

Le celluloscope

Le journal des 1ères STL Biotechnologies

Lycée Notre Dame Fontenay le Comte



*Cellule de banane colorée à l'eau iodée
observée au microscope photonique*

Qu'est ce qu'une cellule ?	3
Histoire de la culture cellulaire	4
La culture cellulaire	5
Origine des cellules humaines utilisées au laboratoire	5
Types de culture cellulaire	5
Culture des cellules in vitro	5
Isolement cellulaire	5
La cellule au microscope	6
Visite du laboratoire	7
D'une anomalie à la maladie	8
La synthèse des protéines	8
La mucoviscidose	8
Enjeux et futur	9
Réglementations et enjeux de la culture cellulaire	9
Deux techniques de soins du futur	9
Les métiers de la recherche	10



Bonjour, je m'appelle **Cellula**.
Je vais vous guider à travers
ce journal.

Passport Recherche au lycée Notre Dame



De gauche à droite :
Sylvie Nzonga, Fabienne Haspot,
Irena, Clara, Marion, Julie, Sarah
Bruneau, Nathalie Viodé, Léandre,
Théo, Sébastien, Thomas.

Soutenue par la Région des Pays de la Loire et le Rectorat de Nantes, l'opération "Passport Recherche en Pays de la Loire" invite des jeunes lycéens à se lancer dans une démarche d'investigation et de production autour d'une problématique scientifique issue des laboratoires de recherche de la région.

Le passeport recherche du lycée associe la classe de 1ère STL/Biotechnologies, deux chercheuses, Mme Fabienne Haspot et Mme Sarah Bruneau de l'unité de recherche de l'INSERM UMR 1064 (centre de recherche en transplantation et en immunologie) et M. Yves Cossais, professionnel de la communication.

La thématique proposée par les chercheuses est :

"la cellule : un élément central du vivant et un outil incontournable de la recherche biomédicale".

Les élèves ont rencontré M. Y. Cossais en novembre 2016 pour établir les bases de la recherche documentaire, pour préparer la visite du laboratoire de l'INSERM et choisir un support de communication (ce journal).

Les chercheuses sont intervenues auprès de la classe en décembre pour approfondir la thématique de recherche proposée.

La classe a visité le laboratoire en janvier 2017. Les élèves ont rencontré deux intervenants extérieurs : Mme Macotta pour une présentation de l'hygiène et de la sécurité en laboratoire de recherche et M. Lebeau pour aborder les aspects

éthiques et réglementaires de l'utilisation d'échantillons humains à des fins de recherche. Les élèves ont pu interviewer des membres de l'équipe de recherche.

De janvier à mai, les élèves ont réalisé ce journal ainsi qu'une maquette de cellule eucaryote animale. Ils présenteront le résultat de leurs travaux lors de la journée de restitution le 16 mai 2017 à Angers.

Nathalie Viodé et Sylvie Nzonga, professeurs en Biotechnologies et CBSV

Lycée Notre Dame

29, rue Rabelais BP 10269

85205 Fontenay-Le-Comte

Tél : 02 51 69 19 33

Mail : ndfontenay@ndfontenay.com

Site Web : ndfontenay.paysdelaloire.e6lyco.fr

Professeurs encadrants :

Nathalie Viodé

Frédérique Marionneau

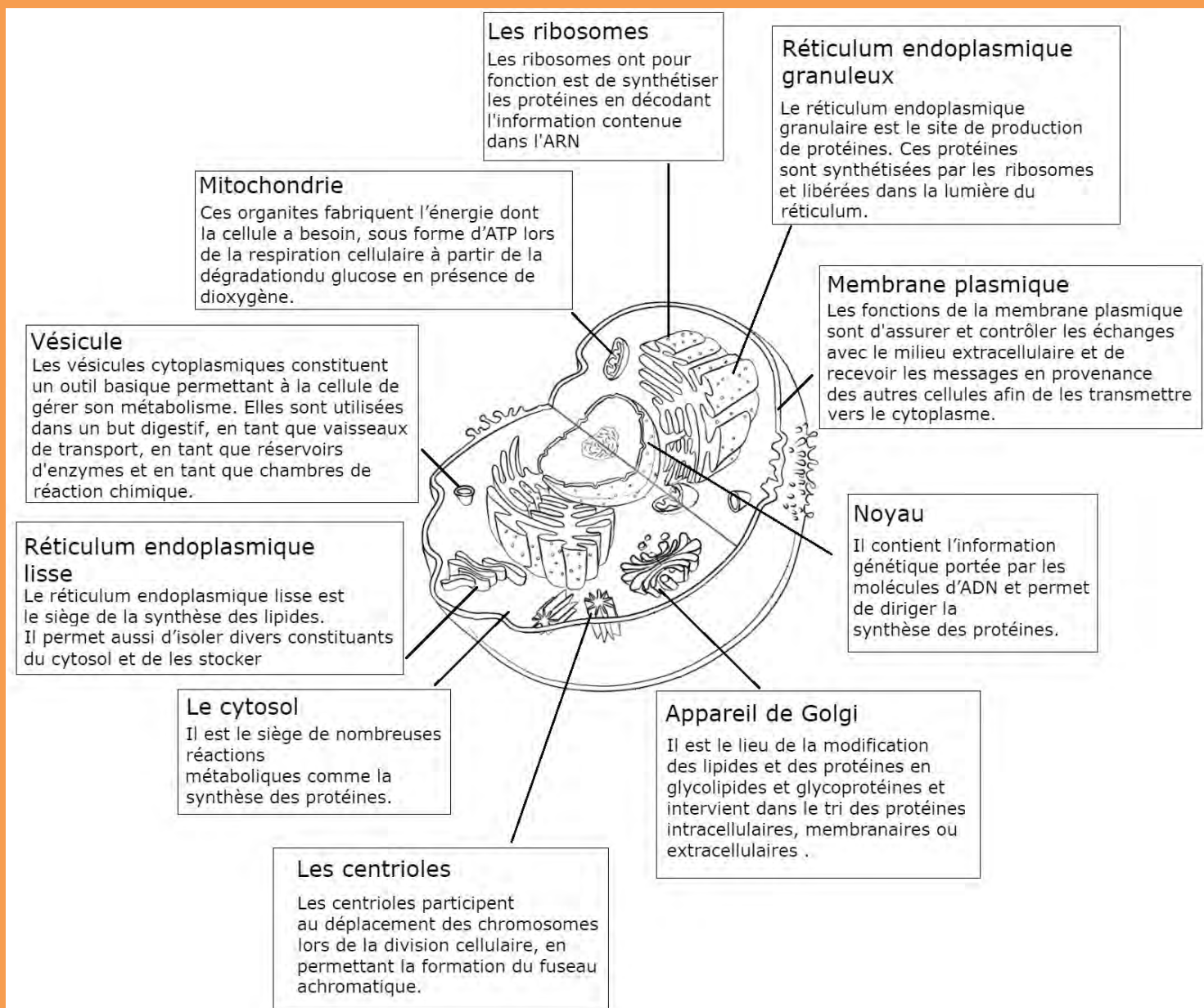
Sylvie Nzonga

Avec la participation de Christophe Brethomé, Armelle Jaffrenou et Christine Renaudet.





Ci-contre : maquette d'une cellule eucaryote animale, réalisée par les élèves de 1ère STL B.



La culture cellulaire est un processus complexe par lequel les cellules sont cultivées dans des conditions contrôlées, à l'extérieur de leur environnement naturel.

L'évolution historique et les méthodes de culture cellulaire sont étroitement liées à celles de la culture de tissus et la culture d'organes.

On appelle culture d'organe, le maintien en dehors de l'organisme, d'un organe ayant conservé sa structure et sa fonction (cœur perfusé).

On appelle culture de tissu, le maintien en dehors de l'organisme, d'un tissu de manière à conserver ses fonctions spécifiques.

On appelle culture cellulaire, le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capables de se diviser in-vitro et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques.

3 périodes vont marquer le développement de la culture cellulaire.

La période des précurseurs (1885, 1900). Cette période annonce la première méthode de culture de tissu en dehors du corps, grâce au Professeur Ross Harrison qui a pu cultiver des neuroblastes de grenouille dans un milieu de lymphes et ainsi franchit un premier pas vers la recherche actuelle sur les cellules souches et dérivées.

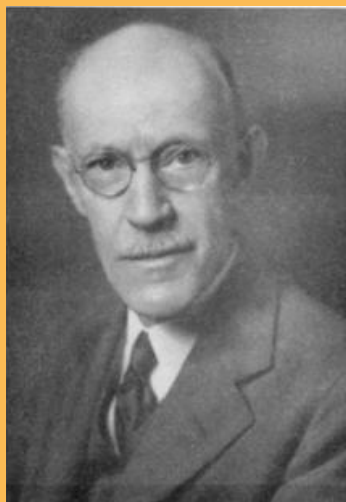
La période de la culture de tissus (à partir de 1902). Cette période est dominée par Alexis Carrel qui oriente le développement de la culture de tissus suivant 3 voies principales :

L'amélioration des techniques d'obtention des tissus.

L'élaboration des règles d'asepsie.

L'étude des besoins nutritionnels.

La culture cellulaire n'apparaît réellement qu'à partir de 1952 lors de l'introduction de la trypsinisation des tissus par Moscona. Il procède à la digestion de tissu d'embryon de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser in-vitro.



Ross Harrison
1870- 1959



Henrietta Laks
1920-1951



Fabienne Haspot



Georges Gey
1899-1970

Dates importantes :

1907 : Le professeur Ross Harrison a été le premier à cultiver artificiellement du tissu humain.

1951 : Prélèvement des cellules Hela (Henrietta Lacks) par George Gey.

1955 : Première mise au point du 1er milieu de culture chimique.

1961 : Mise en évidence de la durée de vie limitée des cellules.

1977 : Production de protéines grâce à des cellules en culture par Richard Axel.

1986 : Culture de cellules souches embryonnaires de souris.

1999 : Culture de cellules souches embryonnaires humaines.

Origine des cellules humaines utilisées au laboratoire

3 origines possibles:

- déchets opératoires (tumeurs, résection d'organes, de tissus, cordons ombilicaux): le consentement et l'information des donneurs ne sont pas obligatoires mais conseillés.
- prélèvements réalisés au cours d'examens médicaux : consentement éclairé des patients obligatoire.
- prélèvements réalisés uniquement pour la recherche : consentement éclairé des patients obligatoire.

Types de culture cellulaire

Cultures primaires

Pour les cellules primaires, c'est une biopsie (cellules prélevées d'un organe). On les dissocie (protéase), les isole et on les met dans les conditions physiologiques.

Le gros inconvénient de cette méthode c'est la mortalité des cellules et l'inhibition de contact. En effet, ces cellules ne peuvent se diviser qu'un certain nombre de fois (limité) dépendant du tissu et de la surface de la boîte de pétri. Mais on peut toujours passer cette inhibition en faisant un repiquage (cellules secondaires).

Les avantages sont que ce sont des cellules identiques aux cellules du tissu parental. Ce sont des cellules avec une fonction particulière et ce sont des cultures faciles.

Cultures de lignées cellulaires

Pour les lignées cellulaires les cellules sont immortelles ce sont des cultures de tumeurs spontanées ou de cellules modifiées gé-

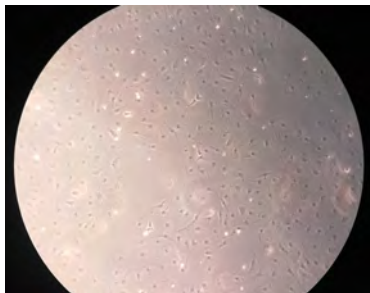
nétiquement par transformation en cellules cancéreuses. Ainsi il n'y a plus d'inhibition de contact.

Il existe différentes techniques variées pour immortaliser la cellule qu'on souhaite étudier : utilisation de virus ou utilisation de substances tumorigènes.

Les avantages sont que ces cellules se cultivent facilement et prolifèrent indéfiniment.

Les inconvénients sont qu'il y a des problèmes de ploïdie et une perte de caractéristiques de tissu parental.

Irena BROOKS et Clara CHARTRON, 1ère STLB.



Observation de cellules en culture au microscope inversé.



Isolement cellulaire

Isolement des lymphocytes T suivant un protocole du laboratoire de l'INSERM

- 1- Prélèvement
- 2- Sang + Ficoll et centrifugation : extraction des PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) par gradient de densité.

3-Isolement grâce à des billes magnétiques portant des anticorps spécifiques.

4-Pour isoler des lymphocytes T, il faut mélanger les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec des billes coâtées avec un anticorps anti-CD3.

5-Après une incubation à 4°C pendant 10-15 min, il faut laver et centrifuger ces PBMC puis reprendre le culot cellulaire dans une solution saline.

6-Placer le tube sur un portoir contenant un aimant et attendre 4 min.

7-Enlever le liquide qui contient les cellules ne nous intéressant pas.

8-Enlever le tube de l'aimant, laver les billes et les cellules et replacer le tube sur l'aimant pendant 4 min. Éliminer de nouveau le liquide et en remettre au frais.

9- Enlever le tube de l'aimant et récolter les lymphocytes T CD3+ .

Remarque sur l'utilisation des lymphocytes T au laboratoire de L'INSERM

On purifie beaucoup les lymphocytes T car ce sont ces cellules du système immunitaire qui reconnaissent le greffon comme étant étranger, ce sont donc ces cellules qu'on souhaite contrôler.

Lorsqu'on teste des molécules immunosuppressives, elles bloquent l'activation de ces lymphocytes T, leur prolifération et leur sécrétion de molécules pouvant détruire le greffon.

En isolant les lymphocytes T, on peut donc étudier spécifiquement l'action des molécules sur ces cellules cibles.

Irena BROOKS et Clara CHARTRON, 1ère STLB.



Isolement des cellules mononucléées par la technique au Ficoll

- Plasma
- Cellules mononucléées
- Ficoll
- Hématies

Purification des lymphocytes grâce à des billes coâtées avec un anticorps anti-CD3.



Culture des cellules in vitro

Un support de cultures approprié.

Travailler en conditions stériles : hotte à flux laminaire.

Un milieu de culture approprié (eau, ions minéraux, source d'azote, des acides gras, glucose, antibiotiques...).

Des conditions de culture adaptées (37°C, fort taux d'humidité,

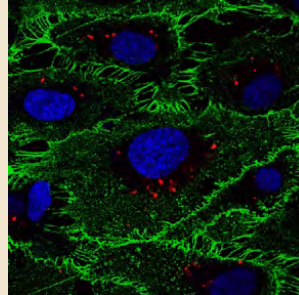


Hotte à flux laminaire.

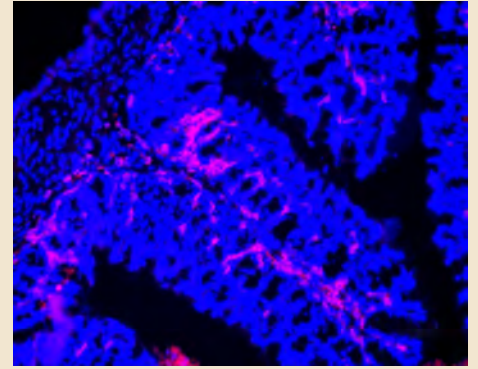
La microscopie à fluorescence



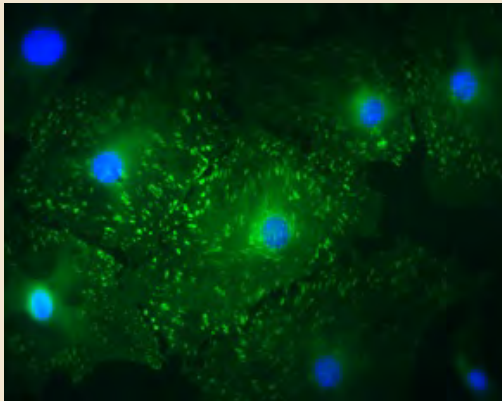
Salle de microscopie à fluorescence



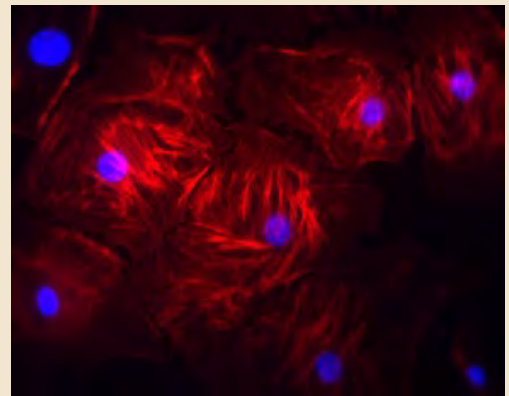
Marquage de la protéine CD31 (en vert), de microvésicules (en rouge) relarguées par des cellules immunitaires et mangées par des cellules endothéliales en culture (HUVEC) aux noyaux bleus.



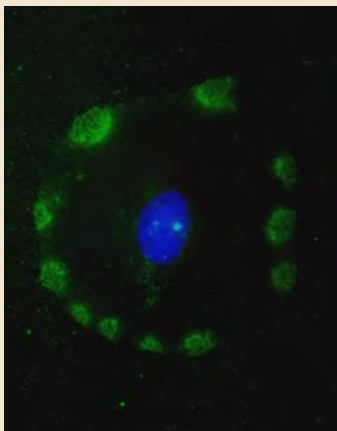
Mise en évidence d'un infiltrat lymphocytaire humain en rouge dans le côlon d'une souris immunodéficiente. Les noyaux des cellules du côlon de souris sont marqués en bleu.



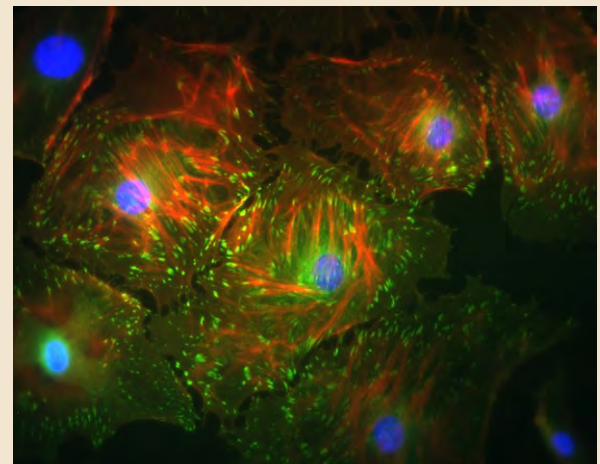
La vinculine est une protéine qui forme les points d'ancrage des podocytes à leur matrice extracellulaire. Ici, les podocytes adhèrent au fond de la boîte de pétri grâce à la vinculine. Marquage de la vinculine en vert.



L'actine-F est une protéine qui forme des microfilaments qui constituent le squelette de nos cellules. Marquage de l'actine-F en rouge et des noyaux en bleu sur des podocytes .

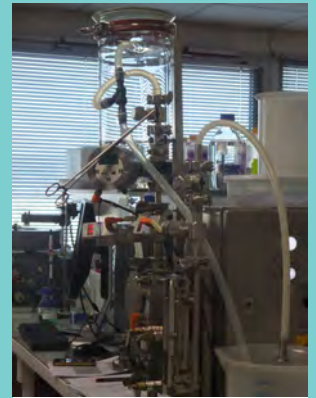


Marquage de la néphrine (en vert) et du noyau (en bleu) sur un podocyte en culture (cellule rénale spécialisée). Les podocytes sont les cellules du rein qui assurent la filtration du sang pour produire l'urine primitive. La néphrine est une protéine localisée dans des zones très spécifiques des podocytes (in vivo, à la jonction entre les prolongements cytoplasmiques de 2 podocytes), ou elle participe à la filtration du sang.



Superposition des deux images

Visite de l'unité de recherche Inserm UMR 1064 - Centre de recherche en transplantation et en immunologie



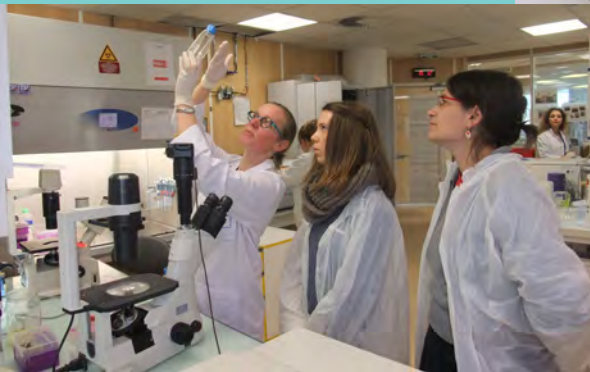
Bioréacteur : production de médicaments par les cellules



Observation de cellules en culture, au microscope inversé.



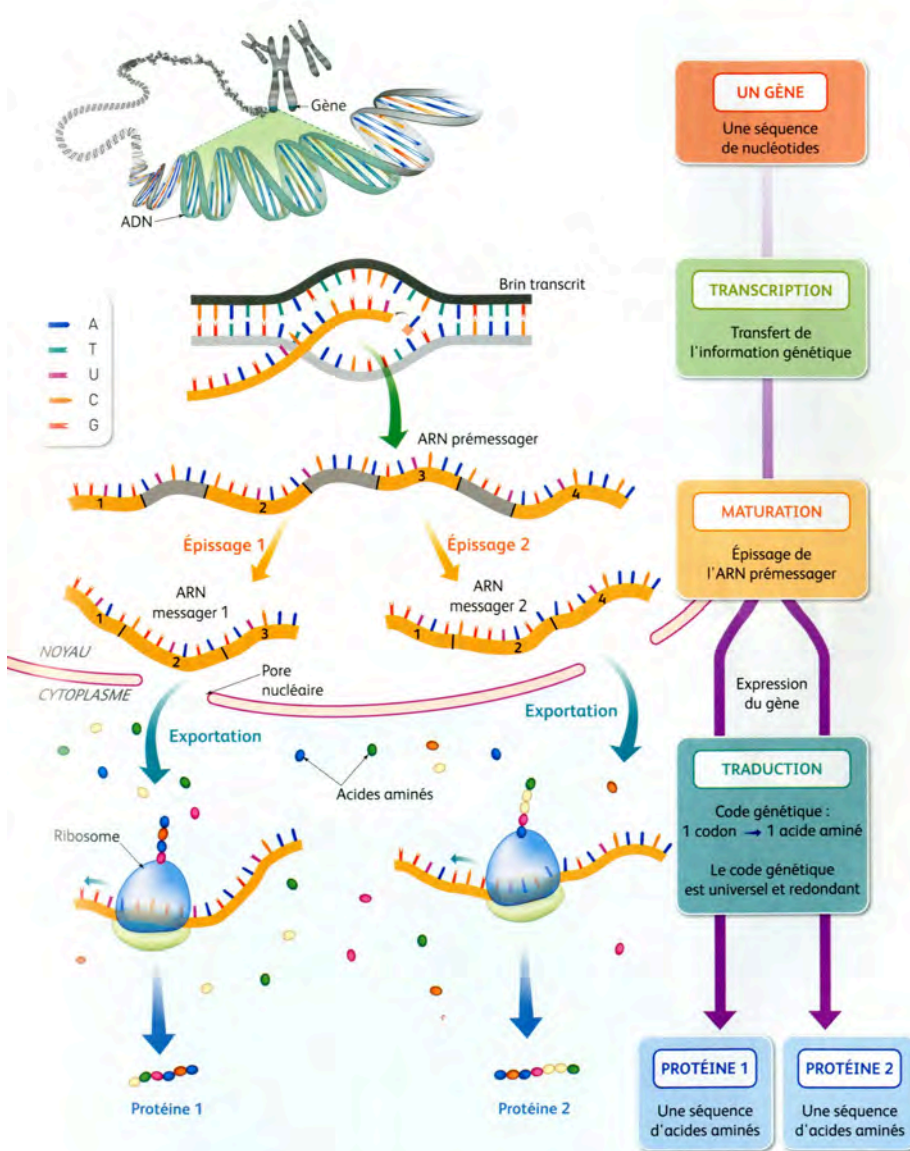
Séparation des lymphocytes sur Ficoll



De gauche à droite : Fabienne Haspot, Frédérique Marionneau, Thomas, Léandre, Sébastien, Théo, Sylvie Nzonza, Sarah Brunneau, Julie, Alice, Marion, Clara, Nathalie Viodé.



La synthèse des protéines



Quelques définitions:

Transcription : processus par lequel un brin complémentaire d'ARNmessenger est synthétisé à partir de l'un des deux brins d'ADN appelé brin transcrit.

Épissage : un même gène peut alors coder pour plusieurs protéines différentes.

Traduction : processus cytoplasmique par lequel l'information génétique portée par l'ARNmessenger est utilisée pour synthétiser les protéines.



La mucoviscidose

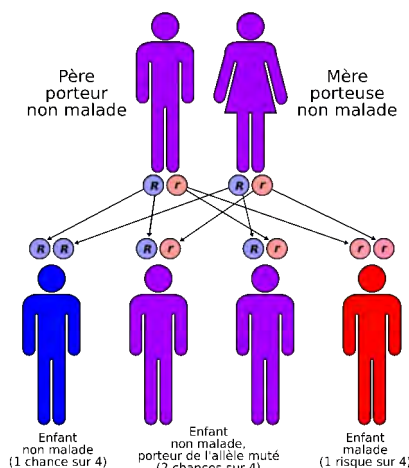
Les chercheurs s'intéressent à la mucoviscidose, qui est une maladie mortelle.

Qu'est ce que la mucoviscidose ?

La mucoviscidose est une maladie génétique qui se développe dès la naissance. Elle touche surtout les organes digestifs comme le pancréas et respiratoires comme les poumons. La mucoviscidose est caractérisée par l'épaississement des sécrétions de plusieurs organes, ce qui altère leur fonctionnement. Elle n'est pas contagieuse et elle n'affecte pas les capacités motrices et intellectuelles et peut toucher les deux sexes.

Les organes touchés :

Le pancréas : les sucs pancréatiques ne sont plus suf-



fisamment sécrétés ce qui conduit à une mauvaise absorption des graisses et des troubles nutritionnels.

Les poumons : la mucovis-

cidose provoque une obstruction des bronches ; elle favorise également les surinfections répétées.

formes qui se révèlent plus tardivement.

La transmission :

Les glandes sudoripares : il y a augmentation des ions chlorure dans la sueur.

Lorsque les deux parents sont porteurs d'une mutation responsable de la mucoviscidose, leur enfant a un risque sur 4 d'être atteint par la maladie. L'enfant atteint de mucoviscidose est donc porteur des mutations héréditaires de chacun des parents.

D'autres organes peuvent être atteints au cours de l'évolution de la maladie comme le foie et les voies biliaires.

Le diagnostic :

On la diagnostique le plus souvent dans l'enfance : à la naissance, lors des premiers mois de la vie ou encore avant 6 ans.

Cependant il existe des

Alice PICARD et Marion BROUILLARD, 1ère STLB.

Réglementations et enjeux de la culture cellulaire

La culture cellulaire permet de repousser les limites des techniques de soins par le biais de nouvelles recherches avec l'utilisation d'échantillons biologiques humains. Les manipulations de ces prélèvements sont soumises à des réglementations administratives, qui ont pour but entre autres de respecter la dignité de l'homme, cela s'appelle l'éthique.

Un enjeu de santé publique

L'utilisation d'échantillons biologiques humains est un réel enjeu de santé publique. Ces prélèvements permettent la mise au point de nouveaux tests diagnostiques, l'étude des facteurs de risques d'une maladie, l'identification de causes génétiques à des maladies, la découverte de marqueurs diagnostiques et pronostiques, etc...

L'utilisation des échantillons biologiques humains soumise à une sévère réglementation

Les échantillons biologiques humains doivent être ac-



Boîtes utilisées pour la cultures cellulaires.

compagnés du consentement du patient et de quelques données cliniques et biologiques.

Les activités de collections d'échantillons biologiques humains sont soumises à diverses formalités réglementaires préalables décrites dans le Code de Santé Publique.

Le collectionneur doit déclara-

rer ou demander une autorisation d'activité de conservation d'échantillons, puis dans un deuxième temps informer et recueillir le consentement du patient.

Ces réglementations encadrent les activités de recherche depuis 1945, elles permettent de protéger les personnes, leurs libertés individuelles.

Les demandes d'autorisa-

tion de collections et d'échanges d'échantillons humains doivent être faites à des institutions telles que le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), l'Agence de la BioMédecine et pour les échanges internationaux, les Comités de Protection des personnes (CCP).

De nos jours dans le

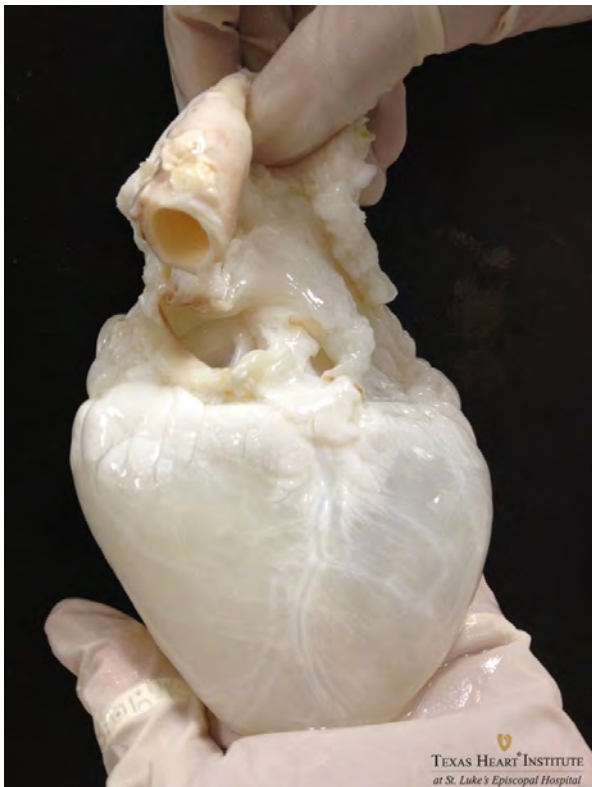
monde, il y a très peu d'activités qui ne sont pas encadrées. Les activités non-encadrées peuvent entraîner la perte des échantillons, des scandales et une très mauvaise publicité mais aussi des procédures pénales et/ou administratives, des amendes voire de la prison.

Thomas FOULON,
1ère STL.B.



Assemblée Nationale, une des institutions permettant l'autorisation de la culture cellulaire.

Deux techniques de soins du futur



Coeur décellularisé, composé uniquement de sa matrice.

La décellularisation

La décellularisation consiste à retirer les cellules d'un organe dans sa totalité et d'y garder uniquement la matrice puis de réintroduire de nouvelles cellules d'un autre organisme, cultivées au préalable.

Ce cas est étudié pour créer une nouvelle forme de greffe.

L'enjeu est de supprimer le phénomène de rejet après une greffe. Le rejet est la cause principale des complications après une greffe d'organe. C'est une réponse des défenses immunitaires activées par l'organisme du receveur sur des cellules qui ne lui appartiennent pas. Voilà pourquoi des patients greffés d'un organe doivent prendre des médicaments anti-rejets.

Thomas FOULON,
1ère STL.B.

Le Bioprinting

Imprimer en 3D de la peau ou des organes, voilà l'incroyable potentiel du "bioprinting".

La bio-impression : « Cette technologie est capable de reproduire des tissus vivants à partir d'une machine. L'imprimante va déposer, couche par couche, des cellules vivantes, pour recréer la structure de l'épiderme humain. Résultat: des échantillons de peau réelle, fabriqués de A à Z. On pourra s'en servir notamment pour tester les

produits cosmétiques sans avoir recours à des animaux et demain, pourquoi pas, pour générer des tissus pour les greffes de peau. A plus long terme, les promoteurs du "bioprinting" imaginent qu'on pourra imprimer des organes entiers comme un foie ou un rein. Une prouesse qui va probablement demander plusieurs décennies, tant le corps humain est complexe à imiter. »

Source BFMTV



Machine permettant l'impression 3D d'un rein.

Nous vous présentons les chercheurs du centre de recherche en transplantation et en immunologie de l'INSERM de Nantes



Fabienne Haspot

Ses études :

Fabienne est chercheuse au laboratoire de l'INSERM de Nantes. Elle a fait un bac S car elle aimait beaucoup la biologie. Ensuite elle a essayé la fac de médecine. Elle s'est dirigée vers une fac de sciences et pendant sa troisième année elle a découvert et aimé l'immunologie. Après avoir fait sa thèse elle poursuit en faisant son post doc à Boston.

Son travail :

Dans son métier elle apprend tous les jours. Elle parle couramment l'anglais.

il faut avoir un bon niveau de langue. Fabienne nous a dit qu'il n'était pas facile de publier des articles ; la publication est faite dans des revues scientifiques et ils sont écrits en anglais. Elle peut travailler dans n'importe quel pays.

Lorsqu'elle n'a pas fini une expérience elle doit revenir le week-end et au moins une fois par an elle est d'astreinte pour vérifier la température du congélateur.

Les techniques utilisées sont différentes selon les labos et leurs spécialités.

Les horaires de travail ne sont pas toujours réguliers lorsque l'on fait sa thèse; ensuite les horaires sont 9h-18h avec environ 30 minutes de pause. Le salaire d'un chercheur est d'environ 2000€.

Qualités :

Pour être chercheur il faut être curieux, tenace car les études sont compliquées, savoir se remettre en question et être ouvert d'esprit.

Alice, Marion



Janina Gergen

Janina is 26 years old and comes from Germany. She studied in Marburg and did a Bachelor and Master of science in "biomedical science - infection biology". Then she chose to work in research as she couldn't imagine herself sitting in an office all day long and do the same thing over and over again. Now she is doing her PhD in Nantes.

For her doctorate, her research consists in finding a new treatment against the human Cytomegalovirus (HCMV). HCMV is a virus which, for most people infected, stays latent and doesn't cause any disease. Indeed it causes problems only in non-immunocompetent patients like babies, AIDS patients and transplant recipients whose immune system is either not completely developed, damaged or blocked. So when the immune system doesn't work, HCMV becomes active and can damage different organs, which can even lead to death. Janina has already developed molecular scissors which can cut the genome of the virus. The problem is to bring the scissors inside every infected cell to reach all the viral genomes to protect the human. So her main work now is to deliver the scissors in the cells and then analyze the different steps of the viral replication to see the effect of the treatment.

According to her working in research is very exciting and emotional: "Once you get a project working or something no one knew before, it is amazing. On the other side, it can be very tough, when nothing is working as expected. But for sure, it's not boring. You have to be creative to find solution."

Mrs Marionneau, Thomas and Julie



Amédée Renané

Amédée a été recruté sur un projet de recherche concernant l'immunologie. Son travail est effectué sur ordinateur (les recherches, les informations, les idées...) puis par manipulation en laboratoire.

Amédée a fait un bac STL suivi d'un BTS Analyses spécialisé dans l'immunologie. Il a ensuite fait l'ESTBA (Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée) à Paris pour avoir son diplôme de l'EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes → bac+5). Après ceci, Amédée a fait une thèse en tant que boursier puis il est allé aux États-Unis à Seattle (3 ans), où il était post-doc en recherche sur les allergies. Puis il est revenu en France à Nantes.

Ce métier détient plusieurs avantages et inconvénients:

- pour les avantages, il est indépendant et n'a pas de supérieur donc, peu de pression.

- alors que pour les inconvénients il y a l'aspect financier (son salaire dépend de l'importance du projet qui lui est confié), et il n'est pas sûr de garder son métier (CDD).

Concernant les qualités qu'il faut avoir pour exercer ce métier, il faut être optimiste, persévérant ainsi que curieux et surtout il faut être passionné et aimer cet univers.

Grâce à ces différents travaux, Amédée a pu écrire une thèse ainsi que des articles dans des magazines ou journaux scientifiques. Ceux-ci peuvent ainsi être insérés dans le CV pour être de nouveau sollicité pour d'autres travaux.

Lorsque l'on fait ce métier, il faut être prêt à faire de l'astreinte ainsi que de travailler de nuit et avoir des horaires irréguliers, le temps de travail est souvent irrégulier. Au niveau du salaire, il est lui aussi variable car il dépend du travail qui lui est attribué. Mais celui-ci tourne en moyenne autour de 2 300 €, cela est donc parfois difficile de financer un projet.

Théo, Sebastien



Alexandra Garcia

Alexandra a obtenu un bac STL-B en 2004, puis un DUT génie biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques et enfin une Licence 3 en recherche biomédicale. Actuellement, elle prépare un diplôme lui permettant d'avoir le niveau bac +5. Elle va valider ses acquis afin de devenir ingénieur. elle est aujourd'hui spécialisée dans la sclérose en plaques qui est une maladie auto-immune, c'est à dire que le corps ne combat pas la maladie mais il se détruit lui même.

Léandre, Clara