

# Chapitre VII :

# Méthode de

# conservation des

# échantillons

## **VII. Cryoconservation**

### **1. Aspects fondamentaux**

#### **1.1. Définition et domaines d'utilisation**

La cryoconservation est la conservation de matériel vivant à très basse température.

Généralement, la cryoconservation consiste à stocker le matériel dans l'azote liquide (-196 °C) ou dans les vapeurs d'azote (-150 °C). À ces températures, toutes les activités physicochimiques des cellules sont arrêtées et, par conséquent, les divisions, la croissance et le vieillissement cellulaires sont interrompus. Les cellules cryoconservées sont ainsi dans un état de « vie suspendue », qui diffère de la mort cellulaire par sa réversibilité. Ce phénomène autorise ainsi la conservation de (matériel vivant pour une durée théoriquement illimitée, sans que celui-ci ne subisse la moindre altération. Après réchauffement, le matériel est théoriquement retrouvé dans son état initial.

On Distingue trois principales applications de la cryoconservation chez les végétaux :

1- la conservation à long terme des ressources génétiques pour les espèces qui ne peuvent pas être conservées au froid sous forme de semences déshydratées, telles que les espèces multipliées végétativement et les espèces à semences dites récalcitrantes, c'est-à-dire qui ne supportent pas une déshydratation jusqu'à une teneur en eau suffisamment basse pour permettre leur stockage à basse température. Enfin, quelle que soit l'espèce considérée, la cryoconservation est la seule méthode de conservation offrant un risque de dérive génétique nul ;

2- la gestion des stocks dans les laboratoires de production in vitro, en permettant de conserver, à moindre coût et sans risque de variation somaclonale, certaines souches correspondant à des variétés dont la demande est arrêtée ou saisonnière :

3 - la conservation de matériel à haute valeur ajoutée, tel que les organismes génétiquement modifiés et les souches cellulaires produisant des métabolites secondaires

#### **1.2. Principes**

Hormis pour les semences dites orthodoxes, qui peuvent être déshydratées jusqu'à des teneurs en eau très basses, la plupart des matériels

biologiques employés en cryoconservation (suspensions cellulaires, callosités, apex, embryons) contiennent des quantités d'eau élevées et sont donc extrêmement sensibles à la congélation. Les cellules doivent donc être déshydratées artificiellement pour les protéger des dégâts causés par la cristallisation de l'eau intracellulaire.

Les techniques classiques et les nouvelles techniques de cryoconservation sont basées sur des mécanismes physiques différents.

Dans les techniques classiques, les explants sont refroidis lentement jusqu'à une température dite de prérefroidissement (généralement  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), puis immergés rapidement dans l'azote liquide. Au cours du refroidissement lent, le milieu extracellulaire cristallise le premier. La membrane cellulaire joue alors le rôle de barrière physique et empêche la cristallisation de progresser dans le milieu intracellulaire qui reste ainsi en surfusion. La cristallisation de l'eau extracellulaire entraîne une concentration des solutés dans ce compartiment. Puisque les cellules restent en surfusion et que leur pression de vapeur aqueuse est plus élevée que celle du compartiment extracellulaire, un afflux d'eau intracellulaire se produit vers le compartiment extracellulaire.

Dans les conditions optimales, une grande quantité d'eau est ainsi extraite des cellules, ce qui limite la cristallisation de l'eau intracellulaire résiduelle lors de l'immersion des échantillons dans l'azote liquide. Les nouvelles techniques sont basées sur la vitrification du milieu intracellulaire, la vitrification peut être définie comme la transition d'une solution de la phase liquide en une phase amorphe, appelée verre, non cristalline et ainsi non dommageable à l'intégrité cellulaire. Dans ces techniques, l'eau cristallisable intracellulaire est extraite avant cryoconservation en exposant les échantillons à des solutions cryoprotectrices très concentrées et/ou à une dessiccation physique. La déshydratation est suivie par un refroidissement très rapide qui favorise la vitrification des Solutions intracellulaires.

### **1.3. Techniques:**

Quelle que soit la technique utilisée, les explants cryoconservés doivent avoir une taille suffisamment réduite pour obtenir un refroidissement et un réchauffement homogènes et éviter ainsi des gradients thermiques à l'intérieur des échantillons. Les explants doivent également comporter une proportion suffisante de cellules méristématiques. Qui sont les plus susceptibles de résister à la congélation,

du fait de leurs caractéristiques structurales (taille réduite, cytoplasme dense et peu vacuolisé, rapport nucléocytoplasmique élevé).

Les techniques de cryconservation comportent une série d'étapes successives, dont les conditions doivent être déterminées pour chaque nouveau matériel. Les plantes mères peuvent subir des traitements particuliers, tels qu'une acclimatation au froid ou une culture sur un milieu à pression osmotique élevée. Les explants sont ensuite traités avec des substances cryoprotectrices avant leur congélation (lente avec les techniques classiques, rapide avec les nouvelles techniques) avant leur stockage dans l'azote liquide ou dans les vapeurs d'azote. Le réchauffement des échantillons est généralement rapide pour éviter les risques de dévitrification et de recristallisation dommageables pour les cellules. Les explants subissent ensuite un post-traitement, qui consiste à les cultiver de manière transitoire (quelques heures à quelques Ours) dans des conditions qui vont stimuler leur reprise de croissance.

### **Conservation des acides nucléiques :**

\* **L'ADN**: peut être conservé dans un tampon (10mM Tris pH=8) additionné d'EDTA (1mM) à 4°C. A pH 8, la dégradation de l'ADN est notablement plus faible qu'à pH 7. L'EDTA permet de chélater les ions divalents (nécessaires pour les nucléases) et évitent la croissance de microorganismes. L'ADN peut être également conservé à -20°C dans le même tampon mais des cycles successifs de congélation/décongélation entraînent des cassures des acides nucléiques de grande taille (>10kb).

\***L'ARN** : même type de conservation que pour l'ADN mais les échantillons sont stockés à -80°C après addition de 3 vol d'éthanol. En l'absence de sels, ils restent en solution. Une aliquote représentative peut être prélevée après agitation puis ajustée à 0.5M d'acétate de sodium pH 5,2 brièvement à -20°C et collectée par centrifugation.