

**Lucile Noël**

Mai-Juillet 1990

Rapport de stage

---

## **Essai de cryoconservation des spores et des gametophytes de deux laminariales :**

*Laminaria Digitata et Undaria Pinnatifida*

## REMERCIEMENTS

Pour commencer ce rapport, je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire d'algologie de l'IFREMER Nantes pour sa gentillesse ainsi que pour l'aide qu'elle m'a apportée tout au long de ce stage.

Je remercierai plus particulièrement Mme S. Arbault qui m'a fait découvrir le monde de la cryobiologie ainsi que Mr R. Perez pour ses conseils judicieux lors de mes expériences et de la rédaction de ce mémoire.

## S O M M A I R E

I- RESUME	
II- INTRODUCTION	1
III- GENERALITES	4
III.1. LA CRYOBIOLOGIE	4
III.1.1. Généralités sur la congélation	4
III.1.2. Les cellules et la congélation	6
III.1.3. Les différents modes de congélation	8
III.1.4. Les cryoprotecteurs	9
III.2. PRESENTATION DES ALGUES ETUDIEES	11
III.2.1. <i>Undaria pinnatifida</i>	11
III.2.1.1. Biologie de l'algue	11
III.2.1.2. La culture	13
III.2.2. <i>Laminaria digitata</i>	16
III.2.2.1. Biologie de l'algue	16
III.2.2.2. La culture	18
IV. MATERIEL ET METHODES	21
IV.1. LES SPORES	21
IV.1.1. Prélèvement	21
IV.1.2. Préparation des thalles	22
IV.1.3. Emission des spores	23
IV.1.4. Congélation	24
IV.1.5. Décongélation	26
IV.1.6. Post-traitement	27
IV.1.7. Mise en culture	27
IV.1.8. Suivi des cultures, évaluation	27
IV.2. LES GAMETOPHYTES	27
IV.2.1. Prélèvement	27
IV.2.2. Prétraitement	31
IV.2.3. Congélation	31
IV.2.4. Décongélation	32
IV.2.5. Post-traitement	32
IV.2.6. Mise en culture	33
IV.2.7. Evaluation de la survie des cultures	33
V. RESULTATS	34
V.1. LES SPORES	34
V.2. LES GAMETOPHYTES	36
VI. DISCUSSIONS	39
VI.1. LES SPORES	39
VI.2. LES GAMETOPHYTES	41
VII. CONCLUSION	44
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	



## I. RESUME

Depuis 1989, le laboratoire d'algoculture de l'I.F.R.E.MER de Nantes a mis au point la culture d'une Phéophycée (algue brune), *Undaria pinnatifida* sur les côtes françaises. Actuellement, il essaie d'adapter cette technique à la culture d'une autre Phéophycée, *Laminaria digitata*. La conservation à basse température de ces algues à deux stades du cycle biologique (la spore et le gamétophyte) complète la culture.

La technique initiée par Gilboa et Ben Amotz (1980) et modifiée par Renard et Arbault (1990) a été employée :

- imprégnation des échantillons par un cryoprotecteur, le glycérol à 20%
- refroidissement en deux étapes; la première de 15 ou 22°C à -40°C à raison de 5°C/min à l'aide d'un congélateur programmable ; la deuxième : immersion dans l'azote liquide à -196°C
- décongélation rapide dans un bain-marie à 32°C

Nous pouvons par cette technique conserver les spores de *Undaria pinnatifida* et celles de *Laminaria digitata* à condition que la concentration en soit élevée. La cryoconservation des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* s'est révélée réalisable pour des suspensions de gamétophytes en culture dont le volume ne dépasse pas 10 ml. Mais la méthode reste à modifier quant à la conservation des gamétophytes de *Laminaria digitata*.

## I. SUMMARY

Since 1989, the algaecultivation laboratory of I.F.R.E.MER in Nantes has perfected the cultivation on the french coasts of the Pheophyceae : *Undaria pinnatifida* . Now, this technique is adjusted for the cultivation of another Pheophyceae : *Laminaria digitata*. The preserving at low temperature of those algae at two stages of the biological cycle (spores and gamétophytes) improves the cultivation.

The technique begun by Gilboa and Ben Amotz (1978) and modified by Renard and Arbault (1990) is used :

- permeation of the samples by the glycerol at 20% as cryoprotector
- then freezing in a two-step procedure the first from 15 or 22°C to -40°C with a freezing rate of 5°C/min, done with a programming freezer; the second by plunging the samples in nitrogen liquid by -196°C
- then rapid thawing in a 32°C water-bath.

This technique allows a good conservation of spore of *U.pinnatifida* and of *L.digitata* if they are in a very high number. The cryoconservation of *U.pinnatifida* gametophytes is possible for cultures whose volume is no more than 10 ml. Meanwhile the method must be improved about the conservation of *L.digitata* gametophytes.



## INTRODUCTION

Lors de sa création, l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (I.F.R.E.MER) s'est doté d'un laboratoire d'algologie, chargé de développer sur les côtes françaises, la culture de macro-algues utilisées ou utilisables. Les travaux ont été focalisés sur deux espèces : *Undaria pinnatifida* (HARVEY) SURINGAR, algue à vocation alimentaire et *Laminaria digitata* (L.) LAMOUR, algue à vocation industrielle car riche en acide alginique.

*Undaria pinnatifida* est une algue brune de l'ordre des laminariales largement consommée en Extrême-Orient sous le nom de WAKAME (près de 500 000 T par an).

Introduite accidentellement dans l'étang de Thau en 1971 lors d'importation d'huîtres en provenance d'Hokkaido, l'espèce y a peu à peu conquis sa niche écologique.

La demande sans cesse croissante au Japon ainsi que la naissance d'un marché prometteur en Europe et aux Etats-Unis ont conduit dès 1984 les chercheurs de l'I.F.R.E.MER à transplanter *Undaria* de l'étang de Thau aux rivages bretons où les conditions hydro-climatiques sont plus propices à la culture intensive de cette algue. On la produit actuellement au large de l'île d'Ouessant.

*Laminaria digitata* est également une espèce de l'ordre des laminariales. Sa forte teneur en acide alginique en fait une matière première de choix pour l'industrie des alginates, mais les peuplements naturels du littoral français ne peuvent fournir que 65 000 T (fraîches) alors que les usines auraient besoin de plus de 90 000 T afin de pouvoir tourner à plein et accroître leur compétitivité sur le plan mondial. La culture intensive apparaît là aussi comme la meilleure solution et les travaux pour mettre au point la méthode sont en cours.

A la différence des Asiatiques qui font appel à un ensemencement par spores, la méthode préconisée par l'I.F.R.E.MER se base sur l'ensemencement au moyen de gamétophytes produits à volonté au laboratoire en conditions contrôlées. C'est le procédé du "Free-living" parce que les gamétophytes maintenus provisoirement stériles et libres (non fixés), se multiplient indéfiniment dans un milieu de culture adéquat jusqu'à rendre ce milieu totalement opaque. La semence ainsi obtenue peut être conservée en état pendant quelques mois; la capacité de gamétogénèse réapparaît lorsque l'on crée les conditions favorables à la fertilité si on a pris soin de renouveler le milieu nutritif tous les quinze jours.

Or, cette pratique comporte trois inconvénients :

- une contrainte liée aux changements de milieux :  
séparation des gamétophytes de la phase liquide, broyage
- un risque de contamination par des algues concurrentes  
comme les cyanophycées et les diatomées
- une diminution dans le temps de la capacité à produire  
des gamètes.

Pour éviter ces difficultés, les chercheurs ont pensé à faire appel à la cryoconservation. Arbault S. et P. Renard (1990) ont montré en travaillant sur des petites quantités que ce procédé était envisageable si l'on traitait préalablement la semence destinée à être congelée par une solution glycérolée, le glycérol agissant comme cryoprotecteur.

Le but de ce stage est une prolongation de ces travaux c'est à dire :

a) rechercher une méthode de congélation au niveau des spores, permettant de conserver sous un petit volume assez d'éléments reproducteurs pour lancer au moment voulu le mécanisme de "Free-living";

b) définir la quantité maximale de gamétophytes qu'il est possible de congeler en une fois selon la technique Arbault-Renard et d'identifier les améliorations permettant d'augmenter cette quantité.

Pour une meilleure compréhension de l'étude que j'ai menée, je rappellerai dans un premier chapitre les caractéristiques de la cryoconservation, les avantages qu'elle offre et les contraintes qu'elle entraîne au niveau cellulaire. Il m'a semblé indispensable de préciser la biologie des algues sur lesquelles se sont portés les essais. Je décrirai ensuite dans le deuxième chapitre, les méthodes employées. Le troisième chapitre sera consacré à l'exposé dans le détail des résultats.

Enfin, avant d'aborder la conclusion, une analyse soigneuse des résultats permettra de détecter des améliorations susceptible d'augmenter l'efficacité des techniques mises en oeuvre.



### III. GENERALITES

#### III.1. LA CRYOBIOLOGIE

La cryobiologie est l'étude de l'influence des basses températures sur les phénomènes biologiques. Elle a permis de déterminer que le froid freinait le métabolisme cellulaire jusqu'à le suspendre en dessous de  $-130^{\circ}\text{C}$ . On peut ainsi conserver intact les capacités du matériel vivant et les retrouver telles quelles après la décongélation si au cours du processus congélation-décongélation il n'y a pas eu dégradation de la structure cellulaire. La difficulté consiste à trouver la technique pour congeler en évitant cette dégradation : il est donc nécessaire pour chaque type de matériel biologique, de définir une méthode de congélation adaptée.

##### III.1.1. Généralités sur la congélation

Afin de mieux comprendre les phénomènes de la congélation nous présenterons des généralités sur la congélation de l'eau pure et des solutions aqueuses, principaux constituant des cellules.

##### \* L'eau pure (fig. 1) :

De l'eau pure refroidie progressivement reste liquide en dessous de  $0^{\circ}\text{C}$  : elle est en surfusion (état instable). La présence d'une impureté provoque la formation d'un cristal : cristallisation hétérogène. En l'absence d'impureté l'eau reste liquide jusqu'à  $-40^{\circ}\text{C}$ . La cristallisation est alors homogène. Ce phénomène étant une réaction exothermique (réarrangement des molécules d'eau en une plus grande réorganisation et donc d'une énergie plus faible) la température de l'eau remonte brusquement (pic de surfusion) et reste stable pendant la durée de la cristallisation même si la température de l'enceinte continue à diminuer (Angelier, 1982).

La cristallisation achevée, la température continue à descendre.

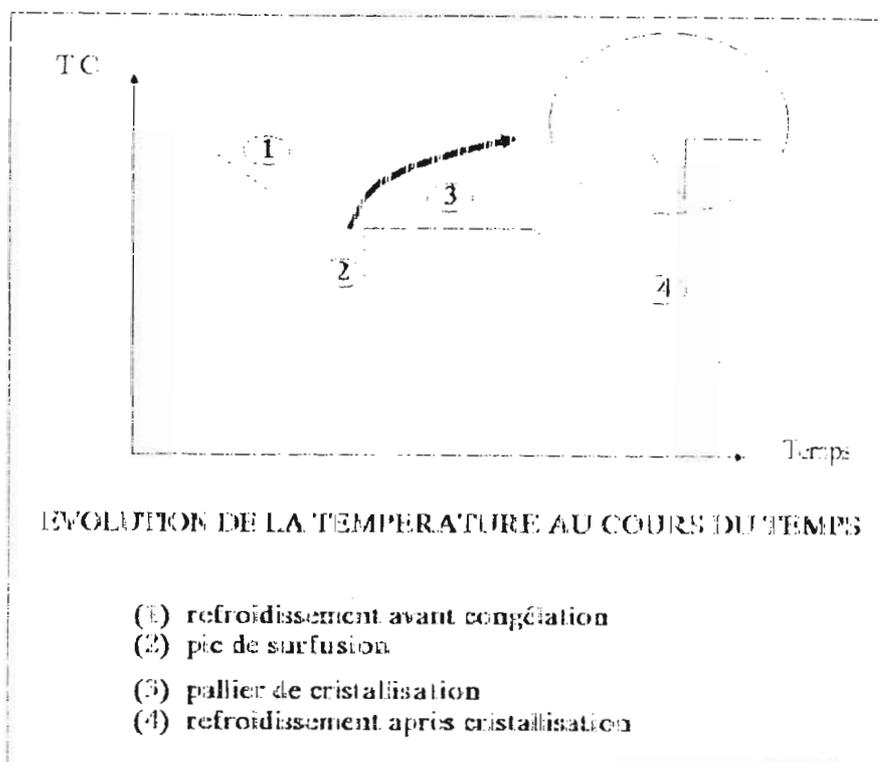


fig.1 Evolution de la température de l'eau pure au cours du refroidissement. La température décroît régulièrement jusqu'au pic de surfusion où elle remonte brusquement. La cristallisation alors amorcée se poursuit pendant le temps que dure le palier de cristallisation, puis la température reprend sa décroissance régulière.

\* Les solutions :

Lors du refroidissement d'une solution, la portion d'eau pure se cristallise en glace tandis que les sels se concentrent dans l'eau restant non congelée. Celle-ci ne se solidifie que lorsque la première est gelée.

Jusqu'à une certaine température, seule l'eau gèle. Cette température est appelée le point EUTECTIQUE (Angelier, 1982). Le

mélange se comporte comme un corps pur : la température reste constante, inférieure au point de fusion de chacun des constituants lors de la solidification.

Lors de la congélation d'un mélange, le pallier de cristallisation n'est pas horizontal mais en légère pente.

### III.1.2. Les cellules et la congélation

#### \* La congélation :

La congélation d'une suspension cellulaire provoque la surfusion des milieux intra et extra-cellulaires.

Les milieux cellulaires se comportent différemment selon la vitesse de congélation.

- *Congélation rapide* : Des cristaux se forment dans la cellule car l'eau ne peut sortir en quantité suffisante (Mazur 1966,1977; Leibo, 1977). La congélation brusque est due à une augmentation de l'énergie interne (Ehram, Larese, 1982). Cette glace provoque la mort des cellules (Gazeau, Dereuddre, 1986).

- *Congélation lente* : (1-5°C/min) Le milieu extra-cellulaire se congèle en premier, diminuant la fraction liquide et concentrant les solutés. Le milieu intra-cellulaire sortira pour équilibrer les concentrations, augmentant la concentration et diminuant le volume cellulaire. La contraction cellulaire ainsi provoquée se poursuit jusqu'à un volume minimal critique entraînant la formation d'un gradient d'électrolytes à travers la membrane. D'après Lovelock (1953), la concentration des solutés atteignant un niveau critique serait dommageable pour la cellule; c'est l'effet solution. Meryman (1974) et Mazur (1969) ont émis la théorie du volume cellulaire minimal pour expliquer la contraction osmotique cellulaire excessive. Pour Steponkus (1984), la membrane plasmique se détruirait lors de la contraction empêchant la cellule de revenir à son volume initial.

Les cellules sont donc soumises aux stress suivants  
(Ehrsam, Larese, 1982) :

- concentration des sels intra et extra-cellulaire
- élimination d'eau
- contraction
- abaissement de la température

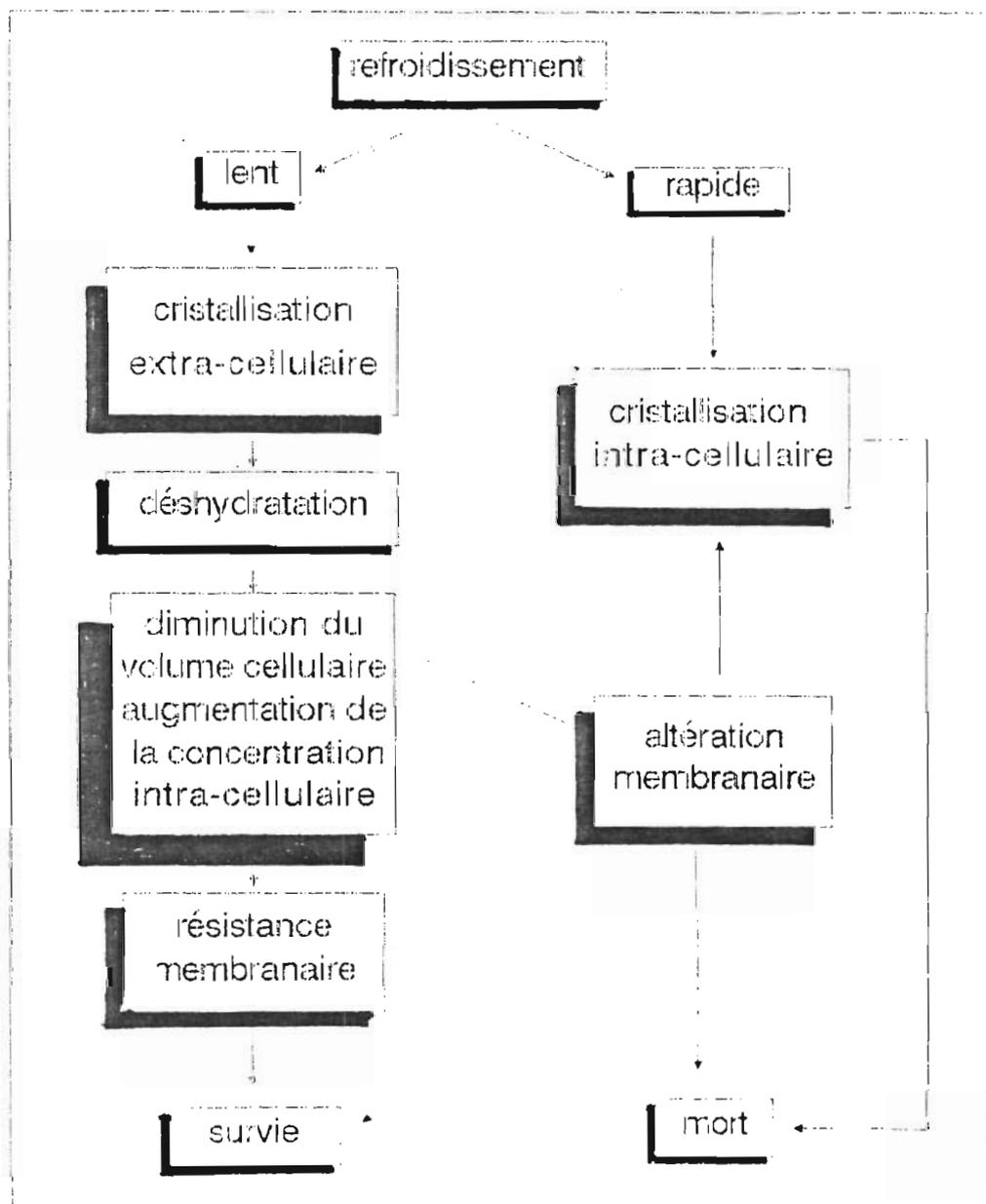


fig.2 Schéma indiquant les divers processus impliqués dans la congélation des cellules végétales, en fonction des vitesses de refroidissement

\* La décongélation :

La vitesse de décongélation est fonction du type de congélation :

- Lors d'une décongélation lente, les petit cristaux fondent totalement en premier. L'eau provenant de cette fonte se recristallise autour des gros cristaux non encore fondus. Ceux-ci augmentent de volume et lésent les cellules. De ce fait en règle générale, on préfère la décongélation rapide à la décongélation lente.
  
- *Décongélation lente* permettant une réhydratation cellulaire progressive (pas de chocs osmotiques dus à une entrée massive d'eau dans la cellule) si la congélation est lente.

\* Congélation dans l'azote liquide :

D'après Dagget (1987), la viabilité des cellules congelées augmente d'autant plus que la température de stockage est basse. En général, on congèle en dessous de  $-100^{\circ}\text{C}$ . La stabilité des préparations est garantie si la température est inférieure à  $-130^{\circ}\text{C}$ . La totalité de l'eau est alors congelée, ce qui inhibe toute réaction chimique. L'azote liquide, qui est à  $-196^{\circ}\text{C}$ , est donc un moyen de protection sûr contre les altérations engendrées par de telles réactions. Aussi, les cellules peuvent y être conservées indéfiniment.

### III.1.3. Les différents modes de congélation

\* Congélation directe :

Les échantillons sont placés directement à la température de congélation :

- $80^{\circ}\text{C}$  carboglace + alcool
- $196^{\circ}\text{C}$  azote liquide

\* Congélation contrôlée :

- *Refroidissement lent* (0,3 à 1°C par min.) et *réchauffement lent* (4 à 25°C par min), technique utilisée par Whittingham et al. (1972) pour congeler des embryons de souris.
- *Refroidissement lent* (0,3 - 0,5°C / min) jusqu'à une température comprise entre -30 et -40°C puis *refroidissement rapide* (environ 100°C / min) ou plongée dans l'azote liquide et *décongélation rapide* (250 - 500°C / min) (Whittingham et al., 1979; Wood et Farrant, 1980).

III.1.4. Les cryoprotecteurs :

On appelle cryoprotecteurs des substances qui permettent de protéger les cellules contre les effets nocifs des basses températures. Ce sont des alcools, des glucides ou des acides aminés.

Leurs propriétés sont liées à leur capacité à former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, les protéines et les groupements hydrophiles des phospholipides.

Ils augmentent la viscosité des milieux cellulaires (Meryman et Williams, 1985) et abaissent la température de congélation (Mac Kenzie, 1977). Ils réduisent la quantité de glace formée à une température donnée et diminuent la vitesse de croissance des cristaux (Boutron et Kaufman, 1978 et 1979).

Selon leur masse moléculaire on distingue deux types de cryoprotecteurs :

- Les cryoprotecteurs pénétrants, de faible masse moléculaire (moins de 400). Ils se substituent à l'eau de la cellule, diminuent le gradient osmotique entre le milieu intra et extra-cellulaire, réduisent les pertes

d'eau au moment de la cristallisation et retardent ou empêchent la formation des cristaux.

- Les cryoprotecteurs non pénétrants, de masse moléculaire supérieure à 1 000, permettent la déshydratation cellulaire et protègent le plasmalème par association aux groupement hydrophiles des phospholipides et des protéines de surface.

Tous les cryoprotecteurs agissent sur les systèmes membranaires, mais les effets sont encore mal connus .

Le choix d'un cryoprotecteur est lié à son innocuité vis à vis des cellules à cryoconserver. Il est donc nécessaire de tester sa toxicité vis à vis de ces cellules.

Afin de prévenir un éventuel choc osmotique, l'ajout du cryoprotecteur doit se faire de manière progressive, soit au goutte à goutte, soit en quantités régulières .

On opère de même pour retirer le cryoprotecteur de la préparation décongelée.

## III.2. PRESENTATION DES ALGUES ETUDIEES

III.2.1 *Undaria pinnatifida*

## III.2.1.1. Biologie de l'algue

\* Classification

*Undaria pinnatifida* est  
une algue appartenant à :

Embt. : Phaeophycophytae  
Classe : Phaeophyceae  
sscl. : Phaeosporae  
Ordre : Laminariales  
famille : Alariaceae  
genre : *Undaria*  
espèce : *U. pinnatifida*

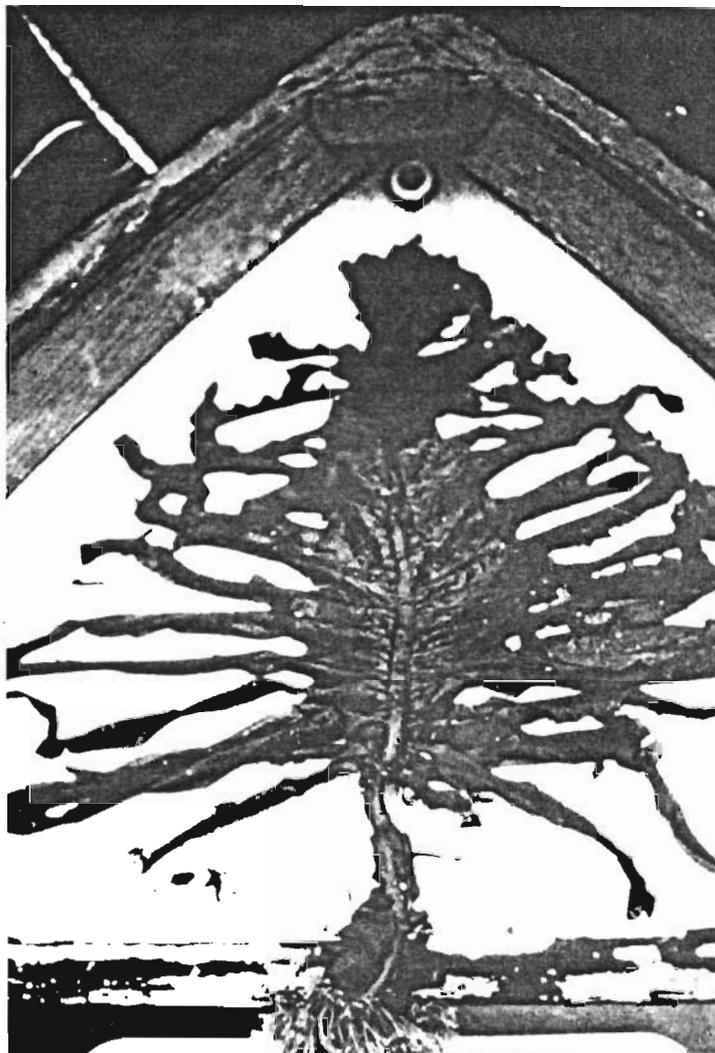


fig.3 Photo d'*U. pinnatifida*, on distingue les trois éléments : lame découpée, le stipe portant les bases fertiles et le crampon.

\* Description :

L'algue se compose de trois éléments : un crampon formé de nombreux haptères qui fixent la plante au substrat, une partie étroite et aplatie : le stipe, une lame très échancrée transversalement et divisée en deux par une nervure centrale prolongeant le stipe (fig.3).

A la base du stipe, se développent les zones fertiles qui se gondolent au fur et à mesure de leur croissance en prenant une forme spiralée.

L'algue a une longueur totale moyenne de 73 à 80 cm :

- 17 à 20 cm pour le stipe
- 40 à 50 cm pour la largeur de la lame
- 0,7 cm pour la largeur du stipe avec un poids total de 102g.

Ces mesures ont été obtenues en mars sur les algues de l'étang de Thau. Elle sont identiques à celles de Corée et du Japon. Par contre, en Bretagne, les frondes peuvent aller jusqu'à 320 cm (Perez et al., 1981).

\* cycle biologique (fig.4):

Vers la mi-mai on aperçoit des taches sombres sur les zones fertiles qui ont commencé leur développement dès le mois de février. Ces taches sombres ou sores proviennent de l'accumulation de sacs ou sporocystes renfermant les spores, grains de 5 à 6  $\mu$  de diamètre. Les spores biflagellées sont émises pendant un quart d'heure environ lorsque les sporocystes sont mûrs. Elles nagent pendant quelques minutes et se fixent après la perte de leurs flagelles. Cette fixation est nécessaire pour la germination. La spore émet un prolongement, le tube de germination dans lequel migre le matériel cellulaire et où se fait la première division.

La spore mâle germe en un filament très ramifié constitué de petites cellules : le gamétophyte mâle. La spore femelle donne un gamétophyte femelle plus court dont les cellules sont plus grosses. A maturité, le gamétophyte mâle donne des gamètes mâles biflagellés qui vont féconder le gamète femelle. Ce gamète femelle rond et immobile est produit par les gamétocystes femelles situés à l'extrémité des gamétophytes. Le zygote issu de la fécondation se développe en une plantule qui sera visible à l'oeil nu au mois de novembre.

*Undaria* est une algue annuelle qui se désagrège complètement après l'émission des spores en mars ou juin.

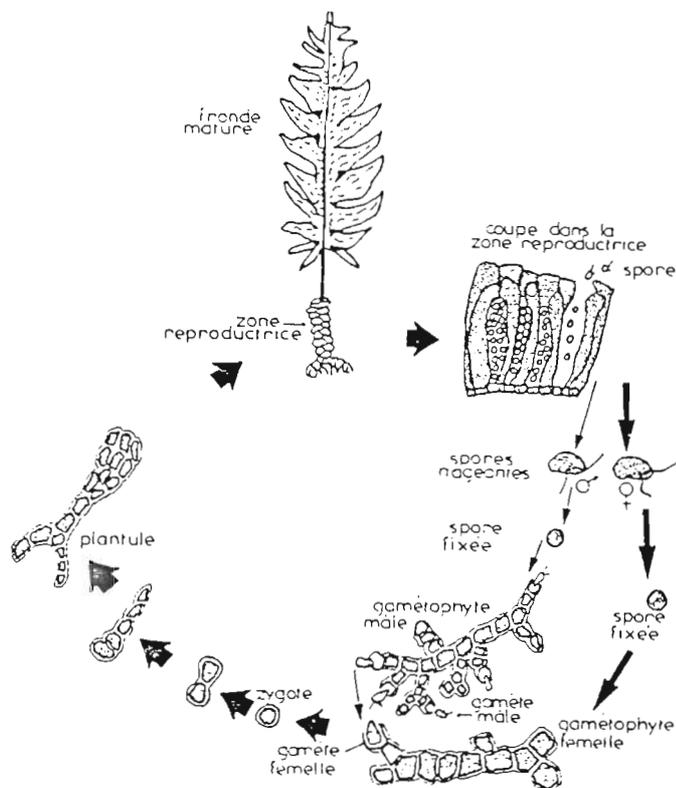


Fig.4 Schéma retraçant le cycle de reproduction d'*Undaria pinnatifida* : la formation des spores commence début mai, l'émission a lieu vers la fin mai: les jeunes plants apparaissent durant octobre en Extrême-Orient, en décembre dans l'étang de Thau.

#### III.2.1.2. La culture

La technique de culture d'*Undaria pinnatifida* mise au point par Perez et al. (1989) se déroule en trois étapes dont une partie au laboratoire avant le passage en mer.

a) *La production de la semence* : cette opération a lieu en laboratoire. Elle comprend :

\* Obtention des spores :

Des bases fertiles sélectionnées et nettoyées sont soumises à une déshydratation partielle à l'air et à l'obscurité pendant douze à vingt quatre heures. L'immersion dans l'eau provoque l'éclatement des sacs contenant les spores et la libération de celles-ci.

\* Ensemencement des ballons :

Pendant le temps que dure l'émission des spores, on prépare le milieu de culture dans des ballons maintenus à 15°C. On y verse 100 ml de solution contenant les spores pour 2 l de milieu selon la méthode du "free-living" (cf annexes).

\* Multiplication des gamétophytes :

Lorsque les gamétophytes provenant de la germination des spores sont composés de sept à huit cellules, on provoque leur multiplication en portant progressivement la température à 22°C à raison de 0,5°C par jour (pour éviter un éventuel choc thermique) sous un éclairage de 40  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et une photopériode de 24h (l'éclairage est obtenu par des tubes fluorescent type Philips "Lumière du jour"). Dans ces conditions, la gamétogenèse est inhibée et la croissance fortement accélérée. Les gamétophytes se multiplient et les ballons s'opacifient au fil des jours (30 jours pour un ballon de 6L). A ce stade, la multiplication végétative est arrêtée par le manque de lumière. Sous ces conditions, on peut conserver le stock de gamétophytes dans cet état pendant plusieurs mois et même une année si on change le milieu nutritif tous les quinze jours.

\* La fécondation :

La gamétogénèse et la fécondation sont obtenues en descendant la température des ballons de 22°C à 15°C à raison de 0,5 en 0,5°C par jour et corrélativement à une modification de la photopériode qui passe de 14/10 puis à 12/12 une semaine après.

b) *Ensemencement des cadres :*

La solution de gamétophytes est pulvérisée sur un cadre en altuglas portant 50 à 60 m de cordelette enroulée en spirale.

Après une attente de dix minutes environ (temps nécessaire pour que les gouttelettes soient absorbées par les cordelettes), les cadres sont plongés lentement dans un bassin d'eau de mer stérilisée. La température du bain est maintenue à 15-17°C, la photopériode à 12/12 et l'éclairement à  $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Les cadres y restent jusqu'à ce que les plantules atteignent 3 mm.

c) *Mise en mer :*

Puis, les cordelettes déroulées du collecteur sont enroulées en mer autour d'un cordage de soutien tendu à 1m sous la surface.

En Bretagne (île d'Ouessant et île de Sein), cette technique permet deux récoltes dans l'année.

### III.2.2. *Laminaria digitata* :

#### III.2.2.1. Biologie de l'algue :

##### \* Classification :

*Laminaria digitata* une algue brune voisine du point de vue systématique d'*Undaria pinnatifida*. Elle appartient en effet à :

Embt. : Phaeophycophytae  
 Classe : Phaeophyceae  
 sscl. : Phaeosporae  
 Ordre : Laminariales  
 famille : Laminariaceae  
 genre : *Laminaria*  
 espèce : *L. digitata*



fig.5 *L. digitata* , notons les trois parties du thalle : la lame digitée, le stipe et le crampon fixant l'algue au substrat.

##### \* Description :

Comme *U. pinnatifida*, *L. digitata* possède crampons, stipe et lame. Mais la lame, est découpée longitudinalement dans sa partie supérieure. Ainsi divisée, elle donne l'impression de

former des doigts d'où le nom spécifique (fig.5). Il n'y a pas de nervure centrale.

\* Cycle biologique (fig.6):

Le cycle est identique à celui d'*Undaria* mais les zones fertiles sont portées par la lame : ce sont des taches sombres appelées sores qui apparaissent d'avril à octobre. En coupe transversale, on peut constater que comme chez *Undaria* les sores sont constituées de sacs, les sporocystes, renfermant les spores (3 à 4  $\mu$  de diamètre) qui seront émises sous forme de zoïdes biflagellés. Celles-ci nagent quelques minutes puis se fixent en perdant leurs flagelles.

Les spores germent en gamétophytes qui sont soit mâle soit femelle (selon la sexualité de la spore dont elles proviennent). Le gamétophyte mâle produit et libère les gamètes mâles qui nagent vers l'oosphère (rond et immobile) et le féconde (oogamie). Le zygote (2n) ainsi formé germe et se divise pour donner une plantule.

*Laminaria* vit de quatre à cinq ans (Perez, 1971). Elle possède une zone de croissance méristématique située entre la base de la lame et l'extrémité supérieure du stipe (zone stipofrondale). La multiplication cellulaire de cette partie repousse les tissus les plus anciens vers l'extrémité de la lame.

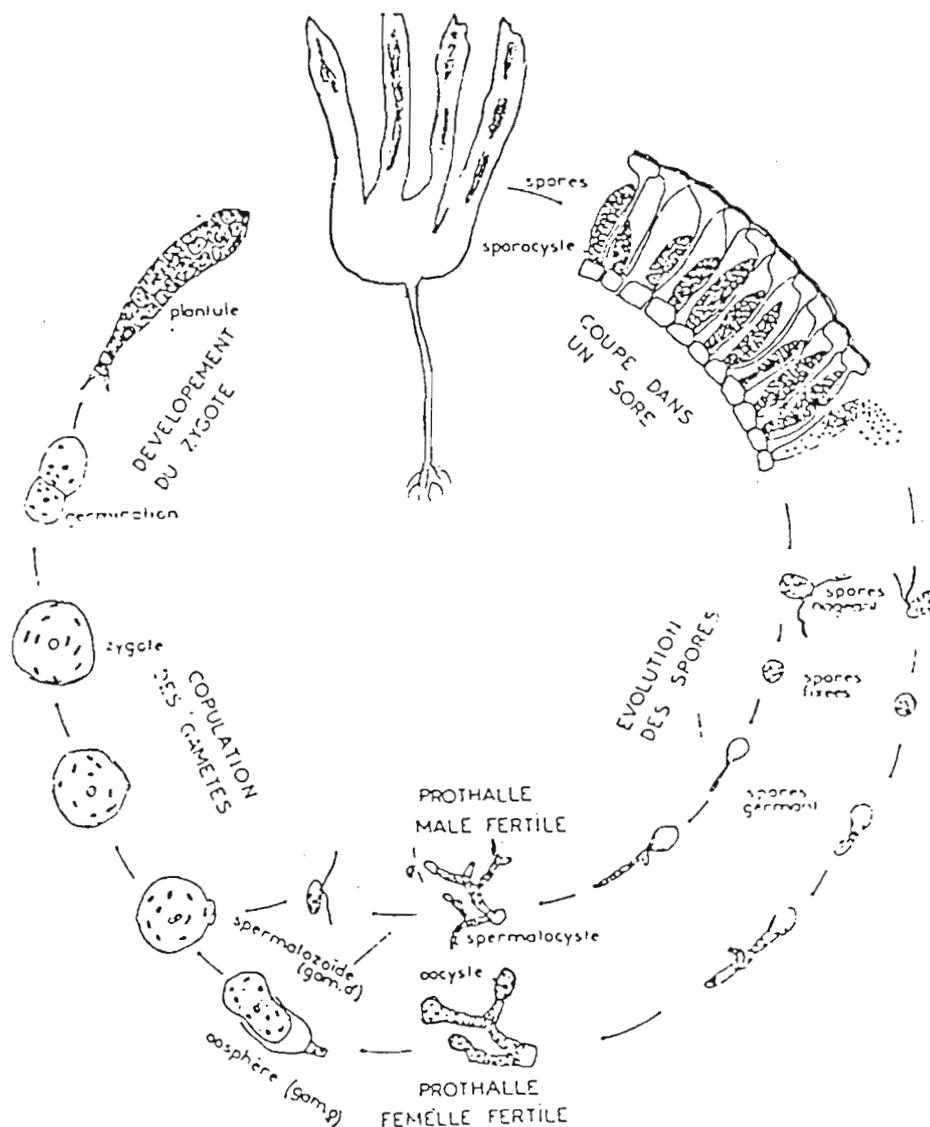


fig. 6 : le cycle de reproduction chez *Laminaria digitata*

#### III.2.2.2. La culture :

La récolte de *L. digitata* a chuté : de 64 000 T en 1987 à 55 000 T en 1988. L'industrie qui utilise cette laminaire comme matière première pour en extraire un colloïde, l'acide alginique, voit son activité hypothéquée par l'insuffisance de l'approvisionnement. La meilleure solution pour remédier à ce problème consiste à réaliser la culture de cette algue dont l'acide alginique est de qualité supérieure à celui extrait de *L. japonica* et de *Macrocystis pyrifera*.

Ce projet a été confié à l'IFREMER en collaboration avec le C.E.V.A.\* et la SOBALG\*.

Le mode de la culture s'inspire de celui utilisé pour *U. pinnatifida* avec ensemencement par "Free-living". La mise au point de la production de semences a été difficile pour deux raisons :

- la lenteur de l'émission des spores
- la présence d'algues parasites qu'il a fallu apprendre à neutraliser.

Le point critique pour les gamétophytes est de 18,5°C et de  $40\mu\text{E.m.}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Dans les semaines à venir des essais de pulvérisation sur cadres vont être faits.

Etant donné la biologie de l'algue et ses possibilités de croissance, on pense pouvoir prélever deux années de suite sur la même plante. En effet, au lieu d'arracher les thalles comme cela se fait actuellement pour les algues sauvages, les goémoniers couperaient les lames en laissant intacte la zone méristématique stipofrondale. On sait que, dans ces conditions, la plante est capable de régénérer une nouvelle lame pour l'année suivante.

Contrairement à *U. pinnatifida* pour laquelle l'émission est massive et rapide (1/4 h), celle de *L. digitata* se prolonge dans le temps. Les spores ne sont libérées que peu à peu. Or, l'algue exude, au bout de quelques minutes après avoir été plongé dans de l'eau, des mucilages tels que alginates et laminarine qui sont nocif pour les spores.

---

\* C.E.V.A. : Centre d'Etude et de Valorisation des Algues,  
Pleubian (Côtes d'Armor)

\* SOBLAG : Société Bretonne des Algues, Landerneau (Finistère)

Notre but a été de chercher comment on pourrait conserver intacts par cryotraitement à  $-196^{\circ}\text{C}$  les stocks de spores et de gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* et *Laminaria digitata* de façon à disposer à volonté d'une semence sous forme de spores ou de gamétophytes à capacité inaltérable.



#### IV. MATERIEL ET METHODES :

##### IV.1. LES SPORES :

##### IV.1.1. Prélèvement :

###### \* *Undaria* :

Les échantillons utilisés ont été prélevés à l'île d'Ouessant sur un des cordages de soutien supportant la culture.

Les congélations de spores ont été faites à deux périodes (Tabl. 1).

éch.	DATE DE PRELEVEMENT	DATE DE CONGELATION
SU1	17 MAI	18 MAI
SU2	4 JUIN	5 JUIN

Tabl.1 dates d'échantillonnage et de congélation des spores d'*Undaria*.

###### \* *Laminaria* :

Les échantillons proviennent de deux endroits différents : de la grève de Tréopan à Portsall (Finistère) et du lieu-dit "la côte sauvage" sur la presqu'île de Quiberon (Tabl. 2).

*Laminaria* pousse au niveau de l'étage infra-littoral; bien qu'elle émerge par des marées de fort coefficient (90 et plus selon la côte), les prélèvements ont été réalisés en plongée. Nous n'avons choisi que les frondes fertiles, c'est-à-dire portant des taches sombres.

éch.	date	lieu	observations
SL1	10 MAI	QUIBERON	congélation des spores sur filtre à -196°C
SL2	6 JUIN	PORTSALL	trop peu de spores émises donc pas de congélation
SL3	14 JUIN	PORTSALL	congélation des spores à -196°C

Tabl.2 Echantillonnage des lames de *Laminaria digitata*.

#### IV.1.2. Préparation des thalles :

Les parties fertiles sont séparées du reste de l'algue et coupées en fragments de 3 à 4 centimètres de côté à l'aide d'un scalpel à lame stérile.

Les fragments sont ensuite :

- \* brossés et lavés dans de l'eau de mer préalablement stérilisée à l'autoclave
- \* passés 2 min dans un bain d'eau de mer javellisée (à 0,5%)
- \* rincés dans deux bains successifs d'eau de mer stérile.

Ces différentes opérations ont pour but d'éliminer les épiphytes accrochés sur les algues.

Enfin, à l'aide d'un papier buvard, on enlève l'eau de surface.

Les bases sont enroulées dans un torchon humide et placées à l'obscurité :

\* dans une glacière entre 10 et 15°C pour *Laminaria*

\* à la température ambiante, à condition qu'elle ne dépasse pas 20°C, pour *Undaria*.

Cette étape permettant une déshydratation partielle dure une nuit.

#### IV.1.3. Emission des spores :

L'émission des spores est provoquée en plongeant les parties fertiles partiellement déshydratées dans de l'eau de mer stérile à 10°C pour *Laminaria* et de 18 à 20°C pour *Undaria*.

Afin d'être sûr d'obtenir une émission en quantité suffisante, il est nécessaire de choisir les fragments ayant laissé sur le torchon des marques de couleur marron, c'est-à-dire ayant déjà commencé leur émission.

Au bout d'environ un quart d'heure, on observe sous le microscope le grouillement de zoïdes : les spores nagent en tous sens.

Pour la réussite de l'émission des spores de *L. digitata*, il faut prendre les précautions suivantes :

. la température de 10°C est à respecter impérativement;

\* quelques minutes après le début de l'émission (10 min environ), l'eau contenant les fragments de lame est filtrée (sur un filtre de 30 à 40 $\mu$ ) pour éliminer les substances mucilagineuses exsudées par l'algue;

\* les fragments du thalle sont essuyés pour la même raison et remis à tremper dans la même eau.

A la fin de l'émission, les fragments sont éliminés et l'eau est filtrée sur une toile à bluter successivement de 40, 30 et 10  $\mu$  de maille.

Pour chaque échantillon, nous prélevons dans la suspension de spores ainsi obtenue 2 ml que nous mettons en culture en boîte de Pétri : ce sont les témoins.

#### IV.1.4. Congélation :

La méthode de congélation utilisée est celle mise au point par Renard P. et S. Arbault (1990) pour la congélation des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*, méthode issue de celle employée pour la congélation de microalgues par Gilboa et Ben Amotz (1978).

La suspension de spores est répartie en tubes de 50 ml en polypropylène (Poly labo, Strasbourg) et centrifugée 10 min à 1000 RPM (rotation par minutes) à 15°C. Une fois le surnageant pipeté, les culots sont transférés en cryotubes en polypropylène de 2 ml (Air Liquide, Sassenage). Une nouvelle centrifugation permet de retirer le surplus d'eau de mer.

Les spores sont imprégnées, à 15°C, par une solution d'eau de mer stérile glycérolée à 20%. Le mélange est réalisé en quatre étapes : 5, 10, 15, 20% (10 min pour chaque bain et centrifugation pour éliminer le surnageant).

Les échantillons sont ensuite refroidis, à raison de 5°C/min, dans l'enceinte d'un congélateur programmable (Minicool LC40, Air Liquide, Sassenage) jusqu'à une température de -40°C.

Puis les tubes sont immergés directement, un quart d'heure à une demi heure, dans un récipient rempli d'azote liquide (-196°C) avant de rejoindre la bouteille de stockage contenant elle aussi de l'azote liquide.

Nous avons mené plusieurs expériences :

expérience 1 : congélation selon la méthode exposée ci dessus : on enlève le maximum de solution glycérolée à 20% après centrifugation (1000 RPM, pendant 10 min à 15°C).

expérience 2 : les spores ne sont pas concentrées par centrifugation mais par filtration; l'eau de mer contenant les spores est filtrée sur un filtre de 5 $\mu$  et de 25mm de diamètre en polycarbonate (type nuclépore, Serlabo). Le filtre est ensuite roulé sur lui-même et introduit dans un cryotube de 2ml. L'imprégnation du cryoprotecteur se fait selon la méthode précédente mais sans centrifugation. Avant de congeler, le glycérol est retiré par pipetage.

expérience 3 : piégeage des spores par de l'acide alginique

a) piégeage des spores avant l'adjonction du glycérol : à la suspension de spores, on ajoute de l'acide alginique (SOBALG) à raison de 0,3g/l. L'acide alginique forme un précipité sur lequel se fixent les spores. Après une centrifugation pour enlever l'eau de mer, les spores contenue dans le culot d'acide alginique sont imprégnées de glycérol par bains successifs.

b) piégeage après l'imprégnation : le glycérol est ajouté en quatre fois dans la suspension de spores, à 15°C, agitée doucement à l'aide d'un agitateur magnétique placé dans une armoire de culture à 15°C. On ajoute à chaque étape, une quantité de glycérol pur, de manière à augmenter la concentration de 5%, en attendant 10 min entre chaque fois. A la fin de l'imprégnation, l'acide alginique est ajouté (0,3g/l). L'excédent de la solution est enlevé après centrifugation.

expérience 4 : piégeage des spores avec du phosphate de calcium (méthode du Free living -annexes-)

- a) adjonction du milieu de Miquel B avant le glycérol
- b) adjonction du milieu de Miquel B après le glycérol

Le procédé est le même que pour l'expérience 3, mais on ajoute du milieu "Miquel B" (1 ml/l) à la place de l'acide

alginique. Le phosphate de calcium contenu dans le "Miquel B" précipite en milieu basique (eau de mer) en un nuage blanchâtre qui prend les spores dans ses mailles.

Pour l'échantillon SU2, nous avons fait des témoins à chaque concentration de glycérol de façon à déceler s'il y a une toxicité due au glycérol : à chaque bain de l'expérience 1, nous avons prélevé 2 ml de suspension que nous avons mis en boîte de Pétri sans ajouter du milieu de culture pour ne pas diminuer la concentration du glycérol.

Les différentes opérations sont résumées dans le tableau 3.

	SU1	SU2	SL1	SL3
exp. n°1	*	G		*
exp. n°2			*	
exp. n°3a		A		
exp. n°3b		GA		
exp. n°4a		B		
exp. n°4b		GB		

Tabl. 3 Correspondance entre les échantillons et les expériences (G : glycérol seul; A : acide alginique avant le glycérol; GA : glycérol avant l'acide alginique; B : milieu de Miquel B avant le glycérol; GB : glycérol avant le milieu de Miquel B).

#### IV.1.5. Décongélation :

Au sortir de l'azote liquide, les échantillons sont décongelés rapidement au bain-marie à 32°C jusqu'à disparition du dernier cristal.

## IV.1.6. Post-traitement :

Après la décongélation, le cryoprotecteur est retiré progressivement par des bains décroissants de 5% d'une durée de 10 min. Deux bains de rinçage à l'eau de mer les suivent. Tous les traitements sont réalisés à 15°C.

## IV.1.7. Mise en culture :

Après élimination de l'eau de mer, le culot de spores est repris par du milieu de culture à 15°C et transféré en boîte de Pétri stériles. Ces dernières sont placées dans une armoire de culture à 15°C sous un éclairage continu de  $40\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

## IV.1.8. Suivi des cultures, évaluation :

L'évaluation de la culture se fait par observation microscopique et prise de photos tous les deux jours après la décongélation. La viabilité des spores est mesurée par leur capacité à germer.

## IV.2. LES GAMETOPHYTES :

## IV.2.1. Prélèvement :

Nous avons congelé les volumes de suspension de gamétophytes suivants : 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70 ml à 22°C pour *Undaria* et 1 l à 18,5°C et 2 l à 15°C pour *Laminaria*.

Les gamétophytes proviennent des cultures en ballon. Le prélèvement se réalise de la façon suivante :

- par pipetage dans les ballons pour des volumes inférieurs ou égaux à 10 ml. Afin d'avoir une suspension représentative de l'ensemble du ballon, le bullage n'est pas arrêté lors du pipetage ;

- à l'aide d'une éprouvette graduée stérile après l'homogénéisation (agitation manuelle du ballon) de la suspension de gamétopytes, pour les volumes supérieurs à 10 ml.

Toutes les centrifugations effectuées sur les gamétophytes se font à la même température que celle de la culture, à 500 RPM et pendant 2 min.

Nous disposons de tubes à centrifugation de trois volumes différents : 2, 5 et 50 ml.

\* La suspension de 2 ml est directement placée dans un cryotube de 2 ml.

\* Pour constituer les culots de gamétophytes correspondant à des suspension de 4, 6, et 8 ml, on regroupe respectivement 2, 3, et 4 culots obtenus par centrifugation de 2 ml de suspension.

Pour les volumes de 10 à 70 ml, la centrifugation s'effectue en tube de 50 ml. Les culots sont ensuite regroupés en tubes de 2 ou 5 ml afin d'obtenir un culot final correspondant à une suspension de 10 à 70 ml.

Le tableau 4 regroupe pour une meilleure lecture les différents volumes prélevés.

ech.	volume de la suspension ml	addition des culots correspondant au vol. des suspensions	volume du tube de centrifugation de la suspension (ml)	volume du cryotube (ml)
U1	2	/	/	2
U2	2	/	/	2
U3	4	2+2	2	2
U4	6	2+2+2	2	2
U5	8	/	50	2
U6	10	/	50	2
U7	20	/	50	2
U8	20	/	50	2
U9	30	/	50	2
U10	30	/	50	2
U11	30	/	50	5
U12	40	/	50	5
U13	45	/	50	5
U14	50	20 + 30	50	5
U15	60	30 + 30	50	5
U16	70	30 + 40	50	5

Tabl.4 Ce tableau rappelle les différents volumes prélevés ainsi que la manière dont les culots ont été préparés.

\* Enfin, pour 180 ml nous avons réparti la suspension en quatre tubes de 50 ml (45 ml par tubes). Les culots de ces tubes ont été rassemblés en un seul tube et centrifugé à nouveau. Nous avons pipeté le surnageant de manière à obtenir un volume restant de 15 ml (culot + surnageant). Les gamétophytes remis en suspension ont été transvasés en cryotubes : - 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml et 2 ml en tubes de contenance de 2 ml

- 2,5 ml, 3 ml, et 3,5 ml en tubes de contenance de 5 ml (Tabl.5).

ech.	volume de la suspension (ml)	volume du cryotube (ml)
U17	0,5	2
U18	1	2
U19	1,5	2
U20	2	2
U21	2,5	5
U22	3	5
U23	3,5	5

Tabl.5 Volumes prélevés dans la suspension concentrée des gamétophytes d'*U. pinnatifida* et volume du cryotube.

Pour la suspension de 1 l des gamétophytes de *Laminaria digitata*, nous procédons de la même manière que pour les échantillons de U17 à U23; mais nous mettons un volume de 4 ml de suspension concentrée dans un cryotube de 5 ml. Nous remplissons 6 tubes dont deux avec un culot plus faible (environ 0,5 et 1 ml) par rapport aux autres tubes (2,5 à 3 ml). Les échantillons sont dénommés L1 (culots de 3ml); L2 (1ml) et L3 (0,5 ml).

Le ballon de 6l est filtré sur une toile à bluter de 40 $\mu$ . Les gamétophytes sont récoltés à l'aide d'une spatule métallique et transférés dans un b cher stérile ( chantillon L4).

Lors de chaque série de congélation, nous isolons une suspension (2ml environ) de gamétophytes du ballon de culture dans une boite de Pétri que nous laissons dans l'armoire à culture. Cette suspension nous servira par la suite de témoins non congelé.

#### IV.2.2. Prétraitement :

L'imprégnation du glycérol se fait de la même manière que pour les spores, pour les échantillons U1 à U16, ainsi que de L1 à L3 : élimination du milieu de culture en excédent après centrifugation, bains dans une solution d'eau de mer glycérolée dont la concentration augmente de 5% en 5% jusqu'à 20% (dix minutes chacun).

Le procédé est différent pour les échantillons U7, U9, et U13 : le culot du tube de centrifugation est repris par une solution de glycérol à 5%. Puis l'échantillon transféré dans une fiole d'Herlenmeyer stérile est agité doucement (agitateur magnétique) à 15°C pendant 10 min. Une nouvelle centrifugation permet d'enlever la solution glycérolée à 5% et de la remplacer par une autre à 10%. L'imprégnation est poursuivie jusqu'à une concentration de 20% en augmentant la concentration de 5% en 5%.

A l'échantillon L4, on ajoute 200 ml d'une solution glycérolée à 5%. Le bécher est ensuite placé sur un agitateur magnétique à 15°C. Puis, toutes les dix minutes, on ajoute un volume de glycérol pur de façon à augmenter la concentration de 5% et ce jusqu'à 20%. Lorsque cette concentration est atteinte, la suspension de gamétophytes est filtrée et les gamétophytes sont répartis, à l'aide d'une spatule métallique, en tubes cryobiologiques de 5ml, à raison de 4 ml de gamétophytes par tubes.

#### IV.3. La congélation :

Nous utilisons la même méthode que celle employée pour la congélation des spores :

- \* congélation de 15 ou 22°C (selon la température de culture des gamétophytes prélevés) à -40°C à l'aide d'un congélateur programmable avec une descente de température de 5°C/min

- \* passage des tubes dans un récipient de polystyrène contenant de l'azote liquide(-196°C) pendant 15 à 30 min.
- \* stockage en bouteille spéciale remplie d'azote liquide (les cryotubes baignent dans l'azote).

Nous pensons qu'un passage dans le récipient en polystyrène est préférable pour les raisons suivantes : nous sommes sûrs que les échantillons sont rapidement refroidis à -196°C. Le temps mis pour sortir les baguettes portant les cryotubes du minicool et les plonger dans le vase en polystyrène est de quelques secondes donc la température n'a pas le temps de remonter. Celui mis pour les transférer directement dans la bouteille de stockage est un peu plus long (car la manipulation est plus délicate), aussi la température des échantillons risquerait d'augmenter au dessus de -40°C.

Le temps de stockage à -196°C n'est pas un paramètre étudié. D'après Whittingham, (1977 et 1980) et Ashwood-Smith (1986), il n'influence pas la viabilité cellulaire. Nos échantillons sont restés de trois quarts d'heure à une semaine dans l'azote liquide.

#### IV.2.4. Décongélation :

La décongélation est réalisée selon la même technique que pour les spores, c'est-à-dire dans un bain-marie à 32°C jusqu'à disparition du dernier cristal.

#### IV.2.5. Post-traitement :

Le glycérol est retiré par une succession de bains de concentration décroissante de 5% en 5% (10 min à chaque bain) puis de deux bains d'eau de mer. celle-ci est ensuite remplacée par du milieu de culture.

#### IV.2.6. Mise en culture :

Les échantillons dont le volume de la suspension de départ est :

- \* inférieure à 1 l sont placés en boîte de Pétri
- \* de 1 l sont transvasés en ballon de 2 l (tous les tubes sont regroupés sauf deux dont le culot est de 0,5 et 1 ml)
- \* de 6 l sont versés en ballon de 6 l (tous les tubes sont regroupés)

La température est la même que celle de la culture avant la cryoconservation.

L'éclairement est continu de  $60 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  à  $15^\circ\text{C}$  et de  $40 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  à  $22^\circ\text{C}$  et  $18,5^\circ\text{C}$ .

#### IV.2.7. Evaluation de la survie des cultures :

Les culture sont suivies pour certaines jusqu'à vingt jours après la décongélation. Nous observons la couleur des ballons ainsi que celle des gamétophytes au microscope optique. La prise de photos est aussi un témoin visuel soutenant les observations.



## V. RESULTATS

### V.1.LES SPORES :

La viabilité des spores se traduit par leur capacité à germer en gamétophytes, c'est ce que nous examinons. Les observations sont regroupées dans le tableau 6. Nous comptons les jours à partir du moment (J0) de la décongélation (J2, J4, J6,...).

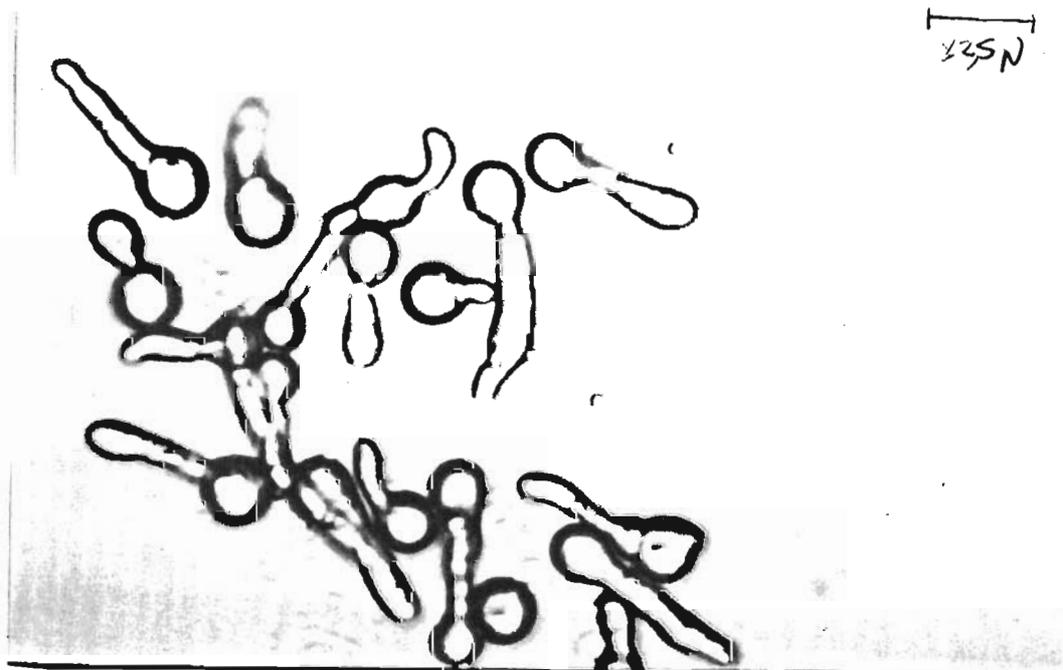
	éch	OBSERVATIONS
glycérol	SU 1	mise en culture en ballon de 500 ml; bullage à J7 germination à J7. Montée de la température (0,5°C par jour) à J16. Présence d'oeufs et de plantules (4 à 8 cellules) à J32)
glycérol	G	germination à J14, très peu de gamétophytes bon développement des gamétophytes à J24
glycérol avant Miquel B	GB	germination à J12, broyage des gamétophytes et remise en culture avec du milieu neuf à J24
Miquel B avant glycérol	B	germination à J14, très peu de gamétophytes broyage des gamétophytes et remise en culture avec du milieu neuf à J24
lycérol avant ac. alg.	GA	pas de germination
ac. alg. avant glycérol	A	pas de germination
non congelé	témoins	germination à J3

Tabl.6 Observation des cultures de spores d'*U. pinnatifida* après la décongélation.

D'après les témoins, les spores germent en trois jours. Les témoins de culture de spores en milieu glycérolé montrent que les spores germent jusqu'à une concentration de 15%.

Les spores de l'échantillon SU1, émises en grand nombre, ont germé à J7 en grande quantité : nous n'avons remarqué que peu de spores n'ayant pas germé. Puis les gamétophytes se sont allongés et ramifiés. Nous avons même observé des plantules à J32.

Pour l'échantillon SU2, la quantité de spores émises à été bien inférieure à celle de l'échantillon SU1 (environ la moitié). Les spores des essais G, GB et B ont germé, leur nombre n'étant pas élevé en raison de la faible quantité de spores émises. Les spores mortes n'étaient qu'en très faible proportion (1/10). Nous



Les spores émettent leur tube de germination dans lequel migre le matériel cellulaire.

*U. digitata* après la décongélation.

Comme pour celles de *U. pinnatifida*, les spores de *L. digitata* germent en trois jours.

Les spores de l'échantillon SL4 ont germées en gamétophytes à J4.

Les spores de l'échantillon SL3 n'ont toujours pas germé à J9; des spores mortes sont seulement visibles en faible quantité.

#### V.2. LES GAMETOPHYTES :

Le bon état des gamétophytes se juge à leur coloration brune foncée, à leur capacité à se ramifier et à l'allongement cellulaire (Tabl. 8 et 9).

volume suspension	ech.	Observations
2 ml	U1	ramification et croissance des gamétophytes présence d'oeuf et de plantules à J7
2 ml	U2	ramification et croissance des gamétophytes présence d'oeuf et de plantules à J7
4 ml	U3	plantules à J9
6 ml	U4	plantules à J15 mais en quantité moindre que pour U3
8 ml	U5	cellules mortes <50%; quelques oeuf et zygotes à J7; quelques plantules à J9
10 ml	U6	quelques oeufs à J7; plantules à J9 mais en quantité moindre que pour U5; 50% cellules mortes
20 ml 30 ml 45 ml	U7, U9 U13	pas de cellules mortes à J2, puis verdissement progressif des cellules, à J22 majorité de cellules vertes, reprise de croissance des cellules brunes
20 ml 30 à 40 ml	U8 et U10 à U12	cellules brun-vert en majorité, peu de cellules brunes (pas de diminution notable dans le temps) ramification de gamétophytes à J8
50 à 70 ml	U14 à U16	gamétophytes brun-vert : 2/3, allongement des cellules; très peu de c. brune, nombre inférieur à 1/6, ramification à J11
	té. moins	bon état des cultures, oeufs et zygotes à J7 plantules à J9

Tabl. 8 observations des gamétophytes d'*U. pinnatifida* après la décongélation.

volume	éch.	observations
0,5 ml à 3,5 ml	U17 à U23	Pas de différence notable entre les échantillons peu de cellules brunes < 1/3; majorité de gamétophytes brun-vert dont les cellules s'allongent au cours du temps
culots de 3ml	L1	ballon brun-jaune à J3, pas de changement de la couleur; très peu de gamétophytes bruns; majorité de cellules brun-vert
culot de 1ml de 0,5	L2 L3	gamétophytes mâles presque tous morts; très peu de cellules brunes; majorité de gamétophytes brun-vert
6 l	L4	verdissement du ballon et de tous les gamétophytes à J2 : mort de la culture

Tabl.9 Observation des gamétophytes d'*U. pinnatifida* et de *L. digitata* après décongélation.

L'observation microscopique des gamétophytes juste après le réchauffement révèle que ceux-ci sont intacts : leur couleur est brune, le cytoplasme occupe toute la cellule, les cellules ont gardé leur forme polygonale.

Dans chaque échantillon, nous observons des gamétophytes dont les différents états biologiques sont caractérisés par la couleur :

\* bruns > gamétophytes en bon état qui croissent et se ramifient (fig. 7 et 8)

\* brun-vert : la paroi est épaissie (état de résistance), le cytoplasme est séparé de la paroi par un espace vide (impression de décollement) (fig. 9) la cellule s'allonge mais très lentement par rapport à une cellule brune.

Pour *Laminaria digitata*, les cellules sont enflées comme si elles étaient en état de turgescence après absorption d'eau à la décongélation (fig. 10).

\* verts, décolorés ou vides : les cellules sont mortes (fig. 11 et 12).



fig.7 : Gamétophytes mâles et femelles de *Laminaria digitata* en free-living (X10); les mâles forment des filaments aux petites cellules, les femelles possèdent des cellules plus grosses.

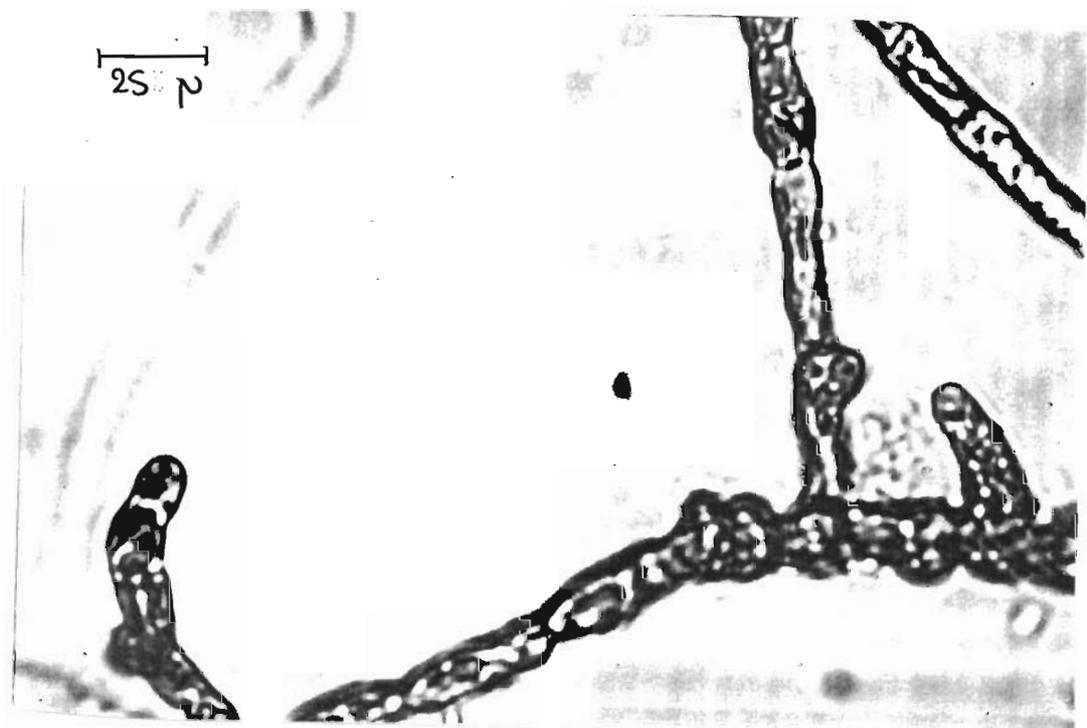


fig.8 : Gamétophytes mâles de *Laminaria digitata* : on remarque leur couleur brune

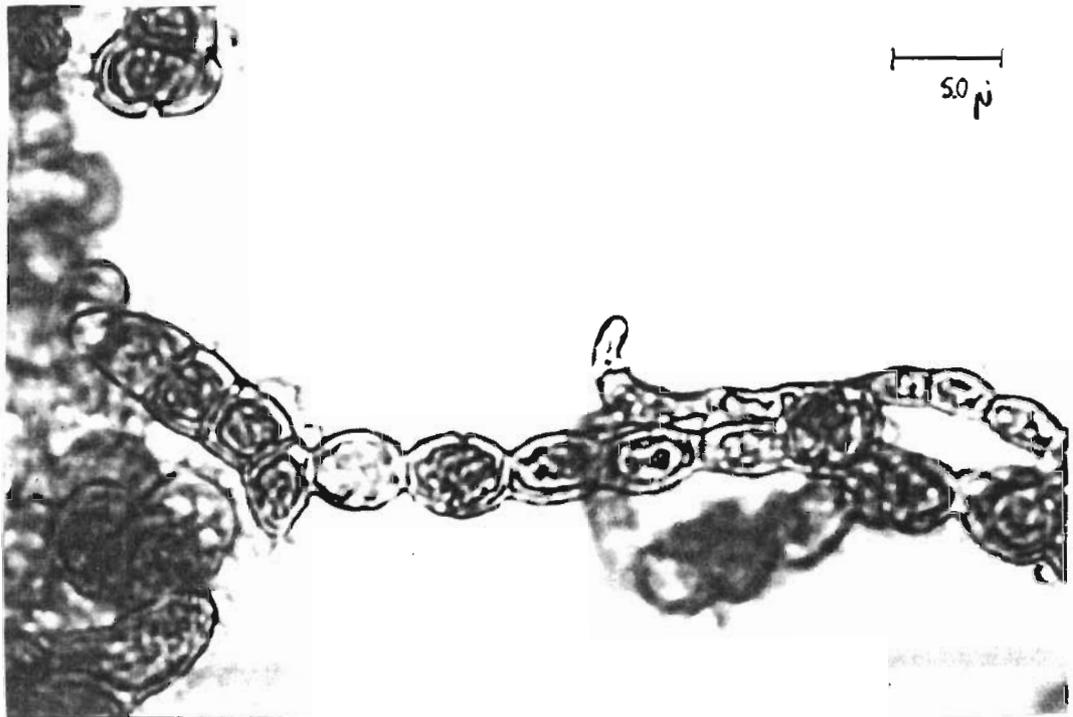


fig.9 : Gamétophyte femelle d'*U. pinnatifida* éch. U7 (20ml) à J10. Le cytoplasme est décollé de la paroi qui s'est épaissie.

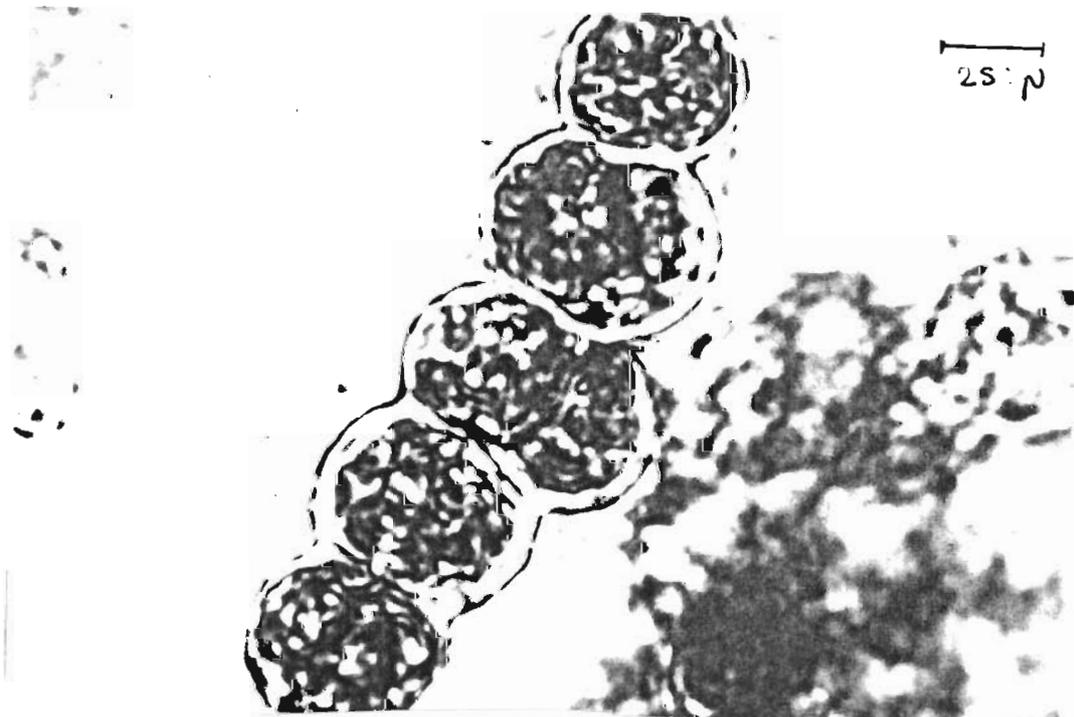


fig.10 : Gamétophytes femelles de *Laminaria digitata* à J4; les cellules se sont arrondies après la décongélation; le cytoplasme est décollé de la paroi.

Dans tous les échantillons, la majorité des gamétophytes morts sont des mâles. Très peu résistent à la congélation. On note tout particulièrement une très forte mortalité pour les volumes de suspension supérieure à 10 ml (fig 11).

Les zygotes et les plantules apparaissent sept à neuf jours après la décongélation (fig. 13 et 14).

Les échantillons U8, U10 à U12 et U14 à U23 ont été mis en culture dans un même ballon de 500 ml enrichi à la vitamine C (500 mg/l) à J8.

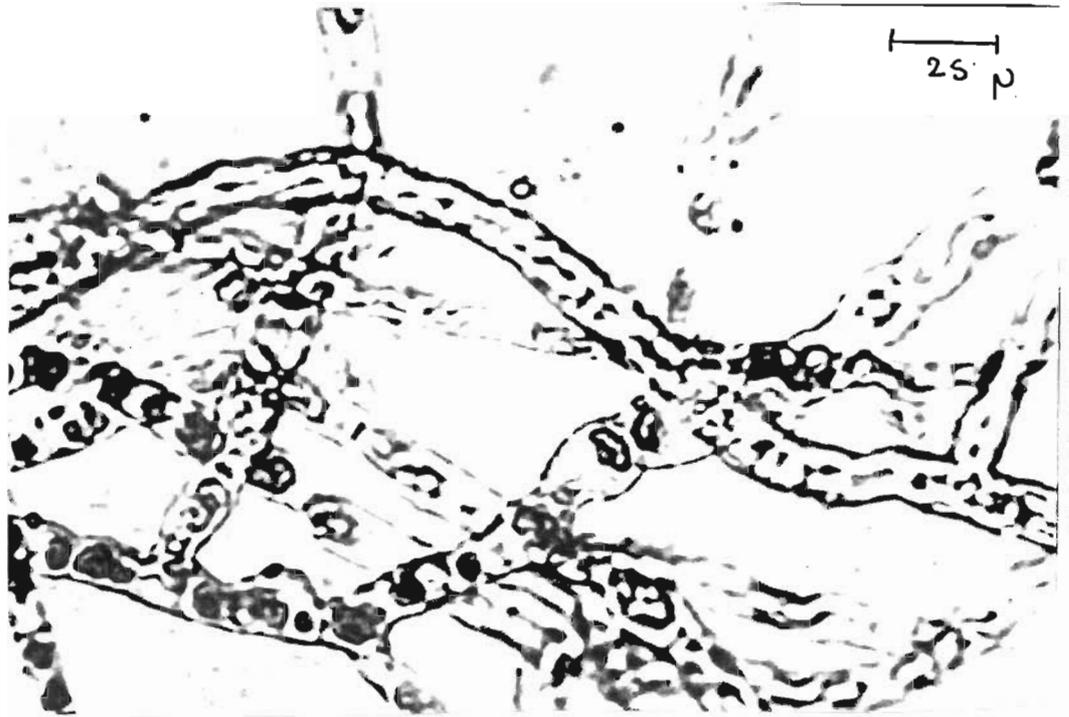


fig.11 : gamétophytes mâles d'*Undaria pinnatifida* à J2; certaines cellules sont vides, d'autres ont leurs plastes rétractés et verdis.

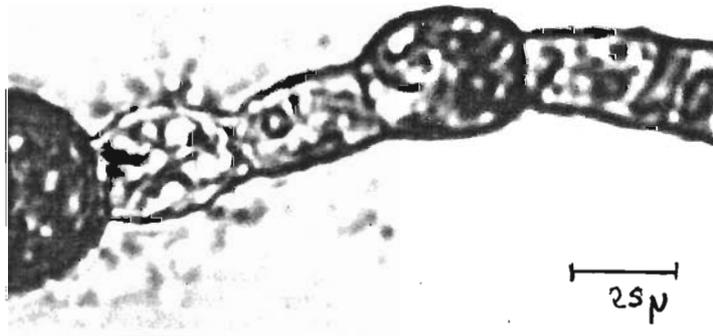


fig.12 : gamétophyte femelle d'*Undaria pinnatifida* après décongélation, on remarque la différence de couleur entre la cellule vivante brune (b) et les cellules en train de mourir : brun-vert (bv) et vertes (v).

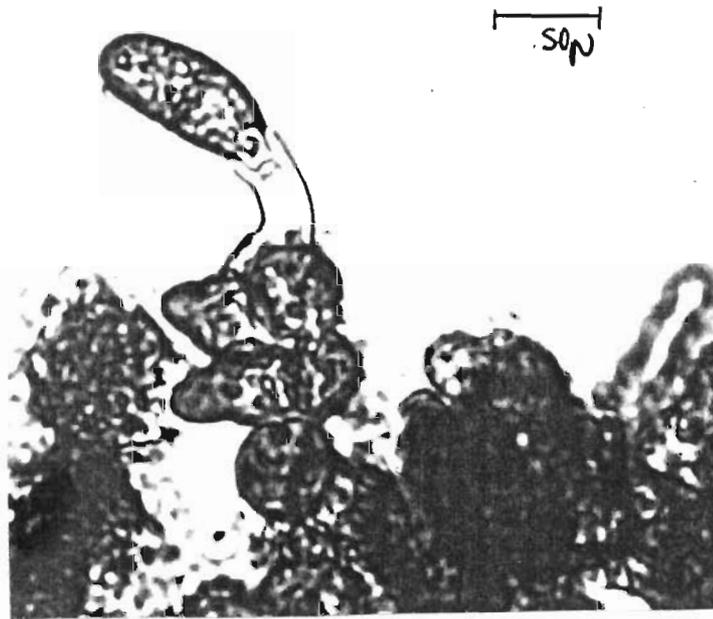


fig.13 : Allongement des grosses cellules des gamétophytes femelle d'*Undaria* (a); plantule unisériée à deux cellules.



fig.14 : La plantule se développe.



## VI. DISCUSSIONS

### VI.1. LES SPORES :

Par comparaison avec les témoins, nous remarquons que la cryoconservation retarde la germination des spores de quatre jours. Pour les essais G, GB et B, nous n'avons décelé une germination qu'à partir de J12 en raison du faible nombre de spores présentes. Mais ces spores ont sûrement germé avant cette date car ce sont des gamétophytes à plusieurs cellules, 4 à 6, que nous avons vus.

La germination des spores dans la solution glycérolée est très ralentie car à J15 les spores n'ont pas terminé la germination. Ceci est peut-être dû au fait que les spores sont dans une solution d'eau de mer glycérolée sans autre élément nutritif que ceux présents dans l'eau de mer. D'autre part, nous avons noté lors de l'imprégnation du glycérol qu'à partir de la concentration à 15% les spores perdaient une partie de leur mobilité. Ils devenaient immobiles à 20%.

La principale difficulté que nous avons eu à surmonter a été de parvenir à concentrer les spores en un culot. En effet ces dernières, flagellées, nagent dès l'émission. Elle ne perdent leur flagelles que pour se fixer. Nous avons eu du mal à obtenir un culot de spores par centrifugation : beaucoup de spores nagent toujours dans le tube en dépit d'une centrifugation à 4000 RPM (la centrifugeuse n'allant pas plus vite) pendant 10 min.

De plus la petite quantité qui est entraînée par la force centrifuge dans le fond du tube se fixe sur les parois de celui-ci; elle est difficile à récupérer. La seule opération de concentration qui a réussi concerne le lot SU1 sans doute parce que nous avons attendu environ deux heures après l'émission, que les spores soient moins mobiles : nous avons obtenu un culot par centrifugation (1000 RPM, 10 min) parfaitement visible.

Afin d'améliorer le culot de spores, nous avons donc tenté de piéger les zoïdes avant de les centrifuger. C'est pourquoi nous avons inclus dans la solution contenant les spores nageantes

- soit du milieu de Miquel B car dans l'eau de mer cette préparation génère un précipité de phosphate de calcium
- soit l'acide alginique qui donne lui aussi un nuage fibreux.

Ces additions ont été réalisées avant et après l'imprégnation du cryoprotecteur afin de vérifier si le phosphate de calcium ou l'acide alginique n'entrave pas l'action du cryoprotecteur.

Nous pensions que ces deux produits entraîneraient avec eux dans leurs mailles au moment de la centrifugation les spores dans le fond du tube et les empêcheraient de se fixer sur les parois.

Après la centrifugation avec l'acide alginique, que ce soit avant ou après l'imprégnation au glycérol, le colloïde forme un culot blanc dans le tube et les spores sont regroupées en une fine couche jaunâtre à la surface du culot. D'après cette constatation, l'acide alginique n'a donc pas rempli le rôle espéré puisqu'il n'a pas emprisonné les spores : la centrifugation n'a en fait provoqué qu'une séparation de densité, le plus lourd (acide alginique) dessous, les spores plus légères dessus. La plus grande partie des spores a disparu avec le surnageant. L'absence de germination des quelques spores présentes dans le culot blanchâtre indique en outre que l'acide alginique a un effet létal pour les éléments reproducteurs.

Par contre, le piégeage des spores par le phosphate de calcium a donné d'excellents résultats : des gamétophytes se sont développés après la décongélation. Il semble toutefois que l'adjonction du glycérol avant le piégeage soit la meilleure méthode puisque le nombre de spores ayant germé est plus élevé. Si l'on fait agir le glycérol après le piégeage, le cryoprotecteur pénètre sans doute plus difficilement et son effet s'en trouve réduit.

Nous avons aussi tenté de concentrer les spores par filtration, méthode appliquée aux spores de *Laminaria digitata* : celles ci ont germé en gamétophytes après la décongélation. La concentration sur filtre n'est donc pas une gêne pour la cryoconservation. Nous avons essayé la filtration des spores d'*Undaria pinnatifida* sur une toile à bluter de 5µm de porosité mais les spores traversaient la toile. Des essais seraient à réaliser sur une toile de maille plus fine.

## VI.2. LES GAMETOPHYTES :

On considère que les résultats de la cryoconservation sont positifs lorsque le nombre de cellules vivantes après la décongélation est supérieur ou égal à 50%, car ce pourcentage permet de mettre en route une nouvelle culture. La quantification n'est qu'approximative car le comptage est très difficile.

Sur les témoins en boîtes de Pétri maintenues à 22°C, nous observons des zygotes au bout de 7 jours; deux jours plus tard des plantules commencent à se développer.

Il en est de même pour les faibles volumes de suspension (jusqu'à 10 ml).

Ceci apparaît étonnant car en principe les gamétophytes sont placés en conditions inhibant la gamétogénèse (température plus élevée et intensité lumineuse réduite). Mais les cultures se trouvent en boîte de Pétri et non en ballon. Donc deux facteurs changent :

- \* le bullage : les gamétophytes ne sont plus remis en suspension. Nous notons que dans les échantillons où des plantules se développent, les gamétophytes se sont fixés sur le fond des boîtes de Pétri.

- \* l'intensité lumineuse : en boîtes de Pétri, les gamétophytes sont répartis en une fine couche. Ils

reçoivent donc une quantité de lumière plus importante que dans un ballon de culture opacifié.

Nous pensons donc que si l'un des facteurs inhibant la gamétogénèse est modifié (ici l'intensité lumineuse), celle-ci peut reprendre.

Nous considérons donc que la capacité des gamétophytes à émettre leurs gamètes et à développer des plantules est un critère supplémentaire quant à l'appréciation de la survie des cellules.

Nous nous sommes aussi demandé si une trop grande quantité de cellules mortes n'entraînait pas la mort des cellules encore vivantes. L'allongement des cellules brun-vert et la multiplication des cellules brunes dans les échantillons où les cellules vivantes sont en faible proportion ( $<1/3$ ) infirme cette hypothèse.

Lors de l'imprégnation du glycérol dans les cryotubes, il est difficile de remettre en suspension des culots de gamétophytes supérieur à 0,5 ml (correspondant à une suspension supérieure à 10 ml) par simple agitation manuelle. Or, cette remise en suspension des gamétophytes est très importante pour une bonne pénétration du cryoprotecteur dans les cellules. On a fait appel à l'action d'un agitateur magnétique réglé au minimum de sa vitesse et placé dans une armoire de culture.

Les échecs de la congélation au niveau des grands volumes résultent peut-être en fait de la phase de décongélation : en effet au moment de la décongélation, les cryotubes contenant les culots les plus importants se réchauffent plus lentement que les autres. Le centre du culot reste plus longtemps congelé et les cellules en contact avec les parois du cryotube plus longtemps exposées à la température de 32°C du bain-marie.

Les échantillons U7 (20 ml), U9 (30 ml) et U13 (45 ml) ont été imprégnés par le glycérol en fiole d'Herlenmeyer et

centrifugés en tube pour changer les bains de la solution glycérolée. Les multiples transvasements entraînant la perte de trop nombreux gamétophytes nous ont conduit à l'abandon de cette technique.



## CONCLUSION

Cette étude fait suite aux travaux de Ph. Renard et S. Arbault sur la cryoconservation des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*.

La méthode de congélation utilisée comprend deux étapes :

- la réfrigération des échantillons jusqu'à  $-40^{\circ}\text{C}$  à raison de  $5^{\circ}\text{C}$  par minute, après l'imprégnation par un cryoprotecteur, le glycérol, à une concentration de 20%
- le passage de  $-40^{\circ}\text{C}$  à  $-196^{\circ}\text{C}$  par immersion dans l'azote liquide.

Le travail a porté sur les gamétophytes et les spores d'*Undaria pinnatifida*, algue à vocation alimentaire, que l'on commence à cultiver en France, et *Laminaria digitata*, autre laminaire que l'on cherche à cultiver car l'industrie qui en extrait un colloïde très recherché, l'acide alginique, en demande de plus en plus.

En ce qui concerne les gamétophytes, nous avons montré, grâce à une adaptation de la technique proposée par P. Renard et en utilisant la centrifugation pour concentrer les organismes, que la cryoconservation des gamétophytes d'*Undaria* était réalisable si l'on se limite à de petits volumes de suspension jusqu'à 10 ml. Dans ces conditions, on récupère à la décongélation des gamétophytes ayant gardé intactes leurs capacités à croître et à produire des gamètes.

Pour *Laminaria digitata*, les essais sont à reprendre avec des volumes de suspension plus faibles : nous avons voulu travailler sur des quantités trop importantes (2 l et 6 l de suspension); les résultats furent décevants puisqu'il n'y eut aucune survie.

Pour ce qui est des spores, le problème vient de la difficulté à obtenir un concentrat par centrifugation. Mais celui-ci obtenu, la technique de congélation appliquée s'est

révélée très efficace à condition d'attendre une à deux heures après l'émission des éléments reproducteurs. Au terme de ce délai, les spores perdent une partie de leur mobilité, ce qui facilite la formation d'un culot par centrifugation. Il est néanmoins apparu que les spores devaient être en grande quantité de façon à ce qu'elles ne soient pas éliminées au cours des bains successifs de cryoprotecteur.

Dans le cadre des cultures intensives de laminariales, il serait très pratique de pouvoir conserver par le froid de grandes quantités de gamétophytes matures prêts à émettre leurs gamètes : pour obtenir un ensemencement rapide des collecteurs, il suffirait de décongeler ces semences et de les pulvériser sur les collecteurs.

Mais, si on ne parvient à congeler que de petites quantités, il vaut mieux dans ce cas là, se tourner vers les spores : celles-ci étant de très petite taille par rapport aux gamétophytes, dans un volume réduit il y en aura un très grand nombre représentant potentiellement de très grande quantités de gamétophytes par la méthode du free-living.

Le perfectionnement de la technique permettra de choisir la solution la plus pratique. Ce travail a tenté d'apporter à cette recherche des moyens de conservation des semences d'algues, notre contribution en en montrant les possibilités mais aussi les limites.



## BIBLIOGRAPHIE

- Angelier N., 1982. Données de base des transformations liquide-solide au cours de la congélation de milieux biologiques. In : France cryo 82, VIII<sup>ème</sup> Réunion du Groupe Français de Cryobiologie, Paris, 8-10 Décembre 1982, 3-8.
- Arbault S., P. Renard, R Perez, R. Kaas , 1990. Cryoconservation des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* (Laminariales).(sous presse).
- Ashwood-Smith M.J., 1986. The cryopreservation of human embryos. *Human Reprod.*, 1, 5, 319-332.
- Ben-Amotz A., A. Gilboa, 1980 a. Cryopreservation of marine photosynthetic unicellular algae. I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2, 157-161.
- Ben-Amotz A., A. Gilboa, 1980 b. Cryopreservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2, 221-224.
- Boutron P., A. Kaufman, 1979. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol. *Cryobiology*, 16, 83-89.

- Daggett P.M., F.P. Simione, 1987. Manuel de cryoconservation. *M.S. of the American Type Culture Collection in coopération avec la compagnie NALGE*, 1-12.
- Ehrsam A., A. Larese, 1982. Les transformations physico-chimiques liées à la cryoconservation; leur incidence sur les systèmes biologiques. In : France cryo 82, VIII<sup>ème</sup> Réunion du Groupe Français de Cryobiologie, Paris, 8-10 Decembre 1982, 17-21.
- Gayral P., 1975. Les algues : morphologie, cytologie, reproduction, écologie. Doin éditeurs, Paris, 166 p.
- Gazeau C., J. Dereuddre, 1986. Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 133, *Actual. bot.*, 3, 41 - 64.
- Larèse A., A. Ehrsam, 1982. Les agents cryoprotecteurs : leur nature et leurs fonctions en cryobiologie. In : France cryo 82, VIII<sup>ème</sup> Réunion du Groupe Français de Cryobiologie, Paris, 8-10 Decembre 1982, Paris, 22-27.
- Leibo S.P., 1977. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryo. In : "The Freezing of Mammalian Embryos". (CIBA Foundation Symposium 52). *Excerpta Medica, Elsevier/North-Holland, Amsterdam*, 69-92. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es- Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris, p.8.).
- Lovelock J.E., 1953. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta.*, 10, 414-426. (Cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es- Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris, p.8.).

- Mackenzie A.P., 1977. Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous system. *Phil. Trans. R. Soc., London, ser. B*, 278, 167-189. (cité par Gazeau C., J. Dereuddre, 1986. Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 133, *Actual. bot.*, 3, 41 - 64).
- Mazur P., 1963. Kinetics of water loss from cells at sub zero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, 47, 347-369. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. *Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.8.*).
- Mazur P., 1966. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, 2, 181-192. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. *Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.8.*).
- Mazur P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14, 251-272. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. *Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.8.*).
- Meryman H. T., 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. *Ann. Rev. Biophys.*, 3, 341-363. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. *Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.8.*).

- Meryman H.T., R.J. Williams, 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells and organs. Kartha K. ed., CRC Press, 13-48. (cité par Gazeau C., J. Dereuddre, 1986. Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 133, *Actual. bot.*, 3, 41 - 64).
- Perez R., 1971. Ecologie, croissance et régénération, teneur en acide alginique de *Laminaria digitata* sur les côtes françaises de la Manche. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 35, 287-346.
- Perez R., R. Kaas, O. Barbaroux, 1984. Culture expérimentale de l'algue *Undaria pinnatifida* sur les côtes de France. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit*, n°343, 3-15.
- Perez R., R. Kaas, O. Barbaroux, S. Arbault, N. Le Bayon, J.Y. Moigne, 1989. Technique de culture pour les côtes bretonnes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida*, Tableau de marché - Etude économique. *Rapp. IFREMER*, 66 p.
- Perez R., J.Y. Lee, C. Juge, 1981. Observations sur la biologie de l'algue japonnaise *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, introduite accidentellement dans l'étang de Thau. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit*, n°315, 1-12.
- Renard P., S. Arbault, R. Kaas, R. Perez, 1990. Une méthode pour la cryoconservation des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* (Laminariale). (soumis à publication).
- Steponkus P.L., 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimatation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 543 - 584.

Whittingham D.G., 1977. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In : "*The Freezing of Mammalian Embryos*" (CIBA Foundation Symposium 52) *Excerpta Medica, Elsevier/ North-Holland, Amsterdam*, 97-108.(cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.12.).

Whittingham D.G., 1980. Principles of embryo preservation. In : "*Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*". Tumbridge Wells, U.K., Pitman Medical, M.J. Ashwood-Smith & J. Farrant (eds), 65-83. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.12.).

Whittingham D.G., S.P. Leibo, P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-296^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178, 411-414. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 décembre 1989, Paris. p.12.).

Whittingham D.G., M. Wood, J. Farrant, H. Lee, J.A. Halsey, 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J. Reprod. Fert.*, 56, 11-21. (cité par Renard P., 1989. Etudes sur la cryopréservation des embryons de bivalve à des fins aquacoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, es-Sciences Naturelles, 11 Décembre 1989, p.13.).

Wood M., J. Farrant, 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17, 178-180.



## Milieu de culture

### Solution de Miquel A

Mg SO <sub>4</sub>	10 g
NaCl	10 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	2 g
KB <sub>2</sub>	0,2 g
KI	0,2 g
eau distillée	100 ml

### Solution de Miquel B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	4 g
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4 g
HCl concentré	2 ml
FeCl <sub>2</sub> (en solution)	2 ml
eau distillée	80 ml

### Solution de provasoli P<sub>6</sub>

EDTA	3 g
FeCl	0,08 g
MnCl	0,12 g
ZnCl	0,015 g
CoCl	0,003 g
CaSO <sub>4</sub>	0,0012 g
BH <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,6 g
MoNa <sub>2</sub> NoO <sub>4</sub>	0,05 g
eau distillée	1000 ml

### MILIEU DE CULTURE

Dans 1000 ml d'eau de mer stérilisée, on ajoute :

- 1 ml de Miquel B
- 2 ml de Miquel A
- 1 ml de Provasoli P<sub>6</sub>
- 0,5 ml de Kanamycine
- 2,5 ml de dioxyde de germanium

Kanamycine (sulfate de) : solution mère à 100 g/l d'eau distillée

Dioxyde de Germanium : solution mère à 1 g/l

Eau de javel : solution mère : un berlingot de 250 ml d'hypochlorite de sodium dans 750 ml d'eau distillée. Pour stériliser on utilise 100 ml de cette solution mère par m<sup>3</sup> d'eau de mer.

Thiosulfate de sodium : Solution mère à 220 g/l. 1 ml de cette solution mère neutralise 1 ml de la solution mère d'eau de javel.

## LE FREE LIVING

Les spores des laminariales sont des cellules flagellées qui, après l'émission, nagent quelques minutes avant de se fixer en perdant leur flagelle. Cette fixation est nécessaire pour qu'il y ait germination.

Mais la spore ne doit pas adhérer à la paroi de ballon car elle ne sera pas remise en suspension. On offre donc un substrat de fixation aux spores par l'intermédiaire du milieu de culture.

### Mise en oeuvre :

Pendant qu'a lieu l'émission des spores on prépare le milieu de culture. L'ajout de la solution de Miquel B provoque un précipité blanc, floconneux qui envahit l'ensemble du ballon. Ce précipité est dû à la présence du phosphate de calcium soluble dans la solution de Miquel B (acide) et insoluble dans l'eau de mer dont le PH est environ de 8.

Dans un ballon de 2 l, on ajoute 100 à 120 ml du filtrat contenant les spores qui se fixent sur les fibres du précipité. Après trois jours de repos, un bullage mis en place désagrège le précipité. Les gamétophytes provenant des spores qui entre-temps ont germé, se retrouvent libres dans le milieu de culture.

Placés dans des conditions de lumière et de température inhibant la gamétogénèse ils s'allongent, se ramifient et se cassent sous l'effet de l'agitation. Les fragments ainsi obtenus s'allongent, se ramifient et se scindent à leur tour. Les gamétophytes se multiplient donc à l'infini, d'où l'intérêt de cette technique : produire des gamétophytes en grande quantité pour obtenir de nombreux gamètes puis de nombreux zygotes et de très nombreuses plantules.

## CHANGEMENT DU MILIEU DE CULTURE

- arrêter le bullage
- laisser décanter pendant 1 heure
- aspirer le surnageant à l'aide d'un fin tuyau stérile jusqu'à ne laisser que 300 à 400 ml
- broyer les gamétophytes dans un bécher stérile à l'aide d'un mixer (type Ultra Turax)
- mettre le broyat des gamétophytes dans un ballon stérile contenant du milieu de culture neuf

Le broyage des gamétophytes permet de diminuer leur longueur car, en s'allongeant au cours du temps, ceux-ci tendent à s'agglutiner et finiraient par tomber sur le fond du ballon. Si on ne réduit pas leur longueur le bullage n'est alors plus assez fort pour maintenir la suspension.

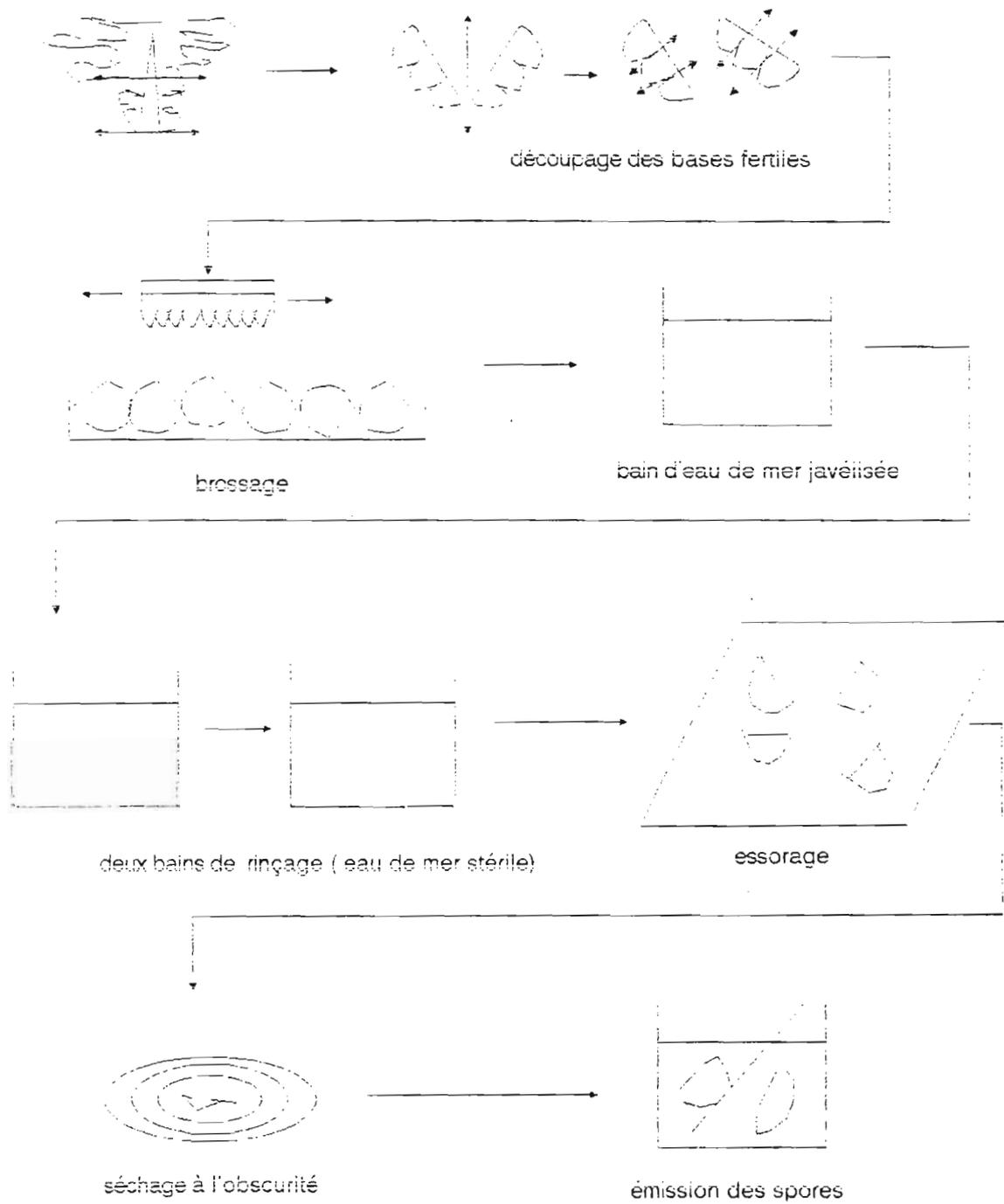


Schéma représentant l'émission des spores