

# Master Guide sur la culture cellulaire

## Optimiser le prélèvement de liquides

Auteurs :  
Hope Needs, PhD,  
Dan Sheridan, MS et  
Gustavo Chavarria, PhD

### Sommaire

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Types de cellules et caractéristiques</b>	<b>3</b>
2.1	Culture de cellules adhérentes, en suspension ou 3D	3
2.2	Cellules primaires, lignées cellulaires immortalisées et iPSC	4
<b>3</b>	<b>Défis liés à la culture cellulaire</b>	<b>6</b>
3.1	Stérilité	6
3.2	Reproductibilité	7
3.3	Vitesse et efficacité	9
3.4	Évolutivité	10
<b>4</b>	<b>Le procédé de culture cellulaire : Étape par étape</b>	<b>12</b>
4.1	Préparation d'un environnement aseptisé	12
4.2	Plaques de revêtement	12
4.3	Séparation des cellules (passage cellulaire)	12
4.4	Cellules d'alimentation	14
4.5	Traitement et transduction des cellules	15
<b>5</b>	<b>Conclusions et recommandations</b>	<b>16</b>

# 1. Introduction

La culture cellulaire, procédé de croissance et de maintien des cellules dans des conditions contrôlées en dehors de leur environnement naturel, est essentielle dans le cadre de la recherche biologique. Les cellules peuvent provenir de différentes sources, notamment des tissus animaux et humains. La culture cellulaire est essentielle dans plusieurs domaines de recherche, notamment l'étude de la biologie et de la biochimie cellulaires élémentaires, l'étude des maladies et le développement de nouveaux traitements, ainsi que la fabrication de produits biologiques comme les vaccins et les anticorps monoclonaux. La culture cellulaire joue également un rôle vital dans le génie tissulaire, où les cellules peuvent être cultivées sur un échafaudage pour créer des tissus et des organes fonctionnels.

Cependant, beaucoup de chercheurs rencontrent des difficultés en matière de stérilité, de reproductibilité, d'efficacité et d'évolutivité dans le cadre de leur travail avec des cellules. Bon nombre de ces difficultés sont liées à des outils et des techniques de manipulation de liquides inadaptés, sous-optimaux ou inappropriés, et il est possible d'améliorer les procédés en sélectionnant et en utilisant de manière optimale les équipements de manipulation de liquides. Il s'agit notamment des pipettes monocanal, multicanaux, à répétition et de systèmes de pipetage semi-automatisés, qui ont tous leur place respective dans le flux de travail de culture cellulaire. À mesure que la technologie de laboratoire continue de se développer, les solutions électroniques de manipulation de liquides réduisent le temps et les variations expérimentales introduites par le pipetage manuel. Notamment, certains systèmes de pipettes semi-automatisés à 96 canaux sont désormais suffisamment compacts pour être transportés dans le laboratoire et utilisés sous des hottes de culture cellulaire, assurant un pipetage à haut rendement qui peut accélérer les flux de travail quotidiens de culture cellulaire et aider à surmonter les défis associés au pipetage manuel.

Ce guide vous aide à tirer le meilleur parti de votre pratique de culture cellulaire. Nous fournissons un guide détaillé de l'ensemble du procédé de culture cellulaire, de la sélection cellulaire au traitement et à la transduction des cellules, en mettant l'accent sur les défis importants rencontrés à différentes étapes du procédé, qui propose également des conseils et astuces pour les surmonter. Nous allons traiter les sujets suivants :

- Les différents types de cellules disponibles et comment sélectionner le système de cellules qui convient le mieux à votre application.
- La gamme complète d'outils requis pour des flux de travail efficaces, notamment les pipettes monocanal, multicanaux, à répétition et semi-automatisées, et la manière dont la sélection optimale des outils et la manipulation de liquides peuvent aider les chercheurs à optimiser le procédé de culture cellulaire.
- Comment l'équipement semi-automatisé peut améliorer considérablement la vitesse et l'efficacité du flux de travail, réduire les risques de contamination et d'erreur, améliorer la fidélité et la reproductibilité et permettre l'évolutivité.

## 2. Types de cellules et caractéristiques

Il existe de nombreux types de cellules aux caractéristiques structurales et fonctionnelles, avantages et inconvénients différents, et le type de cellule le plus approprié à utiliser dépend du domaine de recherche et de l'application spécifiques. Les types de cellules les plus courants et leurs classifications sont décrits dans cette section et résumés dans le tableau ci-dessous.

### 2.1. Culture de cellules adhérentes, en suspension ou 3D

**Les cellules adhérentes** poussent en monocouche sur la coupelle. Il faut les détacher à l'aide d'un agent de dissociation (trypsine ou accutase par exemple) pendant le procédé de passage ; elles adhèrent généralement à nouveau à la plaque dans les 2 à 4 heures suivant le placage.

La plupart des cellules adhérentes peuvent être classées comme épithéliales ou fibroblastiques, en fonction de leur morphologie :

1. Les cellules de type épithélial ont généralement une forme polygonale, ont tendance à se développer en plaques ou en amas et restent stationnaires (c'est-à-dire qu'elles sont peu susceptibles de migrer)<sup>1</sup>.
2. Les cellules de type fibroblaste sont allongées, généralement bipolaires ou multipolaires et ont tendance à migrer à travers la plaque<sup>1</sup>. Les cellules spécifiques de type neuronal sont souvent incluses dans une sous-catégorie de cellules de type fibroblaste, du fait de leur polarité.

**Les cellules en suspension**, ou cellules de type lymphoblaste<sup>2</sup>, ne se fixent pas à la surface des coupelles et flottent dans le milieu de croissance. Elles poussent généralement en amas, surtout à des densités plus élevées. Pour le passage des cellules en suspension, il faut les centrifuger afin d'obtenir un granulé cellulaire, qui peut être remis en suspension dans un milieu frais à la densité requise et transféré dans des coupelles stériles.

**Les cultures cellulaires 3D** poussent généralement sur un échafaudage ou une structure en gel qui permet aux cellules d'interagir avec la matrice extracellulaire et entre elles, formant un modèle 3D<sup>3</sup>. Ces modèles de culture fournissent des informations spatiales précieuses sur les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, et peuvent imiter ce qui se passe *in vivo*. Par conséquent, les modèles cellulaires 3D gagnent en popularité dans la recherche sur le cancer, les neurosciences, la découverte de médicaments et la médecine régénératrice. Par exemple, les sphères tumorales cancéreuses permettent aux chercheurs d'étudier les propriétés de la tumeur et sa réponse aux différents traitements<sup>4</sup>. L'inconvénient des cultures 3D est notamment leur faible reproductibilité et leur courte durée de vie.

Les cultures 3D peuvent être classées en deux groupes en fonction de la méthode de culture :

1. Sur échafaudage : les cellules sont cultivées sur des échafaudages structurels ou des hydrogels.
2. Sans échafaudage : les cellules sont cultivées en suspension. Elles flottent dans le milieu sur des plaques non adhérentes et forment des agrégats appelés sphéroïdes.

## 2.2. Cellules primaires, lignées cellulaires immortalisées et iPSC

**Les cellules primaires** sont isolées directement de leur tissu natif et mises en culture in vitro. Les cellules primaires couramment utilisées comprennent les fibroblastes, directement isolés des patients par biopsies cutanées, les neurones dissociés de régions spécifiques du cerveau de souris ou de rats embryonnaires ou postnataux, et les globules rouges isolés à partir d'échantillons sanguins de patients. Les cellules primaires ne peuvent généralement subir qu'un nombre limité de passages avant de perdre leur viabilité, et certaines cellules primaires, comme les neurones, ne peuvent pas être passées du tout. Les cellules primaires peuvent être exigeantes sur le plan technique, car elles nécessitent souvent des procédures de dissociation compliquées et sont beaucoup plus variables que les lignées cellulaires immortalisées. Cependant, elles fournissent des informations plus pertinentes sur le plan biologique dans un environnement plus physiologique que les lignées cellulaires immortalisées. Par exemple, dans la recherche en neurosciences, les neurones primaires sont nécessaires pour étudier des procédés propres aux neurones, comme la caractérisation des propriétés fonctionnelles des synapses et de leur réponse à la stimulation pharmacologique<sup>5</sup>.

**Les lignées cellulaires immortalisées** proviennent d'un échantillon tissulaire comme les cellules primaires, mais ont subi une procédure d'immortalisation qui permet de passer les lignées cellulaires plusieurs fois sans perte de viabilité et de contourner les réglementations éthiques associées aux cellules primaires. Les lignées cellulaires sont généralement faciles à cultiver et peuvent également être congelées dans de l'azote liquide pour un stockage à long terme et être réactivées (décongelées) pour une utilisation ultérieure. Il est courant pour les laboratoires de partager des lignées cellulaires, car cela permet d'améliorer la cohérence et la reproductibilité de la recherche. Les lignées cellulaires couramment utilisées comprennent les cellules de cancer du col de l'utérus Henrietta Lacks (HeLa), les cellules de rein embryonnaire humain 293 (HEK293), les cellules de fibroblaste embryonnaire de souris (MEF) et les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Bien que ces lignées cellulaires proviennent de tissus humains ou animaux, l'immortalisation entraîne une perte d'informations biologiquement pertinentes.

**Les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPSC ou iPS)** sont des cellules dérivées du sang ou de la peau qui ont été reprogrammées en pluripotence (ou en état embryonnaire), ce qui signifie qu'elles peuvent se différencier en tout type de cellule humaine. L'ajout de facteurs de croissance spécifiques à différents stades de développement permet aux cellules de se différencier en fonction du type de cellule souhaité. Les cellules souches sont couramment utilisées dans la recherche clinique puisqu'elles peuvent être isolées des échantillons patients et utilisées pour comparer les cellules patients à des témoins appariés selon l'âge. Par exemple, les chercheurs peuvent prélever des biopsies cutanées sur des patients atteints de la maladie de Parkinson et les différencier en iPSC neuronales, ce qui leur permet d'étudier la différence entre des neurones patients et des neurones sains<sup>6</sup>. Autre application importante des iPSC : la médecine personnalisée, où les iPSC des patients peuvent être différenciés en cellules fonctionnelles spécifiques (comme les cellules cardiovasculaires) et utilisés comme modèles pour le dépistage de drogues, la thérapie génique et la thérapie de remplacement cellulaire<sup>7</sup>. Malgré les perspectives intéressantes des iPSC, leur culture peut être difficile et chronophage, car elles nécessitent une alimentation régulière (quotidienne ou tous les quelques jours) et le procédé de différenciation peut induire une certaine variabilité. De plus, le milieu et les compléments nécessaires peuvent coûter cher.

**Types de cellules et classifications**

Origine	Type de culture	Morphologie	Méthode de culture	Exemples(s)
<b>Principal</b>	Adhérente	Type épithélial	Les cellules sont isolées de la source et mises en culture dans des coupelles de culture cellulaire pendant une durée limitée.	Cellules épithéliales bronchiques/trachéales, cellules épithéliales mammaires
		Semblable à un fibroblaste		Fibroblastes, neurones
	Suspension	Lymphoblastique		Lymphoblastes, macrophages
	3D	Les cellules interagissent entre elles et/ou avec la matrice pour former un modèle 3D		En échafaudage
Sans échafaudage			Sphère tumorale du cancer	
<b>Immortalisé</b>	Adhérente	Type épithélial	Après immortalisation, les lignées cellulaires peuvent être mises en culture dans des coupelles de culture cellulaire pendant un nombre infini de temps/passages.	Henrietta Lacks (HeLa)
		Semblable à un fibroblaste		Fibroblaste embryonnaire de souris (MEF)
	Suspension	Lymphoblastique		Lymphoblaste leucémique bovin (BL-3)
<b>iPSC</b>	Adhérente	Type épithélial	Les cellules sont isolées de la source, différenciées en un type de cellule souhaité et mises en culture pendant une durée/des passages limités.	Cellules souches pluripotentes de l'intestin grêle induites par l'homme (hiPS-SIEC)
		Semblable à un fibroblaste		iNeurons
	Suspension	Lymphoblastique		Cellules érythroïdes dérivées de l'iPSC
	3D	Les cellules interagissent entre elles et/ou avec la matrice pour former un modèle 3D		En échafaudage
En échafaudage			Organoïde cérébral dérivé de l'iPSC	

### 3. Défis liés à la culture cellulaire

Pour garantir des pratiques de culture cellulaire performantes, les utilisateurs doivent respecter certains principes clés.

#### 3. Stérilité

La contamination est un problème courant dans les laboratoires de culture cellulaire<sup>8</sup>. Les biocontaminants courants comprennent les bactéries, les champignons, les levures et les mycoplasmes. Le port d'un équipement de protection individuelle (EPI) approprié, l'utilisation d'un spray à 70 % d'éthanol et le maintien d'une bonne technique d'asepsie sont essentiels à la stérilité. L'ajout de pénicilline-streptomycine au milieu de culture cellulaire est relativement efficace pour prévenir les infections bactériennes. Les antifongiques peuvent être utilisés pour prévenir les infections par levures et champignons. Les infections bactériennes, fongiques et à levures sont faciles à détecter car elles feront jaunir le milieu de culture (si celui-ci contient du rouge de phénol) et peuvent être observées par microscopie optique standard. Pour les contaminations par mycoplasmes, plus difficiles à détecter, certains laboratoires utilisent des agents anti-mycoplasmes, et des tests réguliers sont essentiels pour garder les contaminations sous contrôle. Il est également recommandé de tester la présence de contaminants dans les nouveaux lots de sérum fœtal bovin ou de veau (FBS ou FCS) avant utilisation.

Les instruments et les consommables utilisés dans la culture cellulaire peuvent contenir de nombreux micro-organismes<sup>9</sup>. Le respect des recommandations suivantes peut réduire les risques de contamination croisée entre le prélèvement de liquides et les cellules :

- Les pipettes monocanal, à répétition et les pipettes multicanaux doivent être réservés exclusivement à cette zone.
- Décontaminer l'extrémité des pipettes à l'aide d'éthanol à 70 % avant de les utiliser dans les équipements de culture cellulaire et utiliser des cônes stériles et filtrés dans la mesure du possible.
- Prévoir un échéancier de nettoyage régulier des pièces internes des instruments.
- Planifier un entretien régulier des instruments pour vérifier l'intégrité de leurs pièces internes (c'est-à-dire s'assurer de l'absence de corrosion, de pièces cassées, etc.)
- Remplacer régulièrement les filtres des contrôleurs de pipette.

De même, l'intégrité d'une lignée cellulaire peut être compromise par l'utilisation de cônes de pipette inappropriés. Il convient de sélectionner soigneusement les cônes, en tenant compte des recommandations suivantes :

- Les cônes peuvent être achetés stériles ou non stériles. Les cônes non stériles doivent être autoclavés avant utilisation en culture cellulaire. Bien que l'autoclavage soit extrêmement efficace pour stériliser l'équipement<sup>10</sup>, il ne détruit pas et n'élimine pas non plus les acides nucléiques, ce qui est essentiel lors de l'utilisation de cellules dans les applications génomiques.
- Il convient d'examiner attentivement la pureté des cônes, en particulier si les cellules sont destinées à être utilisées dans des applications génomiques. Parmi les contaminants importants à prendre en compte, citons : ADN (humain ou bactérien), DNase, RNase, inhibiteurs de PCR et endotoxines.
- Des aérosols se forment souvent pendant les cycles de pipetage. L'utilisation de cônes filtrés dans la culture cellulaire peut réduire considérablement les risques de contamination croisée entre la pipette et le flacon ou la plaque de culture cellulaire.
- Les cônes sérologiques stériles et les contrôleurs de pipettes sont des instruments pratiques pour la préparation de milieux de culture cellulaire avec des compléments (FBS, facteurs de croissance, antibiotiques, etc.). Toutefois, ces instruments ne doivent pas être utilisés dans des étapes quantitatives.

## 3.2. Reproductibilité

Une enquête menée dans Nature a révélé que plus de 70 % des chercheurs n'avaient pas été en mesure de reproduire l'expérience d'un autre chercheur, et environ la moitié n'avaient pas été en mesure de reproduire leur propre travail<sup>11</sup>. Les principaux problèmes de reproductibilité en culture cellulaire découlent de la variabilité biologique entre les passages et les sources de cellules, ainsi que de la mauvaise identification des lignées cellulaires<sup>12</sup>. Un compte rendu récent publié dans la revue EMBO indique qu'au moins 5 % des lignées cellulaires utilisées dans les manuscrits présentés avaient été mal identifiées, et que des problèmes graves de lignées cellulaires avaient abouti au rejet d'environ 4 % des manuscrits<sup>13</sup>.

Les paramètres de culture, la manipulation cellulaire, l'ensemencement cellulaire et la viabilité cellulaire peuvent également affecter la reproductibilité des expériences de culture cellulaire. Une étude multicentrique a suivi la reproductibilité intra- et intercentrique dans les tests de viabilité cellulaire pour examiner la toxicité des médicaments anticancéreux sur la lignée cellulaire épithéliale couramment utilisée, MCF10A<sup>14</sup>. Malgré l'utilisation des mêmes stocks cellulaires et chimiques, l'étude a mis en évidence une variabilité intracentrique ainsi qu'une variabilité intercentrique allant jusqu'à 200 fois les valeurs de puissance du médicament<sup>14</sup>.

En outre, une mauvaise utilisation des instruments de manipulation de liquides peut contribuer à une variabilité accrue dans l'ensemencement et la densité des cellules. Deux éléments clés du pipetage ont une forte incidence sur la reproductibilité : l'instrument et la technique.

Pour l'instrument, les utilisateurs doivent vérifier les points suivants :

- Caractéristiques techniques du fabricant (erreurs systématiques et aléatoires).  
Des erreurs instrumentales importantes peuvent entraîner des variations significatives entre les échantillons.
- L'intégrité de la pipette : vérifier qu'il n'y a pas de pièces manquantes ou cassées, de corrosion interne, etc.
- Un service d'étalonnage planifié. Plus l'intervalle de service est court, plus il y a de chances que les dommages soient détectés à temps et que les pipettes soient utilisées conformément aux caractéristiques techniques<sup>15</sup>.
- Si possible, choisir des instruments électroniques (pipettes ou pipettes à répétition) pour effectuer des tâches d'entretien de culture cellulaire comme l'ensemencement de cellules.
- Les pipettes multicanaux (manuelles ou électroniques) sont la meilleure solution lorsque les protocoles nécessitent un placage partiel à l'aide de plaques à 96 puits (nombre d'échantillons : 4 à 96) ou si la plaque nécessite des modèles spécifiques dans les colonnes ou les rangées.
- Les pipettes électroniques macrovolume (> 1 mL) ou les pipettes à répétition électroniques avec plages de volume étendues sont courantes lorsque les expériences utilisent des fioles de culture cellulaire ou des plaques à 24 puits, qui constituent le format standard pour de nombreux protocoles cellulaires.
- Pour les conceptions expérimentales de plus grande envergure (par exemple, la configuration de plusieurs plaques 96 puits), envisager d'utiliser des plateformes électroniques 96 canaux. Ces instruments garantissent une grande cohérence d'un canal à l'autre et d'une plaque à l'autre.

### Effet du choix de la pipette sur la variabilité : Canal-canal ou plaque-plaque

Variabilité

Supérieur		Inférieur
<b>Manuel :</b> Pipettes monocanal, multicanaux	<b>Électronique :</b> Pipettes multicanaux, à répétition	<b>Semi-automatisée :</b> Plateforme 96 canaux

Les techniques de pipetage sont essentielles à la réussite du placage des cellules. Les pipettes manuelles présentent une variabilité plus élevée et il convient de respecter de bonnes techniques de pipetage (par exemple, en maintenant l'angle d'aspiration, le débit de distribution et l'immersion du cône corrects). Le maintien de bonnes techniques de pipetage (en particulier en se concentrant sur la distribution à près de 90°) est particulièrement important pour la génération réussie de sphéroïdes 3D<sup>16</sup>.

Pour une technique de pipetage optimale, les utilisateurs doivent tenir compte des points suivants (également résumés dans le tableau ci-dessous) :

- En général, les instruments électroniques (pipettes et pipettes à répétition) assurent une moindre variabilité par rapport aux pipettes manuelles.
- Pour les plaques complètes, les systèmes à 96 canaux assurent une homogénéité optimale entre tous les puits et toutes les plaques. Les angles d'aspiration et de distribution sont optimaux (tous les cônes sont perpendiculaires à la surface), les débits d'aspiration et de distribution peuvent être contrôlés, la profondeur/l'immersion du cône est constante dans chaque canal et l'effet du réchauffement des mains est pratiquement négligeable.



Le Rainin MicroPro™ est un système de pipette semi-automatisé à 96 canaux suffisamment compact pour être utilisé dans des hottes de culture cellulaire ou des chambres anaérobies. La gamme MicroPro permet un pipetage à cadence élevée et homogène pour la culture cellulaire de volumes compris entre 2 et 20 µl ou 5 et 300 µl, avec des modes de pipetage avancés qui incluent la multidistribution, la multiaspiration et la possibilité de programmer et d'enregistrer des protocoles personnalisés.

## Effet du choix de la pipette sur la précision du pipetage grâce à la technique de pipetage

Technique	Pipette manuelle (mono/multicanaux)	Pipette électronique (mono/multicanaux)	Pipette électronique à répétition	Instrument 96 canaux
Profondeur d'immersion du cône	•	•	•	•
Optimisation de la plage de volume	•	•	•	•
Temps d'immersion du cône	•	•	•	•
Pré-rinçage des cônes	•	•	•	•
L'angle d'immersion du cône	•	•	•	•
Effets thermiques de la main	•	•	•	•
Débit d'aspiration (d'échantillon à échantillon)	•	•	•	•
Pipetage inversé	•	•	•	•

- Précision/reproductibilité constante du pipetage en raison de l'instrument sélectionné
- Précision/reproductibilité variable du pipetage en raison de l'instrument sélectionné

### 3.3. Rapidité et efficacité

Dans un environnement de culture cellulaire, il est important de travailler rapidement pour maintenir la viabilité cellulaire et veiller à ce que les cellules ne soient pas exposées à des conditions sous-optimales pendant trop longtemps. Ceci est particulièrement important pour les lignées cellulaires délicates ou les cellules déjà stressées, comme les neurones primaires après dissociation du tissu cérébral. Ces cellules sont susceptibles d'être particulièrement sensibles à un maintien en suspension, à température ambiante et en l'absence d'un environnement contrôlé de CO<sub>2</sub>, pendant des périodes prolongées. En outre, une étude a montré que la durée d'incubation des cellules dans des diluants comme la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) était corrélée à une baisse de la viabilité<sup>17</sup>.

À l'inverse, un travail trop rapide lors de la séparation et du placage des cellules peut entraîner des niveaux de variabilité importants. Pour établir la densité cellulaire appropriée, les cellules doivent être dissociées des plaques et mises en stock (cellules en suspension) avant de poursuivre le passage cellulaire ou la mise en place de plaques à des densités cellulaires spécifiques (c'est-à-dire 5 000 cellules par puits). Lorsque les cellules sont en suspension, elles ont tendance à se déposer au fond de la cuve au fil du temps, ce qui signifie que si les cellules sont prélevées directement dans le stock sans mélange dans le but d'ensemencer rapidement, tous les échantillons ne contiendront pas le nombre requis de cellules et on obtiendra des niveaux de variabilité importants. Par conséquent, les stocks cellulaires doivent être mélangés avec un pipetage délicat pour obtenir un stock cellulaire homogène avant de prélever chaque échantillon pour l'ensemencement.

Certains utilisateurs peuvent avoir du mal à trouver un équilibre entre un pipetage correct et la vitesse lors de la mise en plaque des cellules : trop lentement, la viabilité des cellules est compromise ; trop rapidement, la précision du pipetage est compromise. La sélection des bons outils peut vous aider à améliorer la vitesse et l'efficacité du pipetage, tout en maintenant l'exactitude et en réduisant la variabilité :

- Les pipettes électroniques (monocanal ou multicanaux) offrent des capacités de mélange. Avec cette fonction, il n'y a plus besoin d'appuyer sur le bouton de piston d'une pipette manuelle pour exécuter le mélange à chaque fois qu'un échantillon est prélevé dans un stock de cellules. Cette fonction raccourcit également considérablement les protocoles d'ensemencement.
- Les distributeurs répétitifs n'offrent pas de capacités de mélange en soi, mais sont d'excellents instruments pour le placage partiel car elles distribuent le volume requis de manière homogène dans tous les puits (plaques à 96 et 24 puits). Autre avantage : les distributeurs répétitifs réduisent la contrainte cellulaire ou le cisaillement cellulaire lorsque les cellules sont forcées à passer à travers les petits orifices d'un cône de pipette<sup>18</sup>. En général, les seringues ont des orifices plus grands que les cônes de pipette à déplacement d'air.
- Pour plaquer des plaques entières de 96 ou 384 puits, les systèmes à plateforme 96 canaux sont parfaits. Ils offrent des capacités de mélange et les utilisateurs peuvent plaquer les cellules jusqu'à 12 fois plus vite que les pipettes multicanaux électroniques ou manuelles.

### 3.4. Évolutivité

À mesure que les projets de recherche progressent vers la recherche translationnelle, comme la découverte de médicaments et la recherche clinique, il est de plus en plus important d'extrapoler les expériences. Cependant, cela peut s'avérer coûteux en termes de temps et de ressources. Il arrive plus souvent que les scientifiques commettent des erreurs de pipetage dans le cadre de la mise en plaque de nombreux puits et plaques de cellules, par exemple en cas de puits manquants, d'ajout de réactifs deux fois dans le même puits ou de compromission de la stérilité. En outre, les troubles musculosquelettiques (TMS) sont fréquemment associés à des tâches de laboratoire répétitives, comme le pipetage, et sont fréquents chez les opérateurs de laboratoire.

Pour minimiser ces difficultés, les utilisateurs doivent tenir compte des recommandations suivantes lors de la sélection des outils :

- Les systèmes de plateforme 96 canaux réduisent considérablement le temps nécessaire pour réaliser les protocoles liés aux cellules ou des étapes comme le placage et le passage de cellules. Comme indiqué dans les sections précédentes, la vitesse est primordiale pour maintenir la viabilité cellulaire.
- Les pipettes multicanaux électroniques et les pipettes à répétition sont également les instruments de manipulation de liquides de prédilection pour le placage partiel (plaques 96 ou 384 puits). Par ailleurs, les plages de volume étendues des pipettes à répétition leur permettent de configurer des plaques nécessitant des volumes de liquide plus importants, comme des plaques à 24 puits.

Autre aspect crucial de l'évolutivité, le changement des formats de culture cellulaire. L'extrapolation (24 → 96 → 384 puits) ou la réduction (384 → 96 → 24 puits) peut être une lourde tâche pour certains utilisateurs : il est possible d'utiliser des canaux uniques, mais l'homogénéité est difficile à maintenir et le procédé prend du temps. En revanche, les multicanaux standard ne sont pas souples, car les distances entre les canaux sont fixes.

Pour y remédier, les utilisateurs doivent tenir compte des points suivants :

- Les pipettes multicanaux électroniques à écartement variable sont des outils idéaux pour changer de format, puisqu'elles permettent de transférer facilement des échantillons entre des plaques de différents formats.
- Les pipettes électroniques à répétition peuvent fonctionner avec pratiquement tous les paramètres de culture cellulaire : plaque → de réservoir, plaque → plaque, plaque de tuyau → centrifuge, réservoir de tuyau → centrifuge, etc.



Les pipettes Rainin XLS™ à écartement variable à 6 et 8 canaux offrent des volumes compris entre 5 et 1 200 µl. L'écartement des embouts réglable entre 9 et 19 mm simplifie et rationalise le transfert des liquides des tubes de réaction vers toute la gamme de tailles de plaques de culture cellulaire, y compris les plaques 24 puits.

**Compatibilité de la manipulation de liquides avec le transfert de format courant dans la maintenance des cultures cellulaires**

Changement de format	Pipette monocanal (manuelle, électronique)	Entretoises réglables (manuelles, électroniques)	Pipette électronique à répétition	Instrument 96 canaux	Pipette multicanaux (manuelle, électronique)
24 ↔ 24	•	•	•	•	•
96 ↔ 96	•	•	•	•	•
384 ↔ 384	•	•	•	•	•
24 ↔ 96	•	•	•	•	•
96 ↔ 384	•	•	•	•	•
Réservoir ↔ Plaque	•	•	•	•	•
Tuyau ↔ plaque	•	•	•	•	•

- Compatible
- Non compatible

## 4. Le procédé de culture cellulaire : Étape par étape

Le procédé de culture cellulaire comporte plusieurs étapes, de la préparation d'un environnement aseptisé à la préparation des cellules pour les tests de point final. Cette section présente pas à pas chaque stade du procédé, avec des conseils pour réussir chaque étape.

### 4.1. Préparation d'un environnement aseptisé

La préparation d'un environnement aseptisé constitue la première étape d'un procédé de culture cellulaire. Les EPI requis pour travailler dans une salle de culture cellulaire sont les mêmes que dans la plupart des environnements de laboratoire : gants et blouse de laboratoire. Dans certains laboratoires, on utilise également des manches jetables portées sur la blouse, voire même des lunettes de protection. Il faut allumer la hotte de culture cellulaire au moins 20 minutes avant utilisation pour permettre au débit d'air de se stabiliser et éviter toute contamination aéroportée associée. Juste avant utilisation, désinfectez la hotte et tout ce qui va y entrer (par ex. pipettes, cônes, pipettes sérologiques et réactifs) avec une solution d'éthanol à 70 %. Il faut veiller à ce que la hotte reste aussi dégagée que possible. Les utilisateurs doivent s'abstenir de placer quoi que ce soit sur le trajet des zones d'écoulement d'air.

### 4.2. Plaques de revêtement

Pour certains types de cellules ou d'applications, il est nécessaire de recouvrir les plaques de solutions favorisant l'adhérence, comme la poly-L/D-lysine (PLL/PDL), la laminine ou la fibronectine. Les plaques sont incubées avec un agent de revêtement pendant 1 à 24 heures avant d'être soigneusement lavées avec de l'eau de culture tissulaire et d'ajouter les milieux de croissance appropriés dans les coupelles.

### 4.3 Séparation des cellules (passage cellulaire)

La séparation des cellules (également appelée passage cellulaire) implique le transfert d'un nombre approprié de cellules d'une coupelle ou d'un flacon à un autre, généralement pour les flux de travail expérimentaux ultérieurs. Un nombre de passage est désigné chaque fois qu'un flacon de cellules est divisé. Par exemple, un flacon avec des cellules au passage trois peut fournir plusieurs flacons avec des cellules au passage quatre. La séparation, ou passage, est effectuée pour diverses raisons :

1. Pour collecter et enregistrer les cellules en vue d'expériences futures (par exemple, cryoconservation : les cellules sont placées dans un milieu de congélation, congelées lentement à l'aide d'un conteneur de congélation de cellules spécialisé qui refroidit les cellules à 1° C/min, et conservées dans de l'azote liquide).
2. Pour obtenir plus de cellules, conformément aux besoins pour des tests spécifiques (par exemple, tests de cytotoxicité cellulaire ou de migration cellulaire).

Les cellules adhérentes sont lavées avec du PBS puis détachées par incubation à 37 °C avec un agent de dissociation (trypsine ou accutase par exemple), qui est ajouté à l'aide d'un contrôleur de pipette avec une pipette sérologique. Une fois que toutes les cellules se sont détachées de la plaque, la réaction est trempée par l'ajout d'un milieu complet contenant du sérum. Pour obtenir une densité cellulaire précise (cellules/ml), les utilisateurs doivent briser les amas de cellules qui peuvent s'être formés en pipetant doucement le stock cellulaire plusieurs fois à l'aide d'un contrôleur de pipette pourvu d'une pipette sérologique<sup>20</sup>.

Ensuite, les cellules sont comptées pour s'assurer que l'utilisateur place sur plaque un nombre approprié et cohérent de cellules viables pour la sous-culture ou l'analyse expérimentale en aval. Généralement, les cellules sont comptées manuellement à l'aide d'un hémocytomètre ou automatiquement avec un compteur cellulaire automatisé basé sur l'imagerie. Le procédé de comptage cellulaire comprend plusieurs étapes : dilution de l'échantillon, coloration cellulaire (ce n'est pas nécessaire pour les méthodes sans coloration), mesurage (pour quantifier la densité cellulaire et la viabilité) et calcul (pour déterminer le volume de placage). Pour obtenir des résultats fiables en aval, le comptage des cellules doit être exact, précis et reproductible. Les méthodes automatisées de comptage de cellules réduisent les étapes dépendantes de l'utilisateur, limitant le risque d'erreur humaine et améliorant l'exactitude et la fidélité. En outre, le champ d'affichage plus large offert par certains systèmes automatisés de comptage cellulaire offre une signification statistique plus élevée, tandis que les options sans tache limitent la variabilité introduite par la classification subjective de la viabilité.

Comme pour l'ensemble du procédé de culture cellulaire, la vitesse et l'efficacité sont essentielles pour maintenir des cellules intactes et saines. À l'instar des systèmes électroniques de manipulation de liquides, les compteurs de cellules automatisés augmentent la vitesse de comptage des cellules, la cadence et la productivité des utilisateurs. Enfin, le comptage des cellules peut introduire une contamination dans la hotte et les cellules, et l'utilisation de compteurs de cellules portables sous la hotte, ainsi que d'équipements pour la manipulation de liquides, réduit ce risque.

Après avoir déterminé la concentration cellulaire viable, les stocks cellulaires sont dilués avec du milieu complété et le volume approprié est ajouté aux coupelles secondaires à l'aide de contrôleurs de pipettes ; c'est ce que l'on appelle l'ensemencement.

Le choix du milieu cellulaire, la densité cellulaire, le temps entre la préparation des stocks et les flacons d'ensemencement, ainsi que l'agrégation cellulaire sont des facteurs clés pour déterminer le comportement et la viabilité des cellules. Il est donc essentiel de procéder à un ensemencement précis des cellules pour garantir la reproductibilité entre les expériences. Les erreurs de pipetage, les amas de cellules et le mélange incorrect des stocks de cellules font partie des raisons les plus courantes d'écarts lors du comptage des cellules et de leur ensemencement dans des cuves multipuits, telles que les plaques à 24, 96 et 384 puits, même avec des pipettes multicanaux. Par exemple, un chercheur peut manquer une rangée de puits, ce qui signifie qu'il n'y a pas assez de puits pour terminer l'expérience. Les pipettes à répétition et semi-automatisées sont pratiques pour éviter les erreurs d'ensemencement et réduire le temps d'ensemencement, en particulier lors de l'ensemencement de plaques entières de 96 ou 384 puits. Il est important de sélectionner l'outil adapté à l'application. Par exemple, si seulement 1/4 d'une plaque de 96 puits est utilisé, une pipette multicanaux standard peut être l'outil le plus approprié, tandis que si plusieurs plaques sont ensemencées, les pipettes à haut débit, semi-automatisées ou pipettes à répétition sont préférables. Si seuls quelques puits sont nécessaires, une simple pipette manuelle fera probablement l'affaire et offrira le temps de configuration le plus court.



Le contrôleur de pipette Rainin SP+™ est pourvu d'une tête télescopique unique, qui garantit une meilleure ergonomie dans le cadre du travail sous une hotte de culture cellulaire. Les contrôleurs permettent de transférer rapidement des volumes importants (jusqu'à 100 ml) de solutions, comme les milieux et le sérum. Avec des vitesses de distribution réglables, le SP+™ est suffisamment délicat pour être utilisé même avec des cultures cellulaires sensibles.

## 4.4. Cellules d'alimentation

L'alimentation consiste à remplir ou remplacer les milieux de culture cellulaire. Les milieux seront soit supprimés et remplacés par des milieux frais, soit, pour les cellules nécessitant des milieux conditionnés comme les neurones primaires, des milieux supplémentaires seront ajoutés en plus des milieux conditionnés.

Il arrive souvent que le complément de milieu et l'effet du pipetage soient négligés par les utilisateurs. En général, presque tous les milieux de culture cellulaire contiennent des concentrations spécifiques d'acides aminés, de rouge de phénol (ou non), de glucose (ou non) et d'autres sels. Mais toutes les lignées cellulaires ne sont pas créées de la même manière : l'ajout de FBS/FCS/BSA, de facteurs de croissance, de cytokines, de protéines recombinantes, de sels et d'antibiotiques dans les milieux de culture cellulaire (qui deviennent des milieux de culture cellulaire supplémentés) est une procédure standard et contribue à maintenir une viabilité et un déroulement cellulaire optimaux.

Lors de l'ajout de milieux de culture cellulaire, les utilisateurs doivent respecter les directives suivantes :

- **Pour les volumes (V) > 1 000 µl** (p. ex. 10 % de FBS dans le milieu) : les contrôleurs de pipettes avec pipettes sérologiques ou pipettes électroniques à répétition sont d'excellents instruments qui peuvent compléter de grands volumes de FBS, qui est très épais et peut être difficile à manipuler avec d'autres instruments.
- **Pour  $5 \leq V \leq 1\ 000$  µl** (par exemple, 50 UI/ml d'antibiotiques) : pour distribuer des volumes moyens, il est possible d'utiliser des pipettes monocanal (manuelles ou électroniques), des pipettes à répétition (dose unique) ou des contrôleurs de pipettes avec pipettes sérologiques.
- **Pour  $1 \leq V \leq 5$  µl** ou ajout de tout réactif spécial : dans certains cas, les utilisateurs doivent optimiser les compositions des solutions de culture cellulaire. Par exemple, le facteur de croissance épidermique (EGF) est connu pour jouer un rôle clé dans la croissance et la prolifération de certaines lignées cellulaires de type fibroblaste. En utilisant un stock d'EGF à 1 mg/ml, les utilisateurs doivent ajouter 1 µl d'EGF pour 10 ml de milieu de culture cellulaire. Les pipettes électroniques à répétition ou les pipettes électroniques sont les instruments recommandés pour distribuer des volumes inférieurs au microlitre.
- **Pour  $V \leq 1$  µl** : les utilisateurs peuvent utiliser des instruments électroniques portatifs capables de distribuer des volumes aussi faibles que 100 nl de solutions spéciales. Les applications peuvent inclure la réduction de la maintenance de la culture cellulaire en utilisant des fioles à faible volume (surface : 25 cm<sup>2</sup>).



Les pipettes à répétition électroniques modernes comme Rainin NanoRep™ permettent de distribuer des échantillons précis et reproductibles à partir de 100 nl, avec jusqu'à 1 000 échantillons à partir d'une aspiration. La distribution sans contact de NanoRep réduit le risque de contamination croisée entre les puits ou les plaques de culture cellulaire et accélère les flux de travail.

### Effet du volume de distribution utilisé dans le cadre de la maintenance de la culture cellulaire sur le choix de la pipette

Électronique	Convient aux tests quantitatifs ?	$V \leq 1 \mu\text{L}$	$1 \leq V \leq 1\,000 \mu\text{L}$	$1 \leq V \leq 20 \text{ mL}$	$20 \leq V \leq 50 \text{ mL}$
Distributeur à répétition	Oui	•	•	•	•
Contrôleur de pipette	Non	•	•	•	•
Monocanal	Oui	•	•	•	•
Multicanal	Oui	•	•	•	•
Plateformes 96 canaux	Oui	•	•	•	•

- L'instrument peut distribuer un volume spécifique
- L'instrument ne peut pas distribuer un volume spécifique

La plupart des lignées cellulaires nécessitent une alimentation entre les séparations et certaines nécessitent une alimentation quotidienne. Cela peut prendre énormément de temps pour les chercheurs, c'est une tâche banale qui ne nécessite pas de compétences et peut augmenter le risque de contamination, surtout lorsqu'il faut alimenter un grand nombre de coupelles. Si la maintenance de la culture cellulaire utilise des plaques à 24 ou 96 puits, les instruments semi-automatisés à 96 canaux peuvent être extrêmement utiles, car ils possèdent des capacités de pipetage spéciales. Par exemple, les anciens milieux de culture cellulaire peuvent être aspirés à l'aide d'un mode multi-aspiration, tandis que la distribution répétée est un mode puissant qui permet de distribuer du milieu de culture frais dans ces plaques en une seule distribution.

#### 4.5. Traitement et transduction des cellules

Les cellules peuvent avoir besoin d'être traitées avec de nombreux médicaments ou composés, par exemple une bibliothèque de médicaments, afin d'identifier les molécules qui modifient les voies métaboliques de transmission de la maladie. De même, la transduction de lignées cellulaires avec un gène d'intérêt permet l'étude de la fonction génétique.

Le matériel génétique (ADN ou ARN) peut être introduit dans les cellules par lipofection, électroporation ou infection avec des systèmes d'administration virale ; la méthode de transfection est déterminée en fonction du type et des propriétés des cellules et du matériel génétique à transférer<sup>21</sup>. La transfection à base de liposomes implique l'encapsulation de matériel génétique dans les liposomes et leur ajout par gouttelettes aux cellules<sup>22</sup>. Les liposomes fusionnent avec la membrane cellulaire, libérant du matériel génétique dans les cellules où il est exprimé. La lipofection est une méthode efficace, facile et relativement bon marché pour exprimer le matériel génétique dans les cellules eukaryotes, bien que son efficacité puisse varier d'un type de cellule à l'autre.

Dans l'électroporation, les cellules sont incubées avec de l'ADN ou de l'ARN et soumises à des impulsions électriques<sup>23</sup>. Cela perméabilise la membrane cellulaire, permettant au matériel génétique de pénétrer dans la cellule. L'électroporation est beaucoup plus sévère sur les cellules que la transfection à base de liposomes et entraîne par conséquent de nombreuses morts cellulaires. Cependant, l'électroporation permet une expression précoce du matériel génétique dans les cellules, ce qui est intéressant pour étudier les processus de développement. Elle présente également une efficacité de transduction élevée, ce qui la rend pratique pour les cellules difficiles à transférer avec des méthodes basées sur les liposomes (c'est-à-dire les cellules primaires).

L'infection par les systèmes d'administration lentivirale utilise des vecteurs rétroviraux, adénoviraux ou adénoassociés (AAV)<sup>21</sup>. Tout d'abord, les chercheurs doivent produire le virus par lipofection des cellules HEK293T avec un vecteur codant un insert d'intérêt, un plasmide viral emballé et un plasmide d'enveloppe virale. Les particules virales sont purifiées et ajoutées aux cellules. La transduction repose sur la capacité du virus à interagir avec les récepteurs de surface des cellules hôtes et à intégrer son ADN ou ARN dans le génome hôte. La transduction virale produit généralement une efficacité de transduction plus élevée que la transfection, et sa capacité à s'intégrer dans le génome hôte permet de produire des lignées cellulaires s'exprimant de manière stable.

Le traitement des composés et les dosages génétiques peuvent être des expériences coûteuses et les réactifs peuvent être limités, ce qui nécessite que l'utilisateur les transfère avec précision, sans erreur et souvent à des volumes inférieurs au microlitre. Comme pour l'ensemencement, cela peut être propice aux erreurs lorsque vous travaillez avec de grandes plaques multipuits, et les instruments de manipulation de liquides électroniques à haut débit, comme les systèmes semi-automatisés à 96 canaux, peuvent être très utiles pour éviter les erreurs. Pour les étapes nécessitant l'ajout par gouttelettes ou des réactifs, par exemple pendant l'électroporation, les pipettes à répétition électroniques portables avec distribution sans contact réduisent le risque de contamination croisée et accélèrent les flux de travail.

## 5. Conclusions et recommandations

En résumé, la culture cellulaire est un outil puissant avec des applications couvrant les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire, de l'immunologie, de la recherche sur le cancer, des neurosciences, des maladies cardiovasculaires et de la découverte de médicaments. Pour qu'elle soit efficace, il est essentiel d'apprécier les avantages et les inconvénients des types de cellules disponibles, afin de comprendre lesquels fourniront les résultats les plus bénéfiques. En outre, il est essentiel de comprendre les difficultés et les limites associés à la culture cellulaire. Un grand nombre de difficultés en matière de culture cellulaire sont liées à de mauvaises techniques de manipulation de liquides. Il est donc possible de les améliorer ou de les éviter en sélectionnant une pipette optimale, en réduisant les étapes de manipulation requises et en régulant le pipetage. En termes de prévention de la contamination, la réduction du nombre d'étapes de manipulation de liquides et du temps pendant lequel les cellules sont en dehors de l'incubateur est essentiel.

Lorsque vous utilisez des plaques multipuits (24, 96 ou 384 puits), vous pouvez utiliser des pipettes à répétition ou des pipettes multicanaux manuelles ou électroniques. Si l'on utilise seulement une fraction de la plaque, une pipette multicanaux ou une pipette à répétition standard peut être la plus appropriée. Si la plaque complète, ou plusieurs plaques, sont utilisées, un système de pipetage électronique à haut débit permettra de réduire considérablement le temps de flux de travail et, par conséquent, l'exposition de la culture à la contamination ou aux conditions environnementales changeantes. En outre, il est essentiel de travailler dans des conditions d'asepsie et d'utiliser des cônes filtrés pour éviter la contamination des cellules, des expériences et des pipettes<sup>19</sup>. Les systèmes de pipettes électroniques 96 canaux modernes sont désormais suffisamment compacts pour les déplacer autour de la hotte de culture cellulaire et peuvent être utilisés à chaque étape du procédé de culture cellulaire. Cela réduit le risque de contamination et de variabilité introduit pendant le procédé de pipetage.

Il faut également associer les bons outils aux [bonnes pratiques de pipetage \(GPP\)](#). Ils sont essentiels pour améliorer la qualité, la fidélité et la reproductibilité des données, et les pipettes semi-automatisées facilitent considérablement l'obtention d'un pipetage homogène. Les pipettes électroniques et les systèmes de pipetage peuvent réguler l'angle d'immersion, la profondeur, le temps de distribution et le débit d'aspiration/de distribution des cônes, réduisant ainsi la variabilité associée au pipetage manuel. Enfin, les instruments électroniques de manipulation de liquides améliorent efficacement la vitesse et l'efficacité des procédés de culture cellulaire, en particulier les procédés longs comme l'ensemencement de cellules dans des plaques à 96 ou 384 puits, améliorant la viabilité et la qualité des cellules et augmentant la productivité des scientifiques. En outre, les pipettes multicanaux ou à répétition à haut débit permettent d'extrapoler efficacement les expériences et d'éviter les problèmes associés, comme les erreurs humaines et les troubles musculosquelettiques.

Pour en savoir plus sur la façon dont la gamme complète d'outils de manipulation de liquides Rainin peut vous aider à répondre à vos besoins de recherche, rendez-vous sur [www.mt.com](http://www.mt.com).

## Références

1. Petrov YuP, Tsupkina NV. Comparative Morphometry of Epithelial- and Fibroblast-like Type Cells in Culture. *Cell Tissue Biol.* 2019;13(1):47-54. doi:10.1134/S1990519X19010085
2. Hussain T, Mulherkar R. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med.* 2012;1(2):75-87.
3. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci AMS.* 2018;14(4):910-919. doi:10.5114/aoms.2016.63743
4. Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J.* 2014;9(9):1115-1128. doi:10.1002/biot.201300492
5. Maximov A, Pang ZP, Tervo DGR, Südhof TC. Monitoring synaptic transmission in primary neuronal cultures using local extracellular stimulation. *J Neurosci Methods.* 2007;161(1):75-87. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.10.009
6. Xiao B, Ng HH, Takahashi R, Tan EK. Induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: scientific and clinical challenges. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(7):697-702. doi:10.1136/jnnp-2015-312036
7. Chun YS, Byun K, Lee B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol.* 2011;44(4):245. doi:10.5115/acb.2011.44.4.245
8. Stacey GN. Cell Culture Contamination. In: Cree IA, ed. *Cancer Cell Culture*. Vol 731. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2011:79-91. doi:10.1007/978-1-61779-080-5\_7
9. Mahmood A, Ali S. Microbial and Viral Contamination of Animal and Stem Cell Cultures: Common Contaminants, Detection and Elimination. *J Stem Cell Res Ther.* 2017;2(5). doi:10.15406/jsrt.2017.02.00078
10. Dos and don'ts for molecular testing. Accessed June 7, 2023. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis/nucleic-acid-amplification-based-diagnostics/dos-and-don-ts-for-molecular-testing>
11. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature.* 2016;533(7604):452-454. doi:10.1038/533452a

12. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1021-1046. doi:10.1038/bjc.2014.166
13. Souren NY, Fusenig NE, Heck S, et al. Cell line authentication: a necessity for reproducible biomedical research. *EMBO J*. 2022;41(14). doi:10.15252/emboj.2022111307
14. Niepel M, Hafner M, Mills CE, et al. A Multi-center Study on the Reproducibility of Drug-Response Assays in Mammalian Cell Lines. *Cell Syst*. 2019;9(1):35-48.e5. doi:10.1016/j.cels.2019.06.005
15. Akash MSH, Rehman K. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer Nature Singapore; 2020. doi:10.1007/978-981-15-1547-7
16. Llewellyn SV, Kermanizadeh A, Ude V, et al. Assessing the transferability and reproducibility of 3D in vitro liver models from primary human multi-cellular microtissues to cell-line based HepG2 spheroids. *Toxicol In Vitro*. 2022;85:105473. doi:10.1016/j.tiv.2022.105473
17. Chen A, Leith M, Tu R, Tahim G, Sudra A, Bhargava S. Effects of diluents on cell culture viability measured by automated cell counter. *Chalmers J*, ed. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0173375. doi:10.1371/journal.pone.0173375
18. Xie Y, Wang F, Puscheck EE, Rappolee DA. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 2007;74(10):1287-1294. doi:10.1002/mrd.20563
19. Sanders ER. *Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors*. *J Vis Exp*. 2012;(63):2754. doi:10.3791/2754
20. Rossetti T, Nicholls F, Modo M. Intracerebral Cell Implantation: Preparation and Characterization of Cell Suspensions. *Cell Transplant*. 2016;25(4):645-664. doi:10.3727/096368915X690350
21. Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, et al. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:701031. doi:10.3389/fbioe.2021.701031
22. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(21):7413-7417. doi:10.1073/pnas.84.21.7413
23. Potter H. Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol*. 2003;62(1). doi:10.1002/0471142727.mb0903s62