

Optimisation des techniques d'élimination des mycoplasmes dans les cultures cellulaires

Travail de fin d'études réalisé par

Loredana Mimmo

en vue de l'obtention du titre de
**Bachelier - Technologue de
laboratoire médical**

Section Biologie Médicale

Année académique 2011-2012

Promoteur : M. Erik Toussaint
Maîtres de stage: Dr. Marjan Moreels
M. Kevin Tabury

Optimisation des techniques d'élimination des mycoplasmes dans les cultures cellulaires

Travail de fin d'études réalisé par

Loredana Mimmo

en vue de l'obtention du titre de
**Bachelier - Technologue de
laboratoire médical**

Section Biologie Médicale

Année académique 2011-2012

Promoteur : M. Erik Toussaint
Maîtres de stage: Dr. Marjan Moreels
M. Kevin Tabury

Je souhaite adresser ici mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce TFE.

Tout d'abord je tiens à remercier mes maîtres de stage, Monsieur Kevin Tabury pour son aide précieuse, sa patience et sa disponibilité tout au long de ce stage et le Docteur Marjan Moreels pour son aide et ses conseils.

Je remercie aussi le Professeur Sarah Baatout qui m'a permis de réaliser mon stage au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier Monsieur Erik Toussaint, mon promoteur.

Finalement, je remercie ma famille et Arnaud pour le soutien qu'ils m'ont apporté.

PRÉSENTATION DU SCK•CEN¹

En 1952, le Centre d'Etudes pour les Applications de l'Energie Nucléaire est créé par Pierre Ryckmans. Le centre portait alors le nom de CEAEN, et c'est seulement en 1957 qu'il sera appelé SCK•CEN (« Studiecentrum voor Kernenergie » en néerlandais et « Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire » en français).

Situé à Mol, il est l'un des plus grands centres de recherche de Belgique. Le SCK•CEN (Fig. 1) a été créé dans le but de permettre aux milieux académiques et industriels belges d'accéder au développement de l'énergie nucléaire dans le monde entier.

La principale mission du SCK•CEN est de maintenir un centre d'excellence ayant trait à la science et à la technologie nucléaire ainsi qu'aux radiations ionisantes.

Le Centre fait de la recherche au niveau de la sûreté des installations nucléaires, du traitement et de la gestion des déchets radioactifs, de la protection de l'homme et de l'environnement contre les rayonnements, et de la gestion des matières fissiles et autres matières stratégiques.

Il effectue de la recherche relative aux implications sociales dans une perspective de développement durable. Mais le Centre organise aussi de nombreuses formations pour développer, rassembler et transmettre la connaissance du nucléaire. Le Centre fournit également des services dans plusieurs domaines comme l'industrie nucléaire, le secteur médical et les pouvoirs publics.

Les domaines d'activités au sein du SCK•CEN

Science des Matériaux Nucléaires : ce département souhaite améliorer la connaissance et la compréhension de matériaux sous irradiation, afin de prévoir leur comportement.

Systèmes Nucléaires Avancés : Il contribue à mettre au point et tester des technologies et instrumentations pour les nouveaux systèmes de réacteurs, ceci en collaboration avec l'industrie et des groupes de recherche.

Environnement, Santé et Sûreté (EHS): L'institut Environnement, Santé et Sûreté comporte 8 groupes d'expertise dont le **laboratoire de radiobiologie** où le stage se déroule. Ils y étudient le comportement et l'impact des matériaux radioactifs dans l'air, la géosphère et la biosphère, analysant ainsi les effets potentiels des radiations ionisantes sur la santé et l'environnement. L'EHS s'implique aussi dans la sûreté, le support aux autorités, les aspects sociétaux ou éthiques des applications et de la recherche nucléaires.

¹ (1) www.sckcen.be

Les domaines de recherche de l'institut Environnement, Santé et Sûreté sont :

Les effets biologiques des faibles doses de radiations :

Les éventuels risques des faibles doses de rayonnements ionisants pour l'organisme sont évalués. Des études sont réalisées dans les domaines de la radiosensibilité de l'organisme en développement, la radiosensibilité individuelle mais aussi de nouveaux domaines tels que les effets des radiations autres que les effets cancéreux. L'adaptation des bactéries en milieux extrêmes est également étudiée. Celles-ci pourraient être utiles pour la production d'oxygène et le recyclage d'eau en vue de missions spatiales de longue durée. L'influence des radiations et l'absence de microgravité sur les bactéries est aussi étudiée.

Les applications médicales :

L'institut est actif dans ce domaine important de la radioprotection, que ce soit en radiologie, en radiologie interventionnelle, en médecine nucléaire ou en radiothérapie.

La radioprotection :

Les processus par lesquels les radionucléides se dispersent dans l'air, la biosphère et la géosphère y sont étudiés. Elle évalue l'impact des rayonnements ionisants sur l'homme et l'environnement. Une grande importance est accordée également à la recherche et aux services concernant le plan d'urgence, la gestion de crise et le support aux décisions en cas d'accidents nucléaires et radiologiques.

La gestion à long terme des déchets radioactifs :

Les chercheurs souhaitent mettre au point des solutions pour le stockage géologique des déchets radioactifs tant à grande profondeur qu'en surface. Ils analysent leur faisabilité technique ainsi que leurs acceptations par le grand public.

Safeguards :

Les recherches en cours portent sur les contrôles des garanties des installations nucléaires présentes et futures, ainsi que sur des techniques de mesure du combustible usé. L'aspect politico-social de la non-prolifération ainsi que les outils de soutien aux décisions dans le cas de contrôles des matières nucléaires y sont également pris en charge.

Les aspects sociaux des technologies nucléaires :

La recherche se concentre sur la justification, la transparence et l'implication du nucléaire dans la politique et la prise de décision. Les domaines d'application principaux sont: la gestion des déchets radioactifs, les risques nucléaires et la politique énergétique.

Les mesures et calibrages :

L'institut EHS réalise des recherches et fournit des prestations de services dans les domaines suivants: dosimétrie personnelle externe, anthropogammamétrie, dosimétrie de l'environnement, mesures de faibles niveaux de radioactivité dans les échantillons biologiques et environnementaux, mesures de contamination *in situ*, mesures de radon, analyses de déchets et calibrage des unités nucléaires et non nucléaires.

Services généraux et Administration : regroupent les services administratifs, financiers, logistiques et techniques centraux ainsi que les ressources humaines et l'ICT.

Les installations consacrées à la recherche

Le « Belgian Reactor 1 » ou BR1, en activité depuis 1956, est le plus ancien réacteur de recherche de Belgique.

Le « Belgian Reactor 2 » ou BR2, lancé en 1961, est l'un des réacteurs de recherche les plus puissants au monde. Il fonctionne à base d'uranium hautement enrichi, est modéré et refroidi par eau. Il est destiné aux tests des matériaux et à la production de radionucléides pour la médecine nucléaire.

Le « Belgian Reactor 3 » ou BR3 était un prototype de réacteur à eau pressurisée. Il a été sélectionné en tant que projet pilote européen pour démontrer la faisabilité du démantèlement d'un réacteur et pour en garantir la sécurité.

Le laboratoire de haute et moyenne activité (LHMA) étudie les effets de l'irradiation de matériaux utilisés dans des installations nucléaires actuelles et futures.

Le laboratoire HADES se trouve à une profondeur de 225 mètres sous le domaine du SCK•CEN. Il est destiné à l'étude de la couche d'argile à grande profondeur en tant que zone potentielle d'enfouissement pour les déchets hautement radioactifs et de longue demi-vie.

Laboratoire d'analyse nucléaire et chimique, mesure et évalue la contamination interne des travailleurs du secteur nucléaire et contrôle les doses de radiations auxquelles ils ont éventuellement été exposés.

MYRRHA (Mutlipurpose hYbrid Research Reactor for High-tech Applications) est un réacteur sous-critique d'une puissance de ~50 MW. Il a la capacité de réduire la toxicité à long terme des déchets nucléaires par le biais de la séparation et de la transmutation.



Figure 1 : Vue aérienne du SCK•CEN

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	10
THÉORIE.....	11
1. La culture cellulaire	12
1.1. Histoire de la culture cellulaire	12
1.2. Les avantages et les inconvénients	13
1.3. Les contaminants dans les cultures cellulaires.....	13
2. Les mycoplasmes.....	14
2.1. Définition.....	14
2.2. Etymologie et origine des mycoplasmes.....	15
2.3. Propriétés et caractéristiques	15
2.4. Les effets sur les cultures cellulaires	17
3. Les techniques de détection.....	18
3.1. La PCR et l'électrophorèse	18
3.2. La microscopie à fluorescence	19
4. Les techniques d'élimination.....	21
4.1. MRA (Mycoplasma Removal Agent).....	22
4.2. BM cyclin	23
4.3. Plasmocin	24
5. Prévention contre les mycoplasmes	24
MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
6. MATÉRIEL	27
6.1. Hotte à flux laminaire.....	27
6.2. L'hémocytomètre de Neubauer	27
6.3. Microscope à contraste de phase	28
6.4. Microscope à fluorescence.....	29
7. MÉTHODES	30
7.1. La culture cellulaire	30
7.1.1. Utilisation de la hotte à flux laminaire	30
7.1.2. Préparation du milieu DMEM +10% FBS	31
7.1.3. Décongélation des cellules	31
7.1.4. Passage des cellules.....	32
7.1.5. Comptage cellulaire.....	33
7.2. Méthodes de détection des mycoplasmes	34
7.2.1. Préparation des échantillons pour le marquage de l'ADN	34

7.2.2.	Extraction d'ADN (kit Roche)	36
7.2.2.1.	Principe	36
7.2.2.2.	Protocole	36
7.2.3.	La PCR (LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit)	37
7.2.3.1.	Principe	37
7.2.3.2.	Protocole de la PCR	38
7.3.	Méthodes d'élimination des mycoplasmes	39
7.3.1.	Le kit MRA (Mycoplasma Removal Agent)	39
7.3.2.	Le kit BM-Cyclin	39
7.3.3.	Le kit Plasmocin	40
7.3.3.1.	Préparation expérimentale	40
	RÉSULTATS ET DISCUSSION	42
8.	Identification microbiologique	43
8.1.	Résultat	43
9.	Culture d'une lignée contaminée et d'une lignée non contaminée	44
9.1.	Microscopie à contraste de phase	44
9.2.	Vérification des lignées contaminées et non contaminées contrôle	45
9.3.	Microscopie à fluorescence	46
10.	Traitements antibiotiques	47
10.1.	Microscopie à contraste de phase	48
10.2.	Résultats des PCR	49
11.	Suivi des échantillons après utilisation des antibiotiques	53
11.1.	Image de microscopie en contraste de phase	53
11.2.	Image des gels d'électrophorèse	55
12.	Vérification des résultats	56
12.1.	Vérification de la lignée contaminée et non contaminée	57
13.	Prévention	57
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	59
14.	Conclusion	60
15.	Perspectives	61
	BIBLIOGRAPHIE	62

INTRODUCTION

La culture cellulaire est un ensemble de techniques *in vitro* indispensable non seulement dans la recherche fondamentale mais aussi dans nos laboratoires de recherche puisqu'elle permet, par exemple, la mise au point de vaccins, de médicaments ou encore la production de tissus. Elle demande une grande rigueur du point de vue des procédures de culture. Un des points fondamentaux est la stérilité des cultures cellulaires. Malgré cela, il arrive parfois qu'elles soient infectées. Une des contaminations les plus courantes sont les mycoplasmes dont les propriétés leur permettent de circuler dans les cultures cellulaires sans se faire repérer. Ces bactéries sans membrane cellulaire, sont non seulement insensibles aux antibiotiques de routine (pénicilline, streptomycine) mais aussi capables de passer à travers les filtres de 0.2 μm . La problématique de ces contaminations est les effets secondaires que les cellules subissent, tels que des changements au niveau du métabolisme, de la croissance cellulaire et du fonctionnement de la cellule, et dans le pire des cas pouvant conduire à la mort cellulaire. Toutes ces modifications auront pour conséquence une dysrégulation du comportement normal de la cellule, aboutissant ainsi à un fausser les résultats.

Le but de ce stage, réalisé au sein du SCK•CEN dans les laboratoires de radiobiologie, sera d'optimiser une méthode d'élimination des mycoplasmes dans les cultures cellulaires contaminées à partir de trois kits d'élimination différents. Pour ce faire, nous allons mettre en culture des cellules d'une lignée cellulaire endothéliale de veine ombilicale humaine EA.hy926. A partir d'une culture infectée par des mycoplasmes (contrôle positif) ou non (contrôle négatif), nous allons tester les trois kits d'élimination utilisant les antibiotiques anti-mycoplasmes suivants : la BM-cycline, le Mycoplasma Removal Agent (MRA) et le Plasmocyne.

Pour contrôler l'efficacité du kit testé, nous allons détecter la présence de contaminations de différentes manières. Tout d'abord, grâce à un kit spécialement conçu pour mettre en évidence les mycoplasmes. Celle-ci se réalise en trois étapes: une extraction de l'ADN, l'amplification de la séquence 16s spécifique aux mycoplasmes par PCR et la révélation du gène amplifié sur un gel d'agarose après électrophorèse.

La deuxième méthode mise à disposition est la détection du contaminant en microscopie à fluorescence. Elle consiste à coupler un fluorochrome à l'ADN cellulaire pour permettre la visualisation au microscope de l'ADN des cellules et des mycoplasmes.

La suite de ce texte présente la comparaison des trois kits d'éliminations cités précédemment pour évaluer leurs modes d'action, leurs spécificités envers les espèces de mycoplasme, leurs prix, leur reproductibilité et efficacité afin de proposer celui qui est le mieux adapté en vue d'éliminer les mycoplasmes dans les culture cellulaires à venir.

THÉORIE

1. La culture cellulaire^{2,3}

La culture cellulaire est un ensemble de techniques incontournables dans la plupart des laboratoires. Cette méthode permet de maintenir en vie des cellules en dehors d'un organisme vivant. Connue aussi sous le nom de culture *in vitro*, elle a pour principe de cultiver les cellules dans des conditions similaires à celles qu'elles connaissent dans l'organisme (conditions physiologiques). Par exemple, les milieux de culture utilisés apportent les nutriments nécessaires aux cellules et un pH approprié. Des additifs sont régulièrement ajoutés au milieu de base comme, par exemple, le sérum fœtal de bœuf (FBS), une source importante de nutriments. Les cellules sont généralement cultivées dans un incubateur, à une température de 37°C et sous une atmosphère humide à teneur de 5% en CO₂ contrôlée. Des conditions strictes d'asepsie doivent être respectées pour éviter d'éventuelles contaminations.

1.1. Histoire de la culture cellulaire

La première culture cellulaire date de 1907, le professeur Ross Harrison utilisa un nerf d'embryon de grenouille dont il observa le développement durant près de quatre semaines. Cinq ans plus tard, le docteur Alexis Carel perfectionne les techniques de culture cellulaire en mettant au point des règles d'hygiène et en s'interrogeant sur les besoins nutritifs des cellules.

En 1951, une lignée cellulaire immortelle humaine est mise en culture par le docteur Georges Gey. C'est la première lignée continue établie à partir de cellules épithéliales humaines, provenant d'une tumeur de cancer du col de l'utérus. La « donneuse » se nommait Henrietta Lacks, d'où l'appellation de cette nouvelle lignée cellulaire : les cellules HeLa. En 1952, Moscona met au point la technique de trypsinisation des cellules, une technique qui permet d'obtenir des cellules isolées capables de se diviser en condition *in vitro*.

² (2) Culture cellulaire de base

³ (3) <http://www.biochimie.umontreal.ca>

1.2. Les avantages et les inconvénients

La culture cellulaire compte de nombreux avantages :

- La population de cellules obtenue sera dans la plupart des cas homogène et stable dans le temps par rapport à un organisme entier.
- La manipulation est plus pratique puisqu'elle se déroule dans des flasques.
- La quantité de cellules pouvant être obtenues est élevée et peut-être atteinte en peu de temps.
- Les conditions de croissances peuvent aussi être contrôlées.
- Le recours à l'expérimentation animale est diminué.

Il existe néanmoins quelques inconvénients à la culture cellulaire :

- Les résultats obtenus ou les observations effectuées ne sont pas toujours transposable aux cellules qui se trouvent dans l'organisme (*in vivo*), pour lesquelles les paramètres mis en jeu sont plus nombreux.
- Les cellules étant en division constante, les risques de problèmes génétiques sont augmentés.
- Les cellules peuvent perdre des fonctions spécifiques qui leurs sont propres.
- Une autre limite de la culture cellulaire est le risque de contamination. Ce dernier problème nous préoccupera d'avantage dans la suite de ce texte.

1.3. Les contaminants dans les cultures cellulaires

En culture cellulaire, les sources de contamination sont nombreuses et très variées. Leurs origines sont chimiques ou biologiques :

Les contaminants chimiques, comme des ions ou des radicaux libres, sont des produits non vivants ayant un effet indésirable sur la culture cellulaire. Leurs sources sont assez nombreuses : ils peuvent provenir du milieu de culture, du sérum ou de l'eau utilisée pour la préparation des échantillons. Certains composants du milieu peuvent produire des radicaux libres nocifs pour les cellules sous l'action de la lumière ou de la chaleur. Un reste de résidus de détergents ou de germicides ou des impuretés dans le CO₂ de l'incubateur peuvent être la source de contamination chimique.

L'autre contamination possible est d'origine biologique. La présence de bactéries, levures ou moisissures peut être facilement détectées à l'œil nu. En effet, leur croissance rapide provoque une turbidité dans le milieu de culture. Leur développement modifie le pH ce qui peut être fatal pour les cellules. La contamination par les mycoplasmes est plus sournoise, cette bactérie extracellulaire est quasi indétectable de par sa petite taille (environ 0,2 μm) et sa flexibilité. Elle a la capacité d'affecter les cellules hôtes dans leurs fonctions, leur croissance, leur métabolisme, leur morphologie ou leur attachement membranaires. Elle cause également des dommages aux chromosomes, pouvant aboutir à la mort des cellules.

La contamination aux mycoplasmes est donc une contrainte biologique importante pouvant remettre en cause la fiabilité des résultats obtenus en culture cellulaire. Il est ainsi essentiel de pouvoir mettre au point des techniques permettant leur détection ainsi que leur éradication. Celles-ci doivent facilement être mises en place et doivent avoir des effets secondaires aussi faibles que possible sur les cellules mises en culture.

2. Les mycoplasmes^{4,5,6}

2.1. Définition

Les mycoplasmes sont des petites bactéries dont la taille avoisine 0,2 μm et qui font partie de la classe des Mollicutes. Ces bactéries en forme de coque sont dépourvues de paroi, ce qui rend leur détermination par la coloration de Gram impossible. Néanmoins, ils sont considérés comme Gram positifs. Les mycoplasmes sont capables d'autoréplication car ils possèdent un génome très simple avec 580 000 paires de bases pour 517 gènes. Cela dit, ils sont obligés de s'associer avec des cellules hôtes animales pour satisfaire leurs besoins en nutriments comme les acides gras et le cholestérol. Comme leur génome est court, ils ne peuvent pas exprimer beaucoup de protéines. De ce fait, les mycoplasmes ne réalisent pas toutes les voies métaboliques et enzymatiques.

⁴ (4)Kesterman N.

⁵ (5)Razin S.

⁶ (6)Cord C., Hans G.

2.2. Étymologie et origine des mycoplasmes

Le mycoplasme est connu depuis 1898 grâce aux travaux de Roux et Nocard. En 1937, le premier cas humain est observé dans un pus de bartholinite par Dienes et Esdall. D'abord appelé Pleuro-Pneulinialike Organism (PPLO), il est rattaché aux Schizomycètes. Ce n'est qu'en 1967 que le mycoplasme est classé dans les bactéries sans parois. Le mycoplasme, qui signifie « cytoplasme mou », appartient à la classe des Mollicutes (Fig. 2), qui comprend les Mycoplasmatales, qui a leur tour englobe la famille des Mycoplasmataceae et le genre *Mycoplasma*.

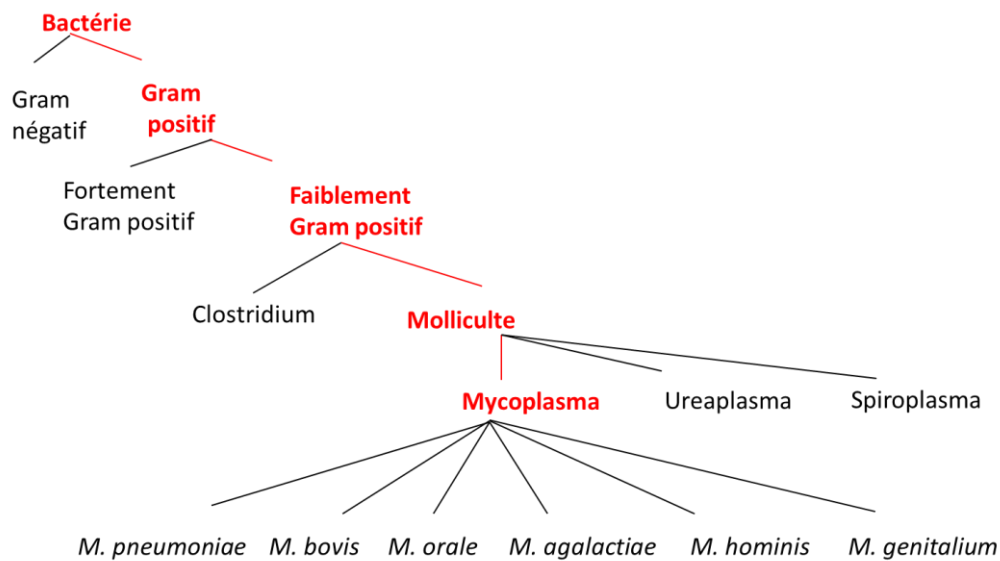


Figure 2 : Arbre phylogénétique du Mycoplasme, la classe des Mollicutes contient les Mycoplasmatales qui comprennent trois familles dont les Mycoplasmataceae avec le genre *Mycoplasma*.

2.3. Propriétés et caractéristiques⁷

Comme dit précédemment, le mycoplasme est une petite bactérie Gram positive et immobile. Il est en forme de coque ou filamenteuse. Ces filaments produisent des ramifications qui lui donnent un aspect de mycélium. L'absence de paroi lui donne une grande plasticité et une résistance aux antibiotiques ciblant la paroi. Le mycoplasme est sensible à la pression osmotique du milieu, au pH, aux variations de température et aux agents tensio-actifs.

Le mycoplasme (Fig. 3) est entouré d'une membrane plasmique composée de trois feuilletts constitués de stérol lui conférant une certaine rigidité, de protéines, de

⁷ (7)Taylor-Robinson D, Bébéar C

polysaccharides et de lipopolysaccharides. Le cytoplasme contient des ribosomes et un ADN filamenteux.

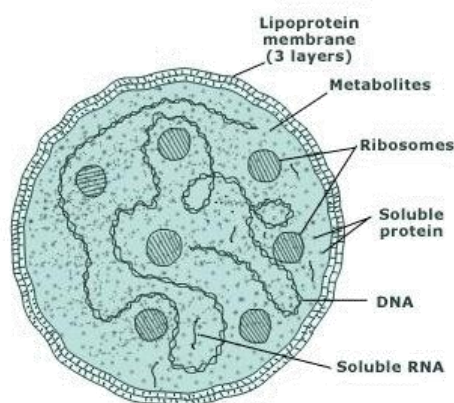


Figure 3 : Structure générale du mycoplasme.

Le mycoplasme est une bactérie Gram positive en forme de coque filamenteuse. Sa membrane plasmique possède de trois feuillettes qui est constitués de stérols, de protéines, de polysaccharides et de lipopolysaccharides. Le cytoplasme est constitué d'un ADN filamenteux, d'ARN, de ribosomes et de protéines solubles.

Le mycoplasme fermente le glucose, hydrolyse l'urée et l'arginine. Sur milieu gélosé, les colonies ont un aspect caractéristique en « œuf sur le plat » (Fig. 4) et leur croissance est lente (7 à 15 jours).

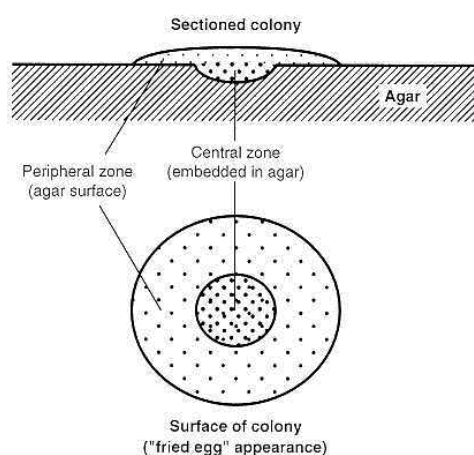


Figure 4 : Forme particulière des colonies de mycoplasme en « œuf sur le plat ». La zone centrale de la colonie se développe en creusant dans la gélose. Les zones périphériques sont en surface de la gélose, ce qui donne un aspect caractéristique aux colonies.

Les mycoplasmes comprennent plus de 250 espèces. Ils sont présents chez les humains ainsi que chez de nombreux animaux comme les oiseaux, les reptiles, les poissons, les mammifères, les insectes et les plantes. Ils peuvent être retrouvés sous forme commensale ou pathogène avec leur espèce hôte.

2.4. Les effets sur les cultures cellulaires

Dans la culture cellulaire, la présence de mycoplasme est un problème majeur. Sa plasticité et sa petite taille lui permet de passer à travers les filtres utilisés usuellement pour stériliser les solutions. Le mycoplasme n'est pas visible au microscope optique, le diagnostic est dans la plupart des cas tardif. Néanmoins, il existe de nombreux signes pouvant nous indiquer que nos cultures contiennent des mycoplasmes.

Les effets néfastes des mycoplasmes sont nombreux. Ceux-ci peuvent altérer le métabolisme cellulaire et induire des aberrations chromosomiques. Ils vont avoir un effet sur la croissance et la morphologie des cellules tout en influençant les mécanismes de transduction du signal. Les mycoplasmes vont provoquer des changements dans la composition membranaire au niveau des antigènes de surface et de l'expression de certains récepteurs. Ils vont interférer avec diverses analyses biochimiques et biologiques. D'autres effets de ce contaminant sont l'augmentation de la propagation des virus et la modulation de l'activité des lymphocytes. Si les cultures ne sont pas traitées rapidement, cela peut aboutir à la mort des cellules.

La source principale de contamination est la flore orale humaine. Les bactéries en suspension dans l'air, le sérum animal, le milieu et les différentes solutions utilisées peuvent facilement contaminer nos cultures. Si nos cultures sont en présence de matériel non stérile ou de cultures contaminées, nos cultures peuvent se contaminer par contamination croisée.

Il existe de nombreuses espèces de mycoplasmes. Les plus fréquemment rencontrés dans les contaminations des cultures cellulaires sont : *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans* et *Mycoplasma hominis*. Ceux-ci font partie de la flore normale de la sphère oropharyngée humaine. Le *Mycoplasma arginini* est d'origine bovine, il est retrouvé comme contaminant lorsque le sérum fœtal de bœuf n'est pas stérile.

3. Les techniques de détection^{8,9}

Il existe de nombreuses techniques pour détecter les mycoplasmes dans les cultures cellulaires. Parmi celle-ci citons certaines : -par colorations histochimiques comme le Giemsa, -la microscopie électronique, -des techniques biochimiques comme des dosages enzymatiques, -des techniques immunologiques comme l'ELISA, -la microscopie à fluorescence, - l'hybridation de l'ARN ou encore la PCR.

La technique de référence pour la détection des mycoplasmes est la culture microbiologique. Les mycoplasmes sont des bactéries exigeantes. Elles nécessitent des milieux complexes, de l'extrait de levure et du cholestérol pour se développer. Le milieu le plus souvent utilisé est le PPLO (Pleuro Pneumonia-Like Organisms). Ce milieu contient de l'extrait de viande, du sérum de cheval, de l'extrait de levure, de l'acétate de sodium et de la pénicilline. Les désavantages de cette technique sont qu'elle n'est pas sensible et que les mycoplasmes poussent très lentement (de 7 à 15 jours).

Les deux techniques de détection utilisées dans le cadre de ce stage, sont la PCR et la microscopie à fluorescence.

3.1. La PCR et l'électrophorèse^{10,11}

La PCR ou technique de polymérisation en chaîne est une suite de réactions qui produit, à partir d'une petite quantité d'ADN, une grande quantité d'une séquence de nucléotides précise d'ADN. La découverte de cette technique a valu un prix Nobel à K.B. Mullis en 1985.

Une PCR se déroule dans un petit tube qui sera placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur porte le tube aux températures voulues pendant la durée du cycle et recommence plusieurs fois le même cycle. Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées déterminées. La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute.

⁸ (8) Cord C. Uphoff, Hans G. Drexler

⁹ (9) C.C., Meyer C, Drexler H.G.

¹⁰ (10) Motte F.

¹¹ (11) Del missier M.

Un cycle PCR se déroule en trois grandes étapes :

1) L'ADN est dénaturé. Pour cela la température monte jusqu'à 95°C, ce qui conduira à la séparation des deux brins d'ADN, nous avons alors de l'ADN simple brin.

2) Les amorces sont hybridées sur l'ADN matrice simple brin à 55°C. Les amorces doivent encadrer le gène d'intérêt à amplifier et servir d'ancrage à l'ADN polymérase.

3) L'ADN est polymérisé, la température remonte à 72°C pour activer la polymérase qui va ajouter les nucléotides complémentaires au brin matrice.

Dans notre cas, le gène d'intérêt est le gène 16S, il s'agit d'un ARN ribosomal couramment utilisé pour identifier les mycoplasmes.

Il est ensuite essentiel de caractériser le gène amplifié, pour cela une migration électrophorétique sur gel d'agarose va être réalisée. Les échantillons, accompagnés d'un marqueur de poids moléculaire, sont déposés en tête du gel. Le kit de détection que nous utilisons (LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit) nous recommande d'appliquer une tension de 100 V durant environ 1 h afin de permettre la séparation des différentes fractions du gène. Un agent fluorescent est ajouté au gel pour qu'après la migration il puisse être lu sous lumière UV. Grâce au marqueur de poids moléculaire, les bandes qui correspondent au contrôle positif et négatif peuvent être visualisées et la contamination aux mycoplasmes caractérisée.

3.2. La microscopie à fluorescence¹²

Les contaminations aux mycoplasmes peuvent également être détectées par microscopie à fluorescence. Pour obtenir une image en microscopie à fluorescence, l'échantillon doit généralement être marqué par un fluorochrome, à moins qu'il ne possède une fluorescence naturelle. La lumière d'excitation de l'échantillon est émise par un laser. La longueur d'onde est sélectionnée à l'aide d'un filtre. Lorsque le fluorochrome contenu dans l'échantillon reçoit cette lumière, ses électrons vont être excités et leur niveau d'énergie va augmenter (Fig. 5). Lorsqu'ils vont retomber à leurs niveaux d'énergie fondamentale, ils vont émettre des photons et donc produire de la fluorescence. La fluorescence produite va être à son tour filtrée pour arriver jusqu'à l'œil de l'observateur qui pourra alors visualiser la structure marquée.

¹² (12) <http://membres-timc.imag.fr>

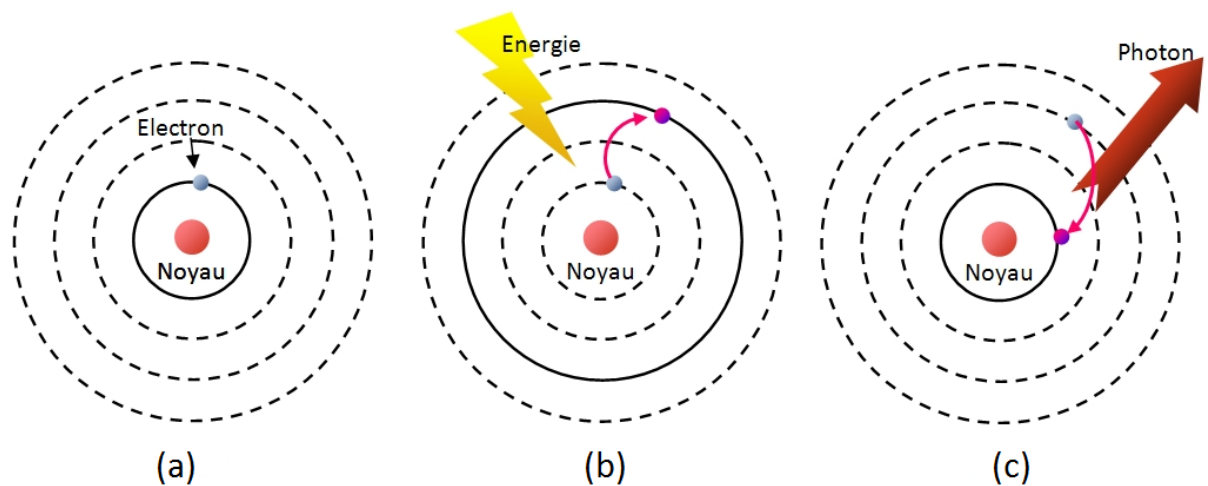


Figure 5 : Schéma d'excitation des électrons.

- (a) L'électron se trouve à son état d'énergie fondamentale.
- (b) L'énergie de la source lumineuse vient exciter l'électron qui monte à un état d'énergie supérieur.
- (c) L'électron retombe à son état d'énergie fondamentale en émettant de la lumière.

3.2.1. Coloration de l'ADN par un fluorochrome¹³

Un fluorochrome est une molécule capable d'émettre de la lumière sous forme de fluorescence lorsqu'il est excité par une source lumineuse.

Le fluorochrome qui sera utilisé est le 4',6-diamidino-2-phenylindole appelé DAPI (Fig. 6). Cette molécule a la capacité de se lier très fortement à l'ADN sur les portions riche en adénine et thymine. La fluorescence émise est de couleur bleue, elle est 20 fois plus intense lorsque le DAPI est lié à l'ADN (Fig. 7). Sa longueur d'onde d'excitation est de 358 nm et celle d'émission est de 461 nm.

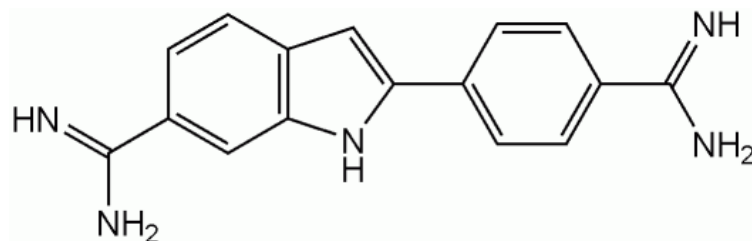


Figure 6 : Molécule de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) qui émet de la fluorescence bleue lorsqu'elle se lie à l'ADN. Sa longueur d'onde d'excitation est de 358 nm et celle d'émission de 461 nm.

¹³ (13) Kapuscinski J.

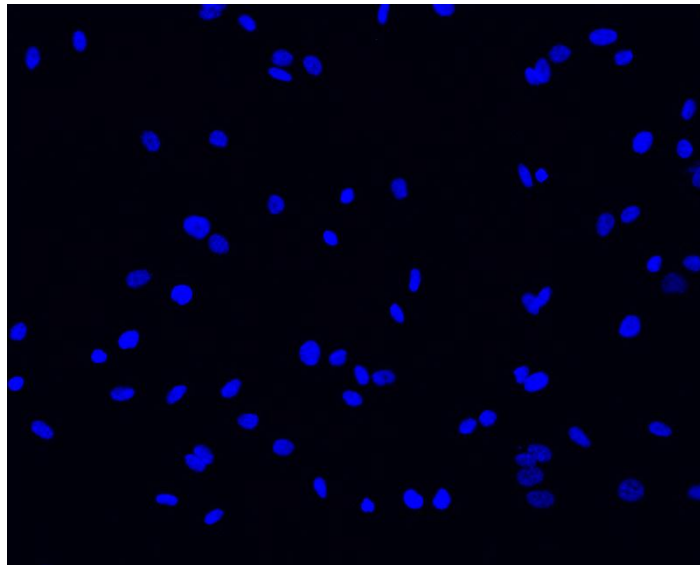


Figure 7 : Coloration DAPI des noyaux de cellules EA.hy 926 non contaminées par des mycoplasmes.
Grossissement 40x.

4. Les techniques d'élimination¹⁴

Les antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines comme la pénicilline n'ont aucun effet sur les mycoplasmes. Les β -lactamines inhibent la synthèse de la paroi des bactéries en se liant au niveau des récepteurs appelés « protéines liant la pénicilline » (PLP). Les PLP sont des protéines qui synthétisent la paroi. Lorsque l'antibiotique se lie aux PLP, la synthèse de la paroi est impossible et la bactérie meurt. Puisque les mycoplasmes n'ont pas de paroi, les antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines n'ont donc aucune action sur ceux-ci.

Il existe toutefois des méthodes pour éliminer les mycoplasmes des cultures cellulaires. Cela peut être fait par:

- Une procédure physique, les échantillons contaminés sont alors traités par la chaleur ou filtrés avec des microfiltres.
- Une procédure chimique comme l'exposition aux détergents, un lavage avec de l'éther chloroforme ou l'incubation avec du polyanéthol sulfonate de sodium.
- Des méthodes immunologiques comme la co-culture avec des macrophages ou avec un antisérum anti-mycoplasme.
- Une technique d'élimination par chimiothérapie qui consiste à éliminer les bactéries à l'aide d'antibiotiques.

¹⁴ (8) Cord C. Uphoff, Hans G. Drexler

La méthode d'élimination que nous avons choisi d'optimiser est celle par chimiothérapie.

Nous allons tester trois kits d'élimination : le MRA (Mycoplasma Removal Agent), le BM cyclin et le Plasmocin. Ces trois kits utilisent des antibiotiques différents pour traiter les cultures infectées. Un antibiotique est une substance chimique synthétisée par des microorganismes et capable de tuer ou d'inhiber la croissance d'agents pathogènes à dose suffisamment que pour ne pas détruire l'organisme hôte.

4.1. MRA (Mycoplasma Removal Agent)^{15,16}

Le kit MRA utilise un antibiotique qui appartient à la famille des quinolones. La molécule est la 4-oxoquinoline-3-carboxylic acid derivative. Les quinolones (Fig. 8) empêchent la gyrase et la topoisomérase de fonctionner correctement, inhibant de ce fait la réplication de l'ADN bactérien. Ces deux enzymes peuvent séparer ou allonger l'ADN circulaire bicaténaire.

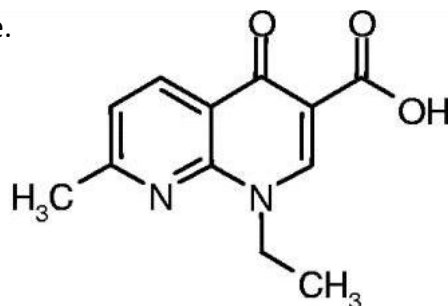


Figure 8 : Molécule de quinolone.

La gyrase est un tétramère composé de deux fois deux sous-unités codant pour les gènes gyrr A et gyrr B. Elle sert à maintenir l'enroulement des hélices de l'ADN, élimine les éventuels nœuds qui pourraient se former dans l'ADN et aide à la formation de la boucle de réplication.

La topoisomérase a la même structure que celle de la gyrase. Son inhibition induit un arrêt de la réplication n'ayant qu'un effet bactériostatique.

¹⁵ (14) www.abdserotec.com

¹⁶ (15) Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X.

Lorsque les quinolones sont additionnées au milieu, la synthèse et le fonctionnement de l'ADN bactérien sont affectés et la mort cellulaire s'en suit.

4.2. BM cyclin^{17,18,19}

Deux antibiotiques sont utilisés dans ce kit: les tétracyclines et les pleuromutilines.

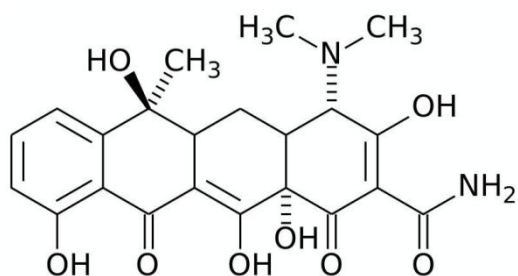


Figure 9 : Molécule de tétracycline.

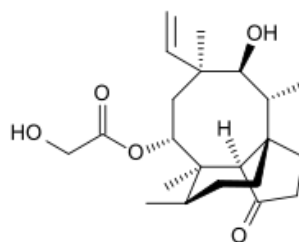


Figure 10 : Molécule de pleuromutiline.

La tétracycline (Fig. 9) se fixe sur la sous-unité 30S du ribosome (Fig. 11) à proximité du site A. Cela empêche la fixation de nouveaux ARNt, avec pour conséquence d'arrêter l'élongation et donc la synthèse de protéines.

La pleuromutiline (Fig. 10) agit également au niveau de la synthèse des protéines en se fixant à la sous-unité 50S du ribosome (Fig. 11).

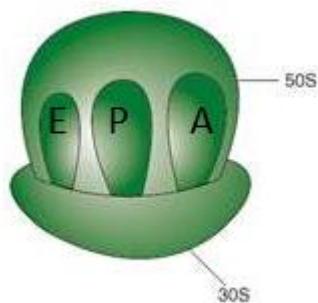


Figure 11 : Schéma du ribosome, la grande sous-unité contient les sites A, P et E et la région 50S et la petite sous-unité la région 30S.

¹⁷ (16) www.roche-applied-science.com

¹⁸ (17) V Gopalkrishna, H Verma, NS Kumbhar, RS Tomar, PR Patil

¹⁹ (18) KatherineS., et al

4.3. Plasmocin^{20,21}

Les antibiotiques utilisés dans ce kit sont une combinaison de macrolides et de quinolones.

Les macrolides (Fig. 12) ont pour mode d'action de se lier à la sous-unité 50S du ribosome (Fig. 11), ce qui a pour conséquence d'inhiber la synthèse protéique.

Les quinolones (Fig. 8) vont, comme vu précédemment, inhiber la synthèse de l'ADN.

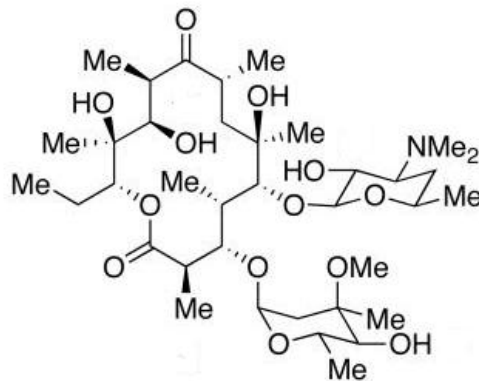


Figure 12 : Molécule de macrolide.

5. Prévention contre les mycoplasmes²²

Même s'il existe des méthodes d'éliminations des mycoplasmes, cela ne nous dispense pas des bonnes pratiques de laboratoire. De plus l'utilisation excessive d'antibiotiques favorise le développement de mécanismes de résistance chez les bactéries. Il est donc important de limiter au maximum les contaminations. La prévention se fait au niveau du technicien, de l'infrastructure dédiée à la culture cellulaire et du matériel nécessaire à la culture cellulaire.

Le technicien doit être formé pour la culture cellulaire, connaître les bonnes pratiques ainsi que les règles d'hygiène à respecter. Il doit se laver soigneusement les mains avant et après avoir manipulé. Le port d'un tablier fermé et de gants est obligatoire. Il devra régulièrement se laver les mains à l'éthanol à 70%.

²⁰ (19) www.invivogen.com

²¹ (20) Tulkens P., Spinewine A.

²²(21) www.bionique.com

Il est conseillé de dédier une partie du laboratoire à la culture cellulaire. Les personnes non autorisées ne doivent pas circuler inutilement dans la salle de culture. Les animaux de laboratoire ne doivent pas se trouver dans cette pièce. Bien évidemment, dans cet endroit tout doit être gardé propre et rangé.

Le matériel mis à disposition doit être stérile. L'utilisation de la hotte à flux laminaire doit se faire correctement tout en respectant les règles d'asepsie. Il convient de nettoyer soigneusement la surface de travail de la hotte avant et après manipulation. Les incubateurs et les bains-marie peuvent être une cause de contamination, il est donc impératif de les nettoyer régulièrement. Lorsque de nouvelles lignées cellulaires arrivent au laboratoire, il vaut mieux les isoler et les tester pour vérifier l'absence de contaminants. Les lignées cellulaires sont aussi testées tous les 6 mois, afin de vérifier l'absence de mycoplasmes.

Si malgré toutes ces précautions il arrive que des cultures soient contaminées par des mycoplasmes, il est conseillé de les isoler des autres cultures et de les traiter contre les mycoplasmes ou le cas échéant les détruire.

MATÉRIEL ET

MÉTHODES

6. MATÉRIEL

6.1. Hotte à flux laminaire²³

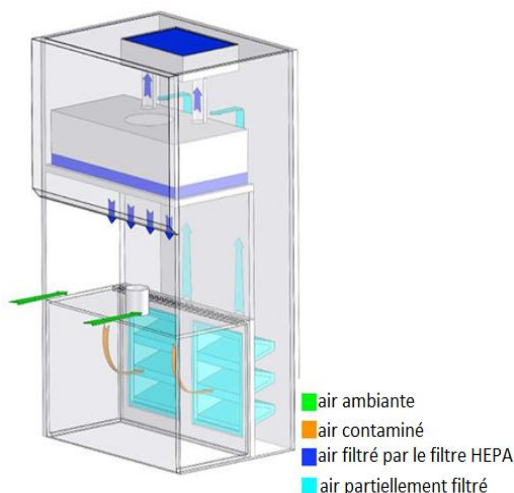


Figure 13 : Hotte à flux laminaire.

La hotte à flux laminaire (Fig. 13) est conçue pour assurer la stérilité des cultures cellulaires ou d'autres manipulations qui nécessitent une certaine stérilité. L'air envoyé dans la hotte est purifié grâce à un filtre HEPA (High Efficiency Particulate Air), qui a la capacité de retenir des particules d'un diamètre de 0.3 μm avec un taux d'efficacité de 99,97%, et les éventuelles particules en suspension sont évacuées immédiatement par le flux d'air. Ce flux d'air pur assure une grande stérilité dans la hotte et protège l'opérateur.

6.2. L'hémocytomètre de Neubauer²⁴

L'hémocytomètre de Neubauer (Fig. 14) est une chambre de comptage, sur laquelle est gravé un réseau qui permet le comptage cellulaire. Nous allons compter nos cellules dans les cinq carrés (Fig. 15) qui forment une croix au centre du réseau afin d'avoir une moyenne. Chaque carré a un volume de 0,1 μl (1 mm x 1 mm x 0.1 mm).

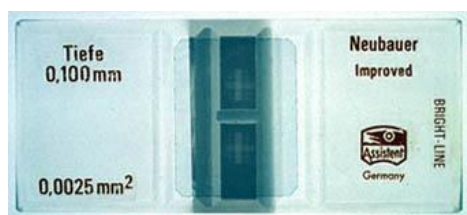


Figure 14: Hémocytomètre de Neubauer.

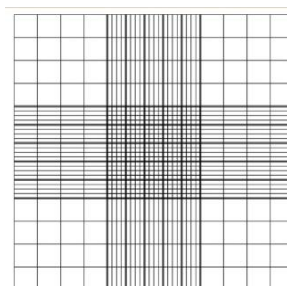


Figure 15 : Réseau de comptage dans l'hémocytomètre.

²³ (22) Biosécurité et normes GMP

²⁴ (23) <http://e-learning.studmed.unibe.ch>

Pour connaître la concentration en cellule, il existe la formule suivante :

$$\text{Concentration cellulaire} = N \times f \times 10\,000$$

Où N est la moyenne des cellules comptées dans les 5 carrés, f est le facteur de dilution, 10 000 correspond au volume d'un carré qui est de 0,1 μl (il y a un facteur de 10 000 pour avoir la concentration dans 1 ml).

6.3. Microscope à contraste de phase^{25,26}

Grâce au microscope à contraste de phase (Fig. 16), nous pouvons observer des cellules vivantes mais aussi certains microorganismes, sans qu'ils soient préalablement colorés, évitant ainsi l'utilisation de certains colorants qui sont très nocifs pour les cellules.



Figure 16 : Microscope à contraste de phase.

L'instrument comporte deux parties importantes,

l'anneau de phase et la plaque de phase (Fig. 17). Dans le condenseur se trouve l'anneau de phase et dans l'objectif la plaque de phase. L'anneau de phase va créer une lumière qui va être en partie absorbée par la partie opaque de l'anneau de phase et qui va envoyer les faisceaux lumineux non absorbés de manière parallèle vers l'échantillon. Ces faisceaux lumineux seront alors diffractés lorsqu'ils vont rencontrer la cellule et de ce fait se déphaser d'un quart de longueur d'onde. Les faisceaux de lumière ne rencontrant pas de cellules (équivalent au pourtour de la cellule) ne seront donc pas déphasés. Ces derniers seront déphasés, par la plaque de phase, d'un quart de longueur d'onde et vont également subir une diminution de leur amplitude. Lorsque les deux types de faisceaux lumineux se superposent, la résultante du déphasage est de $\lambda/2$ et est accompagnée d'une diminution d'amplitude. Ce sont ces deux facteurs qui permettent alors de visualiser à l'œil nu le contraste.

²⁵(12) <http://membres-timc.imag.fr>

²⁶(24) Davidson M. W., Abramowitz M.

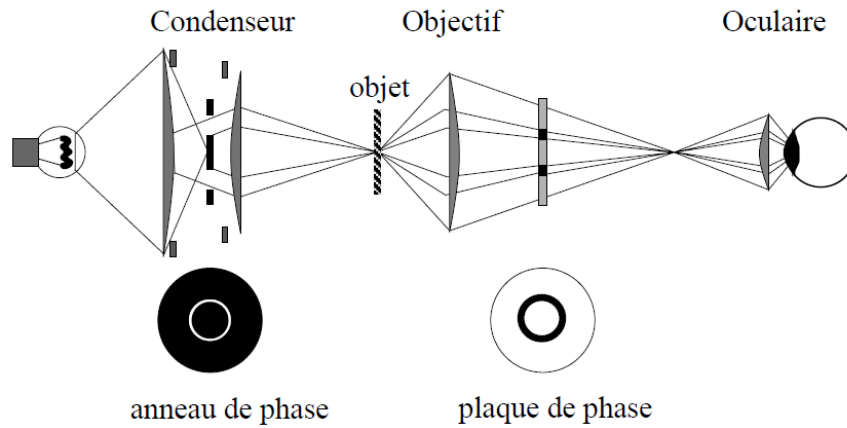


Figure 17 : Dispositif du microscope à contraste de phase.

6.4. Microscope à fluorescence^{27,28}

Le microscope à fluorescence (Fig. 18) permet d'observer la fluorescence dans les cellules. Cette fluorescence peut être soit naturelle soit provenir d'un fluorochrome couplé à la partie de la cellule que l'on souhaite observer. Ces fluorochromes absorbent des faibles longueurs d'onde (bleu, UV) pour réémettre à des plus grandes longueurs d'onde (spectre visible).



Figure 18: Microscope à fluorescence.

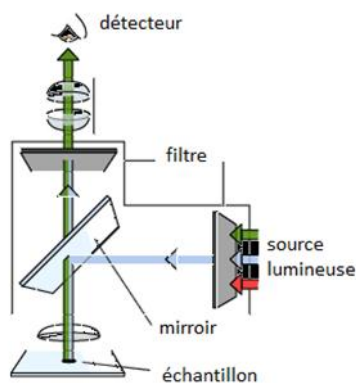


Figure 19: Dispositif du microscope à fluorescence.

La source lumineuse (Fig. 19) va émettre de la lumière. Une longueur d'onde spécifique de cette lumière sera filtrée grâce à un filtre d'excitation. Cette longueur d'onde est sélectionnée en fonction du fluorochrome que l'on désire exciter. Les électrons alors excités vont se désexciter en émettant de la lumière. Cette lumière sera alors filtrée afin d'avoir une seule longueur d'onde d'émission. C'est celle-ci qui sera visualisée par l'observateur.

²⁷ (12) <http://membres-timc.imag.fr>

²⁸ (24) Davidson M. W., Abramowitz M

7. MÉTHODES

7.1. La culture cellulaire^{29,30}

La culture cellulaire a été mise au point vers le début des années 50'. Aujourd'hui, la plupart des laboratoires scientifiques utilisent cet outil essentiel. Cette technique permet de maintenir *in vitro* des cellules vivantes dissociées, capables de se diviser et d'exprimer des propriétés spécifiques. Pour que les cellules se divisent sans problèmes, nous devons recréer les mêmes conditions que celles qu'elles retrouvent dans le corps humain comme la température, le pH, un bon apport nutritif et surtout une certaine stérilité. Nous allons utiliser le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de FBS (sérum foetal de bœuf) qui est un élément nutritif pour mettre nos cellules en culture. La lignée cellulaire mise en culture est une lignée cellulaire endothéliale de veine ombilicale humaine EA.hy926 immortalisée. Ces cellules ont été obtenues par la fusion de cellules EA.hy926 et de cellules cancéreuses A549 exposées à du polyéthylène glycol.

7.1.1. Utilisation de la hotte à flux laminaire

- Porter un tablier propre et des gants en latex.
- Mettre en route la ventilation.
- Allumer la lumière.
- Remonter la vitre de protection jusqu'à la flèche bleue.
- Eteindre l'alarme.
- Se laver régulièrement les mains avec de l'éthanol à 70%.
- Laver toute la surface de la hotte avec de l'umonium et laisser agir 2 à 5 minutes, ensuite essuyer avec un essuie propre (cette opération se fait chaque matin et soir).
- Nettoyer la surface de la hotte avec de l'éthanol à 70% entre chaque manipulation (dans le cas où les cellules sont infectées aux mycoplasmes, cette étape est remplacée par un nettoyage à l'umonium).
- Répéter les étapes précédentes pour la fermeture/arrêt du flux laminaire

²⁹ (25) www.atcc.org

³⁰ (26) Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB.

NB :

- Lors des manipulations, éviter de passer au-dessus des objets présents dans la hotte, cela perturberait le flux et donc une bonne stérilité ne sera plus assurée.
- Nettoyer tout ce qui entre dans la hotte avec de l'umonium.

7.1.2. Préparation du milieu DMEM +10% FBS

- Mettre le FBS dans le bain-marie à 37°C afin de le décongeler.
- Préparer le milieu de culture à 10% en FBS, pour cela prélever 50 ml des 500 ml de milieu et ajouter les 50 ml de FBS décongelé.
- Noter sur la bouteille ce qui est ajouté au milieu (10% FBS), date, initiales et noter si c'est un milieu pour des cellules contaminées avec mycoplasme ou pas.
- Placer la bouteille au frigo.

NB :

- Cela se fait sous hotte, il faut donc respecter toutes les règles de stérilité.
- L'ajout d'antibiotiques (tel que la pénicilline/streptomycine) n'est pas effectué car il a pour effet de dissimuler la présence de mycoplasme sans pour autant les éliminer, et d'interférer ainsi avec les futures expériences.

7.1.3. Décongélation des cellules

- Sortir le cryotube de l'azote gazeux (porter des gants et des lunettes de protection) et le placer dans le bain-marie à 37°C.
- Veiller à respecter le temps précis car le cryotube contient du diméthylsulfoxyde (DMSO) qui est un cryoconservateur mais qui peut être également nocif pour les cellules.
- Nettoyer la surface de la hotte avec de l'éthanol à 70% et nettoyer tout ce qui entre dans la hotte avec de l'umonium.

- Mettre 5 ml de milieu (DMEM+ 10% FBS) dans un tube à centrifuger de 15 ml (les 5 ml de milieu vont diluer le DMSO) et y transférer les cellules du cryotube lorsqu'elles sont décongelées.
- Centrifuger à 350 g durant 5 minutes.
- Pendant ce temps, préparer une flasque avec du milieu (grande flasque (T175) 15 ml, moyenne (T75) 10 ml, petite (T25) 5 ml). Il est important que le milieu recouvre toute la surface de la flasque.
- Après centrifugation sous hotte, éliminer le surnageant dans la bouteille à déchets biologiques, récupérer le culot de cellules avec 1 ml de milieu par refoulement et le placer dans la flasque contenant le milieu et homogénéiser.
- Noter sur la flasque la lignée cellulaire, le numéro de passage, la date et les initiales et la présence éventuelle de mycoplasme.
- S'assurer que les cellules soient bien présentes dans la flasque grâce au microscope à contraste de phase et placer la flasque dans l'incubateur à 37°C (incubateur différent si la culture est infectée par des mycoplasmes).
- Nettoyer la hotte et éteindre le microscope.
- Se laver les mains.

7.1.4. Passage des cellules

- Nettoyer la surface de la hotte avec de l'éthanol à 70% et nettoyer tout ce qui entre dans la hotte avec de l'umonium.
- Sous hotte, éliminer le milieu de la flasque contenant la culture cellulaire dans la bouteille à déchets biologiques se trouvant sous la hotte.
- A l'aide d'une pipette, mettre 5 ml de PBS (tampon phosphate salin) dans la flasque afin d'éliminer totalement le milieu, homogénéiser et jeter le PBS.
- Ajouter la trypsine (5 ml pour les grandes flasques (T175), 2.5 ml pour les moyenne (T75) et 1 ml pour les petites (T25)) et la laisser agir dans l'incubateur durant 5 minutes.

- Ajouter la même quantité de milieu que celle ajoutée en trypsine, homogénéiser par refoulement, récupérer le tout dans un flacon de 15 ml et centrifuger 5 min à 350 g.
- Préparer une flasque plus grande que celle de départ avec la quantité de milieu adéquate.
- Récupérer le tube de la centrifugeuse, vider le surnageant dans la poubelle, récupérer le culot de cellules avec 2 ml de milieu par refoulement, déverser les cellules dans la nouvelle flasque.
- Vérifier la présence de cellules au microscope et incuber à 37°C.
- Nettoyer la hotte à l'éthanol à 70%.
- Se laver les mains.

Rôle de la trypsine³¹ :

La trypsine est une endopeptidase produite par le pancréas des mammifères, elle a un pH optimal de 8 et une température optimale de 37°C. Elle clive principalement au niveau C-terminal de l'extrémité amine de la lysine et de l'arginine, sauf lorsque suit une proline. Les cellules étant adhérentes pas liaison peptidique, la trypsine sert à détacher les cellules du support dans lequel elles sont mises en culture et à les séparer entre elles. La trypsine est inhibée avec un même volume de milieu que celui ajouté en trypsine, celui-ci a été additionné de FBS qui contient énormément de protéines et donc la trypsine va s'attaquer d'avantage aux protéines du FBS qu'à celles des cellules.

7.1.5. Comptage cellulaire

- La préparation de la solution de comptage se faisant sous hotte, il faut respecter toute les règles de stérilité.
- Trypsiniser les cellules comme décrit dans le protocole pour le passage cellulaire (7.2.2.).
- Remettre le culot, en suspension avec 1 ml de milieu (DMEM +10% FBS).

³¹ (27) www.carlroth.com

- Selon la taille du culot réaliser la dilution 1/10 (90 µl de milieu et 10 µl de la suspension cellulaire) ou 1/100 (990 µl de milieu et 10 µl de la suspension cellulaire) pour réaliser la solution de comptage.
- Préparer l'hémocytomètre de Neubauer qui servira pour le comptage : humidifier les bords de l'hémocytomètre avec un papier humide, déposer la lamelle sur ces mêmes bords et laisser sécher.
- Prélever 15 µl de la solution de comptage, les déposer sous la lamelle et compter les cellules dans 5 carrés au microscope.

7.2. Méthodes de détection des mycoplasmes

Comme dit précédemment, les mycoplasmes peuvent causer de graves problèmes. C'est pourquoi il est important de pouvoir détecter leur présence dans nos cultures cellulaires. Il existe plusieurs méthodes, celle que nous avons choisie est la détection par PCR et par microscopie à fluorescence. La PCR est une méthode très sensible qui complète la détection par microscopie à fluorescence.

7.2.1. Préparation des échantillons pour le marquage de l'ADN (microscopie à fluorescence)

- Une fois le comptage réalisé à l'aide de l'hémocytomètre de Neubauer, calculer le volume de solution nécessaire afin que chaque puits contienne 500 µl de solution et 100 000 cellules.
- De façon stérile sous la hotte pour éviter les contaminations lors de la préparation des échantillons, déposer dans chaque puits une lamelle ronde couvre-objet et ajouter ensuite 500 µl de solution dans chaque puits.
- Mettre les cellules 24 h dans l'incubateur afin que les cellules puissent adhérer au support.
- Il n'est plus nécessaire de travailler en condition stérile puisqu'après l'incubation, les cellules fixées seront montées sur lames.
- Eliminer le surnageant de chaque puits, ajouter 500 µl de PBS et mettre 10 min sur l'agitateur.

- Eliminer le PBS et recommencer le lavage.
- Ajouter 400 μ l de PFA 4% (paraformaldéhyde) dans chaque puits afin de fixer les cellules.
- Incuber 30 min au frigo à 4 °C.
- Laver deux fois au PBS comme précédemment et ensuite laver à l'eau MilliQ.
- Sortir les lamelles couvre-objet rondes des puits, les égoutter délicatement sur un papier absorbant et les y déposer avec le côté portant les cellules vers le haut. Les cellules se trouvent sur la face brillante de la lamelle (face vers le haut dans les puits).
- A partir de cette étape, travailler dans l'obscurité car le DAPI (diamidino-2-phenylindole) est photosensible. Cette molécule absorbe à une longueur d'onde de 341nm et émet à 452nm.
- Déposer 30 μ l de solution de montage qui contient le DAPI sur chaque lamelle et mettre la lame par-dessus, enlever le surplus de solution (Fig. 20).

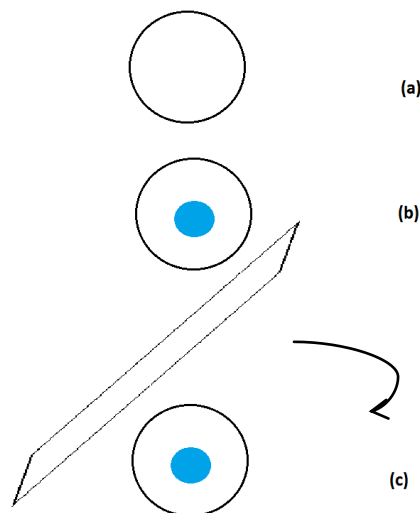


Figure 20 : Montage des lames pour la coloration DAPI
(a) Lamelles où se trouvent les cellules.
(b) Déposer 30 μ l de solution de montage qui contient le DAPI.
(c) Recouvrir avec la lame.

- Sceller la lame et la lamelle avec du vernis à ongles.
- Ranger les lames au frigo à 4 °C.

7.2.2. Extraction d'ADN (kit Roche)³²

7.2.2.1. Principe

Nous allons libérer l'ADN contenu dans les mycoplasmes par une extraction d'ADN. Cette étape va servir à faciliter la PCR qui est l'étape suivante de la détection des mycoplasmes.

Nous allons commencer par une lyse cellulaire, ensuite nous allons éliminer les protéines du milieu et enfin précipiter l'ADN grâce à l'isopropanol pour pouvoir le récupérer.

7.2.2.2. Protocole

- Préparation des échantillons : prélever 3 ml de milieu de culture de chaque culture cellulaire. Celles-ci doivent être à confluence et cultivées sans antibiotiques. Si l'extraction ne se fait pas tout de suite, congeler les échantillons après les avoir étiquetés.
- Centrifuger les tubes contenant les 3 ml de milieu décongelé, durant 10 min à 4000 g, afin d'avoir un culot de cellules.
- Vider soigneusement le surnageant, laver le culot avec 200 µl de PBS et récupérer le tout dans un tube Eppendorf.
- Centrifuger à nouveau et éliminer le surnageant.
- Ajouter 25 µl de tampon de lyse et 5 µl de protéinase K, vortexer et incuber 1 h à 56°C.
- Ajouter 25 µl de binding buffer et incuber 10 min à 70°C.
- Ajouter 12,5 µl d'isopropanol et vortexer.
- Préparer les tubes collecteurs avec leurs filtres et déposer les échantillons sur les filtres.
- Centrifuger 1 min à 8000 g.

³² (28) www.roche-applied-science.com

- Placer les filtres dans de nouveaux tubes collecteurs (vérifier que toute la solution se retrouve dans le tube collecteur) et ajouter 200 µl d' « hibitor removal buffer » sur les filtres.
- Centrifuger 1 min à 8000 g.
- Placer les filtres dans de nouveaux tubes collecteurs, ajouter 200 µl de « washing buffer » sur le filtre et centrifuger 1 min à 8000 g. Répéter deux fois ce lavage.
- Placer les filtres dans de nouveaux tubes collecteurs et centrifuger à grande vitesse durant 1 min à 13000 g afin d'éliminer totalement le washing buffer.
- Placer les filtres dans des tubes Eppendorf, ajouter sur le filtre 50 µl de tampon d'élution pré-incubé à 70 °C, laisser 1 min à température ambiante et centrifuger 1 min à 13000 g.
- Veiller à ce que tout le liquide contenant l'ADN extrait se retrouve bien dans l'Eppendorf et jeter le filtre.
- Congeler les échantillons si la PCR ne se réalise pas tout de suite.

7.2.3. La PCR (LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit)^{33,34}

7.2.3.1. Principe

Cette technique permet d'amplifier un fragment de gène précis à partir d'une très petite quantité d'ADN. La PCR se fait en trois étapes:

La dénaturation qui consiste à séparer les deux brins d'ADN. Cette étape se fait à haute température (94°C), car à cette température les liaisons hydrogène entre les bases sont rompues et l'ADN se retrouve séparé en ses deux brins.

L'hybridation des amorces au niveau de la séquence que l'on souhaite amplifier. La température redescend (55°C) pour permettre l'hybridation. L'ADN polymérase va pouvoir se fixer aux amorces et synthétiser l'ADN.

³³ (29) Paige L. Dobrovolny, Dan Bess

³⁴ (30) www.sigmaldrich.com

La polymérisation de l'ADN. La température remonte (72°C) pour permettre à l'ADN polymérase d'ajouter les nucléotides complémentaires au brin matrice.

Ces trois étapes constituent un cycle, ce cycle est répété autant de fois que nécessaire. A la fin de la PCR notre séquence d'intérêt est amplifiée et peut être visualisée sur gel d'agarose après électrophorèse.

7.2.3.2. Protocole de la PCR

- Le kit comprend les tubes contenant le mix réactionnels (les amorces, les dNTP, le contrôle interne et le tampon de chargement) et les tubes de contrôles positifs lyophilisés. Il faut donc les réhydrater avec le « Rehydratation Buffer ».
- Déterminer la quantité d'ADN polymérase (0,5 µl par échantillon) et de « Rehydratation Buffer » (23 µl par échantillon) nécessaire pour la réaction en tenant compte des contrôles et de volume mort.
- Remplir les tubes de réactions selon le tableau suivant (table 1)

Table 1: Volume nécessaire de réactif pour chaque tube.

	Sample	Positive Control	Negative Control
DNA Polymerase/ Rehydration Buffer	23 µL	25 µL	23 µL
Sample Volume	2 µL		
DNA-free Water			2 µL

NB : Ne plus vortexer les tubes, juste les cliqueter avec les doigts.

- Laisser 5 min à température ambiante.
- Mettre les tubes dans le thermocycleur et programmer les cycles suivants :

1 cycle 94 °C pendant 2 minutes

40 cycles 94 °C pendant 30 secondes

 55 °C pendant 30 secondes

 72 °C pendant 40 secondes

Refroidir jusqu'à 4-8 °C

- Pendant ce temps préparer le gel d'agarose à 1.2%. Pour cela, peser 1.2 g d'agarose et ajouter 100 ml de TBE (Tris Borate EDTA). Faire chauffer au four à micro-ondes et ajouter 10 µl de gel red (pour que le gel soit concentré à 1/10)
- Couler le gel dans la cuve et y déposer le peigne. Laisser polymériser 30 min.
- Lorsque la PCR est terminée et que le gel a polymérisé, enlever le peigne et déposer dans chaque puits 8 µl d'échantillon, le marqueur de poids moléculaire et les contrôles positifs et négatifs.
- Faire migrer les dépôts une heure à 100 V.
- Interpréter le gel.

7.3. Méthodes d'élimination des mycoplasmes

Une fois les mycoplasmes détectés il va falloir les éliminer des cultures cellulaires. Nous avons choisi la méthode d'élimination à l'aide d'antibiotique. Les kits que nous allons tester et comparer au cours de ce stage sont les kits BM-Cycline (Roche), Plasmocine (InvivoGen) et Mycoplasma Removal Agent (MP Biomedicals).

7.3.1. Le kit MRA (Mycoplasma Removal Agent)

Le 4-oxo-quinoline-3-carboxylic qui fait partie des quinolones est l'antibiotique utilisé par ce kit. Sa concentration de départ est de 50 µg/ml. La concentration recommandée est de 0,5 µg/ml pour les flasques T25 que nous utilisons.

Comme pour les autres kits, il faudra renouveler le milieu tous les deux jours et passer et compter les cellules une fois par semaines.

7.3.2. Le kit BM-Cyclin

Ce kit contient deux antibiotiques lyophilisés à deux concentrations différentes. Lorsque ceux-ci sont reconstitués avec de l'eau stérile, la BM-Cycline 1 qui contient la pleuromutiline a une concentration de 2,5 mg/ml et la BM-Cycline 2, qui contient la tétracycline, a une concentration de 1,25 mg/ml.

Le protocole du kit nous indique que la concentration doit être de 10 µg/ml de BM-Cycline 1 et de 5 µg/ml de BM-Cycline 2 pour chaque flasque.

Les cellules doivent incuber 3 jours avec la BM-Cycline 1 et ensuite 4 jours avec la BM-Cycline 2. Une fois par semaine, il est essentiel de passer les cellules et de les compter afin de garder un nombre constant de cellules dans les flasques.

7.3.3. Le kit Plasmocin

Les antibiotiques qu'utilise ce kit sont une combinaison d'antibiotiques appartenant à la famille des macrolides et à celle des quinolones. La solution de stock est concentrée à 25 mg/ml. Il est recommandé d'utiliser une concentration de 25 µg/ml pour traiter les cellules infectées par des mycoplasmes.

Le milieu doit être renouvelé tous les deux jours afin que les cellules disposent d'assez de nutriments. Une fois par semaine, un passage et un comptage doivent être réalisés.

7.3.3.1. Préparation expérimentale

Des flasques de culture vont être traités aux antibiotiques pendant une à cinq semaines afin d'évaluer la cinétique (1, 2, 3, 4, 5 semaines de traitement) l'efficacité de ceux-ci. Nous utiliserons 36 flasques de cultures. Chaque antibiotique traite une série de 3 flasques par semaine. Le planning de ces 5 semaines d'analyse (Fig 21) se déroule comme suit :

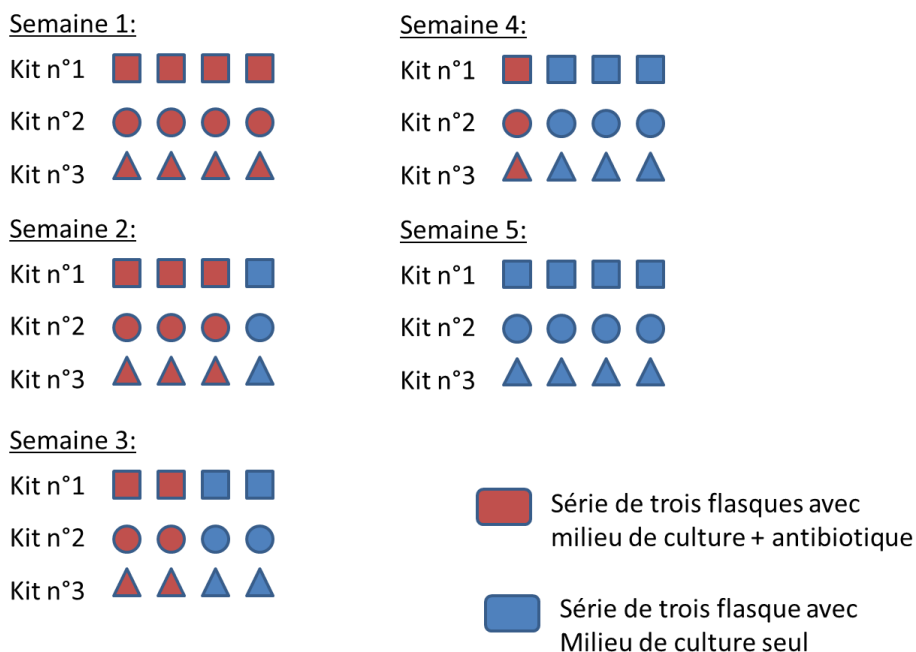


Figure 21 : Planning des 5 semaines de test.

Les flasques utilisées sont des T25, chacune d'elles contient 5 ml de milieu et 200 000 cellules. Chaque semaine, le surnageant des cultures dont le traitement aux antibiotiques est arrêté est récupéré afin de tester la présence de mycoplasme par PCR. Les cellules sont gardées et cultivées avec du milieu sans antibiotique. Nous pourrions ainsi tester l'efficacité des kits et vérifier si les mycoplasmes réapparaissent.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Au cours de ce stage nous avons tenté de mettre au point une technique d'élimination des mycoplasmes dans les cultures cellulaires. Pour cela, nous avons mis en culture des cellules de la lignée endothéliale ombilicale humaine, les cellules Ea.hy926. Une partie des cellules proviennent de la firme ATCC (American Type Culture Collection) et ne sont pas contaminées par les mycoplasmes. L'autre partie des cultures sont des cellules qui ont été testées positives aux mycoplasmes dans le laboratoire et gardées pour servir de contrôle positif à nos expériences. Chaque culture est incubée dans des étuves différentes et les milieux de cultures sont également dans des bouteilles différentes afin d'éviter les contaminations croisées. Les méthodes de détection des mycoplasmes qui ont été choisies sont la microscopie à fluorescence et la PCR. La microscopie à contraste de phase nous permet d'observer la morphologie et le nombre de cellules. La coloration DAPI qui est un fluorochrome qui se fixe spécifiquement à l'ADN permet d'observer, par microscopie à fluorescence, l'évolution de la concentration en mycoplasmes dans nos cultures. La PCR est une méthode sensible de détection des mycoplasmes. Il existe plusieurs méthodes d'élimination, nous avons choisi la chimiothérapie qui est une méthode de décontamination à l'aide d'antibiotiques. L'efficacité de trois kits utilisant des antibiotiques différents (BM cycline, Mycoplasma Removal Agent (MRA) et Plasmocin) a été testée durant 5 semaines.

8. Identification microbiologique

Afin de déterminer l'espèce de mycoplasme qui contamine nos cultures, un échantillon a été envoyé à la firme BaseClear (Pays-Bas), indépendante et accréditée sur la recherche à partir de l'ADN.

La firme propose l'identification microbiologique de 25 espèces de mycoplasme. L'identification de l'espèce de mycoplasme est faite par séquençage. L'ADN bactérien est extrait et purifié, ensuite la portion de gène 16S est amplifiée par PCR.

8.1. Résultat

Le rapport fourni par BaseClear nous montre que le mycoplasme qui contamine nos cultures est le *Mycoplasma orale*. La concordance est de 100% (Table 2) et comme nous l'indique les critères de fiabilité, fournis par BaseClear, cette identification est fiable jusqu'à l'espèce de mycoplasme.

Table 2 : Tableau des résultats et critères de fiabilité fournis par BaseClear.

% de concordance *	Espèce de mycoplasme
100%	<i>Mycoplasma orale</i>
95.66%	<i>Mycoplasma salivarum</i>
92.53%	<i>Mycoplasma arthritidis</i>
91.70%	<i>Mycoplasma hominis</i>
90.15%	<i>Mycoplasma arginini</i>

*% concordance > 99.00% identification fiable jusqu'au niveau de l'espèce
% concordance > 99.00% à 98.99% identification fiable jusqu'au niveau du genre
% concordance > 96.99% identification fiable jusqu'au niveau de la famille

9. Culture d'une lignée contaminée et d'une lignée non contaminée

Des cellules Ea.hy926 de la lignée ombilicale humaine ont été mises en culture. Une partie des cellules sont contaminées par des mycoplasmes, ces cellules serviront de contrôle positif. Une autre partie n'est pas contaminée et servira de contrôle négatif.

9.1. Microscopie à contraste de phase

Des photos des différentes étapes de la croissance cellulaire des flasques contaminées et non contaminées ont été réalisées au microscope à contraste de phase. Les flasques utilisées sont des T25 et chacune contient au départ environ 200 000 cellules qui se divisent au fil des jours.

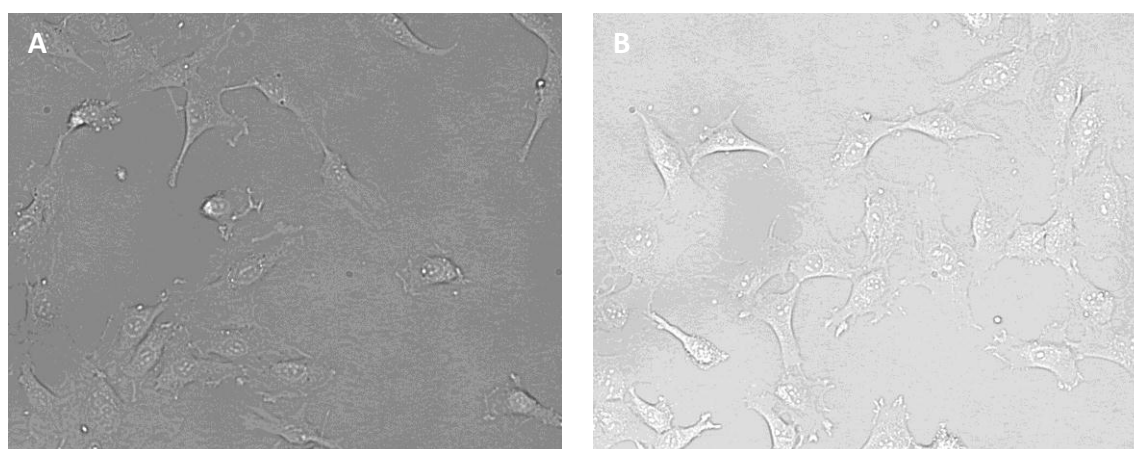


Figure 22 : Cellules EA.hy926 après 3 jours de cultures. A : non contaminées aux mycoplasmes.
B : contaminées aux mycoplasmes. Grossissement 40X

Après 3 jours de culture (Fig. 22 A et B), nous pouvons voir que les cellules ont adhéré au support et aucune différence structurale n'est visible entre les cultures contaminées et non contaminées.

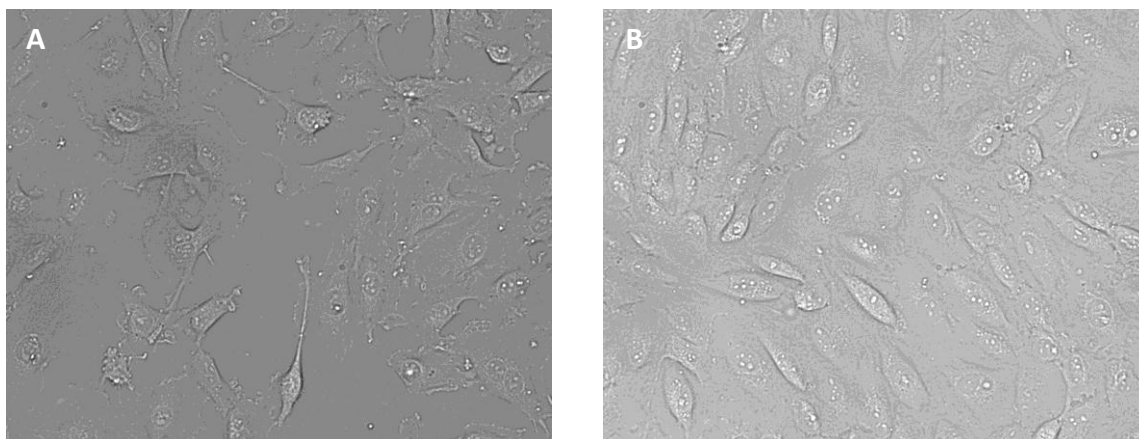


Figure 23 : Cellules EA.hy926 après 5 jours de culture. A : non contaminées après par les mycoplasmes. B: contaminée par les mycoplasmes. Grossissement 40X

Après 5 jours de culture (Fig. 23A), nous pouvons voir que la concentration cellulaire dans la flasque non contaminée est moins importante que dans celle contaminée (Fig. 23B). L'une des pistes pouvant permettre d'interpréter ces observations serait, dans un premier temps, de déterminer si cette différence de concentration est influencée par une variation du taux de prolifération des cellules c'est-à-dire si celle-ci se divisent plus ou alors moins quand elles sont contaminées. L'autre piste pourrait être que la mortalité serait moindre dans la flasque contaminée ou supérieur dans la flasque non contaminée.

9.2. Vérification des lignées contaminées et non contaminées contrôle

Afin de s'assurer que le contrôle positif était bien contaminé par les mycoplasmes et que le contrôle négatif ne l'était pas, nous avons réalisé une PCR (Fig. 24).

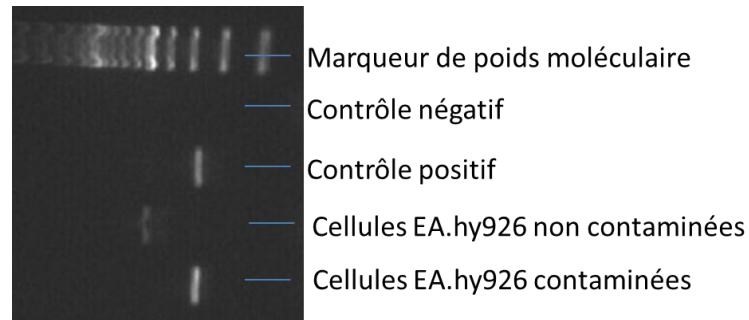


Figure 24 : Révélation de la PCR du contrôle positif et négatif.

En effet, lors de la mise en culture des cellules, nous savons que le contrôle négatif n'est pas contaminé et que le contrôle positif est contaminé par les mycoplasmes.

9.3. Microscopie à fluorescence

Des observations en microscopie à fluorescence ont été réalisées sur des cellules issues de nos flasques contrôles. Les mycoplasmes et le noyau des cellules sont colorés en bleu par la coloration DAPI qui se lie spécifiquement à l'ADN. Nous avons décidé de montrer les photos en noir et blanc car la contamination est plus visible.

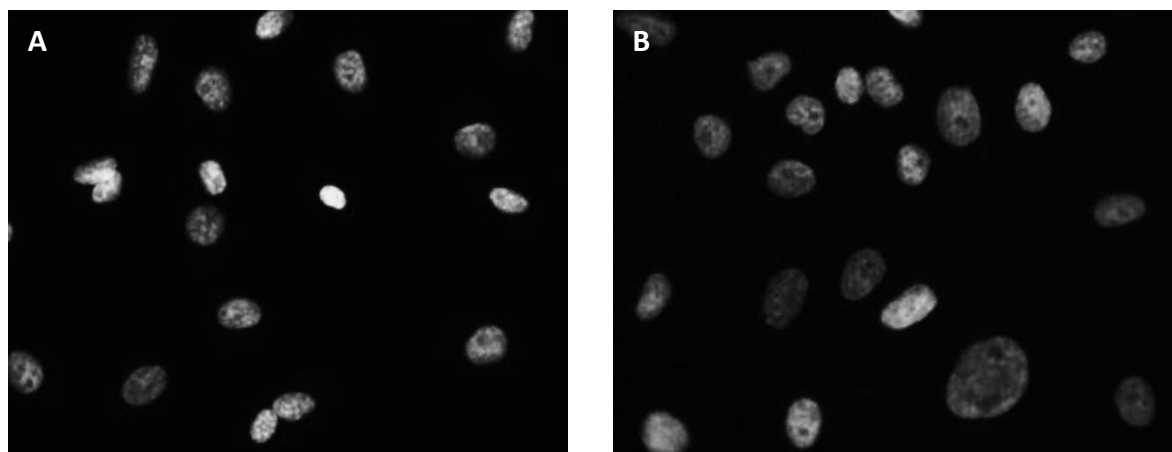


Figure 25: Cellules Ea.hy926 colorées par DAPI après 2 semaines de culture. A : non contaminées par les mycoplasmes. B : contaminées par les mycoplasmes. Grossissement 40x.

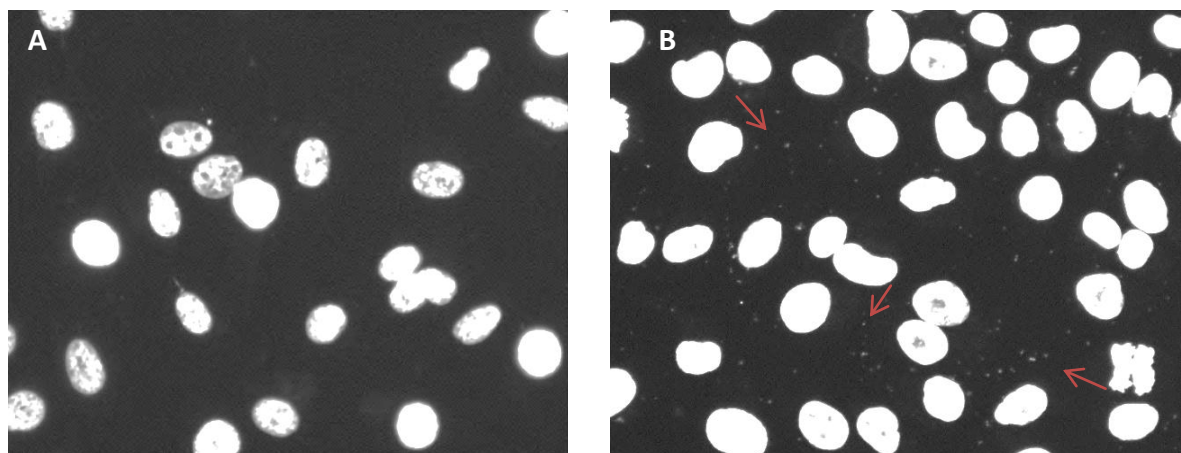


Figure 26: Cellules Ea.hy926 colorées par DAPI après 12 semaines de culture. A : non contaminées par les mycoplasmes. B : contaminées par les mycoplasmes. Grossissement 40x.

Le contrôle négatif suggère l'absence de mycoplasmes après 2 semaines de culture (Fig. 25A). Le contrôle négatif de la semaine 12 (Fig. 26A) est faiblement contaminé. Dans les contrôles positifs, après 2 semaines de culture (Fig. 25B) les mycoplasmes ne sont pas visibles. Ils ne sont probablement pas assez nombreux et la coloration DAPI n'est pas assez sensible pour les détecter. Dans les cellules contaminées qui ont été cultivées 12 semaines (Fig. 26B), les mycoplasmes sont visibles et nombreux. La concentration en mycoplasmes semble donc augmenter avec le temps.

10. Traitements antibiotiques

Les tests des kits BM cycline, MRA et Plasmocin ont duré 5 semaines (Fig. 27). Le milieu de culture additionné d'antibiotiques a été régulièrement changé afin d'apporter suffisamment de nutriments aux cellules.

A la fin de chaque semaine, lorsque les cellules sont à confluence, les milieux de culture sont récupérés et la présence éventuelle de contamination aux mycoplasmes est détectée par PCR.

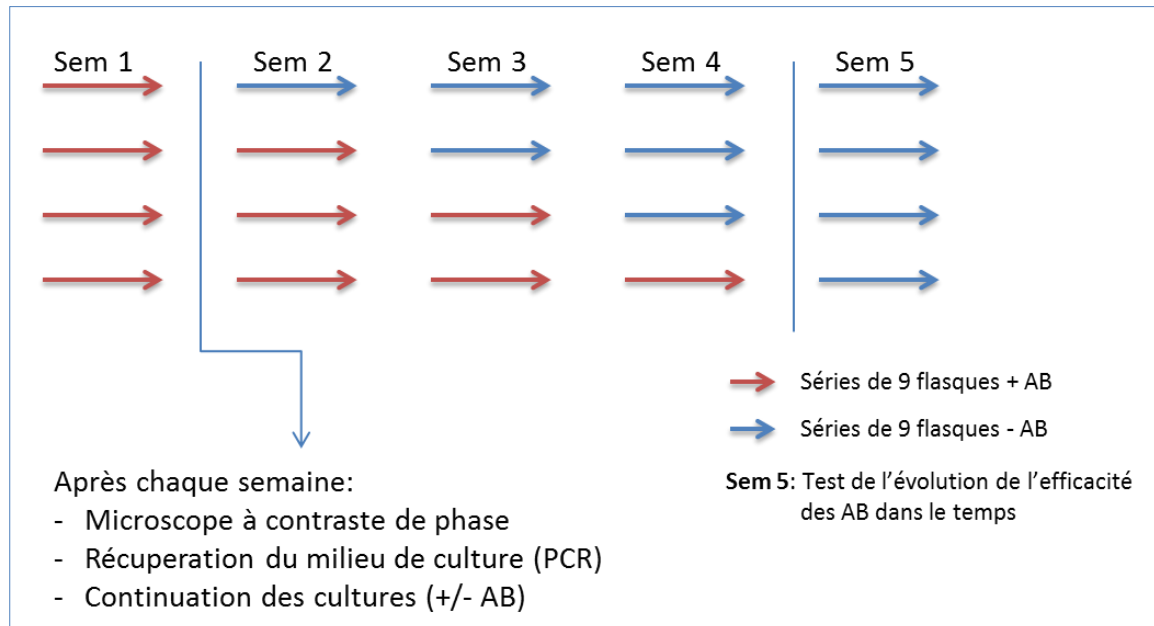


Figure 27 : Schéma des 5 semaines d'expérience. Chaque semaine des photos au microscope à contraste de phase ont été prises. Les surnageants sont récupérés pour détecter la présence de mycoplasmes par PCR.

10.1. Microscopie à contraste de phase

Chaque semaine, une photo par microscopie à contraste de phase des cultures est prise pour observer la morphologie des cellules. Des photos après une semaine de culture n'ont pas été réalisées car toutes les cultures avaient le même aspect.

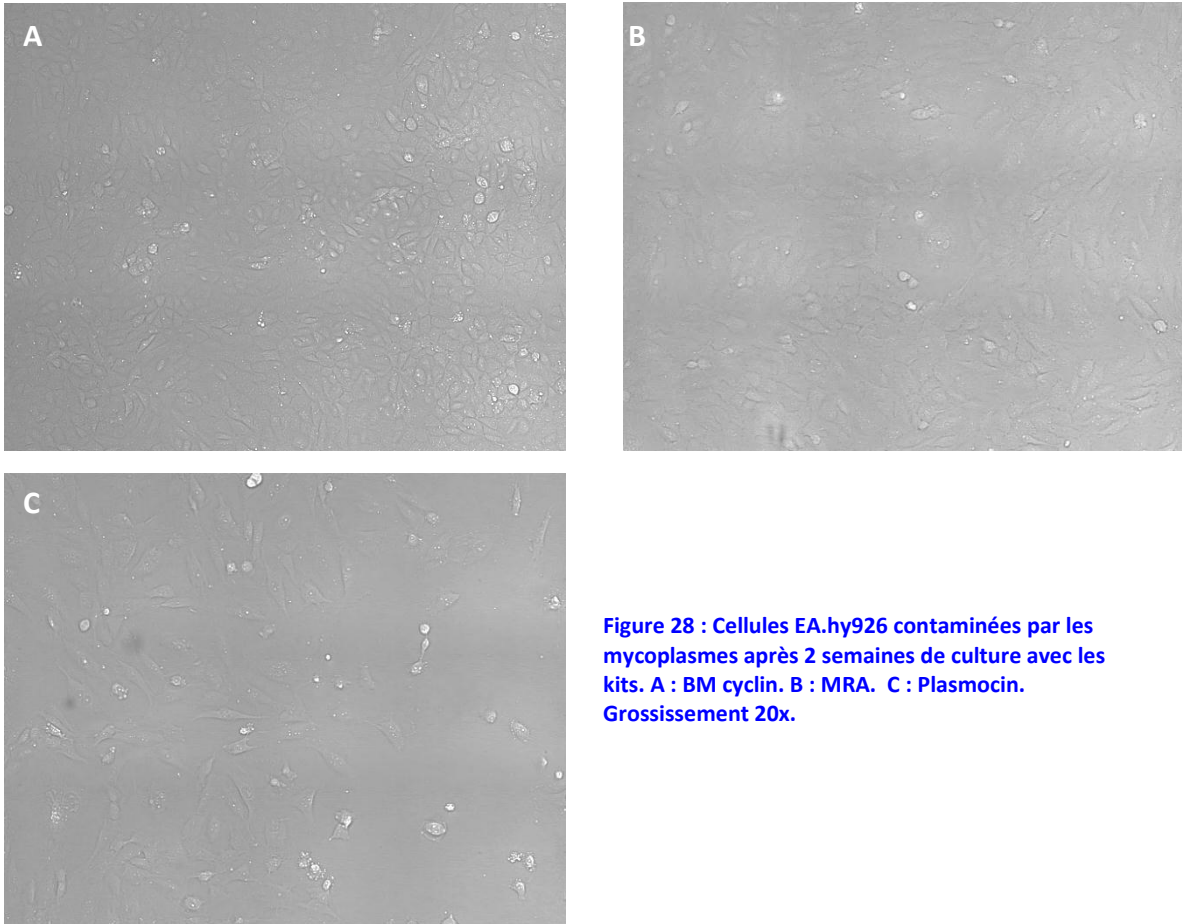


Figure 28 : Cellules EA.hy926 contaminées par les mycoplasmes après 2 semaines de culture avec les kits. A : BM cyclin. B : MRA. C : Plasmocin. Grossissement 20x.

Sur ces trois photos (Fig. 28) les cellules sont à confluence, leur morphologie et leur nombre ne sont pas affectés par les antibiotiques.

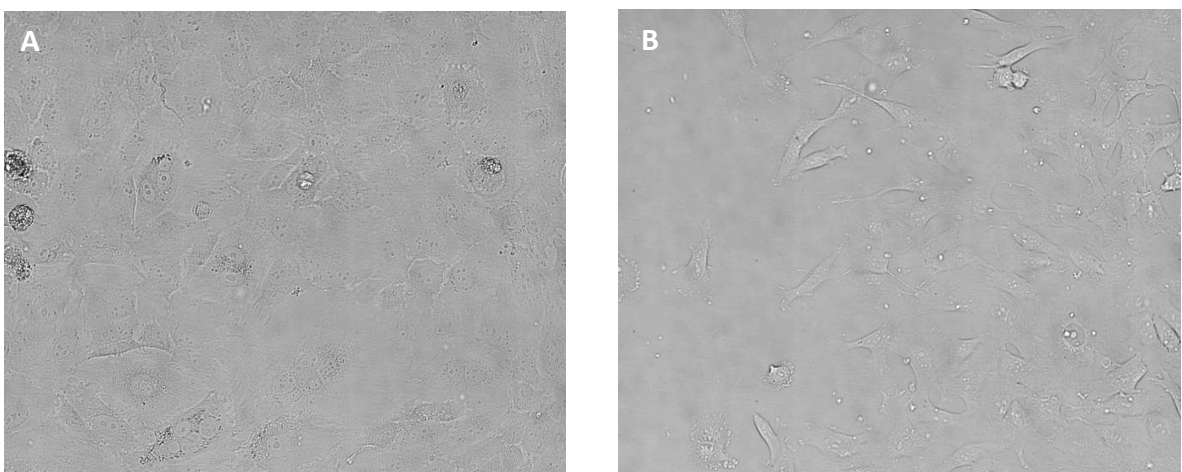
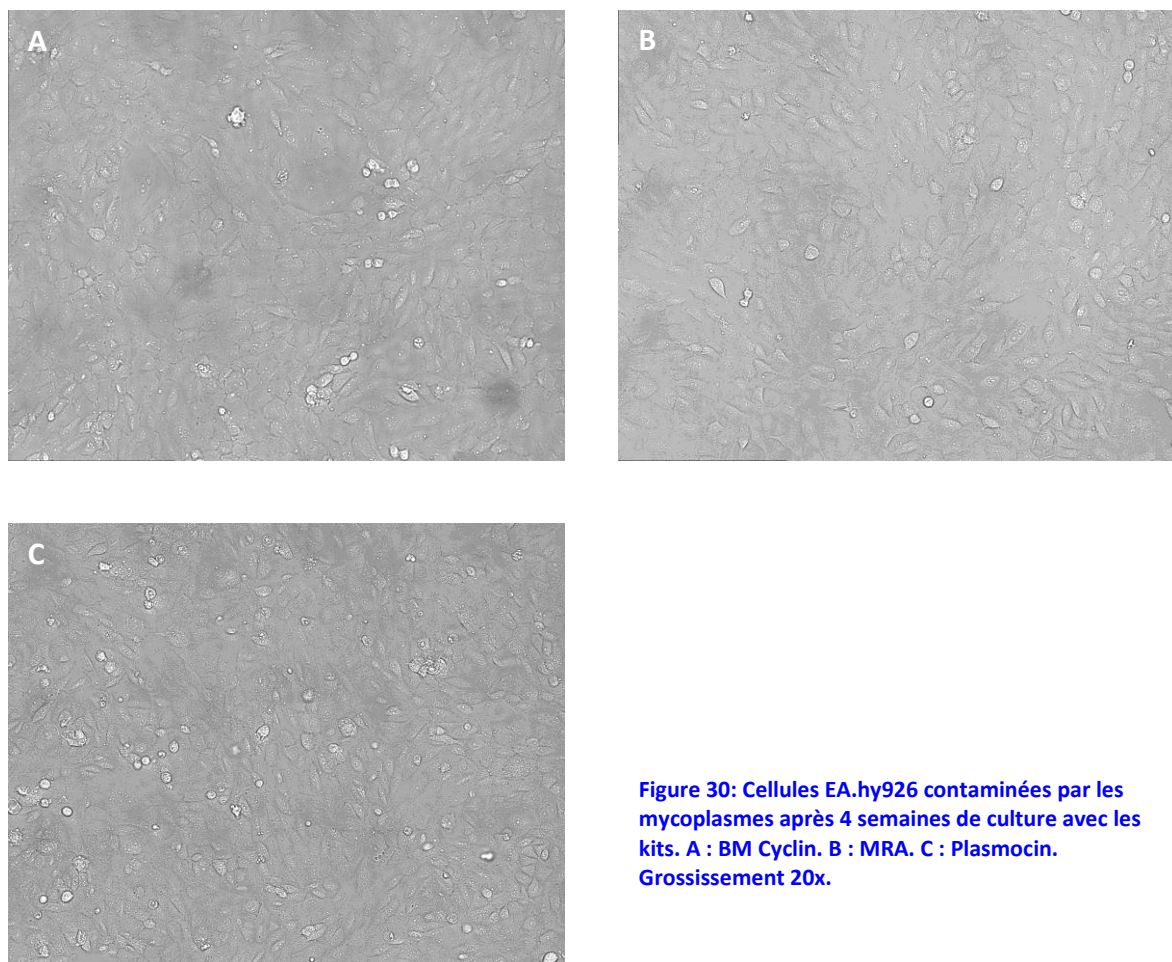


Figure 29 : Cellules EA.hy926 contaminées aux mycoplasmes après 3 semaines de culture avec les kits. A : BM cyclin. B : MRA. Grossissement 40x.

Les résultats pour le kit Plasmocin ne sont pas disponibles suite à un problème technique.

L'aspect des cellules paraît modifié après 3 semaines de traitement (Fig. 29). En effet, la forme est moins étirée et la densité cellulaire semble diminuer.



La morphologie cellulaire (Fig. 30) est peu affectée pour la majorité des cellules traitées avec la BM cycline et MRA. Par contre, les cellules traitées avec le kit Plasmocin ont subi des changements dont nous reparlerons plus loin.

10.2. Résultats des PCR

A partir des milieux récupérés chaque semaine, la présence des mycoplasmes est détectée par PCR. Le kit que nous utilisons est le LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit (Fig. 31). La PCR est une méthode de détection sensible capable de détecter jusqu'à 1fg d'ADN. L'ADN est extrait, ensuite amplifié par PCR et révélé sur gel d'agarose. Le marqueur de poids moléculaire nous permet de visualiser les bandes d'intérêt. La bande à 259 paires de base nous indique que l'échantillon est positif aux mycoplasmes et le

contrôle négatif se trouve à 481 paires de base, il joue aussi le rôle de contrôle interne. Le contrôle interne est une plus petite portion d'ADN, par rapport à celle amplifiée pour le mycoplasme, qui est présente dans le mix réactionnel. Il est aussi amplifié lors de la PCR et sert à montrer si la PCR a fonctionné correctement.

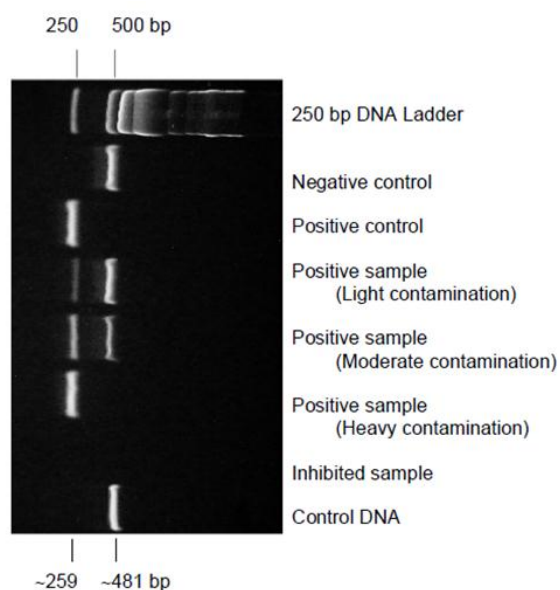


Figure 31 : Exemple de résultats de PCR révélés sur gel d'agarose. La bande du contrôle positif se trouve à 259pb et celle du contrôle négatif à 481pb (Kit LookOut Mycoplasma PCR).

Comme nous pouvons le voir dans le tableau suivant (Table 3), selon les données fournies par les kits, les mycoplasmes doivent être éliminés de tous les échantillons après deux semaines de traitement. Les kits choisis sont bien efficaces contre le *Mycoplasma orale* qui est le contaminant présent dans nos cultures.

Table 3 : Caractéristiques des trois kits utilisés pour les 5 semaines d'expérience.

Chémo-thérapie	Fournisseur	Antibiotiques	Mode d'action des antibiotiques	Durée du traitement	Concentration recommandée	Efficacité contre
BM cyclin	Roche	tétracycline pleuromutiline	Inhibe la synthèse des protéines	2 semaines	10 µg/ml BM-cyclin 1 (pleuromutilin), 5 µg/ml (BM-cyclin 2 (tetracycline)	M. arginini M. hyorhinis M. orale
MRA	MP Biomedicals	4-oxoquinoline-3-carboxylic acid derivative (quinolone)	Inhibe la synthèse de l'ADN	1 semaine	0,5 µg/ml	M. arginini M. hyorhinis M. orale M. fermentans M. salivarium M. homini M. buccale
Plasmocin	InvivoGen	macrolide quinolone	Inhibe la synthèse des protéines et de l'ADN	2 semaines	25 µg/ml	M. arginini M. bovis M. orale

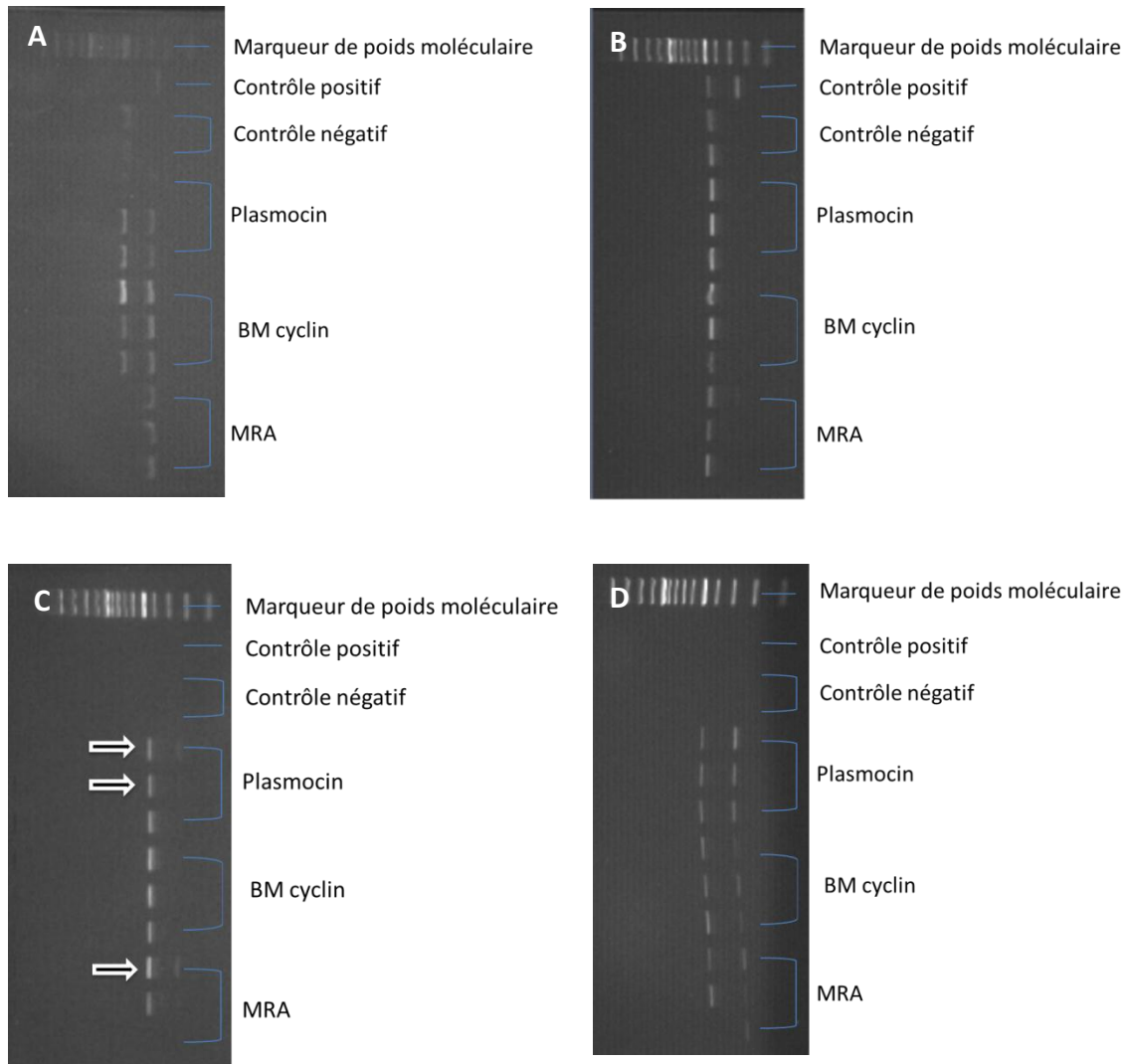


Figure 32 : Révélation des PCR sur gel d'agarose des cultures avec les antibiotiques. A : semaine 1. B : semaine 2. C : semaine 3. D : Semaine 4.

La PCR de la semaine 1 (Fig. 32A) montre que tous les échantillons sont positifs aux mycoplasmes. Les trois échantillons traités avec le kit MRA devraient pourtant être négatifs. Ils sont négatifs après deux semaines de traitement (Fig. 32B). Le kit MRA n'est donc pas efficace après une semaine mais bien après deux semaines de traitement.

Les résultats pour la semaine 2 (Fig. 32B) sont, comme nous l'annoncent les kits BM cyclin et Plasmocin, négatifs à la présence de mycoplasmes.

Après 3 semaines (Fig. 32C), les échantillons du kit MRA et Plasmocin sont à nouveau positifs aux mycoplasmes. Ceux-ci ont peut être mis au point des mécanismes de résistance envers les antibiotiques contenus dans les kits.

Les résultats sont à nouveau tous positifs aux mycoplasmes après 4 semaines de culture avec les antibiotiques (Fig. 32D). Les 3 kits d'élimination ne seraient donc pas efficaces pour éliminer définitivement les mycoplasmes des cultures cellulaires. Les antibiotiques semblent masquer la présence de mycoplasmes et ceux-ci réapparaissent par la suite.

Les contrôles pour les semaines 3 et 4 ont été inhibés lors de la migration sur gel. L'inhibition peut être causée par des agents présents dans l'échantillon ou dans les réactifs du kit pour d'extraction l'ADN ou encore dans le kit PCR. Enfin, elle peut être due à la dégradation du mix réactionnel. Tous les réactifs étant prêts à l'emploi et lyophilisé l'oubli d'un réactif n'est donc pas possible.

11. Suivi des échantillons après utilisation des antibiotiques

11.1. Image de microscopie en contraste de phase

Des photos au microscope à contraste de phase ont été réalisées tout au long des 5 semaines. Ces photos permettent d'observer l'évolution et la morphologie des cellules après le traitement aux antibiotiques.

Suivi du kit BM cyclin

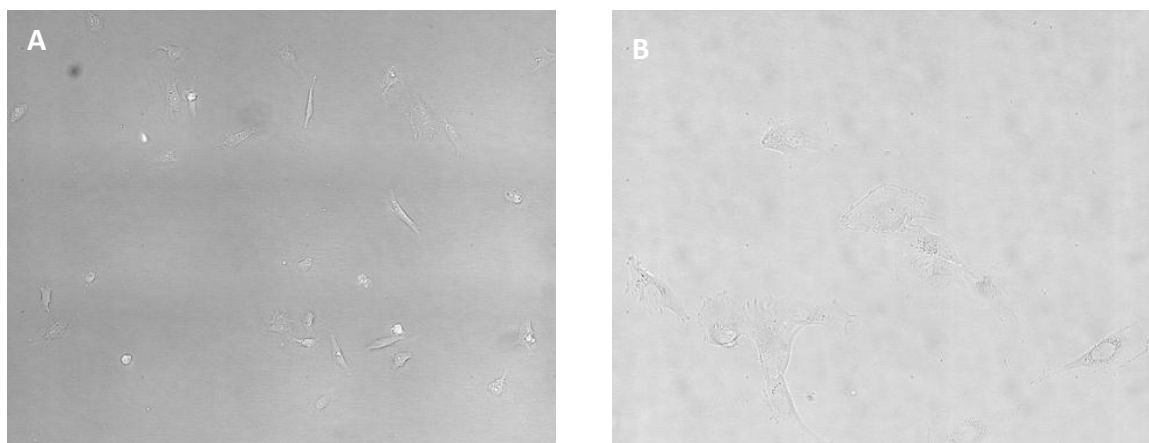


Figure 33 : Cellules EA.hy926 contaminées par les mycoplasmes, culture avec le kit BM cyclin. A : après 2 semaines, B : après 3 semaines. Grossissement 40x.

La morphologie des cellules a changé après l'utilisation du kit BM cyclin (Fig. 33 A et B). Le nombre de cellules a également diminué. Ces effets peuvent être dus à la toxicité des antibiotiques envers les cellules. Après l'arrêt du traitement nous avons continué à cultiver nos cellules dans un milieu classique sans antibiotique. La morphologie des

cellules (Fig. 34) ne revient pas à la normale et le nombre de cellules reste inférieur par rapport à la flasque contrôle. Ces effets n'ont pas été visibles dans toutes les flasques. Il serait donc intéressant de diminuer la concentration en antibiotique et de vérifier à nouveau la toxicité et l'efficacité du kit.

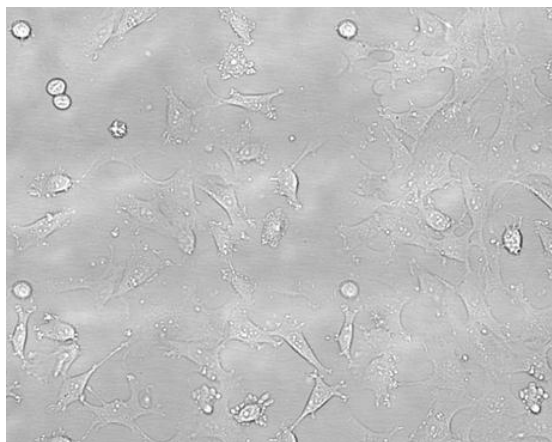


Figure 34: Cellules EA.hy926 contaminées par les mycoplasmes. 3 semaines de culture avec le kit BM cycline et 2 semaines avec du milieu sans antibiotiques. Grossissement 40x.

Suivit du kit MRA

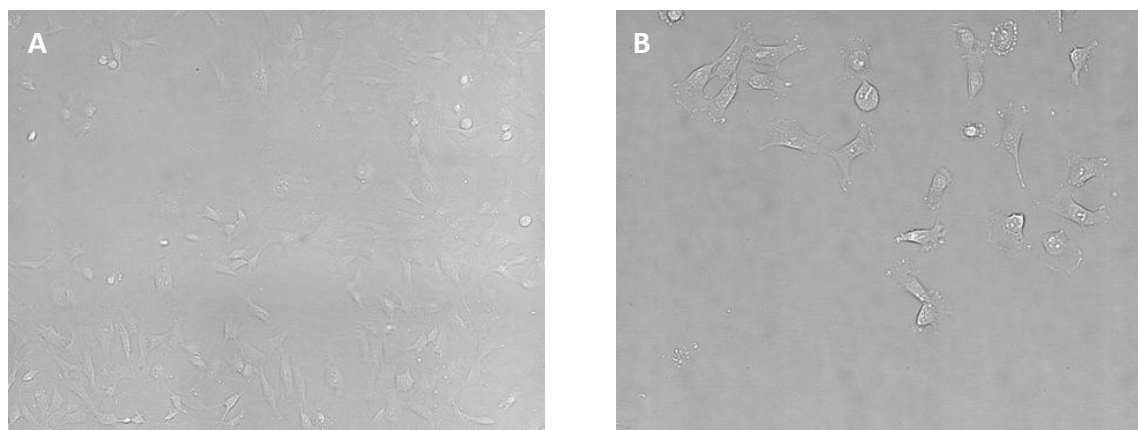


Figure 35 : Cellules EA.hy926 contaminées par les mycoplasmes, culture avec le kit MRA. A : après 2 semaines Grossissement 20x. B : après 3 semaines. Grossissement 40x.

Dans les flasques de culture MRA (Fig. 35), le nombre de cellules diminue déjà après deux semaines de traitement. La morphologie des cellules n'est plus la même. Les cellules ont un aspect moins allongé. La quinolone qui est l'antibiotique utilisé dans le kit MRA serait toxique pour les cellules. Le protocole mentionne qu'à la concentration recommandée le kit n'est pas toxique pour les cellules. Il serait aussi intéressant de diminuer la concentration en antibiotique et vérifier à nouveau la toxicité et l'efficacité du kit.

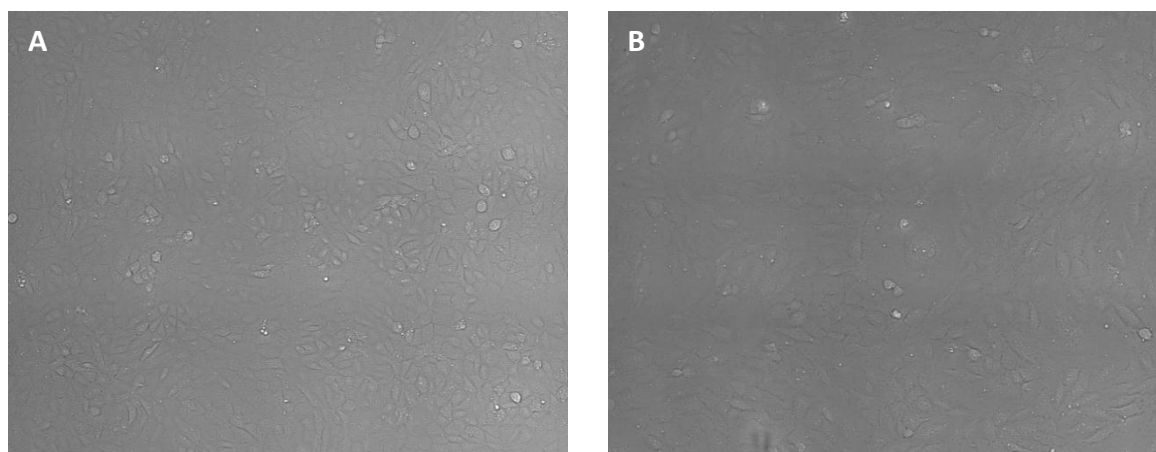


Figure 36 : Cellules EA.hy926 contaminées par les mycoplasmes, culture avec le kit Plasmocin. A : après 2 semaines. B : après 4 semaines Grossissement 20x.

D'après nos résultats, le kit Plasmocin est celui qui cause le plus de dommage aux cellules. La moitié des cellules traitées avec le Plasmocin sont mortes après deux semaines de traitement. Le kit nous met en garde sur la sensibilité des cellules envers les antibiotiques mais spécifie qu'après l'arrêt du traitement les cellules ne devraient plus être affectées par ceux-ci. Ce n'est pas notre cas, nos cellules n'ont pas survécu au traitement.

11.2. Image des gels d'électrophorèse

Afin de vérifier si après élimination des mycoplasmes, ceux-ci réapparaissent dans les cultures, une PCR a été réalisée pour détecter la présence de mycoplasme.

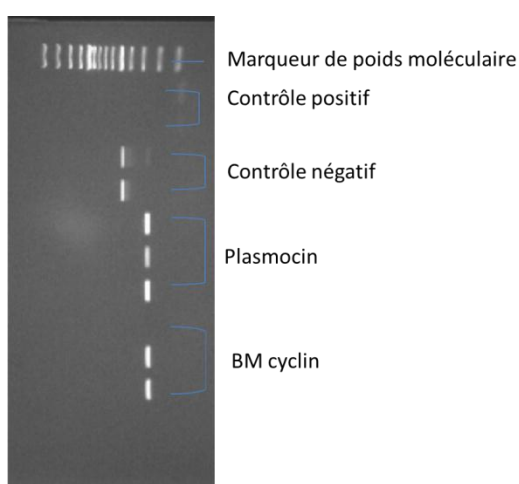


Figure 37 : Révélation de la PCR sur gel d'agarose. Les cellules ont été cultivées durant 3 semaines avec du classique milieu classique sans antibiotiques.

Comme nous l'avons vu dans les résultats précédents, après deux semaines toutes les cultures étaient débarrassées des mycoplasmes. Les cultures de ces cellules ont été

maintenues dans un milieu sans antibiotiques. Les surnageants ont été récupérés après 3 semaines de culture pour détecter la présence de mycoplasmes par PCR (Fig. 37). Les résultats sont tous positifs, les kits ne seraient donc pas efficaces pour éliminer définitivement les mycoplasmes. La contamination est juste masquée et non éliminée.

12. Vérification des résultats

Pour vérifier la répétabilité des résultats, une partie de l'expérience a été recommencée dans les mêmes conditions. Nous avons vérifié si les résultats des semaines 2 et 3 concordent avec les résultats précédents.

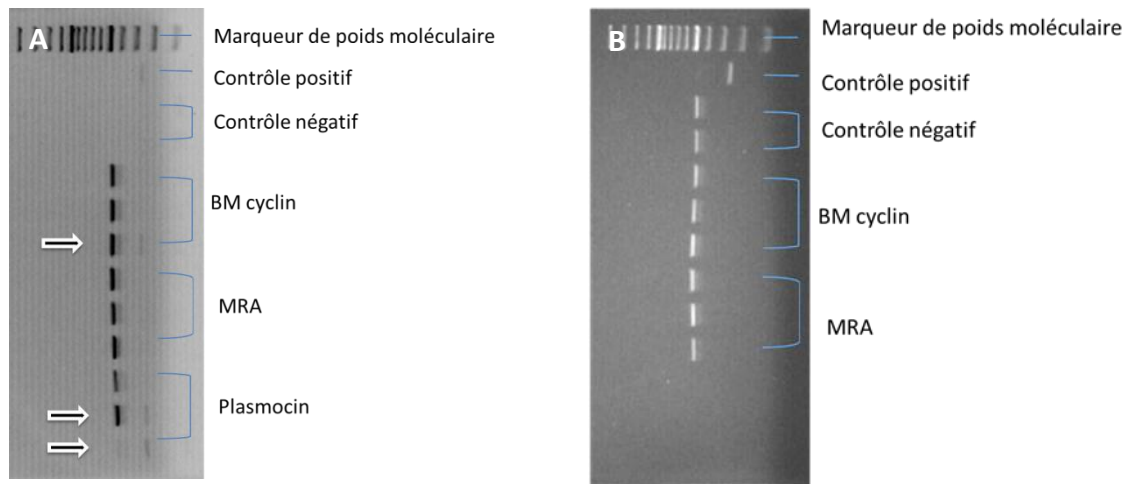


Figure 38 : Révélation de la PCR sur gel d'agarose. A : répétition de l'expérience semaine 2, B: répétition de l'expérience semaine 3.

Les résultats obtenus sont différents des résultats précédents. La PCR réalisée après 2 semaines de traitement (Fig. 38A) montre une présence de mycoplasmes pour un échantillon traité avec le kit BM cycline et deux échantillons traités avec le Plasmocin. Tous les échantillons sont négatifs à la présence de mycoplasmes après 3 semaines de traitement avec les antibiotiques (Fig. 38B). Les cellules traitées avec le kit Plasmocin n'ont pas survécu. Une première piste pour expliquer cette différence de résultats serait que les antibiotiques ne sont pas constants dans leur efficacité à éliminer les mycoplasmes. Pour confirmer cela, il faudrait répéter un plus grand nombre de fois l'expérience. Une autre piste possible serait que lors de la première expérience 36 flasques contaminées étaient présentes dans l'incubateur alors que seulement 9 étaient présentes lorsque l'expérience a été répétée. Le grand nombre de flasques augmente le risque de contamination croisée entre les flasques. L'utilisation d'un seul incubateur augmente également les chances de contamination. L'idéal serait de séparer les

flasques contaminées et non contaminées, mais le manque de place ne nous l'a pas permis.

12.1. Vérification de la lignée contaminée et non contaminée

Les cultures ont été testées à nouveau après les 5 semaines d'expérience, les deux flasques de culture sont positives aux mycoplasmes. Malgré toutes nos précautions (incubateur différent, milieu de culture différent, ne pas manipuler les deux flasques en même temps) notre contrôle négatif a été contaminé. Ceci met en avant la facilité du mycoplasme à contaminer nos cultures. La contamination peut, par exemple, provenir du PBS ou de l'incubateur qui était commun aux deux cultures.

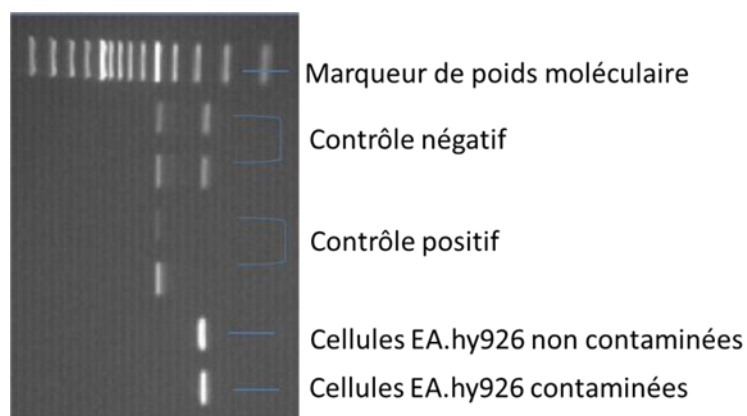


Figure 39 : Révélation de la PCR sur gel d'agarose du contrôle positif et négatif.

13. Prévention

Grâce à l'identification microbiologique, nous connaissons l'espèce de mycoplasme qui contamine nos cultures. Le *Mycoplasme orale* est commensal de la sphère oro-pharyngée (Fig. 40).

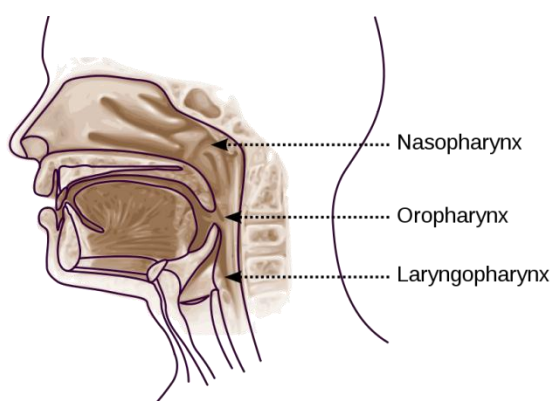


Figure 40 : sphère oro-pharyngée. Le *Mycoplasme orale* est retrouvé dans la cavité buccale et au niveau du pharynx.

Les voies orales humaines sont la cause de nos contaminations par les mycoplasmes (*Mycoplasme orale*). Le manipulateur serait donc la cause principale de contamination. Il suffit que le technicien parle pour disperser les mycoplasmes dans l'air. Il est ainsi préférable d'éviter de discuter inutilement lors de la culture cellulaire ou de pipeter avec la bouche. Le port d'un masque stérile peut être une solution aux contaminations.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

14. Conclusion

Les trois kits d'élimination testés n'ont pas donné de résultats convaincants. Nous avons évalué leurs modes d'action, leur spécificité envers les espèces de mycoplasme, leur prix, leur facilité d'usage et leur efficacité pour proposer celui qui est le mieux adapté à l'élimination des mycoplasmes dans les cultures cellulaires.

Table 3 : comparaison des kits utilisés BM cyclin, MRA et plasmocin.

Chémo-thérapie	Modes d'action	Spécificité envers les espèces de mycoplasme	Prix/Echantillon	Facilité d'usage	Cytotoxicité
BM cyclin	Tétracycline et pleuromutiline qui inhibent la synthèse des protéines	M. arginini M. hyorhinis M. orale	0,957€	+	+
MRA	Quinolone qui inhibe la synthèse de l'ADN	M. arginini M. hyorhinis M. orale M. fermentans M. salivarium M. homini M. buccale	1,645€	++	+
Plasmocin	Macrolides et quinolones qui inhibent la synthèse des protéines et de l'ADN	M. arginini M. bovis M. orale	0,347€	++	+++

Ces trois kits testés ne sont pas la solution à l'élimination des mycoplasmes. Ceux-ci ont développé des résistances envers les antibiotiques et les mycoplasmes sont toujours présents dans les cultures. L'efficacité des kits n'est pas prouvée après ces cinq semaines d'expérience. La meilleure technique reste donc la prévention contre les contaminations.

Le kit MRA couvre plusieurs espèces de mycoplasmes tandis que les deux autres n'éliminent que 3 espèces. Ils sont tous les trois faciles d'utilisation, avec toute fois un petit point négatif pour le kit BM cyclin où les deux antibiotiques sont dans des bouteilles différentes. Le kit qui cause le plus de dégâts aux cellules est le Plasmocin, la majorité des cellules n'ont pas survécu.

15. Perspectives

La toxicité des antibiotiques cause beaucoup de dégâts aux cultures, certaines cultures n'ont pas survécu au traitement. Il serait intéressant dans le futur de tester à nouveau les kits à des concentrations différentes afin de minimiser la toxicité des antibiotiques. D'autres kits d'élimination sont disponibles sur le marché, utilisent d'autres familles d'antibiotiques.

L'une des possibilités serait de tenter d'éliminer totalement les mycoplasmes en se ralliant totalement au concept de bi- ou tri-thérapie. C'est-à-dire en combinant l'utilisation des différents antibiotiques mis à disposition en même temps pour maximiser les chances d'éliminer les mycoplasmes résistants. Il sera important d'en évaluer les effets néfastes sur les cellules en culture.

N'oublions pas qu'il existe d'autres procédures d'élimination que celle par chimiothérapie. Les procédures physiques, les procédures chimiques et les méthodes immunologiques seraient également intéressantes à d'explorer.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) SCK•CEN synopsis de l'entreprise, [online], consulté le 28 mars 2012, disponible sur « <http://www.sckcen.be/fr/SCK-CEN/Profil-d-organisation> »
- (2) Culture in vivo asbl, *Culture cellulaire de base*, formation Nivelles
- (3) La culture cellulaire et ses contaminants, [online], consulté le 17 mars 2012, disponible sur « http://www.biochimie.umontreal.ca/doc/Services/LES_CONTAMINANTS.pdf »
- (4) **Kesterman N.**, Mycoplasmatacae, syllabus, Fleurus, Haute Ecole Louvain en Hainaut, ISC, 2010-2011
- (5) **Razin S.**, Mycoplasmas, *Medical Microbiology*, 4e édition, chapitre 37, University of Texas Medical Branch at Galveston, Baron S, 1996.
- (6) **Cord C., Hans G.**, Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention, *Cyotechnology*, volume 39, p 75-90, 2002
- (7) **Taylor-Robinson D, Bébéar C.**, Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, volume 40, numéro 5, p 622–630, 1997
- (8) **Uphoff C.C., Drexler H.G.**, Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, volume 38, numéro 2, p 79-85, 2007
- (9) **Uphoff C.C., Meyer C, Drexler H.G.**, Elimination of mycoplasma from leukemia-lymphoma cell lines using antibiotics, *biotechnical methods section*, numéro 16, p 284-288, 2002
- (10) **Motte F.**, biologie moléculaire, syllabus, Fleurus, Fleurus, Haute Ecole Louvain en Hainaut, ISC, 2010-2011
- (11) **Del missier M.**, Influence, diagnostic et traitement des infections par les mycoplasmes en reproduction canine : comparaison avec les données acquises dans les espèces humaine et bovine, thèse de doctorat en médecine vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, 2007
- (12) **Usson Y.**, *Bases de la Microscopie*, [online], consulté le 23 mars 2012, disponible sur « <http://membres-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/BASES-MICROSCOPIE.pdf> »
- (13) **Kapuscinski J.**, DAPI: a DNA-specific fluorescent probe, *Biotech Histochem*, volume 70, numéro 5, p 220, 1995

- (14) *Mycoplasma Removal Agent (MRA)*, [online], consulté le 18 février 2012, disponible sur « <http://www.abdserotec.com/catalog/antibody-manufacturing-tools/mycoplasma-removal-agent-mra.html> »
- (15) **Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X.**, Quinolone-mediated bacterial death, *Antimicrob Agents Chemother*, volume 52, numéro 2, p 385-392, 2008
- (16) BM Cyclin, [online], consulté le 18 février 2012, disponible sur « http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_5_3_2_5_1.html »
- (17) **Gopalkrishna V., Verma H., Kumbhar NS, Tomar RS, Patil PR**, Detection of Mycoplasma species in cell culture by PCR and RFLP based method: Effect of BM-cyclin to cure infections, *National Institute of Virology*, volume 25, numéro 4, p364-368, 2007
- (18) **Katherine S. et al.**, Interaction of Pleuromutilin Derivatives with the Ribosomal Peptidyl Transferase Center, *Antimicrob Agents Chemother*, volume 50, numéro 4, p1458-1462, 2006
- (19) Plasmocin™ Treatment, [online], consulté le 18 février 2012, disponible sur «http://www.invivogen.com/PDF/Plasmocin_TDS.pdf »
- (20) **Tulkens P., Spinewine A.**, Pharmacologie spéciale – Macrolides, [online], consulté le 30 mars 2012, disponible sur « <http://www.antiinfectieux.org/antiinfectieux/PLS/Macrolides/PLS-macrolides-mecanisme-action.html> »
- (21) How can I avoid mycoplasma contamination and other serious cell culture problems?, [online], consulté le 26 février 2012, disponible sur « <http://www.bionique.com/mycoplasma-resources/faq/avoid-mycoplasma-contamination.html> »
- (22) Culture in vivo asbl, Biosécurité et normes GMP, formation Nivelles
- (23) **Woermann U.**, Numérations et répartition (ou différenciation) leucocytaire manuelles effectuées au microscope, [online], consulté le 2 mars 2012, disponible sur «http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_F/Lab/count_manual.htm»
- (24) **Davidson M. W., Abramowitz M.**, *Optical Microscopy*, Encyclopedia of Imaging Science and Technology, In J.P. Horniak (Ed.), volume 2, 2002
- (25) Cell Line Designation: EA.hy926 ATCC® Catalog No. CRL-2922™,[online], consulté le 11 mai 2012, disponible sur «<http://www.lgcstandards-atcc.org/attachments/17512.pdf>»
- (26) **Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB.**, Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization, *Proc Natl Acad Sci U S A*, volume 80, p3734-3737, 1983

- (27) **Carl Roth GmbH + Co. KG**, Cell Passage and Use of Trypsin, [online], consulté le 22 février 2012, disponible sur
« http://www.carlroth.com/website/fr-fr/pdf/Zellpassage_Trypsin_E.pdf»
- (28) High Pure PCR Template Preparation Kit, roche, [online], consulté le 22 mai 2012, disponible sur
« <https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCProductDisplay?storeId=10305&langId=-1&catalogId=10304&countryId=be&catEntryId=39980>»
- (29) **Dobrovlny PL, Bess D.**, Optimized PCR-based detection of mycoplasma, *J. Vis. Exp.*, numéro 52, 2011
- (30) LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit, sigma aldrich, [online], consulté le 22 mai 2012, disponible sur
« <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/mp0035bul.Par.0001.File.tmp/mp0035bul.pdf> »