبر، وتقييم مستخلص نباتي كبديل طبيعي ضمن أوساط الزرع. وكان الهدف من ذلك تقليص الاعتماد على المضادات الحيوية الاصطناعية، من خلال البحث عن حلول أكثر استدامة وأخلاقية. وقد أظهرت نتائجنا أن المصل، بعد فصله ومعالجته حرارياً، يتمتع بخواص فيزيائية-كيميائية وبيولوجية تتوافق مع المعايير المطلوبة لزراعة الخلايا. كما أظهر المستخلص النباتي، المستخرج من نبتة طبية شائعة الاستخدام في الجزائر، إمكانات واعدة نظراً لنشاطه المضاد للميكروبات وانخفاض سميته الخلوية تجاه خلايا Vero ، وهي سلالة خلوية استخدمت في دراستنا.

وقد اقترحنا من خلال هذا العمل حلاً مبتكرة لتحسين ممارسات زراعة الخلايا، من خلال دمج بدائل طبيعية والحد من المخاطر المرتبطة بالمواد الكيميائية التقليدية. ويأتي هذا العمل في إطار مقارنة أخلاقية ومستدامة، مع مساهمة فعلية في البحث العلمي الأساسي والتطبيقي في مجال التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية: زراعة الخلايا، وسط الزرع، الإضافات، النشاط المضاد للميكروبات، المصل البقري.

...Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : CHADI Aya
Procédés de fabrication de réactifs destinés à une utilisation dans la réalisation de cultures de cellules animales : milieux de culture et additifs	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique	
<p>La culture cellulaire constitue une technique essentielle dans le domaine biomédical, permettant l'étude des cellules en dehors de leur organisme d'origine, dans des environnements contrôlés. Dans ce contexte, nous avons axé notre travail sur les procédés de fabrication de réactifs destinés à la culture de cellules animales, en particulier les milieux de culture et les additifs. Notre travail se divise en deux parties : une étude bibliographique et une partie expérimentale.</p> <p>Dans la première partie, nous avons exploré les fondements de la culture cellulaire, les différents types de cultures notamment les cultures primaires et secondaires ainsi que les milieux standards utilisés, tels que le RPMI 1640. Nous avons également étudié les additifs essentiels comme le sérum, les facteurs de croissance et les antibiotiques, en analysant leur impact sur la croissance des cellules <i>in vitro</i>.</p> <p>La seconde partie est consacrée à une démarche expérimentale dans laquelle nous avons préparé un sérum bovin en laboratoire et évalué un extrait végétal comme alternative naturelle dans les milieux de culture. L'objectif était de réduire l'utilisation d'antibiotiques synthétiques en explorant des solutions plus durables et éthiques. Nos résultats montrent que le sérum, après séparation et traitement thermique, présente des caractéristiques physico-chimiques et biologiques conformes aux standards requis pour les cultures cellulaires. Par ailleurs, l'extrait végétal, issu d'une plante médicinale couramment utilisée en Algérie, semble présenter un potentiel intéressant en raison de son activité antimicrobienne et de sa faible cytotoxicité sur les cellules Vero, une lignée cellulaire utilisée dans notre étude.</p> <p>Nous avons proposé des solutions innovantes pour améliorer les pratiques en culture cellulaire, en intégrant des alternatives naturelles et en limitant les risques associés aux produits chimiques conventionnels. Ce travail s'inscrit dans une démarche éthique et durable, tout en apportant une contribution à la recherche fondamentale et appliquée dans le domaine des biotechnologies.</p>	
Mots-clefs : culture cellulaire, milieu de culture, additifs, activité antimicrobienne, sérum bovin.	
Laboratoires de recherche : Laboratoires de Culture Cellulaire et cytotoxicologie, de Phytothérapie et de Microbiologie (CRSP - Constantine)	
Président du jury : CHAOUI Naouel (PROF - Université Constantine 1 - Frères Mentouri). Encadrant : REZGOUN Mohamed Larbi (PROF - Université Constantine 1 - Frères Mentouri). Co-encadrant : BEKHOUCHE Khadidja (MR - CRSP - Constantine). Examineur : CHELLAT Djalila (PROF- Université Constantine 1 - Frères Mentouri).	