

Guide pour les laboratoires

**Trucs, astuces et solutions
pour la culture de cellules,
la biologie moléculaire
et la chromatographie
en phase liquide.**

Sommaire

- 3** Bienvenue
- 4** Astuces
- 6** Dépannage des applications sensibles
- 7** Choix du système qui vous convient
- 9** Guides de dépannage
 - 9** Chromatographie en phase liquide
 - 15** Culture cellulaire
 - 18** Biologie moléculaire
- 22** Conclusion
- 23** Guide rapide
- 25** Références
- 26** Nous contacter

Bienvenue



Selon les estimations, un laboratoire moyen utilise **35 millions de litres d'eau par an**. Ce guide permet de mettre en œuvre les bonnes pratiques et d'éviter que l'eau ne compromette vos résultats.

Il existe un certain nombre de raisons pour lesquelles les choses peuvent ne pas se dérouler comme prévu pendant vos recherches. Outre les facteurs comme les pannes d'équipements, les problèmes d'approvisionnement en réactif et (même) l'erreur humaine, vous devrez également gérer de nombreuses sources de contamination.

Dans ce document, nous nous concentrons sur les contaminants que l'on retrouve dans l'alimentation en eau de votre laboratoire et nous proposons des idées afin d'empêcher ces contaminants de compromettre les procédures expérimentales, les analyses des données et les applications en aval.

L'eau est probablement le réactif le plus utilisé dans un laboratoire : en effet, selon les estimations, un laboratoire moyen utilise 35 millions de litres d'eau par an. C'est presque cinq fois plus qu'un bâtiment de bureaux de taille similaire !^{1,2} Il est donc important de contrôler, d'entretenir et de surveiller très

soigneusement la pureté de l'eau dans votre laboratoire.

La contamination de l'eau peut créer un certain nombre de problèmes entraînant la perte de vos échantillons, voire l'endommagement des produits, tandis que la détection inopportune d'une contamination pourrait remettre en question la précision et la validité de vos données. Comme si cela ne suffisait pas, le temps, les ressources et l'argent nécessaires pour remédier à ces problèmes peuvent atteindre des niveaux significatifs, vous écartant, vous et d'autres membres de votre laboratoire, de l'objectif de votre véritable objectif : la recherche scientifique.

Plusieurs facteurs différents peuvent contaminer l'alimentation en eau de votre laboratoire. Ce sont les bactéries et leurs sous-produits (comme les endotoxines), ainsi que d'autres micro-organismes et biomolécules, les ions, les gaz dissous, les composés inorganiques et organiques, les particules et les

enzymes de restriction (comme les nucléases et les protéases).

Dans ce document, nous proposons une vue d'ensemble des meilleures méthodes visant à empêcher la contamination dans les applications de laboratoire courantes. Elle comprend un résumé des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), ainsi que les différents procédés impliqués dans la purification de l'eau.

Nous nous concentrons sur la résolution des problèmes liés à l'eau dans les applications particulièrement sensibles, comme la culture de cellules, la biologie moléculaire et la chromatographie en phase liquide, pour lesquelles la pureté de l'eau revêt une importance toute particulière. Dans chaque cas, nous proposons un résumé des causes, des problèmes et des astuces de dépannage pour chaque problème. ☺

Astuces

CONSIGNES GÉNÉRALES POUR ÉVITER LA CONTAMINATION DE L'EAU

Un certain nombre d'erreurs expérimentales peuvent se produire si vous utilisez de l'eau de mauvaise qualité ou d'une pureté inadaptée. Voici un résumé des différentes méthodes qui vous permettront d'éliminer les contaminants de votre alimentation en eau ou même de les empêcher d'entrer dans le système.

BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE

Les BPL³ sont définies comme :

« un système de garantie de qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées ».

Les BPL sont indispensables dans de nombreux laboratoires industriels. Bien qu'elles ne soient pas respectées de manière aussi stricte dans les laboratoires universitaires, bon nombre de leurs principes constituent le fondement de la conduite de recherches efficaces. Un ensemble clairement défini de procédures de laboratoire peut vous permettre de réduire les risques de contamination et d'erreur. Celles-ci doivent comprendre des protocoles et des programmes pour le nettoyage

de votre laboratoire, ainsi que des détails concernant des zones et équipements spécifiques (par exemple, avant la PCR / après la PCR). De plus, elles doivent également souligner l'importance du port des équipements de protection individuelle (EPI) adaptés, notamment les blouses et les gants, et de la conservation de registres à jour contenant des informations comme les numéros de lot, pour permettre d'identifier la source du problème et l'éviter à l'avenir.

Vous devez effectuer régulièrement la maintenance et les tests de tous vos systèmes pour permettre d'éviter les accidents, et tout le monde dans le laboratoire doit être dûment formé et respecter les procédures opérationnelles permanentes (POP) pour les expériences, la maintenance et le nettoyage.

COMMENT L'EAU DE LABORATOIRE EST-ELLE HABITUELLEMENT PURIFIÉE ?

Les BPL vont grandement servir à éviter la contamination dans votre laboratoire. Néanmoins, pour accentuer encore la protection de vos expériences, il peut être utile de savoir comment fonctionnent les différentes méthodes de purification de l'eau et de connaître les types d'impuretés qu'elles éliminent.

Cela permet de garantir que vous disposez des systèmes de purification adéquats pour obtenir une pureté de l'eau convenant à la tâche en cours. Nous vous recommandons d'utiliser une combinaison de méthodes de purification d'eau. Celles-ci peuvent inclure l'osmose inverse (OI), les résines échangeuses d'ions (IX), l'électrodéionisation (EDI), la lumière ultraviolette (UV) et l'ultrafiltration. ☯

Astuces

SUITE...

« Il est important de veiller à ce que la pureté de l'eau que vous utilisez soit adaptée à votre application. »

Qualité de l'eau	Résistivité, MΩ.cm	COT (ppb)	Bactéries (UFC/ml)	Endotoxines (UE/ml)
Type I+	18,2	<5	<1	<0,03
Type I	>18	<10	<10	<0,03
Type II+	>10	<50	<10	s/o
Type II	>1	<50	<100	s/o
Type III	>0,05	<200	<1 000	s/o

Tableau 1: détails des différentes qualités d'eau et applications classiques. COT, carbone organique total ; ppb, parties par milliards ; UFC, unités formant colonies ; UE, unités d'endotoxine.

CHOIX DE LA PURETÉ DE L'EAU ADAPTÉE À VOTRE APPLICATION

Certaines expériences sont plus sensibles à la contamination et peuvent nécessiter une qualité plus élevée de l'eau.

Par conséquent, il est important de veiller à ce que la pureté de l'eau que vous utilisez soit adaptée à votre application. La pureté de l'eau se classe du Type I+, qui affiche une résistivité de 18,2 MΩ.cm et sert dans les expériences hautement sensibles, au Type III, qui affiche une résistivité >0,05 MΩ.cm et sert d'eau d'alimentation pour les systèmes de purification, les machines à laver et les autoclaves.

Pour vous aider, nous avons inventorié plus de détails sur les différentes qualités de l'eau dans le Tableau 1.

Dans un laboratoire, il est essentiel d'avoir accès à une eau d'une qualité régulière. Par conséquent, vous avez besoin d'un système qui purifie l'eau, mais qui surveille également les niveaux de contaminants, afin de garantir que vous disposez de la qualité de l'eau voulue à tout moment. Il est également important d'effectuer une maintenance régulière des systèmes de purification de l'eau et d'étudier avec soin le stockage de votre eau fraîchement purifiée. En effet, certains contenants peuvent faire relarguer des contaminants dans l'eau au fil du temps et la quantité de gaz dissous dans l'eau peut changer en cas de dépôts.

La gamme PURELAB® Chorus d'ELGA vous permet de choisir une solution de purification qui répond aux exigences spécifiques de votre laboratoire.

Elle vous permet de satisfaire les besoins de votre application avec la qualité de l'eau adéquate. Vous gagnez alors du temps (car vous n'avez plus besoin de réitérer des expériences du fait de l'utilisation d'une eau de mauvaise qualité). Vous pouvez également être sûr de ne pas gaspiller de l'énergie, des ressources et des crédits (par exemple, en utilisant une eau de Type I+ lorsque le Type III suffirait). ☺

**EN SAVOIR PLUS...**

Découvrez notre gamme de produits de purification de l'eau

**DÉPANNAGE LIÉ À L'EAU POUR...**

Les applications sensibles

Si vous respectez les directives des BPL, que vous utilisez la pureté adéquate de l'eau pour votre application et que vous effectuez une maintenance fréquente de votre système de purification, vous réduisez considérablement les risques de contamination. Toutefois, certaines applications sont plus sensibles (Figure 3, page suivante) et nécessitent un niveau de vigilance accru.

Pour vous aider, nous avons créé un guide de dépannage pour trois applications de laboratoires courantes : **la culture cellulaire, la biologie moléculaire et la chromatographie en phase liquide**. Il comprend des suggestions quant à la manière d'identifier les types d'impuretés présentes dans l'eau et pouvant être responsables de la contamination, mais aussi pour résoudre les problèmes courants lorsque vous effectuez vos expériences.

Adaptez le type d'eau à votre application

ET LAISSEZ PARLER VOS DONNÉES

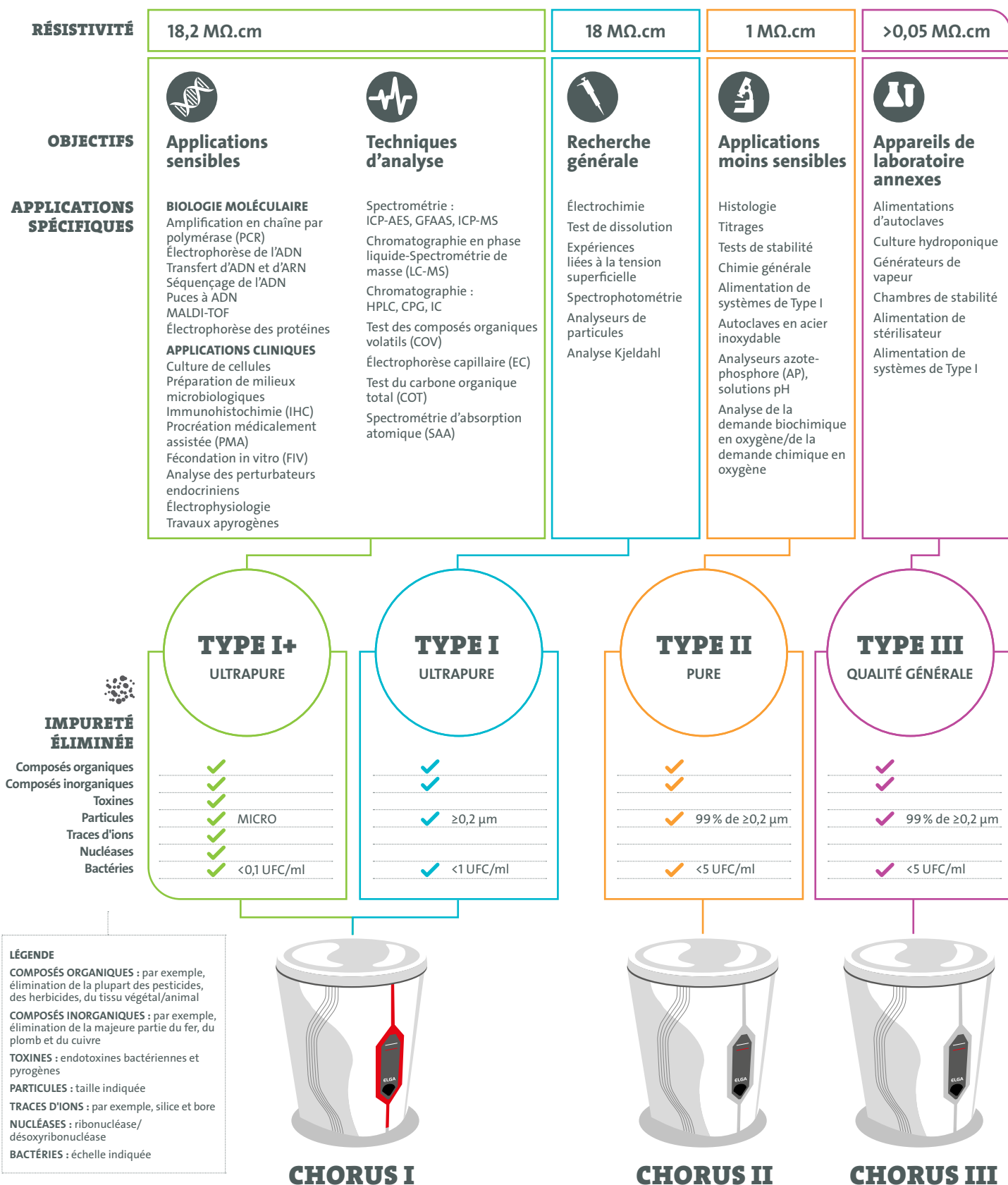


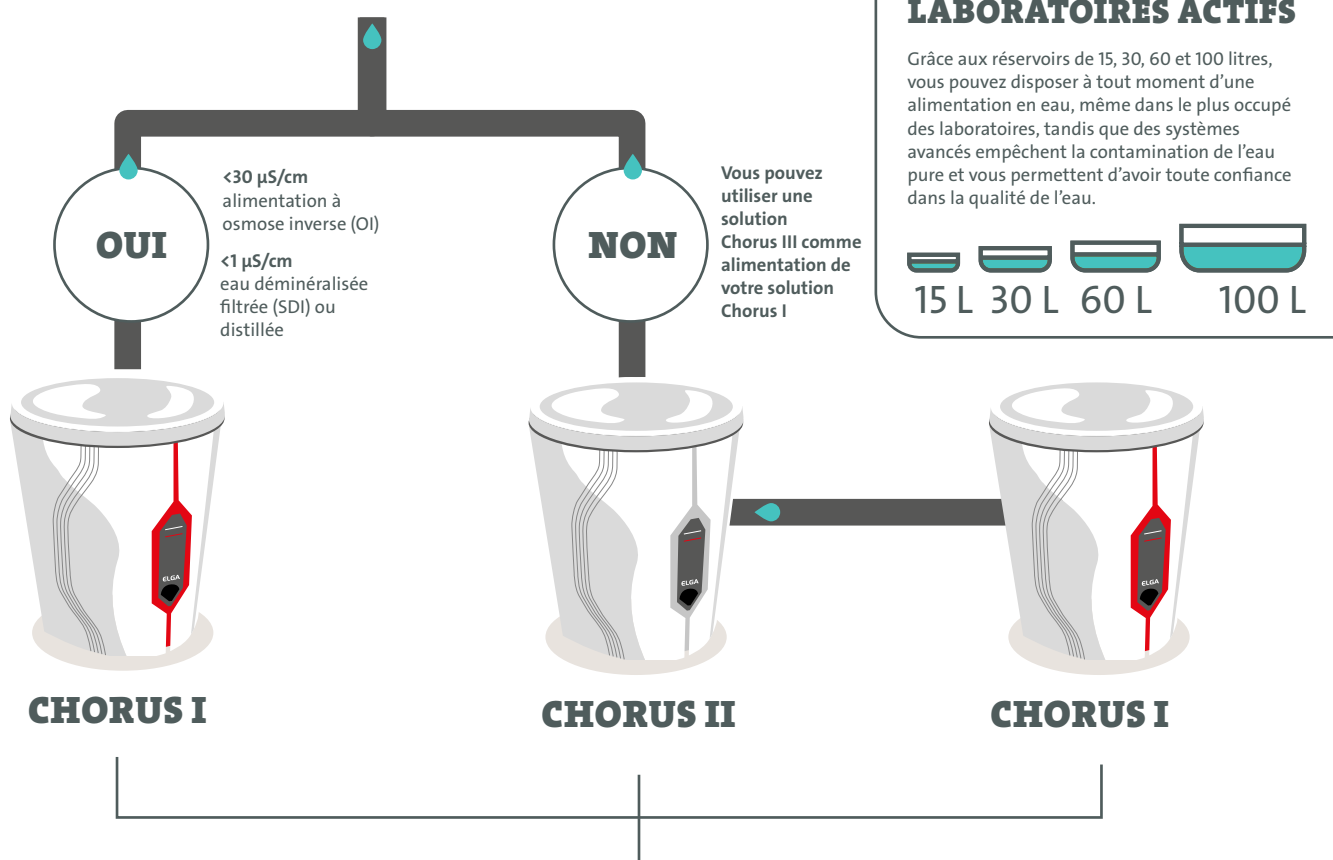
Figure 3 : diverses techniques de laboratoire et niveaux de pureté de l'eau requis pour éviter la contamination et recueillir des données d'excellente qualité.

Préoccupations liées à l'ultrapureté

Vos préoccupations liées à une eau ultrapure dépendent de votre contexte : une eau ultrapure de Type 1+ et de Type 1 nécessite une alimentation en eau prétraitée. Ce guide vous permet de savoir comment vous assurer que vous disposez de la bonne installation, et ne vous inquiétez pas si vous n'avez pas encore l'infrastructure nécessaire : notre solution Chorus III est là pour vous aider.

ALIMENTATION EN EAU PRÉTRAITÉE ?

Le Type 1+ et le Type 1 nécessitent une alimentation en eau prétraitée



CHOIX DU DISTRIBUTEUR

Nous vous proposons trois options différentes de distributeurs pour les adapter au mieux à vos besoins : distributeurs fixes avec fonctions de commande de base ou avancées, ou distributeur manuel pour une flexibilité optimale.



HALO

Distributeur fixe pour vos besoins de base



HALO ADVANCED

Distributeur fixe avec fonctions de commande avancées



HALO FLEXIBLE

Distributeur manuel qui vous apporte des fonctions de commande avancées et une flexibilité optimale

Chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide est une technique qui permet de séparer et d'identifier les composants d'un échantillon. L'échantillon traité est élué avec la phase mobile (qui contient souvent de l'eau, du méthanol et/ou de l'acétonitrile), puis il passe au travers d'une colonne analytique. Chaque composant de cet échantillon va interagir via différents types d'interactions avec la phase stationnaire de celle-ci ; permettant ainsi d'obtenir des informations telles que la composition et la concentration.

Les différents types de systèmes de chromatographie utilisés en laboratoire incluent la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UHPLC) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), qui font passer une phase mobile sous pression dans la colonne.

Ces systèmes peuvent également être associés à un spectromètre de masse pour l'analyse moléculaire en aval des facteurs des composants.

La chromatographie est très sensible. De ce fait, elle est capable de faire la différence entre les formes chargées ou neutres du même analyte. Toutefois, cette sensibilité peut coûter cher : il est essentiel de s'assurer que la phase mobile est exempte de contaminants, ce qui risquerait sans cela de compromettre vos résultats et d'endommager votre équipement.

Des problèmes analytiques peuvent influencer les résultats et l'avancement de votre projet comme : des artefacts électriques, de régulation de la température, de pompage ou même d'injecteur, de phases mobiles.

Dans ce document, nous nous concentrons sur les problèmes pouvant survenir en cas d'utilisation d'une eau de mauvaise qualité, avec notamment des temps de rétention variables, une perte de résolution, des traînées de pics, une dérive, un bruit de ligne de base excessif, des crêtes négatives, des pics « fantômes », des pics d'adduit et une contre-pression. Pour chaque cas, nous proposons des exemples illustrant ce à quoi pourraient ressembler vos données, pour vous permettre de résoudre les problèmes liés à l'eau lors de vos expériences en chromatographie.



Problèmes

Chromatographie en phase liquide

TEMPS DE RÉTENTION VARIABLE

De subtiles modifications de la phase mobile dues aux contaminants de l'eau ou une phase mobile non homogène peuvent induire une dérive des temps de rétention (Figure 4).

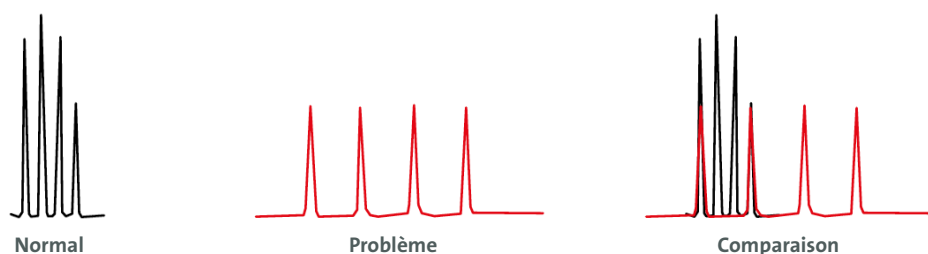


Figure 4 : chromatogramme illustrant des temps de rétention variables.

PERTE DE RÉOLUTION

Si votre phase mobile est contaminée ou dégradée, elle peut conduire à la modification des temps de rétention ou de la sélectivité et, en fin de compte, à une perte de résolution (Figure 5). Vous risquez alors d'avoir du mal à identifier les composants de l'échantillon.

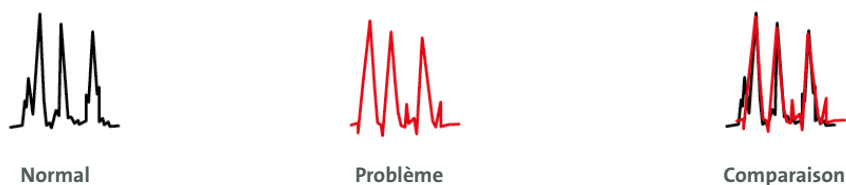


Figure 5 : chromatogramme illustrant une perte de résolution.

TRAÎNÉES DE PICS

Si votre phase mobile est contaminée ou dégradée, elle peut induire des traînées de pics (Figure 6).

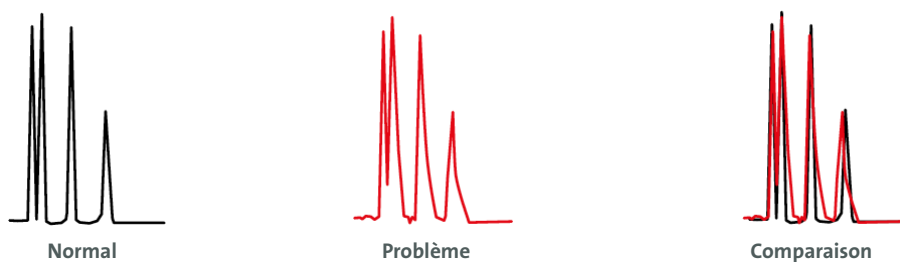


Figure 6 : chromatogramme illustrant des traînées de pics

DÉRIVE DE LA LIGNE DE BASE

La ligne de base peut donner l'impression de monter ou descendre (Figure 7) si votre phase mobile n'est pas totalement homogénéisée.

Cela peut également se produire si vous l'avez stockée pendant une période prolongée ou si vous avez utilisé une eau de mauvaise qualité et/ou des réactifs de qualité non-HPLC pour la préparer.

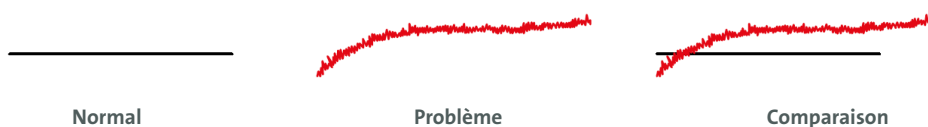


Figure 7 :
chromatogramme
illustrant une ligne
de base qui dérive.

LIGNE DE BASE BRUYANTE

Des lignes de base bruyantes (Figure 8) peuvent apparaître sur le chromatogramme si l'eau ou les réactifs utilisés pour préparer votre phase mobile ne sont pas de qualité HPLC ou n'ont pas été renouvelés. Par conséquent, votre phase mobile est peut-être contaminée, générant un bruit de fond plus important.

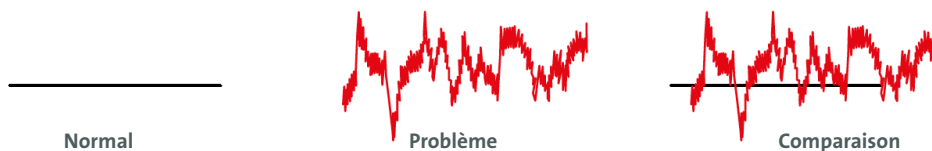


Figure 8 :
chromatogramme
illustrant une ligne
de base bruyante.

PICS NÉGATIFS

Si votre phase mobile ou un contaminant est plus absorbante que les composants de l'échantillon, cela peut se présenter comme des pics négatifs (Figure 9).



Figure 9 :
chromatogramme
illustrant des pics
négatifs.

PICS « FANTÔMES »

De faux pics peuvent se développer si des contaminants sont absorbés dans la colonne. Afin de différentier les pics échantillons des pics fantômes (Figure 10), vous devez simuler une injection sans pour autant injecter dans la colonne, et comparer avec un blanc matrice.



Figure 10 :
chromatogramme
illustrant des pics
« fantômes ».

PICS D'ADDUIT

Les pics d'adduit (Figure 11) posent principalement problème lors de la réalisation d'une spectrométrie de masse et ils se produisent lorsque des ions contaminants modifient la concentration ionique des composants de l'échantillon.

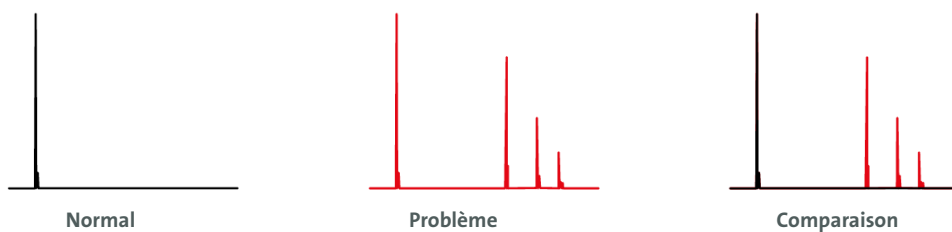


Figure 11 :
chromatogramme
illustrant des pics
d'adduit.

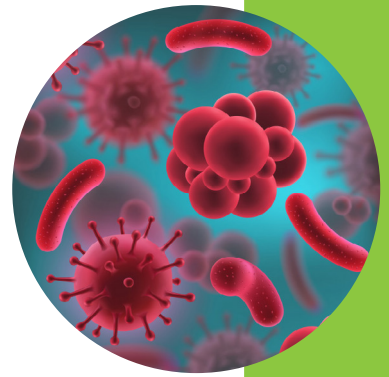
CONTRE-PRESSION

La contre-pression peut résulter d'une accumulation de contaminants dans le système. Si cette situation persiste, elle peut entraîner une fuite sur le système analytique, ou au niveau de la colonne, pour dans le temps raccourcir la durée de vie de la colonne et conduire à l'arrêt du système.

Causes

Chromatographie en phase liquide

En chromatographie en phase liquide, l'eau est utilisée pour préparer la phase mobile, les échantillons, les étalons et les essais à blanc, mais aussi pour nettoyer les récipients. Des contaminants dans l'eau, comme des composés organiques, des ions, des particules et des bactéries, peuvent entraîner des données de mauvaise qualité.



COMPOSÉS ORGANIQUES

Si des contaminants organiques sont présents dans votre phase mobile, ils peuvent s'accumuler dans la tête de colonne. Ils peuvent ensuite être élués et apparaître comme des pics « fantômes » dans le chromatogramme. Les composés organiques peuvent également agir comme la phase stationnaire, entraînant ainsi une dérive des temps de rétention et une traînée des pics.

De plus, les composants du système peuvent être enrobés d'impuretés et entraîner l'introduction de particules par le biais des filtres. Vous trouverez ci-contre une liste des contaminants dont vous devez vous méfier (et des types de problèmes qu'ils peuvent poser).

Une réduction de la résolution et de la sensibilité, ainsi que le bruit et la dérive de la ligne de base, sont également des preuves de la présence

d'impuretés organiques dans votre système de chromatographie. Qui plus est, des accumulations organiques peuvent entraîner une contre-pression de la colonne et conduire à l'endommagement de la colonne.

IONS

Des ions comme le sodium (Na), le potassium (K), l'aluminium (Al), le calcium (Ca), le fer (Fe), le magnésium (Mg), le cuivre (Cu) et le platine (Pt) peuvent modifier la concentration ionique de l'analyte dans votre phase mobile. Ceci est principalement un problème pour les systèmes de chromatographie associés à la spectrométrie de masse.

BACTÉRIES

La phase mobile aqueuse est sensible à la prolifération microbienne. Si des sous-produits bactériens (comme des parois cellulaires) entrent dans le système, ils vont se comporter comme des

particules, en colmatant la pompe et en conduisant à une accumulation de pression dans la colonne. Cela peut non seulement endommager votre équipement de chromatographie, mais également induire des données de mauvaise qualité du fait d'une augmentation du bruit de fond.

PARTICULES

Si vous utilisez une eau de mauvaise qualité ou des réactifs non HPLC pour préparer la phase mobile, vous risquez d'introduire des particules qui, en retour, apparaîtront sous forme de ligne de base bruyante sur le chromatogramme. L'accumulation de particules peut également conduire à une augmentation de la contre-pression du système du fait du colmatage de la colonne. Par conséquent, cela pourrait endommager la colonne et le système HPLC.

Dépannage

Chromatographie en phase liquide

Pour prolonger la durée de vie de vos systèmes de chromatographie et garantir une précision optimale des données, vous devez utiliser de l'eau ultrapure de Type I+ tout au long du procédé.

Ceci est tout particulièrement important lors de la préparation de la phase mobile, qui ne doit jamais inclure que des réactifs de qualité HPLC (comme de l'acétonitrile) et de l'eau. Si un réactif est contaminé à un moment ou à un autre, ou s'il est périmé, vous devez éliminer le lot. Il est également important de veiller à homogénéiser soigneusement votre phase mobile.

L'utilisation d'une eau fraîchement préparée dans un appareil de laboratoire réduit les risques de contamination, car celle-ci a plus de chances de se produire en cas d'utilisation d'une eau qui a été stockée pendant une période prolongée. Cela dit, vous devez remplacer régulièrement les consommables pour éviter que les contaminants ne s'accumulent et ne soient libérés. Nous vous recommandons également d'éliminer les deux premiers litres d'eau lorsque vous prélevez de l'eau ultrapure fraîchement préparée pour la chromatographie, car cela réduit le risque de pénétration dans le système de contaminants provenant des filtres.

L'eau ultrapure est un excellent solvant, elle extrait les contaminants des récipients. C'est pour cette raison que vous devez également éviter d'utiliser des tuyaux et des récipients de stockage en plastique, car les phtalates peuvent être relargués dans l'eau purifiée.

Nous conseillons de toujours utiliser des récipients en verre pour stocker votre eau. Même s'ils peuvent malgré tout libérer des

ions avec la solution, vous pouvez limiter le risque de contamination en nettoyant correctement vos récipients en verre. Cela signifie que vous devez uniquement laver et rincer les récipients en verre avec des solvants de phase mobile et de l'eau ultrapure. Si un nettoyage plus rigoureux est nécessaire, utilisez des ultrasons avec 10 % d'acide formique ou d'acide nitrique, puis de l'eau, puis du méthanol ou de l'acétonitrile, puis à nouveau de l'eau (en répétant ce procédé deux ou trois fois si nécessaire).

N'utilisez pas de détergents, car les résidus (comme le polyéthylène glycol) pourraient contaminer la verrerie et l'HPLC. Après le nettoyage, aucun autre élément que du solvant ne doit entrer en contact avec la surface interne : ne laissez pas sécher les récipients en verre sur des égouttoirs et assurez-vous qu'ils sont lavés et stockés à l'écart des récipients en verre utilisés pour d'autres procédures expérimentales.

L'eau ultrapure absorbe également les contaminants de l'atmosphère. Par conséquent, pour empêcher les bactéries de pénétrer dans le système, vous devez préparer, dégazer et filtrer (0,2 µm ou 0,45 µm) votre phase mobile quotidiennement. Après les longues périodes d'arrêt, vous devez rincer l'ensemble du système avec de l'eau et du solvant organique adapté (comme de l'acétonitrile ou du méthanol). Le stockage du système en eau peut également entraîner une contamination microbienne. Si votre système de chromatographie est contaminé par des bactéries, vous devez passer tous les récipients à l'autoclave et remplacer les filtres et tuyaux. Nous vous suggérons également de purger le système dans du méthanol ou de l'acétonitrile pendant une nuit. ☺



NOUS CONTACTER

Découvrez comment ELGA peut vous permettre de mieux contrôler les contaminants dans votre eau pure et ultrapure.



LISTE DE CONTRÔLE POUR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE



- Utilisez de l'eau ultrapure de Type I+
- Évitez toute pénétration de contaminants atmosphériques
- Ne stockez pas les réactifs pendant de longues périodes
- Utilisez des réactifs de qualité HPLC
- Homogénéisez la phase mobile
- Assurez-vous que la phase mobile n'est pas absorbée
- Utilisez des méthodes de nettoyage appropriées pour les récipients en verre
- Changez régulièrement les filtres du système de chromatographie
- Utilisez de l'eau filtrée sur place plutôt que de l'eau en bouteille/stockée
- Remplacez les consommables

Culture cellulaire

La culture de cellules implique de cultiver des cellules en dehors de leur environnement naturel, selon un ensemble de conditions contrôlées. De plus, tous les travaux sont réalisés en utilisant des techniques aseptiques sous une hotte à flux laminaire stérile. Si des impuretés parviennent à s'introduire dans vos cultures, cela peut induire un certain nombre d'effets secondaires indésirables, dont une faible croissance cellulaire ou une mortalité cellulaire, et potentiellement conduire à des données imprécises.

L'eau est utilisée lors de nombreuses étapes tout au long du procédé de culture. Cela inclut la préparation des milieux et des solutions de lavage, ainsi que le nettoyage des récipients en verre. L'eau est également impliquée moins directement, par exemple, lorsque des solutions sont portées à la bonne température

dans des bains-marie, et elle peut également se retrouver dans le réservoir de l'incubateur.

Voici quelques problèmes pouvant survenir dans un laboratoire de culture de cellules si votre eau est contaminée, ainsi que certaines étapes à suivre pour limiter le risque que cela ne se produise.

Problèmes et causes

Culture cellulaire

FAIBLE CROISSANCE CELLULAIRE OU MORTALITÉ CELLULAIRE

Les problèmes les plus fréquents dans la culture de cellules sont la faible croissance cellulaire ou la mortalité cellulaire. Cela peut ruiner des mois de travail et retarder votre avancement, mais également conduire à la génération de données erronées. Cela peut constituer un défi spécifique si votre expérience implique de déclencher et de mesurer un déclin de la viabilité. Il existe un certain nombre d'impuretés couramment détectées dans l'eau, qui peuvent entraver la croissance cellulaire, comme les endotoxines, les ions métalliques et d'autres impuretés.

IONS MÉTALLIQUES ET IMPURETÉS

Les ions métalliques peuvent se retrouver dans l'eau utilisée pour créer les milieux et laver les récipients en verre. L'eau hautement purifiée est également un solvant agressif, qui peut libérer des ions métalliques toxiques issus des récipients en verre et des pipettes/embouts, ou encore des plastifiants provenant des tuyaux ou des cuves en plastique. De plus, la vapeur dans les autoclaves contient souvent des additifs visant à limiter l'accumulation de tartre (qui pourrait à terme se déposer sur vos récipients en

verre, avant de se retrouver dans votre culture).

ENDOTOXINES

Les endotoxines sont des pyrogènes présents dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles peuvent pénétrer dans les cultures de cellules par le biais de l'eau, des sérums ou d'autres additifs de culture. Les endotoxines peuvent susciter une puissante réponse immunitaire et elles affichent une réactivité biologique élevée. Par conséquent, elles peuvent influencer la croissance de la culture et conduire à la variabilité expérimentale ; si vous suspectez une contamination, vous devez donc, effectuer un test du lysat d'amibocyte de limule (LAL).

CULTURES CONTAMINÉES

Des contaminants comme des bactéries, des moisissures, des levures et des champignons peuvent tous pénétrer dans les cultures de cellules par le biais de l'eau. Certains d'entre eux sont faciles à repérer à l'œil nu. Mais certains peuvent ne pas être détectés, même par un examen sous un microscope. Nous vous recommandons donc de surveiller régulièrement vos cultures.

BACTÉRIES, MOISSISSURES ET LEVURES

Les contaminants biologiques se retrouvent partout, même dans l'eau. Une fois qu'ils ont

pénétré dans votre culture de cellules, ils disposent de conditions de prolifération optimales et les problèmes qu'ils peuvent causer risquent de gagner rapidement en intensité. Ils conduisent souvent à des modifications de la turbidité ou du pH. Cette deuxième modification altère la couleur de la culture en la faisant passer du rouge au jaune (si votre milieu contient un indicateur rouge de phénol). Toutefois, toutes les modifications ne sont pas facilement détectables. Certaines, comme la contamination par mycoplasme, peuvent être difficiles à déceler, surtout si les organismes contaminants ont une croissance lente.

CHAMPIGNONS GÉNÉRANT DES SPORES

Dans bon nombre de laboratoires, les bains-marie servent à décongeler des réactifs pour culture de cellules, comme les sérums, ou à porter le milieu à la bonne température avant de l'ajouter aux cellules. L'eau présente dans le plateau de l'incubateur permet de maintenir un environnement humide dans l'incubateur. Si l'eau que vous utilisez pour remplir les bains-marie et les plateaux est contaminée, cela pourrait alors conduire à la dispersion de champignons générant des spores par le biais des ventilateurs de l'incubateur et des hottes à flux laminaire.



Solutions

Culture cellulaire

Les contaminants biologiques peuvent persister pendant de longues périodes. Par conséquent, une bonne pratique consiste à surveiller régulièrement votre eau et vos cellules, pour éviter que ces contaminants ne compromettent vos expériences. Vous pouvez détecter des contaminants biologiques à l'aide de méthodes comme l'établissement du caryotype, l'électrophorèse, le test de la turbidité, des tests immunologiques ou l'identification génétique.

Une bonne idée est également de garder des registres corrects des équipements, des solutions, des milieux et des fournitures, car ils peuvent vous permettre d'identifier la source du problème si les choses devaient mal tourner. De plus, il est important que vous testiez l'intégralité des nouveaux réactifs, milieux, sérums et eaux en plus de la réalisation des contrôles de maintenance de routine sur les incubateurs, les hottes, les bains-marie et les systèmes de purification de l'eau.

Le respect de bonnes pratiques aseptiques et un programme de nettoyage régulier peuvent considérablement limiter les risques de contamination de vos cultures de cellules. Vous devez vous assurer que seule de l'eau stérile est utilisée lors du remplissage du réservoir de l'incubateur et, si possible, essayez d'éviter d'utiliser les bains-marie complètement. L'utilisation d'autoclaves et d'antibiotiques peut également permettre de résoudre une contamination, même si cela peut avoir d'autres effets indésirables sur votre dispositif expérimental.

La pureté de l'eau est essentielle pour garantir la réussite dans un laboratoire de culture de cellules, nous vous recommandons donc d'utiliser de l'eau ultrapure Type I+. Il est également important que les systèmes de purification de l'eau soient bien entretenus et que les consommables soient remplacés régulièrement pour garantir la qualité permanente de l'eau. Ceci tout particulièrement important pour les résines échangeuses d'ions, car elles peuvent abriter des bactéries qui produisent des endotoxines. ☹

LISTE DE CONTRÔLE DE LA CULTURE CELLULAIRE



- Utilisez de l'eau ultrapure de Type I+
- Surveillez la qualité de l'eau
- Gardez des registres corrects
- Testez les nouveaux réactifs
- Nettoyez l'incubateur et utilisez de l'eau stérile dans le réservoir
- Nettoyez le bain-marie et évitez de l'utiliser si possible
- Utilisez de l'eau purifiée sur place plutôt que de l'eau en bouteille/stockée
- Remplacez les consommables

Biologie moléculaire

La biologie moléculaire inclut généralement la synthèse, la modulation et l'étude des molécules comme l'ARN, l'ADN et les protéines. Par conséquent, vous devrez extraire des molécules avant de pouvoir les analyser en utilisant des techniques comme la PCR quantitative (qPCR), la PCR en point final, la transcription in vitro, la ligation, la précipitation de la chromatine, l'électrophorèse, le western blot, etc.

Des facteurs comme une mauvaise conception d'amorce, des conditions de cycle thermique sous-optimales et une mauvaise utilisation des tampons peuvent influencer le résultat de bon nombre de ces procédures. De plus, une mauvaise qualité de l'eau peut introduire un certain nombre d'impuretés potentiellement dangereuses, notamment des enzymes de dégradation, des ions, du $MgCl_2$ et de l'ADN étranger. Cela peut induire l'échec des extractions, une amplification non spécifique ou ratée, et des dommages pour l'équipement.

Tandis que la biologie moléculaire fait appel à un nombre considérable de techniques, nombreuses sont celles qui reposent sur la détection d'un produit traité sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide. Ainsi, nous avons concentré notre propos sur l'extraction de produits ou de molécules matrices, l'amplification des produits issus de l'ARN/ADN et l'analyse des produits par électrophorèse sur gel ou qPCR.



Problèmes et causes

Biologie moléculaire

AUCUNE MATRICE EXTRAITE

La plupart des expériences de biologie moléculaire se concentrent sur les molécules d'ARN, d'ADN ou de protéines. L'eau est utilisée tout au long du procédé d'extraction de ces facteurs des tissus, cellules et systèmes in vitro. Par conséquent, il est important que votre eau soit exempte de contaminants pour garantir la poursuite sans problème de vos procédés expérimentaux.

ENZYMES DE DÉGRADATION

Les enzymes de dégradation incluent les nucléases (ribonucléases et désoxyribonucléases) et les protéases, qui ciblent et détruisent respectivement l'ARN, l'ADN et les protéines. Si votre eau contient ces enzymes, elle peut empêcher le processus d'extraction et détruire la matrice, surtout si vous utilisez l'eau comme éluant ou comme élément d'un tampon de remise en suspension.

PROBLÈMES D'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

Il est courant de traiter les produits PCR sur un gel avant de réaliser des expériences comme le séquençage ou le clonage. De même, les protéines sont souvent présentées sur un gel pour un

transfert Western, avant d'être transférées sur une membrane pour la coloration des anticorps.

L'électrophorèse sur gel fonctionne en appliquant un courant électrique dans un réservoir rempli de tampon, pour encourager l'échantillon chargé négativement à aller vers l'électrode positive et à se séparer en fonction de la taille moléculaire.

Les tampons de préparation et de transfert sont réalisés avec de l'eau, il est donc important de vous assurer que celle-ci est exempte d'impuretés, comme des ions, qui pourraient sans cela interrompre le processus d'électrophorèse dans votre réservoir de gel.

IONS

Les ions, souvent présents dans l'eau de pureté médiocre, peuvent interrompre le débit du courant électrique. S'ils sont présents en grandes concentrations dans un tampon, votre gel ne fonctionnera pas correctement et cela pourrait en retour entraîner le brûlage du réservoir de gel et de mauvais résultats.

AUCUNE AMPLIFICATION EN EFFECTUANT UNE PCR

Il est souvent nécessaire d'amplifier l'ADN et l'ARN au moyen d'une PCR et d'une transcription inverse pour analyse. Ces procédés reposent sur une matrice intacte et l'utilisation d'une enzyme de polymérase, comme la Taq, pour une amplification réussie. Ainsi, il est important que l'eau que vous utilisez lors de la préparation du tampon de réaction soit exempte de contaminants.

ENZYMES DE DÉGRADATION

Si l'eau que vous utilisez dans le mélange réactionnel contient des enzymes comme des nucléases, celles-ci vont dégrader la matrice. De plus, des protéases pourraient détruire la polymérase, détériorant alors sa capacité à amplifier la matrice (Figure 12).

Figure 12 : illustration d'un gel d'agarose montrant différents types d'erreur qui se produisent en cas d'utilisation d'une eau de mauvaise qualité pour la PCR.



TAILLES DE PRODUITS INCORRECTES ET TRAÎNÉES DE GEL LORS DE LA RÉALISATION D'UNE PCR

Les erreurs d'amplification peuvent être nuisibles et compromettre votre recherche en aval. Elles se présentent souvent sous la forme de dimères d'amorce et proviennent d'une mauvaise conception de l'expérience.

Dans ce document, nous évoquons la manière dont les impuretés de l'eau, comme le $MgCl_2$ et les nucléases, peuvent générer des tailles de bande incorrectes et des traînées de gel (voir la Figure 12 par exemple).

$MgCl_2$

Le $MgCl_2$ est un cofacteur essentiel pour la fonction de polymérase. Toutefois, même s'il peut vous aider à booster l'activité de la polymérase dans votre PCR, c'est souvent aux

dépens de la spécificité. Par conséquent, si vous ajoutez par inadvertance trop de $MgCl_2$ au mélange réactionnel par le biais d'une alimentation en eau contaminée, vous risquez d'obtenir une amplification non spécifique, qui apparaîtra comme des traînées ou des produits inattendus dans votre gel.

NUCLÉASES

La dégradation de la matrice peut induire l'amplification de l'ADN fragmenté dans certains cas. Dans d'autres cas, le produit est généré, mais il commence à se dégrader. Dans les deux cas, une traînée apparaît quand vous réalisez une électrophorèse sur gel.

CONTAMINATION DU CONTRÔLE DU RÉACTIF D'AMPLIFICATION LORS DE LA RÉALISATION D'UNE PCR

Des expériences bien conçues incluent un contrôle négatif

ou « vide ». Cela garantit que vos résultats sont valables et que ce ne sont pas un événement d'amplification imprévu, déclenché par des facteurs inattendus comme la contamination de l'ADN.

Un contrôle habituel ne contient aucun réactif d'amplification et il implique souvent le remplacement de l'échantillon (ou du réactif d'amplification) par de l'eau dans le mélange réactionnel. Vous risquez de rencontrer des difficultés si l'eau que vous utilisez est contaminée par un ADN étranger, comme celui de bactéries.

Après un nombre suffisant de cycles, le problème va s'amplifier et apparaître dans vos échantillons et vos contrôles (cf. Figure 12 et Figure 13). Il risque également d'entrer en concurrence avec le réactif d'amplification de votre choix, de limiter la précision de vos données et diminuer l'efficacité générale de votre équipement.

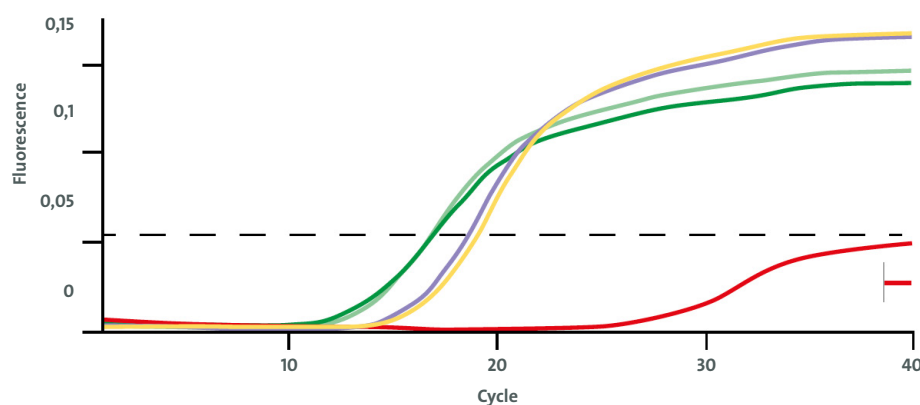


Figure 13 : illustration d'un graphique qPCR classique montrant l'amplification du contrôle du réactif d'amplification (NTC, rouge).

Solutions

Biologie moléculaire

Les applications de biologie moléculaire sont sensibles à un certain nombre d'impuretés de l'eau. Par conséquent, il vaut mieux utiliser de l'eau ultrapure de Type I+, stérile, sans nucléase et traitée par DEPC, pour toutes vos applications impliquant de l'ARN, de l'ADN et des protéines. Cela doit inclure la préparation des tampons de réaction, des blancs et de l'élution de matrice. Il est également vital que vous conserviez toutes vos solutions dans la plage de pH adéquate afin de préserver l'échantillon.

En ayant pris des mesures pour vous assurer d'utiliser l'eau de la meilleure qualité possible, vous devez aliquoter votre eau pour la protéger contre

l'utilisation répétée d'une source d'eau contaminée. Vous pouvez également limiter considérablement le risque de contamination si vous utilisez des embouts avec filtre, car ceux-ci agissent comme une barrière physique pour les contaminants en aérosol. De plus, le travail sous une hotte ou dans une zone dédiée peut permettre de prévenir davantage la contamination croisée.

Enfin, vous devez utiliser de l'eau purifiée de Type I pour la préparation de tampons d'électrophorèse, car sa qualité est suffisante pour garantir le débit ininterrompu du courant électrique dans le réservoir et la réaction homogène de votre gel. ☺

LISTE DE CONTRÔLE DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



- Utilisez de l'eau ultrapure de Type I+ traitée par DEPC pour la PCR et les matrices
- Utilisez de l'eau pure de Type I pour l'électrophorèse
- Utilisez des embouts avec filtre
- Travaillez dans une zone ou sous une hotte dédiée
- Utilisez de l'eau purifiée sur place plutôt que de l'eau en bouteille/stockée
- Remplacez les consommables

Conclusion

Comme nous l'avons mentionné, les impuretés de l'eau peuvent compromettre votre recherche, notamment pour les applications sensibles. Par conséquent, une meilleure compréhension des problèmes potentiels permet de résoudre les difficultés qui se présentent, mais également d'empêcher au préalable qu'elles ne se produisent. Porter une attention toute particulière à la qualité de votre eau lors de la préparation et de la réalisation d'expériences, mais aussi respecter les BPL vous permettra de réaliser des expériences positives.

Outre la garantie de sélectionner la pureté de l'eau adéquate pour votre application et d'entretenir votre système de purification de l'eau, vous devez conserver un registre à jour des lots de réactifs de laboratoire et de leur utilisation, mais également surveiller les niveaux de pureté de l'eau et le remplacement des filtres. Vous pouvez alors être assuré que les données que vous générez sont précises et vous éviterez une multitude de problèmes par la suite.

« Porter une attention toute particulière à la qualité de votre eau vous permettra de réaliser des expériences positives. »

Une eau pure adaptée à avec tous vos besoins

Pour vous garantir d'obtenir le niveau correct de pureté de l'eau pour votre application, nous avons développé une gamme configurable : PURELAB® Chorus. Elle vous permet de concevoir un système parfaitement adapté à vos besoins actuels, mais elle offre également l'atout supplémentaire de la flexibilité si vos besoins devaient évoluer à l'avenir. Peu importe que vous ayez besoin d'eau pour une expérience HPLC sensible ou pour laver vos récipients en verre, une solution est disponible.

PURELAB® Chorus 1 distribue la pureté ultime de l'eau pour les applications critiques nécessitant une eau ultrapure de Type I et Type I+. PURELAB® Chorus 2 distribue une eau pure de Type II et de Type II+ OI/déionisée de base à partir d'une alimentation en eau potable du robinet. Pour une utilisation générale, PURELAB® Chorus 3 distribue une eau de niveau OI primaire à la demande. Ces systèmes peuvent distribuer différentes qualités d'eau à partir de différents points de distribution dans tout le laboratoire. Un système configurable va non seulement garantir que votre eau est adaptée à votre application,

mais il pourrait également vous faire économiser de l'argent en veillant à ce que vous n'utilisiez pas de l'eau ultrapure onéreuse lorsque ce n'est pas nécessaire.

De plus, les systèmes Chorus sont évolutifs et disposent de solutions de stockage modulables si vos futures exigences en termes de réservoir vont au-delà de vos besoins actuels. Outre le gain d'argent, ces systèmes ne compromettent pas l'espace disponible sur votre paillasse. En effet, les réservoirs peuvent être installés dans un placard ou montés au mur, et le distributeur Halo propose trois solutions de distribution et de surveillance à distance.

Assurez-vous que les solutions de purification de l'eau de votre laboratoire correspondent sur vos besoins. ☺

Cliquez ici pour en savoir plus sur notre gamme Chorus de systèmes de purification de l'eau.



Guide rapide



Problème	Causes possibles trouvées dans l'eau	Solution
Temps de rétention variable Perte de résolution Traînées de pics Dérive Bruit de ligne de base excessif Crêtes négatives Pics « fantômes » Contre-pression	Composés organiques Particules Bactéries	Utilisez de l'eau ultrapure de Type I+ - Utilisez un purificateur d'eau sur place plutôt que de l'eau en bouteille Utilisez des réactifs de qualité HPLC (eau/méthanol/acétonitrile) - Ne dépassez pas la date de péremption Utilisez des récipients de stockage en verre Évitez d'utiliser du plastique si possible Utilisez uniquement des récipients en verre dédiés, correctement nettoyés N'utilisez pas de détergents Empêchez toute pénétration de contaminants atmosphériques - Préparez, filtrez et dégazez la phase mobile quotidiennement - Rincez la phase mobile dans l'ensemble du système avant de commencer - Ne stockez pas le système en eau Assurez une phase mobile homogène Changez régulièrement l'eau et les filtres du système de chromatographie
Pics d'adduit	Ions métalliques	
Faible croissance cellulaire et mortalité cellulaire	Ions métalliques et impuretés Endotoxines	Utilisez de l'eau ultrapure de Type I+ Surveillez l'eau et les cellules en termes de contaminants biologiques
Cultures contaminées (par exemple, changements de turbidité, de couleur, etc.)	Bactéries Moisissures Levures Champignons	Gardez des registres corrects des réactifs, des équipements, du nettoyage, etc. Testez tous les nouveaux réactifs avant utilisation Faites preuve de bonnes pratiques aseptiques Assurez la pureté de l'eau pour les milieux et les solutions, mais aussi pour les bains-marie, les incubateurs et les autoclaves Nettoyez l'incubateur et les bains-marie régulièrement Utilisez de l'eau produite au point d'utilisation plutôt que de l'eau en bouteille/stockée Remplacez les consommables L'utilisation d'autoclaves et les antibiotiques peuvent permettre d'éliminer la contamination

Problème	Causes possibles trouvées dans l'eau	Solution
Extraction et manipulation d'ADN/d'ARN/de protéines		
Problèmes d'électrophorèse (par exemple, brûlage de réservoir, mauvaise qualité du gel)	Ions	Utilisez de l'eau de Type I pour les tampons du réservoir de gel
Aucune matrice extraite	Les nucléases et les protéases dégradent la matrice	Utilisez de l'eau ultrapure de Type I+, stérile et traitée DEPC Vérifiez que le PH du tampon de remise en suspension est correct
Aucune amplification Traînées de gel Taille de produit incorrecte	Les protéases dégradent la polymérase ou les protéines cibles Les nucléases dégradent l'ADN/ARN Le MgCl ₂ influe sur la spécificité	Utilisez des aliquotes d'eau Utilisez des embouts-filtres Travaillez dans une zone/sous une hotte dédiée
Contamination dans le « contrôle du réactif d'amplification » pour les réactions PCR	ADN étranger présent	

Note : ce tableau sert à souligner les situations dans lesquelles les impuretés de l'eau peuvent conduire à une erreur expérimentale. Toutefois, ces problèmes ne se limitent pas à l'eau et peuvent potentiellement provenir d'autres sources.

Références

1. Commission européenne (DG ENV), juin 2009. Rapport final, Étude sur les performances de l'eau dans les bâtiments (en anglais). <http://bit.ly/1iY3e0S>.
2. Good Campus, « Energy and Resource Efficiency » (en anglais). <http://bit.ly/1oZaHOZ>.
3. Organisation mondiale de la santé (OMS), 2009. « Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. » Deuxième édition. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf>.

Chez ELGA, nous sommes complètement spécialisés dans la conception, la maintenance et le support aux systèmes de purification de l'eau. Nous proposons aux scientifiques et aux chercheurs du monde entier des solutions fiables garantissant une certitude absolue quant à la qualité de l'eau pure et ultrapure pour leurs travaux.

Au sein de Veolia, la plus grande organisation environnementale au monde, nous nous dévouons à la fourniture de systèmes d'eau pure et ultrapure qui permettent à nos clients de travailler sans interruption.

Nous disposons d'une expérience considérable en matière de défis qui surgissent lors du développement, de l'installation et de l'entretien des systèmes standard de purification d'eau sur place, mais aussi de grands projets impliquant la consultation d'architectes, de consultants et des clients.

ENGAGEMENT ENVERS LA DURABILITÉ

Nous pouvons calculer l'équivalent carbone de tous nos produits, tout au long de leur durée de vie, et nous pouvons fournir cette information à nos clients et à nos partenaires.

NOUS CONTACTER

Les bureaux d'ELGA et ses distributeurs sont répartis dans plus de 60 pays et les équipes sont parfaitement formées sur tous les systèmes ELGA. Pour trouver votre représentant ELGA le plus proche, [contactez-nous !](#)

Ressourcer le monde

Veolia Water Technologies

L'Aquarène • 1 place Montgolfier • 94417 Saint-Maurice Cedex • France
tél. +(33) 0 1 45 11 55 55

www.veoliawatertechnologies.fr