

SOYONS CULTURÉ

Les côtés obscurs de la culture cellulaire...

POURQUOI LA CULTURE ?

- Permet d'utiliser moins d'animaux
- Production d'anticorps, de protéines et essais de drogue...
- Reproductibilité des résultats, le matériels cellulaire est plus homogène, accès facile aux cellules
- Contrôle des éléments, spécifique à un type cellulaire
- Contrôle des paramètres (milieu défini) plus constant...
- Modèle qui se rapproche de l'humain pour l'étude des protéines, simplifie le modèle d'étude

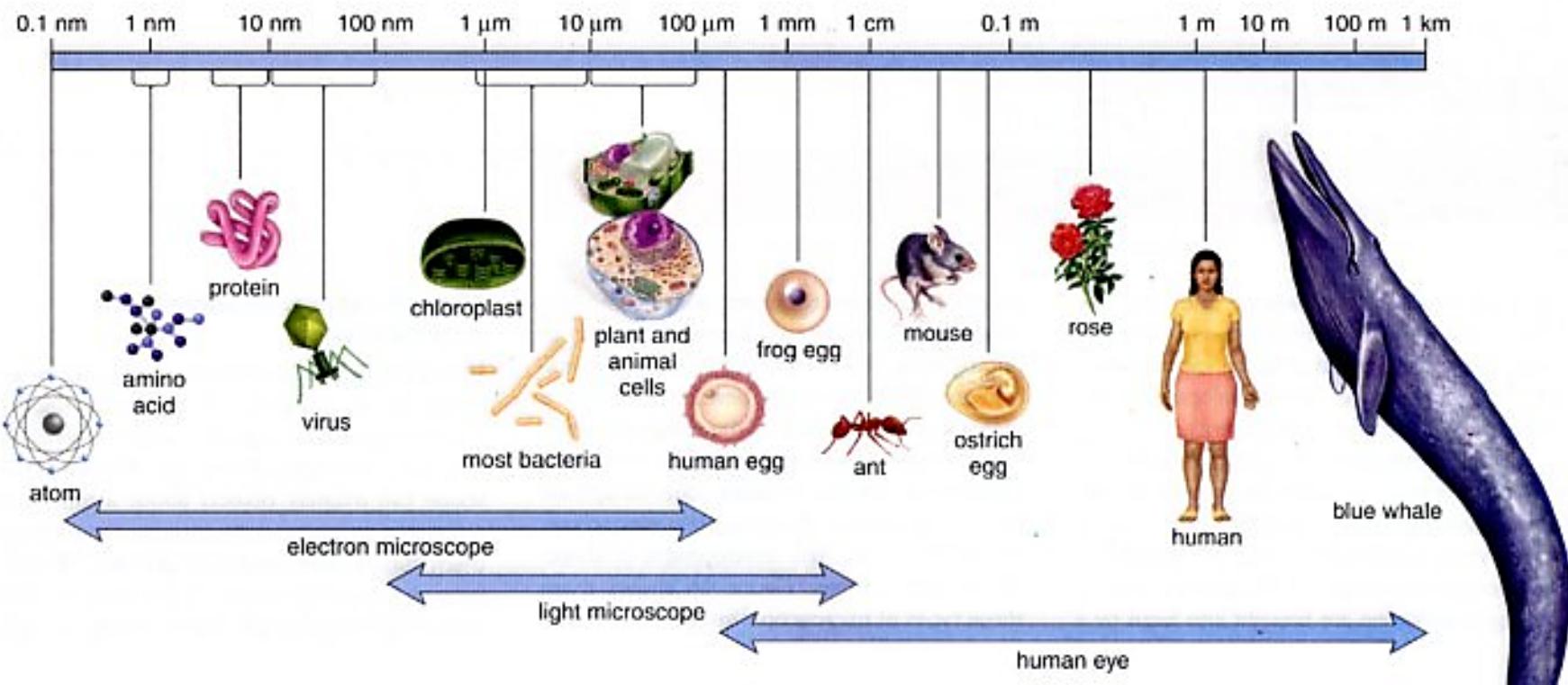
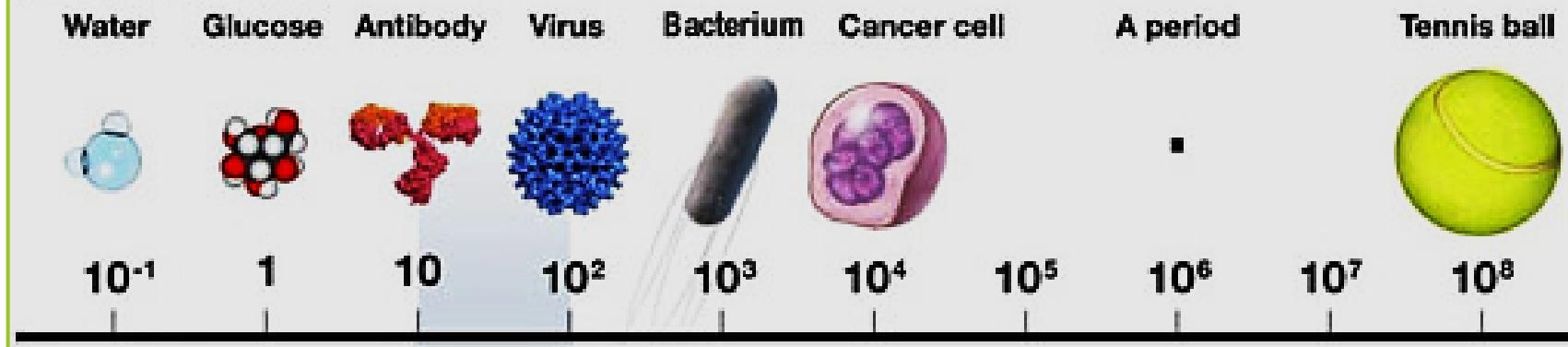


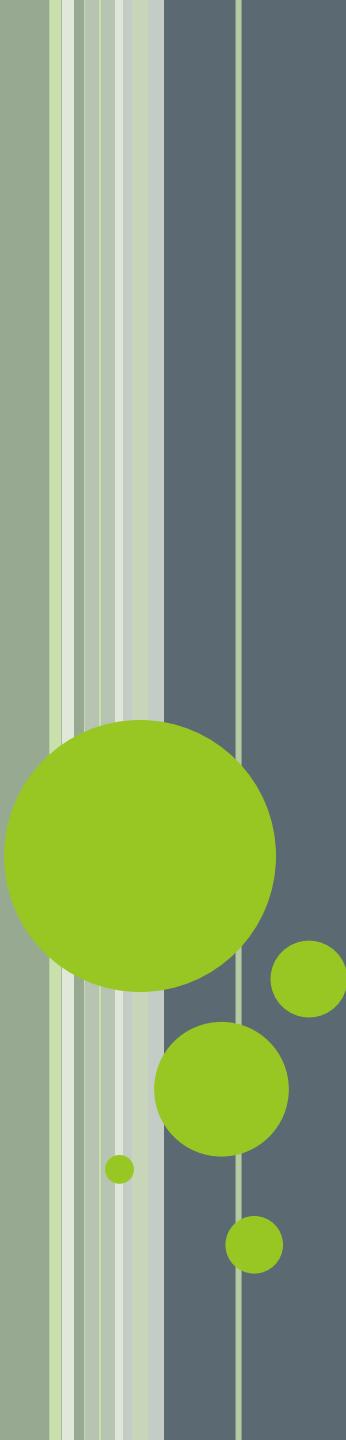
APPLICATIONS

- **Culture primaire** ; Isolation de tissus soit d'animaux ou d'humains mise en culture à des fins...
 - Médicales ; Grand brûlé, études nutritionnelles
 - Diagnostiques ; Isolement de tissus pour production virale
 - Recherches ; Calcification et minéralisation de cellules osseuses, diabète
 - Thérapies géniques ; réimplanter à un patient des cellules modifiées génétiquement
- **Biologie cellulaire**: Étude des caractéristiques de la cellule
 - Cancer; but pharmaceutique. Tester la toxicité des médicaments sur les cellules hépatiques
 - Apoptose et Sénescence ; Suicide cellulaire et vieillissement de la cellule
 - Ciblage ; recherche sur le mécanisme des voies que prend la protéines intra ou extra cellulaires
 - Différenciation; différenciations de cellules cardiaques à partir de cordons ombilicaux
 - Mesurer effet toxique d'un médicament
- **Production de protéines**
 - Protéines endogènes déjà présentes dans la cellule, extraction.
 - Insérer une protéine d'intérêt dans des cellules; soit par transfection ou infection dans le but d'en produire de grosses quantités
- **Virologie**
 - Produire des vaccins, dans les œufs ou sur des cultures cellulaires
 - Étude pathologique virale ; Herpes, SIDA, grippe
- **Culture de tissus**
 - Interaction entre divers tissus, production en 3D
 - Fabrication de valves cardiaques porcines
 - Régénération des tissus, Axolotes possibilité de reproduire leurs organes plusieurs fois.



How Small Is Small?





L'ENVIRONNEMENT EN CULTURE CELLULAIRE

Enceinte biologique

SALLE DE CULTURE

On nomme aussi « salles blanches » un environnement contrôlé avec filtre Hepa et SAS, pressions variables d'une pièce a l'autre

Deux raisons : Éviter les contaminants de sortir et éviter la poussière d'entrer

Le niveau de confinement va déterminer certaines règles a suivre... (SAS, déchets, types de manipulations)

Essayer d'entrer le moins de choses possibles: cartons poussiéreux, sarrau salis de bactéries du labo, gants sales du labo...



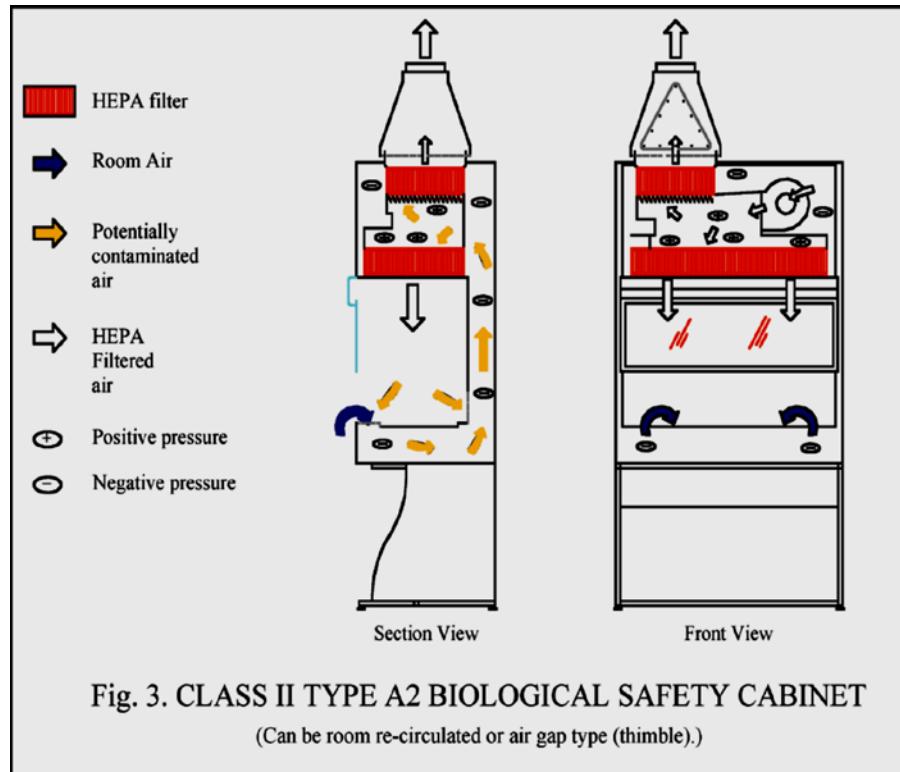
NIVEAU BIORISQUE, NIVEAU CONFINEMENT

- Les niveaux de biorisque sont basés sur deux choses, la pathogénicité et la vitesse et mode de propagation. Ces règles sont établis par l'[Agence de la santé publique du Canada \(ASPC\)](#)
- Ces niveaux vont aussi déterminer le mode de pratique à suivre dans les salles de cultures selon les cellules qu'on manipule (Gestion des déchets, manipulation, vêtements, enceinte biologique , pratique, SAS ...)
- Quelques exemples:
 - I : MCF-7, UMR-106, CHW...
 - II : COS(sv40) , Hela, Hek, 293, rétrovirus, influenza...
 - III : SIDA, bacillus anthracis, fièvre jaune...
 - IV : Ebola, variole...
- http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/pdf/lbg_2004_f.pdf



Comment bien travailler en enceinte de sécurité biologique

- Mettre des vêtements et des gants de protection
- Ne pas obstruer la grille devant, ne pas surcharger l'espace
- Éviter tout mouvement brusque des mains, des bras ou d'objets dans la zone d'accès à l'avant
- Effectuer les opérations qui produisent des aérosols au fond de l'enceinte
- Laisser les matières rejetées et les articles contaminés au fond de l'enceinte
- Ne pas jeter de matières dans des récipients à l'extérieur de l'enceinte
- Ne pas travailler à feu nu à l'intérieur de l'enceinte



- Les UV créés de l'ozone dans la pièce souvent confinée, abiment aussi les chaises et le matériel. 20min suffit si vous devez le faire.
- Un bon nettoyage remplace les UV.



ENCEINTE DE SÉCURITÉ BIOLOGIQUE

▪ Avant de commencer

- Mettre l'enceinte sous tension
- Vérifier que les bouches d'arrivée et d'évacuation d'air ne sont pas obstruées
- Désinfecter les surfaces intérieures
- Placer tout le matériel nécessaire dans l'enceinte
- La surface de travail peut être recouverte d'un papier absorbant
- Séparer les articles « propres » des articles « contaminés »
- Faire fonctionner le ventilateur au moins 5 minutes avant toute manipulation

▪ À la fin du travail

- Fermer les contenants ouverts et désinfecter la surface des objets avant de les sortir de l'enceinte
- Placer tous les déchets solides contaminés dans un sac extérieur (biohazard) qui sera stérilisé par la suite et les déchets liquide dans des contenants (béchers) à l'intérieur de l'enceinte qui sera jeté dans l'évier une fois inactivé
- Au moyen d'un désinfectant non corrosif approprié, désinfecter les surfaces intérieures de l'enceinte
- Enlever les gants contaminés et s'en débarrasser de façon appropriée; se laver les mains

SÉQUENCE DE TRAVAIL

- Une fois entrée dans la pièce, on met les gants et un sarrau
- Les gants servent à nous protéger des produits biorisque et aussi de protéger les cellules de nos microbes

À la fin de la séance, on laisse les gants et le sarrau à l'intérieur de la salle. Pour mieux protéger les autres, manipuler les poignées de porte sans gant.

Un bon lavage des mains s'impose à la sortie, car les gants gardent l'humidité et la poudre peut causer des dermatoses.

<https://www.ssp.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/07/Faut-il-porter-des-gants-si-oui-lesquels.pdf>

- Allumer l'enceinte de travail et nettoyer à l'alcool 70% la surface et passer a l'éthanol tout ce que vous entrez
- RINCER le tuyau avec un produit désinfectant si vous utilisez une pompe à vide, sinon préparer un bécher avec un produit décontaminant (virox 1:4 ou javel)



SUITE...

- Idéalement, il faudrait laisser stabiliser l'air sous la hotte et attendre un laps de temps entre deux utilisateurs (15-20 min)
- Mettre vos solutions à chauffer à 37°C dans un bain-marie . Vérifier la propreté de celui-ci, sinon changer l'eau. Un bain-marie sale est une belle source de contamination
- Éviter de laisser vos solutions trop longtemps dans le bain-marie, car certaines molécules subissent une dégradation en radicaux libres ou toxines par la chaleur et la lumière
- Observer les paramètres de l'incubateur et vérifier vos cellules. Regarder à travers les pétris la couleur (indicateur de Ph ou problèmes de CO²) et la turbidité (contamination)
- Voir l'état des cellules, la confluence (la concentration), amas, apoptose (mort cellulaire)... La cellule est vivante, donc sujette à des modifications morphologiques, sensible au stress, et aux changements génétiques

SUITE...

- Une goutte entre le couvercle et le pétris est une porte d'entrée pour les bactéries, essuyer sous la hotte avec du *virox*
- Nettoyer la surface de travail régulièrement; les dégâts et les aérosols (voir page 45) peuvent apporter des problèmes
- Prendre les pipettes stériles très haute
- Lorsqu'on travaille, on ne passe jamais au dessus des pétris ouverts et des bouteilles ouvertes. L'air filtré circule du haut vers le bas. Travailler avec un angle de 45° permet de minimiser la contamination. Ne pas obstruer les entrées d'air
- À la fin, nettoyer l'enceinte. Notez que l'alcool ne nettoie pas mais précipite les protéines sur les surfaces
- Vider la pompe à vide et rincer avec un produit désinfectant
- Fermer la hotte



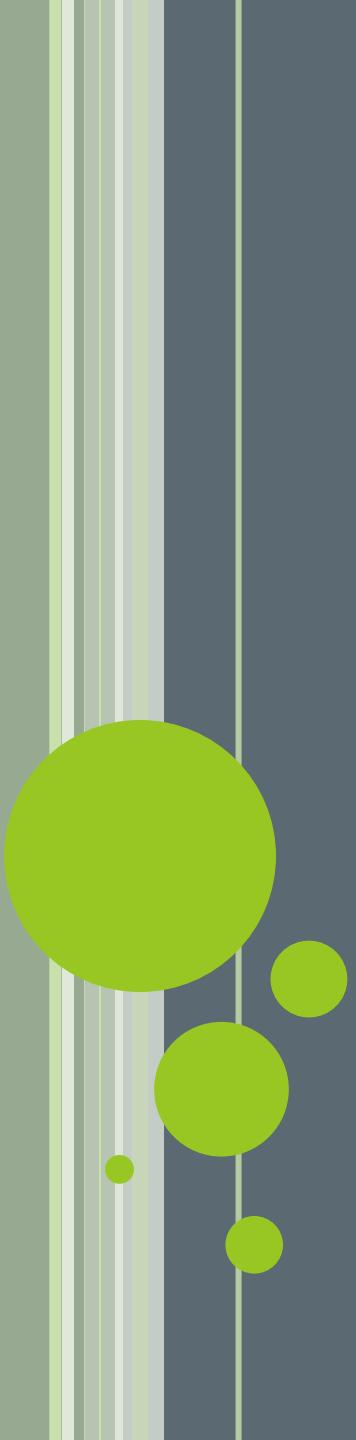
GESTION DES DÉCHETS

Gestion des déchets (Tout ce qui touche aux cellules, surnageant)

- Les sacs contenant les déchets « biohazard » seront autoclavés avant d'être disposés dans les vidanges normales. Inactiver chimiquement les pipettes dans l'eau javellisée
- Déchets liquides en contact avec les cellules, seront inactivés soit au moyen d'eau de javel ou par d'autres produits tel que VIROX concentré (peroxyde hydrogène)
- Attention aux pétris contaminés, éviter d'ouvrir ceux-ci dans la salle, surtout s'il s'agit de levure = spore. Transvider de l'eau de javel afin de neutraliser les micro-organismes. Laisser en dehors de la salle
- Précaution nécessaire pour transporter les cellules : boîte de transport afin d'éviter les déversements en dehors de la salle

STÉRILITÉ OU ASEPSIE ?

- Sachant qu'une bactérie se divise toute les 20 min et qu'une cellule animale se divise en 24 h, tout matériel utilisé en culture doit être obligatoirement stérile, sinon les bactéries ou autres (levures, mycoplasme) prendront vite le dessus, les micro-organismes consommeront toute la nourriture disponible, le milieu deviendra toxique et les cellules vont mourir
- Asepsie: Rendre un champ le plus propre possible, minimiser la quantité de micro-organismes, nettoyer une surface avec de l'éthanol et vaporiser sur les gants
- Stérilité : Autoclave ou filtrée sur filtre 0,2 microns.
Tous milieux ou vaisselles exempts de tout micro-organismes



INCUBATEUR

L'incubateur

- Porter attention aux paramètres de l'incubateur

Humidité et CO²:Pour que le Ph soit stable, nous devons avoir un taux d'humidité assez élevé. Selon le model de l'incubateur il doit toujours avoir de l'eau dans le réservoir. Le Ph sera vérifié avec un appareil FERYTE afin de mesurer le niveau de CO² qui normalement se situe entre 5-10%. Vérifier la température aussi , paramètre TRES important. Une température trop élevée tuera vos cellules

Lorsqu'on ouvre et ferme constamment la porte, la bas niveau de CO² peut être compromise l'ensemencement des cellules, une étape critique!

- Propreté: Porter attention à la contamination sur les tablettes, un incubateur doit être lavé régulièrement aux 3 mois, sinon les micro-organismes risqueront de pousser
- Le centre de l'incubateur est plus stable, une plaque de 96 puits avec de petites quantités de liquide peut subir de l'évaporation, changer d'osmolarité, stress...
- Des piles de pétris trop hautes, empêchent le CO² et la température d'être bien distribués
- Quand on tire les tablettes de l'incubateur, éviter les mouvements brusques pour ne pas causer de déversements, sinon essuyer le pétris ,la tablette et le dessous de celle-ci
- Les tablettes doivent être bien à niveau sinon la distribution des cellules sera compromise

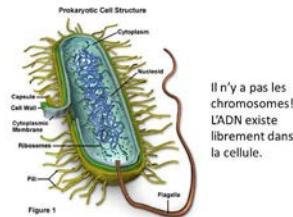
SOYEZ ALERTE!



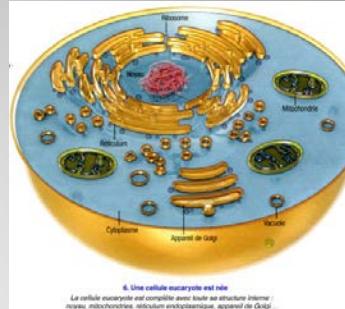
TYPES CELLULAIRES

Prokaryotes

Dans les cellules prokaryotes ...



Eucaryotes

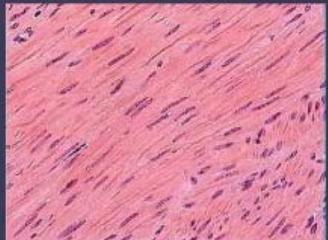


Flagelle
Capsule
Paroi
Plasmide
Mésosome

Membranes cellulaires
Cytoplasmes
Ribosomes

Noyau
Membranes nucléaires
Mitochondries
Réticulum endoplasmique
Appareil de golgi

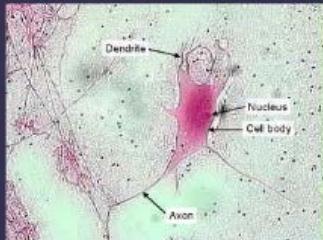
Cellules eucaryotes mammifères



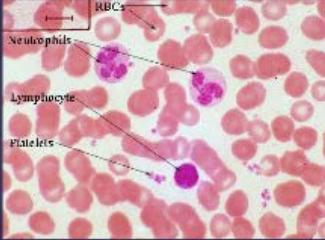
Muscle lisse humain
200 X



Épiderme de grenouille
200 X



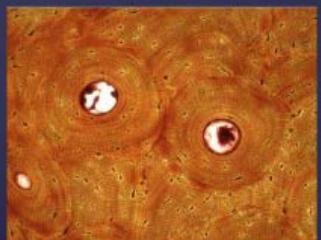
Neurone 200 X



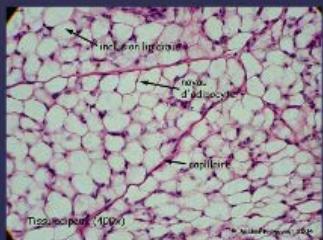
Globule rouge,
neutrophile, plaquette



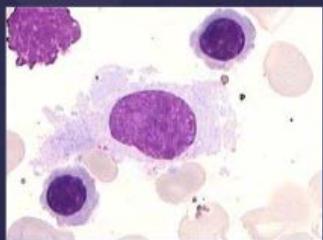
Cellules hépatiques



Os lamellaire 200 X



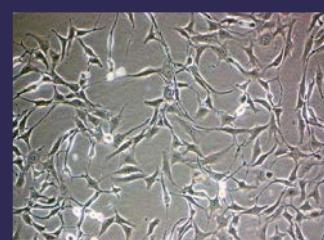
Cellules adipeuses
400 X



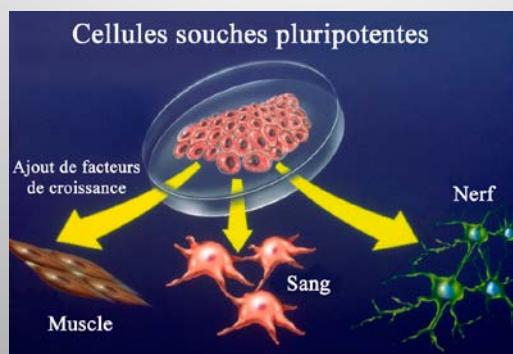
Macrophage (défense)



Ovule 400 X (sexuelle)

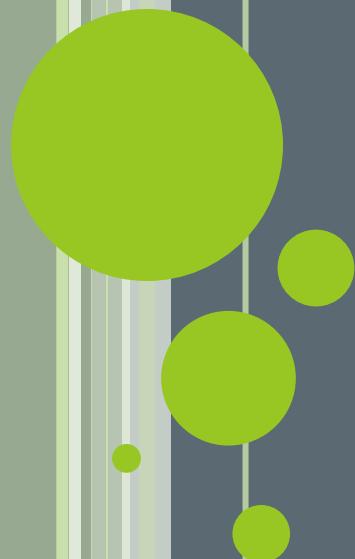


Fibroblastes



Lexiques des lignées cellulaires

- **Les lignées primaires:** proviennent d'un prélèvement de tissu animal ou humain. Elles forment une lignée adhérente (sauf cellules sanguines), plus fragile et ont un nombre de passage limité (5-40 passages). Elles perdent souvent leurs caractéristiques normales dans un environnement artificiel. Elles finissent par montrer des signes de vieillissement et arrêtent de se diviser
- **Les lignées immortelles:** peuvent se diviser presque indéfiniment. Sans formation de tumeur, elles sont rendues immortelles par l'expression de la télomérase ou par suppression du gène p53
- Les lignées transformées perdent leurs caractéristiques normales et se comportent comme les cellules d'une tumeur maligne. Elles poussent rapidement et se divisent indéfiniment (indéfinis ou continus) avec ou sans support. Leur transformation peut être causée par un gène pro-oncogénique (SV40, virus Epstein barr, EIA, CDk4, Hpv...)
- Les lignées stables: lignées continues, indéfinies ou primaires immortalisées auxquelles ont inséré un gène codant pour une protéine d'intérêt couplée à un agent sélectif (G418) et à partir desquelles on en isole des clones. Les clones sont issus de la croissance d'une seule cellule
 - On peut regrouper ces cellules et établir des lignées stables dont le niveau d'expression est le même, les cellules sont triées dans un appareil FACS à l'aide de marqueurs



LE PASSAGE CELLULAIRE

Besoin nutritif

PASSAGE CELLULAIRE

Comme la population augmente, le milieu devient saturé, nous devons diviser le nombre de cellules deux fois par semaine, c'est-à-dire, prendre un pétris et refaire 10 pétris (1/10)

- Choix du milieu de culture ainsi que le choix de la trypsine dépend du type cellulaire
- À l'hémacytometre, s'assurer de bien séparer les cellules pour ne pas avoir d'amas au microscope
- Le lavage au PBS est essentiel, car le sérum inhibe la trypsine
- Le bleu trypan nous permet de calculer le pourcentage de cellules mortes
- La centrifugation si besoin de concentrer les cellules, s'effectue à la vitesse de 200-300g
- Garder votre population cellulaire homogène

Un choix selon le type cellulaire

Milieu de culture	Types cellulaires	
DMEM	Majorité	riche
AMEM	Sein	
RPMI	Sang	
M199	Rein	
Mc Coy's	Intestin	
Neurobasal	Neurone	
Ham-F10	Muscle	pauvre
Iscove	Osseux	
MEM	Cellules primaires	
Grace	INsectes	

Divers trypsine

Trypsin 0,05%

Trypsin 0,25%

Collagénase

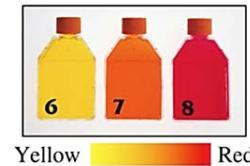
Versene

Dispase

La trypsine est une enzyme, une protéase. Elle agit mieux à 37C. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques, les protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire et détachent les cellules du support. Plus elle est concentrée plus elle agit vite. Surveiller et observer le temps, une durée prolongée aura pour effet de digérer les membranes.

MATÉRIEL VIVANT

- Les cellules se modifient et se transforment au fur et à mesure des passages, phénomène normal d'adaptation
- La fréquence du passage, la concentration de l'ensemencement et l'efficacité d'étalement sont spécifiques à vos cellules alors respecter les consignes. Aussi, la vitesse de croissance est un indice de santé
- Observation: Changement morphologique; apoptose, sénescence, différenciation
- Certains types cellulaires (NIH 3T3) lèvent en tapis si trop confluents. Diviser-les avant que cela arrive



Le Phénol Red indicateur de pH

6 = acide pH 6,8 ou moins. Pour éviter choc de pH, on peut acidifier notre milieu frais.

7 = pH 7,4 idéal

8 = Basique pH 8,4

Regarder si problème incubateur

Bouchons fermés, sans échange de gaz

Condition du milieu

- Frais, tous les 3 jours remettre du milieu frais
- Apport de nutriment, saturation, dégradation
- Le pH peut affecter ou tuer vos cellules, pH **7.2-7.4**
- Afin d'éviter choc de pH, ajuster le pH du milieu dans votre bouteille si nécessaire



BESOIN NUTRITIF

○ Apport nutritif

- DMEM ; Dubelcco's minimum essentiels
Contient les composantes nécessaires pour que les cellules survivent;
Eau, ions minéraux, sels, acides aminés, glutamine, sucre, vitamines...
Cependant ce milieu n'est pas assez riche pour que les cellules augmentent
Chaque types cellulaires a son milieu
- Sérum: Ajouter au milieu à raison de 10% , il contient le nécessaire pour que la population croît. Il est riche en facteur d'attachement et de croissance. Les numéros de lot indiquent différentes concentrations de toxines ou autres éléments...
- *Attention que votre milieu soit frais (un mois) car avec le temps, il y a de la dégradation voir plus loin...*
- Complément : NEAA , sodium pyruvates, hormones, antibiotiques, agents de sélection...



DMEM

Ferrous Sulfate, Heptahydrate	0.417	0.417	0.417
GeO ₂	0.00053	0.00053	0.00053
MnSO ₄ H ₂ O	0.00017	0.00017	0.00017
Molybdcic Acid ammonium Salt	0.00124	0.00124	0.00124
Nikelous Sulfate (NiSO ₄ 6H ₂ O)	0.00013	0.00013	0.00013
Potassium Bromide	0.00012	0.00012	0.00012
Potassium Iodide	0.00017	0.00017	0.00017
Rubidium Chloride	0.00121	0.00121	0.00121
Sodium Selenite	0.0173	0.0173	0.0173
Sodium Selenite, Pentahydrate	0.00263		
Sodium Floride	0.0042	0.0042	0.0042
Sodium Meta-Silicate .9H ₂ O	0.14	0.14	0.14
Stannous Chloride(Tin Chloride-SnCl ₂)	0.00012	0.00012	0.00012
Zinc Sulfate, Heptahydrate	1.295	1.295	1.295
ZrOCl ₂ 8H ₂ O	0.00322	0.00322	0.00322
Nucleosides^b			
Hypoxanthine, Na salt	2.39	2.39	11.95
Thymidine	0.365	0.365	1.825
Amino Acids^b			
L-Alanine	4.45	4.45	22.25
L-Arginine HCl	147.5	147.5	737.5
L-Asparagine H ₂ O	7.5	7.5	37.5
L-Aspartic Acid	6.65	6.65	33.25
L-Cysteine HCl H ₂ O	17.56	17.56	87.8
L-Cystine 2HCl	31.29	31.29	156.45
L-Glutamic Acid	7.35	7.35	36.75
L-Glutamine	584	584	584
Glycine	18.75	18.75	93.75
L-Histidine HCl H ₂ O	31.48	31.48	157.4
L-Isoleucine	54.47	54.47	272.35
L-Leucine	59.05	59.05	295.25
L-Lysine HCl	91.25	91.25	456.25
L-Methionine	17.24	17.24	86.2
L-Phenylalanine	35.48	35.48	177.4
L-Proline	17.25	17.25	86.25
L-Serine	26.25	26.25	131.25
L-Threonine	53.45	53.45	267.25
L-Tryptophan	9.02	9.02	45.1
L-Tyrosine 2Na	55.79	55.79	278.95
L-Valine	52.85	52.85	264.25

SÉQUENCE DU PASSAGE CELLULAIRE

- Jeter le milieu
- Lavage au PBS (solution phosphate) ; ajouter 5ml, brasser le pétris, et rejeter dans le contenant de déchet liquide
- Ajouter la trypsine, une petite quantité suffit, soit 1.5ml dans un pétris de 100mm. Bien agiter pour bien la répandre
- Faite des « up and down » ou triturer avec une pipette de 5ml afin de défaire les amas
- Compléter avec du milieu frais compléter DMEM+10% sérum+1% l=Glut+1% Pen/Strep
- Diviser selon le nombre de pétris désirés. Selon les types cellulaires, pour la majorité on fait 1/10 . La convention fait qu'un pétris de 100mm contient 10 ml de milieu

Certaines expériences demandent aussi de compter les cellules pour avoir un nombre fixe de cellulaires et ainsi avoir une reproductivité

- Remettre les pétris dans l'incubateur en brassant pour bien répandre les cellules uniformément

Choose the proper cell dissociation product

Culture Type	Wash Solution	Dissociation Solution	Products and Cat. No.
Most continuous and strongly adherent cell lines	HBSS or PBS w/o calcium and magnesium	Trypsin 0.25% in balanced salt solution w/o calcium and magnesium	0.25% Trypsin (liquid) (1X) 15050-065 2.5% Trypsin (liquid) (10X) 15050-046 Trypsin Powder (1:250) 27250-018
Many cells at early passage	D-PBS	TrypLE™ products	TrypLE™ Select (liquid) 12563-011 TrypLE™ Express (liquid) 12605-010
Continuous cell lines where cell surface protein integrity is important	HBSS or PBS w/o calcium and magnesium	Trypsin 0.05% in 0.53 mM EDTA	0.05% Trypsin 0.53 mM EDTA (liquid) 25300-054 0.05% Trypsin 0.53 mM EDTA (liquid) (10X) 15400-054
		TrypLE™ products	TrypLE™ Select (liquid) 12563-011 TrypLE™ Express (liquid) 12605-010
Weakly adherent epithelial cells	HBSS or PBS w/o calcium and magnesium	EDTA, glycerol in sodium citrate	Enzyme-Free Cell Dissociation Buffers, Hanks' based 13150-016 , PBS based 13151-014
Transformed fibroblasts		TrypLE™ products	TrypLE™ Select (liquid) 12563-011 TrypLE™ Express (liquid) 12605-010
Primary cells where cell surface protein integrity is important			
Strongly adherent early-passage cell lines	HBSS or PBS w/o calcium and magnesium	Trypsin 0.25% in 1 mM EDTA Dispase 0.6 to 2.4 units/ml in PBS	0.25% Trypsin 1 mM EDTA (liquid) 25200-056 Trypsin Powder (1:250) 27250-018 Dispase 0.6 to 2.4 units/ml in PBS

Epithelial cells	0.5 mM to 1 mM EDTA	0.5 mM to 1 mM EDTA	Versene 1:5,000 (0.53 mM EDTA in PBS)
		Dispase 0.6 to 2.4 units/ml in PBS	Dispase
Strongly adherent, epithelial and some tumor cell lines	0.5 mM to 1 mM EDTA	0.25% with 1 mM EDTA	0.25% Trypsin 1 mM EDTA (liquid) 25200-056 Versene 1:5,000 (0.53 mM EDTA in PBS) Trypsin Powder (1:250) 27250-018
		Dispase 0.6 to 2.4 units/ml in PBS w/o calcium and magnesium	Dispase
Thick cultures, multiple layers	1 mM EDTA	Trypsin 0.25%	0.25% Trypsin 1 mM EDTA (liquid) 25200-056 Trypsin Powder (1:250) 27250-018
Dense cultures that are collagen rich		Collagenase 200 units/ml, 1 mM EDTA in balanced salt solution w/o calcium and magnesium	Collagenase Type I, Type II, Type IV
All adherent cell cultures	HBSS or PBS w/o calcium and magnesium	Scrape off cell sheet	—

Utilisation de l'Hématocymètre

Est composé de 2 chambres identiques, subdivisées en 9 carrés de 1 mm chacun, contenant du liquide sur une hauteur de .1mm, soit un carré de 1 mm². Son utilisation qui, à priori, servait au comptage de cellules sanguines et de spermatozoïdes, nous permet de déterminer la concentration de cellules dans un liquide (par mL).

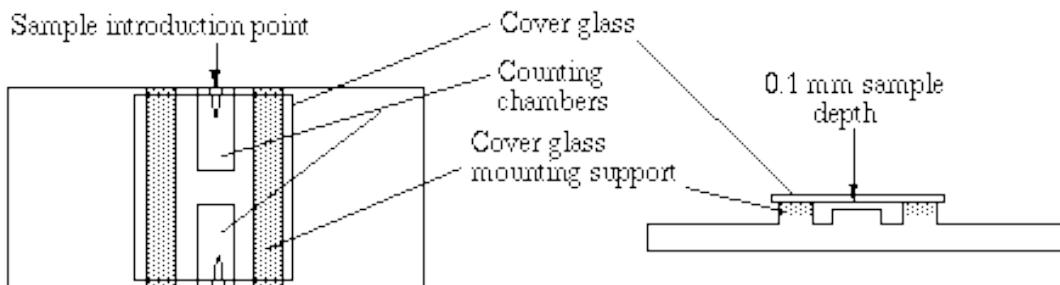
Il est bien important qu'au moment de prélever l'échantillon, votre mélange soit bien homogène et représentatif.

1. Déposer la lamelle sur les chambres, à cheval sur les rebords en verre.
 2. Déposer le liquide, environ 15ul, dans l'encavure en V, soit à l'aide d'un embout ou d'une pipette pasteur. La goutte entrera par capillarité et doit tout recouvrir la chambre sans pour autant qu'elle ne déborde. Prenez garde que la lamelle demeure immobile durant la lecture.
- L'ajout de bleu de trypan 0.1% sert à calculer le % de viabilité en colorant les cellules mortes.
 - L'ajout de crystal violet 0.1% permet la coloration des noyaux.
 - Dans les deux cas, le calcul est réajusté en fonction de la dilution utilisée.
 - Exemple : Un volume de cellules pour un volume de bleu de trypan.

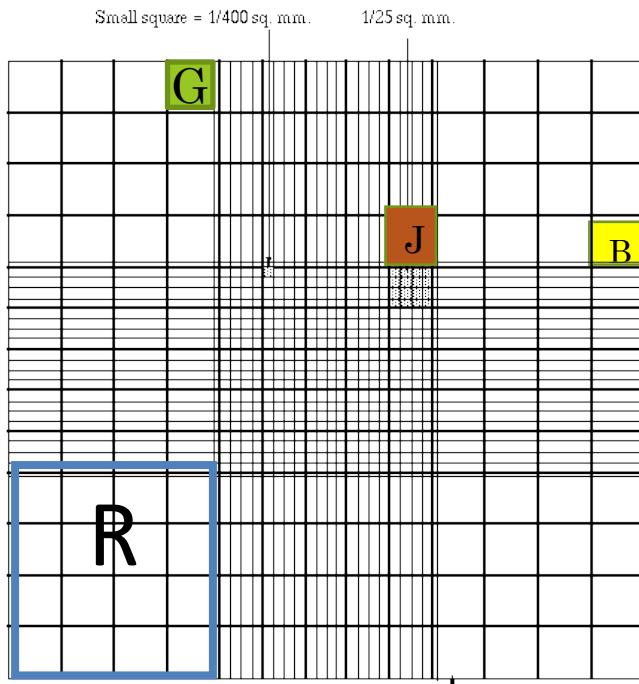
FORMULE : Nbres de cellule X 104 X facteur de dilution (ex: 2) = Nombre cellule par mL

COMPTAGE : Que vous comptiez les quatre carrés autour et divisé par 4 (moyenne), que vous comptiez le carré central dans les deux chambres et faite la moyenne, peu importe. Le nombre de cellules comptées doit être suffisant (entre 50-250 cellules) et la variation entre 2 carrés ne doit pas dépasser la moitié (67 et 70 mais pas 50 et 105).

Si non il faut recommencer, en diluant votre solution ou en la concentrant par centrifugation/ resuspension avec un volume plus petit. Lorsque les cellules touchent les lignes, soyez constant, comptez la ligne du haut mais pas celle du bas et celle de gauche mais pas celle de droite ou vice versa.



Hemacytomètre ; comment installer la petite vitre



Dimensions	Area	Volume at 0.1mm depth	
1 x 1 mm	1 mm ²	100 nL	R
0.25 x 0.25 mm	0.0625 mm ²	6.25 nL	G
0.25 x 0.20 mm	0.05 mm ²	5 nL	B
0.20 x 0.20 mm	0.04 mm ²	4 nL	J
0.05 x 0.05 mm	0.0025 mm ²	0.25 nL	

Valeur des carrés selon leurs dimensions
 Normalement, on compte un carré comme le R



Vaisselles, plastiques, flacons

- Support d'attache pour les cellules

Certain support demandent un traitement pour que les cellules s'attachent bien.

Normalement les pétris sont recouverts de charges négatives, mais d'autres types de revêtements seront utiles selon les besoins

- Laminine (extension des neurones),
- Poly-L-lysine (cellules qui se fixent mal)
- Collagène (Étude en 3D, fibroblastes)





CONSERVATION, CONGÉLATION

CONGÉLATION

- Afin de conserver les cultures cellulaires et poursuivre les travaux dans les labos de recherche, nous devons les congeler dans un cylindre d'azote liquide, et ainsi garder un « stock » de façon permanente. Renouvelable tous les 5ans ou un an dans le -80C
- Les lignées sont congelées à bas passage et multipliées de façon a avoir une grande quantité de cryovials de la même solution mère. On se protège ainsi des problèmes que pourraient survenir en travaillant (contamination, différenciation, sénescence)
- IMPORTANT Lors de la congélation les cellules doivent être en phase exponentielle, d'un Ph 7.2 et de bonne allure
- Milieu de congélation:
Exemple de Composition: 5-10% DMSO, 20% sérum, 70% milieu
Le DMSO sert d'agent conservation, garder les cellules dans un environnement qui va protéger à une température extrême de -170C (T° l'azote liquide)
Le DMSO empêche la formation de cristaux lors de la décongélation

ÉTAPES A SUIVRE DE LA CONGÉLATION

- Faire un passage et compter les cellules
- Centrifuger dans un tube de 15ml, 200-300g
- Comme nous voulons $4-6 \times 10^6$ cellules/ml, si nous avons 20×10^6 nous pourrons faire 5 cryovials
- Préparer le milieu de congélation 5ml
- Resuspendre le culot dans le milieu de congélation
- Mettre à -70°C pour 24 heures et ensuite mettre dans l'azote liquide
- La qualité des cellules est primordiale au succès de la congélation
- La congélation devrait être bonne au moins 5 ans, sinon recongeler
- Identifier correctement, date, nom, mutant, passage...
- Bien répertorier dans un cahier accessible à tous
- Information importante, mycoplasme free, tester ou non...
- Tester votre congélation, prendre un cryovials après un certain temps

DÉCONGÉLATION

- Deux choix ; Soit qu'on dilue les cellules dans le DMEM (tube de 15ml), centrifuger et ensemencer immédiatement, soit que l'on ensemence le pétris et une fois les cellules attachées, on change le milieu au bout de quelques heures.

Certaines cellules sont sensibles au DMSO

- Aussi les cellules ont besoin d'une concentration adéquates, suivez les recommandations des compagnies qui vendent les cellules. Vous y verrez aussi le milieu et trypsine typiques à elles
- Observer la suite, les cellules devront être passées dès une confluence de 90%, puis faire un passage avant de travailler pour s'assurer que les fonctions cellulaires soit normales



DÉCONGÉLATION

- La congélation est de l'ordre de 1° C à la minute
- Congélation lente, décongélation rapide
- Décongélation, plonger le cryovial dans le bain-marie et agiter
- Passer le cryovial à éthanol et ensemencer un pétris
- Lorsque l'on décongèle les cellules, il faut se débarrasser du DMSO car il va finir par digérer les membranes. A l'intérieur de 20heures, changer le milieu par du milieu frais
- Le premier ml doit être ajouté lentement puis le reste plus rapidement. Ceci pour éviter que le DMSO ne fasse éclater les cellules en sortant





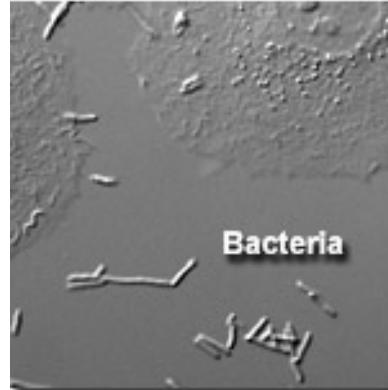
LA CONTAMINATION

CONTAMINANTS BIOLOGIQUES

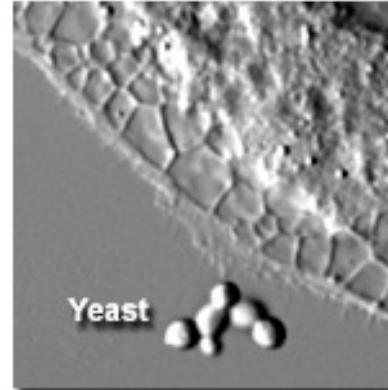
- Les contaminants biologiques sont un sérieux problème en culture. Comme ces micro-organismes croissent plus rapidement (bactéries, levures, mycoplasme, virus...) il faut avoir de bonnes pratiques aseptiques et être rigoureux. La cause ou la provenance n'est pas toujours évidente.
 - Perte de temps et perte d'argent
 - Résultats expérimentaux erronés ou inappropriés
- Signe visible: pH du milieu (acide), turbidité, mort cellulaire, senteur...
- Parfois la mortalité cellulaire qui s'accroît laisse croire à une contamination. Attention, ça peut être non-biologique. Vérifier la forme des débris. Un test: Prendre un peu de surnageant et déposer sur une autre culture. Si ça pousse c'est bien des micro-organismes sinon regarder autres sources

Infections diverses

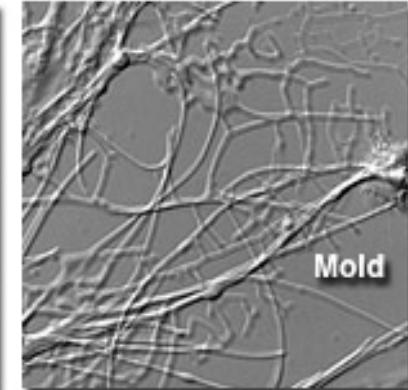
Microbial Contamination in Mammalian Cell Cultures



Bactéries

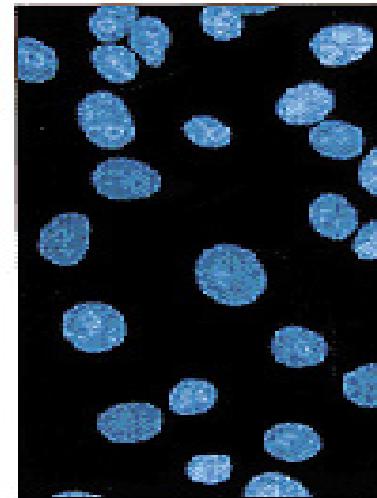


Levures

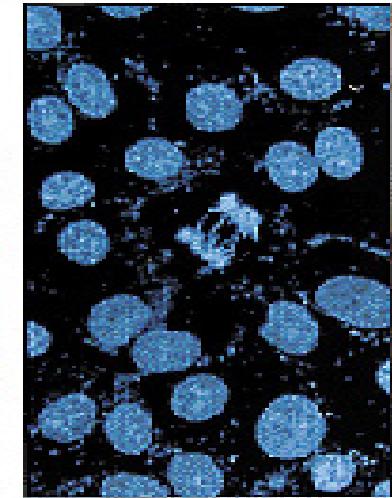


Moisissures

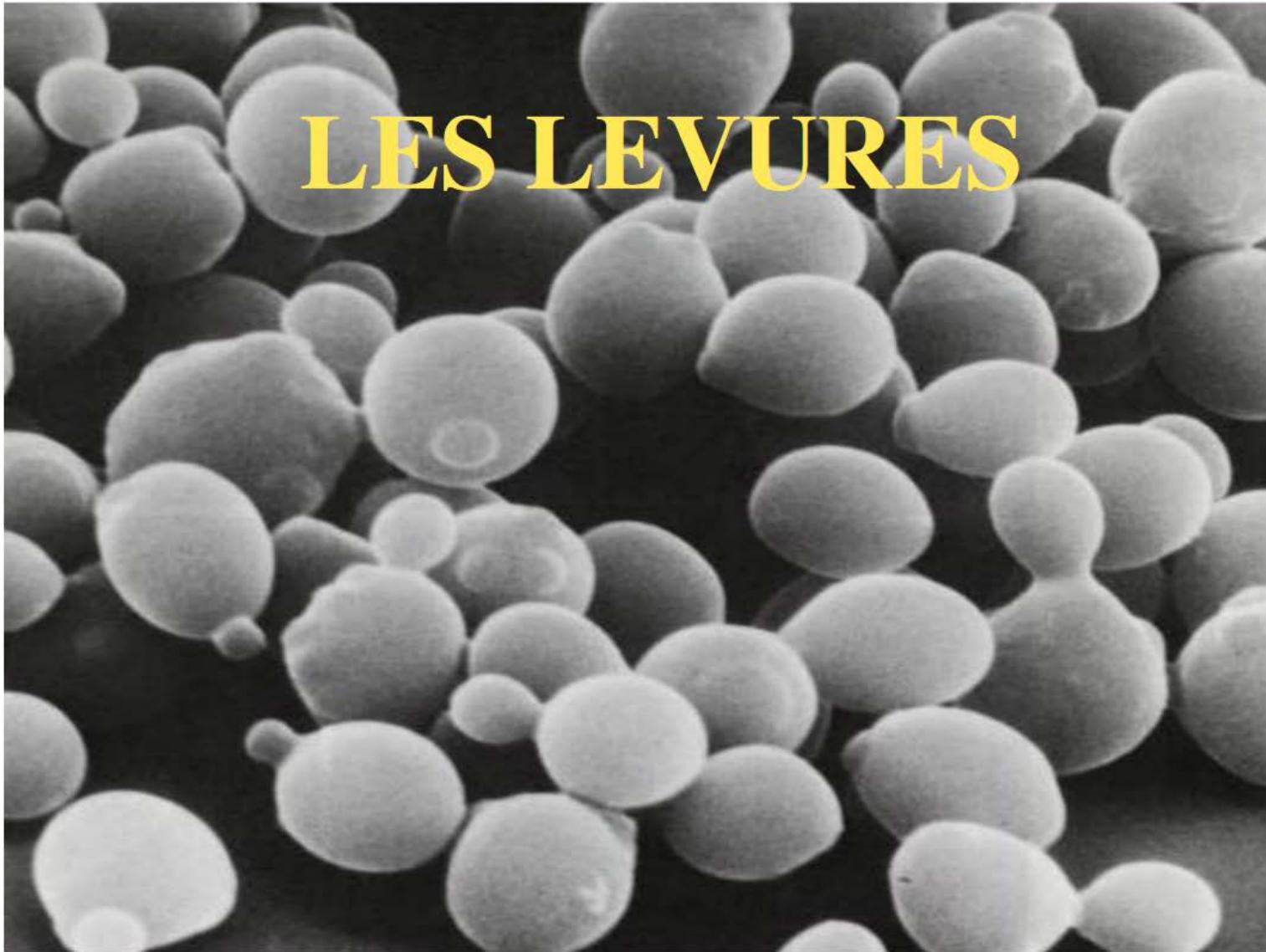
Bactéries



Mycoplasme
(cellules non infectées et infectées)

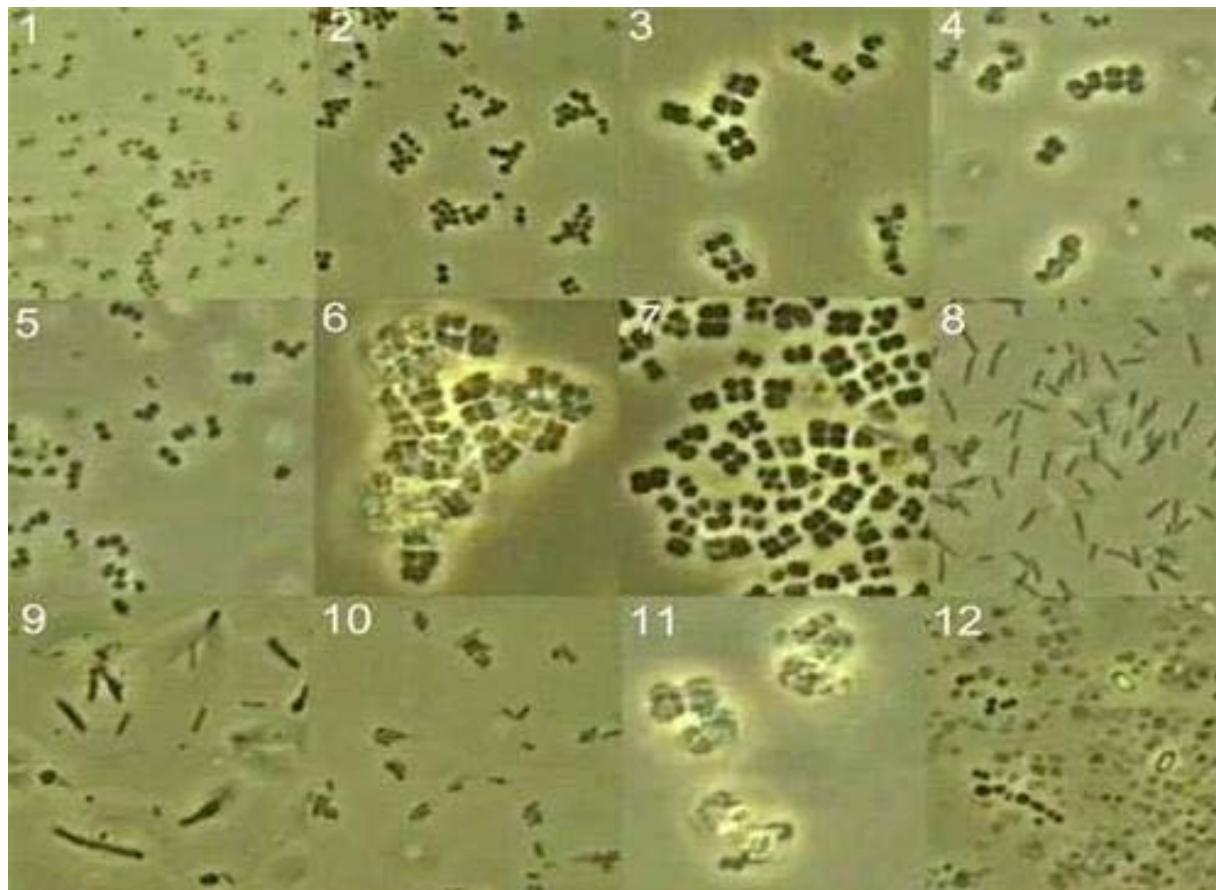


LES LEVURES

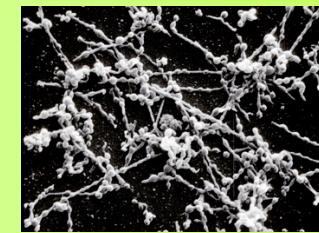


Cellules contaminées par Bactéries...

Comme il existe un très grand nombre d'espèces bactériennes, les contaminations en milieu liquide donne un aspect visuel qui varient tout autant. Pour ce vous verrez ci-dessous différentes façon de voir ses infections.



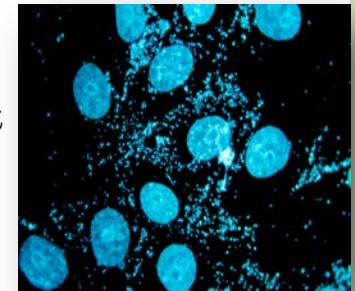
Mycoplasme



Travailleriez-vous avec des cellules infectées? Les mycoplasmes sont dévastateurs.

Les mycoplasmes sont des procaryotes dépourvus de paroi cellulaire. Ils sont résistants à la plupart des antibiotiques et au gel-dégel. Gros de 0,15 à 0,8 μm , ils passent au travers des filtres 0,2 μm . Dépendant de la cellule pour se diviser.

Difficile à détecter par manque de signe visible, L'infection peut atteindre 10^7 à 10^8 organismes/ml et affecter 30% des cultures en laboratoires. Seul des moyens spécifiques comme la coloration Hoechst 33342 ou autres kits vendus commercialement peuvent détecter leur présence (visible à l'intérieur comme à l'extérieur du noyau..)



En plus d'affecter le rendement de la croissance cellulaire, les mycoplasmes ont pour effets la suppression des composants du milieu menant à la diminution des niveaux d'ATP, la cytotoxicité et la famine culture. D'autres effets observés: produire des altérations membranaires, inhibition des protéines carbohydrates, affecte la synthèse des protéines RNA, DNA.

D'où viennent-ils? Souvent des aérosols du manipulateurs, d'autres types cellulaires, des produits utilisés (sérum-milieu...) ou des compagnies. Solution ? Cultiver sans antibiotique, tester régulièrement. Traitement difficile.



SOURCE DE CONTAMINANT

- La plupart des contaminations sont causées par l'usager.
Aérosols par les gants, vêtements...
- Incubateurs ou Bain-Marie, changer l'eau!
Laver la fan de l'incubateur source de propagation
- Nouvelles cellules provenant d'un autre labo
- Sinon vérifier vos solutions: Milieu-PBS-Trypsin
- Pipet-aid et pipetman : laver, décontaminer
- Problème d'autoclave : pipettes , la vaisselle
- Changement filtre (pièce) ou certification annuelle de la hotte
- Informer vos compagnons afin de minimiser la propagation



SOLUTION AUX CONTAMINANTS

- L'usage d'antibiotiques peut dissimuler une contamination.
Travailler sans antibiotique permet d'assurer une lignée saine.
L'usage fréquent d'antibiotique favorise les résistances
- Utiliser des flasks ventilées avec filtre 0,2µm
- Tester régulièrement les mycoplasmes
- Utiliser des embouts (tips) avec filtre pour vos pipetmans
- Nettoyage régulier: incubateur, bain-marie, poignées de portes, téléphone, pipet-aid... Aussi les enceintes !
- Attention à la gestion des déchets: les contaminants qui sporulent (levure ou bactérie) doivent être jetés hors de la pièce. AVERTIR vos collègues, ils ont le même problème ?



LES AÉROSOLS, AUTRES CONTAMINANTS

- Minuscules gouttelettes générées lors de manipulation
 - Lors de l'ouverture de tubes
 - Déversements ou éclaboussures
 - Équipements : aiguilles, pipettes, centrifugeuses, sonificateurs, lyophilisateurs, homogéisateurs, agitateurs de cultures, vortex...
- Attention aux accessoires (pipettes) vous pourriez faire une contamination croisée avec d'autres types cellulaires (genre Hela)



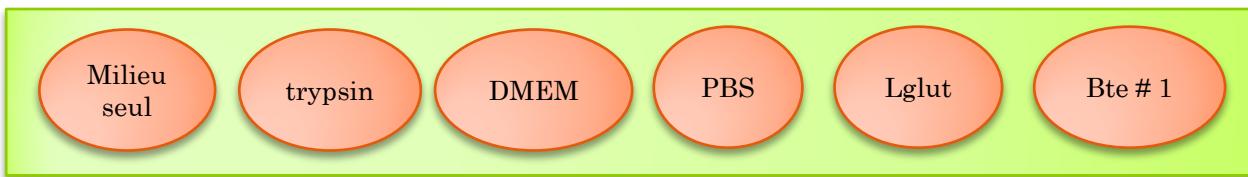
AUTRES CONSEILS PRATIQUES

- Ne pas partager vos solutions
- À chaque type cellulaire ses solutions, laisser les bouteilles de ces solutions fermées autant que possible
- Passer souvent les gants à l'éthanol
- Éviter de toucher vos cheveux, bouche, téléphone cellulaire avec vos gants
- Au printemps, mettez des antibiotiques
- Adopter de bonnes pratiques sous la hotte, éplucher vos pipettes de façon à ne pas mettre vos doigts sur celles-ci
- Investiguer les problèmes de ventilation avec la régie des bâtiments si c'est récurant



CONTAMINATION PERSISTANTE

- Si jamais le malheur vous poursuit et qu'on trouve difficilement la provenance... Parfois ça disparaît et on n'a jamais su la provenance
- Faites des contrôles, tester différents milieux, incuber vos solutions avec un milieu riche ou sur des géloses



- Mettez un pétris ouvert quelques temps pour voir si ça ne viendrait pas de l'enceinte
- Tester l'autoclave, changer d'incubateur, changer de hotte...
- Faire identifier la bactérie, isoler du milieu et centrifuger à haute vitesse, puis regarder au microscope ou faire appel à un microbiologiste. Parfois on peut rester surpris!
- **Faire un bon ménage général de la pièce ça aide parfois**



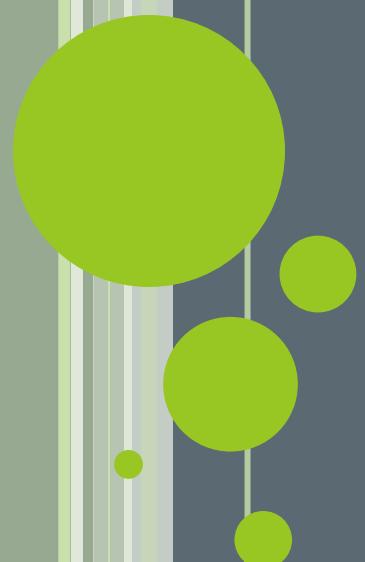
CONTAMINANTS NON-BIOLOGIQUES

- Pureté de l'eau, endotoxines, ions métalliques, pyrogène free
- Sérum: selon la qualité, l'origine, le niveau de toxicité varie d'un lot à un autre
- Plastique (qualité)
- Milieu de culture : dégradation d'éléments (HEPES, riboflavines, tryptophane) par la chaleur ou/et la lumière causant des radicaux libres et peroxyde d'hydrogène, ammoniaque (L-glutamine).
Entreposage adéquat
- Dans l'incubateur faire attention aux savons trop puissants, aux vapeurs d'éthanol, si ça tue les micro-organismes, les cellules ne vont pas survivre. Impureté du gaz aussi
- Résidus de savons sur la vaisselle



EXPÉRIMENTATION

Transfection Infection



TRANSFECTION

- On appelle transfection le processus de transfert d'un ADN exogène dans la cellule par diverses méthodes
- La quantité de cellules (70% confluence), l'état physiologique (milieu frais, belles cellules) sont des facteurs importants pour votre réussite.
La pureté et la longueur de l'ADN influent aussi sur la transfection
- Autres facteurs afin d'optimiser votre rendement
 - Temps d'incubation avec l'ADN (4heures à over night)
 - Concentration de l'ADN dans votre mélange complexe
 - Temps avant la récolte, maturation de votre protéine (24-72hres)
 - Milieu utilisé souvent sans sérum pour complexe commercial
- Méthode/technique utilisée en transfection
 - Calcium phosphate, ce complexe Ca2+ entre dans la cellule par phagocytose
 - PEI
 - LyoVec, transfectamine, lipofectamine, Xfect, fugene...
 - Électroporation

INFECTION

- On appelle infection si on se sert d'un virus pour transporter l'ADN exogène à un type cellulaire
- On a combiné un insert (protéine qui induit la sénescence) à un rétrovirus qui contient un site de réplication autant pour la bactérie (ampicilline) que pour les eucaryotes. Le rétrovirus ne peut se répliquer par lui-même. Les cellules d'empaquetage (Phoenix ou Bing) vont fournir aux virus l'encapsulation nécessaire pour que les protéines puissent infecter un autre type cellulaire

À partir du surnageant des cellules transfectées, 4 jours après, on effectue une infection sur des fibroblastes, cellules difficilement transfectables autrement. Par la suite, la protéine sera intégrée de façon stable à la lignées des fibroblastes



TRANSFECTION TRANSITOIRE STABLE OU TRANSITOIRE

- La transfection transitoire permet à plusieurs plasmides de se diviser indépendamment de la division cellulaire. Votre insert sera multiplié en grande quantité et récolté rapidement
- L'infection comme les transfactions stables permet d'intégrer votre protéine (insert) à la cellule de façon permanente et fait partie de la cellule. On les appelle des lignées stables. Le niveau d'expression de la protéine sera moins élevé qu'une transfection transitoire, mais des moyens nous permettent de trier les cellules les plus intéressantes
- Un agent sélectif nous permet de garder seulement les cellules transfectées, ayant la sélection et les autres mourront
 - G418, hygromycine, puromycine, néomycine...
- CMF: cytométrie en flux est un appareil qui permet de trier par un faisceau laser les cellules désirées avec des caractéristiques particulières.
Le CMF nous permet d'obtenir une population de cellules qui exprime un niveau d'expression équivalent. On ne parle pas ici de culture monoclonalement car elle n'est pas issue d'une seule cellule mais c'est plusieurs cellules qui produisent le même niveau d'expression.

QUELQUES DÉFINITIONS...

- **Plasmide** : Fragment d'ADN double brin, le plus souvent circulaire et distinct de l'ADN moléculaire, que l'on retrouve dans le cytoplasme des bactéries. Le plasmide n'est pas indispensable à la cellule hôte mais lui confère différentes propriétés. On le retrouve de façon naturel dans les bactéries, ce sont d'ailleurs sur ces plasmides que l'on retrouve les résistances aux antibiotiques
- **Vecteur** ; Ce sont des plasmides issus de constructions génétiques faites en laboratoire et présentant un certain nombre de caractéristiques pour des applications en biotechnologie (enzyme de restriction).
Molécule d'ADN susceptible de recevoir un fragment d'ADN étranger, dont elle facilite l'introduction, la multiplication et /ou l'expression dans la cellule
- **Protéines recombinantes** ; Une protéine recombinante (ou protéine hétérologue) est une protéine produite par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique. Un gène codant une protéine d'intérêt est introduit dans le génome de l'espèce productrice (bactéries, cellules mammifères en culture, animaux transgéniques, etc.). Les protéines recombinantes peuvent être purifiées et utilisées à des fins thérapeutiques