

LES PROTOPLASTES : UNE BIOTECHNOLOGIE UTILE, RENTABLE ET REPRODUCTIBLE CHEZ L'ALGUE *Undaria pinnatifida* ?

La production actuelle de l'algue brune *Undaria pinnatifida* a atteint 2,8 millions de tonnes/an sur Terre, devenant la quatrième espèce la plus cultivée au monde avec une importance capitale dans l'alimentation, la médecine, les cosmétiques et les applications pharmaceutiques.

Les protoplastes sont des cellules végétales vivantes nues dont les parois cellulaires ont été enlevées soit par une digestion enzymatique, soit par action mécanique. Ils peuvent être sujets de fusion ou bien de réplication, offrent la possibilité de manipuler et d'améliorer les cultures in vitro, notamment en contournant la reproduction sexuée.

Une amélioration du protocole de production de protoplastes de l'algue *Undaria pinnatifida* permettrait-elle une utilisation industrielle à grande échelle ?

Protoplaste de poireau

Début d'une fusion chou rouge / chou rouge

Observation de protoplastes au microscope x400

Méthode

Cette étude établit un protocole simple et efficace pour l'isolation, la culture et l'analyse des protoplastes.

Isolement des protoplastes :

Des explants (fragments d'organisme extraits d'un être vivant pouvant reprendre leur croissance lorsqu'ils sont placés dans un milieu favorable) de 4 mm² issus de cultures des sporophytes d' *U. pinnatifida* (0,5 à 1 cm de longueur) ont été incubés dans une solution enzymatique stérilisée sur filtre de 0,22 µm à 20° C sous agitation à 70 tr/min dans l'obscurité. Ces explants proviennent de plusieurs localisations de l'algue, telles que le stipe, la fronde ou encore le crampon (pied) de l'algue.

Afin de détruire la paroi cellulaire des cellules de l'algue, il a été choisi d'utiliser des enzymes commerciales, rendant l'expérience la moins coûteuse possible. Ce mélange comprend de la cellulase «Onozuka», de l'alginate lyase et de la driselase.

Par définition, la cellulase est une enzyme capable de dégrader la cellulose qui compose la paroi des cellules végétales.

Cette dégradation se fait par hydrolyse, permettant d'obtenir des protoplastes observables au microscope (Voir encadré à gauche (a)).

Fiabilité du protocole :

La viabilité des protoplastes et l'élimination de la paroi cellulaire ont été évaluées en vérifiant l'auto fluorescence de la chlorophylle rouge et en effectuant des procédures de coloration avec FDA montrant une fluorescence verte.

Les rendements en protoplastes ont été estimés à l'aide d'un hémocytomètre (lame quadrillée possédant des chambres de numérations) qui favorise ainsi le comptage des cellules au microscope.

Régénération des protoplastes :

Les cellules ont été distribuées dans 1 mL de milieu de régénération dans des plaques d'essai de culture tissulaire à 24 puits. Six milieux de régénération ont été utilisés pour les protoplastes d'algues brunes.

Après avoir été soumis à 2 semaines de culture, le mélange d'enzymes a été réutilisé jusqu'à ce que le rendement en protoplastes diminue de manière significative.

Après 2 mois de soumission à des conditions de culture différentes, deux températures ont été testées (20 et 16 °C).

Résultats

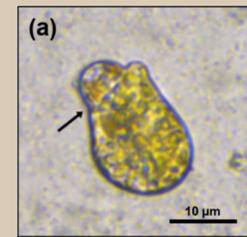
- Les rendements les plus élevés sont obtenus avec des jeunes filaments de gamétophytes. Les résultats ont montré que le méristème basal de l'algue (crampon) était plus adapté pour l'isolement des protoplastes et permettait d'obtenir des rendements plus élevés que les autres explants. L'origine de celui-ci a donc une importance primordiale dans la réalisation de ce protocole.
- Aussi, le mélange enzymatique peut être réutilisé au maximum six fois (fiabilité de 98 à 100%). Au-delà, le rendement est divisé jusqu'à dix fois. Les meilleurs rendements en protoplastes variaient de 10 à 26 × 10⁶ protoplastes. Cependant, l'utilisation de concentrations élevées de cellulase "Onozuka" a diminué le rendement des protoplastes.
- Capacité des protoplastes à survivre uniquement dans les milieux de culture constitué d'eau de mer enrichie, complétée par 285 mM (mmol/L) de NaCl et 5 mM de CaCl₂. Le milieu présente une composition plus simple et dépourvue de sucres, ce qui peut aider à contrôler la croissance bactérienne.
- Les protoplastes se sont régénérés en sporophytes normaux à 20 °C après 3 à 4 mois de croissance en culture à travers des filaments aposporeux, présentant une efficacité plus élevée que celle rapportée précédemment.

Conclusion

Les protoplastes d'*Undaria pinnatifida* deviennent une solution de biotechnologie pertinente grâce à l'amélioration de leur protocole de production. Leurs utilisations en tant que semences artificielles offrent un avantage économique et l'affranchissement des méthodes standard de culture des algues marines avec un approvisionnement continu en plantules.

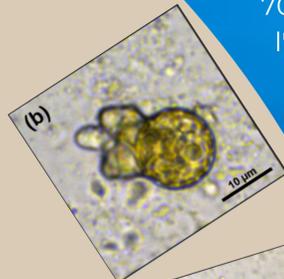
Développement indirect de protoplastes dérivés du sporophyte *Undaria pinnatifida* par formation de filaments aposporeux à 20 °C.

(Photographies : Avila Peltroche et al.)

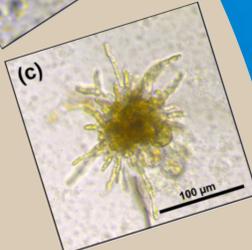


(a) Première division cellulaire asymétrique après soumission à 2 mois de culture. La flèche indique le plan de division.

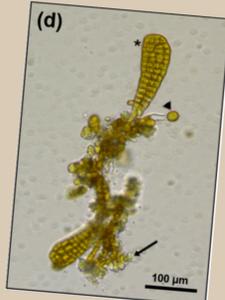
(b) Protubérances de type rhizoïde émergeant des protoplastes initiaux après soumission à 2 mois de culture.



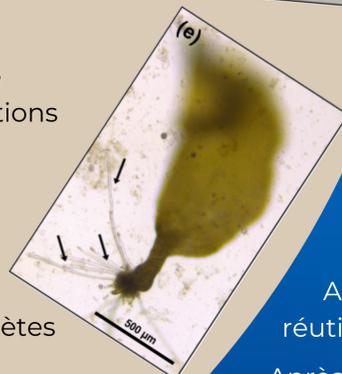
(c) Filaments aposporeux dérivés de protoplastes (PDAF) après soumission à 2 mois et demi en culture.



(d) Anthéridies* (flèche) et un oogonium** (pointe de flèche) provenant des PDAF. L'astérisque indique un jeune sporophyte.



(e) Un sporophyte avec des rhizoïdes bien développés (flèches) après soumission à 3 mois de culture.



(f) Sporophyte après soumission à 4 mois de culture à 12 °C et conditions d'aération constantes.



*Anthéridies : Organe mâle contenant les gamètes mâles.

** Oogonium : descendant d'une cellule germinale primordiale qui donne naissance aux ovocytes.

