"Le Sélectionneur Français," 1983(31) 43-55

RESISTANCE ET CONSERVATION DES CELLULES ET ORGANES VEGETAUX, A LA TEMPERATURE DE L'AZOTE LIQUIDE (-196° C)

par

J. DEREUDDRE et C. GAZEAU

Laboratoire de Cytologie Végétale Expérimentale, Université P. et M. Curie (Paris 6)
12, rue Cuvier, 75230 PARIS Cedex 05

Le développement des cultures de cellules, de tissus et d'organes, haploïdes ou diploïdes, semble lié aux multiples possibilités qu'offre cette méthode dans des domaines variés : multiplication végétative, production de métabolites, hybridation cellulaire et bientôt, manipulations génétiques.

De nombreuses raisons justifient la recherche d'une technique, qui permette la conservation de souches cultivées *in vitro*. Les cultures cellulaires nécessitent des repiquages fréquents et il est important de maintenir constant le patrimoine génétique d'une souche cellulaire. Or, l'état des cultures est susceptible de se modifier progressivement, au cours de repiquages successifs ; on peut craindre l'augmentation du nombre des chromosomes par polyploïdisation, principalement pour les souches haploïdes, ou encore la perte du potentiel morphogénétique... Il paraît également nécessaire de conserver des génomes rares, dérivés d'aberrations chromosomiques ou de mutations, qui pourraient être utilisés ultérieurement dans des programmes d'hybridation.

Parmi les techniques utilisables, celle du stockage des souches à très basse température (-196° C) semble la mieux adaptée. Elle n'impose qu'un appareillage relativement peu onéreux ; elle permet d'éviter les repiquages, ce qui favorise un gain important de temps et d'espace. Cette méthode ouvre aussi à la biologie fondamentale des domaines variés de recherche : sélection de souches résistantes à la congélation, endurcissement au froid, étude du mode d'action des substances cryoprotectrices...

Les premières recherches réalisées dans ce sens ont été faites sur des cellules animales : spermatozoïdes, cellules sanguines, cultures cellulaires de mammifères, tissu d'embryon de poulet, embryon de mammifères. Le glycérol, puis le diméthylsulfoxyde, ont été successivement utilisés comme agents cryoprotecteurs.

Les premiers résultats, relatifs aux végétaux, ont été obtenus sur des cultures de cellules isolées, puis sur des cals. C'est en 1971 que LATTA a réussi à faire proliférer des cultures cellulaires de carotte, qui avaient subi antérieurement une congélation à -196° C. Depuis, les recherches dans le domaine de la cryobiologie végétale se sont multipliées et il est possible d'en dresser un premier bilan.

1. LA RESISTANCE DES RAMEAUX D'ARBRES

Si la résistance des graines, des spores, des grains de pollen... est connue depuis plus d'un siècle, ce n'est qu'en 1960 que des rameaux d'arbres, traités dans certaines conditions, ont pu survivre à une congélation dans l'azote liquide. Les rameaux doivent être prélevés en hiver, alors qu'ils sont en vie latente ; ils subissent ensuite un prérefroidissement avant d'être plongés dans l'azote liquide. La congélation initiale est progressive : en général, quelques degrés par heure jusqu'à une température suffisamment basse (-9 à -70° C) (Fig. 1). Ce traitement préalable des rameaux produit la formation de cristaux de glace dans les espaces intercellulaires et une forte déshydratation des cellules. Après la congélation à -196° C, les rameaux sont réchauffés, soit dans l'eau à 35-40° C, lorsque le refroidissement préalable a été peu intense, soit le plus souvent dans l'air à 0 ou 20° C. Des rameaux de nombreuses espèces (bouleaux, pin sylvestre, mûrier, robinier, certains peupliers...) résistent ainsi à un tel traitement et peuvent être conservés, pendant plusieurs mois au moins, à -196° C.

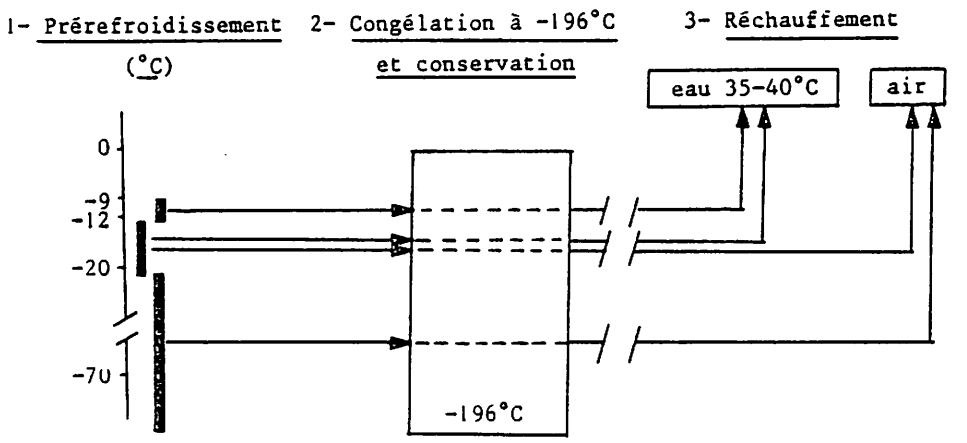

Fig. 1 *Principales étapes pouvant permettre la survie à la température de l'azote liquide (- 196° C) de rameaux d'arbres en période hivernale. Le mode de réchauffement, dans l'air ou dans l'eau, dépend de la température du prérefroidissement.*

2. RESISTANCE ET CONSERVATION DES CULTURES CELLULAIRES

- Les tests de viabilité

Parmi les critères qui permettent d'apprécier la survie des cellules après une congélation dans l'azote liquide, le plus sûr reste la reprise de la croissance. Cependant, d'autres tests peuvent être utilisés :

. Réduction du chlorure de triphényltétrazolium (TTC) par les cellules vivantes. Cette réduction résulte de l'activité des mitochondries. Le formazan, produit de la réaction, est un composé insoluble rouge, qui peut être dissout par addition d'alcool chaud, et dosé par photométrie.

. Coloration et observation en lumière ultraviolette des cellules vivantes par le diacétate de fluorescéine (FDA). Les cellules mortes, colorées par le bleu Evans, sont décelées en lumière ordinaire.

Toutefois, ces tests, lorsqu'ils sont appliqués immédiatement après le réchauffement, ne donnent pas forcément des indications suffisantes sur la survie des cellules ; certaines d'entre elles s'altèrent ensuite, la mort par le froid n'étant pas toujours immédiate. Aussi, peut-on effectuer, en plus, une étude cinétique de la croissance des cultures.

- Le traitement cryoprotecteur

Les substances (glycérol, DMSO, saccharose,...), employées pour la protection des cellules végétales, ont une masse moléculaire faible. Elles sont miscibles à l'eau, peu toxiques aux concentrations utilisées et facilement éliminées. Ces cryoprotecteurs diminuent la température à laquelle cristallise le milieu. Toutefois, les mécanismes de leurs effets sur la cellule sont encore peu connus. Ils pourraient protéger les membranes cellulaires et réduire les conséquences d'une augmentation de la concentration des électrolytes sur le cytoplasme, à la suite d'une forte déshydratation des cellules.

Le DMSO (diméthylsulfoxyde) est le produit le plus souvent utilisé. Les concentrations nécessaires, exprimées en % (v/v), pour assurer une protection satisfaisante sont relativement faibles (Fig. 2). Lorsqu'il est employé seul, la concentration la plus usuelle est de 5 % : cellules de carotte (LATTA, 1971 ; NAG et STREET, 1975) ou de riz (SALA et coll., 1979). Utilisé en mélange avec des oses, la concentration optimale du DMSO est plus élevée : 10 % pour les cellules de canne à sucre (FINKLE et ULRICH, 1979) ou 12 % pour les cellules d'érable (SUGAWARA et SAKAI, 1974). Dès son application, le DMSO ralentit ou arrête la croissance ; cet effet commence avec des concentrations relativement faibles de 0,5 à 1 %. A des concentrations plus élevées, le DMSO peut exercer une action toxique, dont l'intensité dépend de la durée du traitement protecteur et de la température à laquelle il est appliqué. Si certaines souches cellulaires paraissent résis-

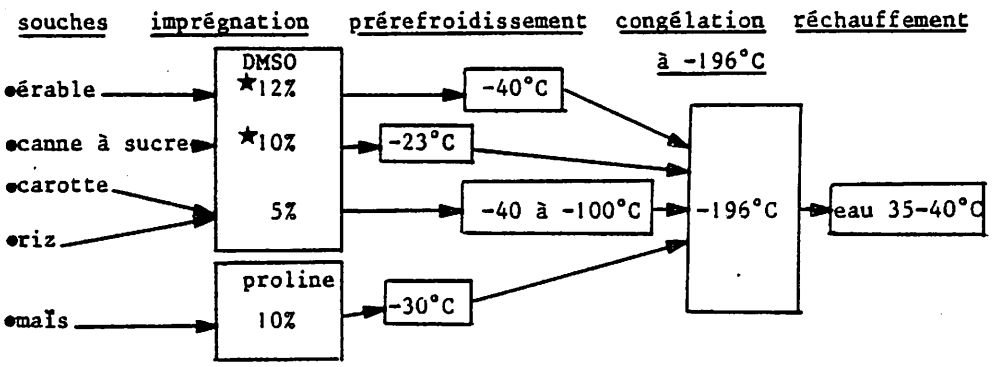

Fig. 2 *Tableau récapitulatif indiquant les principales étapes permettant la survie de diverses cultures cellulaires à une congélation à - 196° C. Les cultures imprégnées par une solution protectrice, sont refroidies progressivement, puis congelées dans l'azote liquide où elles peuvent être conservées ; les cultures sont ensuite réchauffées dans l'eau à 35 ou 40° C.*

ter au DMSO, d'autres y sont plus sensibles. Cet effet nocif peut être atténué par l'addition progressive du produit, pendant une durée limitée (15 à 30 minutes) et à basse température (0 à 2° C). Cette dernière technique n'est cependant guère utilisable pour certaines souches cellulaires (*Capsicum annuum*), qui, d'autre part, sont sensibles aux températures fraîches, même non gelantes.

Le glycérol est également utilisé comme cryoprotecteur ; il nécessite cependant une durée d'incubation plus longue, car il pénètre lentement dans les cellules. Le glycérol inhibe aussi la croissance s'il est employé à des concentrations supérieures à 10%. Relativement moins utilisé que le DMSO, il permet, toutefois, la conservation des cellules de carotte ou d'érable.

Les sucres, tels que le glucose et le saccharose, sont rarement employés seuls. Ils sont mélangés avec les agents cryoprotecteurs usuels (DMSO et glycérol) dont ils atténuent les effets toxiques. Des mélanges de glycérol, de DMSO et de sucres ont été utilisés pour protéger des suspensions cellulaires de carotte, de belladonne et de sycomore contre le froid. Les pourcentages de survie, obtenus sont hétérogènes.

La proline, retenue pour des imprégnations de courte durée, possède un effet cryoprotecteur assez faible ; toutefois, des cellules de maïs, cultivées in vitro pendant 3 jours dans un milieu additionné de 10 % de proline et prérefroidies jusqu'à -30° C, résistent ensuite à une congélation à -196° C (WITHERS et KING, 1979). Le prétraitement par la proline permet de rendre la culture résistante au froid. Celle-ci est particulièrement sensible à l'action toxique du DMSO ou du glycérol. L'action de la proline peut s'expliquer : cet imino-acide étant impliqué dans la protection des cellules contre les effets du gel, de la dessication ou encore des milieux salés.

Si des produits paraîssent efficaces pour conférer une certaine résistance au froid à diverses lignées cellulaires, ils ne fournissent pas forcément des résultats analogues pour d'autres. Chaque souche nécessite la recherche systématique d'un traitement cryoprotecteur spécifique.

- L'état de la culture

La résistance des cultures cellulaires à l'azote liquide dépend de la période du cycle de développement à laquelle le traitement cryoprotecteur est effectué. D'une façon générale, les cultures cellulaires résistent mieux lorsqu'elles sont traitées vers la fin de la phase de latence ou au cours de la phase de croissance exponentielle.

Les cellules les plus résistantes sont souvent groupées. Elles possèdent des parois minces et sont peu vacuolisées. Celles qui demeurent vivantes, malgré un séjour à -196° C, ont un type méristématique. D'autre part, un ensemble de forte densité cellulaire facilite la reprise ultérieure de la culture après la conservation dans l'azote liquide.

Selon une étude plus fine, effectuée par WITHERS (1978) sur des cultures synchrones d'érable, le taux de survie des cellules subit des variations cycliques en rapport avec le rythme des mitoses : les maxima sont légèrement postérieurs à ceux de l'index mitotique et à la diminution de la quantité moyenne d'ADN. L'étude comparée des histogrammes, donnant les quantités d'ADN par noyau, avant et après la congélation, montre que les cellules en phase G_1 résistent mieux que celles qui sont en phase de synthèse d'ADN, ou en phase G_2.

- Le refroidissement et le réchauffement

Ce sont les phases les plus délicates. La congélation s'effectue en deux étapes : prérefroidissement progressif de 1 à 4° C par minute, à une température variable selon les auteurs, et selon les espèces, puis congélation dans l'azote liquide. De plus, pour induire la cristallisation du milieu d'incubation et éviter ainsi une surfusion trop importante, le fond des tubes de culture est placé quelques instants sur de la carboglace (-80° C). Les conditions optimales de survie de la culture dépendent des températures du prérefroidissement. Elles sont de -23° C pour la canne à sucre, -30° C pour le maïs, -40 à -100° C pour d'autres espèces.

Le refroidissement progressif préalable a pour objet de favoriser une déshydratation partielle des cellules, dont les conséquences néfastes peuvent être atténuées par l'emploi de substances protectrices : glycérol ou DMSO. Cependant, la déshydratation demeure incomplète, aussi, des noyaux de glace apparaissent pendant la congélation dans l'azote liquide. Le réchauffement doit être rapide pour diminuer les effets éventuels d'une cristallisation. On l'effectue, en général, dans l'eau à 35 ou 40° C. Si le refroidissement préalable a été particulièrement intense, le taux de survie devient relativement indépendant de la vitesse du réchauffement.

- La phase de latence

Après la congélation dans l'azote liquide et le réchauffement, la reprise de la croissance n'est pas immédiate. Ainsi, les cultures cellulaires de lin, effectuées à la lumière, puis congelées à -70° C, blanchissent dans les heures qui suivent le réchauffement et reverdissent quelques jours après. Leur comportement est analogue, si elles n'ont pas été traitées par le froid : le DMSO serait responsable de leurs altérations. Seules survivantes, des cellules méristématiques se diviseraient pour donner des nodules susceptibles de se différencier et de verdir. Ainsi, un faible pourcentage de cellules résiste au traitement. Les cellules de carotte ont un comportement similaire : les pigments anthocyaniques disparaissent, puis réapparaissent ensuite, après une période de latence de quelques semaines. Des durées de latence plus courtes (5 à 6 jours) ont été observées pour l'érable, le maïs et le riz ; d'autres, plus longues (3 à 4 mois), dans le cas des cellules de tabac.

Une étude quantitative a été faite pour certaines espèces. Des cellules de maïs ont été traitées par la proline, puis congelées à -196° C. Leur viabilité, estimée avec la technique du diacétate de fluorescéine, diminue rapidement pendant les premiers jours de culture, augmente ensuite avec la reprise des divisions cellulaires. Pour les cellules de riz, le taux de survie diminue rapidement dès les premières heures de remise en culture, les cellules retrouvent ensuite un taux de croissance élevé. Pour *Capsicum annuum*, 30 % de cellules demeurent vivantes immédiatement après le réchauffement consécutif à la congélation. Aucune croissance n'est décelable ultérieurement. Ces résultats confirment la nécessité d'une étude cinétique de la croissance de la culture, après le traitement par le froid.

- La durée de conservation

Quelques essais d'exposition de longue durée à la température de -196° C ont été réalisés : 2 à 3 mois pour les cultures de carotte, 6 mois pour celles de tabac, sans que cette conservation affecte de façon sensible le taux de survie des cellules. Ces données sont encore insuffisantes en ce qui concerne la possibilité de conserver des souches vivantes pendant de longues durées. Toutefois, des séjours particulièrement longs dans l'azote liquide, ont été réalisés avec succès sur des cellules animales (7 ans) sans diminution sensible du taux de survie. Aussi, peut-on espérer qu'il en sera de même avec les cellules végétales.

De remarquables succès ont été enregistrés, mais aussi des échecs. Les propriétés éventuelles de la résistance de nombreux autres matériels resteront à explorer. On peut remarquer que certains végétaux sont sensibles à la congélation (canne à sucre, maïs, riz), alors que les suspensions cellulaires de ces mêmes espèces, traitées par un mélange protecteur convenable, peuvent résister à un traitement par l'azote liquide.

3. RESISTANCE ET CONSERVATION DES PROTOPLASTES

Il est également possible de rendre des protoplastes résistants à l'azote liquide. Ces cellules, dépourvues de paroi, présentent un grand intérêt génétique (hybridation, manipulations génétiques), ce qui peut justifier leur stockage à -196° C. Selon leur origine, deux méthodes peuvent être envisagées (fig. 3). A partir d'écorce de *Robinia pseudoacacia*, prélevée en hiver, SIMINOVITCH (1979) obtient des protoplastes, après digestion des parois par un mélange d'enzymes (cellulase, pectinase et driselase), dans un milieu additionné de mannitol (1M). Placés ensuite dans une solution de saccharose de même concentration, ils sont refroidis progressivement jusqu'à -70° C, congelés dans l'azote liquide, puis réchauffés dans l'air à 3° C ; leur taux de survie atteint alors 60 %. La méthode utilisée est analogue à celle mise au point, pour des cellules corticales de la même espèce.

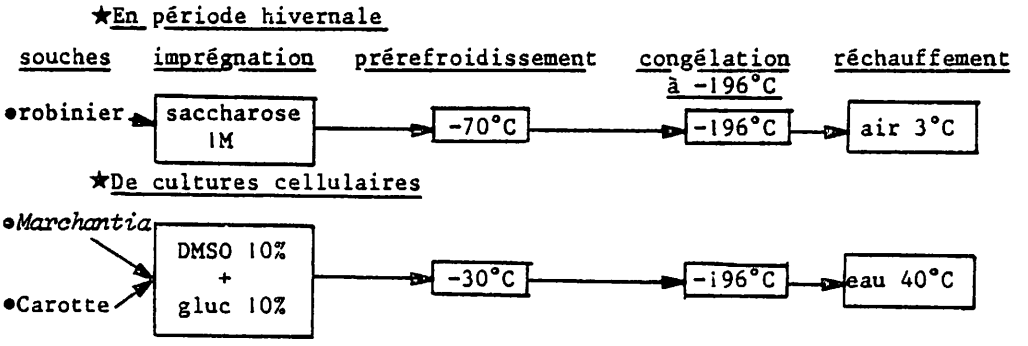

Fig. 3 *Techniques permettant la survie de certains protoplastes après une congélation dans l'azote liquide, selon leur état physiologique.*

Dans le cas de protoplastes issus de cultures cellulaires, une imprégnation préalable par du DMSO à 10 %, additionné ou non de glucose à 10 %, donne les meilleurs résultats. Après un premier refroidissement de 1° C/min. jusqu'à -30° C, une congélation à -196° C et un réchauffement dans l'eau à 40° C, plus de 40 % des protoplastes de *Marchantia polymorpha* et de *Daucus carota* résistent et sont capables de proliférer, donnant des protonémas pour les premiers, des cals pour les seconds (TAKEUCHI et coll., 1980).

4. RESISTANCE ET CONSERVATION DES CULTURES DE TISSUS

Du fait de leur caractère massif, la résistance des cals est plus délicate à réaliser. Deux approches différentes sont à envisager (Fig. 4).

Dans le cas du *Populus euamericana* (SAKAI et SUGAWARA, 1973), les cals peuvent être endurcis par un premier traitement de 25 jours, avec une photopériode courte (8 h de lumière, 16 h d'obscurité), associée à une thermopériode (0° C la nuit, 12° C le jour). Ce traitement permet aux cals de résister à une congélation progressive jusqu'à -20° C ; il s'accompagne d'un ralentissement très net de la croissance. Un séjour complémentaire des cultures à 0° C pendant 20 jours les rend aptes à subir la température de -196° C. Le réchauffement des tissus ainsi traités doit se faire dans l'air. Une analogie existe entre la résistance de ces tissus et celle des rameaux d'arbres, pendant la période hivernale. Cette méthode d'endurcissement n'est efficace que pour les cals provenant d'espèces dont les rameaux peuvent être rendus résistants à une congélation dans l'azote liquide.

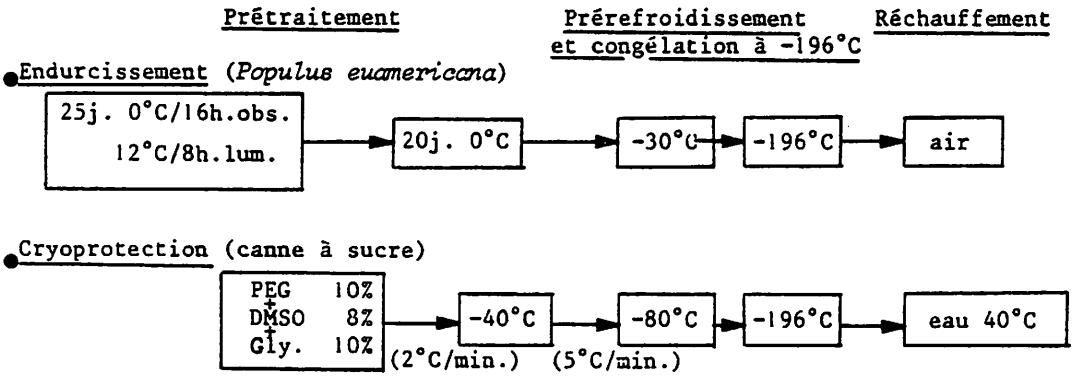

Fig 4 *Méthodes expérimentales spécifiques (endurcissement ou cryoprotection) permettant la conservation de cultures de tissus à la température de l'azote liquide.*

Pour les autres cultures de tissus, un traitement cryoprotecteur est nécessaire. Dans le cas de la canne à sucre, de petits fragments de cals sont mis à incuber à 0° C dans un mélange de polyéthylène glycol (10 %), de DMSO (8 %) et de glycérol (10 %) (ULRICH et coll. 1979). Ils sont ensuite refroidis progressivement jusqu'à -40° C (2° C/min.), puis jusqu'à -80° C (5° C/min.), et enfin congelés dans l'azote liquide. Après une période de 1 à 5 semaines, ils sont réchauffés dans de l'eau à 40° C. Ces sections sont ensuite capables de proliférer et de régénérer des plantes entières. Cette technique s'apparente étroitement à celle de la conservation des souches cellulaires.

5. RESISTANCE ET CONSERVATION DES APEX

Plusieurs techniques ont été utilisées pour rendre des apex résistants à une congélation à -196° C.

En période hivernale, ils peuvent résister à des températures très basses, bien qu'ils ne survivent pas à une cristallisation. Deux processus complémentaires expliquent cette propriété : une surfusion intense des tissus internes des bourgeons végétatifs ou floraux, jusqu'à -10 ou -40° C, et des températures de nucléation nettement supérieures (-2 à -9° C) des tissus externes (écailles, parenchymes cortical et médullaire). Des migrations d'eau peuvent alors se produire, des tissus méristématiques internes vers les tissus externes, où cette eau cristallise. L'apex et ses ébauches foliaires se déshydratent partiellement, leur température de nucléation diminue et leur résistance s'accroît. L'appauvrissement en eau permet aux tissus méristématiques des bourgeons d'éviter une cristallisation toujours mortelle, lorsque le refroidissement est lent. Certains bourgeons, ainsi artificiellement déshydratés, peuvent résister à une congélation directe dans l'azote liquide (DEREUDDRE, 1978). Selon la quantité d'eau qu'ils contiennent encore, le mode de réchauffement, dans l'eau ou dans l'air, doit être choisi pour obtenir les meilleurs résultats. Cette propriété a été établie avec des bourgeons de conifères, elle pourrait être étendue à d'autres espèces.

La technique précédente ne semble pas s'appliquer aux apex en période de croissance active. Deux modalités de refroidissement sont utilisées (fig. 5).

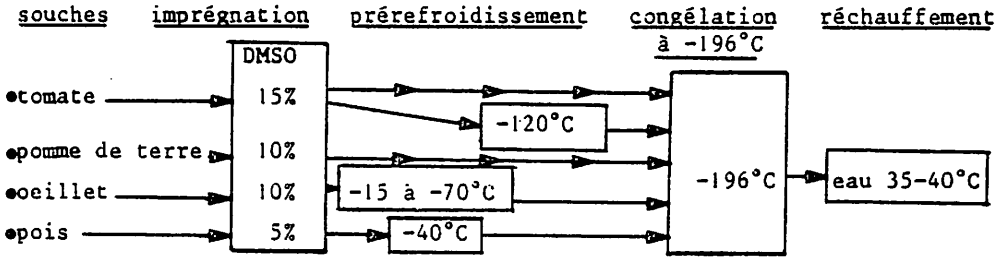

Fig. 5 *Modalités permettant la résistance et la conservation des apex à - 196° C. Certains (tomate, pomme de terre) sont congelés rapidement en une seule étape, par immersion directe dans l'azote liquide, les autres en deux étapes (prérefroidissement progressif, puis congélation à - 196° C.*

Après une imprégnation par du DMSO (5 à 15 %), les apex peuvent être refroidis en une ou en plusieurs étapes. Dans le premier cas (pomme de terre, tomate), les apex sont aspirés dans l'extrémité d'une aiguille de seringue hypodermique, puis plongés directement dans l'azote liquide ; la température des échantillons diminuant de 1000° C/min. environ (GROUT et HENSHAW, 1978). Dans le second cas, les apex subissent un premier refroidissement jusqu'à -15, -40, -70 ou -120° C, selon les espèces (HASKINS et KARTHA, 1980 ; UEMURA et SAKAI, 1980). Ils sont ensuite congelés à -196° C. Des taux de survie élevés (68 % pour le pois, 80 % pour l'oeillet) sont ainsi obtenus. Les échantillons sont ensuite rapidement réchauffés par immersion directe dans l'eau, à 35 ou 40° C. Toutefois, des apex d'oeillet, préalablement refroidis entre -40 et -70° C, puis congelés à -196° C, peuvent être réchauffés indifféremment d'une manière ou d'une autre.

6. RESISTANCE ET CONSERVATION DES EMBRYONS ET DES PLANTULES

Avec la congélation des apex, on atteint ce que l'on pourrait appeler les limites de nos possibilités actuelles dans ce domaine. Toutefois, d'autres résultats intéressants ont été obtenus avec la conservation d'embryons haploïdes de belladonne et de tabac (BAJAJ, 1977) ou d'embryons somatiques de carotte (WITHERS, 1979) après imprégnation par du DMSO (5 à 7 %). Comme pour les cultures cellulaires, ce sont les cellules méristématiques qui résistent le mieux. Ainsi, les embryons globuleux ont un taux de survie (31 %) supérieur à celui des cordiformes (9 à 2 %), lesquels présentent une proportion importante de cellules en voie de différenciation. Alors que les premiers, une fois réchauffés évoluent directement en plantules après congélation, les seconds prolifèrent, ils engendrent des cals susceptibles ensuite de produire des plantules : en effet, seuls quelques massifs cellulaires ont résisté au traitement. Des embryons encore plus différenciés, prélevés dans des ovules immatures de capselle, cultivés pendant 6 jours sur un milieu enrichi en saccharose (300 g/l), résistent aussi à une congélation à -196° C (MONNIER et LEDDET, 1980).

Des organismes encore plus complexes, comme les plantules de blé, cultivés à l'obscurité et traités par un milieu cryoprotecteur complexe, survivent jusqu'à -30° C, ou même, pour une partie d'entre elles, jusqu'à -40° C (GAZEAU, 1980).

CONCLUSION

En conclusion, si de nombreux succès ont été obtenus, il n'existe pas de technique universelle qui permette de conserver une souche cellulaire à la température de l'azote liquide : chaque matériel demande une étude particulière. Les concentrations des substances protectrices et les modalités de congélation et de réchauffement diffèrent sensiblement dans leurs détail. C'est probablement par un prétraitement des cellules en culture (par de la proline, du mannitol...), que d'autres progrès significatifs pourront être obtenus dans ce domaine. Pourtant, le bilan général des recherches est fortement positif. On peut être résolument optimiste quant aux résultats futurs : ils devraient

permettre la création de banques de gènes pour la conservation, peu onéreuse, de génomes rares de souches haploïdes instables ou de variétés commerciales de grande valeur.

BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE

BAJAJ Y.P.S., 1977. Survival of *Atropa* and *Nicotiana* pollen-embryos frozen at -196°C Curr. Sci., 46, 305-307.

DEREUDDRE J., 1978. Effets de divers types de refroidissement sur la teneur en eau et sur la résistance au gel des bourgeons de rameaux d'Epicéa en vie ralentie. Physiol. Vég., 16, 469-489.

FINKLE J. et J.M. ULRICH, 1979. Effects of cryoprotectants in combination of frozen sugarcane cells. Plant Physiol., 63, 598-604.

GAZEAU C., 1980. Accroissement de la résistance au froid (jusqu'à -30° C) de plantules de blé avec un milieu cryoprotecteur. Effets de ce traitement sur les cellules parenchymateuses d'ébauches foliaires. Can. J. Bot., 58,2520-2532.

GROUT B.W.W. et HENSHAW G.G., 1978. Freeze-preservation of potato shoot tip cultures. Ann. Bot., 42, 1227-1229.

HASKINS R.H. et K.K. KARTHA, 1980. Freeze preservation of pea meristems : cell survival. Can. J. Bot., 58, 833-840.

LATTA R., 1971. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. Can. J. Bot., 49, 1253-1254.

MONNIER M. et C. LEDDET, 1980. Action du saccharose sur la résistance au gel des embryons immatures de capselle. Bull. Soc. Bot. Fr., 127, Actual. Bot., 71-77.

NAG K.K. et H.E. STREET, 1975. Freeze-preservation of cultured plant cells. II. the freezing and thawing phases. Physiol. Plant., 34, 261-265.

SAKAÏ A. et Y. SUGAWARA, 1973. Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. Plant and Cell Physiol., 14, 1201-1204.

SALA F., CELA R. et F. ROLLO, 1979. Freeze-preservation of rice cells. Physiol. Plant., 45, 170-176.

SIMINOVITCH D., 1979. Protoplasts surviving freezing to -196° C and osmotic dehydration in 5 molar salt solutions prepared from the bark of winter black locust trees. Plant Physiol., 63, 722-725.

SUGAWARA Y. et A. SAKAÏ, 1974. Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. Plant Physiol., 54, 722-724.

TAKEUCHI M., M. MATSUSHIMA et Y. SUGAWARA, 1980. Long-term freeze preservation of protoplasts of carrot and *Marchantia*. Cryoletters, 1, 519-524.

UEMURA M. et A. SAKAÏ, 1980. Survival of carnation (*Dianthus caryophillus L.*) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. Plant and Cell Physiol., 21, 85-94.

ULRICH J.M., B.J. FINKLE, P.H. MOORE et H. GINOZA, 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. Cryobiology, 16, 550-556.

WITHERS L.A., 1978. The freeze-preservation of synchronously dividing cultured cells of *Acer pseudoplatanus L.* Cryobiology, 15, 87-92

WITHERS L.A., 1979. Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota L.*). Plant Physiol., 63, 460-467.

WITHERS L.A. et P.J. KING, 1979. Proline : a novel cryoprotectant for the freeze-preservation of cultured cells of *Zea mays L.* Plant Physiol., 64, 675-678.

Journée ASF du 3 février 1982