

Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,  
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>

**ifremer**

Institut National des Techniques de la Mer de Cherbourg  
Conservatoire National des Arts et Métiers

IFREMER  
Taravao, Tahiti  
Polynésie Française

Rapport de stage présenté pour

L'obtention du Diplôme de Technicien Supérieur de la Mer  
Option Génie Biologique et Productions Marines

## **Essais de cryoconservation d'algues unicellulaires d'intérêt aquacole**

**Frédéric CHEVALLIER**  
promotion 1989-1991

000 6334  
OBLØ6334  
SISN54415

H761  
CHE  
E

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

Adresse :	IFREMER BP 7004 TARAVAO Tahiti-Polynésie Française	DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES DEPARTEMENT RESSOURCES AQUACOLES STATION/LABORATOIRE TAHITI
-----------	---	---

AUTEUR (S):	Frédéric CHEVALLIER	CODE: DRV/AQ/TAH 91.82
TITRE:	Essais de cryoconservation d'algues unicellulaires d'intérêt aquacole	date: 20/08/91 Nb tirage: 18 Nb pages: 54 Nb figures: 22 Nb photos: 6
CONTRAT (intitulé)		DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>
N° _____		

RESUME

Les essais de cryopréservation ont porté sur *Platymonas sp.* "Batan", *P. suesica*, *Isochrysis aff galbana*, *Chlorella minutissima*, *Nannochloris occulata*, *Chaetoceros gracilis* et *C. sp.* "BA".

La mise au point du protocole a été basée sur la durée d'incorporation et la concentration en cryoprotecteur (DMSO). Deux méthodes sont utilisées pour comparer les effets de chaque protocole de congélation sur la survie des algues. La première méthode permet d'évaluer le taux de survie par coloration à l'acridine orange et lecture en microscopie à épifluorescence. La deuxième nécessite la mise en culture de chaque échantillon et les courbes de croissances sont dressées par lecture journalière de la densité optique des solutions algales.

Le refroidissement des échantillons a été effectué soit par congélation directe dans l'azote liquide (-196°C) soit par congélation avec descente lente jusqu'à -30°C puis plongée dans l'azote. Cette deuxième méthode permet d'ailleurs de raccourcir de façon sensible la durée de latence avant reprise de croissance.

mots clés: Micro-algues, azote liquide, DMSO, congélation

key words: Micro-algae, liquid nitrogen, DMSO, freezing



IFREMER Bibliothèque de PALAVAS



100 43026

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Monsieur Griessinger, directeur du Centre Océanologique du Pacifique et tout le personnel pour les bonnes conditions d'accueil dont j'ai pu bénéficier.

Je tiens à remercier tout particulièrement Alain Diter pour son aide apportée dans l'élaboration de ce rapport et tout au long de ce stage ainsi que pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe génétique cryoconservation.

Grand merci également à Pascal Dumont, qui a su m'inculquer les bases de la cryobiologie, et à Catherine Simon pour leur accueil en Polynésie.

Merci également à Gérard Jonquières et à l'équipe d'algologie pour leurs conseils et leur aide.

## SOMMAIRE

<u>I&gt; INTRODUCTION</u> .....	5
<u>II&gt; MATERIEL ET METHODE</u> .....	7
<u>II-1&gt; Algues microphytes</u> .....	8
II-1-a> Matériel vivant utilisé	
II-1-b> Entretien des souches	
II-1-c> Choix du moment d'utilisation	
<u>II-2&gt; Estimation de la survie</u> .....	9
II-2-a> Méthode par coloration à l'acridine orange	
II-2-a- $\alpha$ > Description de la méthode de coloration	
II-2-a- $\beta$ > Vérification de la fiabilité de la coloration	
II-2-b> Méthode par culture après congélation	
II-2-b- $\alpha$ > Méthode de culture	
II-2-b- $\beta$ > Suivi de croissance des algues congelées/décongelées	
<u>II-3&gt; Essais précédant la congélation</u> .....	13
II-3-a> Centrifugation	
II-3-a- $\alpha$ > Méthode de centrifugation	
II-3-a- $\beta$ > Calcul du rendement de la centrifugation	
II-3-a- $\Gamma$ > Mortalité induite par la centrifugation	
II-3-b> Toxicité du cryoprotecteur	
II-3-b- $\alpha$ > Lors de l'incorporation	
II-3-b- $\beta$ > Pour les cultures	
<u>II-4&gt; Congélation des micro-algues</u> .....	16
II-4-a> Matériel utilisé	
II-4-b> Recherche d'un protocole de congélation	
II-4-b- $\alpha$ > Essais d'orientation	
II-4-b- $\beta$ > Congélations en vue de cultures	
II-4-c> Méthodes de congélation/décongélation	
<u>II-5&gt; Analyses statistiques des données</u> .....	21
<u>III&gt; RESULTATS</u> .....	22
<u>III-1&gt; Méthodes de dénombrement</u> .....	23
III-1-a> Méthode de coloration à l'acridine orange	
III-1-b> Suivi de croissance par densité optique	
III-1-b- $\alpha$ > Choix de la longueur d'onde de travail	
III-1-b- $\beta$ > Corrélation entre densité optique et concentration cellulaire	

<b>III-2&gt; <u>Essais avant la congélation</u></b> .....	24
III-2-a> Centrifugation	
III-2-a- $\alpha$ > <i>Mortalité induite par la centrifugation</i>	
III-2-a- $\beta$ > <i>Taux de récupération après centrifugation</i>	
III-2-b> Toxicité du cryoprotecteur	
III-2-b- $\alpha$ > <i>Toxicité lors de l'incorporation</i>	
III-2-b- $\beta$ > <i>Toxicité sur les cultures</i>	
<b>III-3&gt; <u>La congélation</u></b> .....	27
III-3-a> Essais d'orientation	
III-3-a- $\alpha$ > <i>Congélation directe à -196°C</i>	
III-3-a- $\beta$ > <i>Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C</i>	
III-3-b> Essais avec culture	
III-3-b- $\alpha$ > <i>Congélation directe à -196°C</i>	
III-3-b- $\beta$ > <i>Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C</i>	
III-3-b- $\Gamma$ > <i>Congélation sans DMSO</i>	
<b>IV&gt; <u>DISCUSSION</u></b> .....	38
<b>IV-1&gt; <u>Méthode de comparaison des différents protocoles</u></b> .....	39
IV-1-a> Dénombrement cellulaire par lecture de la densité optique	
IV-1-b> Estimation de la survie par coloration	
IV-1-c> Mise en culture après congélation	
<b>IV-2&gt; <u>Cryoprotecteurs</u></b> .....	40
IV-2-a> Mécanisme d'action des cryoprotecteurs	
IV-2-b> Choix d'un cryoprotecteur	
IV-2-c> Toxicité du DMSO	
IV-2-d> Choix des doses de cryoprotecteur	
IV-2-d- $\alpha$ > <i>Durée d'incorporation</i>	
IV-2-d- $\beta$ > <i>Concentration en cryoprotecteur</i>	
<b>IV-3&gt; <u>Méthodes de congélation</u></b> .....	42
IV-3-a> Vitesse de refroidissement	
IV-3-a- $\alpha$ > <i>Congélation directe à -196°C</i>	
IV-3-a- $\beta$ > <i>Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C</i>	
IV-3-a- $\Gamma$ > <i>Autres méthodes de congélation</i>	
IV-3-b> Décongélation	
<b><u>V&gt; CONCLUSION</u></b> .....	44
<b><u>VI&gt; ANNEXES</u></b> .....	46
<b><u>VII&gt; BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	53

**I> INTRODUCTION**

Les algues unicellulaires se situent à la base de l'aquaculture. Elles jouent en effet le rôle de première nourriture pour bon nombre de larves (crustacés, mollusques), d'animaux adultes (mollusques) ou de proies destinées à des larves plus grosses (poissons). La culture de micro-algues est par conséquent pratiquée dans le monde entier dans toutes les catégories d'écloseries.

Le Centre Océanologique du Pacifique, dont la spécialité reste l'élevage de pénéidés, n'échappe pas à cette règle.

Chaque souche est entretenue de façon quotidienne, du tube à essai jusqu'aux bacs extérieurs de plusieurs mètres cubes.

Le repiquage, contraignant, présente le risque de contaminations par des bactéries ou par des algues d'espèces différentes et surtout entraîne une variation de la qualité des souches d'algues à mesure des générations successives.

L'idée de stocker des algues de qualité constante dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  paraît donc fort séduisante pour une application aquacole. L'objectif est de trouver une méthode de congélation la plus simple possible et permettant une reprise de croissance rapide après la décongélation. Il convient donc, pour cette étude, de considérer le maximum de paramètres pouvant influencer sur la croissance des micro-algues et bien sûr d'en mesurer les effets. C'est pourquoi, une part importante du travail est basée sur des essais préliminaires permettant d'élaborer étape par étape le protocole de congélation en fonction de la tolérance des algues étudiées. Les paramètres que nous avons cherché à maîtriser sont l'âge des cellules algales destinées à la congélation, la concentration en cryoprotecteur et la durée d'incorporation de celui-ci, la vitesse de refroidissement, la méthode de récupération des algues après congélation et la vitesse de réchauffement.

## II> MATERIEL ET METHODE

## II-1> Algues microphytes

### II-1-a> Matériel vivant utilisé

Parmi les souches d'algues présentes au Centre Océanologique du Pacifique (C.O.P.), sept espèces ont été retenues pour leur intérêt aquacole.

Les espèces choisies sont présentées ci-dessous avec leur principale utilisation à Tahiti:

- *Platymonas* sp. "Batan"(\*):
  - *Platymonas* *suesica*:
  - *Isochrysis* *aff galbana* (\$):
  - *Chlorella* *minutissima*:
  - *Nannochloris* *occulata*:
  - *Chaetoceros* *gracilis*:
  - *Chaetoceros* sp. "BA"(¥):
- } nourriture pour larves de crustacés et mollusques.
- } nourriture pour larves de crustacés.
- } nourriture pour rotifères.
- } nourriture pour larves de crevettes et mollusques.

(\*) souche isolée à l'île Batan (Philippines) ; (\$) souche T-Iso: isolée au C.O.P. ; (¥) souche isolée au C.O.P.

### II-1-b> Entretien des souches

Afin de disposer d'algues de qualité constante, une production destinée uniquement à la congélation a été mise en place. Les souches mères sont maintenues en tubes à essais contenant 10 ml de milieu de culture (Fig. 1). Les tubes sont repiqués tout les sept jours. Le tube précédent est gardé en réserve en cas de repiquage défectueux.

#### souches mères

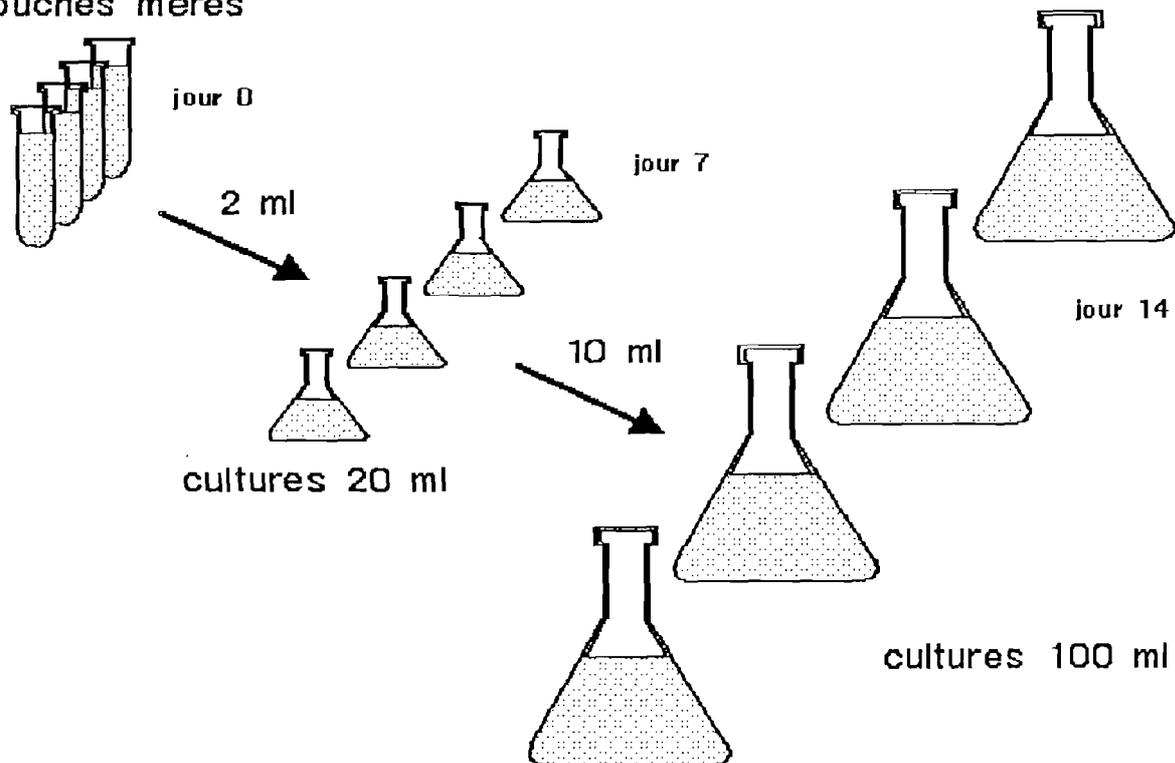


Figure 1: Méthode de repiquage des souches

Au bout de sept jours, 2 ml sont prélevés dans les tubes pour inoculer des fioles d'Erlenmeyer de 50 ml contenant 18 ml de milieu de culture.

Sept jours plus tard, les erlens de 20 ml sont repiqués et 10 ml sont utilisés comme inoculum d'erlens de 250 ml contenant 90 ml de milieu de culture. Les cultures âgées de sept jours sont mises de côté et servent aux différentes expériences.

Les conditions de culture sont les suivantes:

Température: moyenne de 22°C.

Eclairage: panaché de tubes horticoles GROLUX et TRUELIGHT.

Milieu de culture: - eau de mer naturelle filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$

- milieu de WALNE (1 ml/l): Annexe 1

- vitamines (0,1 ml/l): Annexe 1

- silicates (1 ml/l): Annexe 1

(uniquement pour les diatomées)

## II-1-c> Choix du moment d'utilisation.

Des dénombrements cellulaires journaliers à la cellule de Malassez sont effectués afin de connaître la vitesse de croissance de chaque espèce d'algue, dans nos conditions expérimentales.

Les volumes de culture étant très réduits, un prélèvement journalier trop important entraînerait une modification des conditions de culture. On prélèvera donc chaque jour 50  $\mu\text{l}$  de culture. Pour les algues mobiles (*Platymonas* sp. "Batan", *P. suesica* et *Isochrysis aff galbana*) 10  $\mu\text{l}$  de formol sont ajoutés afin d'immobiliser les cellules. D'où une dilution de 5/6 dont il faudra tenir compte.

Le nombre de cellules présentes sur la surface de comptage est multiplié par mille (et par 1,2 pour les cellules mobiles) pour ramener à un nombre d'algues par millilitre de culture.

L'évolution de la concentration algale au cours du temps permet de dresser des courbes de croissance (Annexe 2).

Pour tous les tests, les suspensions algales ont été utilisées après 7 jours de culture.

## II-2> Estimation de la survie

### II-2-a> Méthode par coloration à l'acridine orange

#### II-2-a-a> Description de la méthode de coloration

L'acridine orange permet de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.

Observées en microscopie à épifluorescence, les enzymes lysosomiales apparaissent en rouge et le noyau en vert. Les cellules en bonne santé apparaissent donc avec un noyau vert fluorescent intense et un cytoplasme rouge. Les cellules mortes sont uniformément rouges. Il existe aussi un stade intermédiaire. En effet, juste après la mort cellulaire, la coloration verte du noyau s'étend dans le cytoplasme, la cellule apparaît donc partiellement verte.

La préparation de l'acridine orange se fait selon la méthode de Robbins et Marcus (*in* Kasten, 1973):

Une solution mère, pouvant être conservée un mois à 4°C et à l'obscurité, est préparée à raison de 1 mg de colorant pour 2 ml de solution. Le pH est ajusté à 7,3 avec le minimum d'HCl normal ou de NaOH normale. On utilise une solution diluée à 0,1% renouvelée chaque semaine et conservée au réfrigérateur et surtout à l'abri de lumière.

Les algues sont colorées en ajoutant 10 µl de la solution diluée de colorant par ml de solution algale (Fig. 2). Une fois le colorant ajouté, on dispose de quelques minutes pour l'observation du fait de la décroissance de la fluorescence. Les lames utilisées doivent être très propres afin qu'elles ne fluorescent pas.

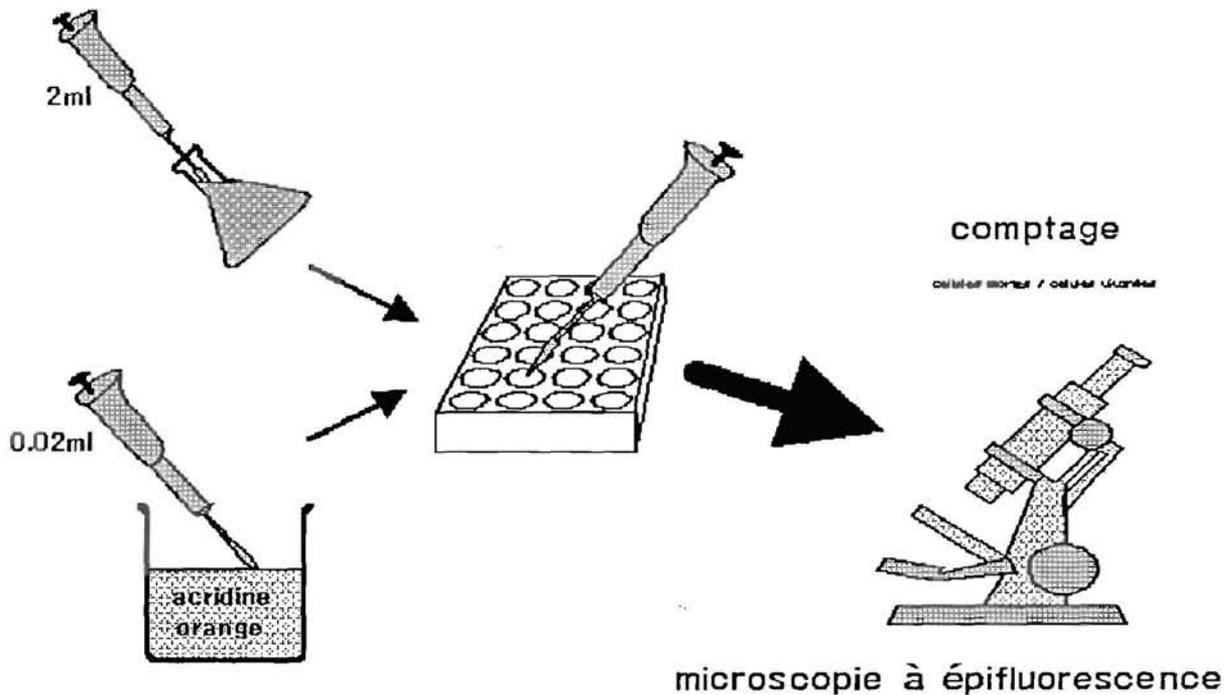


Figure 2: Méthode de coloration à l'acridine orange

Pour chaque lame, on compte au minimum 100 cellules mortes et/ou vivantes présentes dans le champ de l'oculaire. Le taux de survie des algues présentes dans l'échantillon considéré est calculé à partir de la formule suivante:

$$\text{Taux de survie} = \frac{\text{nb cellules vivantes}}{\text{nb cellules vivantes} + \text{nb cellules mortes}} \times 100$$

#### II-2-a-β> Vérification de la fiabilité de la coloration

Des solutions de concentrations en cellules mortes connues sont préparées à partir du mélange d'une solution contenant 100 % de morts et d'une autre contenant 100 % de cellules vivantes (\*).

La gamme étalon ainsi effectuée présente des concentrations en cellules mortes décroissantes de 100 à 0 % (avec un pas de 10 %).

Après coloration à l'acridine orange, on effectue 3 comptages pour chaque préparation. On trace ensuite la droite de régression linéaire (Annexe 3) entre le taux de mortalité compté et le taux de mortalité théorique. Le taux de corrélation ainsi obtenu permet d'apprécier la justesse de la méthode.

(\*) on ne tient pas compte des quelques pour-cent de cellules mortes présentes dans les cultures.

## II-2-b> Méthode par culture après congélation

### II-2-b-α> Méthode de culture

Une fois décongelé, le contenu des tubes (2ml) est mélangé à 18 ml d'eau de mer stérile afin de diluer le cryoprotecteur. Après centrifugation, le culot, soit 2 ml est récupéré (Fig. 3).

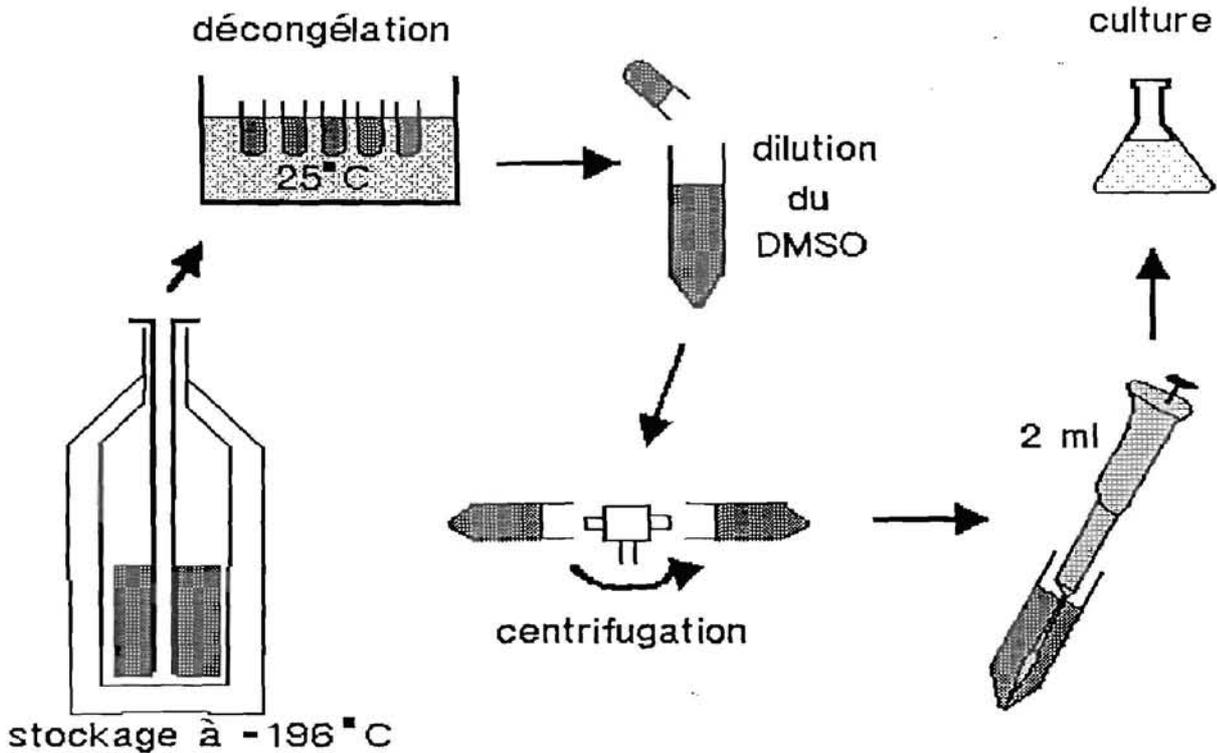


Figure 3: Etapes avant mise en culture des algues décongelées

Les cultures après congélation sont effectuées en fioles d'Erlenmeyer de 50 ml contenant 18 ml de milieu de culture. L'inoculum est constitué par les 2 ml pipetés au fond des tubes de centrifugation.

Toutes les fioles sont placées dans les mêmes conditions de culture, et chaque essai est effectué en triplicats.

### II-2-b-β> Suivi de croissance des algues congelées/décongelées

Face au grand nombre de cultures (jusqu'à 90 simultanées), il a été nécessaire de trouver une méthode de dénombrement cellulaire ultra-rapide permettant d'effectuer cette opération journalière en moins d'une heure.

=> Description de la méthode

Le matériel utilisé ici est, normalement, destiné à la bactériologie, mais son application aux algues microphytes a été possible.

On prélève chaque jour 380  $\mu$ l de chaque culture que l'on dépose dans les cupules d'une microplaque (Fig. 4). Une fois tous les échantillons prélevés, il ne reste plus qu'à introduire la microplaque dans le lecteur de microplaque (Microplate Auto-Reader, Fig. 5). On obtient instantanément les valeurs des densités optiques pour chacun des 96 puits que comporte la plaque.

La longueur d'onde utilisée est 450 nm qui correspond au pic d'absorption des chlorophylles (G. Jonquières, comm. pers.).

=> Etalonnage du lecteur de microplaque

Afin de pouvoir rapporter une valeur de densité optique à une concentration cellulaire, un étalonnage a été effectué.

Pour chaque espèce d'algue, on prépare des solutions de concentration en algues connue (le comptage étant effectué ici à la cellule de Malassez). La gamme étalon est faite par dilution successive de raison 1/3.

Après avoir relevé les densités optiques de chacune des dilutions, on peut tracer les droites de régression (Annexe 5) entre densité optique et concentration cellulaire. Le coefficient de corrélation permet de juger de la fiabilité de la méthode.

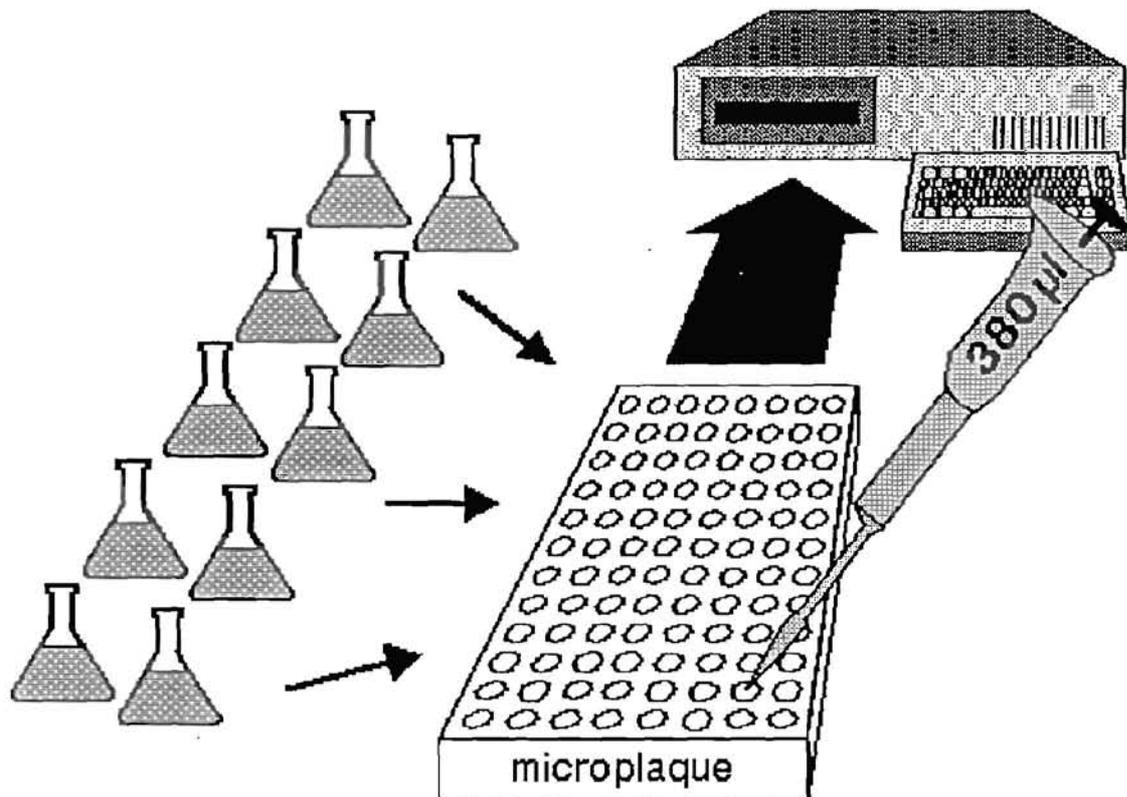


Figure 4: Suivi de croissance par lecture de la densité optique

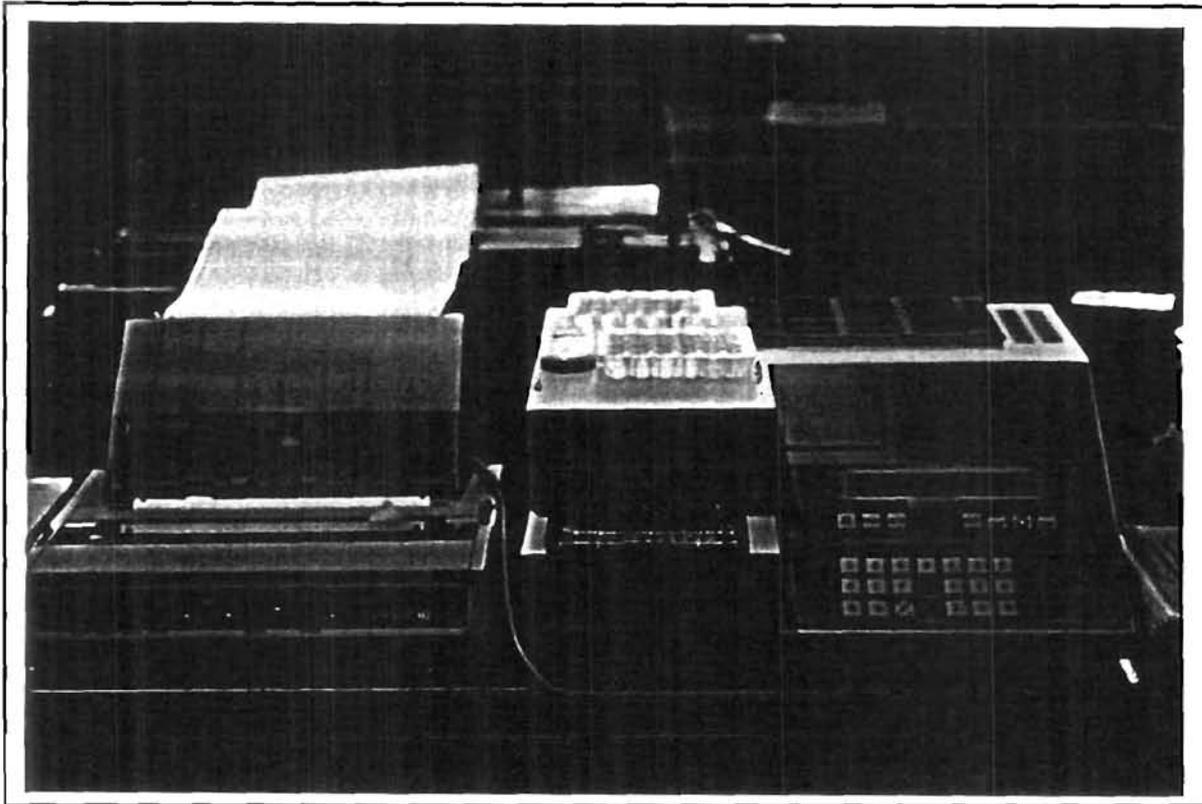


Figure 5: Photographie du lecteur de microplaque

### II-3> Essais précédant la congélation

#### II-3-a> Centrifugation

##### II-3-a-α> Méthode de centrifugation

Les algues de morphologies aussi éloignées que *Platymonas suesica* et *Chaetoceros gracilis* ont des propriétés de sédimentation très différentes. Afin de standardiser le traitement infligé aux algues, il est indispensable de trouver une méthode de centrifugation donnant de bons résultats pour chacune des espèces étudiées.

Après quelques essais, le choix s'est porté sur une vitesse lente (2000 rpm) pour une durée relativement longue (30 mn), la relation entre nombre de rotations par minute et force centrifuge est donnée par la formule suivante:

$$N = \sqrt{((Ng / 11,18 \times 10^{-7}) \times (1 / R))}$$

avec: N = vitesse de rotation (en rpm)  
 Ng = force centrifuge (en nombre de fois  
 l'accélération de la pesanteur g)  
 R = rayon du bras de centrifugeuse (en mm)

Dans le cas présent, l'accélération subie par les suspensions algales est:

$$\begin{aligned} N_g &= R \times N^2 \times 11,18 \times 10^{-7} \times g \\ N_g &= 140 \times 2000^2 \times 11,18 \times 10^{-7} \times g \\ N_g &= 620 \text{ g} \end{aligned}$$

### *II-3-a-β> Calcul du "rendement" de la centrifugation*

Pour chaque espèce d'algue, on effectue des dénombrements cellulaires avant centrifugation (N0) dans la prise d'essai (1 ml de solution algale + 1 ml d'eau de mer stérile) et après centrifugation (N1) dans les deux millilitres pipetés au culot.

Le rapport N1/N0 permet d'apprécier le taux de récupération des algues après centrifugation.

### *II-3-a-Γ> Mortalité induite par la centrifugation*

Une étude de la mortalité induite par l'étape de centrifugation a été menée sur *Platymonas* sp. "Batan", *P. suecica* et *Isochrysis aff galbana*. Toutes les algues subissent le même traitement et le pourcentage de cellules vivantes est estimé par comptage en microscopie à épifluorescence après coloration à l'acridine orange.

### **II-3-b> Vérification de la toxicité du cryoprotecteur**

Parmi les cryoprotecteurs les plus utilisés figure le diméthylsulfoxyde (DMSO). Outre son effet protecteur, cette molécule a une action létale sur la plupart des cellules. Il est donc nécessaire d'étudier son action sur nos souches algales.

### *II-3-b-α> Toxicité lors de l'incorporation*

Des algues provenant de cultures de 7 jours sont mises en contact pendant des durées de 5 à 60 minutes avec le cryoprotecteur à des concentrations de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % du volume final.

On estime la mortalité par coloration à l'acridine orange.

### *II-3-b-β> Toxicité sur les cultures*

Les concentrations en DMSO testées lors des congélations sont comprises entre 5 % et 40 %. Dans le cas où les deux millilitres d'algues congelées sont directement additionnés aux 18 ml de milieu de culture (soit une dilution par 10), la concentration en DMSO dans la culture est donc comprise entre 0.5 % et 4 %.

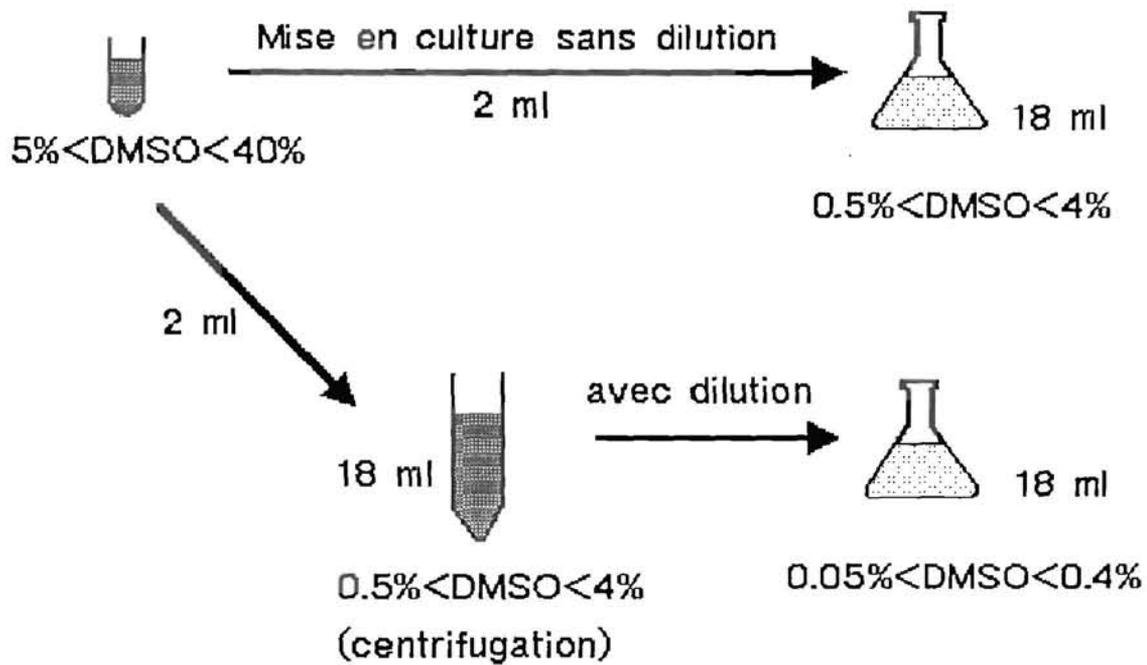


Figure 6: Concentration en DMSO avec et sans dilution

Pour savoir si une étape de dilution supplémentaire (Fig. 6) est nécessaire, des cultures ont été effectuées dans les mêmes conditions opératoires avec des concentrations en DMSO de 0 %, 0.5 %, 1 %, 2 % et 4 % du volume final (Fig. 7). Un comptage journalier permet de tracer les courbes de croissance sur 96 heures.

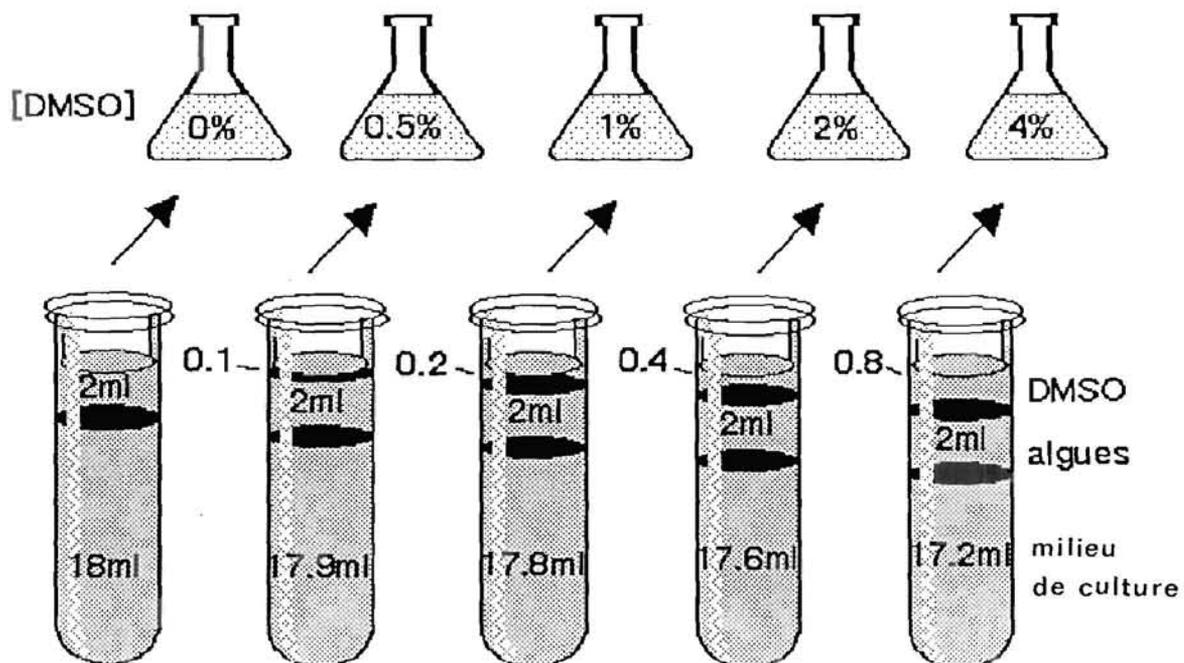


Figure 7: Préparation des milieux de culture avec les différentes concentrations en DMSO



Fig 8: Cultures avec différentes concentrations en DMSO après 4 jours de culture

Cette expérience a été menée sur:

*Platymonas suesica*, *Isochrysis aff galbana*, *Chlorella minutissima*,  
*Nannochloris oculata*, *Chaetoceros gracilis* et *C. sp. "BA"*.

#### II-4> Congélation des micro-algues

##### II-4-a> Matériel utilisé

La cryoconservation nécessite l'emploi de matériel spécifique capable de résister à des chocs thermiques importants.

L'azote liquide permet de maintenir une température de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Le stockage de l'azote se fait dans une cuve de 30 litres. Les échantillons sont conservés dans une cuve de 10 litres contenant 6 canisters et pouvant recevoir jusqu'à 180 tubes de 2 ml (Fig. 9). Les tubes employés sont des tubes NALGENE stérilisés à l'autoclave avant chaque expérimentation.

Pour les congélations directes à  $-196^{\circ}\text{C}$ , on utilise un récipient en polystyrène expansé, préalablement rempli d'azote liquide (Fig. 9). Dans le cas de congélations avec descente lente jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$ , les tubes sont maintenus dans les vapeurs d'alcool à  $-80^{\circ}\text{C}$  suivant le procédé illustré ci-dessous (Fig. 10):

Figure 9:  
Photographie du matériel utilisé, spécifique à la cryobiologie

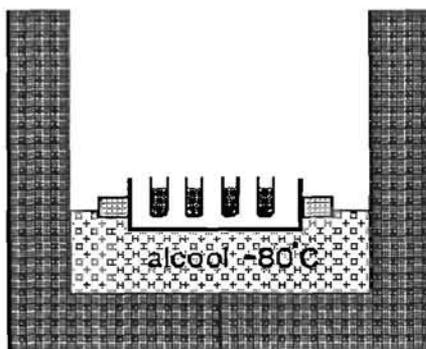
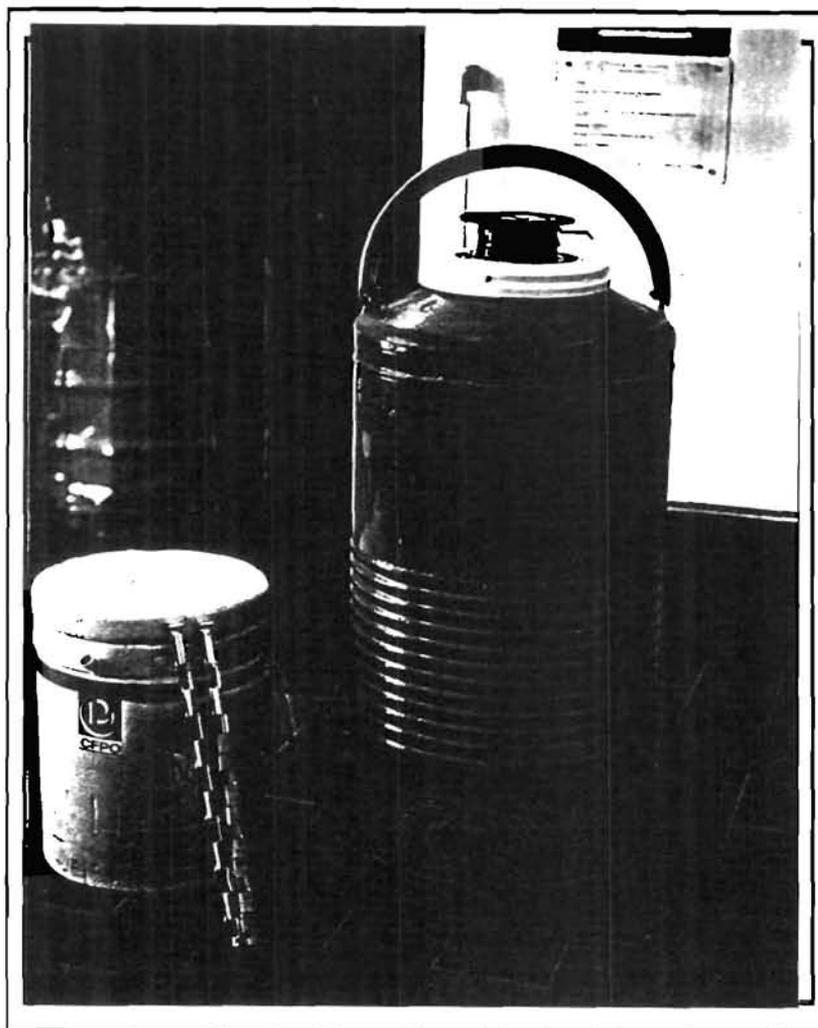


Figure 10: Matériel utilisé pour les congélations lentes

Dans les deux cas, un suivi de température de l'échantillon au cours du refroidissement a été effectué. Un thermomètre électronique muni d'une sonde flexible et relié à une table traçante (Fig. 11) permet l'enregistrement de la température au cours du temps (Annexe 6).

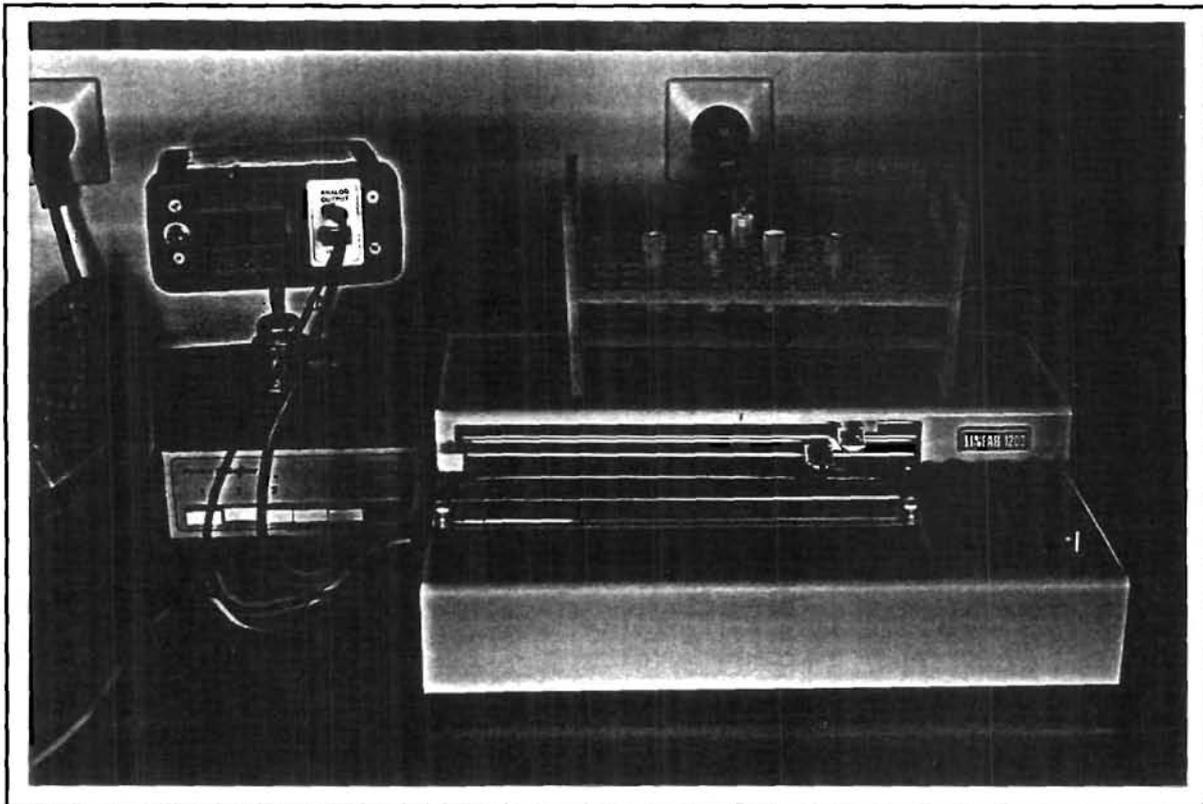


Figure 11: Matériel utilisé pour les suivis de température

#### II-4-b> Recherche d'un protocole de congélation optimale

##### II-4-b- $\alpha$ > Essais d'orientation

En raison de la toxicité du DMSO, plusieurs concentrations en cryoprotecteur (5 %, 10 %, 15 %, 20 % du volume final) sont utilisées pendant différentes durées d'incorporation (0 mn, 1 mn, 5 mn, 10 mn).

Deux vitesses de refroidissement sont étudiées. La première méthode consiste à plonger les tubes dans l'azote liquide directement après l'incorporation du cryoprotecteur. La deuxième méthode fait intervenir une descente lente jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$  avant la mise dans l'azote liquide.

La méthode de congélation est décrite en II-4-c>.

Le taux de survie à la congélation est estimé par comptage à l'acridine orange.

##### II-4-b- $\beta$ > Congélations en vue de cultures

Les premiers essais décrits précédemment ont permis de fixer certains paramètres de congélation. Par la suite, les modalités de congélation seront les suivantes:

- DMSO: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %
- Durée d'incorporation: 1 minute
- refroidissement: direct à  $-196^{\circ}\text{C}$  ou avec descente lente jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$
- réchauffement: bain-marie à  $25^{\circ}\text{C}$

#### II-4-c> Méthode de congélation/décongélation

Avant la congélation, on prépare les solutions diluées de cryoprotecteur, on répartit ensuite les solutions algales dans les tubes NALGENE, préalablement stérilisés, à raison de 1 ml par tube.

Les opérations qui suivent doivent être parfaitement chronométrées: après ajout des solutions de cryoprotecteur (1 ml), on attend la durée d'incorporation voulue puis on congèle les tubes. La congélation se fait, soit en les plongeant directement dans l'azote liquide soit en les laissant 20 minutes dans les vapeurs d'alcool à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Toutes ces opérations (Fig. 12) sont effectuées stérilement (près d'une flamme: Fig. 13) de façon à ne pas introduire de biais, par contamination bactérienne, dans la méthode de comparaison. De plus, en vue d'une analyse statistique, chaque traitement est effectué en plusieurs réplicats.

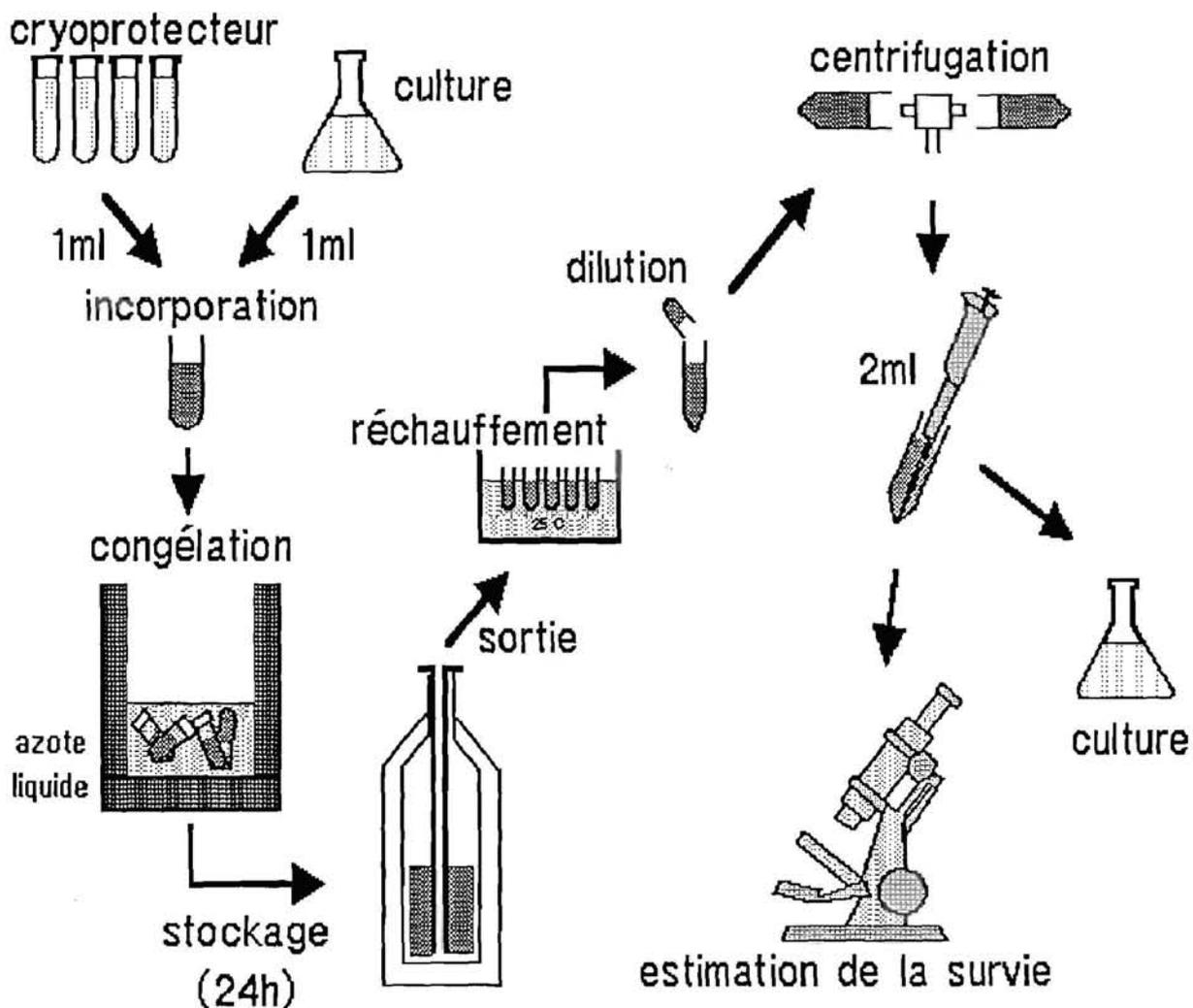


Figure 12: Ensemble des étapes de la congélation

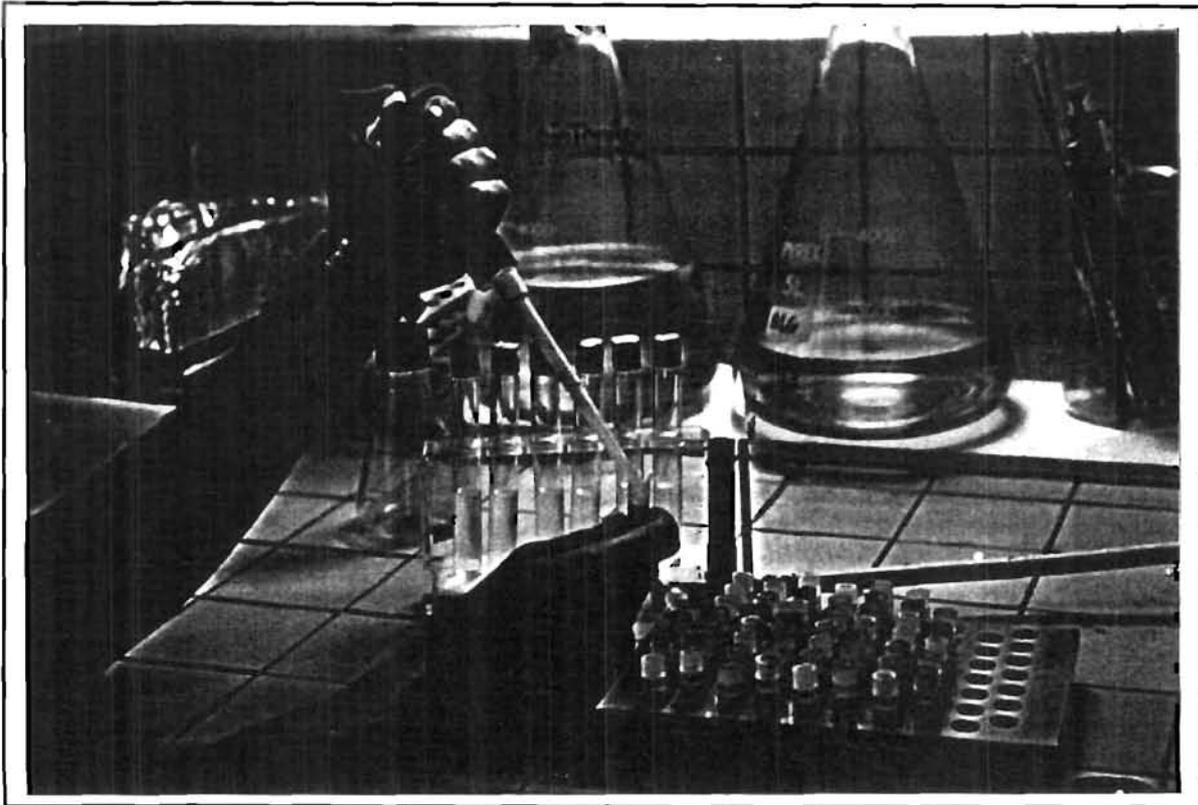


Figure 13: Conditions de manipulation

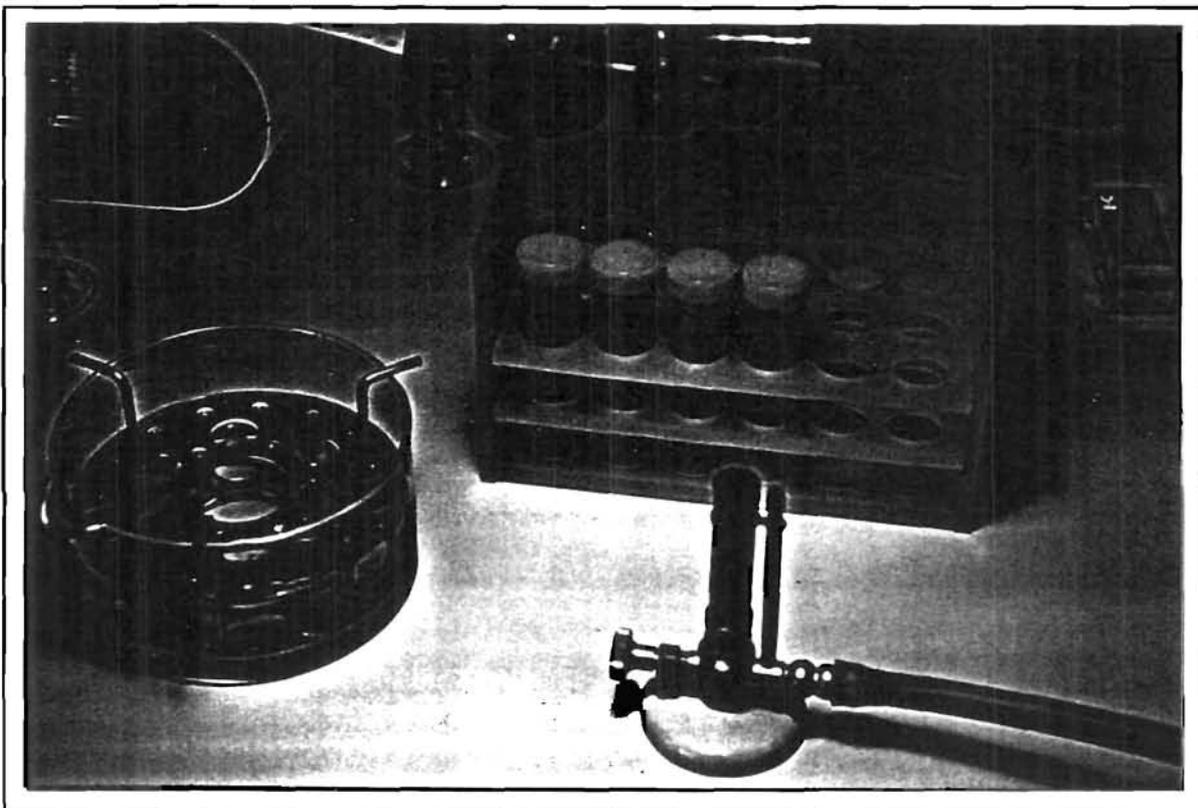


Figure 14: Matériel utilisé pour le réchauffement, la dilution et la centrifugation

Les échantillons sont maintenus 24 heures dans l'azote liquide avant d'être analysés. Les tubes sortis de l'azote sont décongelés au bain-marie à 25°C. Quand tous les cristaux de glace ont disparu (durée standardisée à 5 minutes), les échantillons sont dilués dix fois (Fig. 14) dans de l'eau de mer stérile. On centrifuge immédiatement.

Les analyses sont effectuées sur les 2 ml pipetés au culot après centrifugation.

## II-5> Analyses statistiques des données

Pour le traitement des données, on a utilisé le logiciel STATGRAPHICS.

L'analyse de variance multi-facteur a permis de comparer l'influence des différents paramètres sur la survie des algues. Elle permet aussi de savoir s'il existe une interaction entre ces différents paramètres (concentration en DMSO, temps d'incorporation, vitesse de refroidissement).

Pour les résultats sous forme de pourcentages, les données ont été normalisées par une transformation angulaire:

$$\text{arc-sinus} ( \sqrt{ (\text{pourcentage} / 100) } )$$

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques sur lesquels apparaissent les intervalles de confiance à 95 % .

### III> RESULTATS

### III-1> Méthodes de dénombrement

#### III-1-a> Méthode de coloration à l'acridine orange

L'expérience effectuée sur *Platymonas suesica* a permis de tracer la droite de régression linéaire entre taux de mortalité réel et taux de mortalité compté par la méthode de coloration à l'acridine orange (Annexe 3).

Le taux de corrélation obtenu est de 99 %.

#### III-1-b> Suivi de croissance par densité optique

##### III-1-a-α> Choix de la longueur d'onde de travail

Pour chaque espèce d'algue, ont été tracées les courbes représentant la variation de l'absorption en fonction de la longueur d'onde.

La longueur d'onde choisie correspond au pic d'absorption des chlorophylles (Annexe 4). La valeur commune pour toutes les algues a été fixée à 450 nm.

##### III-1-a-β> Corrélation entre densité optique et concentration cellulaire

Pour chacune des espèces d'algue on détermine le taux de corrélation entre densité optique et concentration cellulaire et l'équation de la droite de régression (Tabl. 1). Les droites de régression (Annexe 5) peuvent être utilisées comme abaques pour déterminer la concentration cellulaire à partir de la densité optique.

Tableau 1: Taux de corrélation et équation de la droite de régression entre densité optique et concentration cellulaire pour chaque espèce d'algue.

Espèce	Tx corrél.	Equation
<i>Platymonas</i> sp. "Batan"	94 %	$Y = 3,4 \times 10^{-7} \times X + 0,016$
<i>Platymonas suesica</i>	96 %	$Y = 1,9 \times 10^{-7} \times X + 0,038$
<i>Isochrysis aff galbana</i>	95 %	$Y = 4,1 \times 10^{-8} \times X + 0,067$
<i>Chlorella minutissima</i>	95 %	$Y = 9,5 \times 10^{-9} \times X + 0,077$
<i>Nannochloris oculata</i>	97 %	$Y = 1,6 \times 10^{-8} \times X + 0,044$
<i>Chaetoceros gracilis</i>	97 %	$Y = 3,5 \times 10^{-8} \times X + 0,022$
<i>Chaetoceros</i> sp. "BA"	98 %	$Y = 5,2 \times 10^{-8} \times X + 0,035$

### III-2> Essais avant la congélation

#### III-2-a> Centrifugation

##### *III-2-a-α> Mortalié induite par la centrifugation*

D'après les résultats obtenus, la mortalité induite par la centrifugation n'est pas négligeable par rapport à celle d'une solution algale non centrifugée. On constate par ailleurs que l'action létale de la centrifugation est significativement plus élevée pour *Platymonas suesica* que pour *P. sp. "Batan"* et *Isochrysis aff galbana* (Fig. 15, p. 29).

##### *III-2-a-β> Taux de récupération après centrifugation*

Le pourcentage de récupération après centrifugation, dans les conditions opératoires données, varie entre 66 % et 88 % (Tabl. 2) en fonction de l'espèce d'algue considérée.

Tableau 2: Pourcentage de récupération après centrifugation pour chacune des espèces d'algue.

N0 = concentration cellulaire avant centrifugation.

N1 = concentration cellulaire après centrifugation.

Espèce	N0	N1	Rendement
<i>Platymonas sp. "Batan"</i>	815.000	535.000	65.6 %
<i>Platymonas suesica</i>	1.142.000	754.000	66 %
<i>Isochrysis aff galbana</i>	12.235.000	10.326.000	84 %
<i>Chlorella minutissima</i>	40.310.000	29.532.000	73.2 %
<i>Nannochloris oculata</i>	29.144.000	25.753.000	88.3 %
<i>Chaetoceros gracilis</i>	9.162.000	6.744.000	73.6 %
<i>Chaetoceros sp. "BA"</i>	6.624.000	5.584.000	84.3 %

### III-2-b> Toxicité du cryoprotecteur

#### III-2-b-a> Toxicité lors de l'incorporation

Pour le cryoprotecteur testé (DMSO), on constate une augmentation de la mortalité en fonction de la durée de contact et surtout de la concentration en cryoprotecteur. Les études ont été menées sur *Platymonas* sp. "Batan" (Fig. 16).

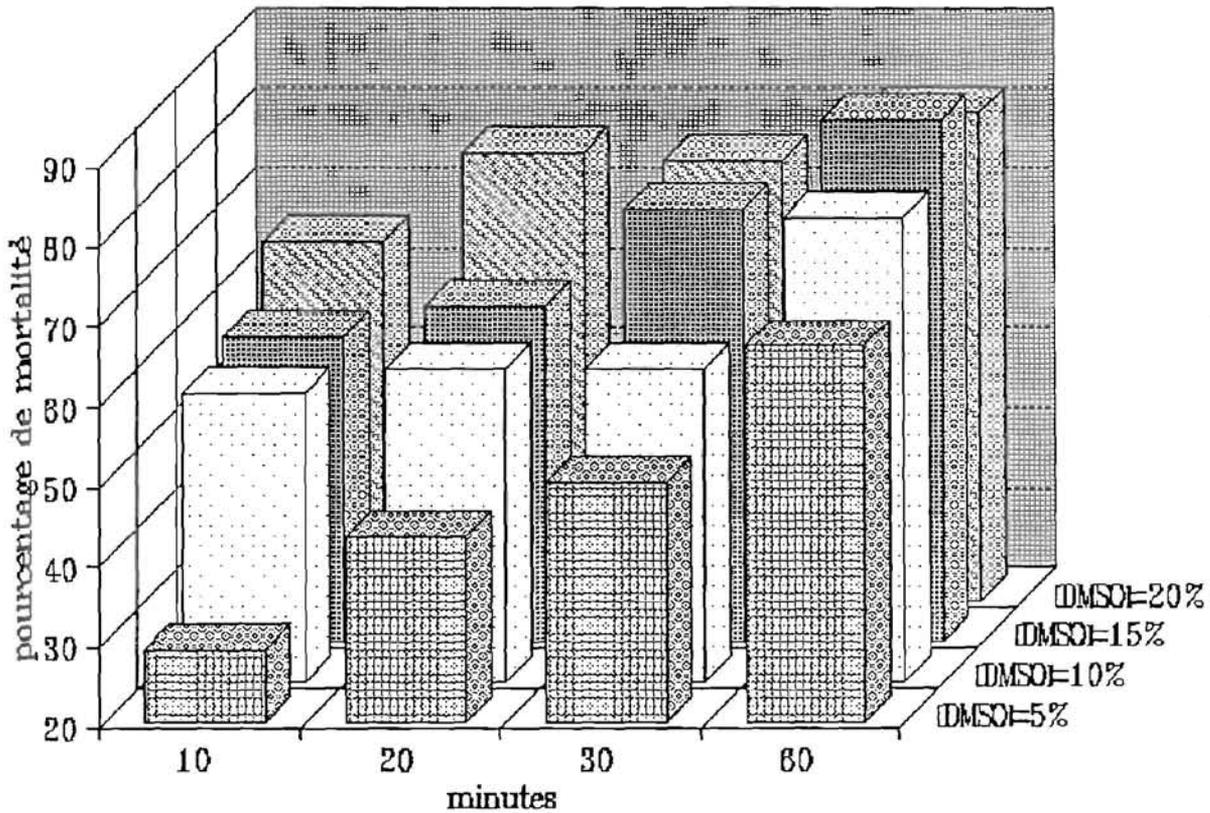


Figure 16: Mortalité en fonction de la concentration en DMSO et de la durée d'incorporation

#### III-2-b-b> Toxicité sur les cultures

Pour chacune des espèces suivantes: *Platymonas suecica*, *Isochrysis aff galbana*, *Chlorella minutissima*, *Nannochloris oculata*, *Chaetoceros gracilis* et *C.sp. "BA"*, on remarque que jusqu'à 1 % de DMSO dans le milieu de culture, la multiplication des algues n'est pratiquement pas modifiée. Par contre, pour 2 % et 4 % de DMSO, la croissance des populations est soit fortement ralentie soit stoppée (Fig. 17).

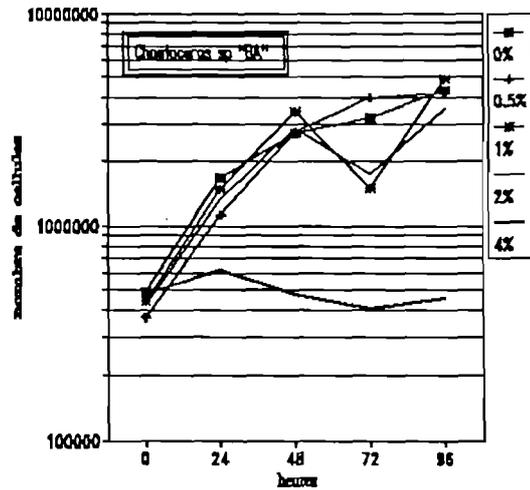
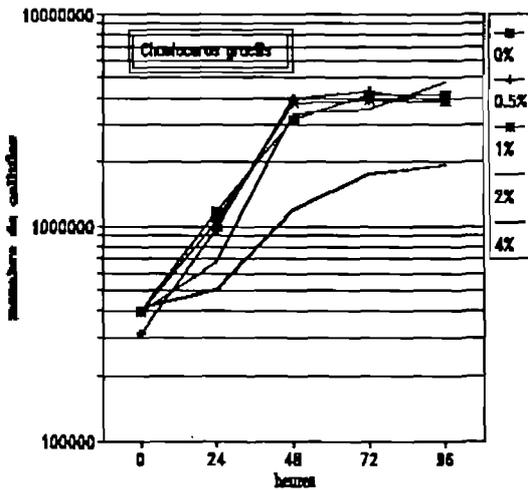
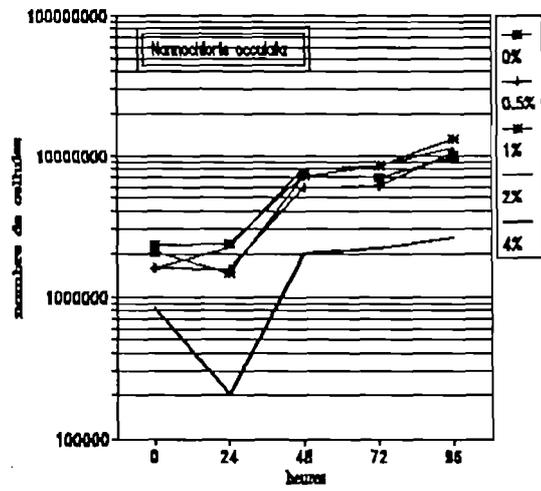
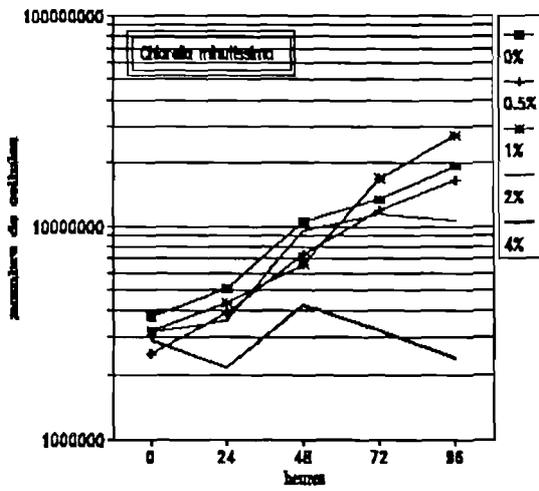
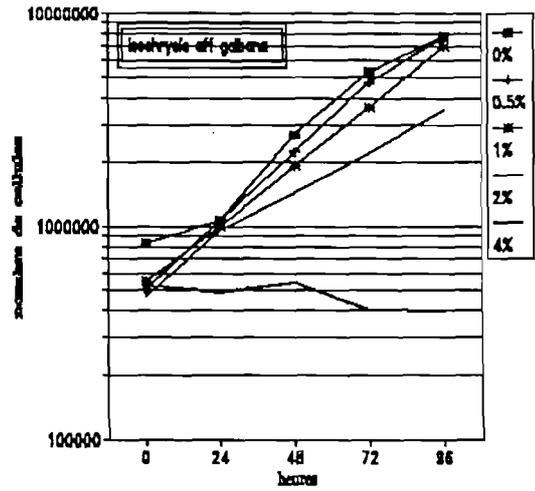
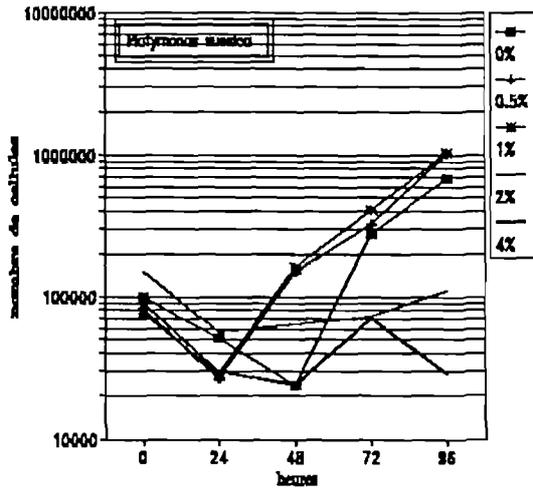


Figure 17: Influence de la concentration en DMSO sur les cultures

Tableau 4: Taux de survie (en %) après décongélation en fonction de la concentration en DMSO et la durée d'incorporation

Durée d'incorporation	Concentrations en DMSO											
	5%			10%			15%			20%		
réplicats n°	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	55	46	30	34	54	50	45	49	45	37	18	41
1	35	40	50	12	47	40	30	49	55	4	33	34
5	36	38	36	42	42	37	52	35	40	57	46	48
10	51	49	31	52	52	52	54	25	39	66	78	64

==> *Isochrysis aff galbana*:

Dans ce cas, les résultats de l'évaluation de la survie après congélation, en fonction de la concentration en DMSO et de la durée d'incorporation (Tabl. 5), permettent de conclure que 0 mn et 1 mn représentent le traitement optimal ( $F=36,5$ ;  $ddl=3$ ;  $p<0,001$ ) et que 5 % est l'optimum de concentration ( $F=28.237$ ;  $ddl=3$ ;  $p<0,001$ ).

Tableau 5: Taux de survie (en %) après décongélation en fonction de la concentration en DMSO et de la durée d'incorporation

Durée d'incorporation	Concentrations en DMSO											
	5%			10%			15%			20%		
réplicats n°	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	78	79	67	68	71	73	69	63	68	38	37	30
1	58	52	55	60	58	56	57	60	72	55	55	57
5	44	57	57	37	33	42	28	33	44	40	41	42
10	67	74	58	56	58	60	52	50	54	41	40	47

En second lieu, une expérience avec trois réplicats et une durée d'incorporation fixée à 1 mn a été effectuée afin de tenter de vérifier la concentration en DMSO optimale. L'analyse statistique des données ne révèle pas d'optimum significatif ( $F=0,969$ ;  $ddl=3$ ;  $p>0,4$ ) même si 15 % paraît donner de meilleurs résultats (Fig. 19).

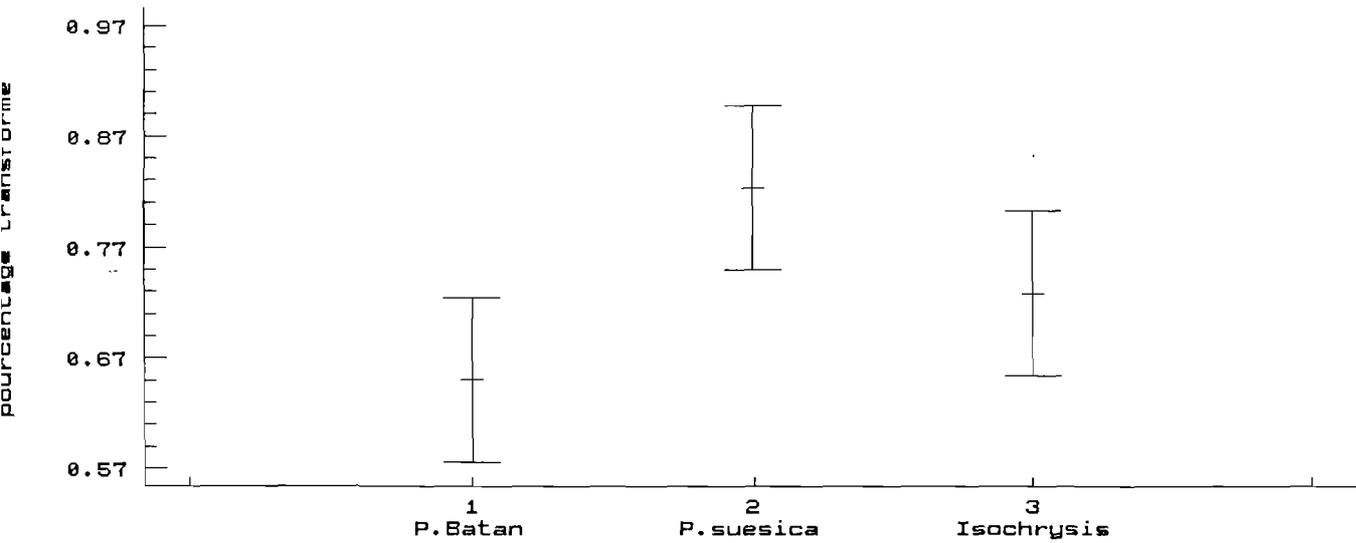


Figure 15: Mortalité induite par la centrifugation

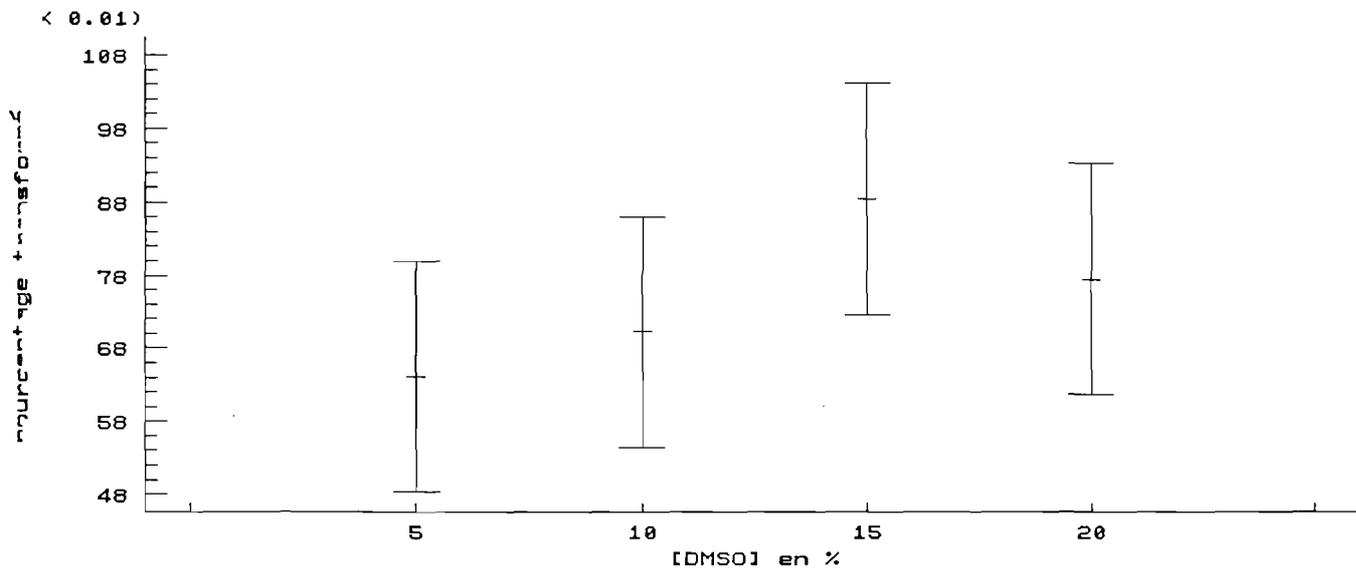


Figure 18: Taux de survie après congélation directe à  $-196^{\circ}\text{C}$  en fonction de la concentration en DMSO pour *P. sp.* "Batan"

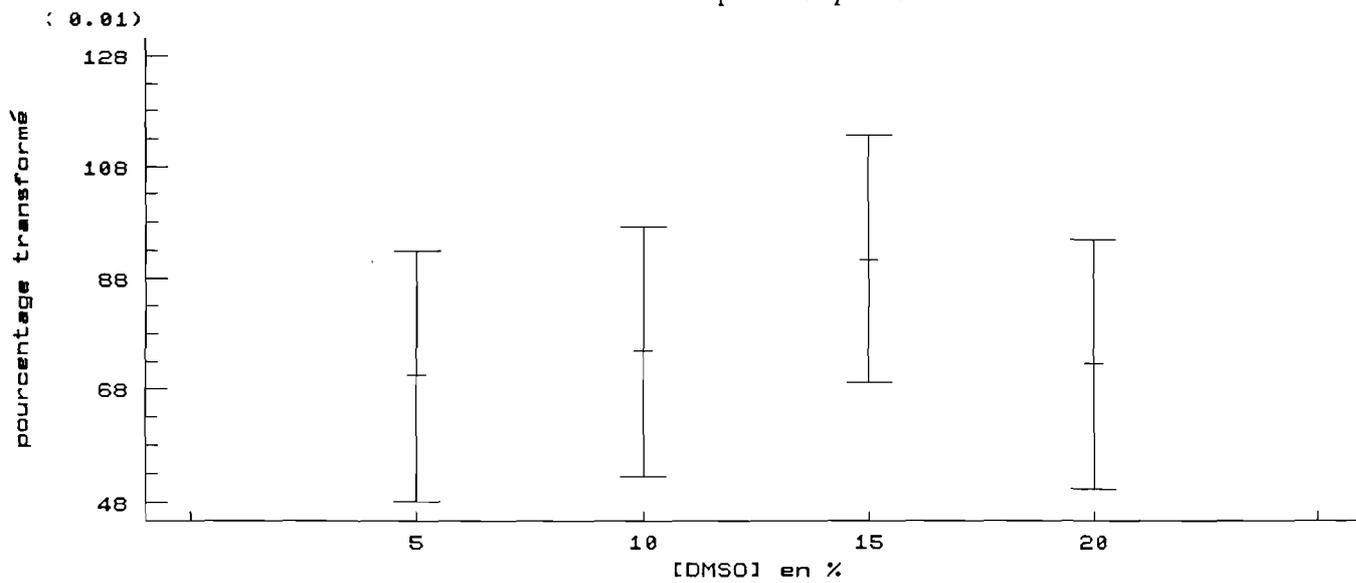


Figure 19: ...avec 1 mn d'incorporation pour *Isochrysis aff galbana*

III-3-a-β> Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C

Les essais effectués dans ces conditions ont tous été faits sans réplicats.

==> *Isochrysis aff galbana*:

La meilleure survie semble être obtenue pour 20 % de DMSO et 1 mn d'incorporation. Pour 10 mn d'incorporation, la survie est meilleure avec 10 % de DMSO (Fig. 20).

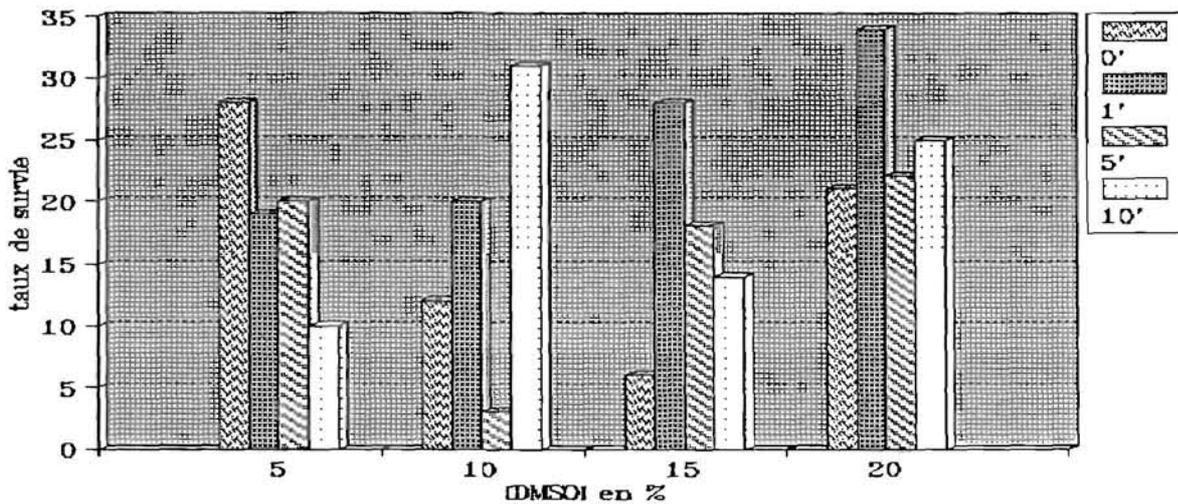


Figure 20: Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C pour *Isochrysis aff galbana*

==> *Chlorella minutissima*:

Pour les concentrations de 5 % et 10 % de DMSO, l'optimum se situe vers 5 mn d'incorporation. Pour 15 % et 20%, ce serait une durée de 10 mn qui conviendrait le mieux (Fig. 21).

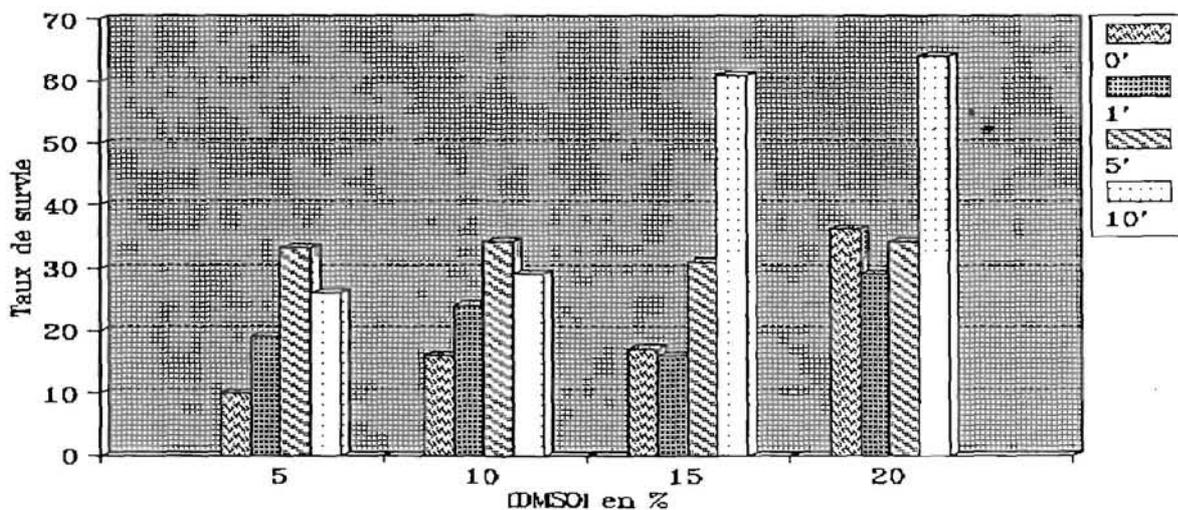


Figure 21: Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C pour *Chlorella minutissima*

==> *Chaetoceros gracilis*:

Pour cette algue, les résultats obtenus ne sont pas assez différents pour en tirer des renseignements (Fig. 22).

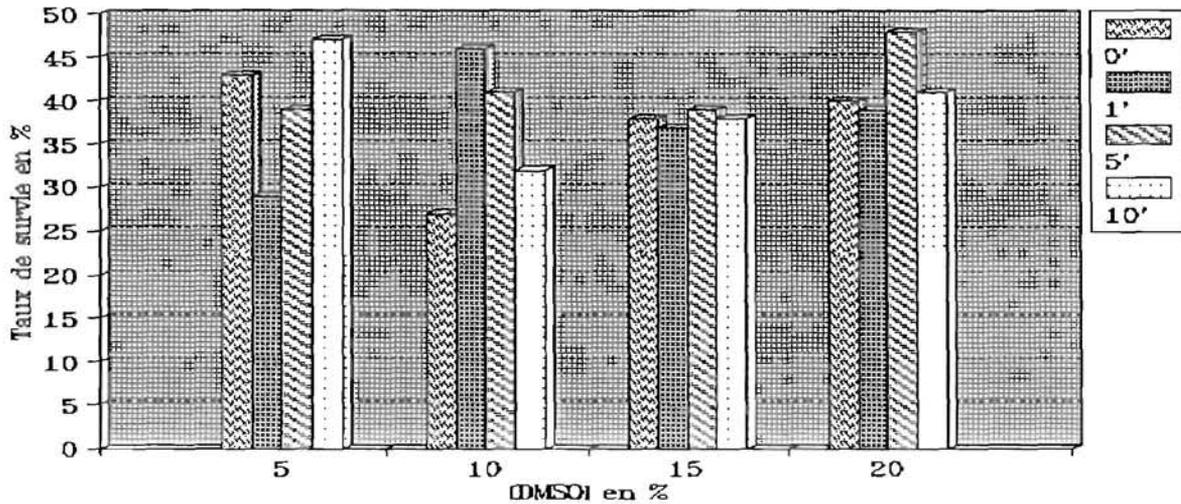


Figure 22: Congélation avec descente lente jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$  pour *Chaetoceros gracilis*

### III-3-b> Essais avec culture

#### III-3-b- $\alpha$ > Congélation directe à $-196^{\circ}\text{C}$

Les essais de congélation suivis de culture ont pu être effectués sur chacune des sept espèces d'algue.

Pour chacune d'elles, on présente l'évolution de la densité optique en fonction du temps (Fig. 23) et ce pour chaque concentration en DMSO testée (5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %).

Ces courbes de croissance permettent de déterminer la concentration en DMSO pour laquelle la croissance est la plus rapide ainsi que le temps nécessaire à la reprise de croissance (Tabl. 6, page suivante).

#### III-3-b-B> Congélation avec descente lente jusqu'à $-30^{\circ}\text{C}$

Ce deuxième protocole de congélation a été testé dans le but de réduire le temps avant la reprise de croissance. Les congélations ont été effectuées avec deux concentrations en cryoprotecteur: la concentration optimale trouvée (III-3-b- $\alpha$ ) et la concentration immédiatement inférieure.

Les courbes de croissance (Fig. 24) permettent de déterminer la nouvelle durée avant reprise de croissance.

Tableau 6: Temps avant reprise de croissance en jours et concentration optimale en DMSO (entre parenthèses)

Espèce	Congélation directe	Avec descente lente
<i>Platymonas</i> sp. "Batan"	8 (15 %)	5 (15 %)
<i>Platymonas</i> <i>suesica</i>	10 (20 %)	5 (15 %)
<i>Isochrysis</i> <i>aff galbana</i>	10 (15 %)	5 (15 %)
<i>Chlorella</i> <i>minutissima</i>	8 (20 %)	6 (15 %)
<i>Nannochloris</i> <i>occulata</i>	5 (15 %)	2 (15 %)
<i>Chaetoceros</i> <i>gracilis</i>	5 (20 %)	4 (20 %)
<i>Chaetoceros</i> sp. "BA"	5 (20 %)	4 (20 %)

### III-3-b-Γ> Congélation sans DMSO

Pour chaque espèce d'algue, des congélations témoins (sans DMSO) ont été effectuées. Les cultures ont été suivies pendant 12 jours. La reprise de croissance n'a été observée que pour *Nannochloris occulata*, au bout de 6 jours (Fig. 25).

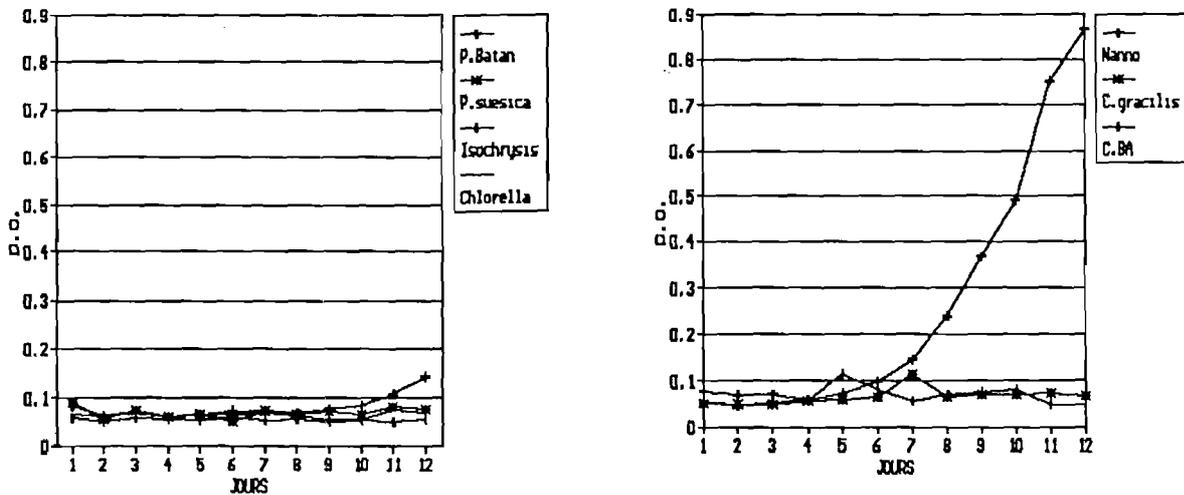


Figure 25: Croissance des algues congelées sans DMSO

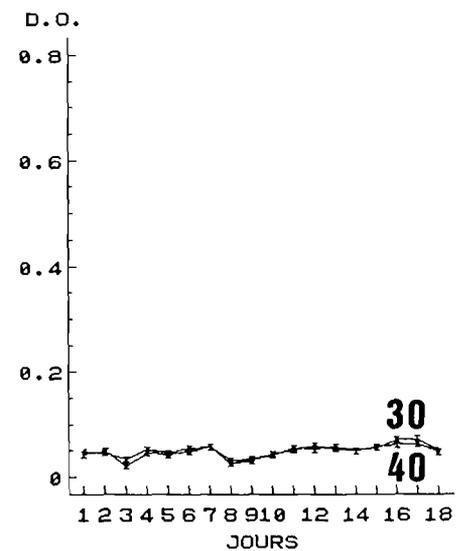
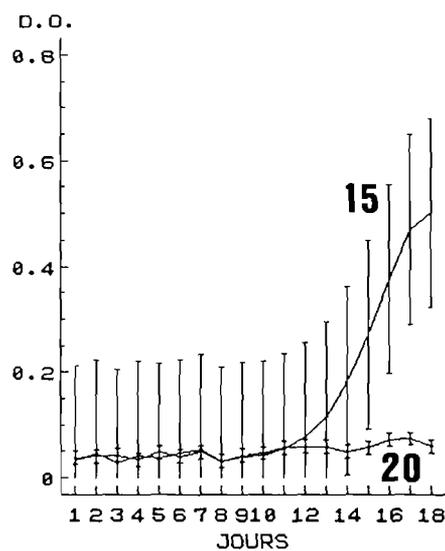
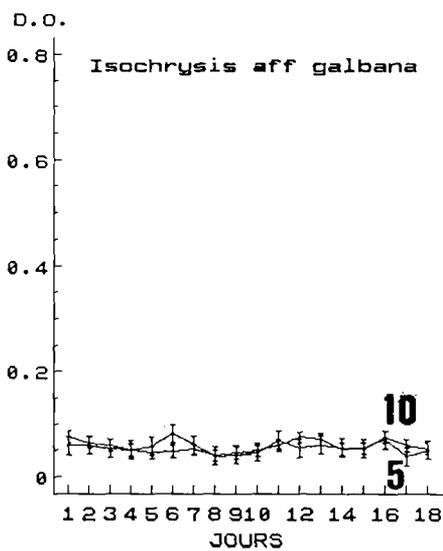
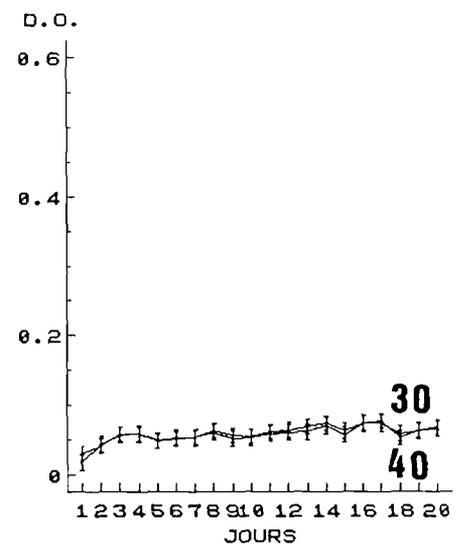
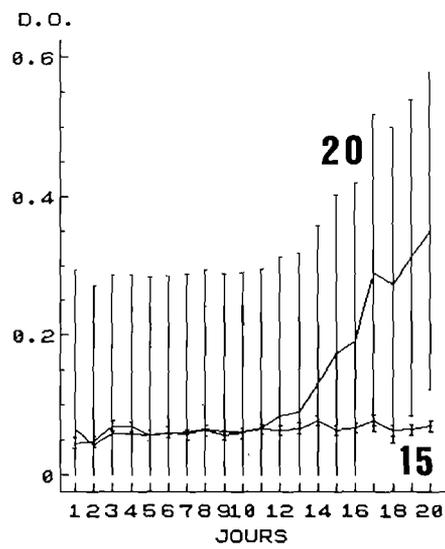
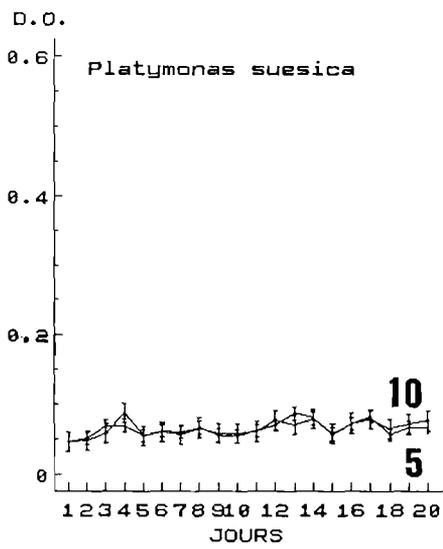
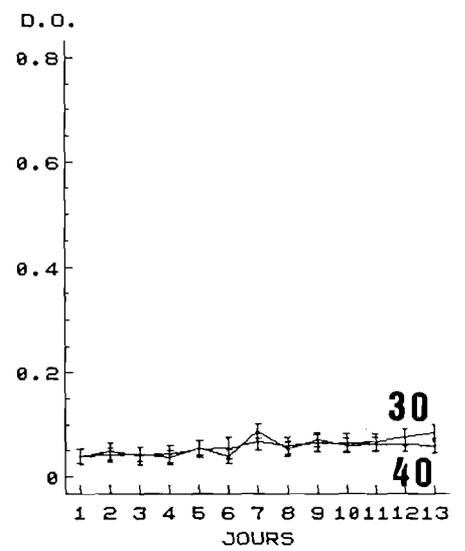
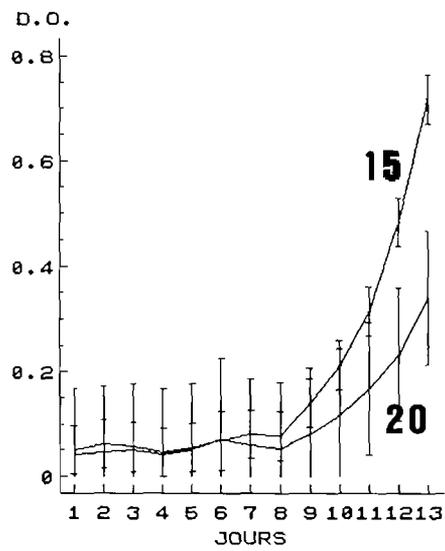
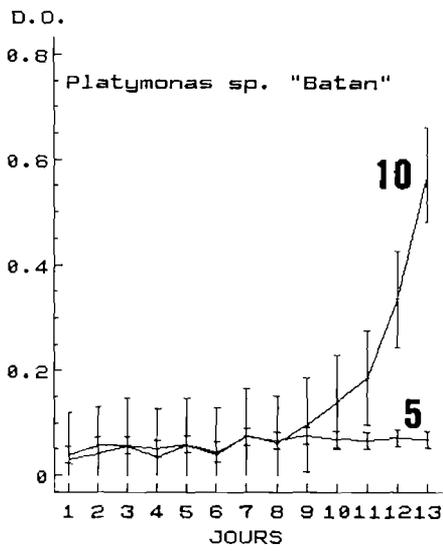


Figure 23: Croissance des algues après congélation avec différentes concentrations en cryoprotecteur

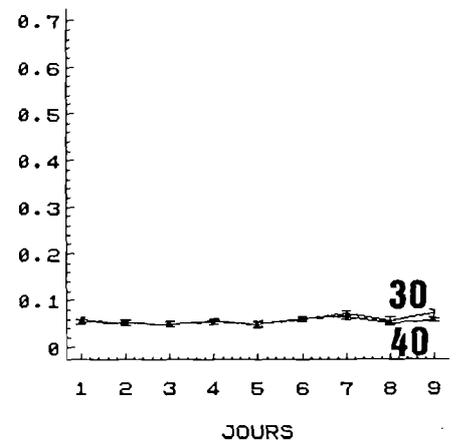
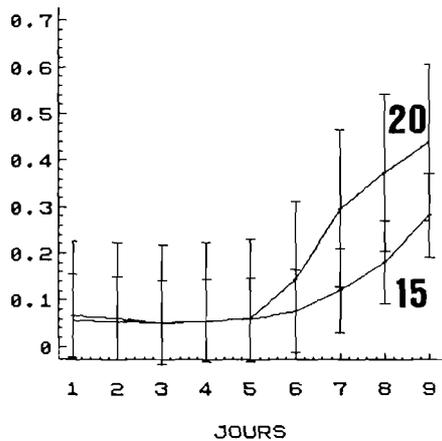
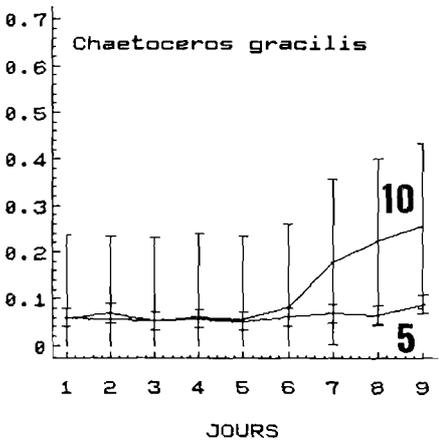
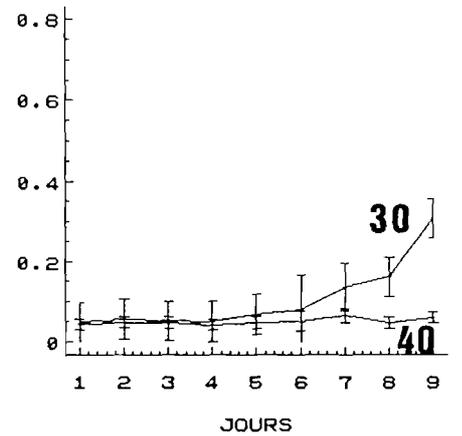
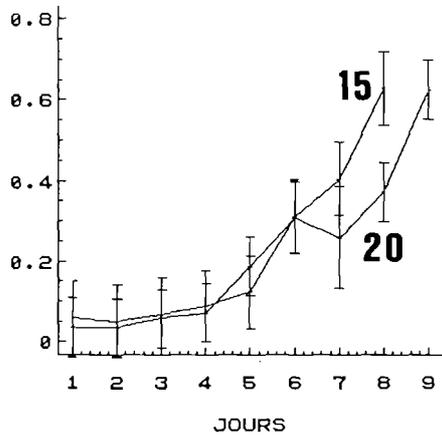
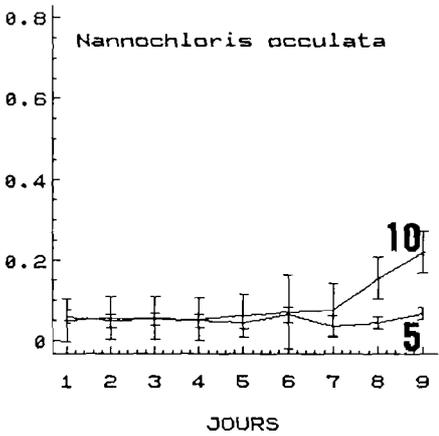
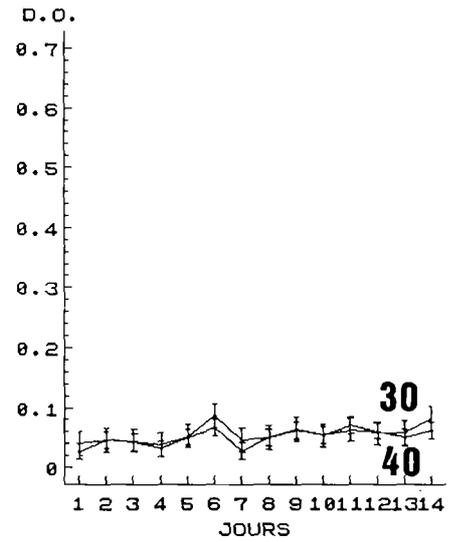
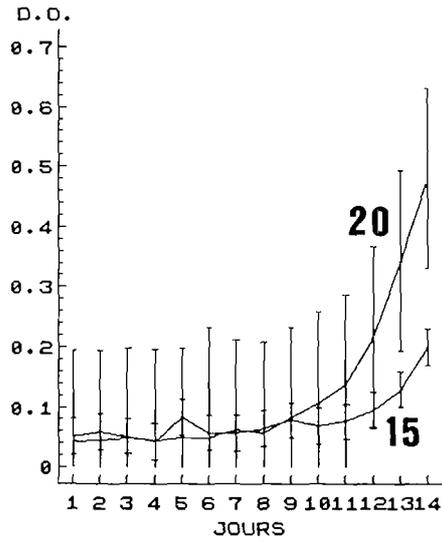
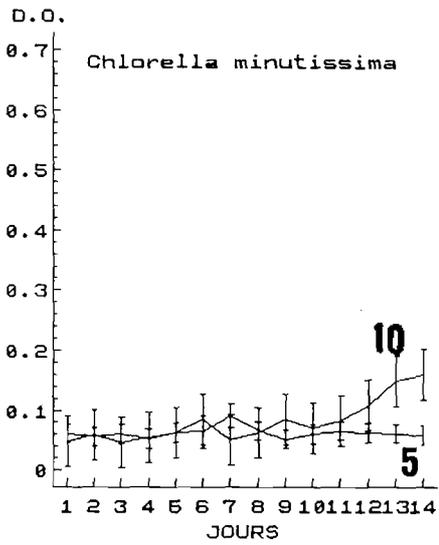


Figure 23 (suite)

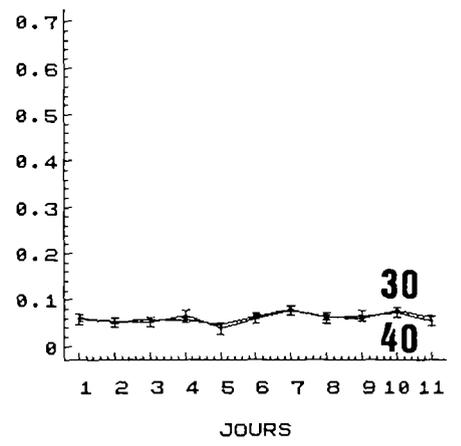
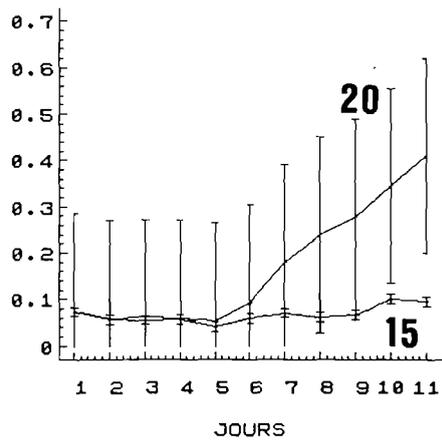
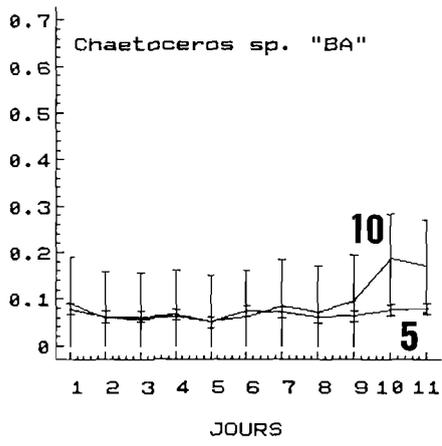


Figure 23: (fin)

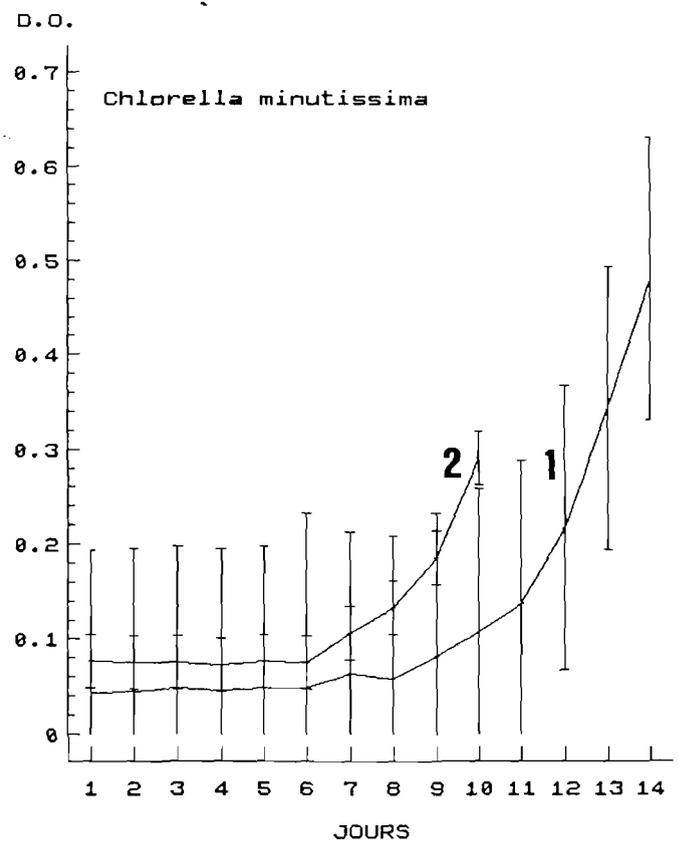
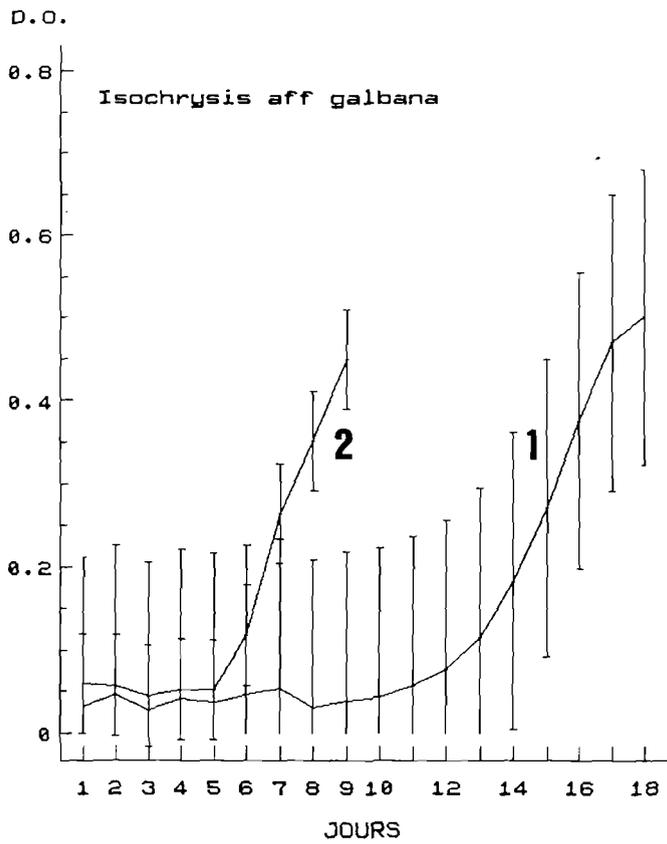
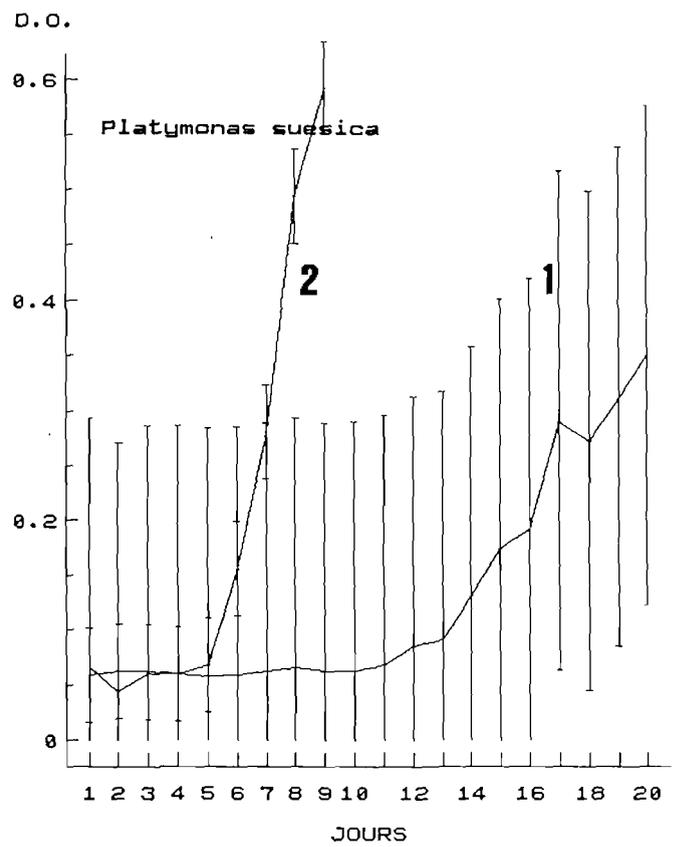
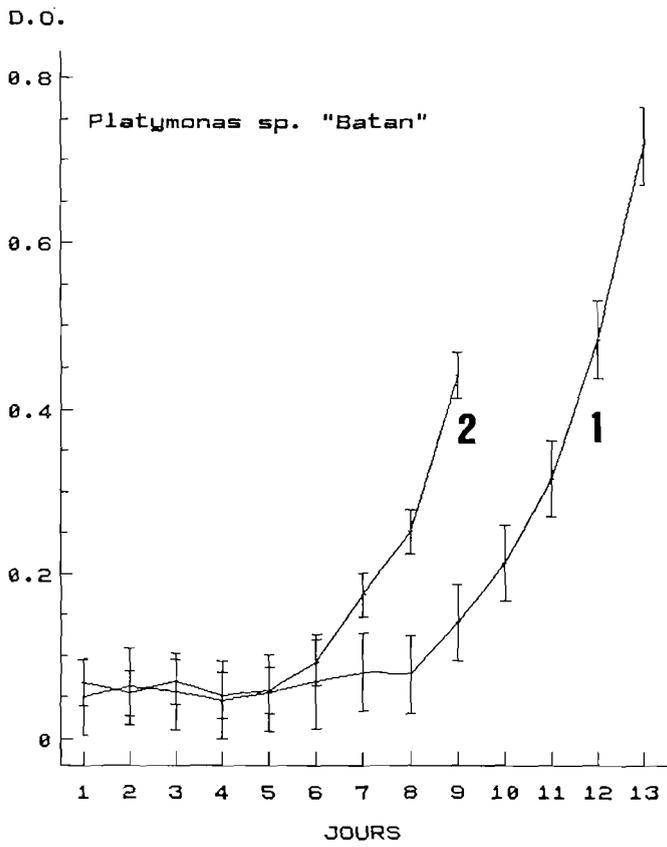


Figure 24: Comparaison de la croissance pour une congélation directe (1) et une congélation lente (2)

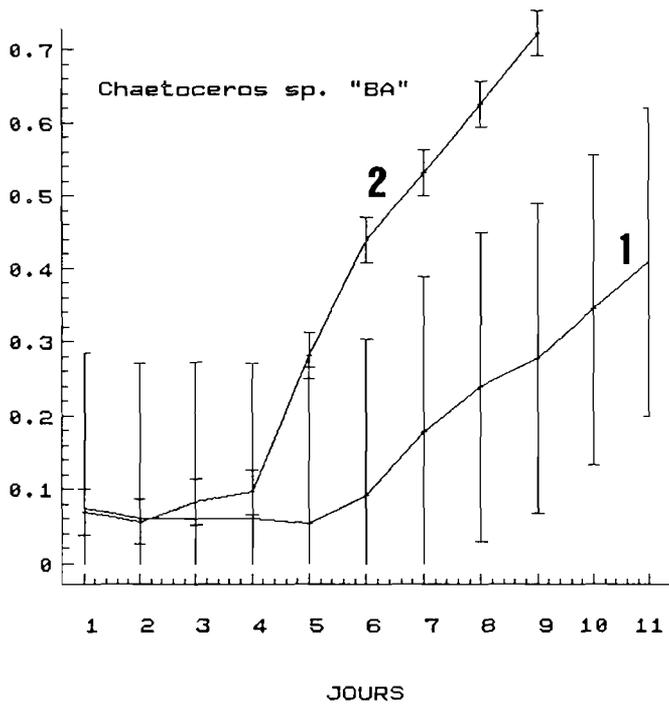
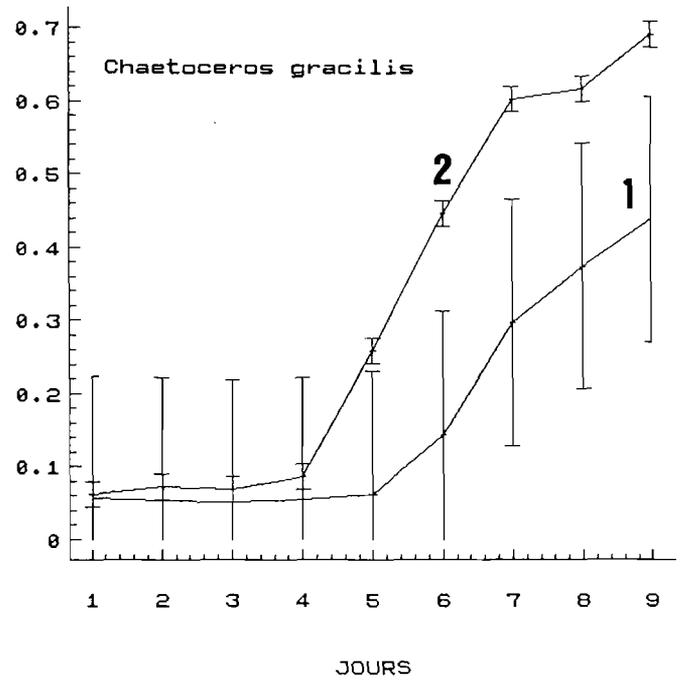
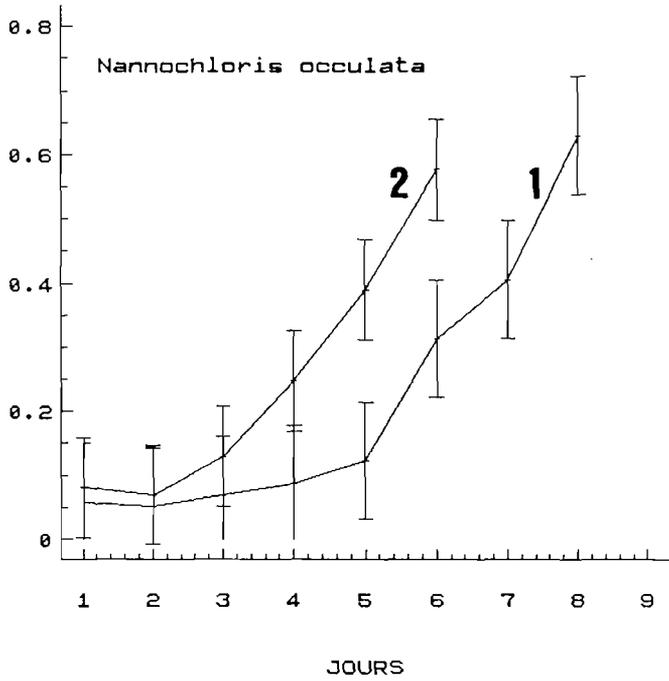


Figure 24: (suite et fin)

#### IV> DISCUSSION

## IV-1> Méthodes de comparaison des différents protocoles

### IV-1-a> Dénombrements cellulaires par lecture de la densité optique

Le taux de corrélation obtenu entre densité optique et la concentration cellulaire sont suffisamment élevés pour que cette méthode, bien qu'indirecte, soit utilisable pour les suivis de croissance.

Toutefois, cette méthode présente des limites.

D'une part, les résultats ne sont fiables que pour des solutions de turbidité faible et surtout constante. Les suspensions algales doivent donc être le plus propre possible.

D'autre part, cette méthode, qui permet, par comparaison, de suivre l'évolution de la croissance d'une population, semble peu appropriée pour déterminer une concentration cellulaire avec précision.

L'information apportée par les courbes de croissance ainsi obtenues se limite donc à la durée de latence et la pente de la droite de croissance. Le taux de survie après décongélation a été estimé selon une autre méthode.

Le choix de la longueur d'onde de travail devait se baser sur les résultats de la mesure de l'absorption en fonction de la longueur d'onde (Annexe 4). Ces mesures ne permettant pas de déterminer une longueur d'onde unique optimale pour toutes les espèces d'algues, une longueur d'onde commune a été choisie de façon arbitraire pour standardiser les opérations. Par ailleurs, des travaux de détermination quantitative de phytoplancton par spectrophotométrie dans des eaux marines ont été effectués avec une longueur d'onde de 450 nm. Cette longueur d'onde, disponible sur le lecteur de microplaque, a donc été choisie.

### IV-1-b> Estimation de la survie par coloration

Lors des essais préliminaires, il était primordial d'utiliser une méthode d'évaluation de la survie rapide et simple à mettre en oeuvre.

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature:

- Dénombrement de colonies cellulaires sur gélose.

Les solutions algales sont diluées par dilutions successives dans le milieu de culture de façon à obtenir quelques algues par boîte de Pétriensemencée. Sachant qu'une cellule donne naissance à une colonie et connaissant la dilution effectuée, on peut calculer le taux de survie des algues après congélation (Alexander *et al.*, 1980).

Cette méthode n'a pas pu être mise en oeuvre du fait de la mauvaise croissance des algues présentes au C.O.P. sur milieu gélosé (G. Jonquière, comm. pers.).

- Evolution de la quantité d'oxygène dissous.

Connaissant la quantité d'oxygène dégagée par une algue en bonne condition physiologique, il est possible en théorie de connaître le nombre de cellules vivantes par millilitre à partir du volume d'oxygène produit (Ben-Amotz et Gilboa, 1980).

Cette méthode paraît très peu précise du fait des interférences dues à d'autres organismes susceptibles de se trouver dans les cultures.

- Coloration différentielle des cellules mortes et vivantes.

Plusieurs colorants permettent de différencier une cellule morte d'une cellule vivante:

- > le rouge neutre
- > le bleu de méthylène
- > l'acridine orange

Lors des essais effectués avec ces différents colorants, seule l'acridine orange a donné des résultats satisfaisants. Le fort taux de corrélation entre taux de mortalité théorique et taux de mortalité compté montre d'ailleurs la validité de cette méthode de coloration.

Cependant, selon l'espèce étudiée, la caractérisation des cellules mortes et vivantes est plus ou moins aisée.

En effet, chez *Chlorella minutissima* et *Nannochloris occulata*, la trop petite taille des cellules empêche une bonne visualisation de leur état. Les dénombrements à l'acridine orange n'ont donc pas pu être effectués pour ces deux algues.

#### IV-1-c> Mise en culture après congélation

La seule méthode directe pour comparer deux traitements est de mettre les algues en culture et d'étudier la croissance.

Il existe quelques inconvénients inhérents à cette méthode:

- le temps parfois important nécessaire à l'obtention de la réponse (jusqu'à 15 à 20 jours après l'ensemencement).
- le risque de contamination des cultures par des bactéries ou par d'autres espèces d'algues.
- la limitation du nombre de tests du fait de l'encombrement des fioles de cultures.

De plus, l'étape de centrifugation apporte un biais qui limite la reproductibilité entre réplicats. En effet, le taux de récupération des cellules après centrifugation varie de 66 % à 88 %. Ceci explique, en partie, la variabilité observée entre les réplicats pour la croissance (surtout pour *P. suesica*, algue pour laquelle les intervalles de confiance à 95 % sont très grands).

Cependant, la mise en culture des échantillons traités reste la méthode la plus fiable comparée à la coloration à l'acridine orange. Les cultures ont en effet permis de déceler des optimums là où la coloration ne mettait en évidence aucune différence significative entre les différents traitements. On a aussi constaté que la coloration pouvait aboutir à des valeurs totalement ératiques, rendant l'analyse statistique beaucoup moins puissante.

#### IV-2> Cryoprotecteurs

##### IV-2-a> Mécanismes d'action des cryoprotecteurs

On distingue deux types de cryoprotecteurs, les pénétrants et les non-pénétrants. Les premiers passent à travers la membrane cellulaire et réduisent le taux de cristallisation du cytoplasme (Rall *et al.*, 1978). La durée de pénétration est variable en fonction du type de cellule et est précédée d'une phase de plasmolyse (due à une déshydratation par gradient de pression osmotique). Les

seconds, par contre, assurent uniquement la déshydratation de la cellule et limitent ainsi la quantité de cristaux pouvant se former lors du refroidissement.

Toutefois, le temps d'équilibration du cryoprotecteur étant plus long que le temps de cristallisation (Pushkar *et al.*, 1980), un cryoprotecteur utilisé avec un temps de contact très court avec la cellule se comporte comme un cryoprotecteur non-pénétrant. D'où l'idée de tester différentes durées d'incorporation avec un cryoprotecteur potentiellement pénétrant.

#### IV-2-b> Choix du cryoprotecteur

Les cryoprotecteurs pénétrants offrent plus de possibilités dans les modalités de protection de la cellule. Le DMSO est sans aucun doute la plus usitée des molécules pénétrantes en cryobiologie. Le DMSO a notamment été utilisé par Flassch *et al.* (1975) pour la cryopréservation d'algues unicellulaires.

#### IV-2-c> Toxicité du DMSO

L'effet toxique du DMSO bien connu pour des cellules animales (Fahy, 1984, 1986 *in* Dumont, 1989), se devait d'être étudié sur des cellules algales.

Nos essais préliminaires ont montré que c'est surtout au moment de l'incorporation (durant laquelle la concentration en DMSO peut atteindre 40% du volume final) que la mortalité induite par le DMSO est la plus grande. Cette indication a donc été très utile pour le choix des durées d'incorporation (toujours inférieures ou égales à 10 mn).

En culture, la croissance des algues n'est pas perturbée pour des concentrations en DMSO inférieures ou égales à 1 %. Dans le cas où les 2 ml d'échantillon congelé sont directement ajoutés aux 18 ml de milieu de culture (soit une dilution par 10), la concentration en DMSO dans la culture peut atteindre 4 %. On en déduit donc qu'une étape de dilution supplémentaire doit être ajoutée dans le protocole de traitement des algues.

#### IV-2-d> Choix des doses de cryoprotecteur

On appelle ici dose, la combinaison du temps d'incorporation et de la concentration en cryoprotecteur.

##### IV-2-d- $\alpha$ > Durée d'incorporation

Pour les raisons présentées plus haut, la durée d'incorporation se doit d'être la plus courte possible tout en permettant au cryoprotecteur de pénétrer dans la cellule. Il semble que pour les algues, une durée de contact avec le cryoprotecteur de 1 mn suffise pour offrir une bonne protection à la congélation. Mais surtout, une durée aussi courte permet de diminuer le taux de mortalité uniquement dû à la présence de DMSO. Cette durée de contact optimale n'est pas comparable à celle utilisée par Ben-Amotz et Gilboa (1980) qui utilisent des temps d'"incubation" avec le même cryoprotecteur de 15 à 30 minutes pour la congélation de *Platymonas suesica*. Nos essais préliminaires, avec détermination de la mortalité par coloration, mettent d'ailleurs en évidence une meilleure survie chez *P. suesica* avec une durée d'incorporation de dix minutes. Mais le souci de standardiser les traitements afin de les appliquer indifféremment sur toutes les espèces d'algues nous a fait préférer la durée d'une minute.

#### IV-2-d-β> Concentrations en cryoprotecteur

Les concentrations testées ont d'abord été 5 %, 10 %, 15 % et 20 % du volume final. Les résultats des comptages avec coloration à l'acridine orange, ne présentant pas dans la plupart des cas d'optimum flagrant, les concentrations testées par la suite ont été 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % afin de cerner l'optimum. Au delà de 40 %, les effets toxiques du cryoprotecteur seraient plus importants que ceux de la congélation en elle-même.

Ces valeurs de concentrations en DMSO, du moins jusqu'à 15 %, ont déjà été utilisées en cryoconservation de *Platymonas suesica* (Flassch *et al.*, 1975). Une meilleure survie, après congélation jusqu'à -25°C a été observée pour 15 % de DMSO comparé à 5 % et 10 %.

Ces concentrations élevées en cryoprotecteurs sont bien adaptées aux vitesses de refroidissement utilisées. En effet, plus la congélation est rapide et moins le cryoprotecteur n'a le temps de pénétrer dans la cellule (d'où l'utilité de mettre beaucoup de cryoprotecteur).

Pour chaque espèce d'algue, des congélations suivies de cultures ont été effectuées sans addition de cryoprotecteur. Le fait que *Nannochloris oculata* pousse après plusieurs jours laisse à penser que cette algue est naturellement résistante à la congélation. On constate en effet que c'est pour cette même espèce d'algue que le temps de latence avant la reprise de croissance est le plus court.

#### IV-3> Méthodes de congélation

##### IV-3-a> Vitesse de refroidissement

###### IV-3-a-α> Congélation directe à -196°C

Cette méthode faisant intervenir des vitesses de refroidissement très rapides (de l'ordre de 200°C/mn) a déjà été utilisée sur des algues unicellulaires (Ben-Amotz et Gilboa, 1980).

Pour chacune des sept espèces d'algue étudiées ici, la congélation directe permet d'obtenir des reprises de croissance très satisfaisantes notamment pour *Nannochloris oculata* et les algues du genre *Chaetoceros*.

Cette méthode présente de nombreux avantages. Elle est simple à mettre en oeuvre, ne nécessite que peu de matériel et surtout est parfaitement reproductible. L'azote liquide, toujours à la même température, permet, en effet, d'obtenir, dans le cas d'une plongée directe, des courbes de refroidissement identiques d'un échantillon à l'autre.

###### IV-3-a-β> Congélation avec descente lente jusqu'à -30°C

Cette méthode, comparée à la précédente, donne généralement des résultats significativement meilleurs (Ben-Amotz et Gilboa, 1980).

Dans le cadre de nos expériences, les temps de latence avant reprise de la croissance sont quasiment divisés par deux pour la plupart des souches d'algue.

Par contre, la mise en oeuvre de ce type de congélation demande plus de matériel et la reproductibilité est moins bonne. La température des vapeurs

d'alcool (à -80°C) peut en effet subir des variations qui peuvent modifier les courbes de refroidissement.

On constate que, pour *Platymonas* sp "Batan", *Isochrysis aff galbana*, *Nannochloris oculata*, *Chaetoceros gracilis* et *Chaetoceros* sp "BA", la concentration de DMSO donnant le meilleur résultat est identique pour les deux méthodes de congélation. Pour *P. suesica* et *Chlorella minutissima* la plus faible concentration en DMSO testée (15 % au lieu de 20 %) donne la croissance la plus rapide. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas significativement différents, on ne peut donc pas conclure à un optimum vrai, propre à la deuxième méthode de congélation.

On pouvait, pourtant, s'attendre à ce qu'une congélation lente requière une concentration plus faible en cryoprotecteur qu'une congélation rapide. Des expériences, avec un affinage de la concentration en DMSO pourraient donc être intéressantes.

#### IV-3-a-Γ> Autres méthodes de congélation possible

En biologie animale, des congélateurs à alcool ou à azote sont très souvent employés (Dumont, comm. pers. ). Ils permettent des refroidissements lents et contrôlés avec possibilité de programmer des vitesses de congélation et des paliers, en général à la température de cristallisation de la cellule. Ce matériel est utilisé pour la congélation d'organismes très peu tolérants aux abaissements de température. Dans notre cas, la recherche d'une méthode simple et facile à mettre en oeuvre exclut l'utilisation de ce type d'appareil.

Il ne faut pourtant pas perdre de vue qu'une congélation avec refroidissement lent (de quelques degrés par minute) et contrôlé pourrait permettre d'améliorer le taux de survie.

#### IV-3-b> Décongélation

Pour des algues congelées par refroidissement rapide (environ 200°C), le réchauffement doit lui aussi être le plus rapide possible (Morris, 1976). C'est pourquoi une décongélation par bain-marie à température ambiante (25°C) a été choisie. Cette méthode permet en effet une décongélation rapide (environ 50°C/mn) et surtout facilement reproductible. De plus, les variations de la température ambiante (quelques degrés) sont tout à fait négligeables face à l'écart de température entre celle-ci et l'azote liquide.

V> CONCLUSION

Les algues microphytes paraissent constituer un matériel vivant peu exigeant et assez résistant vis à vis de la cryopréservation. Des méthodes simples comme la congélation directe dans l'azote liquide permettent d'obtenir des croissances après congélation. Par contre, les durées d'attente avant la reprise de croissance sont plus ou moins longues en fonction, non seulement de la méthode de congélation, mais aussi, en fonction de la dose de cryoprotecteur utilisée. Il va de soi que de nombreuses autres méthodes de congélation peuvent être appliquées aux algues et notamment avec des vitesses de congélation beaucoup plus lentes. De telles congélations permettent d'accroître le taux de survie des algues et donc de réduire la durée d'attente avant la reprise de croissance. Ce type de congélation n'a pas été effectué ici, par souci d'utiliser une méthode de cryoconservation simple, demandant peu de matériel et applicable en routine dans une entreprise aquacole.

Il serait aussi intéressant de vérifier la qualité des algues ayant subi une congélation. Cette vérification doit porter sur la capacité de croissance des algues et sur leurs qualités nutritives. Des élevages comparatifs de larves de crevettes, par exemple, pourraient être effectués avec des algues provenant de souches congelées et d'autres non traitées. Une analyse de la composition lipidique de ces algues pourrait compléter ce test biologique.

Une perspective intéressante serait aussi de chercher à obtenir par congélation successive des souches plus résistantes à la cryoconservation. Le cas de *Nannochloris* permet même d'envisager une sélection de souches résistant à une congélation sans cryoprotecteur.

**V> ANNEXES**

## Annexe 1

### Composition du milieu de WALNE (1966):

#### solution 1:

Na <sub>2</sub> EDTA	45,00 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,60 g
NaNO <sub>3</sub> (KNO <sub>3</sub> )	100,00 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	20,00 g
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,36 g
FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O	1,30 g
Solution 2	1,00 ml
qsp	1 l

#### solution 2:

ZnCl <sub>2</sub>	2,10 g
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	2,00 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,90 g
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	2,00 g
qsp 100ml (+HCl)	

#### solution 3:

Chlorhydrate de thiamine	200 mg
Cyanocobalamine	10 mg
qsp	100 ml

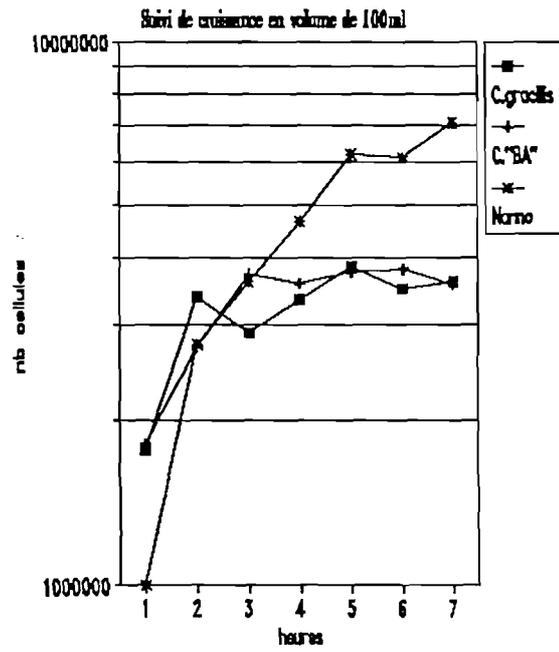
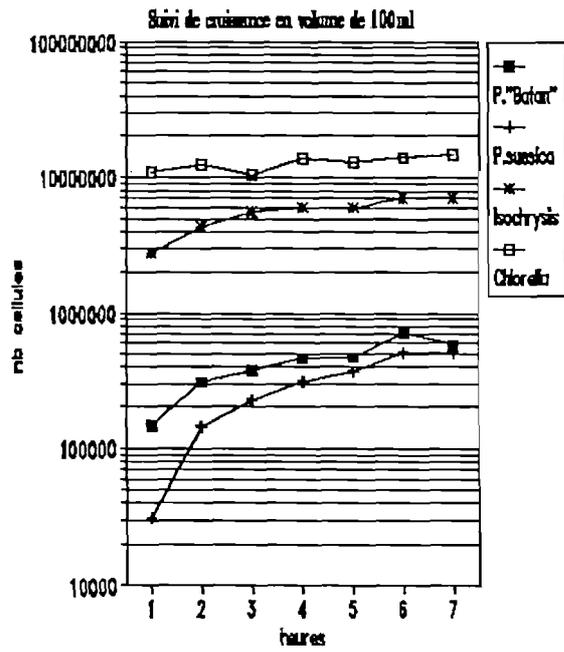
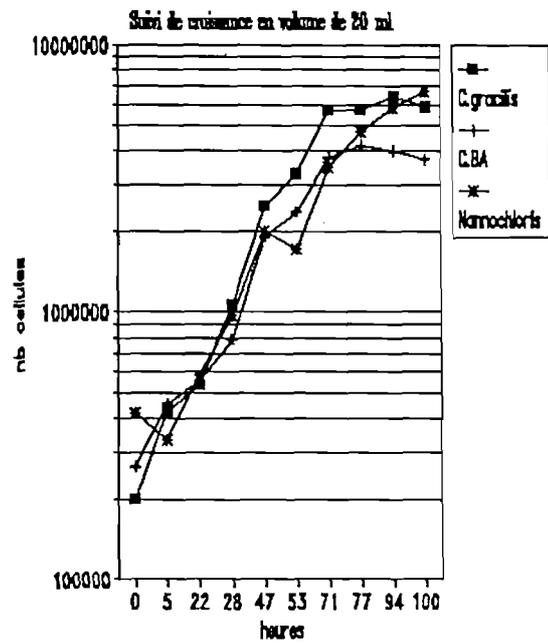
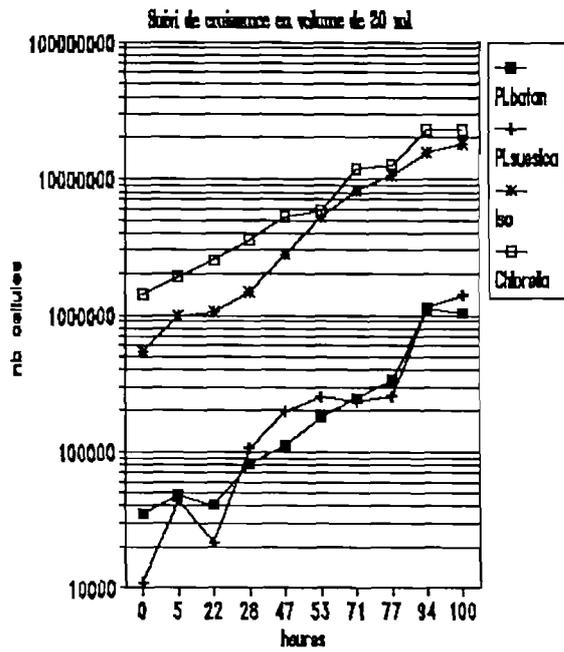
#### solution 4:

Sodium métasilicate	20 g
qsp	1 l

#### solution 5:

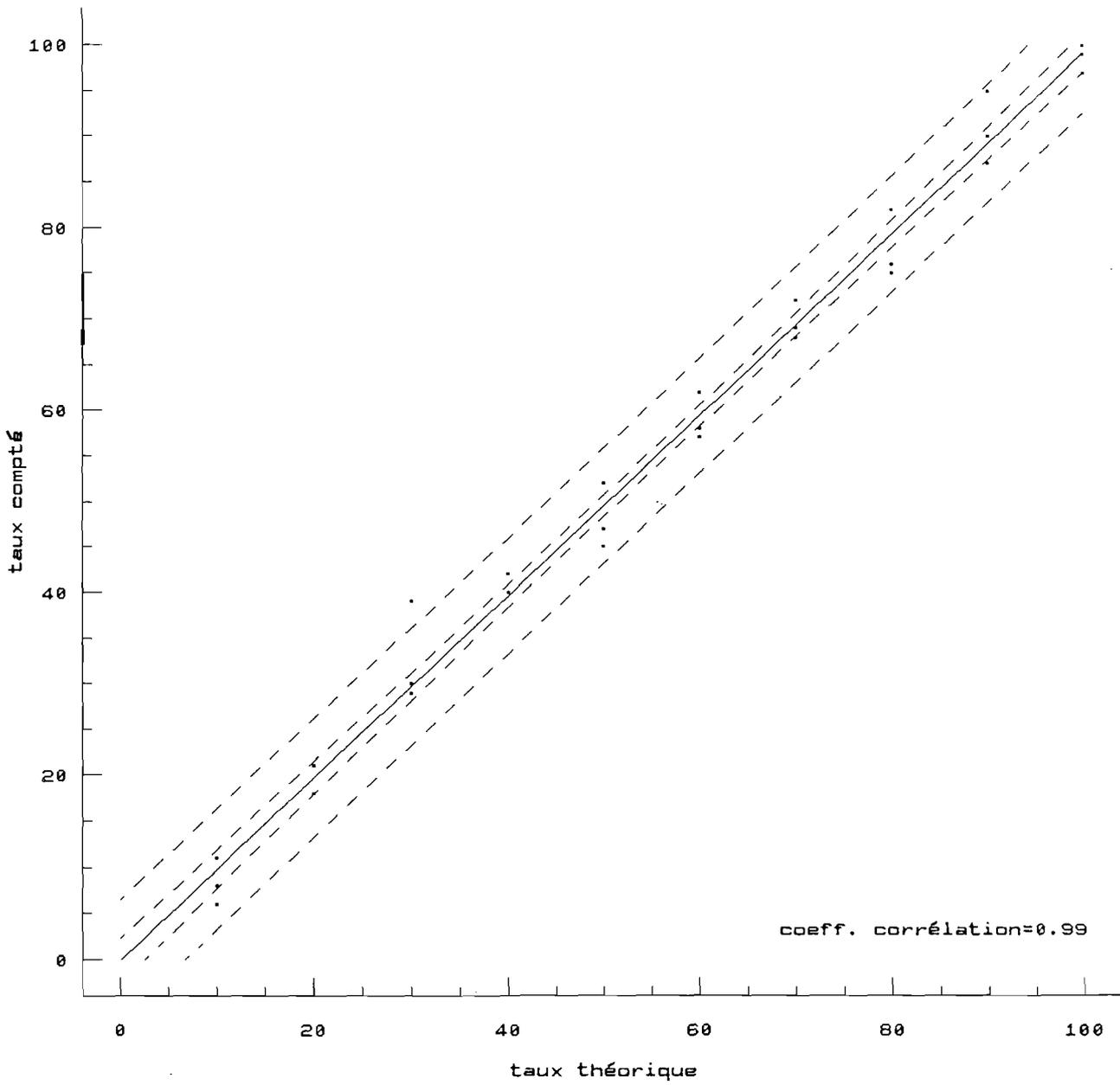
KNO <sub>3</sub>	100 g
qsp	1 l

Annexe 2



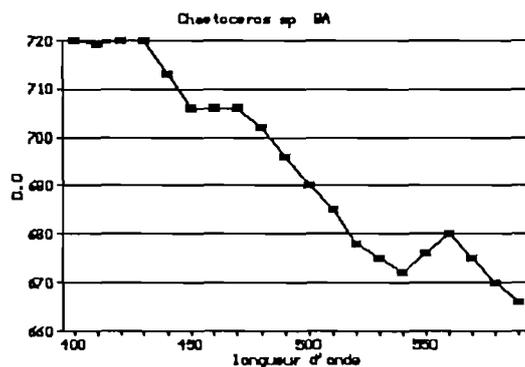
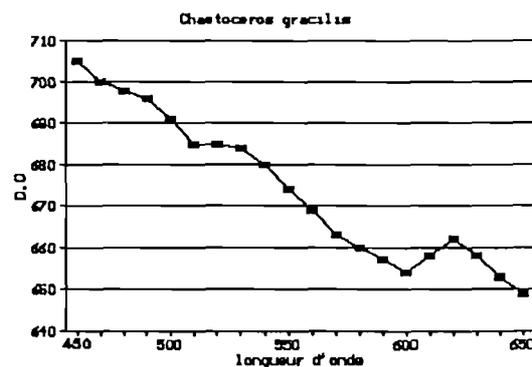
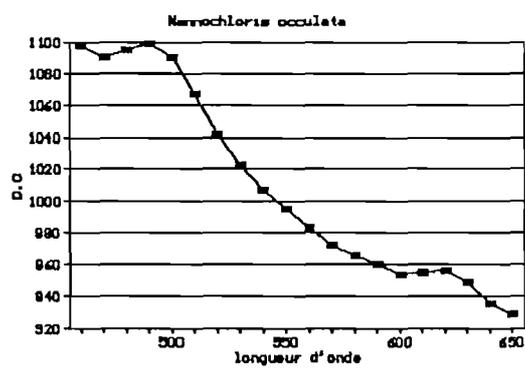
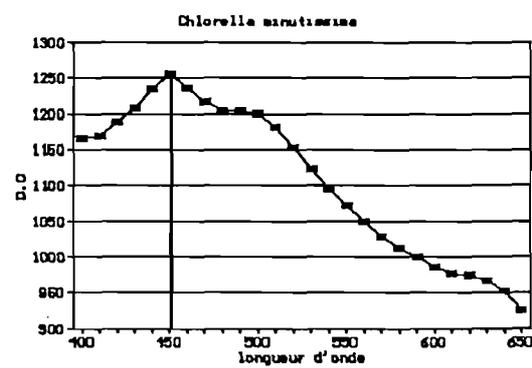
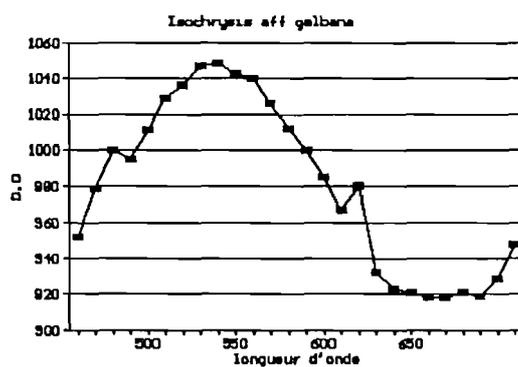
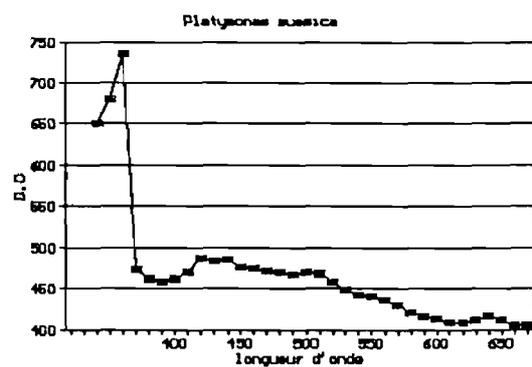
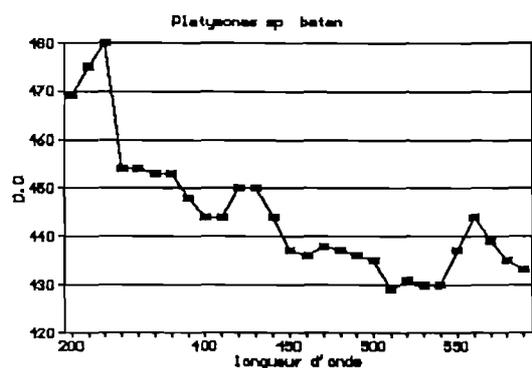
Courbes de croissance sur 7 jours de chacune des espèces d'algue étudiées:

Annexe 3



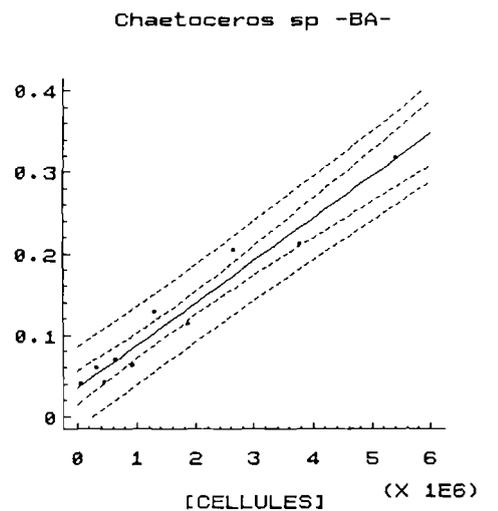
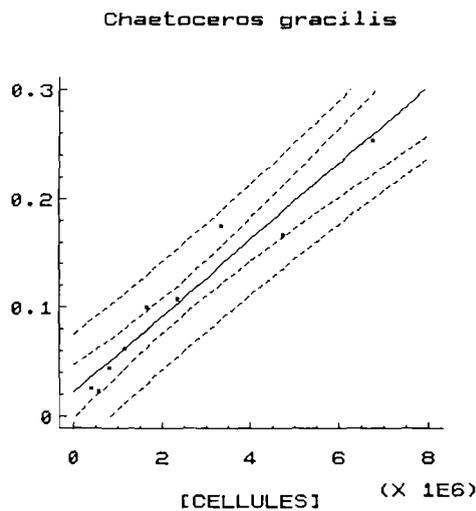
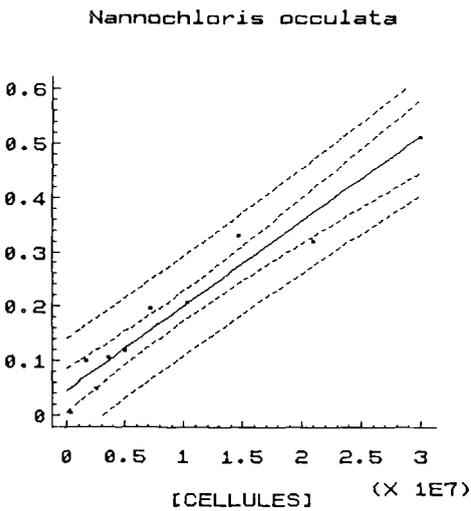
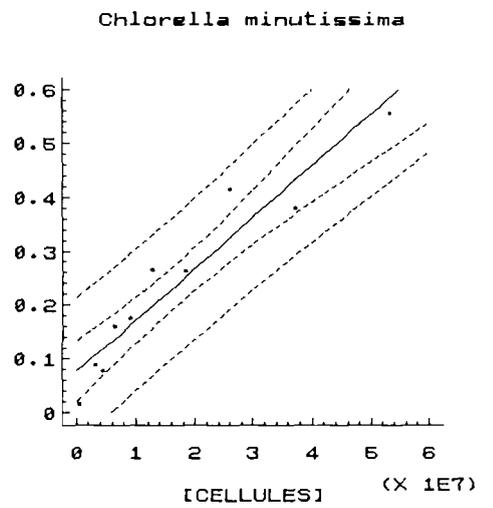
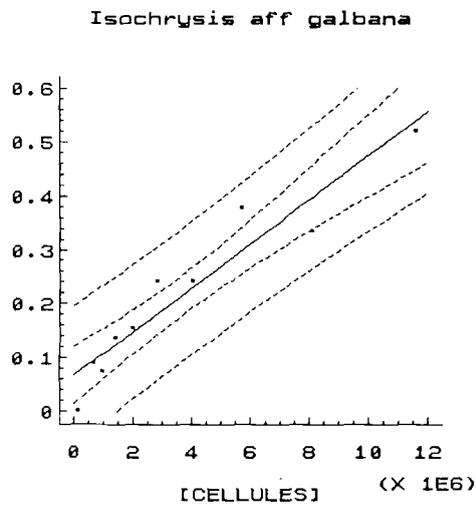
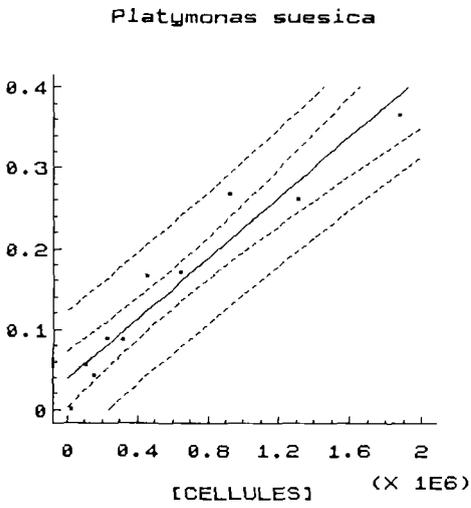
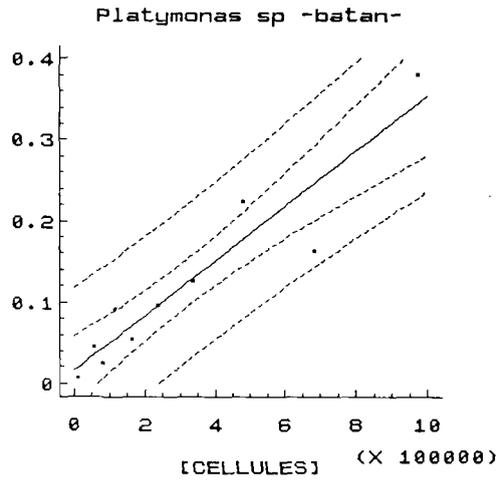
Droite de regression entre taux de mortalité théorique et taux compté

## Annexe 4



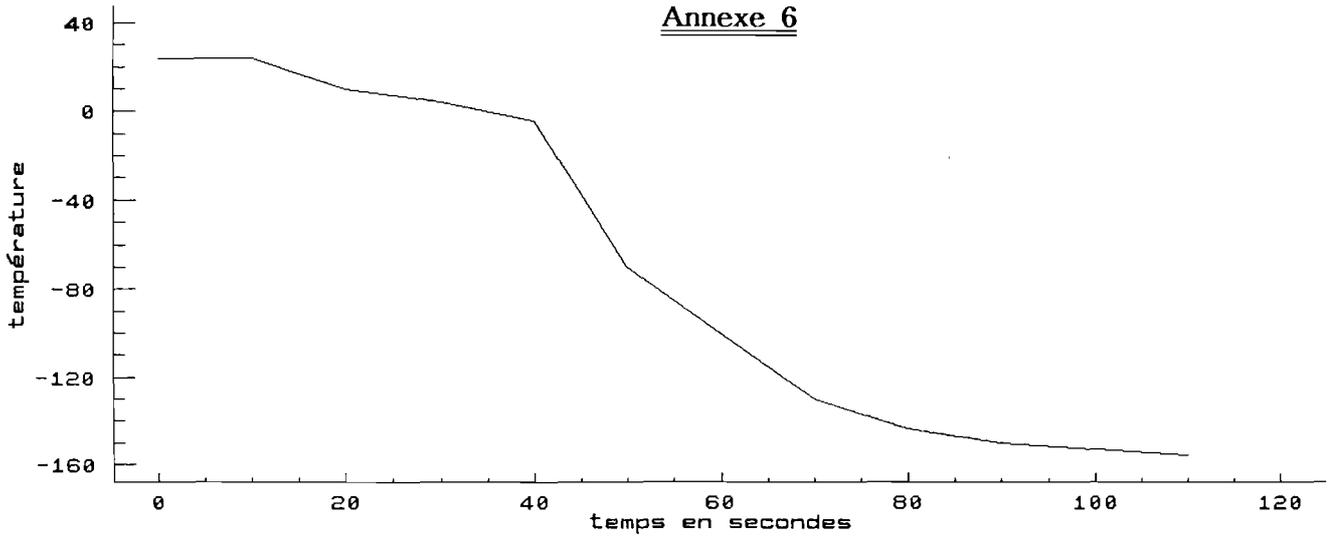
Variation de l'absorption des solutions algales en fonction de la longueur d'onde

Annexe 5

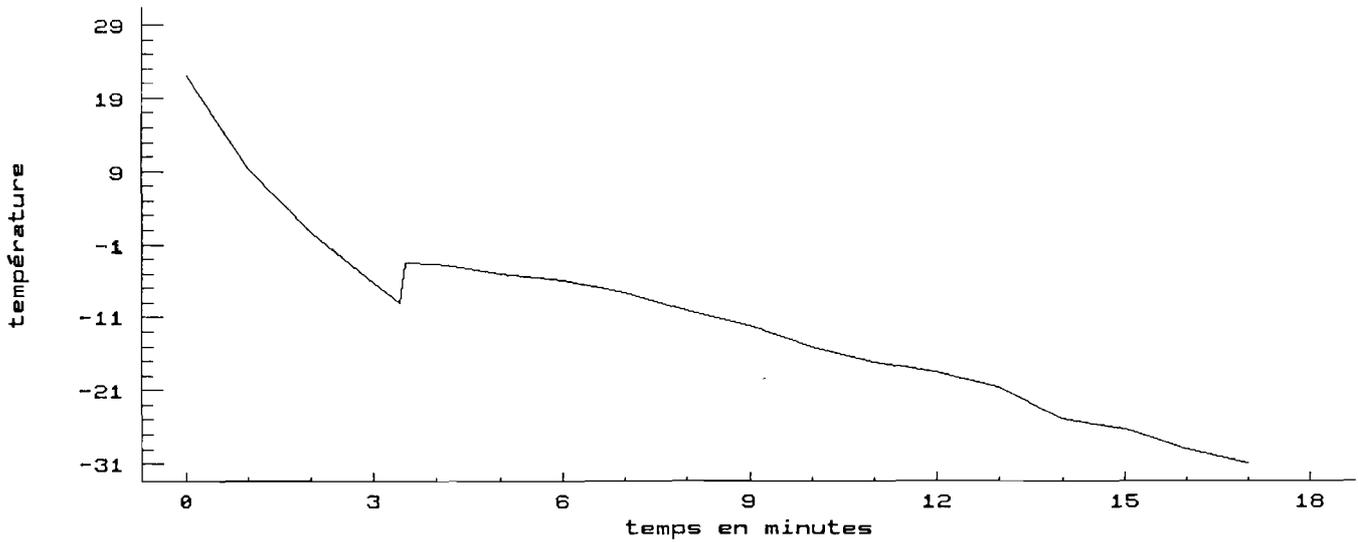


Droites de regression entre densité optique et concentration cellulaire

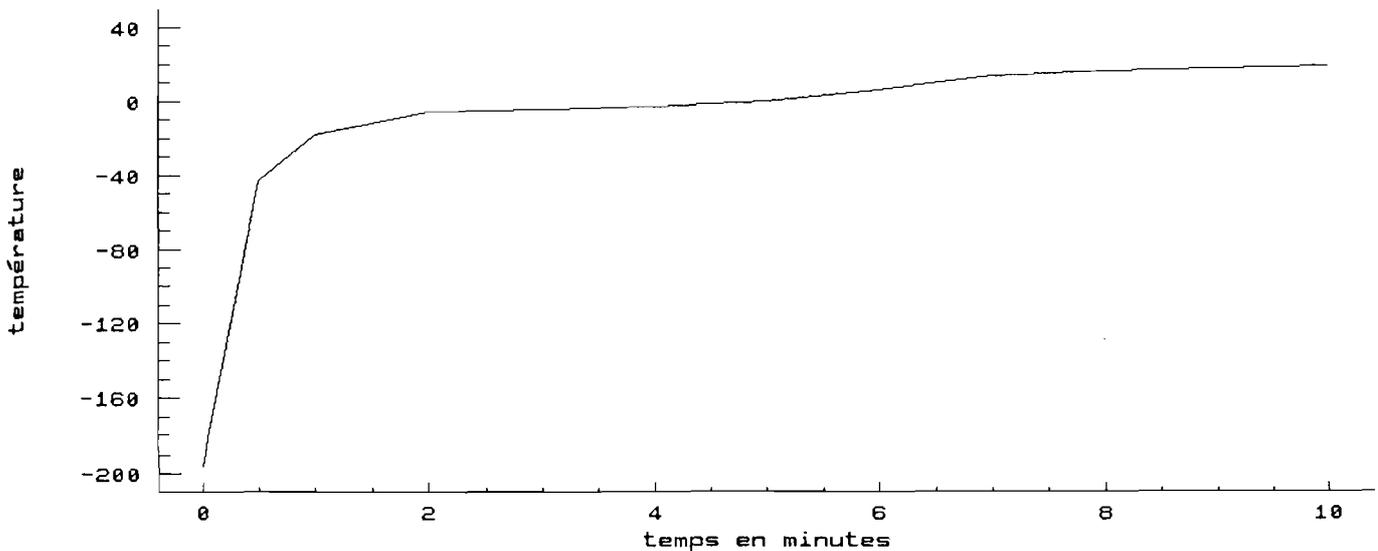
Annexe 6



Refroidissement de l'échantillon lors d'une congélation directe à -196°C



... lors d'une congélation avec descente lente jusqu'à -30°C



Réchauffement de l'échantillon placé au bain marie à 25°C

VI> BIBLIOGRAPHIE

- Alexander B.S., Daggett P.M., Gherna R., Jong S. and Simione F., 1980. Laboratory manual on preservation freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. American Type Culture Collection, Vol. I, Hatt H. Ed., Rockville, Maryland, 51 p.
- Ben-Amotz A. and Gilboa A., 1980. Cryopreservation of marine unicellular algae. Mar. Ecol. Progr. Ser., 2: 157-161.
- Dumont P., 1989. Etude de deux techniques simplifiées de congélation d'embryons de bovin. Th. Doct. Vét., E.N.V. Nantes, 201 p.
- Flassch J.P., Salaun G. and Normand Y., 1975. Viability of phytoflagellate after freezing. Proc. 6th Ann. Workshop World Maricult. Soc., 423-428.
- Morris G.J., 1976. The cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. Arch. Microbiol., 107: 57-62.
- Pushkar N.S., Itkin Y.A., Gordiyenko E.A. and Bronstein V.L., 1980. Osmotic lysis as damaging factor during low-temperature preservation of cell suspensions. Cryobiology, 17: 403-409.
- Rall W.F., Mazur P. and Souzu H., 1978. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. Biophys. J., 23: 101-120.
- Kasten F.H., 1973. Acridine dyes. In Encyclopedia of microscopy and microtechnique, P. Gray Ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp 4-6.
- Walne P.R., 1966. Experiments on the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fishery Invest. Lond., Ser. 2, 25(4): 1-53.