



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

679371

Université de METZ

1994

THESE

Présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 18 Février 1994

Ali BENHRA

*"Validation de l'utilisation d'algues cryopréservées
en Ecotoxicologie".*

MEMBRES DU JURY

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19940485
Cote	S/M3 94/16
Loc	Magasin

Jean-François FERARD, Professeur à l'Université de Metz, Directeur de thèse
Jean-Claude BLOCK, Professeur à l'Université de Nancy, Rapporteur
Jean-Michel JOUANY, Professeur à l'Université de Rouen, Rapporteur
Paule VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz, Examineur

Monsieur J.F. FERARD, Professeur à l'Université de Metz, m'a initié à la recherche et a assuré le suivi et la direction de ce travail. Il m'a fait bénéficier de ses compétences scientifiques et de ses qualités humaines, a mis à ma disposition toutes les facilités matérielles pour la conduite du travail. Qu'il trouve dans l'aboutissement de ces six années de travail avec lui, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont à Mademoiselle P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz et Responsable du Centre des Sciences de l'Environnement, qui m'a accueillie au sein du laboratoire de Toxicologie. Sa présence dans mon jury m'honore et je lui suis profondément reconnaissant de l'attention avec laquelle elle jugera ce travail.

Monsieur J.M. JOUANY, Professeur à l'Université de Rouen, a accepté la lourde tâche de rapporteur et me fait l'honneur de se déplacer pour juger mon travail. Sa compétence et ses remarques judicieuses m'ont toujours impressionné. Je lui exprime mes sincères remerciements.

Monsieur J.C. BLOCK, Professeur à l'Université Nancy I, a accepté avec bienveillance le travail de rapporteur. Je suis particulièrement sensible à l'honneur qu'il me fait en jugeant ce travail. Je lui exprime ici ma gratitude pour avoir su trouver le temps matériel pour participer à ce jury.

J'ai le grand plaisir d'exprimer ici ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué de diverses façons à la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire. Mes remerciements s'adressent spécialement à :

Mademoiselle Maryline GOERGEN qui a participé au tirage de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur C.M. RADETSKI pour la part qu'il a pris dans la mise au point de la méthodologie du test-algue utilisée dans cette étude et pour son aide dans certaines expériences. Nos longues discussions m'ont été d'une grande utilité.

Aux autres membres du laboratoire de Toxicologie, j'adresse ma profonde sympathie pour leur aide quotidienne et pour l'excellente ambiance de travail qu'ils ont su créer durant ces six années passées parmi eux.

Ce travail de recherche a fait l'objet d'un contrat avec le Ministère de l'Environnement (90-03). Il a été réalisé grâce au soutien financier reçu dans le cadre de ce contrat et à une bourse du M.E.N. du Maroc et un complément de bourse du Gouvernement Français (action intégrée 87/272).

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION.</u>	2
<u>1^{ère} PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
<u>CHAPITRE I : UTILISATION DES ALGUES EN ECOTOXICOLOGIE</u>	4
I-1) Importance des algues	4
I-2) Les espèces utilisées en Ecotoxicologie	5
I-3) Les différentes techniques traditionnelles d'entretien et de maintien des algues au laboratoire	6
I-3-1) Culture en milieu biphasique	
I-3-2) Culture en milieu liquide	
I-3-3) Culture en milieu solide	
I-3-4) Avantages et inconvénients	
<u>CHAPITRE II : LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CONSERVATION DES ALGUES</u>	
II-1) L'immobilisation	8
II-2) La lyophilisation	10
II-3) La cryopréservation	12
<u>CHAPITRE III : DONNEES GENERALES SUR LA CRYOPRESERVATION</u>	
III-1) Rôle fondamental de l'Eau	16
III-2) Effets du refroidissement	17
III-3) Effets de la congélation	20
III-3-1) Effets mécaniques de la cristallisation de l'eau sur les structures cellulaires	
III-3-2) Effets dus à la concentration des solutés	
III-3-3) Conclusion sur les effets de la congélation	
III-4) La cryoprotection	24
III-4-1) Cryoprotection naturelle	
III-4-2) Cryoprotection artificielle	

III-4-2-1) Propriétés générales des substances cryoprotectrices

- 1) Cas particuliers du DMSO et du glycérol
- 2) Cas des acides aminés
- 3) Les sucres et les polyols
- 4) Les polymères
- 5) Les mélanges cryoprotecteurs

CHAPITRE IV : FACTEURS AFFECTANT LA VIABILITE DES ALGUES AU COURS DE LA CRYOPRESERVATION

VI-1) Facteurs intrinsèques	33
VI-4-1-1) Effets de l'âge de la culture	
VI-4-1-2) Effets de la température et de la composition du milieu de croissance	
VI-2) Facteurs extrinsèques	35
VI-2-1) Effets de la vitesse de refroidissement	
VI-2-2) Effets des additifs cryoprotecteurs	

2^{ème} PARTIE : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : MATERIELS BIOLOGIQUES

I-1) Taxonomie et mode de vie	43
I-1-1) <i>Selenastrum capricornutum</i>	
I-1-2) <i>Chlorella vulgaris</i>	
I-1-3) <i>Scenedesmus subspicatus</i>	
I-2) Utilisation en Ecotoxicologie	45
I-2-1) <i>Selenastrum capricornutum</i>	
I-2-2) <i>Chlorella vulgaris</i>	
I-2-3) <i>Scenedemus subspicatus</i>	

CHAPITRE II : APPROCHE METHODOLOGIQUE

II-1) Entretien et culture des algues	47
II-1-1) Les cultures mères	
II-1-2) Les précultures	

	Pages
II-2) Méthodologie de cryopréservation	49
II-2-1) La préculture	
II-2-2) Le traitement cryoprotecteur	
II-2-3) La congélation	
II-2-3-1) Dans le bain d'éthylèneglycol	
II-2-3-2) Dans la vapeur d'azote liquide	
II-2-4) Le stockage	
II-2-5) La décongélation	
II-3) Les techniques d'estimation de la viabilité	55
II-3-1) La croissance en milieu liquide	
II-3-2) La croissance sur milieu solide	
II-4) L'exposition aux toxiques	57
II-4-1) Les solution toxiques	
II-4-2) Les systèmes d'essai	
II-4-2-1) La microplaque classique	
II-4-2-2) La microplaque Multiscreen	
II-5) Le calcul des pourcentages d'inhibition	62
II-6) Les méthodes statistiques utilisées	63

3^{ème} PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : ETUDE PRELIMINAIRE DES EFFETS DES TRAITEMENTS DE CONGELATION ET DE CRYOPROTECTION CHEZ *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* ET *SCENEDESMUS SUBSPICATUS*.

I-1) Introduction	65
I-2) Protocole expérimental	65
I-3) Résultats	67
I-3-1) Résultats obtenus avec <i>S. capricornutum</i>	
I-3-1-1) Effet du mode de congélation	
I-3-1-2) Effet cryoprotecteur	
I-3-2) Résultats obtenus avec <i>S. subspicatus</i>	
I-4) Discussion	73

IV-3) Toxicité comparée en présence et en absence de PVP	104
IV-3-1) Conditions de l'essai	
IV-3-2) Résultats	
IV-3-3) Discussion	
IV-4) Toxicité comparée entre les algues fraîches et cryopréservées	106
IV-4-1) Conditions de l'étude	
IV-4-2) Résultats	
IV-4-3) Discussion	

**CHAPITRE V : PROPOSITION D'UN PROTOCOLE DE MICROTTEST
SEMI-STATIQUE UTILISANT UNE ALGUE CRYOPRESERVEE
S. CAPRICORNUTUM : Le "Cryoalgotox".**

V-1) Introduction	109
V-2) Toxicité comparée entre le test microplaque classique et le "Cryoalgotox".	109
V-2-2) Conditions de l'essai.	
V-2-3) Résultats	
V-3) Etude de l'effet du stockage sur la réponse toxique de <i>S. capricornutum</i> .	113
V-3-1) Conditions de l'essai.	
V-3-2) Résultats.	
V-4) Discussion générale.	116
V-4-1) Comparaison entre le test microplaque classique et le "Cryoalgotox".	
V-4-2) Précision et reproductibilité du test "cryoalgotox"	
V-4-3) Effet du temps de stockage	
V-4-4) Comparaisons avec d'autres essais de toxicité	
V-4-5) Limitations du test "Cryoalgotox"	

<u>CONCLUSION</u>	120
--------------------------	-----

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	123
---	-----

ANNEXES.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'évaluation de l'effet des impacts anthropiques sur la qualité de l'eau, constitue l'une des principales préoccupations des gestionnaires de l'Environnement. A l'intérieur des programmes de surveillance de la qualité de l'eau, les bioessais sont, de plus en plus, considérés maintenant comme indispensables.

Compte tenu de leur représentativité écologique, de leur polyvalence d'emploi et de leur sensibilité, les tests-algues sont devenus des outils très répandus pour l'évaluation des dangers liés aux agressions toxiques dans l'écosystème aquatique.

Les méthodes préconisées par certaines normes et dans certains laboratoires présentent cependant des contraintes qui alourdissent leur réalisation.

- Mis à part le fait qu'il faut disposer d'un appareillage assez important (chambre d'incubation ...), un délai minimum de trois jours de préparation de l'inoculum, de la verrerie et des milieux est nécessaire avant le début de chaque test.
- La méthode de culture des souches est exigeante en terme de temps, d'espace alloué et de coût de maintien des cultures mères par repiquages périodiques sur un milieu nouveau. Persoone et Van De Vel (1987) ont estimé que le maintien des cultures mères au laboratoire représentait 19 à 47% du coût total du test.
- Les cultures algales peuvent, en plus, être sujettes à des contaminations accidentelles ou à des modifications génétiques suite à de fréquents changements de milieux (Meyer , 1985).

Il est donc souhaitable que les procédures de réalisation des test-algues puissent être simplifiées tout en obtenant des réponses rapides et fiables et en réduisant les coûts d'exploitation au minimum.

Des travaux ont déjà été réalisés dans cette perspective. Blaise *et al.* (1986) ont développé un microtest avec l'algue *Selenastrum capricornutum*. La procédure utilise une microplaque au lieu des erlenmeyers conventionnels. Elle offre une possibilité d'automatisation tout en étant simple, pratique et économique (espace, temps et coût). Radetski *et al.* (1993), ont utilisé une microplaque de microfiltration pour mettre au point un test-algue semi-statique. Ce test utilise la même espèce algale. Grâce à un renouvellement journalier du milieu, il permet de mieux approcher les conditions naturelles d'exposition aux toxiques sans pour autant augmenter énormément le coût du test.

C'est dans ce cadre que nous avons mené des travaux d'amélioration des techniques de conservation des souches, au laboratoire de toxicologie (C.S.E.) de l'Université de Metz, d'abord en utilisant la lyophilisation (séchage à froid) qui ne nous a pas permis d'arriver à des résultats concluants (Benhra, 1988). L'étude que nous présentons ici porte plus particulièrement sur la mise au point d'un test semi-statique utilisant des algues cryopréservées comme outil biologique.

1ère PARTIE :

**ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I

UTILISATION DES ALGUES EN ECOTOXICOLOGIE.

<< Phytoplankton (algal) bioassays are widely accepted and used as biological tools in environmental impact studies. The justification for employing algae is related to their ecological role as primary producers in transferring energy to higher trophic levels. In addition, the algal bioassays are relatively simple, rapid, and inexpensive as compared to bioassays with fish and invertebrates. They are also less subject to variations due to genetic diversities in the organisms than with bacteria.>>

WONG et COUTURE (1986).

I-1) Importance des algues.

Les algues unicellulaires sont des microorganismes photosynthétiques caractérisés par leur ubiquité dans les écosystèmes aquatiques. Elles transforment l'énergie solaire en biomasse. Elles jouent un rôle écologique important comme producteurs primaires en assimilant le gaz carbonique atmosphérique, en produisant l'oxygène nécessaire aux fonctions vitales des organismes aquatiques et en permettant le transfert de l'énergie aux niveaux trophiques supérieurs.

Situées à la base des chaînes trophiques, les algues ont d'abord été utilisées comme organismes modèles pour mesurer la fertilité des eaux naturelles (Skulberg, 1964), comme espèces indicatrices d'eaux propres ou polluées (Palmer, 1969), mais aussi pour élucider et comprendre les facteurs contrôlant la dynamique des populations (Stoermer, 1984) et l'eutrophisation des lacs (Moss, 1973 ; Reynolds *et al.*, 1983)

Les altérations naturelles ou anthropiques de la qualité de l'eau peuvent intervenir à différents niveaux d'organisation : de la cellule, de l'organisme, de la population, de la communauté et de l'écosystème (Boyle, 1984) provoquant ainsi des changements dans la composition en espèces des communautés algales, eux-mêmes susceptibles d'entraîner ultérieurement une détérioration de la qualité de l'eau.

Quant aux essais biologiques avec des produits purs, on peut admettre qu'ils ont commencé dès lors que les expérimentateurs ont cherché à mettre au point des milieux synthétiques de croissance. L'utilisation des premiers tests de laboratoire, en vue d'établir des concentrations tolérables dans le milieu naturel, date de la fin des années 1960 (Boyle, 1984). Se sont développées ensuite les études d'accumulation (Kulikova, 1960), de toxicité relative (Miller *et al.*, 1978; Bringmann et Kuhn, 1980) et des mécanismes d'action des différentes substances pures plus ou moins solubles dans l'eau (O'bien et Dixon, 1976; Bonaly *et al.*, 1980; Rachling *et al.*, 1982).

Il faut souligner la polyvalence d'emploi des algues en tant qu'indicateurs de la qualité de l'eau et en tant qu'outils biologiques, ce qui a permis de préciser les répercussions environnementales dues à des facteurs toxiques ou nutritifs *in situ* ou au laboratoire .

I-2) Les espèces utilisées en Ecotoxicologie

Les microalgues constituent un groupe hétérogène d'espèces benthiques et planctoniques de différentes classes qui peuvent souvent coexister au sein des communautés complexes. Seules quelques espèces sont utilisées comme organismes-tests en écotoxicologie.

En eau douce, *Selenastrum capricornutum* Printz, récemment renommée *Raphidocelis subcapitata* Korsikov nov. comb. (Nygaard *et al.*, 1986) a été adoptée, aux U.S.A, par le groupe de travail mixte gouvernement-industrie chargé des problèmes d'eutrophisation (EPA, 1971). Cette algue devint ensuite un organisme-modèle dans l'évaluation de la toxicité des substances pures et des milieux complexes.

Actuellement *S. capricornutum* est probablement l'algue la plus utilisée de par le monde dans le cadre des essais biologiques (Leischman *et al.*, 1979; Forsberg et Claesson, 1981).

Selon Lacaze *et al.* (1989), plus de 200 publications concernent cette espèce qui constitue de ce fait une "référence" (Bonin *et al.*, 1986).

D'autres espèces sont utilisées : *Chlorella vulgaris* (OCDE, 1984), *Monoraphidium dybowskii*, *Stichococcus* sp. (Törnqvist, 1990), *Scenedesmus subspicatus* Chodat (ISO 8692, 1989).

En milieu marin un grand nombre d'espèces, représentatives du phytoplancton marin, ont été utilisées. Törnqvist et Forsberg (1990) ont

utilisé *Dunaliella* sp., *Anabaena cylindrica* et *Phaeodactylum* pour analyser les effets d'eaux de traitement secondaire et pour décrire les effets antagonistes et synergiques des métaux lourds.

Coccolithis elebans a été proposée par Walsh et Merrill (1984) car elle réagit rapidement aux changements environnementaux et aux substances toxiques ; elle est génétiquement stable et croît rapidement dans des cultures en suspension au laboratoire. *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornerutum* sont aussi deux diatomées marines représentatives des eaux estuariennes et côtières qui ont fait l'objet de projets de normes internationales (AFNOR T 95 E, 1983; ISO 10253, 1988) de détermination de l'effet toxique des substances chimiques.

I-3) Les différentes techniques traditionnelles d'entretien et de maintenance des algues au laboratoire.

Mise à part la conservation des formes de résistance qui nécessite des conditions bien particulières (Leeson *et al.*, 1984), l'entretien et la maintenance des algues au laboratoire sont généralement assurés par subculture. C'est une technique simple qui consiste à repiquer périodiquement les algues dans un nouveau milieu. Elle peut se pratiquer selon trois méthodes différentes:

- la culture en milieu biphasique,
- la culture en milieu liquide,
- la culture en milieu solide.

I-3-1) La culture en milieu biphasique.

C'est la méthode la plus ancienne et la plus empirique. Le système biphasique est constitué de terre et d'eau, ce milieu constitue un système tampon dans lequel sont disponibles des éléments traces sous forme chélatés, des minéraux et d'autres nutriments apportés par le sol (Pringsheim, 1946). Les algues peuvent être ainsi maintenues à condition d'examiner périodiquement les cultures ainsi conservées.

I-3-2) Culture en milieu liquide.

Il existe dans la littérature une multitude de milieux liquides pour les algues : milieux minéraux tels que le milieu de Bold; milieux organiques nécessaires à la culture des formes hétérotrophes telles que *Euglena gracilis* (Asher et Spalding, 1982). Les milieux sont généralement

stérilisés par autoclavage à 115°C pendant 20 minutes. La période entre deux repiquages varie d'une semaine à trois mois selon les espèces et la vitesse de croissance des algues.

I-3-3) Culture en milieu solide.

Le milieu est préparé par solidification des milieux liquides, généralement par ajout d'agar. Cette technique permet une conservation de certaines souches pour des périodes allant de 1 à 6 mois selon les espèces et selon le type de milieu utilisé.

Bien que l'immobilisation utilisant les alginates, le carrageenan ou le polyuréthane, se rapproche de cette méthode de solidification, elle fera l'objet d'un développement ultérieur.

1-3-4) Avantages et inconvénients

Si les différentes méthodes de conservation des algues par des repiquages périodiques sur milieux liquides, semi-liquides ou solides permettent une maintenance aisée et quasi-routinière des cultures au laboratoire, elles présentent certains désavantages :

- Des contaminations accidentelles peuvent avoir lieu ce qui nécessite l'examen fréquent des cultures (Leeson *et al.*, 1984). Ceci peut se faire au microscope ou plus quantitativement après étalement sur gélose nutritive pour s'assurer de l'axénie des cultures.
- Les changements génétiques sont aussi un inconvénient de la maintenance à long terme des souches par les méthodes traditionnelles de transfert ou de subculture (Morris, 1976b).
- le transfert fréquent et périodique d'inoculats viables dans le nouveau milieu, constitue une contrainte supplémentaire
- Par ailleurs, la culture sur milieu artificiel est souvent inadéquate pour certaines souches d'algues marines (Meyer, 1985) pour lesquelles il a fallu développer une autre méthode de conservation que la subculture, à savoir la cryopréservation.

CHAPITRE II :

LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CONSERVATION DES ALGUES.

II-1) L'immobilisation.

L'immobilisation est une technique qui consiste à fixer des cellules sur ou dans un support. Cette fixation est possible grâce à la propriété qu'ont certains microorganismes à adhérer aux surfaces solides.

Différentes espèces algales d'importance biotechnologique ont été immobilisées pour :

- servir de biocatalyseurs pour faire des biotransformations et des biosynthèses de différents métabolites (Gibby *et al.*, 1987).
- produire de l'énergie (Suzuki et Karube, 1983).
- bioaccumuler des métaux dans les eaux usées (Volesky, 1993).
- et aussi pour assurer la maintenance et la conservation de différentes espèces d'algues (Lukavsky, 1988 ; Dor, 1987).

Il existe quatre techniques principales d'immobilisation (Lebesque et Dubreuil, 1983) :

1) La réticulation qui met en jeu des agents (tels que le glutaraldéhyde) assurant des liaisons covalentes avec certains groupements fonctionnels de la membrane cellulaire.

2) L'inclusion dans des polymères organiques, en particulier des gels de polyacrylamide ou d'alginate de calcium.

3) Le couplage covalent ou l'adsorption par liaison covalente qui implique un traitement chimique préalable du support pour créer des liaisons directes de nature chimique.

4) L'adsorption qui est un simple phénomène d'attraction physique dû à des interactions de faible énergie entre le support et les cellules.

Parmi toutes ces méthodes, la réticulation et le couplage covalent apparaissent comme des techniques inadéquates pour la conservation des algues.

Tableau I: Les méthodes publiées pour la conservation des algues par immobilisation.
(d'après Lukavsky, 1988)
(+ Bonne croissance, +- Croissance moyenne, - Croissance nulle)

Espèces	N° de souches	Immobilisation dans l'agar	Immobilisation dans l'agar + huile de parafine
Cyanobactéries			
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Tischer/Aust. 1444	+	+-
<i>Phormidium autumnale</i>	Marvan 1963/4	+	+
<i>Microcystis Aeruginosa</i>	Hindak 1971/1	+	-
<i>Arthronema africanum</i>	Lukavsky 1980/10%) + S. Lhotsky 1946/praha	+	+
<i>Nostoc sp.</i>	Ac. C-396	+	+
<i>Synechococcus elongatus f. t.</i>	Kovrov 1972/8	+-	+
Chromophytes			
<i>Navicula atomus</i>	Kovacik 1978/9	+	+
<i>Heterotrix debilis</i>	Hindak 1968/20	+	-
Rhodophycées			
<i>Porphyridium cruentum</i>	Vischer 1935/107	+	-
Chlorophytes			
Volvocales			
<i>Chlamydomonas geitlerii</i>	Necas 1980/N-Ac 1	+	+
<i>Chlamydomonas moewussii</i>	Czurda-Denk/Praha		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Ac. A 160	+	+
<i>Dunaliella salina</i>	Czurda-Denk/Praha Ac. 281a	-	-
Tetrasporales			
<i>Nautococcus mammilatus</i>	Lukavsky 1969/1	+	+
Chlorellales			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Gaffron/Göttingen 211-1e	+	+
" <i>sorokiniana</i>	Sorokin-Myers/TX 71105	-	-
" <i>kessleri</i>	Larg/1	+	+
<i>Coelastrum sphaericum</i>	Vischer 1924/13	+	+
<i>Monoraphidium caribeum</i>	Hindak 1965/116	-	-
" <i>contortum</i>	Hindak 1965/119	+	+
" <i>griffithii</i>	Hindak 1969/151	+	+-
" <i>minutum</i>	Kmarek 1964/28	-	-
<i>Raphidocoelis capricornuta</i>	Skulberg 1959/1	+	+
<i>Scenedesmus acutus</i>	Tomaselli CCAO 835	+	+-
" <i>acuminatus</i>	Kovacik 1978/7	+	-
" <i>obliquus</i>	O. Lhotsky 1966/7	+	+
" "	Pringsheim/Praha Ac 125	+	+
" <i>quadricauda</i>	Greifswald/15	+	-
<i>Pediastrum tetras</i>	Kovacik 1977/2	+	-
Ulotrichales			
<i>Koliella spiculiformis</i>	Vischer 1940/208	+	+-
<i>Stichococcus bacillaris</i>	CCA0 408	+	+-
<i>Ulotrix tenerrima</i>	Hindak 1965/96	+	-

Brouers *et al.* (1982) ont, en particulier, montré que l'immobilisation par réticulation ne permet pas une bonne viabilité à long terme de *Scenedesmus obliquus*, de *Chlorella vulgaris* et d'*Anabaena variabilis*.

L'adsorption et l'inclusion sont les techniques les plus utilisées pour l'immobilisation des algues (Harper, 1986; Lukavsky *et al.*, 1986).

Par inclusion Callegari *et al.* (1986) ont immobilisé *Chlorella sorokiniana* dans l'alginate et l'ont conservé "avec succès", dans 20 mM CaCl₂ + 10 mM NaCl à l'obscurité, pendant 36 mois au réfrigérateur. La même technique a été utilisée par Hertzberg et Jensen (1989) pour conserver, à 4°C, 7 espèces de microalgues marines. Ils soulignent que de nouvelles cultures peuvent repartir après 3 à 12 mois de stockage dans ces conditions.

Cette préparation (par inclusion et précipitation) en billes ou en pastilles d'alginate est plus compliquée que la technique utilisée par Lukavsky (1988) qui, par simple inclusion dans 2% d'agar, a pu conserver plusieurs espèces de cyanophycées et d'algues eucaryotes (tableau I). Après 32 mois de conservation à 10°C, 81% des souches immobilisées dans l'agar restaient viables. Ceci étant, l'auteur s'est contenté d'évaluer grossièrement la croissance des algues, sans quantification.

II-2) La lyophilisation.

Il s'agit d'une déshydratation sous vide d'un produit préalablement congelé. Son application aux algues n'a fait l'objet que de quelques publications (Tableau II). Daily et McGuire (1954) semblent avoir été les premiers à avoir lyophilisé diverses algues dont quelques espèces de chlorelles qui se sont révélées viables. Par contre, Watanabe (1959) n'observe aucune croissance après lyophilisation de *Chlorella ellipsoidea*. Cette dernière observation s'explique par le fait que les pourcentages de viabilité sont très faibles, de 0,68 à 2%, selon les conditions de lyophilisation utilisées (Holm-Hansen, 1963b, 1964, 1967). De plus, la viabilité diminue avec la durée de stockage.

Tableau II: Les méthodes publiées pour la lyophilisation des algues.
(d'après LEESON et al., 1984)

Espèces	Milieu de suspension	Viabilité (%) (après 24 h)	Référence
<i>Bracteacoccus cinnabarinus</i>	Sérum de cheval	0.25	DAILY et McGUIRE (1954)
<i>Chlamydomonas pseudococum</i>	" "	0.013	DAILY et McGUIRE (1954)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Lait écrémé (10%) + sodium glutamate (1%)	5	TSURA (1973)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Lait écrémé	0.0053	HOLM-HANSEN (1967)
<i>Chlorella</i> sp.	"	1.3	McGRATH et al. (1978)
Chlorophycées	"	de 10 ⁻¹ à 10 ⁻⁶ %	
Chlorophycées	Sérum de cheval	39/106 souches 15/22 souches viables	DAILY et McGUIRE (1954)
Cyanophycées (7 souches)	Sérum de cheval	7/7 souches viables	DAILY et McGUIRE (1954)
Cyanophycées (13 souches)	Sérum d'agneau	13/13 souches viables	CORBETT et PARKER 1976)
<i>Nitzschia closterium</i>	Lait écrémé (10%) + sodium glutamate (1%)	0.5	TSURA (1973)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Lait écrémé (10%) + sodium glutamate (1%)	1.5	TSURA (1973)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Sérum de cheval	0.025	DAILY et McGUIRE (1954)
<i>Stichococcus bacillaris</i>	Lait écrémé (10%)	3*10 ⁻¹	HOLM-HANSEN (1967)

Depuis les travaux de McGrath *et al.* (1978), il n'y a pas à notre connaissance d'études qui aient été publiées sur le sujet. Leeson *et al.* (1984) concluent que la lyophilisation, bien qu'elle offre de nombreux avantages potentiels, n'est pas encore applicable aux algues eucaryotes.

II-3) La cryopréservation.

C'est une technique qui consiste à conserver un produit biologique sous forme congelée (à différentes températures) tout en préservant ses propriétés physiologiques, génétiques et sa capacité de croissance.

L'utilisation des basses températures au laboratoire date déjà d'une centaine d'années. A la fin du 19^{ème} siècle, la disponibilité des gaz liquides (oxygène, azote, hélium,...) a, en effet, permis le développement de la recherche en cryobiologie. En 1893, Pickett publiait déjà une étude sur l'effet des basses températures sur différents organismes allant des microorganismes aux mammifères.

L'approche des phénomènes biologiques, sur des bases physiques, a permis une meilleure compréhension des mécanismes de congélation au niveau cellulaire. Les travaux de Luyet et Gehenio (1940) sur la congélation ultrarapide et sur la vitrification et ceux de Lovelock (1953, 1954), qui s'est plus intéressé aux mécanismes de dommages et de cryoprotection aux faibles vitesses de congélation, ont été fondamentaux dans ce domaine.

La cryopréservation a été ainsi appliquée à différents types cellulaires : spermatozoïdes (Ryan et Smith, 1974), cellules sanguines (Rowe *et al.*, 1980), bactéries (Felthman *et al.*, 1978), levures (Kirsop et Henry, 1984), protozoaires (Leeson *et al.*, 1984), cellules végétales (Nag et Street, 1975a,b) et algues (Morris, 1980). Les méthodes publiées pour la cryopréservation des algues marines et d'eau douce sont résumées dans les tableaux III et IV. Cette méthode est plus largement développée dans le chapitre III.

Tableau III: Les méthodes publiées pour la cryopréservation des algues d'eau douce à -196°C.
(D'après LEESON *et al.*, 1984).

Espèces	Conditions de préculture	Additifs cryoprotecteurs	Vitesse de refroidissement	Vitesse de réchauffement	Viabilité (%)	Références
Cyanophycées (filamenteuses)	-	-	50°C/min	6°C/min	+	CAMERON et BLANK (1956)
7 Cyanophycées antarctiques	24°C, culture liquide	-	"Rapide"	"Lente"	+	HOLM-HANSEN (1963)
<i>Chlamydomonas pseudagloe</i>	cultures sur agar de 4-8j	Glycérol	1°C/min	400°C/min	+	HWANG et HORNELAND, 1965
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	-	-	N.D.	N.D.	> 50%	BENNOUN (1972)
<i>C. reinhardii</i> (3 mutants)	18 h dans Me ₂ SO 1%	DMSO (5 %) (v/v)	2 étapes -20°C/120 min	"Rapide"	< 0.01-5 %	GRESSHOFF (1977)
<i>C. reinhardii</i> (11 mutants)	Cultures sur agar de 7-10j	DMSO (10 %) (v/v)	1°C/min	"Rapide"	0.1 %	HWANG et HUDOCK (1971)
<i>C. reinhardii</i> (10 mutants)	" "	DMSO (5 % v/v)	1°C/min	"Rapide"	0.003-10 %	McGRATH et DAGGETT, 1977
<i>C. reinhardii</i>	20°C Culture liquide 7 j	Méthanol 2.5M	2 étapes -25°C/60 min	90°C/min	60 %	MORRIS <i>et al.</i> (1979)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	3°C Culture liquide 48 h	-	2 étapes -20°C/20 heures	"Rapide"	> 50 %	HATANO <i>et al.</i> (1976)
<i>C. emersonii</i>	4°C Culture liquide 21 j	-	212°C/min	90°C/min	40 %	MORRIS (1976b)

Tableau III (SUITE): Les méthodes publiées pour la cryopréservation des algues d'eau douce à -196°C.
(D'après LEESON et al., 1984).

Espèces	Conditions de préculture	Additifs cryoprotecteurs	Vitesse de refroidissement	Vitesse de réchauffement	Viabilité (%)	Références
<i>C. emersonii</i>	20°C Culture liquide 7 j	Méthanol (2.5M)	10°C/min	90°C/min	80 %	MORRIS et al. (1980)
<i>Chlorella protothecoides</i>	20°C Culture liquide 7 j	-	0.3-200°C/min	90°C/min	98 %	MORRIS (1976a)
Chlorococcales (7 Souches antarctiques)	24°C Culture liquide	-	"Rapide"	"Lente"	+	HOLM-HANSEN (1963)
Chlorococcales (13 souches)	Culture sur agar de 4-8 j	Glycérol (10 % v/v)	1°/min	400°C/min	+	HWANG et HORNELAND, 1965
Chlorococcales (300 souches)	20°C Culture liquide 35 j	DMSO (5 % (v/v)	2 étapes -25°C/30 min	90°C/min	> 50%	MORRIS (1978)
<i>Euglena gracilis</i>	Culture solide 4-8 j	Glycérol (10 % v/v)	1°C/min	400°C/min	+	HWANG et HORNELAND (1965)
<i>Euglena gracilis</i> (26 souches)	20°C Culture liquide 7 j	Méthanol (2.5M)	0.3°C/min	90°C/min	> 30%	MORRIS et CANNING (1978)
<i>Prototheca</i> (8 souches)	4°C Culture liquide 14 j	-	0.3°C/min	90°C/min	> 30%	MORRIS (1976c)
<i>Spirulina platensis</i>	Conditions autotrophiques cellules phase exponentielle	Ac. aminés (1%) Gomme arabique (2-10 %) Gélatine(2-10%)	20-50°C/min	20-40°C/mn	+	TAKANO et al. (1973)

Tableau IV: Les méthodes publiées pour la cryopréservation des algues marines à -196°C.
(D'après LEESON, 1984)

Espèces	Conditions de préculture	Additifs cryoprotecteurs	Vitesse de refroidissement	Vitesse de réchauffement	Viabilité (%)	Références
Chlorococcales (8 souches)	Culture liquide	DMSO (5%)	2 étapes	"Rapide"	13-100 %	BEN-AMOTZ et GILBOA (1980a,b)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Culture liquide à 25°C phase exponentielle	Glycérol(5%) en milieu 1/2salin	1°C/min	"Rapide"	100 %	SAKS (1978)
<i>Dunaliella cartolecta</i>	"	Glycérol(5%) en milieu 1/2salin	1°C/min	"Rapide"	100 %	SAKS (1978)
<i>Nannochloris adamsii</i>	"	"	1°C/min	"Rapide"	100 %	SAKS (1978)
<i>Nitzchia acicularis</i>	"	"	1°C/min	"Rapide"	100 %	SAKS (1978)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	"	"	1°C/min	"Rapide"	95 %	SAKS (1978)
<i>P. tricornutum</i>	Culture liquid 28 j à 4°C	DMSO (5 %) (v/v)	2 étapes -30°C/15 min	"Rapide"	36 %	BEN-AMOTZ et GILBOA (1980a,b)
<i>Platymonas succia</i>	Culture liquid 28 j à 4°C	DMSO (5 %) (v/v)	2 étapes -30°C/15 min	"Rapide"	24 %	BEN-AMOTZ et GILBOA (1980a,b)

CHAPITRE III

DONNEES GENERALES SUR LA CRYOPRESERVATION

Dans le cadre de ce chapitre, il nous a paru intéressant de développer tout d'abord le rôle fondamental de l'eau, dont le changement des caractéristiques en fonction de la température donne des informations importantes pour l'interprétation des effets de la congélation.

Les deux paragraphes suivants présenteront séparément, d'abord les effets causés par le froid (sans congélation) puis ceux causés par la congélation proprement dite, bien que les effets de ces deux phénomènes soient souvent difficiles à séparer (Franks, 1981).

Enfin, un quatrième paragraphe sera consacré à la cryoprotection naturelle et artificielle (utilisation de certaines substances pour lutter contre les effets du froid et la congélation).

III-1) Rôle fondamental de l'eau.

L'importance universelle de l'eau comme solvant biologique est évidente, la plupart des processus vitaux dépendent largement des propriétés physiques de l'eau. Les caractéristiques de l'eau qui varient en fonction de la température sont les suivantes :

- la constante de dissociation ionique de l'eau diminue à basse température. Il en résulte une augmentation de pH (Meyer, 1985) qui peut avoir une conséquence néfaste sur les systèmes biologiques.

- La constante diélectrique augmente à basse température, ce qui entraîne une réduction des attractions ioniques (Meyer, 1985). Ce changement peut avoir un effet dénaturant sur les molécules et les biopolymères dont la configuration est déterminée dans une large mesure par les propriétés du solvant: la perte d'activité de la chymotrypsine (Franks et Hateley, 1985) et de la phosphofructokinase (Dixon *et al.*, 1981) a été imputée à ce phénomène.

- La viscosité de l'eau augmente aussi avec la diminution de la température (Meyer, 1985), cette augmentation peut avoir une conséquence sur les flux d'eau à travers les membranes biologiques.

- Enfin, il faut rappeler que l'augmentation de la capacité à former des liaisons hydrogène en fonction de la température est à la base même du phénomène de cristallisation de l'eau (la congélation).

III-2) Effets du refroidissement.

Les dommages causés par la diminution de la température peuvent être classés en deux catégories (Morris, 1980) :

a) dommage direct ou choc thermique qui a lieu immédiatement après une réduction de température et qui dépend beaucoup de la vitesse de refroidissement.

b) dommage indirect qui suppose une longue exposition à de faibles températures pour que le dommage cellulaire soit exprimé. Il ne dépend pas de la vitesse de refroidissement et peut avoir lieu durant une période d'acclimatation au froid avec ou sans cryoprotection (Morris, 1980).

Au cours d'un dommage direct, les vitesses rapides de congélation sont plus dommageables que les vitesses lentes (Morris, 1980). Bien qu'il soit difficile de préciser ce qu'on entend exactement par vitesse lente et vitesse rapide, compte-tenu que ces notions sont spécifiques de l'espèce considérée, il est généralement admis qu'une vitesse lente est inférieure à 10°C/min alors qu'une vitesse rapide peut atteindre 200°C/min. Le stress dû au refroidissement rapide a été observé sur diverses cellules ou organismes (le tableau V)

La perte des propriétés de perméabilité sélective de la membrane plasmique est une conséquence directe du dommage précoce causé par le choc thermique (Morris, 1980).

En utilisant du rubidium marqué, Clarke *et al.* (1986) ont constaté une augmentation de la concentration intracellulaire de ce composé chez *Chlamydomonas reinhardtii* CW15+ après une exposition de 45 secondes à -5°C.

Ils ont expliqué ce phénomène par une altération de la membrane plasmique plus que par une augmentation de sa perméabilité aux cations à basse température.

Tableau V : Types cellulaires létalement endommagés par une réduction rapide de la température.
(D'après Morris, 1987)

Type cellulaire	Références
<u>Bactéries</u>	
espèces Gram -	Strange, 1976; Farrell et Rose, 1967.
espèces Gram +	Ring, 1965; Smeaton et Elliot, 1967.
<u>Levures</u>	
<i>Sacchromyces cervisae</i>	Calcott et Rose, 1982.
<u>Protozoaires</u>	
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Morris et al., 1983; 1984.
<i>Blepharisma japonicum</i>	Giese, 1984.
<i>Amoeba</i> spp.	McLellan et al., 1984.
<u>Algues</u>	
<i>Anacystis nidulans</i>	Siva et al., 1977; Forrest et al., 1957. Jansz et Maclean, 1973; Ono et Murata, 1981.
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	Morris et al., 1983.
<u>Plantes supérieures</u>	
Culture en suspension de Sycamore	Morris et al., 1983.
Plantes tropicales	Levitt, 1980; Wilson & McMurdo, 1981.
<u>Cellules de mammifères</u>	
Spermatozoïdes	Watson, 1981.
Embryons	Wilmut et al., 1975.
Hépatocytes	Morris et al., 1983.
Lymphoïdes	Morris et al., 1983.
Granulocytes	Knight et al., 1976; Takahashi et al., 1981.

Jansz et McLean (1973) ont montré qu'une exposition à des températures de 0 et -3°C, de l'algue bleue-verte *Anacystis nidulans*, pendant 15 minutes entraîne une réduction de la viabilité de 98%. Ils suggèrent également que le choc dû au froid affecte la membrane cellulaire, mais ne trouvent pas d'explication valable à la diminution de la photosynthèse, observée en parallèle.

L'arrêt des mouvements et des courants protoplasmiques dans les cellules pellifères de la tomate suite à une exposition à une température de 10°C pendant 2 à 3 minutes, a été interprété par Lyons (1973) comme une atteinte du métabolisme général. Cet arrêt des mouvements protoplasmiques, qui demandent de l'énergie, pourrait être une conséquence de la diminution de la réserve en ATP observée par Wilson (1978) chez les espèces thermosensibles.

En outre, Callow et McGrath (1985) ont observé que le rétrécissement de la membrane plasmique est plus rapide que celui du volume inclus, ce qui peut expliquer la rupture de la membrane au cours du refroidissement et de la congélation.

En ce qui concerne les dommages indirects, Brandts (1967) observe une dénaturation protéique induite par le refroidissement. Les interactions hydrophobes, qui sont importantes dans le maintien de la stabilité de plusieurs protéines, deviennent faibles ou fragiles à basse température, occasionnant une dénaturation irréversible.

Cependant, de nombreux auteurs (Lyons *et al.*, 1979; Ono et Murata, 1981) admettent que les deux types de dommages induits par le refroidissement sont le résultat de transitions de phase que subissent les lipides membranaires en passant de l'état flexible à l'état solide (Quinn, 1985). Ces transitions de phase ont été corrélées avec les observations de perte d'eau, d'ions, de sucres, d'acides organiques et autres métabolites (Wilson, 1987). Cette modification provoque l'inactivation de la photosynthèse, de la réaction de Hill et le changement du spectre des caroténoïdes chez l'algue bleue-verte *Anacystis nidulans* après une brève exposition (10 min) à 0°C (Ono et Murata, 1981). La grande sensibilité du processus de fixation du CO₂ au froid peut également être due à un dommage direct par dénaturation enzymatique ou indirectement à un dommage primaire de la membrane plasmique, du tonoplaste et de l'enveloppe thylakoïdienne (Krause *et al.*, 1984).

III-3) Effets de la congélation.

Entre le temps où les premiers cristaux de glace extracellulaire commencent à se former et le temps de remise en suspension après décongélation, les cellules sont exposées à une séquence d'événements qui sont potentiellement létaux.

III-3-1) Effets mécaniques de la cristallisation de l'eau sur les structures cellulaires.

L'eau existant au voisinage de certains biopolymères ou servant de 'ciment' dans des ultrastructures cellulaires joue un rôle essentiel dans l'organisation des différentes membranes cellulaires, sa transformation en glace provoque des modifications dans les ultrastructures et par suite dans le fonctionnement cellulaire.

Le développement de grandes plages de glace pure, à l'extérieur ou à l'intérieur des cellules est capable de désorganiser les cellules (Simatos *et al.*, 1977). La séparation de la cuticule des cellules épidermiques de chou après congélation-décongélation est un exemple classique du dommage causé par le seul effet mécanique de la glace (Grout et Morris, 1987). Les cristaux de glace extracellulaire percent rarement les parois cellulaires, mais ils peuvent les déformer de façon importante. A l'intérieur des cellules, les cristaux, en se développant, peuvent déplacer et déformer les structures internes.

Les distorsions causées par la cristallisation extracellulaire semblent être réversibles. Trump *et al.* (1965) ont montré que les distorsions très importantes provoquées par la formation de glace extracellulaire au cours de la congélation lente, ne sont pas suivies d'effets après décongélation. Par contre, ces auteurs observent que des microcristaux formés à l'intérieur des cellules provoquent des dislocations irréversibles des différents systèmes membranaires.

Généralement, la formation de glace extracellulaire, a lieu lors d'un refroidissement lent, de l'ordre de quelques degrés par heure (proche de celui obtenu dans des conditions naturelles). Gazeau et Dereuddre (1986) remarquent que les cristaux de glace extracellulaire entraîne une déshydratation de la cellule par simple effet d'osmose. Le cycle de congélation-décongélation provoque donc une plasmolyse et une déplasmolyse qui peuvent provoquer des dommages (Levitt, 1972). Les effets physiologiques et biochimiques observés sont une atteinte de la

photosynthèse (Clarke *et al.*, 1986) et de la respiration (Ben-Amotz et Gilboa, 1980a).

Au contraire, la cristallisation intracellulaire a souvent été associée à un refroidissement rapide. Elle est létale dans la majorité des cas (Gazeau et Dereuddre, 1986). Elle résulte soit d'une nucléation intracellulaire (formation de germes cristallins), soit d'une pénétration des cristaux de glace extracellulaires (Brown et Reuter, 1974).

Franks (1990) a résumé les différents changements chimiques qui peuvent être impliqués dans la congélation des cellules en tenant compte de la vitesse de refroidissement (figure 1). Le résultat final est souvent une dénaturation protéique dont les effets vont se manifester après décongélation.

Steponkus (1981) remarquent que la rapidité avec laquelle le dommage se manifeste implique que la cause est une atteinte de l'intégrité membranaire plutôt qu'un dysfonctionnement métabolique. Les lésions membranaires dues à la congélation ont été étudiées *in vitro* sur les membranes mitochondriales (Heber *et al.*, 1973) et thylakoïdiennes (Hincha et Schmitt, 1985).

Les protoplastes constituent aussi un modèle d'étude quant aux dommages causés par la cristallisation de l'eau, car il y a alors un accès direct à la surface externe de la membrane plasmique. Les altérations de celle-ci seraient dues à une rupture des forces intermoléculaires à l'intérieur de la membrane (Morris, 1980).

III-3-2) Effets dus à la concentration des solutés.

Un phénomène caractéristique de la congélation des solutions aqueuses est la concentration progressive que subissent les liquides interstitiels pendant la première phase de la congélation suite au phénomène d'osmose déjà mentionné. Plusieurs effets secondaires peuvent en résulter, en particulier, sur les vitesses de réactions (Morris et Clarke, 1987).

En outre, pour une faible augmentation de la concentration en solutés l'activité des enzymes solubles est inhibée de façon réversible. Aux fortes concentrations en électrolytes, il y a une dénaturation protéique par modification des interactions moléculaires faibles, responsables du maintien de la structure protéique (Jaenicke, 1981). L'exposition des membranes isolées à des solutions hypertoniques peut aussi induire la perte de protéines membranaires. Ceci ne serait pas due

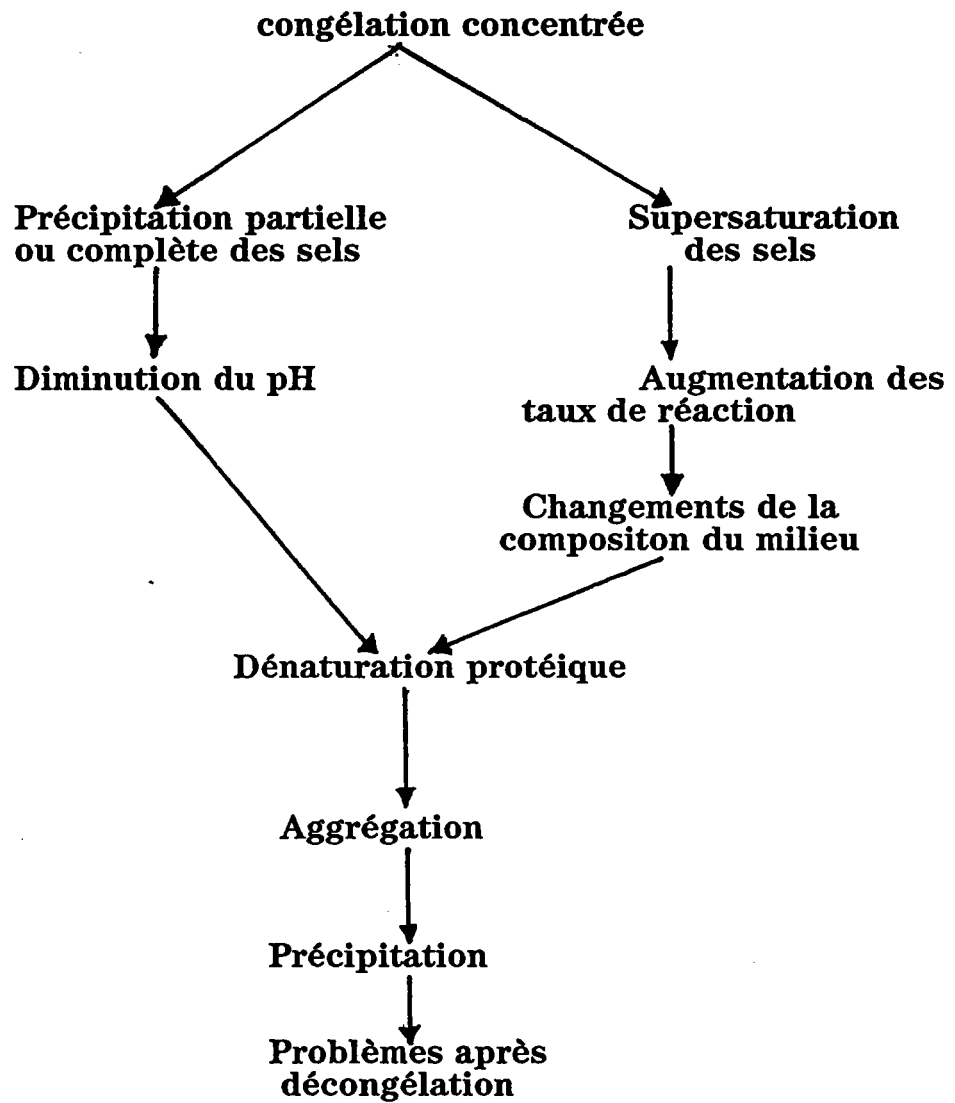


Figure 1 : Changements chimiques ayant lieu dans des solutions aqueuses au cours de la congélation.
(D'après Franks, 1990)

au stress osmotique mais à un effet direct des solutés sur les interactions ioniques intramembranaires (Heber *et al.*, 1981). La perte du cofacteur 1 (CF1) de la membrane thylakoïdienne après congélation (Garber et Steponkus, 1976) a ainsi offert un système d'étude de l'influence du stress de la concentration en solutés sur la structure et la fonction membranaire en prenant en considération une protéine unique dont le rôle structural et fonctionnel sont importants.

III-3-3) Conclusions sur les effets de la congélation.

La congélation peut prendre des aspects extrêmement divers selon le système biologique en cause. La perméabilité des parois des cellules, leur état physiologique, la composition du milieu de congélation, les vitesses de congélation et de décongélation sont tous des paramètres déterminants.

Le choc thermique entraîne le passage de l'état liquide-cristallin à l'état de gel-solide de la phase membranaire (Morris, 1980) qui s'exprime par une perte directe de la perméabilité sélective et une atteinte des constituants intracellulaires. Le dommage indirect causé par le froid est une conséquence des changements de phases membranaires sur le métabolisme cellulaire.

Au cours de la congélation, les cellules peuvent subir soit une cristallisation intracellulaire provoquant surtout des dommages mécaniques, soit une cristallisation extracellulaire correspondant à une action beaucoup plus marquée de la concentration des solutés cellulaires. Aucun des processus d'altérations invoqués dans la littérature ne permet à lui seul d'expliquer toutes les observations (Simatos *et al.*, 1977). La grande diversité des effets du froid a pour conséquence que la congélation doit être effectuée dans des conditions spécifiques au système traité. Ces conditions réalisent souvent un compromis entre différents processus d'altérations possibles.

L'existence d'une vitesse de refroidissement optimale et l'emploi de substances protectrices permet heureusement d'augmenter les pourcentages de viabilité des cellules.

III-4) La cryoprotection.

III-4-1) La cryoprotection naturelle.

Il est connu, depuis longtemps que les espèces végétales originaires des régions chaudes sont sensibles aux basses températures non gélantes ("chilling temperatures") et que la plupart d'entre elles ne survivent pas à quelques degrés en-dessous de 0°C. Par contre, la majorité des espèces des régions froides et polaires peuvent résister à des températures très basses. Burch et Marchant (1983) signalent que les algues unicellulaires *Dunalliella* sp. et *Chlamydomonas* sp. des lacs antarctiques hypersalins, restent actives jusqu'à des températures de -14°C. Pour *Nostoc* et *Prasiola*, qui sont des algues habitant le sol antarctique, la photosynthèse reste possible à -5° et -20°C respectivement.

Cette adaptation naturelle au froid, appelée endurcissement, est un processus physiologique qui permet à certaines cellules végétales de résister aux basses températures. Elle a lieu sous le contrôle de facteurs externes, tels que la température et la photopériode. Elle peut-être mise en rapport avec divers phénomènes que Levitt a déjà évoqué en 1972 et dont les mécanismes sont résumés sur la figure 2.

Les modifications biochimiques accompagnant cet endurcissement naturel, sont des changements de la composition chimique du système membranaire (phospholipides et protéines) (Tischner *et al.*, 1978), l'élaboration de sucres solubles d'acides aminés et la synthèse de protéines solubles (Mohaparta *et al.*, 1987).

Dans le cas des espèces qui ne peuvent pas résister pas naturellement aux basses températures, le recours à des substances cryoprotectrices est nécessaire.

III-4-2) La cryoprotection artificielle.

III-4-2-1) Propriétés générales des substances cryoprotectrices.

Les premières recherches ont été entreprises dans le domaine animal, essentiellement sur des cellules de mammifères (spermatozoïdes et cellules sanguines). Plusieurs travaux ont ainsi démontrés l'efficacité de certaines substances cryoprotectrices. Lovelock (1954) a énuméré quatre caractéristiques des substances cryoprotectrices : i) grande solubilité dans les solutions aqueuses salines, ii) capacité de pénétrer

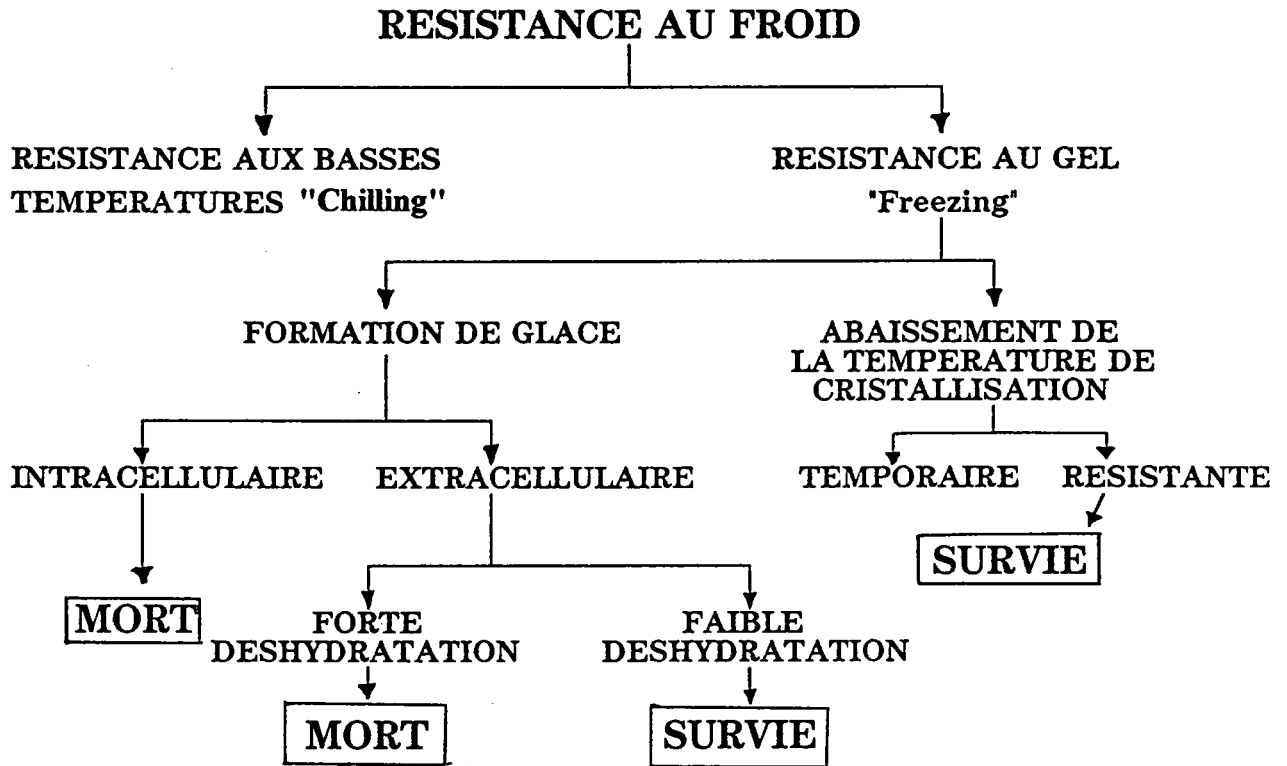


Figure 2 : Mécanismes possibles de la résistance naturelle des végétaux aux basses températures. (d'après Levitt, 1972)

rapidement dans les cellules , iii) faible poids moléculaire et iiiii) absence de toxicité à des concentrations relativement élevées. Malgré le fait que certains composés à haut poids moléculaire, tels que la polyvinylpyrrolidone (PVP) et le polyéthylène glycol (PEG), se soient montrés bénéfiques dans certaines applications (Meyer, 1985), les caractéristiques données par Lovelock restent applicables.

Les principales substances cryoprotectrices utilisées dans la cryopréservation des cellules végétales sont rassemblées dans le tableau VI. Leur nature chimique est variée, elles peuvent comporter des fonctions alcool, aldéhyde, amine, acide, thiol, des liaisons saturées ou insaturées. Cette diversité n'est en fait qu'apparente puisque plusieurs points communs les rapprochent.

Ces substances sont capables de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, les protéines et les groupements hydrophiles des phospholipides. Il existe une corrélation entre la capacité cryoprotectrice de certains composés et la possibilité pour ceux-ci de se lier par des liaisons hydrogène: plus celles-ci sont nombreuses et fortes, plus le composé est stable et son pouvoir cryoprotecteur est élevé. C'est le cas du diméthylsulfoxyde (DMSO), du glycérol et du saccharose (Gazeau et Dereuddre, 1986).

Par ailleurs, la conductivité et la capacité thermique, ainsi que la viscosité dépendent de l'abaissement de la température et de la concentration du milieu (cf. § III.1). En général, les substances cryoprotectrices augmentent la viscosité des milieux cellulaires, ralentissent la nucléation et abaissent la température de cristallisation (Mackenzie, 1977). Ils réduisent aussi la quantité de glace formée à une température donnée et diminuent la vitesse de croissance des cristaux tout en modifiant leurs formes (Boutron et Kaufmann, 1978, 1979).

Tao et Li (1986) ont proposé trois catégories de cryoprotecteurs en fonction de leur masse moléculaire représentative, c'est-à-dire de leur capacité d'entrer dans les cellules ou non.

- Les substances pénétrantes possèdent généralement une masse moléculaire faible (< 400) qui leur permet de traverser la paroi cellulaire et la membrane plasmique. Cette catégorie comprend les composés les plus communément utilisés : glycérol, DMSO, méthanol.

Tableau VI : Principales substances cryoprotectrices utilisées pour la conservation des cellules, tissus et organes, tant animaux que végétaux.

Nature		Masse Moléculaire	Formule chimique
ALCOOL	Méthanol	32	$\text{CH}_3\text{-OH}$
	Ethylène glycol	62	$\text{CH}_2\text{OH-CH}_2\text{OH}$
	Glycérol	92	$\text{CH}_2\text{OH-CHOH-CH}_2\text{OH}$
	Propylène glycol	76	$\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$
	Sorbitol	182	$\text{CH}_2\text{OH-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$
	Mannitol	182	$\text{CH}_2\text{OH-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$
Composé Soufré	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	78	$\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$
Acide Aminé	Proline	115	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$ $(\text{CH}_2)_3$
Glucide	Glucose	180	$\text{CHO-(CHOH)}_4\text{-CH OH}$
	Tréhalose	342	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
	Saccharose	342	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
Polymère	Polyéthylène glycol (PEG)	Elevée	$\text{CH}_2\text{OH-CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{-CH}_2\text{OH}$
	Polyviylpyrrolidone (PVP)	"	$\text{CH}_2=\text{CH-N-CO-(CH}_2)_3n$
	Hydroxyéthyle amidon	"	

- Les substances semi-pénétrantes qui traversent la paroi cellulaire mais ne pénètrent pas la membrane plasmique. Ils ont généralement un poids moléculaire inférieur à 1000, c'est le cas des polymères à faible poids moléculaire tel que le polyéthylène glycol (PEG₁₀₀₀).

Les substances non pénétrantes, qui ne traversent ni la paroi ni la membrane plasmique, ont une masse moléculaire élevée (>1000) et sont représentées par les protéines solubles, les polysaccharides, la PVP et PEG₆₀₀₀.

1) Cas particulier du DMSO et du glycérol.

Ce sont les agents cryoprotecteurs les plus utilisés, ils pénètrent très rapidement et facilement dans les cellules. En général, le DMSO devient toxique, vis-à-vis des cellules végétales, au-delà de 1,5M (Withers, 1980). Utilisés conjointement avec le saccharose, le glycérol ou le DMSO induisent des changements ultrastructuraux au niveau des ébauches foliaires de plantules de blé (Gazeau, 1983). Ces modifications sont cependant réversibles, de même que les altérations morphologiques et la perte de motilité, observées chez *Euglena* après une exposition de 15 minutes à 1,5M de DMSO (Morris, 1980).

Bien que considéré comme non toxique aux concentrations utilisées, le DMSO pourrait induire des modifications épigénétiques, selon Ashwood-Smith (1985), lorsqu'il est utilisé à des concentrations élevées (supérieures à 2M). Certaines précautions doivent être prises quant à l'emploi du DMSO comme cryoprotecteur des cellules embryonnaires animales lorsque des risques de changements dans l'expression du génôme sont à craindre. Le DMSO reste cependant efficace aussi bien avec des vitesses de refroidissement lentes que rapides.

Le glycérol est utilisé surtout pour les cellules animales. Au-delà d'une concentration 2M, il induirait des altérations cytoplasmiques chez *Chlorella* (Plattner *et al.*, 1972). Morris (1976a) a aussi montré que le glycérol réduisait la reprise des cellules de *Chlorella* après un cycle de congélation-décongélation. Comparé au DMSO, il pénètre plus lentement dans les cellules et de façon inégale selon les espèces. Les cellules de carotte semblent ainsi être perméables au Glycérol (Nag et Street, 1975) alors que les cellules d'*Acer* et d'*Haplopappus* lui seraient imperméables (Towill et Mazur, 1976). Concernant les effets du glycérol sur le

comportement des globules rouges humains, au cours de la congélation, Lovelock (1953) estime que son action cryoprotectrice s'explique par la réduction considérable de la concentration en électrolytes.

2) Cas particulier des acides aminés.

Ces substances, dont les effets ont été étudiés sur des membranes ou des organites isolés (Heber *et al.*, 1971), sont peu employées, à l'exception de la proline pour conserver des cellules de *Zea mays* (Withers et King, 1979) ou des algues marines unicellulaires (Meyer, 1985). Ce composé, très soluble et peu toxique est utilisé à des concentrations de 1 à 2M et semble agir, comme le DMSO, sur les milieux extracellulaire et intracellulaire dont il augmente la viscosité (Gazeau et Dereuddre, 1986).

3) Les sucres et les polyols.

Le saccharose et d'autres sucres solubles sont souvent utilisés dans les milieux de préculture et dans les milieux de cryopréservation. Ils réduisent les stress dus aux fortes concentrations en électrolytes (Gazeau et Dereuddre, 1986). En présence de saccharose, l'intégrité structurelle et les propriétés de perméabilité des vésicules unilamellaires de phosphatidylcholine sont préservées au cours du cycle de congélation-décongélation (Strauss *et al.*, 1986). Les mêmes auteurs remarquent que cette stabilisation ne dépend pas du type de sucre utilisé et serait une propriété générale des saccharides.

Le tréhalose est aussi un diholoside (dimère non réducteur du glucose) possédant des propriétés cryoprotectrices. A des concentrations relativement peu élevées 0,2M (Anchordoguy *et al.*, 1987), il est compatible avec la survie des cellules. Il préserverait les membranes biologiques contre la déshydratation (Crowe *et al.*, 1985). Cette capacité a été directement corrélée avec sa propriété d'interagir avec les phospholipides et de maintenir la fluidité de la structure bilamellaire (Anchordoguy *et al.*, 1987). Il a aussi été utilisé avec succès pour conserver dans l'azote liquide des suspensions cellulaires de carotte et de tabac (Bhandal *et al.*, 1985)

Les polyols (sorbitol, mannitol, propanediol) auraient des rôles similaires, ils sont aussi utilisés dans les milieux de préculture pendant la phase de prétraitement de cellules de plantes en suspension (Maddox *et al.*, 1983).

4) Les polymères.

Les mécanismes d'action de ces substances sont souvent controversés. Il est vraisemblable que leur action se situerait au niveau du plasmalemme (GAZEAU et DEREUDDRE, 1986), dont ils assureraient la stabilité par la création de nombreuses liaisons hydrogènes. Etant de haut poids moléculaire, ils ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur de la cellule et restent concentrés à la surface de la paroi cellulaire (Tao et Li, 1986), protégeant ainsi les cellules des stress mécaniques induits par la formation de la glace. L'utilisation de la PVP et du hydroxyéthylamidon (HES) comme polymères cryoprotecteurs dans les études de cryomicroscopie ultrastructurale (Morris, 1976a), n'a malheureusement pas permis d'élucider leurs mécanismes exacts de cryoprotection. Toutefois ces études ont montré que ces substances n'induisaient aucun effet néfaste sur la physiologie cellulaire, et ne nécessitaient qu'une courte période d'incubation pour permettre leur diffusion à la surface de la cellule. Le PEG₆₀₀₀ s'est, cependant, révélé toxique pour les cellules de plantes (Tao et Li, 1986).

5) Les mélanges cryoprotecteurs.

La majorité des travaux effectués, aussi bien sur des cellules animales que végétales, montrent que l'association de cryoprotecteurs appartenant à différentes catégories est souvent bénéfique. Latta (1971), Nag et Street (1975), Maddox *et al.* (1983), Gazeau (1983), Meyer (1985), Tao et Li (1986) ont ainsi montré que des combinaisons binaires ou ternaires de deux ou trois agents cryoprotecteurs ont un effet favorable sur la survie des cellules. L'effet cryoprotecteur semble correspondre à l'intégration des actions de chacun des solutés (GAZEAU et DEREUDDRE, 1986).

Les niveaux d'action des substances cryoprotectrices est lié à leur faculté à pénétrer dans les cellules. GAZEAU et DEREUDDRE (1986) ont présenté un schéma récapitulatif (figure 3) montrant les types de protections exercées en fonction du poids moléculaire de la substance

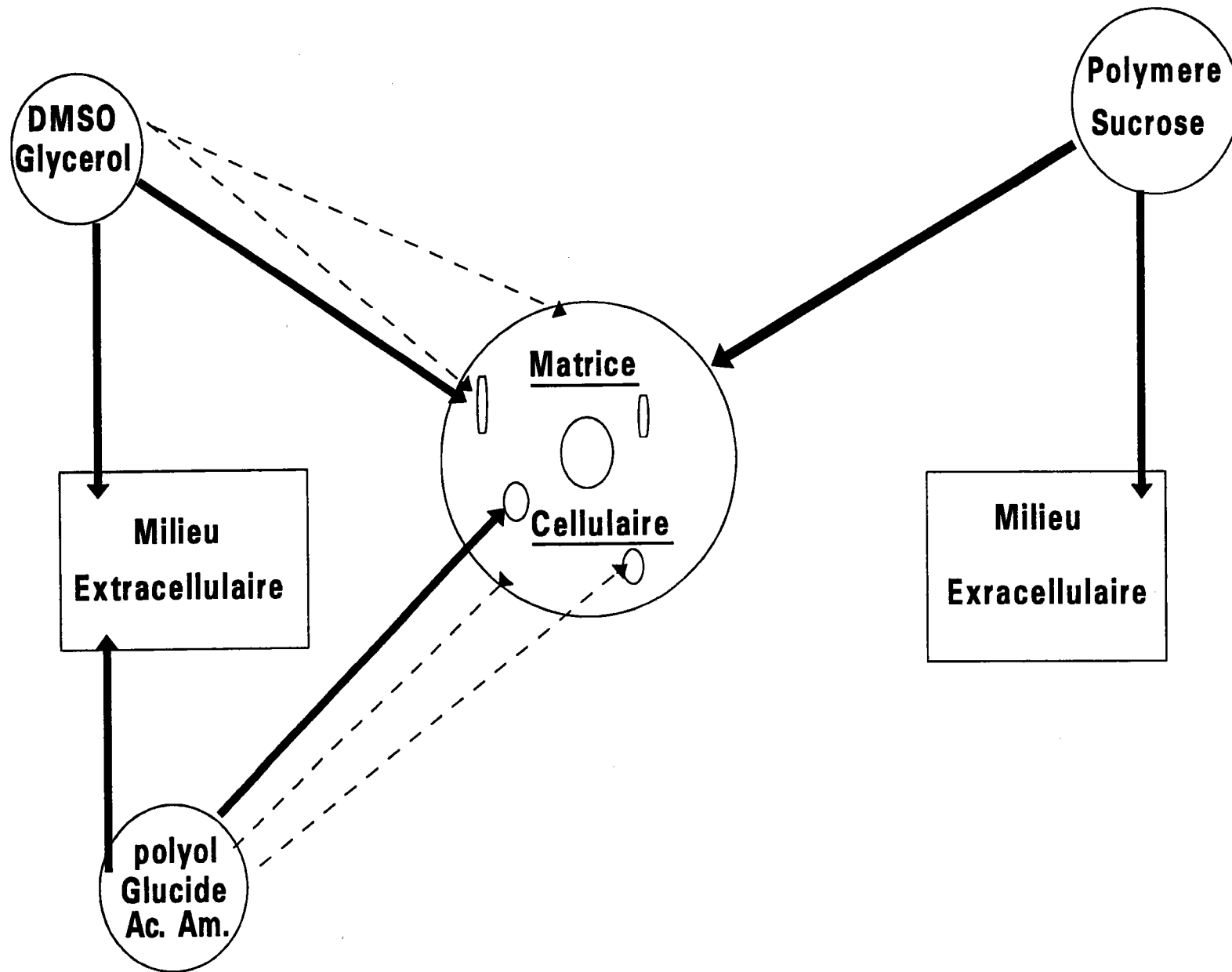


Figure 3 : Schema recapitulatif montrant les differents niveaux d'action des substances cryoprotectrices

utilisée . Les agents de faible masse moléculaire agissent surtout dans le milieu intracellulaire, ils permettent une sortie modérée de l'eau de la cellule limitant ainsi l'accroissement de la concentration saline intracellulaire. Les agents de masse moléculaire plus élevée provoquent eux-mêmes une déshydratation osmotique de la cellule, et donc une moindre formation de glace intracellulaire. Ils protégeraient aussi le plasmalemma en s'associant aux groupements hydrophiles des phospholipides et des protéines de surface. Ces deux types de mécanismes ne peuvent pas être dissociés et chaque substance cryoprotectrice de cette catégorie possède ces deux effets (action intra et extracellulaire) avec un degré d'intensité plus ou moins important selon les possibilités de création de liaisons hydrogène avec les molécules hydrophyles de la cellule.

CHAPITRE IV

FACTEURS AFFECTANT LA CRYOPRESERVATION DES ALGUES.

Les variables qui déterminent la réponse des microalgues aux stress de congélation et de décongélation peuvent être séparées, selon Morris (1980), en deux classes :

- les variables intrinsèques sont plus spécialement reliées à l'espèce algale utilisée et aux conditions de culture de celle-ci : espèce proprement dite, âge de la culture, température d'incubation et milieu de croissance.

- Les variables extrinsèques concernent davantage la technique de cryopréservation elle-même : type et concentration de l'additif cryoprotecteur, vitesses de refroidissement et de réchauffement et température finale atteinte.

Tous ces facteurs interagissent pour déterminer la viabilité cellulaire après décongélation. Ils seront traités séparément.

IV-1) Facteurs intrinsèques.

IV-1-1) Effets de l'âge de la culture.

Des cellules en suspension et en culture continue passent par des phases de croissance bien définies. Morris (1976a) a observé que les cellules de *Chlorella* 211/7a prises en phase exponentielle de croissance (2 à 5 jours) sont plus sensibles au dommage du froid que celles en phase stationnaire (âge supérieur à 6 jours). Au contraire, des cellules de carotte sont plus résistantes durant la phase exponentielle de croissance (Nag et Street, 1975).

Selon Morris (1980), cette sensibilité au froid en fonction de l'âge de la culture n'est pas imputable à des modifications du milieu de culture mais à des changements de la physiologie des algues. C'est ainsi qu'elle a été associée, dans le cas des algues comme dans celui des cellules de carotte, à un grand volume cellulaire et à une augmentation du degré de vacuolisation.

Les cellules algales, en phase stationnaire de croissance (nutriments limitants) comportent, d'après Pyliotis *et al.* (1975), moins de vacuoles et accumulent plus de lipides. L'utilisation de cellules, issues d'une phase de croissance où elles présentent le minimum de vacuolisation, permet alors un maximum de résistance aux dommages induits par la congélation et la décongélation.

IV-1-2) Effets de la température et de la composition du milieu de croissance.

La résistance au froid de certaines microalgues d'eaux douces (Hatano *et al.*, 1976; Hatano, 1978; Morris, 1976b) et marines (Ben-Amotz et Gilboa, 1980b) augmente avec la diminution de la température de croissance. Ce phénomène est analogue au processus d'acclimatation au froid des plantes supérieures pour pouvoir résister aux basses températures hivernales (Leeson *et al.*, 1984). Morris (1976b) a montré que la température de croissance de *Chlorella* 221/8h détermine sa réponse au stress de congélation-décongélation. Les cellules cultivées à 20°C sont plus sensibles au froid que celles incubées à 4°C. Une incubation à 4°C pendant 4 semaines de *Chlorella salina* permet de passer de 0 à 100% de viabilité après congélation à -196°C (Ben-Amotz et Gilboa, 1980b).

La réduction du taux de nitrates (Morris et Clarke, 1977) et de bicarbonates (Ben-Amotz et Gilboa, 1980b) ou l'addition de substances cryoprotectrices à faible concentration (Meyer, 1985) dans le milieu induit cette résistance au froid. En parallèle, une accumulation de glycolipides, une réduction de la taille vacuolaire et une augmentation de l'insaturation des acides gras sont observées chez *Chlorella emersonii* (Morris et Clarke, 1977).

D'une manière générale, il existe une corrélation inverse entre le taux de croissance et la résistance au froid et tout traitement qui réduit la croissance et l'activité métabolique augmente la résistance au froid (Morris, 1980).

IV-2) Facteurs extrinsèques.

IV-2-1) Effets de la vitesse de refroidissement.

Pour chaque espèce ou type cellulaire, il existe une vitesse optimale de refroidissement qui dépend surtout du volume cellulaire et de la perméabilité membranaire. L'utilisation de vitesses plus lentes ou plus rapides entraîne des dommages (Morris, 1980). Avec *Scenedesmus quadricauda* et *Chlamydomonas nivalis*, les vitesses optimales de refroidissement sont respectivement de 2 et 10°C/min (Leeson *et al.*, 1984). Elles sont respectivement de 0.5 et 3°C/min chez *Euglena gracilis* (Morris et Canning, 1978) et *Chlorella* 211/7a (Morris, 1976a).

La vitesse de refroidissement apparaît comme déterminante car elle peut causer des séparations de phase de la membrane lipidique et des modifications de la topographie des protéines membranaires (Krause *et al.*, 1984).

Aux faibles vitesses de refroidissement, deux types de réponses cellulaires peuvent avoir lieu. Celle qui est communément observée est une plasmolyse accentuée (voire totale) de la cellule due au gradient osmotique entre l'intérieur de la cellule et le milieu extracellulaire hypertonique. L'autre possibilité est relative à la formation de glace entre la paroi et la membrane plasmique, ce qui entraîne un décollement de la membrane plasmique (Morris, 1980). Aux vitesses de refroidissement rapides, la probabilité de formation de glace intracellulaire augmente puisque le temps est insuffisant pour que l'équilibre osmotique se rétablisse. Morris *et al.* (1986) ont observé à des vitesses supérieures à 20 °C/min la formation de glace intracellulaire chez *Cylindrocapsa brevissonii*, et l'ont corrélé au faible taux de viabilité observé.

En général, deux méthodes de refroidissement sont utilisées pour la congélation des algues :

- Le refroidissement linéaire au cours duquel la réduction de la température se fait selon une vitesse constante de l'ambiance jusqu'à la température de stockage.
- Le refroidissement ou la congélation en deux étapes comprenant une période initiale de refroidissement généralement rapide. L'échantillon est ensuite transféré directement à la température de stockage.

Cette dernière méthode présente l'avantage d'être simple et de ne pas demander de matériel spécial pour contrôler la vitesse de refroidissement. Elle a été appliquée à différents types d'algues d'eaux douces (Morris, 1978) ou marines (Ben-Amotz et Gilboa, 1980b). Les figures 4 et 5 représentent respectivement la viabilité de *Chlamydomonas reinhardtii* et d'*Euglena gracilis* congelée en une seule (-30°C) ou en deux étapes (-30 puis -196°C). La viabilité des cellules congelées en une seule étape diminue avec l'augmentation du temps d'exposition à -30°C. La reprise des cellules congelées en deux étapes augmente avec le temps d'exposition pour atteindre une valeur maximale à 60 minutes et diminuer ensuite de la même manière que les cellules congelées en une seule étape. Le passage de -30 à -196°C est une étape critique. Les dommages causés peuvent, néanmoins, être grandement diminués, pour autant que soit déterminé le temps optimal d'exposition à -30°C.

IV-2-2) Effets des additifs cryoprotecteurs.

Les effets des additifs cryoprotecteurs sur la reprise de *Chlorella emersonii* a été étudié par Morris (1980) à différentes vitesses de congélation jusqu'à -196°C après une décongélation rapide. Les figures 6, 7 et 8 présentent respectivement les effets de différentes concentrations de méthanol, de glycérol et de PVP sur la viabilité de cette algue.

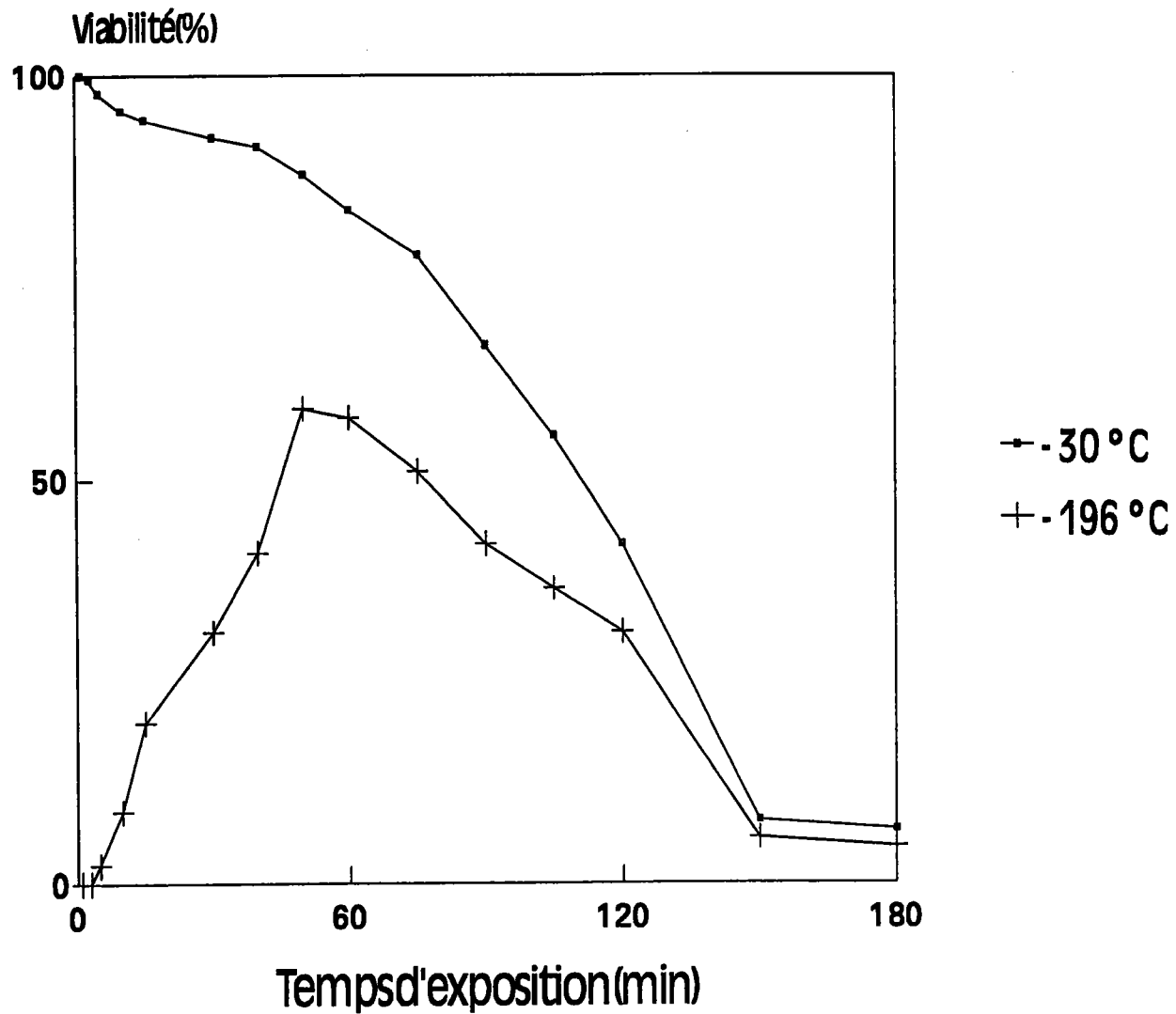


Figure 4 : Viabilité de *Chlamydomonas* après une congélation en une seule (-30 °C) ou en deux étapes (-30 °C puis -80 °C). (D'après MORRIS, 1980)

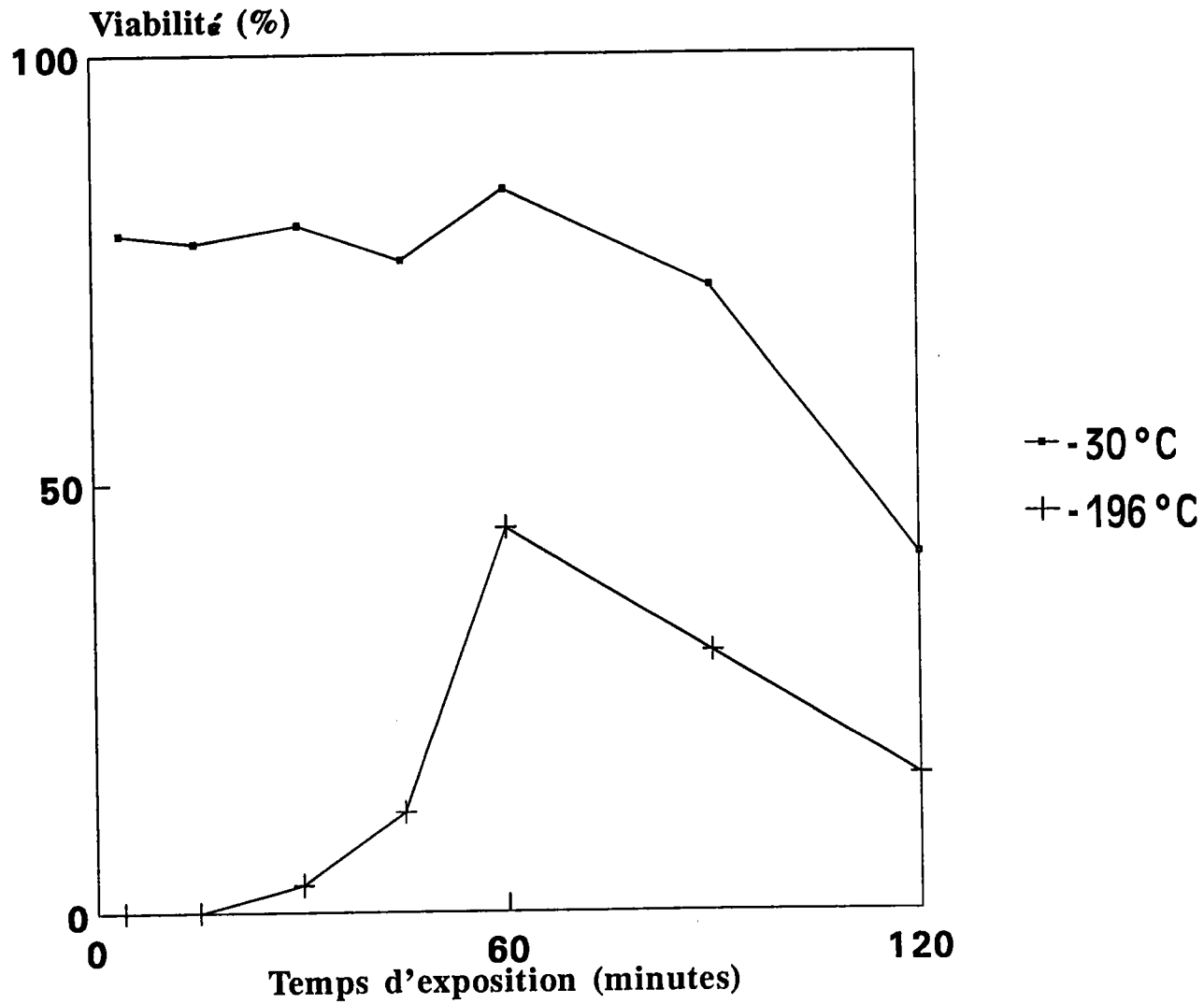


Figure 5 : Viabilité de *Euglena* après une congélation en une seule étape (-30 °C) ou en deux étapes (-30 °C puis -196 °C) (D'après MORRIS, 1980)

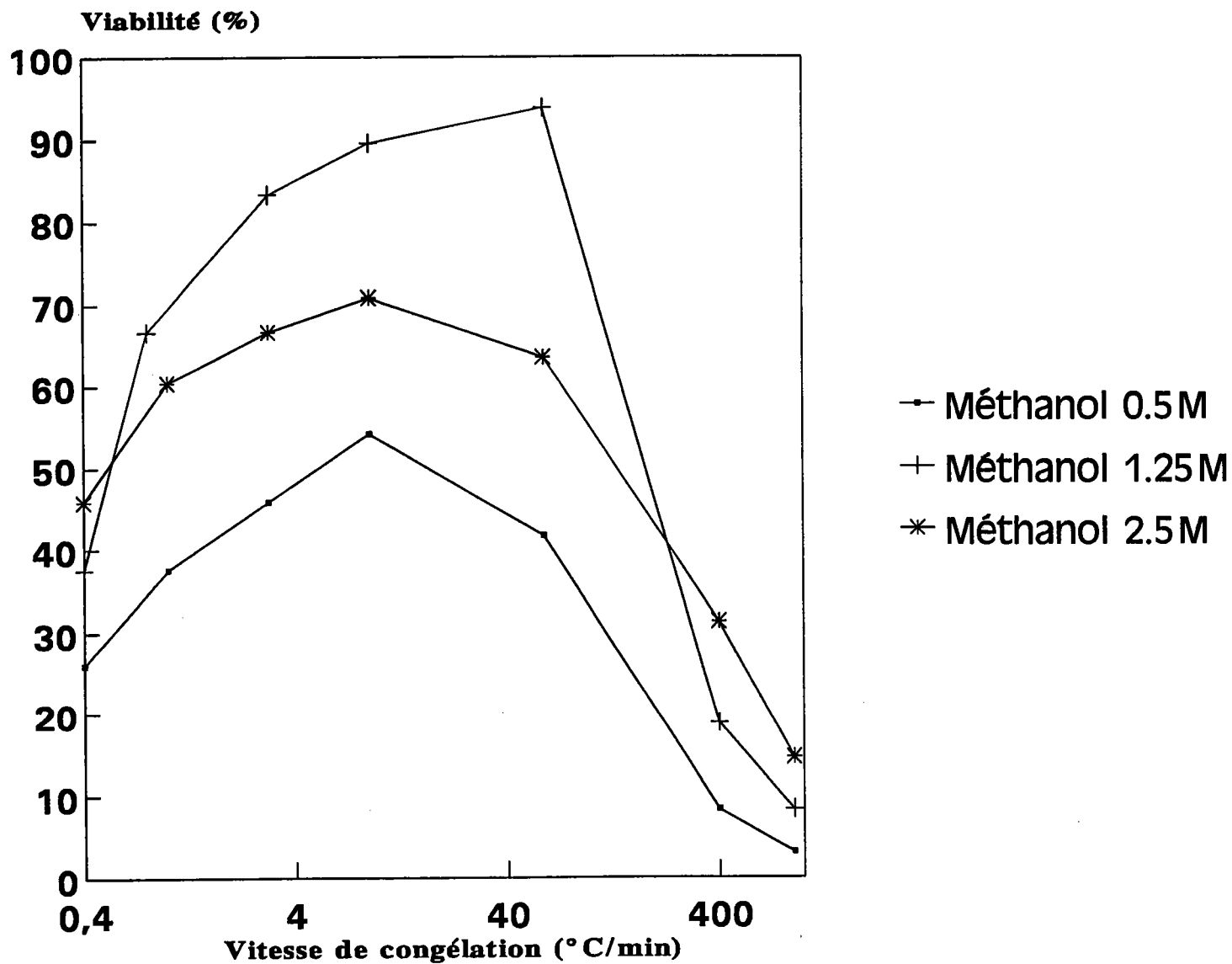


Figure 6 : Effets de différentes concentrations de Méthanol sur la viabilité de *Chlorella emersonii* (D'après MORRIS, 1980)

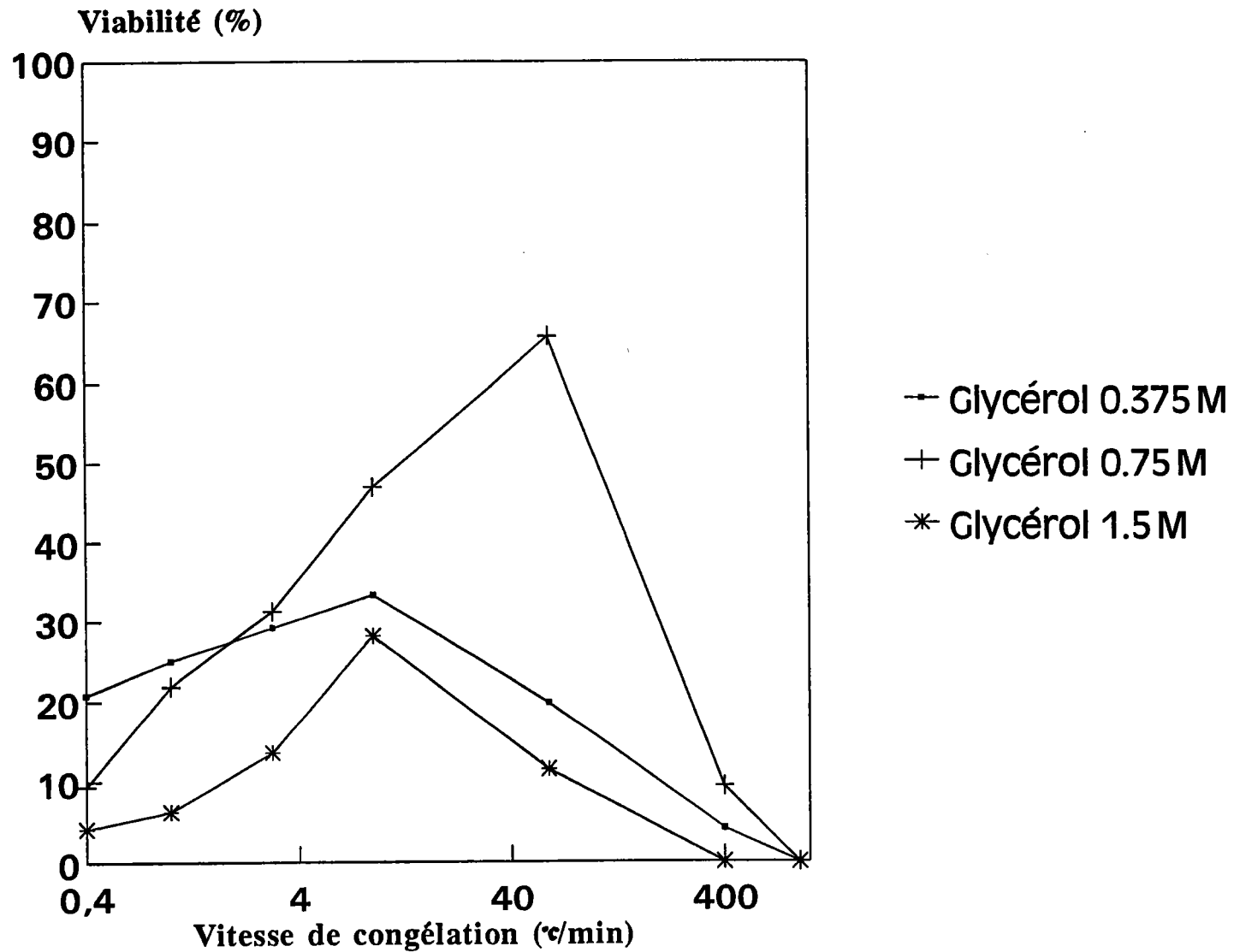


Figure 7 : Effets de différentes concentrations de Glycérol sur la viabilité de *Chlorella emersonii* (D'après MORRIS, 1980)

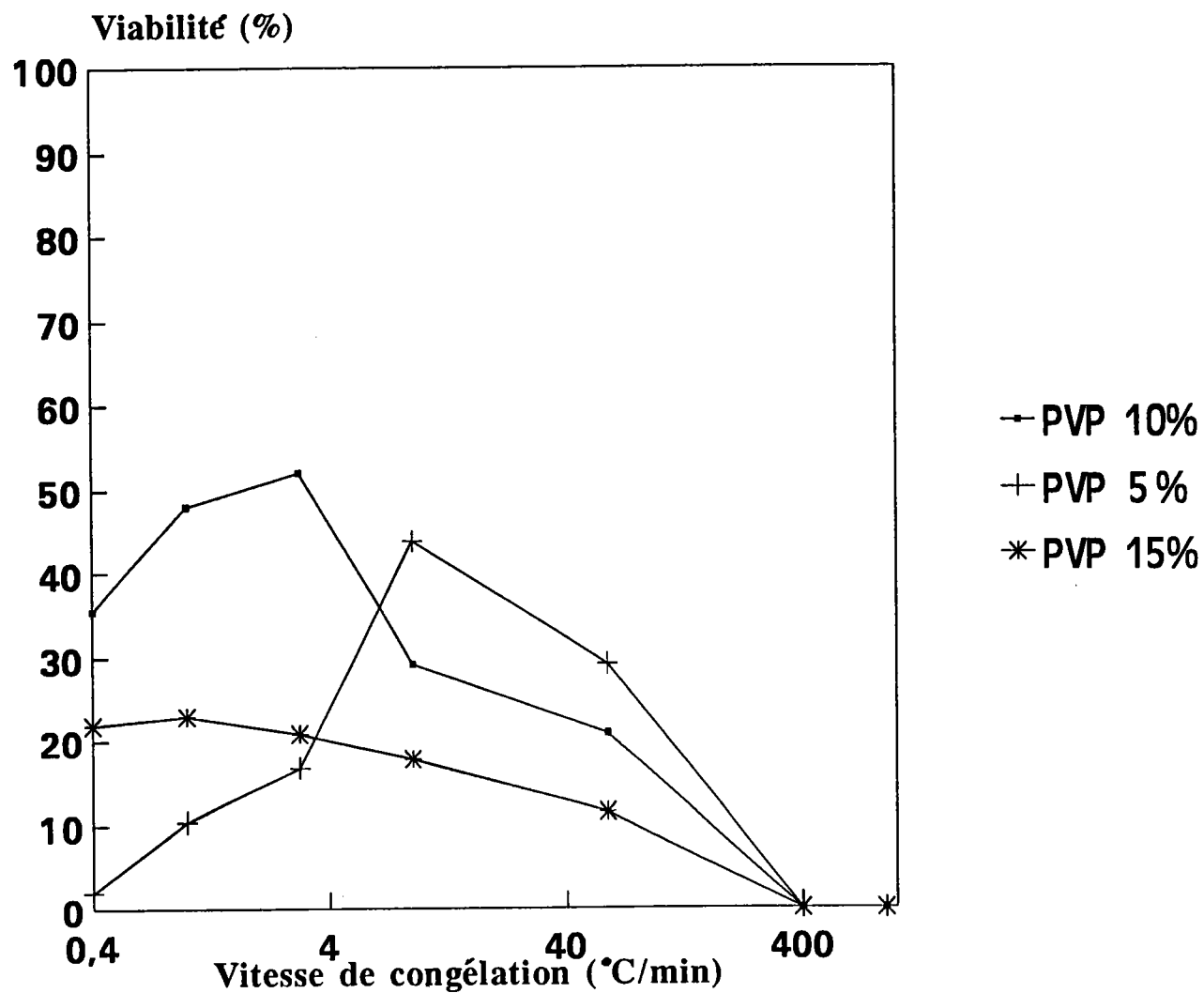


Figure 8 : Effets de différentes concentrations de PVP sur la viabilité de *Chlorella emersonii* (D'après MORRIS, 1980)

L'effet cryoprotecteur des additifs pénétrants est illustré par le méthanol (fig 6), le maximum d'effet est observé avec une concentration de 1.25 M et à des vitesses allant de 10 à 50°C/min. Ce type d'additif susceptible de traverser la paroi et la membrane de la cellule, permettrait la réduction du degré de déshydratation cellulaire au cours de la congélation et de la décongélation (Morris, 1980).

Le glycérol, quant à lui (fig 7), réduirait l'effet de la concentration extracellulaire en sels à n'importe quelle température au cours de la congélation puisqu'il ne pénètre pas les cellules de *Chlorella* (Morris, 1980). Le maximum de protection est observé à une concentration de 0.75M de glycérol. L'exposition au glycérol causerait un efflux osmotique de l'eau de la cellule permettant ainsi une réduction de la probabilité de formation de glace intracellulaire au cours d'une congélation rapide.

Les additifs de haut poids moléculaire tels que la PVP 40 (fig 8) n'induiraient aucune perte significative d'eau intracellulaire. Aux vitesses rapides de congélation aucun effet cryoprotecteur n'est observé. Au fur et mesure que la concentration de PVP augmente la vitesse optimale donnant le maximum de viabilité diminue. Quant au mécanisme de cryoprotection de la PVP, il n'est pas encore élucidé.

2ème PARTIE :

**MATERIEL
ET
METHODES**

CHAPITRE I

DONNEES GENERALES SUR LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Au cours de nos essais, nous avons utilisé trois espèces algales dont nous allons envisager, dans ce chapitre, la taxonomie, le mode de vie et l'utilisation en écotoxicologie

I-1) Taxonomie et mode de vieI-1-1) *Selenastrum capricornutum*.

Selenastrum capricornutum Printz, ATCC 22662 a été renommée *Raphidocelis subcapitata* (Korsikov) par Nygaard *et al.* (1986). Selon la classification de Feldmann (1978), la position systématique de *R. subcapitata* est la suivante :

- Phylum : Chlorophytes
- Embranchement : Chlorophycophytes
- Classe : Chlorophycées
- Sous classe : Chlorophycidées
- Ordre : Chlorococcales

NYGAARD *et al.* (1986) signalent que cette algue a été retrouvée dans plusieurs endroits en Europe Centrale et en Europe du Nord. Elle est représentative des milieux eutrophes et oligotrophes (LACAZE *et al.*, 1989).

Il s'agit d'une algue verte eucaryote unicellulaire et solitaire (sauf évidemment au cours de la division cellulaire). Elle est non flagellée et aisément reconnaissable avec une forme très caractéristique en croissant plus ou moins hélicoïdal. La taille de la cellule varie selon l'âge et les conditions de culture : le volume cellulaire est de 15 à 20 μm^3 pour les cellules en phase exponentielle de croissance alors qu'il peut atteindre 60 à 70 μm^3 pour celles en phase stationnaire de croissance (Nygaard *et al.*, 1986).

La reproduction peut se faire par libération de 2, 4 ou 8 autospores, toutefois la production de deux autospores est le phénomène le plus fréquent.

Haaland et Knutson (1973) ont rapporté que les températures minimale et maximale pour la croissance de *S. capricornutum* sont de 10 et 35°C respectivement. La température optimale de croissance avoisine 24°C (Reynolds *et al.*, 1975).

I-1-2) *Chlorella vulgaris*

La souche que nous avons utilisé est *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 211/11b du Centre de culture d'algues et de protozoaires de Cambridge.

La chlorelle est un eucaryote unicellulaire chlorophyllien de l'ordre des Chlorococcales (tout comme *S. capricornutum*). La position taxonomique de la souche utilisée a été précisée par Kessler (1978).

De point de vue écologique, la chlorelle est caractérisée par son ubiquité. Elle a été retrouvée dans différents systèmes aquatiques, mais elle n'y constitue pas la population dominante (Planas, 1975).

C'est un organisme unicellulaire, solitaire, non flagellée de forme ellipsoïdale (cellules jeunes ou autospores) ou quasiment sphérique (cellules mères). A l'état adulte, les différentes souches de *C. vulgaris* ont une taille variant de 2 à 10 μ m.

La reproduction des chlorelles n'est pas sexuée, elle se fait de façon végétative par autosporelation et libération de 2 à 16 autospores à partir d'une cellule mère. Mais, l'apparition de 2 à 4 autospores est la plus fréquente.

L'une des caractéristiques de cette algue est la résistance de sa paroi qui est une bicouche d'épaisseur variable (20 à 120 nm). La couche externe contient des lipides et la couche interne est essentiellement polysaccharidique (Sassen *et al.*, 1970).

I-1-3) *Scenedesmus subspicatus*

L'espèce que nous avons utilisé est *S. subspicatus* Chodat, 86-81 de l'institut de collection d'algues de l'Université de Göttingen (RFA).

C'est aussi une algue unicellulaire appartenant à l'ordre des Chlorococcales. La systématique est fondée principalement sur la forme des coenobes qui renferment 2, 4, 8, 16 (voire plus) cellules. Le nombre de cellules dépend des conditions de vie et n'a de valeur systématique que dans quelques rares cas (Bourrelly, 1966).

Le genre *Scenedesmus*, est caractérisé par des cellules de forme ellipsoïdale ou fusiforme qui sont groupées par 4 ou 8 en série linéaire pour former une colonie plate. La membrane est lisse ou verruqueuse, les pôles des cellules sont souvent ornés d'épines ou d'aiguillons plus ou moins longs. Les cellules marginales du coenobe ont, parfois, une ornementation en aiguillons ou en crêtes différentes des cellules médianes.

I-2) Utilisation en écotoxicologie

I-2-1) *S. capricornutum*

Cette algue a d'abord été introduite comme organisme modèle dans les bioessais d'étude de la fertilité des eaux (Skulberg, 1964) avant d'être utilisée dans les études de toxicité.

Le test algue utilisant *S. capricornutum* a d'abord été adopté, aux U.S.A., par le groupe de travail mixte gouvernement-industrie chargé des problèmes d'eutrophisation (EPA, 1971). Cette algue devint ensuite un organisme-modèle dans l'évaluation de la toxicité des substances pures, des milieux récepteurs et des effluents (Miller *et al.*, 1978). Elle a été choisie comme matériel biologique dans de nombreux pays.

Cette algue constitue actuellement un matériel biologique pour plusieurs normes ou lignes directrices :

- ligne directrice OCDE N° 201 (1984),
- directive européenne CEE (1988)
- norme ISO 8692 (1989),
- protocole EPA (1989).

I-2-2) C. vulgaris

Cette algue a fait l'objet de plusieurs recherches, tant sur le plan physiologique, biochimique que toxicologique. Son ubiquité, sa sensibilité, sa faible taille, son dénombrement facile à l'aide d'un compteur de particules et ses faibles exigences nutritionnelles, ont fait d'elle un outil biologique modèle dans les études de toxicité en milieu hydrique (Hassall, 1962 ; Butler *et al.*, 1980 ; Kramer *et al.*, 1983 ; Stratton, 1987).

Elle a été proposée comme organisme-test par la ligne directrice OCDE (1984). Par ailleurs, Férard (1986) a utilisé cette espèce comme modèle d'étude des différents aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez les microalgues.

I-2-3) S. subspicatus

Le test-algue utilisant *S. subspicatus* est normalisé par différentes normes et lignes directrices (AFNOR, 1980 ; ISO, 1989 ; OCDE, 1984) pour l'étude de la toxicité des molécules chimiques en milieu hydrique.

S. subspicatus a ainsi été utilisé comme un organisme-modèle pour l'étude des effets ultrastructuraux, à court et à long terme, de certains métaux tels que le cuivre (Bastien et Côté, 1989a,b). Pandard et Vasseur (1992) ont utilisé cette espèce comme biocatalyseur dans la réalisation d'un biocapteur pour le contrôle de la toxicité des eaux.

CHAPITRE II :

APPROCHES METHODOLOGIQUES

II-1) Entretien et culture des algues.

II-1-1) Les cultures mères.

Pour les trois chlorophycées, les cultures mères utilisées dans cette étude, sont cultivées stérilement par repiquage hebdomadaire en milieu liquide de Lefebvre Czarda modifié par ajout d'oligo-éléments, autrement dit oligo- L.C. (AFNOR T 90-304, 1980) dont la composition est présentée dans le tableau VII. L'inoculum représente toujours 10 % (v/v) du volume final.

Les cultures sont réalisées dans une chambre thermostatée à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Elles reçoivent un flux lumineux de 1530 lux au niveau de la plaque supportant les erlenmeyers. Cet éclairage est assuré par des tubes fluorescents GRO-LUX (Sylvania). La photopériode est de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité.

Les cultures sont agitées de façon continue à l'aide d'un agitateur orbital réglé à 150 oscillations par minute.

A chaque changement, une vérification de la contamination bactérienne et algale est réalisée sous microscope. L'étalement sur le milieu oligo L.-C. gélosé à 15 % (p/v) permet de vérifier l'absence de contaminations bactériennes, après incubation à l'obscurité et à 22°C pendant 24 heures.

II-1-2) Les précultures.

Au cours de notre étude, nous avons expérimenté les conditions de préculture de la norme AFNOR T 90-304 (1980) et celles de la norme ISO 8692 (1989).

Tableau VII : Composition des milieux synthétiques :
Oligo L.C. (AFNOR) et ISO (en Moles/litre).

	Milieu d'essai	
	AFNOR	ISO
Macroéléments		
CaCl ₂ .2H ₂ O		1,22.10 ⁻⁴
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,69.10 ⁻⁴	
KNO ₃	9,89.10 ⁻⁴	
NH ₄ Cl		2,97.10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄		1,18.10 ⁻⁵
K ₂ HPO ₄	2,3.10 ⁻⁴	
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,22.10 ⁻⁴	6,09.10 ⁻⁵
MgCl ₂ .6H ₂ O		5,9.10 ⁻⁵
NaHCO ₃		1,79.10 ⁻³
Microéléments		
HBO ₃	4,85.10 ⁻⁷	2,10.10 ⁻⁶
MnCl ₂ .4H ₂ O		2,19.10 ⁻⁶
Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,19.10 ⁻⁷	
CuCl ₂ .2H ₂ O		5,87.10 ⁻¹¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	6,01.10 ⁻⁸	
ZnCl ₂		2,2.10 ⁻⁸
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,04.10 ⁻⁷	
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,26.10 ⁻⁶	6,3.10 ⁻⁹
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,12.10 ⁻⁶	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,15.10 ⁻⁶	2,87.10 ⁻⁷
C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	2,42.10 ⁻⁶	
C ₆ H ₈ O ₂ H ₂ O	2,30.10 ⁻⁷	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	2,42.10 ⁻⁸	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		2,89.10 ⁻⁸
Na ₂ EDTA.2H ₂ O		2,69.10 ⁻⁷

La norme ISO 8692 (1989) prévoit que l'inoculum algal, lors d'un test de toxicité, doit provenir d'une préculture âgée de 3 jours (c'est-à-dire en phase exponentielle de croissance). L'inoculum doit être environ de 10^4 C/ml et provenir d'une culture âgée de 7 jours. La composition du milieu ISO figure dans le tableau VII.

L'incubation se fait dans les mêmes conditions que l'essai décrit plus loin, à savoir : une lumière continue de 1530 lux, une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une agitation continue pendant 72 heures.

Au contraire, la norme AFNOR T 90-304 (1980), préconise d'utiliser une préculture en phase exponentielle de croissance (5 à 8 jours) de façon à obtenir une concentration finale comprise entre $5 \cdot 10^6$ et 10^7 cellules/ml dans le milieu d'essai. Là aussi, les conditions sont les mêmes que l'essai : un éclairage de 1000 à 4000 lux, une température de $24 \pm 3^\circ\text{C}$ et une photopériode de 16 h d'éclairage pour 8 h d'obscurité. Dans notre cas particulier, nous avons travaillé sous une lumière de 1530 lux et à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

II-2) Méthodologie de cryopréservation

La figure 9 schématise la méthodologie utilisée lors de nos essais de cryopréservation. Elle intègre aussi bien les phases de préculture, de traitement cryoprotecteur, de congélation-décongélation que celles d'étude de la viabilité et de la réponse aux toxiques après décongélation.

II-2-1) La préculture.

Les conditions de préculture sont détaillées dans le paragraphe précédent.

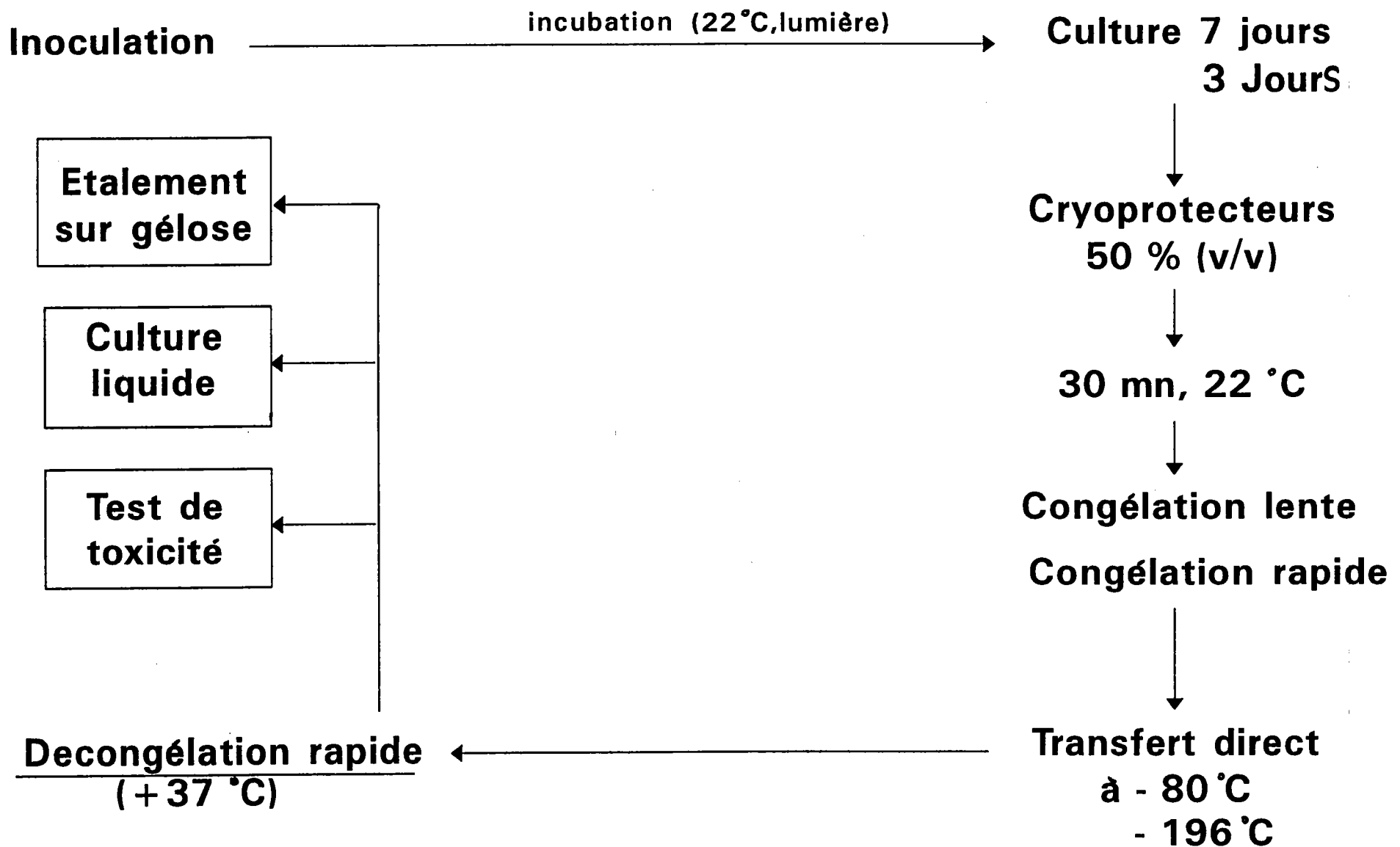


Figure 9 : Méthodologie de cryopréservation

II-2-2) Le traitement cryoprotecteur.

a) Préparation des solutions cryoprotectrices

Au cours de nos essais, nous avons utilisé trois produits qui se sont révélés potentiellement cryoprotecteurs vis-à-vis des algues (Morris, 1980) : le saccharose, la polyvinylpyrrolidone (PVP) et le méthanol.

Les solutions cryoprotectrices sont préparées dans de l'eau ultrapure MilliQ.

- Le saccharose (Merck, 7653) est préparé à 20 % (p/v),
- le méthanol (Descharmes) est préparé à 6 % (v/v),
- la polyvinylpyrrolidone 40.000 ou PVP 40 (Merck, 7443) est préparée dans du tampon HEPES 0.01 M, à 10 % (p/v); le pH de la solution de PVP est ensuite ajusté à 7 avec du KOH 1M (Morris, 1976a). Le pH des solutions de saccharose et de méthanol n'est pas ajusté.

Toutes les solutions cryoprotectrices sont filtrées, sous vide, à travers une membrane 0.22 μm dans des conditions stériles puis conservées à 4°C.

b) Préparation des échantillons à congeler

Après numération de la préculture, la suspension algale est distribuée dans des cryotubes Nunc (ref. 363452). Le même volume de solution cryoprotectrice (saccharose 20 %, PVP 10 % ou méthanol 6 %) est ensuite ajouté aux solutions algales.

Les algues sont laissées en présence des cryoprotecteurs pendant 30 minutes à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous lumière (Morris, 1980) avant de passer à la congélation.

II-2-3) La congélation.

Au cours de nos essais de congélation, nous avons expérimenté deux appareils : un bain d'éthylène glycol et un minicongélateur utilisant l'azote liquide.

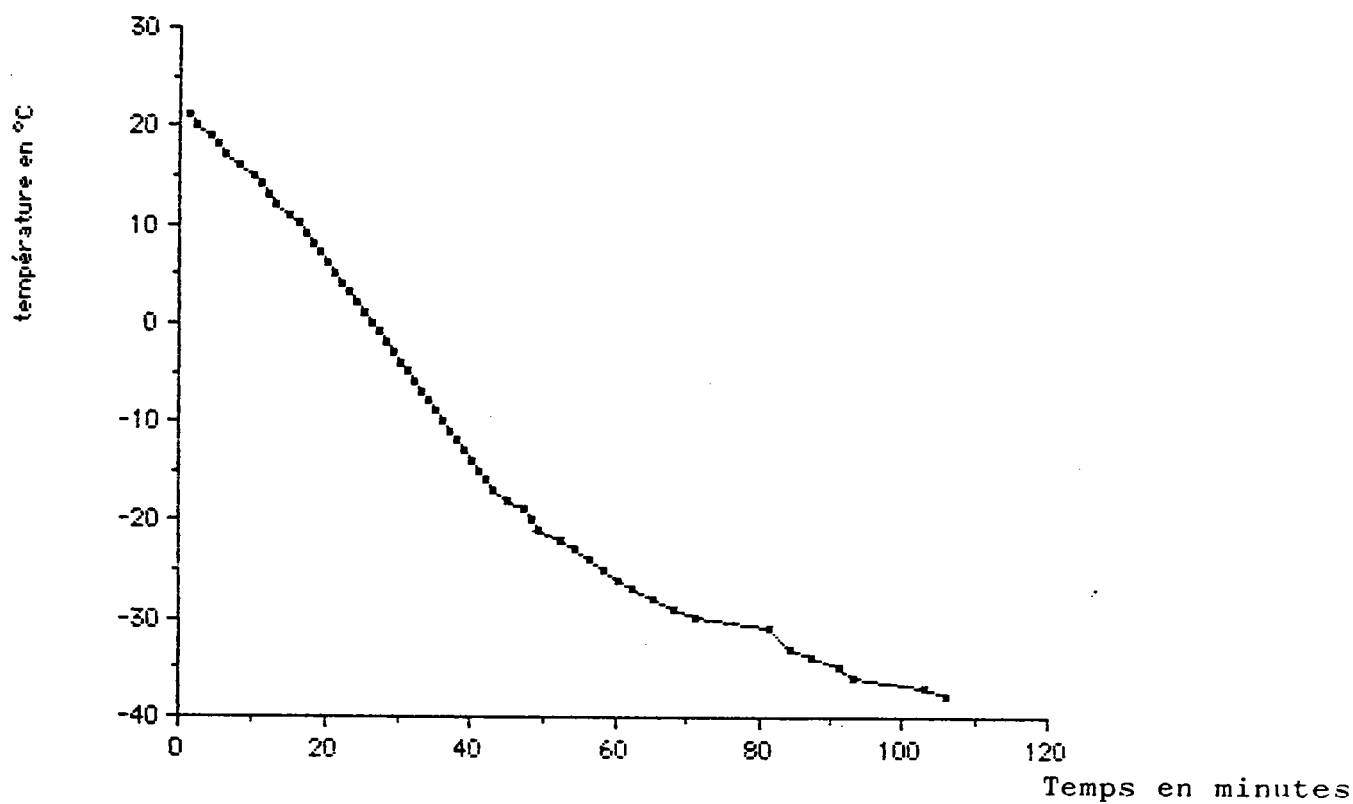


Figure 10 : Evolution de la température du bain de congélation

II-2-3-1) Congélation dans le bain d'éthylèneglycol

Dans un premier temps, nous avons utilisé le bain de congélation d'éthylèneglycol d'un lyophilisateur (Model HETO, type CD-52-1). Ce type d'appareil ne permet qu'un seul type de refroidissement à une vitesse moyenne de 2°C/min jusqu'à -30°C (figure 10). La vitesse de refroidissement n'est pas contrôlable et la congélation se fait (par immersion des échantillons à congeler dans le bain d'éthylèneglycol) de l'ambiance à -30°C.

II-2-3-2) Congélation dans la vapeur d'azote liquide

La congélation dans la vapeur d'azote liquide se fait à l'aide d'un minicongélateur Nicool, LM10 (figure 11).

Les cryotubes contenant les échantillons à congeler sont placés sur un portoir, au sein d'un cylindre en inox (C), au dessus d'un vase (A) contenant de l'azote liquide. La rotation d'une turbine, entraînée par un moteur (D), assure l'évaporation de l'azote liquide dans le cylindre contenant les échantillons.

Au début de chaque congélation, le vase (dewar) est rempli au maximum avec de l'azote liquide (1100 ml). La rotation du moteur est fixée sur la vitesse désirée à l'aide d'un variateur de vitesse.

Les vitesses de refroidissement obtenues avec le Nicool, sont proportionnelles aux vitesses de rotation de la turbine. La figure 12 donne l'évolution de la température, de l'ambiance gazeuse au niveau des cryotubes, en fonction du temps et pour les différentes positions du moteur de V1 à V10. Elles sont comprises entre 0.5 et 12°C/minute et dépendent beaucoup du volume d'échantillons à congeler et du type de cryotubes utilisés.

Nous avons suivi la température de l'ambiance gazeuse au niveau des cryotubes à l'aide d'une sonde PT 100 reliée à un thermomètre à affichage digital Electrotherm (un orifice est prévu dans le couvercle et dans le cylindre pour ce faire).

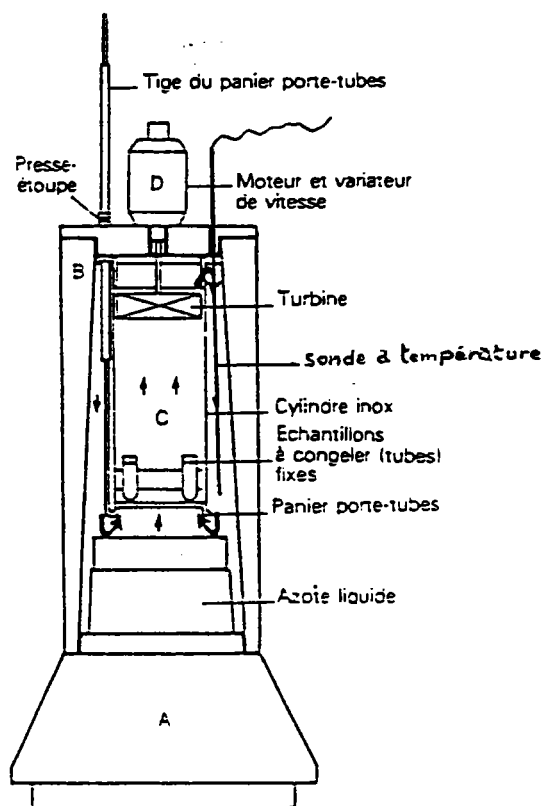


Figure 11 : Mini congélateur Nicool utilisé pour la congélation dans la vapeur d'azote liquide.

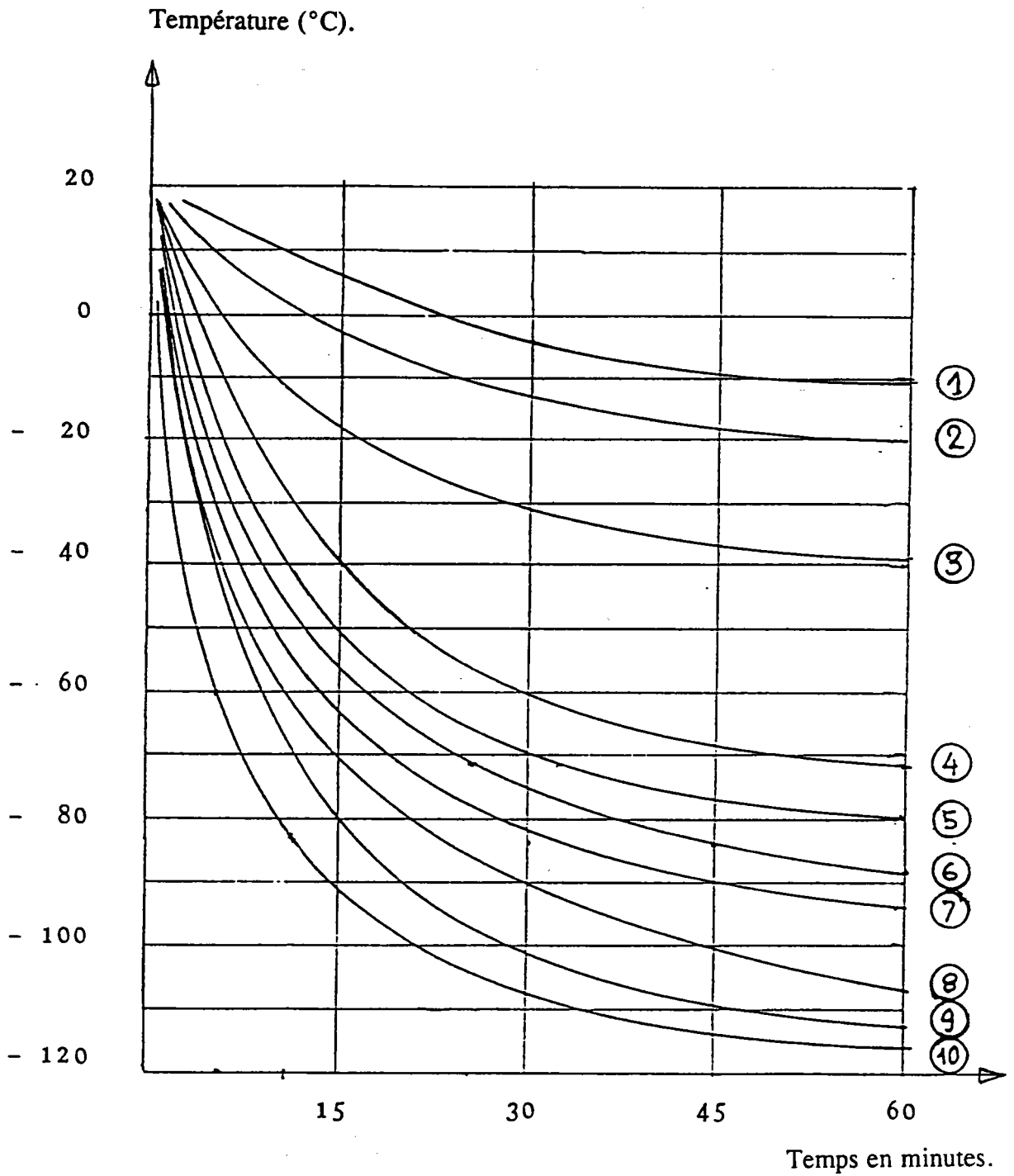


Figure 12 : Evolution de la température de l'ambiance gazeuse, au niveau des cryotubes en fonction de la vitesse de rotation du moteur de V_1 à V_{10} .

II-2-4) Le stockage

Les échantillons congelés et destinés au stockage sont directement transférés dans un congélateur à -80°C (RUA CRYOSYSTEM). La température minimale de conservation ne descend pas en dessous de -65°C (puisque l'alarme de sécurité est fixée à cette température). A cette température, une arrivée de CO_2 liquide est déclenchée pour rétablir la température de conservation fixée au départ (-80°C).

II-2-5) La décongélation

Elle est faite d'une façon rapide, par immersion des échantillons à décongeler, dans un bain-marie fixé à la température de $+37^{\circ}\text{C}$ (Morris, 1976a). La décongélation est terminée quand toute trace de glace a disparu (elle dure au maximum 5 minutes).

II-3) Les techniques d'estimation de la viabilité

II-3-1) La croissance en milieu liquide

L'évaluation de la croissance en milieu liquide se fait par numération cellulaire à l'aide d'un compteur de particules : le Coulter compteur (modèle ZM). Cet appareil est utilisé pour le comptage de diverses espèces algales et il est recommandé par la norme ISO 8692 (1989).

Les réglages effectués sont les suivants :

- Le diamètre de l'orifice de la sonde utilisée est de $70\ \mu\text{m}$ pour A (atténuateur) = 2 et I (courant d'entrée) = 100.

- Le volume du manomètre (volume de liquide aspiré) est de $0.5\ \text{ml}$

- Le seuil du diamètre des particules comptées est fixé à $2.80\ \mu\text{m}$ pour *Selenastrum* et *Scenedesmus* qui sont d'une plus grande taille que *Chlorella* pour laquelle ce seuil est fixé à $2.26\ \mu\text{m}$.

La dilution de l'échantillon à compter est faite dans un électrolyte standard et dépoussiéré, préconisé par Coultronics : l'ISOTON II.

Il sert aussi de "blanc" avant chaque comptage.

Selon le type de test réalisé, la procédure de comptage est différente :

- en erlenmeyers, la dilution utilisée est, en général, de 1/100, soit une prise d'essai de 200 µl de culture algale dans 20 ml d'isoton II.

- En microplaque, la totalité du volume du puits à compter est prélevée. Préalablement, les algues sont remises en suspension par des mouvements d'aspirations-refoulements successifs à l'aide d'une micropipette automatique. Le contenu du puits est déposé dans un gobelet de comptage contenant 20 ml d'électrolyte.

Compte-tenu des travaux de Radetsky (1992), l'évaporation peut être négligée. Sachant que le volume introduit dans un puits, la dilution effectuée est d'environ 1/91.

Le calcul théorique de la numération effective (Y) prend en compte la dilution effectuée (d), la valeur du "blanc" (b) et le chiffre lu au compteur coulter (x) : $Y = (x * d) - b$. Pour avoir un nombre de cellules par millilitre, il faut ensuite multiplier Y par 2 puisque le volume de comptage est de 0.5 ml (manomètre réglé sur 500 µl).

Deux comptages successifs sont réalisés pour chaque échantillon compté.

II-3-2) La croissance sur milieu solide

Le milieu L.C. est gélosé à 1.5 % (gélose nutritive, Biomérieux, 51391). Il est coulé stérilement dans des boîtes de Pétri.

Après numération (microscope, cellule de MALASSEZ) des échantillons témoins ou congelés, des dilutions logarithmiques sont préparées et 100 µl de chaque culture diluée sont étalés stérilement par boîte de Pétri. Trois répétitions sont réalisées pour chaque dilution d'échantillon étalé.

Les boîtes de Pétri sont incubées à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sous une lumière de 1500 lux et le nombre de colonies développées est déterminé au bout de 14 jours d'incubation.

Le pourcentage de pousse sur milieu solide des échantillons témoins ou congelés est déterminé par rapport au nombre de cellules comptées au départ en tenant compte de la dilution effectuée et en considérant qu'une colonie provient d'une cellule :

$$\% \text{ Pousse} = \frac{\text{Nombre de cellules étalées au départ}}{\text{Nombre de colonies comptées après 14 Jours}} \times 100$$

Le pourcentage de pousse pour les échantillons témoins (sans congélation), déterminé sur la base des numérations au microscope, est toujours supérieure à 70 %.

Les pourcentages de pousse permettent de calculer des pourcentages de viabilité après traitement de congélation.

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\% \text{ de pousse avant congélation (témoin)}}{\% \text{ de pousse après congélation (traité)}} \times 100$$

II-4) L'exposition aux toxiques

II-4-1) Les solutions toxiques

Les produits utilisés ont été les suivants :

- le chlorure de cadmium, CdCl_2 (pur 99 %, Merck 802014),
- le sulfate de cuivre pentahydraté, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Extrapur, Merck 2790),
- le dichromate de potassium $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Extrapure, Merck 4864)
- l'atrazine (98.4 %, Riedel-deHaën, 35974)

Les solutions mères de métal sont préparées à 0.1 g/l ou 1 g/l (selon les essais) dans de l'eau MilliQ ultrapure.

Pour l'atrazine, nous avons utilisé l'acétone comme tiers solvant pour préparer une solution mère à 50 mg/l. La concentration finale d'acétone dans le milieu d'essai est au maximum de 0.01 % (v/v). A cette concentration ADAMS *et al.* (1986) n'avaient pas observé d'effet toxique pour les algues. Malgré cela, des "témoins acétone" (à 0.01 % d'acétone v/v par puits) sont préparés pour déterminer tout effet toxique propre au tiers-solvant utilisé.

Toutes les solutions toxiques sont conservées à 4°C.

II-4-2) Les systèmes d'essai

Au cours de nos essais, nous avons utilisé deux types de microplaque. La technique utilisant les microplaques est actuellement suffisamment standardisée et largement utilisée en Amérique du Nord et en Scandinavie (Kemi, 1989 ; Env. Can., 1992). Blaise (1986) a montré que la technique en microplaque pouvait remplacer la technique classique en erlenmeyers. Cette technique miniaturisée permet un plus grand nombre de réplicats par concentration testée et offre des possibilités d'automatisation.

Il existe plusieurs sortes de microplaques sur le marché. Elles se distinguent par la composition et la qualité du plastique (Polyvinyl, Polystyrène, ...), la forme des puits (fond plat, fond rond en "V" ou en "U"), etc... . Dans nos essais, nous avons utilisé deux types de microplaques à 96 puits :

- microplaque à fond plat (Greiner, 655101) que nous appellerons "microplaque classique",
- microplaque multiscreen (Millipore, MADV N 6550)

II-4-2-1) La microplaque classique

La figure 13 schématise la technique utilisée pour les tests en microplaque. A partir d'une solution mère de toxique sont préparées des dilutions appropriées en série. 110 µl de chaque dilution toxique sont pipetés et transférés dans les puits appropriés de la microplaque. Pour les puits témoins (sans toxique), 110 µl d'eau milliQ ultrapure stérile sont utilisés à la place de la solution toxique.

Après numération sous microscope (cellule de Malassez), un inoculum algal à 4.10^4 cellules/ml est préparé dans du milieu ISO concentré deux fois, 110 µl de cette solution sont ajoutés à par puits.

Seuls les 60 puits intérieurs de la microplaque sont utilisés (Caux, 1991), les puits périphériques sont remplis de 220 µl d'eau milliQ stérile.

Les puits de la colonne 1 servent de témoins verticaux, ceux de la ligne D servent de témoins horizontaux. La répartition des concentrations en toxique se fait de façon croissante de la colonne 2 à la colonne 11 de la microplaque. Cinq répétitions sont ainsi réalisées pour chaque concentration en toxique testée.

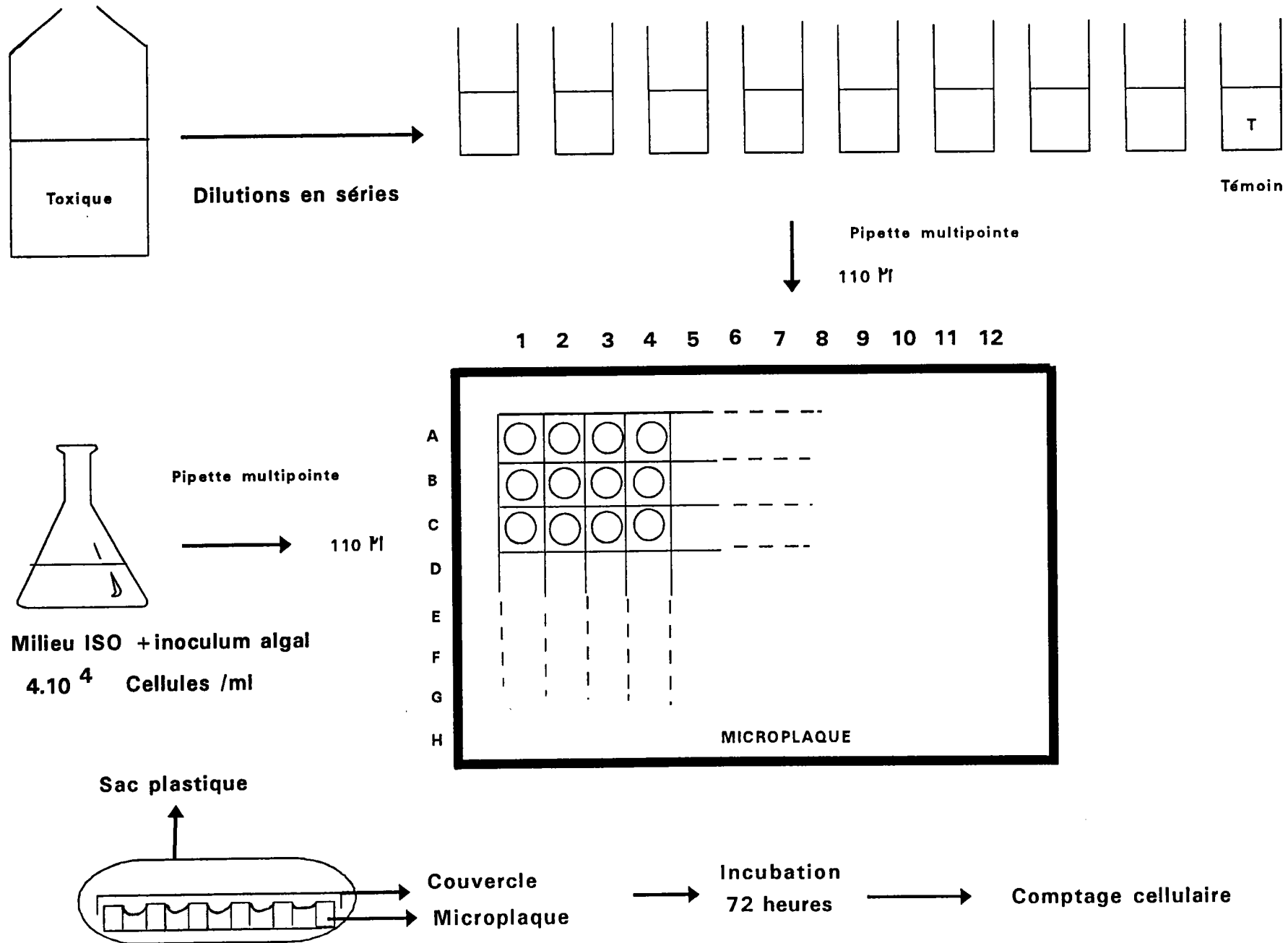


Figure 13 : Technique du test-algues en microplaque (d'après Blaise, 1985)

La microplaque avec son couvercle est introduite dans un sac plastique transparent dont l'ouverture est scellée à la chaleur pour empêcher l'évaporation (Blaise, 1984). La durée du test est de 72 heures et l'incubation se fait dans les conditions de la norme ISO 8692 (1989).

II-4-2-1) La microplaque "Multiscreen".

Cette microplaque associe une microplaque standard de 96 puits à des membranes de microfiltration (figure 14). La membrane microporeuse est soudée au fond de chaque puits. Les caractéristiques de cette membrane de filtration sont les suivantes :

- membrane durapore hydrophile sans surfactant,
- diamètre des pores égale à 0,65 μm ,
- faible adsorption des biomolécules.

La filtration se fait à l'aide d'un système de vide (figure 14) conçu spécialement pour épouser la forme de la microplaque.

L'avantage que présente la microplaque multiscreen, par rapport à la microplaque classique, réside dans le fait qu'elle va permettre de faire un renouvellement périodique du milieu, ce qui offre la possibilité de réaliser un test semi-statique. Pour éviter des pertes de liquide entre chaque renouvellement, elle est équipée à sa base d'un film autocollant (Falcon 3073) .

Un test de toxicité se déroule de la même façon que pour une microplaque classique. Le renouvellement du milieu est réalisé toutes les 24 heures : le film autocollant est éliminé ; l'ancien milieu est éliminé par filtration (à l'aide du système de vide déjà mentionné). Les algues déposées sur le filtre, sont remises en suspension avec 110 μl de milieu ISO concentré 2 fois. 110 μl d'eau milliQ ultrapure pour les témoins ou de substance-test pour les essais sont ensuite ajoutés pour obtenir le volume final de 220 μl .

Les conditions de fermeture (couvercle et sac plastique) et d'incubation sont les mêmes que pour la microplaque classique.

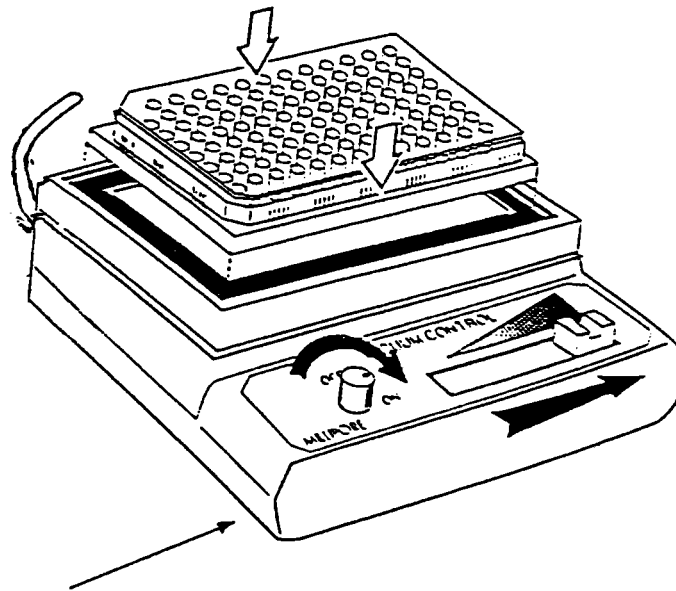
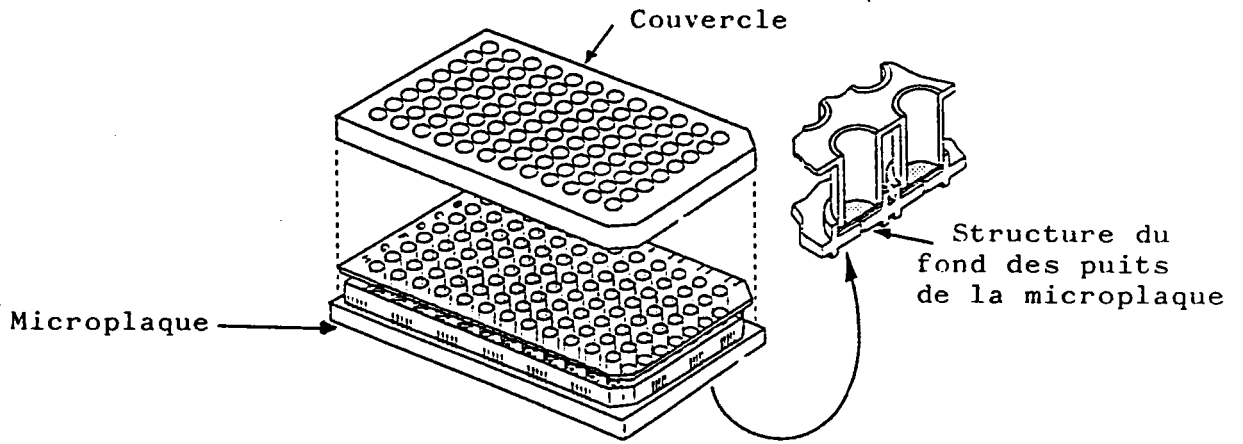


Figure 14 : Schéma de la microplaque Multiscreen et du système de filtration sous vide.

II-5) Le calcul des pourcentages d'inhibition

Deux méthodes de calcul sont utilisées :

a) une méthode simple du calcul du pourcentage d'inhibition de croissance après un temps donné de culture (t). Le calcul utilise les numérations du témoin (N_t) et de l'essai (N_e). le pourcentage d'inhibition est alors le suivant :

$$I \% = \frac{N_t - N_e}{N_t} \times 100$$

b) la méthode de l'aire sous la courbe de croissance est préconisée par la norme ISO 8692 (1989). Le calcul de l'aire sous la courbe se fait différemment selon qu'on a travaillé avec des erlenmeyers ou des microplaques :

- pour différents temps (72, 96 ou 192 H) dans le cas des erlenmeyers.

- à un seul temps (72 H) dans le cas des microplaques puisque dans ce cas, le volume total du puits est utilisé pour un seul comptage.

Le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque concentration selon la formule suivante :

$$I \% = \frac{\text{Aire témoin} - \text{Aire essai}}{\text{Aire témoin}} \times 100$$

Seuls les pourcentages d'inhibition compris entre 16 et 84 % (Environnement Canada, 1992) sont pris en compte lors de l'application d'une régression log-linéaire classique à l'aide du programme GLMTOX (Maul, 1992) qui détermine en même temps une CI_{50} avec un intervalle de confiance.

II-6) Méthodes statistiques utilisées

Le test de STUDENT-FISHER a été utilisé pour la comparaison de deux moyennes au seuil de 5 %.

La comparaison de plus de deux traitements a été réalisée par une analyse de variance suivie ou non d'un test de TUKEY, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett.

Pour comparer deux CI_{50} , nous avons utilisé la formule mathématique proposée dans la norme EPA (1985) :

$$G = \sqrt{\left(\frac{\log_{10} * LS_1}{CI_{50}(1)}\right)^2 + \left(\frac{\log_{10} * LS_2}{CI_{50}(2)}\right)^2}$$

où LS_1 et LS_2 sont respectivement les limites supérieures de l'intervalle de confiance des $CI_{50}(1)$ et $CI_{50}(2)$.

Après avoir calculé G , il s'agit de comparer H et Z sachant que :

$$H = 10^G$$

$$Z = \frac{\text{valeur de la } CI_{50} \text{ supérieure}}{\text{valeur de la } CI_{50} \text{ inférieure}}$$

Si la valeur de Z est plus grande que H , la différence entre les valeurs des deux CI_{50} est significative. Si $Z < H$, les CI_{50} ne sont pas significativement différentes.

La mise en évidence d'interactions a été réalisée selon plan factoriel complet. Les résultats sont traités par une analyse de régression multiple et la réponse des algues ($Y =$ viabilité) est modélisée par une équation polynomiale de la forme suivante :

$$\hat{Y} = b_0 + b_i X_i + b_j X_j + b_{ij} X_i X_j + \dots$$

b_0 étant un terme constant

b_i , b_j , et b_{ij} sont les coefficients d'effets attribués à X_i , X_j et X_{ij} (négatifs si le produit tend à diminuer b_0 , positifs si le produit tend à accroître b_0).

X_i et X_j expriment les facteurs étudiés.

X_{ij} est le terme exprimant l'interaction

Si une interaction existe entre X_i et X_j , elle est introduite dans la somme algébrique sous la forme d'un terme contenant à la fois X_i et X_j .

L'effet global de X_i est dépendant de la présence de X_j , et inversement.

Notre modèle de réponse est basé sur :

- a) l'aire calculée sous la courbe de croissance après 96 heures d'incubation en milieu liquide.
- b) Le nombre de colonies formées après 14 jours d'incubation sur milieu solide.

Le calcul étant basé sur une régression linéaire multiple, les variables sont codées sous forme de polynômes orthogonaux. De cette façon la somme des carrés des écarts peut-être fractionnée en contributions liées à chacun des facteurs et aux interactions (cf. annexe 1).

Les contributions sont rangées par ordre décroissant et soumises à une analyse de variance pour tester leur significativité.

A partir des termes significatifs une équation permet d'interpréter les résultats et d'affirmer l'effet significatif d'un facteur ou l'existence d'une interaction significative entre deux facteurs.

3ème PARTIE :

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

CHAPITRE I

<p>ETUDE PRELIMINAIRE DES EFFETS DES TRAITEMENTS DE CONGELATION ET DE CRYOPROTECTION CHEZ <i>Selenastrum capricornutum</i> ET <i>SCENEDESMUS SUBSPICATUS</i>.</p>
--

I-1) Introduction.

Pour développer une technique de cryopréservation des microalgues utilisées en écotoxicologie, nous nous sommes attachés dans un premier temps à l'étude des effets de deux variables contrôlées : le mode de congélation et le traitement cryoprotecteur. Ces effets ont été évalués par une étude de la viabilité avec et sans congélation des cellules algales. En cela, cette étude préliminaire reprend les critères classiquement utilisés dans la littérature. L'estimation de la viabilité après congélation représente le critère de base dans la mise au point d'une méthode de cryopréservation.

Nous avons choisi de tester, dans cette expérience, le pouvoir de multiplication des algues en milieu liquide. La croissance représente, en effet, la résultante de toute une série de phénomènes physiologiques susceptibles d'être mesurés par ailleurs (mesures d'activités enzymatiques par exemple ou d'activités de transport électronique au niveau des chaînes respiratoires et photosynthétiques,...). En outre, les tests de toxicité chronique sur microalgues utilisent comme critère de toxicité cette capacité des cellules à se multiplier.

I-2) Protocole expérimental.

Les expériences ont été conduites pour évaluer les effets cryoprotecteurs potentiels de 3 composés (le saccharose, la polyvinylpyrrolidone et le méthanol). Leurs propriétés ont été étudiées aux vitesses de congélation lente (réduction de la concentration en sels) et rapide (inhibition de la formation de glace intracellulaire).

Cette expérimentation a été réalisée sur deux espèces algales : *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus*. La préculture âgée de 7 jours, après une inoculation à 10 % (v/v) à partir de cultures mères âgées de 7 jours, a été préparée selon les conditions de la norme AFNOR (1980).

Trois cryoprotecteurs différents ont été testés :

- Saccharose à 10 % (poids / volume),
- Polyvinylpyrrolidone (= P.V.P.) à 5 % (p/v),
- Méthanol à 3 % (v/v).

Les solutions cryoprotectrices sont préparées selon la procédure décrite dans la deuxième partie (chap. II-2-2). Les échantillons à congeler sont préparés par simple ajout de 1 ml de solution cryoprotectrice à 1 ml de suspension algale dans des cryotubes Nunc de 4,5 ml.

Trois modes de congélation ont été choisis, appelés respectivement C₁, C₂ et C₃ :

C1 { Vitesse de congélation lente (2°C/ min)
Arrêt à - 30°C
Pas de stockage

C2 { Vitesse de congélation lente (2°C/ min)
Arrêt à - 30°C
Stockage à - 80°C pendant 22 jours

C3 { Vitesse de congélation rapide
(par transfert direct à - 80°C)
Arrêt à - 80°C
Stockage à - 80°C pendant 35 jours.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque cryoprotecteur testé, pour chaque traitement de congélation et pour chaque espèce algale utilisée.

Pour les deux premiers modes de congélation lente jusqu'à -30°C , nous avons utilisé un bain de congélation d'éthylène glycol selon la procédure décrite dans la deuxième partie, chap. II-2-3-1 : les algues du traitement C_1 (-30°C) ont été immédiatement décongelées (2^{ème} partie, chap. II-2-5), celles du traitement C_2 sont directement transférées à -80°C dans un congélateur (RUA CRYOSYSTEM) et stockées pendant 22 jours à cette température.

Les algues du traitement C_3 ont, quant à elles, subi une congélation rapide (la vitesse de congélation n'a pas pu être mesurée pour des raisons techniques) par transfert direct à -80°C (congélateur) et conservées pendant 35 jours.

Des algues témoins (sans congélation et sans cryoprotecteur) sont préparées de la façon suivante : à 1 ml de suspension algale est ajouté 1 ml d'eau distillée stérile. Ces échantillons témoins sont conservés à l'obscurité à 22°C pendant la durée des cycles de congélation-décongélation (soit 3 heures).

La remise en culture des algues témoins ou congelées se fait par inoculation d'erlenmeyers contenant 45 ml de milieu oligo L.C. de façon à avoir environ 10^5 C/ml au début de l'essai. Trois erlenmeyers correspondant aux 3 répétitions déjà évoquées, sont effectués pour chaque traitement et chaque espèce. Les échantillons sont ensuite incubés à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sous une lumière continue de 1530 lux et une agitation de 150 rpm. La croissance des algues fraîches (non congelées) et décongelées est suivie par numération cellulaire (Coulter Compteur).

La durée de stockage différente entre C_2 et C_3 s'explique par le nombre limité de places disponibles sur la table d'agitation des erlenmeyers.

I-3) Résultats.

Les figures 15a, 15b, 15c et 16a, 16b, 16c permettent d'observer respectivement la croissance de *S. capricornutum* (.) et de *S. subspicatus* (.) congelées selon les différents traitements -30°C (a), $-30^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$ (b), -80°C (c) et pour chaque cryoprotecteur testé.

Nous avons choisi d'exprimer les résultats de croissance sous forme de pourcentages d'inhibition calculés au jour 8 de croissance pour *S. capricornutum* par rapport au témoin non congelé et au jour 6 pour *S. subspicatus*. Ceci est dû au fait que, pour cette dernière, à partir du jour 6 il y a une diminution de la pente de la courbe de croissance, indiquant donc la fin de la phase exponentielle de croissance. Concurrément les différents essais congelés, qui eux se caractérisent par une croissance plus faible au départ (phase de latence plus longue), voient leurs pentes continuer à augmenter. Les écarts calculés au 6^{ème} jour sont donc plus représentatifs des effets des traitements.

I-3-1) Résultats obtenus avec *S. capricornutum*

Il apparaît nettement que la réponse de *S. capricornutum* est différente selon les modes de congélation et les traitements cryoprotecteurs subis. Le tableau VIII présente les pourcentages d'inhibition calculés au jour 8 en fonction des traitement cryoprotecteurs et des modes de congélation suivis.

Tableau VIII : Pourcentages d'inhibition de croissance de *S. capricornutum* (calculés au jour J₈ par rapport au témoin non congelé) en fonction du traitement cryoprotecteur et du mode de congélation suivis.

Des lettres majuscules différentes signifient qu'il y a une différence significative entre les traitements pour un même cryoprotecteur (test de Tukey p=5 % réalisé sur les lignes). Des lettres minuscules différentes signifient qu'il y a une différence significative entre les cryoprotecteurs pour un même traitement (test de Tukey p=5 % réalisé sur les colonnes).

	Sacch.10 %	PVP. 5 %	Méthanol 3%
Traitement C ₁ (-30°C)	73 A a	27 B b	18 D b
Traitement C ₂ (-30/-80)	77 A c	23 B d	99 E e
Traitement C ₃ (-80°C)	61 A f	40 C g	99 E h

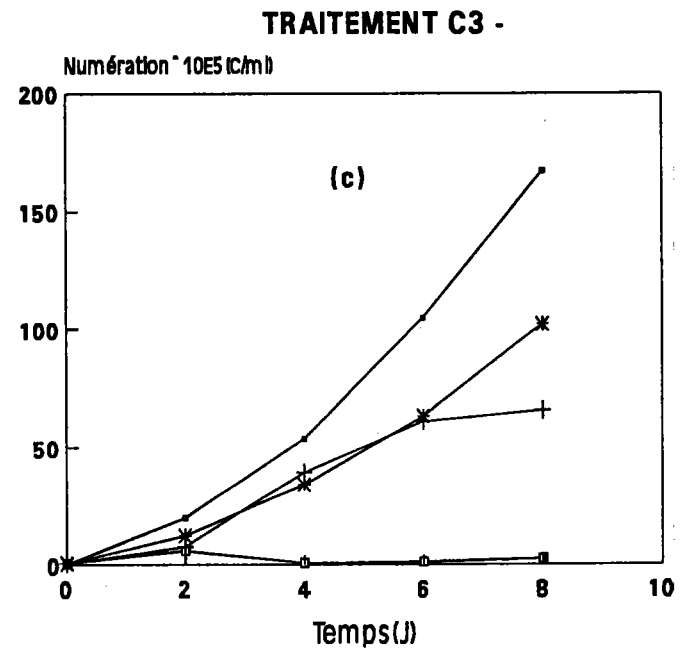
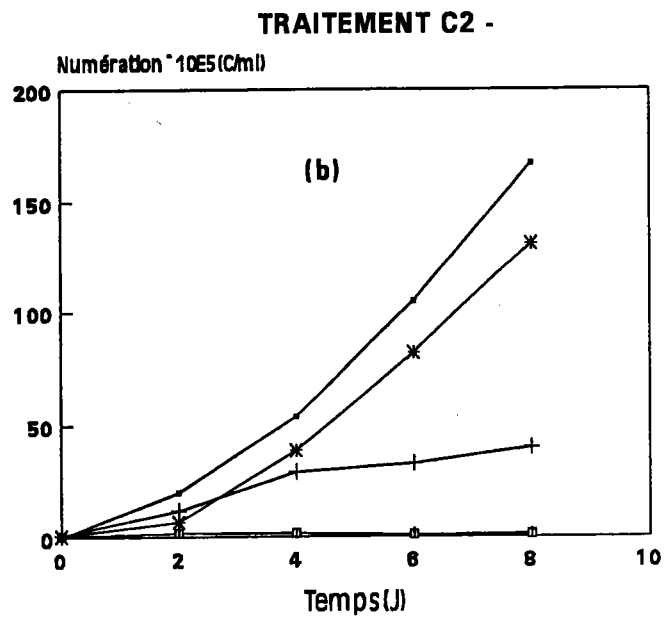
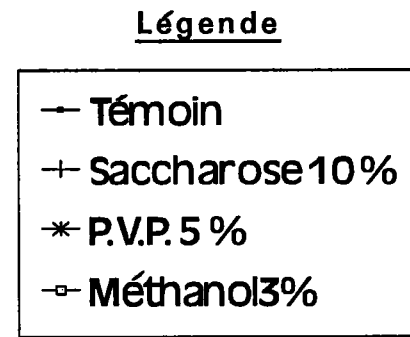
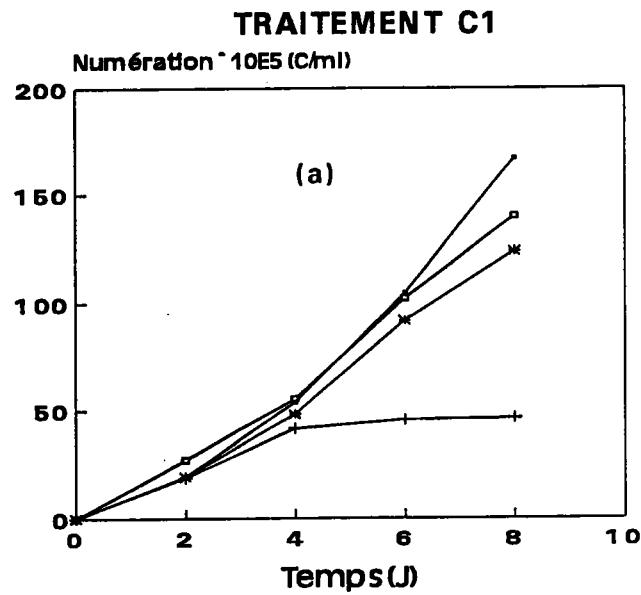


Figure 15 : Effets des traitements de congélation et de cryoprotection sur la viabilité de *S. capricornutum*.

I-3-1-1) Effet du mode de congélation.

(lettres majuscules du tableau VIII)

Pour le saccharose 10 %, les trois modes de congélation (C_1 , C_2 et C_3) ne montrent pas de différence significative à $p = 5 \%$ (test de Tukey). Les pourcentages d'inhibition sont assez importants, puisqu'ils dépassent les 60 % quel que soit le mode de congélation adopté.

En présence de PVP (5 %), il n'existe pas de différence significative (test de Tukey $p = 5 \%$) entre les modes C_1 et C_2 qui se caractérisent par des pourcentages d'inhibition faibles (27 et 23 % respectivement).

Le mode de congélation C_3 se montre significativement plus dommageable (40 % d'inhibition) que les modes C_1 et C_2 .

En principe, le plan expérimental utilisé ne permet pas de faire la différence entre les effets des deux variables "stockage" et "température finale". Cependant l'absence de différence significative entre les modes C_1 et C_2 permet d'avancer deux hypothèses, compte-tenu que le mode C_1 constitue une étape du mode C_2 qui comporte en plus le passage de -30 à -80°C et un stockage pendant 22 jours.

- première hypothèse : les deux variables stockage et température finale jouent en sens contraire. Par exemple, le stockage aurait un effet négatif compensé par un effet positif dû au passage de -30 à -80°C , ou inversement. Cette hypothèse semble devoir être écartée puisqu'il nous paraît évident que ni l'une ni l'autre de ces deux variables ne peut avoir un effet positif.

- deuxième hypothèse : la durée de stockage entre 0 et 22 jours et le passage de -30°C (C_1) à -80°C (C_2) n'ont pas d'effets sur la viabilité de *S. capricornutum*.

Cette dernière hypothèse, seule vraisemblable, permet alors d'avancer deux autres hypothèses concernant le mode de congélation C_3 .

- soit la durée de stockage entre 22 et 35 jours a un effet sur la viabilité de *S. capricornutum*, et il n'est pas possible de faire la différence entre les effets des passages de -30°C à -80°C (C_2) ou de l'ambiance à -80°C (C_3) d'une part et ceux de la durée de stockage d'autre part.

- soit la durée de stockage entre 22 et 35 jours n'a pas plus d'effets que le durée de stockage entre 0 et 22 jours, et dans ce cas, c'est le transfert direct de l'ambiance à -80°C qui serait alors responsable du plus fort pourcentage d'inhibition observé.

Cette dernière hypothèse nous semble devoir être privilégiée car il est peu vraisemblable que la viabilité puisse chuter brusquement entre 22 et 35 jours.

En ce qui concerne les algues congelées en présence de méthanol (3 %), le mode C_1 de congélation s'est avéré le moins dommageable par rapport aux modes de congélation C_2 et C_3 . En effet, jusqu'au jour 6 (fig 15a), l'algue congelée en présence de méthanol selon le mode C_1 présente la même cinétique de croissance que le témoin non congelé. Par contre, les pourcentages d'inhibition de croissance sont supérieurs à 90 % après un passage progressif (C_2) ou direct (C_3) à -80°C .

Dans ces conditions, le méthanol n'a aucun effet cryoprotecteur pour *S. capricornutum* puisque les échantillons conservés en présence de méthanol se caractérisent par une croissance quasi-nulle après 22 ou 35 jours à -80°C

I-3-1-2) Effet cryoprotecteur.

(lettres minuscules du tableau VIII)

Au cours de la congélation lente C_1 le méthanol à 3 % donne le meilleur résultat (18 % d'inhibition seulement) mais non significativement différent de la PVP 5 %. Le saccharose 10 % fournit les moins bons résultats.

Pour le traitement C_2 , c'est indiscutablement la PVP (5 %) qui permet la meilleure protection de l'algue. Le pourcentage d'inhibition (23 % d'inhibition) est significativement différent des deux autres

Pour le traitement C_3 , c'est encore la PVP 5 % qui apparaît comme le meilleur cryoprotecteur mais avec un pourcentage d'inhibition plus élevé par rapport à C_2 (40 % par rapport à 23 %).

En définitive, pour *S. capricornutum*, la meilleure méthodologie de cryopréservation permettant un stockage des échantillons, certes limité dans le temps (35 jours) serait la suivante dans nos conditions d'expérimentation : un traitement cryoprotecteur avec de la PVP à 5 % (p/v) et une congélation en deux étapes, lente ($\sim 2^\circ\text{C}/\text{min}$) jusqu'à -30°C suivie d'un transfert direct à -80°C .

I-3-2) Résultats obtenus avec *S. subspicatus*

Les figures 16b et 16c, permettent de voir que la croissance de *S. subspicatus* est presque nulle après 4 jours d'incubation et ceci quels que soient les traitements de cryoprotection et de congélation adoptés. Au-delà de 4 jours, le mode de congélation C₁ (figure 16a, sans stockage) en présence de saccharose ou de méthanol est le moins dommageable. Le tableau IX présente les pourcentages d'inhibition calculés au jour 6 de croissance en fonction du traitement cryoprotecteur et du mode de congélation suivis.

Il apparaît nettement que les pourcentages d'inhibition obtenus avec le mode de congélation C₁ (-30°C , sans stockage) sont significativement inférieurs (test de Tukey, $p=5\%$) à ceux induits par les congélations C₂ et C₃ et ceci quel que soit le traitement cryoprotecteur. Le meilleur résultat est obtenu ici avec le saccharose et le méthanol avec respectivement 49 % et 52 % d'inhibition par rapport au témoin non congelé (la différence entre ces deux traitements n'étant pas significative).

Pour les modes C₂ et C₃, les pourcentages d'inhibition obtenus sont tous supérieurs à 88 % et aucun des additifs testés ne permet une bonne cryoprotection de *S. subspicatus*.

Tableau IX : Pourcentages d'inhibition de croissance de *S. subspicatus* (calculés à J6 par rapport au témoin non congelé) en fonction du traitement cryoprotecteur et du mode de congélation suivi.

Des lettres majuscules différentes signifient qu'il y a une différence significative entre les traitements pour un même cryoprotecteur (test de Tukey réalisé sur les lignes). Des lettres minuscules différentes signifient qu'il y a une différence significative entre les cryoprotecteurs pour un même traitement (test de Tukey réalisé sur les colonnes).

	Sacch.10 %	PVP 5 %	Méthanol 3%
Traitement C ₁ (-30°C)	49 A a	89 D b	52 F a
Traitement C ₂ (-30/-80)	91 B c	98 E c	99 G c
Traitement C ₃ (-80°C)	88 C d	99 E e	100 G e

I-4) Discussion.

Les résultats de cette étude préliminaire ont permis de voir l'effet de trois modes de congélation sur la croissance de *S. capricornutum* et de *S. subspicatus* et d'étudier l'action cryoprotectrice de trois types d'additifs : le méthanol qui est un composé pénétrant, le saccharose qui est un sucre semi-pénétrant et la PVP qui est un polymère non pénétrant (cf. classification de Tao et Li, 1986).

Tout d'abord l'influence des modalités des variables contrôlées étudiées (mode de congélation et traitement cryoprotecteur), est réellement importante puisque, par exemple, dans le cas de *S. capricornutum* les pourcentages d'inhibition varient de 18 à 99 % (cf. tableau VIII).

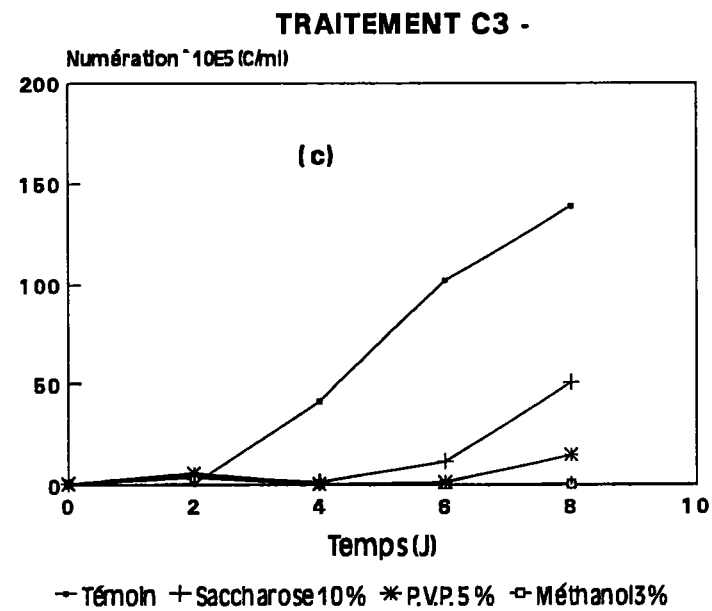
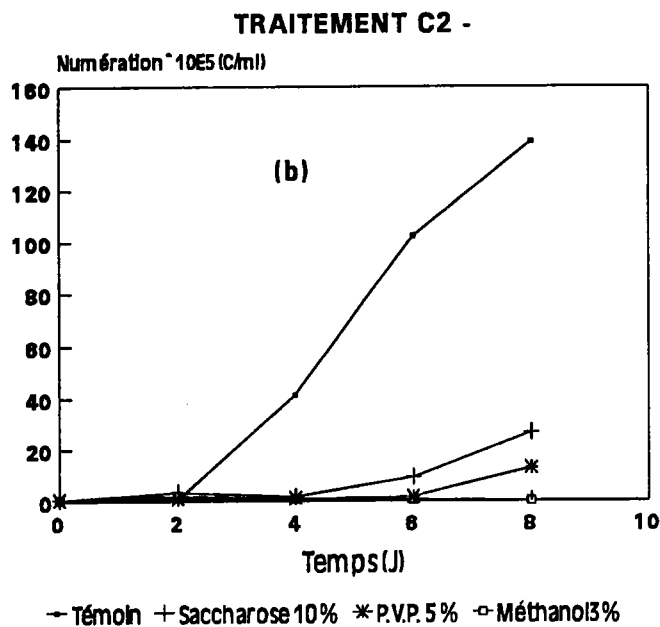
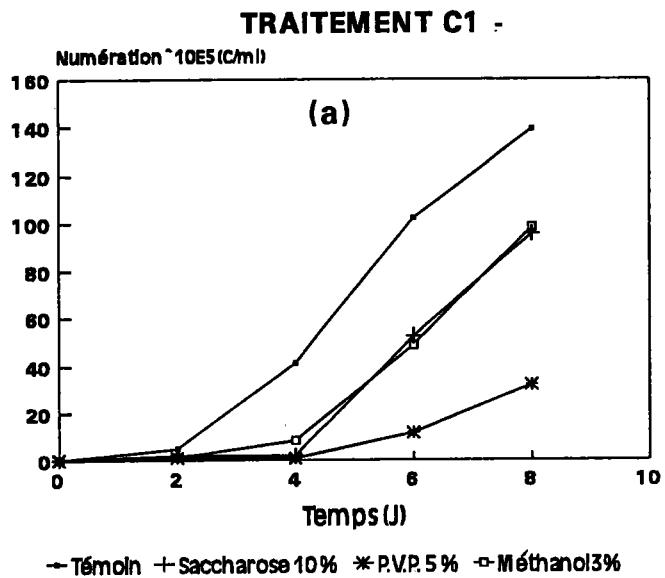


Figure 16 : Effets des traitements de congélation et de cryoprotection sur la viabilité de *S. subspicatus*

En second lieu, la viabilité de *S. capricornutum* est généralement bien meilleure que celle de *S. subspicatus* toutes choses égales par ailleurs. Les résultats obtenus avec cette dernière algue ne sont pas concluants et montrent qu'elle reste plus sensible aux effets du froid et de la congélation, ce qui peut s'expliquer, du moins en partie, par sa morphologie. Elle présente, en effet, une surface externe irrégulière avec des excroissances en forme d'épines ou d'aiguillons (Bourrelly, 1966), qui pourraient la rendre plus sensible aux effets mécaniques de la cristallisation de l'eau.

Il en ressort que quel que soit l'efficacité d'un traitement, celui-ci ne peut pas être appliqué à toutes les algues avec le même succès. Autrement-dit, à chaque espèce algale va correspondre une méthodologie de cryopréservation qui lui sera spécifique.

En ce qui concerne les effets spécifiques de chaque cryoprotecteur, l'effet du méthanol est très clair : il ne permet aucun stockage, même à court terme (22 jours). Il permet, par contre, une bonne viabilité sans stockage car ce type d'additif pénètre rapidement dans les cellules et agirait sur la composition de la membrane (augmentation significative du taux d'acides gras insaturés) tout en réduisant le degré de déshydratation cellulaire au cours de la congélation et de la décongélation (Morris, 1980).

L'effet de la PVP apparaît comme bien meilleur avec *S. capricornutum* qu'avec *S. subspicatus*. De plus les résultats sur *S. capricornutum* nous ont montré qu'il était vraisemblable que c'était le transfert direct de l'ambiance à -80°C qui était responsable du plus fort pourcentage d'inhibition observé (40 %). Or, à la même concentration de PVP, Morris (1980) a observé qu'une vitesse optimale de refroidissement de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ donnait 55 % d'inhibition chez *Chlorella emersonii* alors qu'une vitesse de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entraînait 87 % d'inhibition. Ceci va à l'encontre de nos propres résultats mais confirme l'idée selon laquelle pour chaque espèce (ou type cellulaire), il existe une vitesse optimale de congélation. Cette vitesse optimale dépendrait principalement du volume cellulaire, de la composition de la paroi et de sa perméabilité à l'eau (Morris, 1980).

De même Leeson *et al.* (1984), concluent que la protection fournie par chaque type d'additif au cours d'un cycle de congélation-décongélation dépend beaucoup de la vitesse de refroidissement.

Par ailleurs, la propriété générale des sucres est de réduire les stress dus aux fortes concentrations en électrolytes (Gazeau et Dereuddre, 1986), ce ne serait pas le cas pour *S. capricornutum* lors des modes de congélation expérimentés. Pour *S. subspicatus*, le saccharose apparaît, par contre, comme un "bon" cryoprotecteur lors d'une congélation lente, mais sans stockage.

Leeson *et al.* (1984) ont eux aussi testé les effets cryoprotecteurs du méthanol, de la PVP et du saccharose, sans stockage, mais sur *Euglena gracilis* et à une vitesse lente de congélation (0.25°C/min). Ils ont observé que les additifs extracellulaires (saccharose et PVP) ont moins d'effet protecteur que les additifs pénétrants tel que le méthanol. Nos résultats obtenus sans stockage confirment effectivement ce rôle cryoprotecteur du méthanol.

Par ailleurs, la congélation lente (C₁ ou C₂) jusqu'à -30°C a été réalisée à l'aide d'un bain de congélation d'éthylène glycol qui ne permettait malheureusement qu'une seule vitesse moyenne de refroidissement de 2°C/min. L'effet de différentes vitesses de refroidissement sur cette algue sera étudiée au chapitre suivant avec un appareil permettant d'étudier l'influence de différentes vitesses de refroidissement.

CHAPITRE II

RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE CRYOPRESERVATION DE *SCENEDESMUS SUBSPICATUS*

(Cette étude a été soumise pour publication à la revue Cryoletters, cf annexe 2)

Compte-tenu des mauvais résultats de viabilité observés avec *S. subspicatus* au chapitre précédent, nous avons porté notre effort sur cette algue pour optimiser les conditions de sa cryopréservation.

Pour cela, nous avons décidé de tester l'effet d'un facteur intrinsèque regroupant à la fois l'âge et les conditions de préculture. Morris (1980) et Meyer (1985) avaient, en effet, montré que l'état physiologique des cellules est déterminant vis-à-vis de la viabilité des algues après congélation, et que cet état physiologique dépend beaucoup de l'âge et des conditions de culture.

Nous avons également étudié l'effet de deux autres variables contrôlées :

- la vitesse de refroidissement,
- un traitement cryoprotecteur constitué d'un mélange des trois composés testés précédemment (chap. I).

II-1) Plan de l'essai

Les expériences ont été conduites selon un plan factoriel complet 3^2 (3 variables contrôlées avec deux modalités pour chaque variable) pour déterminer d'abord, et interpréter ensuite, les effets séparés et simultanés provoqués par les facteurs étudiés.

Deux conditions de préculture sont testées :

- la condition C_1 , inspirée de la norme ISO (1989), où les cellules sont incubées pendant 3 jours à 22°C et sous une lumière continue de 1530 lux avec une faible densité cellulaire au départ ($2 \cdot 10^4$ C/ml), l'inoculum provenant d'une culture de 7 jours.
- La condition C_2 , inspirée de la norme AFNOR (1980), où les cellules sont incubées à 22°C pendant 7 jours avec une photopériode de 16/8 et une plus forte densité cellulaire au départ ($4 \cdot 10^6$ c/ml), l'inoculum provenant de la même culture que pour la condition C_1 .

Deux traitements cryoprotecteurs ont été expérimentés :

- le saccharose à 10 % (p/v) que nous allons dénommé S ci-dessous.
- un mélange de saccharose à 10 % (p/v) + PVP 5 % (p/v) + méthanol 3 % (v/v) que nous allons dénommé SPM par la suite.

La congélation a été faite dans la vapeur d'azote liquide à l'aide d'un mini congélateur (Minicool, LM10 - cf. 2^{ème} partie chap. II-2-3-2) selon deux modes de refroidissement :

- le mode M_1 ou le refroidissement se fait lentement à une vitesse moyenne de 1.5°C/min jusqu'à -30°C suivi d'une congélation rapide à 10.5°C/min jusqu'à -80°C.
- le mode M_2 ou les algues sont congelées rapidement à une vitesse moyenne de 10.5°C/min jusqu'à -80°C.

Les échantillons ainsi congelés sont transférés directement dans un congélateur à -80°C et conservés pendant 10 jours avant décongélation.

Chacune des variables contrôlées (X_1 = conditions de préculture, X_2 = traitement cryoprotecteur, ou X_3 = mode de congélation) se caractérise par deux niveaux qui sont codés comme suit :

$$\begin{aligned} X_1 &= -1 \text{ pour } C_1 \text{ (condition ISO),} \\ X_1 &= +1 \text{ pour } C_2 \text{ (condition AFNOR)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X_2 &= -1 \text{ pour S (saccharose 10 \%),} \\ X_2 &= +1 \text{ pour SPM (mélange SPM)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X_3 &= -1 \text{ pour } M_1 \text{ (Congélation lente en deux étapes),} \\ X_3 &= +1 \text{ pour } M_2 \text{ (Congélation rapide en une étape)} \end{aligned}$$

L'estimation de la viabilité des algues fraîches et congelées a été faite par suivi de la croissance :

- en milieu liquide par ensemencement d'erlenmeyers contenant 45 ml de milieu oligo L.C. de façon à avoir environ $2 \cdot 10^4$ C/ml au départ,
- sur milieu solide par étalement des échantillons dilués d'algues témoins ou congelées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu oligo L.C. gélosé à 1.5 %.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque combinaison de facteurs testés.

II-2) Résultats

Les figures 17a, 17b et 18a, 18b présentent l'évolution en fonction du temps de la numération en milieu liquide des algues précultivées respectivement sous conditions ISO ou AFNOR.

Le tableau X présente les résultats brutes de croissance en milieu liquide (exprimés par l'aire sous la courbe de croissance au jour 4 de croissance), et les résultats sur milieu solide au jour 14 (exprimés sous forme de nombres de colonies formées par rapport) en fonction du plan factoriel 3².

S. subspicatus montre des différences de viabilité selon le mode de congélation, les conditions de préculture et le traitement cryoprotecteur subis que nous avons d'abord choisi d'étudier dans leur ensemble :

Les données de croissance en milieu liquide (L) et sur milieu solide (S) ont été traitées par une analyse de variance de régression multiple suivie d'une détermination de la significativité statistique des coefficients du modèle. Les équations regroupant les termes ayant les coefficients statistiquement significatifs sont les suivantes respectivement pour le milieu liquide (L) et pour le milieu solide (S) :

^

$$L = 12.56 - 9.80(X_1) + 6.33(X_2) - 5.76(X_1X_2) + 4.99(X_3) - 4.18(X_1X_3) + 2.05(X_2X_3)$$

^

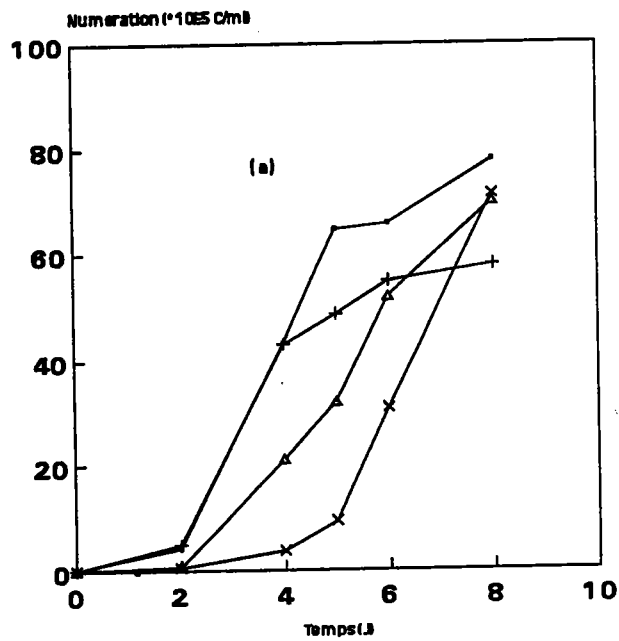
$$S = 15.21 - 14.35(X_1) + 6.71(X_3) + 6.38(X_2) - 5.84(X_1X_3) - 5.59(X_1X_2) + 3.32(X_2X_3)$$

L'interprétation statistique des données confirme la significativité des termes simples X_1 , X_2 et X_3 et donc des variables contrôlées qu'ils représentent et qui seront discutées tour à tour.

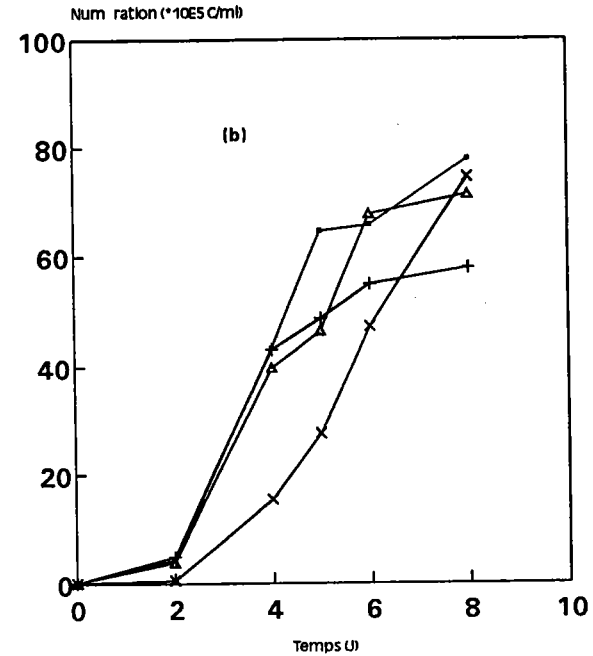
II-2-1) Discussion

II-2-1-1) Effet des conditions de préculture (X_1).

Les cellules précultivées selon la condition C_1 résistent mieux aux effets du froid et de la congélation-décongélation que celles préincubées selon la condition C_2 .

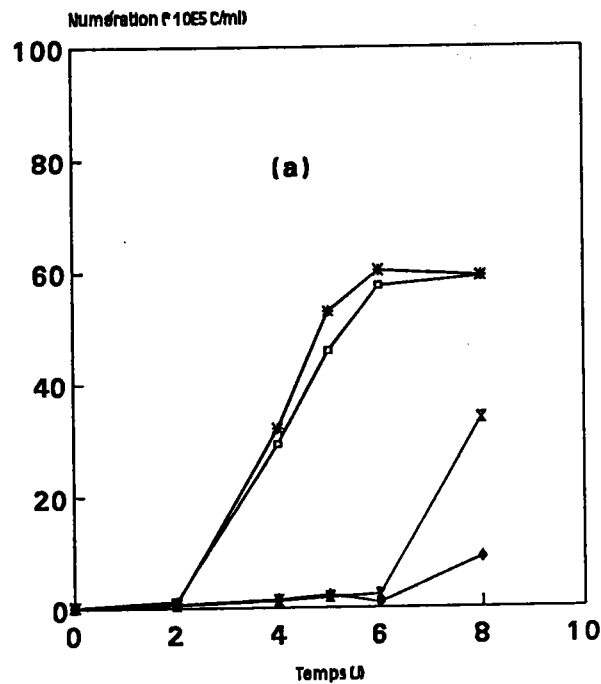


— TémoIn C1-S10
 + TémoIn C1-SPM
 * Congelé C1-S10-M1
 ^ Congelé C1-SPM-M1

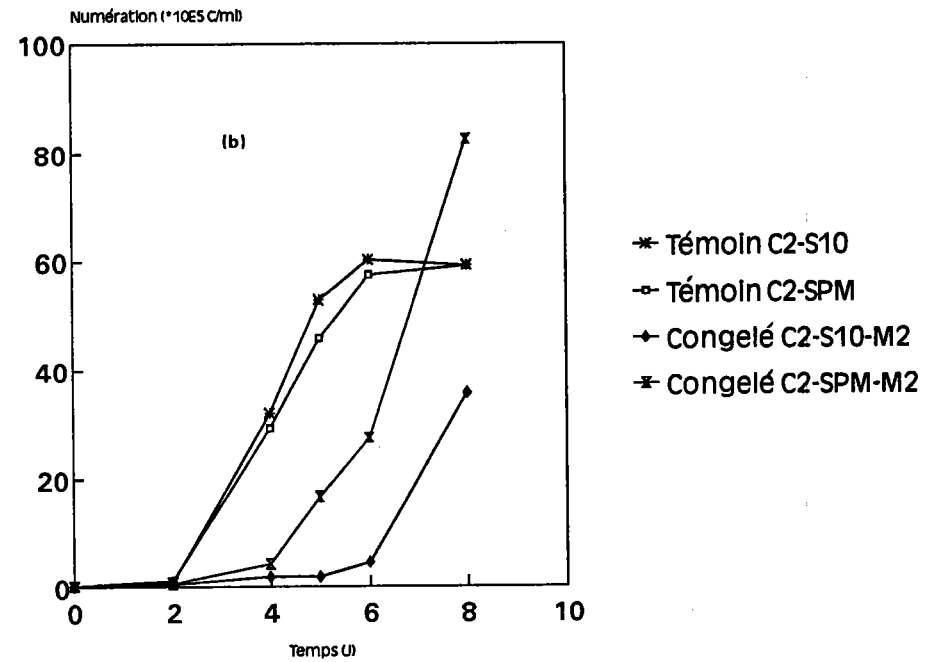


— TémoIn C1-S10
 + TémoIn C1-SPM
 * Congelé C1-S10-M2
 ^ Congelé C1-SPM-M2

Figure 17 : Croissance en milieu ISO de *Scenedesmus subspicatus* en fonction des traitements de congélation et de cryoprotection



- * Témoin C2-S10
- Témoin C2-SPM
- ◆ Congelé C2-S10-M1
- ✕ Congelé C2-SPM-M1



- * Témoin C2-S10
- Témoin C2-SPM
- ◆ Congelé C2-S10-M2
- ✕ Congelé C2-SPM-M2

Figure 18 : Croissance en milieu AFNOR de *Scenedesmus subspicatus* en fonction des traitements de congélation et de cryoprotection

Tableau X : Résultats du plan factoriel d'expériences.
(à J₄ pour le milieu liquide et à J₁₄ pour le milieu solide)

Expérience N°	Conditions de préculture	Traitement cryopro- -tecteur	Méthode de congé- -lation	Culture liquide			\bar{L}	Culture solide			\bar{S}
				Aire sous la courbe J ₄ (cellules.ml ⁻¹ .jour)				% formation de colonies après 14J			
1	C1	S	M1	3.89	3.88	5.60	4.460	3.630	18.180	10.90	10.90
2	C1	S	M2	21.10	19.48	7.58	16.05	51.12	13.75	8.000	24.29
3	C1	SPM	M1	19.62	23.34	22.74	21.90	23.80	19.42	26.19	23.14
4	C1	SPM	M2	46.00	43.80	51.18	46.99	67.69	64.46	47.69	59.95
5	C2	S	M1	2.14	2.38	1.78	2.10	0.000	0.000	0.000	0.000
6	C2	S	M2	1.94	2.93	1.97	2.280	0.440	0.000	0.000	0.147
7	C2	SPM	M1	1.92	1.77	1.71	1.800	0.000	0.000	0.000	0.000
8	C2	SPM	M2	5.04	4.92	4.63	4.860	0.990	0.000	0.000	0.330

C₁ = Conditions de préculture ISO

C₂ = Conditions de préculture AFNOR

S = Traitement cryoprotecteur au Saccharose 10% (w/v) cryotreatment

SPM = Traitement cryoprotecteur Saccharose 10% + PVP. 5% + Methanol 3%

M₁ = Refroidissement lent à 1.5°C/min jusqu'à -30°C + transfert à -80°C

M₂ = Refroidissement rapide à 10°C/mn jusqu'à -80°C

Les différences entre les conditions C_1 et C_2 concernent à la fois l'âge de la culture (3 et 7 jours respectivement), la concentration cellulaire au départ ($2 \cdot 10^4$ et $4 \cdot 10^6$ C/ml) ainsi que le régime d'illumination (continu ou discontinu). Tous ces facteurs affectent directement les caractéristiques du milieu et par conséquent la physiologie cellulaire. Ils déterminent le volume et le degré de vacuolisation, le taux de lipides et le degré d'insaturation des acides gras membranaires (Morris, 1980).

Nous notons, cependant, que ces résultats sont en opposition avec ceux de Morris (1976a) qui a remarqué que les cellules de l'algue verte *Chlorella* 211/7b sont plus sensibles au froid, en phase exponentielle de croissance (âge compris entre 2 et 5 jours) que celles en phase stationnaire (âge supérieur à 6 jours). Nag et Street (1975) ont, par contre, observé que les cellules de carotte en phase exponentielle présentent un faible volume cellulaire et le minimum de degré de vacuolisation et sont plus résistantes à la congélation que celles en phase stationnaire.

Cette différence de sensibilité au froid en fonction de l'âge de la culture entre les cellules de plantes supérieures et les algues unicellulaires a été déjà évoquée par Morris (1980). Il apparaît, cependant, comme une règle générale que la phase de croissance présentant le minimum de vacuolisation permettrait un maximum de résistance à la congélation et à la décongélation.

II-2-1-2) Effet du traitement cryoprotecteur.

Nos résultats montrent que l'utilisation d'une combinaison de trois cryoprotecteurs (SPM) permet, en général, une meilleure viabilité que l'utilisation du saccharose seul (S).

Ces résultats montrent aussi que l'addition de la PVP et du méthanol au saccharose permet une meilleure cryoprotection des cellules de *S. subspicatus* et ceci quels que soient le mode congélation et les conditions de préculture. Le saccharose est un composé semi-pénétrant (Tao et Li, 1986), il ne traverse que la paroi cellulaire et entraîne une faible plasmolyse cellulaire juste avant la congélation ; il protège aussi la surface externe de la membrane plasmique contre la pression mécanique causée par la croissance de la glace.

La PVP est un cryoprotecteur strictement non pénétrant puisqu'il ne traverse pas la paroi cellulaire (Gazeau et Dereuddre, 1986), elle inhiberait la croissance des cristaux de glace à la surface externe de la paroi cellulaire où elle se concentre au fur et à mesure de la congélation du milieu.

Le méthanol est, quant à lui, un composé pénétrant (Tao et Li, 1986) qui permettrait une protection des organites et des membranes intracellulaires contre les effets de la déshydratation et de la concentration en sels, et ceci en retardant la formation de glace aux températures avoisinant le point eutectique.

La meilleure protection obtenue avec l'utilisation du mélange SPM aux concentrations définies serait ainsi due à une combinaison des propriétés cryoprotectrices des trois composés utilisés.

II-2-1-3) Effet du mode de congélation.

Les résultats (tableau X) montrent que la congélation en une seule étape rapide à 10.5°C/min jusqu'à -80°C (mode M₂), est moins dommageable que la congélation en deux étapes lente (1.5°C/min) jusqu'à -30°C suivie d'un transfert à -80°C. Les différences de viabilité observées entre les modes M₁ et M₂ de congélation sont significatives (test t) à 5 % sauf dans un cas (expériences 5 et 6).

La congélation en deux étapes a été utilisée avec succès par différents auteurs (Hwang et Horneland, 1965 ; Morris, 1978 ; Ben-Amotz et Gilboa, 1980a). Les échantillons d'algues passent par deux étapes de congélation rapide. Généralement, ils sont plongés directement dans un bain réglé à une température fixe (généralement -30°C) pendant un temps optimal (30 minutes en moyenne) avant de passer à la température de stockage (-80°C ou -196°C).

Or, nos résultats montrent qu'une congélation en une étape rapide fournit de meilleurs résultats qu'une congélation en deux étapes (lente+rapide). A cet égard, il faut signaler que (pour le mode M₁) des études préliminaires avec deux étapes de congélation (rapide=rapide) nous avaient donné de mauvais résultats de viabilité (résultats non fournis). Par contre, pour Morris et Canning (1978), une première étape lente suivie d'une deuxième étape rapide fournit les meilleurs résultats avec *Euglena gracilis*. Ils observent la formation de larges cristaux de glace extracellulaire au cours des refroidissements lents.

Cette transformation de l'eau en glace exposerait les cellules à des solutions hypertoniques pendant toute la durée du refroidissement, et il en résulterait que plus la vitesse est lente, plus le temps d'exposition à ces solutions hypertoniques est long. Les meilleurs résultats de M_2 par rapport à M_1 pourraient ainsi s'expliquer par l'exposition prolongée à des milieux extracellulaires concentrés.

II-2-1-4) Etude des interactions.

Trois interactions significatives ont été mises en évidence montrant l'importance de l'étude des effets simultanés des trois variables contrôlées :

L'interaction X_1X_2 , avec un coefficient d'effet négatif, montre donc un effet bénéfique quand le produit X_1X_2 est négatif, et plus particulièrement lorsque la condition C_1 ($X_1 = -1$) et le traitement cryoprotecteur SPM ($X_2 = +1$) sont utilisés en association.

De la même façon, le coefficient négatif attribué à l'interaction X_1X_3 permet de dire que l'association de la condition C_1 ($X_1 = -1$) et du mode de congélation M_2 ($X_3 = +1$) a un effet positif sur la reprise des algues après congélation.

Quant au coefficient de l'interaction X_2X_3 , il est positif. Ceci confirme le fait que l'utilisation d'un traitement cryoprotecteur à base de SPM ($X_2 = +1$) suivi d'une congélation rapide ($X_3 = +1$) donnerait de meilleurs résultats de viabilité que les autres combinaisons.

II-2-1-5) Comparaison des résultats obtenus en culture liquide et en culture solide.

A première vue, il peut paraître surprenant que les deux équations, développées au § II-2, soient différentes. Pour autant, même si l'estimation de la viabilité sur milieu solide est classiquement utilisée, la culture sur milieu solide est généralement considérée comme plus stressante que celle en milieu liquide. Car le milieu liquide permet aux microorganismes (algues, bactéries) de puiser plus facilement les nutriments présents dans le milieu. Cette différence de pousse entre milieu liquide et milieu solide a déjà été observée avec des bactéries (Allen-Austin *et al.*, 1984).

II-2-2) Discussion générale

Les résultats de cette étude font apparaître l'importance du facteur "âge et conditions de préculture" dans l'étude de cryopréservation de *S. subspicatus*. Ce facteur se révèle déterminant (et statistiquement significatif) pour la viabilité de cette algue, il apparaît d'ailleurs en première position dans les deux équations. Une attention particulière doit donc être portée à la phase de préculture des cellules dans un protocole de cryopréservation des microalgues.

On ne peut cependant pas attribuer cette augmentation de viabilité à un seul facteur puisque les autres facteurs étudiés sont également significatifs et que toutes ces variables (âge et conditions de préculture - vitesse de congélation - traitement cryoprotecteur) sont en interaction. Elles contribuent donc toutes à la viabilité cellulaire après décongélation (Leeson *et al.*, 1984). Morris (1976a) en étudiant les effets de la vitesse de refroidissement, des additifs cryoprotecteurs et de la vitesse de décongélation sur la viabilité de *Chlorella* avait déjà parlé d'interaction entre ces facteurs sans pour autant lui donner une signification statistique.

L'étude des effets de la vitesse de congélation et du traitement cryoprotecteur, rapportée au chapitre I, avait montré, qu'en présence de saccharose 10 %, *S. subspicatus* se caractérisait par une viabilité comprise entre 1 et 12 % pour les modes de congélation comparables à M_1 et M_2 . Or les résultats de ce chapitre II montrent que dans les mêmes conditions de préculture (condition C_2) et en présence de saccharose 10 % nous obtenons une viabilité (milieu liquide) qui n'est pas meilleure (légèrement supérieure à 2 %).

La comparaison entre ces deux séries d'expériences est délicate puisque le système de refroidissement utilisé (bain d'éthylène glycol ou Minicool), la vitesse de refroidissement, la durée de stockage ne sont pas les mêmes.

Pour autant, le mode de calcul des pourcentages de viabilité n'est pas le même dans les deux cas. Si l'on recalcule les pourcentages de viabilité au jour J_4 pour l'expérience *S. subspicatus* réalisée au chapitre II, il apparaît que les pourcentages d'inhibition ne sont plus de 12 % mais de 3 %. Les résultats obtenus avec les conditions expérimentées au chapitre I et au chapitre II, sont donc comparables.

En définitive, pour *S. subspicatus*, les meilleures conditions de cryopréservation à -80°C sont :

- l'utilisation de cellules précultivées pendant 3 jours avec un faible inoculum $2 \cdot 10^4$ C/ml et une lumière continue (condition ISO)
- une congélation "rapide" (10.5°C/min) en une seule étape à 10°C/min.
- un traitement cryoprotecteur composé d'un mélange de saccharose à 10 % (p/v), de PVP à 5 % (p/v) et de méthanol à 3 % (v/v).

La variable âge de la culture étant apparue comme particulièrement importante au cours de cette expérience, nous avons choisi d'approfondir les effets de cette variable dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

ETUDE DE L'EFFET DE L'AGE DE LA CULTURE SUR LA VIABILITE DE *S. CAPRICORNUTUM*, DE *C. VULGARIS* ET DE *S. SUBSPICATUS* APRES CONGELATION.

III-1) Introduction

Les résultats obtenus sur *S. subspicatus* ont montré l'importance du facteur âge de la culture et ne pouvaient que suggérer l'étude de l'effet de ce même facteur sur la viabilité de deux autres espèces algales (*C. vulgaris* et *S. capricornutum*) après un cycle de congélation-décongélation.

III-2) Conditions de l'étude

Pour cette étude nous avons choisi :

a) pour *S. capricornutum* le meilleur protocole de cryopréservation obtenu au chapitre I à savoir, un traitement cryoprotecteur à base de PVP 5 % (p/v) et une congélation lente ($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jusqu'à -30°C suivie d'un transfert direct à -80°C .

b) Pour *S. subspicatus*, un traitement cryoprotecteur avec le mélange SPM (saccharose 10 % + PVP 5 % + méthanol 3 %) et une congélation rapide ($10.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jusqu'à -80°C (cf chap. II, condition M2).

c) En ce qui concerne *Chlorella vulgaris*, des résultats préliminaires (non présentés ici) nous ont montré qu'un traitement cryoprotecteur avec du saccharose à 10 % (p/v) et une congélation lente ($1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jusqu'à -30°C suivie d'un transfert direct à -80°C donnait des résultats acceptables.

Aucun stockage n'a été réalisé pour cette étude où des inocula d'âges différents ont été testés : 3 et 7 jours. Pour ces 2 âges, l'inoculum est identique (2×10^4 C/ml) et l'illumination est continue. Le choix de ces conditions (cf. ISO) se justifie par le fait que le but final de notre étude est de mettre au point un test de toxicité utilisant des algues cryopréservées et que le protocole ISO est généralement bien reconnu. En outre, nous avons montré (cf. chapitre II) que les conditions ISO permettaient une meilleure résistance au froid que les conditions AFNOR de préculture.

dénombrements effectués (cellules ou colonies) pour les échantillons congelés aux dénombrements effectués pour les témoins. Ceux-ci ont subi le même traitement cryoprotecteur : incubation à 22°C pendant toute la durée du cycle de congélation-décongélation spécifique à chaque algue.

III-3) Résultats

III-3-1) Effet de l'âge de la culture sur la viabilité de *Chlorella vulgaris*.

Les figures 19a et 19b présentent les courbes de croissance de cultures fraîches ou congelées de *C. vulgaris*, l'inoculum étant âgé respectivement de 3 jours (a) et 7 jours (b). Elles montrent que les témoins sans congélation présentent des courbes de croissance différentes selon l'âge de l'inoculum. La plus forte numération est obtenue (au bout de 4 jours de culture en milieu liquide) avec un inoculum âgé de 3 jours. Celle-ci est significativement plus élevée que la numération observée pour l'inoculum âgé de 7 jours (test t, $p=5\%$).

Pour ce même inoculum de 3 jours, la croissance des algues congelées est beaucoup plus faible que celle des algues témoins. La différence entre leurs numérations respectives à J4 est significative (test t, $p=5\%$).

Avec un inoculum âgé de 7 jours, il n'y a pas de différence significative (test t à 5 %) entre la croissance des algues fraîches et congelées à J4.

Entre les cultures congelées, les numérations observées pour les inocula de 3 et 7 jours ne sont pas significativement différentes.

Par contre, l'observation des résultats obtenus en milieu solide (figure 20) permet de constater que les cellules âgées de 3 jours résistent aussi bien aux effets de la congélation que celles âgées de 7 jours ; la différence n'étant pas significative entre les deux traitements (test t, $p=5\%$).

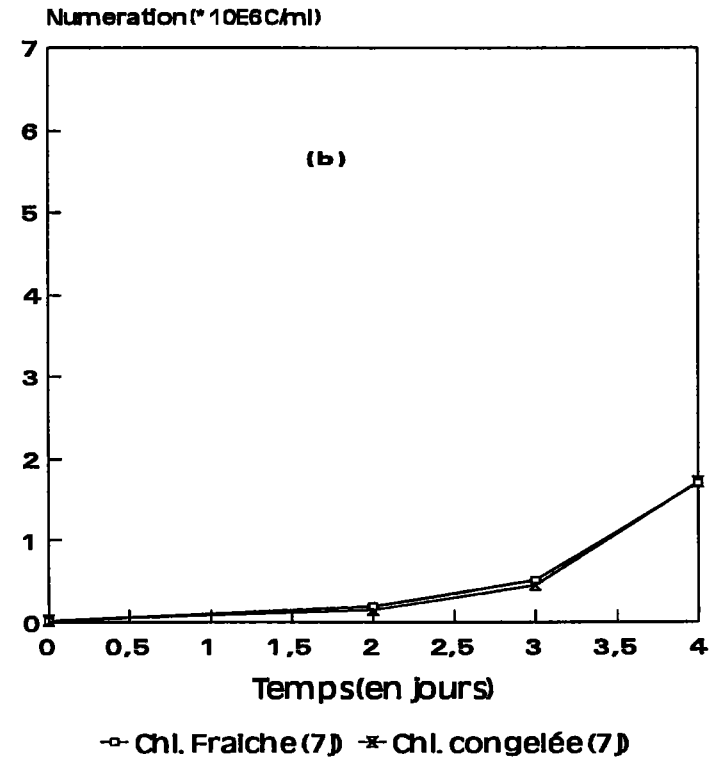
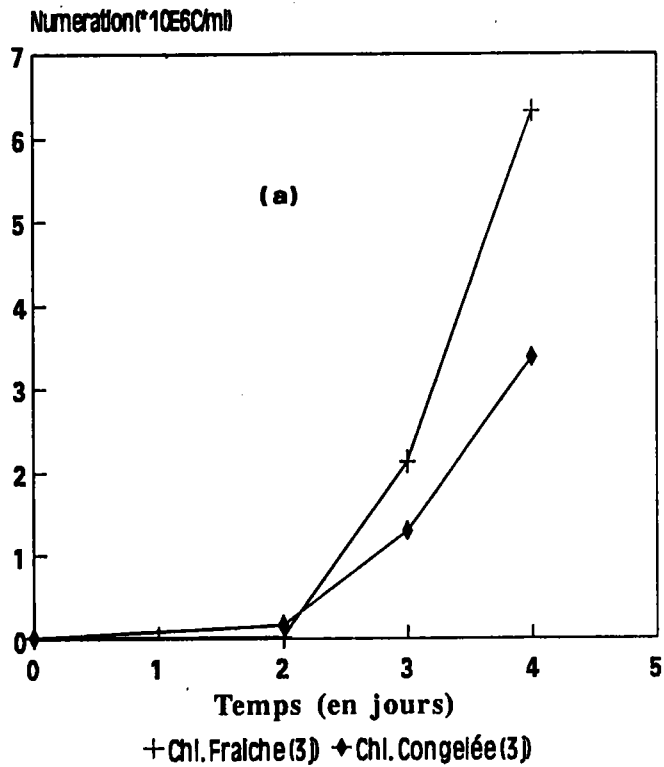


Figure 19 : Effets de l'âge de la culture (3 ou 7 jours) sur la viabilité de *Chlorella vulgaris* apres congélation.

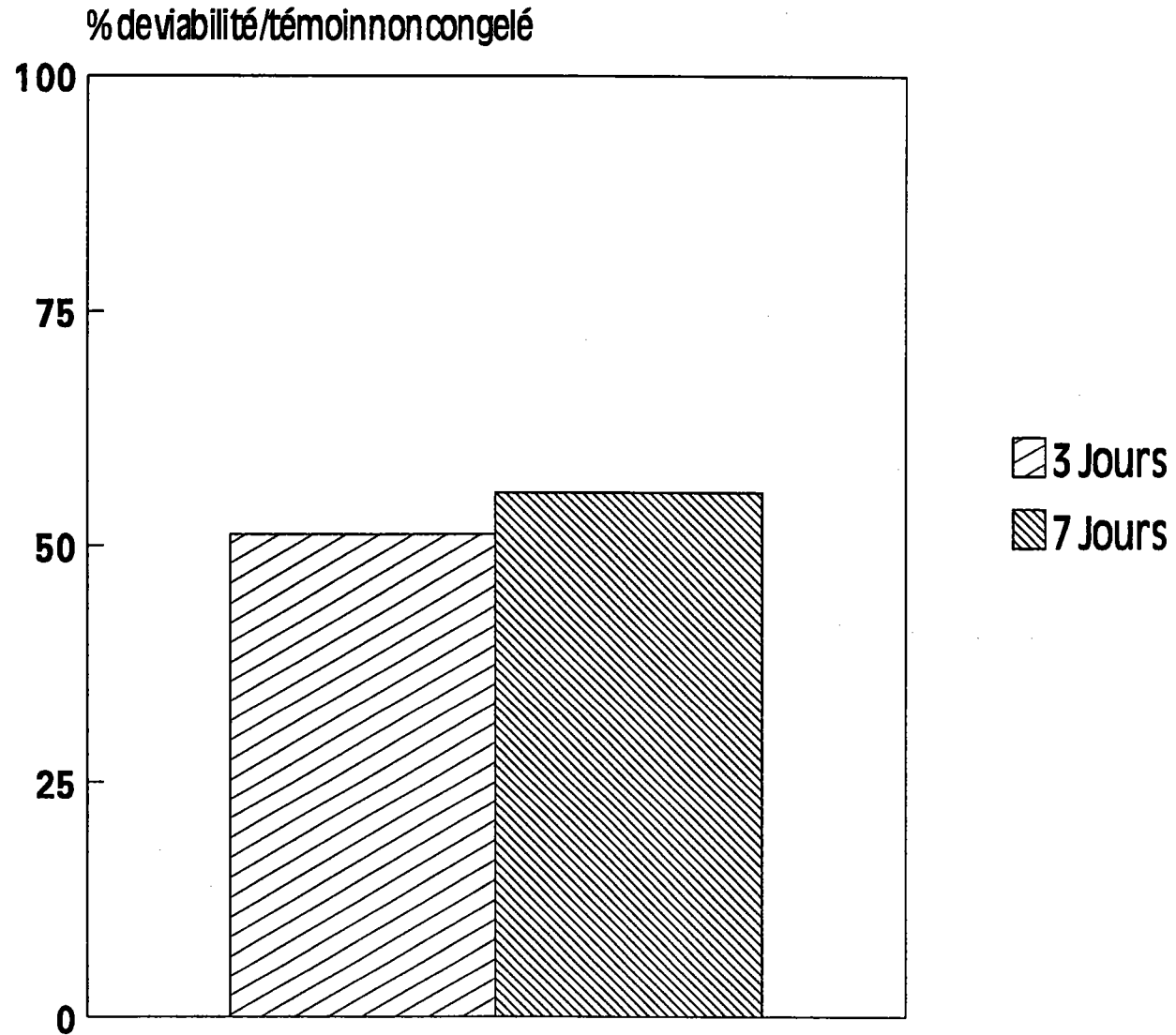


Figure 20 : Effet de la congélation a -80°C sur la viabilité de *Chlorella vulgaris* à différents âges

La croissance en milieu liquide, nous permet donc de voir que, dans nos conditions d'expérimentation, les cellules de *Chlorella vulgaris* résistent mieux à la congélation à l'âge de 7 jours qu'à l'âge de 3 jours, bien que la numération obtenue à l'âge de 3 jours ($3.4 \cdot 10^6$ C/ml) soit supérieure à celle obtenue après 7 jours ($1.7 \cdot 10^6$ C/ml). Ces résultats confirment donc ceux de Morris (1976a) observés avec un autre espèce de chlorelle : *C. protothecoides* Krüger, souche 211/7a. Il avait, en effet, observé que les chlorelles prises en phase exponentielle de croissance (2 à 5 jours) étaient plus sensibles aux dommages du froid que celles prélevées en phase stationnaire (supérieure à 6 jours).

Avec un inoculum âgé de 7 jours, la croissance sur milieu solide révèle un pourcentage d'inhibition de 44 % par rapport aux algues fraîches, ce que nous n'avons pas observé en milieu liquide. Cette différence de pousse entre milieu liquide et milieu solide a déjà été discutée au chapitre précédent, mais dans ce cas la différence de réponse entre les deux milieux est encore plus flagrante.

III-3-2) Effet de l'âge de la culture sur la viabilité de *Selenastrum capricornutum* après congélation.

Les courbes de croissance (en milieu liquide) de cultures fraîches ou congelées de *S. capricornutum*, avec un inoculum âgé de 3 et de 7 jours sont présentées sur les figures 21a et 21b respectivement. Il n'y a pas de différence significative entre les numérations obtenues à J4 pour les algues fraîches et les algues congelées âgées de 3 ou de 7 jours (ANOVA suivi d'un test de Tukey). Toutefois, avec un inoculum âgé de 7 jours, les algues congelées présentent curieusement une croissance légèrement supérieure à celle des algues fraîches, mais non significative.

Les résultats de viabilité sur milieu solide (figure 22), sont, là encore, très différents de ceux obtenus en milieu liquide, puisque nous n'obtenons que 45 % (inoculum de 3 jours) et 35 % (inoculum de 7 jours) de viabilité sur milieu solide. La différence entre les deux pourcentages n'est pas significative (test t à $p = 5\%$).

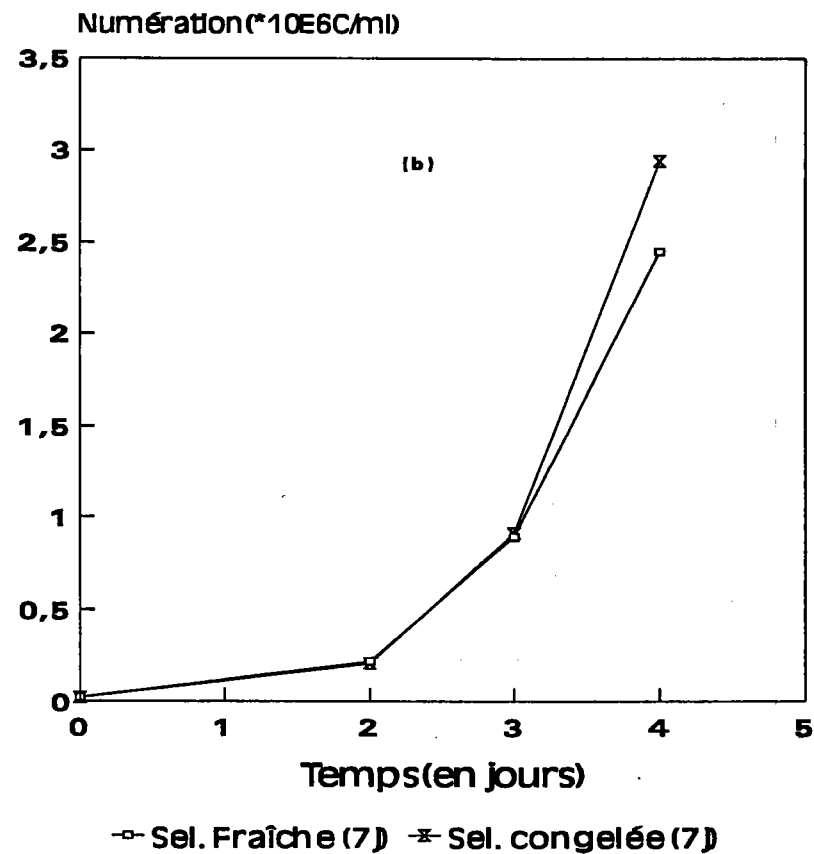
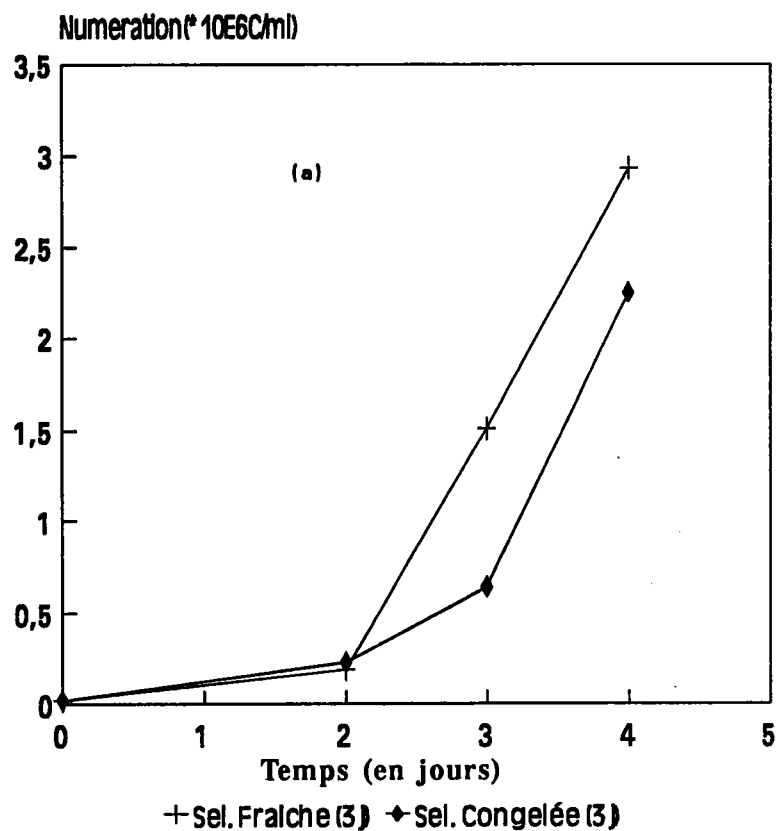


Figure 21 : Effets de l'âge de la culture (3 ou 7 jours) sur la viabilité de *Selenastrum capricinutum* après congélation

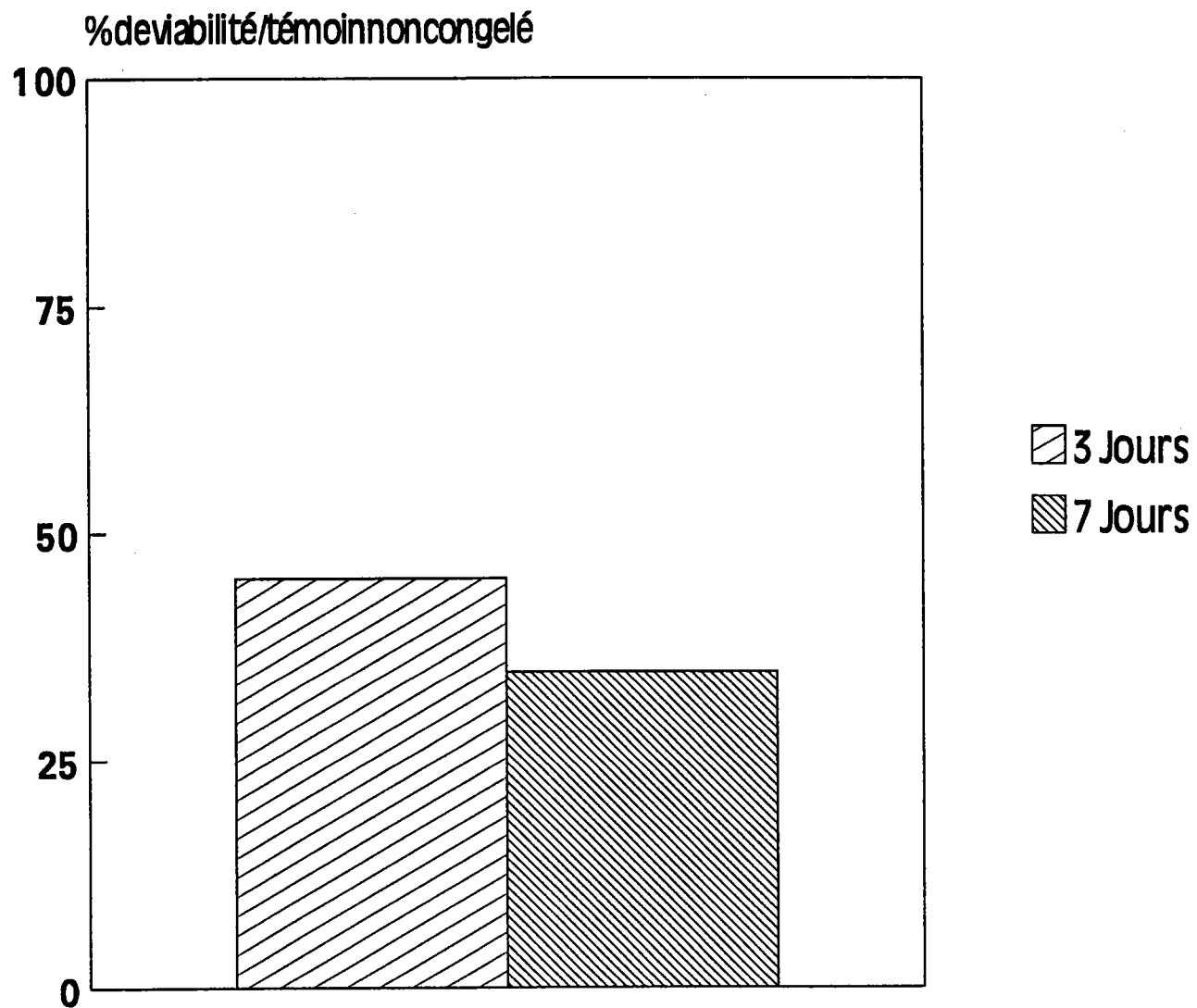


Figure 22 : Effet de la congélation à -80 °C sur la viabilité de *Selenastrum capricornutum* sur milieu solide.

Il ressort de cette étude qu'il est vraisemblable que *S. capricornutum* résiste de la même façon aux effets du froid à l'âge de 3 et 7 jours. Nous ne disposons pas de données bibliographiques traitant spécifiquement de l'effet de l'âge de la culture sur la réponse de cette algue à la congélation. Toutefois, Morris (1978), a obtenu plus de 50 % de viabilité (déterminée sur milieu solide) avec 12 souches du genre *Selenastrum* dont les cellules ont été prélevées en phase stationnaire de croissance (35 jours à 20°C). Cette meilleure viabilité pourrait s'expliquer par le fait qu'après 35 jours de culture en conditions statiques, les cellules sont en conditions défavorables dues au manque de nutriments. De ce fait, elles développent plus de résistance aux effets du froid et de la congélation. En effet, Morris (1978) remarque que la réduction des concentrations en nitrates, en phosphates et en calcium dans le milieu de croissance, augmente la viabilité après décongélation de *Chlorella emersonii*. Cette augmentation de viabilité serait due à une accumulation de lipides.

III-3-3) Effet de l'âge de la culture la viabilité de *Scenedesmus subspicatus* après congélation.

Dans le chapitre précédent, nous avons déjà étudié les effets de l'âge de l'inoculum. Nous avons voulu refaire cette expérience pour pouvoir tester les trois espèces dans les mêmes conditions afin de :

- a) confirmer ou non les résultats obtenus au chapitre I en ce qui concerne la spécificité des traitements d'une espèce à l'autre.
- b) confirmer ou non les résultats obtenus au chapitre II avec la même algue.

La figure 23 ne présente les résultats de croissance que sur milieu solide (exprimés en pourcentages de pousse par rapport au témoin non congelé) après une congélation rapide (10.5°C/min) jusqu'à -80°C, et ceci en fonction seulement de l'âge de l'inoculum. Des impératifs matériels ne nous ont pas permis de réaliser les cultures liquides.

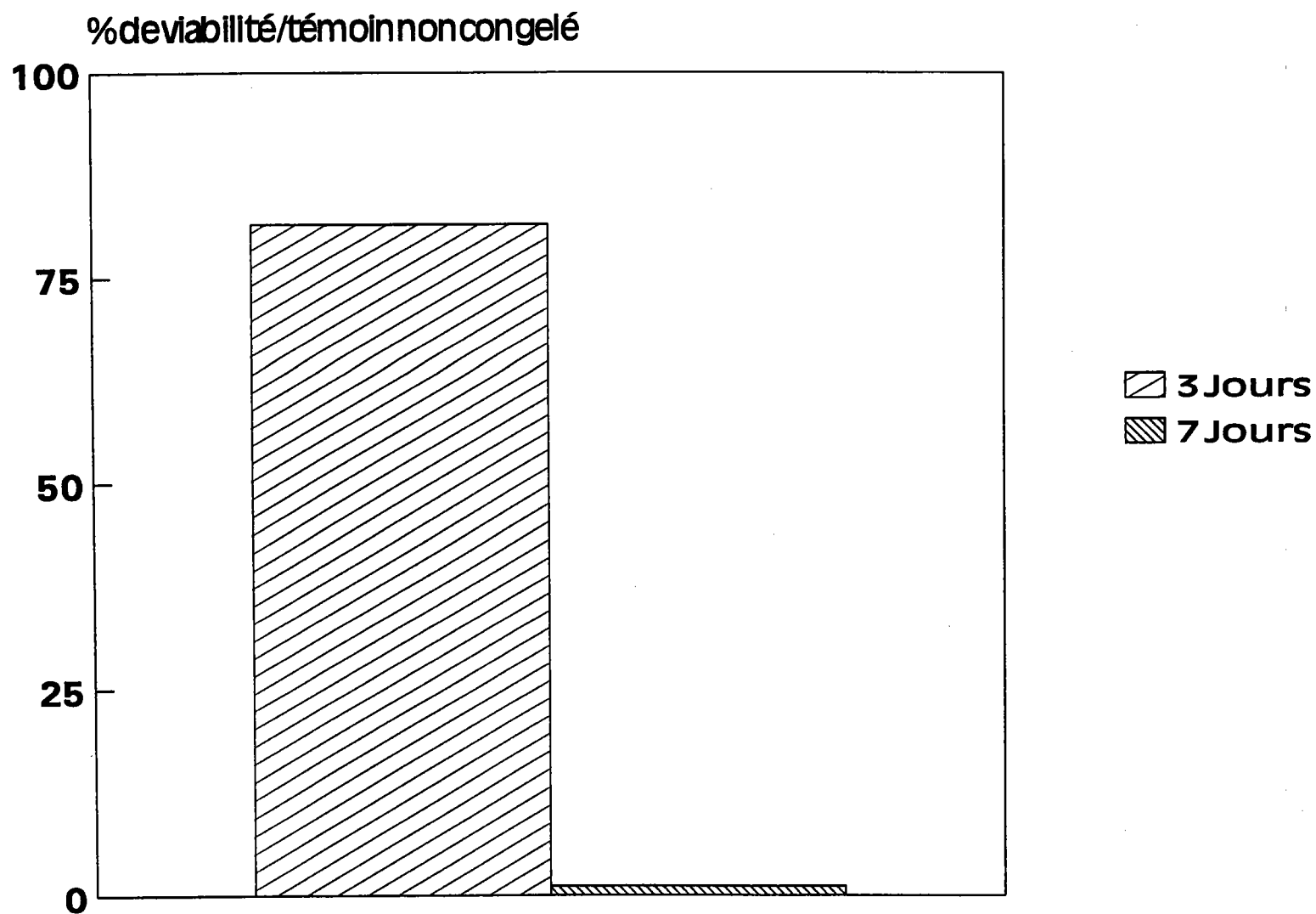


Figure 23 : effets de la congélation à -80°C sur la viabilité de *Scenedesmus subspicatus* sur milieu solide.

Sur milieu solide, les résultats obtenus confirment ceux du chapitre précédent (expérience N°4 et 8 - Tableau X) puisque les algues âgées de 3 jours sont plus résistantes (82 % de viabilité) à la congélation que celles âgées de 7 jours dont la viabilité est presque nulle (1 %). Entre les expériences 4 et 8 (tableau X) du chapitre précédent (60 % et 0.3 % de viabilité), il y avait en réalité 3 variables "cachées" différentes (âge de l'inoculum - taille de l'inoculum - photopériode). Par contre, dans la présente expérience, le seul facteur qui varie est l'âge de l'inoculum.

La variation de ce seul facteur suffirait donc à rendre compte de la variation observée au chapitre II, les deux autres facteurs ayant alors peu d'effets. Il faut aussi signaler que dans la présente expérience, il n'y a pas eu de stockage, ce qui peut expliquer le plus fort pourcentage de viabilité observé (82 par rapport à 60 %). Nous pouvons donc en déduire que la reproductibilité entre les 2 expériences est bonne.

III-4) Discussion générale.

Les résultats de ce chapitre montrent une grande différence entre les pourcentages de viabilité obtenus en milieu liquide et en milieu solide. Malgré le fait que nombre d'auteurs (Morris, 1976a ; Leeson et al., 1984 ; Meyer, 1985 ; ...) aient utilisé, par le passé, la seule mesure sur milieu solide, il nous semble préférable de privilégier les résultats de viabilité obtenus sur milieu liquide pour des raisons déjà évoquées (condition moins stressante - meilleure disponibilité des nutriments). En outre, cette technique en milieu liquide est la seule technique standardisée en Ecotoxicologie algale.

L'effet de l'âge de la culture sur la viabilité des algues testées après congélation varie selon l'espèce considérée. Il n'y a donc pas de règle générale quant à la sensibilité d'une phase de croissance par rapport à une autre. C'est ainsi que nous avons pu observer que si *Selenastrum* résiste aussi bien à l'âge de 3 et 7 jours, *Chlorella* présente une viabilité meilleure à l'âge de 7 jours, alors que *Scenedesmus* se caractérise par une viabilité (déterminée sur milieu solide) presque nulle.

L'âge constitue donc bien un facteur important pour la réussite d'une cryopréservation. Le fait que la résistance à la congélation de l'algue d'eau douce *Chlorella* augmente avec l'âge de la culture pour atteindre un maximum en phase stationnaire de croissance (Morris, 1978) n'est donc pas un phénomène général chez les microalgues. D'ailleurs Ben-Amotz et Gilboa (1980a) précisent que la résistance au froid ne doit pas être attribuée spécifiquement à l'âge de la culture mais plutôt à l'espèce algale elle-même, parfois au volume cellulaire et au taux spécifique de croissance.

On peut résumer l'effet séparé de l'âge de la culture selon l'espèce considérée comme suit :

- pour *Chlorella vulgaris*, il est préférable d'utiliser un inoculum âgé de 7 jours et dans ce cas, le pourcentage de viabilité est de 100 %.

- pour *Selenastrum capricornutum*, il est possible d'utiliser un inoculum de 3 ou de 7 jours. Toutefois pour tenir compte de la norme ISO qui recommande une préculture de 3 jours, nous privilégierons cette dernière condition. Le pourcentage de viabilité est de 87 % dans ce cas.

- pour *Scenedesmus subspicatus*, l'ensemble des résultats obtenus (chapitres II et III) confirment le fait qu'il est nécessaire d'utiliser un inoculum âgé de 3 jours. Dans ce cas, le pourcentage de viabilité est de 47 % (chapitre II).

CHAPITRE IV

MISE AU POINT D'UN TEST D'ECOTOXICITE UTILISANT L'ALGUE CRYOPRESERVEE *S. CAPRICORNUTUM* COMME OUTIL BIOLOGIQUE

IV-1) Introduction.

Dans le but de mettre au point un test de toxicité utilisant des algues cryopréservées, nous avons préféré porter la totalité de nos efforts sur une seule algue verte. Le choix s'est porté sur *Selenastrum capricornutum* car cette algue représente l'espèce la plus utilisée de part le monde dans les tests-algues (Nygaard *et al.*, 1986). De plus, elle constitue un organisme test de choix pour plusieurs normes et lignes directrices (OCDE, 1984 ; CEE, 1988 ; ISO, 1989 ; EPA, 1989).

Dans cette perspective, nous avons entrepris de déterminer, dans un premier temps, l'effet de la présence, dans le milieu, de la polyvinylpyrrolidone uniquement sur des algues fraîches. Cet additif cryoprotecteur s'était avéré constituer le meilleur cryoprotecteur pour cette algue, lors d'une congélation lente jusqu'à -30°C suivie d'un transfert direct à -80°C (cf. chapitre I et III).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à valider l'utilisation de cette algue cryopréservée à l'aide d'un certain nombre de métaux et ceci dans différents systèmes d'essais.

IV-2) Croissance des algues fraîches en présence et en absence de PVP.

Il nous a paru nécessaire d'étudier la croissance de *S. capricornutum* (non congelé) en présence et en absence de PVP. En effet, même s'il y a une étape de dilution entre l'étape de cryopréservation et la réalisation des tests proprement dits, la concentration finale de PVP, bien que faible, est susceptible d'entraîner des effets sur la croissance des algues témoins.

IV-2-1) Conditions de l'essai

Les conditions de préculture et d'incubation sont celles de la norme ISO (1989). La suspension d'algues fraîches de 3 jours est diluée au 1/2 dans des cryotubes :

- soit avec de la PVP (10 % p/v) pour les algues "traitées" de façon à avoir une concentration finale de 5 % en PVP comme traitement cryoprotecteur,

- soit avec de l'eau distillée stérile pour les algues "témoins" (sans PVP).

Les échantillons témoins ou traités sont incubés pendant 30 minutes à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sous lumière avant d'être inoculés en erlenmeyers ou en microplaques de façon à avoir $2 \cdot 10^4$ C/ml au départ. Les échantillons en erlenmeyers reçoivent en moyenne une lumière de 1530 lux alors qu'en microplaques, les algues reçoivent une lumière d'une intensité moyenne de 2000 lux.

Compte-tenu de l'étape de dilution, la concentration de PVP finale atteinte dans le milieu d'essai dépend de la concentration de la solution algale après 3 jours de préculture. Celle-ci est généralement comprise entre $1.5 \cdot 10^6$ et $2.5 \cdot 10^6$ C/ml. Sachant que la concentration cellulaire au début du test est de $2 \cdot 10^4$ C/ml, la concentration finale de PVP est comprise entre 0.04 et 0.07 % (p/v).

Deux systèmes d'essai ont été utilisés : erlenmeyers et microplaques.

En erlenmeyers, trois répétitions sont effectuées pour chaque traitement (avec et sans PVP) et la croissance de *S. capricornutum* est suivie par numération des échantillons témoins ou traités pendant 4 jours.

En microplaques, nous avons réalisé trois essais sur trois cultures différentes. Au niveau de chaque essai, il y a 6 répliqués témoins (sans PVP) et le même nombre de répliqués traités (avec PVP).

En microplaque, il n'est possible de faire qu'une seule détermination de la numération (après 3 jours). La durée de 3 jours a été choisie compte-tenu de l'évolution récente de certaines normes, en particulier celle d'Environnement Canada (1992).

IV-2-2) Résultats obtenus en microplaque

Sur le tableau XI figurent les numérations mesurées après 3 jours d'incubation en microplaques des algues fraîches en présence et en absence de PVP.

Les numérations obtenues satisfont aux critères de validité définis par la norme ISO qui préconise que la concentration cellulaire des solutions témoins doit avoir été multipliée par un facteur supérieur à 16 après 72 heures d'incubation (dans notre cas la numération doit donc être supérieure à 3.2×10^5 C/ml).

Tableau XI : Effet de la PVP sur la croissance algale en microplaque classique.

(* = différences significatives (test t, $p = 0.05$) entre les termes correspondants)

Essais	N° Microplaque	Traitement	Numérations (72 h) moyennes (n = 6) (10 ⁶ C/ml)		
Essai A	μplaque 1	Sans PVP	3.04	± 0.17	*
	μplaque 2	Avec PVP	4.09	± 0.24	
Essai B	μplaque 3	Sans PVP	2.64	± 0.22	*
	μplaque 4	Avec PVP	3.47	± 0.36	
Essai C	μplaque 5	Sans PVP	3.00	± 0.21	*
	μplaque 6	Avec PVP	3.59	± 0.10	

Nous notons, en microplaque, une augmentation significative des numérations obtenues après 3 jours de culture, entre les algues incubées en absence et en présence de PVP. La recherche d'une explication de cette observation sera abordée ultérieurement.

IV-2-3) Résultats obtenus en erlenmeyers

La figure 24 présente les courbes de croissance en erlenmeyers des algues témoins (sans PVP) et traitées (avec PVP). Nous pouvons observer qu'en erlenmeyers les algues traitées présentent la même cinétique de croissance que les algues témoins. Il n'y a pas dans ce cas de différence significative (test t à $p = 5\%$) entre leurs numérations respectives que ce soit à J₃ ou à J₄.

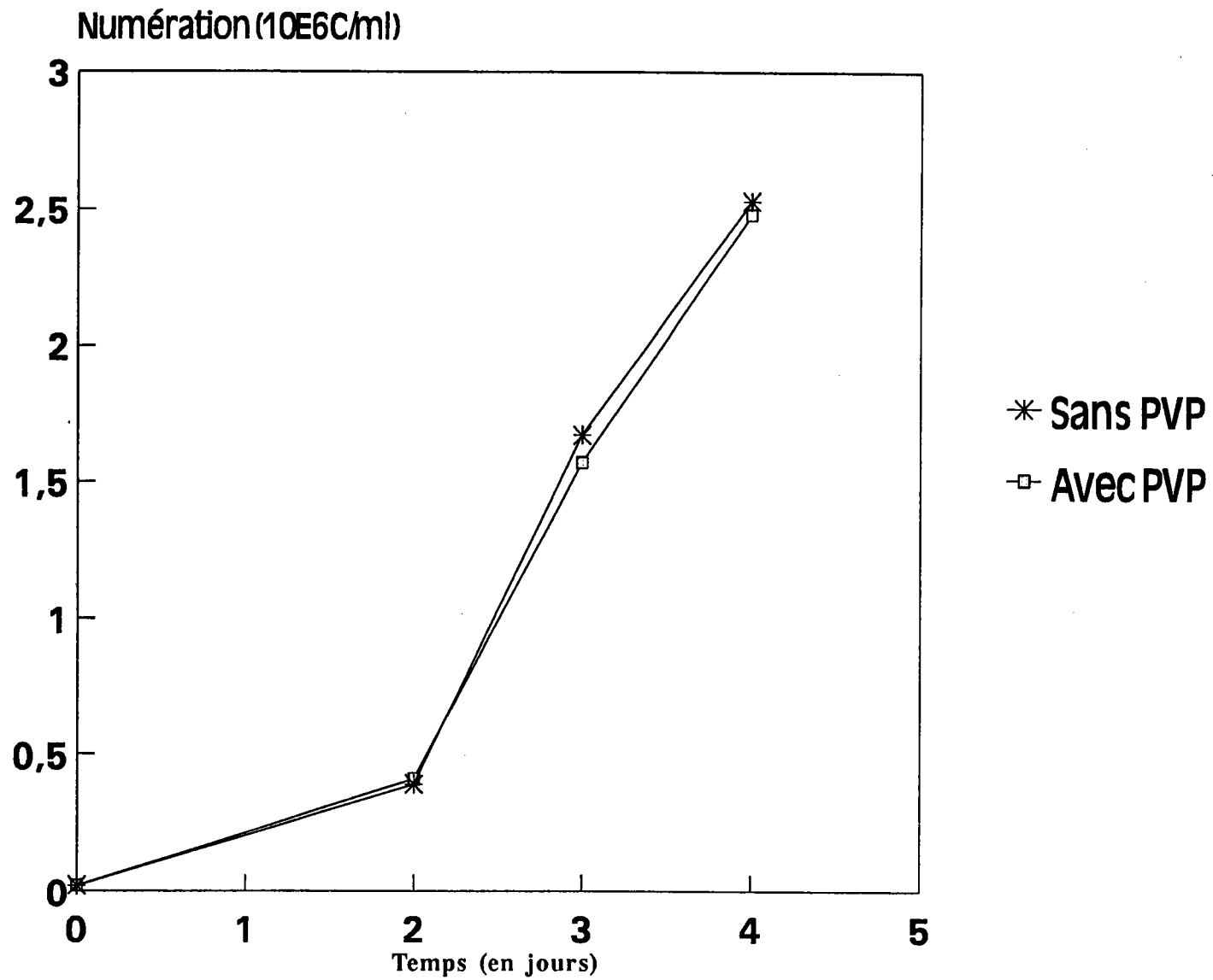


Figure 24 : Effet de la PVP sur la croissance de *Selenastrum*

IV-2-4) Discussion

Le fait qu'une différence significative entre les numérations des algues traitées et celles des algues témoins soit détectée en microplaque et pas en erlenmeyers, pourrait résulter du plus grand nombre de réplicats effectués en microplaques ($n = 6$) par rapport au système en erlenmeyers ($n = 3$). En effet il est d'autant plus facile de mettre en évidence une différence entre deux moyennes, que le nombre de réplicats est grand (Maul, communication personnelle).

Par ailleurs, les numérations cellulaires obtenues après 72 heures en microplaques, sont deux fois supérieures à celles obtenues en erlenmeyers. Ceci est, sans doute, dû au fait que les microplaques ont été incubées sous une lumière moyenne de 2000 lux en moyenne alors que les erlenmeyers ne recevaient qu'en moyenne 1530 lux. Il est possible que la différence observée, entre microplaques et erlenmeyers, soit due aussi à cette meilleure croissance, les effets bénéfiques (ou néfastes) se faisant alors plus sentir.

Quant à la cause de l'effet bénéfique de la PVP observé sur les témoins microplaques, différentes hypothèses peuvent être avancées :

- a) complexation de cations (nous verrons plus loin que cette hypothèse n'est pas plausible).
- b) métabolisation de la PVP sous l'effet conjugué d'une plus forte lumière et des exudats algals.

Il n'en demeure pas moins que dans les deux cas (en erlenmeyers et en microplaques), aucune toxicité de la PVP n'est détectée à la concentration testée (comprise entre 0.04 et 0.07 % p/v). Morris (1976a) avait montré que la PVP jusqu'à une concentration de 10 % (p/v) n'avait pas d'effet sur la viabilité de *Chlorella fusca* 211/8h. Ce n'est qu'à partir de 15 % (p/v) que la PVP provoque une légère diminution de la viabilité.

Malgré la légère stimulation de la croissance observée en microplaque, nous avons choisi de continuer à expérimenter ce protocole afin de pouvoir évaluer si la présence de quantités résiduelles de PVP peut avoir un effet sur la toxicité des métaux.

IV-3) Toxicité comparée en présence et en absence de PVP sur des algues fraîches.

Nous avons déterminé la toxicité de trois ions métalliques : le cadmium (Cd^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}) et le chrome (Cr^{6+}) en présence et en absence de PVP.

IV-3-1) Conditions de l'essai

La toxicité de ces trois produits de référence a été évaluée avec des algues fraîches en microplaque classique selon les conditions d'incubation de la norme ISO (1989).

Les algues témoins (sans PVP) et traitées (avec PVP) ont été préparées de la même façon qu'au paragraphe précédent, la concentration finale de PVP dans le milieu d'essai étant toujours comprise entre 0.04 et 0.07 % (p/v).

IV-3-2) Résultats

Le tableau XII présente les résultats des $\text{CI}_{50-72 \text{ h}}$, obtenues pour chaque toxique, en présence et en absence de PVP.

- Pour le cadmium, les $\text{CI}_{50-72 \text{ h}}$ trouvées sont respectivement de 41.2 et 38.5 ppb en absence et en présence de PVP. La comparaison des deux valeurs de CI_{50} (EPA, 1985) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la toxicité du cadmium en présence et en absence de PVP.

- Pour le cuivre, les $\text{CI}_{50-72 \text{ heures}}$, sont respectivement de 25.9 et 25.4 ppb en absence et en présence de PVP. La comparaison des deux $\text{CI}_{50-72 \text{ h}}$ permet de voir qu'il n'y a pas de différence significative.

Tableau XII : Toxicité du Cd⁺⁺, du Cu⁺⁺ et du Cr⁶⁺ pour *S. capricornutum*, en présence et en absence de PVP. Les CI₅₀ sont exprimées en (µg/l)

Toxique	CI ₅₀ (3 jours)	
	Sans PVP	Avec PVP
Cd ⁺⁺	41.2 [39.7 - 42.7]*	38.5 [36.9 - 39.9]
Cu ⁺⁺	25.9 [25.4 - 26.4]	25.4 [24.1 - 26.1]
Cr ⁶⁺	125.1 [120.5 - 129.5]	117.4 [108.2 - 126.2] **

(* intervalles de confiance à 95 % sur les ordonnées à l'origine des équations de régression linéaire pour les différentes CI₅₀)

(** différence significative, EPA, 1985)

- Pour le chrome, 125.1 et 117.4 ppb entraînent 50 % d'inhibition de la croissance algale respectivement en absence et en présence de PVP. Bien que les écarts des deux CI₅₀ se chevauchent, la comparaison des deux valeurs, à l'aide de la formule EPA (1985), montre une différence significative entre la toxicité du chrome en absence et en présence de PVP.

IV-3-3) Discussion

Concernant les résultats de toxicité du Cd⁺⁺, du Cu⁺⁺ et du Cr⁶⁺, nous pouvons observer, tout d'abord, que les CI_{50-72 h} sont généralement similaires à celles trouvées par d'autres auteurs. Thomas *et al.* (1986) ont ainsi trouvé, avec la même espèce, une CI_{50-72 h} de 41 ppb de Cd⁺⁺. Pour le cuivre, Chiaudani et Vighi (1978), ont observé que 34 ppb de Cu⁺⁺ entraînait 50 % d'inhibition de la croissance de *S. capricornutum* après 72 heures d'incubation. Les valeurs de CI₅₀ déterminées avec le chrome sont très voisines de celles publiées par Blaise (1986) qui a utilisé la même espèce.

D'autre part, les réponses toxiques obtenues (pour chaque métal) en présence et en absence de PVP sont très proches l'une de l'autre. Pour le Cd⁺⁺ et le Cu⁺⁺, il n'y a pas de différence significative entre les CI₅₀-72 h respectives. Pour le chrome, il y a bien sûr une différence significative mais la différence entre les deux CI₅₀-72 h est très faible. L'observation de l'étroitesse des intervalles de confiance permet de comprendre l'obtention de cette différence significative. Donc s'il y a une influence de la PVP, elle est, de toute manière, minime. Il faut remarquer que toutes les CI₅₀ obtenues en présence de PVP sont plus faibles qu'en présence de PVP alors qu'on aurait pu s'attendre au contraire. Ceci montre que la PVP résiduelle ne diminue pas la biodisponibilité du toxique et donc qu'il est possible d'utiliser, dans ces conditions, des algues cryopréservées dans les tests d'écotoxicité, sans avoir à éliminer la PVP.

IV-4) Toxicité comparée entre les algues fraîches et cryopréservées avec le cadmium.

IV-4-1) Conditions de l'étude

Les algues fraîches (avec PVP) sont préparées de la même façon que les algues congelées (cf. paragraphe VI-2). La congélation est faite comme précédemment (chap. III). Après décongélation à +37°C, les algues sont remises en suspension dans le milieu ISO sans lavage ou élimination de PVP.

La toxicité du cadmium est étudiée en deux systèmes :

- une microplaque classique où le test dure 72 heures en conditions statiques.
- une microplaque multiscreen où le test dure aussi longtemps, mais qui permet de procéder à un renouvellement du milieu toutes les 24 heures. Trois répétitions sont effectuées pour chaque type de microplaque avec la même culture-mère âgée de 3 jours et les tests se déroulent selon les conditions d'incubation de la norme ISO (1989). Les CI₅₀-72h ont été déterminées par dénombrement cellulaire et calcul de l'aire sous la courbe.

IV-4-2) Résultats

Les résultats moyens de trois essais sont présentés dans le tableau XIII pour les algues fraîches et les algues congelées, en conditions statique (microplaque classique) ou semi-statique (microplaque multiscreen). Il n'y a aucune différence significative (test t, $p = 5\%$) que ce soit entre les deux systèmes d'essai utilisés ou entre les algues fraîches et les algues congelées.

Tableau XIII : Comparaison de la sensibilité de *S. capricornutum*, fraîche et congelée au Cd⁺⁺. (Les CI₅₀ sont exprimées en (µg/l) et les numérations en cellules/ml).

Microplaque	CI ₅₀ Cd ⁺⁺ (3 jours)	
	Algues fraîches	Algues congelées
Classique (n = 3)	46.5 (± 7.59)* (2.73 x 10 ⁶)*	34.1 (± 14.1) (1.63 x 10 ⁶)
Multiscreen (n = 3)	36.3 (± 3.63) (2.68 x 10 ⁶)	28.1 (± 6.03) (1.63 x 10 ⁶)

(* Numérations moyennes des témoins (sans Cd⁺⁺) après 72 h d'incubation en microplaques classique ou Multiscreen)

(* Ecart-type de la moyenne de trois CI₅₀-72 h).

Aussi bien en microplaque classique qu'en microplaque multiscreen, les numérations des témoins (algues fraîches et algues congelées), satisfont aux conditions de la norme ISO qui préconise comme critère de validité un facteur multiplicatif supérieur à 16 pour les numérations des témoins en 72 h.

IV-4-3) Discussion

Dans cette étude comparative de la sensibilité, au Cd⁺⁺, de *S. capricornutum* avant et après congélation, nous avons choisi comme paramètre de réponse pour le calcul des CI₅₀, la méthode dite de l'aire sous la courbe proposée par Nusch (1982, 1983) et recommandée par la norme ISO 8692 (1989). Cette méthode se caractérise par sa simplicité, sa plus grande sensibilité et par l'obtention du maximum d'information sans avoir besoin de formuler des hypothèses sur le type de croissance (Nyholm, 1985).

La comparaison des résultats des essais en microplaque classique et en microplaque multiscreen, permet d'observer que les CI₅₀-72 h sont un peu plus élevées dans les microplaques classiques. Le rapport des CI₅₀-72h microplaque classique/microplaque multiscreen est en moyenne de 1.2. Avec des algues fraîches, Radetski *et al.* (1993) ont obtenu une CI₅₀-72 h (Cd⁺⁺) deux fois plus élevée en microplaque classique qu'en microplaque multiscreen. Dans notre cas, aucune différence significative n'est, cependant, détectée entre les CI₅₀ respectives obtenues avec les deux systèmes (test t, p = 5 %).

Concernant la reproductibilité, il faut remarquer que le système multiscreen fournit des résultats avec une meilleure reproductibilité. La reproductibilité est de 15.7 % pour la microplaque multiscreen et de 28.8 % pour la microplaque classique au cours des essais exposés dans ce chapitre.

Quant à la sensibilité des algues congelées par rapport aux algues fraîches, les algues congelées paraissent plus sensibles que les algues fraîches. Le rapport de CI₅₀ est en moyenne de 1.3. Mais, dans les deux cas (microplaques classique et multiscreen), nous ne notons aucune différence significative entre la sensibilité des algues fraîches et celle des algues congelées (test de t, p = 5 %).

La faisabilité d'un test algue utilisant des algues congelées, a donc été validée avec le Cd⁺⁺. Cette étude a montré que la réalisation d'un biotest algal avec un réactif biologique cryopréservé donne des résultats significativement similaires à ceux du test classique utilisant des algues fraîches. L'utilisation de la microplaque multiscreen permet, en outre, de réaliser des tests en conditions semi-statiques (renouvellement du milieu toutes les 24 heures). Dans le chapitre suivant, cette approche semi-statique sera élargie à d'autres toxiques.

CHAPITRE V

PROPOSITION D'UN PROTOCOLE DE MICROTEST SEMI-STATIQUE UTILISANT UNE ALGUE CRYOPRESERVEE : Le "Cryoalgotox".

V-1) Introduction

Afin d'appuyer la discussion des résultats acquis et de déterminer l'apport que peut représenter la mise au point d'un biotest semi-statique utilisant l'algue cryopréservée *S. capricornutum* comme réactif biologique, sur de plus larges données, il était nécessaire d'étendre nos essais à d'autres toxiques. Dans cet objectif, deux autres toxiques métalliques (Cu^{++} et Cr^{6+}) et un toxique organique (l'atrazine) ont été testés en plus du cadmium. L'étude conduite comparera le test statique en microplaque classique sur algues fraîches au test semi-statique sur algues congelées "Cryoalgotox". Nous aborderons aussi l'étude de l'effet de la durée de stockage sur la réponse toxique de l'algue cryopréservée.

V-2) Toxicité comparée entre le test microplaque classique et le "cryoalgotox".

V-2-2) Conditions de l'essai

La toxicité des quatre produits de référence a été évaluée, en microplaque classique avec des algues fraîches ou en microplaque multiscreen avec des algues congelées, selon les conditions d'incubation de la norme ISO (1989).

Les algues fraîches (avec PVP) sont préparées de la même façon que les algues congelées (cf. chapitre IV-2). La congélation est faite dans la vapeur d'azote liquide en deux étapes : à une vitesse de refroidissement moyenne de $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -30°C puis à $10.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -80°C . Après décongélation à $+37^{\circ}\text{C}$, les algues sont remises en suspension dans le milieu ISO sans lavage ou élimination de PVP.

Les essais de toxicité se déroulent selon la procédure décrite dans la 2^{ème} partie (chapitre II-5-2). Trois répétitions sont effectuées pour chaque type de microplaque.

V-2-3) Résultats.

En ce qui concerne les résultats de croissance des témoins algues fraîches (système classique) et algues congelées (cryoalgotox), le tableau XIV donne les résultats de croissance (après 72 heures d'incubation) des témoins des 24 essais de toxicité réalisés. Les pourcentages d'inhibition de croissance des algues congelées sont calculés par rapport aux témoins non congelés.

La comparaison de la croissance des algues fraîches et celle des algues congelées, sur la base des numérations moyennes (12 microplaques) obtenues après 72 h d'incubation, montre une différence significative (test t, $p = 5 \%$). Le pourcentage d'inhibition moyen de la croissance des algues congelées est de 22.3 % par rapport aux témoins non congelés.

La croissance des témoins au niveau d'une seule microplaque montre que le coefficient de variation varie de 8.5 à 9.5 % pour la microplaque classique et de 5.8 à 8.7 % pour la microplaque multiscreen ($n = 12$ puits pour chaque valeur rapportée).

L'étude de la reproductibilité des deux systèmes sur la base de la croissance des témoins de 12 microplaques permet, encore une fois, de voir que le système multiscreen se caractérise par un coefficient de variation (13.5 %) inférieur à celui obtenu en système de microplaque classique (17 %).

Concernant les résultats de toxicité, le tableau XV montre les résultats des CI_{50} obtenues pour le cadmium (Cd^{++}), le cuivre (Cu^{++}), le chrome (Cr^{6+}) et l'atrazine avec les coefficients de variation (C.V.) correspondants calculés sur la base de trois tests pour chaque système d'essai (microplaque classique et microplaque multiscreen). Nous avons aussi rapporté sur ce tableau le rapport CI_{50} -test classique/ CI_{50} -Cryoalgotox pour chaque toxique testé.

Tableau XIV : Résultats de croissance des témoins algues fraîches (microplaque classique) et congelées (microplaque multiscreen). Les numérations (72 h) sont exprimées en 10^6 cellule/ml.

		Test classique	Cryoalgotox
Essai 1	μ Plaques 1	1.78	1.57
	μ Plaques 2	2.28	1.57
	μ Plaques 3	1.82	1.72
Essai 2	μ Plaques 1	1.78	1.48
	μ Plaques 2	2.18	1.42
	μ Plaques 3	1.98	1.45
Essai 3	μ Plaques 1	1.59	1.27
	μ Plaques 2	1.79	1.19
	μ Plaques 3	1.83	1.30
Essai 4	μ Plaques 1	2.12	2.00
	μ Plaques 2	2.86	1.64
	μ Plaques 3	2.27	1.82
Moyenne		2.02 *	1.57 *
Ecart-type		0.34	0.21
Coefficient de variation		17 %	13.5 %

(* pas de différence significative entre les deux moyennes, test t, p = 5 %)

Ces résultats montrent qu'en microplaque classique les CI_{50-72} h des quatre produits testés se caractérisent par des coefficients de variation toujours supérieurs à ceux déterminés en microplaque multiscreen. Nous atteignons ainsi 22.5 % de variation en système classique alors que le maximum de variation obtenu en système "Cryoalgotox" est de 6.8 %.

Pour les quatre produits testés les valeurs des CI_{50-72} h calculées en système multiscreen (cryoalgotox) sont toujours inférieures à celles trouvées en système classique. Les rapports CI_{50} -test classique/ CI_{50} -cryoalgotox sont en moyenne de 1.4, 1.3, 1.9 et 1.8 respectivement pour le cadmium, le cuivre, le chrome et l'atrazine.

Tableau XV : Comparaison de toxicité entre le test statique en microplaque classique et le Cryoalgotox (test semi-statique en microplaque multiscreen).
Les CI_{50} -72 h sont exprimées en $\mu g/l$).

TOXIQUE TESTE	CI_{50} -72 h		RAPPORT TEST CLASSIQUE/CRYOALGOTOX
	TEST CLASSIQUE	CRYOALGOTOX	
Cd^{++}	43.3 40.2 47.0 X = 43.5* CV = 7.8 %	32.2 30.7 32.4 X = 31.8* CV = 2.9 %	1.4
Cu^{++}	30.8 29.4 25.4 X = 28.5* CV = 9.8 %	21.6 21.0 22.5 X = 21.7* CV = 3.5 %	1.3
Cr^{6+}	117.4 175.0 125.0 X = 139.1* CV = 22.5%	69.0 79.0 75.0 X = 74.3* CV = 6.8 %	1.9
Atrazine	165.0 127.0 201.0 X = 164.3* CV = 22.5 %	95.2 92.4 91.2 X = 92.9* CV = 2.2 %	1.8

(* différence significative entre les moyennes des CI_{50} respectives en système classique et cryoalgotox ; test t, p = 5 %)

Pour pouvoir confirmer ces principales indications, nous avons effectué une comparaison des valeurs de CI_{50} entre le système classique et le système cryoalgotox par un test t de Student. Les valeurs de t ($p = 5 \%$) ont mis en évidence une différence significative pour les quatre comparaisons réalisées entre les données de toxicité : à savoir celles du cadmium (Cd^{++}), du cuivre (Cu^{++}), du chrome (Cr^{6+}) et de l'atrazine.

Par ailleurs, nous avons comparé les CI_{50} Cd^{++} obtenues au chapitre précédent (tableau XIII) et ceux du tableau XV.

- Pour les algues fraîches en système classique, les CI_{50} obtenues dans les deux cas restent comparables et aucune différence significative n'a été décelée (test t, $p=5 \%$).

- Pour les algues congelées en système multiscreen, les CI_{50} cd^{++} restent également identiques au test t ($p=5 \%$).

V-3) Etude de l'effet du stockage sur la réponse toxique de *S. capricornutum*.

Pour évaluer la faisabilité complète de l'utilisation d'algues cryopréservées dans les tests de toxicité, il était nécessaire de déterminer l'effet de la durée de conservation à basse température sur la viabilité et la sensibilité aux toxiques de *S. capricornutum*. L'utilisation d'un inoculum (cryopréservé) standard et reproductible est, en effet, une condition nécessaire pour réaliser un test de toxicité.

V-3-1) Conditions de l'essai

Nous avons utilisé une culture âgée de 3 jours. La congélation est faite dans la vapeur d'azote liquide en deux étapes : à une vitesse de refroidissement moyenne de $1.5 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -30°C puis à $10.5 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -80°C . Les échantillons d'algues congelées sont conservés dans un congélateur à -80°C .

La décongélation de 3 échantillons (à $+ 37^{\circ}\text{C}$) est pratiquée à différents temps de conservation à -80°C (18, 28, 83 et 99 jours) en vue d'effectuer un test de toxicité. Nous avons utilisé le cadmium (Cd^{++}) comme toxique de référence. Les essais de toxicité se déroulent en système cryoalgotox dans les conditions d'incubation de la norme ISO de la même façon qu'au paragraphe précédent. Une $CI_{50-72 \text{ h}}$ est déterminée pour chaque durée de stockage.

V-3-2) Résultats

Le tableau XVI, présente les résultats des CI_{50} -72 h obtenues à chaque temps de conservation de même que les résultats de croissance des témoins congelés (numérations mesurées après 72 heures d'incubation).

Tableau XVI : Effet de la durée de conservation à $-80^{\circ}C$ sur la réponse toxique de *S. capricornutum*. (Les CI_{50} -72h (Cd++) sont exprimées en g/l et les numérations cellulaires en 10^6 cellules / ml).

Durée de conservation à $-80^{\circ}C$	CI_{50} -72 h (Cryoalgotox)	Numérations des Témoins
18 jours	42.5 [40.3 - 44.6]*	2.20
28 jours	37 [34.3 - 39.5]	2.15
83 jours	40 [38.7 - 41.3]	2.04
99 jours	34.8 [33.7 - 35.9]	2.95
Moyenne C.V.	38.6 8.7 %	2.34 17.8 %

(* Intervalles de confiance à 95 % sur les ordonnées à l'origine des équations de régression linéaire pour les différentes CI_{50})

Il apparaît que les réponses toxiques obtenues après différents temps de stockage à $-80^{\circ}C$ se caractérisent par des intervalles de confiances qui se chevauchent ou qui sont adjacents. La comparaison deux à deux des valeurs de CI_{50} (EPA, 1985) montre qu'il n'y a pas de différence significative pour quatre des six comparaisons réalisées. La différence est, en effet, significative entre la CI_{50} obtenue après 18 jours de conservation d'une part et celles obtenues respectivement à 28 et 99 jours de conservation d'autre part.

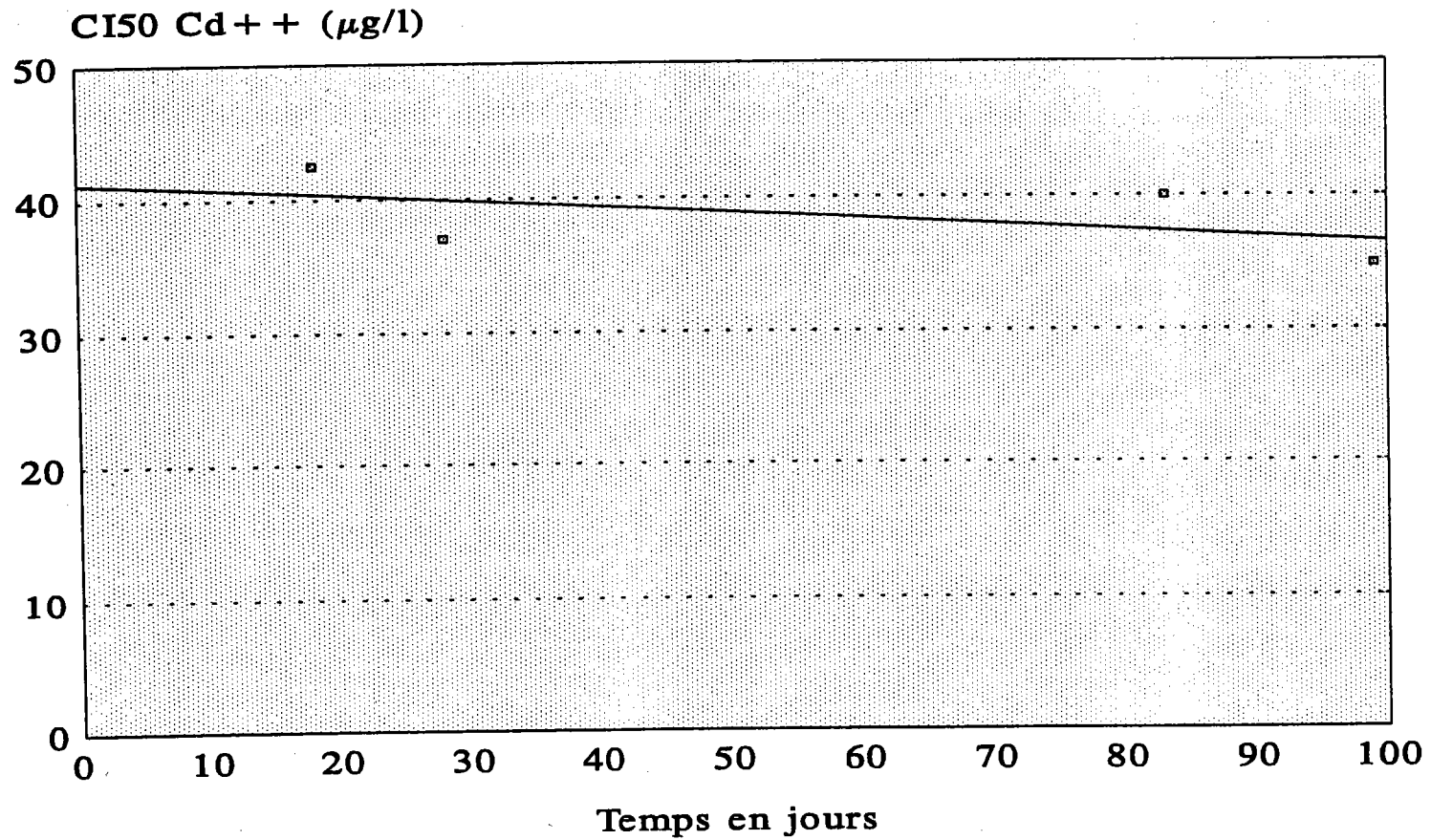


Figure 25 : Evolution de CI₅₀ cadmium en fonction du temps de stockage à -80°C.

La variation dans le temps (figure 25) montre qu'il y a une augmentation de la sensibilité avec le temps. En définitive le coefficient de variation des valeurs de la $CI_{50-72\text{ h}}$ (Cd^{++}) reste, cependant, acceptable puisqu'il est de 8.7 %.

Les résultats du tableau XVI, montrent aussi que la croissance des témoins (sans toxique) est relativement constante. Elle est en moyenne de 2.34×10^6 c/ml au bout de 72 heures d'incubation avec un coefficient de variation dans le temps de 17.8 %.

Contrairement à la méthode utilisée précédemment (Chapitres I, III et IV), ces résultats ont été obtenus avec une deuxième étape de congélation contrôlée et progressive ($10.5^\circ\text{C}/\text{min}$) de -30°C jusqu'à la température de stockage (-80°C). En terme de viabilité ce procédé reste équivalent à un transfert direct de -30 à -80°C .

V-4) Discussion générale

V-4-1) Comparaison entre le test microplaque classique et le "Cryoalgotox".

L'utilisation de la microplaque classique est actuellement assez fréquente, il était logique de comparer les résultats de ce test avec ceux obtenus avec le test en microplaque multiscreen. Les résultats de toxicité obtenus avec quatre substances de référence ont permis de déterminer 12 $CI_{50-72\text{ h}}$ pour chaque système d'essai.

Les valeurs des CI_{50} que nous avons trouvé en utilisant la microplaque classique (sans renouvellement) sont très voisines de celles publiées par Blaise (1986) pour le cuivre, le cadmium et le chrome. Pour l'atrazine, les CI_{50} déterminées en microplaque classique sont en bonne concordance avec celles trouvées par Stratton (1984) qui a utilisé l'algue *Scenedesmus quadricauda* et Altenburger *et al.* (1990) qui ont utilisé l'algue verte *Chlorella fusca*.

La comparaison entre les deux méthodes (statique et semi-statique) permet de mettre en évidence la meilleure sensibilité (significative) du système multiscreen pour les quatre tests réalisés. Cette meilleure sensibilité du système "cryoalgotox" peut s'expliquer par différents facteurs :

- Le renouvellement journalier du milieu assure une plus grande constance des concentrations des nutriments mais aussi des concentrations toxiques. Cette exposition en conditions semi-statiques permettrait de pallier aux pertes en toxiques qui sont dues à leur adsorption sur les parois de la microplaque et/ou à une biosorption par les algues.

- Vasseur *et al.* (1988), ont montré qu'en conditions statiques il se produit une alcalinisation croissante du milieu. Cette augmentation de pH, due à l'activité photosynthétique, peut avoir un effet sur la spéciation des cations métalliques et réduire leur toxicité. Faute d'électrodes adéquates, nous n'avons, malheureusement, pas pu faire des mesures de pH pour pouvoir comparer les deux systèmes. Cependant, nous pouvons supposer que le renouvellement quotidien du milieu assure une variation moindre de pH par rapport au test statique en microplaque classique.

- L'utilisation d'un réactif cryopréservé comme outil biologique du test "cryoalgotox" pourrait aussi expliquer la plus grande sensibilité du test "cryoalgotox", mais les résultats obtenus au chapitre IV viennent infirmer cette hypothèse.

V-4-2) Précision et reproductibilité du test "cryoalgotox".

La croissance des témoins après 72 heures d'incubation en microplaque multiscreen, montre que les résultats des numérations sont reproductibles. Les coefficients de variation obtenus (13.5 et 17.8 %) ne dépassent pas la limite de précision du test microplaque (classique) utilisant *S. capricornutum* à un coefficient de variation de 20 %.

La reproductibilité des CI_{50-72} h obtenues avec le cadmium, le cuivre, le chrome et l'atrazine est, elle aussi, acceptable : les coefficients de variation varient, en effet, entre 2.2 et 6.8 % (n = 3). Une constatation analogue a été faite par Radetski *et al.* (1993) et Férard *et al.* (1993) qui ont comparé le système multiscreen et la microplaque classique pour déterminer la toxicité de différents métaux. Ils ont, à cet égard, montré que la reproductibilité des CI_{50-72} h en microplaque multiscreen est au maximum de 12.5 % de variation alors qu'elle atteint une variation de 24.3 % pour la microplaque classique.

V-4-3) Effet du temps de stockage

La conservation pendant plus de 3 mois à -80°C n'aurait pas d'effet sur la croissance de *S. capricornutum* puisque les numérations cellulaires des témoins obtenues après 72 heures d'incubation ne diffèrent pas significativement (test t, $p = 5\%$) de celles obtenues avec des algues fraîches en microplaque classique (§ V-2). Elles satisfont aux conditions de validité de la norme ISO (1989) et d'Environnement Canada (1992).

La variation dans le temps des valeurs de $\text{CI}_{50-72\text{ h}}(\text{Cd}^{++})$ ne dépasse pas 8.7 %. Toutefois toutes les différences ne sont pas significatives. La conservation à -80°C et la durée de stockage semblent avoir peu ou pas d'effet sur la réponse toxique de *S. capricornutum*.

V-4-4) Comparaisons avec d'autres essais de toxicité

La comparaison de nos résultats (cryoalgotox) avec d'autres travaux sur les algues fraîches, en conditions pseudodynamiques (Jouany *et al.*, 1983) est illustrée au niveau du tableau XVII. Sur ce tableau sont reportés les rapports $\text{CI}_{50}\text{-test semi-statique ou pseudo-dynamique}/\text{CI}_{50}\text{-test statique}$ pour le cadmium, le cuivre et le chrome.

Il apparaît que ce rapport est plus important pour le test pseudo-dynamique (réalisé en erlenmeyers) que pour le test cryoalgotox. Pour le cadmium, ce rapport est davantage comparable que pour les deux autres métaux. L'explication de ces différences réside certainement dans la différence des deux systèmes d'essai.

Plusieurs études comparatives (Walsh *et al.*, 1982 ; Miller *et al.*, 1985 ; Thomas *et al.*, 1986 ; Blaise *et al.*, 1987 ; Greene et Peterson, 1989), ont montré que pour la plupart des composés chimiques (mis à part les pesticides) et pour les mélanges complexes, les algues étaient relativement sensibles. Toutefois, ces études comparent des tests aigus (test Microtox 30 minutes, test daphnies 48 ou 96 heures, test poisson 96 heures, etc...) avec le test algue qui est le plus court des test chroniques.

Tableau XVII : Comparaison des rapports CI50-test statique / CI50-test pseudo-dynamique pour le cadmium, le cuivre et le chrome.

RAPPORT-CI₅₀-72 H TEST STATIQUE / CI₅₀-72 H TEST

Toxique	CRYOALGOTOX (Algues congelées) (Microplaque)	PSEUDO-DYNAMIQUE ⁽¹⁾ (Algues fraîches) (Erlenmeyers)
---------	--	---

Cd ⁺⁺	1.4	1.8
------------------	-----	-----

Cu ⁺⁺	1.3	2.3
------------------	-----	-----

Cr ⁶⁺	1.9	3.9
------------------	-----	-----

(¹ D'après Jouany *et al.* (1983))

La seule étude qui regroupe des données permettant de comparer deux tests de toxicité chronique est celle réalisée par Ferard *et al.* (1992) qui ont étudié la toxicité de certains effluents en utilisant le test algue *S. capricornutum* (statique en microplaque classique) et le test *C. dubia* (reproduction 7 jours avec un renouvellement journalier du milieu). L'étude conclut que le test algue est plus sensible que le test céridaphnie si l'on considère que :

- au cours du test algue l'effluent est filtré, ce qui peut évidemment provoquer une perte de matériel toxique.

- l'effluent n'est apporté qu'une seule fois au début du test pour les algues, alors que le protocole expérimental du test *Ceriodaphnia* prévoit un renouvellement du milieu et de l'effluent tous les jours pendant 7 jours.

- Compte-tenu des coûts calculés respectifs, le rapport coût/sensibilité est indiscutablement en faveur du test algue par rapport au test *Ceriodaphnie*.

V-4-5) Limitations du test "Cryoalgotox"

Mis à part les inconvénients qui sont communs au test algue en général, on pourrait reprocher au test cryoalgotox le fait qu'il :

- utilise un matériel cryopréservé qui a subi un traitement de cryoprotection et de congélation-décongélation. Or, nous avons montré, au cours de cette étude que la sensibilité et la reproductibilité sont meilleurs avec ce réactif.

- nécessite un renouvellement journalier du milieu pendant 72 heures, ce qui constitue une contrainte technique supplémentaire.

Par ailleurs :

- Le test Cryoalgotox implique, en l'état actuel, l'utilisation d'un congélateur (-80°C)

Malgré cette difficulté, le test cryoalgotox permet d'alléger les coûts de maintien des cultures mères au laboratoire.

- Il est représentatif des tests ayant actuellement un bon rapport coût-efficacité (Ferard *et al.*, 1993).

- Il permet de réaliser un test en conditions semi-statiques et de se rapprocher plus des conditions naturelles d'exposition aux toxiques.

- Enfin, le test Cryoalgotox est moins "passéiste" que le test en erlenmeyers puisqu'il offre une possibilité d'automatisation.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le présent travail constitue une contribution aux études de plus en plus nombreuses visant, d'une part à s'affranchir des contraintes liées à l'entretien des cultures et, d'autre part, à simplifier les procédures des bioessais (Persoone, 1991), tout en mettant au point des tests miniaturisés, représentatifs, rapides et fiables (Blaise, 1984, 1991).

LE PREMIER OBJECTIF de notre étude a été la mise au point d'une méthodologie de cryopréservation de trois espèces algales dulçaquicoles fréquemment utilisées (*Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus*). Pour celà, nous avons d'abord étudié les effets séparés et simultanés de différents facteurs inhérents au procédé de cryopréservation (mode et vitesse de congélation, traitement cryoprotecteur, âge et conditions de préculture).

L'étude préliminaire des effets de deux facteurs extrinsèques (traitement cryoprotecteur et mode de congélation) a montré, sur deux espèces d'algues, que l'influence de ces deux facteurs est très importante. A titre d'exemple, l'inhibition de la croissance de *S. capricornutum* varie de 18 à 99 % selon les modalités étudiées.

Cette étude préliminaire a également montré que la protection, fournie par chaque type d'additif cryoprotecteur (saccharose, PVP ou méthanol) au cours d'un cycle de congélation-décongélation, dépend beaucoup du mode de congélation. En outre, les effets peuvent être classés comme suit selon qu'il y a ou non stockage :

- protection au cours de la congélation
 - Méthanol > PVP > Saccharose pour *S. capricornutum*
 - Méthanol > Saccharose > PVP pour *S. subspicatus*
- protection au cours du stockage
 - PVP > Saccharose > Méthanol pour les deux espèces

En définitive, les additifs extracellulaires (saccharose et PVP) ont moins d'effet protecteur, aux faibles vitesses de congélation, que les additifs pénétrants tels que le méthanol qui ne permet, par contre, aucun stockage.

L'étude intégrée de l'effet des facteurs intrinsèques (âge et conditions de préculture) et extrinsèques (vitesse de congélation et traitement cryoprotecteur) sur *S. subspicatus*, a permis d'améliorer grandement la viabilité de cette algue après cryopréservation (de 0 à 60 % de viabilité). L'étude statistique des interactions entre les trois facteurs traités nous a aussi permis de voir qu'il n'est pas possible de dissocier les effets des trois facteurs qui contribuent tous à la viabilité cellulaire après décongélation.

Cependant, cette étude fait apparaître toute l'importance de la phase de préculture dans le protocole de cryopréservation de *S. subspicatus* puisqu'on passe d'une viabilité presque nulle en conditions AFNOR de préculture (inoculum égal à $3 \cdot 10^6$ C/ml, photopériode, durée 7 jours) à 60 % de reprise sous les conditions ISO de préincubation ($2 \cdot 10^4$ C/ml d'inoculum, lumière continue, durée trois jours).

L'étude de l'effet de l'âge de la culture sur la viabilité de *C. vulgaris*, *S. capricornutum* et de *S. subspicatus* après congélation, a montré que l'on ne peut pas émettre de règles générales quant à la sensibilité d'une phase de croissance par rapport à une autre. Cet effet varie, en effet, selon l'espèce étudiée.

De cette première partie de l'étude, la conclusion principale est la suivante : quelle que soit l'efficacité d'un traitement, celui-ci ne peut pas être appliqué à toutes les algues avec le même succès. A chaque espèce algale va correspondre une méthodologie de cryopréservation qui lui sera spécifique.

Partant des résultats acquis au cours de cette première partie, nous avons étudié la faisabilité d'un TEST DE TOXICITE UTILISANT L'ALGUE CRYOPRESERVEE *S. capricornutum*. Nous avons utilisé, pour cela, des toxiques de référence (Cd^{++} , Cu^{++} , Cr^{6+} et atrazine) et un nouveau système d'essai en conditions semi-statiques pour évaluer la sensibilité du réactif cryopréservé et pour promouvoir son utilité potentielle en tant qu'outil d'évaluation de la toxicité chronique.

L'étude de faisabilité pour la réalisation d'un biotest avec l'algue cryopréservée *S. capricornutum* a permis de montrer que la présence d'un additif cryoprotecteur (la polyvinylpyrrolidone) dans le milieu d'essai, n'avait pas d'effet sur la biodisponibilité du toxique. Ce qui constitue un grand avantage quand on sait qu'il n'est pas nécessaire de procéder à un lavage préalable pour éliminer la PVP avant le début de chaque test.

La sensibilité des algues cryopréservées a ensuite été évaluée avec le cadmium. Sur trois essais provenant de trois précultures différentes, les résultats obtenus ne diffèrent pas significativement de ceux des tests classiques utilisant des algues fraîches. La croissance des témoins (algues congelées), satisfait aux conditions de validité de la norme ISO (facteur multiplicatif supérieur à 16 pour les numérations des témoins après 72 heures).

Enfin, nous avons conjugué l'utilisation d'algues cryopréservées et de microplaques Multiscreen (permettant de réaliser un test-algue semi-statique) au sein d'un nouveau système d'essai algal que nous avons appelé "Cryoalgotox". Nous avons comparé ce système avec le test classique en microplaques à l'aide de quatre toxiques différents (cadmium, cuivre, chrome et atrazine). Le cryoalgotox s'avère significativement plus sensible pour les quatre produits testés et le maximum de variation obtenu avec ce système d'essai est de 6.8%

La durée de stockage est, évidemment une donnée importante. Nous avons pu vérifier que la conservation pendant trois mois à -80°C n'avait pas d'effet sur la croissance du réactif cryopréservé. La variation dans le temps des CI₅₀ obtenues ne dépasse pas 8.7%.

En l'état, le coût minimal d'un test "cryoalgotox" peut s'estimer à 1370 F (cf. tableau XVIII) au lieu de 1160 F pour un test classique en microplaque. La différence peut sembler minime, mais il faut se souvenir que l'on gagne aussi en sensibilité, en reproductibilité et en représentativité écologique. Toutefois, ce coût peut encore être diminué si l'on n'utilise pas la procédure semi-statique et donc la microplaque multiscreen : dans ce dernier cas le prix de revient est encore réduit de 25 % (1027 F).

**Tableau XVIII : Coûts estimés des tests microplaque classique et Cryoalgotox.
(coûts exprimés en Francs Français).**

	TEST	
	CLASSIQUE	CRYOALGOTOX
Coût microplaque	10	100
Matériels (communs aux 2 tests)*	400	400
Matériel cryopréservation	0	100
Temps Renouvellement (1 heure technicien)	0	250
Temps Comptage (2 heures)	500	500
Temps Préparation* (1 heure)	250	20
Coût TOTAL	1160	1370→1027

* Calculs faits sur la base de 188 tests sur une durée de 3 mois (temps de stockage) à raison de 4 tests par semaine.

Le "cryoalgotox" ouvre ainsi une perspective intéressante dans le domaine de l'évaluation de la toxicité chronique vis-à-vis des algues. La sensibilité du réactif cryopréservé et la commodité expérimentale permettent d'envisager une utilisation de routine au laboratoire. Cette commodité porte surtout sur la possibilité d'initier des tests sans délai ou période préalable puisque l'étape de préculture (prévue par la plupart des protocoles normalisés) est incluse dans le procédé de cryopréservation. Un autre intérêt de cette méthode réside dans le fait de disposer d'un matériel portable permettant de discerner au cours des enquêtes inter-laboratoires entre les variances liées au matériel biologique (Vb) et celles relatives à l'environnement de l'essai (Ve). Cette remarque s'inspire de la formule développée par Soares *et al.* (1992) :

$$V_t = V_b + V_e + V_r$$

où :

Vt est la variance totale,

Vr est la "somme de toutes nos ignorances" (MAUL, communication personnelle).

Toutefois, il serait souhaitable d'entreprendre dans l'avenir des essais sur une durée de stockage supérieure à trois mois et d'étudier la faisabilité de la conservation à -20°C afin de pouvoir encore diminuer le coût des tests cryopréservés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- ADAMS N., GOULDING K. H. & DOBBS A. J., 1986,
Effect of acetone on the toxicity of four chemicals to *Selenastrum capricornutum*,
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36, 254-259.
- ALTENBURGER R., BÖDEKER W., FAUST M. & GRIMME L.H., 1990,
Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures
of chemicals,
Ecotoxicology & Environmental Safety, 20, 98-114.
- AFNOR, 1980,
Essais des eaux - Détermination de l'inhibition de croissance de
Scenedesmus subspicatus par une substance,
Norme expérimentale T 90-304, 6p.
- AFNOR, 1983
Determination of toxic effect (of chemical compounds) on the growth
of a marine diatom : *Skeletonema costatum*,
Marine water bioassay, Draft method (second issue) T 95 E doc 40, 6p.
- ALLEN-AUSTIN D., AUSTIN B. & COLWELL R. R., 1984,
Survival of *Aeromonas salmonicida* in river water,
Microbiology Letters, 21, 143-146.
- ANCHORDOGUY T.J., RUDOLPH A.S., CARPENTER JF. & CROWE J.H., 1987,
Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids
during freezing,
Cryobiology, 24, 324-331.
- ASHER A. & SPALDING D., 1982,
"Culture Centre of Algae and Protozoa, List of strains"
Institute of Terrestrial Ecology, Natural Environmental Research
Council, Cambridge.
- ASHWOOD-SMITH M. J., 1985,
Genetic damages is not produced by normal cryopreservation procedures
involving either glycerol or dimethyl sulfoxide : A cautionary note,
however, on possible effects of dimethyl sulfoxide,
Cryobiology, 22, 427-433.
- BASTIEN C. & COTE R., 1989a,
Effets du cuivre sur l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda*
et *Chlorella vulgaris*,
Int. Revue ges. Hydrobiol., 74, 1, 51-71.

- BASTIEN C. & COTE R., 1989b,
Variations temporelles de l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* exposée au cuivre lors d'une expérience à long terme,
Int. Revue ges. Hydrobiol., 74 (2), 207-219.
- BEN-AMOTZ A. & GILBOA A., 1980a,
Cryopreservation of marine unicellular algae. I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio,
Mar. Ecol. Prog. Ser., 2, 157-161.
- BEN-AMOTZ A. & GILBOA A., 1980b,
Cryopreservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance,
Mar. Ecol. Prog. Ser., 2, 221-224.
- BENHRA A., 1988,
Essais de lyophilisation de *Chlorella vulgaris* (Chlorophycée) dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des micropolluants,
D. E. A. de toxicologie de l'environnement, Université de Metz.
- BHANDAL I.S., HAUPTMANN R.M. & WIDHOLM J.M., 1985,
Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells,
Plant Physiol., 78, 430-432.
- BLAISE C., 1984,
Développement de bioessais sublétaux pour les évaluations écotoxicologiques des effluents, Thèse de doctorat, Université de Metz, 172p.
- BLAISE C., 1986,
Micromethods for acute aquatic toxicity assessment using the green algae *Selenastrum capricornutum*,
Tox. Assess., 1, 377-385
- BLAISE C., 1991,
Microbiotests in aquatic ecotoxicology : characteristics, utility and prospects,
Environ. Tox. & Water Quality, 6, 154-155.
- BLAISE C. LEGAULT R., BERMINGHAM N., VAN COLLIE R. & VASSEUR P., 19
A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity testing assessment,
Tox. Assess., 1, 261-281.

- BLAISE C., VAN COLLIE R., BERMINGHAM N. & COULOMBE G., 1987,
Comparaison des réponses de trois indicateurs biologiques
(bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents de
fabriques de pâtes et papiers,
Sciences de l'Eau, 3 (1), 9-17.
- BONALY J., BARIAUD A., DURET S. & MESTRE J.C., 1980,
Cadmium cytotoxicity and variation in nuclear content of DNA in
Euglena gracillis,
Physiol. Plant, 49, 286-290.
- BONIN D.J., DROOP M.R. , MAESTRINI S.Y. & GONIN M.C., 1986,
Physiological features of six micro-algae to be used as indicators of
seawater quality,
Cryptogamie Algologie, 7, 23-83.
- BOURRELLY P., 1966,
Les algues d'eau douce, Initiation à la systématique.
Tome I: Les algues vertes, Société nouvelle des éditions Boubée,
Paris, 6^{ème} édition, 209p.
- BOYLE T. P., 1984,
The effect of environmental contaminants on aquatic algae,
In "Alga as biological indicators", 8, 237-357,
L. ELLIOT SHUBERT (ed), Academic Press, London LTD.
- BRANDTS, 1967, cité par MORRIS, 1980.
- BRINGMANN G. et KUHN R., 1980,
Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria,
algae and protozoa in the cell multiplication inhibition test,
Wat. Res., 14, 231.
- BROUERS M., COLLARD F., JEANFELS J. & JEANSON A., 1982,
Immobilization and stabilization of green and blue green algae in
crosslinked serumalbumin glutaraldehyde and in polyurethane matrices,
1, 134-139 *In "Photochemical, photoelectrochemical and photobiological
processes"*, HALL D. O. & PALZ W. (eds), (Dordrecht: Reidel
Publishing Co.).
- BOUTRON P. & KAUFMANN A., 1978,
Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-
diméthylsulfoxide,
Cryobiology, 15, 93-108.
- BOUTRON P. & KAUFMANN A., 1979,
Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-
ethylene glycol,
Cryobiology, 16, 83-89.

- BOWN M.S. & REUTER F.W., 1974,
Freezing of non woody plant tissue. III.- Videotape and the correlation between individual cellular freezing events and temperature changes in the surrounding tissue, *Cryobiology*, 11, 185-191.
- BURCH M. D. & MARCHANT H. J., 1983,
Motility microtubuls stability of Antarctic algae at sub-zero temperatures, *Protoplasma*, 115, 240-242.
- BUTLER M., HANSKEWA. E. J. & YOUNG M. M., 1980,
Cooper tolerance in the green alga, *Chlorella vulgaris*, *Plant, Cell and Environment*, 3, 119-126.
- CALLEGARI J. P., VAN DEN BROECK L., SIMKENS E., DE WANNEMAEKER B. & SIMON J. P., 1986,
Growth kinetics and photosynthetic O₂ - evolution by *Chlorella* immobilized in Ca-Alginate, 399-402,
In "Progress in Photosynthesis Research", 4, BIGGENS J. (ed), (Dordrecht : Martinus Nijhoff publishers), Boston/Lancaster.
- CALLOW R. A. & McGRATH J. J., 1985,
Thermodynamic modeling and cryomicroscopy of cell-size, unilamellar and paucilamellar liposomes, *Cryobiology*, 22, 251-267.
- CAUX P.-Y., BLAISE C., LEBLANC P. & TACHE M., 1991,
A phytoassay procedure using fluorescence induction, *Environ. Tox. and Chem.*, 11, 549-557.
- CEE, 1988,
Méthodes de détermination de l'écotoxicité - niveau 1.
Essai d'inhibition de la croissance des algues, EEC Directive 87/302, Partie C, Journal officiel des communautés européennes, n° L 133, Bruxelles, Belgique, 89-93.
- CHIAUDANI G. & VIGHI M., 1978,
The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies, *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 21, 316-329.
- CLAESSION, 1975; cité par WALSH et MERRILL, 1984.
- CLARKE A., LEESON E. A & MORRIS G. J., 1986,
The effects of temperature on ⁸⁶Rb uptake by two species of *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae), *Journal of Experimental Botany*, 37 (182), 1285-1293.

- CROWE L.M., CROWE J.H., RUDOLPH A. WOMERSLEY C. & APPEL L., 1985,
Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose,
Arch. Biochem. & Biophys., 242, 240-247
- DAILY W. A. & McGUIRE J. M., 1954,
Preservation of some algal cultures by lyophilization
Butler Univ. Bot. Study, 11, 139-143.
- DIXON W. L., FRANKS F. & REES T., 1981,
Cold lability of phosphofructokinase from potato tubers,
Phytochemistry, 20, 969-972.
- DOR I., 1987,
Preservation and microscopy of Blue-green algae (Cyanobacteria)
on dry agar,
Botanica Marina, 30, 507-510.
- EPA, 1971,
Algal Assay Procedure Bottle test, Environmental Protection
Agency, 82p.
- EPA, 1985,
Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater
and marine organisms,
EPA/600/4-83/013, 3ème édition, 216p.
- EPA, 1989,
Algal, *Selenastrum capricornutum*, growth test, method 1003.0,
p. 147-174,
In "Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of
Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms", Rapport
n°600/4-89/001, 2^{ème} édition.
- Environnement Canada, 1992,
Biological Test Method : Growth Inhibition Test Using the
Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*,
Rapport EPS, Environnement Canada, Ottawa, 42 p.
- FELDMANN J., 1978,
Les Algues, p.95-320,
In "Précis de botanique" 1- Végétaux inférieurs, Masson, Paris,
2^{ème} édition.
- FELTHMAN R.K. A., POWER A. K. PELL P. A. & SNEATH P. H. A., 1978
Simple method for storage of bacteria at - 76 °C,
J. Appl. Bact., 44, 313-316.

- FERARD J. F., COSTAN G., BERMINGHAM N. & BLAISE C., 1992,
Comparative assessment of effluents with *Ceriodaphnia dubia* and
Selenastrum capricornutum chronic toxicity tests,
Second Meeting SETAC-Europe, Postdam, 22-24 juin 1992.
- FERARD J.F., BENHRA A., RADETSKY C. & BLAISE C., 1993,
Cryoalgotox : A new semi-static phytotoxicity test with
cryopreserved algae,
Communication faite au 2^{ème} symposium de la SETAC Europeen,
Berlin.
- FERARD J.F., 1986,
Aspects de la toxicité et de l'adsorption du cadmium chez l'algue
Chlorella vulgaris, Thèse d'état, Université de Metz, 222 p.
- FORSBERG A. & CLAESSON A., 1981,
Algal assays with waste-water to determine the availability of
phosphorus for algal growth,
Verh. Internat. Verein. Limnol., 21, 763-769.
- FRANKS F., 1981,
Biophysics and Biochemistry of low temperatures and freezing,
p. 3-19, In "Effects of low temperatures on biological membranes",
MORRIS G. J. & CLARKE A. (eds), Academic Press, London/newYork.
- FRANKS F. & HATELEY R.H.M., 1985,
Low temperature unfolding of chymotrypsin,
Cryoletters, 6, 171-180.
- GARBER M.P. & STEPONKUS P.L., 1976,
Alterations in chloroplast thylakoid during an in vitro
freeze-thaw cycle,
Plant Physiol., 57, 673-680.
- GAZEAU C. M., 1983,
Influence de la température et de la durée d'un traitement
cryoprotecteur sur la résistance au froid de plantules de blé.
Etude ultrastructurale des ébauches foliaires,
Can. J. Bot., 60, 1025-1051.
- GAZEAU C.M. & DEREUDDRE J., 1986,
Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire,
Bull. Soc. Bot. Fr. - Actual. Bot., 133 (3), 41-64
- GIBSY P. E. RAO K. K. & HALL D. O., 1987,
Entrapment technique for chloroplasts, cyanobacteria and hydrogenases,
Methods in enzymology, 135, 440-454.

- GREENE J.C & PETERSON S.A., 1989,
Comparative toxicological assessment of hazardous chemical wastes using *Daphnia magna*, *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*,
Transboundary pollution, October 28 - November 2, Society of Environmental Toxicology & Chemistry, , Tenth annual Meeting, Toronto, Canada.
- GROUT B.W.W. & MORRIS G. J., 1987,
Freezing and cellular orgaization, 147-175,
In "The effects of low temperatures on the biological systems", 4,
GROUT B.W.W. & MORRIS G.J. (eds), Edward Arnold (Publishers) Ltd, London(England)/Victoria (Australia)/Maryland(USA).
- HAALAND P. T. & KNUTSON G., 1973,
Growth experiments with *Selenastrum cpricornutum* Printz., 69-72,
In "Algal assays in water pollution research", Proceedings of Nordic Symposium, osmo, Norway. Norforsk, Secretariat of environment Sciences,
- HARPER R. D., 1986,
cité par ROBINSON *et al.*, 1986.
- HASSALL K. A., 1962,
A specific effect of cooper on the respiration of *Chlorella vulgaris*,
Nature, 193 (6), p90
- HATANO S., 1978,
Studies on frost hardiness in *Chlorella ellipsoidea* : effects of antimetabolites, surfactants, hormones and sugars on the hardening process in the light and dark, 175-196, In "Plant cold hardiness and freezing stress", LI S. & SAKAI A. (eds), Academic Press, New York/London.
- HATANO S., SADAKANE H., TUTUMI M. & WATANABE T., 1976,
Studies of frost hardiness in *Chlorella ellipsoidea*
I- Development of frost hardiness of *Chlorella ellipsoidea* in synchronous culture,
Plant & Cell Physiol., 17, 451-458.
- HEBER U., TYANKOVA L. & SANTARIUS K. A., 1971,
Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino-acids,
Biochim. Biophys. Acta, 241, 578-589.
- HEBER U., TYANKOVA L. & SANTARIUS K. A., 1973,
Effect of freezing on biological membranes in vivo and in vitro,
Biochem. Biophys. Acta, 291, 23-37.

- HEBER U., SCHMITT J.M., KRAUSE G.H., KLOSSON R.J. & SANTARIUS K. A., 1981,
Freezing damage to thylakoid membranes in vitro and in vivo, 263-283, *In "Effects of low temperature on biological membranes"* MORRIS G.J. & CLARKE A. (eds), Academic Press, London.
- HERTZBERG S. & JENSEN A., 1989,
Studies of alginate-immobilized marine microalgae, *Botanica Marina*, 32 fasc. 4, 267-273.
- HINCHA D.K. & SCHMITT J.M., 1985,
Mechanical and chemical injury to thylakoid membranes during freezing in vitro, *Biochem. Biophys. Acta*, 812, 173-180.
- HOLM-HANSEN O., 1963a,
Viability of Blue-green and Green algae after freezing, *Physiologia Plantarum*, 16, 530-540.
- HOLM-HANSEN O., 1963b,
Effect of varying residual moisture content on the viability of lyophilized algae, *Nature*, 198, 1014-1015.
- HOLM-HANSEN O., 1964,
Viability of lyophilized algae, *Canadian Journal of Botany*, 42 (2), 127-137.
- HOLM-HANSEN O., 1967,
Factors affecting the viability of lyophilized algae, *Cryobiology*, 4 (1), 17-23.
- HWANG S. & HORNELAND W., 1965,
Survival of algal culture after freezing by controlled and uncontrolled cooling, *Cryobiology*, 1, 305-311.
- ISO, 1988,
water quality - Marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaedactylum triconutum*,
Draft proposal ISO 10 253, 147/SC 5/WG 5 N 120, 10p.
- ISO, 1989,
Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*,
Norme internationale ISO 8692,
International Organization for Standardization, Genève, Suisse, 5p.
- JANSZ E. R. & MACLEAN F. I., 1973,
The effect of cold shock on the blue-green alga *Anacystis nidulans*, *Can. J. Microbiol.*, 19, 381-387.

- JAENICKE R., 1981,
Enzymes under extremes of physical conditions,
Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 10, 1-67.
- JOUANY J.M., FERARD J.F., VASSEUR P., GEA J., TRUHAUT R. & RAST C.,
1983,
Interest of dynamic tests in acute ecotoxicity assessment in algae,
Ecotoxicol. Environ. Safety, 7, 216-226.
- KEMI, 1989,
The microtest battery - A manual for routine tests of growth
inhibition,
Report to the Swedish National Chemicals Inspectorate,
Printgraf, Stockholm, Suède, 27p.
- KESSLER A., 1978,
Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the
genus *Chlorella* - XII Starch hydrolysis and key for the identification
of 13 species,
Arch. Microbiol., 119, 13-16.
- KIRSOP B. & HENRY J., 1984,
Developpment of a miniaturised cryopreservation method for the
maintenance of a wide range of yeasts,
Cryoletters, 5, 191-200.
- KRAMER C-R., SCHELENZ T, ARNDT H., DOMASCHKA G. & TRÜMPER L., 198
Quantitative structure-activity relations for the growth inhibition
of *Chlorella vulgaris* suspensions by 3-substuted 1-aminoguanidines
and O-alkylcarbamates,
Biochem. Physiol. Pflanzen, 178, 469-477.
- KRAUSE G.H., KLOSSON R.J., JUSTENHOVEN A. & AHRER-STELLER A., 1984,
Effects of low temperatures on the photosynthetic system in vivo,
349-358, In "Advances in photosynthesis research", vol. 4, SYSBEMA C.
(ed), Martinus Nijhoff/ Junj, The Hague.
- LACAZE J.C., CHESTERIKOFF A. & GARBAN E., 1989,
Bioévaluation de la pollution des sédiments de la Seine
(région Parisiène) par l'emploi d'un bioessai basé sur la
croissance à court terme de la microalgue *Selenastrum*
capricornutum Prinz,
Revue des sciences de l'eau, 2, 405-427
- LATTA R., 1971,
Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing,
Can. J. of Bot., 49, 1253-1254.

- LEBESQUE Y. & DUBREUIL P., 1983,
Cellules immobilisées,
Bio-Sciences (revue française de microbiologie appliquée et de
biotechnologie),
2 (7), 107-114.
- LEESON E. A., CANN J. P. & MORRIS G.J., 1984,
Maintenance of algae and protozoa,
In "Maintenance of microorganisms", 131-160, KIRSOP B. E. & SNELL
J.J.S. (eds), Acad. Press, London.
- LEISCHMAN A., GREENE J. & MILLER E., 1979,
*In "Bibliography of literature pertaining to the genus *Selenastrum*",*
U.S. Environmental Protection Agency, Report 600/9-79-021, 1-192.
- LEVITT J., 1972,
Responses of plants to environmental stresses, vol. I,
KOZŁOWSKI T. T. (ed), New York/London/Toronto/Sydney/San Francisco,
2nd edition, 697pp.
- LOVELOCK J. E., 1953,
The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing,
Biochem. Biophys. Acta, 10, 414-426.
- LOVELOCK J. E., 1954
The protective action of neutral solutes against haemolysis by
freezing and thawing,
Biochem. J., 56, 265-270.
- LUKAVSKY J., KOMAREK J., LUKAVSKA A., LUDVIK J. & POKORNY J., 1986,
Metabolic activity and cell structure of immobilized algal cells
(*Chlorella*, *Scenedesmus*),
Arch. Hydrobiol. Suppl., 73 (2), 261-279
- LUYET B. J. & GEHENIO P. M., 1940,
Life and death at low temperature,
Biodynamica, Normandy, MO, p. 341.
- LUKAVSKY J., 1988,
Long-terme preservation of algal strains by immobilization,
Arch. Protistenkd., 135, 65-68.
- LYONS J. M., 1973,
Chilling injury in plants,
Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 445-466.
- LYONS J. M., RAISON J. K. & STEPONKUS P. L., 1979,
The plant membrane in response to low temperature, 1-24,
In "Low temperature stress in crop plants : the role of the membrane",
LYONS J. M., GRAHAM D. & RAISON J. K. (eds), Academic Press, New York.

- MackENZIE A. P., 1977,
Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems,
Philosophical Transactions of the Royal Society London B,
278, 167-189.
- MADDOX A.D., CONSALVES F., SHIELDS R., 1983,
successful preservation of suspension cultures of three *Nicotiana*
species at the temperature of liquid nitrogen,
Plant Science Letters, 28, 157-162.
- MAUL A., 1992,
Applications of generalized linear models to the analysis of
toxicity test data,
Environmental Monitoring & Assessment, 23, 153-163.
- McGRATH J. J., 1978, cité par LEESON *et al.*, 1984.
- MEYER M. A., 1985,
Cryopreservation of marine diatom, Phd thesis, Texas A & M University,
112p.
- MILLER W.E., GREENE J.C. & SHIZOYAMA T., 1978,
The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test,
U.S. Environmental Protection Agency, rapport 600/9-78-018, 126 p.
- MILLER W.E., PETERSON S.A., GREENE J.C. & CALLAHAN C.A., 1985,
Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing
hazardous waste sites,
J. Environ. Qual., 14, 569-574.
- MOHARPATA S. S., POOLE R. J. & DHINDSA R. S., 1987
Cold acclimation, freezing resistance and protein synthesis in
alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Saranac),
Journal of Experimental Botany, 38 (195), 1697-1703.
- MORRIS G. J., 1976a,
The cryopreservation of *Chlorella* : 1. interaction of rate of cooling,
protective additive and warming rate,
Arch. Microbiol., 107, 57-62.
- MORRIS G. J., 1976b
The cryopreservation of *Chlorella* : 2. effect of growth temperature on
freezing tolerance,
Arch. Microbiol., 107, 309-312.
- MORRIS G. J., 1978,
Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by the method of
tow-step cooling,
Br. Phycol. J., 13, 15-24

- MORRIS G. J., 1980,
Plant cells, *In* "Low temperature preservation in medicine and biology", 253-283, ASHWOOD-SMITH M. J. & FARRANT J. (eds), Pitman Medical Ltd, Kent, U.K.
- MORRIS G.J., 1987,
Direct chilling injury, *In* "the effects of low temperatures on biological systems" B.W.W. GROUT & G.J. MORRIS (eds), Edward Arnold (Publishers) Ltd, London(England)/Victoria (Australia)/Maryland(USA).
- MORRIS G. J. & CLARKE A., 1977,
The cryopreservation of *Chlorella* : 3. Effect of heterotrophic nutrition on freezing tolerance,
Arch. Microbiol., 114, 249-254.
- MORRIS G. J. & CANNING C. E., 1978,
The cryopreservation of *Euglena gracilis*,
J. Gen. Microbiol., 108, 27-31
- MORRIS G. J. & CLARKE A., 1987,
Cells at low temperature, 73-119,
In "The effects of low temperatures on biological systems"
GROUT B.W.W. & MORRIS G.J. (eds), Edward Arnold (Publishers) Ltd, London(England)/Victoria (Australia)/Maryland(USA).
- MORRIS G. J., COULSON G. E. & ENGELS M., 1986,
A cryomicroscopic study of *Cylindrocapsa brevissonii* de Bary and two species of *Micrasreriaceae* Ralfs (Conjugatophyceae, Chlorophyta) during freezing and thawing,
J. of Experimental Botany, 37 (179), 842-856.
- MOSS B., 1973,
The influence of environmental factors on the distribution of fresh-water algae : an experimental study. I- Introduction and the influence of the calcium concentration,
J. Ecol., 60, 917-932.
- NAG K. K. & STREET H. A., 1975a,
Freeze preservation of cultured plant cells, 1. The pretreatment phase,
Physiol. Plant., 34, 254-260.
- NAG K. K. & STREET H. A., 1975b,
Freeze preservation of cultured plant cells, 1. The freezing and thawing phases,
Physiol. plant., 34, 261-265
- NUSCH E. A., 1982,
Evaluation of growth curves in bioassays,
ISO/TC 147/SC 5WG5 N62 Nederlands Normalisatie-instituut, Delft, The Netherlands.

- NUSCH E. A., 1983,
Document ISO,
ISO/TC 147/SC 5WG5 N76 Nederlands Normalisatie-institut,
Delft, The Netherlands.
- NYGAARD G., KOMAREK J., KRISTIANSEN J. & SKULBERG O. L., 1986,
Taxonomic designations of bioassay algal NIVA-CHL1 (*Selenastrum
capricornutum*) and some related strains,
Orepa Botanica, 90, 1-46
- NYHOLM N., 1985,
Response variable in algal growth inhibition tests - biomass or
growth rate ?,
Water Res., 19, 237-279.
- O'BRIEN P.Y. & DIXON P. S., 1976,
The effects of oils and oil components on algae: A review
Br. Phycol. J., 11, 115-142.
- OCDE, 1984,
Algues, test d'inhibition de croissance,
*In Lignes directrices de l'O.C.D.E. pour les essais des produits
chimiques*,
201, O.C.D.E., Paris, France.
- ONO T. A. & MURATA N., 1981,
Chilling susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans* -
1. Effect of growth temperature,
Physiology, 67, 176-181.
- PALMER C.M., 1969, cité par STOERMER E. F., 1984.
- PANDARD P. & VASSEUR P., 1992,
Biocapteurs pour le contrôle de la toxicité des eaux :
application des bioélectrodes algales,
Revue des Sciences de l'Eau, 5, 445-461.
- PATRICK *et al.*, 1968, cité par WHITTON, 1984.
- PERSOONE G. & VAN DE VEL A., 1987,
Cost-analysis of 5 current aquatic ecotoxicological tests,
Report EUR. 1134EN, Environment and quality of life.
Commission of the european Communities,
DGXI-Environment, Consumer Protection and Nuclear Safety, 119 p.
- PERSOONE G., 1991,
Cyst-based toxicity tests : I- A promising new tool for rapid
and cost effective toxicity screening of chemicals and effluents,
German Journal for Applied Zoology, 78 (2), 235-241.

- PICKET R., 1893,
De l'emploi méthodique des basses températures en biologie,
Arch. Sc. Phys. Nat., série 3, 30, 393-314.
- PLANAS D., 1975,
Distribution and productivity of the phytoplankton in Spanish
reservoirs,
Verh. Int. Verein. Limnol., 19, 1860-1870.
- PLATTNER H. F., SCHMITT W. M. & BACHMAN L., 1972,
Freeze-etching of cells without cryoprotectants,
J. Cell Biol., 53, 116-126
- PRINGSHEIM, 1946, cité par LEESON *et al.*, 1984.
- PYLIOTIS N. A., GOODCHILD D. J. & GRIMME L. H., 1975,
The regreening of nitrogen-deficient *Chlorella fusca*
II- Structural changes during synchronous regreening,
Arch. Microbiol., 103 (3), 259-270.
- QUINN P. J., 1985,
A lipid phase separation model of low temperature damage to
biological membranes,
Cryobiology, 22, 128-146
- RACHLING J. W., JENSEN T.E., BAXTER M. & JANI V., 1982,
Utilization of morphometric analysis in evaluating responses of
Plectonema boryanum (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals,
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 11, 323-333.
- RADETSKY C.M., 1992,
Mise au point d'un test algue semi-statique,
D.E.A. de Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz.
- RADETSKY C.M., FERARD J.F. & BLAISE C., 1994,
A semi-statique microplate-based phytotoxicity test,
A paraître dans *Environ. Tox. Chem.*
- REYNOLDS J. H., MIDDLEBROOKS E. J., PORCELLA D. B. & GRENNEY W.J., 1
Effects of temperature on the growth constants of
Selenastrum capricornutum,
Journal of the Water Pollution Control Federation, 47, 2420-2436.
- REYNOLDS C.S., WISEMAN S.W., GODFREY B.M. et BUTTERWICK C., 1983,
Some effects of artificial mixing on the dynamics of phytoplankton
population in large limnetic systems,
J. Plank. Res., 5, 203-234.
- ROBINSON P. K., MAK A L. & TREVAN M. D., 1986
Immobilized algae : A review,
Process Biochemistry, august, 122-127.

- ROWE A. W., LENNY L. L. & MANNONI P., 1980?
Cryopreservation of red cells and platelets,
In "Low temperature preservation in medicine and biology",
ASHWOOD-SMITH M. J. & FARRANT J. (eds), Pitmann Medical Ltd,
Kent, U.K.
- RYAN M. M. & SMITH K. O., 1974,
Simple, inexpensive method for controlled freezing of cell cultures,
Applied Microbio., 27, 616-617.
- SASSEN A., VAN EYDEN-EMONS A., LAMERS A. & WANKA F., 1970,
Cell wall formation in *Chlorella pyrenoidosa* : a freeze-etching study,
Cytobiol., 4, 373-382.
- SIMATOS D., BLOND G. & SAUVAGEOT Ph., 1977,
La lyophilisation, principes et applications,
Collection de l'A. N. R. T., Dijon.
- SKULBERG O.L. 1964,
Algal problems related to the eutrophication of European water
supplies, and a bioassay method to assess fertilization influence
of pollution on inland waters, p. 262-299,
In "Algae and man", JACKSON D.F.(Ed.), Plenum Press, New-york.
- SKULBERG O.L., 1967,
Algal cultures as a means to assess the fertilizing
influence of pollution, 1, 113-127
In "Int. Conf. Wat. Pollu. Res.", 3, Munich, Water Pollution
Control Federation (ed), Washington D-C.
- SOAREZ A.M.V.M., BAIRD D.J. & CALOW P., 1992,
Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* straus
in chronic bioassays,
Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1477-1483.
- STEPONKUS P. L., 1981,
Responses to extreme temperature, 12, 372-393
In "Physiological Plant Ecology I - Responses to the
physical environment", LANGE O; L., NOBEL P.S., OSMOND C.B. &
ZIEGLER H. (eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York?
- STOERMER E.F., 1984,
Qualitative characteristics of phytoplankton assemblages, 3,
49-68; In "Alga as biological indicators", L. ELLIOT SHUBERT
(ed), Academic Press, London LTD.
- STRATTON G. W., 1984,
Effects of herbicide atrazine and its degradation products, alone
and in combination, on phototrophic microorganisms,
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13, 35-42.

- STRATTON G. W., 1987,
The effects of pesticides and heavy metals towards phototrophic microorganisms,
Reviews in environmental toxicology, 3, 71-147,
- STRAUSS G., SCHR TENBERGER P. & HAUSER H., 1986,
The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles : stabilization during freeze-thawing and freeze-drying,
Biochem. Biophys. Acta, 858, 169-180.
- SUZUKI S. & KARUBE I., 1983,
Energy production with immobilized cells, 4, 281-310,
In "Applied biochemistry and bioengineering", Academic Press, Inc.
- TAO D. & LI P. H., 1986,
Classification of plant cell cryoprotectant,
J. Theo. Biol., 123, 305-310.
- TISCHNER R., HEISE K. P. NELLE R. & LORENZEN H., 1978,
Changes in pigment content, lipid pattern and ultrastructure of synchronous *Chlorella* after heat and cold shocks,
Planta, 139, 29-33.
- THOMAS J. M., SKALSKI J.R., CLINE J.F., McSHANE M.C., SIMPSON J.C., MILLER W.E., PETERSON S.A., CALLAHAN C.A. & GREENE J.C., 1986,
Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays,
Environmental Toxicity & Chemistry, 5, 487-501.
- TOWILL L. E. & MAZUR P., 1976,
Osmotic shrinkage as a factor in freezing injury in plant tissue cultures,
Plant Physiol., 57, 290-296.
- TRUMP B. F., YOUNG D. E., ARNOLD E. A., & STOWELL R. E., 1965,
Effects of freezing and thawing on the structure, chemical constitution, and function of cytoplasmic structures,
Cryobiology, ?, 144-168.
- VASSEUR P., PANDARD P. & BURNEL D., 1988,
Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*,
Tox. Assess., 3, 331-343.
- VOLESKY B., 1993,
Advances in biosorption of metals,
In FEMS symposium "Metals-Microorganisms relationships & applications", p.22, Arsenal Metz, France.

- WALSH G. E., DUKE K.M., & FOSTER R. B., 1982,
Algae and crustaceans as indicators of bioactivity of industrial wastes,
Water Res., 16, 879-883.
- WALSH G. E. & MERRILL R.G., 1984,
Algal bioassays of industrial and energy process effluents,
In "algae as biological indicators", L ELLIOT SHUBERT . (ed),
Academic press, London LTD.
- WATANABE A., 1959,
Some devices for preserving Blue-green algae in viable state,
J. Gen. Microbiol., 5 (3), 153-157.
- WHITTON B.A., 1984,
Algae as a monitors of heavy metals in freshwaters.
In "algae as biological indicators", L. ELLIOT SHUBERT (ed),
Academic Press, London LTD.
- WILSON J. M., 1987,
Chilling injury in plants, 270-291,
In "The effects of low temperature on biological systems",
GROUT B.W.W. & MORRIS G J. (eds), Edward Arnold (Publishers)
Ltd, London(England)/Victoria (Australia)/Maryland(USA).
- WITHERS L. A., 1980, cité par GAZEAU et DEREUDDRE, 1986.
- WITHERS L. A. & KING P.J., 1979,
Proline. A novel cryoprotectant for the freeze preservation of
cultured cells of *Zea mays* L.,
Plant Physiol., 64, 675-677.
- WONG P.T.S. & COUTURE P., 1986,
Toxicity screening using phytoplankton, chap.4,
In "Toxicity testing using microorganisms", vol.II, DUTKA B.J.
et BITTON G. (Eds), CRC Press inc., Boca Raton.

ANNEXE 1

Equation de la regression multiple calculée sur la base des données de croissance en milieu liquide.

Variabes	Coefficients	Contributions	Résiduelles	T. Carré	DL	Fischer	Variances
Terme constant	1.25558	12.61191	2.48694	5.05	7	5.59	407.41
X1	- .97950	7.67536	1.62221	4.73	6	5.99	247.94
X2	.63333	3.20888	1.30487	2.45	5	6.61	103.66
X1X2	- .57625	2.65651	.96696	2.74	4	7.71	85.81
X3	.49916	1.99333	.62484	3.19	3	10.13	64.39
X1X3	- .14808	1.39824	.23809	5.87	2	18.51	45.17
X2X3	.20475	.33538	.14080	2.38	1	161.40	10.83
X1X2X3	- .13266	.14080	.00000	Test impossible			4.54
<hr/>							
Variance intragroupe des essais : .0928674145							

ANNEXE 1 (suite)

Equation de la regression multiple calculée sur la base des données de croissance sur milieu solide.

Variables	Coefficients	Contributions	Résiduelles	T. Carré	DL	Fischer	Variances
Terme constant	1.52145	18.51868	4.28075	4.32	7	5.59	58.40
X1	-1.43529	16.48049	2.24746	7.33	6	5.99	51.97
X3	.67062	3.59790	1.97737	1.81	5	6.61	11.34
X2	.63795	3.25592	1.65774	1.96	4	7.71	10.26
X1X3	- .58445	2.73273	1.29941	2.10	3	10.13	8.61
X1X2	- .55912	2.50096	.69863	3.57	2	18.51	7.88
X2X3	.33229	.88334	.51392	1.71	1	161.40	2.78
X1X2X3	- .25345	.51392	.00000	Test impossible			1.62
<hr/>							
Variance intragroupe des essais : .0951191							

USE OF A FACTORIAL DESIGN TO OPTIMIZE THE VIABILITY OF THE ALGA *SCENEDESMUS SUBSPICATUS* AFTER CRYOPRESERVATION

A. Benhra , J.F. Ferard* & P. Vasseur.

Laboratoire de Toxicologie, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, 1 rue des Recollets, 57000 Metz, France.

* Corresponding author

Summary

In order to optimize the viability of *Scenedesmus subspicatus* cells after cryopreservation, the influence of different factors - pre-culture conditions, cryoprotectant treatment and cooling rate - were studied by means of a complete factorial design. Only 1 of the 8 tested combinations gave good recoveries in solid and liquid viability tests.

Key-words: Algae, cryopreservation, polyvinylpyrrolidone, methanol, sucrose, factorial design.

INTRODUCTION

The maintenance of algal strains in laboratories, by regular transfers into fresh media, is labour-intensive and allows for the possibility of accidental contaminations and genetic variations (1). In order to avoid these problems, attempts have been made to develop procedures for the conservation and storage of strains and stock cultures.

Although it offers several potential advantages (2), lyophilisation was not applicable to eukaryotic algae because of the very low recoveries of viable cells after freeze drying treatments (3, 4, 5). On the other hand, freeze thawing treatments provided better recoveries for various types of freshwater and marine algae (6, 7). The rate of survival following stresses of freezing and thawing was influenced by different intrinsic and extrinsic factors (1): Unicellular algal cells taken in the exponential phase of growth (days 2-5) were more sensitive than those from older (> day 6) cultures (7, 8); the recovery after freezing of *Chlorella emersonii* was enhanced from 0 to 38% when the growth temperature was reduced from 20 to 4°C (1, 9); growth medium with suboptimal concentrations of nitrate, phosphate and calcium reduced cell yield and increased recovery rate upon thawing (10). Other factors such as the type and the concentration of cryoprotective additives (11), the rates of cooling and warming (4), the final temperature reached during cooling (12) also had an effect on the response of cells to stresses of freezing and thawing.

The aim of this work is to demonstrate the interest of a complete factorial design (2³) in determining the better conditions for the cryopreservation of the green alga *Scenedesmus subspicatus* SAG 86.81. In this prospect, different preculture conditions, cryoprotective additives and freezing methods were studied.

MATERIAL AND METHODS

Cells :

S. subspicatus SAG 86.81, was grown in Lefevre Czarda medium (oligo L.C.): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 40 mg/l, KNO_3 100 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/l, K_2HPO_4 40 mg/l, supplemented with oligo-elements: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.015 mg/l, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.030 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.030 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.030 mg/l, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.030 mg/l, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.030 mg/l, H_3BO_3 0.030 mg/l, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)\text{Fe}$ 0.8125 mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3125 mg/l, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3125 mg/l.

Preculture conditions:

Algal cultures were routinely maintained at 22° C for 7 days with a 16-h light/8-h dark cycle. Two different preculture conditions were selected differing by age and cell concentration.

a) Condition C1 corresponds to a culture in exponential growth phase : cells were grown according to ISO 8692 (13), i.e. at 22° C for 3 days under a continuous illumination of 1530 Lux with a low inoculum (2×10^4 cells/ml) from a 7-day old culture.

b) Condition C2 represents a culture in early stationary phase : cells were grown according to AFNOR 90304 (14), i.e. at 22° C for 7 days with a photoperiod of 16 hours light/8 hours darkness with a 10 % (v/v) inoculum ($4 \pm 1 \times 10^6$ cells/ml) from the same 7-day old culture as used for C1.

Cryoprotective treatment:

Two different cryoprotective additives were prepared in purified water (Milli Q). The first is a simple 20 % sucrose solution; the second is a mixture of polyvinylpyrrolidone solution (PVP), sucrose and methanol. A 10 % (w/v) PVP, average molecular weight 40,000 (SIGMA, 9003-398) was first buffered with 0.01 M HEPES using a back titration to a pH 7.0 with KOH; sucrose (MERCK, 7653) and methanol (> 98 %) solutions were then added to give a final concentration of 20 % (w/v) sucrose and 6 % (v/v) methanol.

These different solutions were added to an equal volume of cell suspension in a 4.5 ml cryotube (Nunc, 363452) to give the required final additive concentrations : a) 10% sucrose b) 5% PVP + 10% sucrose + 3% methanol. The resulting cell suspensions were kept over an equilibrium period of 30 min, at 22° C under light.

Freezing and thawing:

Cells were cooled in a minicooler (Nicoool LM 10) at two different rates:

- a) a slow rate ($\approx 1.5^\circ\text{C} / \text{min}$) until -30°C , followed by a fast freezing ($\approx 10.5^\circ\text{C} / \text{min}$) until -80°C
- b) a fast rate ($\approx 10.5^\circ\text{C}/\text{min}$) until -80°C .

After a storage period of 10 days in a -80°C freezer (Rua CT 190K, 150 LH), the cell suspensions were thawed rapidly in a water bath at $+ 37^\circ\text{C}$ until the last visible crystals of ice melted.

Viability assays and algal responses:

Cell viability, after a freezing–thawing cycle, was assessed by measuring algal growth on either liquid or solid medium in triplicates. Liquid (oligo-L.C.) medium was used and inhibition of growth was estimated according to ISO 8692 (13), using cell counting (Coulter counter ZM) after 48 and 96 hours of incubation. The agar plate method (8) was used to determine the recovery of cells on solidified oligo-L.C. medium (1.5 % agar).

Algal responses were measured by two different ways :

- a) the calculated areas under the growth curve after 96 hours using algal enumerations (E) in liquid medium.
- b) the counts of colonies (C) after 14 days of growth on solid medium.

Controls (unfrozen experiments) were performed systematically in triplicates for each experiment with corresponding preculture conditions and cryoprotective treatments.

Complete factorial design and statistical analysis:

Factorial experiments were conducted by testing each controlled variable (pre-culture conditions, cryoprotectant treatment and cooling rate) at two different levels. Their combinations lead to conduct 8 experiments simultaneously ($2 \times 2 \times 2$). Each level was coded in standard units (-1 and +1).

X_1 (preculture conditions) = -1 for C1 (ISO conditions), and $X_1 = +1$ for C2 (AFNOR conditions)

X_2 (cryoprotective treatment) = -1 for S (sucrose), and $X_2 = +1$ for SPM (mixture of sucrose, PVP and methanol)

X_3 (freezing method) = -1 for M1 (two-step slow-cooling method), and $X_3 = +1$ for M2 (one-step fast-cooling method)

Multiple regression analysis was used to model the observed responses of the factorial design by an equation of the polynomial form:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

Where Y is the calculated value from the model,

X_1 , X_2 and X_3 are the controlled factors,

b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{23} and b_{123} are the regression coefficients,

X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 and $X_1X_2X_3$ are the terms expressing interaction,

Multiple regression analysis consisted in evaluating the b_i regression coefficients of the polynomial (15). A coefficient was considered significantly different from zero when the ratio $b_i Y_i / s_k^2$ was superior to Fisher's F value with 1 and 16 degrees of freedom at 5% risk (Y_i was the contrast associated with the variable X_i , and s_k^2 was the estimation of residual variance).

RESULTS AND DISCUSSION

Results are reported in table 1. In liquid medium, algal viability was expressed as area under the growth curve after 96 hours using algal enumerations (E). On solid medium, viability is estimated by the percentages of colony formation (C) related to the number of particles enumerated under microscope after treatment.

The algal cells displayed (table 1) marked specific differences in survival according to the three studied factors : freezing methods, preculture conditions and cryoprotective treatments. Best recoveries were obtained with experiment 4, where the results were at least two times greater than in the other experiments.

1) Fitting the complete model to the experimental data

Percentages of enumerated cells in liquid medium (E) and colony formation on solid medium (C) were computed and the corresponding equations were :

$$E = 12.56 - 9.80(X_1) + 6.33(X_2) - 5.76(X_1X_2) + 4.99(X_3) - 4.18(X_1X_3) + 2.05(X_2X_3) - 1.33(X_1X_2X_3)$$

$$C = 15.21 - 14.35(X_1) + 6.71(X_3) + 6.38(X_2) - 5.84(X_1X_3) - 5.59(X_1X_2) + 3.32(X_2X_3) - 2.53(X_1X_2X_3)$$

The two assessment endpoints (E and C) showed similar patterns e.g. controlled factor X_1 appeared at the first rank in the E and C expressions and the signs of the different terms were always identical.

2) Testing the regression parameters

The reduced models i.e. with only the significant coefficients were the following :

$$E = 12.56 - 9.80(X_1) + 6.33(X_2) - 5.76(X_1X_2) + 4.99(X_3) - 4.18(X_1X_3) + 2.05(X_2X_3)$$

$$C = 15.21 - 14.35(X_1) + 6.71(X_3) + 6.38(X_2) - 5.84(X_1X_3) - 5.59(X_1X_2)$$

Statistical interpretation of data clearly confirms the similarity of patterns and the significance of single terms (X_1 , X_2 or X_3). Their influence is discussed in details below.

3) Effect of preculture conditions (independent variable X_1)

Whatever the assessment endpoint (cell counts in liquid or on solid media) and other conditions related to independent variables X_2 and X_3 , recovery was always superior with ISO pretreatment conditions (3-day old culture with a continuous illumination and a low inoculum) than with AFNOR pretreatment conditions (7-day old culture with a photoperiod and a greater inoculum).

Table 1 : Algal responses to the freezing methods (X_3) after different preculture conditions (X_1) and cryoprotective treatment (X_2). See text for explanations regarding X_1 , X_2 and X_3 . S=sucrose, SPM=mixture of sucrose, PVP and methanol.

Experiment N°	Independent variables			Algal growth			
	X1	X2	X3	Liquid culture (E)		Solid culture (C)	
1	ISO	S	Slow 2steps	3.9	4.5	3.6	10.9
				3.9		18.2	
				5.6		10.9	
2	ISO	S	Fast 1step	21.1	16	51.1	24.3
				19.5		13.8	
				7.6		8.00	
3	ISO	SPM	Slow 2steps	19.6	21.9	23.8	23.1
				23.3		19.4	
				22.7		26.2	
4	ISO	SPM	Fast 1step	46.0	47	67.7	60
				43.8		64.5	
				51.2		47.7	
5	AFNOR	S	Slow 2steps	2.1	2.1	0	0
				2.4		0	
				1.8		0	
6	AFNOR	S	Fast 1step	1.9	2.3	0	0
				2.9		0	
				2.0		0	
7	AFNOR	SPM	Slow 2steps	1.9	1.8	0	0
				1.8		0	
				1.7		0	
8	AFNOR	SPM	Fast 1step	5.0	4.8	1	0.3
				4.9		0	
				4.6		0	

The fact that the ISO preculture conditions (which provide exponentially-growing cells) contribute to more resistance to freezing damage with *S. subspicatus* cells can then be explained, not only by the age of the culture (72-hour old cells), but also by differences in cell concentrations and illumination procedures. All these factors directly affect medium characteristics and mainly cellular physiology such as cell size, degree of vacuolation, lipid content and degree of unsaturated membrane fatty acids (1).

Our results are in disagreement with other results (8), where cells of the green alga *Chlorella* 211/7a from an exponential growth phase (days 2-5) were more sensitive to freezing and thawing damages than cells from a stationary growth phase (>day 6). But with carrot plant cells, it has been observed (11) that it is important to use exponentially-growing plant cells, developing minimum degree of vacuolation and minimum cell size. The fact that in our case we observed better viability recoveries with exponentially growing cells could be explained by the observation of less lipid in the exponential phase of algae growth.

In this respect, it has been suggested (8) that differences in recovery following freezing and thawing during the growth-cycle of *Chlorella* 211/7a are mainly due to alterations in cellular physiology rather than to changes in growth medium. For example, the resistance to freezing damage of *Chlorella* 211/8h, after an induction of reduced metabolic rates, has been explained by an accumulation of lipid resulting in a reduction of vacuole size, rather than specific alterations in the degree of unsaturation of the membrane fatty acids (10).

4) Effect of cryoprotective treatment (independent variable X2)

Generally, the use of a combination of 3 cryoprotectants (SPM) gave better recoveries than the use of sucrose (S) alone. Only in one case (experiment 7) was the area under the curve for cell counting slightly less important for the SPM mixture than for the corresponding sucrose treatment (see Table 1).

These results showed that the addition of PVP and methanol to sucrose increased the recovery of algal cells. Sucrose is known to be a semi-penetrating compound (16): it only penetrates the cell wall and produces a slight cell plasmolysis prior to freezing. Moreover, it forms a buffer layer between the cell wall and the plasmalemma to protect its outer surface, by mitigating the mechanical pressure of growing ice on plasmalemma. PVP is a strict non-penetrating cryoprotectant (17) : it does not penetrate the algal cell wall. PVP becomes concentrated as the ice crystals form, and it inhibits the rate of ice formation as soon as the medium freezes. On the other hand, methanol is a penetrating reactant (18) which essentially enables protection of cellular organites and membranes against freeze-induced excess dehydration. Also, it reduces salt toxicity by maintaining high levels of unfrozen water at sub-zero temperatures.

The more effective protection obtained with the use of a mixture of sucrose, PVP and methanol (SPM) at the defined concentrations could be related to the combined cryoprotection properties of the three components.

The SPM cryotreatment mixture allows the presence of cryoprotectant in the external medium (PVP), thereby delaying ice formation and reducing salt concentration (23). Sucrose penetrates between the plasmalemma and cell wall and acts directly on membrane phospholipids to prevent dehydration effects (24). The uptake of methanol into the cells also enables protection of internal cytomembranes and proteins of cellular matrix (25). The mechanism of cryoprotection afforded by methanol may also be associated with its high coefficient of permeability (26).

5) Effect of freezing method (independent variable X3)

The use of a one-step fast-cooling method gave, in most cases, better recoveries than a two-step slow-cooling procedure.

The two-step cooling procedure has been used successfully by different authors, but with some differences related to the intermediate and final temperatures, and to the cooling rate (4, 8, 9, 19). Our results contrast those of MORRIS (7), who reported that a two-step cooling procedure was less injurious to *Chlorella* 211/8h cells than a one-step method.

However, at a slow rate of cooling, large extracellular ice crystals are formed. This removal of water (in ice form) may then produce hypertonic solutions to which cells are exposed for a longer period of time than in a fast cooling procedure (19). It could be possible that, for *S. subspicatus*, the exposure to concentrated extracellular medium is damaging and leads to cell death.

6) Interactions

Three significant interactions have been found, clearly showing the importance to simultaneously test the three controlled factors.

The X_1X_2 interaction (with a negative coefficient) shows an obvious beneficial effect when the product X_1X_2 is negative: this appears clearly in table I in the case where ISO preculture conditions ($X_1 = 1$) and SPM cryoprotective treatment ($X_2 = +1$) were used in association.

Likewise, the X_1X_3 interaction shows a positive effect on the recovery of algae when ISO preculture conditions ($X_1 = 1$) and a one-step fast-cooling method ($X_3 = +1$) were used.

The X_2X_3 interaction, solely found with enumeration, confirms that SPM cryoprotective treatment ($X_2 = +1$) associated with a rapid cooling method ($X_3 = +1$) gives better results than other combinations.

To our knowledge, it is the first time that some interactions are clearly and statistically observed. An interaction between protective additive and rate of cooling have been mentioned (8) but not correctly proved. Such an interaction (X_2X_3) appears statistically significant in this study.

7) Comparison with corresponding unfrozen controls

For each experiment, results of corresponding controls are presented in tables 2 and 3. Algae grew better under ISO than AFNOR preculture conditions. But there was only a significant difference (t test, $p=5\%$) in liquid medium when sucrose (S 10) was used as cryotreatment.

Comparison between control and cryopreserved cultures in liquid or solid media appeared generally significantly different, except for the condition SPM-ISO-Fast cooling. These results confirm previous results obtained with the factorial design.

Moreover, the percentage of viabilities obtained with a fast cooling rate, a SPM treatment and a preculture under ISO standard conditions were quite near 100% (89.7 and 86.8) showing that these conditions were poorly injurious to *S. subspicatus* cells.

Table 2 : Comparison of cryopreserved *S. subspicatus* on liquid medium with the corresponding unfrozen control.

Liquid culture (E)						
(Area under the growth curve)						
Cryotreatment	Culture conditions	Control	Cryopreserved		% Viability ^(a)	
			Slow cooling	Fast cooling		
SPM	ISO	52.4 ± 1.3	21.9* ±2	47 ± 3.8	41.8	89.7
SPM	AFNOR	31 ±15	1.8* ±0.1	4.9* ±0.2	5.8	15.7
S10	ISO	51.4 ± 4.4	4.5* ±1	16* ± 7.4	8.7	31.2
S10	AFNOR	33.3 ± 3	2.1* ± 0.3	2.3* ± 0.6	6.3	6.8

* significantly different of the corresponding control (t-test, p=5%)

(a) Viability calculated on the basis of the liquid enumerations (area under the growth curve), normalized to the survival of the corresponding unfrozen control.

Table 3 : Comparison of cryopreserved *S. subspicatus* on solid medium with the corresponding unfrozen control.

Solid culture						
(% of colony developed)						
Cryotreatment	Culture conditions	Control	Cryopreserved		% Viability ^(b)	
			Slow cooling	Fast cooling		
SPM	ISO	69.1 ± 16.2	23.1* ±3.7	60 ±10.7	33.3	86.8
SPM	AFNOR	52.6 ± 1.9	0* ± 0	0.3* ± 0.6	0	0.6
S10	ISO	89.4 ± 11	10.9* ± 7.3	24.3* ± 22.7	12.2	27.9
S10	AFNOR	70.9 ± 10	0* ± 0	0* ± 0	0	0

* significantly different of the corresponding control (t-test, p=5%)

(b) Viability calculated on the basis of the number of the colonies developed on solid medium, normalized to the survival of the corresponding unfrozen control.

8) Expression of viability tests

Colony formation on solid medium has been classically used in cryopreserved algal studies (1,6,9). This method, however, is much more stressful than liquid culture as shown by some studies in microbiology (20, 21). Another reason to give greater importance to results obtained with enumeration in liquid culture is the large variability of colony formation results.

CONCLUSION

In conclusion, the results presented here indicate the feasibility of preserving *S. subspicatus* cell suspension cultures at -80°C. Attention has been paid to an appropriate pre-growth of cells, cryoprotectant addition and cooling rates. All these factors have been found to be very important for a good and successful recovery of algae.

Finally, highest survival of *S. subspicatus* cells frozen to and thawed from -80°C has been achieved :

- using cells precultivated under ISO conditions (low inoculum 2×10^4 cells/ml and a continuous illumination for three days),
- with a fast cooling rate of $\sim 10^\circ\text{C}/\text{min}$,
- with a SPM mixture as cryoprotective treatment.

Exponentially-growing cells are more resistant than stationary cells. There is at least an additive effect of cryoprotectant properties of PVP, sucrose and methanol. A one-step fast-cooling rate is more appropriate than a two-step cooling rate. Some interactions have been found, but their significance still remains to be investigated.

Acknowledgments. This work was supported by the French Environment Ministry (Mission du contrôle des produits chimiques, contract 90-03), by the French Foreign Office (Integrated action 87/272) and by the Moroccan Education Ministry. Thanks are extended to Dr. C. Blaise and Prof. A. Maul for their critical review of the manuscript.

REFERENCES :

- 1 G.J. Morris, in "Low temperature in medicine and biology" M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, eds, Pitman Medical Ltd, Kent, U.K., 1980, p. 253-284.
- 2 E.A. Leeson, J.P. Cann and G.J. Morris, in "Maintenance of microorganisms : A manual of laboratory methods", B.E. Kirsop and J.J.S. Snell, eds, Academic Press, New York, 1984, p. 131-160.
- 3 W.A. Daily and J.M. McGuire, *Butler Univ Bot. Stud.* 11, 139-143 (1954).
- 4 S. Hwang and W. Horneland, 1965, *Cryobiology* 1, 305-311 (1965).
- 5 O. Holm-Hansen, *Physiologia plantarum* 16, 530-540 (1963).
- 6 A. Ben-Amotz and A. Gilboa, *Mar. Ecol.* 2, 221-224 (1980).
- 7 G.J. Morris, *Br. Phycol. J.* 13, 15-24 (1978).
- 8 G.J. Morris, *Arch. Microbiol.* 107, 57-62 (1976).
- 9 A. Ben-Amotz and A. Gilboa, *Mar. Ecol.* 2, 157-161 (1980).
- 10 G.J. Morris and A. Clarke, *Arch. Microbiol.* 119, 153-156 (1978).

- 11 K.K. Nag and H.E. Street, *Physiol. Plant* 34, 260-265 (1975).
- 12 M.A. Meyer, Cryopreservation of marine diatom, Ph.D thesis, University of Texas A & M, U.S.A (1985).
- 13 ISO 8692, "Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*" (1989).
- 14 AFNOR T 90-304, "Essais des eaux - Détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance" (1980).
- 15 F Bois, P.J. Gravil, P. Vasseur and P. Isoard, *Wat. Res.* 22, 1443-1447 (1988).
- 16 D.Tao and P.H. Li, *J. Theo. Biol.* 123, 305-310 (1986).
- 17 C.R. Olien and M.N. Smith, 1981, in "Analysis and improvement of plant cold hardiness", Boca Raton, Florida, CRC Press, 1981.
- 18 T.H.H. Chen, K.K. Kartha, F. Constabel and L.V. Gusta, *Plant Physiol.* 75, 720-732 (1984).
- 19 G.J. Morris G.J. and C.E. Canning, *J. Gen. Microbiol.* 108, 27-31 (1978).
- 20 G. Kuratha and R.Y. Morita, *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1206-1211 (1983).
- 21 D. Allen-Austin, B. Austin and R.R. Colwell, *FEMS Microbiology Letters* 21, 143-146 (1984).
- 22 R.J. McLean, *J. Phycol.* 4, 277-283 (1968).
- 23 J. Farrant and A.E. Woolgar, in "The frozen cells", G.E.W. Wolsten-Holm and M. O'Connor, eds, Ciba foundation Symposium, Churchill, London, 1970, p. 97-114.
- 24 L.M. Crowe, J.H. Crowe and D. Chapman, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236, 289-296 (1985).
- 25 C. Gazeau and J. Dereuddre, *Bull. Soc. Bot. Fr. - Actual. Bot.* 133, 41-64 (1986).
- 26 G.J. Morris, A. Clarke and B.J. Fuller, *Cryoletters* 1, 121-128 (1980).