

## Essai de cryoconservation des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* (Laminariales)

Suzanne Arbault, Philippe Renard, René Pérez et Raymond Kass

IFREMER, Laboratoire d'algoculture, BP 1049, 44037 Nantes Cedex 01, France.

Reçu le 9 avril 1990, accepté le 13 juin 1990.

---

Cryopreservation trials on the gametophytes of the food alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales).

Arbault S., P. Renard, R. Pérez, R. Kass. *Aquat. Living Resour.*, 1990, 3, 207-215.

### Abstract

Low temperature tolerance was determined for gametophytes of food alga *Undaria pinnatifida* according to various cryopreservation methods. Survival durations after storage in a medium containing 28% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$  or in a 5-10% glycerol solution at  $-196^{\circ}\text{C}$  were only 9 and 4 days respectively. On the other hand, cooling at  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . and storage at  $-15^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes, without cryoprotective medium, did not reduce viability but this was highly decreased by storage for 15 minutes at  $-30$  or  $-196^{\circ}\text{C}$ , with or without DMSO. The morphological cooling injuries were depigmentation and/or a contraction of the cells.

**Keywords :** Alga, cryopreservation, gametophyte, *Undaria pinnatifida*.

### Résumé

La tolérance aux basses températures des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* est examinée selon différentes méthodes de cryoconservation. La conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une solution glycérolée à 28 % et celle à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans une solution en eau de mer de glycérol à 5 ou 10 % ne permettent que des survies de, respectivement, 9 et 4 jours. Par ailleurs, la viabilité n'est pas affectée par un refroidissement de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  et une conservation de 15 minutes à  $-15^{\circ}\text{C}$  sans milieu de cryoprotection mais est fortement diminuée par un stockage de 15 minutes à  $-30$  ou  $-196^{\circ}\text{C}$ , même en présence de DMSO. La réduction de la survie des gamétophytes se traduit morphologiquement par une dépigmentation et/ou une contraction des cellules.

**Mots-clés :** Algues, cryoconservation, gamétophyte, *Undaria pinnatifida*.

---

## INTRODUCTION

L'ordre des Laminariales est composé d'algues brunes de toute première importance sur le plan économique, tant au niveau national que mondial (Matsuyama, 1985, Boude *et al.*, 1988, 1989). Ces algues fournissent la majeure partie de la matière première aux industries d'extraction des phycocol-

loïdes car elles sont riches en produits épaississants et gélifiants tels que l'acide alginique. A l'échelon mondial, l'industrie des alginates génère en 1989 un chiffre d'affaire de plus de 250 millions de dollars (Indegaard, comm. pers.). Certaines espèces, telles que *Laminaria japonica* et *Undaria pinnatifida* sont également consommées directement par l'Homme, particulièrement en Extrême-Orient (1,8 millions de

tonnes), tandis qu'en Europe et aux États-Unis un marché non négligeable commence à se structurer.

En raison de la demande accrue et de la surexploitation des populations naturelles, des méthodes de culture des Laminariales ont été progressivement établies. Ainsi, Pérez et al. (1981, 1984) ont mis au point une technique permettant la production régulière de semences (gamétophytes) grâce à un contrôle de l'éclairement, de la température, de la photopériode et du milieu nutritif. Par cette méthode, la production de jeunes plantules peut être effectuée indépendamment de la période de fertilité naturelle de l'algue. Néanmoins, la conservation et le maintien de la fertilité des gamétophytes n'excèdent pas quelques mois (Kaas et al., 1987). Le stockage à long terme de cette semence serait donc un complément indispensable à la gestion des cultures d'algues.

Les techniques de conservation à très basses températures (cryoconservation) ont depuis longtemps montré leur efficacité sur un grand nombre d'organismes différents. Elles permettent de réduire voire d'éliminer les modifications liées au temps qui se produisent normalement dans tous les systèmes biologiques et garantissent une longue durée de conservation. La cryoconservation des microalgues a déjà été réalisée (Gilboa et Ben Amotz, 1978; Saks, 1978; Ben Amotz et Gilboa, 1980 a et b). En revanche, celle des gamétophytes de macroalgues n'a, jusqu'à présent, jamais été rapportée.

Nous examinons ici la tolérance aux basses températures des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* selon différentes techniques de cryoconservation.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

A l'état adulte, l'algue *Undaria pinnatifida* se présente sous la forme d'une lame d'environ 1 m de longueur, découpée dans le sens horizontal et parcourue par une nervure centrale (fig. 1). Cette nervure se prolonge par un stipe plat de 8 à 20 cm de longueur, à la base duquel se développe le crampon. Au moment de la période de fertilité, la partie basale du stipe se transforme et se couvre de taches brunes constituées de petits sacs microscopiques contenant les spores. A maturité, ces spores sont libérées et germent en un filament unisériel microscopique ramifié, appelé gamétophyte mâle ou gamétophyte femelle selon la spore qui lui a donné naissance. Les cellules de ces gamétophytes sont limitées par une membrane dite « cytoplasmique » et contenues dans une membrane dite « squelettique » (Fritsch, 1971, 1972). Les gamétophytes produisent des gamètes. Le zygote qui résulte de la fécondation germe en une plantule qui, en se développant, devient l'algue macroscopique.

Au laboratoire, les gamétophytes sont conservés en suspension, grâce à un bullage, dans un milieu nutritif

maintenu à une température de 22°C et sous un éclairage continu de 40  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Pérez et al., 1984), jusqu'à leur utilisation.

## Méthodes de refroidissement et de conservation à basses températures

### Conservation selon les techniques utilisées pour les microalgues

*Expérience 1.* — Cette méthode est issue de celle employée par Meryman et Hornblower (1977) sur les hématies, et appliquée par Cassidanius et al. (1990) sur l'algue *Tetraselmis suecica*. Les gamétophytes sont répartis dans des tubes à essai de 5 ml puis centrifugés à 1400 tr/min, pendant 10 minutes, afin de retirer le milieu de culture. Ils sont ensuite mélangés, à température ambiante (20-22°C), à une solution stérile glycérolée à 28 % (tableau 1), à raison d'1,35 ml de solution/ml de culot de gamétophytes. Ce mélange est réalisé en deux étapes : un quart de la quantité totale de la solution est d'abord ajoutée goutte à goutte, puis, 10 minutes après, les trois quarts restants sont incorporés selon le même procédé. Après 5 minutes d'exposition, la phase liquide est retirée après centrifugation à 1400 tr/min pendant 10 minutes. Les gamétophytes sont alors immédiatement placés dans des tubes cryobiologiques de 2 ml (Poly Labo, Strasbourg) et immergés pendant 30 minutes dans un mélange d'alcool dénaturé et de glace carbonique (-80°C). Les échantillons sont ensuite stockés dans un congélateur à -80°C pendant 1-2 h, 3, 7, 14 ou 39 jours. Les gamétophytes sont décongelés en immergeant les tubes cryobiologiques pendant 10 minutes dans un bain-marie à 37°C. Afin d'éliminer la solution de cryoprotection, le contenu de chaque tube est transvasé dans 100 ml d'eau de mer à double concentration en sel (70‰), puis dans de l'eau de mer de salinité normale (30‰), pendant 10-15 minutes. Les gamétophytes sont alors récupérés par centrifugation (1400 tr/min pendant 10 minutes) puis mis en culture.

*Expérience 2.* — Cette méthode est issue de celle utilisée sur plusieurs algues unicellulaires par Gilboa et Ben Amotz (1978). Après concentration par centrifugation à 1400 tr/min pendant 10 minutes, les gamétophytes sont inclus, à température ambiante et pendant 30 minutes, dans une solution en eau de mer de glycérol à 5 ou 10 %. Le mélange est ensuite réparti dans des tubes cryobiologiques de 2 ml et placé dans un congélateur à -30°C, pendant 15-20 minutes, puis dans l'azote liquide (-196°C). Les échantillons sont conservés 1-2 heures, 3, 7 ou 14 jours puis ils sont décongelés par une immersion de 10-15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le glycérol est progressivement éliminé par des bains décroissants de 5 %, d'une durée de 10 minutes, et les gamétophytes sont mis en culture.

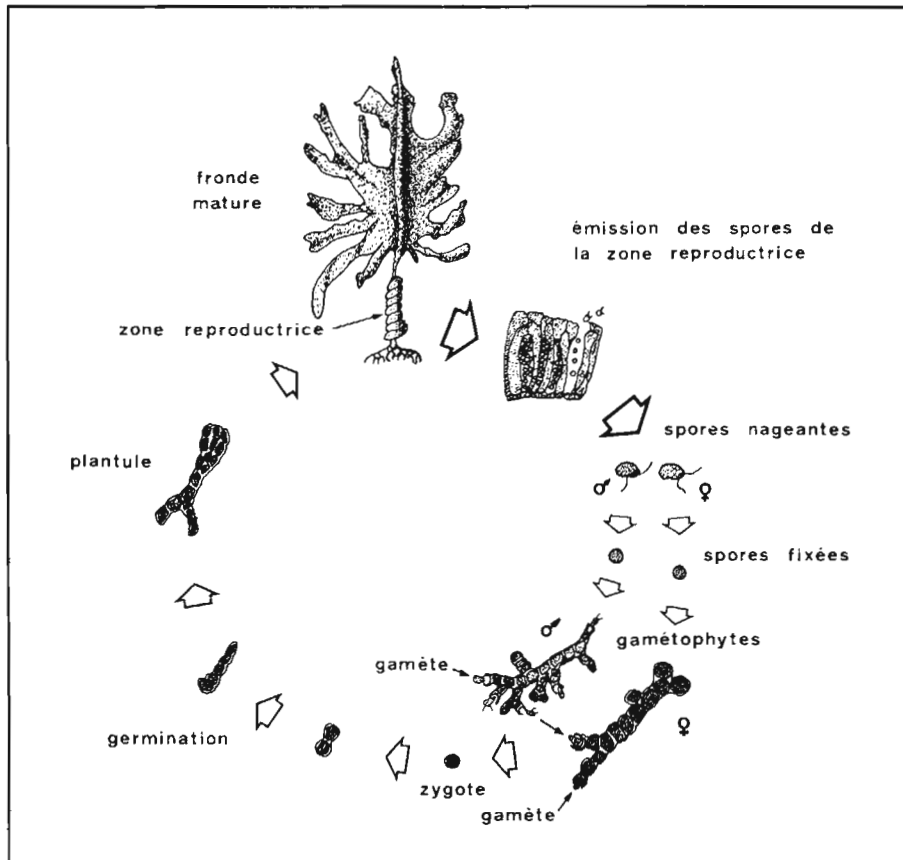


Figure 1. — Cycle de reproduction de l'algue *Undaria pinnatifida* (Pérez et al., 1981).

*Reproductive pattern of Undaria pinnatifida alga* (Pérez et al., 1981).

Tableau 1. — Composition de la solution glycérolée employée dans l'expérience 1.

*Composition of the glycerol solution used in experiment 1.*

	(g)
Glycérol	57,00
Lactate de Na	1,60
KCl	0,03
MgCl <sub>2</sub>	0,04
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,08
Eau distillée qsp 100 ml (pH compris entre 6,8 et 7,0)	

Les gamétophytes témoins sont représentés par des échantillons conservés à 22°C pendant toutes les expérimentations puis mis en culture.

*Conservation par refroidissement et réchauffement contrôlés* (expérience 3)

Une suspension de gamétophytes (2 ml) disposés dans des tubes cryobiologiques de 2 ml sont centrifugés à 400 tr/min, pendant 3 minutes, afin de retirer le milieu de culture. Les gamétophytes sont alors

mélangés, à température ambiante et progressivement, à une solution en eau de mer de diméthyl sulfoxyde DMSO (5, 10 ou 15 %, pendant environ 40 minutes. Le mélange à 5 % est réalisé en une seule fois tandis que ceux à 10 et 15 % sont effectués respectivement en deux étapes (5 % pendant 20 minutes puis 10 % pendant 20 minutes) et trois étapes (5 % pendant 13 minutes, puis 10 % pendant 13 minutes, et enfin 15 % pendant 13 minutes). Ils sont ensuite refroidis, à raison de 5°C/min, dans la chambre de refroidissement d'un congélateur programmable (Minicool LC40, Air Liquide, Sassenage), jusqu'à la température de -15 ou de -30°C. Les tubes sont conservés à ces températures pendant 15-20 minutes ou directement plongés dans l'azote liquide (-196°C) pendant 15-20 minutes.

Le réchauffement est effectué soit rapidement, en immergeant les tubes dans un bain-marie à 35°C pendant 8-10 minutes, soit lentement, en disposant les tubes dans une enceinte thermostatée à 0°C pendant 55-60 minutes puis à température ambiante pendant 15-20 minutes. Le cryoprotecteur est ensuite retiré progressivement par des bains décroissants de 5 %,

d'une durée de 5-7 minutes; les gamétophytes sont alors mis en culture.

Deux types de témoins sont effectués : le premier (témoin 1) consiste en des gamétophytes uniquement conservés à 22°C; le deuxième (témoin 2) réside dans des gamétophytes refroidis, sans solution de cryoprotection, jusqu'à -15, -30 ou -196°C.

### Culture des gamétophytes et estimation de leur survie

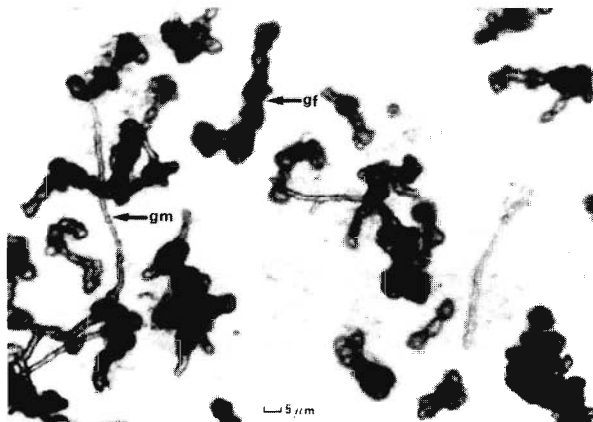
Pour les expériences 1 et 2, le contenu des tubes est transvasé dans des ballons en verre avec 500 ml de milieu nutritif, à raison de trois tubes par ballon. Pour les autres expériences, les gamétophytes sont versés dans des tubes avec 50 ml de milieu nutritif, à raison d'un tube cryobiologique par tube de culture. Les gamétophytes sont ainsi cultivés en suspension grâce à un bullage à une température de 22°C et sous un éclairage de  $40 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

La survie des gamétophytes est estimée grâce à un examen morphologique au microscope optique, par comparaison avec les échantillons témoins. Cette estimation est effectuée immédiatement après le réchauffement et la dilution du cryoprotecteur, et au cours des jours qui suivent la mise en culture des gamétophytes.

## RÉSULTATS

### Conservation selon les techniques utilisées pour les microalgues

*Expérience 1.* — Les gamétophytes témoins se présentent sous la forme de chapelets de cellules brunes, grêles pour les gamétophytes mâles et plus renflées pour les gamétophytes femelles (*fig. 2*). Ils conservent



**Figure 2.** — Morphologie externe des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* conservés à 22°C (témoin) : gamétophyte mâle (gm), gamétophyte femelle (gf).

*External morphology of Undaria pinnatifida gametophytes kept at 22°C (control): male gametophytes (gm), female gametophyte (gf).*

cet aspect en s'allongeant et en se ramifiant au cours de leur culture. Suite à une exposition à -80°C, tous les gamétophytes meurent après 20 jours de remise en culture. Il semblerait, par ailleurs, que les gamétophytes mâles meurent plus précocement que les gamétophytes femelles.

*Expérience 2.* — Comme pour l'expérience précédente, les gamétophytes témoins conservent leur aspect morphologique et leur coloration brune et continuent de se développer (*tableau 2*).

Immédiatement après leur décongélation et l'élimination du cryoprotecteur ( $J_0$ ), les gamétophytes sont morphologiquement identiques aux témoins, quelles que soient la durée de conservation à -196°C et la concentration en glycérol (*tableau 2*). En revanche, quelle que soit la durée de conservation, ils apparaissent brun-vert au 4<sup>e</sup> jour de culture ( $J_4$ ) quand ils sont refroidis dans le glycérol à 5%, et au 7<sup>e</sup> jour de culture ( $J_7$ ) quand ils sont refroidis dans le glycérol à 10%. Par la suite ils deviennent verts puis dépigmentés et ne se développent plus, à partir de  $J_7$  avec le glycérol à 5%, et à partir de  $J_{14}$  avec le glycérol à 10%. Il apparaîtrait, en outre, que les gamétophytes mâles meurent plus précocement que les gamétophytes femelles.

### Conservation par refroidissement et réchauffement contrôlés (expérience 3)

Dans ces expériences, la morphologie, la coloration brune et la multiplication des cellules des gamétophytes témoins non refroidis (témoin 1) perdurent tout au long de la culture (*tableau 3*).

Immédiatement après leur décongélation et le retrait du cryoprotecteur ( $J_0$ ), les gamétophytes refroidis à -15°C, avec ou sans DMSO (témoin 2), présentent un aspect et une coloration identiques aux témoins non refroidis, quelle que soit la vitesse de réchauffement (*tableau 3*). Au cours des jours qui suivent cet aspect morphologique est conservé et les cellules se multiplient. En revanche, si les gamétophytes refroidis jusqu'à -30°C puis réchauffés, rapidement ou lentement, avec ou sans DMSO, ont une coloration brune à  $J_0$  et à  $J_2$ , ils montrent une forte contraction des cellules (*fig. 3*). Par ailleurs, ils apparaissent brun-vert à  $J_6$ .

Les gamétophytes ayant subi une congélation à -196°C montrent également à  $J_0$  une coloration brune et des cellules fortement contractées à l'exception de ceux traités de la façon suivante : refroidissement dans le DMSO jusqu'à -15°C puis immersion dans l'azote liquide et enfin réchauffement rapide (*tableau 3*). Les cellules de ces derniers prennent, toutefois, un aspect contracté au 2<sup>e</sup> jour de culture ( $J_2$ ). Par ailleurs, quelle que soit la vitesse de réchauffement, la perte de la coloration brune est plus précoce quand les gamétophytes, conservés dans le DMSO,

**Tableau 2.** — Morphologie externe des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* après conservation à  $-196^{\circ}\text{C}$  (expérience 2) : effets de la durée de conservation à  $-196^{\circ}\text{C}$ , de la concentration en glycérol et du temps de culture après la décongélation.

*External morphology of Undaria pinnatifida after freezing to  $-196^{\circ}\text{C}$  (experiment 2): effects of the storage duration at  $-196^{\circ}\text{C}$ , glycerol concentration and breeding time after thawing.*

		DUREE DE CONSERVATION A $-196^{\circ}\text{C}$ ET CONCENTRATION GLYCEROL							
		1-2 h		3 j		7 j		14 j	
		TEMOIN	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%
TEMPS DE CULTURE	J <sub>0</sub>								
	J <sub>4</sub>								
	J <sub>7</sub>								
	J <sub>8</sub>								
	J <sub>14</sub>								

1 (*brown gametophyte*).

2 (*brown-green gametophyte*).

3 (*green gametophyte*).

sont directement immergés dans l'azote liquide à partir de  $-30^{\circ}\text{C}$  (J<sub>2</sub>) que lorsqu'ils le sont à partir de  $-15^{\circ}\text{C}$  (J<sub>4</sub>).

**DISCUSSION**

Nos études montrent que les méthodes de cryoconservation employées pour les microalgues (expérience 1 et 2) ne permettent qu'une survie réduite des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*. En effet, la durée de cette survie n'excède pas 9 jours après une conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une solution glycérolée à 28 % (expérience 1), et 4 jours après un stockage à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans une solution en eau de mer de glycérol à 10 % (expérience 2). Dans ces deux études, la durée de stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$  (jusqu'à 39 jours) ou à  $-196^{\circ}\text{C}$  (jusqu'à 14 jours) ne modifie pas la viabilité des gamétophytes. Par ailleurs, avec un refroidissement et un réchauffement contrôlés (expérience 3), la survie des gamétophytes n'est pas affectée par une conservation de 15 minutes à  $-15^{\circ}\text{C}$  sans milieu de cryoprotection mais est fortement diminuée par un stockage de 15 minutes à  $-30$  ou  $-196^{\circ}\text{C}$ , même en présence de DMSO. Ces résultats démontrent une résistance

naturelle des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* à un refroidissement temporaire jusqu'à  $-15^{\circ}\text{C}$  mais ils prouvent aussi que la conservation à des températures inférieures réduit la viabilité. A  $-15^{\circ}\text{C}$ , l'eau de mer ou les solutions de DMSO extracellulaires sont cristallisées (températures de cristallisation enregistrées : eau de mer :  $-2,2^{\circ}\text{C}$ ; DMSO à 5 % :  $-4,6^{\circ}\text{C}$ ; DMSO à 10 % :  $-7,0^{\circ}\text{C}$ ; DMSO à 15 % :  $-10,1^{\circ}\text{C}$ ). En revanche, n'ayant pas effectué d'observations des gamétophytes au cours de leur refroidissement, nous ne pouvons pas confirmer la prise en glace du milieu cellulaire. Les critères de glace étant principalement reconnus responsables des dommages causés par la congélation (Mazur, 1963), les survies enregistrées à  $-15^{\circ}\text{C}$  pourraient n'être dues qu'à la persistance de la surfusion (état instable d'une solution aqueuse entre sa phase liquide et sa phase solide) du milieu cellulaire.

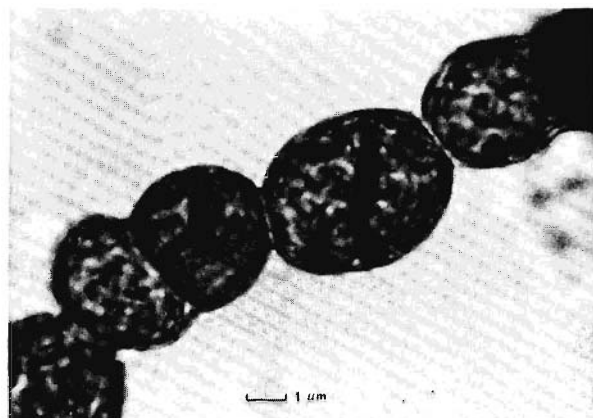
Si la viabilité des gamétophytes n'est pas affectée par un refroidissement à  $-15^{\circ}\text{C}$ , en revanche, celle-ci est fortement réduite après une immersion directe dans l'azote liquide à partir de  $-15^{\circ}\text{C}$ . En conséquence, le refroidissement rapide à  $-196^{\circ}\text{C}$  à partir de  $-15^{\circ}\text{C}$  est néfaste à la viabilité des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*.

	temp. de stockage °C	réchauff!	TEMPS DE CULTURE					
			J0	J2	J4	J5	J6	J7
témoin 1	22							
témoin 2	-15	rapide						
		lent						
	-30	rapide						
		lent						
	-196*	rapide						
		lent						
	-196**	rapide						
		lent						
DMSO 5%	-15	rapide						
		lent						
	-30	rapide						
		lent						
	-196*	rapide						
		lent						
	-196**	rapide						
		lent						
DMSO 10%	-15	rapide						
		lent						
	-30	rapide						
		lent						
	-196*	rapide						
		lent						
	-196**	rapide						
		lent						
DMSO 15%	-15	rapide						
		lent						
	-30	rapide						
		lent						
	-196*	rapide						
		lent						
	-196**	rapide						
		lent						

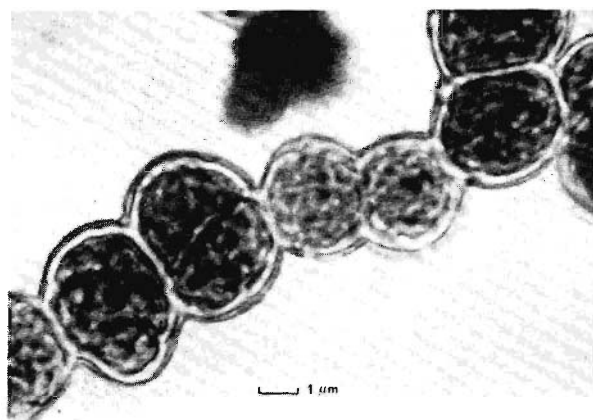
**Tableau 3.** — Morphologie externe des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* après conservation à  $-15$ ,  $-30$  ou  $-196^{\circ}\text{C}$  (expérience 3) : effets de la concentration en DMSO, de la vitesse de réchauffement et du temps de culture après la décongélation. \* gamétophytes immergés dans l'azote liquide après passage à  $-15^{\circ}\text{C}$ . \*\* gamétophytes immergés dans l'azote liquide après passage à  $-30^{\circ}\text{C}$ .

*External morphology of Undaria pinnatifida gametophytes after freezing to  $-15$ ,  $-30$  or  $-196^{\circ}\text{C}$  (experiment 3): effects of DMSO concentration, warming rate and breeding time after thawing. \* gametophytes plunged in liquid nitrogen from  $-15^{\circ}\text{C}$ . \*\* gametophytes plunged in liquid nitrogen from  $-30^{\circ}\text{C}$ .*

- 1 *normal brown gametophyte;*
- 2 *contracted brown gametophyte;*
- 3 *contracted brown-green gametophyte;*
- 4 *contracted green gametophyte.*



A



B

**Figure 3.** — Effet de la conservation à  $-30$  et  $-196^{\circ}\text{C}$  sur la morphologie externe des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*: A, gamétophytes conservés à  $22^{\circ}\text{C}$  (témoin); B, gamétophytes immédiatement après leur décongélation.

*Effect of the storage at  $-30$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  on the external morphology of *Undaria pinnatifida* gametophytes. A, control gametophytes; B, post-thawed gametophytes.*

Quels qu'en soient les mécanismes responsables, les baisses de survie enregistrées dans nos études témoignent des mauvaises propriétés cryoprotectrices de la solution glycérolée et des solutions eau de mer-glycérol ou eau de mer-DMSO. La pénétration de ces substances dans les cellules est généralement indispensable à l'action cryoprotectrice (Miyamoto et Ishibashi, 1986). Cette pénétration est étroitement liée à la perméabilité des membranes cellulaires. Les perméabilités des membranes cytoplasmiques et squelettiques des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* vis-à-vis du glycérol ou du DMSO ne sont malheureusement pas connues. Il n'est donc pas certain que la concentration intracellulaire en cryoprotecteur au moment de la congélation ait été suffisante pour permettre une

bonne protection. Des concentrations en cryoprotecteur plus élevées ou/et des durées d'exposition des cellules aux cryoprotecteurs plus longues pourraient être un moyen d'obtenir une meilleure protection de ces substances.

Dans toutes les expériences, la réduction de la survie des gamétophytes se traduit principalement par une modification de la coloration des cellules qui passent progressivement du brun au brun-vert puis au vert, avant de perdre toute pigmentation. Ce phénomène, significatif de la mort des gamétophytes, dévoile une forte sensibilité à la conservation à basse température des pigments jaune-orange (constitués de caroténoïdes) et verts (composés de chlorophylles) qui forment le complexe pigmentaire des algues laminariales (Gayral, 1975); le pigment jaune-orange apparaît, en outre, plus sensible que le pigment vert. Des constatations similaires ont été effectuées avec des microalgues marines : les espèces brunes résistent moins bien à une conservation à  $-85^{\circ}\text{C}$  que les espèces vertes (Goguenheim, comm. pers.). Ce phénomène de fragilité des pigments ne peut être expliqué pour le moment. Néanmoins, la tolérance des gamétophytes à une exposition de 220 minutes au glycérol ou au DMSO à 10 % à température ambiante (résultats non publiés) témoigne que les pigments ne sont pas affectés par les cryoprotecteurs. Il a également été démontré que la reprise de la croissance de méristèmes nécessite souvent des temps de latence après la décongélation : 2 à 3 jours chez l'œillet, 7 à 10 jours chez le fraisier, 2 semaines chez le manioc (Dereudde *et al.*, 1988). Un tel processus pourrait aussi avoir lieu chez les gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*. Dans ce cas, leur remise en culture immédiatement après le réchauffement pourrait nécessiter des conditions de température, d'éclairement et de milieu nutritif particulières.

Les cellules des gamétophytes ayant subi une congélation à  $-30$  ou  $-196^{\circ}\text{C}$  (expérience 3) présentent souvent un aspect contracté immédiatement après leur décongélation ou les jours suivants. Pour Steponkus (1984), cette forme de lésion communément observée chez les organismes végétaux tués par la congélation (Levitt, 1972) correspond à une plasmolyse des cellules due à une perte de leur propriété osmorégulatrice. En effet, au cours de la congélation, les cellules subissent une déshydratation qui provoque leur contraction (Mazur, 1963). La perte de réponse osmotique pourrait donc correspondre à une altération de la perméabilité de la membrane plasmique lors de la contraction. Par ailleurs, Dowgert et Steponkus (1982) ont montré que la membrane plasmique de protoplastes peut être lésée par une exposition à une solution hypertonique mais que ces lésions sont moins importantes chez les protoplastes acclimatés au froid que chez ceux non acclimatés. Les protoplastes acclimatés résistent également mieux à de fortes contractions que ceux non acclimatés. Cette différence d'aptitude vis-à-vis des contractions osmotiques s'explique

par des modifications morphologiques et structurales de la membrane plasmique (Pomeroy et Siminovitch, 1971; Niki et Sakai, 1981). De telles modifications n'ont pas encore été étudiées chez les gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*. Toutefois, nous avons observé un épaississement de la membrane cytoplasmique et/ou de la membrane squelettique de gamétophytes exposés à 28-30°C (Pérez et al., 1984). Ces gamétophytes se développant normalement, l'épaississement de leur(s) membrane(s) constitue donc une forme d'acclimatation à l'élévation de la température. En outre, la résistance naturelle des gamétophytes à un refroidissement de 15 minutes à -15°C constaté dans cette étude et leur survie pendant 1 semaine à 5°C (résultats non publiés) peuvent suggérer qu'il existe un mécanisme d'acclimatation des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* aux températures inférieures à la normale. L'influence de cette acclimatation des gamétophytes sur leur résistance à la congélation reste à déterminer.

Il a également été démontré que la survie des cellules d'intestin humain est affectée par la libération de cadavérine et de putrécine des cellules mortes (Weil, 1972). La production de telles substances toxiques chez les gamétophytes morts d'*Undaria pinnatifida* n'a pas, jusqu'à présent, été établie. Néanmoins, sans remettre en cause notre interprétation des résultats, l'influence, au cours de la culture, des gamétophytes morts sur les gamétophytes vivants ne peut totalement être exclue.

## CONCLUSION

Bien que ces résultats ne constituent qu'une étude préliminaire pour la cryoconservation des gamétophytes de l'algue *Undaria pinnatifida*, ils apportent d'utiles informations sur la tolérance de ces organismes. Premièrement, les méthodes de conservation employées pour les microalgues ne sont pas applicables dans leur totalité aux gamétophytes d'*Undaria pinnatifida*. Ceux-ci nécessitent donc la mise au point d'une méthode spécifique. Deuxièmement, l'effet délétère de la conservation à basses températures se traduit morphologiquement par une dépigmentation et/ou une contraction des cellules. Troisièmement, les gamétophytes ont une résistance naturelle à un refroidissement temporaire à -15°C. Ce dernier résultat ainsi que l'importante capacité d'adaptation des gamétophytes et leur simplicité de structure nous permettent néanmoins d'envisager la cryoconservation de ces organismes dans un proche avenir.

## RÉFÉRENCES

- Ben Amotz A., A. Gilboa, 1980a. Cryopreservation of marine unicellular algae. I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2, 157-161.
- , 1980b. Cryopreservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2, 221-224.
- Boude J. P., Y. Negro, A. Fauchoux, B. Simon, 1988. Le marché des algues alimentaires dans le monde en 1987: place d'*Undaria pinnatifida*. Publ. Dép. Halieut. n° 8, ENSAR Rennes, 47 p.
- Boude J. P., A. Do, S. Gouin, C. Hoang, Y. Negro, J. P. Reveret, 1989. Le marché nord-américain de *Undaria pinnatifida*. Publ. Dép. Halieut. n° 10, ENSAR Rennes, 76 p.
- Cassidanius A., C. Marcaillou, J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, D. Boudard, 1990. Essai de conservation d'algues phytoplanctoniques, *Tetraselmis suecica*, par congélation. XII<sup>e</sup> Réunion du Groupe Français de Cryobiologie, Marseille, 13-15 décembre 1989 (*sous presse*).
- Dereuddre J., C. Bassaglia, A. Bertrand-Desbrunais, S. Blandin, F. Engelman, J. Fabre, M. Galerne, C. Gazeau, C. Morisset, D. Yilmaz, 1988. Applications des très basses températures à la conservation des cultures de cellules et d'organes végétaux. *Rev. gén. froid*, 400-411.
- Dowgert M. F., P. L. Steponkus, 1982. Resting tension of the plasma membrane of isolated protoplasts following osmotic contraction and expansion: influence of cold acclimation. *Plant Physiol.*, 69, 119 (Suppl.).
- Fritsch F. E., 1971. The structure and reproduction of the algae. Vol. I. Introduction Chlorophyceae, Xanthophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Cryptophyceae, Dinophyceae, Chloromonadineae, Euglenineae, Colourless, Flagellata. 1 Vol. *Cambridge University Press*, 791 p., 245 fig.
- , 1972. The structure and reproduction of the algae, Vol. II. Forward Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, 1 Vol. *Cambridge University Press*, 939 p., 336 fig.
- Gayral P., 1975. Les algues: morphologie, cytologie, reproduction, écologie. Doin, Paris, 166 p.
- Gilboa A., A. Ben Amotz, 1978. An improved method on rapid assaying of viability of cryopreserved unicellular algae. *Plant. Sci. Letters*, 14, 317-320.
- Kaas R., R. Pérez, C. Vinot, P. Durand, 1987. *Undaria pinnatifida*, culture et valorisation. Recent progress in algal biotechnology. Société pour l'algologie appliquée, 14-17 sept. 1987, C 24.
- Levitt J., 1972. Responses of plants to environmental stresses. New York Academic, 697 p.
- Matsuyama M., 1985. Fisheries statistics of Japan. Statistics and information department, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan, 64 p.
- Mazur P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, 47, 347-369.
- Meryman H. T., M. Hornblower, 1977. A simplified procedure for deglycerolysing red blood cells frozen in a high glycerol concentration. *Transfusion*, 17, 438-442.



- Miyamoto H., T. Ishibashi, 1986. The effects of time of equilibration with cryoprotectants at 0°C prior to freezing on the survival of mouse embryos frozen by two-step method. *Experientia*, **42**, 815-816.
- Niki T., A. Sakai, 1981. Ultrastructural changes related to frost hardiness in the cortical parenchyma cells from mulberry twigs. *Plant Cell Physiol.*, **22**, 171-183.
- Pérez R., J. Y. Lee, C. Juge, 1981. Observations sur la biologie de l'algue japonaise *Undaria pinnatifida* (Harvey) suringar, introduite accidentellement sur les côtes de France. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, **317**, 1-12.
- Pérez 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.*, **323**, 1-15.
- Pomcroy M. K., D. Siminovitch, 1971. Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* in relation to cold hardiness. *Can. J. Bot.*, **49**, 787-795.
- Saks N. M., 1978. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology*, **15**, 563-568.
- Steponkus P. L., 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543-584.
- Weil J. M., 1972. *Biochimie générale*. Masson, Paris, 394 p.