

Identification des problèmes de croissance et d'attachement

À cause de la complexité que représente la culture cellulaire, il n'est pas facile d'identifier les divers problèmes de croissance, d'attachement et de comportement des cellules.

Pour ce, nous allons survoler différentes complications qui peuvent influencer notre façon de faire.

Les problèmes

- Croissance inégale du tapis cellulaire
- Croissance par agrégats
- Attachement irrégulier
- Changement brutal du taux de croissance
- Changement de morphologie, apparence

Les sources

- Les cellules
- Le culturiste
- Les appareils (incubateur...)
- Les solutions (milieu, FBS, autres...)
- La vaisselle ou plastique utilisés
- Autres collègues...

Cependant, encore faut-il être à l'écoute de ses cellules et les connaître assez pour pouvoir s'apercevoir des changements qui y surviennent... L'observation est la première règle importante.

Vaisselles et plastiques

La plupart des plastiques manufacturés sont traités pour avoir une surface hydrophile qui permet aux cellules, par ses charges négatives, de bien s'attacher.

Advenant que l'on soupçonne que le traitement peut être en cause, on pourrait comparer diverses compagnies du même type de plastique, ou d'un autre numéro de lot.

Les charges électrostatiques d'une pièce trop sèche peuvent aussi causer des problèmes semblables.

L'entreposage des boîtes de Pétris sur un frigo ou autre source de chaleur, peut altérer l'adhérence de la surface.

Technique

Si l'on colore le tapis cellulaire et que l'on observe les patrons suivants :

- Trou, cercle, « spot »
 - Reliez à la mousse formée lors de l'inoculation des cellules
 - Évitez de faire de la mousse en pipetant
- Surface sans cellule près de la ligne vers le collet
 - Manque de milieu, mauvaise distribution du milieu en inoculant
 - Mouvement trop brusque lors du transport des cellules
- Trop de cellules en bordure
 - Quantité insuffisante de milieu
 - Tablette de l'incubateur croche, pétris mal empilés (tour de Pise...)
- **L'Effet de Halo**
 - surtout observé dans les puits à cause du ménisque. Ainsi on retrouve plus de milieu (plus épais sur les bords), donc plus de cellules au bord qu'au centre.
Règle 0,2 à 0,3 mm milieu/cm²

Exemple : 75cm² → 15 à 22.5ml

150cm² → 30 à 45 ml

pétris 100mm → 11ml

Truc : Dans les 96 puits, on peut ensemencer avec un minimum de liquide.
Ajouter le volume final une fois les cellules attachées.

Mycoplasme

Des cellules infectées aux mycoplasmes peuvent dans certains cas perdre de l'adhérence ou mourir. Cependant il est difficile de cerner le problème sans test approprié. Voir le chapitre sur les contaminants.

Rollers

- La vitesse peut être un facteur important
- Trop vite : Agrégat de cellules
- Niveau de l'appareil
- Vitesse uniforme de roulement (.5 à 1 rpm)

Tapis levé

- Cellules trop confluentes, inhibition-contact
- Rayure due à un accrochage avec la pipette
- Toxicité

Appareils, incubateurs

Les paramètres doivent être stables afin d'obtenir une constance dans les résultats de recherches.

Température

Quand nous sommes nombreux à ouvrir et à fermer la porte constamment, les cellules peuvent être influencées surtout au moment le plus critique qu'est l'ensemencement. Le devant de l'incubateur est sujet à des baisses de température. Sur les tablettes du haut la température va refroidir plus vite. Au centre c'est plus stable.

Patron carrelé : Problème de température. Le métal restant plus chaud que l'air, les cellules collent seulement à l'endroit où est le métal. Patron inverse dans le cas contraire.

Éloignez-vous des autres voisins. Risque de renversement.

Évaporation

Garder un réservoir humide dans l'incubateur (contribue à la stabilité du CO₂)

Un milieu qui s'évapore, est un milieu qui change d'osmolarité (stress). Attention au petit volume comme les plaques 96 trous, surtout les trous autour de la plaque. Éloignez-vous de la fan.

Vibration

Patron de cellules concentriques, d'anneaux

Vérifier l'emplacement de l'incubateur ou voir la source du problème.

CO₂

Facteur critique : Pas de CO₂, pH basique, mort des cellules.

Niveau des tablettes

Trypsinisation

Pas assez : Agrégats, les cellules poussent et forment des montagnes....

Trop : Digestion des cellules

Trituration : On peut avec la pipette faire des UP AND DOWN pour bien séparer les cellules mécaniquement, soyez plus ou moins délicats selon le type cellulaire.

Milieu

Souvent, le milieu est un des premiers suspects de problèmes sérieux. Cependant, il est difficile à détecter car il est invisible. Seul les références, la littérature ou les compagnies qui vendent ces cellules peuvent vous informer sur la formulation adéquate.

- Soit déficient (L-glutamine)
- Soit toxique (L-glutamine, FBS, Hepes...)

Qualité de l'eau (endotoxine)

Voir référence sur les contaminants

Tampon

Earle's Balanced Salt pour CO₂.

Hank's Balanced Salt dans un environnement atmosphérique.

Filtration

Certaines membranes tel que cellulose nitrate ou nylon peuvent fixer des composantes du milieu, spécialement les peptides et autres protéines.

Sérum

\$, qualité variable, potentiellement infecté de mycoplasme, endotoxine

Lumière

Un milieu exposé à la lumière devient toxique avec le temps d'exposition. La lumière interagit avec certaines composantes du milieu

- riboflavine, tryptophane, Hepes----→ peroxyde hydrogène, radicaux libres
- L-Glutamine ----→ Ammoniaque
- Référer au document : Problème de contaminant

Collègues de travail

- Méfiez-vous de ceux qui sont passé avant vous...
- Nettoyez tout avant de commencer à travailler.
- Limitez la surcharge des incubateurs
- Ne pas partager de bouteilles avec les autres, aucun contrôle...
- Attention aux matériels communs : Canons, hottes, sac de pétris ouvert, microscope, le contenant à déchets sous la hotte, la pompe à vide (tuyau)
- Lavez le tuyau de la pompe avant et après usage.

Solution

- Essayez d'identifier le problème
- Évaluez toutes les possibilités
- Ne pas tout changer d'un coup
- Voyez s'il n'y a pas eu de changement récent
- Combien de personnes ont les mêmes problèmes que vous ?
- Faites des tests pour bien confirmer que le problème est vraiment celui auquel vous pensez