



Culture cellulaire sans contamination

Stérilisation à l'air chaud et autres méthodes
– comparaison du point de vue de l'utilisateur

Résumé

Les contaminations sont un problème très courant dans le domaine des cultures cellulaires. Pour les éviter, il est indispensable d'adopter une bonne technique de travail stérile et de manipuler les cultures avec précaution. L'incubateur à CO₂ joue également un rôle important car il offre des conditions de croissance idéales pour les cultures cellulaires, mais aussi pour de nombreux microbes indésirables. C'est pourquoi tout bon incubateur possède plusieurs fonctions permettant d'éviter les contaminations. Pour autant, la décision d'acheter un incubateur à CO₂ ne peut pas se prendre uniquement sur la base des caractéristiques techniques cumulées. Il convient d'évaluer et de comparer les systèmes complets, en particulier les concepts anticontamination. Dans ce domaine, il apparaît que les systèmes complexes ne sont pas plus sûrs que les systèmes simples. L'appareil doit permettre d'éviter les contaminations de manière fiable, rapide, simple et sans dépenses excessives de consommables

Sommaire

2 Résumé

4 Importance du contrôle de la contamination lors des travaux sur cultures cellulaires

5 Définition des termes clés :
décontamination, stérilisation, désinfection

6 Mesures pour éviter les contaminations dans les incubateurs à CO₂

10 Sécurité des process, efficacité et coût des différents concepts de décontamination

13 Le concept BINDER pour minimiser le risque de contamination

14 Conclusions

15 Informations

Importance du contrôle de la contamination lors des travaux sur cultures cellulaires

Les contaminations microbiennes, causées par des bactéries, des champignons ou des virus, représentent un risque difficile à évaluer lors des travaux sur cultures cellulaires. Et comme ces contaminations n'apparaissent pas forcément au même rythme que la croissance cellulaire, elles sont souvent détectées trop tard. D'autres paramètres plus subtils altèrent le développement des cellules. Par exemple, le manque de certains nutriments essentiels et l'excrétion de métabolites microbiens entraînent une modification du pH, qui doit être de 7,4 pour les cellules humaines et de mammifères. Les infections à mycoplasmes, tant redoutées, peuvent susciter des changements de la morphologie des cellules hôtes ou même des modifications génétiques sans autre effet perceptible. Dans les cas extrêmes, un seul germe peut anéantir des semaines, voire des mois de recherche.

Il existe de nombreuses voies de contamination allant de l'utilisation de lignées cellulaires, milieux, sérums ou autres réactifs déjà contaminés à la transmission par le personnel de laboratoire, en passant par des germes présents dans l'air ou une désinfection insuffisante du matériel. Et comme la vérification de la présence éventuelle de germes implique des procédures complexes et fastidieuses, il est essentiel de prendre des mesures efficaces pour contrôler les contaminations.

Les progrès considérables réalisés dans le domaine des cultures cellulaires sensibles, à l'image de l'ingénierie tissulaire ou des thérapies tissulaires et cellulaires régénératives, ont renforcé les exigences en matière d'hygiène pour les incubateurs à CO₂. L'ensemble du processus doit aujourd'hui répondre à des normes élevées de perfection et de fiabilité dont l'incubateur à CO₂ constitue un maillon central. Dans toutes les thérapies à base de cellules, par exemple une suspension de chondrocytes autologues destinés à être réimplantés chez un patient, le problème réside dans le fait que le produit final ne peut pas être stérilisé. Pour cette raison, des directives comme les Bonnes pratiques de fabrication (BPF, en anglais GMP)¹, les Bonnes pratiques de culture cellulaire du GCCP² et la directive européenne sur le don de cellules et de tissus humains³, entre autres, recommandent l'utilisation de matériel stérile à usage unique ou d'équipements stérilisables pour la manipulation des cellules et tissus humains. Des conditions stériles doivent pouvoir être assurées pendant toute la période de culture des cellules, essentiellement car en plus du risque de dispersion de la contamination, une infection menaçant la vie du patient peut se développer.

Définition des termes clés : décontamination, stérilisation, désinfection

Dans un premier temps, il convient de définir les termes décontamination, désinfection et stérilisation dont l'emploi est fréquent.

Décontamination est un terme générique qui désigne l'élimination des contaminants dangereux, qu'ils soient biologiques, chimiques ou radioactifs. Ce terme ne permet pas de tirer des conclusions précises quant à l'efficacité de l'opération.

La **désinfection** joue un rôle majeur dans l'asepsie médicale. On parle de désinfection lorsqu'on obtient une réduction des germes de 10^5 dans le cadre d'une procédure de test définie, c'est-à-dire que sur 100 000 germes initialement présents, un a survécu au maximum.

La **stérilisation** désigne l'élimination de tous les micro-organismes. La stérilisation totale n'étant pas garantie à 100 % dans la pratique, différentes pharmacopées s'accordent sur le fait qu'après une stérilisation efficace, au maximum une unité sur un million de germes formant des colonies doit subsister. Avec ce résidu négligeable, la stérilisation – contrairement à la désinfection – offre une grande sécurité.

Concernant le mode opératoire et la démonstration de l'efficacité des méthodes de désinfection et de stérilisation⁴, plusieurs directives et normes sont notamment appliquées dans l'industrie pharmaceutique et le secteur clinique à l'échelle mondiale. Les pharmacopées indiquent en principe les méthodes « classiques » de stérilisation par chaleur humide (autoclave), par chaleur sèche (stérilisateur à air chaud), par fumigation à l'oxyde d'éthylène et par filtration. L'adéquation d'une méthode spécifique dépend du cas d'utilisation et doit être validée avec des souches bactériennes définies.

Mesures pour éviter les contaminations dans les incubateurs à CO₂

La nécessité de créer un environnement stérile pour la culture de cellules vivantes dans un incubateur à CO₂ pose un défi technique de taille. En effet, les conditions de croissance optimales dans un incubateur favorisent également le développement de micro-organismes indésirables.

Un concept de contrôle de la contamination dans un incubateur à CO₂ doit intégrer les aspects critiques suivants :

- Chambre intérieure adaptée à une désinfection périodique par pulvérisation et essuyage, cette méthode courante représentant un important moyen de réduire le nombre total de germes, c'est-à-dire la charge microbienne de l'incubateur à CO₂.
- Dispositif permettant d'éliminer totalement les contaminants potentiels grâce à un procédé de stérilisation simple et efficace apte à supprimer toutes les sources de contamination à intervalles réguliers ou en cas de besoin.
- Limitation des éléments encastrés tels que les conduits d'aération, les ventilateurs ou supports d'étagères. Ces systèmes constituent des nids de contamination, sont fastidieux à nettoyer et doivent être retirés avant la stérilisation.
- Prévention de la condensation dans l'espace d'incubation, les environnements humides favorisant le développement des germes.
- Prévention de la transmission des germes présents dans l'air, qu'on retrouve même dans une certaine proportion lors des travaux réalisés en salle blanche.

Mesures pour éviter les contaminations dans les incubateurs à CO₂

Pour éviter les contaminations, les fabricants d'incubateurs à CO₂ ont mis au point des fonctions très différentes avec des process parfois complexes ou ont adapté des concepts existants aux exigences des incubateurs à CO₂. Il convient de distinguer les mesures de décontamination, qui sont mises en œuvre périodiquement ou en cas de besoin et immobilisent temporairement l'appareil, et les fonctions permettant de réduire la probabilité de contamination de manière permanente. Le Tableau 1 présente les mesures et les procédés les plus courants.

Décontamination en fonction des besoins	Protection permanente contre la contamination
Chaleur sèche à 160 – 180 °C	Surfaces minimisées, sans joints
Chaleur sèche à 120 – 140 °C	Limitation de l'humidité
Chaleur humide à 90 – 95 °C	Matériau de surface bactéricide
Fumigation au peroxyde d'hydrogène	Filtration de l'air par un filtre HEPA
Irradiation UVC	Irradiation UVC

Tableau 1 : Mesures et procédés permettant de minimiser le risque de contamination

La **stérilisation à l'air chaud** à des températures de **160 à 180 °C** est le seul des procédés cités ci-dessus à être conforme aux directives de stérilisation des dispositifs pour applications médicales ou pharmaceutiques (Tab. 2). Le programme de stérilisation d'un incubateur comporte trois phases : chauffage à la température maximale, qui doit être atteinte en tout point de la chambre intérieure de l'incubateur, maintien à la température maximale afin d'inactiver efficacement les matières biologiques, puis refroidissement à 37 °C afin de préparer l'appareil pour la prochaine incubation. Il a été démontré que les programmes de stérilisation à l'air chaud des incubateurs à CO₂ éliminent totalement les germes d'essai prescrits⁵.

Différentes normes et pharmacopées exigent des températures de stérilisation de 160 à 180 °C maintenues pendant une durée allant jusqu'à deux heures. Par conséquent, une stérilisation à l'air chaud pendant deux heures à 180 °C dépasse toutes les normes mondiales.

Mesures pour éviter les contaminations dans les incubateurs à CO₂

Norme	Température	Durée de stérilisation
Pharmacopée britannique	160 °C	60 min
Pharmacopée européenne	160 °C	120 min
Pharmacopée japonaise	160 – 170 °C	120 min
	170 – 180 °C	60 min
	180 – 190 °C	30 min
Pharmacopée nordique	180 °C	30 min
Pharmacopée américaine	170 °C	120 min
Association Dentaire Américaine	160 °C	120 min
ANSI/AAMI ST50	160 °C	120 min
DIN EN 556 (Stérilisation des dispositifs médicaux)	160 °C	120 min
	180 °C	30 min

Tableau 2 : Normes internationales pour la stérilisation à l'air chaud

Si l'utilisation de la **chaleur sèche à 120 – 140 °C** n'offre pas une stérilisation conforme aux normes, elle permet tout de même de réduire significativement le nombre de germes. Il a été démontré que l'air chaud à 140 °C entraîne une réduction de 10⁶ des spores de *Bacillus subtilis* var. niger⁶.

L'efficacité de la désinfection par **chaleur humide à 90 – 95 °C** n'est pas comparable à celle d'une stérilisation en autoclave avec une vapeur à 121 °C. Si le nombre de germes est considérablement réduit à 90 °C, beaucoup de spores résistantes à la chaleur, par exemple celles des bactéries *Bacillus subtilis* et *B. stearothermophilus*, ne sont pas totalement inactivées^{5,10}.

La vapeur de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est habituellement utilisée pour la décontamination des salles blanches⁷. La désinfection au H₂O₂ adaptée aux incubateurs à CO₂ nécessite ensuite une inactivation sûre et complète de la vapeur de H₂O₂ corrosive et cytotoxique, p. ex. par irradiation UVC.

Mesures pour éviter les contaminations dans les incubateurs à CO₂

Désinfection par **irradiation UVC** à 253,7 nm. L'effet mutagène des rayons UV a été prouvé; cependant, l'efficacité du procédé dépend de l'exposition directe à ces rayons car ils ont un pouvoir pénétrant limité. Par conséquent, cette méthode convient uniquement pour le traitement des surfaces. Une certaine efficacité a été démontrée pour le traitement de l'eau dans les systèmes d'humidification des incubateurs à CO₂⁸. Wallhäuber et. al. indiquent toutefois que l'effet des rayons UV diminue lorsque l'humidité relative de l'air est supérieure à 80 %⁴.

L'utilisation de **filtres HEPA** (High Efficiency Particulate Airfilter) avec un rendement défini est un procédé reconnu permettant de réduire la concentration en particules dans les salles blanches et les hottes de sécurité. L'air de l'incubateur à CO₂ est aspiré par un ventilateur à travers un filtre HEPA qui retient les particules d'une taille définie. Des études ont montré que ce procédé présente une certaine efficacité pour la protection permanente contre la contamination dans les incubateurs à CO₂⁹.

Les **surfaces en cuivre** libèrent par oxydation des ions de métaux lourds bactéricides qui empêchent le développement des bactéries dans les endroits humides. Cependant, les ions cuivre libérés sont aussi toxiques pour les cellules cultivées. L'efficacité des alliages cuivre/inox sur des germes d'essai sélectionnés a été démontrée par une série d'expériences⁸, mais la toxicité dépend directement de la teneur en cuivre de l'alliage¹².

Limitation de l'humidité : un incubateur à CO₂ doit présenter l'hygrométrie la plus élevée possible afin d'éviter l'évaporation du milieu, tout en empêchant toute condensation incontrôlée dans la chambre intérieure. Avec un système d'humidification passif utilisant une surface d'eau à découvert, comme c'est le cas dans la plupart des incubateurs à CO₂, il faut donc un dispositif de limitation de l'humidité. Dans l'idéal, on oriente la condensation de l'humidité excédentaire en un point précis facile à contrôler. Et les microbes ne peuvent pas se développer sur une surface sèche.

Conception simple : plus les éléments encastrés sont complexes et plus les surfaces cumulées dans la chambre intérieure sont importantes, plus le travail de nettoyage et le risque de contamination sont conséquents. De fait, la limitation des surfaces intérieures et la suppression des éléments encastrés constituent une mesure efficace pour éviter les contaminations de manière permanente

Sécurité des process, efficacité et coût des différents concepts de décontamination

En matière de gestion des contaminations, les principaux critères pour l'utilisateur final sont la facilité de manipulation, la sécurité des process, l'efficacité et le faible niveau des coûts induits. Vous trouverez ci-dessous un comparatif des mesures et procédés mentionnés précédemment (Tab. 3). Quatre concepts différents typiquement utilisés sur le marché sont examinés. Ils représentent chacun l'équipement maximal d'un type d'appareil.

	Décontamination périodique		Décontamination permanente	Risque de contamination par		
				Ventilateur	Conduit d'aération	Supports d'étagères
Concept 1	S 180 °C	10 – 12 h	–	Non	Non	Non
Concept 2	H 90 °C	25 h	–	Oui	Non	Oui
Concept 3	S 140 °C	12 – 14 h	Filtre HEPA	Oui	Oui	Oui
Concept 4	H ₂ O ₂	3 h	Irradiation UVC, Cu	Oui	Oui	Oui

Tableau 3 : Concepts de contrôle de la contamination (S=chaleur sèche, H=chaleur humide)

Le concept 1 est le seul à offrir une stérilisation sans compromis. Dix heures après le lancement du programme de stérilisation par simple pression d'un bouton, on obtient un incubateur prêt à l'emploi, propre d'un point de vue microbiologique et exempt d'organismes étrangers. Ce concept ne fait appel à aucun autre dispositif technique de lutte contre la contamination, mais la minimisation des surfaces et l'élimination des éléments encastrés réduisent considérablement le risque de contamination. La suppression du ventilateur limite les déplacements d'air dans la chambre intérieure, ce qui diminue le risque de transmission de germes présents dans l'air et rend un filtre à particules inutile. Ce système nécessite très peu de consommables, évite les procédures de décontamination longues ou complexes et induit des dépenses courantes très faibles, améliorant ainsi le confort d'utilisation de l'incubateur.

Avec ce concept, l'utilisateur peut se concentrer pleinement sur la culture cellulaire, et non sur l'incubateur à CO₂. Il offre un haut niveau de sécurité, des processus de travail simples et des coûts réduits.

Sécurité des process, efficacité et coût des différents concepts de décontamination

La chaleur humide utilisée dans le **concept 2** requiert une durée de stérilisation de plus de 24 heures. De plus, il est souvent nécessaire de réétalonner le système de capteurs de CO₂ après la procédure. Le condensat qui se forme dans la chambre intérieure lors du refroidissement de la vapeur d'eau risquant de recontaminer les surfaces traitées, le fabricant recommande de procéder en second lieu à une désinfection par pulvérisation et essuyage avec des chiffons stériles. Le ventilateur et les supports d'étagères augmentent le risque de contamination et le travail de nettoyage.

Au final, ce concept n'offre pas une grande sécurité pour un temps d'immobilisation maximal.

Le **concept 3** est basé sur un filtre à particules qui filtre en permanence les germes présents dans l'air, que l'on retrouve partout dans une certaine proportion. Ce filtre HEPA ne fait que « récupérer » les germes et les spores, qu'il faut ensuite éliminer en remplaçant le filtre. Plus l'utilisateur est consciencieux, plus les dépenses courantes associées à ce système sont importantes. La technique HEPA nécessite des ventilateurs et des conduits d'aération qui augmentent le risque de contamination et le travail d'entretien, ces dispositifs fastidieux à nettoyer constituant des nids pour les germes. En cas de besoin, il est possible de décontaminer la chambre intérieure avec de l'air chaud à 140 °C pendant 14 heures, mais il ne s'agit pas d'une stérilisation.

Ce concept semble offrir un haut niveau de sécurité car les germes présents dans l'air sont filtrés. Mais pour ce faire, il nécessite des composants qui favorisent la formation de nids de contamination.

Sécurité des process, efficacité et coût des différents concepts de décontamination

Le **concept 4** associe deux procédés reconnus issus de la technique de la stérilisation : la décontamination à la vapeur de peroxyde d'hydrogène et l'irradiation UV. La vaporisation de H_2O_2 est la méthode de décontamination la plus rapide. Comme elle n'implique pas de temps de chauffage ni de refroidissement, elle ne prend que trois heures. La procédure doit être réalisée par des employés formés pour éviter tout risque pour le personnel ou les cultures cellulaires. Le dispositif d'irradiation UV nécessaire pour inactiver le peroxyde d'hydrogène, corrosif et cytotoxique, décontamine également périodiquement le flux d'air, mais rend la chambre intérieure de l'incubateur plus complexe et plus fragile. Ce système requiert un ventilateur, ce qui augmente les déplacements d'air et favorise la contamination par les germes présents dans l'air. Les supports d'étagères et les conduits d'aération sont de véritables nids de contamination. Enfin, les dépenses liées aux réactifs H_2O_2 et aux lampes UV augmentent avec le soin apporté aux mesures de prévention des contaminations.

Ce concept est celui qui nécessite les techniques les plus perfectionnées pour le temps d'immobilisation le plus faible. En raison de sa complexité, il est plus sensible aux pannes et présente les dépenses courantes les plus élevées des quatre concepts étudiés.

Le concept BINDER pour minimiser le risque de contamination

Les incubateurs à CO₂ BINDER proposent un concept probant (voir concept 1) avec une procédure de désinfection simple et rapide et une autostérilisation facile. En éliminant les consommables coûteux tels que les filtres HEPA, les lampes UV ou le peroxyde d'hydrogène, ils favorisent une utilisation régulière sur le long terme. Le concept BINDER séduit par ses différentes caractéristiques associées :

- **Une procédure de désinfection plus simple** : la chambre intérieure sans soudures, sans joints, sans arêtes ni angles saillants et sans conduits d'aération ni éléments encastrés se nettoie et se désinfecte rapidement et facilement par pulvérisation et essuyage.
- **Une stérilisation sans compromis** : la procédure d'autostérilisation avec de l'air chaud à 180 °C, dont l'efficacité a été prouvée, satisfait aux directives internationales sur les dispositifs médicaux. La sonde de CO₂ moderne avec technologie IR précise reste dans l'appareil et est donc également stérilisée (nouvelle série CB).
- **Une minimisation radicale des surfaces** : la suppression d'éléments encastrés tels que les supports d'étagères, les conduits d'aération, les ventilateurs, les filtres HEPA et les lampes UV permet de réduire au minimum les surfaces sur lesquelles les microbes et les spores peuvent se fixer dans l'espace d'incubation.
- **Une absence totale de condensation** : le système d'humidification à double cuve breveté génère un haut niveau d'humidité limité à 95 % grâce un point froid. Ainsi, les parois intérieures restent sèches jusque dans les coins.

Conclusions

Les publications actuelles¹¹ mettent en avant la durée totale de la procédure de décontamination ainsi que la nécessité d'une décontamination permanente. Pour autant, la durée effective du process, les coûts de remplacement des composants, qui nécessitent un entretien important, le temps de travail associé et la fragilité du système sont des aspects à ne pas négliger.

Cet exposé compare différents concepts anticontamination pour les incubateurs à CO₂ du point de vue de l'utilisateur. S'il est impossible d'éviter toute contamination, l'utilisateur dispose de moyens plus ou moins complexes pour réaliser une culture cellulaire dans de bonnes conditions. L'appareil doit être simple, solide, fiable et sûr à long terme. Les efforts déployés pour y parvenir dépendent dans une large mesure de l'utilisation d'un concept probant pour éviter les contaminations.

Informations

| Auteur

Le Dr Jens Thielmann est biologiste et chef Produit Croissance & Stockage chez BINDER GmbH. Il est responsable des différents incubateurs utilisés dans la recherche médicale, scientifique et pharmaceutique pour l'incubation de bactéries ou de cultures cellulaires, ainsi que des congélateurs à très basse température pour le stockage à long terme d'échantillons sensibles.

| Profil de l'entreprise

BINDER est le spécialiste mondial des chambres de simulation pour les laboratoires scientifiques et industriels. Grâce à ses solutions techniques, la société contribue pour une grande part à améliorer durablement la santé et la sécurité des êtres humains. Notre gamme de produits convient aussi bien aux applications courantes qu'aux travaux pointus en matière de recherche et de développement, de production et d'assurance qualité. Avec actuellement 400 employés et un taux d'exportation de 80 %, la société BINDER a réalisé un chiffre d'affaires de plus de 60 millions d'euros en 2013.

| Contact

BINDER GmbH
Im Mittleren Ösch 5
78532 Tuttlingen
Tel: +49(0)74 62-20 05-0
info@binder-world.com
www.binder-world.com

Informations

| Liste de recommandations internationales

British Pharmacopoeia Commission Methods of Sterilization. London, UK: App. X VIII, 2003

Pharmacopoeia Europea 7th Edition, 2010

Pharmacopée japonaise www.jpdb.nihs.go.jp/jp14e

Pharmacopée nordique, référence en ligne via www.dekker.com

Pharmacopée US www.usp.com

American Dental Association www.ada.org

Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) www.aami.org

Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) www.din.de

| Bibliographie

¹ Leitfaden für die Gute Herstellungspraxis, EU-GMP Leitfaden ISBN-10: 3-934971-24-5
Maas & Peither GMP-Verlag

² S. Coecke et. al., Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture (GCCP), ATLA 33, 261-287, 2005

³ Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains

⁴ K.H. Wallhäußer Praxis der Sterilisation, Desinfektion – Konservierung, Keimidentifizierung – Betriebshygiene, 5. Auflage, 1995

⁵ P. Distler, 180 °C Hot air sterilization: a safe method against microbiological contamination in CO₂ incubators Lab Asia, novembre 2003, p. 11

Informations

| Bibliographie

- ⁶ J. Dalamasso, APEX Laboratories, Effective Heat Sterilization in CO₂ Incubators, Vol. 4, Nr. 3, Thermo Electron Corporation's Heat Sterilization White Paper, 2003
- ⁷ D.M. Carlberg, Cleanroom Microbiology for Non-Microbiologists, CRC Press, 2005
- ⁸ H. Basujima, D. Mistry, Technical Development Report, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd. A Comparative Analysis of Ultraviolet Light Decontamination versus High-Heat Sterilization in the Cell Culture CO₂ Incubator, with the Use of Copper-Enriched Steel Construction to Achieve Background Contamination Control™, 2007
- ⁹ A. Campbell, D. Figel, Importance of Class 100 Air in a CO₂ Incubator, Vol. 4, Nr. 1, Thermo Electron Corporation's Class 100 Air White Paper, 2003
- ¹⁰ Bio safety Investigation Unit, CAMR, Efficacy of a CO₂ incubator heat disinfection cycle on dried microbes, 1998
- ¹¹ Schaffung eines sicheren Umfelds für Zellkulturen in biopharmazeutischen Anwendungen, White Paper Panasonic, Laborpraxis septembre 2013
- ¹² H.T. Michels, Anti-Microbial Characteristics of Copper; ASTM Standardization News, Oktober 2006; www.tellurex.com