

FICHE TECHNIQUE *CULTURE 2D*

Milieu sans sérum – OptiPASS®

Produit	Numéros de catalogue	Volumes disponibles
Milieu sans sérum OPTIPASS®	631706 – OPTI04	50mL
-	631703 – OPTI04	100mL
Culture 2D	631702 – OPTI04	500mL

Description du produit

La complémentation en Sérum de Veau Foetal (SVF) est un geste naturel banalisé depuis des dizaines d'années pour beaucoup de chercheurs réalisant des cultures cellulaires. Ces milieux enrichis en sérum d'origine animale permettent d'apporter les constituants nécessaires à la culture in vitro.

Néanmoins, le recours à la supplémentation en SVF dans les milieux est de plus en plus controversé : les méthodes d'obtention du sérum posent des problématiques éthiques, il y a de la variabilité inter-lot, de la fluctuation dans les prix et des risques de contamination importants...La problématique est renforcée par la règle européenne des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) sur l'expérimentation animale et l'utilisation de produits d'origine animale dans la Recherche.

Aussi, des alternatives à l'utilisation du sérum tels que des milieux complets, sans produits d'origine animale et chimiquement définis (sans sérum) sont de plus en plus démocratisées.

Le consortium BIORCELL3D (société BIOPASS) développe des outils et procédés de biotechnologie pour la Santé « **éthiques, reproductibles et fiables** ». Ils permettent de réduire l'utilisation des animaux et des produits d'origine animale dans les recherches. BIORCELL3D a conçu des formulations de milieux de culture **prêts à l'emploi, chimiquement définis et exempts de composés d'origine animale** (gamme de milieux OptiPASS®), gages de **fiabilité** et de **reproductibilité** dans les cultures.

OptiPASS® est composé d'un milieu de base comportant tous les éléments essentiels à la survie des cellules en quantité suffisante. En supplément de ce milieu de base, un ensemble de composés est ajouté, chacun ayant pour but de remplacer le sérum. Ces composés doivent donc fournir les mêmes apports à la culture cellulaire que l'ajout habituel de sérum. Ils doivent donc apporter des facteurs de croissance et des hormones qui stimuleront / favoriseront la prolifération cellulaire.

L'ensemble des lignées cellulaires validées avec OptiPASS® pour la **culture cellulaire 2D et 3D** est issu de types tumoraux très différents : **cancers de sein**, du **poumon**, de l'**ovaire**, de la **prostate** ou encore de la **peau**, soit 15 à ce jour, ainsi qu'un certain nombre de **tissus sains**. Tout cela **sans induire de changements morphologiques et phénotypiques majeurs, ni de modifications de réponse aux traitements**. Ces lignées sont normalement cultivées dans plus de 8 milieux de base différents supplémentés en SVF. Grâce à OptiPASS®, elles peuvent être cultivées aujourd'hui dans un seul milieu pour un grand nombre de types cellulaires, facilitant et optimisant les manipulations en laboratoire, gage d'une certaine **universalité**.

Afin de favoriser l'adhésion cellulaire pour la culture en monocouche, il est nécessaire de réaliser un coating des surfaces de pousse avec des facteurs d'adhésion, tels que le Geltrex®, Matrigel® et du Collagène 1 (composants de la matrice extracellulaire).

Conditions de stockage

Stockage : +4°C / -20°C / -80°C, à l'abris de la lumière

Stabilité : 6 mois à +4°C / 12 mois à -20/-80°C

Volumes disponibles à la vente : 50mL, 100 mL, 500 mL

Complémentation en antibiotique : À effectuer

Conditions et conseils d'utilisation

❖ Adaptation cellulaire au milieu sans sérum

Il est conseillé d'effectuer un **premier passage** avec un mélange de milieu avec la proportion suivante : **50% milieu de référence et 50% milieu OptiPASS®**. Lors du passage suivant, il est possible de **passer directement avec 100% du milieu sans sérum sans effet délétère pour les cultures**.

Pour plus de renseignements et/ou d'accompagnement sur notre produit, n'hésitez pas à nous contacter.

❖ Coating de la surface de pousse

De par sa composition sans sérum de veau fœtal qui contient de nombreux facteurs d'adhésion cellulaire, une étape préliminaire de *coating* de la surface est nécessaire pour une culture avec OPTI-04. Trois types de protéines ou cocktails de protéines d'adhésion ont été testés : le Geltrex® (Gibco), le Matrigel® (Corning Life Science) et le Collagène 1. Des protocoles sont proposés ci-dessous pour les 3 types de *coating*

- *Geltrex® et Matrigel® – concentration d'utilisation recommandée 1%*

Le Geltrex® et le Matrigel® sont des matrices biologiques contenant les principaux constituants de la Matrice ExtraCellulaire (MEC) tels que la laminine, le collagène de type IV, le protéoglycane ou encore l'entactine. Ces gels polymérisent de façon irréversible une fois réchauffés au-dessus de 20°C pendant plus de 15 minutes. Pour la culture en monocouche de cellules adhérentes dans un milieu sans sérum, ces matrices sont généralement nécessaires afin de favoriser l'adhésion / attachement des cellules à leur support de pousse. La concentration finale conseillée du Geltrex® et du Matrigel® est de 1%, une fois dilués dans du milieu de culture ou du PBS. Le volume de solution adéquat est de 0,12mL/cm².

Exemple pour une flasque de 25cm²

- Prélever 3 mL de PBS ou milieu Froid (maintenu à 4°C)
- Au dernier moment, sortir un aliquot congelé de 30 µL de matrice
- Faire fondre rapidement le glaçon avec 1 mL de PBS ou milieu **FROID** prélevé dans le tube Falcon
- Transférer le Geltrex® ou le Matrigel® solubilisé dans le tube de dilution
- Bien mélanger afin d'obtenir une solution homogène
- Répartir dans la flasque
- S'assurer que la solution est correctement répartie sur l'ensemble de la surface de pousse
- Incuber la flasque au minimum 30 minutes (incubateur) et au maximum 4h
- Retirer le surplus de matrice avec une pipette 5 mL, attention à ne pas laisser sécher le *coating* ni toucher la surface de pousse avec le cône / pipette pour ne pas retirer le *coating*. La flasque doit être rapidementensemencée afin qu'il n'y ait pas d'assèchement de la matrice.

- *Collagène 1 – concentration d'utilisation recommandée 50µg/mL*



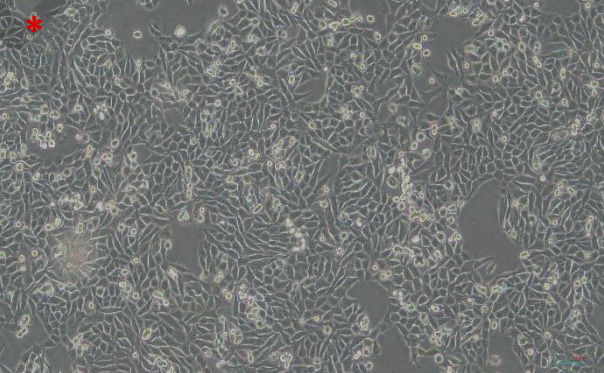
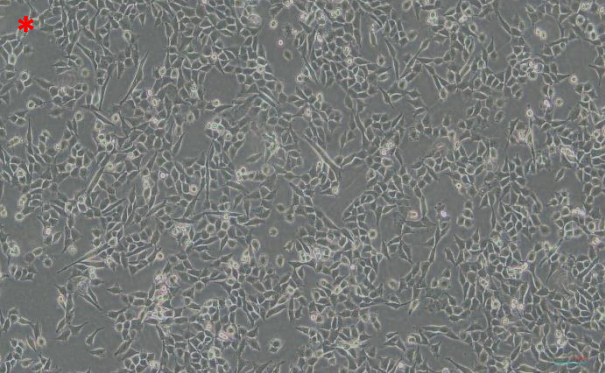
Le collagène 1 est l'un des principaux constituants de la Matrice ExtraCellulaire (MEC). Son utilisation permet d'imiter au mieux les environnements *in vitro* pour les applications en culture cellulaire 2D. Pour la culture en monocouche de cellules adhérentes dans un milieu sans sérum, cette matrice est indispensable pour l'adhésion et l'attachement des cellules à leur support de pousse. La concentration finale conseillée de collagène de type 1 dilué dans de l'acide acétique (0,02N) est de 50 µg/mL. Le volume de solution adéquat est de 0,12mL/cm².

Exemple pour une flasque de 25cm²

- Préparer une solution d'acide acétique à une concentration de 0.02N avec de l'eau ultrapure
- Bien mélanger afin d'obtenir une solution homogène
- Filtrer la solution sur filtre PES 0.22µm – la solution peut se conserver à +4°C durant 2 mois
- Prélever le volume adéquat de collagène type 1 selon la concentration mère
- Diluer le collagène dans un volume de la solution d'acide acétique 0,02N (Quantité suffisante pour 3,0 mL) afin d'obtenir une concentration finale de 50 µg/mL
- Bien mélanger afin d'obtenir une solution homogène
- Répartir la solution dans la flasque
- S'assurer que la solution est correctement répartie sur l'ensemble de la surface de pousse
- Incuber la plaque au minimum 4 heures à +37°C (incubateur)
- Retirer le surplus de collagène avec une pipette. Attention à ne pas laisser sécher le *coating* ni toucher la surface de pousse avec le cône / pipette pour ne pas retirer le *coating*
- Effectuer un rinçage avec du PBS. La flasque doit être rapidementensemencée afin qu'il n'y ait pas d'assèchement de la matrice.

Exemple de lignées* pouvant être cultivées en 2D avec OptiPASS® : différents types cellulaires tumoraux et sains

***Non exhaustif**



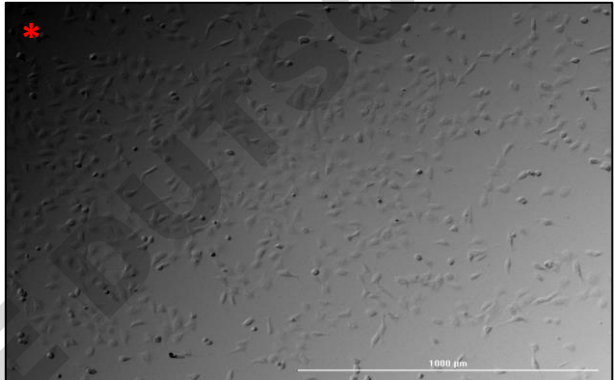

Lignée cellulaire	Origine	Milieu de référence avec concentration d'utilisation de SVF	Aspect morphologique Milieu de référence	Aspect morphologique Milieu OptiPASS
MDA MB 231	Cancer du sein Triple-Négatif Dérivée d'un site métastatique	RPMI 1640 – 10% SVF		
CAL51	Cancer du sein Triple-Négatif	DMEM High Glucose – 10% SVF		

* Pas de différence notable de morphologie entre les deux milieux



A375	Mélanome	DMEM High Glucose – 10% SVF		
PC3	Adénocarcinome de grade IV de la prostate Métastase osseuse	RPMI 1640 – 10% SVF		
NCI H1975	Adénocarcinome du poumon Cancer du poumon non à petites cellules	RPMI 1640 – 10% SVF		

* Pas de différence notable de morphologie entre les deux milieux

SK-OV-3	Adénocarcinome de l'ovaire	RPMI 1640 – 10% SVF		
VERO E6	Lignée saine de rein de Cercopithecus aethiops	DMEM High Glucose – 5% SVF		

* Pas de différence notable de morphologie entre les deux milieux

Précautions et avertissements

Utilisation à des fins de Recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic. Les propriétés physiques, chimiques et toxicologiques des produits chimiques et des réactifs contenus dans OptiPASS® peuvent ne pas avoir été entièrement étudiées. Par conséquent, BIOPASS S.A.S recommande d'utiliser des gants, des blouses de laboratoire et des lunettes de protection lors de l'utilisation de ces réactifs. BIOPASS S.A.S décline toute responsabilité pour les dommages résultant de la manipulation ou du contact avec ces produits.

Références

- Dubois C. et al, « The New Synthetic Serum-Free Medium OptiPASS Promotes High Proliferation and Drug Efficacy Prediction on Spheroids from MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines », Journal of clinical medicine (2019)

Pour les références spécifiques aux lignées cellulaires, veuillez nous contacter :

contact@biorcell-3d.com

Support Technique

Pour une assistance technique, des questions ou des remarques, veuillez nous contacter par e-mail (contact@biorcell-3d.com) ou par téléphone +33 4 73 17 70 77