

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences agronomiques  
Département de Biologie

## THÈSE

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Sciences Biologiques

### Sujet

**Congélation de fragments de tissu somatique pour sauvegarder les  
Ressources génétiques du lapin  
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Présenté par

Madame **BENKEDDACHE DJAMILA**

Soutenue le 30/01/2012 devant le jury composé de :

|                 |                                    |                                                                    |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Présidente :    | P <sup>r</sup> MOULTI-MATI. Farida | UMMTO.                                                             |
| Rapporteur :    | P <sup>r</sup> BERCHICHE Mokrane   | UMMTO.                                                             |
| Co-Rapporteur : | D <sup>r</sup> Thierry JOLY        | Directeur de recherche<br>ISARA-LYON.                              |
| Examineurs :    | P <sup>r</sup> KAIDI Rachid        | Université SAAD AHMED BLIDA<br>Faculté Agro-Vétérinaire.           |
|                 | D <sup>r</sup> KHELEF Djamel       | Maître de conférence (A)<br>Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire |
|                 | D <sup>r</sup> HOUALI Karim        | Maître de conférence (A) UMMTO                                     |

## Remerciements

A monsieur le Professeur Berchiche. M.

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance. Vous m'avez fait confiance à chaque instant. Il m'a été très agréable de travailler dans le climat de respect et de sérénité que vous avez su instaurer tout au long de la durée de préparation de la thèse.

A monsieur le Docteur Thierry Joly.

Vous m'avez acceptée de suite et m'avez ouvert bien des portes. Bien que nous ayons souvent divergé, vous avez toujours été là pour moi et ma reconnaissance ne peut qu'être totale.

A monsieur le Docteur Xavier Vignon.

Vous m'avez enseigné toutes les techniques de culture cellulaire, vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire à Jouy en Josas, vous m'avez encouragée toutes les fois où je perdais espoir. Je vous dois l'aboutissement de ce travail.

A madame le Docteur Moulti-Mati.F.

Notre collaboration ne date pas d'aujourd'hui, vous m'avez scientifiquement aidée dans le cadre d'une autre thèse de par le passé. C'est tout naturellement que nous avons pensé à vous. Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse de doctorat.

A monsieur le Professeur Kaïdi.R.

Bien que très pris, vous avez accepté de nous donner de votre temps pour juger ce travail et vous avez de suite répondu favorablement à notre demande. Merci de nous honorer de votre présence.

A monsieur le Docteur Khelef. D.

Notre premier contact téléphonique a tout de suite été rassurant, avec gentillesse vous avez accepté de juger ce travail. Vous avez grâce à votre disponibilité facilité l'organisation de cette soutenance. Pour tout cela, merci.

A monsieur le Docteur Houali. K.

Merci pour tous vos précieux conseils, merci de vos encouragements durant ces années de thèse. Au-delà de vos compétences scientifiques, il fallait que vous fassiez parti de mon jury pour juger si j'avais fait bon usage de vos conseils.

A monsieur Madiou. H.

Je vous dois toute l'étude statistique. Vous m'avez toujours dit oui avec la gentillesse que tout le monde vous connaît.

A madame Zerrouki .N.

Vous m'avez introduite auprès du Docteur Thierry Joly. Votre aide m'a été très précieuse.

Au Professeur Halli-Hargas .R.

Sans vous, toute cette aventure scientifique n'aurait jamais été possible. C'est vous, qui m'avez informée à temps du programme de bourse Algéro-Française (B.A.F). Vous avez toujours rayonné élégamment sur nous en nous insufflant le goût du perfectionnement scientifique.

Au Professeur Derridj A, Doyen de la faculté Bio-Agro.

Nous ne pouvions rêver meilleur doyen. Avec vous les choses sont toujours facilitées.

A mes amis et collègues.

Si chaque matin, c'est avec plaisir que je me rends à mon travail, c'est parce que j'y rencontre mes camarades de promotion qui sont devenus mes collègues. Nous nous connaissons depuis l'année 1977 et nous ne nous sommes jamais déçus. Je les aime tellement. Il s'agit (par ordre alphabétique) de :

- Madame Abdelli. O.
- Monsieur Belkadi. M.
- Madame Mazouzi. F.
- Mademoiselle Salhi. N.

Plus tard, nous ont rejoint à l'enseignement supérieur des collègues plus jeunes que nous (certains ont été nos étudiants). Ils n'ont pas grossi les rangs de quelques prédateurs opportunistes et voraces qui sévissent au sein de notre faculté. Pour ne pas avoir cédé aux chants des sirènes je les remercie. Il s'agit (par ordre alphabétique) de :

- Madame Ali Ahmed. D.
- Monsieur Aoudjiane. M.
- Madame Cherfaoui.D.
- Monsieur Larbes. H
- Monsieur Laribi.M.
- Madame Lounaouci. G.
- Mademoiselle Méguenni.N.
- Et tous les autres qui se reconnaîtront.

## *Dédicaces.*

*Je dédie ce travail :*

*A ma mère en premier lieu et aux autres  
Membres de ma famille, particulièrement à Madjid  
Mon frère, à mes soeurs Fadhila et Dabbia, à Chérifa ma  
Douce nièce et à toute la bande de Fougeroux.*

*A Philippe Guiz et à toute sa famille  
Pour leur amitié et pour leur soutien durant mon  
Séjour en France.*

*Aux chercheurs de Jouy en Josas, particulièrement à  
Xavier Vignon, Nathalie Beaujean et Juliette Salvaing .*



# SOMMAIRE

|                                                                                                                                                                            | Page |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Introduction générale</b>                                                                                                                                               | 01   |
| <b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>                                                                                                                               | 08   |
| 1-1 Les fondements de la cryobiologie                                                                                                                                      | 08   |
| 1-1-1 Conditions physicochimiques induisant la formation de cristaux de glace                                                                                              | 09   |
| 1-1-2 Répercussions physiques et chimiques de la formation de glace au niveau cellulaire                                                                                   | 10   |
| 1-2 Notions de Cryopreservation en équilibre et en non équilibre osmotique                                                                                                 | 12   |
| 1-2-1 Rappels concernant les équations d'équilibre osmotiques                                                                                                              | 13   |
| 1-2-2 La cryopreservation en équilibre osmotique                                                                                                                           | 16   |
| 1-2-3 La cryopreservation en non équilibre osmotique                                                                                                                       | 18   |
| 1-3 Les différentes techniques decryopreservation                                                                                                                          | 19   |
| 1-3-1 Le traditionnel « rate freezing ».                                                                                                                                   | 19   |
| 1-3-2 La vitrification                                                                                                                                                     | 20   |
| 1-4 Les cryoprotecteurs : rôles, avantages et inconvénients                                                                                                                | 21   |
| 1-5 Les différentes voies de cryopreservation                                                                                                                              | 23   |
| 1-5-1 La voie embryonnaire                                                                                                                                                 | 24   |
| 1-5-2 La voie germinale                                                                                                                                                    | 24   |
| 1-5-3 La voie somatique                                                                                                                                                    | 25   |
| 1-6 Le clonage                                                                                                                                                             | 27   |
| <b>Chapitre II : Etude expérimentale</b>                                                                                                                                   | 29   |
| 2- 1 Matériel et méthodes                                                                                                                                                  | 29   |
| 2-1-1 Matériel biologique et mise en culture des lots témoins                                                                                                              | 29   |
| 2-1-2 Protocole global de congélation adopté                                                                                                                               | 30   |
| 2-1- 3 Mode d'addition et de retrait du cryoprotecteur                                                                                                                     | 33   |
| 2-1-4 Références des produits chimiques utilisés                                                                                                                           | 34   |
| 2-1- 5 Evaluation des résultats                                                                                                                                            | 34   |
| 2-1-6 Traitements statistiques                                                                                                                                             | 39   |
| 2-2 Expériences et résultats                                                                                                                                               | 39   |
| 2-2-1 Effet de l'âge des animaux sur la viabilité des fragments de peau mis en culture à 0h post-mortem (lots témoins)                                                     | 39   |
| 2-2-1-1 Mode opératoire                                                                                                                                                    | 39   |
| 2-2-1-2 Résultats et discussion                                                                                                                                            | 39   |
| 2-2-2 Etude de la toxicité du DMSO et de l'éthylène glycol (E.G) sur des fibroblastes de lapin                                                                             | 41   |
| 2-2-2-1 Mode opératoire                                                                                                                                                    | 41   |
| 2-2-2-2 Résultats et discussion                                                                                                                                            | 41   |
| 2-2-3 Recherche de la concentration optimale en DMSO pour la congélation à -20°C des fragments de peau avant leur stockage dans l'azote liquide                            | 42   |
| 2-2-3-1 Mode opératoire                                                                                                                                                    | 45   |
| 2-2-3-2. Résultats et discussion                                                                                                                                           | 46   |
| 2-2-4 Etude de la viabilité des biopsies en fonction de la durée de leur stockage à - 20°C dans une solution cryoprotectrice avant congélation dans l'azote liquide        | 46   |
| 2-2-4-1 Mode opératoire                                                                                                                                                    | 48   |
| 2-2-4-2 Résultats et discussion                                                                                                                                            | 48   |
| 2-2-5 Etude de la viabilité en fonction de l'âge des biopsies stockées durant cinq jours à – 20°C dans une solution cryoprotectrice avant congélation dans l'azote liquide | 51   |
| 2-2-5-1 Mode opératoire                                                                                                                                                    | 51   |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 2-2-5-2 Résultats et discussion                                         | 52 |
| 2-3 Discussion et perspectives...                                       | 54 |
| <b>Conclusion générale</b>                                              | 58 |
| <b>Références bibliographiques</b>                                      | 61 |
| <b>Annexes</b>                                                          | 73 |
| <b>Résultats supplémentaires présentés en juin 2007 à Jouy en Josas</b> | 81 |
| <b>Article publié dans Cell And Tssue Banking</b>                       | 82 |

## Liste des figures

|                                                                                                      | <b>Page</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figure 1</b> : Equilibration du cryoprotecteur entre la solution extracellulaire et le tissu      | 15          |
| <b>Figure 2</b> : Courbes d'abaissement de la température lors des congélations à -20°C et à -80°C   | 32          |
| <b>Figure 3</b> : Courbes d'abaissement de la température lors des congélations à - 20°C et à - 80°C | 34          |

## Liste des photographies

|                                                                                                                                                            | <b>Page</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Photographie 1</b> : Croissances de fibroblastes à partir d'explants d'oreilles de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant <b>5 jours</b>  | 35          |
| <b>Photographie 2</b> : Croissances de fibroblastes à partir d'explants d'oreilles de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant <b>8 jours</b>  | 36          |
| <b>Photographie 3</b> : Croissances de fibroblastes à partir d'explants d'oreilles de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant <b>10 jours</b> | 37          |
| <b>Photographie 4</b> : Croissances de fibroblastes à partir d'explants d'oreilles de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant <b>20 jours</b> | 38          |

## Liste des tableaux

|                                                                                                                                              | <b>Page</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Tableau I</b> : Effet de l'âge des lapines sur le taux de viabilité des explants frais                                                    | 40          |
| <b>Tableau II</b> : Evaluation de la toxicité du DMSO et de l'héthylène glycol sur la viabilité des fibroblastes isolés de lapin             | 43          |
| <b>Tableau III</b> : Comparaison de deux concentrations en DMSO et de deux niveaux de refroidissement                                        | 47          |
| <b>Tableau IV</b> : Evolution de la viabilité des explants en fonction de la durée du séjour à -20°C avant cryopreservation en azote liquide | 50          |
| <b>Tableau V</b> : Viabilité des explants ayant été stockés durant 5 jours à -20°C avant cryopreservation en fonction de l'âge               | 53          |

## **Abréviations :**

- DMSO: Dimethylsulphoxide  $C_2 H_6 OS$ .
- E. G : Ethylene glycol: 1, 2 –Ethanediol ( $HOCH_2 CH_2OH$ )
- 0h pm: Zéro heure post-mortem.
- P.V.P : Polyvinylpyrrolidone.

## INTRODUCTION GENERALE

La préservation des espèces n'est pas une nouvelle préoccupation de l'homme. Dès 1872, le premier parc national du monde a été créé à Yellowstone (U.S.A), suivi une trentaine d'années plus tard (en 1909) par la création des premiers parcs européens qui virent le jour en Suède. C'est ainsi que certains hommes avant-gardistes et visionnaires, se sont instinctivement préoccupés de sauvegarder la biodiversité au sein de notre planète avant même la définition de ce concept. Ce néologisme (biodiversité) proposé en 1985 par Walter Rosen pour parler de diversité biologique admet aujourd'hui une centaine de définitions (Levrel, 2007). La biodiversité (dont le sens littéral est: la diversité du vivant) est envisagée actuellement, de l'échelle moléculaire à celle de la biosphère.

Cependant, aujourd'hui c'est l'homme qui constitue la plus grande menace pour cette précieuse biodiversité qu'il a reçue en héritage. De par ses chasses et ses pêches abusives, de par ses activités industrielles polluantes et les dérèglements climatiques qui en découlent, l'homme a gravement mis en péril de nombreuses espèces animales et végétales.

Pourtant depuis l'année 1948, date de sa création, l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (U.I.C.N) n'a cessé de sensibiliser et d'alerter les opinions publiques ainsi que les autorités concernées sur les dangers encourus par les espèces animales et végétales. C'est cette organisation non gouvernementale (O.N.G), qui depuis 1963 établit chaque année, une liste rouge mondiale des espèces menacées (en anglais : I.U.C.N red list). Cette liste constitue l'inventaire mondial le plus complet de l'état de conservation globale des espèces animales et végétales. Remise à jour chaque année, elle s'appuie sur une série de critères précis pour évaluer le risque d'extinction de milliers d'espèces et de sous espèces. L'U.I.C.N a retenu les mêmes critères pour toutes les espèces et ce dans tous les pays du monde. Cette liste rouge est reconnue comme étant l'outil de référence le plus fiable sur l'état de la diversité biologique. Les experts de la commission de sauvegarde des espèces de l'U.I.C.N ont défini neuf catégories correspondant à de différents degrés de menaces des espèces et sous espèces dans le monde. Ces catégories sont : Eteinte (EX) ; Eteinte à l'état sauvage (EW) ; En danger critique d'extinction (CR) ; En danger (EN) ; Vulnérable (VU) ; Quasi menacée (NT) ; Préoccupation mineure (LC) ; Données insuffisantes (DD) ; Non évaluées (NE). La classification d'une espèce dans une catégorie donnée se fait sur la base de critères basés sur des facteurs biologiques associés au risque d'extinction : taux de déclin, population totale, zone d'occurrence, zone d'occupation, degrés de peuplement et fragmentation de la répartition. La dernière mise à jour de cette liste rouge publiée le 3 novembre 2009 stipule que la crise d'extinction gagne encore du terrain et rapporte, que sur les 47677 espèces recensées, 17291 espèces sont menacées d'extinction. Cette liste révèle que sont menacés :

- 21% de tous les mammifères connus.
- 30% de tous les amphibiens connus.
- 12% de tous les oiseaux.
- 28% des reptiles.
- 37% des poissons d'eau douce.
- 70% des plantes.
- 35% des invertébrés répertoriés.

Si l'on détaille les chiffres relatifs à l'embranchement des mammifères nous avons sur les 5490 espèces répertoriées dans le monde :

- 79 qui sont au stade « éteints » ou « éteints à l'état sauvage ».
- 188 qui sont au stade « en danger critique d'extinction ».
- 449 qui sont au stade « en danger ».
- 505 qui sont au stade « vulnérables ».

Chaque année, des espèces existantes dans la liste changent de catégorie pour accéder à des catégories de degrés de menaces supérieurs. De même que sont enregistrées de nouvelles entrées dans la liste rouge, ce qui est le cas cette année du rongeur endémique de Madagascar : voalavo (*Voalavo antsaahabensis*) qui fait son entrée dans la catégorie « en danger ».

Selon Teyssédre (2004), toute espèce a une durée de vie limitée qui est de l'ordre de cinq à dix millions d'années. A partir de l'espérance de vie des espèces et de leur nombre, il est possible de calculer un taux d'extinction global qui correspond à la proportion d'espèces disparaissant pendant un intervalle de temps donné. Aujourd'hui, ce taux serait selon les espèces de 50 à 560 fois supérieur au taux d'extinction attendu pour une biodiversité stable. Plus que toutes autres époques, ces dernières décennies auront été les plus fatales pour la biodiversité. Pourtant, ce n'est que depuis 1992, date de la signature de la convention sur la diversité biologique à Rio de Janeiro que la sauvegarde de la biodiversité a officiellement accédé au rang de préoccupation mondiale. Dans le cadre de cette convention, l'année 2010 a été retenue comme date à laquelle tous les états du monde devront faire le bilan de leurs avancées concernant la conservation de la biodiversité.

Jusque-là, des stratégies avaient été élaborées pour tenter de sauver les espèces menacées. Il s'agit de la conservation in situ et de la conservation ex-situ.

- La conservation in- situ est faite sur site, elle intervient sur le terrain, dans le milieu naturel. Ce mode de conservation a vu le jour dans les années soixante- dix. Son but est de préserver et de maintenir les espèces menacées dans leur milieu naturel de sorte qu'elles continuent d'évoluer avec leurs prédateurs et leurs parasites dans le respect de la chaîne alimentaire. Ces lieux de conservation (qui sont les réserves naturelles et les parcs naturels) font l'objet de contrôles, d'assainissement et de protection. Ces réserves sont conçues de telle sorte qu'elles puissent abriter des effectifs suffisamment importants afin d'assurer la diversité génétique nécessaire à la survie de ces populations protégées. Dans les cas où la conservation in- situ n'est pas réalisable, la conservation ex-situ est alors envisagée.

- La conservation ex-situ se fait hors site, elle permet de soustraire une partie de la population à un habitat menacé et de le placer dans un nouvel environnement. Ces lieux de conservation peuvent être soit des aires sauvages soit des espaces entretenus par l'homme (jardins zoologiques et aquariums publics pour les espèces aquatiques). Les espèces ainsi sauvegardées peuvent dès que les conditions le permettent être réintroduites dans leurs habitats naturels. La conservation ex-situ, porte aussi les noms : « d'élevage conservatoire, d'élevage en captivité ou reproduction en captivité ». Ce mode de conservation qui est ancien, s'est approprié aujourd'hui des disciplines modernes telles que la culture in vitro, la congélation d'embryons et la mise en place de banques de ressources génétiques.

Ces banques constituent de véritables collections où sont répertoriées et conservées les ressources génétiques patrimoniales qu'il s'agisse de souches locales aussi bien que d'animaux sélectionnés.

La sélection des reproducteurs pour obtenir des populations répondant aux besoins de l'homme est un acquis ancestral qui a abouti aux races domestiques dont nous disposons aujourd'hui. Ces populations génétiquement différentes les unes des autres se transforment en permanence sous l'influence de facteurs tels que les sélections, les mutations de gènes, les croisements et les déplacements de ces populations. L'enjeu aujourd'hui est de pouvoir conserver puis de disposer à tout moment de ces différentes combinaisons génétiques. Pour reconstituer convenablement une population, son matériel génétique stocké ne doit pas être sélectionné au hasard, il doit correspondre à une certaine qualité, quantité et représentativité. Ces critères génétiques de sélection s'accompagnent aussi de critères sanitaires de sélection. En effet, le développement de la cryoconservation du matériel génétique s'est toujours fait dans le respect des critères sanitaires impliquant la mise en place de stations de quarantaines et de centres de collecte agréés. Les animaux donneurs doivent être soumis à un contrôle sanitaire avant que leur matériel génétique ne soit conservé. Ils doivent aussi répondre à de strictes exigences concernant leurs cheptels d'origines.

Une exploitation sûre et efficace de ces ressources génétiques patrimoniales ne peut se faire qu'en s'appuyant sur les biotechnologies reproductives modernes (inséminations artificielles, transfert d'embryons, fertilisation in vitro et clonage) qui elles-mêmes sont tributaires des nouveaux procédés de stockage des patrimoines génétiques (cryobanques de semences, d'embryons et plus récemment de cellules somatiques).

L'avenir de la sauvegarde de la biodiversité sur notre planète est donc conditionné par la mise en place dans un premier temps, de cryobanques nationales ayant pour but de rationaliser et de sécuriser les collections existantes, suivi dans un deuxième temps par l'élargissement de cette pratique à toutes les espèces et ce, à l'échelle planétaire.

Cependant, la réalité actuelle est toute autre, car il faut savoir que les mises en place et les prises en charge des ces cryobanques sont coûteuses. De ce fait, pour l'instant, même les pays développés disposant de cryobanques sont dans l'obligation de se limiter et de sélectionner le matériel à cryopréserver. Selon la cryobanque de France, trois types de matériel issus de populations d'animaux sélectionnés sont éligibles pour entrer dans une cryobanque nationale :

- Le matériel de type I : Issu de races à effectifs réduits, pour lesquelles le risque de disparition est réel ;
- Le matériel de type II : Issu d'animaux exceptionnels pour certaines aptitudes qui apparaissent dans des races en exploitation, mais non retenu aujourd'hui par le schéma de sélection qui aurait d'autres orientations pour l'instant ;
- Le matériel de type III : Constitué par des échantillons représentatifs de l'état génétique à un instant donné d'une race ou

population soumise à une sélection intense. Congelés à des intervalles de temps réguliers, ces échantillons témoigneront des combinaisons génétiques originales qui ont été créées et les rendront accessibles pour tout besoin d'analyse ou de réorientation de la sélection rendue nécessaire par un contexte différent.

La classification sus-citée correspond au sein d'une espèce donnée au choix des animaux à cryopreserver. Il faut savoir, qu'une fois le choix de l'animal fait, il faut encore faire le bon choix du matériel biologique adéquat à prélever en vue de sa cryopreservation. Jusqu'à récemment, pour restaurer la quasi-totalité du génome d'une population donnée seules deux voies existaient : La voie de la semence et celle de l'embryon. Depuis l'avènement du clonage, une troisième voie s'est ouverte c'est la voie via les cellules somatiques. Chaque voie, permet un mode de restauration différent :

- A partir des semences (sperme et ovocytes), la restauration n'est possible que par croisements appropriés sur plusieurs générations. Les scientifiques sont en mesure aujourd'hui de calculer le nombre de paillettes nécessaires pour chaque espèce.

- A partir des embryons, la restauration se fait plus rapidement puisque l'embryon permet de reconstituer la race en une génération. Cependant cette deuxième voie présente le gros inconvénient de nécessiter des techniques de congélation difficiles à mettre en place et très coûteuses.

- A partir des cellules somatiques la restauration est possible par transfert nucléaire d'une cellule somatique donneuse prélevée d'un adulte (type fibroblaste) vers une cellule receveuse (ovocyte) : C'est le principe du clonage.

Cependant, bien que l'expression de "reproduction à l'identique " soit usuellement attribuée au clonage, J.P.Renard et X.Vignon (2001) attirent l'attention sur le fait que tout animal obtenu à partir du noyau d'une cellule somatique, prélevée sur un animal adulte, possède le génome nucléaire de l'animal donneur de cellule, mais un génome mitochondrial provenant de l'ovocyte receveur. De ce fait, l'animal obtenu n'est donc pas tout à fait génétiquement identique à l'animal donneur.

Il faut savoir cependant que, pour toutes les voies citées, les efforts consentis par les scientifiques gagneraient à être pris en charge médiatiquement, afin d'informer et d'éveiller les consciences sur la nécessité de rejoindre les programmes de dons et de collecte de ces divers matériels biologiques. En matière de stratégie de sensibilisation sur la nécessité du « tissue banking » par exemple, IAEA qui est « l'International Atomic Energy Agency » préconise d'axer les campagnes sur deux points à savoir :

- Cibler les auditoires.
- Créer les événements médiatiques.

Le but étant de promouvoir le partenariat entre le public et les professionnels de sorte que chaque partenaire soit considéré comme partie intégrante du système (Pedraza, 2008).

Dans le cadre de notre travail, notre intérêt s'est porté sur la voie offerte par les cellules somatiques dans un contexte de conservation à long terme. En plus de

l'indéniable avantage économique que présente cette voie, de nombreux atouts plaident en faveur de notre choix. En effet, après leur mise en culture, les méthodes de congélation des cellules somatiques sont souvent très simples. Leur aptitude à se multiplier permet de compenser, après décongélation, les pertes engendrées par le stress de la cryoconservation. En outre, la collecte des tissus dont ces cellules sont issues présente de solides atouts par rapport aux cellules sexuelles et embryonnaires : elle est simple en terme de manutention des animaux, peu invasive pour l'animal et surtout très souple puisque la maturité sexuelle des animaux n'est plus un facteur limitant. De plus, la collecte de tissus somatiques (surtout lorsqu'il s'agit d'un fragment de peau comme c'est le cas dans notre étude) autorise une grande réactivité en situations d'urgences. En effet, en cas d'épizootie au niveau de cheptels immatures qui doivent être abattus, en cas de décès d'un animal précieux, ou en cas de récolte dans des situations extrêmes sur des animaux sauvages dans leur biotope, il est plus aisé de prélever un fragment de peau que des ovocytes.

Jusque-là, la facilité d'incorporation des cellules somatiques dans la cryobanque admettait une seule limite, que nous nous sommes fixé de repousser dans le cadre de notre étude. Cette limite, était la nécessité de passer par une étape de mise en culture des fragments de tissus avant toute cryopreservation. Ce qui n'est réalisable que dans des laboratoires équipés en salles de cultures disposant de personnels qualifiés. Cela représentait un sérieux frein du fait du coût élevé de l'opération et du détour qu'elle occasionne. Dans le cadre de la lutte pour la sauvegarde des ressources génétiques des animaux menacés et ce dans le but de préserver la biodiversité, notre modeste contribution est purement et simplement technique.

Nous nous sommes proposés de venir en aide à l'éleveur qui perd un animal précieux alors qu'il est loin des structures compétentes qui pourraient prendre en charge son problème. Pour ce faire, nous nous sommes posés certaines questions auxquelles nous avons répondu, à savoir :

- Compte tenu des différentes techniques de cryopreservation et de leurs coûts vers laquelle d'entre elles devrait porter notre choix ?
- Compte tenu de la toxicité des cryoprotecteurs, vers lequel devrait porter notre choix ? Une fois ce choix fait, quel dosage retenir ?
- Compte tenu enfin, de l'éloignement de l'éleveur, de quel temps pourrait-il disposer entre la date de la mort de l'animal et celle de l'intervention des structures compétentes ?

Convaincu de la nécessité et de la rentabilité de la cryopreservation des populations, nous devons nous fixer aussi, sur l'espèce qui nous servirait de matériel biologique. Notre choix s'est porté sur le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) qui présente des caractéristiques intéressantes facilitant les élevages intensifs en vue de larges expérimentations. En effet, on note chez le lapin :

- Une maturité sexuelle précoce (entre 16 à 17 semaines).
- Une durée de gestation courte (environ 31 jours).
- Une taille de portée importante (6 à 12 lapereaux par mise bas).
- Un intervalle entre générations court par rapport aux domestiques.

D'un point de vue génétique, le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est un modèle intéressant. En effet, comme le rapportent P. Salvetti et collaborateurs (2008), le lapin est une espèce animale qui présente une très large diversité de population liée à son histoire. Il existe sous forme sauvage telle que le lapin de Garenne (originaire de la péninsule Ibérique et du Maghreb) ou domestiqué en tant que lapin d'élevage pour sa viande (lignées de chair) ou sa fourrure (lignées productrices de phanères). Le lapin est aussi un excellent animal de laboratoire prisé aussi bien par l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines thérapeutiques que par la recherche biomédicale. De plus, l'espèce cunicole se distingue aussi par son statut sanitaire particulier au regard des recommandations sanitaires de l'Office International des Epizooties (O.I.E) qui ne recense actuellement aucune épizootie majeure à inscrire dans le livre A.

Nous avons aussi été confortés dans notre choix d'espèces par le succès de la recreation chez le lapin en novembre 2006 d'une population de « Brun Marron de Lorraine » à partir d'embryons stockés durant 14 ans dans l'azote liquide. Il faut savoir que de cette opération, 69 lapereaux viables ont été obtenus à partir de 134 embryons décongelés et transférés dans 14 femelles receveuses, soit un taux de survie embryonnaire de 51,5% (Salvetti *et al.*, 2008).

Notons, que tout le mérite de cet exploit revient à la cryobiologie grâce à laquelle la recreation de lignées éteintes est possible à condition que celles-ci subsistent sous forme de semences ou d'embryons congelés. Cette discipline n'est pourtant pas si jeune. En effet, c'est en 1949 que S.Polge et ses collaborateurs ont cryoconservé avec succès du sperme démontrant ainsi que des cellules pouvaient survivre après exposition à la température de l'azote liquide (-196°C). C'est aussi cette année-là que les propriétés cryoprotectrices du glycérol ont été découvertes (Bakhach *et al.*, 2007). On considère aujourd'hui que de ces deux événements est née la cryobiologie.

La cryobiologie se définit comme étant la science basée sur l'induction du ralentissement des activités physico-chimiques des cellules par abaissement de la température. Cet abaissement, peut être poussé jusqu'à obtention de l'arrêt total de toutes manifestations vitales sans qu'il y ait pour autant mort du matériel biologique ainsi traité. L'état de «vie suspendue» obtenu par ces procédés est réversible puisqu'un réchauffement adéquat ramène les cellules à leur état initial. En cryobiologie, en plus de l'impact des cryoprotecteurs, deux éléments sont déterminants, il s'agit de la vitesse de refroidissement lors de la congélation et de la vitesse de réchauffement lors de la décongélation. De ces deux vitesses, dépend l'apparition du premier cristal que l'on appelle la nucléation (Mazur, 1977). Ce changement de phase par passage de la phase liquide à la phase solide correspond à la cristallisation. Le risque de cristallisation débute dès que la température est inférieure ou égale au point de congélation. Une bonne congélation est celle réalisée sans apparition de cristaux intracellulaires car ces derniers provoquent la lésion irréversible des enveloppes cellulaires. C'est à ce niveau que le rôle, du ou des cryoprotecteurs est prépondérant.

Depuis l'avènement de la cryobiologie, les chercheurs n'ont eu de cesse de tester différents protocoles de cryopreservation et différentes combinaisons de cryoprotecteurs. De toutes les stratégies de cryopreservation élaborées à ce jour, aucune ne s'est dé faite des deux éléments principaux que nous avons cités ci-dessus à savoir: d'une part le cryoprotecteur et d'autre part, les cinétiques de refroidissement et de réchauffement que les anglophones nomment : « the cooling-warming rate ».

C'est ainsi que toutes ces stratégies de cryopreservation, bien que très variées, répondent toutes à quelques variantes près au schéma général suivant :

**Etape I :** Addition des cryoprotecteurs (la durée de cette étape détermine si la cryopreservation se fait en équilibre ou en non équilibre osmotique).

**Etape II :** Refroidissement, que les anglophones nomment « cooling » ou « freezing » (dont la vitesse et le nombre de paliers, dépendent du mode choisi selon que l'on soit en mode « slow ou rapide freezing »).

**Etape III :** Stockage en azote liquide. La durée de cette étape varie selon les besoins des utilisateurs (d'un mois à plusieurs décennies).

**Etape IV :** Réchauffement, que les anglophones nomment « warming » (dont la vitesse dépend du mode choisi selon que l'on soit en mode « slow ou rapide warming »).

**Etape V :** Retrait du cryoprotecteur et réhydratation des cellules.

Les modes de cryopreservation se classent en deux groupes : le mode traditionnel « slow-rate freezing » d'une part et la vitrification d'autre part. Les différences fondamentales entre ces deux groupes résident dans les deux premières étapes citées ci-dessus, alors qu'elles ne diffèrent que très peu pour les trois dernières. (Vajta et Kuwayama, 2006).

La vitrification que nous n'avons pas citée jusque là, est un procédé plus récent et révolutionnaire dans la mesure où la phase liquide passe par un état vitreux qui ne cristallise jamais. Les auteurs cités ci-dessus, rapportent que, ces dix dernières années, les revues traitant de cryopreservation en embryologie ont déployé un effort considérable pour départager enfin qui de la méthode traditionnelle ou la vitrification présentait les meilleurs avantages. Il en est ressorti que, bien que la méthode traditionnelle (le « slow-rate freezing ») ait eut un rôle significatif dans l'histoire de la cryopreservation et que son impact soit encore d'actualité, on ne rencontre aucun espace en embryologie où cette méthode offrirait des avantages significativement plus intéressants que ceux de la vitrification. Bien que ce point de vue soit partagé par de nombreux auteurs, nous n'avons pas opté pour la vitrification compte tenu du coût élevé de ce procédé qui ne cadre pas avec nos réalités nationales. De plus, si la vitrification est la meilleure alternative lorsqu'il s'agit de tissus composites, elle s'avère tout à fait contournable dans les cas de groupes cellulaires homogènes ou de tissus monocellulaires (Lornage *et al.*, 2006 ; Bakhach *et al.*, 2007).

Le but de notre travail est de déterminer les temps post-mortem limites durant lesquels des biopsies peuvent être congelées avec succès par des procédés accessibles à des éleveurs en situation d'urgence afin de sauvegarder les ressources génétiques d'animaux précieux immédiatement après leur mort. Notre souci fut aussi d'éprouver un mode de cryopreservation qui soit simple, peu coûteux et qui plus est, comporte en début de processus une étape accessible à l'éleveur (tant techniquement qu'économiquement) de sorte que ce dernier puisse en situation d'urgence entamer, juste après la perte d'un animal précieux, l'opération de cryopreservation en attendant de se rapprocher des structures compétentes.

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## Introduction :

Dès que les scientifiques ont accédé à la cryopreservation du matériel vivant, leurs investigations ont eu pour objectifs, d'en améliorer les techniques et d'en généraliser l'application à différentes espèces animales. C'est ainsi que de différents matériels biologiques ont été congelés chez de nombreuses espèces et ce à divers stades (Hochi *et al.* , 2003 ; Silvestre *et al.* , 2003<sub>a</sub> ; Chen et Tian, 2005 ; Cuello *et al.* , 2007).

Tous les auteurs s'accordent à dire, que chaque type de cellule et chaque type de tissu, possèdent leur propre réactivité et résistance aux cryoprotecteurs et aux phénomènes de congélation (Carpenter et Dawson ,1991 ; Taylor et Busza, 1992 ; Bateson *et al.* , 1994 ; Fuller et Busza, 1994 ; Wusteman *et al.* , 1995 ; Walcerz *et al.* , 1995 ; Muldrew *et al.* , 1996 ; Zieger *et al.* , 1997 ; Pegg, 1998 ; Lakey *et al.* , 2003, Gandini.L *et al.* , 2006)

En effet, alors que pour un groupe cellulaire homogène ou un tissu monocellulaire, il est possible de définir les conditions techniques optimales de cryopreservation (substances cryoprotectrices, vitesse et palier de refroidissement, vitesse de réchauffement), il n'est pas évident par contre, de maîtriser tous ces paramètres pour ce qui est de la cryopreservation de tissus composites. La règle semble être de sélectionner au cas par cas, l'association de cryoprotecteurs et les paramètres techniques adaptés aux besoins des différents tissus (Bakhach *et al.*, 2007).

D'autre part, il faut noter que, bien que les choix en matière de cryoprotecteurs soient variés, que les voies de congélations explorées (semences, embryons ou cellules somatiques) soient nombreuses et que les différentes techniques de cryopreservation mises au point (slow-freezing ou rapide-freezing traditionnels, vitrification, ultra rapide vitrification ....) soient de plus en plus élaborées il n'en demeure pas moins que tous ces éléments possèdent à ce jour leurs adeptes et leurs détracteurs au sein de l'espace bibliographique.

### 1-1 Les fondements de la cryobiologie.

La cryobiologie permet de conserver à température de l'azote liquide (-196°C) du matériel biologique en le maintenant dans un état de vie et d'animation suspendu. Toutes les manifestations de vie cellulaires, telles que les activités chimiques, métaboliques et les interactions physiques intra et extracellulaires demeurent figées. Cet état qui peut être longuement maintenu n'est pas irréversible, puisque le retour à une activité métabolique normale, passe par un réchauffement adéquat. Au fur et à mesure de l'abaissement de la température, les fonctions se figent graduellement. C'est ainsi que pour des températures allant de 0°C à - 25°C on note un ralentissement des activités enzymatiques des cellules et que le gel des échanges physicochimiques n'est atteint qu'à partir de -40°C. Il faut atteindre des températures inférieures à -130°C pour être assuré d'une conservation cellulaire à long terme et ce, en présence de cryoprotecteurs.

Ces abaissements de température, ne sont pas sans risques pour les cellules (Bakhach *et al.*, 2007), dans la mesure où :

- Ils occasionnent, une perte en eau avoisinant les 95% du volume intracellulaire (Mazur *et al.*, 2007).
- Ils occasionnent, consécutivement à cette perte d'eau, une importante augmentation du taux de concentration en électrolytes intra et extracellulaire avec un risque de dénaturation des protéines et autres constituants membranaires.
- Ils occasionnent, souvent la formation de cristaux de glace dommageable aussi bien au niveau intracellulaire qu'extracellulaire.
- Ils occasionnent enfin, lorsqu'ils sont brusques, des lésions cellulaires et ce même en absence de formation de glace. Ce phénomène porte le nom de « choc thermique ». Il se produit essentiellement entre + 37°C et + 15°C et aussi entre 0°C et -80°C. Ces chocs thermiques sont sensiblement réduits en présence de cryoprotecteurs.

### **1-1-1 Conditions physicochimiques induisant la formation de cristaux de glace.**

La cristallisation de l'eau est la résultante de deux phénomènes :

- La nucléation, qui est l'apparition du premier cristal dans la phase liquide (ce qui correspond à la formation d'un point de déséquilibre).
- La croissance des cristaux formés (Mazur, 1977).

Toute cryopreservation doit être menée en maîtrisant la formation de glace. Ce n'est qu'à cette condition que l'on peut être assuré de la réussite de l'opération (Leibo, 1989). La formation de cristaux d'eau est autant à redouter que la toxicité du cryoprotecteur lui-même (Fahy, 2004). Chez tous les spermatozoïdes de mammifères, la perméabilité membranaire à l'eau durant la congélation et ce en présence de cryoprotecteur diminue manifestement dès qu'il y a apparition de glace extracellulaire (Devireddy.R.V *et al.*, 1999 ; Devireddy.R.V *et al.*, 2004). La réussite de la vitrification d'un échantillon biologique ne peut théoriquement être attestée que si l'absence de cristaux de glace dans les tissus peut être prouvée (Mazur *et al.*, 2005 ; Lornage *et al.*, 2006). Pour éviter la formation de glace intracellulaire, les cellules doivent être refroidies suffisamment lentement pour donner le temps à la déshydratation osmotique de se faire (Mazur *et al.*, 2005). Dans la plupart des cas, la glace intracellulaire se forme lors des refroidissement trop rapides en dessous de - 40° C, mais dans certains cas, celle-ci se manifeste non pas durant le refroidissement mais au contraire durant le réchauffement. En effet, cela se passe lorsque l'eau cellulaire qui était vitrifiée durant l'étape de refroidissement se dévitrifie en premier lieu et se recristallise durant l'étape du « warming » (Seki et Mazur, 2008). En effet, la transition par la température de cristallisation peut se faire aussi bien lors du « slow cooling » que lors du « slow rewarming » (Fahy *et al.*, 2004)

Notons cependant que d'autres auteurs, se demandent si au contraire chez des fibroblastes (de hamster et de canins) refroidis jusqu'à - 40°C, la glace intracellulaire ne jouerait pas un rôle cryoprotecteur en empêchant la déshydratation durant le « slow cooling » (Acker et Gann ,2003).

Toute eau soumise à des températures inférieures à 0°C, perd sa stabilité thermodynamique et tend alors vers un état cristallin. C'est le risque que court l'eau

intracellulaire au cours de la cryopreservation. Ce risque est d'autant plus redoutable, que la masse liquide des tissus biologiques avoisine les 70% du volume cellulaire.

La plupart des substances, se liquéfient et se solidifient approximativement à la même température. Cette température de fusion ou de solidification d'un corps pur est appelée « point de fusion ». Le point d'équilibre de fusion / solidification d'une solution liquide correspond à la température en deçà de laquelle cette solution tend vers sa phase solide et au delà de laquelle elle tend vers sa phase liquide. Cette température est de 0°C pour l'eau pour qui, la solidification porte le nom de cristallisation.

Au cours de ce processus, la portion de la solution encore à l'état liquide est exclue de la matrice cristalline et devient de plus en plus concentrée. Cette augmentation de la concentration s'accompagne d'une baisse du point de fusion de la solution restante. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que s'installe un équilibre thermodynamique entre la phase cristalline et la solution liquide restante. Une fois cet équilibre atteint, la cristallisation s'arrête alors. Il en découle que la quantité de cristaux de glace qui peut se former à une température donnée dépend de la composition initiale de la solution (Watson .P.F, 2000). Les processus de formation de glace (par cristallisation classique ou par surfusion) sont sensiblement ralentis par l'augmentation de la viscosité de la solution (Bakhach *et al.*, 2007). L'impact de la viscosité lorsque celle-ci est élevée se fait ressentir à l'approche du seuil de cristallisation en évitant la diffusion moléculaire et en bloquant la transition de la phase liquide vers la phase solide. Lorsque les effets de la viscosité sont conjugués à ceux d'une vitesse élevée de refroidissement, on peut alors atteindre le seuil de fusion de la solution avant que le processus de cristallisation n'ait eu le temps de se mettre en place : C'est le principe de la vitrification.

La manifestation visuelle de la formation de glace intracellulaire se traduit par l'observation d'étincelles que les anglophones nomment « flashing ». Ce phénomène se produit à la température à laquelle 90 à 95% de l'eau de la solution externe est gelée entraînant une augmentation de la concentration en sels et en agents cryoprotecteurs environnants. Il a été démontré qu'il y avait une corrélation entre la température d'apparition de ces flashes et la concentration en soluté de la fraction non gelée (Mazur *et al.*, 2007)

### **1-1-2 Répercussions physiques et chimiques de la formation de glace au niveau cellulaire.**

La formation de glace extracellulaire entraîne une modification chimique de l'espace intercellulaire ayant un impact direct au niveau des cellules. La constitution de ces cristaux de glace s'accompagne d'une augmentation de la concentration ionique de la portion du liquide extracellulaire (Mazur, 1963 et 1984). Il s'en suit, la mise en place d'un gradient de concentration entre les espaces extracellulaires et intracellulaires ce qui occasionne au niveau cellulaire une entrée de solutés accompagnée d'une sortie d'eau. On parle de phénomène de déshydratation cellulaire dont l'effet est facilité par le fait qu'à basse température, la membrane cellulaire modifie son coefficient de perméabilité et se comporte comme une membrane semi-perméable (Mazur *et al.* ,1984). C'est donc en réponse à cette hypertonicité du milieu extracellulaire, que la cellule se contracte et se rétracte. Il faut noter cependant, que ce phénomène de rétractation admet des limites, puisqu'il existe un seuil minimum vital de volume cellulaire. En dessous de ce seuil, la rétractation cellulaire devient irréversible (Merymann, 1970).

Ce phénomène de déshydratation occasionne parfois des lésions cellulaires. En effet, la perte d'eau entraîne une augmentation de la concentration en sels ce qui dénature les protéines et les complexes lipoprotéiques composant la membrane plasmique. Selon Mazur (1963), ce sont ces modifications membranaires de la cellule qui accentuent le transfert de liquide. Ce transfert ne serait pas le fait d'une simple diffusion transmembranaire.

A la conséquence d'ordre chimique de la formation de glace, s'ajoute la compression physique qu'exerce la glace sur les parois cellulaires en entraînant leurs déformations. Ces déformations et ces distorsions sont selon de nombreux auteurs le point de départ d'une cristallisation intracellulaire (Mazur *et al.* , 2005 ; Bakhach *et al.*, 2007 ; Mazur *et al.* , 2007). Cependant, il faut noter que ces distorsions sont souvent réversibles dans la mesure où elles disparaissent avec la fonte de la glace (Mazur *et al.* , 2005).

Les facteurs déclenchant la nucléation et les mécanismes régissant ces interactions sont encore mal connus et nous n'avons rencontré dans la littérature en guise d'explications du phénomène que des hypothèses. Cependant, une fois le processus initié, l'agrégation des noyaux de glace intracellulaire en cristaux macroscopiques a été mathématiquement modélisée. Il existe une corrélation entre la vitesse d'agrégation, la baisse de température cytoplasmique et la déshydratation cellulaire. En effet, la vitesse d'agrégation des noyaux de glace dépend à la fois de la déshydratation intracellulaire et de la baisse de température cytoplasmique (Karlsson *et al.* , 1994). Lors de la cryopreservation, les températures cryogéniques (-196°C) sont moins à redouter que les vitesses de congélation et de réchauffement. Il semble, que les taux de survie cellulaires dépendent de la vitesse de congélation et non pas du type cellulaire. C'est ainsi que, pour une vitesse de congélation donnée, le taux de survie cellulaire serait identique quel que soit le type cellulaire. Lorsque les vitesses de congélation sont, soit trop faibles, soit trop rapides, les taux de survie cellulaires sont faibles. Ces derniers, sont par contre optimaux pour des vitesses intermédiaires (Mazur *et al.* , 1972). De nombreux auteurs expliquent que, deux cas de figure peuvent se présenter :

- Lorsque la vitesse de refroidissement des cellules est lente, on enregistre une importante perte d'eau vers le milieu extracellulaire. Ce qui présente l'avantage d'empêcher le sur-refroidissement intracellulaire et qui par voie de conséquence limite la dynamique d'agrégation et de cristallisation intracellulaire. Dans ce cas, la déshydratation cellulaire domine le processus de cristallisation intracellulaire (Karlsson *et al.* , 1994). Cependant, à faible vitesse, l'importance de la déshydratation cellulaire induite soumet les cellules à des solutés de concentration élevée, ce qui entraîne des dénaturations lipoprotéiques au niveau membranaire engendrant leurs lésions. De plus, ces lésions sont aggravées par l'action mécanique qu'exercent les cristaux de glace extracellulaire (Mazur *et al.* , 1972).
- Lorsque la vitesse de refroidissement des cellules est rapide, la perte d'eau cellulaire est relativement faible et la cristallisation intracellulaire est prédominante (Karlsson *et al.* , 1994). Dans ce cas, c'est la formation de glace intracellulaire (du fait de la faible déshydratation) qui occasionne les lésions cellulaires. Ces lésions d'origine mécanique peuvent apparaître aussi

bien au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau de la membrane des organelles intracellulaires. Notons, que les cristaux intracellulaires formés dans ces conditions sont instables et de petite taille, que leur risque d'agrégation pour se transformer en cristaux plus grands (par phénomène de nucléation) se joue lors de la phase de réchauffement lent. C'est dans ce cas que les cristaux peuvent lyser les cellules (Mazur *et al.* , 1972).

Enfin, la glace extracellulaire, une fois formée s'organise en prolongements dendritiques émanant des cristaux. Ces expansions sont à l'origine de perforations au niveau de la membrane plasmique (Hubel *et al.* ,1992). Il faut noter cependant, que certaines structures naturelles externes constituent de véritables barrières pour la glace extracellulaire, c'est le cas en effet de la zone pellucide entourant les ovocytes par exemple (Mazur *et al.* , 2005).

Notons que ces phénomènes de formation de glace ne constituent pas une fatalité puisque selon certains auteurs, il est possible grâce à des modèles mathématiques de prévoir quantitativement l'étendue de ces phénomènes de cristallisation au niveau cellulaire. Ces modèles tiendraient compte du gradient de diffusion de l'eau, des paramètres de cristallisation et d'agrégation intracellulaire (Karlsson *et al.* , 1994).

## **1-2 Notions de Cryopreservation en équilibre et en non équilibre osmotique**

Que les méthodes de cryopreservation considérées soient traditionnelles (cas du « slow-rate freezing ») ou modernes (cas de la vitrification), elles passent toutes par une première étape qui met en jeu la perméabilité (ou la vitesse de pénétration) du cryoprotecteur (Vajta et Kuwayama, 2006). Pour la réussite d'un protocole de cryopreservation, il est nécessaire de déterminer la concentration d'équilibre final du cryoprotecteur dans le tissu (Elmoazzen *et al.* , 2005). Le comportement d'un matériel biologique durant la congélation est essentiellement dicté par les propriétés osmotiques des cellules qui le composent (Tanaka *et al.* , 2001). La première procédure réussie de cryopreservation d'embryons a utilisé une méthode permettant aux embryons de réaliser un approximatif équilibre osmotique aussi bien avant que pendant le refroidissement. Cela a nécessité l'usage de basses concentrations molaires en cryoprotecteurs de même qu'un refroidissement lent. Ce qui a permis de donner le temps à l'embryon de subir les contractions osmotiques causées par la sortie de l'eau cellulaire en réponse à l'accroissement graduel de la concentration de la solution extracellulaire (Leibo, 1989). Des taux élevés de survie après cryopreservation ont aussi été obtenus, chez des embryons n'ayant pas atteint l'équilibre osmotique avant la congélation.

Leibo (1989) considère que : « la cryopreservation équilibrée ou non équilibrée peut être vue comme un continuum, explicable comme étant une réponse osmotique des ovules et des embryons ». Par contre, Mazur.P (1990), évoque de ce point de vue, trois possibilités lors de la congélation : l'équilibre, le quasi-équilibre et le non-équilibre. Pour cet auteur, chacun de ces cas, dépend de la cinétique de perte d'eau qui elle-même dépend de la cinétique de refroidissement.

Selon Elmoazzen et ses collaborateurs (2005), plusieurs tissus atteignent l'équilibre avec une différence de concentration entre les milieux extracellulaire et

intracellulaire. Selon bon nombre d'auteurs, l'importance de cette différence semble varier en fonction du type cellulaire :

- Pour certains tissus, la concentration d'équilibre final en cryoprotecteur à l'intérieur du tissu approche celle du milieu extérieur. C'est le cas entre autres des artères de lapin (Bateson *et al.* , 1994 ; Wusteman *et al.* , 1995), du myocarde chez le porc (Carpenter et Dawson ,1991) des valves cardiaques chez le porc (Lakey *et al.* , 2003).
- Alors que d'autres tissus semblent atteindre leur équilibre à des concentrations internes plus basses que celles du milieu extérieur. C'est le cas entre autres du cartilage articulaire chez le porc (Muldrew *et al.*, 1996 ; Pegg, 1998), de la peau (Zieger *et al.* , 1997), de la cornée (Taylor et Busza, 1992 ; Walcerz *et al.* , 1995), le tissu hépatique (Fuller et Busza, 1994).

Cela s'explique par le fait qu'en fonction des tissus, la perméabilité à l'eau et au cryoprotecteur, ainsi que la sensibilité osmotique varient (Elmoazzen *et al.* , 2005). D'autre part, la sensibilité osmotique a été étudiée chez les spermatozoïdes canins, il en ressort que le stress osmotique affecte davantage la motilité des spermatozoïdes que l'intégrité membranaire et que la résistance au stress osmotique varie en fonction du milieu de suspension préalable (diluente, milieu physiologique....) (Songsasen *et al.* , 2002).

La durée et la nature des échanges cellulaires lors de l'étape d'addition du cryoprotecteur ainsi que la vitesse de refroidissement conduite durant l'expérimentation, déterminent si la cryopreservation se fait en équilibre ou en non équilibre osmotique (Mazur, 1963 ; Leibo, 1989). Quoiqu'il en soit, la compréhension de ces équilibres fait appel à des équations physico-chimiques qu'il nous semble nécessaire de rappeler.

### **1-2-1 Rappels concernant les équations d'équilibre osmotiques.**

Selon Elmoazzen et ses collaborateurs (2005), il semblerait y avoir confusion dans la littérature sur au moins deux points :

- Le rôle de la pression différentielle sur l'équilibration du tissu.
- La dénomination du phénomène, dans la mesure où certains auteurs parlent d'équilibre (Mazur, 1963 ; Leibo, 1989 et Mazur 1990) et que par exemple, Levin (1981) parle de transport. Notons que ce dernier inclut la possibilité d'une pression différentielle dans l'équation de transport d'eau. Par contre, cette pression n'aurait aucun rôle, dans le transport des solutés.

L'idée la plus généralisée est que, les cryoprotecteurs pénètrent à l'intérieur des cellules ou des tissus par équilibration thermodynamique avec l'environnement (Elmoazzen *et al.* , 2005). Les caractéristiques biophysiques de la membrane plasmique mises en jeu durant cette étape sont : la sensibilité osmotique de celle-ci et sa perméabilité à la fois aux cryoprotecteurs et à l'eau. De ces caractéristiques dépend l'état du matériel récupéré après cryopreservation (Agca.Y *et al.* , 2005).

La perméabilité de la membrane cellulaire à l'eau et au soluté a été modélisée par Kedem et Katchalsky (1958). Bien que ce modèle ait fait l'objet de nombreuses remarques de la part de Richardson (1970), il a cependant été largement repris plus tard par Kleinhans (1998) puis par Devireddy et collaborateurs (2002). Selon ces auteurs, le

flux de l'eau et du soluté via la membrane cellulaire est relaté par les équations suivantes :

$$dV_w / dt = - L_p A R T (M^e - M^i)$$

$$dN_s / dt = P_s A (M^e_s - M^i_s)$$

Avec :

$V_w$  : Volume d'eau intracellulaire ( $\mu\text{m}^3$ ).

$L_p$  : Perméabilité de l'eau (cm/s atm).

$A$  : Superficie de la cellule ( $\mu\text{m}^2$ ).

$R$  : Constante universelle des gaz [ $(\mu\text{m}^3 \text{ atm}) / (\text{mol K})$ ].

$T$  : Température absolue (K).

$M^e$  et  $M^i$  : osmolalité externe et interne.

$N_s$  : Nombre de moles du soluté filtrant à l'intérieur de la cellule.

$P_s$  : Perméabilité du soluté (cm /s).

$M^e_s$  et  $M^i_s$  : osmolalité externe et interne de l'agent cryoprotecteur filtrant.

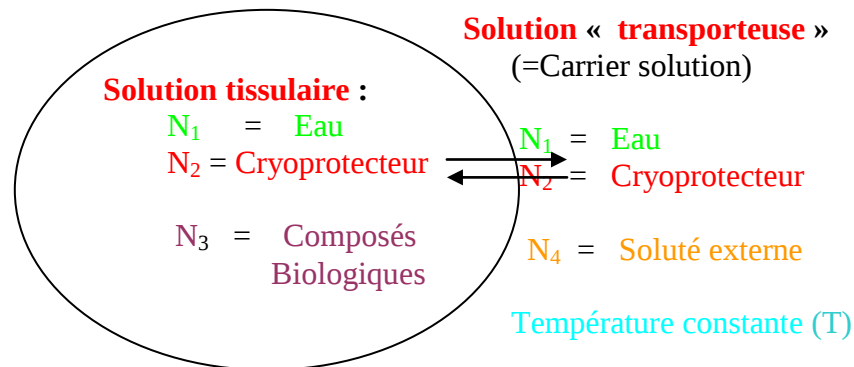
Mukherjee et ses collaborateurs (2007) mettent en évidence qu'il existe des paramètres autres que ceux figurants dans les équations ci-dessus qui entrent en jeu dans la perméabilité membranaire. Il s'agit de l'organisation et l'agencement des cellules, de l'évolution de la température, de la concentration initiale en agent cryoprotecteur, du mode de culture cellulaire et du type cellulaire. Selon ces auteurs, la concentration initiale en agent cryoprotecteur peu augmenter ou diminuer la perméabilité membranaire vis-à-vis de certains types de soluté.

D'un point de vue thermodynamique, lorsque le tissu peut maintenir une pression différentielle d'équilibre sur la solution environnante, la concentration d'équilibre en cryoprotecteurs à l'intérieur du tissu est inférieure ou égale à celle de la solution environnante (Elmoazzen *et al.* , 2005).

Rappelons, qu'une solution est un mélange homogène de deux ou plusieurs substances et que la substance majoritaire est appelée solvant, alors que les substances minoritaires sont appelées solutés, qu'une solution diluée est caractérisée par une quantité de soluté très inférieure à la quantité totale de solution (Ravomanana ,2005).

Indépendamment du fait que de nombreux auteurs attestent que les mixtures de cryoprotecteurs soient plus avantageuses que les solutions ne contenant qu'un seul soluté (Vajta *et al.* , 1999 ; Paynter *et al.* , 1999), il est admis aussi, que pour qu'une solution de vitrification soit biologiquement applicable, les cryoprotecteurs qui la constituent doivent être dissous dans des solutions que les anglophones nomment : « carrier ou vehicle solution ». Ces solutions apportent un support osmotique et physiologique pour les systèmes vivants (Wusteman<sub>a</sub> *et al.* , 2008). Ainsi, à la longue liste de cryoprotecteurs s'ajoute celle des solutions « transporteuses ». Notons qu'une spécificité rigoureuse couple les cryoprotecteurs aux « solutions transporteuses » dans la mesure où, une « solution transporteuse » peut s'avérer excellente pour un cryoprotecteur donné et inefficace pour un autre (Fahy *et al.* , 2002). La nécessité d'avoir un excellent transporteur est d'autant plus importante que le matériel à congeler est massif ce qui est le cas des organes et des tissus composites (Fahy et Ali, 1997).

Lors de l'étude thermodynamique de l'équilibre, deux cas de figure peuvent se présenter à savoir que l'on soit en présence de solution diluée idéale ou non. Une étude approfondie de cet aspect de la problématique a été menée par Elmoazzen et ses collaborateurs (2005). Il ressort qu'en présence d'une solution diluée idéale, l'équilibration entre la solution extracellulaire et le tissu est assurée par un ensemble de mouvements représentés en figure 1 :



**Figure 1 :** Equilibration du cryoprotecteur entre la solution extracellulaire et le tissu (Elmoazzen *et al.*, 2005)

Il est admis que l'eau et le cryoprotecteur sont libres de traverser la solution tissulaire frontalière, alors que les composés biologiques (exemple la matrice) séjournent dans le tissu et que toute la solution transporteuse complémentaire (carrier solution en anglais) reste hors du tissu. Le système est entièrement maintenu à température constante (Figure 1). En équilibre thermodynamique, le potentiel chimique de l'eau est le même aussi bien à l'intérieur du tissu qu'au niveau du milieu environnant, il en est de même pour le potentiel chimique du cryoprotecteur. Il en découle dans ce cas, qu'en équilibre thermodynamique, la concentration en cryoprotecteur de la solution environnante est aussi égale à celle de la solution à l'intérieur du tissu. Rappelons, que le potentiel chimique mesure la capacité d'une substance à réagir ou à se déplacer et que seule une molécule (ou un ion) a un potentiel chimique. Ce dernier, varie avec, la concentration, la pression et la température (Ravomanana, 2005). Selon l'équation de J.W. Gibbs, le potentiel chimique qui se note  $\mu$  est lié à la concentration par l'équation suivante :

$$\mu = \mu_o + RT \ln (C_1 / C_2)$$

Avec :

$\mu$  = Potentiel chimique.

$\mu_o$  = Potentiel chimique standard ( $T^o = 298 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ atm}$ ).

$R$  = Constante des gaz parfaits.

$T$  = Température.

$C_1$  et  $C_2$  = Différentes concentrations.

Pour que les concentrations extérieures et intérieures en cryoprotecteur soient égales, il faudrait qu'il n'y ait pas de différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur du tissu. Cela signifie que les tissus soient capables de se distendre jusqu'à ce que la fraction molaire des composés biologiques soit égale à la fraction molaire des composés extracellulaires. Les cellules se gonfleront jusqu'à ce que la contribution des

composés biologiques soit égale à celle des composés non filtrants de la solution environnante. La pression à l'intérieur du tissu (ou de la cellule) sera égale à celle de l'environnement, alors, la concentration d'équilibre en cryoprotecteur à l'intérieur du matériel biologique étudié sera elle aussi égale à celle de la solution environnante. Inversement, si un tissu ne peut pas se distendre pour suffisamment diluer les composés biologiques à l'équilibre il maintiendra une différence de pression entre son milieu interne et la solution environnante. Il en découlera que la concentration d'équilibre en cryoprotecteur à l'intérieur du tissu sera différente de celle de la solution environnante et cela même dans le cas des solutions diluées. Notons, que dans le cas des solutions non diluées les auteurs sont parvenus aux mêmes conclusions (Elmoazzen *et al.* , 2005).

### **1-2-2 La cryopreservation en équilibre osmotique.**

C'est la cryopreservation qui se fait après que le matériel biologique ait eu le temps de réaliser les échanges nécessaires avec le milieu de suspension pour tendre vers un équilibre osmotique. Selon Leibo (1989), les embryons survivent mieux à la congélation lorsqu'ils sont suspendus dans des solutions de concentration molaire d'un (ou de plusieurs) soluté de poids moléculaire bas.

La plupart des cryoprotecteurs, sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules, aussi bien à température ambiante qu'en deçà. Pour que la protection du matériel traité soit assurée, il faut que soit réalisée au moins une partielle infiltration du cryoprotecteur. Lorsque les ovules et les embryons sont exposés à un cryoprotecteur, pénétrant, leur première réponse à ce contact se traduit par une perte osmotique d'eau pour réaliser un équilibre entre le milieu extra et intracellulaire. Comme l'additif pénètre l'embryon, on note parallèlement un regonflement de l'embryon. Ce dernier se redilate graduellement au fur et à mesure que l'eau rentre à nouveau pour maintenir l'équilibre osmotique. Le taux auquel cette ré-expansion se produit varie suivant :

- L'espèce de l'embryon.
- Le stade de développement embryonnaire.
- Le ratio : surface de l'embryon /volume.
- La nature du cryoprotecteur.
- La température d'exposition.

Lorsque les embryons, suspendus dans la solution cryoprotectrice, sont refroidis en dessous de zéro, plusieurs changements physiques, chimiques et physiologiques surviennent. Usuellement, aux températures en dessous de -10°C, la glace se forme spontanément ou par induction artificielle nommée « seeding ». Cette cristallisation extracellulaire est équivalente à une immobilisation d'eau sous forme de glace. Il en résulte une augmentation de la concentration au niveau de la fraction extracellulaire non cristallisée (Mazur, 1963 et 1984). Il faut noter que cette augmentation de concentration est liée à la température et qu'elle a lieu aux températures en dessous de zéro. Dès que cette augmentation a lieu, l'embryon devient alors imperméable au cryoprotecteur auquel il était perméable aux températures au-dessus de zéro (Leibo ,1989). Comme la température continue de baisser, la concentration de la solution extracellulaire continue de croître et les embryons et les ovules continuent de se contracter par déshydratation osmotique (Leibo *et al.* , 1978 ; Shabana et Grath, 1988 ; Lehn-Jensen et Rall, 1983 ; Rall *et al.* , 1983 ; Leibo *et al.* ,1984 ; Rall *et al.* , 1984 ; Rall et Polge, 1984).

Les embryons et ovules continuent à se contracter et à perdre de l'eau en fonction de la cinétique de refroidissement, cela même en dessous de zéro (Mazur, 1963).

- Lorsque la vitesse de refroidissement est faible (inférieure ou égale à 1°C/Minute), le matériel biologique continu de perdre de l'eau et reste en équilibre osmotique aux températures en dessous de -25°C.

- Lorsque la vitesse de refroidissement est élevée, les températures basses sont atteintes plus rapidement, ce qui empêche de nouvelles pertes d'eau. Dans ce cas, le milieu intra cellulaire est plus riche en eau que dans le cas précédent et cette eau se congèle formant de la glace intracellulaire (Leibo *et al.* , 1978 ; Lehn-Jensen et Rall, 1983 ; Leibo *et al.* , 1984 ; Rall *et al.*, 1984 ; Rall et Polge, 1984 ; Myers *et al.* , 1987). Notons qu'une telle nucléation intracellulaire n'entraîne pas de lésions intracellulaires irréversibles mais produit cependant un état métastable (état de la matière qu'un facteur déclenchant peut troubler). Cet état est stable, cinétiquement mais pas thermodynamiquement. C'est selon les conditions de réchauffage que cet état peut ou non mener à des lésions (Rall *et al.*, 1984).

La probabilité de formation de glace intracellulaire et l'importance de celle-ci dépendent de la cinétique de refroidissement « cooling rate ». La cinétique de refroidissement conduisant à la congélation intracellulaire d'un matériel biologique dépend de son ratio surface/volume et de la température. Mais la principale caractéristique déterminant la dépendance de la formation de glace intracellulaire par rapport à la cinétique de refroidissement est la conductivité hydraulique (ou le coefficient de perméabilité à l'eau) des ovules et embryons. Notons, que ce coefficient dépend de la température. Leibo (1980) rapporte, que les ovules de hamster ont un coefficient de perméabilité à l'eau, presque deux fois plus élevé que celui des ovules de souris, bien que les ovules des deux espèces aient approximativement le même volume. La congélation d'ovules de souris, nécessite une cinétique de refroidissement moins importante que celle requise pour les ovules de hamster.

La survie, des ovules et embryons cryopréservés dépend, de manière aussi critique de la cinétique de réchauffement que de refroidissement qui l'a précédée. En générale, pour la survie des embryons, il y a une interdépendance entre la cinétique de refroidissement et celle de réchauffement. C'est ainsi que :

- Les embryons qui ont été lentement refroidis seulement de -30° C à -40 °C avant d'être plongés dans l'azote liquide, doivent être réchauffés après stockage rapidement pour qu'ils puissent survivre( Leibo 1989).
- Les embryons qui ont été lentement refroidis à des températures allant jusqu'à -65°C ou même en dessous, doivent généralement être lentement réchauffés pour qu'ils puissent survivre (whittingham *et al.*, 1972 ; Leibo *et al.* , 1974 ). Notons qu'actuellement, cette deuxième hypothèse est controversée.

L'étape finale de toute procédure de cryopreservation est celle du retrait ou de la dilution du cryoprotecteur. Souvent, des ovules et des embryons qui ont été correctement cryopréservés sont irrémédiablement endommagés durant cette étape. Cela est dû au fait que, ce matériel biologique qui contient une concentration multi molaire en cryoprotecteur, doit être dilué afin d'empêcher le gonflement osmotique excessif

causé par le rapide influx d'eau. Il y a trois façons basiques d'éviter ces chocs osmotiques nuisibles :

- La première consiste à pratiquer plusieurs étapes de dilutions, dans des solutions de pression osmotique décroissante. Cette méthode est fastidieuse et prend beaucoup de temps.
- La deuxième consiste à utiliser un soluté imperméable durant la dilution. Le sucre étant le plus commun en tant que tampon (amortisseur) osmotique. Cette méthode décrite pour la première fois par Leibo et Mazur a été adaptée pour un usage pratique qui a permis une dilution in situ d'embryons cryopréservés (Leibo, 1989).
- La troisième méthode, utilise une température élevée durant la dilution. Cette méthode est basée sur le fait que la perméabilité de l'embryon vis-à-vis du cryoprotecteur augmente aux températures élevées.

### **1-2-3 La cryopreservation en non équilibre osmotique.**

C'est la cryopreservation qui se fait sans que le matériel biologique n'ait eu le temps de réaliser les échanges nécessaires avec le milieu de suspension pour tendre vers un équilibre osmotique. Elle concerne les cryopreservations qui se font par refroidissement rapide (Leibo, 1989). Les procédures de « Rapid- Freezing » et de vitrification sont des modes de cryopreservation qui se font en non-équilibre : elles ne requièrent pas l'accès à un équilibre osmotique entre les solutions intracellulaires et extracellulaires durant la congélation (Fahning et Garcia, 1992 ; Lopez-Béjar et Lopez-Gatius, 2002).

On croyait au départ que pour réussir une congélation d'embryon, il fallait refroidir lentement les embryons lors de la congélation et les chauffer lentement lors de la décongélation (Wilmut, 1972). Puis, il a été mis en évidence qu'un taux élevé de survivants pouvait être obtenu si les embryons étaient refroidis brutalement à des températures très fortement en dessous de zéro avant d'être plongés dans l'azote liquide et d'être au moment voulu réchauffés rapidement. Ce qui suppose que les embryons pourraient ne pas réaliser leur équilibre osmotique durant le refroidissement. Cette vision, a aussi été renforcée, par le fait que des embryons de souris aient été bien préservés en leur faisant subir un refroidissement par paliers à des températures intermédiaires en dessous de zéro avant de les plonger à -196°C dans l'azote liquide (Whittingham *et al.*, 1979). Un grand pourcentage de survivants a été obtenu chez des embryons de souris rapidement refroidis de -7°C à -100°C avant d'être plongés dans la vapeur d'azote liquide (Kasai *et al.*, 1980). Les embryons peuvent donc être cryopréservés avec succès quand ils sont refroidis autrement que dans les conditions permettant la réalisation de l'équilibre (ces conditions étant le refroidissement lent et continu).

Un taux élevé de survivants peut aussi être obtenu quand les embryons sont déshydratés avant tout refroidissement. Les embryons exposés à des mixtures de cryoprotecteurs perméables enrichies d'un soluté non perméant (le sucre en général), se contractent par déshydratation osmotique. Un taux élevé de survivants a été obtenu par rapide et brutal refroidissement des embryons à -30°C permettant leur déshydratation avant de les plonger dans l'azote liquide (Renard J.P, 1984). Par ailleurs,

si les embryons sont mélangés à des solutions de concentration élevée en sucre juste avant le refroidissement, ils peuvent être directement refroidis à -196°C (Szell et Shelton 1986 et 1987).

### **1-3 Les différentes techniques de cryopreservation.**

Il existe deux types de techniques de cryopreservation :

- Les traditionnelles « rate freezing », qui incluent les procédures rapides et les slow-freezing.
- La vitrification.

#### **1-3-1 Le traditionnel « rate freezing ».**

Ce mode de cryopreservation englobe toutes les méthodes de congélations, par paliers. Selon que la cinétique de refroidissement soit, lente ou rapide on parle alors, de rapide ou lente congélation. La cryopreservation d'embryons d'ovins (aux stades morulas et blastocystes) par le « slow-freezing » a permis un taux de naissances de 55,5% après décongélation et réimplantation (Martinez et Matkovic, 1998).

Bien que ces techniques qui ont connu une grande réussite soient de plus en plus délaissées au profit de la vitrification, nous trouvons encore dans la littérature récente, (en 2008), des raisons de ne pas nous en défaire complètement.

Des études comparatives entre l'efficacité du « rapide freezing » et celle de la vitrification ont été menées chez le lapin et le porc. Ainsi, à partir de biopsies issues de la peau de nouveau né (24h à 48h) chez le lapin cryopréservées en « rapid-freezing » on atteint un meilleur taux de subconfluence (94%) qu'avec celles vitrifiées (77%). Dans cette même étude, les résultats obtenus sur la peau de porcs adultes vont dans le même sens à savoir : 100% pour le « rapid-freezing » contre 92% pour la vitrification (Silvestre, 2002).

Notons, que les « rapid-freezing » malgré leur dénomination, n'atteignent cependant pas les vitesses de refroidissement propres aux techniques de vitrification. De plus, ces deux techniques diffèrent fondamentalement de par les concentrations en cryoprotecteurs utilisées. En effet, les vitrifications requièrent des quantités très élevées, (de l'ordre de 40% à 50%) en cryoprotecteurs, (Lopez-Béjar et Lopez-Gatius, 2002).

Des carotides humaines ont été cryopréservées (dans du DMSO) selon une cinétique lente (« slow-freezing ») à raison de 1°C/min jusqu'à -90°C, avant d'être plongées à -196°C dans l'azote liquide pour une période d'un mois. Les segments ainsi traités ont conservés toutes leurs propriétés élastiques et n'ont présenté aucune différence significative avec les segments frais (Bia .D *et al.*, 2006).

Des ovocytes de poisson rayé (*Danio rerio*), cryopréservés selon une méthode lente de congélation, ont présenté immédiatement après décongélation rapide, un taux élevé de viabilité (88%). Cependant, après deux heures d'incubation à 22°C, leur viabilité a chuté à 30% (Guan *et al.*, 2008).

Des cellules embryonnaires souches, de souris transgéniques précieuses pour la recherche biomédicale ont été récemment cryopréservées selon un protocole de slow-freezing. Ce protocole a permis de conserver une intégrité membranaire de 80% du matériel traité (Kashuba Benson *et al.*, 2008).

Enfin, selon Pereira et Marques (2008), pour la cryopreservation des gamètes et des embryons, le slow-freezing présente par rapport à la vitrification l'avantage d'utiliser de faibles concentrations en cryoprotecteurs évitant les problèmes de toxicité chimique et de chocs osmotiques. Même si en contre partie, ces faibles concentrations ont une capacité plus réduite à prévenir la formation de glace.

### **1-3-2 La vitrification.**

Les premières procédures de vitrification ont vu le jour dans les années quatre-vingt (Isachenko *et al.* , 2003). La vitrification est la transformation de la solution aqueuse en forme solide amorphe sans qu'il y ait formation de cristaux. Cela est rendu possible par l'extrême élévation de la viscosité durant le refroidissement. En général, ce procédé requière de très fortes concentrations d'agents cryoprotecteurs et un rapide refroidissement (Elmoazzen *et al.* , 2007 ; Cuello *et al.* , 2008).

Il a été démontré sans équivoque, qu'une des caractéristiques intéressante de la vitrification est que plus on augmentait la vitesse de refroidissement plus on avait la possibilité de diminuer la concentration en cryoprotecteurs et vice versa (Cuello *et al.* , 2008). Notons que des travaux effectués auparavant par ces derniers auteurs démontrent, qu'il est cependant inutile d'augmenter indéfiniment les vitesses de refroidissement. En effet, la vitesse de vitrification d'embryons de porc a été augmenté de 2500°C/min à 20 000° C/min (en utilisant des pailles de plus faible épaisseur et de plus petit diamètre interne). Il a été rapporté suite à ces travaux que cette ultrarapide congélation n'a pas permis d'améliorer les résultats obtenus avec les vitesses usuelles de la vitrification (Cuello *et al.* , 2004).

Des doubles vitrifications ont même été éprouvées sur des embryons de rat de souche Wistar (stades morula et blastocyste). Le matériel décongelé est mis en culture puis recongelé. Bien que les taux de survie baissent après la deuxième vitrification, les auteurs pensent que la double vitrification pourrait être utilisée pour tester la résistance au stress et les qualités fonctionnelles des embryons.

Ce traitement permettrait la révélation des faiblesses morphologiques non détectables des embryons d'une part et la mise en place de procédés de vitrification plus appropriés d'autre part (Isachenko *et al.* ,2003).

La tendance actuelle est d'obtenir des résultats par vitrification, avec les concentrations relativement basses typiques des « slow-freezing ». C'est ainsi que sur des cellules souches embryonnaires de murines, des concentrations en cryoprotecteurs comprises entre 1 et 2M (propres au « slow-freezing ») ont été utilisées avec succès en vitrification (qui requière habituellement des concentrations en cryoprotecteur supérieures à 4M). Après ce mode de cryopreservation combinant les avantages des deux techniques, les cellules récupérées avaient préservé leurs caractères non différenciés et pluripotents (He.X, 2008). La taille de la pièce à cryopréserver semble être un facteur déterminant pour l'efficacité de la méthode de congélation. A ce titre, selon Wusteman et collaborateurs (2004), lorsque les pièces sont volumineuses, la congélation traditionnelle n'est pas envisageable et la vitrification s'avère peu satisfaisante. Enfin, au-delà de la rivalité qui oppose ces deux techniques, une nouvelle stratégie voit le jour. Cette dernière est basée sur la réduction du capital lipidique intracellulaire qui augmenterait du simple au double la tolérance vis-à-vis de la cryopreservation et des micromanipulations (Pereira et Marques ,2008)

#### 1-4 Les cryoprotecteurs : rôles, avantages et inconvénients

Les protocoles de cryopreservation requièrent l'usage d'agents cryoprotecteurs pour améliorer la survie des cellules et des tissus. Ces cryoprotecteurs sont des solutés organiques qui protègent les organelles cellulaires durant la cryopreservation (Manjunatha *et al.*, 2009). La distribution du cryoprotecteur dans l'échantillon à traiter doit être uniforme. Il ne doit pas y avoir de zones insuffisamment protégées et d'autres endommagées parce qu'exposées à des concentrations élevées de cryoprotecteurs (Karlsson et Toner, 1996). La liste des cryoprotecteurs est longue, ils se classent en deux groupes selon qu'ils soient perméables (Me<sub>2</sub> SO, éthylène glycol (E.G), méthanol (Meth) etc..) ou imperméables (Polyvinylpyrrolidone PVP, sucrose etc. ....) (Cabrita *et al.*, 2003).

Les cryoprotecteurs modèrent les effets létaux de la concentration extracellulaire en sels, ceux de la glace intracellulaire ainsi que ceux de la glace de la matrice des tissus (Bateson *et al.*, 1994 ; Karlsson et Toner, 1996 ; Muldrew *et al.*, 1996 ; Bidault *et al.*, 2000 ; Lakey *et al.*, 2003, Fabbri, 2006). Les agents cryoprotecteurs perméables, protègent les cellules en abaissant les concentrations létales en électrolytes intracellulaires et en diminuant la quantité de glace extracellulaire susceptible de se former (Mukherjee *et al.*, 2007).

L'immersion dans l'azote liquide, du matériel biologique en vue de le conserver ne se fait qu'après qu'il fut imprégné de cryoprotecteurs. Dès cette première étape commune à tous les processus de cryopreservation, chaque matériel biologique, a un comportement spécifique vis-à-vis des différents cryoprotecteurs (Kasai *et al.*, 1981). Chez les préadipocytes de porc par exemple, l'éthylène glycol (EG) s'avère toxique, alors que le DMSO (le Me<sub>2</sub> SO) et le polyvinylpyrrolidone (PVP) ne le sont pas. Du point de vue viabilité après traitement, le PVP permet d'obtenir de meilleurs taux que le DMSO et s'avère être l'agent approprié aux adipocytes (Li *et al.*, 2006). Par contre, chez les embryons de turbot (espèce de poisson plat : *Scophthalmus maxime*), ces trois agents cryoprotecteurs, ne présentent aucune toxicité et permettent tous sans distinction un bon taux de viabilité après décongélation (Cabrita *et al.*, 2003). Il semble que la spécificité de ces agents cryoprotecteurs pour la préservation de chaque type de cellules soit dictée par le type de phospholipides composant la membrane plasmique des cellules. Ces phospholipides dépendant eux mêmes de la longueur de la chaîne acyle. Les détails de la composition en acides gras de la membrane plasmique contribuent à sélectionner les agents appropriés pour chaque spécimen (Siow *et al.*, 2008).

L'enjeu est de mettre au point la combinaison en cryoprotecteurs qui soit à la fois peu toxique et suffisamment stable pour préserver la viabilité du matériel et empêcher la formation de glace (Fahy *et al.*, 2004). A cet effet, Vajta et Kuwayama (2006), parlent de concept de volume essentiel minimal, qui consiste en l'utilisation du plus petit volume possible de solution de vitrification.

Il faut rappeler que l'usage des cryoprotecteurs n'est pas sans risque et que leur cytotoxicité a été prouvée. L'exposition aux cryoprotecteurs a des effets toxiques indépendamment de ceux causés par le froid (Wusteman *et al.*, 2004). Cette toxicité varie d'un type cellulaire à un autre, dépend de la concentration et du type de cryoprotecteur et intervient surtout durant la phase d'équilibration avant la congélation (Wusteman *et al.*, 2008). En effet, la survie du matériel congelé dépend, de la

température, de la composition de la solution de congélation et du temps d'exposition à celle-ci (phase d'équilibration) (Elmoazzen *et al.*, 2007 ; Manjunatha *et al.*, 2009).

L'effet délétère de nombreux agents cryoprotecteurs sur des morulas de souris à 20°C a été mis en évidence. Il s'agit de, l'éthylène glycol (E.G), du glycérol, du DMSO (dimethyl sulphoxide), de l'erythritol, du dimethyl formamide et du sucrose (Kasai *et al.*, 1981). Selon ces auteurs, la toxicité de ces agents dépend de la température à l'instant considéré et des cinétiques de refroidissement et de réchauffement menées durant le protocole. Cependant, il faut noter, qu'il a été démontré, sur des chondrocytes de porc, que l'effet toxique de fortes concentrations de DMSO (dimethylsulphoxide) était plus important à 37°C qu'aux basses températures (Elmoazzen *et al.*, 2007).

Les effets de ces agents sur les cellules sont multiples. Il a été rapporté par exemple, la présence d'altérations au niveau des composés du cytosquelette, des modifications d'ordre biochimique compromettant le développement (Succu *et al.*, 2007 ; Manjunatha *et al.*, 2009). On note aussi, un effet sur la composition des lipides membranaires, qui réduit la fluidité membranaire et qui rend les cellules plus vulnérables à la congélation (Zeron *et al.*, 2002). On mentionne des perturbations osmotiques dommageables au niveau cellulaire (Manjunatha *et al.*, 2009). On note des répercussions au niveau de l'ADN avec apparitions d'aberrations chromosomiques (Men *et al.*, 2003), ainsi que des altérations au niveau des microtubules et au niveau de la polymérisation des microfilaments (Rojas *et al.*, 2004).

Des études montrent que le DMSO et l'éthylène glycol (E.G) induisent une activation parthénogénique chez les ovocytes d'ovins. Ce qui a pour conséquence le durcissement de la zone pellucide et la réduction de la pénétration spermatique (Tian *et al.*, 2007). Il faut savoir enfin, que tous les ovocytes et embryons d'animaux domestiques connaissent des dommages morphologiques et fonctionnels durant leur cryopreservation (Vajta et Kuwayama, 2006).

Il existe cependant certains produits pouvant atténuer la toxicité de bon nombre de cryoprotecteurs. Ces produits entrent dans la composition de la solution dans laquelle les cryoprotecteurs sont dissous. Ces solutions transporteuses que nous avons déjà citées portent le nom de « carrier solution », (Wusteman<sub>a</sub> *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'usage de la choline en remplacement du sodium dans la solution transporteuse, réduit de moitié la toxicité du propane-1,2- diol et du dimethyl sulphoxide (DMSO) (Wusteman<sub>b</sub> *et al.*, 2008). La toxicité chimique de ces agents peut être aussi atténuée en réduisant la température ou en réduisant les temps des échanges des cryoprotecteurs lors des étapes d'addition et de retrait de ces derniers (Mukherjee *et al.*, 2007). Des traitements préalables peuvent aussi réduire la toxicité de certains cryoprotecteurs. Ainsi, la sensibilité au DMSO des spermatozoïdes canins est moins importante, si ces derniers sont suspendus au préalable dans une solution de vitellus-citrate (E.Y.C) (Songsasen *et al.*, 2002).

Certains sucres rares qui sont des monosaccharides ont des capacités cryoprotectrices vis-à-vis des cellules de la plupart des mammifères. C'est le cas du D-Allose et du tréhalose (un disaccharide composé de deux molécules de glucose) qui sont reconnus comme cryoprotecteurs non perméables. Bien qu'actuellement le dimethyl sulphoxide (DMSO qui est le Me<sub>2</sub> SO) soit considéré comme le meilleur cryoprotecteur pour les cellules, certains auteurs envisagent son remplacement par le D-Allose en

raison de la non-toxicité de ce dernier,(Sui *et al* ., 2007). D'autres auteurs rapportent que la vitrification d'artères carotides de lapin avec du propanediol seul est impossible alors qu'elle devient réalisable lorsqu'on rajoute du tréhalose. Ce dernier aurait même la capacité de réduire la toxicité du propanediol (Wusteman<sub>b</sub> *et al* ., 2008). Notons, que l'effet des sucres sur la réduction de la toxicité des cryoprotecteurs avait déjà été évoqué auparavant. Par ailleurs, He.X et collaborateurs (2008) ont démontré que, le tréhalose extracellulaire (non perméant) et le 1,2-propanediol intracellulaire (perméant) travaillaient synergiquement pour protéger les cellules souches (E.S) de murines. L'addition de 0,5M de tréhalose dans la solution de vitrification réduit la probabilité de nucléation extracellulaire et permet d'accéder à des taux de viabilité post-vitrification supérieurs à 70%. Par ailleurs, cette addition de tréhalose entraîne aussi une augmentation de la concentration extracellulaire induisant une déshydratation des cellules réduisant l'activité de l'eau aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules. Compte tenu du nombre élevé de molécules jouant un rôle cryoprotecteur et des affinités de celles-ci entre elles et vis-à-vis des divers matériels biologiques, compte tenu aussi des différentes techniques de congélation, il semble donc que chaque protocole et chaque matériel traité nécessitera sa propre solution de cryopreservation avec des concentrations appropriées.

## **1-5 Les différentes voies de cryopreservation.**

C'est durant la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, qu'ont eu lieu les considérables avancées en matière de technologies reproductives chez les mammifères appelées aussi technologies de reproduction assistée (A.R.T) (Andrabi et Maxwell, 2007). Ces technologies incluent production d'embryons in vitro destinés à la réimplantation et le clonage. Cependant, dans la plus part des cas, l'indisponibilité à l'état frais de cellules reproductrices (spermatozoïdes et ovocytes) et des tissus (tissus testiculaires et ovariens) est conjuguée aux problèmes de synchronisation en matière de maturité sexuelle des donneurs et receveurs. Ces obstacles ont fait ressentir la nécessité et l'urgence de la cryopreservation des cellules et des tissus reproducteurs (Woods *et al* ., 2004). Depuis l'avènement du clonage en tant que nouvelle méthode de reproduction (Vignon 2008), la maîtrise du stockage des cellules somatiques en particulier les fibroblastes est devenue nécessaire. En effet, l'intérêt de la cryoconservation des cellules somatiques pour sauvegarder les ressources génétiques des espèces de mammifères en voie de disparition n'est plus à démontrer de nos jours (Silvestre et al ., 2002 ; 2003<sub>b</sub> et 2004). Ce procédé nommé GRB (genetic resource banking) tient maintenant sa place dans les biotechnologies reproductives modernes. Il est cité au même titre que l'insémination artificielle, le transfert d'embryons, la fécondation in vitro, la micromanipulation de gamètes et d'embryons ou le clonage. Il constitue lui aussi une stratégie pour freiner l'érosion de la biodiversité (Andrabi et Maxwell ,2007). Aujourd'hui, les voies de cryopreservation sont au nombre de trois :

- La voie embryonnaire (et ce à différents stades).
- La voie germinale (spermatozoïdes et ovules).
- La voie somatique (elle regroupe tous les types cellulaires isolés, tissulaires et voire organes)

### 1-5-1 La voie embryonnaire.

La nécessité de préserver les embryons s'est faite ressentir aussi bien pour résoudre les problèmes de stérilité chez les humains (Baudot *et al.*, 2007) que pour cryopréserver les espèces (Woods *et al.*, 2004). Différents stades embryonnaires ont été éprouvés avec succès au niveau de nombreuses espèces :

- Chez le porc par vitrification pour des embryons stade 2-4 blastomères (Cuello *et al.*, 2007).
- Chez le lapin par vitrification pour des zygotes au stade des pronoyaux (Hochi *et al.*, 2003) de morula stade-32 (Silvestre *et al.*, 2003<sub>a</sub>) et de blastocyste (Lopez-Béjar et Lopez-Gatius, 2002) qui montrent pour ce dernier cas que les résultats sont meilleurs pour les blastocystes que pour les morulas.
- Chez le flet (espèce de poisson à protéger), Chen et Tian (2005) montrent que les stades 4 somites et bourgeons caudales sont les meilleurs stades pour une cryopreservation du fait de leur plus grande tolérance aux cryoprotecteurs.
- Chez l'homme enfin, alors que depuis 25 ans, la cryopreservation au stade 2 cellules est la plus sûre, celle des blastocystes en revanche est limitée à ce jour, avec des taux de grossesses extrêmement variables. Notons cependant, qu'en dépit de ses nombreux avantages en tant que solution à la stérilité des couples, la cryopreservation d'embryons humains rencontre encore des problèmes d'ordre éthique. En effet la crainte viendrait du devenir du surplus d'embryons cryopréservés qui pourraient soit être détruits soit détournés pour d'autres recherches (Michelmann et Nayudu, 2006).

### 1-5-2 La voie germinale.

La cryopreservation des ovocytes constitue un potentiel d'appoint important pour assister les technologies reproductives, tout en contournant les dilemmes éthiques, moraux et religieux posés par la cryopreservation des embryons humains (Fabbri, 2006). Il faut cependant savoir que la cryopreservation des ovocytes ne permet que de faibles rendements du fait de leur fragilité et sensibilité vis-à-vis du froid (Pereira et marques 2008). De plus leur niveau de maturité semble être un facteur déterminant. En effet, la cryopreservation d'ovocytes (de porc) obtenus par maturation *in vitro* a été éprouvée avec de meilleurs résultats sur les ovocytes matures que ceux immatures (Somfai *et al.*, 2007). Du tissu ovarien a été cryopréservé avec un taux de viabilité après décongélation de 60% pour les petits follicules et de 50% pour les follicules primordiaux normaux (Baudot *et al.*, 2007).

La cryopreservation des spermatozoïdes, contribue aussi à l'expansion des techniques reproductives telles que l'insémination artificielle et la fécondation *in vitro*. Il faut cependant noter que les protocoles de préservation de ces cellules varient énormément d'une espèce animale à l'autre. Il y aurait par exemple une différence entre les résultats obtenus chez les équidés et ceux des autres mammifères (Devireddy *et al.*,

2002). D'autre part selon ces auteurs, du sperme de cheval peut parfaitement être cryopréservé sans cryoprotecteurs avec une cinétique de refroidissement de  $\sim 29^{\circ}\text{C}/\text{min}$  alors qu'en présence de cryoprotecteurs la cinétique requise serait de  $\sim 60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Du sperme de deux espèces de gazelle en voie de disparition (*Gazella gazella* et *Gazella dorcas*) a été cryopréservé à 6h et 24h post-mortem. Les taux de viabilité de spermatozoïdes après décongélation étaient de 58% et leur motilité variant de 15% à 63% (Saragusty *et al.*, 2006).

Des inséminations artificielles réalisées avec de la semence de bélier, congelée puis décongelée ont connu un taux de fertilité de 20%, ce qui constitue selon les auteurs un résultat convenable (Barbas et Mascarenhas, 2009). Enfin, des spermatozoïdes de poulet ont conservé après décongélation 85% de leur fertilité (Blesbois *et al.*, 2008).

### 1-5-3 La voie somatique.

Avant l'avènement du clonage, la cryopreservation des cellules somatiques était exclusivement au service de la médecine curative ou esthétique. Les premières transplantations de peau pour pallier aux brûlures graves et autres maladies de la peau remontent au début du siècle dernier (Davis, 1910). Dès lors, la nécessité de stockage s'est faite ressentir. Actuellement, la cryopreservation de peau humaine en vue de réaliser des allogreffes pour traiter les brûlés dépasse les 80% de taux de réussite et des cryobanques fonctionnelles sont en place (Alotto *et al.*, 2002).

Depuis 1997, la cryopreservation de vaisseaux sanguins et de systèmes plus fins encore a été réalisée avec un succès raisonnable alors que la cryopreservation des organes entiers est plus dure à mettre au point (Fahy, *et al.*, 2004).

Des lambeaux de tissus épigastriques de mâles chez le rat Lewis refroidis à  $-140^{\circ}\text{C}$  dans du DMSO puis transférés dans l'azote liquide sont greffés sur des animaux receveurs avec autant de succès que les lambeaux de tissus frais (Cui *et al.*, 2007).

Chez les invertébrés, des cellules vésiculaires de *Crassostrea gigas* (mollusque) ont un taux de viabilité de 70% après cryopreservation (Hanquet-Dufour, *et al.* 2006).

Depuis l'avènement du clonage, un autre créneau que celui médical a été envisagé par les scientifiques avec pour ambition, la création de cryobanques pour le stockage de fibroblastes afin de permettre la reconstitution par transfert nucléaire d'espèces menacées d'extinction. Dès lors, des essais de régénération de fibroblastes à partir de biopsies cryopréservées ont été tentés chez de nombreuses espèces.

Des cellules somatiques ont permis d'obtenir des clones viables et fertiles chez le furet domestique (*Mustela putorius furo*). Il faut noter cependant, qu'à l'instar de la plus part des cas de clonage, les taux de réussite sont faibles, de l'ordre de 3 à 4 % seulement (Li *et al.*, 2006). Notons, qu'en général, les taux de réussite du clonage avoisinent les 5% (Vignon, 2008).

Chez les bovins, la possibilité de régénérer des cellules viables à partir de peau de fœtus congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en vue de transfert nucléaire a été étudiée. Il s'est avéré que 35% des clones obtenus à partir de ces cellules ont atteint le stade blastocyste contre 38% pour ceux obtenus à partir de cellules fraîches (différence non significative  $p > 0,05$ ) (Fahrudin *et al.*, 2002).

Chez le lapin et le porc, des biopsies de peau (prélevées sur des fœtus âgés de 12 jours, sur des nouveaux nés et sur des adultes) ont été cryopréservées. Après décongélation, tous ce matériel biologique a pu atteindre une fois mis en culture des taux de confluence allant de 92 à 100% (Silvestre *et al.*., 2002).

Chez une espèce de poisson (*Carassius auratus*) la cryopreservation des nageoires anales a permis de récupérer 65% de leur viabilité. Des résultats probants ont été rapportés pour tous types de nageoires à l'exception des dorsales (Mauger *et al.*., 2006). Plus tard, sur l'espèce *Carassius auratus*, il a été mis en évidence qu'au bout de 14 jours de culture, les explants cryopréservés présentaient les mêmes taux de croissance que les frais (Moritz et Labbe, 2008).

Il faut cependant noter que le succès largement rencontré au niveau de la production d'animaux à partir de cellules somatiques, ne se généraliserait pas aux primates non humains. En effet, chez le singe rhésus et chez le macaque, le clonage par transfert nucléaire de cellules somatiques (SCNT), ne permet pas d'obtenir des naissances viables telles qu'elles sont obtenues par transfert nucléaire (NT) à partir de cellules embryonnaires (Chen *et al.*, 2006). Ces auteurs pensent que cela serait peut-être le fait d'une reprogrammation incomplète du noyau de la cellule donneuse. Parmi les paramètres qui jouent sur la capacité du cytoplasme à reprogrammer le noyau de la cellule donneuse on note, les changements épigénétiques se produisant durant le développement après le transfert nucléaire et le stade du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2006).

Parallèlement, un défi supplémentaire s'est greffé à la problématique : la possibilité de stocker à des temps post-mortem de plus en plus longs des biopsies aptes à produire après cryopreservation des fibroblastes viables. A ces temps post-mortem s'associent bien évidemment les températures de stockage durant ces laps de temps. Le but étant de palier à la disparition d'animaux précieux en réintroduisant le patrimoine génétique perdu via le clonage. C'est ainsi, que des biopsies de lapin et de porc, prélevées sur des animaux 24h, 48h, 72h et 240h après leur mort ont été conservées à 4°C et à des températures ambiantes de 22°C, 25°C et de 35°C. Il en est ressorti de cette étude, que pour la température extrême de 35°C au delà des 24h post-mortem, il n'y pas eu récupération de fibroblastes. Notons, que pour les biopsies prélevées à 24h post-mortem ayant séjournées à 35°C il y a eu un taux de confluence de 70% après cryopreservation puis mise en culture. La meilleure manière de sauvegarder dans l'urgence des biopsies en vue de régénérer des fibroblastes est de les stocker à 4°C. En effet, 100% des biopsies de lapin stockées durant 240h (temps post-mortem) à 4°C congelées puis mises en culture ont atteint la subconfluence (Silvestre *et al.*, 2003). Les mêmes expériences ont été reconduites avec d'autres espèces animales, les résultats obtenus après vitrification puis mise en culture pour des biopsies stockées à certaines températures durant des temps post-mortem donnés sont :

- Chez la chèvre et chez les bovins, 80% des biopsies ont atteint la subconfluence pour les lots prélevés sur des animaux à 96h post-mortem et stockés à 25°C.
- Chez le mouton, 90% des biopsies ont atteint la subconfluence pour les lots prélevés sur des animaux à 96h post-mortem et stockés à 25°C (Silvestre *et al.*, 2004).

Bien qu'il ait été possible de régénérer des fibroblastes humains à partir de biopsies ayant été conservées à 4°C de zéro jour à 35 jours post-mortem, il faut noter cependant que les taux de viabilité obtenus au bout des 35 jours se sont avérés significativement inférieurs à ceux obtenus à partir de biopsies fraîches. Les auteurs rapportent que cette décroissance commence à s'observer à partir du septième jour de stockage (Hautier *et al.*, 2008).

## **1-6 Le clonage.**

Les recherches sur le clonage par transfert de noyau participent à l'émergence d'une nouvelle méthode de reproduction des animaux de rente. Celle-ci élargit la panoplie des biotechnologies de la reproduction mises en œuvre depuis le milieu du siècle dernier dans les élevages, d'abord avec l'insémination artificielle chez l'espèce bovine, puis avec la maîtrise des cycles ovariens, la transplantation embryonnaire et la production d'embryons *in vitro* » (Vignon *et al.*, 2008). En effet, depuis la naissance de Dolly (1996), le premier animal produit par transfert nucléaire à partir d'une cellule somatique prélevée sur un adulte, les chercheurs n'ont cessé de tenter la généralisation du concept aux autres espèces animales (Campbell *et al.*, 2007). Peu de temps après (1998),

Chez le bovin, le Docteur X. Vignon et son équipe de l'I.N.R.A. de Jouy en Josas (Paris) ont cloné la première vache européenne obtenue par transfert nucléaire. Ces expériences permettaient alors de démontrer que des noyaux de cellules somatiques cultivées issues de tissus différenciés pouvaient être rendus multipotents (Vignon *et al.*, 1998). Ces avancées ont permis de percevoir la nécessité du clonage non seulement en tant que nouvelle méthode de production animale mais aussi et surtout comme moyen de reconstitution d'espèces éteintes. En effet, après l'extinction du bucardo, une sous-espèce endémique de bouquetin d'Espagne (*Capra pyrenaica pyrenaica*), la reconstitution de cette dernière a été possible par clonage. En 1999, des biopsies de peau ont été cryopréservées après avoir été prélevées sur le dernier spécimen vivant qui était une femelle et ce une année avant sa mort (qui s'est produite en l'an 2000). Dans un deuxième temps, des ovocytes prélevés sur des chèvres domestiques superovulées (par des traitements hormonaux) ont été énucléés puis couplés (par électrofusion) aux fibroblastes cryopréservés issus de l'espèce éteinte. Les embryons ainsi reconstitués ont été mis en culture avant d'être transférés en fonction de leur stade de développement dans l'utérus d'une chèvre domestique receveuse. De cette expérience, un bucardo femelle, morphologiquement normal est né par césarienne. L'étude de l'A.D.N. nucléaire a confirmé que le clone obtenu était génétiquement identique à celui des cellules donneuses (Folch *et al.*, 2009).

Bien que les taux de viabilité restent encore relativement bas, actuellement, la faisabilité du procédé biologique est démontré et les recherches s'orientent aujourd'hui vers la généralisation du clonage à d'autres espèces, la congélation d'embryons clonés, le point sur les caractéristiques anatomophysiologiques de ces clones etc.... C'est ainsi que des embryons clonés par transfert nucléaire à partir de cellules somatiques (S.C.N.T : « Somatic Cell Nuclear Transfer ») ont été obtenus puis cryopréservés au stade blastocyste chez le porc avec des taux de survie après vitrification avoisinant ceux des contrôles (Du *et al.*, 2007). Des embryons clonés à partir de cellules du cumulus chez le bovin ont été congelés puis décongelés. Ces derniers ont fait l'objet d'implantation et des gestations ont été menées puis interrompues au bout de 25, de 45 et de 75 jours de

gestation afin de récupérer les fœtus pour analyse. Il en est ressorti de cette analyse, que chez les sujets clonés, les anomalies morphologiques du fœtus et du placenta se manifestaient après 45 jours de gestation (Loneragan *et al.* , 2007).

Enfin une étude relative au comportement des clones a été menée chez des génisses prépubères obtenues par transfert nucléaire à partir de cellules somatiques prélevées sur des génisses âgées de 13 ans. Les traits de caractères étudiés se rapportaient au comportement de jeu, à la fréquence des mouvements, le rapport agressivité-dominance, la curiosité et les vocalisations. Il en est ressorti qu'il n'y avait pas de différence entre les clones et les témoins en ce qui concerne les comportements de jeux et les vocalisations. Par contre, les clones présentaient un plus grand niveau de curiosité et étaient plus agressifs et dominants que les contrôles. Il a été rapporté aussi, que les clones préféraient la compagnie des autres clones, ce qui a laissé penser aux auteurs qu'il y aurait une reconnaissance parentale génétique (Savage *et al.* , 2003).

## **Chapitre II : Etudes expérimentales**

### **2- 1 Matériel et méthodes.**

#### **2-1-1 Matériel biologique et mise en culture des lots témoins.**

Notre expérimentation, a entièrement porté sur des explants d'oreilles de lapines récupérés juste après l'abattage des bêtes, ce qui correspond à un stade 0h post-mortem. Ce matériel biologique a été gracieusement mis à notre disposition par l'abattoir de l'I.N.R.A de Jouy en Josas (Paris) qui est propriétaire des souches utilisées. Les élevages et abattoir de cette institution répondent aux normes sanitaires les plus exigeantes et font l'objet de contrôles vétérinaires réguliers. Ce contexte nous a permis d'effectuer notre travail dans des conditions optimales d'hygiène et de sécurité sanitaire compatibles avec les exigences de la cryobiologie en cette matière. Les prélèvements effectués sur la souche I.N.R.A, ont porté sur trois classes d'âge à savoir :

- Classe I : constituée de lapines âgées d'un mois et demi.
- Classe II : constituée de lapines âgées de quatre mois et demi.
- Classe III constituée de lapines âgées d'un an et demi.

Les zones apicales d'oreilles de lapines sont récupérées de l'abattoir au moment même de l'abattage. Elles sont nettoyées au savon et rasées sur la paillasse. Puis, sous la hotte à flux laminaire après un très bref passage à l'éthanol à 75% (étape importante afin d'éviter de cryopréserver du matériel contaminé (Irland et Spemann, 2005) elles sont rincées deux fois de suite dans 20ml de P.B.S puis disposées dans des boîtes de pétries P<sub>100</sub> (boîtes de diamètre 100 mm). Dans 20 ml de P.B.S, des biopsies de 1,0 mm<sup>2</sup> environ sont découpées à l'aide de matériel à dissection stérile. Ces biopsies sont alors baignées, durant 30 minutes dans de la collagénase à 0,05% (2,5 mg collagénase dans 5ml de DMEM à 0% SVF), le tout entreposé dans un incubateur humidifié à 5% CO<sub>2</sub> et réglé à 38°C, (notons, que toute notre expérimentation est menée dans le même incubateur). Puis les biopsies subissent trois rinçages consécutifs dans du DMEM à 0% SVF afin d'éliminer totalement la collagénase. La mise en culture de ces biopsies se fait dans des boîtes de pétri P<sub>35</sub> (de diamètre 35mm) spécifiques pour la culture cellulaire de marque Falcon. Pour chaque lapine, nous mettons en culture selon les expériences entre 150 à 360 biopsies réparties en lots de 15 par boîte P<sub>35</sub>.

Les biopsies sont d'abord déposées à sec durant 2 à 3 minutes afin d'assurer une meilleure adhérence au substrat. Après quoi, elles sont délicatement recouvertes de 700 µL de milieu enrichi (DMEM +10%SVF +5% de Penicilline-Streptomycine). Les boîtes sont ensuite entreposées dans l'incubateur, d'où elles ne doivent pas être déplacées sous 48h. Passé ce délai, le niveau en milieu de culture des boîtes doit être ajusté. La fréquence de cet ajustement du niveau est de 48h les premiers jours, puis de 24h dès que les divisions deviennent intenses entraînant une plus grande consommation de milieu de culture. La quantité de milieu à rajouter est de 150 µL environ. Ce volume est introduit goutte à goutte à l'aide d'une micropipette pour éviter de décoller les biopsies du substrat. Notons, que l'adhérence des biopsies au substrat est une condition sine qua non au démarrage des colonies. Après avoir séjourné 48h à l'incubateur, les boîtes sont observées quotidiennement au microscope inversé afin de repérer l'apparition des premières colonies de fibroblastes. Les observations faites à partir de ces boîtes nous

renseignent sur la viabilité des biopsies à 0h post-mortem des lots témoins. Ces observations se font au microscope inversé et la viabilité des biopsies pour chaque boîte P<sub>35</sub> qui correspond au taux de régénération est chiffrée par le rapport : Nombre de colonies / Nombre de biopsies.

### 2-1-2 Protocole global de congélation adopté.

Le schéma général commun à toutes les procédures de cryopreservation (cité en introduction, page 7) a été adapté à notre problématique. Il en a découlé le plan de travail suivant :

**Etape I : addition du ou des cryoprotecteurs.** Au préalable, nous avons évalué la toxicité de deux cryoprotecteurs vis-à-vis de notre matériel biologique. Les cryoprotecteurs testés sont : l'éthylène glycol (E.G) et le diméthyl sulphoxide (D.M.S.O.). Compte tenu des résultats de notre expérimentation, (cf. chapitre 2-2-2), le choix du D.M.S.O s'est imposé pour la suite de nos travaux. Quant à la durée de l'étape d'addition du cryoprotecteur, elle est de 20 minutes, de ce fait nous pouvons estimer, qu'il s'agit d'une cryopreservation s'effectuant en équilibre osmotique (cet aspect est développé en 2-1-3).

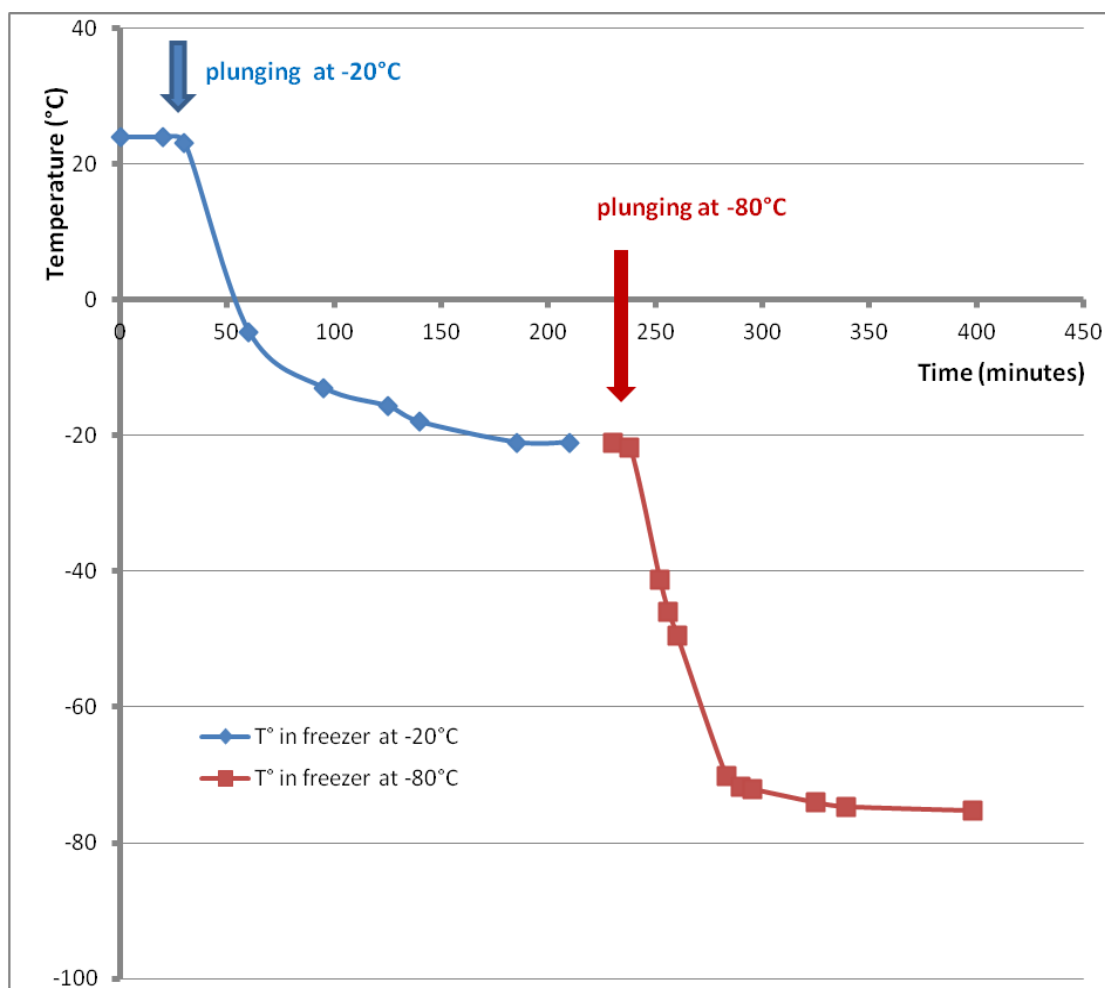
**Etape II : refroidissement.** Le mode de refroidissement retenu est de type lent (« slow-rate freezing »), comportant deux paliers de refroidissement avant immersion en azote liquide.

- **Le premier palier de refroidissement**, correspond à un abaissement de la température à - 20°C. Cette température est caractéristique des congélateurs domestiques accessibles à tout un chacun. Notre espoir est de pouvoir confier à l'éleveur l'étape I et la première phase de l'étape II. En effet nous nous sommes fixé comme but de mettre au point une solution de congélation, avec laquelle, l'éleveur, pourra en situation d'urgence assurer l'étape I et la phase citées ci dessus et en attendant d'être relayé par des équipes compétentes. Nous nous sommes posés aussi, la question des limites de la prolongation de cette étape: en d'autres termes, de combien de temps disposerait l'éleveur avant toute autre intervention ? Nous avons testé pour cette durée de stockage à -20°C les valeurs : d'une journée, puis de 5, 10 et 20 jours. L'idéal étant bien entendu, que ce début de processus puisse être extensible dans le temps pour agrandir la marge de manœuvre de l'éleveur en situations extrêmes.

- **Le deuxième palier de refroidissement**, consiste en un abaissement de la température à -80°C, pratiqué 24h (ou plus selon le cas) après le premier refroidissement cité ci dessus. C'est à compter de cette étape que le relais doit être pris par les structures compétentes disposant de congélateurs pouvant atteindre les - 80°C. Cette étape ne dure que 24 heures dans tous les cas.

La cinétique de refroidissement a été mesurée à l'aide d'un thermocouple dont la sonde transperce le bouchon du cryotube et baigne dans la solution de congélation dosée à 10% de DMSO. Cela nous a permis d'établir une courbe (figure 2), révélant les taux de refroidissement pour les deux paliers étudiés. Ces taux sont respectivement :

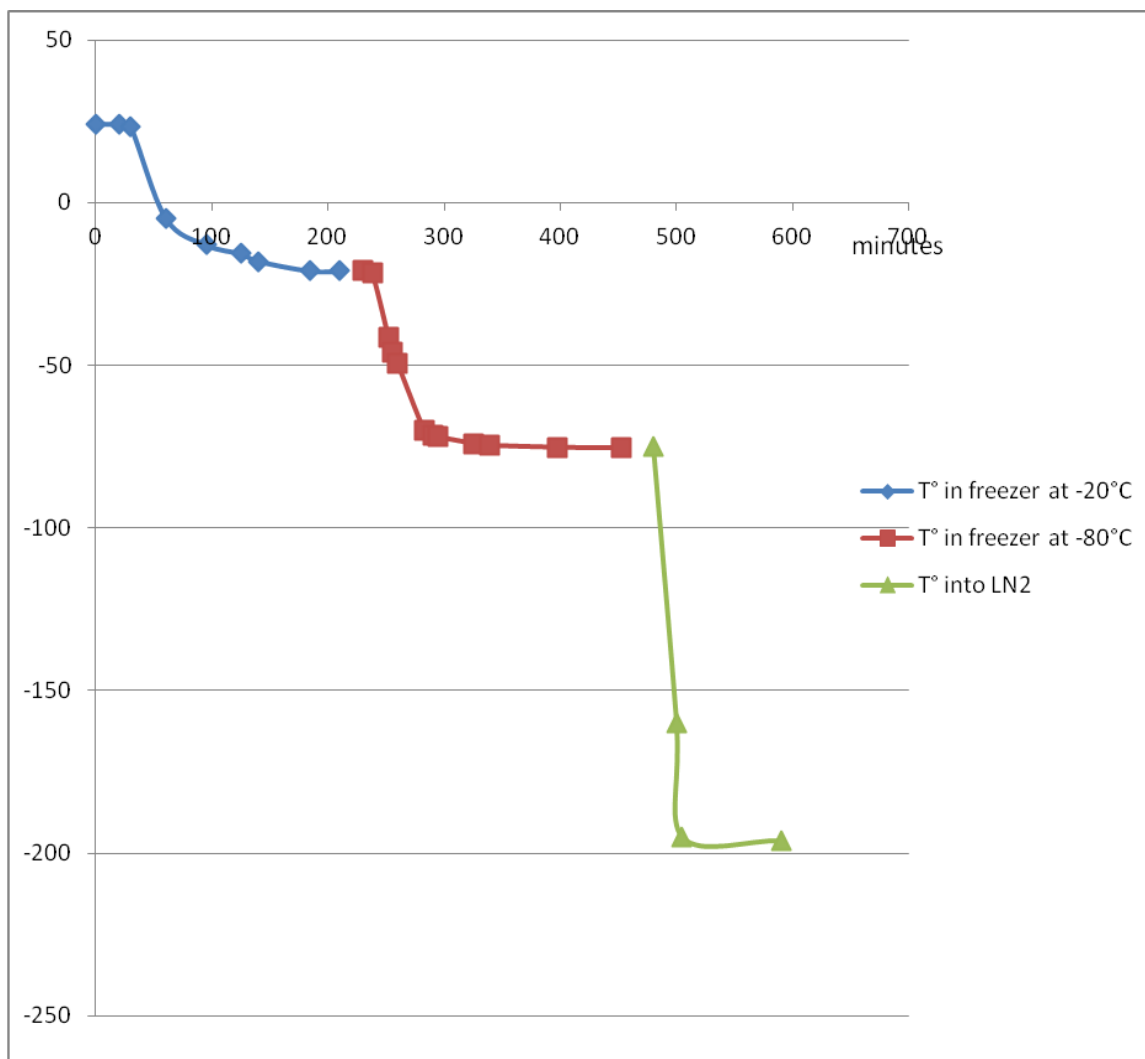
- 0,5°C/min lors de la congélation à -20°C.
- 1°C/min lors de la congélation à - 80°C.



**Figure 2 :** Courbes d'abaissement de la température lors des Congélations à  $-20^{\circ}\text{C}$  et à  $-80^{\circ}\text{C}$

L'allure des deux courbes nous confirme bien que le mode de refroidissement avant immersion en azote liquide n'est pas brutal. L'abaissement de la température se fait lentement, qu'il s'agisse de l'étape de la congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou de l'étape de la congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cependant, il faut noter que la vitesse de refroidissement à  $-80^{\circ}\text{C}$  est deux fois plus rapide qu'à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Etape III : stockage dans l'azote liquide.** Les cryotubes comportant les explants y sont stockés durant un mois en immersion dans des canisters disposés dans des bonbonnes d'azote liquide (dont la température est de  $-196^{\circ}\text{C}$ ). La courbe de refroidissement correspondant à cette étape est obtenue de la même manière que celle décrite ci-dessus et est relatée en figure 3 qui regroupe les trois étapes de refroidissement.



**Figure 3 :** Courbes d'abaissement de la température lors des congélations à  $-20^{\circ}\text{C}$  et à  $-80^{\circ}\text{C}$  et de l'immersion en azote liquide.

Contrairement aux deux étapes de refroidissement pré azote liquide, l'immersion en azote liquide correspond à un refroidissement brutal dans la mesure où il est extrêmement rapide. La courbe révèle que le passage de  $-80^{\circ}\text{C}$  à  $-196^{\circ}\text{C}$  est obtenu quasi instantanément.

**Etape IV : réchauffement.** Notre choix a porté sur un mode de réchauffement rapide, faisant coïncider le réchauffement avec le retrait du cryoprotecteur et la réhydratation des cellules (ce qui correspond à un jumelage des étapes IV et V), décrite en introduction (page 8). Pour ce faire, nous utilisons un milieu de culture non enrichi préchauffé à la température de  $37^{\circ}\text{C}$ . Les cryotubes stockées dans l'azote liquide sont récupérés pour être traités sous la hotte à flux laminaire selon le protocole de décongélation déjà décrit (fin du paragraphe 2-1-3).

Une fois le processus de décongélation achevé, les biopsies sont ensuite traitées à la collagénase, puis mises en cultures dans des boîtes de pétri (selon le protocole décrit en 2-1-1), pour évaluer leur capacité à générer des colonies de fibroblastes. Cette évaluation est basée sur l'observation quotidienne des boîtes, sur le comptage des

colonies au fur et à mesure de leurs apparitions. Ce qui nous permet en fin d'expérimentation le calcul du taux de régénération. Ce dernier correspondant au rapport : nombre de colonies / nombre de biopsies.

### **2-1- 3 : Mode d'addition et de retrait du cryoprotecteur :**

Alors que certaines biopsies sont mises en culture de suite après la mort de l'animal (constituant nos lots témoins), d'autres sont cryopréservées dans des solutions à base de DMSO en guise de cryoprotecteur (le choix de cet agent est justifié au chapitre 2-2-2). La congélation est faite par refroidissement lent à deux paliers. Après avoir été nettoyées et découpées (comme indiqué en 2-1-1), les biopsies sont plongées à température ambiante (sous la hotte) durant 20 minutes dans des cryotubes contenant 1ml de solution de congélation. Le DMSO étant perméable (Cabrita *et al.*, 2003), nous pensons, que c'est durant cette étape que s'établit l'équilibre osmotique entre le matériel biologique et la solution de congélation. Cette étape est déterminante car les cryoprotecteurs ne peuvent protéger les tissus des dommages causés par la congélation que s'ils pénètrent tous les constituants de la cellule (S.A Isbell *et al.*, 1997). En même temps, il faut éviter que les biopsies subissent une longue exposition aux cryoprotecteurs compte tenu de leur toxicité. D'autre part, nous savons selon S.P Leibo (1989) que lorsque les concentrations molaires en cryoprotecteurs sont basses, (ce qui est notre cas soit de 10 ou de 20%), l'équilibre osmotique se réalise aussi bien avant que pendant le refroidissement en dessous de 0°C. C'est, en prenant en compte ces faits, que le choix d'une exposition au cryoprotecteur de vingt minutes seulement nous a semblé être un bon compromis. Il faut noter cependant que les temps nécessaires à l'équilibration osmotique rapportés dans la littérature sont disparates. C'est ainsi que ce temps est d'une heure (dans le DMSO) pour les artères de lapins, valves cardiaques de porc et cartilage articulaire d'ovins (Elmoazzen *et al.*, 2005). Alors qu'il faudrait 24h pour atteindre le complet équilibre pour des échantillons d'organes (rein et foie) de rat traités au DMSO (S.A Isbell *et al.*, 1997).

Il faut noter que dans ce dernier cas l'auteur expérimente des concentrations très élevées de DMSO (de l'ordre de 60 et 70%) ce qui expliquerait le temps mis à réaliser l'équilibre. Dans notre cas, les solutions de congélation sont selon les expérimentations, soit de 10% DMSO (1 ml de DMSO pour 9 ml d'Embryo Holding Medium) soit de 20% DMSO (2 ml de DMSO pour 8 ml d'Embryo Holding Medium). Ensuite, dans tous les cas, les cryotubes sont stockés à -20°C pour des durées variant selon l'expérience (1, 5, 10 et 20 jours). Une fois ces durées respectivement écoulées, tous les cryotubes sont transférés à -80°C pour 24 h avant d'être plongés dans l'azote liquide. Notons que les cryotubes sont directement plongés à -20°C, puis sont transférés à -80°C pour une durée de 24 h dans des boîtes de polystyrène préalablement refroidies. Notons que ces boîtes de 15 cm de long, de 8 cm de large pour 8 cm de hauteur et dont les bords ont un centimètre d'épaisseur sont elles aussi disposées vides à -80°C pour une durée de 24 h. Passé ce délai, les boîtes de polystyrène déjà refroidies sont remplies d'azote liquide pour y recevoir les cryotubes juste avant leur transfert définitif vers les bonbonnes d'azote liquide.

La décongélation, se fait par un procédé rapide pour éviter que les cellules ne s'imprègnent de cryoprotecteur et pour éviter aussi la formation de cristaux. Pour cela, 700 µL de milieu non enrichi (0% SVF) préchauffé à 37°C sont introduits dans les cryotubes. Des mouvements rapides d'aspirations puis de refoulements à l'aide de

micropipette sont pratiqués dans le but de décoller le culot de biopsies des parois du cryotube. Dès lors, le culot encore non décongelé est plongé dans un tube conique à centrifuger contenant 13 ml de milieu non enrichi préchauffé à 37°C. Après la fermeture du tube, celui-ci est soumis à un léger mouvement de bascule, jusqu'à séparation des biopsies. Puis le tube est mis à centrifuger pendant 5 minutes à la vitesse de 1000 tours/minute. Le surnageant est ensuite aspiré et les biopsies qui demeurent collées au fond du tube sont manuellement récupérées, traitées à la collagénase et mise en culture (comme indiqué en 2-1-1).

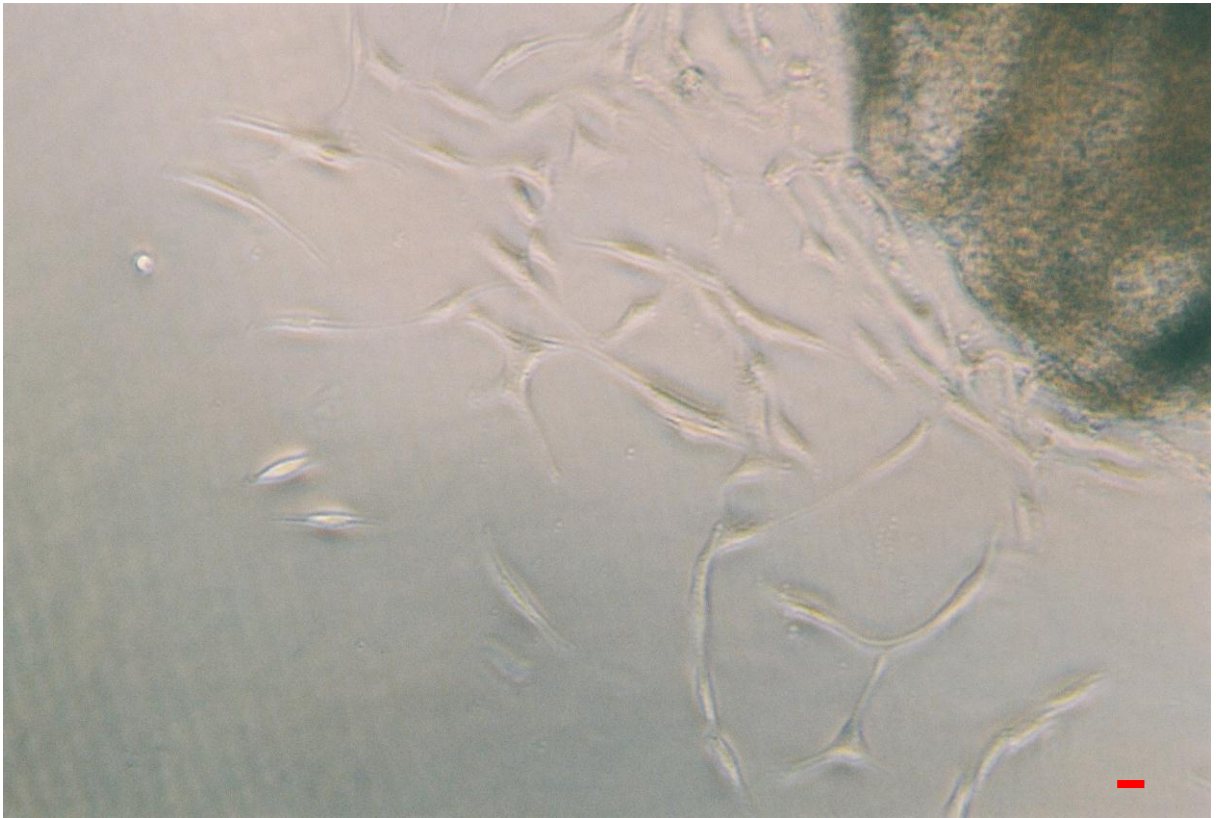
#### **2-1-4 Références des produits chimiques utilisés.**

Les références des produits et les noms des laboratoires fournisseurs sont répertoriés en annexes (pages 76 et 77).

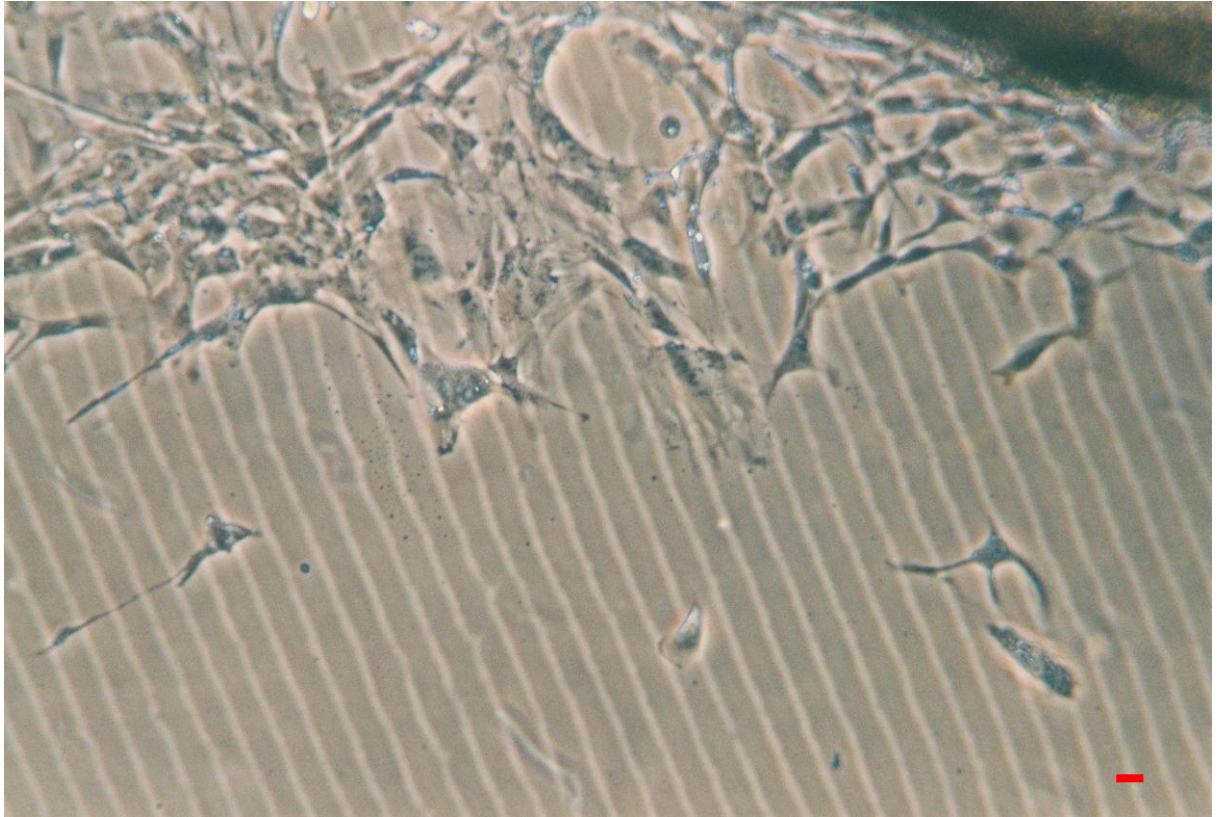
#### **2-1- 5 Evaluation des résultats :**

48 h après leur mise en cultures, les biopsies font l'objet d'observations quasi journalières pour ajuster le niveau en milieu enrichi d'une part et pour surveiller l'apparition de colonies de fibroblastes d'autre part. Notons que dès leur apparition, les colonies de fibroblastes sont minutieusement comptabilisées. Les observations se font au microscope inversé et la viabilité des biopsies pour chaque boîte P<sub>35</sub> et pour chacun des traitements décrits est chiffrée par le rapport : Nombre de colonies / Nombre de biopsies.

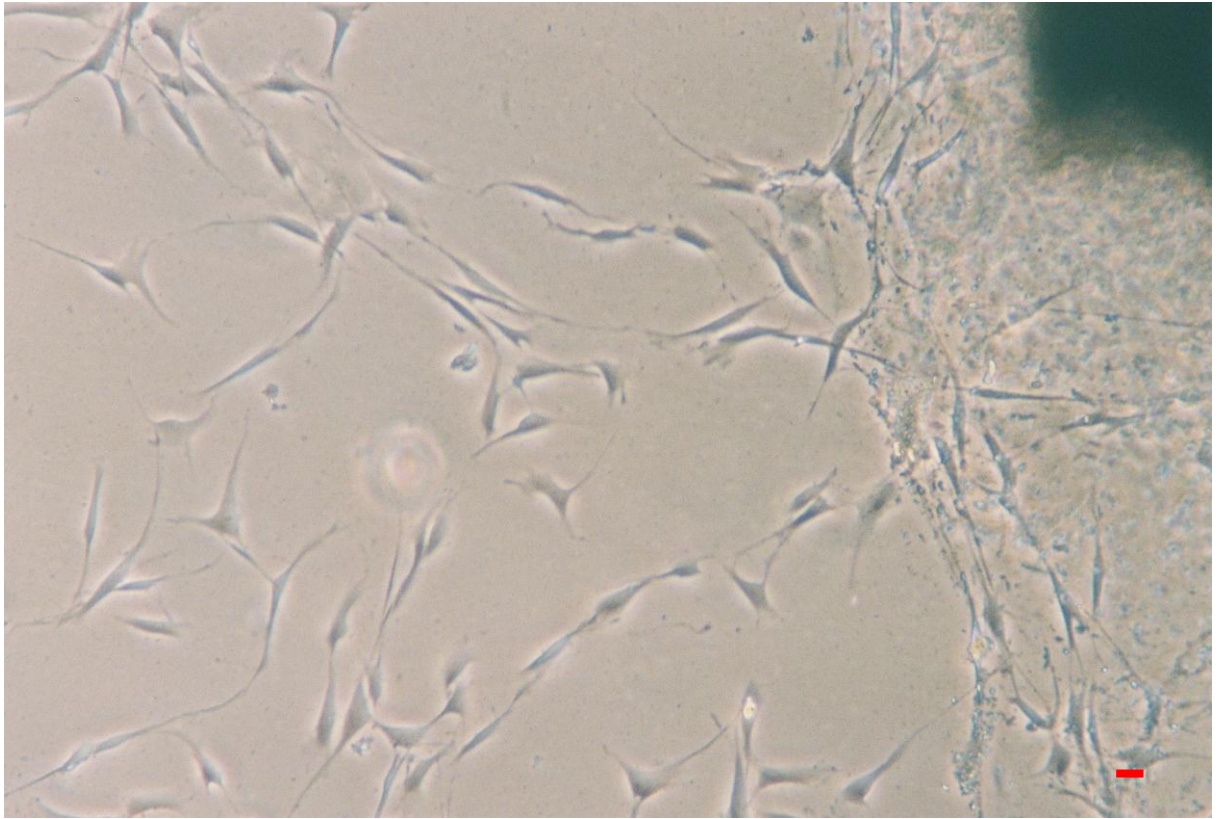
Notons qu'une colonie est constituée de plusieurs fibroblastes qui se sont divisés puis aplatis au fond de la boîte. Certaines colonies se disposent autour de la biopsie mère d'autres migrent un peu plus loin (cf. photographies 1, 2, 3). Au bout d'une vingtaine de jours environ, les boîtes atteignent la subconfluence (photographie 4).



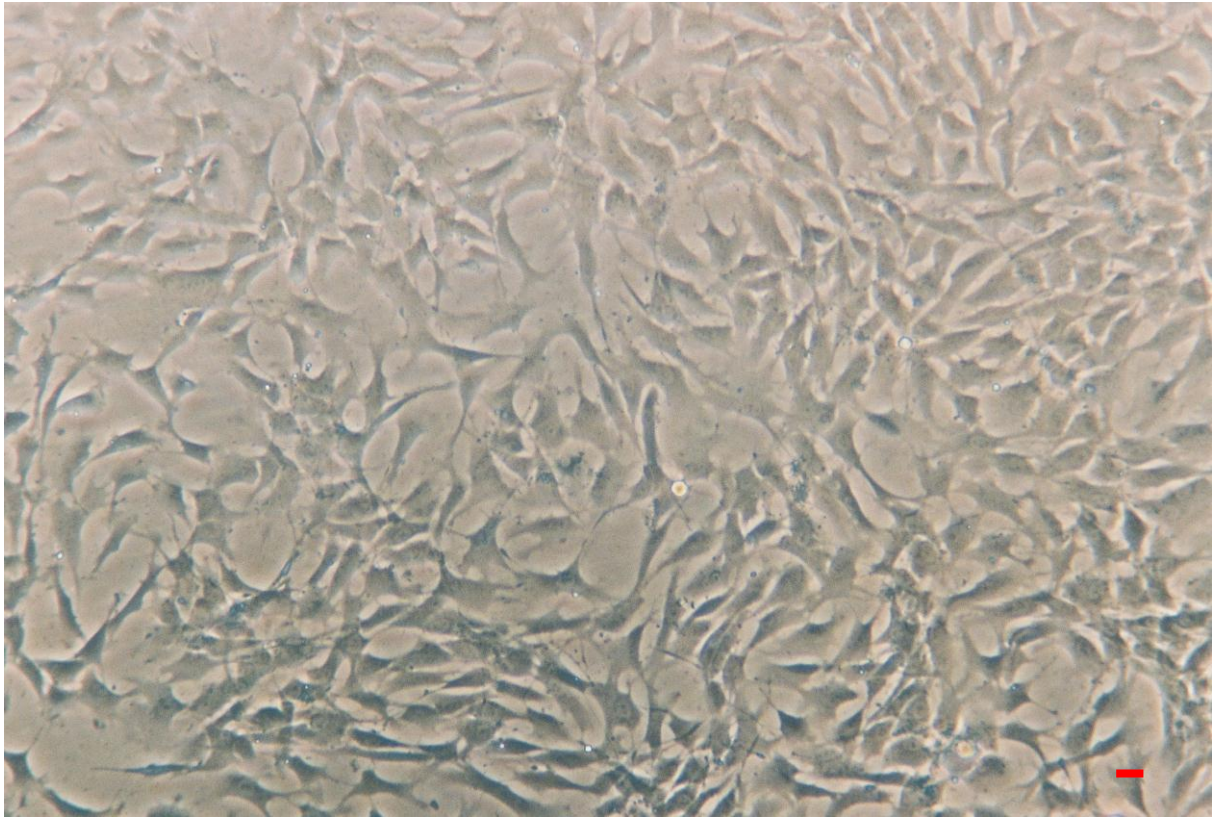
**Photographie 1** : croissance de fibroblastes à partir d'explants d'oreille de lapin, congelés-décongelés puis mis en culture durant 5 jours. Début de formation de colonies (Bar = 10 $\mu$ m).



**Photographie 2** : croissance de fibroblastes à partir d'explants d'oreille de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant 8 jours. (Bar = 10 $\mu$ m).



**Photographie 3** : croissance de fibroblastes à partir d'explants d'oreille de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant 10 jours. Etirement des fibroblastes pour coloniser les extrémités de la boîte de pétrie. (Bar = 10µm).



**Photographie 4** : Croissance de fibroblastes à partir d'explants d'oreille de lapin congelés-décongelés puis mis en culture durant 20 jours. A ce stade, la culture atteint la subconfluence (Bar = 10 $\mu$ m).

### **2-1-6 Traitements statistiques.**

Les résultats ont été traités selon le logiciel ANOVA .Les tests utilisés sont :

- Test non paramétrique Krukal-Wallis (pour comparer les lots témoins entre les trois classes d'âges en 2-2-1) complété par le test d'homogénéité de Newman-Keuls.
- Test 't' Student (pour tout le reste de l'étude). Test d'analyse de variance à un facteur (pour l'expérience en 2-2-4) complété par le test d'homogénéité de Newman-Keuls.

### **2-2 Expériences et résultats.**

#### **2-2-1 Effet de l'âge des animaux sur la viabilité des fragments de peau mis en culture à 0h post-mortem (lots témoins).**

En situation d'urgence, le choix de l'âge de l'animal à cryopréserver ne relève ni de la volonté des éleveurs ni de celle des équipes impliquées dans les programmes de cryopreservation. Cependant, il nous a semblé intéressant de déterminer la classe d'âge qui nous fournirait les explants dont la qualité répondrait le mieux aux besoins de proliférations intensives nécessaires à l'optimisation des expérimentations. Ces informations seraient exploitables dans le cadre de programmes de cryopreservation menés à titre préventif en dehors de toutes situations d'urgences.

##### **2-2-1-1 Mode opératoire**

En vue de notre étude, des biopsies provenant d'oreilles de lapines de trois classes d'âges ont été mises en culture juste après l'abattage des animaux, ce qui correspond au stade 0H post-mortem. La préparation des biopsies, des milieux de cultures et les conditions de mises en cultures sont menées selon le protocole décrit en 2-1-1. Les classes étudiées sont au nombre de trois:

- Classe I : Lapines âgées d'un mois et demi.
- Classe II : Lapines âgées de quatre mois et demi.
- Classe III : Lapines âgées d'un an et demi.

Les effectifs pour chacune des classes sont les suivants :

- 210 biopsies prélevées sur 7 lapines pour la classe I.
- 240 biopsies prélevées sur 8 lapines pour la classe II.
- 180 biopsies prélevées sur 6 lapines pour la classe III.

##### **2-2-1-2 Résultats et discussion.**

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau I.

**TABLEAU I :**

|                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|
| Effet de l'âge des lapines sur le taux de viabilité des explants frais. |
|-------------------------------------------------------------------------|

| <b>Taux de viabilité</b>                               | <b>Classes d'âge</b> | <b>Classe d'âge I :<br/>(1 mois ½)</b> | <b>Classe d'âge II :<br/>(4 mois ½)</b> | <b>Classe d'âge III :<br/>(1 an ½)</b> |
|--------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Nombre de colonie/nombre de biopsies (% ± Sem).</b> |                      | 98,29% ±2,4% <sup>(a)</sup>            | 87% ± 16% <sup>(a,b)</sup>              | 82,6% ± 9,3% <sup>(c)</sup>            |
| <b>Nombre de lapines.</b>                              |                      | 7                                      | 8                                       | 6                                      |
| <b>Nombre de biopsies</b>                              |                      | 210                                    | 240                                     | 180                                    |

P=0,003<0,005

Il ressort de notre étude statistique, que les taux de viabilité des biopsies présentent des différences significatives en fonction de l'âge de l'animal dont elles sont issues ( $P=0,003 < 0,05$ ). Le taux de viabilité est inversement proportionnel à l'âge de l'animal. En effet, au fur et mesure que l'on progresse dans les classes d'âge les taux de viabilité diminuent. Ces taux sont respectivement de 98% pour les lapereaux d'un mois et demi (classe I); de 87% pour les lapins de quatre mois et demi (classe II) et de 82% pour les lapins d'un an et demi (classe III). Cependant, lorsqu'on affine notre étude statistique en pratiquant le test d'homogénéité de Newman-Keuls, il s'avère que la limite entre les classes d'âge I et III est très nette (exposant a pour la classe I et b pour la classe III dans le tableau I), alors que la limite entre la classe d'âge II et les deux autres n'est pas aussi nette (d'où les exposants a et b à la fois pour la classe II).

Bien que le choix de l'âge de l'animal ne soit pas toujours du ressort de l'éleveur, il semble donc, qu'il soit préférable de prélever des biopsies sur des lapereaux, compte tenu de leur plus grande capacité à régénérer des fibroblastes. Dans le cadre de création de cryobanques, la collecte de jeunes biopsies lorsque celle-ci est possible, s'avère donc plus rentable dans la mesure où elle permet d'accéder pour un coût équivalent en début d'opération à une production de biomasse en fin de parcours significativement plus importante. Bien que ce résultat se soit vérifié de manière récurrente tout au long de nos observations et expériences (cf. Chapitre 2-2-5-2), nous n'avons cependant pas trouvé dans la littérature de données bibliographiques nous permettant de confronter nos résultats.

### **2-2-2 Etude de la toxicité du DMSO et de l'éthylène glycol (E.G) sur des fibroblastes de lapin.**

Les cryoprotecteurs testés sont connus sous les noms suivants :

- Le diméthyl sulphoxide ou DMSO de formule  $\text{Me}_2\text{SO}$ .
- L'éthylène glycol ou E.G de formule :  $\text{C}_2 \text{H}_6 \text{O}_2$ .

Bien que ces agents soient utilisés de façon routinière dans la bibliographie, il nous a semblé important compte tenu du fait que leur toxicité varie d'un type cellulaire à l'autre (Siow *et al.*, 2008 ; Wusteman<sub>a</sub> *et al.*, 2008) de faire le point par rapport à notre matériel biologique. La toxicité de ces cryoprotecteurs est donc étudiée sur une population de fibroblastes de lapin, ce qui constitue un travail préliminaire sur cellules isolées avant de pouvoir traiter les fragments de tissus. Les fibroblastes frais sont obtenus à partir de biopsies fraîches mises en cultures. Les populations ainsi obtenues sont ensuite amplifiées par passages et repiquages successifs (cf. en annexe les protocoles de mise en culture d'amplification et de repiquages pages 79 à 81).

#### **2-2-2-1 Mode opératoire.**

Pour fixer notre choix en matière de cryoprotecteurs (DMSO ou E.G), la concentration testée pour les deux produits est de 20%. Le choix d'une telle concentration nous a semblé justifié par le fait que certains tissus requièrent des concentrations élevées en cryoprotecteurs (Elmoazzen *et al.*, 2007). Deux temps d'exposition à ces produits sont également étudiés (30 et 60 minutes). Les solutions à tester sont préparées selon le protocole publié par Silvestre (2002) à savoir :

- Préparation du sérum de base : F- PBS (2 ml de S.V.F+8ml de PBS)
- Préparation du mélange DMSO-F-PBS (2 ml de DMSO + 8ml de F-PBS)

La solution ainsi obtenue est dosée à 20% en DMSO.

Le protocole de préparation de la solution de congélation à base d'éthylène glycol (E.G) est identique à celui décrit ci-dessus, il nous permet d'obtenir une solution dosée à 20% en éthylène glycol et se réalise avec le mélange :

- Préparation du sérum de base : F- PBS (2 ml de S.V.F+8ml de PBS)
- Préparation du mélange EG-F-PBS (2ml d'EG+8ml de F-PBS).

L'expérience est réalisée sur trois boîtes P<sub>100</sub> contenant chacune des fibroblastes à confluence, ce qui correspond à une population de 5 millions de fibroblastes par boîte confluente. Rappelons que la confluence correspond au stade où les fibroblastes colonisent le fond de la boîte de culture en ne ménageant aucun espace libre entre deux fibroblastes. Ce stade est atteint dans nos conditions expérimentales au bout d'une douzaine de jours environ à partir d'explants frais et autour de vingt jours à partir d'explants décongelés. Chaque boîte confluente est trypsinée (à l'aide de 2ml de trypsine diluée à 0,025% dans du PBS) pour décoller les fibroblastes qui adhèrent au substrat. Le traitement à la trypsine se fait dans l'incubateur et dure 5 minutes. Puis 8ml de DMEM sont ajoutés pour inhiber l'action de la trypsine. Les 10ml résultants (et contenant les fibroblastes en suspension) sont répartis dans 5 tubes (à raison de 2ml par tube). Les tubes sont ensuite mis à centrifuger pendant 5 minutes à 1000Tours /Minutes. Le surnageant est aspiré et le culot obtenu est délicatement resuspendu soit dans 2ml de DMEM enrichi (pour les deux tubes témoins) soit dans 2ml de la solution de cryoprotecteur à tester (pour les trois autres tubes).

Une fois le culot suspendu dans la solution à tester, les tubes sont entreposés à température ambiante sous la hotte durant 30 minutes pour certains et 60 minutes pour d'autres. Ils sont ensuite complétés goutte à goutte avec 8ml de DMEM puis mis à centrifuger. Le surnageant est ensuite aspiré, cette étape correspond à l'élimination du cryoprotecteur. Le culot est délicatement suspendu à nouveau dans 10 ml de milieu enrichi par des aspirations et refoulements à l'aide de la micropipette avant d'être mis en culture dans des boîtes P<sub>100</sub>. Après une mise en culture de 48h, puis une coloration au bleu de trypan, le comptage des cellules vivantes est effectué à l'aide de la cellule de thoma (cf.protocol en annexe page 83 et 84). Sachant qu'une boîte P<sub>100</sub> à confluence contient, environ 5 millions de cellules et que la solution est répartie en 5 tubes (à raison de 2 témoins et 3 tests), Le nombre de fibroblastes mis en culture par boîte de pétri est alors estimé à un million environ.

### **2-2-2-2 Résultats et discussion.**

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau II

**TABLEAU II :**

Evaluation de la toxicité du DMSO et de L'ETHYLENE GLYCOL sur la viabilité des fibroblastes isolés de lapin.

| <div> Durée<br/>d'exposition aux<br/>cryoprotecteurs. </div> <div> Cryoprotecteurs [C°] </div> | 0 mn<br>(Témoin)                  | 30 mn                            | 60 mn                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| DMSO [20%]                                                                                     | 13,17x10 <sup>5</sup> Cell ± 2,61 | 8,00x10 <sup>5</sup> Cell ± 3,13 | 8,12x10 <sup>5</sup> Cell ± 2,25 |
| ETHYLENE GLYCOL [20%]                                                                          | 13,17x10 <sup>5</sup> Cell ± 2,61 | 8,96x10 <sup>5</sup> Cell ± 3,11 | 4,37x10 <sup>5</sup> Cell ± 0,97 |

nb : les souches sont exposées aux cryoprotecteurs aux temps indiqués ci-dessus puis mises en culture durant 48h avant de faire l'objet d'un comptage des cellules vivantes à la cellule de Thoma.

Le traitement statistique des résultats rapportés dans le tableau II, nous révèle que les cryoprotecteurs testés présentent tous deux une toxicité avérée. Dans tous les cas, nous avons comparé l'évolution de la population des souches témoins à celle des souches exposées à chacun des cryoprotecteurs et ce pour les deux temps éprouvés (30 minutes et 60 minutes d'exposition).

**Pour ce qui est du DMSO**, il ressort concernant la viabilité des fibroblastes en fonction de la durée de leur séjour dans une solution dosée à 20% de DMSO avant d'être mis en culture pendant 48h :

- que la population des souches témoins connaît en 48 h un accroissement significatif (au seuil de 5%) et passe de  $10.10^5$  cellules à  $13,17.10^5 \pm 2,61$ . A l'inverse, les souches exposées au DMSO, durant 30 minutes connaissent un taux de mortalité significatif (au seuil de 5%) et chutent d'une population de  $10.10^5$  cellules à  $8.10^5 \pm 3,13$  cellules.

- que les souches exposées au DMSO, durant 60 minutes connaissent elles aussi un taux de mortalité significatif (au seuil de 5%) et passent de  $10.10^5$  cellules à  $8,12.10^5 \pm 2,25$  cellules.

- qu'en revanche, il n'y a pas de différence significative (au seuil de 5%) des taux de mortalité de la populations en fonction des temps d'exposition ( $8,00.10^5 \pm 3,13$  cellules pour 30 minutes d'exposition contre  $8,12.10^5 \pm 2,25$  pour 60 minutes d'exposition). Nous pouvons donc conclure, que le DMSO a un effet toxique avéré induisant un certain taux de mortalité mais que ce taux se stabilise et ne croit pas en fonction du temps d'exposition.

**Pour ce qui est de l'éthylène glycol (E.G)**, il ressort concernant la viabilité des fibroblastes en fonction de la durée de leur séjour dans une solution dosée à 20% d'E.G avant d'être mis en culture pendant 48h :

- que contrairement à la population des souches témoins qui connaît en 48h un accroissement significatif (au seuil de 5%) et passe de  $10.10^5$  cellules à  $13,17.10^5 \pm 2,61$ , les souches exposées à l'éthylène glycol durant 30 minutes connaissent un taux de mortalité significatif (au seuil de 5%) et chutent d'une population de  $10.10^5$  cellules à  $8,96.10^5 \pm 3,11$  cellules.

- que les souches exposées à l'éthylène glycol durant 60 minutes connaissent elles aussi un taux de mortalité significatif (au seuil de 5%) et passent de  $10.10^5$  cellules à  $4,37.10^5 \pm 0,97$  cellules.

- qu'il y a cependant une différence significative (au seuil de 5%) des taux de mortalité des populations en fonction de la durée d'exposition à l'éthylène glycol ( $8,96.10^5 \pm 3,11$  cellules pour 30 minutes d'exposition contre  $4,37.10^5 \pm 0,97$  pour 60 minutes d'exposition) En d'autre termes, l'éthylène glycol (E.G), a non seulement un effet toxique avéré, mais en plus, ce dernier croit significativement (au seuil de 5%) en fonction du temps d'exposition. Contrairement au DMSO, la toxicité de l'E.G croit en fonction du temps d'exposition.

En conclusion, les produits testés présentent tous deux un effet toxique dont la conséquence se traduit par l'induction d'un taux de mortalité significatif (au seuil de 5%) au sein de la population des fibroblastes traités par rapport au lots témoins. Ce taux de mortalité pour une exposition de 30 minutes, ne présente pas de différence significative pour les deux produits ( $8.10^5 \pm 3,13$  cellules pour le DMSO et  $8,96.10^5 \pm 3,11$  cellules pour l'E.G) testés au seuil de 5%. Par contre, pour une exposition de 60 minutes, la toxicité de l'E.G est significativement supérieure à celle du DMSO au seuil de 5% ( $8,12.10^5 \pm 2,25$  cellules pour le DMSO contre  $4,37.10^5 \pm 0,97$  pour l'Ethylène glycol).

Nos résultats vont dans le sens de ceux relatés par certains auteurs. En effet, Li et ses collaborateurs (2006) démontrent que chez les préadipocytes de porc l'Ethylène glycol est plus toxique que le DMSO et que le polyvinylpyrrolidone (PVP). Le DMSO est actuellement considéré comme étant le plus efficace pour la conservation de cellules de mammifères (Sui *et al.*, 2007), de même qu'il est considéré comme étant relativement peu toxique (Wusteman *et al.*, 2008)

D'autre part, bien que de nombreux auteurs utilisent des mélanges de cryoprotecteurs dans leurs solutions de congélation, ( Silvestre *et al.*, 2002 , 2003 et 2004 ; Hochi *et al.*, 2004 , Moritz et Labbe 2008 ) , nous nous sommes inspirés d'auteurs n'ayant utilisés qu'un seul produit (Fahrudin, 2001 ; Mukherjee *et al.*, 2007). Ces derniers auteurs démontrent en effet que chez les murines, les cellules de la lignée  $\beta$ TC-tet tolèrent mieux la présence d'un seul composant .C'est ainsi que 6,0M DMSO seuls ou 6,0 M PD (1,2 propanediol) seuls sont mieux tolérés qu'un mélange 3,0 M DMSO + 3,0 M PD .

A la lumière de nos résultats et des données bibliographiques, la solution de congélation qui s'est imposée pour la suite de nos travaux est une solution ne contenant qu'un seul agent cryoprotecteur : le DMSO.

### **2-2-3 Recherche de la concentration optimale en DMSO pour la congélation à -20°C des fragments de peau avant leur stockage dans l'azote liquide.**

Après avoir sélectionné l'agent cryoprotecteur le mieux toléré par notre souche de fibroblastes, l'enjeu dans un deuxième temps est de déterminer, la concentration optimale de DMSO dans la solution de congélation. Compte tenu de la toxicité des cryoprotecteurs largement évoquée dans la littérature, la concentration recherchée est celle qui tout en étant la moins élevée assurerait le meilleur taux de viabilité après cryopreservation.

Deux concentrations choisies de manière aléatoire de cet agent cryoprotecteur (10% et 20% de DMSO) sont étudiées. Les tests sont effectués cette fois-ci non pas sur des fibroblastes mais sur les biopsies directement. Les biopsies séjournent toutes dans une solution de 10% ou de 20% de DMSO pendant 24 h à -20°C avant d'être selon le cas, soit mises en culture, soit entreposées durant 24h à -80°C puis congelées à -196°C durant un mois avant d'être mises en culture. Toutes ces expériences visant à déterminer la meilleure concentration en DMSO sont réalisées sur des lapines de classe d'âge II (4 mois ½).

### **2-2-3-1 Mode opératoire**

La solution de congélation est selon les besoins de l'expérience soit de 10% DMSO (1 ml de DMSO pour 9 ml d'Embryo Holding Medium) soit de 20% DMSO (2 ml de DMSO pour 8 ml d'Embryo Holding Medium). L'addition (puis plus tard le retrait) du cryoprotecteur est conduite selon le protocole décrit au chapitre II-1-3. Une fois les biopsies dans les cryotubes contenant les différentes solutions de congélation, deux protocoles de cryopreservation sont menés :

#### **D'une part :**

- 300 biopsies (provenant de 10 lapines différentes), baignant dans une solution de congélation dosée à 10% DMSO sont maintenues à – 20°C durant 24h avant d'être mises en culture (protocole décrit en 2-1-1).
- 270 biopsies (provenant de 9 lapines différentes), baignant dans une solution de congélation dosée à 20% DMSO sont maintenues à – 20°C durant 24h avant d'être mises en culture (selon le protocole décrit en 2-1-1).

#### **D'autre part :**

- 360 biopsies (provenant de 12 lapines différentes), baignant dans une solution de congélation dosée à 10% DMSO sont maintenues à – 20°C durant 24h, puis à – 80°C durant 24h et enfin un mois en azote liquide avant d'être décongelées (selon le protocole décrit en 2-1-3) puis mises en culture (selon le protocole décrit en 2-1-1).
- 360 biopsies (provenant de 12 lapines différentes), baignant dans une solution de congélation dosée à 20% DMSO sont maintenues à – 20°C durant 24h, puis à – 80°C durant 24h et enfin un mois en azote liquide avant d'être décongelées (selon le protocole décrit en 2-1-3) puis mises en culture (selon le protocole décrit en 2-1-1).

Des lots témoins constitués de biopsies qui n'ont pas été mises en contact avec la solution de congélation sont mis en culture (selon le protocole décrit en 2-1-1). Ces lots sont constitués de 210 biopsies (provenant de 7 lapines différentes).

### **2-2-3-2 Résultats et discussion.**

Les résultats de viabilité des explants obtenus pour les lots témoins, les deux parcours de refroidissements et pour les deux concentrations testées sont présentés dans le tableau III.

**TABLEAU III**

Comparaison de deux concentrations de DMSO et de deux niveaux de refroidissement  
(lapines âgées de 4mois ½)

| <b>Protocole</b><br><b>[C°] en DMSO</b> | Témoins<br>mis en culture à<br>0hpm                                 | 24h à -20°C<br>Avant<br>mise en culture                              | 24h à -20°C puis 24h à -80°C<br>→ azote<br>→ mise en culture         |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 10% DMSO                                | 87% ± 16% <sup>N.S</sup><br>(7) <sup>*</sup><br>(210) <sup>**</sup> | 79% ± 19% <sup>N.S</sup><br>(10) <sup>*</sup><br>(300) <sup>**</sup> | 84% ± 16% <sup>N.S</sup><br>(12) <sup>*</sup><br>(360) <sup>**</sup> |
| 20% DMSO                                | 87% ± 16% <sup>N.S</sup><br>(7) <sup>*</sup><br>(210) <sup>**</sup> | 82% ± 13% <sup>N.S</sup><br>(9) <sup>*</sup><br>(270) <sup>**</sup>  | 83% ± 19% <sup>N.S</sup><br>(12) <sup>*</sup><br>(360) <sup>**</sup> |

(n)\* = nbre de lapines

(n)\*\* = nbre de biopsies

% = Taux moyens de viabilité des explants après décongélation.

N.S : différence non significative (P>0,005)

N.B : les témoins sont mis en culture sans avoir subis de congélation au préalable.

L'analyse statistique des résultats relatés au tableau III, montre que :

- pour le premier mode de refroidissement (qui se limite à un séjour de 24h à - 20°C pour les biopsies), il n'y a pas de différence significative ( $P>0,05$ ) des taux de régénérescence des biopsies en fonction des concentrations étudiées (respectivement : 79% pour 10% de DMSO et 82% pour 20% de DMSO).

- pour le deuxième mode de refroidissement (pour lequel les biopsies séjournent à - 20°C durant 24h, puis à - 80°C durant 24h et enfin un mois en azote liquide avant d'être décongelées), il n'y a pas de différence significative ( $P>0,05$ ) des taux de régénérescence des biopsies en fonction des concentrations étudiées (qui sont respectivement : 84% pour 10% de DMSO et 83% pour 20% de DMSO ( $P>0,05$ )).

D'autre part, lorsque nous comparons simultanément les différents modes de refroidissements pour les mêmes concentrations (respectivement 79%, 84% pour 10% de DMSO) et (82%, 83% pour 20% de DMSO) les différences ne sont pas significatives dans tous les cas ( $P>0,05$ ).

Enfin, lorsqu'on compare les taux de régénérescence des témoins à ceux des différents modes de refroidissement (dans le strict respect de la durée des étapes décrites ci-dessus) et ce pour les deux concentrations étudiées, les différences ne sont pas significatives dans tous les cas ( $P>0,05$ ). En d'autres termes, les biopsies présentent des taux de régénérescences significativement voisins ( $P>0,05$ ), aussi bien, lorsqu'elles sont mises en culture à 0h post-mortem (lots témoins) que quand elles sont cryopréservées dans des solutions de congélation soit à 10% soit à 20% de DMSO et ce pour les deux modes de congélation tels que décrits ci-dessus. Il n'y a Pas de différence significative entre le taux de régénérescence de 87% des lots témoins, que celui de 79% et de 84% pour 10% de DMSO et que celui de 82% et 83% pour 20% de DMSO ( $P>0,05$ ).

Compte tenu de ces résultats, la concentration retenue pour le reste de notre expérimentation est celle de 10% DMSO (1 ml de DMSO pour 9 ml d'Embryo Holding Medium).

#### **2-2-4 Etude de la viabilité des biopsies en fonction de la durée de leur stockage à - 20°C dans une solution cryoprotectrice avant congélation dans l'azote liquide.**

Comme nous l'avons évoqué en introduction générale, notre objectif est d'évaluer de combien peut être prolongé le stockage des biopsies à - 20°C dans notre solution de congélation avant d'être transféré dans l'azote liquide. Rappelons que la température de -20°C correspond à celle d'un simple congélateur domestique et qu'elle est accessible aux éleveurs. Cela permettrait aux éleveurs en situation d'urgence, de sauvegarder les ressources génétiques d'animaux précieux immédiatement après leur mort tout en disposant ensuite d'un maximum de temps avant l'intervention des professionnels.

##### **2-2-4-1 Mode opératoire**

Pour cette expérimentation, les biopsies sont prélevées (selon le protocole décrit en 2-1-1) sur des oreilles de lapines de quatre mois et demi (classe d'âge II). Puis les biopsies sont plongées dans des cryotubes contenant 1 ml de notre solution de

congélation à 10% DMSO. Ces cryotubes sont maintenus à température ambiante sous la hotte à flux laminaire durant 20 minutes pour que soit réalisé l'équilibre osmotique (cf. 2-1-3). Les cryotubes subissent ensuite trois séjours différents à -20°C (soit 5, 10 et 20 jours) avant d'être maintenus à -80°C durant 24h pour être enfin plongés dans l'azote liquide pour une durée d'un mois. Passé ce temps, les biopsies sont décongelées (selon le protocole décrit en 2-1-3), puis mises en culture (selon le protocole décrit en 2-1-1) afin de comparer leurs taux de viabilité.

Notons que pour ces expériences, en plus des lots témoins habituels, un lot contrôle 2 est également étudié. Ce deuxième lot contrôle nous renseigne sur l'effet du DMSO en dehors de toute congélation. Pour cela, des biopsies prélevées à 0h pm sont baignées à 20°C durant 20 minutes dans une solution à 10% DMSO avant d'être mises en culture. Rappelons, que l'effet létal du DMSO démontré au chapitre 2-2-2 concernait une concentration de 20% en DMSO, une exposition de 30 ou 60 minutes et enfin une mise en culture de 48 h.

Les effectifs mis en jeux lors de cette expérience sont de :

- 210 biopsies prélevées sur 7 lapines pour les lots témoins.
- 180 biopsies prélevées sur 6 lapines pour les lots contrôle 2.
- 300 biopsies prélevées sur 10 lapines pour les lots 5 jours à -20°C.
- 270 biopsies prélevées sur 9 lapines pour les lots 10 jours à -20°C.
- 210 biopsies prélevées sur 7 lapines pour les lots 20 jours à -20°C.

#### **2-2-4-2 Résultats et discussion.**

Le tableau IV présente les résultats obtenus lors de cette expérimentation.

**TABLEAU IV**

Evolution de la viabilité des explants en fonction de la durée du séjour à -20°C avant cryopreservation en azote liquide (âgées de 4 mois ½).

| Témoins mis en culture à 0hpm | Contrôle 2<br>(20 min à +20°C dans le DMSO) | 5j à -20°C→24h à -80°C→<br>azote→culture | 10j à -20°C→ 24h à -80°C→<br>azote→culture | 20j à -20°C→ 24h à -80°C→<br>→azote→culture |
|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 98,29% ± 2,4% <sup>(a)</sup>  | 82% ± 10% <sup>(b)</sup>                    | 87% ± 11% <sup>(b)</sup>                 | 86% ± 10% <sup>(b)</sup>                   | 39% ± 18% <sup>(c)</sup>                    |
| (7) <sup>*</sup>              | (6) <sup>*</sup>                            | (10) <sup>*</sup>                        | (9) <sup>*</sup>                           | (7) <sup>*</sup>                            |
| (210) <sup>**</sup>           | (180) <sup>**</sup>                         | (300) <sup>**</sup>                      | (270) <sup>**</sup>                        | (210) <sup>**</sup>                         |

(n)\* = nbre de lapines

(n)\*\* = nbre de biopsies

% = taux moyens de viabilité des explants après décongélation

Contrôle 2 = biopsies récupérées à 0hpm baignées dans 10% DMSO durant 20min puis mises en culture.

**a, b, c** : les superscriptes sont significativement différents entre eux (P<0,005)

N.B : les témoins sont mis en culture sans avoir subis de congélation au préalable.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative ( $P>0,05$ ) entre ceux ayant effectués 5 ou 10 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être plongés dans l'azote liquide (87% contre 86% respectivement). Par contre, ces taux diffèrent significativement ( $P<0,05$ ) de celui des témoins (98%) alors qu'ils ne diffèrent pas significativement ( $P>0,05$ ) de celui du contrôle 2 (respectivement 87%, 86% et 82%). Notons, qu'il y a une différence significative ( $P<0,05$ ) entre les témoins et les contrôles 2 (respectivement 98% et 82%) ce qui confirme qu'il y a bien un effet létal du DMSO indépendamment de toute congélation et ce même dosé à 10% et pour une exposition de 20 minutes seulement.

En ce qui concerne, le taux de viabilité des biopsies ayant séjournées durant 20 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant passage en azote liquide celui ci est sensiblement plus bas (39%). Il diffère significativement à la fois, des taux obtenus à 5 et 10 jours ( $P<0,05$ ), de celui obtenu avec les témoins ( $P<0,05$ ) et de celui obtenu avec le contrôle 2 ( $P<0,05$ ). L'intérêt de prolonger de plusieurs jours le stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  est justifié par le souci que nous avons de soulager à deux niveaux l'éleveur qui vient de perdre un animal précieux. Le premier niveau est lié au facteur économique car la solution proposée ne doit pas attendre de lui un équipement coûteux de ce fait la congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  reste la plus accessible. Le deuxième niveau est lié au facteur temps, car nous tentons de rallonger au maximum le temps dont dispose l'éleveur pour se rapprocher des structures compétentes pour la prise en charge de la suite du protocole.

D'un point de vu pratique, nos résultats veulent dire que les temps limites durant lesquels des biopsies peuvent être congelées avec succès par des procédés accessibles à des éleveurs en situation d'urgence afin de sauvegarder les ressources génétiques d'animaux précieux immédiatement après leur mort avoisine les vingt jours. En effet, bien que ce taux soit relativement bas, il demeure suffisant pour que les fibroblastes récupérés soient amplifiés par repiquages permettant de constituer des réserves utilisables pour régénérer par transfert nucléaire les animaux précieux disparus (Vignon *et al.*, 1998 ; Du *et al.*, 2007 ; Folch *et al.*, 2009).

#### **2-2-5 Etude de la viabilité en fonction de l'âge des biopsies stockées durant 5 jours à $-20^{\circ}\text{C}$ dans une solution cryoprotectrice avant congélation dans l'azote liquide.**

Afin de boucler la boucle, nous nous sommes demandé enfin, si l'effet âge mis en évidence sur les lots témoins non congelés (en 2-2-1) se faisait ressentir aussi sur les biopsies congelées. La viabilité des biopsies issues de lapines de classe III (un an et demi) ayant séjournées 5 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis 24h à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant transfert en azote liquide est donc étudiée afin d'être confronté à celle déjà étudiée ci-dessus, chez les lapines d'un mois et demi (tableau IV en 2-2-4-2).

##### **2-2-5-1 Mode opératoire.**

Le protocole mené est celui déjà décrit (chapitre 2-2-4-1 à la différence que cette fois, les biopsies sont prélevées sur des lapines âgées d'un an et demi au lieu de quatre mois et demi. Le nombre de biopsies ainsi traitées est de 150 (prélevées sur 5 lapines différentes).

#### **2-2-5-2 Résultats et discussion.**

Les résultats relatifs à l'étude comparative des taux de régénérescence des biopsies stockées durant 5 jours à -20°C (avant poursuite du processus de congélation) en fonction de l'âge sont relatés tableau V.

**TABLEAU V**

Viabilité des explants ayant été stockés durant 5 jours à -20°C en fonction de l'âge.

| Age \ Protocole | 5j à -20°C → 24h à -80°C → azote → culture. |
|-----------------|---------------------------------------------|
| 4 mois ½        | ( 87% ± 11%)*<br>(10)**<br>(300)***         |
| 1 an ½          | (65% ± 14%)*<br>(5) **<br>(150) ***         |

(%± sem)\* = taux moyens de viabilité des explants après  
Décongélation.

(n)\*\* = nbre de lapines

(n)\*\*\* = nbre de biopsies

L'étude statistique de nos résultats nous révèle que pour un même mode de cryopreservation (à savoir stockage à -20°C durant 5 jours avant poursuite du processus de congélation), il y a une différence significative ( $P < 0,05$ ) des taux de viabilité en fonction de l'âge (87% pour la classe II contre 65% pour la classe III). Tout comme pour les témoins mis en culture à 0h post-mortem, il s'avère que même la congélation n'estompe pas l'effet âge. Comme nous l'avons déjà signalé (chapitre 2-2-1), dans le cadre d'une cryopreservation préventive, en dehors de toute situation d'urgence, le choix du matériel à congeler devrait se porter sur des biopsies prélevées sur des animaux jeunes.

### **2-3- Discussion et perspectives.**

Cette étude démontre que, de petits explants de peau d'oreille, cryopréservés selon une simple procédure peuvent, après décongélation recouvrer leur pleine capacité à se multiplier dès leur mise en culture.

Le fait que les biopsies ainsi traitées soient capables de générer des cellules viables après décongélation et que de surcroît, ces cellules soient aptes à fournir un matériel approprié pour la relance des ressources génétiques de l'espèce, rend possible les perspectives de généralisation des cryobanques. Nous avons choisi comme modèle le lapin du fait de son intérêt économique, de son large usage dans les branches biomédicales et de sa remarquable diversité génétique (Joly *et al.* , 2005).

La cryopreservation de biopsies d'oreilles a largement été étudiée par Silvestre et ses collaborateurs (2002, 2003 et 2004). Ces auteurs ont choisi la conservation par vitrification pratiquée sur de minces échantillons de tissus. Ce qui leur a permis d'obtenir après décongélation, des taux de viabilité élevés au niveau de leurs cultures. Cependant, la méthode de vitrification utilisée par ces auteurs, implique l'usage de hautes concentrations en cryoprotecteurs, ce qui risque d'être préjudiciable à la viabilité des cellules, si le temps d'exposition avant une rapide congélation n'est pas réduit (Fahy *et al.* , 1986). En plus du fait que la vitrification nécessite la maîtrise d'une fine technicité, elle requière en outre, la disponibilité d'azote liquide dès le début du processus de cryopreservation des échantillons.

Nous sommes parvenus à obtenir des cellules viables à partir de biopsies congelées selon notre protocole. Nous avons mis au point un procédé simplifié de congélation lente à deux paliers de refroidissement avant immersion en azote liquide. Puis nous avons évalué de combien nous pouvions augmenter la durée de notre premier palier (qui correspond au stockage des explants frais à - 20°C) avant la poursuite de notre processus de congélation.

Cette technique de congélation lente, nous a permis aussi d'atteindre notre objectif en mettant en cause de faibles concentrations en DMSO, compatibles avec une bonne cryopreservation et une faible toxicité pour les cellules. Cela a rendu possible le maintien des échantillons à - 20°C durant un certain temps avant de poursuivre le protocole de congélation. C'est ainsi que nous avons appliqué cette stratégie de congélation lente à de petits explants d'oreilles de lapin avant de les plonger en fin de parcours dans l'azote liquide (après les avoir au préalable stockés durant 24h à - 80°C). Nous avons choisi le DMSO comme agent cryoprotecteur, car largement utilisé pour la cryopreservation des cellules cultivées (Sui *et al.*, 2007 ; Wusteman *et al.* , 2008).

Parallèlement, dans la plupart des laboratoires, les cellules cultivées sont lentement congelées dans des congélateurs à - 80°C simplement en disposant les cryotubes dans des boîtes isothermes en polystyrène (type boîtes Styrofoam). Dans le cas des explants, l'échantillon entier n'est pas également et efficacement cryoprotégé, seules les cellules se trouvant à la périphérie et celles de la matrice lâche de collagène le sont. Ainsi, les échantillons congelés puis décongelés requièrent plus de jours que les explants frais (contrôles) pour croître en culture (Silvestre *et al.*, 2004). Chez certains tissus, les cellules sont capables de résister aux dommages liés à la cryopreservation, du fait de l'effet protecteur de la glace intracellulaire durant le lent refroidissement (Acker et Mc Gann, 2003). La peau d'oreille est essentiellement constituée de tissus épithéliaux et connectifs. Parfois, au niveau des cultures d'échantillons frais, des cellules épithéliales peuvent croître en dehors de l'explant, cela, n'a pas été le cas dans nos cultures du fait de la forte activité proliférique des fibroblastes.

Le développement intensif de ces derniers, empêchant le développement des cellules épithéliales. A partir de biopsies congelées, il s'est avéré aussi, que la plus part des cellules vivantes qui se sont développées étaient des fibroblastes. Ce qui nous a permis de penser que, contrairement aux fibroblastes, les cellules épithéliales ne supportaient pas les procédures de congélation. Comme nous n'avons pas obtenu de divisions cellulaires après décongélation d'explants congelés sans cryoprotecteurs, nous pensons aussi, que les fibroblastes des tissus connectifs de la peau, ne bénéficient pas de l'effet cryoprotecteur de la glace décrit par Acker et Mc Gann (2003). A moins que cet effet protecteur ne s'applique pas aux petites biopsies. Cependant, les petites biopsies provenant d'organes externes sont faciles à collecter et à traiter. Elles constituent l'approche la mieux appropriée pour la préservation de larges collections de matériel génétique à des fins de clonage par transfert nucléaire de noyau somatique.

Les dégâts de la congélation concernant les tissus épais, cryopréservés à des fins de transplantation, ont largement été cités (Pegg, 2006), cependant, de récents travaux assez déroutants ont mis en évidence que les cryoprotecteurs n'étaient pas toujours indispensables. En effet, récemment, Hoshino et collaborateurs (2009) ont pu obtenir chez le taureau, des cellules somatiques à partir de tissus provenant de testicules congelés sans cryoprotecteurs durant 10 ans à - 80°C. Ces auteurs ont par la suite utilisé avec succès ces cellules, à des fins de clonage par transfert de noyau somatique, démontrant ainsi, qu'une bonne cryopreservation sans cryoprotecteur peut s'avérer réalisable. Ces résultats impliquent, qu'au moins un petit nombre de cellules de certains organes peut échapper aux dommages induits par la cristallisation de l'eau et le stress osmotique au niveau d'un tissu congelé sans cryoprotecteur. Cela a aussi été démontré chez d'autres tissus, tel que le tissu osseux, chez qui on note, la présence de cellules vivantes après congélation sans cryoprotecteurs à - 80°C (Heyligers *et al.*, 2005).

Concernant la préservation d'organes entiers, nous devons cependant dire, compte tenu du long temps de stockage dans les cryobanques, que leur préservation, serait techniquement et économiquement peu envisageable et qu'elle impliquerait de trop grands moyens de stockage. Il semble plutôt, que la préservation de petites biopsies d'organes externes (plus facile à collecter et à congeler) soit l'approche la plus appropriée pour la préservation de larges collections de matériel génétique disponibles au service de deux secteurs clefs : le clonage et la production de cellules souches pluripotentes.

En ce qui concerne la production de cellules souches, il a été démontré que des cellules souches pluripotentes pouvaient être obtenues à partir de fibroblastes adultes par induction de gènes spécifiques (Takahashi et Yamanaka, 2006).

Concernant, le clonage, notons qu'il a été démontré que les fibroblastes adultes s'avéraient être d'excellents donneurs dans le cadre des technologies de transfert nucléaire (Vignon *et al.*, 1998). Le clonage a été concluant dans plusieurs cas à partir d'échantillons de peau stockés dans différentes conditions (Farhudin *et al.*, 2001 ; Hoschino *et al.*, 2009). Ceci démontre, la pertinence de la cryopreservation de fragments de peau en vue de restaurer des populations de tissus ou d'individus. C'est dans le but de servir ces technologies que s'inscrit notre travail avec comme objectifs, la mise au point d'un procédé simple de congélation utilisant une solution de congélation peu toxique, le tout permettant l'augmentation du temps de stockage des tissus frais avant toute longue congélation. Dans le cas du lapin, le stockage d'embryons ou de semences est la voie favorite pour la cryopreservation des ressources génétiques. Cependant, en situation d'urgence, la voie somatique reste (comparativement aux voies embryonnaires et celles des cellules reproductrices) la plus pratique en termes d'échantillonnage et de congélation. Cette méthode est donc, une alternative qui nous semble intéressante pour préserver les animaux sauvages ou ceux en danger d'extinction, de même que pour suivre la diversité génétique des populations animales.

Dans notre expérimentation, nous avons observé que la viabilité des explants exposés durant 20 minutes (contrôles 2) à 20°C (température ambiante) dans notre solution de congélation baisse légèrement comparativement à celle des biopsies fraîches. Cependant, le maintien des explants durant 10 jours à - 20°C dans notre solution de congélation est possible, cela avec un taux de régénération intéressant (86 %  $\pm$  10%) et sans effet toxique du DMSO. Il est possible aussi de rallonger ce délai à 20 jours, avec toutefois, une baisse notable de la viabilité qui atteint la valeur de 40%. Ce qui nous pousse à penser que le métabolisme cellulaire n'est pas stable à - 20°C conduisant alors à la mort progressive des cellules. Bien que le taux obtenu au bout de 20 jours soit relativement bas (40%), il demeure tout à fait acceptable pour régénérer les espèces menacées. Le potentiel de division des fibroblastes obtenus dans ces conditions, fourni assez de matériel viable pour satisfaire les biotechnologies reproductives ou les analyses d'ADN.

Dans nos conditions, nous n'avons pas pu stocker les biopsies à température ambiante ni même à 4°C (température d'un réfrigérateur domestique) sans obtenir à chaque fois des nécroses. Alors que, Silvestre et ses collaborateurs (2003<sub>b</sub> et 2004) ont réussi dans cette voie, en stockant avec succès à des températures positives, des oreilles entières prélevées sur des lapins, des moutons, des chèvres et des porcs. La grande taille des tissus doit être probablement déterminante dans la préservation de ces échantillons. Il faut noter cependant, que ces auteurs n'ont pas pu préserver au-delà de 30°C les échantillons d'oreilles prélevés sur lapins et porcs (Silvestre *et al.*, 2003<sub>b</sub>).

Pour notre part, la procédure que nous proposons est simple et peu coûteuse. L'échantillonnage de tissus de peau d'oreilles est très accessible et le stockage de petites biopsies dans un cryoprotecteur ne nécessite pas d'étape de culture cellulaire préalable avant stockage en azote liquide. Dans notre pays où en matière de cryopreservation tout est à faire alors que les espèces sauvages locales sont menacées, il nous a semblé que pour un début, les procédés les plus simples et les moins coûteux étaient les mieux

appropriés. Aujourd'hui, il est plus que jamais opportun d'envisager la mise en place de structures compétentes pour instaurer une tradition de cryopreservation. La création de cryobanques nationales loin d'être un luxe relève désormais de la nécessité. Le travail consisterait à faire dans un premier temps le point sur l'état des lieux de l'érosion de la biodiversité et d'établir une liste rouge des espèces menacées. S'en suivrait ensuite la mise en place de cryobanques dotées d'infrastructures et de personnels à même de prendre en charge la sélection des espèces et du matériel biologique candidat à la cryopreservation et leur cryopreservation effective. Parallèlement, cette structure devra en collaboration avec les médias et par le biais de conférences élargies assurer l'instruction et la sensibilisation des citoyens sur la problématique.

## CONCLUSION GENERALE

Développer et généraliser les diverses stratégies de préservation des ressources génétiques du règne animal est désormais vital pour le maintien de l'équilibre de notre planète. Les structures telles que les cryobanques, s'avèrent être un outil incontournable dans la lutte pour le maintien de la biodiversité (Andrabi et Maxwell, 2007). La plus part des techniques de cryopreservation ont été développées en vue de prolonger la durée de stockage des cellules et des tissus reproductifs (Woods *et al.* , 2004). Cependant, dans les cas d'immaturité sexuelle des animaux, rendant impossible la collecte de cellules sexuelles, la préservation de cellules somatiques reste la seule alternative (Corley-Smith et Brandhorst, 1999). L'usage des tissus congelés comme donneurs de noyaux lors des transferts nucléaires de cellules somatiques est maintenant complètement acquis. En effet, chez de nombreuses espèces de mammifères, des clones ont été produits avec succès par transfert de noyaux provenant de cellules somatiques, faisant du matériel somatique, une appréciable alternative, pour préserver les génomes diploïdes, lorsque les tissus reproductifs ou les embryons sont indisponibles (Holt *et al.* , 2004). La restauration d'animaux par le biais des technologies basées sur le transfert nucléaire à partir de cellules somatiques a été concrétisée chez les ruminants (Loi *et al.* , 2001 ; Folch *et al.* , 2009). Puis cette technique a été appliquée à de nombreuses espèces, parmi elles l'espèce lapin (Chesné *et al.* , 2002 ; LI *et al.* , 2006). L'usage de fibroblastes, en tant que cellules types donneuses dans la plus part des procédures de transferts nucléaires, fait de la peau le tissu le mieux approprié, compte tenu justement de sa richesse en fibroblastes.

Beaucoup d'études expérimentales ont été publiées depuis 1903, afin d'évaluer le meilleur procédé de cryopreservation des tissus et ce pour de nombreuses espèces animales (Perry, 1966). Chez les humains, des greffes ont été réalisées avec un taux de réussite optimal, à partir de peaux stockées durant une semaine dans un milieu nutritif à 4°C (May *et al.* , 1985). Cependant, ces données, ne sont pas applicables pour la préservation de peau des espèces non humaines (Rosenquist *et al.* , 1988). La durée de ces stockages a été augmentée grâce aux congélations profondes en azote liquide, bien qu'à -196°C, l'intégrité métabolique de la peau soit affectée par le milieu basal et/ou par le cryoprotecteur (De Loecker *et al.* , 1980 ; Villalba *et al.* , 1996).

Récemment, plusieurs méthodes de préservation de peau inspirées des techniques de congélations d'embryons ont été utilisées chez les animaux. Ainsi, de petits blocs de tissus peuvent être vitrifiés et stockés dans des paillettes adaptées au stockage en azote liquide.

Chez le lapin, des tissus de peau ont été vitrifiés ou congelés à de grandes vitesses (quick-freezing) avec succès, afin de mettre en place des cryobanques d'échantillons de peau d'adultes. En effet, l'étude de la cryopreservation de biopsies d'oreilles a été sérieusement approfondie par Silvestre et ses collaborateurs (2002). Ces auteurs ont choisi, la cryopreservation par vitrification, pratiquée sur de fins échantillons, obtenant ainsi des taux élevés de viabilité après décongélation. Cette technique a aussi été pratiquée sur des échantillons, prélevés à partir d'animaux stockés à des températures au dessus de zéro, durant un certain temps après leur mort (Silvestre *et al.* , 2003). Il s'est avéré que des biopsies de ruminants vitrifiées après avoir été, stockées à 4°C durant 15 jours, pouvaient encore générer des fibroblastes (Silvestre *et al.* , 2004). Cette valeur n'est que de 10 jours environ pour le lapin (Silvestre *et al.* , 2003). Il faut noter aussi,

que dans cette étude, les temps de stockages post-mortem avant congélation cités concernent l'oreille entière, ce qui ne peut être appliqué pour les spécimens vivants dans le cadre d'une cryopreservation préventive. En effet, les biopsies collectées à partir d'animaux vivants doivent impérativement être petites de sorte à ne pas être invasives pour l'animal. Chez les poissons, une procédure de congélation lente (slow-freezing) sur de fines biopsies a démontré qu'il était possible de cryopréserver de petits échantillons (Mauger *et al.* , 2006 ; Moritz et Labbe 2008). Cette étude a démontré la possibilité de maintenir de fins explants dans un congélateur standard à  $-20^{\circ}\text{C}$  durant plus de 14 jours avant de les cryopréserver dans l'azote liquide sans même procéder à une culture de cellules entre les deux phases. Ce résultat montre qu'il est possible de combiner les conditions de terrain pour collecter et stocker les biopsies avant d'appliquer la congélation.

Dans le même esprit, nous avons voulu vérifier, chez le lapin, si des cellules somatiques cultivables, pouvaient après un procédé simplifié de congélation/décongélation, recouvrer leur capacité à se multiplier. Nous nous sommes fixés comme objectif de tester une méthode simple d'échantillonnage et de préparation qui puisse être directement disponible et applicable aux espèces mammifères. Dès les premiers résultats de notre étude, il s'est avéré, que des deux agents cryoprotecteurs testés (à savoir l'éthylène glycol et le DMSO), le moins toxique était le DMSO. Ce résultat étant en conformité avec ceux relatés par de nombreux auteurs, le DMSO fût celui retenu pour la suite de notre expérimentation. En effet, selon Cabrita et ses collaborateurs (2003), le DMSO est parmi les cryoprotecteurs perméables le plus toléré et cela, même à de fortes concentrations. Cependant, l'effet toxique du DMSO est à prendre en considération car lorsque nous avons comparé les taux de viabilité des témoins avec ceux des contrôles 2 (biopsies ayant été traitées au DMSO puis mises en culture sans être congelées), il s'était avéré que, la différence était significative ( $P < 0,05$ ), ces taux étant respectivement de 98% et 82%). Ce qui nous a confirmé, que, même dosé à 10%, le DMSO présentait un effet toxique, qui lui est propre et cela, indépendamment de toute congélation.

Il faut savoir qu'avec un stockage de 24h à  $-20^{\circ}\text{C}$  les taux de viabilité (testés sur la classe d'âge II) sont sensiblement ( $P > 0,05$ ) les mêmes, pour ceux ayant séjournés 24h à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis mis en culture aussi bien que pour ceux ayant séjourné ensuite durant 24h à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis stockés dans l'azote liquide avant mise en culture (79% et 84%). Cette conclusion ne vaut que pour le délai de 24h testé. Ce résultat, gagnerait à être approfondi en étudiant les effets de la prolongation du délais de 24h à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans notre solution de congélation avant mise en culture (en dehors de toute congélation). Ce travail fait, il serait ensuite intéressant de confronter ces résultats avec ceux qu'on obtiendrait avec un processus complet de congélation tel que nous l'avons mené.

Pour les biopsies (classe d'âge II) ayant subits 5 et 10 jours de stockages à  $-20^{\circ}\text{C}$  (avant passage en azote liquide), nous pouvons dire que, les taux de viabilité sont sensiblement ( $P > 0,05$ ) les mêmes (87% et 86% respectivement) et qu'ils ne diffèrent pas sensiblement de ceux du contrôle 2 qui est de 82% ( $P > 0,05$ ). Ces taux, diffèrent cependant significativement ( $P < 0,05$ ) des taux de viabilité des lots témoins (98,29%).

Au bout de 20 jours de stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  (avant un passage de 24h à  $-80^{\circ}\text{C}$  , stockage dans l'azote liquide puis mise en culture) le taux de viabilité des biopsies n'est plus que de 39%. Notons que ce dernier taux reste suffisant pour assurer la régénération

de l'animal (Vignon *et al.*, 1998 ; Du *et al.*, 2007 ; Folch *et al.*, 2009). Ainsi, l'éleveur qui perd un animal précieux pourra toutefois sauvegarder les ressources génétiques de son espèce s'il dispose d'un congélateur domestique (-20°C) et d'une solution de congélation dosée à 10% en DMSO. La durée de stockage à -20°C avant de poursuivre le protocole de congélation (que seuls des professionnels équipés peuvent assurer), que nous avons testé est de 20 jours. Cette durée pourrait probablement être prolongée et serait probablement corrélée à la baisse des taux de viabilité. Nous avons estimé pour notre part, que quel que soit l'isolement de l'éleveur, 20 jours constituaient un délai suffisamment long pour réagir.

Enfin, le facteur âge intervient toujours, même après cryopreservation (Tableau V), la différence se fait ressentir de manière significative ( $P < 0,05$ ) lorsque nous comparons les taux de viabilité des explants ayant séjournés 5 jours à -20°C (avant passage en azote liquide puis mise en culture) pour les classes d'âge II et III (87% et 65% respectivement). Bien que les résultats obtenus sur des lapines âgées (1 an et demi) soient satisfaisants (65% de viabilité après 5 jours de stockage à -20°C) il s'avère préférable de cryopréserver du matériel plus jeune (4 mois et demi dans notre cas) Tableaux I et V. Il en découle, qu'une cryopreservation préventive, planifiée et systématique, opérée sur des lapereaux d'espèces précieuses pourrait être mise en place avant toute situation d'urgence.

Notre humble contribution vise à démystifier la cryopreservation et à la rendre envisageable dans notre pays. Elle démontre qu'avec des moyens modestes le défi de l'implantation de cryobanques peut être relevé au Maghreb. Que les structures une fois mises en place pourraient rayonner sur les élevages mêmes les plus reculés, puisque nous avons démontré que les éleveurs munis d'un simple congélateur domestique et de notre solution de congélation, avaient jusqu'à vingt jours pour se rapprocher des structures compétentes afin de leur confier le matériel partiellement cryopréserver. A charge ensuite pour ces structures de prendre le relais et d'assurer la suite du protocole de cryopreservation.

Parallèlement, une étude de terrain pour évaluer l'état de la biodiversité animale dans notre pays et le niveau de son érosion est primordiale et incontournable. Des études prévisionnelles de l'évolution des populations pourraient être faites afin de tirer la sonnette d'alarme concernant les espèces menacées. Ainsi, à titre préventif des collections de souches précieuses pourraient être mises au point. Dans ce cadre il serait intéressant de mettre à profit les résultats de nos expériences (rapportées en 2-2-1-2 et confirmées en 2-2-5-2) mettant en évidence l'intérêt de cryopréserver du matériel jeune. Les opérations de prélèvements seraient bien encadrées par le personnel sanitaire et les prélèvements seraient alors effectués, non pas dans l'urgence mais dans des conditions d'asepsie optimales. Ces prélèvements, ne porteraient ni sur les cellules sexuelles (sperme et ovocytes) ni sur les cellules embryonnaires mais sur des biopsies d'oreilles de jeunes animaux, ils seraient peu invasifs pour l'animal et intéressants en terme de rentabilité.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- [1] Acker .Jason.P and Gann Locksley E. MC. Protective effect of intracellular ice during freezing? Cryobiology 2003; 46: 197-202.
- [2] Agca Y , Mullen.S , Liu.J , Johnson-Ward. J, Gould .K, Chan .A, Critser .J. Osmotic tolerance and membrane permeability characteristics of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa.Cryobiology 2005; 51: 1-14.
- [3] Alotto.D ,Ariotti.S, Graziano.S, Verrua.R, Stella.M, MagliacaniG and Castagnoli.C. The role of quality control in skin bank: tissue viability determination. Cell and Tissue Banking 2002; 3: 3-10.
- [4] Andrabi S.M.H and Maxwell W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. Animal Reproduction Science 2007; 99:223-243.

### B

- [5] Barbas J.P, Mascarenhas.R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank 2009;10 :49-62.
- [6] Bakhach . J, Casoli .V, Guimberteau .J.C. La cryopreservation de tissus composites : Principes , revue de la littérature et expérience de l'équipe Bordelaise. Annales de Chirurgie Plastique Esthétique . Octobre 2007 ; 52 issue 5 : 531-547.
- [7] Bateson E.A.J , Busza .A.l , Peeg .D.E , Taylor.M.J. Permeation of rabbit common carotid arteries with dimethyl-sulfoxide . Cryobiology 1994; 31:393-397.
- [8 ] Baudot .A, Courbiere .B, Odagescu.V, Salle.B, Mazoyer.C, Massardier.J, Iornage.J .Towards whole sheep ovary cryopreservation. Cryobiology 2007; 55:236-248.
- [9] Bia.D, Pessana.F, Armentano.R, Perez.H, Graf.S, Zocalo.Y, Saldias.M, Perez.N, Alvarez.O, Silva.W, Machin.D, Sueta.P, Ferrin.S, Acosta.M and Alvarez.I. Cryopreservation procedure does not modify human carotid homografts mechanical properties: an isobaric and dynamic analysis. Cell and Tissue Banking 2006; 7: 183-194.
- [10] Bidault. N.P, Hammer .B.E, Hubel. A. Rapid MR Imaginn of cryoprotecteur permeation in engineered dermal replacement. Cryobiology 2000; 40: 13-26.
- [11] Blesbois.E, Grasseau.I, Seigneurin.F, Mignon-Grasteau.S, Saint Jalme.M, Mialon-Richard .M.M. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. Theriogenology 2008; vol69, issue 2:252-261.

## C

- [12] Cabrita .E, Robles. V, Chereguini . O, Wallace .J.C, Herraiez .M.P. Effect of different cryoprotecteurs and vitrificant solutions on the hatching of turbot embryos (*Scophthalmus maximus* ). Cryobiology 2003; 47:204-213.
- [13] Campbell.K.H.S, Fisher.P, Chen.W.C,Choi.I, Kelly.R.D.W, Lee.J-H, Xhu.J. Somatic cell nuclear transfert: Past, present and future perspectives. Theriogenology 2007;68S:S214-S231.
- [14] Carpenter .J.F , Dawson.P.E. Quantitation of dimethyl-sulfoxide in solutions and tissues by high-performance liquid-chromatography. Cryobiology 1991; 28 : 210-215.
- [15] Chen S.L and Tian .Y.S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification .Thériogenology 2005; 63:1207-1219
- [16] Chen.N, Liow.S.L, Yip.W.Y ,Tan.L.G, Tong.G.Q, Ng.S.C. Early development of reconstructed embryos after somatic cell nuclear transfer in a non-human primate. Theriogenology 2006;66:1300-1306.
- [17] Corley-Smith GE, Brandhorst BP (1999). Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis ? Mol Reprod Dev 53 : 363-367.
- [18] Cuello .C, Gil M.A, Parrilla .I, Tornel.J, Vazquez J.M, Roca .J, Berthelot.F, Martinat-Botté .F, Martinez. E.A.Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. Theriogenology 2004;62:353-361.
- [19] Cuello .C, Gil M.A, Alminana. C, Sanchez-Osorio .J, Parrilla .I, Caballero. I, Vazquez J.M, Roca .J, Rodriguez-Martinez .H, Martinez. E.A. Vitrification of in vitro cultured porcine two- to-four cell embryos. Theriogenology 2007; 68:258-264.
- [20] Cuello .C, Sanchez-Osorio .J, Alminana. C, Gil M.A, Peralas.M.L, Lucas.X, Roca .J, Vazquez J.M, Martinez. E.A. Effect of the cryoprotecteur concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. Cryobiology 2008; 56: 189-194.
- [21] Cui .x, Gao .D.Y, Fink .B.F, Vasconez H.C, Rinker B .Cryopreservation of composite tissue and transplantation: preliminary studies .Cryobiology 2007; 55(3):295-304.

## D

- [22] Davis.J.W. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. Johns Hopkins Med J 1910; 15:307-396.
- [23] De Loecker W, De Wever F , Penninckx F (1980) Metabolic changes in human skin preserved at – 3 and at – 196°C . Cryobiology 17: 46- 53

[24] Devireddy. R.V , Swanlund .D.J , Roberts .K.P, Bischof .J.C. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents .Biol. Reprod 1999; 61: 764-775.

[25] Devireddy . R.V , Swanlund .D.J , Olin.T,Vincente.W, Troedsson.M.H.T, Bischof. J.C and Roberts .K.P. Cryopreservation of Equin Sperm:Optimal cooling rate in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry.Biology of Reproduction 2002;66:222-231.

[26] Devireddy.R.V , Fahrig. B , Godke. R.A and Leibo .S.P. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. Mol.Reprod.Dev 2004; 67:446-457.

[27] Du.Y, Zhang.Y,Li.J, Kragh,P.M., Kuwayama.M,Ieda.S, Zhang.X, Schmidt.M, BØgh.I.B, Purup.S , Pedersen.A.M, Villemoes.K, Yang.H, Bolund.L, Vajta.G. Simplified cryopreservation of porcine cloned blastocysts. Cryobiology 2007; 54:181-187.

## E

[28] Elmoazzen H.Y, Elliott .J.A.W, McGann . L.E. Cryoprotecteur equilibration in tissues. Cryobiology 2005 ;51:85-91.

[29] Elmoazzen H.Y, Poovadan A, Law. G. K, Elliott Janet A.W, Gann Locksley E. MC, Jomha .N. M. Dimethyl sulfoxide toxicity kinetics in intact articular cartilage. Cell tissue banking 2007; 8:125-133.

## F

[30] Fabbri .R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. . Cell tissue banking 2006; 7:113-122.

[31] Fahning . M.L, Garcia.M.A . Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology 1992; 29:1-18.

[32] Fahrudin .M, Otoi .T, and Suzuki T .Developmental competence of bovine embryos reconstructed by the transfert of somatic cells derived from frozen tissues .J Vet Med Sci 2001oct;63 (10) :1151-4 .

[33] Fahy. G.M and Ali. S.E. Cryopreservation of the mammalian kidney. II. Demonstration of immediate renal function after introduction and removal of 7.5M cryoprotecteur. Cryobiology 1997; 35: 114-131.

[34] Fahy. G.M, Grégory.M, Wowk and Brian. 21<sup>ST</sup> Century Medicine (U.S/U.S) 10844 Edison Court, Rancho Cucamonga, CA 91730(U.S.A). 2002.

[35] Fahya. G.M, Wowk .B, Wu. J, Paynter. S .Improved vitrification solution based on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology 2004; 48: 22-35.

[36] Fahy, G.M, Wowk .B, Wu.J, Phan .J, Rasch.C, Chang.A and Zendejas.E. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. Cryobiology 2004; 48:175-178.

[37] Folch. J. Cocero.M.J, Chesné .P, Alabart.J.L, Dominguez.V, Cognié.Y, Roche.A, Fernandez-Arias.A, Marti.J.L,Sanchez.P, Echegoyen.E, Beckers.J.F,Sanchez Bonastre.A, Vignon .X. First birth of animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. Theriogenology 2009; 71:1026-1034.

[38] Fuller.B.J, Busza.A.L. Proton NMR-studies on the permeation of tissue fragments by dimethyl-sulfoxide-liver as a model for compact tissues. Cryo.Lett 1994; 15:131-134.

## G

[39] Gandini.L, Lombardo.F,Lenzi.A,Spano.M and Dondero.F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. Cell and Tissues Banking 2006; 7:91-98.

[40] Guan.M, Rawson.D.M, Zhang.T.Conservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. Cryobiology 2008;56: 204-208.

## H

[41] Hanquet –Dufour. A.C, Kellner. K, Heude. C, Naimi .A, Mathieu. M, Poncet. J.M. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: viability and metabolic activity. Cryobiology 2006; 53: 28-36.

[42] Hautier .A, Sabatier.F, Stellmann.P, Andrac.L, De Gorce .Y.N, Dignat-George.F,Magalon.G.Assessment of organ culture for the conservation of human skin allografts. Cell Tissue Banking 2008;9:19-29.

[43] He.X, Park.E.H.Y, Fowler .A, Yarmush.M.L, Torner.M. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectors in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells.Cryobiology 2008; 56:223-232.

[44] Hochi .S, Terao .T, Kamei M, Kato .M, Hirabayashi. M, Hirao. M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygote by minimum volume cooling procedure .Theriogenology 2004; 61: 267-275.

[45] Hubel. A, Cravalho . E.G, Nunner. B and Korber. C. Survival of directionally solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions. Cryobiology 1992 ;29:183-198.

## I

[46] Ireland .Lyn and Spelman Denis .Bacterial contamination of tissue allograft – experiences of donor tissue bank of Victoria .Cell and tissue banking 2005; 6: 181-189.

[47] Isachenko. V, Folch.J, Isachenko.E, Nawroth .F, Krivokharchenko .A, Vajta.G, Dattena .M, Alabart .J.L.Double vitrification of rat embryos at different developmental stage using an identical protocol. *Thériogenology* 2003;60:445-452.

[48] Isbell a . S .A. Development of a protocol for the quantitative evaluation of contrast in NMR images of cryoprotective solvents in intact tissues. *Cryobiologie* 1997; 34:165-175.

[49] Isbell b . S.A, Fyfe .C.A , Ammons .R.L.M , Pearson .B. Measurement of cryoprotective solvent penetration into intact organ tissues using high-field NMR microimaging.*Cryobiology* 1997;35:165-172.

## K

[50] Karlsson.J.O.M , Cravalho. E.G and Toner .M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing. *J. Appl. Phys.* 1994; 75:4442-4455.

[51] Karlsson.J.O.M and Toner .M .Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 1996; Vol 17, No 3 :243-256.

[52] Kasai. M, Niwa .K, Iritani. A. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod.Fert* 1980; 59:51-56.

[53] Kasai. M, Niwa .K, Iritani . A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod.Fert* 1981; 63:175-180.

[54] Kashuba Benson .C.M, Benson .J.D,Critser.J.K. An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line. *Cryobiology* 2008;56:120-13.

[55] Kedem.O, Katchalsky.A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim Biophys Acta* 1958;27:229-246.

[56] Kleinhans .F.W. Membrane permeability modelling: Kedem-Katchalsky vs a two-parametre formalism. *Cryobiology* 1998; 37:271-289.

## L

[57] Lakey .J.R.T, Helms .L.M.H, Moser.G, Lix.B, Slupsky.C.M, Rebeyka .I.M, Sykes.B.D , Gann .L.E Mc. Dynamics of cryoprotecteur permeation in porcine heart valve leaflets . *Cell transplant* 2003;12 :123-128.

[58] Lehn-Jensen.H, Rall. W.F. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Therigenology* 1983;19:263-277.

[59] Leibo .S.P,Mazur.P, Jackowsky .S.C. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exptl Cell Res* 1974;89:79-88.

[60] Leibo .S.P, McGrath.J.J and Cravalho .E.G. Microscopic observations of intracellular ice formation in infertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1978;15:257-271.

- [61] Leibo .S.P. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Membrane Biol* 1980;53:179-188.
- [62] Leibo .S.P, Dowgert .M.F and Steponkus .P. Observations of intracellular ice formation and melting in bovine embryos cooled at various rates. *Cryobiology* 1984; 21: 711.
- [63] Leibo S.P. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Thériogenology* 1989; 31: 85-93.
- [64] Levin.R.L. Osmotic Effects of Introducing and Removing Cryoprotecteurs: Perfused Tissues and Organs , in:1981 *Advances in bioengineering: Presented at the Winter Annual Meeting of the American Society of Mechanical Engineers, Washington,D.C.November 15-20 , 1981.*
- [65] Levrel .H. Quels indicateurs pour la gestion de la biodiversité? *Les cahiers de l'I.F.B* octobre 2007, I.F.B édition, Paris, 90 pages.
- [66] Li. Z, Sun .X ,Chen.J, Liu.X, Wisely.S.M ,Zhou.Q, Renard .J.P Leno .G.H. Engelhardt. J.F. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfert.*Developmental Biology* 2006 ;293 :439-448.
- [67] Li .Y, Lu .R.H, Luo.G.F, Pang .W.J, Yang .G.S. Effects of different cryoprotecteurs on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte .*Cryobiology* 2006; 53: 240-247.
- [68 ] Lonergan .P, Evans .A.C.O. Boland.E, Rizos.D, Fair.T,Duffy.P, Sung L-Y, Du. F, Chaubal.S, Xu.J, Yang.X, Tian.X.C. Pregnancy and fetal characteristics after transfert of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. *Theriogenology* 2007;68:1128-1137.
- [69] Lopez-Béjar .M, Lopêz-Gatius. F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology* 2002; 58:1541-1552.
- [70] Lornage.J ,Courbière.B, Mazoyer.C, Odagescu.V, Baudot. A, Bordes. A, Poirel. M.T, Franck . M and Salle. B. Ovarian tissue vitrification: cortex and whole ovary in sheep. *Gynécologie obstétrique & fertilité* 2006;34 issue 9: 746-753. Onzièmes journées nationales de la FFER (Paris, 11-13 Octobre 2006).

## M

- [71] Manjunatha B.M, Gupta.P.S.P, Ravindra.J.P, Devaraj.M , Nandi.S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *The Veterinary Journal* 2009; 179 issue 2 : 287-291.
- [72] Martinez A.G, Matkovic .M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 1998;49:1039-1049.

- [73] Mauger .P-E, Le Bail P-Y, Labbé. C .Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation .Comparative Biochemistry and Physiology 2006; Part B 144: 29- 37.
- [74] Mazur. P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing . J.Gen Physiol 1963; 47 : 347-369.
- [75] Mazur. P, Leibo. S and Chu .E.H.Y . A two-factor hypothesis of freezing injury. Exp Cell Res. 1972 ;71 : 345-355.
- [76] Mazur. P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology 1977; 14 issue3: 251-272.
- [77] Mazur. P. Freezing of living cells : mechanisms and implications. Am J Physiol 1984 ;247:C125-C142.
- [78] Mazur. P, Rall.W.F and Leibo. S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Cell Biophys 1984; 6:197-213.
- [79] Mazur. P .Equilibrium, quasi-équilibre and nonéquilibre freezing of mammalian embryos. Cell Biophysics 1990. The humana Press Inc.Vol 17, Page 53. Edditor-in-chief Leonard Weiss.
- [80] Mazur. P ,Seki. S, Pinn . I.L, Kleinhans. F.W, Edashige. K. Exta and intacellular ice formation in mouse oocytes. Cryobiology 2005; 51: 29-53.
- [81] Mazur. P , Pinn . I.L, Kleinhans. F.W. The temperature of intacellular ice formation in mouse oocytes vs. the unfrozen fraction at that temperature. Cryobiology 2007; 54: 223-233.
- [82] Men.H, Monson.R.L, Parrish.J.J, RutledgeJ.J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. Mol Reprod Dev 2003; 64: 245-250.
- [83] Merymann. H.T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: Wolstenholme. G.E.W and O' Connor. M. Editors; The frozen cell: Ciba Foundation Symposium, London: Churchill 1970:51-64.
- [84] Michelmann.H.W and Nayudu. P.Cryopreservation of human embryos. Cell and tissue banking 2006; 7: 135-141.
- [85] Moritz .C and Labbe .C.Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. Cryobiology 2008; 56:181-188.
- [86] Mukherjee .I.N, Song .Y.C, Sambanis .A .Cryoprotecteur delivery and removal from murine insulinomas at vitrification-relevant concentration. Cryobiology 2007; 55: 10-18.

[87] Muldrew. K, Sykes. B, Schachar .N, Gann .L.E.Mc .Permeation kinetics of dimethyl sulfoxide in articular cartilage. Cryo.Letters 1996; 17:331-340.

[88] Myers .Sp, Lin .T.T ,Pitt.R.E and Steponkus .P.J. Cryobehavior of immature bovine oocytes. Cryo.Letters 1987;8:260-275.

## **P**

[89] Paynter .J.S, Cooper. A, Fuller.B.J and Shaw .R.W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. Cryobiology 1999; 38:301-309.

[90] Pedraza. J.M. The importance of the selection of the audiences and the organisation of media events within public awareness strategies for tissue banks. Cell Tissue Banking 2008; 9 : 317-322.

[91] Peeg.D. Cryobiology of cells in situ: experiments with ovine articular cartilage. Cryobiology 1998; 37: 381-382.

[92] Pereira.R.M and Marques.C.C. Animal oocytes and embryo cryopreservation.Cell Tissue Banking 2008;9:267-277.

[93] Perry VP (1966) A review of skin preservation. Cryobiology 3: 109- 130

[94] Polge .C, Smith .A.U, Parkes .A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures .Nature1949; 164: p666.

## **R**

[95] Rall. W.F, Mazur .P and McGrath.J.J. Depression of the ice nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. Biophys.J 1983;41:1-12.

[96] Rall . W.F and Polge.C. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J.Reprod.Fert 1984 ;70: 285-292.

[97] Rall . W.F, Reid.D.S and Polge. C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physical-chemical methods. Cryobiology 1984; 21: 106-121.

[98] Ravomanana. P. Chimie générale. Cours, exercices, annales et QCM corrigés. 2005 (deuxième édition) ; Ediscience, Stedimédia, 1, Bd Ney 75018 Paris ; PP : 150-154.

[99] Renard .J.P , Bui .X.N, Garnier. V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J.Reprod.Fert 1984; 71:573-580.

[100] Renard .J.P, Vignon .X. La reproduction chez les mammifères et l'homme. C.Thibault et M.C Levasseur. 2001. 2<sup>ème</sup> édition. Editeur: INRA-Editions et Ellipse.

[101] Richardson .I.W. Some Remarks on The Kedem-Katchalsky equation for non-electrolytes. Bulletin of Mathematical Biophysics 1970; 32: 237-248.

[102] Rojas C, Palomo J.M, Albarracin.J.J, Mogas.T. Vitrification o immature pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. Cryobiology 2004 ; 49 :211-220.

[103] Rosenquist MD, Cram AE, Kealey GP (1988) Skin preservation at 4°C : a species compartion. Cryobiology 25: 31-37

## S

[104] Salvetti .P ,Allain.D, Bolet.G,Hurtaud.J ,Boucher .S, Joly .T. La cryobanque nationale lapin : un outil de gestion dynamique des ressources génétiques cunicoles. Les actes du B.R.G 2008 ; 7 : 391-404.

[105] Saragusty.J, Gacitua.H, King.R,Arav.A .Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas* ) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). Theriogenology 2006;66:775-784.

[106] Savage.A.F, Maull.J,Tian.X.C, Taneja.M, Katz.L, Darre.M, Yang.X. Behavioral observations of adolescent Holstein heifers cloned from adult somatic cells. Theriogenology 2003;60:1097-1110.

[107] Seki . S, Mazur. P. Kinetics and activation energy of recrystallization of intracellular ice in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling. Cryobiology 2008; 56 :171-180.

[108] Shabana.M , McGrath.J.J. Cryomicroscope investigation and thermodynamic modeling of the freezing of unfertilized hamster ova. Cryobiology 1988 ;24:338-354.

[109] Silvestre M.A, Saeed A.M, Escriba M.J, Garcia-Ximénez F. Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. Thériogenology 2002;58: 69-76.

[110] Silvestre M.A <sub>a</sub>, Saeed A.M, Escriba M.J, Garcia-Ximénez F. Vitrification of in vitro cultured rabbit morulae. Animal Reproduction Science 2003; 76: 113-124.

[111] Silvestre M.A <sub>b</sub>, Saeed A.M ,Cevera. R.P, Escriba M.J, Garcia-Ximénez F Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. Thériogenology 2003;59: 1469-1477.

[112] Silvestre M.A, Sanchez J.P, Gomez E.A. Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. Cryobiology 2004; 49: 221-229.

[113 ] Siow .L.F, Rades .T, Lim .M.H. Cryo-responses of two types of large unilamellar vesicles in the presence of non-permeable or permeable cryoprotecting agents. Cryobiology 2008; 57: 276-285.

- [114] Somfai .T,Ozawa.M, Noguchi.J, Kaneko.H,Karja .N.W.K ,Farhudin .M, Dinnyes. A, Nagai.T and Kikuchi.K. Developmental competence of in vitro-fertilised porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 2007;55:115-126.
- [115] Songsasen . N, Yu. I, Murton. S, Paccamonti .D.L, Eilts .B.E, Godke. R.A and Leibo. S.P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* 2002 ; 44 : 79-90.
- [116] Succu.S, Leoni.G.G, Berlinger.F, Madeddu. M, Bebbere.D, Mossa.F, Bogliolo. L, Ledda.S, Naitana.S. Effect of vitrification solution and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology* 2007; 68: 107-114.
- [117] Sui .L , Nomura . R, Dong. Y, Yamaguchi.F, Izumori. K, Tokuda. M. Cryoprotective effects of D-Allose on mammalian cells. *Cryobiology* 2007;55:87-92.
- [118] Szell. A, Shelton .J.N. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert* 1986 ;76: 401-408.
- [119] Szell . A, Shelton .J.N. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert* 1987;80:309-316.

## T

- [120] Tanaka. J.Y, Walsh .J.R, Diller. K.R, Brand .J.J and Aggarwal S.J. Algae permeability to Me<sub>2</sub> So from -3 to 23°C. *Cryobiology* 2001; 42: 286-300.
- [121] Taylor.M.J, Busza .A.L. A convenient, non-invasive method for measuring the kinetics of permeation of dimethyl-sulfoxide into isolated corneas using NMR-spectroscopy. *Cryo Lett.*1992; 13: 273-282.
- [122] Teyssède .A (2004) .Vers une sixième grande crise d'extinction ? In Barbault R et Chevassus-au-Louis B, (eds), Biodiversité et changements globaux. Enjeux de société et défis pour la recherche, edition ADPF , pp :24-36.
- [123] Tian S.J, Yan C.L, Yang .H.X, Zhou .G.B, Yang. Z.Q, Zhu .S.E. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Animal Reproduction Science* 2007 ;101:365-371.

## V

- [124] Vajta.G, Rindon. N, Peura.T.T, Holm .P, Greve .T, Callesen .H. The effect of media and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 1999; 52:939-948.
- [125] Vajta.G, Kuwayama .M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006 ;65:236-244.

[126] Vignon. X, Chesné .P, Lebourhis .D, Fléchon .J.E, Heyman .Y, Renard. J.P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells.C.R.Acad.Sci.Paris.Sciences de la vie/ Life Science 1998;331:735-745.

[127] Vignon. X, Heyman. Y, Chavatte- Palmer .P, Renard . J.P. INRA. Productions Animales 2008; 21 (1): 33-44.

[128] Villalba R, Benitez J, De No-Lowis Erioja LF, Gomez-Villagran JL (1996) Cryopreservation of human skin with propane 1,2 diol. Cryobiology 33: 525-529.

## W

[129] Walcerz .D.B,Taylor.M.J, Busza .A.L. Determination of the kinetics of permeation of dimethyl-sulfoxide in isolated corneas. Cell Biophys 1995;26:79-102.

[130] Watson .P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000; 60-61: 481-492.

[131] Whittingham.D.G, Leibo.S.P, Mazur .P. Survivalof mouse embryos frozen to -196°Cand -269°C. Science 1972; 178 :411-414.

[132] Whittingham.D.G , Wood. M, Farrant. J, Lee.H, Halsey. J.A. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. J.Reprod.Fert 1979;56: 11-21.

[133] Wilmut. I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci 1972;11:1071-1079.

[134] Woods E.J, Benson.J.D, Agca.Y and Critser .J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology 2004;48:146-156.

[135] Wusteman.M, Busza .A , Boylan.S , Hayes.A and Peeg. D. E. Ethylene-glycol permeation and toxicity in rabbit common carotid-artery. Cryobiology 1995;32:428-435.

[136] Wusteman.M, Robinson.M, and Peeg. D. E. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. Cryobiology 2004;48:179-189.

[137] Wusteman<sub>a</sub> .M.C, Simmonds. J, Vaughan. D, Pegg .D.E. Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose. Cryobiology 2008 ;56:62-71.

[138] Wusteman<sub>b</sub> .M.C, Rauen. U, Simmonds. J, Hunds . N, Pegg .D.E. Reduction of cryoprotecteur toxicity in cells in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. Cryobiology 2008 ;56:72-79.

## **Z**

- [139] Zieger.M.A.J, Tredget.E.E, Sykes.B.D, Gann .L.E.Mc. Injury and protection in split-thickness skin after very rapid cooling and warming. *Cryobiology* 1997;35 :53-69.
- [140] Zeron. Y, Tomczak.M, Crowe. J, Arav.A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 2002; 45: 143-152.

## ANNEXES

### REFERENCES DES PRODUITS UTILISES.

- S.V.F : Sérum de veau fœtal (Origine agréée par la C.E.). Laboratoire: GIBCO™-Invitrogène. (Auckland N Z).
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium with Ultraglutamine 1, with 4,5g/l Glucose. Laboratoire : Cambrex (Belgique).
- Pénicilline-Streptomycine. Laboratoire : GIBCO™-Invitrogène . (Auckland N Z).
- DMEM enrichi : DMEM +10%SVF +5% Pénicilline-Streptomycine
- DMEM non enrichi : 0% SVF +5% Pénicilline-Streptomycine
- P.B.S: Phosphate Buffered Saline 0,0067M (PO4) Without Ca and Mg. Laboratoire: Cambrex (Belgique).
- DMSO: Dimethylsulphoxide C<sub>2</sub> H<sub>6</sub> OS. Laboratoire : SIGMA (Germany).
- Ethylene glycol: 1, 2 –Ethanediol (HOCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OH). Laboratoire: Sigma-Aldrich. (Germany).
- Embryo Holding Medium. Laboratoire: I.M.V (France).
- Solution de congélation à préparer le jour même : 10 ou 20% de DMSO (selon les concentrations à tester) dans de l'Embryo Holding Medium
- Collagénase: Clostridium histolyticum Type IV. Laboratoire: SIGMA (U.S.A).
- Collagénase à 0,05% (2,5mg collagénase dans 5ml de DMEM à 0% SVF)
- Trypsine EDTA (200mg /l Versene (EDTA), 500mg/l Trypsine 1:250). Laboratoire: Lonza (Belgique).

Les solutions de congélation :

- à 10% DMSO (1 ml de DMSO pour 9 ml d'Embryo Holding Medium)
- à 20% DMSO (2 ml de DMSO pour 8 ml d'Embryo Holding Medium)

## **PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE DES FIBROBLASTES.**

*Notons au préalable, que toutes les manipulations décrites dans ces annexes, sont réalisées sous la hotte à flux laminaire avec obligation pour le manipulateur de porter : blouse, charlotte, chaussons et gants stériles.*

Le milieu de culture nécessaire pour obtenir des fibroblastes à partir de biopsies mises en culture, est identique à celui utilisé pour mettre en culture à leur tour les fibroblastes ainsi obtenus afin d'en amplifier le nombre. Ce milieu se prépare de la manière suivante :

- Décongeler au bain Marie le sérum de veau et les antibiotiques (Pénicilline – Streptomycine).
- Sortir du réfrigérateur le milieu D.M.E.M.
- Sous la hotte à flux laminaire réaliser le mélange suivant : 445 ml de DMEM + 50ml de sérum de veau + 5ml de la solution Pénicilline –Streptomycine, ce qui nous donne ==► 500ml de milieu à 10% S.V.F.
- Porter sur la bouteille la date de fabrication du mélange ainsi obtenu. Celui-ci peut être conservé à + 4°C durant plusieurs jours. Tant que le milieu conserve sa couleur rouge orangé, il reste neutre est réutilisable. Dès qu'il vire au jaune (il devient acide) ou au fushia (il devient basique) il n'est plus propre à l'emploi.

## **PREPARATION DE LA TRYPSINE.**

Lorsque des fibroblastes en culture dans une boîte de pétrie arrivent à confluence, la trypsine est alors utilisée pour décoller les fibroblastes afin de réaliser des dilutions et de relancer de nouvelles cultures. La souche est ainsi amplifiée, on parle de passages. Les passages sont comptabilisés, on indique alors sur les boîtes de pétrie le nombre de passages déjà effectués.

- Décongeler au bain Marie la trypsine. La concentration de la solution mère est de 0.25%.
- Sous la hotte à flux laminaire réaliser le mélange suivant : 5 ml de trypsine mère + 45 ml de P.B.S, ce qui nous donne ==► 50 ml de trypsine à 0.025%.
- La préparation obtenue doit être conservée à + 4°C dans un réfrigérateur et peut être utilisée jusqu'à épuisement.

## **PREPARATION DE LA SOLUTION DE COLLAGENASE.**

La collagénase est utilisée pour détruire le collagène présent dans la peau afin de faciliter la libération des fibroblastes. La collagénase de départ se présente sous forme de poudre que l'on stocke à des températures inférieures à zéro mais qui ne nécessite pas d'être décongelée. La collagénase doit être dissoute avant usage. Dans notre protocole, la dissolution se fait dans du milieu de culture ne contenant pas de sérum de veau (D.M.E.M à 0% S.V.F).

▪ **Pour la solution à 0.02% de collagénase.**

- Peser 1 mg de collagénase.
- Préparer la solution D.M.E.M à 0% S.V.F. Pour cela mélanger 495 ml de D.M.E.M avec 5 ml de solution antibiotique (Pénicilline – Streptomycine)
- Prélever 5 ml de la solution D.M.E.M à 0% S.V.F et y dissoudre 1 mg de collagénase en agitant au vortex, ce qui nous donne ==► une solution à 0.02 % de collagénase.
- Filtrer le mélange sur 0.2  $\mu$  avant usage. Cela est réalisé grâce à des seringues stériles munies de filtre.

▪ **Pour la solution à 0.05% de collagénase.**

- Peser 2.5 mg de collagénase.
- Préparer la solution D.M.E.M à 0% S.V.F. Pour cela mélanger 495 ml de D.M.E.M avec 5 ml de solution antibiotique (Pénicilline – Streptomycine)
- Prélever 5 ml de la solution D.M.E.M à 0% S.V.F et y dissoudre 2.5 mg de collagénase en agitant au vortex, ce qui nous donne ==► une solution à 0.05 % de collagénase.
- Filtrer le mélange sur 0.2  $\mu$  avant usage. Cela est réalisé grâce à des seringues stériles munies de filtre.

Notons que les solutions de collagénase une fois préparées doivent être utilisées le jour même et ne peuvent être stockées.

**PREPARATION DES SOLUTIONS DE CONGELATION.**

▪ **Pour la solution à 10% DMSO.**

- Travailler impérativement avec des gants et éviter tout contact avec le D.M.S.O qui est classé cancérigène et mutagène.
- Sous la hotte à flux laminaire réaliser le mélange suivant : 1 ml de DMSO + 9 ml d'Embryo Holding Medium, ce qui nous donne ==► une solution à 10% D.M.S.O.

▪ **Pour la solution à 20% DMSO.**

- Travailler avec les mêmes précautions sécuritaires que ci dessus.
- Sous la hotte à flux laminaire réaliser le mélange suivant : 2 ml de DMSO + 8 ml d'Embryo Holding Medium, ce qui nous donne ==► une solution à 20% D.M.S.O.

**MISE EN CULTURE DES BIOPSIES.**

Les zones apicales d'oreilles de lapines sont récupérées de l'abattoir au moment même de l'abattage. Elle sont nettoyées au savon et rasées sur la pailleasse. Puis, sous la hotte à flux laminaire après un très bref passage à l'éthanol à 75% (étape importante afin d'éviter de cryopreserver du matériel contaminé elles sont rincées deux fois de suite dans 20ml de P.B.S puis disposées dans des boites de pétries P<sub>100</sub> (boites de diamètre 100 mm). Dans 20ml de P.B.S, des biopsies de 1,0 mm<sup>2</sup> environ sont découpées à l'aide

de matériel à dissection stérile. Ces biopsies sont alors baignées, durant 30 minutes dans de la collagénase à 0,05% (2,5mg collagénase dans 5ml de DMEM à 0% SVF), le tout entreposé dans un incubateur humidifié à 5% CO<sub>2</sub> et réglé à 38°C. Puis les biopsies subissent trois rinçages consécutifs dans du DMEM à 0% SVF afin d'éliminer totalement la collagénase. La mise en culture de ces biopsies se fait dans des boîtes de pétrie P<sub>35</sub> (de diamètre 35mm). Les biopsies sont réparties en lots de 15 par boîte P<sub>35</sub>.

Ces dernières sont d'abord déposées à sec durant 2 à 3 minutes afin d'assurer une meilleure adhérence au substrat. Après quoi, elles sont délicatement recouvertes de 700 µL de milieu enrichi (DMEM +10%SVF +5% de Penicilline-Streptomycine). Les boîtes sont ensuite entreposées dans l'incubateur, d'où elles ne doivent pas être déplacées sous 48h. Passé ce délai, le niveau en milieu de culture des boîtes doit être ajusté. La fréquence de cet ajustement du niveau est de 48h les premiers jours puis de 24h dès que les divisions deviennent intenses entraînant une plus grande consommation de milieu de culture. La quantité de milieu à rajouter est de 150 µL environ. Ce volume est introduit goutte à goutte pour éviter de décoller les biopsies du substrat. Notons, que l'adhérence des biopsies au substrat est une condition sine qua non au démarrage des colonies. Après avoir séjourné 48h à l'incubateur, les boîtes sont observées quotidiennement au microscope inversé afin de repérer l'apparition des premières colonies de fibroblastes. Dès que les boîtes arrivent à confluence, les fibroblastes doivent être récupérés pour subir une dilution et être à nouveau remis en culture pour amplifier la culture. Ces dilutions correspondent à des passages dont le nombre doit toujours être mentionné sur les boîtes de pétrie. Ainsi après avoir noté sur la boîte de pétrie le nom et les références de la souche, la date de sa mise en culture, on note par P<sub>x</sub> le nombre de passage subi. Par exemple, une souche qui vient de subir son vingtième passage est notée P<sub>20</sub>.

## **RECUPERATION DES FIBROBLASTES ET AMPLIFICATION DE LA CULTURE.**

Lorsque des fibroblastes sont mis en culture, ils se divisent, s'étirent pour migrer au fond de la boîte de pétrie (photographie 3 chapitre 2 page 39) pour finalement adhérer fortement à sa paroi. Lorsque la boîte de pétrie est entièrement colonisée on dit que la boîte est à confluence (photographie 4 chapitre 2 page 40). Lorsqu'une culture atteint ce stade, pour éviter que les divisions soient bloquées par manque d'espace, on procède à des dilutions puis des repiquages, on parle alors de passages. Le protocole suivant décrit les étapes à suivre pour réaliser des passages à partir de boîtes de pétrie de trois dimensions différentes :

- Boîte de pétrie de 35 mm de diamètre : P<sub>35</sub>.
- Boîte de pétrie de 60 mm de diamètre : P<sub>60</sub>.
- Boîte de pétrie de 100 mm de diamètre : P<sub>100</sub>.

Pour réaliser les passages, il faut :

- 1) Aspirer le surnageant (qui correspond au milieu de culture) afin de ne garder que les fibroblastes qui demeurent collés au fond de la boîte de pétrie.

- 2) Rincer les cellules deux fois au P.B.S avec respectivement :

2.5 ml de P.B.S pour les P<sub>35</sub>.

5 ml de P.B.S pour les P<sub>60</sub>.

10 ml de P.B.S pour les P<sub>100</sub>.

- 3) Ajouter de la trypsine (à 0.025 %) à raison de :
  - 0.5 ml (=500µl) de trypsine pour les P<sub>35</sub>.
  - 1 ml de trypsine pour les P<sub>60</sub>.
  - 2 ml de trypsine pour les P<sub>100</sub>.

Mettre ensuite à incuber durant 5 minutes puis observer au microscope pour s'assurer que toutes les cellules se sont décollées du fond de la boîte.

- 4) Ajouter ensuite du milieu de culture pour inhiber l'action de la trypsine à raison de :
  - 2.5 ml de milieu pour les P<sub>35</sub>.
  - 5 ml de milieu pour les P<sub>60</sub>.
  - 7 ml de milieu pour les P<sub>100</sub>.

Homogénéiser le tout en effectuant à la micropipette des mouvements successifs d'aspiration et de refoulement. En fin de parcours, nous avons dans chaque boîte de pétrie les volumes suivants :

- **Pour les P<sub>35</sub>**, nous avons 0.5 ml de trypsine contenant des cellules en suspension + 2.5 ml de milieu ==► **3 ml** de volume final.

- **Pour les P<sub>60</sub>**, nous avons 1ml de trypsine contenant des cellules en suspension + 5 ml de milieu ==► **6 ml** de volume final.

- **Pour les P<sub>100</sub>**, nous avons 2ml de trypsine contenant des cellules en suspension + 7 ml de milieu ==► **9 ml** de volume final.

- 5) Pour repiquer enfin les cellule, nous procédons comme suit :

- **Pour les P<sub>35</sub>**,

Les **3 ml** de volume final sont répartis à raison de 1ml par boîte nouvelle de **P<sub>35</sub>**, à laquelle on rajoute 2ml de milieu par boîte==► ce qui nous donne 3 boîtes **P<sub>35</sub>** contenant 3ml chacune.

- **Pour les P<sub>60</sub>**,

Les **6 ml** de volume final sont répartis à raison de 2ml par boîte nouvelle de **P<sub>60</sub>**, à laquelle on rajoute 4ml de milieu par boîte==► ce qui nous donne 3 boîtes **P<sub>60</sub>** contenant 6ml chacune.

- **Pour les P<sub>100</sub>**,

Les **9 ml** de volume final sont répartis à raison de 3ml par boîte nouvelle de **P<sub>100</sub>**, à laquelle on rajoute 7ml de milieu par boîte==► ce qui nous donne 3 boîtes **P<sub>100</sub>** contenant 10ml chacune.

## CONGÉLATION DE CELLULES REPIQUÉES.

Une fois les cultures amplifiées, il est nécessaire de congeler les populations de cellules contenues dans les boîtes confluentes. Toute la manipulation s'effectue sous la hotte à flux laminaire et se déroule comme suit:

- 1) Sortir le Sérum de veau fœtal (S.V.F) du congélateur puis le mettre sous la hotte à flux laminaire à température ambiante (ne jamais le mettre au bain marie).
- 2) Préparer les cryotubes en y inscrivant les références à retenir concernant la souche pour cela :
  - Inscrire sur le bouchon du cryotube, le numéro de la souche.
  - Inscrire sur le côté du cryotube, le nombre de passage, la nature du traitement, la date de congélation et la taille de la boîte dont sont issues les cellules (P<sub>100</sub>, P<sub>60</sub>, P<sub>35</sub>).
- 3) Sous la hotte à flux laminaire, ouvrir le cryotube et y mettre 900µl de sérum pur pour les P<sub>100</sub> (450 µl pour les P<sub>60</sub> et les P<sub>35</sub>).
- 4) Ajouter du DMSO à raison de 100µl pour les P<sub>100</sub>, de 50 µl pour les P<sub>60</sub> et les P<sub>35</sub>. Mettre ensuite en attente le cryotube sur un portoir sous la hotte.
- 5) Sortir la boîte de pétri confluyente de l'incubateur et en aspirer le milieu de culture surnageant à l'aide de la pompe.
- 6) Rincer les cellules en les recouvrant de P.B.S à raison de 5ml de P.B.S pour les P<sub>100</sub> et les P<sub>60</sub> et de 2,5 ml de P.B.S pour les P<sub>35</sub>. Après deux minutes d'attente, aspirer le P.B.S. Répéter l'opération trois fois.
- 7) Décoller ensuite les cellules à l'aide de trypsine concentrée à 0.025%. les volumes utilisés sont de : 2ml pour les P<sub>100</sub>, 1ml pour les P<sub>60</sub> et 0,5ml pour les P<sub>35</sub>. Laisser agir 4 minutes à l'autoclave et vérifier si le détachement des cellules a eu lieu observant au microscope. Sinon prolonger d'une minute le temps d'attente. Dès que les cellules sont détachées, stopper l'action de la trypsine en rajoutant du milieu de culture à raison de 8ml de milieu pour les P<sub>100</sub>, de 5ml de milieu pour les P<sub>60</sub> et 2,5 ml de milieu pour les P<sub>35</sub>.
- 8) Mettre le tout dans un tube de 15ml et centrifuger à 1000 Tours/Minutes durant 5 minutes.
- 9) Retirer le tube de la centrifugeuse et aspirer le surnageant à l'aide de la pompe.
- 10) Récupérer à l'aide d'une micropipette le contenu du cryotube (sérum-DMSO) laissé en attente au point « 4 » ci-dessus pour resuspendre le culot de cellules se trouvant dans le tube centrifugé. Procéder alors à un mouvement de va et viens entre les deux tubes jusqu'à dissolution complète du culot. Ces mouvements doivent s'effectuer avec la plus grande délicatesse pour ne pas aggraver les cellules et pour ne pas faire mousser le sérum de veau. Lorsque la suspension est terminée, disposer la solution dans le cryotube déjà répertorié.

- 11) Mettre ensuite le cryotube dans la boîte à isopropanol qui abaisse la température d'un degré par minute puis disposer le tout à  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 12) Quelques heures plus tard, mettre le tout dans l'azote liquide.

### **PROTOCOLE DE DÉCONGÉLATION, DE COMPTAGE A LA CELLULE DE THOMA ET DE MISE EN CULTURE DE FIBROBLASTES DE LAPIN.**

- 1) Préparer le milieu de culture de façon indiquée en page 88.
- 2) Récupérer de l'azote liquide le cryotube, le mettre sur un portoir au bain marie ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Retirer le cryotube lorsqu'il ne reste qu'un petit cube de glaçon au fond.
- 3) Mettre goutte à goutte 1ml de milieu dans le cryotube puis réaspirer le tout à l'aide de la micropipette puis « injecter » le mélange obtenu dans un tube contenant 10ml de milieu (ce qui nous donne en fin d'étape un volume de 11ml).
- 4) Mettre à centrifuger durant 5 minutes à 1000Tours/Minute.
- 5) Aspirer à l'aide de la pompe le surnageant et garder le culot.
- 6) Ressuspendre le culot dans 2ml de milieu pour envisager une énumération à la cellule de Thoma. Pour cela, il faut prélever 20 $\mu\text{l}$  des 2 ml sus-cités et ajouter 20 $\mu\text{l}$  de bleu de Tripán (produit cancérigène et mutagène à manipuler soigneusement).
- 7) Placer à l'aide d'une micropipette 10 $\mu\text{l}$  du mélange milieu + bleu de Tripán dans les deux cuves de la cellule de Thoma.
- 8) Procédez au comptage sous microscope pour dénombrer les cellules vivantes. Il faut savoir que les cellules vivantes sont imperméables au colorant  $\Rightarrow$  elles sont donc claires, alors que les cellules mortes intègrent le colorant  $\Rightarrow$  et sont de ce fait foncées.

La cellule de Thoma (ou Mallasez) permet de déterminer la concentration en cellules vivantes et mortes d'une solution donnée en tenant compte de la dilution de celle-ci. La cellule de Thoma est une lame quadrillée comportant deux cuves au niveau desquelles se croisent les lignes verticales et horizontales de la lame. Les cellules prises en compte dans l'énumération sont celles situées sur le lieu de croisement de ces lignes. Les cellules disposées soit sur les lignes horizontales soit sur celles verticales ne sont pas prises en compte.

Exemple : si la moyenne des cellules comptées dans les cuves de la cellule de Thoma est de 20,33 cellules et qu'à partir de cette solution, nous voulonsensemencer des P<sub>35</sub>, à raison de  $45.10^3$  cellules par boîte, le calcul du volume à prélever sera fait sur la base du raisonnement suivant :

Nous avons :

**2. 2. 20,33  $10^3$  cellules  $\Rightarrow$  dans les 2ml de solution**

Le premier chiffre « 2 » correspond aux 50% de bleu de Trypan.

Le deuxième chiffre « 2 » correspond au volume de suspension.

Nous voulons  $45.10^3$  cellules pour cela combien de volume devons prélever ?

**$45.10^3$  cellules  $\Rightarrow$   $V_x$  ml de solution mère**

$$V_x = \frac{45.10^3 \text{ cellules. 2ml}}{2. 2. 20,33 10^4 \text{ cellules}}$$

$$V_x = 0,110\text{ml} = 110\mu\text{l}$$

$\Rightarrow$  Il faudra donc prélever 110 $\mu\text{l}$  de solution mère pour avoir environ  $45.10^3$  cellules.

9) Mettre ensuite 3ml de milieu dans une P<sub>35</sub> puisensemencer les 110 $\mu\text{l}$  de solution mère. Homogénéiser en basculant délicatement la boîte dans les sens : gauche-droite et avant-arrière. Mettre enfin à incuber.

## RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Le but de cette dernière partie est de présenter à partir de nos résultats non publiés une sélection d'informations répondant aux questions s'articulant autour du comportement de croissance des fibroblastes après décongélation. Les expériences visent étudier les effets de la congélation sur les fibroblastes :

- 1) en évaluant la fluctuation des taux de croissance au sein de trois lots différents de fibroblastes issue d'une même lapine.
- 2) en évaluant la fluctuation du taux de croissance au sein de trois souches de fibroblastes issues de trois lapines différentes (mais de même âge). Dans ce cas, c'est l'effet individu sur le phénomène croissance qui est étudié.
- 3) en établissant les courbes de croissance permettant de calculer les temps de doublement de deux souches à des niveaux de passages différents ( $P_2$  pour l'une et  $P_{20}$  pour l'autre).

Les fibroblastes expérimentés, ont été obtenus à partir de biopsies prélevées sur des lapines souches I.N.R.A de Jouy en Josas. Ces biopsies ont été traitées puis mises en culture selon le protocole décrit au chapitre 2-1-1. Les fibroblastes ainsi obtenus ont été amplifiés (par 2 passages successifs), congelés puis décongelés au bout de trois mois selon les protocoles décrits en annexe (Page 79 à 81). Le comptage des cellules est effectué à la cellule de Thoma tel que décrit en annexes (page 83). Il ressort de notre étude pour les trois points cités respectivement ci-dessus :

1) que dans tous les cas,  $t$  est inférieur à la valeur relevée pour le seuil de 5% et pour les d.d.l correspondants dans la table de la loi de Student (diapositives N° 5 et 6). Par conséquent, il n'y a pas de différence significative entre les trois lots : ==► **le phénomène croissance des fibroblastes décongelés présente une répétitivité lorsqu'il s'agit de lots différents issus d'un même individu (cela étant valable aussi bien après 48 h d'incubation qu'après 144 h).**

2) que dans tout les cas,  $t$  est inférieur à la valeur relevée pour le seuil de 5% et pour les d.d.l correspondants dans la table de la loi de Student (diapositive N° 7). Par conséquent, il n'y a pas de différence significative entre les trois lots : ==► **le phénomène croissance des fibroblastes décongelés présente une répétitivité lorsqu'il s'agit de lot issus d'individus différents (cela ayant été testé après 144 h d'incubation).**

3) qu'après établissement des courbes de croissance (diapositives N° 8, 9, 10 et 11) permettant de calculer les temps de doublement de deux souches de niveau de passage différents après décongélation ( $P_2$  pour l'une et  $P_{20}$  pour l'autre), nous pouvons dire qu'au fur et à mesure des passages successifs, les fibroblastes recouvrent leur vitesse de croissance puisque les temps de doublement (diapositive N° 11) sont de :

- 46 h pour les  $P_2$
- 36 h pour les

N.B : notons, que le temps de doublement est le temps que met une souche en culture pour doubler son effectif.