

# CONGÉLATION DES CELLULES

## Primo

Pour bien réussir la congélation de ses cellules, il est TRÈS important que les cellules soient en phase exponentielle, pas trop confluentes. Elles doivent être en bonne santé, le pH du milieu bien rouge, pH 7.2-7.4, pas trop acide.

## Trypsination

Procédez comme pour faire un passage.

Enlevez le milieu et rincez avec du PBS

Enlevez le PBS et ajoutez un peu de trypsin (1.2 à 2 ml)

Laissez le temps aux cellules de se détacher facilement.

Séparez les cellules en les triturant (mouvement de va et vient dans le fond du pétris) plus ou moins fort selon le type cellulaire.

Arrêtez la trypsine en ajoutant une quantité de milieu complet (au moins la même quantité ou plus) et complétez à un volume fixe.

Exemple : si dans un pétris de 100mm vous avez trypsiné avec 1.5ml de trypsine et ajouté 8.5ml de milieu complet pour un total de 10ml

## Comptage des cellules

Cette étape permet d'établir la quantité de cryovials que nous allons avoir besoin à partir du ou des pétris que nous avons. La concentration idéale est de 4 à 6 millions de cellules par ml /par cryovial. Dans le cas ou vous auriez trop de cellules via la quantité de milieu de congélation, les cellules pourraient crever à cause d'un manque de nutriments qui les préservent. Dans le cas contraire, il n'y a pas assez de cellules (plus diluées), il n'y a pas vraiment de problème. Le seul inconvénient va se présenter lors de la décongélation. Les cellules, si trop diluées, ont de misère à survivre. Pour contrer ce problème, déposez-les dans un plus petit contenant, dans un plus petit volume de façon à les concentrer d'avantage. Nous savons, par expérience, que la quantité suggérée plus haut (4-6Millions de cellules) repartira facilement dans un pétris de 100mm ou un flacon de 75 cm<sup>2</sup>.

Revenons à nos moutons. Nos cellules sont dans un tube de 15ml dans un volume de 10ml. On prélève un aliquote qu'on dépose sur un hématocymètre. Attention de bien mélanger le tout avant de prendre votre aliquot pour qu'il s'agisse bien d'un mélange homogène. Une fois que vous aurez pris cette aliquote à l'aide de pipette pasteur ou de

tip, NE PAS RETOURNER LE RESTANT DANS LE TUBE, VOTRE HÉMATOCYMÈTRE N'EST PAS STÉRILE LUI. Vous êtes prêt à compter. La quantité que vous déposez doit entrer par capillarité et ne doit pas déborder. Faites le focus au petit objectif pour centrer le carré le plus subdivisé, puis tournez vers un plus gros pour avoir ce même carré dans tout votre champs de vision, soit 25 carrés (5X5) subdivisés en 16(4X4). Pour une mesure plus précise, comptez les deux parties de l'hématocymètre et faites la moyenne. S'il y a trop d'écart entre les deux, recommencez. Le nombre que vous obtiendrez X 10 000 sera la quantité de cellules par ml. Multipliez ensuite par la quantité de volume pour avoir la quantité totale de cellules dans votre tube.

*Exemple : 200 cellules X 10 000 = 2 X 10<sup>6</sup> X 10ml = 20 X 10<sup>6</sup> soit 4-5 vials*

Vous devez maintenant centrifuger le tube pour concentrer les cellules et les resuspendre dans 4 ou 5 ml de milieu de congélation. Le tout doit congeler lentement soit 1°C/min. Mettre les tubes dans un support de styrofoam et ensuite déposez à -70°C, puis attendre un minimum de 24 heures pour le transférer dans l'azote liquide.

Bien identifier les tubes : type cellulaire, passage, mutant si, date, etc.

Le passage indiqué est soit celui d'avant, ou le passage suivant, peut importe, en autant que vous faites de la même façon à chaque fois, nous retenons que de congeler les cellules c'est la même chose que d'effectuer un passage. Que vous l'ajoutiez avant ou après importe peu, en autant que vous l'ajoutez.

## **Milieu de congélation**

Normalement, vous suivez les recommandations du fabricant (ATCC) ou sinon, on se prépare un milieu de base. Ce milieu contient entre 5 à 10% DMSO, le double de sérum utile normalement et votre milieu dans lequel les cellules poussent mais sans généticin ou autre antibiotique si possible (pen/strep) ne dérange pas beaucoup.

Voyons pour des 293 (HEK) 10% DMSO + 20% FBS + 70% DMEM. Ce milieu doit être assez frais préparé. Semble-t-il que le DMSO pourrait être contaminé si vous êtes plusieurs à utiliser la même bouteille, il serait bon de filtré la solution sur 22um.

## **Décongélation**

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

Effectuons maintenant la chose. On vide le contenu du cryovial dans une boîte de Pétri et lentement, pour le premier millilitre (1 ml/min), on y dépose le milieu complet, puis, plus rapidement pour le reste. Vous pouvez attendre simplement que les cellules s'attachent

(2-24 hres) et changer pour du milieu frais. Certaines cellules sont très sensibles au DMSO, comme les COS-1, il faudra changer le milieu après 2-3 heures maximum.

Sauvetage : Si vous avez eu des problèmes à la décongélation avec certains vials, que les cellules meurent et que vous soupçonné une contamination quelconque, il serait préférable de les centrifuger, de faire des lavages et de les resuspendre dans un milieu complet contenant un antibiotique sûr du genre ciprofloxacine ou plasmocin. Le principe étant que par les lavages, vous vous débarrassez des indésirables dès le départ et avec de la chance, sauvez le dernier vial qui vous reste. Un supplément de sérum (15%) apporte des facteurs d'attachement au milieu.

Dans le cas de cellules en suspension, on peut aussi re-suspendre les cellules (tube de 15 ml), attendre 30 minutes et centrifuger pour se débarrasser du DMSO restant.

C'est alors qu'il faut être patient et attendre que les cellules deviennent assez confluentes pour les passer. Idéalement, 1-3 jours seraient préférables pour bien permettre aux cellules de bien s'attacher, reprendre leurs fonctions normales avant de leur faire subir un autre stress. De toute façon, les cellules vont pousser mieux et plus vite lorsqu'elles sont concentrées que si on décidait de les passer le lendemain de la décongélation. Donnez-leur une chance!

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