

Soyons Culturés

Voici quelques trucs

Les cellules sont des entités vivantes qui évoluent, se divisent et vieillissent tout comme nous. L'état des cellules dépend du traitement qu'on leur fait subir; même chose, on ressemble à ce que l'on mange. Il est important de bien dorloter ses cellules.

Premièrement : Les Gants

On entre dans une salle de culture les mains nues (**SANS GANT**). Ceux-ci ont servi à autre chose auparavant, peut importe l'usage... Une fois entré, on se lave les mains, permettant ainsi d'éliminer les levures qui sont restées sous les ongles ou après avoir manger une orange... Si vous venez de l'extérieur ou de brasser votre bière maison, les spores se retrouvent sur les cheveux, souliers, etc. Plusieurs lignées cellulaires exigent des gants (sécurité), mais comme règle générale, il apparaît que les gens ne se lavent pas les mains suffisamment, pour éviter la contamination par levure ou mycoplasme, mieux vaut porter des gants.

IMPORTANT ! Lorsque l'on a fini, on enlève nos gants et on se lave les mains avant de ressortir. Vous avez mis des gants pour vous protéger (ex : HeK293 tumorigène)? **Protégez aussi les autres SVP**. Les poignées de porte sont un exemple d'endroit que vous pouvez contaminer.

Préchauffer les milieux

Assurez-vous que le bain-marie ne soit pas un bain de culture... Nettoyez régulièrement et y ajouter un savon désinfectant (Osyl, VirKon, Rocall ou qui contient du Benzalconium chloride 0.05%). Aspergez bien vos bouteilles avec EtOH 70% avant de les déposer sous la hotte. Il n'est pas recommander de laisser vos bouteilles dans le bain-marie pendant des heures et des heures... La lumière et la chaleur dégradent certaines molécules qui se transforment en déchets toxiques pour les cellules.

Observation des cellules

Avant de commencer vos manipulations, il serait préférable d'observer vos cellules pour en connaître la morphologie et ainsi détecter certains changements (s'il en survient) ou de remarquer quelques intrus indésirables. Prenez la peine d'observer la couleur des milieux dans les boîtes de pétris de façon générale ainsi que le niveau de l'eau dans le réservoir. Advenant que toutes les boîtes de Pétri aient une couleur jaunâtre, c'est que le CO₂ est élevé. Si les milieux sont mauves, c'est qu'il n'y a plus de CO₂. S'il n'y a plus d'eau dans le réservoir, la concentration de CO₂ n'est pas contrôlée. **L'incubateur a besoin d'EAU pour que le CO₂ soit contrôlé adéquatement**. Il faut que le

réservoir d'eau soit nettoyé régulièrement car le bouillon de culture n'est pas désiré dans un incubateur.

Préparation de la hotte

Allumez la hotte (si ce n'est déjà fait) et attendez 10-15 minutes pour vous assurez que l'enceinte est bien stérile. Passez à l'EtOH : surface de travail, canons, pipetAid ainsi que toutes les bouteilles qui vont entrer sous la hotte.

1. Hotte à flux « flow » laminaire

L'air circule du fond vers vous. Donc tout ce qui obstrue la circulation d'air nuit à la stérilité des manipulations (ex : Vous passez vos cellules devant un pot à déchets qui risque de ne pas être trop propre, les saletés risquent d'être transportées dans vos cellules.). Le principe de la gravité s'applique pour la même raison du haut vers le bas. Attention de ne pas travailler trop prêt de votre corps, l'air ne circule plus suffisamment. L'enceinte de travaille est au centre de la surface.

2. Hotte biologique

La gravité étant ce qu'elle est, si vous travaillez au-dessus de la boîte de Pétri ouverte, les saletés de vos mains ont bien des chances de se retrouvés dans la boîte de Pétri. Même chose si vous passez vos manches de chandail au-dessus du couvercle, ce dernier va se retrouver sur vos cellules une fois la boîte de Pétri fermée. Il en va de même pour les bouteilles... [Ne JAMAIS passer au-dessus d'une boîte de Pétri ou bouteille ouverte que vous voulez garder stérile.](#) Les antibiotiques cachent bien des choses mais ne pourront vous sauvegarder tout le temps. Lors des manipulations, tenez votre pipette (ainsi que le pipet-aid) avec un angle incliné de 30-40 degrés de façon à ce que vos mains (ainsi que le pipet-aid) ne soit pas directement au dessus du pétri. Idéalement, on laisse le moins possible les bouteilles et boîtes de Pétri ouvertes. Si vos bouchons et couvercles sont déposés du côté face de la surface, la surface doit être propre sans éclaboussures de milieu. S'ils sont déposés du côté du ciel, évitez de passer vos bras au-dessus.

La grille en avant ne doit pas être obstruée avec des objets ou papiers de toutes sortes. Elle aspire l'air autour (de l'extérieur), ce n'est donc pas un espace stérile. Ce n'est pas non plus un support pour déposer vos tips souillés, le jus retombe à l'intérieur de la hotte.

3. Flamme

À moins d'être vraiment obligé, la flamme dans une hotte modifie la circulation normale de l'air. Aussi, ça peut être dangereux pour le feu, ça peut affecter le filtre Hepa ou comme j'ai vu, faire fondre le plastiglass des côtés ou du plafond de la hotte. Si vous échappez une goutte de milieu sur le goulot de la bouteille, essuyez-la avec un papier propre imbibé d'éthanol. Ça marche très bien.

4. UV

Allumer les UV pour stériliser est une méthode qu'on utilisait en bactériologie. Si vous voulez mon avis, il serait préférable de bien laver les murs et côtés, et d'employer de bonnes méthodes de travail. La poussière déposée sur le tube UV empêcherait celui-ci d'être efficace, en plus, ça dégage de l'ozone dans la pièce (si renfermée) et ça use aussi le mobilier.

Préparation du milieu

Un milieu le plus frais possible est idéal. Après un mois, le milieu complété (avec FBS) peut réagir avec la lumière et devenir [plus toxique que bénéfique pour vos cellules](#). Le sérum doit se décongeler [au frigo et non dans le bain-marie](#). La L-glutamine se dégrade rapidement, il serait préférable d'en rajouter après 3 semaine/ 1mois.

PH du milieu

Le pH reste stable normalement quand la bouteille est bien étanche.

Le pH dans l'incubateur est stabilisé grâce au % CO₂ et à l'humidité. Certains milieux sont moins tamponnés, ex : F12 1,176 g/l NaHCO₃ via DMEM 3.7 g/l. Si la couleur du milieu varie d'une bouteille à l'autre, ce n'est pas un mystère, il y a deux raisons principales. La première se pose dans le cas d'une bouteille pleine : soit que l'air entre soit par le goulot écorché ou par un bouchon non efficace, non étanche. Dans le deuxième cas, lorsque la bouteille est entamée ou presque vide, l'air (stérile de la hotte) qui y entre, abaisse le pH du milieu. Dès que vous laissez vos boîtes de Pétri trop longtemps sorties de l'incubateur, le milieu devient de plus en plus basique, voir mauve. Comme les cellules requièrent un pH 7.2 à 7.4, il serait conseillé d'ajuster vos fonds de bouteilles avec du HCl IN avant de le déposer sur vos cellules. Surtout que beaucoup de gens ont déjà laissé aller leurs cellules trop confluentes, ont déjà un milieu à tendance acide (jaune) et déposent leur milieu mauve sur les cellules : une douche froide. Chaque stress que vous faites subir à vos cellules risque de compromettre vos expériences même si ça ne se voit pas à l'œil nu. Afin d'éviter un choc de pH drastique, passez vos cellules la veille alors qu'elles sont encore en phase exponentielle et en forme, soit vous les jeter car elles sont tellement acides qu'elles sont rondes et granuleuses, soit vous changer de milieu avec un milieu au pH ajusté (avec HCl) se rapprochant de celui sur les cellules quelques heures avant de les passer.

Noter qu'une fois les cellules remises à l'incubateur, le taux de CO₂ va prendre un certain délai avant de revenir à la normale. Le pH du milieu des nouvelles boîtes de Pétri va encore se basifier avant de se stabiliser. Et le moment le plus fragile pour les cellules est au moment où elles se rattachent. Attention au pH. L'Hepes est employé pour stabiliser le pH, mais génère des produits de dégradation qui devient toxique. Son usage est spécifique.

Composition du milieu

Lorsque vous avez de nouvelles cellules à repartir, faites attention de suivre les consignes du commerçant. N'ajoutez que ce qu'il recommande, un milieu trop riche peu bousiller vos cellules aussi bien qu'un milieu trop pauvre. Si vous deviez changer de milieu, sauvegarder d'abord quelques vials congelés dans le milieu proposé initialement. Ensuite, vous devez les adapter de façon graduelle, surtout si vous changez pour un milieu plus pauvre. Certaines parfois ne s'en remettent jamais. On observe aussi de grosses variantes morphologiques, des clones se forment... Pensez-y!

Autres facteurs

Voici quelques facteurs (non biologiques) qui peuvent influencer la qualité du milieu : qualité de l'eau, propreté de la vaisselle utilisée (bouteille, pipette), numéro de lot du sérum, conservation du milieu à l'abri de la lumière et ensuite, fraîcheur du milieu complété (déchets toxiques). Quand vous avez terminé de compléter le milieu, n'agitez pas votre bouteille de haut en bas, cul à terre... Faites des mouvements circulaires pour éviter d'amener du jus plein le bouchon, plein le goulot... c'est très malpropre.

Utilisation des canons

On travaille avec les canons dans le sens horizontal. Pour la même raison que j'ai mentionné plus haut, c'est une question de gravité. Maintenant, imaginez que la personne ayant travaillé avant vous a retenu le haut de toutes les pipettes du canon avec ses doigts. Le haut de chaque pipette de ce canon est potentiellement contaminé. Vous qui ne savez rien, prenez une pipette doucement tout en la faisant glisser sur les autres et voyez que l'embout (bas de la pipette) touche maintenant au haut des pipettes. C'est comme si vous aviez maintenant les doigts des personnes précédente sur la partie la plus importante de votre pipette??? Même réflexion, si vous prenez une pipette de 5 ml avec vos doigts au centre (vers 2.5-3 ml) et que vous la rentrez dans une bouteille de 500 ml, c'est comme si vous mettiez vos doigts dans la bouteille. Encore pire pour les bouteilles d'un litre. Et même en portant des gants, n'oubliez pas qu'ils ne sont jamais complètement stériles. Si votre pipette balade et touche quoique ce soit de non-stérile, jeter la. Et si vous n'êtes pas surs, « [dans le doute, abstient toi!](#) » En résumé, vaut mieux faire glisser les pipettes par des mouvements du canon, que de mettre ses doigts dedans.

Pipetman

On voit souvent des gens utiliser des pipetman dans leurs bouteilles. Horreur! Depuis quand vos pipetman sont-ils stériles et encore plus, nettoyés? On devrait garder un set de pipetman uniquement pour la salle de culture plutôt que d'entrer et sortir des pipettes du labo, avec lesquelles on a fait d'autres manipulations diverses. Idéalement, on devrait utiliser des tips (anti-aérosol),

car le liquide se ramassant souvent à l'intérieur de l'embout du pipetman cause des risques de contamination, peut-être même propager des mycoplasmes.

Disposition des déchets liquides

Certains utilisent une pompe à vacuum, d'autres des plats à déchets. Dans les 2 cas, pour raisons de sécurité environnementale, nous devons employer un désinfectant qui agit dans un délai court (soit 10 minutes environ). Pour ce, vous en versez un fond dans le plat à déchets avant de manipuler. Une fois terminé, on jette le tout à l'évier et bien rincer. La javel est sûrement efficace quoi que irritant pour les yeux et voies nasales. D'autres désinfectants sont aussi employés : Virkon, Roccal, Wescadyne, O.Syl. Pour la pompe, ça demande un nettoyage régulier et rigoureux. Si ce n'est pas fait, vous pouvez même contaminer vos cellules. Plusieurs oublient de rincer le tuyau qui relie l'erlenmeyer à vos cellules. Et surtout, c'est toujours la même personne désignée au lavage.

Passage cellulaire

On est maintenant prêt à passer les cellules. Chaque lignée cellulaire a ses spécificités propres. Cependant, règle générale, on commence par ôter le milieu, rincer la boîte de Pétri avec du PBS (FBS inhibe la trypsine), ajouter la trypsine et diviser en quantités et concentrations désirées.

Ensemencement

Attention, les étudiants paresseux qui divisent leurs cellules une fois semaine, bien diluées (trop même), constateront des changements cellulaires au cours des passages. Il est important de suivre les recommandations de la fiche du distributeur (ATCC). Des cellules trop diluées forment des extensions, des amas cellulaires et subissent un stress énorme allant parfois jusqu'à la mort des cellules. Des cellules trop confluentes ont aussi beaucoup de stress dû au changement de pH, milieu acide concentré en déchets... Un changement de milieu en mi-semaine est fortement recommandé. L'important est de suivre l'évolution de vos cellules (confluence, pH, contamination). **C'est À VOUS À VOUS ADAPTER AUX CELLULES ET NON L'INVERSE**. Selon les types cellulaires, les cellules seront plus en forme avec 2-3 passages/semaine mais plus concentré que l'inverse. Évitez de passer vos cellules deux journées consécutives. Laissez un peu de repos à vos cellules pour qu'elles puissent reprendre des fonctions normalement. Notez le passage, c'est très important. Qu'il s'agisse de lignées stables ou non, vaut mieux travailler avec des cellules ayant de bas passages.

Trypsination

La trypsination est une étape simple, mais pas toujours bien réussie. Si vous laissez vos cellules à l'incubateur et que vous allez prendre un café, les membranes cellulaires pourraient être digérées en partie. Si, par contre, vos cellules prennent un temps fou à décoller ou restent en amas, vaudrait mieux

essayer une trypsine plus concentrée (0,25% Trypsine –0,03% EDTA) au lieu de 0,05% Trypsine + 0,53 mm EDTA. Divers autres produits s'offrent pour diverses lignées cellulaires. Plus les cellules sont confluentes, plus il est difficile de les diviser. Dans un monde parfait, les cellules devraient être divisées avant d'être trop confluentes, encore en pleine expansion. Le rinçage au PBS avant est primordial. On peut aussi le faire avec de la trypsine mais cela est plus coûteux.

Souvenez-vous, si vous essayez de gagner du temps... les cellules ne suivent pas et vous serez perdant...

Observez vos cellules lors de la trypsinisation et quand l'ensemble des cellules sont rondes et détachées de la boîte de Pétri, vous l'arrêtez immédiatement avec le même volume de milieu complet ou plus que le volume de trypsine (ex : 1.5ml de trypsine arrêter avec 1.5ml ou plus de milieu complet). Attention de garder une population hétérogène et ne pas sélectionner une population X au cours des passages. Ensuite, vous les comptez et redistribuez avec un nombre défini (ex : 1 million/boîte de Pétri) soit vous les diluez (1/3-1/10). La centrifugation reste un moyen de débarrasser totalement de la trypsine si la concentration l'exige. Concentration de trypsin trop élevée via le milieu finale.

(ex : division $\frac{1}{2}$, lorsqu'on a mit 2 ml trypsine, on retrouvera dans la nouvelle boîte de Pétri, 1 ml trypsine + 9 ml de milieu complet)

Mais la centrifugation demeure un stress pour les cellules. Vaut mieux déposer le milieu complet dans le pétri avant d'y verser les cellules. Pour bien répartir le tout de façon uniforme, NE PAS TOURNER VOTRE BOÎTE DE PETRI CIRCULAIREMENT. Vous concentreriez alors vos cellules au centre de la boîte de Pétri. Faites des mouvements NORD-SUD en le déposant à l'incubateur. Assurez-vous qu'il n'y ait pas de goutte indésirable entre le couvercle et la base de la boîte de Pétri. Celle-ci servirait d'entrée pour les indésirables. Essayez votre dégât avec l'EtOH sur un linge propre. SVP, placez vos boîtes de Pétri bien empilées pour que cela n'est pas l'air de la Tour de Pise. Les cellules pousseront seulement d'un côté ou les boîtes de Pétri risquent de tomber... On a déjà vu sur une même boîte de Pétri : jaune à droite et rouge à gauche... Pas terrible! Si par malheur vous accrochiez vos boîtes de Pétri ou celles des autres, essayez le dégât immédiatement. Le milieu de culture sur la tablette de l'incubateur pourrait permettre aux bactéries ou levures de se développer. Non seulement on lave la tablette, mais aussi le dessus et les tablettes qui sont en bas de celle-ci. N'utilisez pas de Javel (CORROSIF), ni trop d'EtOH pour faire mourir toutes les cellules de l'incubateur, demandez de l'aide dans le doute.

Dispersion : Si vos cellules restent en amas, vous aurez plus de misère à transférer. Il est important de bien les séparer soit en triturant mécaniquement avec la pipette ou avec une trypsine plus efficace. Voir selon les types cellulaires.

Boîtes de Pétri

Les boîtes de Pétri qui sont le plus couramment utilisées sont chargées négativement. Il existe aussi des boîtes de Pétri chargées positivement pour des cellules qui adhèrent plus difficilement (PC12). Les « primarias » sont utilisés dans certains cas (culture primaire). Enfin, pour des mesures monétaires, on peut créer nous mêmes les boîtes de Pétri avec Poly-L-Lysine, laminine, collagène ou autre. Quand vous prenez un ou quelques boîtes de Pétri dans le sac (pK/20), **ASSUREZ-VOUS QU'IL EST BIEN FERMÉ**, de façon à ce que les boîtes de Pétri n'ouvrent pas seules facilement et compromettre ainsi la stérilité.

Terminer

Quand votre travail est fini, remplacez et nettoyez l'espace de travail de façon qu'elle soit aussi ou plus propre que lorsque vous avez commencé. La disposition de déchets solides se fait de façon sécuritaire : pipette de verre cassée et pasteur seront autoclavés dans un « sécuripient » (à l'abri des bris de verre) et les boîtes de Pétri, flacons, tubes dans un sac de plastic à cet effet. Notez que lors des grands congés, les sacs ne doivent pas être laissés ouverts à 25°C dans la salle de culture. Vous comprendrez que ça peut causer bien des problèmes. Évitez de verser du liquide dans ce même sac, un petit trou pourrait rendre le transport bien embêtant.

Si vous pensez être le dernier de la journée à travailler dans la salle de culture, pensez à :

- Nettoyer l'hémacytomètre que vous avez utilisé
- Fermer le microscope allumé (ménager nos lampes)
- Fermer la hotte (si indiqué)
- Fermer le bain-marie (l'élément, si sec, pourrait griller)
- Fermer la radio, les lumières et LA PORTE!!!

Congélation-Décongélation

Congélation

Une congélation réussie commence par des cellules en santé. L'idéal serait que les cellules soit en phase exponentielle. Si vos cellules sont trop confluentes, repassez les de nouveau et attendez quelques jours. Ça en vaut la peine car si vos cellules ne repartent plus, vous y perdrez encore bien plus de temps croyez moi! La congélation doit se faire lentement, soit 1°C/min. Le DMSO (ou glycérol) sert d'antigel et évite ainsi la formation de cristaux lorsque les cellules seront plongées dans ce froid intense (-180°C). Les cellules sont comptées, centrifugées et re-suspendues dans le milieu de congélation puis aliquotées dans des cryovials à raison de 1 ml/vial. Important, si vous avez trop de cellules via la quantité de milieu de congélation, vos cellules mourront au froid. Pour ma part, je mets 4-6 millions de cellules/ml et je sais que lors de la

décongélation, ça ira très bien dans une boîte de Pétri de 100 mm. Si vous devez par hasard mettre moins de cellules, décongelez alors dans un flacon 25 cm² ou petite boîte de Pétri. Les cellules, pour repartir, ont bien besoin des autres. Les cellules trop diluées crèveront. Un apport de sérum peut aider à l'attachement des cellules. S'il s'agit de lignées stables, attendez avant de remettre le G418 ou autre agent de sélection. Vaut mieux éviter d'ajouter des antibiotiques (Pen/strep, G418, hygromycine) au milieu de congélation.

Décongélation

La décongélation se fait rapidement, au bain-marie à 37°C en agitant. Nettoyez le cryovial avec EtOH 70% avant de l'ouvrir. Notez que le DMSO prend environ 20 minutes pour sortir de la cellule. C'est le but de cette étape, se débarrasser du DMSO. Si ce dernier demeure trop longtemps en contact avec les cellules, le DMSO pourrait affecter vos membranes ou tuer les cellules.

Effectuons maintenant la chose. On vide le contenu du cryovial dans une boîte de Pétri et lentement pour le premier millilitre (1 ml/min), on y dépose le milieu complet, puis, plus rapidement pour le reste. Vous pouvez attendre simplement que les cellules s'attachent (2-24 hrs) et changer pour du milieu frais. Dans le cas de cellules en suspension, on peut aussi re-suspendre les cellules (dans tube de 15 ml), attendre 30 minutes et centrifuger pour se débarrasser du DMSO restant. C'est alors qu'il faut être patient et attendre que les cellules deviennent assez confluentes pour les passer. Idéalement, 2-3 jours seraient préférables pour bien permettre aux cellules de bien s'attacher, reprendre leurs fonctions normales avant de leur faire subir un autre stress. De toute façon, les cellules vont pousser mieux et plus vite lorsqu'elles sont concentrées que si on décidait de les passer le lendemain de la décongélation. Donnez leur une chance!...

À noter, après la décongélation, faites un ou deux passages avant de reprendre vos manipulations ou de recongeler vos cellules. Apprenez le sens du mot PLANIFICATION. Des cellules congelées dans l'azote devraient, théoriquement, se conserver 5 ans et à -70°C, un an pas plus. Il est nécessaire de renouveler le stock à l'occasion.

Sauvetage : Si vous avez eu des problèmes à la décongélation avec certains vials et que les cellules meurent, soit que vous supponné une contamination ou autres, il serait préférable alors de les centrifuger et de les resuspendre dans un milieu complet contenant un antibiotique sure genre ciprofloxacine ou plasmocin. Le principe étant par les lavages de vous débarrassez des indésirables dès le départ et avec de la chance, sauvez le dernier vial qui vous reste.

Contaminant

L'observation régulière de vos cellules est importante. Un jour, on se dit : « Il y a quelque chose d'anormal? » Et oui, mais quoi?

Les levures et bactéries

Les levures et bactéries ne collent pas aux cellules, elles flottent en suspension. Les précipités de CaPO_4 ressemblent à certaines levures et ça bouge grâce au mouvement Brownien. Cependant, il existe toutes sortes de levures ayant des caractéristiques différentes. Leur croissance est lente et la formation de spores, propagée par la ventilation à l'intérieur de l'incubateur, peut causer un cauchemar pour les utilisateurs. On sait quand ça commence, mais on ne sait pas quand ça fini. On en sait encore moins la cause. Et parfois, l'épisode se termine sans qu'on ait su d'où elle venait. Bien des choses sont en cause : milieu, sérum, trypsine, PBS, pipette, boîtes de Pétri, incubateur, mauvaise manipulation, pipetman, pipetaid, etc. On doit prévenir ses compagnons d'incubateur, ce n'est pas une maladie honteuse... Soit on jette tout, soit on teste le premier accusé (milieu complet-PBS). On pourrait déposer un aliquot dans un milieu propice aux levures et mettre celles-ci : un à 37°C, un à 30°C. On peut aussi déposer un aliquot sur une boîte de Pétri de culture bactérienne. Un service d'aide est offert par des gens spécialisés en microbiologie si le problème persiste.

Procédure :

1. Avertir les gens dans le même incubateur
2. Disposer les déchets contaminés avec Javel concentré mais à **l'extérieur de la salle de culture**. Ne pas ouvrir pour augmenter les risques de contamination
3. Mettre les cellules en quarantaine (celles non contaminées ou susceptibles de l'être) ou les répartir dans un flacon avec bouchon ventilé (avec filtre)
4. Nettoyer l'incubateur avec EtOH 70% ou autre. Les tablettes et côtés peuvent aller à l'autoclave (n'oubliez pas le « fan »)
5. Repartir à zéro avec du matériel neuf si possible
6. Faite des tests et des contrôles avec les solutions utilisées sur d'autres cellules que vous savez sure.

Les bactéries

Les bactéries sont plus faciles car moins contagieuses. Elles dégagent une odeur forte, le milieu vient rapidement trouble et acide. Cependant, ne jamais sous-estimer l'ennemi, j'ai vu des bactéries prendre 2 semaines à pousser, causant un milieu basique. La contamination se règle souvent plus facilement car elle est souvent causée par de mauvaises manipulations (erreur technique).

Les mycoplasmes

La contamination aux mycoplasmes est la plus sournoise. On détecte les mycoplasmes par d'autres moyens tel que : IFA, PCR, Gel Agarose, ELISA, etc. Plus de 20% des cultures cellulaires sont infectées aux mycoplasmes.

Plusieurs personnes croient que les mycoplasmes affectent peu leurs expériences, mais attention, **est-ce que vous travailleriez avec des cellules infectées avec des bactéries???** Les mycoplasmes SONT des bactéries. Ils adoptent un comportement viral plutôt que bactérien, mais ils réduisent la productivité cellulaire, le taux de croissance et la vitalité cellulaire. Les mycoplasmes altèrent les membranes et affectent la synthèse des protéines ainsi que celle de l'ADN et ARN. On devrait tester nos cellules pour les mycoplasmes régulièrement. Bien que les mycoplasmes soient résistants à certains antibiotiques, ils se traitent assez bien avec la ciprofloxacine ou au plasmocin. Voir le document sur les contaminants, pour plus de détails.

Transfection

Quelques petits mots pour réussir ses transfections. Les techniques de transfection (ex : CaPO₄) sont assez bien conservées, bien qu'il y ait quelques variations d'un labo à l'autre. C'est en jouant sur ses variations justement qu'on peut optimiser son rendement : le temps d'incubation avec l'ADN (over night ou 5 heures), le temps d'incubation total (transfection-récolte), la quantité d'ADN, la concentration des cellules... Mais de façon générale, les éléments les plus importants sont : santé et pH des cellules, pH du HBSS, longueur et pureté de l'ADN. D'autres additifs tels que Sodium Butyrate (2-10 mM), Methotrexate (20-100 ng/ml), glycérol, chloroquine ou polybrène augmentent la production de l'ensemble des protéines cellulaires. Le sodium Butyrate favorise l'acétylation des histones.

Conclusion

L'idéal c'est que votre passage en culture passe inaperçu. La liberté des uns s'arrête là où celle des autres commence. Le respect des autres contribue au bon fonctionnement de l'ensemble des utilisateurs.

Je vous souhaite bonne chance dans vos cultures, si vous avez des questions, je suis à votre disposition.

Louise Cournoyer

Références

1. Cell culture; P. Michael Conn
2. Tissu Culture Techniques; Bernice M. Martin
3. Culture de cellules animales; Monique Adolphe et Georgia Barlovatz-Meimon
4. Cell Culture; William B. Jakoby et Ira H. Pastan
5. Cells; David L. Spector, Robert D. Goldman et Leslie A. Lenard
6. Culture of animal Cells; R.Ian Freshney

Annexe I

Entreposage

Solution saline	1 an	20°C	Noirceur
Milieu de culture	2 mois	4°C	Noirceur
Milieu de culture sans L-glutamine	4-6 mois	4°C	Noirceur
Milieu en poudre	1 an	4°C	Noirceur
Sérum	6-30 mois	-20°C	
Sérum inactivé	6 mois	4°C	
Antibiotique (liq 100x)	6-12 mois	-20°C	
Glutamine (200 mM)	6 mois	-20°C	
Trypsine	2-3 mois	-20°C	
Versène	1 semaine	4°C	
Versène	1 an	20°C	
LAH	2-3 mois	4°C	
Sodium Bicarbonate (7,5%)	1 an	4°C	
Geneticin pH 7.0	3 ans	15-30°C	
Geneticin pH 7.0 + 10-25 mM Hepes	6 mois	-5- -20°C	
Geneticin pH 7.0 + 10-25 mM Hepes	8-10 jours	37°C	
Ciprofloxacin	6 mois	-20°C	
Ciprofloxacin	28 jours	37°C	

Bactéries

- Cocci : forme ronde
- Bacilli : forme de bâton (1µm de diamètre par 4µm de longueur)
- Spirille : forme de spirale
- Acide : aérobie
- Basique : anaérobie

Les bactéries sont difficiles à distinguer avec un objectif 100x. On suspecte une contamination :

- 1) L'espace entre les cellules est granulé à cause des bactéries qui se promènent parmi les cellules
- 2) Morphologie régulière, mobilité dans la boîte de Petri contrairement aux précipités de sérum qui sont opaques et irréguliers
 - Première source : bain-marie; nettoyer deux fois/mois avec désinfectant (0,05% benzalconium chloride)
 - Deuxième source : incubateur; nettoyer régulièrement avec EtOH 70%

Annexe II

Caractéristiques morphologiques des cellules

	Normal	Âgé	Transformé
Grosueur	50 = 100 μm (pour cellule adhérent)	Plus large irrégulière	Plus petite
Confluence	Inhibition contact	Trou	Perte attachement
Distribution	Une ou plusieurs couches	Espacé	Empilés les uns sur les autres Distribution au hasard

Propriétés de croissance

Temps de doublage	Selon le type cellulaire	↓	↑
Densité de saturation	Selon le type cellulaire	↓	↑
Propriété phénotype	Devrait rester pareil	Souvent perdu	Peut en perdre ou en gagner
Capacité à pousser sans sérum	Devrait rester pareil	↓	↑

Pour les cellules infectées par des mycoplasmes

- Turbidité du milieu
- Milieu plus acide
- Perte d'adhérence
- Perte de croissance
- Mortalité cellulaire