



**SODIM**

Société de développement de l'industrie maricole inc.

*Amélioration des techniques de culture des  
algues marines : culture in vitro de semences  
de la laminaire à long stipe et ensemencement  
de cordes de culture*

*Rapport final*

---

*Dossier n° 710.118*

*Rapport commandité par la SODIM*

*Octobre 2008*

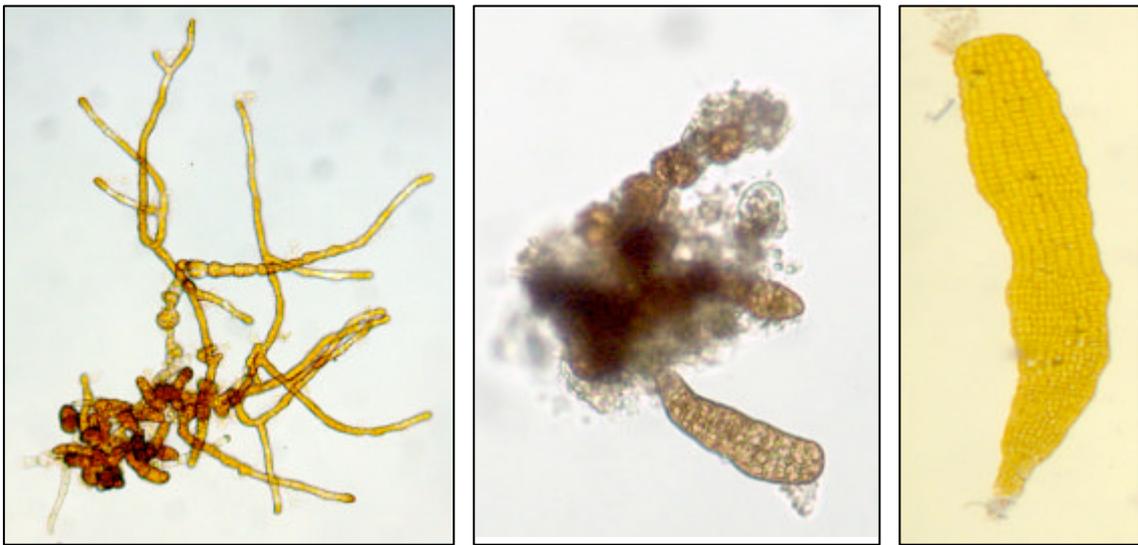
PROGRAMME D'AIDE À LA RECHERCHE TECHNOLOGIQUE

*PROJET DE RECHERCHE AUTONOME :*

**AMÉLIORATION DES TECHNIQUES DE CULTURE DES ALGUES  
MARINES : CULTURE *IN VITRO* DE SEMENCES DE LA  
LAMINAIRE À LONG STIPE ET ENSEMENCEMENT DE CORDES  
DE CULTURE**

---

## RAPPORT FINAL



MARIE-JOËLLE LEBLANC, ÉRIC TAMIGNEAUX ET MARIE-LYNE LARRIVÉE

**HALIEUTEC**

(CENTRE COLLÉGIAL DE TRANSFERT DE TECHNOLOGIE DES PÊCHES)  
CÉGEP DE LA GASPÉSIE ET DES ÎLES

## RÉSUMÉ

Code du projet (MELS) : PART 2007N003

**Titre** : Amélioration des techniques de culture des algues marines : culture *in vitro* de semences de la laminaire à long stipe et ensemencement de cordes de culture

**Par** : Marie-Joëlle Leblanc, Éric Tamigneaux et Marie-Lyne Larrivée

---

**Établissement** : Cégep de la Gaspésie et des Îles

**CCTT** : HALIEUTEC, Centre collégial de transfert de technologie des pêches

**Durée** : 6 mois

---

**Résumé** : Le présent travail a permis d'adapter à la laminaire à long stipe (*Saccharina longicuris*) une méthode d'induction artificielle de la sporogénèse et une méthode de culture des gamétophytes *in vitro* (culture en free-living) initialement mises au point pour d'autres espèces de laminaires. Les tests se sont déroulés de mars à octobre 2008 et comprenaient la récolte de sporophytes sur la côte sud de la Gaspésie, l'induction artificielle de la sporogénèse, la libération et la germination des zoospores, la culture en free-living, ainsi que l'ensemencement de cordes de culture. Tout d'abord, les résultats de l'étude ont montré que l'amputation de la zone méristématique couplée à une photopériode artificielle de jours courts et constants dans une eau à 10 °C permet d'initier, en hiver et en été, l'apparition des sores et leur maturation sur des plants initialement immatures. Ceci suggère que chez *S. longicuris*, comme chez d'autres espèces de laminaires, la zone méristématique à la jointure du stipe et de la fronde sécrèterait un facteur d'inhibition de sporulation. Ensuite, le suivi du sex-ratio a démontré que la proportion des gamétophytes femelles augmente rapidement pour dominer (>80%) la population des gamétophytes cultivés en free-living. En fait, l'augmentation du nombre de filaments femelles survient juste après que les cultures aient été passées au mélangeur, tandis que le nombre de brins mâles reste stable. Des modifications au protocole sont proposées pour éviter cette situation. Malgré le déséquilibre dans le sex-ratio avant l'ensemencement des cordes de culture, la fécondation des gamétophytes femelles et le développement de plantules de 0,3 à 0,7 mm de long sur les cordes a été observé après 30 jours. En ce qui concerne l'effet du type de corde de culture sur le succès de l'ensemencement par la suspension de gamétophytes, c'est la corde de kuralon qui a donné les meilleurs résultats en terme de densité d'ensemencement et de développement des plantules. La meilleure alternative au kuralon est le nylon râpé et brûlé. Par ailleurs, il faut prendre garde d'utiliser une source d'air comprimé suffisamment puissante pour insérer les filaments de gamétophytes entre les fibres de la corde. En conclusion, les méthodes testées ici permettent de diversifier les stratégies de culture de *S. longicuris*. Le cultivateur peut désormais s'affranchir des limites que constitue l'approvisionnement en géniteurs matures dans le milieu naturel et il peut ainsi réensemencer des cordes de culture à tout moment de l'année.

---

Laurent Millot, directeur de HALIEUTEC

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé .....</b>	<b>2</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>7</b>
<b>La culture de laminaires en free-living .....</b>	<b>8</b>
<b>Le cycle vital des laminaires .....</b>	<b>10</b>
<b>Les objectifs du projet.....</b>	<b>11</b>
<b>Méthodologie .....</b>	<b>12</b>
<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>20</b>
1. Induction artificielle de la maturité .....	20
2. Suivi du sex-ratio .....	23
3. Types de cordes .....	24
4. Position sur le collecteur .....	29
<b>Conclusions et recommandations .....</b>	<b>31</b>
<b>Diffusion des résultats et retombées .....</b>	<b>34</b>
<b>Crédits .....</b>	<b>35</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>36</b>
<b>Annexe 1. Protocole de l'induction artificielle de la maturité des organes fertiles (sores) ....</b>	<b>38</b>
<b>Annexe 2. Protocole de l'induction de la sporulation.....</b>	<b>42</b>
<b>Annexe 3. Protocole de culture en free-living .....</b>	<b>47</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1.</b> Calendrier de récolte des géniteurs en milieu naturel.....	12
<b>Tableau 2.</b> Calendrier des cultures en free-living.....	15
<b>Tableau 3.</b> Description des cordes testées.....	18
<b>Tableau 4.</b> Sommaire des résultats des tests sur l'induction artificielle de la maturité.....	20

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Cycle vital de la laminaire <i>Saccharina longicuris</i> .....	10
<b>Figure 2.</b> Gamétophyte femelle (A) et amas de gamétophytes mâles (B) dans les cultures en free-living (grossissement 10 X 10).....	14
<b>Figure 3.</b> Pulvérisation d'une solution de gamétophytes sur un collecteur .....	16
<b>Figure 4.</b> Jeune sporophyte visible au microscope (10 X 40), 20 jours après ensemencement sur des cordes de culture.....	17
<b>Figure 5.</b> Frondes de laminaires maintenues pendant 50 jours à plat sur un support en filet dans des conditions de température et de photopériode contrôlée. Témoin = frondes intactes. Coupe 20 cm = fronde amputées à 20 cm de la jointure stipe-fronde. Coupe 30 cm = fronde amputées à 30 cm de la jointure stipe-fronde. Coupe 40 cm = fronde amputées à 40 cm de la jointure stipe-fronde.....	21
<b>Figure 6.</b> Fragment de fronde avec sore centrale bien développée après 21 jours en mouvement dans un bassin avec des conditions de température et de photopériode contrôlée.....	22
<b>Figure 7.</b> Pourcentage (%) de gamétophytes femelles par rapport au total des gamétophytes dans les cultures en free-living S1, S2, S3 et S4. Barre verticale : utilisation du mélangeur électrique pour fragmenter les gamétophytes mâles et femelles.....	24
<b>Figure 8.</b> Position des différents collecteurs dans les aquariums (A1 et A2) mis en incubation le 18 juin 2008. 1 : nylon ; 2 : nylon fuzzy ; 3 : ficelle verte ; 4 : jute grosse ; 5 : jute petite ; 6 : corde en sysal ; 7 : laine ; 8 : ficelle de maçon.....	25
<b>Figure 9.</b> Position des différents collecteurs dans l'aquarium mis en incubation le 4 août 2008. 1 : nylon ; 2 : nylon fuzzy ; 7 : laine ; 9 : kuralon.....	26
<b>Figure 10.</b> Nombre d'algues par 100 mm de corde selon le type de corde. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.....	27
<b>Figure 11.</b> Longueur moyenne (mm) des algues selon le type de corde. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.....	27
<b>Figure 12.</b> Indice de longueur totale (nombre d'algues * longueur moyenne en mm) par 100 mm de corde selon le type de corde. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.....	28
<b>Figure 13.</b> Nombre d'algues par 100 mm de corde selon la position sur le collecteur. Barre d'erreur: intervalle de confiance à 95%. $R^2$ : coefficient de détermination.....	29
<b>Figure 14.</b> Longueur moyenne (mm) des algues selon la position sur le collecteur. Barre d'erreur: intervalle de confiance à 95%. $R^2$ : coefficient de détermination.....	30
<b>Figure 15.</b> Indice de longueur totale (nombre d'algues * longueur moyenne en mm) par 100 mm de corde selon la position sur le collecteur. Barre d'erreur: intervalle de confiance à 95%. $R^2$ : coefficient de détermination.....	30

**LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1.** Protocole de l'induction artificielle de la maturité des organes fertiles  
(sores)..... 38

**Annexe 2.** Protocole de l'induction de la sporulation.....42

**Annexe 3.** Protocole de la culture en free-living.....47

## INTRODUCTION

Depuis quelques années, plusieurs entreprises québécoises s'intéressent à l'exploitation des algues marines. Ces entreprises s'approvisionnent principalement en algues sauvages mais étant donné les limites imposées par le Ministère des Pêches et des Océans et les difficultés de la cueillette en mer, elles s'orientent progressivement vers la culture. La culture des algues comporte plusieurs avantages importants par rapport à la cueillette d'algues sauvages. Elle favorise notamment une production homogène et de qualité supérieure. En outre, le volume de production et le temps de récolte peuvent être contrôlés. Finalement, la culture assure la protection des stocks naturels. Il n'est donc pas étonnant que 92% de l'approvisionnement mondial en algues proviennent de cultures marines pour une valeur de 5,7 milliards de US\$ (Anonyme, 2006 ; Druehl, 1999).

Avec le présent projet, Halieutec (Centre collégial de transfert de technologie des pêches) souhaite adapter à la laminaire à long stipe (*Saccharina longicuris*<sup>1</sup>) une nouvelle méthode de culture *in vitro*. Cette méthode aurait l'avantage de donner au cultivateur d'algues un meilleur contrôle de son calendrier de production, tout en s'affranchissant du cycle naturel de maturation des laminaires. Il s'agit tout particulièrement de résoudre deux verrous technologiques qui ont été identifiés lors de travaux exploratoires réalisés par Halieutec en 2006. Ce projet qui vise l'amélioration des techniques de culture des laminaires vient en appui au développement industriel des régions côtières et pourra contribuer à la diversification de l'industrie maricole au Québec.

---

<sup>1</sup> *Laminaria longicuris* de la Pylaie, dans l'ancienne nomenclature.

## LA CULTURE DE LAMINAIRES EN FREE-LIVING

Jusqu'à présent, la production des laminaires au Québec est basée sur la technique de culture asiatique. Cette technique repose sur l'ensemencement de cordes de culture avec les spores extraites de plants sauvages récoltés en mer (Pérez *et al.*, 1990). Dans l'est du Canada, les laminaires sont connues pour se reproduire principalement en automne (Chapman, 1987). De ce fait, il n'y a qu'une seule récolte par an puisque la méthode de culture dépend du cycle reproducteur naturel des laminaires. Le principal inconvénient est qu'en cas de perte accidentelle (tempête, maladie, prédateurs), il est rarement possible de réensemencer immédiatement les cordes de culture.

Il existe cependant une méthode de culture alternative qui permet de conserver pendant plusieurs mois des semences microscopiques de laminaires. Les semences sont des spores qui ont germé et se sont divisées, pour former des filaments potentiellement mâles et femelles (gamétophytes, Figures 1 et 2). La maturation sexuelle des filaments est alors volontairement inhibée et ceux-ci sont conservés vivants, en suspension dans des bouteilles remplies de milieu de culture. Les bouteilles sont ensuite placées dans un incubateur à cultures végétales. C'est ce qu'on appelle la culture en free-living. La maturation sexuelle des filaments peut ensuite être réactivées à volonté, juste avant de transférer ceux-ci sur les cordes de culture. Ceci permet la fécondation et le développement de nouvelles plantules macroscopiques (sporophytes) sur les cordes.

La technique du free-living permet de réensemencer en tout temps les cordes destinées aux cultures en mer (Pérez *et al.*, 1990). La culture de semences en free-living possède également d'autres avantages dans le contexte d'une production de laminaires cultivées. D'une part, elle permet de multiplier indéfiniment la quantité de semences dont on dispose. D'autre part, ce procédé requiert moins de temps et de main-d'œuvre pour les opérations d'écloserie que dans la méthode traditionnelle de production de plantules. Il réduit aussi les sources de contamination, donc de pertes. Finalement, le free-living facilite les travaux d'amélioration génétique des souches de cultures par sélection, croisement et hybridation (Druehl *et al.*, 2005).

Dans la littérature scientifique il a été démontré que le nombre de cellules des gamétophytes mâles et femelles augmente avec la température du milieu de culture (Pérez *et al.*, 1992 ; Andersen, 2005). Au delà d'une température limite (19 °C chez *L. Japonica* ; 21 °C chez *Undaria pinnatifida*; 14 °C chez *Alaria esculenta*) ou bien lorsque les gamétophytes sont soumis à une lumière rouge, la production de gamètes est temporairement suspendue et les gamétophytes, maintenus au stade végétatif infertile, s'accroissent indéfiniment (Pérez *et al.*, 1992 ; Andersen, 2005; Arbonna et Mola, 2006). La culture en free-living est précisément basée sur ce principe. Les tests préliminaires menés par Halieutec en 2006 ont montré que la maturation des gamétophytes de *S. longicruris* est bien inhibée lorsque les cultures en suspension sont conservées sous lumière rouge et que la quantité de filaments s'accroît rapidement.

Normalement, le retour à la lumière blanche et/ou à une température de 10 °C provoque la maturation des gamétophytes. Ensuite, une alternance de lumière et d'obscurité provoque l'émission des gamètes, la fécondation et le développement d'une plantule. Cependant, lors des tests préliminaires menés par Halieutec, il n'a jamais été possible d'obtenir des plantules de *S. longicruris* après ensemencement des cordes de culture avec les filaments gamétophytes maintenus en free-living.

Une des explications serait que, dans les cultures expérimentales trop anciennes, la répartition des sexes évolue parfois vers une population monosexue mâle ou femelle, ce qui nécessiterait de mélanger plusieurs cultures pour rétablir l'équilibre (50% mâles et 50% femelles) avant l'ensemencement des cordes (Pérez *et al.*, 1992). Il est possible également que la corde de nylon tressée utilisée jusqu'ici ne permette pas de retenir les filaments. Dans la littérature technique, il est mentionné que l'utilisation de cordes pelucheuses et hydrophiles comme le kuralon améliore le succès de l'ensemencement des gamétophytes et la croissance des plantules (*idem*). Dans le présent projet il est proposé de reprendre ces travaux de façon systématique pour tenter de résoudre ces deux problèmes.

## LE CYCLE VITAL DES LAMINAIRES

Le cycle vital des laminaires est bien connu. Ces algues manifestent une alternance de génération dans leur développement (Figure 1). Le sporophyte macroscopique (diploïde;  $2N$ ) alterne avec le gamétophyte microscopique (haploïde;  $N$ ) (Pérez *et al.*, 1992). Le sporophyte est une plante complète qui recouvre les fonds marins rocheux. Il est composé d'un crampon, d'un stipe et d'une lame (Figure 1). Lorsqu'il est mature, en automne, le sporophyte développe sur sa lame des structures appelées sores. Chez *S. longicruris*, les plants fertiles portent leurs sores sur la partie distale de la lame. Les sores contiennent les zoospores, des spores mobiles qui possèdent deux flagelles. Lorsqu'ils sont libérés des sores, ils nagent puis se déposent et adhèrent au fond. Une fois fixés, les zoospores perdent leurs flagelles et germent en un filament microscopique ramifié qui évoluera en un gamétophyte mâle ou femelle. Ceux-ci produiront alors respectivement des gamètes mâles et femelles. Lors de la fertilisation, les gamètes fusionnent pour former un zygote ( $2N$ ) qui se développera durant l'hiver pour former une jeune plantule macroscopique (sporophyte). Au printemps suivant, le sporophyte aura l'aspect d'une jeune pousse avec toutes les parties caractéristiques de l'algue (fronde, stipe, crampon).

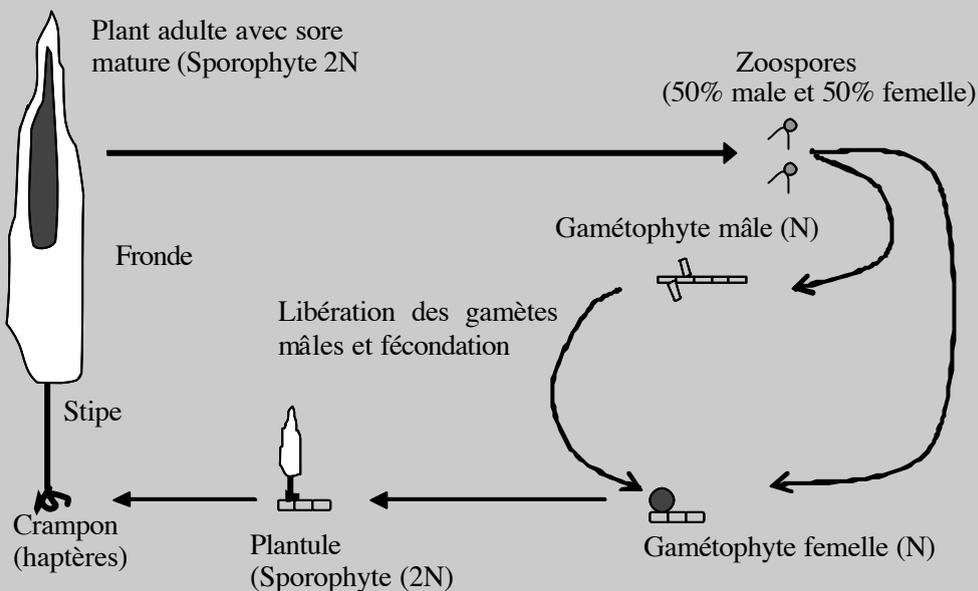


Figure 1. Cycle vital de la laminaire *Saccharina longicruris*.

## LES OBJECTIFS DU PROJET

En appui aux entreprises d'algoculture, Halieutec a réalisé plusieurs projets de culture de la laminaire à long stipe en Gaspésie. Un projet est actuellement en cours avec l'Institut Maurice-Lamontagne (Ministère des Pêches et des Océans, Mont-Joli) et l'entreprise *Les gaspésiennes-algues de Gaspésie* pour déterminer les vitesses de croissance mensuelles des laminaires cultivées en mer sur filières flottantes ainsi que l'impact des bio-salissures marines sur les algues. Les laminaires utilisées pour ces projets ont été produites dans les installations d'Halieutec en utilisant la technique de culture asiatique classique, bien maîtrisée par nos chercheurs et techniciens. De nos jours, ces aspects de la culture sont bien documentés (Pérez *et al.*, 1992 ; Andersen, 2005).

Pour ce qui est de la culture de semences de laminaires en free-living, celle-ci a été expérimentée avec succès dans l'hémisphère nord pour les espèces suivantes : *Undaria pinnatifida* (Pérez *et al.*, 1990), *Alaria esculenta* (Kraan et Guiry, 1998 ; Arbonna et Molla, 2006), *Laminaria japonica* (Pérez *et al.*, 1992) et *Laminaria saccharina* (Peteiro *et al.*, 2006). Toutefois, peu d'informations sont disponibles quant à l'application de cette technique à la culture de *Saccharina longicuris*. Raymond Kaas (IFREMER, Laboratoire d'algoculture de Nantes) nous a confirmé qu'aucun test n'avait jusqu'à présent été réalisé sur cette espèce. De plus, M. Kaas se montre assez confiant en la possibilité d'adapter cette méthode à *S. Longicuris*. Dans ce contexte, il s'avère donc nécessaire d'adapter la méthode du free-living à l'espèce cultivée au Québec et de faire la démonstration de sa faisabilité aux algoculteurs.

Les objectifs du projet sont donc de :

- 1) Vérifier si le rétablissement du sex-ratio dans les cultures en free-living avant l'ensemencement des cordes permet la fécondation des gamétophytes femelles et le développement des plantules.
- 2) Tester différents types de cordes de culture disponibles au Québec pour déterminer laquelle permet le meilleur ensemencement par les filaments du free-living et le développement des plantules.

## MÉTHODOLOGIE

1. Récolte de plants sauvages fertiles (géniteurs). De janvier 2008 à septembre 2008, plusieurs récoltes de laminaires ont été effectuées le long de la côte sud de la Gaspésie. À chaque fois, une dizaine d'exemplaires de plants adultes, parfois porteurs de sores matures, étaient sélectionnés. Les algues étaient soit cueillies dans les herbiers naturels de Percé par une équipe de deux plongeurs, soit ramassées sur les plages de Grande-Rivière suite à un échouage. A une occasion des laminaires à long stipe dérivant en surface ont été récoltées à Paspébiac (Tableau 1). Les plongées nécessitaient environ 3 heures de travail.

**Tableau 1.** Calendrier de récolte des géniteurs en milieu naturel.

Date	Type de récolte	Lieu	Présence/absence de sore mature
22 janvier 2008	Pêche à pied	Anse Mc-Innis	Absence
10 juillet 2008	Plongée	Percé	Absence
28 juillet 2008	Plongée	Percé	Absence
4 septembre 2008	Plongée	Percé	Présence partielle
10 septembre 2008	Pêche à pied	Plage de l'Anse-à-Beaufils	Présence
24 septembre 2008	Algues dérivantes en mer	Paspébiac	Présence
27 septembre 2008	Algues échouées sur la plage	Pabos	Présence

2. Induction artificielle de la maturité (sporogénèse). Il a été démontré expérimentalement que la maturation des plants de *L. Saccharina* peut être induite artificiellement en séparant la partie distale de la lame de la partie proximale et en ajustant la température et la photopériode (Pang et Lüning, 2004). Étant donné que certaines des lames recueillies au printemps et en été étaient

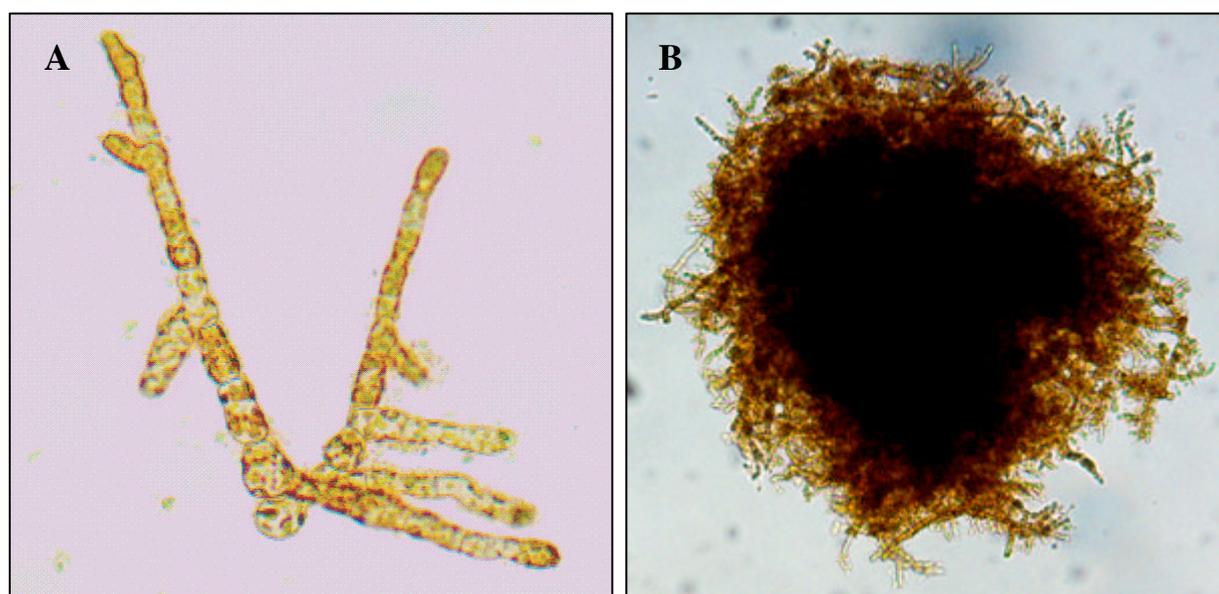
immatures ou peu matures, nous avons appliqué cette méthode à *S. longicuris* pour augmenter le succès des sporulations chez les lames immatures. À l'arrivée chez Halieutec, les lames immatures étaient coupées 30 cm au-dessus du point d'attache du stipe, identifiées par un numéro et immergées immédiatement dans un bassin isolé de la lumière naturelle, avec une forte aération et un débit d'eau modéré à 10 °C. Des tubes fluorescents suspendus au dessus du bassin permettaient de contrôler l'intensité lumineuse et la photopériode. Le protocole utilisé pour l'induction artificielle de la maturité est fourni à l'Annexe 1.

3. Libération des zoospores. À l'écloserie, les sores matures ont été découpées et chaque morceau a été soigneusement brossé, désinfecté dans plusieurs solutions et finalement asséchés. Les sores propres et sèches étaient ensuite exposées pendant une nuit à l'air pour provoquer une déshydratation partielle. Le lendemain, les sores étaient réhydratés dans de l'eau de mer stérile, ce qui provoquait la libération des spores. Si la libération des spores échouait, les sores étaient placées dans un dessiccateur de laboratoire rempli de drierite, lequel était maintenu pendant 3 heures dans un frigo à 10 °C, à l'obscurité. Ensuite, la solution de spores était filtrée à travers plusieurs tamis pour retirer les épiphytes, les débris et les colloïdes libérés avec les spores. Le filtrat contenant les spores était immédiatement transvasé dans les récipients servant à la germination. Le protocole utilisé pour l'induction de la sporulation est fourni à l'Annexe 2.

4. Germination des spores et culture en free-living (Annexe 3). Les spores mobiles étaient directement transférées dans des ballons de culture en verre. Ceux-ci étaient remplis d'eau de mer stérile, contenant du milieu de culture et des biocides. Un précipité cristallin au fond du ballon permettait alors la fixation et la germination des spores. Une fois les spores germées (3 jours), un diffuseur alimenté par un compresseur était installé dans les bacs de culture afin de renouveler le CO<sub>2</sub> dans la culture et d'induire une agitation destinée à homogénéiser le milieu. L'air alimentant les diffuseurs était stérilisé par barbotage dans une solution de sulfate de cuivre.

Les cultures en free-living étaient conservées pendant un mois à 10 °C dans un incubateur végétal à température et éclairage contrôlés (Low temperature illuminated incubator 218. Precision. Thermo Electron Corporation). Les tubes fluorescents de l'incubateur étaient entourés d'un filtre rouge pour prévenir la maturité sexuelle des gamétophytes. Le milieu de culture était

renouvelé tous les quinze jours et une évaluation du sex-ratio des gamétophytes était alors réalisée sous microscope (Figure 2). Les gamétophytes femelles sont caractérisés par des brins épais et peu ramifiés, tandis que les mâles se présentent plutôt sous forme de gros amas formés de filaments minces et fortement ramifiés.



**Figure 2.** Gamétophyte femelle (A) et amas de gamétophytes mâles (B) dans les cultures en free-living (grossissement 10 X 10).

**Tableau 2.** Calendrier des cultures en free-living.

No de l'échantillon	Date de démarrage de la culture en free-living	Date de transfert sur collecteurs	Durée de la culture en free-living (jours)
S1	12 mars	18 juin	98
S2	12 mars	4 août	145
S3	12 mars	18 juin	98
S4	12 mars	4 août	145
S5	10 juillet	(perte)	---
S6	18 septembre	(en cours)	---

5. Ensemencement des cordes et croissance des plantules Après plusieurs mois de reproduction végétative (98 jours pour les S1 et S3 ; 145 jours pour S2 et S4), les cultures étaient diluées et exposées à la lumière blanche pendant trois jours pour activer la maturation sexuelle des gamétophytes. Les cultures étaient examinées au microscope optique pour s'assurer qu'elles contenaient des gamétophytes matures des deux sexes. Il était initialement prévu de mélanger les cultures avant de procéder à la pulvérisation pour obtenir une solution de filaments mâles et femelles à part égale.

Des cordes de culture d'environ 10 mètres de longueur, enroulées autour de supports cylindriques, étaientensemencés par pulvérisation avec le mélange de gamétophytes (Figure 3). Dans la salle à température et éclairage contrôlés de l'écloserie, les supports étaient placés à la verticale dans des aquariums de vingt litres contenant de l'eau de mer filtrée, stérilisée aux U.V. et enrichie avec du milieu de culture (Fritz A et B). Dans des tests d'orientation réalisés en hiver 2007, on avait observé que la libération des gamètes mâles et la fécondation avaient lieu sur le collecteur au bout de quatre semaines et que des plantules de 5-10 mm étaient visibles au bout de deux mois de culture *in vitro* (Figure 4).



**Figure 3.** Pulvérisation d'une solution de gamétophytes sur un collecteur.

Huit types de cordes ont été testées dans cette étude (Tableau 3). Les cordes ont été sélectionnées pour leur disponibilité dans les magasins d'articles de pêche et les quincailleries. La corde de référence était le kuralon 4 mm de diamètre. La fibre de vinylon dont est constituée le kuralon est une fibre synthétique imputrescible. C'est la fibre qui est considérée comme la plus proche du coton puisqu'elle est la plus absorbante de toutes les fibres synthétiques (Japan chemical fibers association, 2007). Elle a une flottabilité négative et est plus résistante à la traction que le coton. Cette corde est fabriquée et vendue en Asie et est utilisée dans l'industrie des pêches et dans les fermes de cultures d'algues asiatiques. C'est le kuralon qui a été utilisé dans les travaux de l'IFREMER sur le free-living (Pérez *et al.*, 1989) et qui est recommandée par R. Kaas (Communication personnelle). Cependant, nous avons été incapable de trouver un fournisseur de kuralon au Canada Atlantique et c'est seulement en Irlande, en participant à la 11<sup>ième</sup> conférence

internationale en phycologie appliquée, en juin 2008, que nous avons pu obtenir un échantillon de 50 mètres de cordelette de kuralon pour nos tests.

Toutes les cordes ont été pré-conditionnées pendant cinq heures dans de l'eau bouillante pour les débarrasser des substances toxiques, rincées à l'eau douce et conservées ensuite au sec dans une étuve à 50 °C pour augmenter leur pouvoir d'absorption. Certaines cordes de culture en nylon tressé étaient également grattées superficiellement au papier sablé et brûlées à la flamme pour obtenir des barbelures grossières susceptibles de mieux retenir les gamétophytes (Pérez *et al.*, 1990 ; Pérez *et al.*, 1992), ajoutant ainsi un neuvième type de corde. La durée nécessaire à l'apparition des plantules et la densité des plantules sur les cordes a fait l'objet d'un suivi. Le protocole utilisé pour l'ensemencement des cordes et la culture des plantules est fourni à l'Annexe 3.



**Figure 4.** Jeune sporophyte visible au microscope (10 X 40), 20 jours après ensemencement sur des cordes de culture.

**Tableau 3.** Description des cordes testées.

Nom	Description	Photo
Nylon	Corde blanche de nylon tressée. Diamètre : 4 mm Disponible au Québec.	
Nylon fuzzy	Corde blanche de nylon tressée, râpée et brûlée. Diamètre : 4 mm Disponible au Québec.	
Ficelle verte	Corde en plastique verte « spiralebond » ; 305 m ; 64 kg résistant à la rupture ; no 18365 ; Canada Cordage Inc. Diamètre : 1,5 mm Disponible au Québec.	
Jute grosse	Corde en jute ; 43 m ; Canada Cordage Inc. Diamètre : 4 mm Disponible au Québec.	
Jute petite	Corde en jute petite. Diamètre : 1 mm Disponible au Québec.	
Sisal en ballot	Ballot de corde en sisal ; 1820' 1 PLY SISAL 5 LB. BAL ; no 127091 ; Canada Cordage Inc. Diamètre : 2 mm Disponible au Québec.	

**Tableau 3.** Description des cordes testées (suite).

Nom	Description	Photo
Laine	Laine à tricoter 75% acrylic, 25% laine ; 3½ oz. / 100 g ; Marque Patons Shetland Chunky. Diamètre : 3 mm Disponible au Québec.	
Ficelle de maçon	Petite ficelle blanche en nylon non-tressé. Diamètre : 1 mm Disponible au Québec.	
Kuralon	Corde blanche pelucheuse asiatique de type Kuralon (vinyon ou polivinyol alcohol polymer) procurée par le Dr Stefan Kraan, manager du Irish Seaweed Centre Martin Ryan Institute, National University of Ireland, Galway, Irlande. Diamètre : 2 mm Non disponible au Québec	

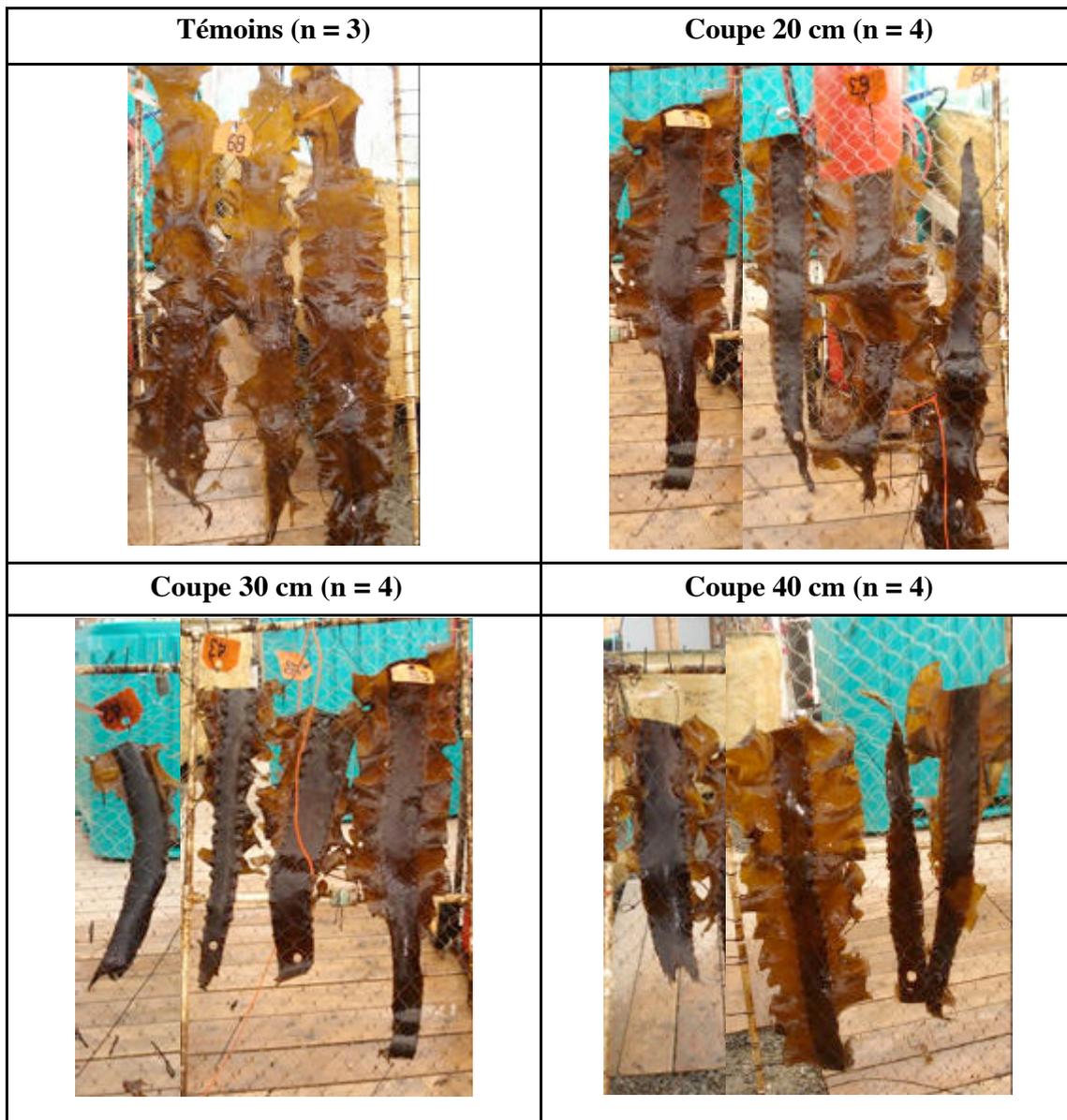
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1. Induction artificielle de la maturité

Un premier essai d'orientation a été réalisé en hiver, entre le 22 janvier et le 12 mars 2008, avec quinze plants immatures de 100-150 cm de long provenant de l'Anse McInnis à Port-Daniel (Tableau 4). Trois groupes de 4 plants ont été amputés de leur zone méristématique, respectivement à 20 cm, 30 cm et 40 cm de la jointure stipe-fronde. Un groupe de trois plants servant de témoins a été laissé intact (Figure 5). Les lames ont été maintenues à plat, entre deux nappes de filet de nylon monofilament tendues sur un support de tubes de PVC. Le support était immergé juste sous la surface de l'eau, dans un bassin isolé de la lumière du jour, dans lequel une photopériode de jours courts et constants ( $80 \mu E m^{-2}s^{-1}$ , 8L-16D, 10 °C) a été maintenue avec quatre tubes fluorescents. Au bout de 22 jours, des sores bien développées étaient visibles sur toute la longueur de chacune des lames amputées tandis que sur les lames témoins, il y avait soit une absence de sore, soit un début de formation de sore sur une fraction limitée de leur longueur (Figure 5). Après 50 jours, une vérification a montré que seules les sores des lames amputées étaient capables d'émettre des spores compétentes, lesquelles ont servi à ensemercer des cordes de culture le 12 mars. Le 2 avril, des embryons de plantules étaient visibles sur les cordes, soient 77 jours après la cueillette des plants géniteurs immatures. Durant cet essai, il a été remarqué qu'au bout de 25 jours, les franges (ailes) des frondes avaient tendance à pourrir et à se désagréger, sans que la partie centrale des frondes, plus épaisse, ne soit affectée (Figure 5).

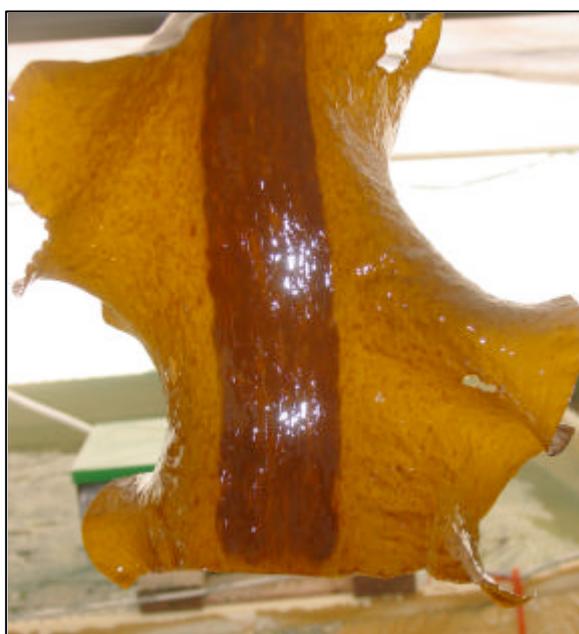
**Tableau 4.** Sommaire des résultats des tests sur l'induction artificielle de la maturité.

Date	T <sub>0</sub> +	Observations
22 janvier 08	0 jours	Aucune sore visible
13 février	22 jours	Sores bien développées
4 mars	50 jours	Émission de spores
12 mars	56 jours	Ensemencement de ficelles de culture
2 avril	77 jours	Embryon de plantule



**Figure 5.** Frondes de laminaires maintenues pendant 50 jours à plat sur un support en filet dans des conditions de température et de photopériode contrôlée. Témoin = frondes intactes. Coupe 20 cm = fronde amputées à 20 cm de la jointure stipe-fronde. Coupe 30 cm = fronde amputées à 30 cm de la jointure stipe-fronde. Coupe 40 cm = fronde amputées à 40 cm de la jointure stipe-fronde.

Au cours de ce premier essai, après amputation du stipe et de la zone méristématique (30 cm), quatre lames immatures supplémentaires ont été découpées en fragments de 30 cm de long. Ces fragments ont été placés dans un bassin isolé de la lumière du jour, dans 35 cm d'eau, avec une photopériode de jours courts et constants ( $80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 8L-16D, 10 °C). À la différence du groupe précédent, les fragments étaient laissés libres dans l'eau et maintenus en mouvement par une forte aération. Au bout de 50 jours, les deux tiers des fragments présentaient des sores bien développés sur une partie de leur surface (Figure 6). Contrairement aux frondes fixées sur le filet, les franges des fragments maintenus en mouvement étaient beaucoup moins affectées par le pourrissement (Figure 6).



**Figure 6.** Fragment de fronde avec sore centrale bien développée après 21 jours en mouvement dans un bassin avec des conditions de température et de photopériode contrôlée.

Un second essai a eu lieu en été 2008. Le 10 juillet, onze plants adultes (lame = 100 cm) et immatures de *S. longicuris* ont été cueillis par un plongeur dans la baie de Percé, amputés de leur zone méristématique, placés à plat sur le support de PVC et maintenus sous la surface du bassin à température et photopériode contrôlée ( $80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 8L-16D, 10 °C). Il a été remarqué qu'au bout de 20 jours, les franges des frondes avaient tendance à se désagréger. Après 42 jours,

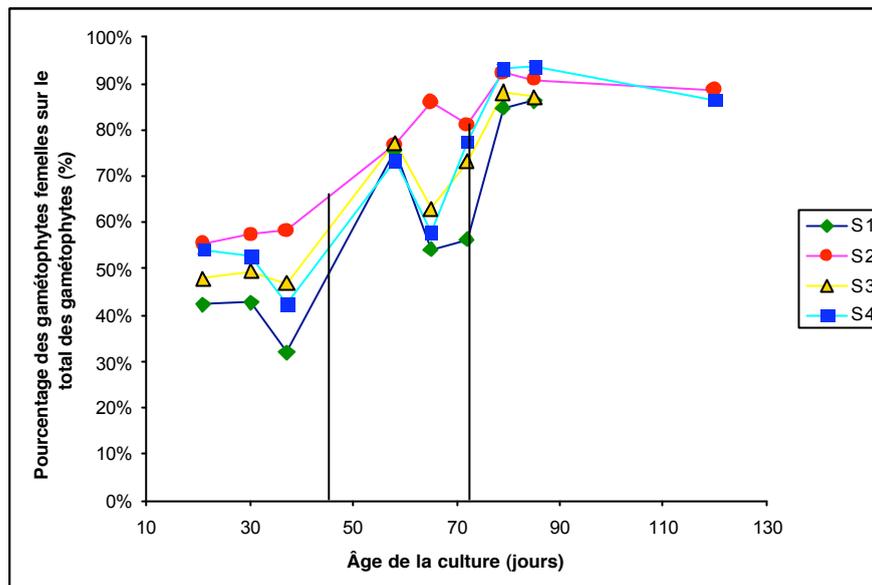
les parties centrales des frondes avaient développés des sores matures sur toute leur longueur. Le 21 août, ces sores ont servi à ensemercer des cordes de culture. Après 32 jours d'incubation, les cordes portaient un semis régulier de plantules de 1-2 mm.

## **2. Suivi du sex-ratio**

Le décompte des gamétophytes mâles et femelles a été fait régulièrement durant la culture en free-living (Figure 7). Les observations montrent que les filaments femelles sont peu ramifiés et s'allongent en longueur, ce qui les rend plus susceptibles de se briser sous l'effet des turbulences induites par l'aération des cultures (Figure 2). À l'inverse, les filaments mâles se développent en formant de nombreuses ramifications ce qui conduit rapidement à la formation de petits amas sphériques très denses, moins susceptibles de se fragmenter naturellement dans la culture (Figure 2).

Au début, le sex-ratio était proche de 1 : 1 (mâle : femelle) dans toutes les cultures. À deux reprises, le sex-ratio a augmenté brutalement de telle façon qu'après 70 jours, toutes les cultures contenaient plus de 80% de gamétophytes femelles. La cause de ces sauts quantitatifs pourrait être reliée au broyage des cultures avec un mélangeur électrique, tel que recommandé par Pérez *et al.* (1992). Ce broyage, qui avait lieu tous les 15 jours, avait pour objectif de briser les amas de filaments en unités plus petites et multiplier ainsi leur nombre. La figure 7 montre que c'est après avoir été broyées (barres verticales sur la figure) que le pourcentage de femelles augmente. Les observations au microscope optique après broyage des filaments montrent effectivement que les amas de filaments mâles restent intacts, alors que les filaments femelles sont brisés en plusieurs fragments qui vont continuer à s'allonger individuellement par la suite.

Un autre point important à noter dans les opérations de culture en free-living est la durée de conservation des cultures. Il était prévu au protocole de diluer les ballons de solutions en transférant une partie de la culture dans de nouveaux récipients lorsque le ballon deviendrait opaque, ce qui n'a pas été fait. C'est peut-être la raison pour laquelle on avait observé un début de décomposition dans les solutions S2 et S4 (145 jours sans dilution). Comme toutes les cultures ont évolué vers un pourcentage de femelles plus grand que 80 %, il n'a donc pas été possible de rétablir un équilibre en mélangeant différentes cultures avant la pulvérisation sur les cordes.



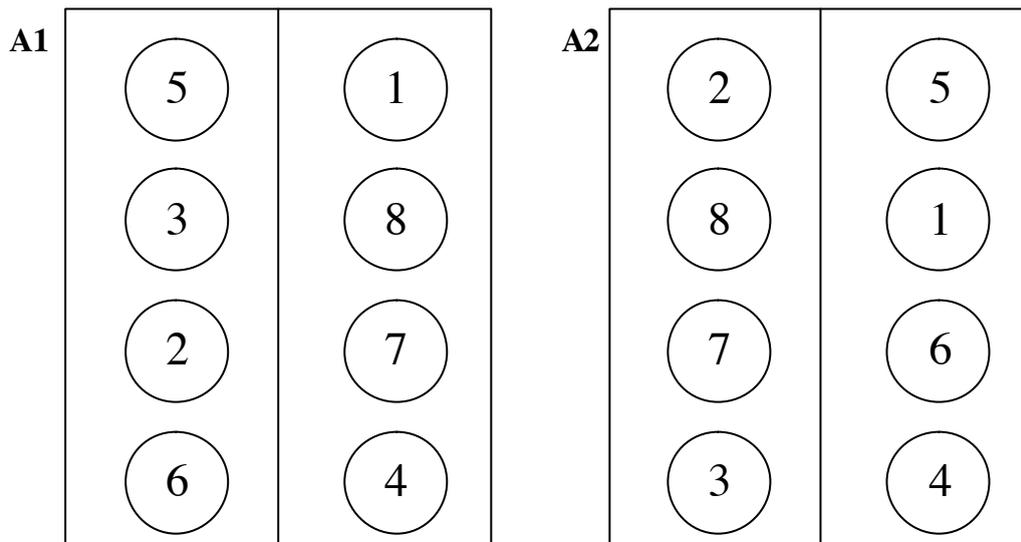
**Figure 7.** Pourcentage (%) de gamétophytes femelles par rapport au total des gamétophytes dans les cultures en free-living S1, S2, S3 et S4. Barre verticale : utilisation du mélangeur électrique pour fragmenter les gamétophytes mâles et femelles.

### 3. Types de cordes

Les solutions S1 et S3 de gamétophytes en free-living ont été pulvérisées le 18 juin 2008 sur des collecteurs munis de huit types de cordes différents (Figure 8), disposés au hasard dans un aquarium à photopériode et intensité lumineuse contrôlées. Notons que, à cette date, la corde kuralon (rapportée d'Irlande en juillet 2008 à l'occasion du colloque de l'International Society of Applied Phycology) n'était pas encore disponible. Afin de prévenir les différences de croissance dues à la position des collecteurs par rapport aux lampes fixées sur la porte de l'incubateur, les collecteurs ont été tournés d'un quart de tour tous les matins.

Le 25 juillet 2008, après 37 jours de croissance, les aquariums ont du être retirés de l'incubateur, à cause d'un dysfonctionnement de celui-ci. Nous avons donc perdu les cultures qui étaient en cours, mais avons pu recueillir des renseignements précieux. Premièrement, nous avons pu constater qu'il y avait des plantules sur tous les types de cordes. Par contre, nous avons décidé de rejeter la ficelle verte, la corde en sysal et la ficelle de maçonpour les tests à venir. Le crampon

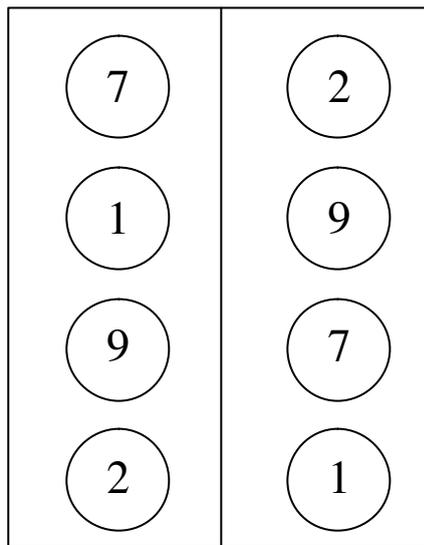
des plantules n'était pas bien accroché à la ficelle verte. Nous avons d'ailleurs remarqué dès la pulvérisation que la solution «glissait» sur le collecteur, la corde en sysal commençait déjà à se désagréger et le diamètre de la ficelle de maçon était beaucoup trop petit pour les besoins de l'étude.



**Figure 8.** Position des différents collecteurs dans les aquariums (A1 et A2) mis en incubation le 18 juin 2008. 1 : nylon ; 2: nylon fuzzy ; 3 : ficelle verte ; 4: jute grosse ; 5: jute petite ; 6 : corde en sysal ; 7 : laine ; 8 : ficelle de maçon.

Les gamétophytes filamenteux du free-living ne s'attachent pas naturellement au substrat, contrairement aux spores. C'est la force de pulvérisation et la texture pelucheuse des cordes qui permet aux filaments d'y rester accroché jusqu'à ce que les plantules aient développé des haptères. De façon générale, lors de l'étape de pulvérisation, il a été constaté que la solution de semences glissait sur les cordelettes sans y adhérer. Nous avons utilisé l'air comprimé (4 psi) par un compresseur d'aquarium pour faire la pulvérisation. Un protocole de culture en free-living d'*Alaria esculenta* indique toutefois que des bouteilles des plongée sont utilisées comme source d'air comprimé (200 bars, 3000 psi) pour l'étape de pulvérisation (Arbonna et Molla, 2006). Il est donc possible que, dans nos tests, la puissance de projection des semences sur les cordes ait été trop faible pour faire suffisamment pénétrer les filaments à l'intérieurs des fibres des cordes.

Le 4 août 2008, huit autres collecteurs ont étéensemencés avec un mélange de semences provenant des cultures en free-living S2 et S4 (Figure 9). Cette fois, nous avons choisi d'ensemencer les types de corde les plus prometteuses, soient : nylon, nylon fuzzy, laine et kuralon . Les mesures ont été effectuées le 3 septembre 2008, après 30 jours de croissance. Les plantules n'étaient pas encore visibles à l'œil nu, les mesures de taille et de nombre ont donc été effectuées au microscope (10 X 5).

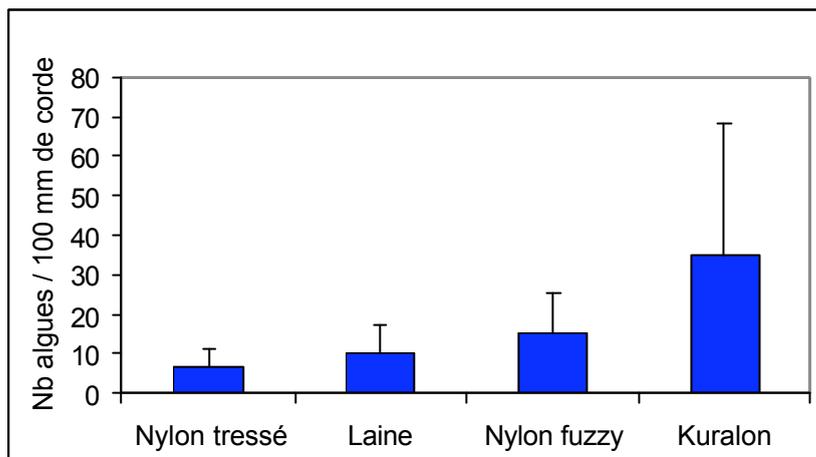


**Figure 9.** Position des différents collecteurs dans l'aquarium mis en incubation le 4 août 2008. 1 : nylon ; 2 : nylon fuzzy ; 7 : laine ; 9 : kuralon.

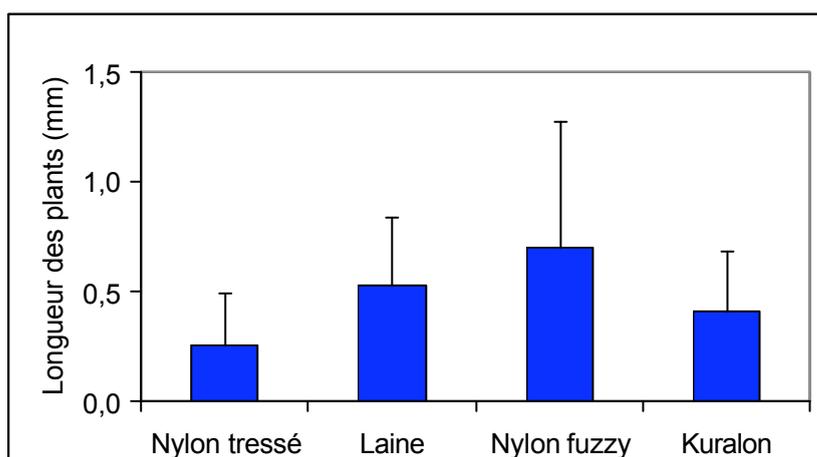
Les graphiques suivants (Figures 10 à 12) illustrent l'effet du type de corde sur la croissance et le nombre d'algues présents sur le collecteur après 30 jours de croissance en milieu contrôlé. Notons que, même si aucune différence ne s'est avérée significative étant donné le faible nombre d'échantillons, il y a toutefois quelques tendances qui apparaissent.

Premièrement, il apparaît qu'il y avait en moyenne plus de plantules par 100 mm de corde sur le kuralon (35,1) que sur le nylon fuzzy (15,0), la laine (10,3) et le nylon (6,9). Par contre, c'est le nylon fuzzy qui a eu le meilleur effet sur la longueur des plantules : 0,7 mm en moyenne, contre 0,3 mm pour le nylon, 0,4 mm pour le kuralon et 0,5 mm pour la laine. Finalement, si on intègre ces deux facteurs en multipliant le nombre d'algues par 100 mm de corde par la longueur

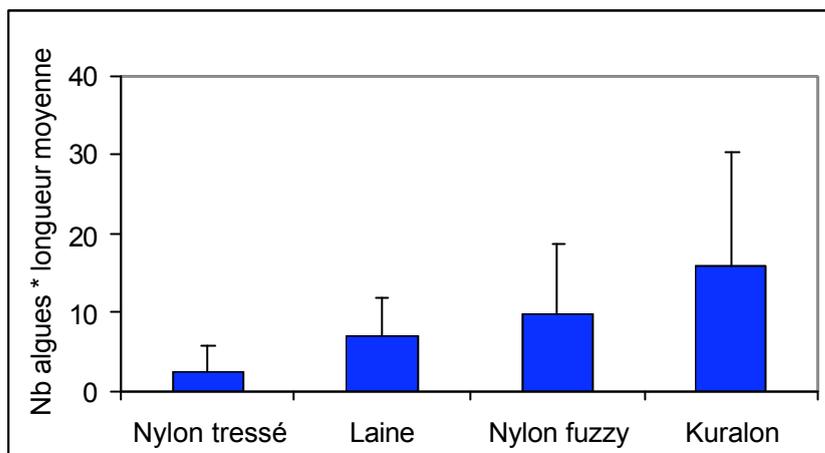
moyenne des plantules, on obtient un indice de la longueur totale par 100 mm de corde. Cet indice est représenté à la figure 12 et montre le kuralon comme étant la meilleure option : 15,9 mm par 100 mm de corde, alors que le nylon fuzzy en contient seulement 9,7 mm, la laine 7,0 mm et le nylon 2,4 mm.



**Figure 10.** Nombre d'algues par 100 mm de corde selon le type de corde. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.



**Figure 11.** Longueur moyenne (mm) des algues selon le type de corde. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.

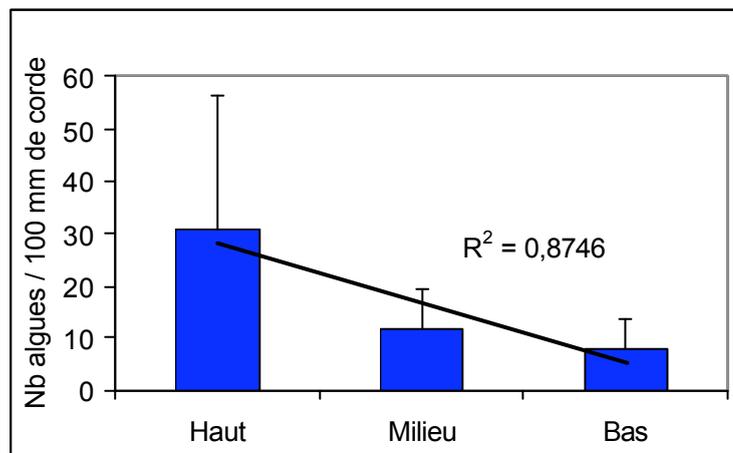


**Figure 12.** Indice de longueur totale (nombre d'algues \* longueur moyenne en mm) par 100 mm de corde selon le type de corde. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.

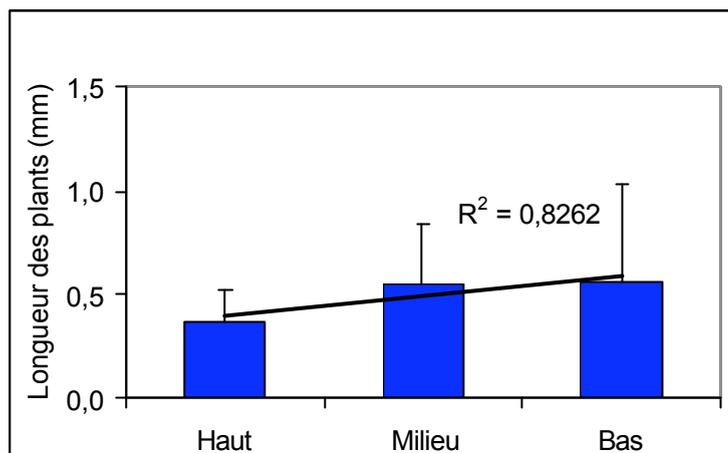
Il faut noter que, dans le présent travail, la densité de plantules obtenue sur les cordes ensemencées avec le free-living est similaire à ce qui est rapporté pour *Undaria pinatifida* (300 plantules par mètre) cultivée selon la même méthode (Pérez *et al.*, 1990). Par contre, cette densité est relativement faible par rapport à ce qui est observé lors de l'ensemencement des cordes avec des spores dans la méthode asiatique. Ainsi, Gendron *et al.* (2007, 2008) mentionnent une densité de  $\pm 1000$  plantules par 5 cm de cordelette après  $\pm 40$  jours de croissance. Cependant cette densité a décliné rapidement par autoréduction et atteignait  $< 170$  plantules par 5 cm de cordelette après  $\pm 40$  jours de croissance (Gendron *et al.*, 2007, 2008). Une faible densité de plantes au moment de l'ensemencement des cordes n'est pas forcément nuisible puisqu'il est établi que les laminaires ont une meilleure croissance à faible densité et, dans plusieurs pays, une réduction de densité est volontairement réalisée par les algoculteurs pour ne laisser parfois que 10 plantes par mètre linéaire de corde de culture (Pérez *et al.* 1990; Gendron *et al.*, 2008).

#### 4. Position sur le collecteur

Les mesures de dénombrement et de longueur des plantules ont été effectuées à différents emplacements (haut, milieu, bas) sur le collecteur, afin d'éliminer un biais possible. Ces données se sont révélées intéressantes pour l'étude et cette partie du texte en fait l'analyse (Figures 13 à 15). La position explique une bonne proportion de la variance en nombre d'algues par 100 mm de corde (le coefficient de détermination  $R^2$  est de 87%) et explique aussi une bonne proportion de la longueur moyenne des algues (83%). Il est donc vrai de dire que le nombre d'algues augmente avec la hauteur sur le collecteur (39,9 algues/100 mm dans le haut contre 7,9 algues/100 mm dans le bas), mais que la longueur moyenne des algues diminue avec la hauteur sur le collecteur (0,4 mm dans le haut contre 0,6 mm dans le bas).

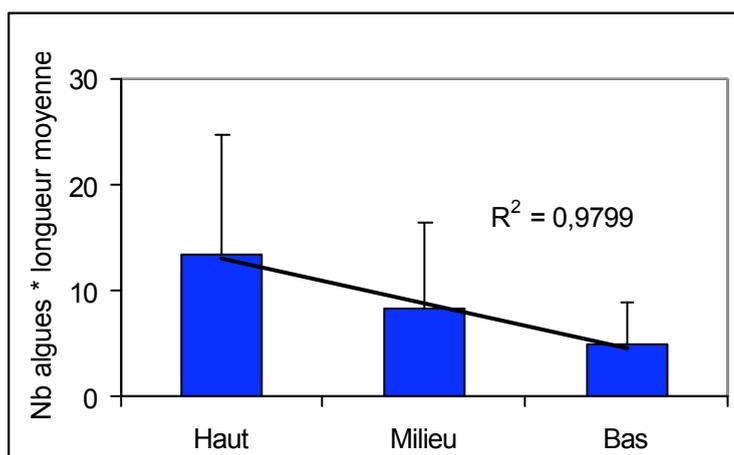


**Figure 13.** Nombre d'algues par 100 mm de corde selon la position sur le collecteur. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.  $R^2$  : coefficient de détermination.



**Figure 14.** Longueur moyenne (mm) des algues selon la position sur le collecteur. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.  $R^2$  : coefficient de détermination.

Finalement, la figure 15 montre que l'indice de la longueur totale par 100 mm de corde (nombre d'algues par 100 mm de corde multiplié par la longueur moyenne des plantules) est influencé en bonne proportion (98%) par la position sur le collecteur. Cet indice augmente avec la hauteur sur le collecteur : 13,4 mm par 100 mm de corde dans le haut, contre 5,1 mm par 100 mm de corde dans le bas. Comme une lampe était insérée dans le couvercle de l'aquarium, au-dessus des collecteurs, il est probable que la différence d'illumination soit responsable de l'étagement des longueurs de plantules le long de la hauteur du collecteur.



**Figure 15.** Indice de longueur totale (nombre d'algues \* longueur moyenne en mm) par 100 mm de corde selon la position sur le collecteur. Barre d'erreur : intervalle de confiance à 95%.  $R^2$  : coefficient de détermination.

## CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Avec cette étude, il a été possible d'adapter à la laminaire à long stipe (*Saccharina longicruris*) une méthode d'induction artificielle de la maturation des sores et une méthode de culture *in vitro* mise au point initialement pour d'autres espèces de laminaires. Les tests se sont déroulés de janvier à octobre 2008 et comprenaient la récolte d'algues matures, l'induction artificielle de la maturité, la libération et la germination des spores, la culture en free-living, ainsi que l'ensemencement sur les cordes de culture. La majorité des objectifs du projet ont été atteints, et les travaux menés ici ont montré que :

- 1) L'amputation de la zone méristématique couplée à une photopériode artificielle de jours courts et constants dans une eau à 10 °C permet d'initier, en hiver et en été, l'apparition des sores et leur maturation sur des plants initialement immatures.**

Cette partie du travail a permis de démontrer que la méthode mise au point par Pang et Lüning (2004) fonctionne également dans le cas de *S. longicruris*. Ceci suggère fortement que chez *S. longicruris*, la zone méristématique à la jointure du stipe et de la fronde sécrète un facteur d'inhibition de sporulation comme cela a déjà été montré dans le cas de *L. saccharina*, *L. digitata* et *L. japonica* (Pang et Lüning, 2004). Le pic de développement des sores dans les populations de laminaires à long stipe de l'est du Canada a lieu de la fin août à la fin octobre, selon les conditions locales de luminosité, de température et d'exposition aux vagues (Chapman, 1987). Il est possible de trouver toute l'année des individus de un an et plus, porteurs de sores matures, mais ceux-ci restent rares, donc difficiles à récolter (Tamigneaux E., observations personnelles). La méthode testée ici avec succès vient donc compléter et renforcer la culture de semences en free-living puisqu'elle permet d'obtenir des spores compétentes du début de l'hiver jusqu'à la fin de l'été, donc de s'affranchir des limites que constitue l'approvisionnement en géniteurs matures dans le milieu naturel.

**2) Un déséquilibre dans le sex-ratio des cultures en free-living, avant l'ensemencement des cordes, n'empêche pas la fécondation des gamétophytes femelles et le développement de plantules.**

Le suivi du sex-ratio a démontré que, dans les conditions de culture du présent projet, la proportion des gamétophytes femelles augmente rapidement pour dominer la population des gamétophytes cultivés en suspension. Or, l'analyse des données a montré qu'une augmentation du nombre de filaments femelles survient principalement après que la culture ait été passée au mélangeur, tandis que le nombre de brins mâles reste sensiblement le même. En effet, les brins femelles se brisent plus facilement au mélangeur, ce qui multiplie leur nombre plus rapidement que celui des filaments mâles. Il serait recommandé d'éviter de passer les solutions en free-living au mélangeur électrique, à moins que le suivi du sex-ratio ne montre un nombre de filaments femelles beaucoup plus bas que celui des mâles. Une autre stratégie qui pourrait être testée ultérieurement consisterait à utiliser le mélangeur à intervalles rapprochés dès les premières semaines de culture, c'est-à-dire avant que les filaments mâles ne forment des amas trop denses pour être fragmentés efficacement par les couteaux du mélangeurs. Malgré cet écart dans le sex-ratio, les cultures en free-living ont permis d'obtenir des plantules visibles au microscope après 30 à 37 jours d'incubation.

Comme de la décomposition a été observée à 145 jours de culture en free-living, il serait également recommandé de diluer les ballons de culture dès qu'ils deviennent opaques, tel que recommandé dans le protocole de culture en free-living (Annexe 1).

**3) Le kuralon est le type de corde qui permet le meilleur ensemencement par les filaments du free-living et le développement des plantules.**

En ce qui concerne l'effet du type de corde, il vaut mieux utiliser le kuralon, car c'est lui qui comporte le plus grand nombre de plantules après 145 jours de croissance en incubateur. Le Kuralon présentait aussi une longueur combinée de 15,9 mm d'algues par 100 mm de corde, alors que le nylon fuzzy en supportait seulement 9,7 mm, la laine 7,0 mm et le nylon 2,4 mm. Toutefois, s'il s'avère impossible de se procurer ce type de corde au Canada, la meilleure alternative reste le nylon râpé et brûlé («fuzzy»). Ce type de corde est d'ailleurs déjà utilisée

dans des cultures d'*Alaria esculenta* basées sur le free-living (Arbonna et Molla, 2006). Par ailleurs, il faut prendre garde d'utiliser une source d'air comprimé suffisamment puissante pour insérer les filaments de gamétophytes entre les fibres de la corde.

Finalement, les résultats ont aussi révélé qu'il y avait plus d'algues dans le haut des collecteurs. Ainsi, la compétition pour la lumière ralentit la croissance des plants en haut du collecteur par rapport à ceux du bas qui sont moins nombreux mais plus développés. Si nous voulons avoir une croissance plus homogène sur les collecteurs, il serait recommandé de retourner les collecteurs régulièrement ou de modifier la répartition des systèmes d'illumination dans les incubateurs.

## **DIFFUSION DES RÉSULTATS ET RETOMBÉES**

La maîtrise de la culture en free-living contribuera à éliminer les obstacles au développement d'une exploitation industrielle significative des laminaires au Québec. Elle permettra aux algoculteurs de mettre plus facilement en place plusieurs cycles de culture par an, en réduisant à la fois les coûts de production et les risques de pertes. La sécurisation des cultures en mer et l'étalement des récoltes sur l'année aideront les producteurs à développer des marchés. Par la suite, ce procédé pourra servir de base à des projets d'amélioration génétique des souches de culture (sélection, hybridation contrôlée).

Par ailleurs, l'enseignant qui a participé au projet sera aussi en mesure de former pour la première fois les étudiants du DEC en aquaculture à la culture des laminaires, diversifiant ainsi leurs champs de compétences. Ces étudiants pourront par la suite appuyer le développement des entreprises impliquées dans la culture des algues. Aussi, avec l'expertise développée dans ce projet, l'École des pêches et de l'aquaculture du Québec sera en mesure de proposer des activités de formation aux employés adultes des nouvelles entreprises d'algoculture.

Finalement, c'était la première fois que cette technique de culture était appliquée à *S. longicuris*. Ce projet a permis à Halieutec de développer un protocole de culture unique pour cette algue et d'être ensuite en mesure de proposer son savoir-faire à l'industrie québécoise de l'algoculture. De ce fait, nous espérons devenir un partenaire incontournable dans le développement de cette nouvelle industrie. Ce projet nous permettra également de présenter des résultats originaux dans des congrès internationaux et par le fait même, de développer ainsi un réseau de contacts avec des experts étrangers.

## CRÉDITS

Ce projet de recherche a été réalisé grâce à une subvention du programme d'aide à la recherche technologique du MÉLS. Les auteurs remercient le Dr Stefan Kraan et Maeve Edwards de l'Irish seaweed center pour leur aide et leurs conseils. Le projet a également bénéficié du soutien technique des techniciens en aquaculture de l'ÉPAQ et de Halieutec : Mme Valérie McInnis, M. Daniel Bourdages et M. Antoine Dumais-Roy. Nous remercions également les plongeurs Frank Mauger et ses collègues pour leurs interventions sous-marines. Halieutec est un centre de transfert de technologie supporté financièrement par le MÉLS et le MDEIE.

---

Marie-Joëlle Leblanc, chercheuse

---

Éric Tamigneaux, chercheur

---

Maire-Lyne Larrivée, Coordonnatrice de la recherche et de l'aide technique



Partenaires  
financiers



## BIBLIOGRAPHIE

- Arbonna, J. F. et M. Molla (2006). Cultivation of the brown seaweed *Alaria esculenta*. Dublin, BIM. *Aquaculture explained*, report N° 21, 50 pages.
- Andersen, R.A., éditeur (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. 578 pages.
- Anonyme (2006). State of world aquaculture 2006. FAO fisheries technical paper N° 500. 134 pages.
- Chapman, A.R. (1987). The wild harvest and culture of *Laminaria longicuris* in eastern Canada, in Case studies of seven commercial seaweed resources. Dans: Case studies of seven commercial seaweed resources. M.S. Doty , J.F. Caddy et B. Santelices, éditeurs. FAO Fisheries technical paper - T281. 311 pages.
- Druehl, L.D. (1999). Potential for a new seaweed industry in Canada: a western perspective. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*. **99-1**: 18-22.
- Druehl, L.D., Collins, J.D., Lane, C.E. et G.W. Saunders. (2005). An evaluation of methods used to assess intergeneric hybridization in kelp using pacific laminariales (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **41**: 250-262.
- Gendron, L., P. Gauthier et G. Savard (2007). Expériences préliminaires de culture de l'algue brune *Laminaria longicuris* en laboratoire et en mer au large de Paspébiac (Québec) en 2006. Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques N° 2731. Direction régionale des Sciences, Pêches et des Océans Canada, Institut Maurice-Lamontagne, 53 pages.
- Gendron, L. et E. Tamigneaux 2008. Culture de l'algue brune *Saccharina longicuris* en bassin et en mer au large de Paspébiac et Grande-Rivière (Québec) en 2007. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 70 pages (en révision).
- Japan chemical fibers Association. [www.jcfa.gr.jp](http://www.jcfa.gr.jp). Site consulté le 10/12/2007.
- Kraan, S. et M.D. Guiry. (1998). Strain selection in the edible brown seaweed *Alaria esculenta* : genetic fingerprinting and hybridization studies under laboratory conditions. Marine Fisheries Services Division, Marine Institute, Irlande. Final report IR.95.MR.011, 30 pages.
- Pang, S.J. et K. Lüning. (2004). Breaking seasonal limitation : year-round sporogenesis in the brown alga *Laminaria saccharina* by blocking the transport of putative sporulation inhibitors. *Aquaculture* **240** : 531-541.

Pérez, R., Kaas, R., Barbaroux, O., Arbault, S., Le Bayon, N. et J.Y. Moigne. (1990). Technique de culture pour les côtes bretonnes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida*. Tableau de marché - Étude économique. IFREMER Nantes, 65 pages.

Pérez, R., Kaas, R., Campello, F., Arbault, S. et O. Barbaroux. (1992). La culture des algues marines dans le monde. Éditions IFREMER. 613 pages.

Peteiro, C., Salinas, J.M., Freire, O. et C. Fuertes. (2006). Cultivation of the autoctonous seaweed *Laminaria saccharina* off the Galician coast (NW Spain) : production and features of the sporophytes for an annual and biennial harvest. *Thalassas*. **22** (1): 45-53.

# ANNEXE 1. PROTOCOLE DE L'INDUCTION ARTIFICIELLE DE LA MATURITÉ DES ORGANES FERTILES (SORES)

## Résumé des conditions de culture

	Température (°C)	Lumière	Intensité lumineuse à la surface de l'eau ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Cycle lumineux (jour : nuit)
Sporogénèse rapide	10-15	Fluorescent blanc	100-200	Jours courts et constants (8 : 16)

## Étape 1 : Aménagement des bassins

### **Matériel à préparer**

- Salle ou serre d'élevage (avec un système en recirculation d'eau salée préfiltrée et maintenue à 10 °C)
- Bassins de type « raceways »
- Système d'alimentation en air basse pression ( soufflante)
- Support horizontal ajouré
- 4 tubes fluorescent (Phillips F96T12/D/H00 110 watt)

1. Aménager un bassin par l'ajout d'un système d'aération sur la longueur du bassin. Un tube percé de trous posé longitudinalement sur toute la longueur du fond au centre du bassin et connecté à la ligne de la soufflante génère une agitation permanente. Il faut que l'eau circule de chaque côté de chaque fronde sinon elle pourrit.
2. Il faut manipuler la photopériode des bassins. Entourer le bassin d'une paroi opaque et installer au dessus des bassins un système des tubes fluorescent connectés à un chronorupteur programmable. L'objectif est de soumettre les frondes à des jours courts (8 heures de lumière/jour) et constants.
3. Ajuster l'alimentation en eau à 1 changement d'eau / heure si possible.
4. Concevoir un système de support pour conserver les algues étalées à plat, face à la lumière, sans empêcher la circulation d'eau sur les 2 faces de l'algue. Les lames peuvent par exemple être étendues

entre deux nappes de filet maillant (monofilament de nylon translucide) fixées sur un cadre faits de tubes de PVC pour maximiser leur exposition à la lumière.

5. Maintenir un courant rapide et/ou une agitation intense de l'eau dans le bassin (avec un bulleur) sinon les lames pourrissent. Maintenir le puit de sédimentation au bout du bassin le plus propre possible car les algues sont sensibles à la production de  $H_2S$  qui est toxique pour elles.



Bassin de culture isolé de la lumière naturelle

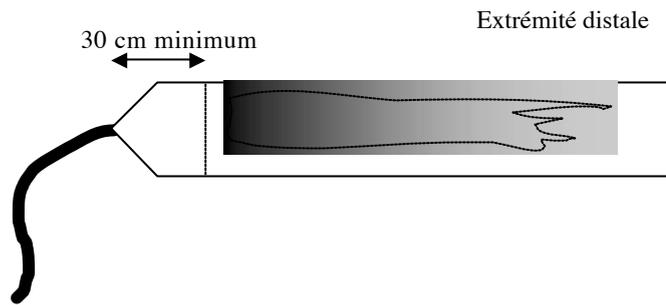


Frondes de *S. longicuris* étalées entre deux nappes de filet maillant tendues sur un cadre de PVC.

## Étape 2 : Réception des algues

### **Matériel à préparer**

- Tag d'identification
  - Brosse
  - Papier absorbant
1. Communiquer régulièrement avec le plongeur pour qu'il apporte 10 plants de *Saccharina longicuris* (stipe long et creux). Lui demander de cibler les plants de plus grande taille avec des frondes de plus de 150 cm de long. Les algues doivent être livrées le jour même et conservées à l'humidité et au frais pendant le transport.
  2. À la réception, attacher un tag à chaque lame de *Saccharina* pour aider les suivis individuels ultérieurs dans les bassins de la serre.
  3. À la réception des lots d'algues : noter le nombre d'algues qui présentent des sores (zones sombres) , la position des sores par rapport à la base de la lame et l'extension des sores .
  4. Brosser soigneusement chaque morceau de lame (2 faces), rincer avec de l'eau de mer et l'essuyer soigneusement avec un tampon de papier absorbant pour enlever les épiphytes, les pontes d'escargot de mer (*Lacuna vincta*) et les autres organismes associés qui pourraient contaminer le bassin .
  5. Les lames qui portent des sores visiblement à maturité sont immédiatement utilisées pour la production de spores (*voir le protocole de culture en éclosion*). Voici 3 signes de maturité :
    - les sores sont uniformément opaques et très noires ;
    - les sores sont recouvertes d'une mince membrane semi-transparente ; cette cuticule a tendance à se détacher en lambeaux ;
    - les sores sont très dures et rigides, ce qui rend la lame cassante si on essaie de la plier à ce niveau.
  6. Pour les lames qui n'ont pas de sores ou dont les sores ne sont pas suffisamment mûres : les couper au moins 30 cm au dessus de l'attache du stipe à la lame, jeter les stipes et placer les lames (partie distale) dans les bassins de la serre.



7. Il faut donc faire un brossage régulier des lames de laminaires (avec une éponge ou un tampon de papier ou une brosse douce) et des parois du bassin 1-2 fois par semaine, car il y a croissance rapide d'épiphytes (diatomées et cyanobactéries) sur les lames des laminaires et sur les parois des bassins.

### Étape 3 : Suivi de la maturité

1. L'état de maturité des sores de la serre fait l'objet d'une observation visuelle et est noté chaque semaine. Vérifier chaque jour l'état de santé des lames (blanchissement, pourrissement, etc.).
2. On peut voir l'apparition des premières traces de sores 10 jours après la séparation de la partie basale de la lame si la température du bassin est de 15 °C tandis que cela prend 20-40 jours à 10 °C. L'apparition de la membrane semi-transparente à la surface des sores a lieu 40-60 jours après la séparation de la partie basale de la lame.
3. Lorsque les sores sont arrivées à maturité, prélever un échantillon de sore avec un perce-bouchon sur chacune des lames, placer les échantillons dans un dessiccateur de laboratoire, au noir et à 10 °C pendant 4 heures. Après ce temps, réhydrater les échantillons dans 40 ml d'eau de mer filtrée, à 10 °C, et observer au microscope optique s'il y a émission de spores mobiles. Noter la quantité relative de spores mobiles visibles dans le champ de l'oculaire (10 x 10) et les caractéristiques du déplacement des spores (nage en rond ou nage en ligne droite). Cette méthode permet de sélectionner objectivement les sores les plus matures pour l'ensemencement des cordes. On sélectionnera les sores qui émettent rapidement un grand nombre de spores. Les spores qui nagent en rond, sur place, ne sont pas de bonne qualité

## ANNEXE 2. PROTOCOLE DE L'INDUCTION DE LA SPORULATION

### Résumé des conditions de température et de luminosité

	Température (°C)	Lumière	Intensité lumineuse minimum ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Cycle lumineux (jour : nuit)
Lavage et désinfection	10	Fluorescent blanc du laboratoire	Ambiante au laboratoire	-
Déshydratation des sores	4-10	À l'obscurité	0	-
Libération des spores et germination	10	Fluorescent blanc de l'incubateur	15	24 : 0

### Caractéristiques des sores matures

- Ce sont les plus grands individus (200-350  $\mu\text{m}$ ), ayant passé l'hiver intacts dans des zones protégées, qui ont le plus de chance de porter des sores au printemps.
- Les sores sont généralement plus développés et plus matures à l'extrémité distale de la lame et moins matures (ou inexistantes) près du stippe.
- Lorsque les laminaires sont fertiles, les sores forment une bande plus épaisse de couleur sombre (noir) au centre de la lame, ils ont une bordure bien nette et distincte autour du tissu fertile, et sont très rigides : ils cassent si on essaie de les plier.
- Lorsqu'on examine une section transversale de sore au microscope, on aperçoit nettement les spores à l'intérieur des sporocystes (cellules-sac).
- Lorsque les sores sont prêts à sporuler, la cuticule de surface se desquame et il y a comme des lambeaux transparents qui s'en détachent si on frotte la surface avec le pouce ou avec l'ongle.

## Étape 1. Lavage et désinfection des sores

*Ces opérations visent à enlever et détruire les épiphytes présents sur les sores.*

### **Matériel à préparer**

- 5 litres d'eau de mer propre stérilisée à l'autoclave (20 minutes à 120 °C) ou filtrée 0,2 microns<sup>2</sup>.
- Pinceau dur
- Cotton (ouate)
- Papier absorbant
- Eau de javel neuve ou solution d'iode (Betadine, The Purdue Frederik Co., Norwalk, CT, USA)
- Solution stock de dioxyde de Germanium à 1g/litre<sup>3</sup>
- Verrerie lavée à l'acide et stérilisée à l'autoclave

Note. Comme il est difficile de savoir avec certitudes si les sores d'un individu vont effectivement relâcher leurs spores après l'étape de réhydratation et si les spores seront fonctionnels, il convient de travailler avec au minimum les sores de 10-20 plantes différentes à la fois pour augmenter ses chances.

Note. Les lames de laminaires sont recouvertes d'organismes épiphytes dont les plus gênants pour la culture en éclosion sont les diatomées et les cyanobactéries qui, grâce à leur vitesse de division rapide, peuvent envahir les milieux de culture. C'est la raison pour laquelle l'étape de brossage, lavage et désinfection est essentielle.

1. Un minimum de 10-20 lames avec les sores les plus matures (les plus sombres) sont sélectionnées.
2. On découpe dans la partie la plus sombre des fragments de 5 cm x 10 cm.
3. Brosser longuement et soigneusement toutes les surfaces de chaque fragment avec de l'ouate ou du papier absorbant.
4. Rincer de temps à autre avec de l'eau de mer à 10 °C, stérilisée à l'autoclave entre deux brossages.

### **Jeter l'eau de rinçage à chaque fois pour ne pas recontaminer les sores**

---

<sup>2</sup> Peut aussi provenir du MAPAQ qui ont une bouilloire et peuvent fournir 500 litres d'eau parfaitement stérile. Si l'eau vient de la salle de culture de l'ÉPAQ, attention au réglage du débit car le tube à UV n'est efficace que dans une certaine gamme de débit limitée. Vérifier dans le mode d'emploi du UV les valeurs de débit efficaces.

<sup>3</sup> Pour le dioxyde de germanium, Thierry Chopin utilise une solution stock saturée.

5. Les fragments de sores sont ensuite désinfectés en les trempant 2 minutes dans une solution d'eau de mer stérile à 10 °C additionnée d'eau de javel (hypochlorite de sodium à 30 ppm final = 30 mg / litre<sup>4</sup>). Alternative : tremper les sores 30 sec. dans une solution d'iode, 5 ml de Betadine par litre edm autoclavée.
6. Ils sont ensuite rincés successivement dans deux bains à 10 °C d'eau de mer stérile différents contenant chacun du dioxyde de germanium (1 mg/l)<sup>5</sup>. Ensuite les deux faces des fragments sont séchées avec un tampon de coton (ouate) ou du papier absorbant.
7. Les fragments secs sont déposés sur une couche de papier absorbant et placés pendant 68 h à l'obscurité dans une chambre froide (4 °C) où elles subissent un début de déshydratation : elles ne sont pas sèches et friables mais restent humides et souples. Une alternative consiste à mettre les fragments de sores dans un dessiccateur de laboratoire rempli de drierite et de conserver le dessiccateur au noir, dans une chambre froide (10 °C), pendant 3-4 heures.

## Étape 2 : Libération des spores

### **Matériel à préparer**

- chaudières de 10 litres lavée et stérilisée<sup>6</sup>
- 10-15 litres d'eau de mer stérile
- 1 barreau aimanté et 1 plaque agitatrice par bécquer / peut être remplacé par un bullage ou un moteur électrique entraînant une hélice immergée dans l'eau
- 1 thermomètre pour vérifier la température des solutions
- Toiles Nytex de 20 et 10 microns de taille de maille ou coton à fromage
- 1 microscope avec lame et lamelle

---

<sup>4</sup> L'IFREMER utilise une solution 5 pour mille en hypochlorite de sodium (5 ml d'eau de javel 12 % par litre de solution = 600 mg/l) et les fragments sont immergés dans le bain de chlore pendant 5 minutes mais nos tests montrent que c'est un peu trop concentré. Pour désinfecter des objets solides à l'ÉPAQ on utilise du chlore 200 ppm et pour désinfecter un liquide on utilise du chlore 30 ppm.

<sup>5</sup> En 2006, Thierry Chopin m'a dit que, par litre d'eau de mer, il ajoutait seulement 0.1 à 0.5 millilitre d'une solution stock saturée en GeO<sub>2</sub> = optimal pour inhiber les diatomées sans inhiber la croissance des stades microscopiques des laminaires. Selon son expérience, 1 ml de solution stock saturée en GeO<sub>2</sub> par litre de milieu de culture est déjà toxique pour les laminaires. Andersen (2005) recommande de ne pas dépasser 1 mg/l dans le milieu de culture des algues brunes.

<sup>6</sup> Au lieu de chaudières on peut aussi utiliser les grands cylindres gradués de 4 litres du labo de biochimie.

1. Après 6-8 h à la chambre froide (4 °C), les sores qui sont prêts à émettre laisse une trace brunâtre sur le papier.
2. Les morceaux de sores sont plongés tous ensemble dans une chaudière et sont recouverts avec quelques litres<sup>7</sup> d'eau de mer stérile à 10 °C avec agitation mécanique, ce qui provoquera l'éclatement des sporocystes et la libération des spores<sup>8</sup> (diam. spores : 5 microns). Le processus doit avoir lieu en pleine lumière.
3. Au cours du processus d'émission, évaluer régulièrement le nombre de spores en plaçant une goutte sous le microscope au grossissement 100 X (10 x 10). Il faut compter 50 spores bi-flagellées qui grouillent dans le champ oculaire pour être certain d'un ensemencement suffisant<sup>9</sup>.
4. Au bout de quelques minutes (5-30 minutes), l'émission des spores est constatée par l'eau qui devient trouble et laiteuse (grouillement de spores visibles seulement au microscope). Le liquide est alors filtré à 4 reprises (en passant de chaudière à chaudière) à travers des tamis à maille de 20 microns puis 10 microns pour retirer les débris et les colloïdes libérés avec les spores (les colloïdes sont nocfs pour les éléments reproducteurs dans les étapes suivantes de la culture).
5. Les tubes-collecteurs portant les cordes à ensemercer seront alors plongés pendant 12 heures dans la dernière chaudière, celle contenant le filtrat propre. Le tout est maintenu à 10°C sans bullage pour favoriser la fixation et la germination des spores.<sup>10</sup>

Note. Une fois émises par les sporocystes, les spores restent mobiles pendant un temps limité allant de 30 minutes à quelques heures (variable selon la température). On dispose donc d'un délai limité pour les mettre en contact avec les cordes collecteurs et permettre leurs fixation sur la corde.

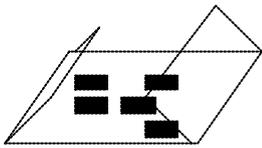
<sup>7</sup> Le volume d'eau de mer doit être suffisant pour qu'à la dernière étape (étape 5), on puisse immerger complètement les collecteurs dans le filtrat de spores.

<sup>8</sup> Les spores ont 5,5 microns de diamètre. Elles perdent leur flagelle au bout de 24 h et se fixent sur un substrat. Le pic d'émission des spores a lieu après 40-60 minutes suivant la réhydratation selon S. Kraan de l'U. de Gallway. D'après R. Kaas de l'IFREMER, en 5 minutes on doit avoir un soupe grouillante de spores. Si ce n'est pas le cas, pas la peine d'insister. Pour déterminer les meilleures conditions adaptées à notre environnement, essayer par la méthode des plans d'expérience en jouant sur les températures de déshydratation, les temps de déshydratation, la température de l'eau pour les émissions, l'aspect des sores.

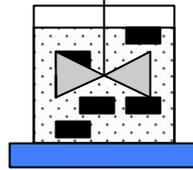
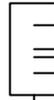
<sup>9</sup> Selon Thierry Chopin, la densité optimale de spores pour l'ensemencement des collecteurs est de 24 000 spores par millilitre. Avec cette densité, il n'est pas nécessaire selon lui d'opérer une réduction (éclaircissement) de densité des plantes dans les étapes suivantes de la culture.

<sup>10</sup> Dans la littérature, il est indiqué de garder les collecteurs à la lumière 15 microEinstein m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, mais comme nous procédions toujours à la libération des spores dans l'après-midi et que nous les laissions dans la salle d'écloserie, nous devons composer avec la photopériode de la salle, c'est-à-dire 18 : 6, dont les 18 heures de luminosité étaient à 30-40 microEinstein m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Cela n'a jamais causé de problème.

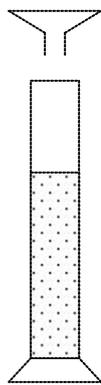
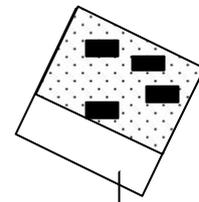
Brossage, désinfection  
(Javex et  $\text{GeO}_2$ ) et  
rinçage des sores



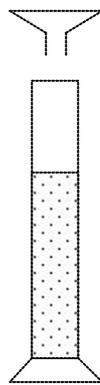
Frigo, au sec  
4 °C 6-8 h  
obscurité



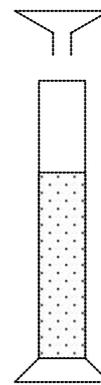
Réimmersion 1 h  
10 °C  
lumière  
agitation mécanique



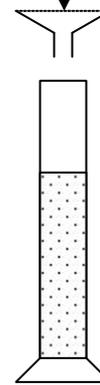
Filtration  
10 microns



Filtration  
10 microns



Filtration  
20 microns



Filtration  
20 microns

ENSEMENCEMENT ←

### ANNEXE 3. PROTOCOLE DE CULTURE EN FREE-LIVING

#### Résumé des conditions de culture

	Température (°C)	Lumière	Intensité lumineuse minimum ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Cycle lumineux (jour : nuit)
Déshydratation des sores	4 - 10	Obscurité complète	-	-
Libération des spores	10	Fluorescent blanc	Lumière ambiante	-
Germination	10	Fluorescent blanc	8-10	16 : 8 ou 24 : 0
Reproduction végétative des gamétophytes sans fertilisation	10	Fluorescent rouge	8-10	16 : 8 ou 24 : 0
Reproduction sexuée des gamétophytes (fertilisation)	10	Fluorescent blanc	10-40	12 : 12
Culture des plantules en écloserie	10	Fluorescent blanc	10 => 100	12 : 12 => 18 : 6

#### Étape 1. Lavage et désinfection des sores

*Voir le protocole sur la méthode d'induction de la sporulation.*

#### Étape 2 : Préparation des récipients

##### **Matériel à préparer**

- Solution stock Miquel A
- Solution stock Miquel B
- Solution stock Provasoli P6<sup>11</sup>
- Fritz A et Fritz B (Fritz Algae Food, Fritz Aquaculture, Dallas, Tx, USA)

<sup>11</sup> Attention, la solution stock de Provasoli P6 a tendance à cristalliser à température normale (20 °C). Faire chauffer et mettre sur un agitateur magnétique pour bien dissoudre le précipité cristallin avant chaque utilisation.

- Solution de dioxyde de Germanium à 1g / litre<sup>12</sup>
- Solution de sulfate de kanamycine à 50 g / litre
- Réserve d'eau de mer stérile
- Ballons de culture de 6 litres en verre, propres et stérilisés

1. Les récipients servant à la germination sont remplis d'eau de mer stérile à 10 °C à laquelle on ajoute des solutions nutritives et des biocides. Pour chaque litre de milieu de culture, ajouter :

- 2 ml de la solution stock Miquel A,
- 1 ml de la solution stock Miquel B,
- 1ml de la solution stock Provasoli P6
- 1 ml de la solution stock 1mg/l de dioxyde de Germanium<sup>13</sup> (1 mg/l ou 2,5 mg/l final dans la culture, selon les sources) pour prévenir la croissance des diatomées
- 1 ml de la solution stock de Kanamycine (prévient la croissance de *Pseudomonas alginovora* et des cyanophytes)

2. Amener le milieu de culture à 10 °C avant d'y placer les algues ou les spores.

Note. Il va se former un précipité cotonneux dans le récipient. Ce précipité est nécessaire pour la fixation et la germination des spores. **Ne pas agiter, ni mélanger, ni ajouter de bullage !!**

### Étape 3 : Libération des spores

*Voir le protocole sur la méthode d'induction de la sporulation.*

---

<sup>12</sup> Thierry Chopin utilise une solution stock saturée.

<sup>13</sup> En 2006, Thierry Chopin m'a dit que, par litre de milieu de culture, il ajoutait seulement 0,1 à 0,5 millilitre d'une solution stock saturée en GeO<sub>2</sub> = optimal pour inhiber les diatomées sans inhiber la croissance des stades microscopiques des laminaires. Selon son expérience, 1 ml de solution stock saturée en GeO<sub>2</sub> par litre de milieu de culture est déjà toxique pour les laminaires. Andersen (2005) recommande de ne pas dépasser 1 mg/l dans le milieu de culture des algues brunes.

## Étape 4 : Préculture en free-living

### **Matériel à préparer**

- *Blender* lent (disperseur) ou agitateur magnétique ou bullage
- Incubateur végétal à température contrôlée
- Éclairage au néon rouge dans l'incubateur : tube fluorescent rouge (F20 T12/R Sylvania, Mississauga, Ontario, Canada) ou bien cool white fluorescent (Phillips F30T12/CW/RS 30 watts) recouvert d'un filtre rouge (tube guards ou tube sleeve).

### **A. Germination des spores**

1. 30-40 ml du filtrat contenant les spores sera immédiatement transvasé dans les récipients<sup>14</sup> servant à la germination. On laisse reposer deux jours sans agitation.
2. Les conditions de culture requises pour la germination des spores sont : 10°C, 8-10  $\mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de lumière blanche continue (ou bien avec un cycle de 16h lumière : 8h obscurité)
3. Après 3 jours, les spores ont entamé leur processus de germination et on ajoute un bullage avec de l'air stérile ayant barboté dans une solution de sulfate de cuivre à 4%. Le bullage provoque la dissolution des cristaux et la mise en suspension des gamétophytes = free-living.

### **B. Croissance et multiplication végétative des gamétophytes (maintien au stade stérile)**

4. Les gamétophytes seront maintenus dans un état végétatif immature (croissance sans production de gamètes) sous une lumière fluorescente rouge et une intensité lumineuse de 10-40  $\mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en lumière continue (24L : 0D). La température optimale pour maintenir l'état végétatif de *Saccharina longicruris* n'est pas connu mais on peut sans doute garder la culture à 10°C.
5. L'état de suspension peut être maintenu dans une armoire isotherme en changeant le milieu de culture tous les 15 jours (avec dioxyde de germanium<sup>15</sup> et kanamycine). Après la germination, on peut aussi utiliser Fritz A et Fritz B (0,13 ml L<sup>-1</sup>) à la place des milieux Miquel et Provasoli.
6. Pour le changement de milieu, procéder comme suit : arrêter le bullage, laisser reposer pendant 1 h pour que les gamétophytes sédimentent, aspirer le surnageant avec un tube stérile en laissant 300-400 ml au fond. Verser le fond dans un bécher et passer dans un disperseur (*blender*) pour briser les

---

<sup>14</sup> Attention, si les récipients sont placés dans le frigo-incubateur du labo de biochimie, recouvrir chaque récipient avec un bouchon, un parafilm ou un film alimentaire pour ralentir l'évaporation du liquide car dans ce frigo, les liquides s'évaporent très vite.

<sup>15</sup> Ces produits peuvent inhiber la croissance des algues brunes.

filaments. Verser dans un nouveau ballon de culture de 6 litres (avec bouchon et aérateur neuf et stérile) et compléter avec du nouveau milieu de culture. Remettre le ballon dans l'incubateur de culture

7. Lorsque le ballon devient opaque, il est temps de diluer la culture en transférant une partie de la culture dans de nouveaux récipients.

### ***C. Maturation des gamétophytes (déclenchement de la reproduction sexuée)***

8. S'assurer d'avoir un sex ratio de 50 % mâle : 50% femelles dans le ballon qui servira à la pulvérisation. Si nécessaire, mélanger plusieurs cultures différentes pour rétablir le sex ratio idéal
9. Lorsqu'il est nécessaire d'ensemencer des collecteurs, il faut amorcer la maturation sexuelle des gamétophytes en modifiant les paramètres de culture dans un des ballons de filaments. Les conditions requises pour la maturation des gamétophytes et la fécondation sont: 10°C, 40  $\mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de lumière blanche avec un cycle de 12 h lumière : 12 h obscurité.
10. Observer les modifications des gamétophytes dans la culture. Les gamétophytes deviennent fertiles en 8-10 jours lorsque les conditions sont optimales. Quand les premiers cystes (cellule de grande taille, comme un bourgeon) commencent à se former à l'extrémité des filaments il est temps de commencer la pulvérisation sur les collecteurs (voir ci-dessous). La fécondation aura lieu sur les cordes collecteurs dans les bassins de pré-élevage.

NOTE : Une autre façon de faire consiste sauter les points 9 à 10 ci-dessus. Dans ce cas, il faut pulvériser la solution de gamétophytes du point 8 (50% mâle :50% femelle) sur les collecteurs et laisser les gamétophytes amorcer la gamétogénèse dans l'aquarium de pré-culture (étape 6 ci-dessous).

## **Étape 5 : Conditionnement des collecteurs**

*Ces opérations visent à retirer les substances toxiques des cordes et à faciliter l'accrochage des plantules (Voir Pérez et al. 1992 : La culture des algues marines dans le monde.) La corde-collecteur doit subir un pré-traitement pour la débarrasser de ses radicaux libres toxique.*

### **Matériel à préparer**

- 60 m de cordelettes tressée de couleur claire (3 brins) de 3 ou 6 mm de diamètre (par collecteur). La cordelette ne doit être ni siliconée, ni paraffinée, sinon, faire bouillir la corde pendant 5 heures et rincer à l'eau courante. On peut aussi utiliser du polyester souple tressé (polyamide).
- Papier sablé à gros grain

- Sèche-cheveux ou un brûleur à gaz
- Support cylindrique en PVC lourd (ne doit pas flotter), gravé de sillons espacés (3-5 mm) sur toute sa longueur pour enrouler la cordelette (facultatif). Le but est d'espacer chaque spire pour augmenter la surface de corde disponible aux spores.

1. Les cordelettes sont râpées à l'aide d'un papier sablé de façon à séparer les fibres et en augmenter les aspérités ; elles sont ensuite chauffées à l'aide d'un brûleur de façon à raccourcir les barbelures ainsi créées.<sup>16</sup>
2. Les cordelettes et le support de PVC ont trempés dans de l'eau bouillante pendant 5 h pour éliminer les substances toxiques. La cordelette est ensuite rincée pendant 3 h dans de l'eau douce courante (eau déchlorée!) et pressée à plusieurs reprises afin d'en faire circuler l'eau à l'intérieur.
3. La cordelette est enroulée sur le support de PVC en conservant un espace (3-5 mm) entre chaque spire.
4. Les cordes sur leurs supports sont désinfectées par trempage dans de l'eau distillée bouillante pendant 10 minutes. Elles sont ensuite séchées à l'étuve (60°C) juste avant leur utilisation.



## Étape 6 : Ensemencement des collecteurs

### **Matériel à préparer**

- Pulvérisateur (cela peut être un flacon laveur modifié : un tube souple, dans lequel passe de l'air comprimé, passe dans le bouchon. En renversant le flacon, l'air projette la solution en *spray*)
- Milieu de culture Fritz A et B <sup>10</sup>
- Solution de dioxyde de Germanium à 1g / litre <sup>17</sup>
- Solution de sulfate de kanamycine à 50 g / litre
- Solution de sulfate de cuivre à 4%
- Réserve d'eau de mer stérile
- Éclairage au néon blanc 400-700 nm (Sylvania supersaver cool white Ecologic F34CW/SS/ECO)
- Tubes-support en PVC lavé et stérilisé
- Corde-collecteur conditionnée, stérilisée et enroulée sur son tube-support

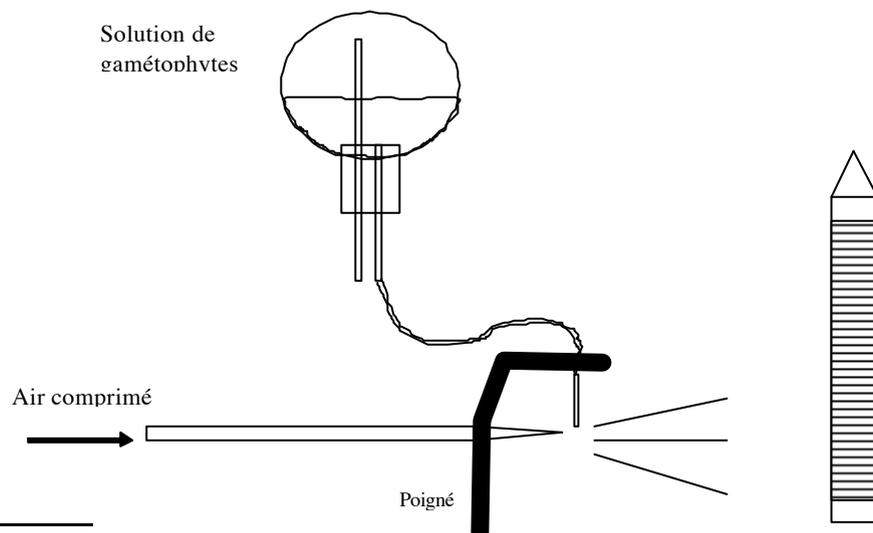
<sup>16</sup> Si les barbelures sont trop longues, les algues ne s'accrocheront pas directement à la corde et glisseront au moindre mouvement de l'eau.

<sup>17</sup> Thierry Chopin utilise une solution stock saturée.

- Récipient de pré-culture (aquarium de verre) propre et désinfecté et aménagé pour recevoir les collecteurs
- Incubateur de pré-culture à température et photopériode contrôlée (Low temperature illumination incubator 818, Thermo Electron Corporation)

Note. Le succès de la fertilisation dépend de la densité et de la proximité des gamétophytes sur le collecteur (1 mm de distance minimum). Donc il faut s'assurer de recouvrir les cordes avec suffisamment de matériel vivant.

1. Les aquariums de pré-culture sont remplis d'eau de mer stérile, maintenue à 10 °C, à laquelle on ajoute des solutions nutritives et des biocides. Pour chaque litre de milieu de culture, ajouter :
  - 0,13 ml de Fritz A + 0,13 ml de Fritz B par litre d'eau de mer stérile (= milieu Guillard's F/2)<sup>18</sup>.
  - 1 ml de la solution stock de dioxyde de Germanium<sup>19</sup> (5 mg/l final ou 2,5 mg/l ou 1 mg/l selon les sources) pour prévenir la croissance des diatomées.
  - 1 ml de la solution stock de Kanamycine (prévient la croissance de *Pseudomonas alginovora* et des cyanophytes ; 50 ppm final selon Kaas).
2. Après avoir stimulé le retour des gamétophyte au stade fertile, on pulvérise en fines gouttelettes le contenu des cultures de gamétophytes sur les collecteurs. La fécondation et le développement des zygotes auront lieu sur la corde collecteur.



<sup>18</sup> Louise Gendron utilise le milieu F/2. On peut aussi utiliser les solutions de culture de l'IFREMER (Miquel A, + Miquel B + Provasoli) ou le milieu VonStoch modifié selon Guiry et Cunningham, 1984 et Kraan et Guiry 2000)

<sup>19</sup> En 2006, Thierry Chopin m'a dit que, par litre de milieu de culture, il ajoutait seulement 0,1 à 0,5 millilitre d'une solution stock saturée en GeO<sub>2</sub> = optimal pour inhiber les diatomées sans inhiber la croissance des stades microscopiques des laminaires. Selon son expérience, 1 ml de solution stock saturée en GeO<sub>2</sub> par litre de milieu de culture est déjà toxique pour les laminaires.

3. L'opération terminée, on attend 10 minutes que le liquide soit bien absorbé par la cordelette avant de l'immerger dans l'aquarium de pré-culture.
4. Les collecteurs sont immergés lentement et précautionneusement<sup>20</sup> dans les aquariums de pré-culture. Les collecteurs sont maintenus verticalement dans les bassins.
5. Faible<sup>21</sup> au début (20 microEinstein  $m^2 s^{-1}$ ) l'intensité lumineuse blanche à la surface de l'aquarium dans l'incubateur est augmentée progressivement jusqu'à 30-40 microEinstein  $m^2 s^{-1}$  au bout de 10 jours et peut même aller jusqu'à 100 microEinstein  $m^2 s^{-1}$  au bout de 15 jours. La photopériode initiale dans l'incubateur est de 12 L: 12 D pour favoriser la gamétogénèse et la fécondation. Après 10 jours, la photopériode peut-être ajustée à 16 L: 8 D. La température est maintenue constante à 10 °C. Il est essentiel d'avoir des tubes fluorescents qui émettent de la lumière blanche entre 400 et 700 nm.
6. Au bout de 5 jours, un système de bullage ou une pompe immergée est installé pour provoquer le mélange de l'eau et la bonne répartition des nutriments. L'agitation, très faible au début est augmentée progressivement pour être très intense juste avant la mise en mer afin de renforcer les haptères des crampons (utiliser un compresseur et plusieurs diffuseurs).
7. Au bout de 12 jours après l'ensemencement des cordes, le milieu de culture doit être changé 1 fois par semaine<sup>22</sup>.
8. Le transfert des collecteurs dans un bassin de culture final en circuit ouvert ou en mer s'effectue lorsque les plantules ont entre 0,5 mm (T. Chopin) et 5 mm (L. Gendron). Cela devrait prendre plus ou moins 20-30 jours.

Note. Il est conseillé de répartir les collecteurs qui ont été ensemencés dans un grand nombre de petits récipients de pré-culture (voir photos du Chili) plutôt que de les rassembler tous dans un grand bassin. Ainsi, en cas de développement de maladie dans un des bacs, il est plus facile de l'isoler.

Il est conseillé d'augmenter l'intensité du bullage au fur et à mesure qu'on avance dans les étapes de pré-culture. À l'IFREMER ils utilisent un bouillonnement intense dès que le collecteur a été ensemencé. Les photos du Chili montrent également un bullage intense dans les bacs de pré-culture où incubent les tubes-collecteurs alors que les plantes sont encore au stade microscopique.

<sup>20</sup> Pour éviter que les filaments d'algues se détachent.

<sup>21</sup> Dans les ballons de free-living les filaments ont été habitués à une faible lumière  $2-10 \mu Em^{-2} s^{-1}$ . Il faut donc les habituer progressivement à une intensité plus forte dans l'incubateur en interposant des grilles entre les lampes et les cultures et en jouant sur la distance entre l'aquarium et les lampes.

<sup>22</sup> Il faut réduire au maximum les périodes où les collecteurs sont exposés à l'air. Il est évidemment plus facile de disposer de suffisamment de bacs de culture pour faire une rotation. Les bacs de rechange sont remplis de solution de culture fraîche et cela réduit le temps pendant lequel les collecteurs sont exposés à l'air puisqu'il suffit de les transférer d'un bac à l'autre.