

La culture cellulaire et ses contaminants

Général

La qualité des résultats de recherche dépend de la santé des cultures cellulaires et dans cette optique, le culturiste doit être vigilant face aux divers contaminants, soit d'origine biologique ou chimique.

Qu'ils soient visibles ou non, destructeurs ou non, les contaminants agissent sur la croissance, altèrent les caractéristiques et les fonctions cellulaires et influent sur la qualité des résultats. Parfois, certains agents ne sont pas toxiques individuellement mais peuvent le devenir, soit par leur forte concentration ou combinés avec un autre agent. Également, certains types cellulaires sont plus sensibles que d'autres. Voici quatre bonnes raisons de s'y attarder :

- Perte d'argent et de temps
- Résultats expérimentaux erronés ou inappropriés
- Perte de produits importants
- Embarras personnel (réputation dû à des résultats erronés)

Contaminants chimiques

Les contaminants chimiques sont définis comme étant une présence de produits non vivants ayant un effet indésirable sur la culture cellulaire. Voyons quelles pourraient être les sources potentielles de problèmes... Ils peuvent être une source de variabilité de vos résultats.

- Ions métalliques, endotoxines et autres impuretés du milieu, du sérum ou de l'eau.
- Qualité du plastique jetable (pétris, tubes, bouteilles)
- Radicaux libres et peroxyde d'hydrogène présents dans le milieu causés par la photo activation du tryptophane, riboflavine ou hepes exposé à la lumière. Ammoniaque dans le cas de la dégradation de la L-glutamine.
- Dépôt de matière sur le verre ou sur les pipettes causé par un reste de détergent, résidu qui vient du papier aluminium.
- Résidu de germicides ou pesticides utilisés lorsqu'on désinfecte les incubateurs, comptoirs ou autres instruments.
- Impureté de CO₂ de l'incubateur.

Milieu

La qualité de l'eau qu'on utilise pour préparer le milieu. Le système d'eau ultra-pure utilisé au département est de très bonne qualité. Les réactifs achetés doivent être de qualité supérieure (degré de pureté) et toujours testés pour la culture cellulaire.

L'entreposage et le chauffage du milieu peuvent affecter ce dernier. **GARDEZ VOS MILIEUX À LA NOIRCEUR à l'abri de la chaleur et de la lumière.** La L-Glutamine contenue dans le milieu se dégrade en ammoniaque au fur et à mesure que votre milieu baigne dans le bain-marie ou sous la hotte. En 7 jours d'exposition, il ne reste plus de L-Glutamine. D'autres ingrédients tels que la riboflavine, le tryptophane et l'hepes se transforment en peroxyde d'hydrogène et en radicaux libres.

Solution

- Invitrogen offre un produit de remplacement : le GlutaMax plus stable à la lumière et à la chaleur.
- Achetez du milieu sans L-Glutamine et le rajouter au besoin
- Préparez de plus petites quantités de milieu
- Laissez votre bouteille de milieu sortie le moins longtemps possible, évitez la chaleur et la lumière.
- Solution extrême et difficile à réaliser : mettez du papier d'aluminium sur vos bouteilles et travaillez sous la hotte à la noirceur.

Sérum

La composition d'un sérum est variable d'un numéro de lot à l'autre pour sa quantité d'hormones de croissance, de facteurs de croissance et de matières toxiques. Cette variation peut ainsi causer des changements à vos cultures. Il est préférable de le décongeler au frigo plutôt qu'à 37°C. On voit souvent de petits débris dans le sérum causés par le gel-dégel, ce n'est pas contaminé mais ce sont des protéines précipitées et c'est normal.

Notons que certaines protéines du sérum ont une affinité avec les contaminants chimiques tels que les métaux lourds.

Eau

Pour la préparation des solutions (milieu, PBS, autres) le système MILLI-Q RO est un bon choix, tant qu'il est bien entretenu.

Endotoxines

Ce sont des lipopolysaccharides produits par les déchets des bactéries gram- dans l'eau, aussi appelés pyrogène. D'autres origines du sérum : ils sont une source significative de problèmes qui affectent la performance des cellules.

Certains types cellulaires qui expriment des produits de sécrétions tels que les hybridomes (Ac), vaccin ou lignée stables (protéines), ont déjà un haut taux de toxicité.

Entreposage de la vaisselle

On peut retrouver dans les bouteilles utilisées, des métaux lourds, des composantes organiques, des colorants, des solvants, des pesticides. La même chose peut se retrouver dans les bouchons, sur les pipettes.

Résidus de désinfectant, savon, détergent, papier aluminium...

Lumière

Certaines composantes du milieu exposées à la lumière, ainsi qu'à la chaleur, produisent du peroxyde hydrogène (hepes), de l'ammoniaque (L-Glutamine) et des radicaux libres, toxiques pour les cellules. Notez que plus il est exposé, plus il est toxique.

Incubateur

Les produits utilisés pour nettoyer l'incubateur peuvent être toxiques. Il est important de bien rincer. Ce n'est pas parce que vous ne sentez rien qu'il n'y a pas de risque.

Le CO₂ peut contenir d'autres composantes telles que de l'huile ou autres gaz (CO). La qualité de gaz (CO₂) MEDICAL est supérieure au gaz (CO₂) INDUSTRIEL. Le prix du gaz médical est plus cher. C'est ce dernier que nous avons ici au département.

Contaminants biologiques

Ces derniers sont plus facilement détectables et souvent visibles à l'œil nu (bactéries, levures, moisissures, etc.). La croissance rapide de ses micro-organismes (surtout en absence d'antibiotique) permet de les détecter en peu de temps : turbidité, changement de pH, mort cellulaire. Cependant, l'utilisation fréquente d'antibiotiques contribue à garder un faible taux d'infection, difficile à percevoir et persistante dans l'entourage. Sans parler du nombre grandissant de bactéries qui deviennent résistantes!

D'autres bactéries sont moins perceptibles au microscope comme les bactéries de petites dimensions ou intracellulaires.

Dans un cas comme dans l'autre, une contamination insidieuse qui persiste de façon permanente peut causer des altérations significatives et compromettre vos résultats.

Bactéries

Mobilité, forme définies, pousse rapide, le pH du milieu, turbidité. Cependant, certains de nos microscopes ont leurs limites... Soyez vigilant. Les bactéries anaérobies poussent beaucoup plus lentement.

Levures, moisissures

Plus gros, poussent en colonies, signes de bourgeonnement. Les spores qui sont invisibles donnent parfois des maux de tête... On sait quand ça commence mais on ne sait pas quand ça fini. Les spores restent latentes et éclosent sous l'effet d'un stress.

Une des souches fréquentes, *Candida* ressemble à des ballons de Football, un contour très défini et l'intérieur brillant en contraste de phase. Ne pas ouvrir les pétris dans la salle de culture, vous risqueriez de libérer les spores dans l'air ambiant.

Virus

- Trop petits pour être détectables à moins de tests sophistiqués.
- Les virus sont souvent spécifiques à certaines espèces ou à certains tissus
- Plusieurs donnent un effet cythopatique (mort des cellules)
- Attention aux cultures primaires humaines (HIV, hépatite B, Epstein-Barr...)
- Source : Le sérum peut contenir des virus bovin.

Protozoaire

- La plupart sont unicellulaires, tel que les amibes
- Certains peuvent former des spores
- Certains ont un effet cythopatique (cellules détruites en moins de 10 jours).
- Source : poussière, saleté, air, occasionnellement des tissus (tissu de gorge)

Invertébré

- Araignées ou insectes (mites)
- Source : boîtes de cartons, pieds, chariot

Mycoplasmes

Le mycoplasme est le plus dévastateur et le plus répandu des contaminants. On le surnomme le cancer des cellules. Aussi appelé PPLO (*PleuroPneumoniae like Organisme*), il en existe de nombreuses souches. Ils agissent sur les cellules soit par la production de substances codées par le génome bactérien ou soit par l'utilisation de constituants du milieu de culture. Les mycoplasmes ont la capacité d'affecter leur cellule hôte dans leur fonction, croissance, métabolisme, morphologie, attachement membranaire, propagation de virus, causent des dommages au niveau des chromosomes et enfin amener les cellules vers leur belle mort. Travailleriez-vous avec des cellules contaminées avec des bactéries?

Description

- procaryote 0.15 à 0.8 um diamètre (passe à travers 0.2um)
- Dépourvu de paroi cellulaire
- Bactéries-likes, se comporte un peu comme un virus
- Leur double DNA est circulaire et riche en adénine et en thymidine.
- Intracellulaire, se réplique de façon indépendante
- Poussent à forte densité 10⁷ à 10⁹ colony forming units/ml
- Autres souches associés : acholeoplasma et les uréoplasma
- Résistance : sont résistantes a plusieurs antibiotique, gel-dégel
- Division intervient après 6heures

Apparence

Aucune particulière, seul des tests spécifiques peuvent en détecter la présence. Parfois on observe un changement dans le métabolisme, une diminution de croissance, un milieu plus acide ou plus alcalin selon la variété, perte d'adhérence ou des débris cellulaires du à une mort cellulaire.

Conséquences

Les cellules infectées peuvent donner des résultats erronés qui sont causés soit par des produits des mycoplasmes ou soit ils sont cachés par ceux-ci.

L'infection réduit la productivité, le taux de croissance et la viabilité des cellules.

Cette même infection produit des altérations membranaires (caractéristique antigénique). Il affecte la synthèse des protéines, RNA, DNA, inhibe les protéines carbohydrates. Les mycoplasmes peuvent interférer avec le métabolisme des AA et des acides nucléiques des cellules hôtes.

Exemple : Augmente la dégradation des acides nucléiques. Le HPRT des mycoplasmes est plus sensible à la 6-thioguanine que l'enzyme des mammifères. Les mycoplasmes utilisent L'Arg et diminuent de 2 logs le titre de la production virale.

Source

Les sources principales sont la flore orale humaine, les bactéries en suspension dans l'air, aérosol soit sous la hotte ou par les incubateurs, le sérum animal, le milieu et les diverses solutions. La contamination se propage aussi par des nouvelles cultures cellulaires provenant des compagnies, des labos extérieurs ou de nouvelles souches décongelées récemment. Selon les normes, il faudrait attendre 20 min entre chaque type cellulaire, mais la pratique étant ce qu'elle est!

Traitement

Plusieurs compagnies développent des produits d'élimination

- Plasmocin (InvivoGen) 25ug/ml pendant 2 semaines
- Mynox (Minerva Biolab)
- Ciprofloxacine : 10 jours à 10ug/ml (Bayer)
- Clean Cell
- Mycoplasma-Ex et Biomyc-3 (Promokine)

Les fluoroquinolones tels que *MRA* (agent Suppression Mycoplasme) utilisés 7jrs dans un milieu contenant 1% de MRA à 50ug/ml (ICN) combiné à la *Tylosine* utilisée pendant 3jrs dans un milieu contenant 1% tylosine à 6mg/ml.

Personnellement je préfère le Plasmocin, facile d'usage, peu coûteux, non toxique, traitement intracellulaire.

Attention même aux compagnies qu'on croit exemptes de mycoplasme...

- DA (Food and Drug Administration) 15%
- Bionique Testing Laboratories 11%
- Microbiological Associates 13%
- ATCC 14%

Curieusement plus on fait l'emploi d'antibiotiques, plus il y a de chances que vos cellules soient contaminées. De cette façon, on contribue à cacher le problème qui semble très répandu à travers le monde...

- USA 15%
- Europe 25%
- Japon 80%

Les autres cultures cellulaires

Le plus répandu de ces cas est sans doute la cellule HeLa. Des chercheurs ont démontré qu'environ 25% des cellules humaines sont contaminées par les cellules de types HeLa.

Prévention : n'utiliser qu'une bouteille de milieu par lignée cellulaire

- Même chose pour la trypsine, PBS...
- Bien désinfecter la hotte entre chaque type cellulaire
- Idéalement, on suggère d'attendre 20 minutes
- Utilisez des filtres sur le pipette-aid

Si vous avez plusieurs types de cellules, finissez par les cellules Hela

Utilisez des tips avec filtres quand on se sert des pipettes-mans

Source de contamination

Solution, vaisselle

- Autoclave : Le choix du cycle approprié, le volume parfois critique (>500ml)
 - La forme, la grosseur et la nature des objets à autoclavés.
- Entreposage : endroit propre et sans poussière.
- Vaisselle jetable : garder les pétris stériles une fois le sac ouvert, fermer le sac...
- Tout produit biologique : milieu, sérum (bien que filtré sur 1micron, il n'est pas rare que le sérum commercial soit contaminé avec des mycoplasmes.)

Particules aérosols, poussières en suspension

Une partie des contaminants microbiens se retrouvent dans l'air accrochés à de fines particules de poussière en suspension.

Sources

- souliers, vêtements, cheveux, pompes aspirateurs, centrifugeuses, pipetage, sonicateurs, radiateurs (chauffage), four, réfrigérateurs, congélateurs...
- Les peaux mortes ou sèches (attention aux poignets, cette partie du corps doit être propre, même si vous portez des gants et un sarreau propre)
- Ne pas passer au dessus des pétris ouverts, la gravité fait que ça retombe dans vos pétris. Travaillez avec un angle, pas droit au-dessus de vos choses.
- Une personne malade (problème de maladie fongique...)
- Limitez l'entrée de chariot, boîte poussiéreuse, manteau...
- Tenez le labo le plus propre possible : microscope, hotte, incubateurs...
- Entreposage; les boites de carton devraient être proscrit, les moisissures poussent bien sur le carton avec un peu d'humidité.

Sources humides

- Réservoir d'eau dans l'incubateur
- Tablettes souillées par de pétris renversés

- Bain-marie
- Ventilateur au plafond de l'incubateur
- Transport des cellules d'un labo à un autre

Mycoplasme sous la hotte

Des personnes ont volontairement travaillé sous la hotte avec deux types de cellules dont un infecté avec des mycoplasmes. Après 6 semaines, les cellules saines étaient devenues positives aux mycoplasmes. Suite à ces études, certains pensent que les mycoplasmes peuvent rester vivants de 4 à 6 jours sous la hotte.

Conseils

- Ne pas éternuer ou parler sous la hotte
- Évitez d'entraver la circulation de l'air de la hotte (le grillage avant ne doit pas servir à accrocher votre feuille de protocole ou pour poser des tips)
- Passez toutes vos choses à l'éthanol (ou autre) avant de les amener sous la hotte.
- Limitez les mouvements brusques sous la hotte
- Limitez les mouvements derrière la hotte
- Testez de façon régulière la présence de mycoplasmes.

Insertion, pénétration

- Une bouteille mal fermée, entrouverte, un goulot effrité
- Une goutte de milieu entre le couvercle et le côté extérieur du pétris est une bonne porte d'entrée pour les micro-organismes. Éviter les mouvements brusques.
- Bouchons souillés remplis de milieu, même raison que ci-haut. Ne pas mélanger vos bouteilles en les tournant à l'envers.
- Les étagères sales dans l'incubateur : prenez le temps de bien les laver si vous renversez du milieu. N'oubliez pas le dessous de la tablette de l'incubateur...
- Attention aux transports des pétris de l'incubateur au microscope...

Accident

Une autre source de contamination reliée à la négligence humaine :

- Le symptôme du vendredi, la fatigue, la course avant de partir en vacances, surcharge de travail, nouvelle technique...
- Avoir une bonne méthode d'identification, être clair dans ses explications
- Observez le niveau d'azote liquide
- Observez le CO₂, température de l'incubateur
- Réduisez les accidents : l'identification, information complète lors du passage des cellules à une autre personne

Comment contrôler la contamination

- Avoir une bonne formation de technique aseptique
- Tenez un inventaire des problèmes survenus dans le labo (si pas associés à un appareil ou autre. Surtout utile si le problème revient.)

- Gardez en tête le niveau de risque ou danger pour vous et aussi pour les autres, particulièrement lorsque vous travaillez avec des virus, des cellules dérivées humaines ou primates. Laissez les gants avant de sortir de la salle.
- L'argent et le temps que vous perdez quand vos cellules sont contaminées
- Matériel : hotte certifiée, bon usage (pas de flamme, turbulence de l'air...)

Autres conseils

- Utilisez des flacons ventilés
- Lors du versement de milieu d'une bouteille à l'autre, essayez la goutte sur le goulot avec un papier propre ethanolé, avant de refermer le bouchon.
- Même chose si vous échappez du milieu entre le couvercle et le pétris. Sinon le milieu restant est un pont favorable à la pousse bactérienne.
- Quand vous utilisez des pétris, refermez bien le sac pour qu'il n'y ait pas de contact avec l'air, la poussière. Le sac risque de s'ouvrir en tombant sur le côté. Ne laissez pas vos pétris sans protection sur le comptoir.
- La hotte n'est pas un endroit de storage. Plus vous entrez de matériels sous la hotte, plus il y a de chances que l'air soit mal distribué...
- Ne pas pipetter à la bouche. Utilisez des tips avec filtres pour les pipette-mans.
- Utilisez un sarreau propre, uniquement pour la culture et pas ailleurs.
- Utilisez une bouteille par lignée cellulaire, désinfectez la hotte entre chaque lignée.
- Travaillez sans antibiotique.
- Aliquotez vos solutions (Trypsin, L-glutamine, autres...)
- Réduisez les accidents, voir ci-haut
- Il est important d'être vigilant, d'observer ses cellules régulièrement.
- Gardez un environnement propre
 - Lavez les incubateurs, hotte, microscope et bain-marie de façon régulière
 - Nettoyez régulièrement la surface de la hotte, des gouttelettes ou éclaboussures tombent souvent sans que vous ne les voyiez.
 - Se méfier des choses qui sont en commun, ex. : les boîtes de pipettes
 - Changez l'eau des récipients qui contiennent les pipettes sales régulièrement et ne pas oublier d'y mettre du javel.
 - Nettoyez le rebord des portes de frigos et congélateurs (moisissures)
 - Portez des gants élimine la possibilité que les micro-organismes qu'on a sur nos mains, sous nos ongles se retrouvent dans nos pétris. Les gants ne doivent pas venir du labo où vous étiez avant. Évitez de transporter les contaminants du labo à la salle de culture SVP! Même chose quand vous avez fini, enlevez vos gants, **SECURITÉ, BIORISQUE OBLIGE.**
- Faites des tests de stérilité
 - Vérifiez le bon fonctionnement de l'autoclave
 - Testez vos milieux une fois complétés avant de les utiliser 2 semaines à 30°C et 37°C sur gélose (trypticase Soy, Blood agar, Sabouraud...)
- Détection de mycoplasmes aux 3 mois sur les cellules, de nouvelle souche, ou s'il s'agit de cellules qui viennent d'un autre labo. Testez un nouveau numéro de lot du sérum.

- Établissez une liste de problèmes, voir les associations avec un numéro de lot de sérum, un lavage d'un appareil, un appareil défectueux.
- Congélation : les cellules congelées viennent à la rescousse des contaminées. Pour s'assurer qu'elles ne le sont pas, laissez-les 2 semaines sans antibiotique. Congelez vos cellules à bas passage avant qu'il n'arrive un pépin. Congelez plusieurs fois des pétris différents (pas pool).

Stratégie d'usage d'antibiotiques

Les antibiotiques sont indirectement responsables de la contamination, ils empêchent de faire ressortir rapidement la contamination.

- Avec antibiotiques : on trouve 72% des cellules qui ont des problèmes.
- Sans antibiotique : on a trouvé 7% des cellules qui sont contaminées

Travailler sans antibiotique permet vraiment de savoir s'il y a le moindre risque de contamination. Les situations qui font exceptions sont : dans le cas de culture primaire, lors de transfections transitoires ou lorsqu'on a besoin d'une grosse quantité de pétris (pour récolter).

Les antibiotiques ne remplacent pas de bonnes techniques aseptiques

Évitez la résistance aux antibiotiques

- 80% des mycoplasmes sont résistants à la gentamicine
- 15% des mycoplasmes sont résistants au ciprofloxacine
- 28% des mycoplasmes sont résistants à la lincomycine
- 21% des mycoplasmes sont résistants à la Tyrosine

Quoi faire ?

Il est préférable de jeter ce qui est contaminé et de recommencer le tout avec des cellules congelées (saines). Le traitement à l'aide d'autres antibiotiques peut modifier les caractéristiques des cellules. Notez que la fongizone ne permet pas de se débarrasser des levures mais d'arrêter leur croissance. L'utilisation massive d'antibiotique peut occasionner des problèmes de résistance (super-bactérie). Ne pas jeter vos contaminants dans l'évier de la salle de culture. Allez plutôt dans un autre labo.

Stratégie de contamination

Il se peut que pour diverses raisons vous ne sachiez jamais d'où vient réellement la contamination. S'il s'agit d'un mauvais mouvement sous la hotte, d'une pipette du canon qui était souillée par un collègue précédent, d'un pétris qui a pris un peu trop l'air ou que la bouteille que vous avez utilisée est terminée... Cependant, les solutions utilisées sont assez coûteuses et avant de tout jeter, il est bon de vérifier la source.

- Prévenez les autres utilisateurs, surtout ceux qui partagent le même incubateur. Dans le cas où il s'agirait de levures, il est important de stopper ou même de prévenir une épidémie. Par contre, si d'autres gens ont le même problème, voyez s'il y a un lien commun (cellules, hepes, etc.).

- Vérifiez tous les ingrédients individuellement

Exemple : bouteille milieu complet X, trypsin, L-glut, FBS (aliquote du même no lot, PBS, autres... Prenez un ml de chaque item mentionné et déposez-les dans 6ml (environ) d'un autre milieu sans antibiotique Y dans un petit flacon fermé hermétiquement. Prenez soin de faire un contrôle négatif avec le milieu Y seul. Le test s'effectue à 37°C durant 1 à 2 semaines et observez régulièrement et voyez s'il pousse quelque chose. Le type de flacon et l'endroit pour faire votre test peuvent varier. Si on fait le test dans l'incubateur habituel, vous pouvez utiliser un flacon ventilé. Contamination ou pas, ça ne sortira pas du flacon.

Mais comme ça prend un certain espace, on peut aussi utiliser n'importe quel incubateur pourvu que votre flacon soit bien fermé. À cause de l'échange d'air qui se fait (si le flacon est ventilé et aucun CO₂), le pH risque de changer vers un milieu tellement basique que les protéines vont se dénaturer et flotter à la surface du milieu comme une nappe d'huile. Aussi, les bactéries préfèrent un pH acide... L'idéal est d'utiliser des milieux propices à la pousse bactériennes tels que : LB, gélose sang, etc. Variez les températures, ex : 30°C pour les levures...

Par contre, la contamination peut provenir des cellules comme tel. Vérifiez si d'autres collègues qui ont les mêmes cellules ont le même problème que vous. Sinon décongelez un autre vial et recommencer. Vous pouvez aussi donner un vial en parallèle à un collègue pour voir...

Si le problème persiste, voyez d'autres possibilités, les appareils...

Un petit ménage s'impose des lieux communs : poignées de portes, le microscope, les poignées du frigo, la porte et le bain-marie, le téléphone, et tout ce que le monde touche en général... Un bon nettoyage des hottes s'impose! Il est possible de faire analyser le type de contaminant par des experts et ces spécialistes peuvent nous faire des suggestions selon les bactéries ou levures en cause. Voir les antibiotiques à utiliser (résistance). Dans certains cas, il s'agit d'une source extérieure, une boulangerie à proximité, les conduits d'alimentation d'air, de la construction dans un local voisin...