

Conservation des souches pures

1. Préliminaire fondamental:

L'objectif de la conservation d'une souche pure est le suivant: maintenir ta souche pure à conserver viable, disponible et à l'identique. Dans l'absolu, conserver à l'identique, c'est conserver à l'identique le génotype. En pratique, on ne peut vérifier l'absence totale de modification du patrimoine génétique d'origine de la souche pure lors de la conservation ; on se contente de maintenir à l'identique un ensemble de caractères génétiques et/ou morphologiques et/ou physiologiques et/ou biochimiques qui caractérisent la souche pure à conserver et qui sont d'intérêt pour les utilisateurs de la souche (les caractères sont définis par l'utilisateur en fonction de la nature de son travail sur la souche à conserver). La conservation doit évidemment exclure les contaminations.

Selon les cas pratiques, les durées de conservation nécessaires varient de quelques jours à plusieurs années et le choix d'une technique de conservation doit tenir compte de ce paramètre de durée.

Exemples pratiques où on doit conserver une souche pure :

- Exemple médical : Conservation d'une souche isolée sur un patient et transmise à un laboratoire spécialisé pour études complémentaires (typage très précis, études de réactions vis à vis d'antibiotiques, élément d'étude épidémiologique). Souvent, une conservation de courte durée suffit.
- Conservation de souches de références dans un soucier de références (conservation de très longue durée pour une série très importante et fondamentale de caractères).
- Exemple en génie biologique : Conservation de souches sélectionnées ou obtenues par génie génétique et brevetées Il s'agit de conserver absolument les caractéristiques d'intérêt biotechnologique (par exemple une souche destinée à la production industrielle d'un antibiotique ou d'une molécule à très haute valeur ajoutée ...). Ainsi, c'est délicat pour les souches génétiquement manipulées qui perdent les gènes introduits avec une certaine fréquence. Comme les cellules qui produisent le composé d'intérêt biotechnologique sont en général moins prolifiques que les cellules qui ont perdu cette activité, la tendance est à la disparition de la souche modifiée mise au point. D'où l'intérêt d'une conservation très au point !

L'idéal théorique de la conservation est le suivant: arrêter toutes les réactions chimiques dans la suspension de cellules à conserver (on serait ainsi sûr de préserver la totalité de ce vivant à l'identique) en maintenant la viabilité, la disponibilité pour une reprise de culture ultérieure.

Les paragraphes qui suivent vont maintenant décrire les techniques usuelles de conservation et les qualifier.

2. Conservations de formes cellulaires naturelles à vie ralentie (à température ambiante ou à +4°C).

Utilisable en fait uniquement pour certaines souches de bactéries ou de champignons présentant naturellement des formes de conservation (par exemple des spores ou des cystes). On conserve les formes de conservation. De telles cellules sont en inactivité métabolique naturelle, il suffit d'assurer des conditions dépourvues de mutagènes physiques (rayons UV ...) qui maintiennent cette inactivité

Exemples : conservation d'endospores de Bacillus (souches produisant des exoenzymes de type protéase ...); conservation des spores de Streptomyces (souches brevetées produisant des antibiotiques). Le terme spore désigne en fait ici une forme de dissémination non thermostable présente chez le genre Streptomyces.

3. Conservation par repiquages successifs

L'idée est la suivante : repiquer régulièrement (avant perte de viabilité) sur un nouveau milieu nutritif. En fait, même si on fait abstraction des problèmes éventuels des risques de contaminations liées aux repiquages, cette technique est limitée par les dérives, les instabilités génétiques des souches pures. Ainsi, à partir d'un clone de départ de cellules identiques entre elles et identiques à la cellule mère du

clone, on va aller vers l'apparition de variants génétiques qui seront rapidement présents en grandes proportions. C'est le milieu de culture et les conditions de culture qui vont faire la sélection des variants. L'apparition des variants est spontanée (typé mutation), la sélection des variants cultivant est réalisée par le milieu de culture et les conditions de culture.

Pour minimiser le développement des variants on doit :

- (i) utiliser des conditions environnementales de culture et une composition chimique des milieux de culture qui maintiennent les cellules dans un état métabolique réduit, qui occasionnent des temps de génération très longs.
- (ii) utiliser des milieux qui maintiennent une pression de sélection élevée sur les caractères qui caractérisent la souche à conserver. Ainsi les milieux de conservation sont toujours des milieux "pauvres" et/ou sélectifs de caractères, Par exemple :
- (iii) éviter tous les agents favorisant les mutations, en particuliers la lumière.

Exemple pratique pour lequel on utilise une conservation sur milieu de conservation: les conservations de souches pour compléments d'études dans les laboratoires, pour des durées de quelques semaines. Échanges de souches entre laboratoires.

4. Conservation de longue durée par les très basses températures (congélation)

4.1. Rappels concernant les basses températures, l'eau et le vivant

Les basses températures vont permettre d'arrêter toutes les réactions chimiques cellulaires «t donc de conserver, en théorie, de façon parfaite. L'arrêt est presque total vers -30°C . Le problème lié à la conservation par le froid est celui de la formation de cristaux de glace qui peuvent être très dommageables pour les cellules.

Au cours de la congélation d'une suspension microbienne, on peut voir se former deux types de cristaux de glaces :

- (i) des cristaux extra-cellulaire. Ils sont peu lésant pour les cellules mais peuvent conduire à une déshydratation néfaste pour les cellules.
- (ii) des cristaux intra-cellulaire. Ils endommagent les structures cellulaires, en particuliers les structures membranaires et entraînent ainsi la mort cellulaire. Ils sont donc à éviter absolument. Du moins, doit on faire en sorte que leur probabilité d'apparition et leur taille soit la plus faible possible.

Les paramètres qui vont intervenir pour la mise au point d'une technique de conservation par congélation sont les suivants :

- cinétique de descente en température, température finale, présence d'additifs chimiques cryoprotecteurs ;
- les problèmes liés à la décongélation (voir 4.4)

4.2. Congélation à -18°C , en congélateur de type familial

En absence de cryoprotecteur :

- (i) le milieu extra-cellulaire glace d'abord et provoque une extraction importante et dommageable de l'eau des cellules par phénomène d'osmose;
- (ii) des gros cristaux de glace pure intracellulaire peuvent apparaître.

Ainsi on congèle en présence d'additifs cryoprotecteurs comme le DMSO (diméthylsulfoxyde) ou le glycérol à des concentrations de l'ordre de 50%. Ces additifs pénètrent dans les cellules et abaissent la température de congélation largement en dessous de -18°C (ainsi avec 67% de glycérol, la température de congélation est abaissée à -46°C !). Leur action protectrice est due au fait qu'ils empêchent les cristallisations dans les conditions du refroidissement

Il faut considérer qu'à -18°C dans le milieu intracellulaire, quelques réactions chimiques (non catalysées par des enzymes) ont une cinétique non nulle et il y a une détérioration évolutive des cellules. La mortalité liée à ce type de congélation est élevée et progresse dans le temps. Méthode adaptée à des conservations de l'ordre de 1 à 3 ans.

4.3. Congélation vers -70 , -80 , -196°C

Les problèmes essentiels sont liés aux cristallisations de glace pure intracellulaire. Les protocoles sont empiriques, adaptés à la nature des cellules à conserver. Les paramètres fondamentaux sont: la

cinétique de descente en température qui doit être parfaitement programmée, le type des additifs cryoprotecteurs utilisés.

En général on assure un refroidissement lent, progressif, en présence de cryoprotecteurs pénétrant les cellules. Il s'agit d'éviter une trop forte déshydratation des cellules lors de la formation primitive de glace extra-cellulaire puis d'éviter la formation secondaire (qui suit la déshydratation consécutive à la formation de glace extra cellulaire) de trop nombreux et trop gros cristaux de glace pure intracellulaire.

Certains protocoles assurent au contraire un refroidissement très rapide. Il s'agit d'obtenir une "vitrification" intracellulaire non lésante. Les agents cryoprotecteurs utilisés sont alors essentiellement des agents ne pénétrant pas les cellules (des agents pénétrants abaisseraient la température de congélation du cytoplasme et donc défavoriseraient la vérification au profit de cristaux intracellulaires de glace pure). (P.E.G.)

A ces températures, on peut considérer que toute réaction chimique est abolie dans les cellules. Et c'est ce qu'on recherche! Très souvent, le stockage final est réalisé à -196°C (sous azote liquide). Congélation adaptée à des conservations de très longue durée.

4.4. La décongélation

Il faut absolument éviter les processus de réarrangement des structures congelées avec formation de gros cristaux de glace intracellulaire lors de la phase de remontée de la température. L'idéal est une décongélation instantanée.

5. Conservation après dessiccation

Après déshydratation, les réactions chimiques cellulaires sont arrêtées (au moins ralenties): la conservation est donc effective.

5.1. Dessiccations "en absence de froid"

La déshydratation peut être facilitée par l'utilisation d'un vide partiel ou d'agents dessiccateurs. Les micro-organismes sont répartis sur des supports "inertes" comme du papier buvard, des sables, des grains de silices ... Stockage à $0-4^{\circ}\text{C}$ au sec.

La revivification s'effectue par immersion dans du milieu de culture.

Ne convient pas à toutes les espèces de micro-organismes. Intéressant pour des conservations de quelques semaines.

Exemples : les entérobactéries supportent bien.

5.2. Lyophilisation (cryodessiccation)

La souche pure du micro-organisme à conserver est :

- (i) congelée (avec tous les problèmes liés à la congélation exposés ci-avant) ;
- (ii) déshydratée par sublimation (implique un travail au froid à pression très réduite).

Les lyophilisats sont stockés sous ampoules scellés sous vide, à $[0-4]^{\circ}\text{C}$.

La lyophilisation n'est pas possible pour toutes les souches. Pour certaines souches, en particuliers des souches recombinées industrielles, les techniques de lyophilisation conduisent à des altérations génétiques et cellulaires.

La revivification (réhydratation) est effectuée par ajout de quelques gouttes de milieu de culture dans l'ampoule de lyophilisat.

Lorsque les conditions pratiques pour une souche donnée sont au point. C'est une excellente méthode de stockage sur le long terme (plus de 30 ans ...).

Exemples : des collections entières de souches dans les souchiers de référence.