

Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales

Bulletin technique



CORNING

Life
Sciences

*John Ryan, Ph.D.
Corning Incorporated
Life Sciences
Lowell, MA 01851, USA*

Sommaire

Introduction	1
Avantages de la congélation de cultures cellulaires .	2
Principes de la congélation de cellules	2
Aspects pratiques de la congélation de cellules	3
Références	10

Introduction

Maintenir en bonne santé des cultures de cellules en croissance est une tâche exigeante rendue encore plus difficile par le risque omniprésent de leur perte par accident ou contamination. De plus, les cultures de cellules en croissance active ne sont pas statiques mais, comme toutes les populations de microorganismes, soumises à des modifications liées à l'âge ou induites par l'environnement qui peuvent conduire à leur évolution et à leur perte potentielle.

La conservation cryogénique permet de minimiser ces problèmes en stoppant l'horloge biologique des cultures cellulaires, les plongeant efficacement dans une activité réellement suspendue. Ce concept, longtemps un des stratagèmes favoris des écrivains et producteurs de cinéma de science-fiction, est devenu réalité depuis l'importante découverte de Polge, Smith et Parkes (11) en 1949 selon laquelle le glycérol protège les cellules des lésions causées par la congélation. De nombreux protocoles dignes de recettes de cuisine sont maintenant disponibles pour congeler des cellules, et ces procédures fonctionnent généralement bien (3, 6, 13-16). Il est essentiel, cependant, lorsque des problèmes surgissent ou que les protocoles nécessitent une adaptation et des améliorations, de bien comprendre les concepts sous-jacents sur lesquels ils sont basés. Ce guide examine les concepts théoriques de base et les aspects pratiques nécessaires pour réussir la congélation de cellules animales et pour gérer une banque de cellules.

Avantages de la congélation de cultures cellulaires

- Moins de travail-économise du temps et de l'argent.
- Sert de réserve de secours en cas d'urgence
- Fournit une population plus homogène en minimisant le vieillissement et l'évolution de la culture.

Avantages de la congélation de cultures cellulaires

La maintenance des cultures de cellules nécessite peu de temps et d'effort lorsqu'elles sont correctement congelées et conservées. Le seul réel coût sont les dépenses de maintenance d'un congélateur mécanique ultra-froid (-130°C ou moins) ou d'une alimentation en azote liquide. Ces dépenses limitées valent très largement le temps, l'effort et le coût substantiel des milieux et fournitures nécessaires au maintien en activité de cultures en croissance active, ou le coût d'une nouvelle culture obtenue à partir d'une banque. Les cultures congelées sont une source importante de réserve de secours pour remplacer les pertes occasionnelles dues aux contaminations ou aux accidents, et assurent une alimentation homogène de cultures. Des changements ou altérations cellulaires surviennent dans toutes les populations en croissance active. Ces changements entraînent souvent la perte de caractéristiques importantes pendant l'évolution des cultures, introduisant ainsi des variables indésirables dans les expériences de longue durée. Les cultures conservées par cryogénéisation ne subissent apparemment aucune modification décelable une fois conservées en dessous de -130°C (1, 8). Par conséquent, les effets biologiques du vieillissement et de l'évolution cellulaires *in vitro* peuvent être minimisés en revenant fréquemment aux cultures stock congelées, permettant ainsi de terminer avec succès les expériences de culture de longue durée en cours sans subir de variables indésirables. Les cultures congelées assurent également une ligne de base précieuse pour mesurer ou comparer les modifications futures induites par l'expérience.

Principes de la congélation de cellules

Pour comprendre pourquoi les protocoles de congélation fonctionnent, il est nécessaire d'examiner les événements intracellulaires et extracellulaires qui surviennent dans les cultures de cellules animales pendant le processus de congélation (2, 4, 8). La réfrigération initiale de la température ambiante à 0°C ralentit le métabolisme cellulaire, interrompant rapidement le transport actif et la pompe ionique. Cette interruption n'endommage généralement pas la cellule si le milieu de culture est osmotiquement équilibré. Lorsque le refroidissement se poursuit (0° à -20°C), des cristaux de glace commencent à se former dans l'environnement extracellulaire, ce qui augmente la concentration en solutés du milieu de culture. De ce fait, l'eau commence à sortir des cellules pour aller dans le milieu extracellulaire partiellement congelé, ce qui initialise le processus de déshydratation et de rétrécissement cellulaires.

ronnement extracellulaire, ce qui augmente la concentration en solutés du milieu de culture. De ce fait, l'eau commence à sortir des cellules pour aller dans le milieu extracellulaire partiellement congelé, ce qui initialise le processus de déshydratation et de rétrécissement cellulaires.

Lorsque le processus de refroidissement est rapide, des cristaux de glace intracellulaires se forment avant la fin du processus de déshydratation cellulaire. Ces cristaux de glace déchirent les membranes et les organelles cellulaires et entraînent la mort de la cellule pendant le processus de décongélation (Figure 2).

Lorsque le processus de réfrigération est lent, l'eau libre intracellulaire est expulsée de la cellule par la force osmotique, entraînant une déshydratation et un rétrécissement complets de la cellule. Ceci peut également entraîner une mort cellulaire mais il n'existe pas de consensus sur les mécanismes impliqués. Les contraintes physiques du rétrécissement cellulaire peuvent provoquer quelques dégâts, entraînant une perte de membrane irréparable et une perturbation du cytosquelette et des organelles. Les concentrations élevées en solutés dans le milieu extracellulaire non congelé (essentiellement de l'eau salée) peuvent également provoquer des dégâts. Ces solutés attaquent les cellules par l'intérieur et l'extérieur, endommageant la membrane et provoquant un déplacement du pH et une dénaturation générale des protéines.

Cependant, lorsque la vitesse de refroidissement est suffisamment lente pour empêcher la formation de glace intracellulaire, mais suffisamment rapide pour éviter les effets de déshydratation graves, les cellules peuvent survivre aux processus de congélation et de décongélation. La zone ou fenêtre de survie est facilement observable chez de nombreuses bactéries ou autres procaryotes, mais pour la plupart des cellules eucaryotes, elle est inexistante ou très difficile à trouver sans utiliser d'agents cryoprotecteurs. Ces agents ont peu d'effet sur les dommages causés par une congélation rapide (formation de cristaux de glace intracellulaires), mais préviennent ou diminuent généralement les dommages dus à la congélation lente (déshydratation et rétrécissement) (8).

La température finale de conservation est également critique pour réussir une cryoconservation. Pour stopper entièrement l'horloge biologique, les températures de conservation doivent être maintenues en

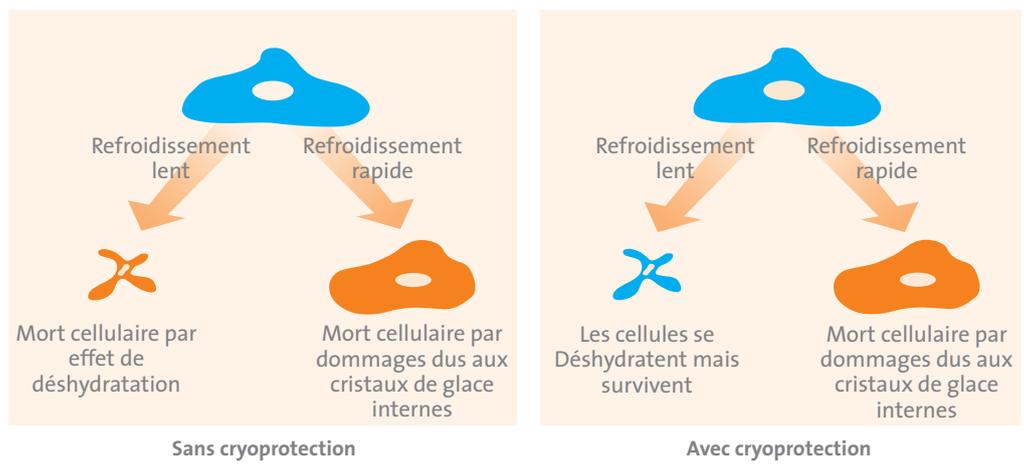


Figure 1. Effets des vitesses de congélation sur les cellules.

dessous de -130°C , point de transition vitreuse en dessous duquel l'eau liquide n'existe pas et la diffusion est insignifiante. Bien que de nombreuses cultures cellulaires soient conservées avec succès entre -70°C et l'horloge biologique n'est pas stoppée, mais uniquement ralentie, et des altérations ou modifications cellulaires vont s'accumuler.

La conservation dans l'azote liquide à -196°C prévient efficacement toutes les réactions chimiques thermodépendantes. Seuls les effets physico-chimiques causés par le rayonnement ionisant de fond est toujours actif à cette température. On estime qu'il faudrait des milliers d'années avant que ces rayonnements de fond ne produisent d'effets notables sur les cellules cryoconservées (2, 8). -90°C pendant des mois ou même des années.

Aspects pratiques de la congélation de cellules

Même dans les meilleures circonstances, le processus de congélation reste stressant pour toutes les cultures cellulaires. Il est important de faire tout ce qui est possible pour minimiser ce stress sur les cultures afin de maximiser leur récupération et survie ultérieures. Les suggestions et recommandations suivantes sont conçues pour compléter les protocoles cités précédemment.

I. Sélection des cellules

S'assurer d'abord que les cellules sont dans le meilleur état possible. Sélectionner les cultures proches de la fin de la phase de croissance logarithmique (à environ 90% de confluence) et changer leur milieu 24 heures avant de les récolter. Rechercher soigneusement toute trace de contamination microbienne dans la culture. Cette procé-

sure est facilitée par la culture des cellules dans un milieu sans antibiotique pendant plusieurs passages avant de les tester. Ceci laisse du temps à toute contamination résistante ou cachée (présente en très petit nombre) d'atteindre un niveau plus élevé et donc plus facilement détectable. Examiner ensuite des échantillons de ces cultures au microscope et les tester par culture directe pour rechercher la présence de bactéries, levures, champignons et mycoplasmes.

Les mycoplasmes représentent un problème particulier, car ils peuvent être trouvés à des concentrations très élevées (jusqu'à 10^8 organismes par millilitre de milieu) dans les cultures sans effets ni turbidité visibles. Ainsi, jusqu'à 20% de toutes les cultures de cellules animales sont contaminées par ces organismes ubiquitaires mais invisibles. Malgré les efforts particuliers nécessaires pour détecter les mycoplasmes, les conséquences sérieuses de leur présence rendent absolument essentiel le test de tous les stocks de cultures congelées (9, 12).

Vérifier l'identité des cultures et la présence de toutes les caractéristiques particulières attendues. Contrôler l'identité des cellules par leur caryotype et leur analyse isoenzymatique pour s'assurer qu'elles sont au moins de la bonne espèce (10).

II. Récolte des cellules

Démarrer par la procédure de récolte standard généralement conseillée pour la culture en étant aussi délicat que possible. Retirer tous les agents de dissociation en lavant ou en les inactivant (particulièrement important en cas d'utilisation de milieu sans sérum). La centrifugation, lorsqu'elle est absolument nécessaire, doit être juste suffisamment forte pour obtenir un culot sou-

ple : 100 x g pendant 5 à 6 minutes sont généralement suffisants. Pour assurer l'uniformité du stock final congelé, rassembler les contenus de tous les récipients de culture récoltés. Ceci facilite également l'exécution des tests de contrôle qualité essentiels pour la recherche des contaminations microbiennes et l'identification de la culture.

Compter puis diluer ou concentrer la suspension de cellules récoltées pour obtenir deux fois la concentration finale désirée, qui est habituellement de 4 à 10 millions de cellules viables par millilitre. Un volume égal de milieu contenant l'agent cryoprotecteur à deux fois sa concentration finale sera ajouté plus tard pour obtenir l'inoculum désiré. Conserver les cellules au frais pour ralentir leur métabolisme et les empêcher de s'agréger. Éviter toute dérive alcaline du pH en aérant avec du CO₂ si nécessaire

III. Cryoprotection

Comme mentionné précédemment, les agents de cryoprotection sont nécessaires pour minimiser ou empêcher les détériorations associées à la congélation lente. Les mécanismes permettant cette protection, bien qu'incomplètement compris, semblent fonctionner essentiellement en modifiant l'état physique de la glace et des solutions entourant immédiatement (extérieures aux) les cellules. La perméation des cellules par des agents cryoprotecteurs n'apparaît pas nécessaire pour leur action correcte (4). Rappelons que ces agents ne protègent pas contre les dégâts dus à une congélation rapide (formation de glace interne), mais protègent plutôt par un contrôle attentif de la vitesse de congélation. Une grande variété de produits chimiques assure une cryoprotection adéquate, y compris l'acétamide de méthyle, le méthanol, l'éthylène glycol et la polyvinylpyrrolidone (7). Cependant, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le glycérol sont les plus pratiques et les plus largement utilisés. Plusieurs de ces agents, bien qu'assurant une excellente cryoprotection, ont des effets secondaires toxiques sur les cultures, rendant leur utilisation difficile.

Le DMSO est le plus souvent utilisé à une concentration finale de 5 à 15% (v/v). Toujours utiliser une qualité réactif ou une autre pureté suffisamment élevée dont la compatibilité a été testée. Stériliser par filtration à travers une membrane de Nylon de 0,2 microns dans un logement en polypropylène ou en acier inoxydable et conserver en petites quantités (5 mL). ATTENTION :

faire particulièrement attention à éviter tout contact avec une solution contenant du DMSO. C'est un solvant polaire très puissant capable de pénétrer rapidement dans la peau intacte en emportant avec lui des contaminants dangereux tels que des carcinogènes ou des toxines. Certaines lignées cellulaires sont affectées par un contact prolongé avec le DMSO. Cet effet peut être réduit ou éliminé en ajoutant le DMSO à la suspension cellulaire à 4°C et en le retirant immédiatement lors de la décongélation. Si cela n'aide en rien, abaisser la concentration ou essayer du glycérol ou un autre cryoprotecteur.

Le glycérol est généralement utilisé à une concentration finale de 5 et 20% (v/v). Stériliser par autoclavage pendant 15 minutes dans de petits volumes (5 mL) et réfrigérer à l'obscurité. Bien qu'étant moins toxique pour les cellules que le DMSO, le glycérol cause fréquemment des problèmes osmotiques, surtout après décongélation. Toujours l'ajouter à température ambiante ou supérieure et le retirer lentement par dilution.

Les concentrations élevées en sérum peuvent également aider les cellules à survivre à la congélation. Le remplacement des mélanges milieu-cryoprotecteur standards par 95% de sérum et 5% de DMSO peut être meilleur pour certaines lignées cellulaires trop sensibles, surtout les hybridomes.

Ajouter les agents cryoprotecteurs au milieu de culture (sans cellules) immédiatement avant de l'utiliser pour obtenir deux fois la concentration finale désirée (2X). Mélanger cette solution 2X avec un volume égal de suspension cellulaire récoltée (également 2X) pour obtenir l'inoculum à congeler. Cette méthode est moins agressive pour les cellules, surtout en cas d'utilisation de DMSO comme cryoprotecteur.

IV. Récipients de conservation

Après avoir mélangé la solution cryoprotectrice avec la suspension cellulaire, l'inoculum résultant est ajouté par petits aliquotes (généralement 1 à 2 millilitres) à chaque récipient de stockage. Du fait des températures extrêmement basses rencontrées en cryoconservation, toutes les matières ou conceptions de récipients ne sont pas appropriées ni sûres. De nombreux matériaux deviennent cassants à ces températures ; les récipients qui en sont composés peuvent se briser ou se craqueler pendant le stockage ou la décongélation. Vérifier soigneusement les recommandations du fabricant du récipient avant de le choisir et de l'utiliser.

Prévention des altérations par congélation

- Exécuter une congélation lente pour extraire toute l'eau intracellulaire.
- Utiliser des agents cryoprotecteurs pour minimiser les effets de la déshydratation.
- Conserver en dessous de -130°C pour arrêter complètement l'horloge biologique.



Figure 2. Tubes cryogènes Corning à bouchon coiffant (gauche) et à bouchon entrant (droite)

Il est également important de choisir le système de scellage ou le type de bouchon utilisé pour maintenir l'intégrité du récipient, surtout pour le stockage dans l'azote liquide. Si ces récipients fuient pendant le stockage (comme beaucoup le font), ils se remplissent lentement d'azote liquide.

Lorsqu'ils reviennent finalement à la température ambiante, l'azote liquide se vaporise rapidement en entraînant une accumulation rapide de pression. Les récipients peuvent alors expulser violemment leur bouchon ou exploser pour relâcher la pression et libèrent alors leur contenu dans l'atmosphère. Ceci crée une situation très dangereuse, surtout si les récipients contiennent des organismes pathogènes ou des substances potentiellement toxiques ou dangereuses. Une conservation au-dessus de l'azote liquide est vivement conseillée pour diminuer les risques potentiels dans ces situations.

Deux types de récipients sont couramment utilisés en cryoconservation : les ampoules de verre thermoscellables et les tubes en plastique (généralement du polypropylène) à bouchon vissant. Les deux sont disponibles dans différentes tailles (capacité de 1 à 5 mL), bien que les tailles les plus faibles soient préférées pour la cryoconservation (voir Figure 2).

À cause des problèmes d'étanchéité et d'étiquetage, les ampoules de verre ne sont plus aussi largement utilisées dans les laboratoires de culture cellulaire. Des "trous d'épingle" invisibles peuvent se former dans les tubes pendant le processus de scellage ; s'ils sont ensuite stockés immergés dans l'azote liquide, ils peuvent exploser lorsqu'on les retire pour les décongeler. Les trous d'épingle peuvent généralement être détectés avant congélation en immergeant les

ampoules scellées pendant 30 minutes dans une solution réfrigérée d'éthanol à 70% contenant 1% de bleu de méthylène. Cette solution pénètre rapidement et colore toute ampoule présentant une fuite ; après rinçage à l'eau, les ampoules défectueuses sont alors facilement détectées et écartées.

Du fait de leur meilleure sécurité et de leur côté pratique, les tubes en plastique ont largement remplacé les ampoules de verre en cryoconservation. La grande variété de formes et de caractéristiques particulières comme les surfaces de marquage imprimées et les bouchons colorés facilitant l'identification a également contribué à leur popularité.

Différents types de capuchons sont disponibles, certains à bouchons entrants et d'autres à bouchons coiffants qui aident à minimiser la contamination (voir Figure 3).

V. Étiquetage et archivage

Assurer une localisation et une identification de longue durée des cultures cellulaires est le domaine le plus fréquemment négligé de la cryoconservation. Une banque de cellules cryogénique est sensée survivre aux travailleurs du laboratoire ayant contribué à son établissement, mais des archivages d'inventaires mal entretenus ou inexistantes, et des tubes et ampoules mal étiquetés ou de façon illisible peut empêcher cela, surtout après le départ des responsables.

Les étiquettes doivent contenir suffisamment d'informations pour localiser les archives appropriées ; généralement, l'identité de la culture, la date de congélation, et les initiales de la personne responsable sont suffisants. La plupart des tubes en plastique possèdent des points ou zones de marquage facilitant leur étiquetage. Sur les tubes et ampoules sans point de marquage, utiliser

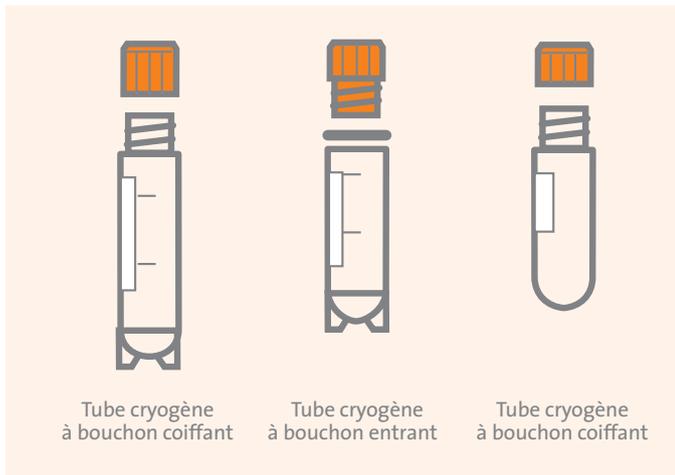


Figure 3. Formes de bouchons de tubes cryogènes Corning

des étiquettes en toile avec des adhésifs spéciaux composés spécialement pour les conditions cryogéniques.

Des encres spéciales à base de céramique sont disponibles pour étiqueter les ampoules de verre. Appliquer ces encres avant le remplissage puis les cuire sur le verre, généralement pendant la stérilisation à chaleur d'archivage informatisé ; toujours conserver une copie de sauvegarde actualisée en plus des informations conservées dans l'ordinateur.

VI. Vitesse de réfrigération

La vitesse de refroidissement utilisée pour congeler les cultures doit être juste assez lente pour permettre aux cellules de se déshydrater, mais suffisamment rapide pour empêcher des altérations dues à une déshydratation excessive. Une vitesse de refroidissement de -1°C à -3°C par minute convient à la plupart des cultures de cellules animales. Les cellules plus grandes, ou les cellules possédant des membranes moins perméables, peuvent nécessiter une vitesse de congélation plus lente car leur déshydratation prendra plus de temps. Des points de marquage permanents peuvent être appliqués sur les ampoules de verre avec du vernis à ongle blanc. Lorsqu'il a séché, utiliser un stylo de marquage de laboratoire pour écrire sur le point.

Quelle que soit la méthode de marquage choisie, faire très attention à bien vérifier sa permanence en conditions cryogéniques. Certaines zones de marquage, encres et étiquettes peuvent s'effriter ou

s'effacer pendant les stockages de longue durée ; nous conseillons de faire un essai d'au moins plusieurs semaines.

Consigner avec précision dans un registre les conditions de stockage des cultures, comprenant toutes les informations suivantes : identité de la culture, nombre de passages, date de congélation, milieu et méthode de congélation utilisés, nombre de cellules par tube, nombre total de tubes initialement congelés, le nombre restant, leurs emplacements, leur viabilité attendue et les résultats de tous les tests de contrôle qualité effectués (stérilité, mycoplasmes, espèce, caryotype, etc.). Des informations complémentaires sur les cultures, surtout leur origine, historique, paramètres de croissance, caractéristiques spéciales et applications sont également utiles et doivent être ajoutées chaque fois que possible.

Faire des efforts particuliers pour garder toutes les archives à jour et pour s'assurer que tout le monde dans les locaux les utilise correctement. Utiliser des formulaires pré-imprimés pour faciliter la procédure d'archivage des informations et favoriser son exécution. Conserver des copies actualisées de toutes les archives cruciales dans un endroit sûr à l'écart du laboratoire pour les protéger contre toute perte ou destruction accidentelle. Ceci est particulièrement important pour un système

La meilleure façon de contrôler les vitesses de réfrigération est l'utilisation d'appareils de congélation électroniques programmables. Bien qu'ils soient chers, ils permettent un contrôle précis du processus de congélation, donnent des résultats uniformes et reproductibles, et peuvent congeler un grand nombre de tubes ou d'ampoules. La plupart des appareils sont disponibles avec un enregistreur pour un rapport permanent du processus de réfrigération.

Il existe de nombreux appareils de congélation mécaniques différents, relativement peu chers permettant de contrôler correctement la vitesse de réfrigération. Certains appareils utilisent des portoirs conçus pour accueillir des tubes à des profondeurs prédéterminées dans le col d'un cryoconservateur à azote liquide. La

vitesse de congélation dépend du nombre total de tubes et de la profondeur à laquelle le portoir est placé. Une autre technique utilise un "canister" en métal ou plastique rempli d'alcool contenant un portoir d'une capacité de 24 tubes maximum. La boîte remplie est placée dans un congélateur mécanique ultra-froid où l'alcool agit comme un bain pour obtenir un transfert thermique et une réfrigération plus uniformes. Après une congélation de 4 à 5 heures, les tubes sont retirés de la boîte et transférés dans leur emplacement de stockage final.

Les boîtes en carton ou en mousse de polystyrène isolées sont couramment utilisées comme chambre de congélation dans les congélateurs ultra-froids. Ces systèmes maison marchent bien avec de nombreuses lignées cellulaires mais ne donnent pas toujours une réfrigération contrôlée, reproductible ou uniforme. Ainsi, il peut exister des différences importantes de viabilité entre les tubes lors de la décongélation. Cette approche maison n'est pas conseillée pour les cultures précieuses ou irremplaçables.

Quelle que soit la méthode de réfrigération utilisée, le transfert de la chambre ou de l'appareil de réfrigération vers l'emplacement de stockage final doit se faire rapidement pour éviter le réchauffement des tubes. Utiliser un récipient de transfert isolé rempli de carboglace ou d'azote liquide pour s'assurer que les cellules demeurent en dessous de -70°C .



Figure 4. Cryoconservateurs classiques

VII. Conservation cryogénique

Seuls les congélateurs capables de maintenir en continu une température inférieure à -130°C doivent être considérés comme des cryoconservateurs de longue durée. Bien que la plupart des congélateurs refroidis à l'azote liquide et certains congélateurs mécaniques spécialement conçus répondent à ces exigences, la plupart des laboratoires de culture cellulaire préfèrent les cryoconservateurs à azote liquide (Voir Figure 4). Le choix final est souvent basé sur la disponibilité d'une alimentation fiable en azote liquide, la capacité de stockage nécessaire, et l'importance du budget. Les cryoconservateurs à azote liquide permettent un stockage soit dans les vapeurs d'azote au-dessus du liquide entre -140°C et -180°C , soit en immersion dans le liquide à une température inférieure à -196°C . La conservation dans la phase gazeuse diminue considérablement le risque d'explosion de tubes ou d'ampoules présentant une fuite au moment de leur retrait. Cependant, comme la quantité d'azote liquide dans le cryoconservateur est réduite pour faire de la place pour une conservation dans la phase vapeur, l'autonomie du cryoconservateur (durée de maintien de sa température de stockage sans ajouter d'azote liquide supplémentaire) est également réduite. Ceci abaisse la marge de sécurité du cryoconservateur et nécessite une surveillance et un contrôle plus fréquents. Prêter une attention toute particulière à ces problèmes de sécurité lors du choix de la méthode de stockage.

Vérifier régulièrement les niveaux d'azote dans les cryoconservateurs ; établir un calendrier et s'y conformer strictement. L'évaporation de l'azote dépend du degré d'utilisation et de l'autonomie statique du cryoconservateur. Des augmentations soudaines et inexplicables de la vitesse d'évaporation peuvent signaler une détérioration de l'isolation ou l'apparition d'autres problèmes avec le cryoconservateur qui doivent être activement recherchés. Éviter la formation de givre ou de glace autour des ouvertures du cryoconservateur ; ceci augmente la vitesse d'évaporation de l'azote et peut entraîner des augmentations de température dans la partie supérieure des cryoconservateurs à phase vapeur. Des systèmes d'alarme sonore pour détecter des niveaux faibles d'azote liquide procurent une sécurité supplémentaire ; cependant, ils donnent un faux sentiment de sécurité s'ils ne sont pas surveillés 24 heures sur 24.

VIII. Décongélation

ATTENTION : toujours utiliser un équipement de sécurité approprié pour retirer des tubes ou ampoules de cryoconservateurs à azote liquide ou en phase vapeur. Le port d'un écran facial complet, de cryogants épais et d'un tablier de laboratoire est vivement conseillé pour se protéger des explosions de tubes et ampoules.

Retirer le tube ou l'ampoule de son emplacement de stockage et vérifier soigneusement l'étiquette et le registre de stockage pour s'assurer que c'est la bonne culture. Placer le récipient dans l'eau tiède, en l'agitant doucement jusqu'à décongélation complète. Une décongélation rapide (60 à 90 secondes à 37°C) permet d'obtenir une meilleure récupération pour la plupart des cultures cellulaires ; elle réduit ou empêche la formation de cristaux de glace pouvant endommager la cellule pendant la réhydratation.

IX. Rétablissement

Certains agents cryoprotecteurs pouvant endommager les cellules après une exposition prolongée, il faut retirer ces agents aussi rapidement et délicatement que possible. Plusieurs approches sont utilisées suivant l'agent cryoprotecteur et les caractéristiques des cellules.

La plupart des cellules récupèrent normalement si l'agent de cryoprotection est retiré par changement de milieu dans les 6 à 8 heures après décongélation. Transférer le contenu de l'ampoule ou du tube dans un flacon T-75 ou un autre récipient approprié contenant 15 à 20 millilitres de milieu de culture et incuber normalement. Dès qu'une majorité des cellules a adhéré, retirer le milieu contenant l'agent cryoprotecteur maintenant dilué et le remplacer par du milieu frais.

Pour les cellules sensibles aux agents cryoprotecteurs, il est possible de retirer facilement l'ancien milieu par une centrifugation douce. Transférer le contenu du tube ou de l'ampoule dans un tube à centrifuger de 15 mL contenant 10 mL de milieu frais et centrifuger pendant 5 minutes à 100 x g. Jeter le surnageant contenant l'agent cryoprotecteur et resuspendre le culot cellulaire dans du milieu frais. Transférer ensuite la suspension cellulaire dans un récipient de culture approprié et incuber normalement.

En cas d'utilisation de glycérol comme cryoprotecteur, l'addition brusque d'un grand volume de milieu frais à la suspension cellu-

laire décongelée peut provoquer un choc osmotique, endommageant ou détruisant les cellules. Utiliser plusieurs dilutions en série avec un volume égal de milieu tiède toutes les 10 minutes avant tout traitement supplémentaire pour donner du temps aux cellules pour réajuster leur équilibre osmotique.

X. Suggestions de résolution de problèmes

Les problèmes de viabilité associés à la cryoconservation sont généralement rencontrés tout de suite après la décongélation et l'ensemencement des cellules. Les problèmes surviennent dans quatre secteurs principaux:

1. Pendant la récolte et le traitement des cellules. Les problèmes peuvent être dus à une exposition excessive des cellules aux agents de dissociation, à l'utilisation d'un agent cryoprotecteur toxique ou à des suspensions cellulaires à forte densité laissées trop longtemps à température ambiante ou à un pH trop alcalin.
2. Pendant le processus de réfrigération (congélation). Des cellules excessivement endommagées et une viabilité des cultures réduite résultent souvent de l'application d'une vitesse de réfrigération trop rapide ou trop lente, ou d'une interruption temporaire du processus de réfrigération. Le fait de ne pas utiliser l'agent cryoprotecteur approprié à la bonne concentration entraîne également des problèmes de viabilité.
3. Pendant la cryoconservation. La viabilité des cultures est souvent réduite lorsqu'on laisse les tubes se réchauffer pendant le transfert vers le congélateur, ou si la température de la banque n'est pas maintenue constante à des températures cryogéniques appropriées.
4. Pendant la décongélation et la récupération. Les problèmes surviennent souvent lorsque le processus de décongélation est trop lent ou que les cryoprotecteurs ne sont pas correctement retirés (voir ci-dessus).

Ces problèmes de viabilité peuvent souvent être corrigés en utilisant les techniques suivantes pour identifier l'étape du processus de congélation qui est à l'origine du problème.

Récolter suffisamment de cellules pour préparer au moins quatre tubes. Prélever un échantillon de suspension cellulaire, équivalent au nombre de cellules qui sera placé dans les tubes, et le déposer immédiatement

dans un récipient de culture avec la quantité adéquate de milieu et incubé. Cette culture sera utilisée comme contrôle pour la comparer avec les cultures traitées dans les étapes restantes.

Liste de contrôle de congélation

- ▶ Récolter délicatement les cellules.
- ▶ Vérifier l'absence de contamination dans les cultures, surtout par les mycoplasmes.
- ▶ Vérifier l'identité de la culture par caryotype ou analyse aux isoenzymes.
- ▶ Utiliser des agents cryoprotecteurs testés.
- ▶ Utiliser uniquement des tubes testés pour les conditions cryogéniques.
- ▶ S'assurer que l'étiquette est permanente et complète.
- ▶ Contrôler la vitesse de réfrigération.
- ▶ Conserver les cultures en dessous de -130°C .
- ▶ Surveiller fréquemment les niveaux d'azote liquide.
- ▶ Archiver correctement.

Ajouter ensuite l'agent cryoprotecteur aux cellules restantes et diviser en trois tubes. Placer un tube à 4°C pendant une heure. Retirer ensuite les cellules du tube, procéder comme si elles venaient juste d'être décongelées du cryoconservateur, et ensemercer dans un milieu comme ci-dessus. Cette culture sera comparée à la culture contrôle pour voir s'il y a des problèmes associés à l'agent de cryoprotection.

Pendant ce temps, traiter les tubes restants en leur appliquant la procédure habituelle de réfrigération lente. Un tube est alors immédiatement décongelé et traité comme précédemment. Cette culture sera comparée à la culture contrôle pour déterminer s'il y a des problèmes liés à la procédure de réfrigération lente.

Transférer le tube restant dans le cryoconservateur et le conserver pendant la nuit avant de le décongeler et de le traiter comme ci-dessus. Cette culture sera comparée à la culture contrôle pour déterminer s'il y a des problèmes liés aux conditions de cryoconservation. Si des tubes sont encore disponibles, utiliser différentes techniques de récupération pour déterminer si cette technique est la source du problème.

En comparant toutes les cultures à la culture d'origine, il doit être possible de déterminer

à quelle étape du processus de congélation survient le problème. Une fois cela identifié, les informations présentées dans ce guide et ces références devraient être suffisantes pour résoudre le problème.

XI. Gestion d'une banque de cellules

Les efforts et les dépenses investis dans la gestion d'une banque doivent être mis en relation avec la valeur des cultures qui y sont stockées. Cette valeur est déterminée en répondant à deux questions : combien de temps, d'argent et d'effort ont-ils déjà été investis dans ces cultures cellulaires stockées ? Et, quelles seraient les conséquences de leur perte ? Les cultures facilement remplaçables auprès d'autres laboratoires ou de sources commerciales ne nécessitent pas d'efforts particuliers, mais les cultures uniques, telles que des hybridomes et autres cellules génétiquement modifiées, sont irremplaçables et exigent des efforts spéciaux à mettre en œuvre pour assurer leur sécurité. Les réponses à ces questions vous aideront à déterminer jusqu'où doivent porter vos efforts.

Identifier ensuite les domaines pouvant poser des problèmes conduisant à la perte de ces cultures. Certains de ces domaines, comme le choix du récipient, l'archivage, l'étiquetage, la surveillance du cryoconservateur, les conditions de stockage et les problèmes de qualité (contamination et identité des espèces), ont déjà été abordés dans ce guide. Décider quels étapes sont nécessaires pour éliminer ou minimiser ces problèmes. Répartir les cultures irremplaçables ou très précieuses dans plusieurs cryoconservateurs, avec au moins un cryoconservateur dans un autre endroit pour se protéger contre les incendies ou autres catastrophes naturelles. Les collègues des autres laboratoires ou autres bâtiments devraient pouvoir vous assurer une réserve de secours, surtout en cas d'arrangement réciproque.

Une étape finale demeure ; planifier à l'avance les urgences ! Une des urgences les plus sérieuses et inattendues est la panne de cryoconservateur. Une surveillance attentive du niveau d'azote liquide ou un diagramme de température peut donner une alerte précoce d'une défaillance en cours, mais une panne au milieu de la nuit peut également se produire. Préparer des plans à l'avance pour gérer une panne de cryoconservateur ou les autres problèmes. Si ces plans impliquent l'équipement d'un collègue, obtenir sa permission et faire tous les arrangements

nécessaires à l'avance – les coups de téléphone tard dans la nuit sont généralement peu appréciés.

Ces informations ont été réunies pour rédiger ce guide permettant de mieux comprendre le processus de cryoconservation. Pour obtenir une assistance dans ce domaine, merci de contacter le Service Technique de Corning Life Sciences au 800.492.1110, 1.978.635.2200 ou écrire à l'adresse clstechserv@corning.com, cctech@corning.com

References

1. Aswood-Smith, M. J. and G. B. Friedmann, 1979. Lethal and Chromosomal Effects of Freezing, Thawing, Storage Time and X-irradiation on Mammalian Cells Preserved at -196°C in Dimethylsulfoxide. *Cryobiology* 16:132-140.
2. Aswood-Smith, M. J., 1980. Low Temperature Preservation of Cells, Tissues and Organs, p. 19-44. In *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. M. J. Aswood-Smith and J. Farrant, Eds. (Pitman Medical Limited, Kent, England).
3. Coriell, L. L., 1979. Preservation, Storage and Shipment, p. 29-35. In *Methods in Enzymology*. Vol. 58, W. B. Jacoby and I. H. Pasten, Eds., (Academic Press, New York).
4. Farrant, J., 1989. General Observations on Cell Preservation, p. 1-18. In *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, M. J. Aswood-Smith and J. Farrant, Eds. (Pitman Medical Limited, Kent, England).
5. Freshney, R. I., 1994. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, p. 254-263. (3rd edition; Wiley-Liss, New York).
6. Hay, R. J., 1978. Preservation of Cell Culture Stocks in Liquid Nitrogen, p. 787-790. *TCA Manual 4*.
7. Klebe, R. J. and M. G. Mancuso, 1983. Identification of New Cryoprotective Agents for Cultured Mammalian Cells. *In Vitro* 19:167-170.
8. Mazur, P., 1984. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications, p. C125-C142. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell Physiol. 16).
9. McGarrity, G. J., J. Sarama, and V. Vanaman, 1985. *Cell Culture Techniques*. ASM News 51:170-183.
10. Peterson, W. D., W. F. Simpson and B. Hukku, 1973. Cell Culture Characterization: Monitoring for Cell Identification, p. 164-178. In *Tissue Culture: Methods and Applications*, P. F. Kruse and M. K. Patterson Jr. Eds. (Academic Press, New York).
11. Polge, C., A. U. Smith, and A. S. Parkes, 1949. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature* 164: 666.
12. Ryan, J., 1994. *Understanding and Managing Cell Culture Contamination, TC-CI-559*. Corning, Inc. Technical Monograph.
13. Schroy, C. B., and P. Todd, 1976. A Simple Method for Freezing and Thawing Cultured Cells, p. 309-310. *TCA Manual 2*, Procedure Number 76035.
14. Shannon, J. E. and M. L. Macy, 1973. Freezing, Storage, and Recovery of Cell Stocks, p. 712-718. In *Tissue Culture: Methods and Applications*. P. F. Kruse and M. K. Patterson Jr. Eds. (Academic Press, New York).
15. Smith, K. O., 1981. Low Temperature Storage of Surface Attached Living Cell Cultures. *Cryobiology* 18:251-257.
16. Waymouth, C. and D. S. Varnum, 1976. Simple Freezing Procedure for Storage in Serum-free Media of Cultured and Tumor Cells of Mouse, p. 311-313. *TCA Manual 2*, Procedure Number 76165.

Pour toute information complémentaire sur nos produits ou techniques, veuillez consulter notre site www.corning.com/lifesciences ou appelez le 800.492.1110. Pour les clients en dehors des États-Unis, merci d'appeler le +1.978.635.2200 ou de contacter votre bureau local Corning ci-dessous.

CORNING

Corning Incorporated Life Sciences

Tower 2, 4th Floor
900 Chelmsford St.
Lowell, MA 01851
t 800.492.1110
t 978.442.2200
f 978.442.2476

www.corning.com/lifesciences

Distributeurs dans le monde

ASIE/PACIFIQUE

Australie
t 61 2-9416-0492
f 61 2-9416-0493

Chine
t 86 21-3222-4666
f 86 21-6288-1575

Hong Kong
t 852-2807-2723
f 852-2807-2152

Indes

t 91-124-235 7850
f 91-124-401 0207

Japon

t 81 (0) 3-3586 1996/1997
f 81 (0) 3-3586 1291/1292

Corée

t 82 2-796-9500
f 82 2-796-9300

Singapour

t 65 6733-6511
f 65 6861-2913

Taiwan

t 886 2-2716-0338
f 886 2-2716-0339

EUROPE

France

t 0800 916 882
f 0800 918 636

Allemagne

t 0800 101 1153
f 0800 101 2427

United Kingdom

t 0800 376 8660
f 0800 279 1117

**Pays-Bas & tous les
autres pays européens**
t 31 (0) 20 659 60 51
f 31 (0) 20 659 76 73

AMERIQUE LATINE

Royaume-Uni

t (55-11) 3089-7419
f (55-11) 3167-0700

Mexique

t (52-81) 8158-8400
f (52-81) 8313-8589