

N° d'ordre : 380

503**76** 1977 **76**

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le Grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Thérèse DUBOIS-TYLSKI

BIOLOGIE DU CLOSTERIUM MONILIFERUM (BORY) EHRENB. ex RALFS (ZYGOPHYCEE, DESMIDIALE), EN CULTURE N VITRO.

soutenue le 24 MAI 1977, devant la Commission d, examen

Section ' de SCIENLES

- E.J. BONNOT
- F. MAGNE
- R. JACQUES
- L. LACOSTE
- P. BOURRELLY
- M. BODARD

Président

Rapporteurs

Examinateurs

au Professeur Pierre BOURRELLY

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE	
Chapitre I : Résultats des observations et des travaux antérieurs relatifs à la sexualisation	2
Chapitre II : Matériel et techniques générales de culture	7
DEUXIEME PARTIE	
Chapitre I : L'individu végétatif	14
Chapitre II : Les stades de la sexualisation et de la conjugaison	31
Chapitre III : La zygospore mûre	50
Chapitre IV : La germination	61
Table des planches	72
Planches et légendes des planches, hors-texte (24).	

TROISIEME PARTIE

Chapitre I : Le milieu de culture	73
Chapitre II : La température	95
Chapitre III : L'éclairement	99
Annexe : Recherches préliminaires sur les conditions de la germination des zygospores	137
CONCLUSION GENERALE	140
BIBLIOGRAPHIE	149

Un plan détaillé est donné en tête de chaque partie.

TABLE DES FIGURES.

Figure non numérotée , en page de garde : aspect d'une culture presqu'entièrement sexualisée, en lumière "rouge".

Fig	• 1	Déroulement schématique des stades de la conjugaison 10
Fig	. 2	Partitions anormales
Fig	. 3	Schémas représentant les différents stades de la conjugaison a) appariement
Fig	. 4	Influence de la teneur en glucose du milieu sur la sexualisation
Fig	. 5	Anomalies observées après addition de mannitol au milieu 82
Fig	. 6	Multiplication végétative et sexualisation en fonction de la température et de l'éclairement en lumière blanche 96
Fig	. 7	Influence de l'intensité de l'éclairement sur la multiplication végétative et la sexualisation
Fig	r. 8	Répartition spectrale des différents types de lampes fluorescentes utilisées 114
Fig	r. 9	Répartition spectrale des lumières approximativement mono- chromatiques utilisées 115
Fig	r. 10	Répartition spectrale de la lumière "rouge sombre" utilisée . 120
Fig	r. 11	Influence des radiations monochromatiques sur la multi- plication végétative
Fig	r. 12	Influence des radiations monochromatiques sur la multi- plication cellulaire, la sexualisation et le rapport l/L 124
Fig	r. 13	Influence des radiations monochromatiques seules ou en appoint à une période d'éclairement blanc trophique sur la multiplica- tion végétative. Comparaison avec le spectre d'absorption ín vivo
Fig	y. 14	Influence des radiations monochromatiques d'intensités diverses données à divers moments, sur la sexualisation
Fig	7. 15	Influence des interruptions de longues périodes obscures par des éclairements rouge clair, rouge sombre et bleu 128

R E M E R C I E M E N T S

Après m'avoir fait passer un diplôme d'études supérieures sur "les Micromycètes du Nord de la France", le Professeur M. HOCQUETTE m'a orientée vers l'Algologie d'eau douce sous la direction d'Emile DELAHAYE.

C'est au cours d'un stage que j'ai effectué dans le service du Professeur P. BOURRELLY que j'ai acquis les bases de la connaissance des Algues d'eau douce. Ses conseils bienveillants m'ont été une aide constante. Qu'il trouve dans ce travail l'expression de ma très profonde et très sincère gratitude. Je ne saurais oublier non plus Emile MANGUIN qui me transmit une petite partie de sa connaissance des Diatomées.

Le Professeur L. LACOSTE m'a suggéré de transposer aux Algues le thème de recherche qu'il avait développé dans sa propre Thèse : l'influence des facteurs du milieu, en particulier de la lumière, sur la sexualisation d'un Champignon Ascomycète. Ce fut une idée féconde. Je lui suis reconnaissante de me l'avoir donnée, ainsi que les moyens matériels pour la réalisation de cette étude.

Le Professeur F. MAGNE a bien voulu accepter de lire et de juger ce travail. J'en suis très honorée.

Monsieur R. JACQUES, Directeur de recherches au C.N.R.S, m'a accueillie et aidée au cours de séjours au Phytotron de Gif-sur-Yvette. Je lui suis très vivement reconnaissante de n'avoir jamais ménagé ses explications techniques et théoriques à propos de la lumière comme facteur expérimental à la néophyte que j'étais. Je le remercie d'avoir bien voulu participer au Jury de cette Thèse, et j'espère n'avoir pas trop déformé l'enseignement qu'il m'a transmis. J'ai eu avec le Professeur E.J. BONNOT quelques discussions sur l'interprétation de la Cytologie de mon matériel. Je suis très honorée qu'il ait accepté de juger mon travail.

Le Professeur M. BODARD m'a beaucoup aidée en m'autorisant à utiliser les matériels disponibles dans son service et surtout sa bibliothèque personnelle. Je tiens à le remercier très particulièrement pour tout ce qu'il m'a permis d'apprendre, non seulement en Algologie, mais aussi sur le plan de la Biologie végétale en général, au cours de discussions sur l'enseignement.

En dehors des membres du Jury, je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidée de façon ou d'autre au cours de la réalisation de ce travail.

Le Professeur R. BOURIQUET a mis à ma disposition les pièces stériles, les pièces climatisées et la chambre noire du service de Physiologie végétale. Je remercie également le personnel de ce service, en particulier B. LEGRAND qui s'occupe de la maintenance des pièces climatisées et J. DUBOIS, responsable de la chambre noire.

J'ai beaucoup apprécié l'enseignement de Botanique du Professeur R. LINDER. Il m'a autorisée à utiliser le microscopie à fluorescence du service de Cytogénétique, et R. JEAN m'a toujours aidée de bonne grâce.

Le Professeur R. MORQUER a relu la partie du travail concernant l'influence de la pression osmotique sur la sexualisation, et m'a suggéré quelques expériences.

Le Professeur E. VIVIER, directeur du laboratoire de Protistologie et de Microscopie électronique, a bien voulu me mettre en relation avec le personnel de son service qui m'a initiée aux techniques de base de la microscopie électronique. J'ai toujours trouvé en Biologie animale un climat amical et coopératif. Monsieur M. ABADIE, Directeur à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, a étudié pour moi la structure de la zygospore mûre du C. moniliferum. Je lui dois trois des planches présentées dans ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon amicale reconnaissance.

Le Docteur Claire BERKALOFF a accepté de discuter quelques aspects cytologiques de mon matériel et j'ai tiré beaucoup d'enseignements de la lecture de sa Thèse.

Enfin, je ne saurais oublier le personnel du laboratoire d'Algologie que je côtoie chaque jour, en particulier J. GODIN et R. KLING qui m'aident à leur manière en créant une atmosphère amicale.

En outre, je voudrais expliquer, sinon justifier deux points relatifs à ce mémoire.

C'est délibérément et par souci de simplification que j'ai omis d'indiquer, sauf quand cela était indispensable, les noms d'auteurs des genres et des espèces que je cite en dehors de mon matériel d'étude.

Il m'a paru inutile de refaire des planches qui ont pour la plupart déjà été publiées. Je les ai sorties des tirés à part en y intercalant quelques planches nouvelles, ce qui rend l'ensemble assez disparate, avec une numérotation des figures qui n'est pas continue d'une planche à l'autre. Je prie le lecteur de me pardonner l'effort que je lui demande, après m'en être moi-même dispensée.

INTRODUCTION

Alors que l'influence de la lumière et de la température dans le déterminisme de la floraison des Angiospermes a été mise en évidence dès les années 1920-1930, ce n'est qu'à une époque relativement récente que ces mêmes facteurs ont été utilisés de manière systématique pour induire la sexualisation chez les Cryptogames. Les "spores", sexuées ou non, des Algues et des Champignons semblaient se former dans la nature d'une manière fortuite et leur production *in vivo* était rare et aléatoire.

La maîtrise des facteurs de l'environnement influençant la morphogénèse et la sexualité des Algues en culture n'a été acquise que récemment (à partir des années 50 environ) grâce à l'utilisation de chambres de cultures plus ou moins perfectionnées. C'est ainsi que la connaissance de l'écophysiologie de ces Thallophytes a pu progresser, surtout en ce qui concerne l'influence de la température et de la lumière sur le cycle sexué.

Le travail de LACOSTE (1965), montrant l'influence des facteurs externes sur la sexualisation d'un Ascomycète, et la rareté des observations de zygospores de Desmidiées que nous avions pu constater au cours de nos études du peuplement algal des milieux acides du Nord de la France (DELAHAYE et DUBOIS-TYLSKI, 1965 ; DUBOIS-TYLSKI, 1966 et 1969) nous ont suggéré la recherche des facteurs pouvant provoquer la sexualisation dans ce groupe d'Algues vertes unicellulaires, où les individus haploïdes conjuguent en général deux par deux pour former des zygospores diploïdes. Le terme "Desmidiées" désignant les Zygophycées unicellulaires rarement réunies en filaments n'est pas un terme de nomenclature très précis mais comme il est consacré par l'usage nous continuerons à l'utiliser par commodité.

PREMIERE PARTIE.

CHAPITRE I : Résultats des observations et des travaux antérieurs relatifs à la sexualisation des Desmidiées.

I.1	HISTORIQUE	2
I.2	LA METHODE DE STARR POUR L'OBTENTION DE CONJUGAISONS IN VITRO	4
I.3	BUT DU PRESENT TRAVAIL	5

CHAPITRE II : Matériel et techniques générales de culture.

II . 1	Position systématique de la souche utilisée	7
II.2	Description morphologique	8
<i>III.3</i>	Techniques de culture	
	a) Isolement	10
	b) Obtention de souches axéniques	11
	c) Modifications expérimentales de l'environnement	12
	d) Technique de comptage	12

PREMIERE PARTIE

Chapitre I : RESULTATS des OBSERVATIONS et des TRAVAUX ANTERIEURS RELATIFS à la SEXUALISATION des DESMIDIEES.

1.1 - HISTORIQUE.

Tous les auteurs qui ont observé des Desmidiées insistent sur la rareté de leur reproduction sexuée dans les conditions naturelles ; ils remarquent également que dans les cas rares où elle se produit elle affecte pratiquement toute la population. Des espèces et des genres différents sexualisent en même temps, et en grande abondance, indiquant ainsi que la réponse sexuelle est probablement induite pour des espèces différentes par la même combinaison de facteurs de l'environnement.

Les premiers chercheurs (DE BARY, 1858 ; KLEBAHN, 1891) obtinrent parfois des zygospores en transportant des populations naturelles au laboratoire. KLEBS (1896) provoqua la sexualisation du *Cosmarium botrytis* en immergeant les cellules dans une solution de saccharose, et celle du *Closterium lunula* en augmentant l'éclairement. Ensuite, pendant une longue période, ceux qui utilisèrent des cultures unialgales ou clonales ne réussirent plus à obtenir la reproduction sexuée au laboratoire. Seul LEFEVRE (1937) observa par hasard, une fois à la fin du printemps, une autre fois en hiver, des zygospores dans une culture de *Closterium acerosum* homothallique, sans pouvoir ensuite reproduire le phénomène.

Dans la première moitié du XXème siècle, on ne mentionne donc pratiquement aucune expérience d'obtention systématique de zygospores en culture. Il n'est fait état que d'observations fortuites sur le terrain, parfois accompagnées d'indications précises de dates. Nous ne rappelons que quelquesunes de ces observations. On trouvera dans KRIEGER (1937) et dans TASSIGNY (1971a) des listes bibliographiques très complètes sur ce sujet. COMERE (1906) mentionne des sporulations dans des "collections d'eau temporaires" du Midi de la France, pendant la période estivale.

FRITSCH et RICH (1913) observent des zygospores de Closterium kützingii en mai 1906 et celles d'un Staurastrum en juillet 1908 en Grande-Bretagne.

ALLORGE et al. signalent le plus grand nombre d'espèces en conjugaison en Sologne (1925) puis en Galice (1930), pendant la période estivale.

HOMFELD (1929) décrit de nombreuses zygospores de Desmidiées en Allemagne du Nord sans toujours préciser la date.

C'est à partir des très nombreuses observations de terrain de divers auteurs, que nous ne pouvons citer tous, que sont repris la plupart des dessins de zygospores qui illustrent les monographies sur les Desmidiées de WEST & WEST (1904-1923) et de KRIEGER (1937).

D'après LEFEVRE et MANGUIN (1938), l'opinion généralement admise à l'époque est que les zygospores de Desmidiées sont formées au début de la saison froide et sont des organes de résistance au froid. Leurs propres observations dans divers étangs de la région parisienne montrent que les Desmidiées sont capables de résister et même de se multiplier à des températures très basses, mais ils n'observent aucune zygospore en hiver (pas plus d'ailleurs qu'en été dans les mêmes stations...). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la reproduction sexuée des Desmidiées :

- le rôle prépondérant de la <u>lumière</u> dans la sexualisation des Algues et des Champignons est pressenti par KLEBS dès 1896 ;

- pour COMERE (1906) c'est l'élévation de température et l'assèchement des "collections d'eau" qui provoquent la sexualisation en masse ;

- TRANSEAU (1916) suggère que la conjugaison ne peut intervenir qu'<u>après un</u> grand nombre de multiplications végétatives : la reproduction sexuée des Algues coîncide avec leur maximum d'abondance et marque très souvent la fin de leur période de croissance active";

- cependant DUCELLIER (1915) remarque que dans les tourbières de montagne en voie d'assèchement rapide et où la température peut s'élever jusqu'à 30°C on n'observe jamais de zygospores ;

- enfin, SCHREIBER (1925) insiste sur le rôle de la <u>carence en certains produits</u> <u>nutritifs</u>, en particulier l'azote, dans la sexualisation des Algues vertes en général.

Toujours d'après LEFEVRE et MANGUIN (1938) "il est bien difficile de préciser dans quelles conditions se forment les spores ou zygospores d'Algues..." et "les observations relatives aux causes de formation des zygospores sont souvent contradictoires".

VILLERET (1953) obtient des zygospores d'espèces non précisées dans des conditions non définies.

C'est seulement en 1954 que STARR met au point aux Etats-Unis une méthode pour l'obtention systématique et reproductible de conjugaisons chez les Desmidiées, en particulier chez *Cosmarium botrytis* var. subtumidum (dont le nom erroné sera remplacé par celui de *Cosmarium turpinii* en 1958). La méthode est décrite en 1955c.

1.2 - LA METHODE DE STARR POUR L'OBTENTION DE CONJUGAISONS IN VITRO.

Les isolements ne sont tentés qu'à partir de populations naturellement sexuées (ce qui étant donné la rareté du phénomène limite le nombre des isolements possibles), soit à partir de paires conjuguées soit à partir de zygospores. Pour STARR, les facteurs limitant la réponse sexuelle du *Cosmarium botrytis* var. *subtumidum* sont : la lumière, la composition du milieu et la teneur en CO₂ atmosphérique.

L'obtention routinière de zygospores se fait en ensemençant en même temps deux souches compatibles d'une espèce hétérothallique, âgées de 1 mois environ, dans un verre de montre contenant un <u>milieu appauvri</u>, et placé dans une boîte de Pétri au fond de laquelle on verse une solution de bicarbonate de sodium à 5 %. Les cultures sont exposées à la <u>lumière</u> (environ 5.000 lux) de tubes fluorescents "warm-white" pendant 18 heures sur 24. La température varie de 20 à 23°C. La suppression du CO₂ par l'addition de NaOH au fond de la boîte de Pétri empêche la conjugaison. Les zygospores sont obtenues, en général après une bipartition, 2 à 4 jours après l'inoculation, d'abord sur le pourtour du verre de montre.

Par cette méthode, plusieurs auteurs sont parvenus à provoquer de manière reproductible la reproduction sexuée de diverses espèces de Desmidiées. FOX (1957) obtient la sexualisation de Closterium moniliferum et ses travaux sont repris par LIPPERT (1967) sur C. moniliferum et C. ehrenbergii. COOK (1963) induit la formation de zygospores chez plusieurs espèces de Closterium. STARR et RAYBURN (1964) provoquent la formation de spores chez Mesotaenium kramstai et GEITLER (1965) l'observe chez Mesotaenium dodekahedron. BIEBEL (1964) étudie la sexualisation et la germination de Netrium digitus. KIES obtient des spores de Closterium acerosum (1964), Roya obtusa (1967) et Micrasterias papillifera (1968). BRANDHAM et GODWARD (1965a) décrivent des conjugaisons chez Closterium leibleinii, C. acerosum, C. siliqua, C. kützingii, Staurastrum denticulatum et S. polymorphum. HOSHAW et HILTON (1966) observent le cycle sexué de Spirotaenia condensata. LING et TYLER (1972) induisent la conjugaison chez Pleurotaenium ehrenbergii. ICHIMURA (1972) obtient la conjugaison de Closterium strigosum et VIDYAVATI (1973a et b) celle de Closterium acerosum et de Cosmarium auriculatum. COESEL et TEIXEIRA (1974) après avoir isolé 120 clones de Desmidiées n'obtiennent la sexualisation que pour 3 d'entre eux, dont Closterium moniliferum.

Tous ces auteurs utilisent soit des zygospores récoltées dans la boue du fond des mares et conservées à sec, soit des populations naturelles sexuées, et appliquent strictement la technique de STARR sans faire varier aucun des facteurs.

1.3 - BUT DU PRESENT TRAVAIL.

D'une manière générale ces expériences sont positives mais les rendements en sont faibles : BIEBEL (1964) ne signale chez Netrium digitus que 14 cellules sexuées pour 1000 cellules végétatives. Les résultats sont obtenus à partir de cultures âgées (un mois le plus souvent) déjà en phase de sénescence.

Il nous a semblé intéressant de partir de populations végétatives (d'ailleurs nous n'avons jamais rencontré de zygospores en masse dans le Nord de la France), et d'essayer d'obtenir un maximum de zygospores, le plus rapidement possible, en faisant varier les conditions de l'environnement, de manière à élucider le déterminisme de la sexualisation chez une Cryptogame à chlorophylle.

Nous avons isolé plusieurs clones de Cosmarium, Micrasterias, Euastrum, Closterium, Netrium, etc..., provenant soit de tourbières des Ardennes, soit de cuvettes à Sphaignes du Nord ou du Pas-de-Calais. Les seuls résultats positifs ont été obtenus avec des espèces de Closterium homothalliques : C. rostratum, C. venus, C. acutum et C. moniliferum. En raison de sa taille et de ses facilités de culture, c'est ce dernier qui a été retenu pour l'essentiel de l'expérimentation. Les premiers essais ont été effectués avec des cultures non axéniques, mais ensuite des cultures pures ont été obtenues ; sur milieu favorable, elles peuvent sexualiser avec presque autant d'intensité que les cultures non axéniques.

Après avoir mis au point une technique d'obtention des stades sexués de manière reproductible, nous avons pu en effectuer l'étude ultrastructurale. Celle-ci fera l'objet, pour plus de commodité, de la seconde partie, essentiellement descriptive. Les conditions dans lesquelles ces stades sexués peuvent être obtenus seront traitées dans la troisième partie. Chapitre II : MATERIEL et TECHNIQUES GENERALES de CULTURE.

II.1 - POSITION SYSTEMATIQUE DE LA SOUCHE UTILISEE.

Nous avons isolé plusieurs clones d'une forme de *Closterium* prélevée à l'état végétatif en septembre 1968 dans une mare à Sphaignes du Pré Communal de Wardrecques (Pas-de-Calais) dont le pH variait de 5 à 6. Aucune zygospore n'a été observée ni dans les prélèvements ni dans la boue du fond de la mare. Il s'agit d'une espèce benthique de grande taille.

Tous les clones sont identiques par leur comportement et leur morphologie, ce qui laisse penser que le peuplement de la mare a pu s'effectuer à partir d'une seule cellule à l'origine.

Les Closterium sont des Algues vertes unicellulaires. Si l'on suit la terminologie de BOURRELLY (1972), il faut les placer dans l'embranchement des Chlorophytes, ou Chlorophycophytes, dans la classe des Zygophycées, dans l'ordre des Desmidiales, et dans la famille des Clostériacées.

MIX (1973), considérant la structure de la paroi, les place dans la classe des Conjugatophyceae, dans l'ordre des Desmidiales (Placodermae), dans le sous-ordre des Archidesmidiinées, et dans la famille des Clostériacées.

Pour STEWART (1974) ils appartiennent à la classe des Chlorophyceae et à l'ordre des Desmidiales.

Il s'agit d'un type de *Closterium* à cellules en forme de croissant dont les moitiés symétriques portent le nom d'hémisomates. La paroi est lisse, incolore et dépourvue de "ceintures", c'est à dire des traces circulaires des bipartitions successives. Chaque hémisomate renferme un chloroplaste de grande taille (chromatophore), à section étoilée, où les pyrénoïdes en nombre variable (2 a 5) sont disposés en file. Le critère de taille seul (L : 160 - 80 µm; 1: 26 - 21 µm) nous amène en suivant la clé de détermination de KRIEGER (1937) au *Closterium leibleinii* Kütz (140 - 24 µm) plutôt qu'au *Closterium moniliéerum* (Bory) Ehrenb. (250 - 42 µm). Mais COOK (1963) a montré que par sa reproduction sexuée C. *leibleinii* se rapprochait davantage du groupe *venus-dianae* que du groupe *moniliéerum*. P. BOURRELLY et B. LIPPERT qui ont bien voulu examiner cette souche sont d'accord pour y voir une forme de C. *moniliéerum* à cellules plus petites, moins courbées et moins renflées au centre que celles du type. En outre, cette forme est nettement acidiphile alors que le type se trouve plutôt dans les eaux eutrophes à pH neutre ou légèrement basique.

L'espèce étudiée par BRANDHAM (1965a) sous le nom de Closterium siliqua West & West ne ressemble par sa morphologie végétative et sexuelle ni au C. littorale Gay donné en synonymie par KRIEGER (1937) ni au C. littorale étudié en microscopie électronique par PICKETT-HEAPS et FOWKE (1971). Elle présente par contre de grandes analogies avec l'espèce que nous étudions.

II.2 - DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE.

La morphologie des individus végétatifs varie avec les conditions de culture ; le rapport l/L par exemple varie entre 0,16 (21°C, 1300 lux) et 0,22 (21°C, 2600 lux). Les cellules sont en forme de croissant faiblement courbé, légèrement renflé au centre (Pl. I, fig. 1). Elles sont limitées par une enveloppe pecto-cellulosique, colorable par le rouge de ruthénium, le réactif phosphorique iodé de MANGIN, et faiblement par le chlorure de zinc iodé. A chaque extrémité de la cellule, du côté concave, se trouve un pore à mucilage de grande taille ; le mucilage excrété par ces pores terminaux joue un rôle dans la locomotion et l'on peut colorer au rouge de ruthénium les traces circulaires laissées par les cellules sur la gélose. Contrairement à ce que nous

avons pu observer chez diverses espèces de *Cosmarium* et de *Micrasterias* nous n'avons pu mettre ici en évidence aucun phototopotactisme : la direction de la source de lumière par rapport à la culture ne semble pas avoir d'importance. Par contre, l'Algue réagit aux différences d'intensité de l'éclairement et manifeste un photophobotactisme dont nous décrivons les effets p. 12 . En outre, il semble que des rangées de pores plus petits se trouvent sur toute la surface cellulaire. Ils ont été mis en évidence dans une condition de culture où la proportion de chélate de fer avait été accidentellement doublée. Après fixation au mélange 3/1 [3 parties d'éthanol absolu et 1 partie d'acide acétique glacial], la surface des cellules était couverte de verrues brunâtres alignées leur donnant l'aspect "*punctatum*" décrit par KRIEGER (1937) pour diverses espèces de *Closterium* et que LEFEVRE et BOURRELLY (1938) interprètent comme des excrétions plus ou moins pathologiques. Les études de MIX (1969) au microscope électronique ont confirmé la présence de ces pores chez de nombreuses espèces de *Closterium*, dont *moniliferum*.

Chacun des deux chromatophores montre une section étoilée à 6 ou 8 crêtes longitudinales. Le nombre de pyrénoïdes (2 à 5 par chromatophore) varie avec les conditions de culture : il diminue en lumière atténuée. Les pyrénoïdes sont entourés d'amidon, que l'on trouve également dans les crêtes du plaste. Le noyau volumineux (diamètre : 10 µm environ) à nucléole très apparent, occupe une position centrale. Des vacuoles de grande taille se trouvent entre les crêtes des chromatophores. Les vacuoles terminales renferment seulement 2 ou 3 cristaux de gypse, parfois même aucun.

Pour rendre plus compréhensible la suite de l'exposé, nous décrivons brièvement sur la fig. 1 les stades de la conjugaison et le déroulement de celle-ci en fonction de l'éclairement qui s'est révélé être pour cette espèce particulière le facteur déterminant de la sexualisation.

Après une période de maturation et de dormance qui dure un mois et demi environ, les zygospores conservées à la lumière à la température ambiante peuvent germer spontanément, avec ou sans réhydratation de la gélose. C'est au moment de la germination qu'a lieu la fusion des noyaux gamétiques, immédiatement suivie d'une méiose. Deux jeunes individus, d'abord binucléés, puis uninucléés par dégénérescence de l'un des noyaux, résultent de ce processus. Dans des conditions d'éclairement favorables, ils peuvent se sexualiser après une seule bipartition végétative.

Il s'agit d'un organisme à cycle monogénétique haplophasique.



Fig.1_Déroulement des phases de la conjugaison chez le <u>C. moniliferum</u>.

II.3 - TECHNIQUES DE CULTURE.

a - Isolement :

Les individus végétatifs sont prélevés en conditions stériles à partir du milieu d'origine à la micropipette sous la loupe binoculaire, lavés une dizaine de fois dans un milieu nutritif stérile selon la technique de PRINGSHEIM (1967) puis mis en culture sur milieu solidifié par le Bacto Agar Difco à 15 g.l⁻¹, en boîtes de Pétri fermées par du ruban adhésif. Les souches ainsi obtenues sont unialgales mais non axéniques.

Plusieurs milieux pour culture d'Algues d'eau douce, décrits par STARR (1964) ont été essayés. Au départ, celui qui a donné la multiplication la plus rapide est le milieu de WARIS (1953), dont la composition est donnée dans le paragraphe "Influence du milieu" p. 74.

La culture sur milieu solide ne peut s'appliquer qu'aux espèces subaériennes ou benthiques, mais elle présente de multiples avantages, en

particulier une observation très facile des colonies à travers la gélose. Chaque clone peut être rapidement isolé, et les clones sexuels rigoureusement sélectionnés.

b - Obtention de souches axéniques :

Les premières expériences de sexualisation ont été effectuées avec des cultures non axéniques. Parallèlement, nous avons tenté d'isoler des cultures axéniques par l'utilisation d'antibiotiques après avoir effectué un antibiogramme sur les cultures mixtes. Chloramphénicol, kanamycine, néomycine, streptomycine se sont tous révélés plus toxiques pour les Algues que pour les Bactéries. Seule la pénicilline a donné des résultats satisfaisants. Le milieu de culture gélosé est additionné de 2500 U.I.ml⁻¹ de "Specilline G" des laboratoires SPECIA. Les cultures, préalablement lavées, demeurent 2⁴ heures en contact avec ce milieu, en lumière atténuée, à 20°C. Elles sont ensuite transplantées sur milieu neuf où elles se développent. Environ 10 % des colonies obtenues sont axéniques. Elles sont isolées rapidement et multipliées. Un contrôle est effectué sur milieu nutritif Standard pour Bactéries mais MACHLIS (1973) insiste sur le fait qu'un contrôle supplémentaire s'impose au microscope car certaines Bactéries qui se développent mal sur milieu Standard peuvent néanmoins contaminer les souches.

Un contact de plus de 24 heures avec le milieu additionné d'antibiotique, une concentration plus élevée de celui-ci, ou un éclairement intense pendant la période de contact empêchent la division ultérieure des cellules.

La plupart des colonies axéniques, bien que présentant une bonne croissance végétative ne sexualisent pas lorsqu'elles sont placées en conditions normalement inductrices. Sur 2100 sous-clones, 6 seulement ont restauré leurs potentialités sexuelles, et leurs réponses ultérieures n'ont pas été aussi régulières que celles des colonies non axéniques. MACHLIS (1973) a également observé ce phénomène à propos d'*Oedogonium cardiacum* sans pouvoir en expliquer la cause.

c - Modifications expérimentales de l'environnement :

Nous disposons d'enceintes conditionnées" où peuvent varier la température, l'intensité de l'éclairement et la longueur de la photopériode. Les premières expériences en lumière blanche ont été effectuées avec des tubes fluorescents du type "blanc brillant de luxe" ; ensuite de meilleurs résultats ont été obtenus avec les tubes "Sylvania Gro-lux", en particulier les tubes "W.S." à large spectre d'émission, riche en radiations rouge sombre.

Les expériences en lumière monochromatique ont été effectuées d'abord de manière approximative avec des tubes Philips émettant une lumière "rouge", "verte" ou "bleue", et des filtres Rohm et Haas. Ensuite nous avons effectué deux séjours au Phytotron de Gif-sur-Yvette où nous avons pu utiliser l'illuminateur spectral. Enfin le laboratoire de Cryptogamie a acquis 4 lampes au Xénon de 450 watts sur le flux lumineux desquels on interpose des filtres interférentiels M.T.O. Ce dispositif permet d'obtenir une gamme de longueurs d'onde avec une bande passante suffisamment étroite de l'ordre de 10 à 15 nm et un niveau énergétique convenable.

Les mesures de l'intensité d'éclairement ont été effectuées avec un luxmètre pour la lumière blanche, avec une thermopile Kipp et Zonen couplée à un galvanomètre Philips pour les lumières monochromatiques. Les conditions expérimentales précises seront détaillées dans les paragraphes consacrés à l'action de la lumière sur la biologie du *Closterium*.

d - Technique de comptage :

Lorsque l'éclairement des cultures n'est pas trop intense (< 2500 lux). les cellules ont tendance à se disposer en colonies circulaires nettement séparées les unes des autres si l'ensemencement est suffisamment dilué. Il est facile de repérer les cellules sexuelles dans ces colonies ; mais les individus sont plus ou moins superposés et leur dénombrement n'est pas aisé. Nous avons trouvé plus commode d'exprimer les résultats en "nombre de colonies sexuelles", en considérant comme "sexuelles" celles qui présentaient au moins un couple de

^{*}Ces enceintes conditionnées dépendant soit du laboratoire de Cryptogamie, soit du laboratoire de Physiologie végétale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille. cellules appariées, celles-ci, très sombres, se distinguant nettement des cellules végétatives. Nous traçons sur le fond de la boîte de Pétri un quadrillage à maille de 5 mm et nous comptons dans 5 à 10 des carrés pris au hasard le nombre de "colonies végétatives" et le nombre de "colonies sexuelles". Le résultat est exprimé en "pourcentage de colonies sexuelles", et il n'a qu'une valeur indicative. La variabilité des résultats d'une culture à une autre pourtant ensemencée et placée dans des conditions absolument identiques interdit tout calcul d'erreur ; il est fréquent d'obtenir par exemple dans 4 boîtes de Pétri un résultat sexuel positif et cohérent, et de n'observer dans 2 autres boîtes identiques qu'une réponse végétative. Il serait plus exact de parler de "réponse positive" ou "négative" ; le seul moyen d'obtenir des résultats reproductibles a été d'effectuer un grand nombre d'expériences en éliminant systématiquement les souches qui demeuraient végétatives.

Lorsque l'éclairement est intense ou prolongé, les cellules se dispersent sur la gélose sans former de colonies ; il est plus commode alors de dénombrer les cellules sexuées par rapport aux cellules demeurées végétatives. Dans chaque boîte 1000 à 1500 cellules sont ainsi dénombrées dans 5 à 10 carrés pris comme précédemment.

Cette variabilité dans les réponses expérimentales semble fréquente chez les Desmidiées. BIEBEL (1964) signale : "when a series of tubes is inoculated from the same culture at the same time, abundant production of spores occurs in some tubes while few or none are formed in others". LIPPERT (1973) à propos d'expériences sur l'action du CO₂ et du pH dans la conjugaison des C. moniliferum et ehrenbergii remarque également : "... the results were not as consistent as one may have wished..".

DEUXIEME PARTIE.

Morphologie et cytologie de l'Algue au cours de son cycle biologique.

CHAPITRE I : L'individu végétatif.

I.1 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

1.1.1	Morphologie et cytologie de l'individu quiescent	14
1.1.2	La mitose	16
1.1.3	Anomalies de la bipartition	17

I.2 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1.2.1	Techniques de fixation et d'inclusion	19
1.2.2	Structure de la paroi a) la pellicule externe b) la paroi interne	20 22
1.2.3	Le plasmalemme et les structures associées	25
1.2.4	Les plastes	26
1.2.5	Le поуаи	29
1.2.6	Les autres inclusions cytoplasmiques	30

CHAPITRE II : Les stades de la sexualisation et de la conjugaison.

II . 1	L'APPARIEMENT					
	II.1.1 Observations en microscopie photonique	31				
	II.1.2 Modifications infrastructurales	34				
II.2	LA PRECONJUGAISON ET LA PAPILLE DE CONJUGAISON					
	II.2.1 Observations en microscopie photonique	35				

II.2.2 Modifications infrastructurales

II.3 LA CONJUGAISON ET LA JEUNE ZYGOSPORE

II.3.1	Observations	en	microscopie	photonique	••••	42
II.3.2	Observations	en	microscopie	électronique		46

CHAPITRE III : La zygospore mûre.

III.1	OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	50
<i>III.2</i>	OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	51
	III.2.1 Méthodes de fixation et d'inclusion	52
	III.2.2 La paroi	53
	III.2.3 Les constituants cytoplasmiques	54
	III.2.4 Le zygote réactivé par la lumière	58

CHAPITRE IV : La germination.

IV.1 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

IV.1.1	Les stades morphologiques de la germination	61
IV.1.2	La méiose	63

IV.2 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

IV.2.1	Le stade	"2 plastes verts"	65
IV.2.2	Le stade	"vésicule de germination"	66
TV 2 3	Le stade	"deur jeunes individus"	68

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE	70
TABLE DES PLANCHES	72
PLANCHES HORS-TEXTE.	

DEUXIEME PARTIE: MORPHOLOGIE et CYTOLOGIE de l'ALGUE au COURS de son CYCLE BIOLOGIQUE.

CHAPITRE I : L'INDIVIDU VEGETATIF.

I.1 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

I.1.1 Morphologie et cytologie de l'individu quiescent :

Une brève description morphologique a déjà été donnée p. 7 . Il y a peu de choses à y ajouter. La paroi de la cellule est entourée d'un abondant mucilage qui peut être mis en évidence par imprégnation de la gélose à l'encre de chine, ou par coloration au rouge de ruthénium. Excrété par un des pores terminaux en grande quantité il permet la locomotion de la cellule sur un substrat solide, en général selon une trajectoire circulaire.

En quantité moins importante, plus diffus, il entoure la cellule et il est vraisemblablement excrété par les pores plus petits alignés à sa surface.

La paroi elle-même se colore en rouge vif par le rouge de ruthénium, et réagit aux colorants suivants : bleu de méthylène, chlorure de zinc iodé, réactif iodo-sulfurique, réactif iodo-phosphorique, qui la colorent en bleu ; la réaction est toujours plus faible sur l'hémisomate néoformé.

La réaction à l'acide périodique-Schiff (selon JENSEN 1962 p. 198), colore vivement en rouge le mucilage périphérique, qui forme une sorte de manchon souple que la cellule abandonne au fur et à mesure sur la gélose ; la paroi se colore également, mais de manière moins intense.

Le mucilage se dissout dans une solution d'oxalate d'ammonium (0,5 %, 12 h à 70-80°C) ; il est probablement formé de composés pectiques. YEH et GIBOR (1970) ont montré que chez *Closterium acerosum* le mucilage, qui n'est dissous que par le lysozyme, est vraisemblablement un polymère "composé au moins en partie d'acide N-acétyl muramique lié à la N-acétyl glucosamine".

La paroi des cellules âgées de 24 heures au moins résiste à l'extraction par la soude à 4 % (12 h à 25°C) puis par la soude à 17 % (12 h à 25°C) et elle est vraisemblablement de nature cellulosique. Les hémisomates néoformés (jusqu'à 12 h environ après la bipartition) ne résistent pas à cette extraction par la soude ; ils se boursouflent, se distendent et éclatent. Ils sont vraisemblablement constitués d'abord de composés pectiques et d'hémicelluloses ("paroi primaire" selon la terminologie de MIX 1972) ; la cellulose se dépose ensuite massivement lorsque l'élongation est terminée.

Le fluorochrome "Calcofluor White ST"^{*} est fréquemment utilisé pour mettre en évidence les parois cellulosiques (NAGATA et TAKEBE, 1970) en particulier au cours de leur régénération par les protoplastes de Spermatophytes, bien que sa spécificité pour la cellulose n'ait pas été démontrée et que des travaux récents montrent qu'il se fixe sur de nombreux polysaccharides. Utilisé comme colorant vital à la concentration de 0,0025 % dans le milieu de culture il provoque dans la paroi du C. moniliferum éclairé par une lumière U.V. à 350 nm une fluorescence bleue très intense (Pl. III, fig. 1 et 2).

L'"auramine", autre fluorochrome, utilisé habituellement pour la mise en évidence des Mycobactéries, qui est d'après RICHARDS (1941) un colorant spécifique de l'acide mycolique, provoque également une fluorescence jaunâtre dans la paroi des cellules du C. moniliferum.

Plusieurs espèces de *Closterium* présentent dans leur paroi une accumulation de fer. Les jeunes cultures de *C. moniliferum* ne montrent aucune réaction au ferrocyanure de potassium en solution saturée ; elles ne fixent pas de fer dans leurs parois. Par contre, les cultures âgées (2 mois ou plus) réagissent positivement à cette réaction ; les hémisomates âgés montrent une vive coloration de bleu de prusse ; la réaction est moins intense au niveau des hémisomates les moins âgés.

Gracieusement mis à notre disposition par American Cyanamid Co. Bound Brook, N.J. U.S.A.

L'observation du cytoplasme en microscopie photonique n'apporte que peu de renseignements. Les vacuoles qui se trouvent masquées entre les expansions du plaste étoilé sont mises en évidence par le rouge neutre ou le bleu de crésyle brillant. Les vacuoles à gypse renferment rarement des cristaux en culture.

Les plastes montrent leurs crêtes longitudinales, et leurs pyrénoïdes alignés dont le nombre varie de 2 à 5 par plaste selon l'intensité de l'éclairement. L'amidon, mis en évidence par le lugol dilué, se présente en plaques groupées autour des pyrénoïdes ou dispersées dans le plaste. L'abondance de l'amidon varie avec l'éclairement.

Le noyau volumineux dont le diamètre atteint 10 µm se trouve au centre de la cellule entre les deux plastes ; il présente un nucléole réfringent de grande taille, qui se colore en rouge sombre par le carmin acétique.

I.1.2 La mitose :

Elle a été étudiée sur des cultures partiellement synchronisées soumises à un éclairement de 16 heures par cycle de 24 heures. Les cellules sont fixées à partir du début d'une période sombre, toutes les 30 mn pendant 4 heures, directement sur la gélose, par le mélange 3/1, et placées au réfrigérateur pendant au moins 24 heures. Le fixateur est éventuellement renouvelé. Ce temps de fixation de 24 heures est un minimum, si l'on ne veut pas être gêné par la chlorophylle et l'amidon des plastes. Cet amidon est partiellement hydrolysé au cours de la fixation.

Les cellules sont ensuite placées sur une lame dans une goutte de carmin acétique ferrique avec un cristal d'alun de potassium (GODWARD, 1948) ; la préparation est chauffée jusqu'à noircissement du colorant. La coloration est améliorée par addition d'une goutte d'hématoxyline acétique selon GAGNIEU (1949). Les chromosomes punctiformes sont difficilement séparables et leur numération en mitose est pratiquement impossible comme c'est le cas chez la plupart des espèces de *Closterium* (GODWARD 1966).

La cellule destinée à se diviser présente une élongation de la région centrale comprise entre les deux plastes, qui passe de 8 µm environ à près de

15 µm. Cette zone claire est nettement visible sur le vivant. Elle présente une légère constriction, conforme à la description rapportée par FRITSCH (1965) mais à ce stade nous n'y avons pas observé d'épaississement annulaire interne. La prophase dure 30 à 45 mn. Dès la métaphase (Pl. II, fig. 1), très courte (10 mn), le septum annulaire caractéristique du genre Closterium est nettement visible au niveau de la légère constriction signalée plus haut. Au début de l'anaphase (Pl. II, fig. 2), les deux cellules-filles sont séparées sur un tiero de leur largeur environ et les fibres fusoriales sont tout à fait indépendantes de la formation du septum qui s'achève pendant la télophase, très longue (1 h environ) (Pl. II, fig. 3). Les deux noyaux néoformés migrent latéralement vers le tiers de l'ancien hémisomate. Dans la plupart des cas, la division du plaste s'effectue en même temps que cette migration. La séparation entre les deux hémisomates primitifs se fait au niveau du septum. La partie néoformée atteint sa taille définitive 10 à 12 heures après le début de la période obscure. La paroi cellulosique s'épaissit ensuite et les deux cellules-filles se disposent tête-bêche sur un arc de cercle. La colonie a finalement une forme circulaire ; dès le stade 32 cellules, elle mesure 400 à 600 µm de diamètre et elle est visible à l'oeil nu.

I.1.3 Anomalies de la bipartition :

En lumière continue intense (2600 lux) on n'observe aucun synchronisze. Des anomalies de division peuvent provoquer la formation de boyaux plurinucléés, létaux, correspondant à 3 ou 4 cellules, et de cellules binucléées, viables, de taille plus grande que celle des cellules normales (160 - 210 µm x 30 - 35 µm). On peut ainsi isoler des clones binucléés, très instables ; remis en conditions normales, ils reviennent rapidement à l'état haploïde. Mais ainsi que l'a montré KALLIO (1953) certains de ces clones peuvent se stabiliser et se révéler diploïdes. Le stade tétraploïde n'a pas été observé. BRANDHAM (1965a) a également obtenu des clones diploïdes de *Closterium siliqua* West et West, sans traitement particulier, en éclairant les cultures 12 h sur 24. Ces clones peuvent provenir de cellules où les deux noyaux issus d'une mitose se retrouvent accidentellement du même côté du septum, ou lorsque le septum ne se forme pas. Les deux noyaux peuvent alors persister côte à côte ou fusionner. De telles fusions ont été observées chez plusieurs espèces de *Micrasterias* par KALLIO (1946).



100 µm

- Figure 2 : Partitions anormales. Culture axénique de 2 mois.
 a cas le plus fréquent : rejet réitéré d'un fragment anucléé du même côté de la cellule végétative.
- b cas peu fréquent : rejet d'un fragment anucléé de part et d'autre de la cellule végétative.

Dans certaines conditions de culture nous avons observé des figures anormales (fig. 2), différentes de celles décrites par STARR (1955b) chez C. didymotocum, ou par LHOTSKY (1948) chez C. moniliferum sous le nom de "chlamydospores", mais proches de celles observées par BRANDHAM (1965b) chez la même espèce. Cependant, la figure d'un tel "akinète" donnée par BRANDHAM n'a été que rarement observée par nous (2 % des cas environ). Dans la plupart des cas, une cellule végétative abandonne, sans division nucléaire apparente mais après bipartition de l'un des plastes, un fragment d'hémisomate plus ou moins long, vert foncé, dans lequel on reconnaît encore la structure du plaste avec un ou plusieurs pyrénoïdes et de l'amidon très abondant. La présence d'un noyau n'a pu être mise en évidence dans ces fragments qui se décolorent 1 ou 2 semaines après leur abandon. La partie restante régénère un hémisomate. Celui-ci atteint une taille normale dans le cas de cellules demeurées longtemps en conditions défavorables (froid, obscurité), puis transférées sur milieu neuf ; les autres bipartitions sont normales. Dans le cas de cultures axéniques demeurées 3 mois à 18°C en alternance 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité, ce nouvel hémisomate demeure court et le phénomène d'abandon peut se répéter 4 ou 5 fois, toujours du même côté de la cellule. Transplantée sur milieu neuf, celle-ci subit d'emblée une bipartition normale. En aucun cas, ainsi que l'avait observé BRANDHAM, la paroi de la cellule restante ne s'épaissit. Il s'agit vraisemblablement d'un processus de régénération de la cellule lorsque celle-ci se trouve placée en conditions défavorables ne permettant pas une multiplication normale. A ce propos se pose cependant le problème de la division du plaste et de la néoformation de la paroi en dehors de la division nucléaire. LHOTSKY (1973) a décrit à nouveau des chlamydospores chez plusieurs *Closterium* récoltés dans la nature, et les a interprétées comme des "hypnospores asexuées" ; les figures qu'il donne montrent toutes un épaississement de la paroi que nous n'avons jamais observé.

I.2 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

I.2.1 Techniques de fixation et d'inclusion :

Après quelques essais de fixation par les techniques classiques glutaraldéhyde postosmié, acide osmique seul, permanganate de potassium seul, la technique qui s'est révélée la plus favorable pour ce matériel est celle décrite par FRANKE et al. (1969). Pour faciliter le transport des cellules, nous avons essayé plusieurs types de préinclusion, dans un bloc de gélose ou dans un caillot de fibrine (selon CHARRET et FAURE-FREMIET, 1967). Ces procédés ont été abandonnés à cause des difficultés de déshydratation puis de pénétration des résines qu'ils entraînent.

Les cellules, prélevées à la micropipette sur la gélose, sont fixées, dans une microcuvette posée sur de la glace pilée, par un mélange de glutaraldéhyde à 2 % et d'acide osmique à 2 %, en solution dans le milieu de WARIS^{*}

" La composition du milieu de WARIS est détaillée p. 74.

à pH 5,4 ou dans un tampon au cacodylate de sodium 0,05 M à pH 6,8 ; la fixation dure 30 mn à l heure à froid. Après plusieurs lavages dans les solutions précédentes on procède à une post-fixation par l'acide osmique à 2 % soit dans le milieu de WARIS soit dans le tampon cacodylate, à froid, pendant 3 heures. Après déshydratation par l'acétone, les cellules sont incluses dans l'araldite ou dans l'épon. Les coupes sont contrastées soit par une solution aqueuse de KMnO₄ à 1 % soit par la méthode classique acétate d'uranyle-citrate de plomb, soit par l'acétate d'uranyle seul en solution aqueuse saturée.

Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope HITASHI du type H.S. 75.

I.2.2 Structure de la paroi :

a - La pellicule externe :

D'après MIX (1967, 1969, 1972) cette couche externe ("Aussenschicht") de matériel amorphe et dense aux électrons est caractéristique des genres Penium, Closterium et Gonatozygon. CHARDARD (1965) l'avait observée chez Closterium acerosum sous forme de "couche mince de matériel dense et d'épaisseur inégale, qui présente un aspect dentelé", et n'y avait pas signalé de pores. En 1975, chez le même Closterium, CHARDARD ne mentionne plus cette couche externe, dans les coupes de jeunes hémisomates présentées, elle ne se différencie pas du reste de la paroi après le test de Thiéry. GERRATH (1969) signale chez Penium spinulosum "an outer electrondense layer" dont les épines sont des expansions ; il ne formule aucune hypothèse quant à sa nature.

Chez Closterium moniliferum cette couche est percée de pores, mis en évidence par MIX (1969) puis nous-même (1973, paru en 1975) ; ils ne se prolongent pas complètement dans les couches sous-jacentes (Pl. IV, fig. 1 et Pl. V, fig. 1).

Pour CHARDARD (1964), cette pellicule externe, d'après sa coloration au rouge de ruthénium, est de nature pectique. MIX (1972) lui attribue les "caractères généraux des composés pectiques"; chez *Penium* et *Gonatozygon* elle ne réagit plus au rouge de ruthénium après un traitement de 60 mn à la potasse à 24 %; les épines qui sont dans ces genres des expansions de la couche externe disparaissent également. MIX reprend ainsi l'hypothèse émise par FRITSCH (1965) qui décrit chez les Algues une couche externe sombre, résistante, nettement définie et néanmoins différente de la cuticule des végétaux supérieurs. Chez les Rhodophycées et les Phéophycées, il attribue une nature pectique à cette "cuticule". HANIC et GRAIGIE (1969) ont montré que cette "cuticule" était, chez les Rhodophycées et les Chlorophycées qu'ils ont étudiées, essentiellement de nature protéique ; chez *Porphyra* cette couche externe mince et dense aux électrons est très comparable à ce que nous observons. Malgré son rôle protecteur, elle n'est pas identique à la cuticule des Spermatophytes qui ne renferme pas de protéines.

Chez Closterium moniliferum, le traitement à la potasse à 24 % pendant 1 heure suffit pour supprimer la réaction au rouge de ruthénium et donc pour éliminer les composés pectiques. L'acide osmique colore fortement la pellicule externe sur les hémisomates fixés et vidés de leur contenu. Ce n'est pas un réactif spécifique des lipides, mais l'observation des cellules pendant les repiquages révèle une partie externe non mouillable, à comportement différent de ce que l'on peut observer par exemple chez Spirogyra où cette couche externe est essentiellement pectique, bien que JORDAN (1970) y montre une très mince pellicule externe dense aux électrons.

Il est probable que chez *Closterium* cette couche externe est au moins en partie de nature lipidique ; malheureusement elle ne se colore que faiblement par un des colorants spécifiques des lipides, le Soudan III. Le rouge neutre, qui est liposoluble, la colore faiblement.

Chez Micrasterias, KIERMAYER et STAHELIN (1972) ont montré que la couche externe, non fibrillaire, se clive comme une "lipid bilayer" ; KIES (1970a) parle d'"ölige Abscheidungen der Gametangien".

L'hydrolyse de la paroi cellulosique par H₂SO₄ à 70°C pendant 10 mn, puis à température ordinaire pendant 24 heures laisse subsister cette pellicule externe, qui ne prend plus alors ni le rouge de ruthénium ni le Soudan III ; elle se colore en jaune par le lugol.

Il est difficile en l'absence d'une analyse chimique de définir la nature exacte de cette pellicule externe, mais elle n'est pas uniquement pectique. Le terme "cuticule" utilisé par FRITSCH prête à confusion, et les termes "Aussenschicht" ou "pellicule externe", plus vagues, paraissent plus adéquats.

Chez C. moniliferum, cette couche n'est pas parfaitement lisse et présente de part et d'autre des rangées de pores de petites éminences. MIX (1969) émet l'hypothèse que cette couche se constitue par sécrétion à travers la paroi primaire, et même la paroi secondaire, comme une cuticule de Spermatophyte. Elle donne comme argument que dans les jeunes hémisomates cette couche est très mince alors qu'elle s'épaissit autour des hémisomates âgés. C'est ce qui expliquerait l'aspect des coupes de CHARDARD (1975) : cette couche ne serait pas différenciée dans les parties jeunes.

Je ne suis pas entièrement d'accord avec cette opinion ; chez C. moniliferum cette couche se différencie très tôt, elle est parfaitement nette au niveau des papilles de conjugaison, qui sont cependant des parties très jeunes, et on l'observe très rapidement autour des jeunes individus issus de la germination des zygospores. Peut-être comme chez l'Hydrodictyon africanum étudié par NORTHCOTE et al. (1960) une matrice à la fois protéique et hémicellulosique sert-elle de support pour l'élaboration de la paroi, hypothèse reprise, étayée et généralisée par LAMPORT (1965). La couche externe s'épaissit probablement ensuite avec l'âge, selon l'hypothèse de MIX.

En résumé, cette pellicule externe, qu'il faut éviter d'appeler cuticule, n'est pas uniquement pectique ; elle est probablement lipidique et protéique également. Elle s'édifie très rapidement autour des parties néoformées et son épaisseur peut s'accroître avec l'âge.

b - <u>La paroi interne</u> :

MIX (1967 - 1969 - 1972) a montré sur les parois isolées de Gonatogygacées et de "Desmidiacées" du type *Penium* et *Closterium* une structure externe, qu'elle appelle primaire, avec des fibres de cellulose disposées sans ordre dans une substance amorphe, et une structure interne, secondaire, où les fibrilles sont disposées parallèlement par faisceaux de 8 à 10. Elle précise (1972, p. 203) qu'en coupe transversale cette distinction entre paroi primaire et paroi secondaire n'est pas possible. CHARDARD (1965) et GERRATH (1969) signalent d'ailleurs une paroi unique.

Les pores ne perforent pas complètement cette paroi ; ils ont une forme conique, et sont partiellement remplis d'une substance moins dense aux électrons que le reste de la paroi à structure fibrillaire (Pl. V, fig. 1 et Pl. X, fig. 3). Pour CHARDARD (1975) l'élaboration de la cellulose pariétale se fait dans le cytoplasme, au niveau des vésicules golgiennes dont le contenu à structure fibrillaire est analogue à celui de la paroi néoformée d'un jeune hémisomate ; il rapproche ce mode d'élaboration de la cellulose, fort rare chez les Végétaux supérieurs, du cas des Algues Haptophycées [terminologie anglo-saxonne] décrites par MANTON (1966) et BROWN et al. (1970b) où des écailles glycoprotéiques sont élaborées dans les vésicules golgiennes puis transportées à l'extérieur du plasmalemme pour constituer la paroi.

Ces structures ("vésicules A") réticulées sont très semblables à celles observées et décrites sous le nom de "Schleimstrukturen" par DRAWERT et MIX (1961a) chez diverses Desmidiées, par KIERMAYER (1968) chez Micrasterias denticulata comme de "large vesicles which presumably contain slime" puis de nouveau par MIX (1969) chez Closterium acerosum ; elle remarque que ces vésicules ("Schleimvakuolen") sont abondantes au niveau des pores.

Par ailleurs, les mêmes structures se retrouvent en abondance dans les glandes digestives du *Drosera rotundifolia* où elles sont décrites par DEXHEIMER (1972) comme des vésicules à mucilage "avec un centre réticulé parfois très dense, d'où rayonnent de nombreuses fibrilles".

Chez Closterium moniliferum nous avons observé le même type de structure dans les cellules végétatives où elles ont un aspect réticulé, et dans les cellules en voie de sexualisation, où leur aspect est variable selon la fixation (Pl. IV, fig. 1 et Pl. X, fig. 2 et 3).

L'aspect le plus typique, que nous avions interprété comme "vésicule à mucilage", est celui des vésicules de type "A" de CHARDARD (1975) à aspect réticulé. Ces vésicules n'ont pas de limite nette et leur contenu a souvent un aspect étoilé. On les observe parfois dans les hémisomates néoformés, plus souvent dans la partie ancienne de la cellule où la paroi est très épaisse. Leur déversement dans le périplasme semble probable. La figure 3 de la planche X montre un alignement de telles vésicules, bordant le plasmalemme creusé de "fossettes" situées juste en face des pores par lesquels les polysaccharides seraient excrétés sous forme de mucilage.

Les vésicules du type "B" de CHARDARD, à contenu nettement délimité et à contenu dense, granuleux, homogène, sont beaucoup moins fréquentes (Pl. X, fig. et 2). En outre, nous avons observé dans les hémisomates néoformés, et également lors de la formation des papilles de conjugaison, c'est à dire dans les zones à croissance rapide, de très nombreuses vésicules de taille variable, dont le diamètre est le plus souvent de l'ordre de 0,3 à 0,6 µm, à contour net, à contenu généralement transparent aux électrons, situées dans des zones où l'appareil de Golgi paraît particulièrement actif (Pl. VIII, Pl. IX, fig. 6, et Pl. X, fig. 1). Parfois une partie centrale plus dense, grisâtre, vaguement étoilée, se trouve mise en évidence au hasard des fixations. VAN DEN WOUDE et al.(1971) observent dans le tube pollinique de *Lilium longiflorum* la même abondance de vésicules du même type, de même taille et une "fixation inhabituelle" montre également dans ces vésicules les structures étoilées que nous y observons parfois.

Il paraît difficile, en l'absence de tests spécifiques de la cellulose, d'affirmer que celle-ci se forme dans les vésicules golgiennes. Tout au plus, par comparaison avec les images obtenues par d'autres auteurs, peut-on dire que ces vésicules renferment les précurseurs pariétaux pecto-cellulosiques, sans préjuger de leur nature, qui varie probablement avec l'âge de la cellule.

Les structures réticulées se rencontrent plus fréquemment dans les parties où la paroi est déjà relativement épaisse ; les vésicules à contour net et contenu transparent, accidentellement dense aux électrons, sont plus abondantes dans la région où la croissance est rapide, en particulier dans les jeunes hémisomates immédiatement après la mitose.

Le raccord entre les hémisomates est beaucoup moins complexe que chez Cosmarium par exemple, où intervient une sorte d'agrafage des parois (PICKETT-HEAPS, 1972) ; il y a continuité entre la partie ancienne et la partie néoformée ; celle-ci présente seulement une couche externe moins différenciée, et une paroi secondaire d'épaisseur moindre (Pl. VIII). Il n'y a pas non plus de formation "en biseau" ni d'emboitement apparent, ce qui explique la rupture facile des cellules au niveau de la suture.

Dans son Traité de Cryptogamie, CHADEFAUD (1960) écrit : [chez Closterium] "Chaque cellule comprend 1) une locula qui n'enveloppe peut être que la moitié la plus jeune de la cellule ; 2) une valve qui enveloppe la moitié la plus âgée . On ne sait pas au juste si la locula s'étend aussi autour de cette moitié, à l'intérieur de la valve".

CHARDARD (1965) n'avait pu mettre en évidence chez Cosmarium lundellii et chez Closterium acerosum cette dualité entre locula et valve. PICKETT-HEAPS et FOWKE (1970b) qui ont étudié le développement des parois chez Closterium littorale ne signalent pas cette distinction, et si l'on compare leur schéma à celui de CHADEFAUD, il faut admettre que la locula se confond avec le plasmalemme, et la valve avec la paroi primaire et secondaire de l'hémisomate le plus ancien.

MIX (1972) a établi une classification des "Conjugatophycées" basée sur la structure des parois. Elle y distingue 4 familles.

- chez les <u>Mésotaeniacées</u> et les <u>Zygnematacées</u>, la paroi est d'une seule pièce ; il n'y a pas de "mue". La couche externe est lisse et hyaline. L'incrustation de la paroi est nulle ou faible et les pores sont absents ;

- chez les <u>Gonatozygacées</u>" et les <u>Desmidiacées</u> du type *Penium* et du type *Closterium*, la paroi est formée de plusieurs segments qui se touchent ou qui s'emboitent légèrement ; il n'y a pas de "mue". La couche externe est compacte et les ornements (stries, épines) en sont des expansions. La paroi est nettement incrustée. L'appareil poral est présent seulement dans la couche externe ;

- chez les Desmidiacées du type Cosmarium, la paroi est constituée par deux parties emboitées ; la couche externe est la "valve primaire" décrite par CHADE-FAUD. Elle n'est pas traversée par l'appareil poral. Les incrustations sont importantes. L'appareil poral se trouve dans la paroi secondaire dont les épines et les verrues sont des expansions. COUTE et RINO (1975) ont analysé chez Cosmarium anthophorum la structure de la paroi au niveau de ces ornementations.

I.2.3 Le plasmalemme et les structures associées (Pl. X, fig. 1 à 4) :

Le plasmalemme des cellules végétatives ne présente aucun caractère particulier. Celui de l'hémisomate néoformé montre souvent un aspect festonné, se creusant au niveau de vésicules cytoplasmiques de grande taille dont le contenu semble s'y incorporer selon un processus déjà connu (VIAN et ROLAND, 1972). C'est également au niveau des hémisomates néoformés que l'on observe parfois des structures multivésiculaires, d'abord décrites chez les Champignons sous le

Pour BOURRELLY (1972), cette coupure entre Gonatozygon et Penium/Closterium n'est pas justifiée ; une seule famille est admise, celle des <u>Clostériacées</u>, définie par EHRENBERG en 1831. nom de "lomasomes" (MOORE et Mc ALEAR, 1961) puis observées par plusieurs auteurs chez les Spermatophytes (entre autres : JENSEN, 1965 ; HALPERIN et JENSEN, 1967). MARCHAND et ROBARDS (1968) passant en revue les divers types de formations multivésiculaires proposent le terme de "plasmalemmasomes" pour les structures associées au plasmalemme et suggèrent qu'ils participeraient à l'élaboration de la paroi au même titre que les vésicules golgiennes. FOWKE et SETTERFIELD (1969), après une étude expérimentale sur des tissus d'Helianthus tuberosus concluent que ces corps multivésiculaires sont des artéfacts, alors que FRIEND (1969) montre leur réalité et leur analogie avec le complexe golgien dans l'épididyme du Rat. NOUGAREDE et LESCURE (1970) aboutissent à la même conclusion sur des suspensions cellulaires du cambium d'Acer pseudoplatanus : les structures multivésiculaires ont un comportement cytochimique analogue à celui des vésicules golgiennes.

Sans pouvoir affirmer rien de précis quant à leur rôle dans la cellule du *Closterium*, nous constatons leur présence au niveau des parties cellulaires en voie d'extension. Ces structures sont d'ailleurs assez rares.

Elles se rencontrent également chez d'autres Algues, dans les cellules en croissance de *Spirogyra* (JORDAN, 1970) et chez l'Algue brune *Petalonia* (COLE et LIN, 1970) (ces auteurs passant en revue les différents cas où des "lomasomes" ont été observés chez les Algues). KIERMAYER et DORDEL (1976) en montrent chez *Micrasterias denticulata* soumis à une centrifugation non létale.

Chez les végétaux supérieurs, il semble que les "lomasomes" aient un rôle enzymatique dans la synthèse de la paroi (ROBARDS, 1968) : ils seraient les transporteurs de méthyl-pectinestérases, jouant un rôle dans les phénomènes de méthylation et d'estérification des précurseurs pariétaux. DASHEK et ROSEN (1966) attribuaient le même rôle aux vésicules sécrétrices issues de l'appareil de Golgi.

I.2.4 Les plastes (Pl. IV, fig. 1 et Pl. V, fig. 1) :

Chaque cellule de Closterium renferme deux plastes focaux à section étoilée, dont les pyrénoïdes sont alignés sur un rang. Le nombre de pyrénoïdes est variable selon l'éclairement.
A l'observation en microscopie électronique, le plaste est classiquement limité par une double membrane. Pour CHARDARD (1971a) la membrane interne joue un rôle très important qu'il a étudié chez *Closterium acerosum* cultivé en lumière atténuée. Elle est à l'origine des lamelles plastidales par invagination et elle bourgeonne des vésicules à contenu granuleux. Ces vésicules seraient à l'origine des "écailles" du pyrénoïde et de la substance granuleuse située entre les lamelles.

Les pigments plastidaux des Desmidiées étudiés par WEBER (1969) sont analogues à ceux des Cormophytes ; un seul pigment caroténoïde semble leur être particulier. La structure du plaste montre également beaucoup d'analogies avec celle des Végétaux supérieurs par la présence d'empilements de thylakoïdes [sacs aplatis, creux, limités par une membrane simple, définis par MENKE, 1960] signalés d'abord par DRAWERT et MIX (1961d) chez Micrasterias, par PUISEUX-DAO et LEVAIN (1963) chez Mougeotia, par CHARDARD (1965) chez Closterium acerosum. CHARDARD a d'ailleurs repris cette étude en 1973 sur Cosmarium lundellii et Closterium acerosum et il aboutit à la conclusion qu'il n'y a "pas de différence essentielle entre les grana des végétaux supérieurs et ceux des Desmidiales". Parmi les Algues vertes, dont la structure du plaste est en général agranaire, les Zygophycées ne sont pas les seules à posséder des formations analogues aux granums. On en a observé également chez Carteria (JOYON et FOTT, 1964; LEMBI et LANG, 1965), chez Chlamydomonas (LEMBI et LANG, 1965; OHAD et al., 1967), chez Protosiphon botryoides (BERKALOFF, 1967). Leur présence semble liée à l'état physiologique de la cellule.

Entre les thylakoïdes, le stroma plastidal se présente en zones finement granuleuses, les granules étant des ribosomes plus petits que ceux du cytoplasme (GIBBS,1968). L'amidon stromatique est peu abondant dans les cellules végétatives ; d'après CHARDARD (1971b) il se formerait dans des zones granuleuses du stroma, limitées par une membrane, et semblables aux "écailles" du pyrénoïde.

Les individus végétatifs montrent fréquemment des alignements de globules fortement osmiophiles entre les thylakoïdes ; leur aspect et leur localisation sont identiques à ceux des plastoglobules des végétaux supérieurs.

L'amidon des individus végétatifs est surtout localisé autour des pyrénoïdes, et d'autant plus abondant que la lumière est plus intense. GRIFFITHS

(1970) puis DODGE (1973) donnent des revues exhaustives concernant les différents types de pyrénoïdes. DRAWERT et MIX (1962) avaient déjà montré chez Micrasterias de larges pyrénoïdes traversés par des thylakoïdes solitaires. CHARDARD (1971b) montre chez Closterium acerosum cultivé en lumière atténuée une structure de pyrénoïde constituée d'un empilement d'"écailles" granuleuses limitées par une membrane, avant que les saccules n'aient atteint le centre du plaste. "Ce n'est qu'ultérieurement que les lamelles prennent contact avec lui". Nous n'avons pu observer ces stades précoces sur les individus végétatifs cultivés normalement. Nous observons la structure classique chez la plupart des Algues vertes, où les saccules empilés se séparent avant de traverser le pyrénoïde, comme c'est le cas chez Chlamydomonas ou Spirogyra. D'autres Chlorophycées (Scenedesmus, Cladophora, Urospora) possèdent un pyrénoïde massif que les lamelles ne pénètrent pas ; chez ces Algues, l'amidon entoure le pyrénoïde d'une enveloppe continue. Chez Closterium, l'amidon se présente sous forme de grains plus ou moins développés, séparés par des empilements de 2 ou 3 lamelles (Pl. V, fig. 2). CHAR-DARD (1971b) émet l'hypothèse que cet amidon se formerait dans les écailles, au sein de la substance fondamentale qui au début existe tout autour du grain. L'amidon stromatique est peu abondant chez les individus végétatifs.

L'origine du pyrénoïde est très controversée. Pour CHARDARD (1971b) il se formerait par coalescence des vésicules granuleuses émises par l'enveloppe interne du plaste.

Dans la plupart des cas, les pyrénoïdes des cellules végétatives se forment par bipartitions des pyrénoïdes préexistants (Chlamydomonas reinhardtii, GOODENOUGH, 1970), il semble que ce soit également le cas au cours de la multiplication des pyrénoïdes végétatifs chez Closterium où l'on peut observer des pyrénoïdes de tailles différentes situés côte à côte. Chez d'autres Algues (Scenedesmus quadricauda, BISALPUTRA et WEIER, 1964) le pyrénoïde disparaît au moment de la division cellulaire puis se reforme dans les cellules-filles ; c'est également le cas chez Tetracystis excentrica (BROWN et ARNOTT, 1970) et lors de la formation des zoospores chez Oedogonium cardiacum (HOFFMAN, 1968) et Bulbochaete hiloensis (RETALLACK et BUTLER, 1970).

Nous avons observé une fois, à côté d'un pyrénoïde normal, une masse paracristalline, d'une taille voisine de celle du pyrénoïde (Pl. IV, fig. 2 et

Pl. VI, fig.3). Nous la signalons ici sans en donner d'interprétation. Nous reviendrons sur ce sujet à propos des jeunes individus issus de la germination où ce type de structure est particulièrement fréquent.

Le pyrénoïde de certaines Algues peut présenter une matrix granuleuse, voire paracristalline, en rapport avec sa nature protéique, chez les Diatomées Achnanthes brevipes (HOLDSWORTH, 1968), Cocconeis diminuta (TAYLOR, 1972), Navicula pelliculosa traité par la colchicine (COOMBS et al., 1968), chez l'Haptophycée Chrysochromulina acantha (LEADBETTER et MANTON, 1971), chez les Dinophycées Prorocentrum micans (KOWALLIK, 1969) et Exuviella mariaelebouriae (DODGE et CRAWFORD, 1971) (DODGE et BIBBY, 1973). Chez les Chlorophycées, des structures cristallines dans le pyrénoïdes ont été observées chez Carteria (JOYON et FOTT, 1964) et chez Chlorella (BERTAGNOLLI et NADAKAVUKAREN, 1970).

En analysant la composition du pyrénoïde d'Eremosphaera viridis HOLDSWORTH (1971) a montré qu'il est un réservoir enzymatique pour la photosynthèse ; ces mêmes enzymes (ribulose-1-5-diphosphate-carboxylase entre autres), présentes dans le stroma des plastes des Spermatophytes, sont également connues dans le "stromacentre" d'Avena sativa (GUNNING et al. 1968), dont la structure apparaît au microscope électronique très semblable à celle des structures paracristallines observées dans le plaste de *Closterium moniliferum*.

I.2.5 Le noyau :

Nous n'avons pas observé la mitose en microscopie électronique. Elle a été parfaitement étudiée par PICKETT-HEAPS et FOWKE (1970b) chez Closterium littorale.

Le noyau quiescent est du type eucaryotique, limité par une double enveloppe dont les feuillets sont distants de 20 à 30 nm, percée de pores de 70 à 90 nm de diamètre, où n'apparaît aucune structure. La partie interne est homogène et finement granuleuse, analogue à ce qu'ont observé BRANDHAM et GODWARD (1965c) chez Closterium ehrenbergii.

Le nucléole volumineux n'est pas limité par une membrane. Comme chez Micrasterias rotata (DRAWERT et MIX, 1961b), on y observe de larges espaces

* Selon la terminologie anglo-saxonne.

clairs ou "lacunes", entourés de zones plus sombres à structure finement granulaire. La structure fibrillaire qui coexiste avec les granules chez Spirogyra britannica (GODWARD et JORDAN, 1965) et chez Micrasterias rotata (DRAWERT et KALDEN, 1967) n'a été nettement observée que dans les noyaux en dégénérescence des jeunes individus issus de la germination.

1.2.6 Les autres inclusions cytoplasmiques :

L'appareil de Golgi et les vésicules golgiennes ont été traités p. 23 en rapport avec la paroi.

Les mitochondries sont d'un type banal, à "crêtes tubulaires" (selon DODGE, 1973), fréquemment rencontré chez les Algues.

Les vacuoles de très grande taille situées entre les expansions du plaste et de part et d'autre du noyau sont nettement limitées par un tonoplaste, et paraissent optiquement vides sauf dans quelques cas où l'on peut y observer des précipités ou des tubules. Les vacuoles à gypse n'ont pas été observées en microscopie électronique.

Le réticulum endoplasmique est souvent du type "rough", et il n'est nettement visible qu'à proximité du plaste.

Les globules lipidiques intracytoplasmiques sont peu fréquents et de petite taille chez l'individu végétatif.

CHAPITRE II: Les STADES de la SEXUALISATION et de la CONJUGAISON.

II.1 - L'APPARIEMENT.

II.1.1 Observations en microscopie photonique (Fig. 3a et Pl.I, fig. 2) :

La première manifestation visible de la sexualisation en conditions d'éclairement favorables est l'appariement de deux cellules adultes, riches en amidon colorable au lugol et en lipides, mis en évidence par le noir Soudan en solution dans l'éthanol. Ces cellules appariées présentent un aspect vert foncé qui les distingue des cellules végétatives de la colonie. Dans le cas le plus fréquent l'appariement se fait entre deux cellules soeurs issues de la division d'une cellule sexuellement induite. Cet appariement s'effectue pendant une phase d'éclairement. Les cellules soeurs, souvent encore réunies par une extrémité s'accolent par la face ventrale au lieu de glisser légèrement l'une pær rapport à l'autre sur un arc de cercle comme les cellules végétatives. Dans les colonies axéniques, à 14°C, jusqu'à 5 cellules sexuellement induites peuvent ainsi s'accoler. Mais ce cas est exceptionnel, de même que l'appariement de deux cellules induites appartenant à des colonies voisines.



Figure 3a : Appariement de deux cellules sexuellement induites.

- 1 mucilage locomoteur, colorable au rouge de ruthénium.
- 2 mucilage entourant les cellules et abandonné au fur et à mesure de la progression, en manchon très mince, faiblement colorable au rouge de ruthénium, donnant une réaction A.P.S. positive et fluorescent au Calcofluor white.
- 3 amidon très abondant, mis en évidence par le lugol et masquant les pyrénoïdes.
- 4 globules lipidiques, réfringents, jaune pâle sur le vivant, colorables par le noir Soudan, observés dans le cytoplasme après mise au point superficielle.
- 5 vacuoles à gypse, colorables par le rouge neutre, le bleu de crésyl brillant et le bleu de nil.
- 5'- de rares autres vacuoles peuvent être mises en évidence dans le cytoplasme par les mêmes colorations.

- Déterminisme de l'induction sexuelle :

En lumière blanche, à 21°C, il est très rare que toutes les cellules d'une colonie, pourtant placéesdans des conditions identiques d'éclairement et de nutrition, présentent les signes extérieurs de l'induction sexuelle. La plupart poursuivent une multiplication végétative. Quel peut être le déterminisme de cette induction sexuelle ? Pourquoi certaines cellules sont-elles plus sensibles à la stimulation lumineuse, ou sensibles plus rapidement ? On pourrait penser à un déterminisme génétique, mais il ne semble pas que ce soit le cas puisque ces cellules qui demeurent végétatives peuvent, lorsqu'elles sont repiquées sur milieu neuf, donner des colonies sexuelles. Il est vrai que certaines demeurent indéfiniment stériles, et qu'il faut maintenir une pression sélective constante pour conserver les clones sexuels ; la proportion d'individus stériles est d'ailleurs variable selon les colonies et de repiquage en repiquage. Contrairement à ce que semble indiquer BIEBEL (1964), l'induction sexuelle n'est pas transmissible de cellule à cellule par contact. Le contact étroit d'un ou plusieurs couples de cellules induites et de cellules végétatives dans la même colonie ne suffit pas à induire dans la voie sexuelle les cellules végétatives. L'appariement expérimental d'une cellule induite et d'une cellule végétative n'aboutit jamais à une conjugaison : elles se séparent, chacune se divise pour son propre compte, et celle qui était végétative donne, en général, une colonie végétative ; celle qui était induite peut, soit redevenir végétative, soit donner un couple de cellules-soeurs qui s'apparient. L'induction sexuelle n'est transmissible que par bipartition ; au stade de l'appariement elle est réversible : les cellules séparées reviennent à l'état végétatif dès que cesse la stimulation lumineuse inductrice de l'appariement (se reporter à la fig. 1, p. 10).

- Mécanisme de l'appariement :

Lorsque les cellules sont induites sexuellement, par quel mécanisme s'apparient-elles ? L'appariement se fait en général par les faces ventrales, mais il peut aussi se faire de toutes les façons possibles. Les cellules sexuellement induites subissent une attraction réciproque, ce qui semble exclure ici toute ébauche de différenciation des sexes. L'attraction, bien que très nette et observée en particulier dans le cas de l'appariement de cellules de colonies voisines, est cependant faible : au-delà d'une longueur de cellule , elle ne se manifeste plus. S'il s'agit d'un chimiotactisme, comme semble l'indiquer BRANDHAM (1967b) à propos du Cosmarium botrytis, les substances excrétées le sont en quantité si minime que leur isolement demeure très problématique. Cette attraction est durable : les cellules appariées peuvent effectuer ensemble de longs trajets (jusqu'à 500 µm) qui les éloignent de la colonie et la double trace mucilagineuse peut être mise en évidence par le rouge de ruthénium (Pl. I, fig. 3).

II.1.2 Modifications infrastructurales (Pl. VI, fig. 2 et 3) :

Les cellules appariées présentent par rapport aux individus végétatifs des différences notables:

- au niveau des plastes, où l'on observe une accumulation d'amidon, qui n'est plus localisé autour des pyrénoïdes mais dispersé partout, entre les thylakoïdes réduits et tassés ; on n'observe plus d'empilements analogues aux granums ; les globules osmiophiles intraplastidaux sont moins abondants dans les coupes.

- au niveau du cytoplasme, où apparaissent des globules osmiophiles sphériques de grande taille, alors que les vacuoles régressent. L'origine de ces globules n'a pu être démontrée clairement. Une image montrerait la formation d'un tel globule dans une sorte de vacuole (Pl. VII, fig. 1). L'aspect de ces globules est très comparable à celui qui est observé dans les kystes rouges du Protosiphon botryoides étudiés par BERKALOFF (1970). Bien qu'ils donnent une réaction de CARR et PRICE positive (coloration bleu violet par le trichlorure d'antimoine en solution chloroformique), il ne semble pas pourtant qu'ils contiennent en abondance des pigments caroténoïdes car le spectre d'absorption des extraits acétoniques, éthéro-pétroliques et in vivo (Fig. 12) ne montre pas de différence pigmentaire nette entre les individus végétatifs et les individus sexués. D'ailleurs, à l'oeil nu, les cultures ne sont pas rouges mais légèrement jaunâtres. D'après GOODWIN (1971) l'accumulation extraplastidale de globules lipidiques contenant des pigments caroténoïdes est provoquée par des conditions de culture défavorables, en particulier la carence du milieu en azote. MAYER et CZYGAN (1969) ont montré que chez Ankistrodesmus braunii et Chlorella fusca

la carence en azote provoque la régression des thylakoïdes et de la teneur en chlorophylle, et l'augmentation des caroténoïdes secondaires (du type astaxanthine) localisés dans des "vacuoles lipidiques extraplastidales". Existe-t-il ou non une membrane autour de ces globules lipidiques extraplastidaux ? Cette question extrêmement controversée sera discutée p.55 à propos des globules lipidiques de la zygospore.

- dans les cellules animales, l'accumulation des lipides contenant des substances stéroliques est souvent associée au développement du réticulum endoplasmique lisse. Cela n'a pas été observé dans le cas du C; moniliferum, où le réticulum demeure rugueux.

- au niveau de l'appareil de Golgi dont les dictyosomes apparaissent plus nombreux et plus actifs dans les coupes, et émettent de nombreuses petites vésicules de 50 à 100 nm, à contour dense, semblables aux "coated vesicles" (Pl. IX, fig. 6). D'autres vésicules plus grandes (0,5 à 1 µm) à contenu clair aux électrons sont analogues à celles que l'on observe dans l'hémisomate en croissance et participent vraisemblablement à l'édification de la paroi et à l'excrétion du mucilage qui peut être mis en évidence par le "Calcofluor white". Elles sont tout à fait comparables, par leur aspect et par leur taille, aux vésicules qui s'accumulent dans l'extrémité en croissance des tubes polliniques.

II.2 - LA PRECONJUGAISON ET LA PAPILLE DE CONJUGAISON.

II.2.1 Observations en microscopie photonique (Pl. I, fig. 4 à ?) :

Les cellules appariées à la lumière demeurent accolées pendant un temps plus ou moins long qui peut aller jusqu'à 48 heures. Dans le cas le plus favorable, elles subissent 1 à 2 heures avant le début de la phase obscure une mitose synchrone (accidentellement asynchrone) (Fig. 3b). Cette mitose précoce par rapport à celles des cellules végétatives avait déjà été remarquée par



Figure 3b : Bipartition anormalement asynchrone de cellules appariées.

La cellule n° 1 est au stade métaphase. Le septum annulaire qui séparera les deux cellules-filles est déjà mis en place.

La cellule n° 2 a subi une bipartition et donné deux jeunes individus 2', renfermant chacun un noyau haploïde, masqué par deux plastes inégaux toujours très riches en amidon. Un mucilage faiblement colorable au rouge de ruthénium mais A.P.S.-positif entoure les cellules. Il est facilement éliminé par montage des cellules dans l'eau, mais on le met très bien en évidence en laissant les cellules en place sur la gélose.

BIEBEL (1964) chez Netrium digitus. Elle est très différente de ce qui se passe chez Cosmarium botrytis où BRANDHAM (1967b) va jusqu'à dire : "It seems to be a general phenomenon, therefore, that conjugating cells which start to undergo mitosis and cell division can no longer maintain an attraction for cells of the opposing mating type. This suggests that an attractive substance is secreted constantly during conjugation but that this secretion is stopped when the nucleus passes from the metabolically active interphase to the metabolically less active mitosis". L'attraction mutuelle n'est pas affectée ici par la mitose mais uniquement par les variations de l'éclairement. Au stade post-mitotique les cellules sont encore séparables et peuvent revenir à l'état végétatif.



Figure 3c : Emission des papilles de conjugaison.

Les jeunes individus issus de la bipartition des cellules appariées émettent dans leur partie néoformée, sur la face ventrale, une papille fortement réfringente sur le vivant, colorable au rouge de ruthénium, à réaction A.P.S.-positive, et fortement fluorescente après coloration au Calcofluor-white. Un mucilage diffus et peu colorable entoure l'ensemble des quatre cellules-gamètes.

Une à trois heures après le retour de la phase lumineuse, chaque hémisomate néoformé émet une papille de conjugaison hyaline (Fig. 3c). A ce stade les cellules que l'on peut alors appeler gamétocystes ne sont plus séparables sans dommage.

Lorsqu'il y a plus de deux cellules accolées, il arrive qu'une même cellule-gamète émette deux papilles et deux vésicules de conjugaison, mais ce cas est rare.

La partie terminale réfringente des papilles de conjugaison et la vésicule mucilagineuse qui les relie ensuite (Fig. 3d) se colorent vivement au rouge de ruthénium ; le mucilage qui entoure la partie centrale des cellules appariées se colore en rose pâle. La réaction A.P.S. est également positive pour



Figure 3d : Sécrétion des vésicules de conjugaison.

Les papilles réfringentes en contact (1) sécrètent une "vésicule de conjugaison" hyaline (2), faiblement colorable par le rouge de ruthénium mais présentant une réaction A.P.S.-positive et une vive fluorescence après coloration au Calcofluor-white. La partie centrale des cellules est entourée d'un mucilage (3) peu colorable au rouge de ruthénium mais A.P.S.-positif, et faiblement fluorescent après coloration au Calcofluor-white. Un début de contraction du cytoplasme (4) s'observe aux extrémités des hémisomates anciens, avec émission de mucilage (5) colorable au rouge de ruthénium entre la paroi et le plasmalemme. Ailleurs, la membrane cytoplasmique, étroitement accolée à la paroi, n'a pas été représentée.

le mucilage, pour la vésicule de conjugaison et pour la partie terminale des papilles de conjugaison. Les parois de l'ancien hémisomate sont rose pâle. Après action de l'oxalate d'ammonium à 0,5 % à 70-80°C, pendant 12 heures (selon JENSEN, 1962) le mucilage ne réagit que très faiblement à l'A.P.S. Par contre, les parois des hémisomates néoformés, la partie terminale de la papille de conjugaison et la vésicule demeurent rouge vif, et sont vraisemblablement composés d'hémicelluloses.

L'action de la soude à 4 % à 25° pendant 12 heures, après action de l'oxalate d'ammonium provoque l'éclatement des hémisomates néoformés et des papilles. Seule persiste la paroi des hémisomates les plus anciens. L'extraction par la soude à 17 % à 25°C pendant 3 heures, succédant aux divers réactifs précédents, provoque la dissolution des structures autres que les anciens hémisomates.

Le "Calcofluor-white" provoque une vive fluorescence des parois, surtout à l'extrémité de la papille de conjugaison (Pl. III, fig. 2) et au niveau de la vésicule de conjugaison (Pl. III, fig. 3). Les hémicelluloses sont donc également fluorescentes après action du "Calcofluor-white".

L'auramine ne donne qu'une faible fluorescence au niveau de la papille de conjugaison et le résultat est négatif avec l'acridine orange et le bleu d'aniline en solution basique, utilisés pour la recherche de la callose (ESCHRICH et CURRIER, 1964).

II.2.2 Modifications infrastructurales :

Le plaste demeure toujours très riche en amidon, avec des thylakoïdes plus ou moins désorganisés.

Les globules osmiophiles confluent probablement car ils deviennent moins nombreux mais de plus grande taille, occupant souvent entre les crêtes des plastes l'emplacement des vacuoles totalement disparues.

L'appareil de Golgi semble toujours très actif et divers types de vésicules concourent à l'élaboration de la paroi et à l'excrétion du mucilage. C'est à ce stade que l'on observe assez fréquemment, dans la partie néoformée, les structures du type lomasome (Pl. X, fig. 1). C'est également dans cette partie néoformée que sont abondantes les "Schleimstrukturen" dont le contenu semble s'incorporer au plasmalemme, qui présente un aspect festonné, et qui participent probablement à l'excrétion du mucilage mis en évidence à ce niveau par le "Calcofluor-white" (Pl. X, fig. 2 et 3).

C'est évidemment au niveau de la papille de conjugaison que l'on observe les modifications les plus frappantes (Pl. XI, fig. 9). Elle est le siège de phénomènes d'excrétion et de croissance actifs et rapides. Son évolution dure environ 2 à 4 heures. Elle émerge dans la partie néoformée du gamète, sur la face interne de la cellule. A ce niveau la paroi pecto-cellulosique est mince et ne semble pas présenter de pores. Le plaste croît en même temps que la papille et un ou deux dictyosomes par section se retrouvent souvent à proximité. Les mitochondries demeurent également proches du plaste. La papille elle-même renferme quelques globules osmiophiles et de nombreuses vésicules de toutes tailles. Des structures semblables à d'énormes "corps multivésiculaires" s'y observent pendant un temps très court. A l'extérieur du plasmalemme, la paroi présente une trame lâche dont les fibrilles sont orientées d'abord parallèlement à la surface de la papille puis perpendiculairement. Il semble que cette formation mucilagineuse, hydrophile, comparable à la périphérie d'un poil absorbant (ROLAND et VIAN, 1970), autre zone de croissance et d'échanges actifs, soit excrétée directement à travers le plasmalemme et s'accumule d'abord sous la couche externe osmiophile qui se distend et se rompt par endroits.

A un stade plus avancé, cette trame mucilagineuse plus développée et plus irrégulière constitue le "tube de conjugaison" ou mieux la "vésicule de conjugaison" qui ne semble pas exister chez *Closterium littorale* (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1971) où par contre l'on observe dans la papille une volumineuse vacuole, toujours absente ici. La vésicule de conjugaison n'a pas de limite nette, et sa partie centrale présente une structure réticulée (Pl. XI, fig. 9 à 12). La papille montre un aspect dense et granuleux. Les ribosomes y sont très abondants. Les vésicules claires de grande taille semblent confluer en une couche externe très épaisse (0,9 à 1,5 µm) emprisonnant des structures denses opaques aux électrons. Les schémas de la planche XII récapitulent cette évolution.

Ces aspects rappellent ceux que l'on observe lors de la croissance du tube pollinique. ROSEN et al. (1964) montrent que dans le tube pollinique de *Lilium*, la croissance est localisée dans une zone située à 3-5 µm de l'extrémité, caractérisée par une abondance de vésicules et l'absence des autres éléments cytoplasmiques. JENSEN et FISCHER (1968) étudiant le tube pollinique du Coton, constatent la même croissance rapide et localisée à la partie apicale, où des "vésicules polysaccharidiques" confluent pour constituer la paroi et les "bouchons". L'extrême transparence aux électrons, la présence de résidus fixant le plomb pourraient faire penser à un bouchon de callose au niveau de l'extrémité

de la papille, mais cette couche ne se colore que très faiblement par le bleu d'aniline et le bleu résorcine, et ne présente pas de fluorescence appréciable dans l'U.V. Ce bouchon, ainsi que la vésicule de conjugaison, montrent par contre une intense fluorescence dans l'U.V. après coloration au "Calcofluor-white" (Pl. III, fig. 3).

La similitude est également remarquable entre la formation de la papille de conjugaison chez cette Algue et celle de la "papille de germination" du sporocyste de *Pythium proliferum* où LUNNEY et BLAND (1976) donnent le nom de "vésiculogène" à l'extrémité épaissie de la papille, qui constituera par extension la paroi de la vésicule de germination où le contenu-du sporocyste se déverse.

Si l'on compare cette papille de conjugaison à celle de Micrasterias papillifera étudiée par KIES (1973), on remarque quelques différences notables : - vacuolisation importante chez Micrasterias, nulle chez C. moniliferum ; - abondance de mitochondries et de vésicules diverses dans la partie subterminale de la papille chez Micrasterias, présence d'un seul type de vésicules claires de grande taille chez C. moniliferum ;

- paroi terminale épaisse et homogène chez *Micrasterias*, avec mucilage de conjugaison non structuré, préformé et nettement délimité entre les papilles, alors que *C. moniliferum* présente une paroi structurée qui se résout en une vésicule de conjugaison mucilagineuse à trame réticulée réunissant les papilles.

L'induction sexuelle s'accompagne de modifications ultrastructurales importantes, assez voisines chez C. *littorale* (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1971) et chez C. moniliferum, et présentant une analogie avec les phénomènes qui accompagnent la floraison chez certaines Angiospermes : augmentation de la teneur en glucides, modifications de la fraction présumée lipidique où la plupart des auteurs s'accordent à situer l'activité florigénique. Par ailleurs, certains aspects sont assez comparables à ceux décrits par CHARDARD (1970) sur des cellules de *Cosmarium* placées en milieu hypertonique : régression des vacuoles, développement de l'appareil de Golgi, apparition de globules osmiophiles intracytoplasmiques. II.3 - LA CONJUGAISON ET LA JEUNE ZYGOSPORE.

II.3.1 Observations en microscopie photonique :



Figure 3e : Rupture des papilles et sortie des gamètes.

Cette conjugaison asynchrone montre des cellules qui ne sont encore qu'au stade "émission des papilles de conjugaison", alors que leurs partenaires qui ont émis une papille et élaboré une "vésicule de conjugaison" en sont déjà au stade "rupture de la papille". Le cytoplasme (dont la membrane n'a été figurée qu'aux niveaux où elle est décollée de la paroi) se contracte dans les hémisomates anciens (flêche) et progresse dans la partie néoformée (double flêche). L'extrémité de la papille (1) se rompt sous la poussée du cytoplasme pour former une sorte de tube mou, fortement fluorescent après coloration au Calcofluor-white, alors que le mucilage de la vésicule de conjugaison (2) est moins fortement fluorescent. Le mucilage qui entoure la partie centrale des cellules (3) est encore plus diffus.

BIIS

Alors que chez *Closterium littorale* (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1971) les cellules appariées sont en contact étroit par leur partie centrale néoformée, chez *C. moniliferum* ces hémisomates néoformés ne sont pas accolés. C'est la croissance des papilles de conjugaison qui assure le contact en même temps que s'édifie la vésicule mucilagineuse. L'émission n'est pas toujours synchrone ce qui implique qu'il n'y ait pas obligatoirement stimulation des gamètes l'un par l'autre. Lorsque le contact est établi à travers une mince couche centrale de mucilage, la papille gonfle, sa paroi réfringente diminue d'épaisseur tandis que les plastes et le noyau pénètrent rapidement dans la papille élargie, par un mouvement amiboide (Fig. 3e). La contraction du gamète et son expulsion semblent facilitées par l'accumulation de mucilage entre le plasmalemme et la paroi du gamétocyste.



Figure 3f : Sortie des gamètes et fusion.

La contraction des gamètes s'accélère (flèche). Ils sortent dans la vésicule de conjugaison distendue et s'arrondissent. La partie gauche de la figure représente deux gamètes accolés non encore fusionnés alors que dans la partie droite la fusion a eu lieu. Le jeune zygote ainsi formé est binucléé. Les protoplastes expulsés sur la gélose s'arrondissent et fusionnent rapidement (Fig. 3f). Le phénomène dure 3 à 5 mn. Il est plus rapide que chez *Cosmarium botrytis* où selon BRANDHAM (1967a) il dure 13 à 25 mn. Il arrive que les gamètes ne sortent pas entièrement du gamétocyste. Le zygote prend alors une forme irrégulière, avec deux protubérances qui demeurent attachées aux gamétocystes vides (Pl. I, fig. 8 et 9).

Lorsque les phénomènes sont asynchrones, ou que plus de deux cellules sont accolées, le devenir d'une cellule-gamète sans partenaire est très variable : elle peut revenir à l'état végétatif si elle est remise en lumière atténuée, ou bien son contenu peut s'entourer d'une paroi épaisse et devenir une parthénospore (Pl. I, fig. 11), ou bien la papille de conjugaison se lyse spontanément et le contenu de la cellule se répand sur le milieu de culture. Il arrive aussi que 4 zygotes haploïdes se forment côte à côte sans que s'effectue la fusion des protoplastes.

C'est à ce stade que les cultures sont particulièrement sensibles aux variations de pression osmotique du milieu (voir p. 82).

Les jeunes zygotes jumeaux ainsi constitués sont de forme subsphérique. Leur paroi se colore au rouge de ruthénium ; la réaction A.P.S. est positive surtout sur les restes pecto-cellulosiques de la vésicule de conjugaison, colorables également par le "Calcofluor-white" (Pl. III, fig. 4). Beaucoup plus intéressante est la réaction qu'ils donnent avec le bleu d'aniline, utilisé selon ESCHRICH et CURRIER (1964) et caractéristique de la callose d'après ces auteurs, bien que la spécificité de cette réaction soit parfois contestée. La callose forme une mince couche fluorescente dans l'U.V. autour des zygotes dès les premières heures de leur formation. Cette réaction persistera chez les zygospores même très âgées. Certains zygotes montrent des "bouchons" plus fortement fluorescents, souvent situés au contact du gamétocyste vidé (Pl. III, fig. 7 et 8).

La présence de callose a été signalée chez les Algues sous forme de bouchons transitoires dans la paroi des cellules végétatives de Spirogyra, Zygnema et Mougeotia par BUER (1964), et chez trois espèces de Caulerpa par ZAFARALLA et PANTASTICO (1971). A notre connaissance c'est la première fois qu'elle est signalée autour des zygospores de Desmidiées. La plupart des auteurs considèrent la callose comme un polysaccharide se formant très rapidement en réponse

à des conditions défavorables (températures basses ou élevées, plasmolyse), d'existence temporaire, jouant un rôle important dans les échanges d'eau.

Nos cultures de *Closterium* étant effectuées sur milieu gélosé, on peut se demander si la callose observée n'est pas une réaction pathologique au milieu aérien dans lequel on force l'Algue à se reproduire. Il n'en est rien : la callose se forme également autour des zygospores obtenues en milieu liquide, en verre de montre. Il semble donc que cette Algue soit en quelque sorte préadaptée au milieu aérien par son aptitude à protéger ses zygospores contre la dessiccation dès leur formation. Cette aptitude va probablement de pair avec l'absence de "tube de conjugaison" protecteur des gamètes tel qu'il existe chez *Spirogyna* ou chez *Closterium rostratum*, où nous n'avons pas observé de callose autour des zygospores.

A l'inverse, WATERKEYN et BIENFAIT (1967) attribuent à la callose un rôle temporairement accélérateur de l'évaporation de l'eau par transpiration dans les feuilles de Sélaginelle.

La formation de callose dans le cas du C. moniliferum compenserait alors la rareté des vacuoles contractiles, très développées dans les zygospores jeunes d'autres Desmidiées telles que Cosmarium botrytis (BRANDHAM, 1967a).

Le contenu vert foncé de la zygospore permet de distinguer les 4 plastes et leurs pyrénoïdes. Les noyaux sont difficilement mis en évidence à ce stade. Contrairement aux phénomènes observés par BRANDHAM (1967a) chez Cosmarium botrytis et par KIES (1964, 1968) chez Closterium acerosum et Micrasterias papillifera, nous n'avons pas observé de vacuoles contractiles, tout au moins en microscopie photonique, et le zygote ne subit pas de rétraction appréciable. Ni LIPPERT(1967) chez C. moniliferum ni HOSHAW (1965) chez Sirogonium melanosporum ne signalent ces vacuoles contractiles. Les dimensions des zygotes varient peu au cours de la maturation : 35-46 µm x 50-55 µm. Les zygotes issus de clones diploïdes sont un peu plus volumineux : 60-70 µm x 70-75 µm (Pl. I, fig. 10).

Une paroi brune (la mésospore) est mise en place entre le deuxième et le quatrième jour après la conjugaison. Elle résiste à l'acétolyse ce qui confirme sa nature voisine de celle de la sporopollénine. De plus, la primuline utilisée selon WATERKEYN (1971) pour mettre en évidence la sporopollénine sur des pollens d'Angiospermes donne sur les jeunes zygospores une faible fluorescence jaunâtre.

II.3.2 Observations en microscopie électronique :

A mesure que les papilles s'accroissent et que les protoplastes y pénètrent, la paroi réfringente diminue d'épaisseur, sans doute par étirement; elle est repoussée sur les côtés du protoplaste extrudé. Les gamètes font irruption à travers la paroi plus ou moins désorganisée de la papille et s'accolent. Tout en continuant à sortir des gamétocystes, ils prennent dans le milieu extérieur une forme hémisphérique. La fusion a lieu dans une enveloppe protectrice mucilagineuse non limitée, qui n'est pas l'homologue du "tube de conjugaison" cellulosique solide et persistant des Zygnémetacées et de quelques Desmidiées, dont *Closterium nostratum* (DUBOIS-TYLSKI, 1973). Des restes de la calotte réfringente gélifiée et de la couche externe osmiophile caractéristique de la paroi des *Closterium*, se retrouvent autour des jeunes zygospores, spécialement à proximité des gamétocystes vides. Cette couche protectrice est d'épaisseur très inégale et parfois les protoplastes semblent nus dans le milieu extérieur (Pl. XIII, fig. 1 et 2).

Comme chez Closterium littorale (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1971) et Spirogyra (FOWKE et PICKETT-HEAPS, 1971), il semble qu'une accumulation de vésicules mucilagineuses entre le plasmalemme et la paroi du gamétocyste favorise l'expulsion des gamètes (Pl. X, fig. 4 et Pl. XIII, fig. 2). Au cours de cette expulsion, les plastes deviennent élastiques et déformables. Leur forme cylindrique dans l'individu végétatif est presque sphérique dans les gamètes accolés. A ce stade y apparaissent des inclusions paracristallines, de nature vraisemblablement protéique selon les données bibliographiques concernant ce type de structure, rarement observées dans les cellules en cours de sexualisation, plus fréquemment dans les jeunes individus issus de la germination (Pl. XIV, fig. 4).

La fusion des gamètes est extrêmement rapide. Les plasmalemmes en contact s'accolent en certains points, mais nous n'avons pu observer d'images parfaitement démonstratives de ce processus. La zone d'accolement est parfois très régulière, sans aucun aspect de vésicules caractéristiques de part et d'autre. Parfois elle se présente comme un chapelet de vésicules irrégulières plus ou moins allongées. Il y a dans cette zone un remaniement de membranes très rapide et comme les protoplastes sont nus, il ne se produit pas à ce niveau les phénomènes de lyse de parois contiguës observés chez *Spirogyra* (FOWKE et PICKETT-HEAPS, 1971) (Pl. XIV, fig. 3). L'aspect est parfois très voisin de ce que l'on peut observer lors de la fusion de protoplastes de Spermatophytes, avec une chaîne de petites vacuoles au niveau des plasmalemmes fusionnés (BURGESS et FLEMING, 1974).

Dès sa formation, la zygospore élabore une couche callosique dont l'aspect au microscope électronique est assez variable. Peut être par défaut de fixation, elle se présente rarement sous sa forme classique de couche parfaitement transparente aux électrons. Le plus souvent elle a un aspect grisâtre et fibrillaire (Pl. XV, fig. 5, 6, 7). Il est probable aussi qu'il ne s'agit pas de callose seule. Elle est sans doute associée à des composés pectocellulosiques, qui donnent une réaction positive au "Calcofluor-white". PRAT et ROLAND (1971) ont d'ailleurs mis en évidence autour de cellules plasmolysées destinées à fournir des protoplastes la présence simultanée, dans l'espace de rétraction, de polysaccharides réactifs à la fois au Calcofluor-white et au bleu d'aniline, et présentant un aspect fibrillaire en microscopie électronique.

L'origine de la callose est controversée. Pour HEITZ (1971), des vésicules "grises", denses aux électrons et de grande taille, d'origine golgienne, participent à l'élaboration de la callose dans le tube pollinique du *Linum austriacum*. Pour GENEVES (1973) le plasmalemme joue un rôle primordial dans la mise en place de la callose, formée dans de grandes vésicules "grises" dont l'origine n'est pas précisée. Pour CATESSON (1973), les précurseurs de la callose sont transportés sous forme de glucides de faible poids moléculaire dans les saccules du réticulum endoplasmique ; les précurseurs de la callose et de la cellulose ont des voies de transit très différentes.

Chez Closterium moniliferum nous observons une abondance de vésicules "grises" dont le contenu semble s'incorporer au plasmalemme festonné, mais bien que l'appareil de Golgi soit actif dans la jeune zygospore, l'origine golgienne de ces vésicules n'est pas démontrée. Le réticulum endoplasmique est extrêmement développé à proximité du plasmalemme et présente de grands saccules clairs (Pl. XV, fig. 5 et Pl. XVI, fig. 8 et 9).

La zygospore de 24 heures est donc entourée par les restes irréguliers et diffus de la couche externe osmiophile de la papille, par une enveloppe mucilagineuse provenant de la désorganisation de la vésicule de conjugaison et par une couche callosique qui est l'exospore sécrétée par le zygote dès sa formation (Pl. XV, fig. 7). Le cytoplasme ne présente pas de modifications importantes par rapport aux gamètes. La seule différence notable est la présence de vacuoles contractiles, qui n'avaient pas été observées en microscopie photonique (Pl. XV, fig. 6). Elles sont peu volumineuses, et n'existent que dans les premières heures de vie du zygote, alors que la couche callosique est peu développée. Ensuite, elles régressent complètement et le contenu du zygote devient très dense, très osmiophile, ainsi que l'avaient observé PICKETT-HEAPS et FOWKE (1971) chez Closterium littorale.

Les plastes, remplis d'amidon accumulé par les gamètes ont encore des pyrénoïdes bien distincts.

Entre 24 et 48 heures commence à s'édifier, au contact de l'exospore callosique, la première couche de la mésospore, de nature sporopollénique, déjà observée par KIES (1970b) chez Micrasterias papillifera. La sécrétion de cette couche de sporopollénine, au contact d'une couche callosique, présente de remarquables analogies avec les aspects observés par ROBERT (1971) lors de l'édification des parois microsporales chez Selaginella selaginoïdes ou par CHRISTENSEN et al. (1972) lors de la formation du pollen chez Sorghum bicolor.

Les pigments caroténoïdes accumulés lors de l'induction sexuelle des cellules de *Closterium* se retrouvent dans la zygospore, où ils participent vraisemblablement à l'élaboration de la mésospore sporopollénique. SHAW (1971) attire l'attention sur la présence de sporopollénine autour des zygospores des *Mucor*, où l'on observe également une accumulation de caroténoïdes au cours de la sexualisation ; les deux types de zygospores sont tout à fait comparables. Cependant, la sporopollénine n'est pas limitée aux spores sexuées chez les Algues : ATKINSON et al. (1972) ont montré sa présence dans la paroi des *Chlorella* et d'autres Algues, capables d'accumuler des caroténoïdes à la fin de leur période de multiplication, ou en milieu carencé en azote.

La mise en place de la sporopollénine (Pl. XVI, fig. 8, 9, 10) se fait à l'extérieur du plasmalemme, au contact de la callose qui ne semble pas se dégrader, soit sous forme de granules, soit de lamelles fortement osmiophiles, observées d'abord par ROWLEY et SOUTHWORD (1967). Ces lamelles, à structure tripartite caractéristique, s'accroissent par leurs bords, vraisemblablement par polymérisation des précurseurs en provenance du cytoplasme (HESLOP-HARRISON et DICKIN-SON, 1969).

Les coupes de zygospores âgées de 48 heures montrent à partir de l'extérieur (Pl. XVII, fig. 11 et 12) :

- la couche externe osmiophile rompue des papilles de conjugaison ;

- les restes irréguliers de la vésicule de conjugaison à structure fibrillaire ;

- l'exospore callosique d'épaisseur variable ;

- la première couche sporopollénique de la mésospore.

Les quatre plastes sont encore visibles, avec leurs pyrénoïdes. Les noyaux sont encore distincts et les volumineux globules osmiophiles intracytoplasmiques ont tendance à se regrouper à l'un des pôles de la zygospore.

CHAPITRE III : La ZYGOSPORE MURE.

III.1 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Les phénomènes apparents de la maturation se terminent 7 à 15 jours après la conjugaison ; 48 heures après celle-ci la paroi brune est constituée et on peut parler alors de zygospore. Classiquement, cette enveloppe comporte trois parties (Pl. I, fig. 12).

L'exospore est mince, colorable par le rouge de ruthénium ; le réactif iodophosphorique et le chlorure de zinc iodé la teintent en bleu clair. Elle est essentiellement pecto-cellulosique. Cependant le Soudan III la colore faiblement et nous avons vu qu'elle présentait également après coloration par le bleu d'aniline, la fluorescence caractéristique de la callose.

La mésospore, épaisse d'1 µm environ, est brun clair sur le vivant. Il semble que l'on puisse distinguer deux couches, non colorables par le rouge de ruthénium, ni par le chlorure de zinc iodé. Le réactif iodo-phosphorique la colore en bleu dans sa partie moyenne. Elle donne avec la primuline une très faible fluorescence jaunâtre et résiste à l'acétolyse.

L'endospore a environ 2 µm d'épaisseur. Elle n'est pas colorable par le rouge de ruthénium. Le chlorure de zinc iodé la colore en bleu vif de même que le réactif iodo-phosphorique ; son épaississement se poursuit pendant 8 à 15 jours après la conjugaison. Ces données concordent avec les observations de BRANDHAM (1967b) chez Cosmarium et de KIES (1964) chez C. acerosum. Il semble, d'après KIES (1968), que le zygote de Micrasterias papillifera possède une exospore à 2 couches, l'externe colorable au rouge de ruthénium, l'interne colorable au chlorure de zinc iodé.

La chlorophylle disparaît peu à peu, et les plastes ne sont plus individualisés. Il subsiste d'abord 5 ou 6 pyrénoïdes, puis seulement deux masses de grains d'amidon où le pyrénoïde n'est plus décelable. Le cytoplasme contient par ailleurs d'énormes inclusions osmiophiles, colorables par le Soudan III et le noir Soudan et renfermant des pigments caroténoïdes mis en évidence par la réaction de Carr et Price. Cette abondance de caroténoïdes se retrouve chez la plupart des Desmidiées. Les deux noyaux des gamètes sont parfaitement individualisés et présentent un énorme nucléole. Des inclusions protéiques peuvent être mises en évidence par le bleu de bromophénol mercurique (MAZIA et al., 1953).

Chez le C. moniliferum, des observations répétées de semaine en semaine au cours de la maturation pendant un mois, montrent après coloration au lugol, la disparition progressive de deux plastes.

III.2 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

L'ultrastructure des zygospores de Desmidiées a été jusqu'à présent peu étudiée en raison des difficultés rencontrées au niveau des processus de fixation et d'inclusion de ces organes de résistance. On peut toutefois citer les travaux de BUER (1964) sur Spirogyra et de KIES (1970b) sur Micrasterias papillifera ; seule la structure de la paroi y est décrite. PICKETT-HEAPS et FOWKE (1971) montrent quelques aspects de jeunes zygospores de Closterium littorale et de Spirogyra. JORDAN (1974) a observé dans la zygospore de Spirogyra des "projections" de l'enveloppe nucléaire des "pronucléi".

III.2.1 Méthodes de fixation et d'inclusion :

Les techniques de fixation et d'inclusion de ce matériel difficile ont été mises au point par Michel ABADIE qui est également l'auteur des micrographies électroniques concernant ce chapitre.

Le matériel est initialement trié par micromanipulation. Seuls sont retenus les zygotes effectivement en phase de quiescence absolue. L'enveloppe formée par la vésicule de conjugaison est enlevée par microdissection. On utilise la fixation combinée aux aldéhydes par immersion des zygotes dans le mélange paraformaldéhyde-glutaraldéhyde-tampon cacodylate de sodium à pH 7,2, additionné de plasma humain lyophilisé. Après 15 minutes de traitement sous vide, le fixateur est régénéré pour une période de 12 heures à 4° C. Plusieurs lavages dans le même tampon sont nécessaires avant de post-fixer par $0sO_{4}$ à 4° C durant 8 heures. La déshydratation par la série des alcools est conduite progressivement jusqu'aux bains d'oxyde de propylène pur suivis d'une imprégnation très soignée dans diverses résines fluides.

Lorsque les zygotes sont dans le bain de résine pure, sans accélérateur , une première incision est pratiquée dans la paroi à l'aide d'un microscalpel, ce qui permet au gaz sous pression de s'échapper tout en décollant légèrement les diverses couches de la paroi. Selon le cas et après 24 heures d'imprégnation préalable dans la résine pure, les différentes enveloppes peuvent être successivement enlevées au micromanipulateur. A ce stade, des pressions exercées sur l'ensemble du zygote, à l'aide d'instruments appropriés, permettent de s'assurer du départ de la totalité du gaz contenu dans le cytoplasme. On termine par un dégazage de 15 minutes à la pompe, sous une pression de 10^{-2} Torr.

La résine d'imprégnation est renouvelée plusieurs fois durant 15 jours à 48°C, avant de lui substituer le mélange final avec accélérateur, dont la polymérisation est conduite progressivement. L'Araldite, le mélange Epon-Araldite ou encore le produit Spurr ont été utilisés avec succès dans l'imprégnation des zygotes. Le DMSO^{°°} a été employé à 20 % après une fixation convenable par le mélange paraformaldéhyde-glutaraldéhyde.

D.M.S.O. : dimethylsulfoxide, qui permet l'élimination des lipides.

III.2.2 La paroi :

Si ses différentes couches peuvent déjà être grossièrement mises en évidence par la microscopie photonique et les colorants classiques, la microscopie électronique à transmission apporte des précisions intéressantes sur sa structure :

- <u>la vésicule de conjugaison pectocellulosique</u> persiste autour de la zygospore. Son épaisseur très variable, est de $0,6 \mu$ m en moyenne et sa périphérie montre parfois les restes rompus de la couche osmiophile qui limitait le gamétocyste (Pl. XVIII, fig. 3);

- <u>l'exospore callosique</u>, édifiée en 24 heures environ, a une épaisseur variant de 0,2 µm à 0,8 µm, parfois plus de 1 µm au niveau des "bouchons" visibles sur certaines zygospores. Elle se présente tantôt comme une couche parfaitement claire aux électrons, tantôt comme une couche finement granuleuse (Pl. XVIII, fig. 3 et 4);

- <u>la mésospore</u> constitue à elle seule un ensemble très complexe : elle est également différente de celle du zygote de Micrasterias papillifera décrit par KIES (1970b).

A l'état de maturité totale on y distingue au moins quatre zones.

La première est formée d'une couche polysaccharidique à fibrilles en réseau, d'une épaisseur de 0,1 μ m, qui n'apparaît pas distinctement après fixation osmique, mais plus nettement après la double fixation aldéhyde-osmium (Pl. XVIII, fig. 5a).

La seconde, constituée d'une couche de substance analogue à la sporopollénine, résistante à l'acétolyse, apparaît très opaque après fixation à l'osmium, mais plus claire dans le cas de la double fixation avec le complexe paraformaldéhyde-glutaraldéhyde. Son épaisseur est de 0,2 µm environ (Pl. XVIII, fig. 5b).

La troisième est représentée par une couche de 0,5 µm d'épaisseur environ, dans laquelle des fibrilles de cellulose s'intriquent en présentant des entrecroisements très particuliers destinés probablement à ancrer fortement l'une dans l'autre les couches de sporopollénine et de cellulose (Pl. XVII, fig. 5c).

La quatrième est constituée par une couche de sporopollénine interne de 0,2 µm environ (Pl. XVIII, fig. 5d).

Une couche supplémentaire de nature polysaccharidique, constituée par un réseau bourgeonnant de fibres de cellulose peut être différenciée à l'intérieur de la couche d (Pl. XVIII, fig. 5e). L'intrication des fibrilles dans la couche de sporopollénine précédente semble postuler en faveur d'un rattachement de cette couche à la mésospore, dont elle faciliterait l'ancrage au niveau de l'endospore sous-jacente. On peut aussi considérer qu'il s'agit de la partie la plus externe de l'endospore.

- <u>l'endospore</u>. D'après KIES (1970b) l'endospore du Micrasterias papillifera se sépare mécaniquement en deux couches. Nous n'avons rien observé de semblable dans la zygospore quiescente du Closterium moniliferum. L'endospore est une énorme couche cellulosique dont l'épaisseur variable peut atteindre 1,8 µm et dont la structure est stratifiée. Le nombre de strates varie de 14 à 27 sur les échantillons observés. L'épaisseur moyenne d'une strate est de 70 nm environ (Pl. XVIII, fig. 4). Chez les zygospores âgées qui entament un processus de germination spontanée la partie interne de l'endospore perd sa stratification (Pl. XVIII, fig. 1). Les zygospores âgées sont incrustées de sels de fer et donnent une réaction bleue au ferrocyanure de potassium.

La paroi présente peu de différences avec celle du Micrasterias papillifera (KIES, 1970a et b) ou du Closterium littorale (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1971). Celles-ci apparaissent surtout au niveau de la mésospore où l'alternance et l'épaisseur des couches de cellulose et de sporopollénine sont variables. La caractéristique essentielle du matériel étudié consiste en une exospore callosique non observée dans aucun des cas précédents.

III.2.3 Les constituants cytoplasmiques :

Le contenu extrêmement dense des zygospores leur confère des aspects ultrastructuraux semblables à ceux des graines.

Les noyaux. Les deux noyaux des gamètes demeurent séparés dans la zygospore. Ils ne fusionnent qu'après réhydradation et verdissement des deux plastes. Aucune coupe n'est passée avec certitude au niveau des noyaux dans le zygote quiescent.

Le plasmalemme. Difficile à définir dans la zygospore mûre, nous avons pu observer qu'il est parfois séparé de l'endospore par une "zone à déchets" (Pl. XVIII, fig. 6). Il semble que s'y accumulent des débris membranaires qui se retrouvent sous la forme d'enroulements myéliniques. De telles figures s'observent également au moment de l'enkystement des zoospores du Blastocladiella emersonii. CANTINO et TRUESDELL (1972) les considèrent comme des "manifestations visibles d'altérations dans les membranes lorsque les zoospores sont incitées à s'enkyster". Il n'est pas rare d'apercevoir des restes de thylakoïdes entre le plasmalemme et les globules osmiophiles périphériques. Nous avons pu d'autre part constater la présence d'un gaz sous pression à l'intérieur de la zygospore. S'il vient à s'accumuler entre le plasmalemme et l'endospore, son départ brutal au moment de la fixation favorise la décompression du plasmalemme, ce qui provoque une désorganisation générale et une perte d'homogénéité de l'ensemble du cytoplasme. Il est possible que ce gaz soit du CO2 respiratoire. Au moment de la réactivation par la lumière, ce gaz paraît se résorber et la fixation s'en trouve facilitée. A la "poche à gaz" correspond dans le cytoplasme une "zone spongieuse" lacuneuse, difficile à imprégner, où l'on observe une accumulation de vésicules à contenu clair, non nettement délimitées, avec quelques globules chromophores osmiophiles. Une telle structure correspond vraisemblablement à la zone de stockage du gaz dans le zygote (Pl. XIX, fig. 6).

Les sphérosomes ou globules lipidiques, ou oléosomes : Nous avons adopté la terminologie de "sphérosome" qui désigne pour YATSU et al. (1971) ce que les auteurs précédents séparaient sous les termes de sphérosomes et de globules lipidiques. La littérature donne à ce sujet des interprétations fort différentes.

Pour SOROKIN (1967) et SMITH (1974), sphérosomes et globules lipidiques sont des entités totalement différentes. Les sphérosomes, antérieurs à la formation des globules lipidiques, sont formés à partir du réticulum endoplasmique, en accord avec les observations de FREY-WYSSLING et al. (1963) ; ils renferment des phospholipides et sont limités par une membrane unitaire qui empêche leur coalescence. Les globules lipidiques selon SMITH (1974) renferment des triglycérides, et se forment dans des "zones particulières du cytoplasme" au cours du développement des graines. FREY-WYSSLING et al. (1963) les font dériver des sphérosomes et y observent également une membrane unitaire limitante. Si SCHWARZENBACH (1971) admet cette filiation, il constate chez *Ricinus communis* qu'au cours de la transformation du sphérosome en globule lipidique, la membrane unitaire se modifie et que le globule lipidique n'est plus limité que par la couche externe de cette membrane originelle. YATSU et JACKS (1972) observent de

même une "demi-membrane unitaire" autour des "sphérosomes" ou "oléosomes" pris dans un sens très large, terminologie simplifiée que nous avons également adoptée.

Les sphérosomes constituent la réserve la plus importante de la zygospore. Les techniques de fixation les préservent plus ou moins bien (Pl. XIX, fig. 1). Il semble que leur contenu ne soit pas homogène ; l'extraction par le D.M.S.O. est en effet incomplète (Pl. XIX, fig. 3). De rares auteurs (PIHAKASKI, 1972) observent une membrane unitaire tripartite autour des globules lipidiques. D'autres n'observent à leur périphérie "aucune membrane nette" (BERKALOFF, 1970). La plupart cependant s'accordent à voir autour de ces globules une "structure interfaciale" bien définie (HARWOOD et al. 1971, MOLLENHAUER et TOTTEN, 1971) ou une "demi-membrane unitaire" (YATSU et JACKS, 1972). Dans le cas présent, il semble bien que les globules contigus montrent chacun une "demi-membrane unitaire", dont la juxtaposition simule une membrane tripartite (Pl. XIX, fig. 4).

Les globules protéiques. Provenant vraisemblablement de l'accumulation de réserves dans les vacuoles ou dans des cavités du réticulum endoplasmique, sans que cela ait pu être démontré, dans le cas présent, ils sont comparables aux grains d'aleurone des graines, sans différenciation de globoïde ni de cristalloïde. Leur aspect varie avec le type de fixation ; il est finement granuleux après fixation permanganique. Le globule semble limité par une membrane unitaire (Pl. XIX, fig. 2).

Le hyaloplasme. Il montre une dense accumulation de ribosomes. Le réticulum endoplasmique n'est pas visible. De très rares mitochondries inactives sont cependant observables tandis que les dictyosomes ne peuvent être mis en évidence (Pl. XIX, fig. 5).

Les plastes. Au nombre de quatre dans la jeune zygospore, les plastes sont réduits à deux dans le zygote mûr. Le devenir des plastes dans les zygotes d'Algues est très variable. Dans le zygote de *Laminaria*, les plastes provenant des gamètes coexistent (BISALPUTRA et al., 1971). BRATEN (1973) démontre, par des études autoradiographiques, la désintégration rapide de l'un des deux plastes dans le zygote de l'Ulva mutabilis.

Chez le Chlamydomonas reinhardtii, CAVALIER-SMITH (1970) a montré une fusion des plastes provenant des deux gamètes ; il en est de même chez le Monostroma grevillei (CHESNOY et JONSSON, 1973).

Chez le Closterium moniliferum, si les observations en microscopie photonique suggèrent une dégénérescence de deux des plastes parentaux, la microscopie électronique n'en donne pas de preuve absolue mais l'abondance de thylakoïdes dispersés dans la zygospore et les lamelles rejetées à l'extérieur du plasmalemme peuvent faire penser à un processus de dégénérescence (Pl. XIX, fig. 1 et 5).

Bien qu'incolores, les plastes de la zygospore mûre sont peu modifiés. On y observe des thylakoïdes épars, rarement empilés, et des grains d'amidon (Pl. XX, fig. 1). Ils présentent cependant, par rapport à l'individu végétatif, des différences caractéristiques. On n'y voit aucun pyrénoïde. Par contre, plusieurs types d'inclusions s'y rencontrent :

- <u>La phytoferritine</u> : caractérisée par son opacité naturelle aux électrons, elle n'a été observée à aucun autre stade du cycle de l'Algue. Elle se présente sous l'aspect d'un réseau irrégulier et très dispersé (Pl. XIX, fig. 8). D'après ROBARDS et ROBINSON (1968), la phytoferritine assure une fonction de stockage du fer sous une forme non toxique pour la plante. Elle peut se rencontrer dans les plastes non différenciés ou sénescents.

- Les structures paracristallines intraplastidales : ces structures ne sont pas propres à la zygospore. On les observe rarement dans les individus en voie de sexualisation, plus fréquemment dans les jeunes individus issus de la germination où elles coexistent avec des pyrénoïdes (Pl. XIX, fig. 7 et Pl. XX, fig. 2). Chez les Spermatophytes, elles ont été observées par de nombreux auteurs. Pour certains, comme SHUMWAY et al. (1967), elles sont en relation avec le milieu d'isolement et apparaissent après traitement par des solutions hypertoniques. Leur nature est vraisemblablement protéique. NEWCOMB (1967) signale leur ressemblance avec le corps prolamellaire des chloroplastes étiolés mais remarque leur plus faible taille, leur organisation moins régulière et leur apparente indifférence à l'action de la lumière. Leur aspect les rapproche plutôt du "stromacentre" décrit par GUNNING (1965) dans l'étioplaste d'Avoine, ou des "centres cristallins" observés par VON WETTSTEIN (1959) chez *Picea*.

On pourrait également les rapprocher de la matrix cristalline du pyrénoïde de certaines Algues. HOLDSWORTH (1968) chez Achnanthes brevipes, KOWALLIK (1969) chez Prorocentrum micans et BERTAGNOLLI et al. (1970) chez Chlorella pyrenoidosa, décrivent de tels pyrénoïdes cristallins, attirant d'ailleurs l'attention sur la

similitude existant entre ces aspects et les zones cristallines rencontrées dans le stroma des plastes des végétaux supérieurs dépourvus de pyrénoïdes.

Quoi qu'il en soit, stromacentres ou précurseurs de pyrénoîdes, leur rôle n'a pu être élucidé pour l'instant. De même, leur relation possible avec la phytoferritine n'a pu être précisée (Pl. XIX, fig. 8).

- Les corps prolamellaires : caractéristiques des étioplastes de végétaux supérieurs, ces formations ont été rarement décrite chez les Algues. On en connaît cependant chez Chlamydomonas reinhardtii (FRIEDBERG et al., 1971), Chlorella pyrenoidosa (BUDD et al., 1969) et Euglena gracilis (SALVADOR et al., 1971), cultivés à l'obscurité. Les plastes du C. moniliferum montrent, dans la zygospore maintenue à l'obscurité, des zones à arrangements microtubulaires lâches. Ces microtubules, d'un diamètre variable, ressemblent à des sections de thylakoïdes et sont parfois en relation avec des dilatations de ces derniers (Pl. XIX, fig. 8). De telles formations ont été observées chez d'autres Algues maintenues à la lumière par HOFFMAN (1967) chez Oedogonium, par BARTELS et HOSHAW (1968) chez Sirogonium, par Mc LEAN et PESSONEY (1970) chez Zygnema, et par PICKETT-HEAPS (1968) chez Volvox, Chara et Nitella sans être assimilés à des corps prolamellaires.

III.2.4 Le zygote réactivé par la lumière :

Deux à trois heures de lumière blanche sans réhydratation de la gélose suffisent à réactiver les zygospores conservées à l'obscurité pendant plusieurs mois. La fixation et l'inclusion deviennent aussitôt plus faciles et des modifications importantes sont rapidement décelables.

L'endospore perd sa structure stratifiée et acquiert une structure réticulée (Pl. XVIII, fig. 1). La couche interne de l'endospore se désorganise profondément ; c'est elle qui persistera autour de la vésicule de germination. Entre le plasmalemme et l'endospore, on observe une accumulation de lamelles enroulées, d'allure myélinique, et le plasmalemme présente lui-même un aspect festonné (Pl. XX, fig. 5). Le cytoplasme perd sa densité. Il renferme de nombreuses vésicules à contenu clair, mal délimitées, entourées de polyribosomes. Les sphérosomes euxmêmes prennent un aspect réticulé, indice d'un début de "recyclage" de leur contenu (Pl. XX, fig. 6).

Les corps protéiques, de grande taille, à contour irrégulier, montrent un contenu particulièrement dense aux électrons (Pl. XX, fig. 6).

Les dictyosomes s'individualisent à nouveau et, comme chez l'individu végétatif, se retrouvent typiquement localisés autour des plastes (Pl. XX, fig. 6).

La structure des deux plastes reprend un aspect typique sans qu'aucun verdissement ne soit apparent à ce stade. Les lamelles, beaucoup plus nombreuses, semblent se reformer à partir des zones vésiculeuses qui simulaient, dans le zygote quiescent, un corps prolamellaire (Pl. XIX, fig. 8). Elles ne paraissent pas, contrairement à ce que signale CHARDARD (1971a) chez *Closterium acetosum* cultivé en lumière atténuée, se former à partir d'invaginations de l'enveloppe plastidale interne. Les thylakoïdes, dispersés de manière lâche dans le zygote quiescent, se réorganisent en empilements simulant des granums (Pl. XX, fig. 4). Entre les thylakoïdes on peut observer de nombreux plastoglobules alignés, comme chez les individus végétatifs. L'amidon, toujours abondant, est groupé autour d'un pyrénoïde qui se reforme rapidement. Il se présente comme une zone granuleuse dense à l'intérieur de laquelle pénètrent les thylakoïdes, comme dans la structure végétative typique (Pl. XX, fig. 2 et 3).

Le stroma du plaste comporte des zones claires où sont dispersées des granulations denses aux électrons, de nature inconnue (phytoferritine ?) et des vésicules à contenu granuleux, semblables à celles observées par CHARDARD (1971b) chez *Closterium acerosum* cultivé en lumière atténuée. Le contenu de ces vésicules présentent parfois un aspect cristallin (Pl. XX, fig. 2) ce qui pourrait faire penser qu'il s'agit bien de "stromacentres"très dispersés (peut être à l'origine de l'amidon stromatique ?).

Si l'étude ultrastructurale de la zygospore mûre de Closterium moniliferum ne nous permet pas encore d'apporter d'amples précisions sur le mode de formation et la nature de certaines enclaves de réserve, elle nous aide, cependant, à mettre en lumière, d'une part la succession des couches qui composent

la paroi, la présence d'une poche à déchets extérieure au plasmalemme et d'une zone gazogène spongieuse au sein du cytoplasme ; d'autre part elle nous révèle, dans les plastes de cet organisme, la présence de corps prolamellaires et de formations paracristallines particulières, qui sont autant de structures rarement décrites chez les Algues. CHAPITRE IV : La GERMINATION.

IV.1 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

, IV.1.1 Les stades morphologiques de la germination :

Les zygospores obtenues en grande quantité dans des conditions d'éclairement appropriées forment sur la gélose où elles se sont développées une couche jaune pâle. Au microscope elles montrent une épaisse paroi brunâtre (> 2 µm) et un contenu granuleux où deux masses plastidales incolores sont parfois distinctes. Leur diamètre est d'environ 50 µm. Le lugol permet d'y mettre en évidence deux masses amylifères dépourvues de pyrénoïde. Le noir Soudan y colore des globules lipidiques très abondants, et le bleu de bromophénol mercurique, selon MAZIA et al. (1953) permet d'y observer des globules protéiques. La coloration par le carmin acétique après fixation par le mélange éthanol absolu : 3 parties/acide acétique glacial : 1 partie montre deux noyaux gamétiques de taille équivalente, à volumineux nucléole. A l'obscurité, cet aspect peut se maintenir un an ou davantage.

- Le stade "deux plastes verts" (Pl. I, fig. 13 et Pl. XXI, fig. 1) :

Après 6 à 24 heures de réhydratation, les zygospores augmentent très légèrement de volume. De manière non synchrone, dans une population obtenue pourtant dans les mêmes conditions, les deux plastes amylifères verdissent. Le cytoplasme ne se modifie pas de manière apparente. Le verdissement net des plastes coïncide avec la fusion des noyaux gamétiques. Ce comportement avait déjà été signalé par BIEBEL (1964) chez Netrium digitus. La fusion nucléaire a lieu 24 à 36 heures après le début de la réhydratation et de l'éclairement, et on peut parfois observer un début de prophase à la fin de ce stade.

- Le stade "vésicule de germination" :

Après 36 heures de réhydratation, la plupart des zygospores montrent la sortie des "vésicules de germination" (Pl. I, fig. 14). C'est un phénomène brusque et non synchrone pour des zygospores apparemment identiques. Il est dû essentiellement à la réhydratation du contenu cytoplasmique ; la sortie de la vésicule ne se fait pas au hasard par une déchirure comme chez Closterium acerosum (KIES, 1964); il ne s'agit pas non plus d'un opercule comme chez Pleurotaenium ehrenbergii (LING et TYLER, 1972), mais d'une fente bordée de dents arrondies qui se produit dans l'enveloppe de la zygospore (Pl. XXI, fig. 6). Cette fente n'est pas visible avant la germination ; elle ne préexiste pas à celle-ci comme c'est le cas chez Spirogyra où le zygote quiescent en montre déjà l'emplacement. La vésicule fait saillie par cette fente, se gonfle progressivement et on assiste en même temps à son décollement de la paroi opposée (Pl. XXI, fig. 2). Contrairement à l'interprétation de KIES (1964) et de LIPPERT (1967) il ne s'agit pas d'un véritable protoplaste. Le cytoplasme est entouré de la partie interne cellulosique de l'endospore colorable par le "Calcofluor-white" (Pl. III, fig. 6); lorsque la forme de la zygospore est irrégulière, celle de la vésicule l'est aussi, contrairement à ce qu'observent LING et TYLER (1972) chez Pleurotaenium où la vésicule prend une forme sphérique quelle que soit celle de la zygospore. Chez Netrium digitus, BIÉBEL (1964) signale que l'enveloppe de la vésicule est "quelque peu rigide".

Le diamètre moyen de la vésicule est d'environ 70 µm. Entre 36 et 48 heures après le début de la réhydradation, la coloration au carmin acétique permet de mettre en évidence les stades de la méiose. Au cours de ce processus, le diamètre de la vésicule diminue pour revenir vers 55 µm environ, puis son contenu se scinde en deux parties. Cette scission irrégulière commence typiquement par un bord ; des formes en coeur sont visibles à ce stade et les processus incomplets conduisent à des individus à trois branches.

Le nombre de plastes dans la vésicule est typiquement de 2. Il est de 4 dans les vésicules issues de zygospores tétraploïdes qui donneront naissance à 4 jeunes individus.
- Le stade "2 jeunes individus" :

Lorsque la méiose est achevée, la vésicule contient deux jeunes individus ou "gones" des auteurs anglo-saxons. Chacun renferme deux noyaux haploïdes, l'un normal, à nucléole volumineux, l'autre en dégénérescence. Les "gones" d'abord orthogonaux (Pl. XXI, fig. 1) deviennent parallèles. Ils n'ont pas à ce stade la forme typique en croissant des *Closterium* adultes (Pl. I, fig. 15 et Pl. XXI, fig. 1).

Le nombre de "gones" est variables chez les Desmidiées : 1 seul chez Cosmarium biretum (STARR, 1959) et chez Pleurotaenium ehrenbergii (LING et TYLER, 1972) ; 2 chez Cosmarium botrytis var. subtumidum (STARR, 1955a), Closterium acerosum (KIES, 1964), Micrasterias rotata (LENZENWEGER, 1968), Closterium moniliferum (LIPPERT, 1967 ; DUBOIS-TYLSKI, 1972) ; 1, 3, 4 ou 5 chez Netrium digitus var. digitus (BIEBEL, 1964), 4 chez Staurastrum dickiei var. parallelum qu'il faut nommer actuellement Staurodesmus mucronatus (Ralfs) Croasd. var. parallelus (Nordst.) Teiling. (FRITSCH, 1948).

Les "gones" renferment d'abord chacun un plaste puis celui-ci se divise. Les pyrénoïdes ne deviennent visibles et caractéristiques qu'à ce stade. L'allongement des cellules provoque la rupture de la vésicule de germination. Les "gones" demeurent proches sur le milieu gélosé et dans des conditions d'éclairement favorables, ils peuvent se sexualiser immédiatement après leur première bipartition.

IV.1.2 La méiose :

La coloration nucléaire par la méthode exposée pour la mitose nécessite l'écrasement des zygospores fixées. Pendant les premières 24 heures de réhydradation on met en évidence les deux noyaux-gamètes, très proches l'un de l'autre mais bien distincts (Pl. II, fig. 4). La fusion nucléaire coîncide avec le verdissement des plastes. Le noyau de fusion se place entre les deux plastes, à la partie inférieure et il a souvent une forme triangulaire après étalement. Lors de la sortie des vésicules de germination, le noyau se trouve en prophase de méiose, au stade diplotène ou diacinèse (Pl. II, fig. 5 et 6). Les bivalents sont très nombreux et peu séparables. Comme l'ont fait observer BRANDHAM et GODWARD (1965b) chez Cosmarium botrytis, le noyau est placé de telle sorte que le développement du fuseau n'est pas limité par les plastes. Ce fuseau est en général tronqué ; contrairement

à ce qui se passe chez Cosmarium botrytis, la plaque métaphasique est ici très nette (Pl. II, fig. 7 et 8). L'anaphase I est très rapide et nous n'en avons observé que 2 : il semble qu'un ou deux chromosomes, plus longs, présentent un certain retard lors de la montée aux pôles (Pl. II, fig. 9). Si chez Cosmarium botrytis, on passe directement de l'anaphase à la métaphase II, il semble qu'ici on puisse distinguer une interphase (Pl. II, fig. 10), où les noyaux sont cependant dépourvus de nucléole et pendant laquelle ils migrent aux extrémités de la cellule opposées à l'emplacement de la métaphase I. Lors de la métaphase II, les plaques équatoriales sont très nettement orthogonales (Pl. II, fig. 11), de même que les anaphases II (Pl. II, fig. 12). En télophase II, les noyaux sont d'abord identiques mais très rapidement deux d'entre eux, opposés et ne contenant pas de "chromatides-soeurs", présentent un aspect condensé et vivement coloré par le carmin (Pl. II, fig. 13); ils dégénèrent très rapidement, tandis que les deux autres noyaux différencient un nucléole. Une bipartition qui débute par un des bords de la cellule-mère, en dehors des fuseaux, amène la formation de deux jeunes individus, où se distinguent un "macronucleus" viable et un "micronucleus" en dégénérescence (Pl. II, fig. 14). Il arrive que les 2 micronucleus se retrouvent dans la même cellule.

A cause de leur petite taille et de leur grand nombre, la numération des chromosomes n'est pas aisée : la moyenne obtenue par l'observation des 30 plaques métaphasiques I ou II est de 70 chromosomes pour le nombre haploïde. Ceci est approximativement conforme au chiffre de 70 \pm 10 donné par LIPPERT (1967) et à celui de 66 donné par KING (1960) pour des numérations en mitose. GODWARD (1966) cite pour diverses souches de C. moniliferum les nombres haploïdes de 66, 95 et 174 chromosomes.

Peu de figures de méiose ont été observées dans le cas des zygotes issus de clones diploïdes. Une seule fois, 4 plaques de métaphase II ont été observées dans la même vésicule, ce qui laisse supposer que la fusion des noyaux-gamètes n'a pas lieu dans ce cas et explique l'obtention de 4 jeunes individus.

IV.2 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

IV.2.1 Le stade "2 plastes verts" :

L'intégrité de l'épaisse enveloppe de la zygospore à ce stade ne permet pas une bonne fixation et les images obtenues ne sont pas très satisfaisantes.

La paroi montre encore les couches caractéristiques de l'exospore callosique, de la mésospore polysaccharidique limitée par deux couches de sporopollénine et de l'endospore cellulosique. L'endospore perd en général sa structure stratifiée et se rompt au tiers de son épaisseur environ. La partie externe demeure solidaire de la mésospore, la partie interne reste accolée au plasmalemme dont elle est séparée par une zone fortement osmiophile, discontinue, de 0,1 µm environ, qui représente sans doute les restes remaniés des débris membranaires expulsés hors du cytoplasme de la zygospore mûre (Pl. XXI, fig. 3 et 4).

Le cytoplasme réhydraté est assez peu différent de celui de la zygospore mûre. On n'y observe pas de mitochondries ni de dictyosomes. Les globules lipidiques ne semblent pas modifiés. Les globules protéiques montrent par contre un contenu plus dispersé ; ils gonflent et développent des cavités, où la plupart des auteurs s'accordent à voir le début de la formation de nouvelles vacuoles. SRIVAS-TAVA et PAULSON (1968) décrivent lors de la germination des akènes de Laitue une continuité entre la dissolution des globules protéiques et la formation des vacuoles, et ces observations sont confirmées pour le même matériel par NABORS et al. (1974).

C'est au niveau des plastes que les modifications sont les plus importantes, la lumière induisant leur réactivation, la réorganisation du système lamellaire et la réapparition "de novo" des pyrénoïdes, ce qui constitue un phénomène fréquent, déjà observé chez Oedogonium cardiacum par HOFFMAN (1968) et Bulbochaete hiloensis par RETALLACK et BUTLER (1970), au niveau des zoospores.

IV.2.2 Le stade "vésicule de germination" :

La paroi comporte une partie de l'endospore, d'épaisseur variable, et une couche interne osmiophile plus mince que dans le stade "2 plastes verts", et qui semble dépourvue de pores. Cette paroi a suivi l'extension du volume de la vésicule tout en conservant la forme de la zygospore primitive.

Les globules lipidiques ne semblent modifiés ni en nombre ni en volume ; ils sont rassemblés sur le pourtour de la vésicule et autour des plastes.

C'est au niveau des vacuoles qu'ont lieu les modifications les plus spectaculaires. Certaines, à contour irrégulier, au contenu homogène extrêmement transparent aux électrons sont probablement des vacuoles contractiles, responsables de la diminution de volume des vésicules par expulsion d'eau. Leur diamètre passe en effet de 70 µm environ à 55 µm environ.

D'autres, limitées par une membrane simple, mais plus ou moins fusionnées, à contenu granuleux, dispersé, dense aux électrons, résultent vraisemblablement de la réhydratation des globules protéiques. Si dans les cellules méristématiques, les vacuoles au sens strict dérivent du réticulum endoplasmique (BUVAT et MOUSSEAU, 1960), dans les graines en germination la réhydratation des grains d'aleurone donne également des "vacuoles nouvelles" (BUVAT, 1969 p. 124), pour lesquelles MATILE (1968) a émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir de lysosomes à partir desquels les substances de réserve seraient réutilisées par la cellules (Pl. XXII, fig. 7).

Le noyau est unique, diploïde, et on y observe parfois deux nucléoles (Pl. XXII, fig. 8) ; il est très souvent au stade prophase de méiose lors de l'expulsion de la vésicule. Malgré le grand nombre de vésicules coupées (plus de 50), peu de stades intéressants ont été rencontrés. Le manque de synchronisme des évènements de la méiose dans les vésicules avait déjà occasionné ces difficultés lors de l'observation en microscopie photonique.

Les stades de prophase sont les plus fréquemment observés (Pl. XXII, fig. 9 et 10). L'enveloppe nucléaire et le nucléole sont encore distincts à ce stade tandis que les chromosomes s'individualisent en masses opaques aux électrons. La membrane nucléaire qui commence à se fragmenter montre sur sa face externe de nombreuses coupes de microtubules. Le seul autre stade de la méiose observé est une plaque de métaphase II, d'après sa position par rapport aux plastes (Pl. XXIII, fig. 11 et 12). Le noyau est dépourvu d'enveloppe nucléaire, contrairement à ce qui se passe chez Ulva mutabilis (BRATEN et NORDEY, 1973), mais conformément aux observations en mitose chez Closterium littorale (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1970b). Chez Spirogyra sp. (FOWKE et PICKETT-HEAPS, 1969) et chez Mougeotia sp. (BECH-HANSEN et FOWKE, 1972) l'enveloppe nucléaire ne se rompt pas complètement. Le fuseau renferme peu de fibres et celles-ci s'attachent aux chromosomes par un cinétochore diffus, assez semblable à celui que l'on observe chez Mougeotia sp. (BECH-HANSEN et FOWKE, 1972) et beaucoup plus simple que celui d'Oedogonium cardiacum (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1970a). Il n'a pas été possible d'observer le "centre organisateur de microtubules" décrit par PICKETT-HEAPS et FOWKE (1970b) chez Closterium littorale.

Lorsque la méiose a lieu, la cellule a expulsé une grande partie de l'eau qu'elle avait absorbée lors de la sortie de la vésicule ; les coupes ne montrent plus de vacuoles contractiles ; les vacuoles à contenu granuleux sont moins développées et leur aspect plus dense.

Les plastes montrent peu de modifications : le nombre des grains d'amidon n'augmente pas de manière apparente. Un plaste (Pl. XXIII, fig. 11) montre une inclusion paracristalline dont le rôle possible a été discuté précédemment. Son aspect rappelle celui du stromacentre décrit par GUNNING et al. (1965, 1968) chez Avena sativa et Phaseolus vulgaris. Chez Closterium moniliferum, la taille des particules (environ 16 nm) est sensiblement plus importante que dans les cas précédents où elle n'est que de 8,5 à 9 nm. Chez Carteria (JOYON et FOTT, 1964) la taille des particules (15 nm) paraît voisine de ce que nous observons ici. Chez Phaseolus vulgaris ces structures semblent apparaître lorsque les feuilles sont soumises à une dessiccation plus ou moins prononcée. Cette éventualité est à rejeter dans le cas présent, puisque les vésicules se forment en milieu aqueux et sont ensuite maintenues dans des milieux peu concentrés au cours de la fixation. D'autre part, aucun signe de plasmolyse n'est perceptible, mise à part l'expulsion normale de l'eau qui provoque la diminution de taille de la vésicule.

Par leur position dans le plaste, en particulier leur alignement au centre du plaste des jeunes individus que nous observerons plus loin, ces structures pourraient être des précurseurs de pyrénoïdes. Chez Bulbochaete hiloensis (RETALLACK et BUTLER, 1970) les pyrénoïdes formés de novo peuvent d'ailleurs présenter parfois une structure cristalline voisine de celle observée ici.

67

Le clivage de la vésicule n'a pu être observé, car la relative rapidité du processus rend hasardeuse son observation.

IV.2.3 Le stade "deux jeunes individus" :

Les "gones" sont d'abord orthogonaux dans l'enveloppe de la vésicule de germination puis deviennent parallèles(Pl. XXIII, fig. 14). Leur paroi est homogène. Une pellicule externe osmiophile très festonnée se différencie rapidement à l'extérieur du plasmalemme. Ensuite il semble qu'avant la première division seule s'élabore une paroi primaire dépourvue de pores. Certains aspects de la pellicule externe osmiophile laissent penser qu'elle n'est pas continue et qu'elle peut ainsi laisser passer le mucilage qui entoure parfois les jeunes individus (Pl. XXIV, fig. 17). L'élongation de la cellule se fait par toute sa surface et il n'y a pas de distinction entre hémisomates.

D'une manière générale, le contenu des "gones" apparaît extrêmement dense. Les dictyosomes et les mitochondries deviennent abondants dans les coupes. Les globules lipidiques sont souvent accompagnés de vésicules à contenu granuleux, nettement limitées par une membrane simple, de taille voisine de celle des mitochondries, dont l'aspect rappelle celui des glyoxysomes, qui jouent un rôle dans la réutilisation des réserves lipidiques (Pl. XXIV, fig. 17). Autour du plaste, entre les globules lipidiques se trouvent les futures vacuoles à contenu dense, limitées par une enveloppe simple. Elles peuvent être assimilées à des vacuoles autophagiques ou à des lysosomes puisque leur contenu sera utilisé par la jeune cellule pendant son développement (Pl. XXIV, fig. 17 et 18).

A l'intérieur du plaste, le nombre de grains d'amidon visibles dans les coupes augmente sensiblement. Il diminue au contraire chez les jeunes individus maintenus à l'obscurité et vivant sur leurs réserves. C'est à ce stade que les structures paracristallines, semblables à des stromacentres, rarement présentes à d'autres moments de la vie de l'Algue, deviennent particulièrement fréquentes ; elles peuvent coexister avec des pyrénoïdes complètement différenciés dont elles sont probablement les précurseurs (Pl. XXIV, fig. 15 et 16). La parenté entre stroma des végétaux supérieurs et pyrénoïde des Algues en ce qui concerne le contenu enzymatique est d'ailleurs soulignées par DODGE (1973). Le plaste unique du jeune gone s'étire puis se clive. Le clivage a lieu au niveau du noyau, mais en dehors de toute division nucléaire (Pl. XXIV, fig. 18 et 19). Il semble que des microtubules participent au processus de cette scission. Les deux noyaux, d'aspect très différents, peuvent être placés en contiguïté (Pl. XXIII, fig. 13). Le noyau définitif est typique, à chromatine finement granuleuse et dispersée ; le nucléole volumineux est constitué d'une substance dense, opaque aux électrons, et de structures filamenteuses enroulées semblables à celles décrites dans le noyau interphasique de *Micrasterias rotata* par DRAWERT et KALDEN (1967). Le noyau qui dégénère se présente comme une masse sphérique, de diamètre sensiblement égal à celui du nucléole du noyau définitif, et présente les mêmes structures enroulées, beaucoup plus développées. Il peut persister jusqu'à 48 heures après l'individualisation des jeunes gones.

Lorsque la cellule a atteint la taille adulte, une division nucléaire a lieu ; elle est précédée par la formation, autour du noyau, d'une zone claire dépourvue d'inclusions.

L'étude ultrastructurale permet de préciser certains aspects de la germination, en particulier la présence autour de la vésicule de germination d'une enveloppe cellulosique provenant de l'endospore interne, et très peu visible en microscopie photonique. Les pyrénoïdes se reforment très précocement et de novo dès le stade deux plastes verts. Des masses paracristallines intraplastidales, analogues à des stromacentres de végétaux supérieurs, précèdent les pyrénoïdes dans la zygospore mûre, puis se retrouvent aux différents stades de la germination avec une particulière abondance au stade "deux jeunes individus", stade où la microscopie photonique montre une augmentation du nombre de pyrénoïdes. Ces structures paracristallines peuvent coexister avec des pyrénoïdes typiques, et si leur position dans le plaste suggère qu'elles pourraient être des précurseurs de pyrénoïdes, rien ne permet de l'affirmer en l'absence d'une analyse biochimique de ce matériel et d'une comparaison entre la fraction paracristalline et la fraction pyrénoïde. L'évolution des globules protéiques de la zygospore mûre qui passent par différentes phases de réhydratation puis de concentration avant de devenir des vacuoles est également caractéristique de ce matériel.

69

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE.

La cellule du Closterium moniliferum subit au cours de son cycle biologique des modifications ultrastructurales que l'on peut mettre en rapport essentiellement avec l'action de la lumière.

Dans la cellule végétative, l'aspect des plastes et le nombre des pyrénoîdes sont très variables selon l'éclairement ; ce problème a été particulièrement bien étudié par CHARDARD.

Si l'éclairement est suffisant, en qualité et en quantité, la cellule présente des aspects très particuliers qui caractérisent l'induction sexuelle : l'amidon s'accumule dans tout le plaste, le système de thylakoïdes régresse ; dans le cytoplasme apparaissent de nombreux globules lipidiques, l'appareil vacuolaire disparaît et l'appareil de Golgi manifeste une intense activité qui se traduit par l'accumulation de vésicules polysaccharidiques participant à la néoformation des parois et à l'excrétion de mucilage.

Ces aspects ne sont pas sans rappeler les modifications des cellules méristématiques de Spermatophytes orientées vers l'état préfloral, ou celles des cellules végétatives d'autres Desmidiées soumises à des solutions hypertoniques.

La différenciation des papilles de conjugaison qui s'accroissent rapidement tout en excrétant un mucilage constituant d'abord un ciment intergamétique puis une vésicule de conjugaison, est un phénomène dont les modalités paraissent propres à cette espèce.

L'expulsion des gamètes pratiquement nus dans le milieu, et ainsi très vulnérables, est compensée par la sécrétion dès les premières heures de la formation de la jeune zygospore d'une enveloppe callosique dont l'équivalent n'est pas connu chez d'autres Algues. La zygospore mûre montre également des structures dont la présence a été rarement signalée chez les Algues : corps prolamellaires, phytoferritine....

L'action de la lumière induit la germination des zygospores, au cours de laquelle a lieu la méiose dont quelques stades ont pu être observés en microscopie électronique. C'est au niveau des vacuoles et des plastes qu'ont lieu les modifications les plus frappantes.

Il faut également signaler que tout au long de la vie de l'Algue on peut observer dans le plaste des structures paracristallines, particulièrement fréquentes au stade "2 jeunes individus", que nous avons comparées au "stromacentre" de certains végétaux supérieurs et qui pourraient être des précurseurs de pyrénoïdes.

TABLE DES PLANCHES

I à III : OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

- pl. I Conjugaison et germination chez C. moniliferum
- pl. II Mitose et méiose chez C. moniliferum
- pl. III Mise en évidence de constituants des parois par action de fluorochromes et observation en lumière U.V.

IV à XXIV : OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

- IV à XII : L'individu végétatif et les stades de la sexualisation
- pl. IV Individus végétatifs, coupes transversale et longitudinale
- pl. V Individus végétatifs, détails de la paroi, du plaste, du pyrénoide
- pl. VI Individus sexuellement induits, coupes transversale et longitudinale
- pl. VII Individus sexuellement induits, formation d'un globule lipidique, bipartition
- pl. VIII Individus sexuellement induits, raccord entre hémisomates
- pl. IX Individu au stade préconjugaison
- pl. X Divers types de vésicules chez les "individus sexués"
- pl. XI Aspects des papilles de conjugaison
- pl. XII Représentation schématique de la formation des papilles, de la vésicule de conjugaison et de la conjugaison.

XIII à XVII : La conjugaison et la jeune zygospore

- pl. XIII Sortie des gamètes
- pl. XIV Accolement des gamètes et fusion
- pl. XV Formation de l'exospore callosique
- pl. XVI Mise en place de la mésospore sporopollénique
- pl. XVII Zygospores âgées de 48 heures environ.

XVIII à XX : La zygospore mûre. Photos de Michel ABADIE

- pl. XVIII Aspects de la paroi
- pl. XIX Constituants cytoplasmiques de la zygospore mûre conservée à l'obscurité
- pl. XX Constituants cytoplasmiques de la zygospore réactivée par la lumière sans réhydratation.

XXI à XXIV : La germination de la zygospore
pl. XXI Zygospore mûre réhydratée et réactivée par la lumière
pl. XXII Vésicule de germination ; prophase de méiose
pl. XXIII Métaphase de méiose ; individu à 2 noyaux
pl. XXIV Particularités cytoplasmiques des jeunes individus.

PLANCHE I : Conjugaison et germination chez Closterium moniliferum

1 : individus végétatifs. 2 : appariement de 2 cellules sexuellement induites.
3 : mouvement simultané des cellules appariées ; coloration au rouge de ruthénium. 4 : émission des papilles de conjugaison. 5 : papilles et vésicules de conjugaison. 6 et 7 : accolement anormal de plusieurs cellules sexuellement induites. 8 et 9 : cystogamie. 10 : zygotes provenant d'un clone haploïde (a) et diploïde (b). 11 : parthénospore provenant d'un gamète sans partenaire. 12 : zygote mûr coloré au réactif iodo-phosphorique ; ex : exospore ; me : mésospore ; en : endospore. 13 : zygotes mûrs réhydratés et éclairés 24 h ; pl : plaste.
14 : vésicule de germination. 15 : jeunes individus issus de la germination et libérés de leur vésicule.

La longueur portée sur chaque figure représente 50 µm.

PLANCHEI



BUS

PLANCHE II : Mitose et méiose chez Closterium moniliferum

Fig. 1, 2, 3 : Mitose. 1 : métaphase. 2 : début d'anaphase. 3 : télophase.
Fig. 4 et suivantes : Méiose. 4 : zygote mûr à 2 noyaux. 5 : libération de la vésicule de germination, noyau de fusion en fin de prophase. 6 : diacinèse.
7 et 8 : métaphase I vue de face et de profil. 9 : anaphase I. 10 : fin de télophase I. 11 : métaphase II. 12 : anaphase II. 13 : télophase II. 14 : jeunes individus à 2 noyaux, dont l'un dégénère. 15 : jeunes individus à 1 noyau.

La longueur portée sur chaque figure représente 10 µm.

PLANCHE II



PLANCHE III : Mise en évidence de constituants des parois par action de fluorochromes et observation en lumière U.V. 350 nm.

Fig. 1 à 6 : Mise en évidence des composés pecto-cellulosiques par le "Calcofluor-White S.T.".

Fig. 1 : individus appariés. 2 : début de la formation des papilles de conjugaison. 3 : accumulation de matériel fortement fluorescent constituant les vésicules de conjugaison. 4 : zygospores âgées de moins de 24 heures, un des gamétocystes vides montre des zones annulaires dont la fluorescence est plus ou moins intense, indices des élongations successives de l'hémisomate. 5 : cellule végétative, gamétocystes vides et zygospores âgées de 2 mois, fortement fluorescents. 6 : vésicule de germination entourée par la partie interne de l'endospore cellulosique.

Fig. 7 et 8 : Mise en évidence de la callose par le bleu d'aniline.

Fig. 7 : zygospores âgées de moins de 24 heures. 8 : zygospores âgées de 2 mois. Dans les deux cas on observe des bouchons de callose d'épaisseur et de localisation variable. Les gamétocystes vides qui entourent les zygospores ne montrent aucune fluorescence.

L'échelle portée sur les figures représente 25 µm.

PLANCHE III



PLANCHE IV : Individus végétatifs

Fig. 1 : Coupe transversale. Paroi pecto-cellulosique (pp) incomplètement percée de pores (p). Cytoplasme renfermant des mitochondries (m), des dictyosomes (d), des structures mucilagineuses (s) et de nombreuses vacuoles (vac). Plaste à section étoilée (pl) renfermant relativement peu d'amidon (a) et des plastoglobules (pg). x 7000 env.

Fig. 2 : Individus ayant subi un début d'induction sexuelle. Coupe longitudinale. Vacuoles (vac) encore importantes mais apparition de globules osmiophiles (go) dans le cytoplasme. Amidon (a) très abondant dans tout le plaste (pl). Pyrénoïde (py) accompagné d'une structure pseudo-cristalline (ps). Noyau (n) à nucléole (nu) volumineux. x 5000 env.

> fixation : glutaraldéhyde postosmié contraste : acétate d'uranyle - citrate de plomb.

PLANCHE IV



PLANCHE V : Individus végétatifs, hémisomate âgé, coupes transversales.

Fig. 1 : Détail de la paroi et du plaste. La paroi présente une couche externe osmiophile ou pellicule externe (pe). Paroi primaire et paroi secondaire ne peuvent être dissociées en coupe transversale (p). Les pores (po) coniques sont partiellement obturés par des fibrilles polysaccharidiques qu'on retrouve entre le plasmalemme (pl) et la paroi (flèches).

Le cytoplasme montre des structures mucilagineuses rayonnantes (s), un dictyosome (D) localisé à proximité du plaste (Pl) et de rares globules osmiophiles intracytoplasmiques (go).

Le plaste renferme peu d'amidon (a) et des rangées de plastoglobules (pg entre des empilements de thylakoïdes analogues aux granums (gr). x 16 000 env.

Fig. 2 : La coupe passe au niveau d'un pyrénoïde dont la matrix (m) montre une structure granuleuse nettement différente de celle du stroma (st). De nombreux thylakoïdes (th), parfois empilés par 4 ou 5, traversent la matrix. Des grains d'amidon (a) entourent le pyrénoïde, formant une enveloppe discontinue. x 30 000 e:

fixation : glutaraldéhyde postosmié contraste : acétate d'uranyle - citrate de plomb.

PLANCHE V



PLANCHE VI : Individus sexuellement induits.

Fig. 3 : Individu en cours d'induction sexuelle. Détail de la figure IV, 2. a : amidon. py : pyrénoïde auquel est accolée une structure pseudo-cristalline : ps. x 20 000 env.

Fig. 4 : Individu sexuellement induit et apparié. Coupe transversale. x 11 000 env.

Fig. 5 : Idem. Coupe longitudinale. Noter l'absence de vacuole remplacée par des vésicules claires (v), l'abondance de l'amidon (a) dans le plaste et des globules osmiophiles (go), dispersés dans le cytoplasme. x 8000 env.

fixation : glutaraldéhyde postosmié contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE VI



PLANCHE VII : Individus sexuellement induits.

Fig. 1 : Coupe transversale d'un individu au début du stade "appariement". Le plaste (Pl) présente de nombreux grains d'amidon stromatique (a) et des alignements de plastoglobules (pg). Des empilements de thylakoïdes sont encore visibles. Un globule osmiophile (go) intracytoplasmique semble se former entre des vésicules claires (v), à l'emplacement occupé par une vacuole dans l'individu végétatif. x 25 000 env.

Fig. 2 : Coupe longitudinale d'un individu au stade "appariement" venant de subir la mitose préconjugale. On remarque dans le plaste l'abondance des grains d'amidon (a) et la régression des structures pseudo-granaires, dans le cytoplasme les nombreux globules osmiophiles (go) et les vésicules claires (v) accumulées de part et d'autre du septum (sept). Ces vésicules claires, fréquentes dans les hémisomates néoformés puis dans la papille de conjugaison participent vraisemblablement à l'élaboration de la paroi. x 12 500 env.

fixation : glutaraldéhyde postosmié contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE VII



PLANCHE VIII : Raccord entre hémisomates dans un individu au stade "appariement".

La paroi de l'hémisomate ancien (ha) est nettement plus épaisse que celle de l'hémisomate néoformé (hn), et la zone de raccord (flèche) a une structure simple sans appareil d'agrafage particulier . Il y a continuité entre les deux parties, sans "ceinture". La pellicule externe (pe) est déjà nettement différenciée dans la partie néoformée, bien qu'elle paraisse un peu moins épaisse que dans la partie ancienne. Les coupes longitudinales ne montrent que rarement les pores.

Le cytoplasme dense ne renferme plus de vacuole, mais ici, un globule osmiophile (go) intracytoplasmique. Les coupes de mitochondries (m) sont fréquentes ; les dictyosomes (D) sont proches du plaste et émettent d'abondantes petites vésicules golgiennes (vg) qui pourraient évoluer en vésicules claires (v) de plus grande taille. On observe également de nombreux polyribosomes et quelques membranes du réticulum endoplasmique (re).

Le plaste est riche en amidon (a) et les empilements pseudo-granaires sont encore bien visibles à ce stade (gr) ; quelques plastoglobules (pg) sont alignés entre les thylakoïdes. x 45 000 env.

fixation : mélange glutaraldéhyde - acide osmique, puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE VIII



un

PLANCHE IX : Individus sexuellement induits.

Fig. 6 : Individu apparié, coupe longitudinale. Vacuole (vac) restreinte encombrée de vésicules. Globules osmiophiles (go) intracytoplasmiques. Dictyosomes (d) parfois constitués de saccules refermés sur eux-mêmes émettant de nombreuses vésicules de petite taille. Les vésicules claires de grande taille (v) n'ont pas de rapport évident avec l'appareil de Golgi dans cette image. x 21 000 env.

Fig. 7 : Individu au stade de préconjugaison ; coupe transversale de la partie néoformée du gamète. Noter la faible épaisseur de la paroi pecto-cellulosique (pp) et l'aspect festonné du plasmalemme. pm : plasmalemmasome. x 36 000 env.

Fig. 8 : Individu au stade de préconjugaison ; coupe transversale de la partie ancienne du gamète. Paroi pecto-cellulosique (pp) épaisse et percée de pores. Dans le cytoplasme apparaissent de nombreuses mitochondries (m), des vésicules claires de grande taille (v), des dictyosomes (d) et des globules osmiophiles volumineux (go). Le plaste (pl) renferme de l'amidon (a) en abondance et quelques plastoglobules (pg). x 8000 env.

fixation : mélange glutaraldéhyde - acide osmique, puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE IX



PLANCHE X : Divers types de vésicules chez les individus sexués.

Fig. 1 : Hémisomate néoformé, à paroi mince et plasmalemme festonné montrant un plasmalemmasome (pm). Le cytoplasme renferme de nombreuses "vésicules claires" (v), quelques "vésicules denses" (vd). Un dictyosome (D) est accolé au plaste (Pl) rempli d'amidon (a), où les pseudo-granums commencent à se désorganiser. x 25 000 env.

Fig. 2 et 3 : Hémisomate ancien montrant une pellicule externe osmiophile (pe), une paroi pecto-cellulosique (pp) incomplètement percée de pores coniques (po). Le cytoplasme renferme de nombreuses structures mucilagineuses (s) réticulées ("Schleimstrukturen" de MIX), non délimitées par une membrane nette. D'autres vésicules, nettement délimitées (vd) sont interprétées comme analogues aux "vésicules denses" décrites par CHARDARD. Il semble que ces divers types de vésicules s'incorporent au plasmalemme. On retrouve entre celui-ci et la paroi (flèche) du matériel fibrillaire qui pourrait être à l'origine du mucilage (mu) excrété par les pores. La paroi a atteint à ce stade son épaisseur maximale.

2 : x 25 000 env. - 3 : x 28 000 env.

Fig. 4 : Extrémité de l'hémisomate ancien d'un individu en conjugaison. La pellicule externe (pe) est très épaisse sauf au niveau des pores (po). Le cytoplasme du gamète en se contractant excrète des vésicules mucilagineuses (mu), fortement colorables au rouge de ruthénium sur le vivant, qui s'accumulent à l'extrémité du gamétocyste. Ce mucilage hydrophile gonfle et participe ainsi à l'expulsion du cytoplasme-gamète. x 20 000 env.

fixation : mélange glutaraldéhyde - acide osmique puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE X



PLANCHE XI : Aspects des papilles de conjugaison.

Fig. 9 : Individu au stade de préconjugaison. Coupe transversale de la papille de conjugaison. La paroi pecto-cellulosique (pp) se résout en une trame mucilagineuse (tm). Le cytoplasme est pauvre en mitochondries, en dictyosomes (d). Il renferme quelques globules osmiophiles (go), de nombreux ribosomes et des vésicules claires (v) de grande taille. x 9000 env.

Fig. 10 : Individus au stade de préconjugaison. Coupe longitudinale de deux papilles accolées. Les vésicules claires semblent confluer pour constituer une épaisse paroi festonnée. x 15 000 env.

Fig. 11 : Individus au stade de préconjugaison. Coupe longitudinale de deux papilles accolées. Le "tube de conjugaison" (tc) n'a pas de limite nette. La confluence des vésicules claires retenant entre elles des résidus opaques constitue un épais bouchon (c). Le cytoplasme de la papille (cyt) est remarquablement pauvre en inclusions autres que les ribosomes. Le plaste (pl) commence à pénétrer dans la papille. a : amidon. x 8000 env.

Fig. 12 : Détail de la figure précédente montrant l'organisation complexe de la trame fibreuse du "tube de conjugaison" (1) fibrilles en réseau ; (2) fibrilles à disposition rayonnante ; (3) fibrilles à disposition tangentielle ; c : couche à aspect de callose, mais de nature hémicellulosique (fluorescence au Calcofluor-white et non au bleu d'aniline) ; cyt : cytoplasme ; pl : plaste ; a : amidon. x 22 000 env.

fixation : mélange glutaraldéhyde - acide osmique puis acide osmique seul, à froid.

contraste : KMnO₄ en solution aqueuse à 1 % pour la fig. 10 ; acétate d'uranyle-citrate de plomb pour les autres figures.

PLANCHE XI



PLANCHE XII : Représentation schématique des papilles, de la vésicule de conjugaison et de la fusion des gamètes.

Fig. 1 : Les hémisomates néoformés émettent chacun une papille de conjugaison dont la paroi pecto-cellulosique (pp) est d'abord peu épaisse (partie en pointillé). Un abondant mucilage hydrophile, à structure fibrillaire, (smh : strate mucilagineuse hydratée), provenant peut-être en partie de la modification de la paroi de l'hémisomate, s'accumule entre cette paroi et la pellicule externe osmiophile (pe) qui se rompt. Le plaste (Pl), rempli d'amidon stromatique (a) dans lequel on n'a représenté que quelques thylakoïdes (th) et quelques plastoglobules (pg), fait saillie dans la papille ; il est souvent bordé de dictyosomes (d). Quelques globules osmiophiles (go), quelques mitochondries (m) et une grande densité de ribosomes (non figurés) s'y observent également. La partie apicale de la papille est dépourvue de toute inclusion autre que des vésicules à contenu généralement transparent aux électrons (v) mais dans lesquelles le hasard des fixations peut faire apparaître un contenu fibrillaire (f₁).

Fig. 2 : Les strates mucilagineuses hydratées en contact entremêlent leurs fibrilles et continuent de s'accroître, repoussant le mucilage sur les côtés. La cohésion des gamètes est ainsi assurée et la "vésicule de conjugaison (vc1) ainsi constituée n'a pas de limite nette (cette absence de limite nous fait exclure le terme de "tube de conjugaison", que nous avions employé de manière erronée dans la planche XI, au début de nos recherches). Les vésicules claires se rassemblent à l'extrémité de la papille pour former une épaisse couche réfringente (cr). Le hyaloplasme des papilles renferme d'abondants ribosomes (non figurés), et des globules osmiophiles. Les plastes (P1) remplis d'amidon (a) s'avancent dans les papilles.

Fig. 3 : Les vésicules mucilagineuses (mu) accumulées par les gamètes entre le plasmalemme et la paroi du gamétocyste (et qui n'ont été que partiellement figurées gonflent et repoussent les gamètes vers l'extérieur. La partie terminale des papilles se déplisse brusquement et se rompt. Quelques vésicules coalescentes (reste de cr) se retrouvent soit à proximité du gamétocyste soit dans la zone de contact entre les protoplastes-gamètes. Le mucilage fibreux (f2) de la vésicule de conjugaison est également entraîné et entoure les protoplastes de manière irrégulière. La fusion incomplète des protoplastes est figurée par un alignement de vésicules allongées. Chaque gamète renferme un noyau haploîde (N) à nucléole dense ; deux plastes (Pl) de forme variable remplis d'amidon (a), où les pyrénoïdes (Py) sont encore distincts et traversés de thylakoïdes (simplifiés sur ce schéma) ; des inclusions paracristallines intraplastidales (pc) sont fréquentes à ce stade. On observe en outre d'abondants globules osmiophiles (go), souvent à proximité de mitochondries (m), quelques dictyosomes (d) et une grande densité de ribosomes qui n'ont pas été figurés. Des vacuoles contractiles (vc2) à contour irrégulier servent à l'élimination de l'eau. Des vésicules "grises" (vg), proches du plasmalemme, participent probablement à l'élaboration de l'exospore, à la fois callosique et pecto-cellulosique.

PLANCHE XII



Fig.3

BIIS

3 9 µm

PLANCHE XIII : Conjugaison : sortie des gamètes.

Fig. 1 : Sortie d'un gamète. G : gamétocyste ; g : gamète ; mu : mucilage accumulé entre le plasmalemme et la paroi du gamétocyste ; co : couche osmiophile (= pellicule externe) caractéristique de la paroi du *Closterium* ; vc : reste de la vésicule de conjugaison. x 18 000 env.

Fig. 2 : Gamètes accolés. N : noyau ; nu : nucléole ; Pl : plaste ; Gl : globule lipidique intracytoplasmique ; vc : reste de la vésicule de conjugaison avec couche osmiophile rompue. x 9000 env.

fixation : mélange glytaraldéhyde - acide osmique puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul.
PLANCHE XIII



PLANCHE XIV : Conjugaison : accolement et fusion des gamètes.

Fig. 3 : Zone d'accolement des gamètes. Les flèches indiquent les vésicules correspondant aux plasmalemmes en voie de fusion. x 18 000 env.

Fig. 4 : Jeunes zygospores voisines séparées par les restes des vésicules de conjugaison (vc). La flèche indique une des vésicules de fusion de plasmalemmes. P : formation paracristalline intraplastidale. x 18 000 env.

fixation : mélange glutaraldéhyde - acide osmique puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE XIV



alls une PLANCHE XV : Jeunes zygospores : formation de l'exospore callosique.

Fig. 5 et 6 : Zygospores âgées de 6 heures environ. vc : reste de la vésicule de conjugaison mucilagineuse ; c : exospore callosique ; ve : vésicule à contenu dense ; Pl : plaste ; vac : vacuole contractile. x 18 000 env.

Fig. 7 : Zygospore âgée de 24 heures. G : reste du gamétocyste avec paroi P percée de pores de l'hémisomate ancien et paroi p apparemment sans pores de l'hémisomate néformé ; vc : reste de la vésicule de conjugaison ; c : exospore callosique d'épaisseur variable. x 10 800 env.

PLANCHE XV



PLANCHE XVI : Jeunes zygospores : mise en place de la mésospore sporopollénique.

Fig. 8 : Zygospore âgée de 40 heures environ. vc : vésicule de conjugaison ; c : exospore callosique ; me : début de la mise en place de la mésospore sporopollénique avec lamelle sporopollénique à structure tripartite (flèche). x 18 000 env.

Fig. 9 et 10 : Zygospores âgées de 48 heures environ. La première couche de sporopollénine est formée par la juxtaposition d'éléments à structure tripartite. x 18 000 env.

fixation : mélange glutaraldéhyde - acide osmique puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul.

PLANCHE XVI



PLANCHE XVII : Zygospores âgées de 48 heures environ.

Fig. 11 : G : gamétocyste ; co : restes de couche osmiophile (pellicule externe) ; vc : vésicule de conjugaison ; c : exospore callosique ; me : mésospore sporopollénique en voie d'élaboration. x 18 000 env.

Fig. 12 : Dans l'une, un des noyaux est visible avec un volumineux nucléole. Trois des plastes peuvent être discernés. Les globules lipidiques intracytoplasmiques sont rassemblés à l'un des pôles. x 5000 env.

PLANCHE XVII



· · · · ·

PLANCHE XVIII : Divers aspects de la structure pariétale du zygote mûr quiescent ou réactivé par la lumière.

Fig. 1 : Zygospore mûre réactivée sur place par une exposition de 2 heures à la lumière. me : mésospore avec ses différentes couches : a) couche polysaccharidique externe ; b) couche sporopollénique externe ; c) couche polysaccharidique moyenne à fibrilles entrecroisées ; d) couche sporopollénique interne ; e) couche plus interne à fibrilles en réseau ; E : endospore montrant une partie interne très désorganisée. x 36 000.

Fig. 2 : Détail de la mésospore d'une zygospore quiescente âgée. x 75 000. Les couches a, b, c, d, e sont commentées en 1.

Fig. 3 : Jeune zygospore. De l'extérieur vers l'intérieur : co : couche osmiophile ;
vc : vésicule de conjugaison ; ex : exospore ; me : mésospore sporopollénique ;
E : endospore stratifiée. x 11 000.

Fig. 4 : Zygospore quiescente très âgée. Pour les éléments de la paroi, mêmes abbréviations que sur les figures précédentes. S : sphérosomes. x 33 000.

Fig. 5 : Jeune zygospore quiescente. vc : vésicule de conjugaison ; ex : exospore callosique ; me : mésospore ; E : endospore stratifiée. x 42 000.

Fig. 6 : Zone à déchets (zd), située entre le plasmalemme (pl) et l'endospore (E). S : sphérosome. x 18 000.

Photos de Michel ABADIE. Le détail des fixations est donné dans le texte.

PLANCHE XVIII



PLANCHE XIX : Coupes réalisées sur des zygospores quiescentes très âgées, conservées à l'obscurité.

Fig. 1 : Détail du cytoplasme. th : thylakoïde ; S : sphérosome. x 60 000.

Fig. 2 : Globules protéiques (gp), autour desquels on peut apercevoir la membrane unitaire limitante (flèches). am : amidon. x 40 000.

Fig. 3 : Aspect des sphérosomes S après une extraction partielle par le D.M.S.O. x 22 000.

Fig. 4 : Détail de l'accolement des "half-unit membranes" (hu), de deux sphérosomes **S** contigus. x 90 000.

Fig. 5 : Détail du contenu cytoplasmique profond. mi : mitochondrie quiescente (flèche) ; th : thylakoïdes. x 36 000.

Fig. 6 : Aspect de la zone spongieuse révélée à proximité d'un plaste (P). am : amidon ; flèches : zone gazogène. x 20 000.

Fig. 7 : Inclusion paracristalline intraplastidale (pc). x 20 000.

Fig. 8 : Détail d'un plaste à l'intérieur d'un zygote âgé. Cp : corps prolamellaire ; g : globule chromophore ; pf : phytoferritine (flèches) ; pc : inclusion paracristalline. x 20 000.

Photos de Michel ABADIE.

PLANCHE XIX



PLANCHE XX : Coupes réalisées à partir de zygospores réactivées sur place par une exposition de 2 heures à la lumière.

Fig. 1 : Aspect général d'une zygospore. Plaste (P) entouré d'amidon (am). x 4000.

Fig. 2 : Pyrénoïde (Py) traversé par les thylakoïdes (th) et entouré d'amidon (am). Le stroma renferme des inclusions paracristallines (pc). x 22 000.

Fig. 3 : Pyrénoïde (Py), entouré d'amidon (am). x 11 000.

Fig. 4 : Formation des thylakoïdes à partir des vésicules (vs) du corps prolamellaire. x 40 000.

Fig. 5 : Aspect festonné du plasmalemme (pl) et enroulements myéliniques (em), développés entre le plasmalemme et l'endospore (E). Des thylakoïdes (th) sont très proches du plasmalemme. x 22 000.

Fig. 6 : Détail du cytoplasme à proximité d'un plaste (P). cpr : corps protéique ; S : sphérosome dégradé ; am : amidon dégradé ; D : dictyosome. x 36 000.

Photos de Michel ABADIE.

PLANCHE XX



.

PLANCHE XXI : Germination des zygospores réhydratées.

Fig. 1 et 2 : Stades de la germination des zygospores observés en microscopie photonique. a : stade 2 plastes verts ; b : sortie de la vésicule de germination par gonflement ; c : vésicule de germination libérée ; d : stade 2 gones orthogonaux ; e : stade 2 gones parallèles. x 200 env.

Fig. 3 et 4 : Stade 2 plastes verts, après 24 heures de réhydratation à la lumière, observations en microscopie électronique. La paroi, constituée par 3 couches principales (ex : exospore, me : mésospore limitée par deux couches de sporopollénine, en : endospore cellulosique) se décolle du cytoplasme ; la partie interne de l'endospore et une épaisse couche osmiophile (co) demeurent accolées au cytoplasme très dense dans lequel on peut distinguer un noyau (N), de nombreux globules osmiophiles (go) et des vacuoles (v) résultant de la réhydratation des globules protéiques, parfois entourées d'enroulements membranaires (flèches en 3). 3 : 10 000 env. ; 4 : x 5000 env.

Fig. 5 : Détail de l'enveloppe de la zygospore vidée ; un décollement (flèche) s'observe également entre exospore et mésospore. x 6000 env.

Fig. 6 : Zygospore vide montrant la fente de déhiscence (f) bordée de dents arrondies. x 1000 env.

> fixation concernant cette planche et les suivantes : mélange glutaraldéhyde - acide osmique, puis acide osmique seul, à froid.

contraste : acétate d'uranyle seul en solution aqueuse saturée.

PLANCHE XXI



.

PLANCHE XXII : Vésicule de germination.

Fig. 7 : Pl : plaste avec amidon (a) ; v : vacuole ; vc : vacuole contractile ; go : globules osmiophiles refoulés vers la périphérie par les vacuoles. x 2300 env.

Fig. 8 : noyau de fusion (N) à 2 nucléoles (nu) avec enveloppe nucléaire (en) bien distincte. x 12 000 env.

Fig. 9 : noyau en préprophase de méiose. x 4000 env.

Fig. 10 : noyau en prophase de méiose avec individualisation des chromosomes (chr) et nucléole (nu) montrant une partie dense homogène et une partie à structure filamenteuse enroulée. L'enveloppe nucléaire (en) commence à se désorganiser. x 6000 env.

PLANCHE XXII



ULLE

PLANCHE XXIII : Méiose et formation des jeunes individus.

Fig. 11 : Vésicule de germination, métaphase II vue de profil ; Pl : plaste avec amidon (a) et structure paracristalline intraplastidale (cr). Globules osmiophiles (go) dans le cytoplasme. x 4000 env.

Fig. 12 : Métaphase II : chromosomes à cinétochore (ci) diffus relié à des microtubules (mi). x 10 000 env.

Fig. 13 : Coupe longitudinale de jeune individu à 1 plaste et 2 noyaux.
N : noyau définitif dont le nucléole (nu) présente des structures enroulées ;
n : nucléole du noyau en dégénérescence ; v : vacuole à contenu dense ; Pl : plaste avec amidon (a) ; go : globule osmiophile intracytoplasmique. x 8000 env.

Fig. 14 : Coupe transversale de jeunes individus encore enfermés dans la vésicule de germination (ves). Les abbréviations sont les mêmes que pour les figures précédentes. Des dictyosomes (D) sont souvent accolés aux expansions du plaste. x 4000 env.

PLANCHE XXIII



PLANCHE XXIV : Particularités cytoplasmiques des jeunes individus (en coupes longitudinales).

Fig. 15 : Coexistence d'un pyrénoïde typique (py) (venant de subir une bipartition ?) et d'une structure paracristalline (cr) intraplastidale, analogue à un "stromacentre". L'amidon (a) est surtout localisé autour du pyrénoïde. Les globules osmiophiles (go) intracytoplasmiques se retrouveront dans toutes les figures de cette planche. x 12 000 env.

Fig. 16 : Autre aspect de structure paracristalline intraplastidale, non associée à un pyrénoïde. x 20 000 env.

Fig. 17 : Présence dans le cytoplasme, à côté des globules osmiophiles (go), de structures analogues aux glyoxysomes (gl) et de mitochondries (m), autour d'une vacuole (v). Les dictyosomes (D) sont accolés au plaste (Pl). La paroi montre une pellicule externe osmiophile (pe) discontinue et une paroi mince, qui semble dépourvue de pores. x 13 000 env.

Fig. 18 : Bipartition du plaste : Pl. x 3600 env.

Fig. 19 : Détail de la figure précédente. Le noyau (N) s'enfonce comme un coin entre les deux parties du plaste (Pl). Des microtubules (flèches) semblent border le plaste au niveau de la bipartition. x 15 000 env.

PLANCHE XXIV



(HUS)

TROISIEME PARTIE.

Influence des facteurs externes sur la sexualisation.

CHAPTTRE	Τ	:	Le	milieu	de	culture.
	_	•		111000000	0.0	

I.1 COMPOSITION DU MILIEU	73
I.2 INFLUENCE DU pH	76
I.3 INFLUENCE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE	
1.3.1 Effet de l'addition de glucose	77
1.3.2 Effet de l'addition d'acétate de sodium	80
I.4 INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE	81
I.5 INFLUENCE DE LA TENEUR EN NITRATE	85
I.6 INFLUENCE DE SUBSTANCES INHIBITRICES DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS	91
CHAPITRE II : La température. CHAPITRE III : L'éclairement.	
III.1 INTRODUCTION : Etat actuel des connaissances sur le rôle de la lumière dans la reproduction des Algues	99
III.1.1 Influence de l'intensité de l'éclairement et de la quantité totale d'énergie fournie	100
III.1.2 Influence de la qualité de la lumière fournie	102

<i>III.1.3</i>	Influence	de	la longu	eur relative	des périod	les d'éclai-	
•	rement et	d ' 0	bscurité	(photopériod	lisme)	, 	103

SII.2 EXPERIENCES EFFECTUEES EN LUMIERE BLANCHE

	III.2.1 Influence de la longueur de l'héméropériode	106
	III.2.2 Influence de l'intensité de l'éclairement	108
	III.2.3 Influence du temps d'exposition aux conditions photo- inductrices et du moment d'application. Intervention de l'autoantagonisme	109
	III.2.4 Lumière et synchronisation des cultures	112
	III.2.5 Influence de la composition`spectrale de la lumière blanche fournie	113
III.3	EXPERIENCES EFFECTUEES EN LUMIERE MONOCHROMATIQUE	
	III.3.1 Lumières approximativement monochromatiques	115
	a) lumière monochromatique continue	116
	b) lumière monochromatique 18 h : $\overline{6}$ h	116
	c) en appoint de longue durée (6 h) à une période d'éclairement blanc de 12 heures, à 20°C	116
	d) en appoint de longue durée (6 h) à une période d'éclairement blanc de 12 heures, à 10°C	117
	e) en appoint de courte durée (15 mn) à une période d'éclairement blanc de 14 heures, à 20°C	117
	g) interruption de nuits longues critiques par des éclairements "rouge clair" ou "rouge sombre"	120
	III.3.2 Lumières rigoureusement monochromatiques	
	a) éclairements monochromatiques seuls	122
	b) éclairements monochromatiques d'appoint à une période trophique fournie en lumière blanche	125
	c) interruption de longues périodes obscures par de brefs éclairements monochromatiques	127
·	d) essai de dissociation des rôles respectifs de la photosynthèse et du photopériodisme dans la sexualisation	129
	III.3.3 Discussion des résultats. Conclusion de la troisième part	ie
	a) effet des radiations monochromatiques sur la multi- plication végétative	132
	b) effet des radiations monochromatiques sur la sexualisation. Rôle éventuel du phytochrome	
	- nécessité d'un "minimum trophique" important	132
	– la photosynthèse n'est pas seule en cause	133
	- il s'agit probablement d'une plante "de jour long"	134
	- quel serait le pigment responsable ?	136

TABLEAUX relatifs à la troisième partie.

88

89

97

TABLEAU I :

TABLEAU 2 :

Pourcentage de colonies sexuelles dans une souche non axénique en fonction de la teneur en azote du milieu

TABLEAU 3 :

Pourcentage de colonies sexuelles dans une souche axénique en fonction de la teneur en azote du milieu

TABLEAU 4 :

Réponse sexuelle en fonction de la température et de la longueur de l'héméropériode

TABLEAUX NON NUMEROTES - p. 118 - 119 - 121.

Réponses sexuelles en fonction des interruptions de longues nyctipériodes par des éclairements blancs ou monochromatiques. TROISIEME PARTIE : INFLUENCE des FACTEURS EXTERNES sur la SEXUALISATION.

CHAPITRE I: Le MILIEU de CULTURE.

Le but de l'expérimentation étant d'obtenir la sexualisation, nous n'avons pas cherché de formule inédite de milieu de culture mais choisi et adapté, parmi ceux qui existaient, celui qui permet d'obtenir pour cette espèce, une multiplication rapide (1 division/48 h.), une morphogénèse normale et une sexualisation satisfaisante.

I.1 - COMPOSITION DU MILIEU.

Les Desmidiées sont des organismes fondamentalement autotrophes, et l'addition de substances organiques à un milieu de culture constitué de solutions minérales n'est pas théoriquement nécessaire.

La plupart des milieux convenant aux Desmidiées (repris par STARR, 1964) renferment de l'extrait de terre, ou sont placés au-dessus d'une couche de terre qui garnit le fond du récipient de culture. Ils sont peu commodes à préparer et à manipuler ; leur composition non définie varie avec la provenance de la terre. Nous avons rapidement abandonné les essais avec ce type de substrat pour n'utiliser que des milieux synthétiques. Le plus favorable à la multiplication des espèces que nous avons isolées s'est révélé être le milieu de WARIS (1953) amélioré par WARIS et ROUHIAINEN (1970).

Composition du milieu de WARIS (1953) que nous avons utilisé dans les expériences préliminaires sur l'action de la température et de la lumière, et ensuite dans les expériences sur l'action de la carence en nitrate.

A 1000 ml d'eau distillée on ajoute 1 ml des solutions mères suivantes :

	KNO3	10 %	soit	1.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
-	MgSO ₄ ,7H ₂ O	2 %		0,08.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
-	(NH ₄) ₂ H PO ₄	2 %		0,16.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
	CaSO ₄	5 %	-	0,36.10 ⁻³ M.1 ⁻¹

- Chélate de fer préparé comme suit :

.Na ₂ -EDTA	2,61 g	.0,013.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
.FeSO4,7H20	2,49 g	0,017.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
.KOH 1N	27 ml	0,053.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
.H ₂ 0	500 ml	

Composition du milieu de WARIS et ROUHIAINEN (1970) servant essentiellement à l'entretien des souches. Par litre de milieu, il comporte :

- macro-é	léments :		
- KNO3	0,100 g	soit	1,00.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
- (NH4)2HPO4	0,010 g		0,07.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	0,010 g		0,07.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
- MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,020 g		0,08.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
$- Ca(NO_3)_2, 4H_2O$	0,050 g		0,21.10 ⁻³ M.1-1
- FeSO ₄ ,7H ₂ O	0,005 g		0,017.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
- $MnSO_4, 4H_2O$	0,001 g		0,004.10 ⁻³ M.1 ⁻¹
- Na ₂ -EDTA	0,0083 g		0,02.10 ⁻³ M.1 ⁻¹

- oligo-éléments :

- H ₃ BO ₃	0,010.10 ⁻³ g	soit	0,16.10 ⁻⁶ M.1 ⁻¹
- ZnSO4,7H ₂ O	0,010.10 ⁻³ g		0,03.10 ⁻⁶ M.1-1
- CuSO4,5H ₂ O	0,003.10 ⁻³ g		1.10 ⁻⁹ M.1 ⁻¹
- CoSO4,7H2O	0,0001.10 ⁻³ g		0,3.10 ⁻⁹ M.1 ⁻¹
- (NH4)6M07024,4H20	0,015.10 ⁻³ g		1.10 ⁻⁹ M.1 ⁻¹
- KI	0,0005.10 ⁻³ g		3.10 ⁻⁹ M.1 ⁻¹

Le pH est ramené à 5,4 par addition de HCl décinormal avant autoclavage. Pour éviter l'hydrolyse de la gélose, le milieu nutritif liquide à double concentration et la suspension de gélose sont autoclavés séparément, 20 mn à 120°C, et mélangés au moment du remplissage des boîtes de Pétri.

La gélose apporte aux Algues une quantité non négligeable d'éléments minéraux dissous qui s'ajoutent à ceux du milieu nutritif liquide. MILLER (1956) trouve dans l'eau de gélose (Difco Bacto Agar), en p.p.m :

- potassium 0	- manganèse O
- calcium 120	- fer 2
- magnésium 24	- aluminium 3,8
- phosphore 8	- cuivre 0,08
- sodium 20	- bore 2,6

Ces milieux se sont révélés satisfaisants pour les colonies non axéniques qui peuvent y végéter jusqu'à 1 an en lumière atténuée et à basse température. Cependant, la croissance des colonies axéniques y est moins rapide, et les cellules n'y survivent qu'un mois environ, ce qui nécessite de fréquents repiquages. Ces inconvénients disparaissent si l'on ajoute au milieu de l'extrait de Levure (Difco Yeast Extract, 0,5 g.l⁻¹), dont l'action bénéfique sur la croissance et la longévité des cultures d'Algues d'eau douce a été mise en évidence par FUSEY (1947).

Chez cette espèce de Closterium, l'addition de vitamine B 12 au milieu de culture, préconisée par HILL et MACHLIS (1970) pour Oedogonium cardiacum et par TASSIGNY (1971b) pour de nombreuses Desmidiées n'est pas indispensable. D'autres espèces que nous cultivons (C. rostratum, C. venus, C. acutum) nécessitent pour sexualiser l'addition de 1 μ g.l⁻¹ de vitamine B 12. TASSIGNY signale d'ailleurs que "les besoins en vitamine B 12 sont caractéristiques de chaque souche et non de chaque espèce correspondante. Ces besoins peuvent varier lorsque les souches sont conservées longtemps en culture".

I.2 - INFLUENCE DU PH.

Les premiers essais ont été effectués sur des souches non axéniques, en milieu liquide, par addition de HCl 0,01 N ou de KOH 0,01 N, avant la stérilisation.

Des pH très bas, < 4, essayés pour éliminer les Bactéries par la méthode de LACOSTE (1965) provoquent la mort des cellules en moins de 48 h. La multiplication est nulle ; le plaste se désorganise et les Bactéries persistent.

Au-delà de pH 7, les Bactéries se développent excessivement et inhibent la division des *Closterium*. Les cultures axéniques supportent mieux les élévations de pH. Entre pH 7 et pH 8 elles se multiplient encore normalement mais la durée de survie de la culture est réduite à 3 semaines environ.

Une gamme de pH de 0,5 en 0,5 entre 5 et 7 ne montre pas de différences dans la vitesse de multiplication, l'aspect des cellules et l'aptitude à sexualiser. Nous avons choisi pH 5,4 pour les milieux de routine parce que c'était celui de la mare d'origine à l'emplacement du prélèvement. Cette relative indifférence au pH se retrouve dans la reproduction sexuelle du *Pandorina unicocca* étudié par RAYBURN (1974), et LIPPERT (1973) la confirme pour *Closterium moniliferum* et C. *ehrenbergii* qui peuvent selon lui sexualiser entre pH 4 et pH 9, l'optimum se situant entre pH 5,5 et pH 7,2. La souche que nous étudions paraît plus sensible à l'alcalinisation du milieu que celle de LIPPERT. L'espèce C. moniliferum comporte probablement une gamme d'écotypes adaptés à des milieux plus ou moins acides ou alcalins.

I.3 - INFLUENCE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE.

I.3.1 Effet de l'addition de glucose :

1, 2, 5, 10 et 20 g.l⁻¹ de glucose ont été ajoutés au milieu de Waris gélosé. La stérilisation a été effectuée à 110°C. Seules des cultures axéniques ont été utilisées, avec addition d'extrait de Levure (0,5 g.l⁻¹).

Les cultures placées à l'obscurité montrent au plus une bipartition puis stagnent sans se développer. Le glucose ne permet donc pas une croissance hétérotrophe.

A la lumière, en ce qui concerne la multiplication végétative, on n'observe pas de différence significative entre la croissance sur milieu témoin dépourvu de glucose et sur milieu additionné de glucose à 1,2 ou 5 g.l⁻¹. Il y a une bipartition par 48 h. environ et les cellules ont une morphologie normale. Pour 10 et 20 g.l⁻¹ les cellules subissent 2 à 3 bipartitions puis cessent de se multiplier ; leur morphologie est profondément modifiée:elles deviennent courtes, présentent un aspect granuleux et sont bourrées de lipides et d'amidon. Elles se désorganisent et meurent après 1 ou 2 semaines. MORQUER (1931) signale chez le Champignon *Dactylium macrosporum* le même phénomène de raccourcissement des cellules sous l'effet de concentrations croissantes.

En ce qui concerne la sexualisation, l'addition de glucose au milieu provoque des modifications par rapport aux réponses obtenues avec le milieu témoin. En conditions normalement non inductrices (lumière blanche grolux 12 h. obscurité 12 h.^{*}, intensité de l'éclairement 2500 lux, à 20°C) ni les témoins sans glucose ni les cultures sur milieu enrichi en glucose ne sexualisent même après 10 jours de culture.

En conditions normalement inductrices (lumière blanche grolux $18 : \overline{6}$ h., intensité de l'éclairement 2500 lux à 20°C) les témoins montrent des cellules appariées dans 60 % des colonies à partir du 5ème cycle de culture. La présence d'une faible quantité de glucose, 1, 2 ou 5 g.l⁻¹, n'inhibe pas les appariements ; 50 % au moins des colonies en montrent après 10 jours de culture, mais les conjugaisons sont anormales pour 5 g.l⁻¹ et n'aboutissent pas toujours au stade zygospore, car les gamètes éclatent sur le milieu gélosé au moment de leur sortie.

Les concentrations 10 et 20 g.l⁻¹ sont inhibitrices pour la sexualisation, comme pour la multiplication végétative : bien que les cellules remplies de réserves ressemblent morphologiquement à celles qui sont sexuellement induites, on n'observe que de rares appariements (< 5 % du total des cellules) et aucune zygospore n'est formée. L'antagonisme entre multiplication végétative et reproduction sexuée ne se manifeste aucunement dans ce cas.

Le graphique de la figure 4 résume les résultats de 3 expériences. Ont été considérées comme colonies sexuelles celles qui présentaient au moins un couple de cellules appariées après 10 jours de culture. L'élévation apparente du taux de sexualisation pour 1 g.l⁻¹ n'est pas significative puisque la sexualisation des témoins peut varier de 50 à 70 % et n'est pas constante d'une expérience à l'autre.

En conclusion, l'addition de glucose au milieu de culture ne peut remplacer l'éclairement et ne permet pas de raccourcir la longueur des photopériodes inductrices. Dans les conditions de lumière inductrice une teneur en glucose croissante jusqu'à 5 g.l⁻¹ n'a pas d'effet sur l'induction sexuelle mais elle empêche le processus de formation des zygospores. A partir de 10 g.l⁻¹ le glucose est inhibiteur à la fois pour la multiplication végétative et la sexualisation. Il faut remarquer que pour 5 g.l⁻¹ on observe une dissociation entre l'effet sur

Plus loin nous abrégeons selon le symbole 12 : $\overline{12}$ h, le trait horizontal supérieur indiquant la durée de la période obscure. l'induction sexuelle (appariement, émission des papilles de conjugaison) qui est faible, et la réalisation effective de zygospores qui est fortement inhibée.



Fig.4 _ Influence de la teneur en glucose sur la sexualisation du C. moniliferum .

Ces résultats concordent en partie avec ceux de BIEBEL (1973) étudiant la sexualisation de *Cylindrocystis brebissonii*, en milieu liquide. Il observe des lyses fréquentes pendant la conjugaison et les attribue à la nature hypotonique du milieu minéral. L'addition de glucose 0,28 M (50,4 g.l⁻¹) au milieu dépourvu de nitrate ne permet cependant aucun appariement. L'addition de glucose 0,14 M (25 g.l⁻¹) permet l'appariement et l'initiation de la papille de conjugaison mais pas la formation du tube de conjugaison. L'addition de glucose 0,07 M (12,5 g.l⁻¹) permet la formation de paires qui ne fusionnent pas complètement. BIEBEL pense que le phénomène de lyse est dû partiellement à une cause métabolique et partiellement à une cause osmotique. Nous reviendrons sur ce sujet p. 81. Remarquons cependant, que les concentrations utilisées sont beaucoup plus importantes que celles que tolère la souche de C. moniligerum que nous étudions.

I.3.2 Effet de l'addition d'acétate de sodium :

De nombreuses Algues vertes (Chlorella, Euglena, Chlamydomonas, Gonium, etc...) peuvent se comporter en hétérotrophes et utiliser à l'obscurité le lactate ou l'acétate de sodium. NEILSON et al. (1973) insistent sur le fait que ces substances doivent être ajoutées en faible quantité au milieu. Nous avons ajouté au milieu de Waris additionné d'extrait de levure à 0,5 g.l⁻¹ des quantités variables de CH₃COONa, 3H₂O. La stérilisation a été effectuée à 110°C. Le pH a été ajusté avant la stérilisation à la valeur 5,4 par addition d'acide acétique. Il a été vérifié à la fin de l'expérience.

Les concentrations suivantes ont été essayées : 0,01 % (0,7 mM.l⁻¹) ; 0,02 % ; 0,05 % ; 0,1 % (7 mM.l⁻¹) dans les 3 conditions : obscurité ; lumière grolux 18 h : $\overline{0}$ h ; lumière grolux 12 h : $\overline{12}$ h, à 20°C, avec une intensité d'éclairement de 2500 lux environ.

A l'obscurité on n'observe aucune multiplication, ni sur le milieu témoin ni sur les milieux contenant l'acétate de sodium. Après 5 cycles de 24 h., il n'y a pas de décoloration des plastes mais ils présentent un aspect réticulé. Après 10 cycles de 24 h., on observe pour les concentrations 0,01 % et 0,02 % une bipartition des plastes sans division cellulaire.

A la lumière, les concentrations 0,05 % et 0,1 % sont toxiques. Elles empêchent complètement la multiplication et provoquent la décoloration complète des cellules après 5 cycles de 24 h. Les concentrations 0,02 % et 0,01 % permettent un début de multiplication : les colonies sont respectivement aux stades 2 et 4 cellules, alors que les témoins sont au stade 8 cellules après 5 cycles de 24 h., et présentent les premiers signes de sexualisation lorsque les cultures sont éclairées 18 h sur 24. Après 10 cycles de 24 h. (18 : 6 h), les cultures sur milieu contenant 0,01 % d'acétate de sodium montrent les premières cellules sexuelles. Le milieu contenant 0,02 % d'acétate de sodium ne permet pas la multiplication au-delà du stade 4 cellules, bien que celles-ci demeurent vertes et apparemment normales.

Sur un milieu contenant une faible quantité d'acétate, de l'ordre de 0,01 %, l'Algue peut se multiplier et sexualiser avec un retard de 5 cycles environ par rapport aux témoins placés dans les mêmes conditions photo-inductrices. L'addition de ce composé organique ne stimule pas la multiplication ni la sexualisation mais les retarde sans les inhiber.

Il semble que *Closterium moniliferum* soit une Algue complètement photoautotrophe qui peut s'adapter dans une faible mesure à l'enrichissement du milieu en composés organiques. Ces conditions se trouvent d'ailleurs rarement dans la nature, la plupart des Desmidiées vivant dans des milieux oligotrophes, pauvres en matière organique assimilable.

Peut être peut-on opposer l'action de l'acétate de sodium chez cette Algue, strictement autotrophe, qui n'en tolère que de faibles quantités, et chez le Champignon *Leptosphaeria typhae*, végétal hétérotrophe, où VIALA et VIDAL (1972) ont montré que l'addition d'acétate au milieu active la croissance végétative et inhibe la sexualisation. Rien de tel ici où multiplication végétative active et sexualisation semblent aller de pair.

I.4 - INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE.

A la suite des observations sur les effets de l'addition de glucose au milieu de culture nous avons voulu vérifier si les accidents de conjugaison observés pouvaient provenir de l'élévation de pression osmotique du milieu extérieur (hypothèse inverse de celle de BIEBEL).

Nous avons ajouté au milieu de Waris additionné de Bacto Agar Difco à 15 g.l⁻¹ du mannitol dont le poids moléculaire (182) est très voisin de celui du glucose, mais qui n'est pas absorbé par les cellules["], aux concentrations

^{*} Lorsque les cellules sont plongées dans une solution plasmolysante de mannitol (0,33 M.l⁻¹) pendant 6 h., aucune déplasmolyse ne se produit. Placées dans une solution de glucose à la même concentration, les cellules présentent d'abord une plasmolyse nette, puis une déplasmolyse après un temps qui varie de 15 à 30 mm pour 10 % des cellules environ.

suivantes : 0,1'; 0,2 ; 0,5 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 g.1⁻¹. Les mêmes conditions d'éclairement et de température que dans l'expérience précédente avec le glucose ont été utilisées.

En-dessous de 0,5 g.l⁻¹ l'induction sexuelle et la formation de zygospores sont identiques à celles des témoins qui montrent environ 56 % de colonies sexuelles après 7 cycles photopériodiques 18 : 6.

A partir de 0,5 g.1⁻¹ l'induction sexuelle persiste. Pour 0,5 g.1⁻¹ on observe (moyenne de 3 expériences) 42 % de colonies sexuelles ; pour 2 g.1⁻¹ : 43 % ; pour 5 g.1⁻¹ : 41 %. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles fournies par les témoins sans mannitol. Mais aucune des conjugaisons n'aboutit à la formation de zygospores : le contenu des gamètes se lyse et se répand sur la gélose. Un faible nombre de conjugaisons aboutit à la formation de zygospores non sphériques munies de deux expansions arrondies (Fig. 5).



Figure 5 : Anomalies observées dans une culture axénique sur milieu de Waris additionné de mannitol (0,5 à 20 g. l^{-1}).

- a) l'appariement a lieu normalement
- b) la mitose préconjugale a lieu normalement
- c) les papilles de conjugaison se forment, mais pour 20 g.l⁻¹ il n'y a pas de vésicule de conjugaison mucilagineuse
- d) cas le plus fréquent : lyse des gamètes au moment de leur expulsion. Les zygospores ne se forment pas
- e) cas peu fréquent : les rares zygotes présentent des formes atypiques dues à la sortie incomplète des gamètes.
La concentration 10 g.l⁻¹ provoque la formation de cellules denses. Après 7 cycles de culture, les colonies sont au stade 4 ou 8 cellules, accolées en pseudo-appariements. Aucune zygospore n'est formée bien que 12 % environ des colonies montrent des conjugaisons avortées.

La concentrations 20 g.l⁻¹ provoque l'aspect morphologique le plus atypique : les colonies sont au stade 4 cellules accolées, à contenu dense, vert foncé, après 7 cycles de culture. Un très faible nombre (< 1 %) sexualise. Les conjugaisons montrent avant d'avorter des phénomènes nets de plasmolyse et aucun mucilage ne peut être mis en évidence au niveau de ce qui serait normalement l'emplacement d'une vésicule de conjugaison.

Le tableau 1 résume l'influence de la pression osmotique du milieu sur la sexualisation. Les pressions osmotiques ont été calculées de manière approximative, pour le milieu par la formule donnée par MORQUER (1931), pour les cellules par la méthode de plasmolyse limite, en utilisant des solutions de concentrations connues de glucose et de NaCl.

Type de milieu	Pressions approxima atmosp	osmotiques tives en hères	Réponse sexuelle			
	dans le milieu	dans les cellules	induction sexuelle	formation de zygospores		
milieu de Waris	0,5	6	+	+		
additionné de mannitol						
0,1 g.1 ⁻¹ (0,0005 M.1 ⁻¹)	0,57	6	÷	+		
0,5 g.1 ⁻¹ (0,003 M.1 ⁻¹)	0,64	8	+ ·	+		
2 g.1 ⁻¹ (0,011 M.1 ⁻¹)	0,78	10	+	-		
5 g.1 ⁻¹ (0,027 M.1 ⁻¹)	1,2	10	+	-		
10 g.1 ⁻¹ (0,054 M.1 ⁻¹)	1,9	12	+	-		
20 g.1 ⁻¹ (0,11 M.1 ⁻¹)	3,3	14	-	-		

Tableau 1 : Relation entre la pression osmotique du milieu additionné de mannitol, la pression osmotique des cellules du C. moniliferum et leur réponse sexuelle après 7 cycles d'éclairement 18 : 6 h, 2500 lux, à 20°C. D'après KREBS (1952) la pression osmotique intracellulaire des Desmidiées varie de 6 à 9 atmosphères. Celle que nous observons sur milieu de Waris seul est donc "normale", bien que légèrement supérieure à celle des jeunes zygospores de *Micrasterias papillifera* dont KIES (1968) évalue la pression osmotique à 4 atmosphères environ, en milieu liquide.

Bien que la concentration la plus élevée utilisée ici (20 g.l⁻¹) soit très inférieure à celle qui provoque chez les cellules sexuelles cultivées sur milieu normal une plasmolyse commençante (0,25 à 0,3 M, environ 45 g.l⁻¹) son influence sur la pression osmotique intracellulaire après 7 jours de culture est indéniable.

Pour les concentrations inférieures à 10 g.l⁻¹ qui n'inhibent pas la multiplication cellulaire, la pression osmotique du milieu extérieur n'empêche pas l'induction sexuelle mais elle perturbe le déroulement normal de la conjugaison. C'est au moment de la formation de la "vésicule de conjugaison", constituée de mucilages fortement hydrophiles, que cette influence se manifeste, empêchant la sortie et la fusion normale des gamètes.

Au-delà de la concentration 10 g.l⁻¹, la multiplication cellulaire étant inhibée il paraît presque normal que l'induction sexuelle le soit aussi puisque nous avons montré qu'elle ne pouvait se manifester que sur des colonies jeunes, en phase exponentielle de croissance.

Il est probable que dans le cas de l'addition de glucose au milieu, jusqu'à 2 g.1⁻¹, la pénétration modérée de cette substance dans les cellules équilibre d'une certaine manière le rôle défavorable de la pression osmotique trop élevée du milieu extérieur, permettant la formation de zygospores. A partir de 5 g.1⁻¹ on constate les mêmes accidents de conjugaison qu'avec le mannitol.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux de BIEBEL (1973) qui constate que l'addition de mannitol (0,07 M), soit environ 13 g.l⁻¹, réduit la lyse des gamètes sans affecter apparemment le processus de conjugaison chez Cylindrocystis brebissonii.

Le rôle de l'assèchement du milieu sur l'induction sexuelle chez les Algues a parfois été évoqué (COMERE, 1906). Il a été mis en relation avec

l'augmentation de la teneur en lipides chez les Diatomées d'eau douce (EVANS, 1959a et b). Dans le cas du *Closterium moniliferum* toutes les cellules cultivées sur milieu additionné de glucose ou de mannitol à 20 g.1⁻¹ présentent, pourvu que l'éclairement soit suffisant, une morphologie parasexuelle, avec une grande abondance d'amidon et de globules lipidiques jaunes extraplastidaux. Cependant, très peu d'entre elles s'apparient réellement. L'assèchement "physiologique" du milieu ne peut être considéré, pour cette espèce, comme un facteur inducteur de sexualisation.

A l'époque où la mare de Wardrecques d'où provient notre souche existait encore, nous n'y avons pas effectué d'analyses d'eau. Ensuite, la mare a été comblée. Cependant, si l'on calcule la pression osmotique d'un milieu analogue, favorable à la multiplication des Desmidiées (d'après des analyses non publiées d'E. DELAHAYE concernant la "tourbière" du Mont des Bruyères à Saint-Amand), celle-ci se révèle extrêmement faible (0,067 atmosphères), 10 fois plus faible que celle du milieu de Waris. Nous n'avons malheureusement aucune donnée sur l'évolution de la pression osmotique dans une mare en voie d'assèchement.

I.5 - INFLUENCE DE LA TENEUR EN NITRATE.

KLEBS (1896) et la plupart des anciens auteurs insistent sur le fait que la reproduction sexuée est favorisée par des milieux pauvres chez les Algues et les Champignons.

Dès 1918, PRINGSHEIM montre que la suppression des nitrates dans le milieu peut provoquer la sexualisation chez Cylindrocystis.

L'idée que la sexualisation des Algues est due à une carence azotée connaît un renouveau en 1950 (LEWIN) puis 1953 et 1954 où SAGER et GRANICK montrent que c'est le principal facteur inducteur dans la formation des gamètes chez Chlamydomonas reinhardtii à l'obscurité. STARR (1955c) utilise entre autres ce procédé de suppression des nitrates dans le milieu de culture pour provoquer la conjugaison chez Cosmarium botrytis et la plupart des auteurs étudiant les Desmidiées l'utilisent également.

Ce même facteur semble intervenir dans la sexualisation du Pandorina morum (WILBOIS-COLEMAN, 1958), du Scenedesmus obliquus (TRAINOR et BURG, 1965), du Golenkinia minutissima (ELLIS et MACHLIS, 1968), d'Oedogonium cardiacum (HILL et MACHLIS, 1970) ; TASSIGNY (1972) signale que c'est le facteur le plus important dans la sexualisation du Mesotaenium kramstai et du Cosmarium formosulum. HISHIMURA (1972) n'obtient de zygospores chez Closterium strigosum qu'après suppression des nitrates.

Il semble donc que dans beaucoup de cas, la carence azotée par suppression des nitrates, en conservant cependant une autre source d'azote dans le milieu de culture, soit, sinon le facteur primordial, du moins un élément important dans la sexualisation des Algues vertes. Les résultats des expériences citées plus haut suggèrent d'ailleurs à la plupart de leurs auteurs une explication écologique séduisante du phénomène ; c'est l'appauvrissement du milieu consécutif à une multiplication végétative active qui provoque l'apparition des formes sexuées et des spores de résistance, permettant ainsi aux espèces qui en possèdent de survivre aux périodes défavorables.

Des expériences et des conclusions identiques pourraient être signalées à propos des Champignons. Toutes insistent sur l'apparent antagonisme entre multiplication végétative et sexualisation. Cependant, quelques résultats d'expériences apparemment discordants viennent troubler cette unanimité : la sexualisation peut avoir lieu en présence de nitrates chez Chlamydomonas moewusii (TRAINOR, 1959), et pour les souches 105 et 106 du Pandorina unicocca (RAYBURN, 1974) dans un milieu renfermant 1.10⁻³ M.1⁻¹ de KNO₃. La carence en nitrate ne suffit pas à induire la sexualisation chez Eudorina elegans (SZOSTAK et al., 1973).

Le milieu de WARIS (WARIS, 1953) renferme de l'azote sous deux formes ioniques, NO₃⁻⁻ et NH₄⁺, ce dernier à concentration beaucoup plus faible. D'après PRINGSHEIM (1967) ce double apport évite une trop grande acidification du milieu due à l'utilisation préférentielle du sel d'ammonium par la plupart des Algues et une alcalinisation du milieu lorsque l'azote n'est fourni que sous forme de nitrate. Des expériences préliminaires de suppression totale de l'azote dans le milieu nous ont montré une mort rapide des cellules après une seule bipartition, sans sexualisation. Aussi, dans les expériences ultérieures n'avons nous supprimé que le nitrate, le sel d'ammonium apportant 0,3 mM d'azote permet un début de multiplication (2 ou 3 bipartitions). Aucune modification sensible du pH 5,4 du milieu de Waris initial n'a été constatée après 7 jours de culture dans ces conditions. Nous avons par ailleurs montré que C. moniligerum se développe et sexualise indifféremment à des pH variant de 5 à 7. Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois et dans le cas des cultures axéniques, l'extrait de Levure, habituellement ajouté au milieu de WARIS, a été supprimé.

Le milieu de WARIS témoin renferme 18 mg d'azote par litre soit $1,3.10^{-3}$ M.l⁻¹.

Le milieu carencé, dépourvu de nitrate renferme 4 mg d'azote par litre soit $0,3.10^{-3}$ M.l⁻¹ sous forme ammoniacale.

Les milieux enrichis en nitrate renferment le volume de solution mère de KNO_3 du milieu de WARIS multiplié par 2, 5, 10 et 25. Ils contiennent ainsi 32, 74, 144 et 354 mg d'azote par litre de milieu, soit respectivement 2,3.10⁻³ M ; 10,3.10⁻³ M ; 25,3.10⁻³ M.1⁻¹.

A titre de comparaison, l'eau d'une mare à Sphaignes riche en Desmidiées étudiée par DUTHIE (1965) renferme 0,016 à 0,095 mg.l⁻¹ de nitrate, à pH 5,5. C'est environ 10³ fois moins que le milieu de WARIS normal. Mais l'auteur ne signale aucune observation de Desmidiées conjuguées.

Toutes les expériences ont été effectuées à $20^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$; les cultures sont éclairées par des tubes grolux W.S. soit 12 heures sur 24 soit 18 heures sur 24. Pour chacune des photopériodes deux intensités d'éclairement ont été utilisées : approximativement 1500 et 2500 lux. Un essai à 5000 lux a provoqué la mort des cellules dans toutes les conditions de milieu. Les repiquages ont été effectués à partir de souches âgées de 2 à 3 semaines maintenues en conditions non inductrices et lavées une fois en milieu "sans nitrate". Les résultats sont donnés après 10 jours de culture et exprimés en pourcentage de colonies sexuelles. Sont considérées comme sexuelles les colonies présentant au moins un couple de cellules appariées. Le comptage porte sur des carrés de 5 mm de côté tracés sur la boîte de Pétri et pris au hasard. Les colonies de 5 à 10 carrés sont observées, selon leur densité, et pour chaque boîte 25 à 50 colonies sont ainsi comptées. Les expériences ont été répétées 5 fois, avec 3 boîtes au moins dans chaque condition.

Une différence de comportement s'observe entre les souches non axéniques et les souches axéniques.

 $[0,3 \text{ mM.l}^{-1} \text{ d'azote sont fournies constamment sous forme NH}_4^+$; des doses croissantes sont fournies sous forme NO $_3^{--}$].

			<u></u>	,	Azote	mM.1 ⁻¹		······································
			0,3	témoin 1,3	2,3	5,3	10,3	25,3
ч.	.ч 12 h лед	1500 lux	0	0	0	0	0	0
par 24		2500 lux	2	0	0	0	0	0
ière,	ົບ 	1500 lux	30	. 0	0	0	0	0
	10 H	2500 lux	95	80	0	0	0	0

Tableau 2 : Pourcentage de colonies sexuelles dans une <u>souche non axénique</u> en fonction de la teneur en azote du milieu.

L'examen de ces tableaux appelle quelques remarques. La souche <u>non axéni-</u> <u>que</u> sexualise pratiquement à 100 % sur milieu carencé, en lumière vive, dès le 3ème jour de culture, c'est à dire après une seule bipartition, pourvu que la longueur de la photopériode soit suffisante. Sur milieu normal, les premiers indices de sexualisation (appariements) ne commencent à s'observer qu'à partir du 5ème jour de culture et une grande partie des cellules demeure végétative. Il semble

			Azote mM.l ⁻¹							
			0,3	1,3	2,3	5,3	10,3	25,3		
+ h.	ਸ 10 ਮ	1500 lux	0	0	0	0	0	0		
1 21 1 21	2500 lux	0	0	0	0	0	. 0			
ère, I	, i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	1500 lux	0	0	0	0	0	0		
	2500 lux	0 à 50	60	60	60 [×]	60 [°]	40 [×]			

Tableau 3 : Pourcentage de colonies sexuelles dans une <u>souche axénique</u> en fonction de la teneur en azote du milieu.

* des appariements sans formation de zygospores.

donc qu'ici l'antagonisme entre multiplication végétative et sexualisation se vérifie. Un excès d'azote dans le milieu, aux concentrations utilisées, permet la multiplication végétative mais inhibe la sexualisation. La Bactérie associée, qui est un bacille G + a été cultivée sur milieu approprié pour vérifier sa capacité éventuelle à fixer l'azote atmosphérique. Tel n'est pas le cas, et elle n'en fournit donc pas à l'Algue sur milieu carencé. Le grand développement qu'elle prend sur milieu enrichi en nitrate est peut être la cause de l'inhibition sexuelle observée chez l'Algue.

Pour la souche <u>axénique</u>, les résultats ont d'abord été négatifs en l'absence de nitrate pendant les deux premières séries d'expériences (juin puis septembre-octobre 74). Ensuite 3 expériences successives donnent 20 à 40 % de colonies sexuelles en 10 à 20 jours de culture. Fin janvier 75, une expérience donne 50 à 60 % de colonies sexuelles en 7 jours de culture et depuis 2 expériences ont montré des résultats du même ordre. Il y a peut être à cela une explication génétique : les repiquages ont été effectués à partir de souches provenant de milieux identiques, mais non sexuelles en photopériode $12-\overline{12}$; une sélection massale involontaire a ainsi été effectuée, et cela montrerait la plasticité remarquable de la souche et la rapidité de l'adaptation clonale. Le comportement de la souche axénique est très différent en présence d'un excès d'azote. Pour les concentrations utilisées, il n'y a pratiquement pas d'inhibition de l'induction sexuelle, et un excès de nitrate prolonge même la longévité des cultures qui présentent un excellent aspect végétatif. TASSIGNY (1973) signale également que les Desmidiées "placées dans un milieu de culture supportent sans dommage de fortes concentrations de NO₃⁻⁻". Pour des teneurs en azote égales ou supérieures à 74 mg.l⁻¹, on observe toujours de nombreux appariements, mais ils n'aboutissent pas à la formation de zygospores. On observe le même phénomène qu'en présence d'un excès de glucose ou de mannitol : les gamètes se lysent au moment de leur sortie des gamétocystes, et la fusion n'a pas lieu. L'élévation de la pression osmotique du milieu extérieur intervient probablement à ce stade : des teneurs équivalentes de mannitol (500 mg.l⁻¹ soit 2,2.10⁻³ M.l⁻¹), en tenant compte du coefficient de dissociation ionique du nitrate, provoquent les mêmes accidents.

L'influence favorable de la carence azotée du milieu sur la sexualisation s'exerce probablement par l'intermédiaire de l'accumulation des lipides et de l'amidon, phénomène bien étudié chez la Chlorelle. SPOEHR et MILNER (1949) montrent que la teneur en lipides des Chlorelles carencées est plus importante en lumière vive qu'en lumière atténuée, et AACH (1952) précise que la teneur en lipides des Chlorelles cultivées sur milieu carencé en azote s'accroît de 22 à 70 % au 25ème jour de culture lorsque la croissance a cessé. GUERIN-DUMARTRAIT et MOYSE (1970) décrivent des Chlorelles carencées en azote ; après 48 heures de carence, la teneur en chlorophylles est diminuée d'environ 80 %, les thylakoïdes sont très dégradés, les cellules, incapables de se diviser, sont enrichies en lipides et en amidon. Cette description correspond exactement à ce que nous avons observé dans les cellules du *Closterium moniliferum* cultivé sur milieu normal et sexuellement induit.

La carence en azote, par l'accumulation de lipides qu'elle provoque, associée à une lumière intense qui permet une photosynthèse importante, accélère le processus de sexualisation pour cette souche. Elle est cependant inapte à déclencher le phénomène en l'absence d'un éclairement approprié. Il semble donc que la lumière soit le facteur primordial dans l'induction de la sexualisation chez cette Algue. Il faut également ajouter que les très abondantes zygospores obtenues sur milieu carencé en azote montrent un taux de germination beaucoup plus faible et plus irrégulier que les zygospores obtenues sur milieu normal.

Pour continuer la comparaison déjà esquissée entre le comportement sexuel de cette Algue et celui de beaucoup de Champignons, notons que chez ces derniers ce n'est pas la carence en azote du milieu en valeur absolue qui favorise la sexualisation. C'est en général le rapport C/N, variable en qualité et en quantité selon les espèces qui permet ou non le passage de l'état végétatif à l'état sexué, pourvu que les conditions de lumière et de température soient favorables.

I.6 - INFLUENCE DE SUBSTANCES INHIBITRICES DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS SUR LA SEXUALISATION.

La spectaculaire augmentation du nombre des globules lipidiques sous l'action d'une photopériode adéquate, leur grande taille et leur coloration jaune nous ont suggéré un rapprochement avec l'augmentation des lipides dans les feuilles du Fraisier "des quatre-saisons" photo-induit étudié par SIRONVAL (1957). Les observations de cet auteur ont étayé l'hypothèse de la nature lipidique, et même plus précisément stérolique, de l'hormone florigène "responsable de la floraison chez les végétaux supérieurs. De même, chez certains Champignons, en particulier *Mucor mucedo*, on observe une augmentation des globules lipidiques colorés par des pigments caroténoïdes dans les filaments sexuels et les hormones qui interviennent lors de la conjugaison sont des composés terpéniques (GOODAY, 1968).

D'autre part, CHOUARD (1936, 1937) a montré l'influence de l'oestradiol sur la floraison de Reines-marguerites maintenues en conditions photopériodiques défavorables ; KOPCEWICZ (1972) retrouve la même influence sur deux plantes de jour long. L'addition de stérols au milieu de culture de certains Champignons Phycomycètes induit *in vitro* leur reproduction sexuée (expériences de HASKINS sur *Pythium* (1963), de HENDRIX sur *Pythium* et *Phytophtora* (1964). C'est devenu une technique classique que d'ajouter un stérol (β -sitostérol) au milieu de culture pour faire sexualiser ces Champignons (HUGUENIN et BOCCAS, 1971).

Faute de pouvoir démontrer directement le rôle des stérols dans la reproduction sexuée des Végétaux les auteurs ont procédé par élimination. La découverte de substances qui bloquent la synthèse des stérols au niveau de l'acide mévalonique (HOLMES et DI TULLIO, 1962) a permis l'expérimentation par inhibition. Bien que le procédé soit criticable puisqu'il est difficile d'affirmer que l'inhibiteur n'intervient qu'au niveau du métabolisme des stérols sans interférer avec d'autres processus, il a été utilisé par BONNER et al. (1963) sur Xanthium pennsylvanicum. L'application des inhibiteurs est efficace sur la suppression de la floraison seulement avant l'unique nuit longue inductrice, mais aucun stérol n'est capable de lever l'inhibition. Par contre, chez l'Ascomycète Cochliobolus carbonarum étudié par NELSON et al. (1967) l'inhibition peut être levée par l'application simultanée de squalène ou de différents stérols, et il faut en ajouter d'autant moins que l'on applique l'inhibiteur plus près du moment de la formation normale des périthèces.

Nous avons obtenu des laboratoires SMITH, KLINE et FRENCH à Philadelphie les inhibiteurs suivants :

- SK & F 525-A (β-diethylaminoethyldiphenyl propyl acétate hydrochloride). chloroacétate de β-diethylaminoethyl diphenyl propyl.
- SK & F 3301-A (chlorure de 2,2-diphenyl-1 (β-dimethyl-amino-ethoxy)-pentane).
- SK & F 7732-A3 (trichlorure de tris (2-dimethylamino ethyl)-phosphate).
- SK & F 7997-A₃ (trichlorure de (2-diethylaminoethyl)-phosphate).

Nous avons dissous ces inhibiteurs dans l'eau distillée selon la technique de BONNER et non dans l'éthanol comme NELSON, car l'alcool est toxique pour *Closterium*. Le pH a été ajusté à 5,4. Nous n'avons pas ajouté de mouillant. La solution d'inhibiteur est déposée à la pipette sur les cellules placées sur la gélose nutritive. Une gamme de concentration de 0,5 à 5 mg.ml⁻¹ a été essayée pour déterminer la sensibilité de la souche. Chaque boîte de Pétri remplie de milieu de Waris gélosé est divisée en compartiments numérotés par des bandelettes de matière plastique pour éviter la diffusion. Les cellules du compartiment témoin reçoivent de l'eau distillée seule. Le traitement est appliqué après 3 cycles photopériodiques de lumière blanche grolux 18 : $\overline{6}$ (éclairement de l'ordre de 2500 lux) à 20°C. Les colonies sont alors au stade 4 cellules et n'ont pas commencé à sexualiser. L'observation a lieu après 5 cycles de 24 heures, où les témoins présentent les premiers appariements dans des colonies au stade 8 cellules.

Les composés SK & F 525 et SK & F 3301 ont provoqué à toutes les concentrations utilisées une nécrose totale des cellules avec décoloration complète 48 heures après l'application. Nous n'avons pas poursuivi les expériences avec ces substances. BONNER signale que ces produits, qui inhibent la conversion de l'acide mévalonique en squalène causent un jaunissement des feuilles de Xanthium à la concentration de 2 mg.ml⁻¹.

Les composés SK & F 7997 et SK & F 7732 provoquent une inhibition végétative sans nécrose à la concentration de 4 mg. ml^{-1} . La concentration 5 mg. ml^{-1} est létale. La concentration 3 mg. ml^{-1} a été retenue pour l'expérimentation ultérieure sur l'effet du moment d'application de l'inhibiteur (Remarque : BONNER et al. n'ont retenu que le SK & F 7997 à la concentration de 2 mg. ml^{-1}).

Lorsque l'inhibiteur est appliqué au moment de l'ensemencement, aucune différence n'est perceptible entre la partie témoin et la partie traitée après 5 cycles photopériodiques de lumière blanche grolux 18 : 6. Environ 50 % des colonies axéniques présentent au moins un couple de cellules appariées.

Lorsque l'inhibiteur est appliqué 24 heures après l'ensemencement, au début d'une période d'éclairement de 18 heures, on observe après 5 cycles une inhibition quasi complète de la sexualisation avec le SK & F 7732. Les colonies traitées avec le SK & F 7997 sexualisent faiblement (de 2 à 5 % de colonies sexuelles). Après 8 cycles, aucune différence n'est perceptible par rapport au témoin : la sexualisation est de l'ordre de 50 à 60 % des colonies dans les deux cas.

Si l'inhibiteur est appliqué 48 heures après l'ensemencement au début d'une période d'éclairement de 18 heures, les colonies traitées avec le SK & F 7732 montrent une faible sexualisation (de l'ordre de 5 %) ; les colonies traitées avec le SK & F 7997 ne sexualisent pratiquement pas. Cependant, après 8 cycles les parties traitées ont "rattrapé" les témoins.

L'application de l'inhibiteur SK & F 7732 72 heures après l'ensemencement ne permet d'obtenir que 2 à 8 % de colonies sexuelles dans les parties traitées lorsqu'elles sont observées après 5 cycles photopériodiques. Le SK & F 7997 n'a aucun effet inhibiteur.

Pour le SK & F 7732 on constate donc une inhibition de la sexualisation quel que soit le moment de l'application. Pour le SK & F 7997 la période sensible se situe entre 24 et 48 heures après l'ensemencement et la sexualisation est retardée. Plus tard, lorsque le processus de sexualisation est déjà engagé, l'inhibiteur est inefficace ; il n'a d'efficacité que pendant les 3 premiers cycles photopériodiques à longue héméropériode. Le problème est plus simple chez Xanthium où une seule nuit longue suffit à induire la floraison. Chez Closterium nous n'avons jamais pu abaisser ce minimum en-dessous de 3 cycles photopériodiques à héméropériode longue. Il faut remarquer également que l'action de l'inhibiteur est temporaire et qu'après un temps suffisant, de l'ordre de 8 cycles d'éclairement, les cellules ont complètement restauré leurs capacités sexuelles. Si l'on souhaite, en jour long, empêcher la sexualisation, il est nécessaire d'appliquer chaque jour, pendant au moins 5 cycles, la dose adéquate d'inhibiteur, jusqu'à ce que les colonies soient trop âgées pour être sensibles au stimulus lumineux. CHAPITRE II: La TEMPERATURE.

Des expériences préliminaires ont été effectuées à 10°C, 14°C, 18°C, 21°C, 25°C et 30°C. La condition 10°C a dû être abandonnée à cause de la lenteur de la multiplication ; nous n'y avons jamais obtenu de zygospores. A 30°C, les cellules ne se multiplient que très peu, et les conjugaisons n'aboutissent pas à la formation de zygospores normales. A 25°C, les cellules se multiplient mais présentent un aspect décoloré. Ces conditions 25 et 30°C n'inhibent pas la sexualisation, mais le contenu des gamètes se vide fréquemment sur la gélose au moment de la conjugaison. A 18°C et 21°C multiplication et réponse sexuelle diffèrent peu. Seules ont été retenues pour l'expérimentation les températures 14 et 21°C.

Ainsi que l'a montré LEFEVRE (1937) chez *Closterium acerosum*, la vitesse de multiplication dépend de la température, et pour une même température de 21°C nous observons qu'elle varie légèrement avec l'intensité de l'éclairement. A 14°C, cette différence est peu sensible. Le graphique de la figure 6 concerne la multiplication végétative du *Closterium moniliferum* (non axénique) en fonction de la température et de l'éclairement. Il a été établi en héméropériode de 18 h. ; l'intensité de l'éclairement fourni par des tubes fluorescents "Claude Blanc 4500" du type "lumière du jour" est de 1300 lux ou de 2600 lux environ au niveau des cultures.



Fig.6 _ Multiplication végétative du <u>C. moniliferum</u> en fonction de la température et de l'éclairement.

En alternance de lumière et d'obscurité, les bipartitions sont synchrones à 80 % jusqu'au stade de 32 cellules par colonie ; le temps de génération est de 48 heures environ pendant la phase exponentielle de croissance qui dure environ 10 jours à 21°C. La multiplication est ensuite très ralentie, mais les colonies demeurent vivantes et présentent quelques divisions pendant 4 à 6 mois.

L'abaissement de la température allonge la phase de latence après le repiquage et le temps de génération est également augmenté ; il est de l'ordre de 72 heures à 14°C pour un éclairement de 2600 lux. A basse température, la survie de la culture peut dépasser un an en lumière atténuée.

Des températures trop basses de l'ordre de 10°C ne permettent pas la formation de zygospores et des températures trop élevées, supérieures à 25°C, provoquent des accidents lors de la fusion des gamètes. De 14 à 21°C, la température intervient sur la rapidité de la réponse sexuelle, sur le nombre de zygospores formées par colonie et sur leur temps de maturation. Le tableau n° 4 résume ces observations.

lempérature		•	14° C			· · ·		2	1° C	•	
Durée de la phase lumineuse Dar 24 h (2600 lx)	12	14	15	16	18	12	14	15	16	18	24.
éponse sexuelle	-	-	+ .	. +	+		-	+	+	+	↓ · ·
femps de réponse sexuelle en jours après repiquage			12821	12à21	10à20			9à14	9à14	528	5
de colonies sexualisantes			1	6 0	90			2	80	90à95	80è100
Ériode d'activité sexuelle, en jours			8210	> 30	> 30			224	228	225	2
iombre de conjugaisons par colonie après 15 jours de culture			4210	> 50	> 50			284	428	4220	2
Temps de maturation des zygotes, en semaines				3à4	324				122	182	1

Tableau 4 · Réponse sexuelle en fonction de la température et de la longueur de l'héméropériode.

A 14°C la multiplication cellulaire, l'apparition des premières conjugaisons et la maturation apparente des zygospores (épaississement de la paroi, passage de la coloration verte à la coloration brune) sont lentes, mais la période d'activité sexuelle est longue, et les zygospores sont finalement très abondantes : plus de 100 par colonie après 1 mois de culture. A 21°C les phénomènes se déroulent plus rapidement mais le nombre de zygotes ne dépasse pas 40 par colonie après 15 jours de culture.

Dans la mesure où elle permet une multiplication végétative active, la température n'a pas d'influence sur l'induction de la sexualisation lorsque l'intensité de l'éclairement dépasse un certain seuil (de l'ordre de 1500 lux) et lorsque l'héméropériode est supérieure à 15 heures pour un éclairement du type "blanc brillant de luxe". Les expériences sur le rôle du milieu dans la sexualisation nous avaient déjà montré que celle-ci ne pouvait intervenir que lorsque la composition du milieu permettait une multiplication végétative active. La même conclusion s'impose quant au rôle de la température sur la sexualisation. Il y a là une différence avec le comportement de certains Champignons. Chez Nectria galligena (DEHORTER, 1972) la sexualisation ne peut avoir lieu qu'en-dessous de 18°C. A 21°C, le Champignon demeure stérile bien que sa croissance végétative soit plus importante qu'à 18°C. Cette donnée semble généralisable à beaucoup de Champignons Ascomycètes. La conidiogenèse est souvent possible pour beaucoup d'Aspergillus dans une gamme de températures plus étendue que celle qui permet la formation des périthèces.

CHAPITRE III : L'ECLAIREMENT

III.1 - INTRODUCTION. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LE ROLE DE LA LUMIERE DANS LA SEXUALISATION CHEZ LES ALGUES EN GENERAL.

Si KLEBS a pressenti dès 1896 le rôle de la lumière dans la sexualisation des Algues et des Champignons, il semble bien que la première mention d'un photopériodisme (c'est à dire d'une alternance de périodes de lumière et d'obscurité) provoquant la sexualisation d'une Algue ait été faite par KARLING en 1924 chez *Chara fragilis*. L'auteur signale d'ailleurs qu'il a entrepris ses expériences à la suite des travaux de GARNER et ALLARD (1920), qui sont également à l'origine de la plupart des travaux effectués sur le thème "lumière et floraison" chez les plantes supérieures. L'auteur aboutit à la conclusion qu'il s'agit d'une Algue "de jour long".

A de très rares exceptions près, aucune Algue ne sexualise à l'obscurité complète. Ces exceptions sont : Protosiphon botryoides (MAHER, 1947) ; Chlamydomonas reinhardtii, sur milieu riche en acétate et carencé en nitrate (SAGER et GRANICK, 1954) ; Chlamydomonas eugametos (FORSTER, 1957). Nous envisageons, dans cette revue, l'influence de la lumière sur la sexualisation chez les Algues, en faisant parfois une digression sur la production de spores non sexuelles et en n'excluant que les processus morphogénétiques purement végétatifs.

III.1.1 Influence de l'intensité de l'éclairement et de la quantité totale d'énergie fournie :

Chez de très nombreuses espèces, l'activité reproductrice croît avec l'intensité de l'éclairement et avec sa durée (pourvu que les autres conditions soient favorables).

a - L'exemple-type est celui de Golenkinia (ELLIS et MACHLIS, 1968) sur milieu carencé en azote, pour la production des gamètes mâles.

Il n'y a pas de réponse sexuelle si la lumière n'est pas fournie pendant au moins 9 h. à 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹ ou en lumière continue à 2300 ergs.cm⁻².s⁻¹. Le degré de sexualisation est directement proportionnel à la durée de l'irradiation, et en lumière continue à l'intensité de l'éclairement.

Le spectre d'action est superposable à celui de l'activité photosynthétique.

b - L'activité reproductrice ne se manifeste qu'à partir d'un seuil
 d'éclairement :

- chez Hydrodictyon (NEEB, 1952) pour la zoosporogénèse ;

- chez Acetabularia crenulata (TERBORGH et THIMANN, 1965) pour la formation des chapeaux et des cystes ;
- chez le gamétophyte de Laminaria hyperborea (KAIN, 1964);
- chez le gamétophyte de Laminaria digitata (COSSON, 1973);
- chez le gamétophyte de Desmarestia aculeata (CHAPMAN et BURROWS, 1970), où la maturation n'a lieu qu'entre 54 et 1540 lux d'éclairement moyen journalier (éclairement en lux x longueur du jour/24); elle est inhibée à des niveaux d'éclairement plus bas; la saturation n'est pas atteinte à 1540 lux;
- chez le gamétophyte et le tétrasporophyte de Polysiphonia denudata (ERDWARDS, 1970).

c - Des éclairements d'intensité trop forte peuvent provoquer une inhibition de la reproduction ;

- chez le gamétophyte de Laminaria saccharina (HSIAO et DRUEHL, 1971-1973);

- chez les Diatomées, de fortes intensités d'éclairement maintenues pendant de longues durées ont un effet inhibiteur sur la reproduction, par exemple chez les Centrales Melosira moniliformis et Biddulphia aurita (CASTENHOLZ, 1964) et chez la Pennale Rhabdonema adriaticum (ROZUMEK, 1968).

d - En l'absence de recherches plus précises on met en relation avec la photosynthèse les types de reproduction suivants :

- Volvox (STARR, 1970) : gamétogénèse (intervention de la lumière + hormones) ;

- Closterium acerosum (KIES, 1964) : formation des zygospores ;

- Derbesia neglecta (HUSTEDE, 1964), où des sporocystes se forment en lumière intense, des propagules en lumière faible ;

- Ectocarpus siliculosus (MULLER, 1962), où des zoïdocystes uniloculaires se forment à de fortes intensités d'éclairement, des zoïdocystes pluriloculaires à de faibles intensités.

Le rôle de la lumière dans la sexualisation des Chlamydomonas est très variable selon les espèces et les travaux de LEWIN, SAGER et GRANICK, etc... des années 50 n'ont pas été repris. L'opinion généralement admise est celle d'un effet photosynthétique.

e - La relation directe entre sexualisation et activité photosynthétique ne peut expliquer entièrement l'effet sexualisant d'un passage brusque à de forts éclairements chez Rhodochorton (KNAGGS, 1966) et chez quelques Diatomées : Stephanopyxis turris (VON STOSCH et DREBES, 1964), Coscinodiscus asteromphalus (WERNER, 1971).

L'interprétation généralement donnée pour ce type de résultats est que les effets de l'intensité de l'éclairement sur la reproduction sont liés à une variation de l'activité photosynthétique mais deux travaux mis à part (NEEB, 1952 ; KAIN, 1964) la relation directe entre action de la lumière, photosynthèse et reproduction n'a pas été montrée. Cependant, quelques résultats (KAIN, 1964 ; KNAGGS, 1966) montrent que l'activité photosynthétique n'est pas saturée pour des intensités d'éclairement saturantes ou inhibitrices de la reproduction.

III.1.2 Influence de la qualité de la lumière fournie :

Si l'influence de la longueur d'onde de la lumière fournie sur la morphogénèse a été bien étudiée chez de nombreuses Algues (LARPENT et al., 1971 ; KLING, 1974), peu d'effets spécifiques de la lumière sur la reproduction ont été observés jusqu'à une époque récente.

a - Chez Acetabularia le chapeau ne se forme pas en l'absence de lumière bleue (TERBORGH, 1965, RICHTER et KIRSCHTEIN, 1966), mais cet effet est probablement dû à la stimulation de la photosynthèse par la lumière bleue, alors que la lumière rouge l'inhibe dans ce genre.

Les effets de la lumière sur la morphogénèse et la reproduction des Acétabulaires semblent faire intervenir une réaction complexe entre les radiations rouges et bleues, dont le mécanisme n'est pas complètement élucidé.

b - La lumière bleue a un effet spécifique sur la reproduction d'un certain nombre d'espèces.

1) les gamétophytes de Laminaria saccharina demeurent indéfiniment végétatifs en lumière rouge, mais 12 heures d'irradiation bleue sont suffisantes pour induire la production de gamètes après 10 jours dans 50 % des gamétophytes femelles. LUNING et DRING (1972 et 1975) ont montré que cet effet était indépendant de la photosynthèse. PEREZ (1971), ne signale pas d'effet inhibiteur de la lumière rouge sur le gamétophyte de Laminaria digitata, éclairé simultanément par des lumières bleue et rouge.

2) la lumière bleue stimule la libération des gamètes chez Monostroma (SHIHIRA, 1958) et des tétraspores chez Nitophyllum (SAGROMSKY, 1961).

3) elle inhibe la formation des zoospores chez Protosiphon botryoides (DURANT et al., 1968 ; O'KELLEY et al., 1974) ; celle-ci est stimulée par les radiations vert-jaune. Cet effet réversible jaune/bleu est comparable à celui qui provoque l'émission des spores chez le Champignon Sphaerobolus (INGOLD, 1969).

4) chez Trebouxia (Algue verte symbionte d'un Lichen) les choses semblent moins compliquées. L'irradiation pendant 1 mn, avec une forte intensité de lumière rouge clair, suffit à multiplier par 4 la production de spores ; cet effet peut être inversé par une exposition de même durée à une irradiation rouge sombre de même énergie (GILES, 1970). Ceci semble un premier exemple net de l'activité phytochrome chez une Algue verte.

III.1.3 Influence de la longueur relative des périodes d'éclairement et d'obscurité (photopériodisme) :

III.1.3.1 <u>Algues "de jour long" nécessitant un minimum d'heures d'éclairement</u> journalier pour sexualiser. Font partie de cette catégorie :

. Probablement Chara fragilis (KARLING, 1924), où cet effet est indépendant de la photosynthèse : 4 jours après mise en culture en éclairement continu de faible intensité, fourni par une lampe à incandescence (1000 lux), on observe une abondante production de gamétocystes. Un éclairement important, qui permet une excellente croissance végétative inhibe la sexualisation. Une très faible lumière incandescente d'appoint au jour court favorise la sexualisation.

.Probablement Ulothrix flacca (HYGEN, 1948) où les zygotes se forment en jour long.

Vaucheria sessilis (LEAGUE et GREULACH, 1955) a d'abord été considérée comme une Algue de jour long, mais l'addition de glucose et de peptone au milieu de culture en jour court produit un effet de jour long : la photosynthèse est donc prédominante pour la formation de gamétocystes.

Stigeoclonium amoenum (ABBAS et GODWARD, 1963) produit des zygotes en jour long.

TERBORGH et THIMANN (1964-1965) ont montré chez Acetabularia crenulata un accroissement du degré de formation des chapeaux en jour long.

Chez la Diatomée Stephanopyxis palmeriana (STEELE, 1965) la reproduction sexuée n'a lieu qu'en jour long. Les éclairements de faible intensité provoquent la formation d'auxospores, ceux de forte intensité la formation des gamètes mâles.

Chez la Rhodophycée Porphyra umbilicalis les conchospores se forment en jour long (KUROGI et SATO, 1967).

Le gamétophyte du Pseudobryopsis myura (MAYHOUB, 1974) est fertile en jour long 16 : $\overline{8}$ h.

Chez toutes ces Algues dites "de jour long" il est difficile de dissocier l'effet photosynthétique et le photopériodisme vrai. Les critères essentiels pour la définition du photopériodisme n'ont pas été souvent démontrés :

- il doit y avoir induction, c'est à dire prolongement de l'effet lorsque le matériel est transféré à une photopériode non inductrice ;

- la réponse doit être sensible à des interruptions de la période sombre.

III.1.3.2 <u>Algues de "jour court" nécessitant un minimum d'heures d'obscurité</u> par cycle :

a - L'Algue de ce type la mieux étudiée est *Porphyra tenera* où KUROGI a montré dès 1959 la formation de conchospores en jours courts. Ensuite, presque simultanément, DRING (1966-1967) et RENTSCHLER (1967) ont mis en évidence un effet phytochrome chez le même *Porphyra*. C'était la première fois qu'un effet phytochrome était rigoureusement démontré chez une Algue. DRING a montré que la croissance du stade *Conchocelis* était directement proportionnelle à la longueur du jour entre 8 et 16 heures. Des spores abondantes ne sont formées qu'en durée d'éclairement de <u>10 h ou moins</u>. <u>L'interruption</u> d'une période obscure de 16 h par 1 h d'éclairement (1000 lux) inhibe complètement la formation des conchospores. Le maximum d'inhibition est obtenu en lumière rouge clair, et cet effet est <u>réversible</u> par le rouge sombre.

Des résultats à peu près identiques ont été obtenus chez l'espèce proche Bangia fuscopurpurea par RICHARDSON et DIXON (1968) et RICHARDSON (1970).

b - Quelques autres Rhodophycées montrent également un comportement de "jour court" mais ne semblent pas sensibles à l'interruption des nuits longues par un bref éclair. Ces expériences doivent probablement être reprises en augmentant la durée et l'intensité de l'éclairement de cette interruption. Forment des tétrasporocystes en jour court :

Achrochaetium pectinatum, Rhodochorton purpureum et tenue (WEST, 1968-1969).
Calosiphonia vermicularis (MAYHOUB, 1975), pour lequel l'auteur a signalé que des expériences d'interruption de nuits longues s'étaient montrées positives.

c - Quelques Algues brunes (au sens large) sexualisent en jour court : Si pour les Diatomées *Biddulphia* et *Melosira* étudiées par CASTENHOLZ en 1964 l'effet de jour court est probablement dû à une inhibition de la photosynthèse par de trop fortes irradiations, il semble que *Rhabdonema* étudié par ROZUMEK (1968) ait un comportement photopériodique : avec des cycles 8 : $\overline{16}$ h, on obtient des auxospores. Avec des cycles 4 : $\overline{10}$: 4 : $\overline{6}$ h, il n'y a pas formation d'auxospores.

Les gamétophytes de Desmarestia tabacoïdes (NAKAHARA et NAKAMURA, 1971) deviennent végétatifs en lumière continue. Après 1 cycle 10 : $\overline{14}$ h puis retour en lumière continue, 13 % des rameaux deviennent fertiles ; après 4 cycles 10 : $\overline{14}$ h puis retour en lumière continue,85 % des rameaux deviennent fertiles. Chez Laminaria longicruris (BYRNE et CRAIGIE, 1971), la gamétogenèse est plus abondante en jours de 5 h qu'en jours de 12 h. De brèves interruptions rouge clair réduisent le niveau de sexualisation à celui obtenu en jour long. Cet effet est réversible par le rouge sombre. Il y a là mise en évidence d'un effet phytochrome.

En conclusion, le problème de l'influence de la lumière sur la sexualisation dans les différents groupes d'Algues semble beaucoup plus complexe que chez la plupart des plantes à fleurs. En outre, température et composition du milieu jouent souvent un rôle important qui interfère avec celui de la lumière.

Chez beaucoup d'entre elles, la photosynthèse joue un rôle prépondérant et c'est seulement lorsqu'un certain niveau photosynthétique est atteint que la sexualité peut se manifester.

Chez d'autres intervient un photopériodisme qui agit par l'intermédiaire de divers pigments.

Un effet phytochrome analogue à celui observé chez les végétaux supérieurs a été démontré chez l'Algue verte Trebouxia (GILES, 1970) ; chez l'Algue brune Laminaria longicruris (BYRNE et GRAIGIE, 1971) ; chez la Rhodophycée Porphyra tenera (DRING, RENTSCHLER, 1967). Il est probable chez Chara où son rôle a été mis en évidence dans la germination des oospores (TAKATORI et HIMAHORI, 1971) et la croissance des plantules (RETHY, 1968).

D'autres pigments dont l'existence n'a pas été démontrée interviennent peut être chez Acetabularia, Laminaria saccharina, Protosiphon botryoides qui réagissent aux radiations bleues.

Nous allons essayer de préciser quelles sont les modalités de l'action de la lumière sur la sexualisation du Closterium moniliferum.

III.2 - EXPERIENCES EFFECTUEES EN LUMIERE "BLANCHE".

III.2.1 Influence de la longueur de l'héméropériode :

Nous avons déjà envisagé partiellement ce problème à propos de l'action de la température (tableau n° 4) car les deux facteurs ont été étudiés simultanément. Nous disposions d'enceintes réglées à la même température dont les 4 compartiments éclairés par des tubes fluorescents "Claude Blanc 4500" de type "blanc brillant de luxe", pouvaient être programmés selon des cycles photopériodiques différents.

A l'obscurité complète nous avons vu (p. 77) que même en présence d'une source de carbone organique l'Algue est incapable de se multiplier, et par conséquent de se sexualiser. Il se produit parfois une bipartition ; le plus souvent les plastes se clivent sans qu'il y ait division cellulaire.

En alternance 12 : 12 h, la multiplication végétative est satisfaisante, mais on n'observe jamais de sexualisation, ni dans les cultures axéniques ni dans celles qui ne le sont pas, quelle que soit l'intensité de l'éclairement. Si celuici est trop intense (> 5000 lux), les cellules jaunissent et meurent sans sexualiser.

C'est seulement à partir d'une héméropériode de 15 heures que l'on commence à observer un faible pourcentage de colonies sexuelles (2 %), après un temps de culture relativement long, de 9 à 14 jours, lorsque l'intensité de l'éclairement est supérieure à 1500 lux.

Pour une héméropériode de 16 h à 2500 lux, le temps de réponse est également assez long (9 à 14 jours) mais le pourcentage de cellules sexuelles (de l'ordre de 30 %) est déjà très satisfaisant, compte tenu par exemple du résultat signalé par BIEBEL (1964) qui obtient chez Netrium digitus 1,4 % de cellules sexuelles.

A partir d'une héméropériode de 18 heures à 2500 lux jusqu'à la condition "lumière continue", le pourcentage de sexualisation est pratiquement identique, entre 90 et 95 % de colonies sexuelles (et de l'ordre de 30 à 40 % de cellules sexuelles) pour la souche non axénique, rarement plus de 60 à 70 % pour la souche axénique après 5 à 8 cycles. A ce propos, il faut signaler que si la sexualisation de la souche axénique semble stabilisée, celle de la souche non axénique a subi des fluctuations et ses potentialités sexuelles, sur milieu non carencé en nitrate ont régressé en 5 années de culture. Les expériences concernant le rôle de la teneur en nitrate du milieu sur la sexualisation avaient d'ailleurs montré la sensibilité de la souche à l'élévation de la teneur en nitrate. Cette sensiblité s'est accrue.

En lumière continue intense (2600 lux environ) 5 jours après le repiquage, on observe 80 à 100 % de colonies sexuelles ; c'est une condition apparemment très favorable, mais les conjugaisons n'aboutissent que rarement à la formation de zygospores typiques car elles avortent au stade "fusion des gamètes". En lumière continue atténuée, jusqu'à 1500 lux environ, la sexualisation est aussi importante, et le nombre de zygospores bien formées augmente. C'est dans des conditions de lumière continue, d'abord intense pendant 4 à 5 cycles, puis atténuée, qu'apparaissent fréquemment des clones diploïdes.

Les cultures placées dans une pièce exposée au nord, recevant en plus de la lumière du jour un éclairement fluorescent de 2500 lux environ pendant 12 heures, de 8 h à 20 h, ne sexualisent qu'à partir du mois de mai. La période trophique de 12 h est incapable seule de provoquer la sexualisation mais l'appoint de <u>5 à 6 h de lumière du jour à faible intensité</u> à l'aube et au crépuscule suffit à l'induire entre le mois de mai et le mois de juillet, période où la longueur du jour dépasse 15 heures à Lille.

Cette souche de Closterium moniliferum peut donc être considérée à priori comme une Algue de jour long, comme les Stigeoclonium (ABBAS et al., 1963) et Chara (KARLING, 1924). C'est ce qui nous a incité à rechercher l'intervention d'un photopériodisme dans la sexualisation.

Nous n'avons pas effectué de mesures de l'activité photosynthétique, et nous ne savons pas si elle est saturée pour les éclairements qui permettent la sexualisation. Il est difficile de dissocier les rôles respectifs de la quantité totale de lumière fournie et de la longueur de l'héméropériode. Cependant, puisque l'on n'observe aucune sexualisation pour des héméropériodes inférieures à 15 h (avec un éclairement du type "lumière de jour de luxe") quelle que soit l'intensité de cet éclairement, il semble extrêmement probable qu'intervienne un effet photopériodique.



III.2.2 Influence de l'intensité de l'éclairement sur la multiplication végétative et la sexualisation :

Fig. 7 - Multiplication végétative du <u>C. moniliferum</u> en fonction de l'intensité de l'éclairement (blanc, 18.6, 20°C)

Pour chacune des héméropériodes suivantes : 12 h, 15 h, 18 h et 24 h, plusieurs niveaux de l'intensité de l'éclairement ont été fournis. La vitesse de multiplication varie peu avec l'accroissement de l'héméropériode à $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C et le graphique de la figure 7 ne concerne que celle de 18 h.

En lumière atténuée (< 500 lux, environ 2000 $ergs.cm^{-2}.s^{-1}$) la multiplication végétative est ralentie, mais la longévité des cultures est augmentée : ce fait est bien connu de tous les auteurs qui maintiennent une collection de Desmidiées. Pour 1300 lux (soit 5500 ergs.cm⁻².s⁻¹ environ), on n'observe aucune sexualisation quelle que soit la longueur de l'héméropériode.

Pour 2600 lux (soit 12 000 $\operatorname{ergs.cm}^{-2}.\mathrm{s}^{-1}$ environ), la sexualisation a lieu après 5 à 7 cycles, pourvu que la longueur de l'héméropériode soit supérieure ou égale à 15 h. Le seuil de réponse se situe vers 1500 lux, et il n'y a pas de gradation sensible entre 1500 et 2600 lux.

Au-delà de 2600 lux, lorsque les cellules sont très proches de la source lumineuse, leur aspect se modifie ; elles demeurent courtes et les plastes se décolorent. Pour un éclairement de 5000 lux les cellules meurent rapidement après avoir subi en général une bipartition, sans présenter d'indices de sexualisation.

III.2.3 Influence du temps d'exposition aux conditions photoinductrices et du moment d'application :

Un nombre minimum de cycles à héméropériode longue est nécessaire à l'induction sexuelle. Nous avons plus particulièrement étudié cette exigence à $20 \pm 1^{\circ}$ C, en lumière blanche du type "blanc brillant de luxe", sur milieu non carencé en nitrate.

Trois séries de cultures^{*}issues de la même souche maintenue en conditions non inductrices et âgées de 2 à 3 semaines sont repiquées le même jour.

1 - en lumière continue, à 2600 lux pendant 48 heures puis en alternance 18 heures de lumière (2600 lux) - 6 heures d'obscurité, elles sexualisent le 5ème jour après le repiquage au stade 8 ou 16 cellules par colonie ;

2 - en alternance 18 heures de lumière (2600 lux) - 6 heures d'obscurité, elles sexualisent en 5 à 8 jours au stade 8, 16 rarement 32 ;

3 - en alternance 18 heures de lumière - 6 heures d'obscurité, d'abord à 1300 lux pendant 2 à 15 jours, puis à 2600 lux, elles sexualisent 4 à 5 jours après l'augmentation de l'éclairement, au stade 64, 128.

Dans les conditions précédemment exposées, il faut donc un minimum de 5 cycles à longue héméropériode, avec éclairement suffisant, pour provoquer les appariements cellulaires, premiers indices de la sexualisation. Si l'on place alors les cultures montrant ces appariements en conditions défavorables (lumière faible, jour court), elles se séparent et redeviennent végétatives. Il est nécessaire d'appliquer aux cultures au moins un cycle inducteur supplémentaire, de façon à les mener au stade des "papilles de conjugaison" pour que le processus devienne irréversible quelles que soient les conditions qui leur sont appliquées ensuite. A ce stade on peut alors parler de photo-induction.

Il est nécessaire que ces cycles photo-inducteurs soient appliqués à des cultures jeunes, en phase exponentielle de croissance. Maintenues en conditions photopériodiques défavorables à 20°C pendant 15 jours après le repiquage, les colonies ne sexualisent que rarement et irrégulièrement lorsqu'elles sont replacées en conditions normalement inductrices. Après 12 jours on observe les mêmes résultats. Une durée de 10 jours après le repiquage semble être la limite pour que les cultures axéniques maintenues en conditions photopériodiques défavorables, à 20°C, fournissent encore de l'ordre de 30 % de colonies sexuelles lorsqu'elles sont replacées en conditions normalement inductrices pendant 3 à 5 cycles. L'abaissement de la température prolonge cette aptitude à réagir à l'éclairement.

La colonie vieillit donc dans son ensemble, alors que les individus sont encore relativement jeunes : au 12ème jour, à 20°C, on en est au début du plateau de la courbe de multiplication cellulaire. L'inaptitude à réagir au stimulus lumineux qui déclenche la sexualisation semble donc liée à l'inaptitude à la multiplication cellulaire, qui est elle-même probablement conditionnée par l'accumulation dans le milieu de substances organiques auto-antagonistes que LEFEVRE (1939) avait déjà signalées chez les Desmidiées puis chez de nombreuses autres Algues et qui, sans être toxiques, inhibent la multiplication, bien que le milieu soit encore suffisamment riche en éléments minéraux pour n'être pas un facteur limitant.

CHARDARD (1966) a étudié la cytologie infrastructurale du Cosmarium lundellii et du Closterium acerosum auto-inhibés. Il y observe une hypertrophie de l'appareil de Golgi, une accumulation d'amidon dans les plastes et de globules lipidiques intracytoplasmiques ("dégénérescence graisseuse"). Ces aspects infrastructuraux sont très voisins de ceux des cellules sexuellement induites et présentent également une convergence avec les aspects des cellules d'Algues placées en milieu hypertonique ou carencées en azote. Cependant, si ces différents facteurs induisent des aspects cytologiques très voisins, il semble que seul un éclairement approprié oriente les cellules sur la voie de la conjugaison.

Nous avons voulu vérifier si l'accumulation des substances organiques excrétées en même temps que le mucus pouvait avoir une influence sur la sexualisation.

Des cultures axéniques sont maintenues pendant 15 jours, à 20°C, en lumière blanche (du type grolux) continue faible de l'ordre de 1500 lux ; elles sexualisent en fournissant environ 50 % de cellules sexuelles. Après 10 jours les cellules sont tassées dans un abondant mucus et n'évoluent plus. Les galettes de gélose de 3 boîtes de Pétri portant ces cultures, sont partagées en 4 zones qui sont transférées dans des boîtes stériles.

La zone 1 sert de témoin et ne subit pas de modification.

La zone 2 est abondamment lavée par plusieurs passages d'eau distillée stérile de façon à diluer éventuellement les substances auto-inhibitrices tout en laissant les cellules en place.

La zone 3 est débarrassée de ses cellules à la pipette, à sec, en laissant le plus possible de mucus sur la gélose.

La zone 4 est débarrassée des cellules et du mucus et lavée à l'eau distillée stérile.

Dans les zones 3 et 4 sont repiquées des cellules âgées de 15 jours, maintenues à 18°C, en lumière atténuée, sur un rythme 12 : 12 h, dont les colonies ne sont qu'au stade 16 cellules, sans mucus abondant.

Toutes les boîtes sont replacées à 20°C, en lumière blanche grolux, avec un éclairement de 2500 lux, sur un rythme 18 : 6 h, et sont observées après 7 jours.

La zone 1 ne montre aucune nouvelle bipartition et les cellules ont un aspect dense.

Les cellules de la zone 2, auparavant dispersées sur la gélose, ont formé de petites colonies de 8 cellules ; quelques-unes montrent des préconjugaisons.

La zone 3 montre des cellules isolées ou par paires ; les cellules repiquées ne se sont pas divisées ou ont subi au plus une bipartition.

La zone 4 montre des colonies au stade 16 ou 32 cellules, avec quelques stades sexuels (de l'ordre de 10 % des colonies). Ce n'est donc pas l'appauvrissement du milieu après 15 jours de culture qui inhibe la sexualisation mais bien l'accumulation du mucus et des substances auto-antagonistes. Ces substances, qui n'ont pas été isolées à notre connaissance chez les Desmidiées, sont chez la plupart des autres Chlorophycées des polysaccharides et des acides organiques (HELLEBUST, 1974). Elles sont excrétées en plus grande abondance à température élevée et sous des éclairements intenses. Cela explique probablement qu'à 14°C nous constations une période de sexualisation très longue.

Le repiquage des cultures pendant plusieurs mois dans les mêmes conditions inductrices optimales provoque un affaiblissement de la réponse sexuelle qui devient irrégulière et peut finir par disparaître. L'aptitude à produire des zygospores peut être restaurée par passage en conditions non sexualisantes favorables à la multiplication végétative. Cette aptitude peut se maintenir virtuelle pendant plusieurs mois (4 mois à 14°C, 6 mois à 4°C à l'obscurité) et s'extérioriser après repiquage en conditions inductrices.

Lorsque les cultures sont placées en lumière intense (2600 lux) sur milieu carencé en nitrate le processus est accéléré : après 3 cycles à héméropériode longue, 10 % des cellules environ se sont transformées en zygospores. 80 % environ sont appariées. Après 5 cycles, la quasi totalité des cellules a fourni des zygospores et cela quel que soit l'âge des cellules qui ont servi au repiquage.

STARR (1954), BIEBEL (1964) utilisent des cultures âgées de 4 à 8 semaines et probablement enrichies en lipides et en amidon pour la recherche de la sexualisation dans des conditions de carence en nitrate. Effectivement, dans ces conditions on accélère également les phénomènes de sexualisation chez *Closterium moniliferum* mais il faut noter l'aspect jaunâtre et atypique des cellules, et surtout souligner que la germination des zygospores ainsi obtenues est presque nulle.

III.2.4 Lumière et synchronisation des cultures :

L'alternance lumière/obscurité est un procédé classique pour la synchronisation des cultures d'Algues vertes. Ce synchronisme peut être obtenu chez

Closterium moniliferum pour 80 % des colonies environ lorsque les cultures, après un séjour de 48 à 72 heures à l'obscurité complète, à 20°C, sont replacées dans une enceinte soumise à des cycles photopériodiques. A 21°C, pour un éclairement de 1300 lux et sur un rythme de 16 : $\overline{8}$ h, les mitoses commencent environ 1 h. après le début de la phase obscure. Un maximum de divisions s'observe vers 2 h. et il n'y en a plus après 3 h 30. Ceci est tout à fait conforme aux observations de BRANDHAM et GODWARD (1965d) sur d'autres Desmidiées et c'est dans ces conditions que nous avons pu étudier la mitose.

III.2.5 Influence de la composition spectrale de la lumière blanche fournie :

Le remplacement accidentel des tubes fluorescents du type "blanc brillant de luxe" par des tubes du type "cool-white" ou "blanc industrie" a provoqué une baisse du rendement en zygospores. Le retour aux conditions "blanc brillant" a restauré les potentialités sexuelles initiales. Nous avons alors pensé à utiliser des tubes du type "grolux" émettant une lumière riche en radiations rouges, qui font défaut dans la lumière émise par les tubes "cool-white". Ce type d'éclairement s'est révélé très favorable puisque nous avons pu abaisser à 13 h 30 -14 h la longueur des héméropériodes inductrices, sans cependant pouvoir diminuer leur nombre. En utilisant une lumière "grolux" continue faible (de l'ordre de 1500 lux) il est possible d'obtenir entre 95 et 100 % d'individus transformés en zygospores, avec très peu de cellules végétatives après 5 à 7 cycles photopériodiques. Les meilleurs aspects végétatifs, en conditions non inductrices, sont obtenus avec les tubes du type $F_{40}/T_{12}/Gro/WS$, émettant un large spectre de radiations, plus riche en radiations rouge sombre qu'aucun des autres types de tubes fluorescents existant sur le marché (fig. 8).

Ce sont ces observations presque fortuites sur l'influence du spectre de la lumière blanche fournie aux cultures qui nous ont donné l'idée d'expérimenter l'action des lumières monochromatiques sur la sexualisation de cette Algue, fournies seules ou en appoint à une période d'éclairement blanc destinée à assurer un minimum trophique.



courbes 8a n'ont pas été mis en évidence.

Fig.8_Répartition spectrale des différents types de lampes fluorescentes utilisées.

III.3 - EXPERIENCES EFFECTUEES EN LUMIERE MONOCHROMATIQUE.

III.3.1 Lumières approximativement monochromatiques :

Il s'agit d'enceintes éclairées par des tubes Philips émettant une lumière "colorée" bleue, verte ou rouge. Le large spectre d'émission de ces tubes est corrigé par l'interposition de filtres de "Plexiglas" Rohm et Haas. Un spectro radiomètre S.R. ISCO a permis d'établir les spectres des lumières reçues au niveau des cultures (fig. 9).



Figure 9 : Répartition spectrale des lumières approximativement monochromatiques obtenues à l'aide de tubes fluorescents Philips et de filtres "Plexiglas" Rohm et Haas.

* Prété par le laboratoire de Physiologie du Professeur ROLLIN.

L'énergie de l'éclairement est approximativement, au niveau des boîtes, de 1750 ergs.cm⁻².s⁻¹ dans le "rouge", de 1600 ergs.cm⁻².s⁻¹ dans le "vert", de 1500 ergs.cm⁻².s⁻¹ dans le "bleu", qui est un peu "faible" par rapport aux autres conditions. Les boîtes de Pétri sont placées à l'endroit, et la déperdition d'énergie à travers le couvercle de matière plastique est de l'ordre de 10 % d'après PREVOST-MONNOT (1974). Sauf indication contraire, toutes les expériences ont été effectuées à 20°C \pm 1°C, pendant 7 cycles de 24 heures.

a - Lumière "monochromatique" continue :

-"bleu" : aucune sexualisation, excellente croissance végétative.

-"vert" : aucune sexualisation dans le cas des souches axéniques. Une sexualisation faible et aléatoire (< 10 % des cellules) dans le cas des souches non axéniques. La multiplication végétative est normale, malgré des conditions défavorables à la photosynthèse.

-"rouge" : pour les souches axéniques, la réponse sexuelle positive après 5 jours de cultures varie entre 60 et 80 % de cellules sexuelles par rapport au nombre total des cellules. Pour les souches non axéniques, on obtient après 3 à 5 jours les premiers appariements, et après une semaine 90 à 95 % des cellules se sont transformées en zygospores. Ces réponses sont très comparables à ce que l'on observe en éclairement "grolux" continu, de faible intensité (photographie de la page de garde).

b - Lumière "monochromatique" : 18/obscurité : 6 h :

Les résultats sont pratiquement identiques à ceux de l'expérience précédente. Dans le "rouge", les premiers appariements sont obtenus en 3 à 5 jours après le début de l'exposition, quelles que soient les conditions de culture (sauf l'obscurité complète, qui retarde alors le processus de 5 à 7 jours) pendant les 5 jours suivant le repiquage, dans le cas des colonies non axéniques. Ce délai est un peu plus long (5 jours minimum) pour les souches axéniques. Dans le cas inverse (1 ou 2 jours d'exposition à la lumière "rouge" puis passage en "vert" ou en bleu") on n'observe aucun effet stimulant. L'effet de la lumière "rouge" ne se conserve pas dans les autres conditions.

c - Lumière monochromatique en appoint de longue durée à 20°C :

L'éclairement est fourni selon la séquence : lumière blanche "cool-white" 12 h, lumière "monochromatique" : 6 h/obscurité : 6 h, à 20°C. Lorsque la période

trophique de 12 h est donnée avec un éclairement de 1300 lux environ, on n'obtient aucune réponse sexuelle quelle que soit la lumière d'appoint.

Lorsque la période trophique de 12 h est donnée avec un éclairement de 2600 lux environ, c'est seulement lorsque la lumière d'appoint est "rouge" que l'on obtient une réponse sexuelle, de l'ordre de 70 % des cellules pour les souches non axéniques, de l'ordre de 50 % pour la souche axénique.

d _ Lumière monochromatique en appoint de longue durée à 10°C :

L'éclairement est fourni selon la séquence:lumière blanche "cool-white" : 12 h, à 2600 lux et 20°C/lumière "monochromatique" : 6 h à 10°C/obscurité : 6 h à 20°C. Dans tous les cas on observe un retard dans la multiplication. Au 5ème jour, les colonies sont au stade 4 cellules au lieu de 8 cellules habituellement à 20°C. Aucune des conditions n'induit la sexualisation, même après un temps de culture prolongé jusqu'à 15 jours. Il est probable que la photosynthèse, ralentie à basse température, joue un rôle dans la sexualisation même dans la période d'appoint.

e - Lumière monochromatique en appoint de courte durée :

L'éclairement est fourni selon la séquence:lumière blanche "cool-white": 14 h à 2600 lux/lumière "monochromatique" : 15 mn à 20°C/obscurité : 9 h 45. Dans tous les cas la réponse sexuelle est négative. Le rôle de la photosynthèse, même dans la période d'appoint, semble se confirmer : un appoint de lumière rouge clair trop bref est inefficace pour faire basculer les cellules de l'état végétatif à l'état sexuel.

f - Eclairements interrompant de longues périodes obscures :

Cette série d'expériences a été effectuée à 20°C avec des colonies non axéniques. La période trophique est fournie par un éclairement fluorescent blanc soit du type "cool-white" soit du type "Gro-lux", avec une intensité de 2500 lux environ pendant un temps variant de 13 h à 15 h. La phase obscure de 11 h à 9 h a été interrompue par deux périodes d'éclairement soit "blanc", identique à celui de la période trophique, soit "rouge", λ 660 nm, 1000 ergs.cm⁻².s⁻¹, soit "bleu", λ 450 nm, 1500 ergs.cm⁻².s⁻¹, de 30 mn chacune, situées 3 heures après le début et 3 h 30 avant la fin de la période obscure. Les observations sont effectuées après 7 cycles de ce type :



Les expériences ont été répétées en général 4 fois, avec 3 boîtes de Pétri dans chacune des conditions. Le résultat est exprimé en pourcentage moyen de colonies sexuelles, arrondi à la dizaine la plus proche du fait de la grande variabilité d'une boîte à l'autre.

* Eclairement trophique fourni en lumière du type "Cool-white"
13 : 11 h. Ni les témoins ni les cultures ayant reçu les interruptions décrites ci-dessus ne sexualisent.

14,5 : $\overline{9,5}$ h. Seules les cultures recevant les interruptions "rouge" montrent de faibles signes de sexualisation (< 1 %).

15 : 9 h.

	Interruptions en lumière					
Pas d'interru	ptions :témoin	blanche	rouge	bleue		
exp. n ^o 1	0	5	0	10		
exp. nº 2	2	30	80	30		
exp. n° 3	5	50	50	20		
exp. nº 4	1	60	50	30		
* Eclairement trophique fourni en lumière du type "Gro-lux"
13 : 11 h. Aucune sexualisation dans aucune condition.
14 : 10 h.

Pas d'interruptions:témoin		interruptions en lumière			
		blanche	rouge	bleue	
exp. nº 1	0	5	10	10	
exp. nº 2	1	40	50	2	
exp. nº 3	0	60	80	50	
exp. nº 4	1	0	0	1	

15 : 9 h.

	interruptions en lumière			
Pas d'interruptions:témoin	blanche	rouge	bleue	
exp. n° 1 60	70	80	60	
exp. nº 2 80	90	90	80	
		•		

- <u>Conclusions</u> : La durée de la période trophique minimale à fournir aux cellules pour qu'elles sexualisent varie avec la qualité de la lumière blanche fournie. Nous avions déjà constaté (p. 113) l'influence favorable de l'éclairement de type Gro-lux riche en radiations rouges.

Les interruptions des nuits longues critiques complétant des périodes trophiques minimales ont en général un effet promoteur sur la sexualisation, mais les résultats ne sont pas très précis. Les interruptions données en lumière "rouge" ou "blanche" ont sensiblement le même effet. La lumière "bleue" est moins efficace.

g - <u>Interruptions des nuits longues critiques par des éclairements "rouge clair</u>" ou "rouge sombre" :

Ces expériences ont été effectuées à 20°C avec des colonies non axéniques. La période trophique est donnée par un éclairement de type "Gro-lux", pendant 13 h 30, avec une intensité d'éclairement de l'ordre de 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹. L'interruption des nuits longues est effectuée soit 1 heure soit 4 heures après le début de la nyctipériode, par un éclairement "rouge clair" λ 660 nm, d'environ 1000 ergs.cm⁻².s⁻¹ pendant 5 mn ou par un éclairement "rouge sombre" λ 730 nm d'environ 1200 ergs.cm⁻².s⁻¹ obtenu par une superposition de papiers "cellophane" rouges et bleus placés devant une lampe à incandescence (spectre de la figure 10) pendant 15 mn. Comme précédemment chaque expérience porte sur 3 boîtes de Pétri dans chacune des conditions et le résultat est exprimé en pourcentage moyen de colonies sexuelles. Les témoins ne sexualisent pas.



Figure 10 : Répartition spectrale de la lumière rouge sombre obtenue à l'aide d'une lampe à incandescence et d'un filtre constitué par 2 couches de "cellophane" bleue et 2 couches de "cellophane" rouge.

(mesures effectuées tous les 25 nm avec un spectroradiomètre ISCO; à 750 nm, passage du spectre visible dans l'infra-rouge).

Séquences des interrup- tions de la nyctipériode	Moment de l'interruption après le début de la nyctipériode 1 heure 4 heures				de ures		
*****	exp. 1	2	3	4	5	6	7
RC 5 mn	50	50.	· 50	10	1	70	5
RS 15 mn	10	5	2	5	0	5	0
RC 5 mn + RS 15 mn	20	20	5	30	10	40	5
RC 5 mn + RS 15 mn + RC 5 mn	20	5	50	50	40	1	0

Le RC donné seul a un effet promoteur. Le RS donné seul n'est pas complètement inhibiteur, il n'efface pas totalement l'effet du RC lorsqu'il lui succède, et de même le RC ne lève pas totalement l'effet du RS lorsqu'il lui succède.

Ces résultats sont plutôt confus, et bien moins nets que dans les expériences classiques effectuées avec la matériel type : germination des akènes de Laitue "Grand Rapids". Les interruptions de la nuit "critique" sont d'ailleurs beaucoup plus efficaces dans le cas des plantes "de jour court". Les plantes "de jour long" réagissent beaucoup moins nettement à ce type d'expérience, qui est cependant considéré comme le critère de l'existence ou non d'un photopériodisme.

Il est d'ailleurs possible que les Algues réagissent plus lentement que les végétaux supérieurs aux interruptions de la nyctipériode. DRING (1967), dans ses expériences sur *Porphyra tenera* montre que seules sont efficaces des interruptions de longue durée (1 h) et de forte intensité (1000 lux en lumière blanche).

En outre, la variabilité des réponses d'une expérience à l'autre laisse assez sceptique : pour l'effet du rouge clair seul on peut avoir 50 % de colonies sexuelles ou seulement 1 % selon les expériences.

III.3.2 Lumières rigoureusement monochromatiques :

Les lumières monochromatiques utilisées ont une bande passante de l'ordre de 10 nm[×]. Les expériences ont été effectuées à 20°C. Les longueurs d'onde utilisées sont les suivantes : 425, 445, 470, 490, 510, 530, 550, 570, 590, 620, 655, 680, 693, 710 et 730 nm. Les cultures axéniques, en boîtes de Pétri plastiques, sont disposées de manière à recevoir des quantités d'énergies isoquantiques. Les cultures sont d'abord maintenues 4 jours en lumière blanche atténuée non inductrice selon un rythme 12 heures de lumière - 12 heures d'obscurité, puis elles sont transportées au Phytotron et placées en lumière monochromatique pendant 7 jours. Les observations sont donc effectuées 11 jours après le repiquage.

a - Eclairement monochromatique seul :

Nous exposerons les expériences dans l'ordre où elles ont été effectuées, par rectifications successives. Cela nous permettra de mettre en évidence les difficultés qu'a suscité l'utilisation des lumières monochromatiques seules. La première expérience a été réalisée par comparaison avec ce que nous obtenions en lumière approximativement monochromatique rouge, à 1750 ergs.cm⁻².s⁻¹ environ, pendant 3 à 5 cycles de 18 heures sur des cultures non axéniques.

al) La période d'éclairement est de 18 heures avec une énergie de l'ordre de 1250 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm ; elle est suivie d'une période obscure de 6 heures Le graphique a de la figure 11 montre la multiplication végétative en fonction de la longueur d'onde. On observe de très rares zygospores pour 680 nm. Au vu de ces faibles résultats, nous allons essayer d'activer la multiplication cellulaire (puisqu'en lumière blanche elle va se pair avec une sexualisation satisfaisante) en augmentant à la fois le temps d'exposition et le niveau d'énergie ; mais nous sommes limités par le fait que l'énergie maximaleque l'on puisse utiliser dans le bleu 445 nm si l'on veut éclairer la surface d'une boîte de Pétri est de l'ordre de 3200 ergs.cm⁻².s⁻¹, ce qui correspond à une énergie de l'ordre de 2000 ergs. cm⁻².s⁻¹ dans le rouge 680 nm.

* Elles ont été fournies par l'illuminateur spectral du Phytotron aimablement mis à notre disposition par Monsieur JACQUES.



BUS

2000 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm, 24 h : 0 h.

() () a2) <u>La période d'éclairement est de 19 h 30</u> avec une énergie de l'ordre de 2000 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm. Elle est suivie d'une période obscure de 4 h 30. La courbe de multiplication cellulaire est figurée sur le graphique 11b. Seules les longueurs d'onde 680 et **693** nm permettent d'observer de rares conjugaisons.

a3) <u>L'éclairement est continu</u>, avec une énergie de l'ordre de 2000 ergs. cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm.

La multiplication cellulaire est activée, sans atteindre cependant le niveau obtenu en lumière blanche de 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹ (figure 11c et 14.1); elle montre deux pics pour 680 et 445 nm. Nous en discuterons plus loin en la comparant aux courbes obtenues dans les diverses conditions d'applications de la lumière monochromatique d'appoint. La sexualisation s'observe pour les longueurs d'onde 620 et 655 nm avec des pourcentages respectifs de cellules sexuelles de 31 et 44 %. De rares conjugaisons sont observées pour 490 nm.

a4) Dans cette condition d'éclairement continu, nous avons voulu voir s'il existait une relation entre la taille des cellules et la sexualisation, comme chez beaucoup de plantes à fleurs de jour long où la mise à fleur est précédée d'un allongement de la tige. La variation du rapport largeur/longueur des cellules est mise en parallèle avec la multiplication végétative et la sexualisation sur les graphiques de la figure 12.



Figure 12: Comparaison entre multiplication cellulaire, pourcentage de sexualisation et rapport 1/L en lumière monochromatique continue de l'ordre de 2 000 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm, après 7 jours de culture, à 20°C.

124

Le rapport 1/L varie peu autour de 0,16 ; cependant il atteint 0,20 à 655 nm dans la condition où la sexualisation est la plus importante. Il semblerait que les cellules longues demeurent végétatives et que l'induction sexuelle s'accompagne d'un raccourcissement des cellules (qui pourrait être consécutif à une multiplication plus active, les cellules se divisant plus fréquemment s'allongeraient moins ; mais cette explication ne tient pas, puisque pour 445 nm où la multiplication végétative est également active nous observons des cellules longues et aucune sexualisation).

b - <u>Eclairement monochromatique d'appoint à une période trophique fournie en lu-</u> mière blanche :

b1) <u>L'éclairement monochromatique d'appoint est fourni pendant 6 heures</u> <u>avec une énergie de 1250 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm</u>. Il succède à une période d'éclairement blanc de 12 heures fourni par des tubes fluorescents Mazda "Blanc super" avec une énergie de l'ordre de 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹, il est suivi d'une période obscure de 6 heures. Dans ces conditions aucune sexualisation n'a été observée après 7 jours de culture. La courbe de multiplication végétative est figurée en 13b.



Figure 13 : Influence des radiations monochromatiques sur la multiplication végétative du C. monitigerum.

Les cellules issues de la multiplication d'une cellule originelle constituent une colonie et leur nombre est déterminé au llème jour de culture, après 4 jours en lumière blanche atténuée et 7 jours en lumière monochromatique seule ou en appoint à une période d'éclairement blanc de 12 h (10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹).

a) - ∇ - Lumière monochromatique seule (2 000 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm pendant 19 h 30).

b) ---- Lumière monochromatique d'appoint (1 250 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm pendant 6 h).

c) Spectre d'absorption in vivo. La densité optique a été arbitrairement ramenée à 0 pour l= 750 mm.



Fig. 14_Influence des radiations monochomatiques sur la sexualisation du <u>C.moniliferum</u>.

-

b2) <u>L'éclairement monochromatique d'appoint est fourni pendant 4 h 30</u> <u>avec une énergie de l'ordre de 2000 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm</u>; il succède à une période d'éclairement blanc de 13 h 30 fourni par des tubes Sylvania Gro-lux F 40 T 12 avec une énergie de l'ordre de 12 000 ergs.cm⁻².s⁻¹. Il est suivi d'une période obscure de 6 heures. Les témoins qui ne reçoivent que 13 h 30 de lumière blanche sexualisent très peu. Les lumières d'appoint les plus efficaces sont situées dans le rouge (et plus particulièrement le rouge sombre 730 nm) et dans le bleuvert 490 nm (figure 14.2) pour lesquels la sexualisation atteint respectivement 85 et 71 %, ce qui est peu fréquent en lumière blanche avec la souche axénique.

b3) <u>L'éclairement monochromatique d'appoint est fourni pendant 4 h 30</u> <u>avec une énergie de 500 ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 680 nm</u>. Il succède à une période d'éclairement blanc de 13 heures fourni par des tubes Sylvania Gro-lux F 40 T 12 avec une énergie de l'ordre de 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹, immédiatement (figure 14.3) ou après une période obscure de 4 h 30 (figure 14.4). Il est suivi d'une période obscure de 6 h 30 (figure 14.3) ou de 2 heures (figure 14.4). Dans le cas n° 4 l'éclairement d'appoint s'intercale donc entre deux courtes périodes obscures et il est fourni dans la seconde partie de la nuit longue critique.

Dans le cas n° 3 nous observons à nouveau une sexualisation importante dans le bleu-vert (490 nm) et dans le rouge (693 nm). Dans le cas n° 4, l'effet est beaucoup moins net ; il disparaît dans le bleu-vert et il est remplacé par un effet dans le jaune (590 nm). Deux autres réactions favorables s'observent pour 680 et 730 nm. JACQUES et LECHARNY (1976) signalent qu'à 580 nm la teneur en chlorophylle des feuilles du *Chenopodium polyspermum* est maximale. L'appoint de longue durée au milieu de la période obscure pourrait ainsi,à 590 nm, favoriser l'élévation de la teneur en chlorophylle et permettre une accumulation d'amidon plus importante pendant la période trophique suivante.

c - Eclairements monochromatiques brefs interrompant une longue période obscure :

De brèves interruptions d'une période obscure de 10 h 30 succèdant à une période d'éclairement blanc Gro-lux de 13 h 30 avec une énergie de l'ordre de 12 500 ergs.cm⁻².s⁻¹ non ou faiblement inductrice, par des éclairements monochromatiques à 445, 655 et 730 nm n'ont pas donné de résultats cohérents. Toutes les conditions se sont révélées plus ou moins favorables à la sexualisation. Les résultats les plus importants (53 % de colonies sexuelles après 6 cycles interrompus) ont été obtenus avec une succession d'éclairements rouge 655 et bleu 445, de 10 minutes chacun (figure 15).



Figure 15 : Influence des interruptions de longues périodes obscures par des éclairements rouge clair, rouge sombre et bleu.

Les témoins ne subissent pas d'interruption. Les autres cultures reçoivent 6 cycles, à 20°C, selon le schéma ci-dessous.



d - Essai de dissociation des rôles respectifs de la photosynthèse et du photopériodisme :

La charge photosynthétique a été fournie en lumière monochromatique "bleue" en interposant sur le flux de lumière blanche fournie par les lampes Xénon les filtres interférentiels MTO suivants :

λ	r	ΔX
442 nm	0,39	14 nm
443 nm	0,35	13 nm
445 nm	0,29	12 nm
446 nm	0,34	12 nm

L'énergie maximale possible à cette époque sans provoquer l'échauffement des filtres est de l'ordre de 4500 ergs.cm⁻².s⁻¹ au niveau des cultures, qui sont effectuées dans des tubes à hémolyse ; 8 tubes peuvent être placés dans la tache lumineuse colorée fournie par chaque lampe. L'observation des colonies à la loupe binoculaire est difficile à travers les parois épaisses des tubes à hémolyse et un nombre restreint (entre 20 et 30) a été compté chaque fois ; les pourcentages donnés n'ont qu'une valeur indicative, et il vaudrait mieux traduire les résultats par "réponse positive".

La période trophique dure 18 heures, l'éclairement d'appoint est fourni pendant 4 heures aux longueurs d'onde suivantes :

×			
А	e	Δ. λ	energie de l'ordre de
445 nm	0,20	12 nm	$4500 \text{ ergs.cm}^{-2} \text{.s}^{-1}$
491 nm	0,30	1 8 nm	$7000 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$
661 nm	0,33	10 nm	7000 ergs.cm ⁻² .s ⁻¹
720 nm	0,47	11 nm	$7000 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Il est suivi d'une période obscure de 2 heures.

Tous les résultats ont été négatifs sauf pour la lumière d'appoint de longueur d'onde 661 nm. Dans les deux expériences effectuées, nous avons observé après 10 cycles de 24 heures les pourcentages suivants de colonies sexuelles, présentant au moins un couple de zygospores (les résultats sont donnés dans l'ordre où les tubes sont placés dans le cercle lumineux).

* λ longueur d'onde

20

 ${\boldsymbol{\mathscr C}}$ transmission

 $\Delta \lambda$ largeur de la bande passante

lère expérience : 0% - 8%; 15% - 12%; 30% - 10%; 5% - 5%2ème expérience : 5% - 2%; 60% - 50%; 95% - 50%; 10% - 5%.

Les tubes extrêmes présentent probablement des résultats plus faibles à cause de la diminution de l'énergie de l'éclairement vers les bords de la tache.

Bien que la multiplication végétative soit normale en lumière "bleue" (après 10 cycles les colonies sont pour la plupart au stade 32 cellules) et que l'aspect des cellules végétatives soit excellent, 18 ou 22 heures d'éclairement "bleu" à 4500 ergs.cm⁻².s⁻¹ ne suffisent pas à induire la sexualisation. Les plastes présentent des crêtes très apparentes, et on ne met en évidence avec le lugol que très peu d'amidon, localisé autour des pyrénoïdes. Il se pourrait que ce défaut d'accumulation d'amidon soit dû à une photosynthèse trop faible.

Il est possible également que, comme chez Chlorella pyrenoïdosa (KOWALLIK, 1970), la lumière "bleue" favorise la synthèse de protéines aux dépens de l'accumulation de glucides, pour un poids sec équivalent. KOWALLIK a montré qu'après 8 heures d'illumination, en lumière bleue, la matière sèche comporte 50 % de protéines et 15 % de glucides tandis que des cultures parallèles en lumière rouge contiennent 29 % de protéines et 38 % de glucides. Cet effet apparaît indépendant de la photosynthèse.

La lumière d'appoint "rouge" intense (7000 ergs.cm⁻².s⁻¹ environ à 661 nm) fournie pendant 4 heures à chaque cycle, pourrait permettre cette accumulation d'amidon.

Lorsque nous avons pu disposer d'un monochromateur, nous avons tenté d'obtenir en lumière bleue une énergie suffisante pour accumuler dans les cellules l'amidon nécessaire à la sexualisation.

<u>lère expérience</u> : Après 10 cycles de 24 heures à 18°C, en lumière bleue continue de longueur d'onde 445 nm avec une énergie de l'ordre de 5000 ergs.cm⁻².s⁻¹ on observe de faibles indices de sexualisation (< 3 %) ; les zygotes sont peu nombreux et de petite taille. Les témoins, à 20°C, en lumière blanche continue faible de l'ordre de 6000 ergs.cm⁻².s⁻¹ ont commencé à sexualiser après 6 cycles de 24 heures.

Après 14 cycles de 24 heures, on n'observe aucune amélioration de la sexualisation (moins de 3 % des cellules ont fourni des zygospores) bien que la multiplication végétative soit excellente. Les cellules sont vert clair, allongées, avec des pyrénoïdes très apparents, ce qui indique une faible teneur en amidon.

Après 14 cycles de 24 heures dans le rouge 681 nm, soit pendant 12 h/24 avec une énergie de 10 000 ergs, soit pendant 24 h/24 avec une énergie de 5000 ergs, on n'observe aucune sexualisation dans les tubes à hémolyse contenant des colonies axéniques.

<u>2ème expérience</u> : Des cultures axéniques sur milieu carencé en azote sont placées à 21°C, en boîtes de Pétri, dans les lumières monochromatiques suivantes et observées après 7 cycles de 24 heures.

- <u>bleu</u> : λ = 445 nm (monochromateur), énergie comprise entre 5000 et 6500 ergs. cm⁻².s⁻¹, éclairement continu : aucune sexualisation.

- <u>bleu</u> : $\lambda = 442$ nm ($\Delta \lambda = 14$ nm) avec filtre MTO. Energie comprise entre 15 000 et 18 000 ergs.cm⁻².s⁻¹^{*}, éclairement continu : des zygospores dans la partie centrale de la tache lumineuse dans 22 % des colonies environ.

- <u>rouge</u> : $\lambda = 681$ nm ($\Delta \lambda = 14$ nm) avec filtre MTO. Energie de l'ordre de 9000 ergs.cm⁻².s⁻¹, éclairement continu : des zygospores dans la partie centrale de la tache lumineuse dans 49 % des colonies environ.

- <u>rouge</u> : $\lambda = 681$ nm ($\Delta \lambda = 11$ nm) avec filtre MTO. Energie de l'ordre de 17 000 ergs.cm⁻².s⁻¹. Eclairement 12 h/24. Aucun indice de sexualisation.

Il est donc possible d'obtenir des sexualisations en lumière "bleue", mais en faisant agir en continu des énergies très importantes et il semble chez cette espèce quasiment impossible de dissocier les rôles respectifs de la photosynthèse et d'un éventuel phytochrome.

L'intervention d'un photopériodisme est démontée dans l'expérience ci-dessus : la même quantité globale d'énergie fournie en 24 heures n'a pas du tout le même effet selon qu'elle est donnée pendant 12 heures (réponse négative) ou pendant 24 heures (réponse positive).

* Un système de refroidissement amélioré des filtres a permis cette augmentation de l'énergie.

DISCUSSION DES RESULTATS - CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE.

a) Effet des radiations monochromatiques sur la multiplication végétative :

Compte tenu des 4 jours de latence imposés en lumière blanche non inductrice avant l'expérimentation en lumière monochromatique, on constate que (figure 11) seules les radiations bleues (445 nm) et rouge clair (680 nm) sont efficaces pour la multiplication cellulaire, les radiations vertes et jaunes ne la permettant pas, tout au moins sur milieu exclusivement minéral.

La courbe de multiplication cellulaire est superposable au spectre d'absorption de l'Algue *in vivo* (figure 13) et il semble que la photosynthèse soit le facteur prépondérant dans ce phénomène de multiplication. Contrairement à ce qui a été observé par LARPENT et JACQUES (1972) chez *Draparnaldia*, un phénomène d'élongation peut se manifester chez *Closterium* d'après les observations de LEFEVRE (1934). Dans le rouge sombre et le jaune, le rapport 1/L est de 0,15 environ, alors qu'il atteint 0,20 dans le rouge clair. La coloration par le Calcofluor-white permet d'ailleurs de rendre visibles les élongations successives d'un même hémisomate.

b) Effet des radiations monochromatiques sur la sexualisation :

- Nécessité d'un "minimum trophique" important

Il est certain que, comme chez Golenkinia étudié par ELLIS et MACHLIS (1968), la photosynthèse intervient dans le processus de sexualisation. L'accumulation d'amidon et de lipides observée dans les cellules conjugantes ne peut être réalisée que par une photosynthèse accrue par rapport à celle des cellules végétatives. Un "minimum trophique" important doit être fourni soit en lumière blanche, soit en lumière monochromatique intense et continue.

La qualité de la lumière blanche fournie influe d'ailleurs dans une certaine mesure sur la longueur de cette phase trophique, les tubes du type Gro-lux permettant de l'abaisser aux environs de 13 h 30 pour une énergie de l'ordre de 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹. L'effet favorable du CO_2 sur la sexualisation des Desmidiées observé par STARR (1955) pourrait s'expliquer par une activation de la photosynthèse. Les faibles résultats que nous avons obtenus avec les lumières monochromatiques seules sont probablement dus à une énergie insuffisante qui ne permet pas une multiplication suffisamment active ; dès que l'on offre aux Algues une période de lumière blanche intense, la courbe de multiplication cellulaire est nettement plus élevée.

- La photosynthèse n'est pas seule en cause

Cependant, la photosynthèse indispensable n'est pas seule en cause, comme chez Laminaria saccharina étudié par LUNING et DRING (1972 et 1975) où les radiations bleues ont un rôle prédominant sans qu'intervienne la photosynthèse.

L'addition de glucose au milieu de culture ne permet pas la sexualisation des cellules recevant 13 heures de lumière blanche, bien que le glucose soit absorbé par les cellules (voir expériences parallèles avec mannitol et glucose). Entre 1 et 5 g.l⁻¹, le glucose n'inhibe pas mais ne favorise pas non plus la sexualisation pour des éclairements plus prolongés.

L'addition de lumières monochromatiques d'appoint de faible énergie (500 ergs.cm⁻².s⁻¹) pendant 4 h 30 après une période de lumière blanche intense de 13 h 30 provoque des réponses pour des longueurs d'onde 490 nm et 693 nm où la photosynthèse est peu importante.

La charge photosynthétique en lumière bleue (445 nm) avec une énergie de l'ordre de 4500 ergs.cm⁻².s⁻¹ pendant 18 ou 22 heures permet une multiplication végétative presqu'aussi active qu'en lumière blanche mais on n'y observe pas de sexualisation. En lumière monochromatique continue, seul le rouge clair semble efficace pour promouvoir la sexualisation. KOWALLIK (1970) a montré que chez les Chlorelles la lumière rouge provoquait l'accumulation des glucides alors que les radiations bleues favorisaient au contraire l'accumulation des protéines et de l'A.R.N. Le même effet d'accumulation d'amidon et de saccharose en lumière rouge a été observé chez Vicia faba par SZASZ et BARSI (1971). Il est possible que chez ce *Closterium* également la lumière rouge favorise l'accumulation d'amidon qui précède la sexualisation. Cette importante teneur en amidon expliquerait la nécessité d'une photopériode en lumière blanche intense appliquée pendant plusieurs cycles consécutifs ; sinon la quantité d'amidon "se dilue" dans les cellules au cours des multiplications successives. Ceci expliquerait également le fait que "l'induction sexuelle" ne se maintienne pas au-delà de 48 heures et ne se manifeste pas avant 3 cycles photopériodiques au minimum. La bipartition préalable à l'émission des papilles de conjugaison complique encore la mise en évidence d'un photopériodisme.

- Il s'agit probablement d'une plante "de jour long"

Cette Algue, tout comme les *Stigeoclonium* étudié par ABBAS et GODWARD (1963) et *Chara fragilis* étudié par KARLING (1924) se comporte comme une plante supérieure de "jour long", d'ailleurs assez peu sensible puisqu'il lui faut au minimum 3 cycles de lumière intense pour sexualiser. Elle présente de grandes analogies de comportement avec la Jusquiame étudiée par SCHNEIDER et al. (1967) :

. nécessité d'une période d'irradiation longue et intense pendant plusieurs journées consécutives (plusieurs semaines pour la Jusquiame) ;

. influence de la qualité de la lumière fournie pendant la période trophique : la lumière des tubes fluorescents pauvres en radiations rouge sombre est moins efficace que la lumière de lampes à incandescence ou de tubes fluorescents riches en radiations rouges ;

. effet marqué du rouge sombre en appoint (et l'appoint doit être de durée relativement longue, avec une énergie importante) lorsque la période obscure est courte (8 heures pour la Jusquiame, 6 heures pour *Closterium*) et suit une période d'éclairement fluorescent pauvre en rouge sombre ;

. de brèves interruptions des nuits longues par un éclairement rouge clair, efficaces pour beaucoup de plantes de jour court, le sont beaucoup moins avec les • plantes de jour long. Le Pavot, qui ne réagit pas à ce type de stimulations (GENTNER et al., 1975) est cependant considéré comme une plante photopériodique de jour long.

Les conclusions des résultats obtenus avec la Jusquiame font intervenir l'hypothèse d'un pigment autre que le phytochrome qui serait responsable de l'action H E R (High energy reaction) [ou H I R (high irradiation reaction) selon HARTMANN (1966)], pour expliquer l'efficacité de la lumière rouge sombre et les résultats obtenus en lumière bleue. D'après JACQUES (1969) et MOHR (1972) il n'est pas nécessaire de faire appel à cet hypothétique pigment autre que le phytochrome. L'important effet du rouge sombre prolongé serait dû à un équilibre favorable entre les concentrations du phytochrome actif Pfr et du phytochrome inactif Pr et HARTMANN (1966) l'a montré par des irradiations simultanées à 768 nm et à 658 nm, toutes deux virtuellement inefficaces. Pour un certain équilibre, on obtient la même réponse qu'à 717 nm. BLONDON et JACQUES (1970) ont obtenu des résultats identiques dans l'initiation de la floraison chez la plante de jour long *Lolium temulentum*, montrant que l'action du rouge sombre s'exerce par le maintien d'un <u>pourcentage de phyto-</u> chrome actif faible.

SCHAFER (1975) a repris cette hypothèse et insiste sur le fait que ces réactions induites par le rouge sombre et le bleu agissant à haute énergie pendant des temps longs ne sont pas réversibles, ce qui expliquerait les résultats peu probants des expériences d'actions successives du rouge clair et du rouge sombre que nous avons effectuées.

Les résultats confus que nous avons obtenus par des interruptions des nuits longues critiques tiennent probablement au fait que ces interruptions ont été appliquées au hasard. JACQUES et LECHARNY (1976) ont montré que l'action du phytochrome n'est pas constante dans le temps au cours des périodes d'obscurité critiques chez le *Chenopodium polyspermum*. En prenant soin d'éliminer le phytochrome actif à la fin de la période d'éclairement trophique avec un éclairement rouge sombre de courte durée, on peut mettre en évidence, en ce qui concerne la croissance et l'induction florale, l'existence de quatre sous-périodes. Au cours de la première, qui dure 3 heures environ, l'éclairement rouge clair est inhibiteur ; au cours de la seconde (4 heures) la croissance est stimulée par la lumière rouge sombre, la lumière rouge clair n'a plus d'effet ; la troisième souspériode (5 heures) permet une inhibition de la croissance et de la floraison, la lumière rouge sombre n'a plus d'effet ; enfin, au cours de la dernière sous-période (3 heures) la lumière n'exerce aucun effet. Les expériences devraient être reprises dans ce sens.

Chez Closterium moniliferum nous observons la nécessité d'une période trophique de longue durée (13 h à 13 h 30), avec une énergie importante (entre 10 000 et 12 500 ergs.cm⁻².s⁻¹) et une qualité de lumière particulière, riche en radiations rouge clair qui permettent l'accumulation d'amidon dans les cellules, puis la nécessité d'une lumière d'appoint riche en radiations rouge sombre.

Cette énergie trophique peut difficilement être fournie en lumière monochromatique. Les radiations bleues (445 nm) fournies de manière continue avec une énergie de l'ordre de 5000 ergs.cm⁻².s⁻¹ permettent difficilement, après 10 cycles, l'obtention de rares zygospores. Avec une énergie de l'ordre de 18 000 ergs.cm⁻².s⁻¹ on obtient, après 7 cycles, 22 % de cellules sexuelles.

- Conclusion. Quel serait le pigment responsable ?

Au vu de ces résultats on pourrait penser que la photosynthèse intervient de manière prépondérante dans la sexualisation de cette Algue. Mais si elle est indispensable elle n'intervient pas seule. La durée de la période d'éclairement ne peut être ramenée en-dessous de ce seuil critique de 13 h 30 - 14 h, quelle que soit l'intensité de l'éclairement, même en lumière rouge 681 nm. Un éclairement d'appoint de longue durée (4 h 30), avec une énergie de l'ordre de 500 ergs.cm⁻².s⁻¹ permet d'obtenir la sexualisation pour des longueurs d'onde (490 nm et 693 nm) où la photosynthèse est peu importante. Il est donc probable qu'un mécanisme photopériodique intervient en même temps que la photosynthèse, mécanisme dont le médiateur pourrait être le phytochrome qui a d'ailleurs été extrait des cellules d'une autre Desmidiée (Mesotaenium, TAYLOR et BONNER, 1967). Par contre, il ne semble pas qu'intervienne dans la sexualisation l'hypothétique "pigment jaune" qui provoque chez Mougeotia le mouvement du plaste (HAUPT et SCHONBOHM, 1970) lors de l'éclairement par des radiations bleues de forte intensité, alors que le mouvement du plaste avec de faibles intensités d'éclairement est sous la dépendance du phytochrome.

ANNEXE : ETUDE PRELIMINAIRE DES CONDITIONS DE LA GERMINATION DES ZYGOSPORES DU CLOSTERIUM MONILIFERUM.

a) Conditions de la germination "normale" :

Après une période de maturation d'un mois et demi au minimum, les zygospores conservées à la lumière sur la gélose peuvent parfois germer spontanément. Mais le plus souvent une réhydratation par l'eau distillée ou le milieu de Waris est nécessaire au déroulement correct des différents stades de la germination, à la lumière du jour et à 20°C environ.

Contrairement à KIES (1964) qui observe chez *Closterium acerosum* un maximum de germination pour des zygospores âgées de 6 mois, puis une diminution avec le vieillissement, chez *C. moniliferum* les zygospores germent en totalité à partir d'un mois et demi à deux mois, et cette capacité se maintient jusqu'à environ 1 an, lorsque la gélose-support n'est pas complètement desséchée ; dans ce cas, les zygospores se dépriment et ne germent plus.

b) Influence de la température :

- Température de conservation :

Conservées à la température du laboratoire, les zygospores conservent très longtemps leur capacité germinative. Par contre, si elles sont conservées au moins une semaine dans un réfrigérateur entre 4 et 7°C, on n'observe plus de germination ; cette inhibition n'a pu être levée par l'utilisation de divers procédés réputés pour leur capacité à lever la dormance des graines ou des spores (choc thermique à 30°C, trempage dans l'éther, trempage dans une solution d'hélicase....).

- Température de réhydratation :

Pour des zygospores réhydratées par le milieu de Waris et placées à la lumière du jour à 10°C, la germination n'a pas lieu ; elle dure jusqu'à 10 jours à 16°C. A 20°C, les zygospores donnent de jeunes individus en 72 à 96 heures et on n'observe aucun synchronisme. Pour des températures de l'ordre de 25°C, toutes les zygospores germent en 72 heures environ ; de même à 30°C, mais dans ce cas les "gones" sont très pâles et non viables. Il se produit beaucoup de germinations anormales.

c) Influence des conditions dans lesquelles les zygospores ont été obtenues :

Le pouvoir germinatif est considérablement diminué, voire annulé, lorsque les zygospores ont été obtenues sur milieu carencé en nitrate ou sur milieu additionné d'inhibiteurs de synthèse des stérols à des doses non létales, conditions qui apparemment permettaient la formation de zygospores normales parfois en très grande quantité.

d) Influence de la lumière sur la germination :

Les résultats que nous avons obtenus sont très confus et contradictoires. Il semble cependant que nous puissions en dégager quelques idées directrices.

Passé un délai de un mois et demi pendant lequel la dormance est totale, les zygospores réagissent de façon très différente à la réhydratation selon qu'elles ont été conservées à la lumière ou à l'obscurité.

- Conservation à la lumière du jour :

Les zygospores obtenues en lumière "rouge" (lampe Philips et filtre Rohm et Haas) n'ont germé ultérieurement qu'en lumière "rouge".

Les zygospores obtenues en lumière blanche "Gro-lux" germent à la lumière du jour et en lumière rouge clair (660 nm), fournie en continu pendant 48 heures, avec une énergie de l'ordre de 5000 ergs.cm⁻².s⁻¹. La lumière rouge sombre (730 nm) fournie en continu avec une énergie de l'ordre de 7000 ergs.cm⁻².s⁻¹ et l'obscurité ne permettent pas la germination. La condition "obscurité" est obtenue en enveloppant les boîtes de Pétri où les zygospores ont été ensemencées de plusieurs épaisseurs d'aluminium. Le tout est placé dans des boîtes noires ayant servi à emballer du papier photographique, dans la même enceinte à 20°C que celles qui subissent un éclairement rouge clair ou rouge sombre.

Des temps d'exposition trop brefs(de l'ordre de 15 mn) à la lumière blanche ou rouge clair n'ont aucun effet. Un minimum de 3 heures d'éclairement intense est nécessaire, à partir de la réhydratation pour provoquer la germination, même si les zygospores sont ensuite remises à l'obscurité.

- Conservation à l'obscurité :

Les zygospores obtenues en lumière blanche "Gro-lux" à la température du laboratoire deviennent extrêmement sensibles au plus bref éclairement au moment de la réhydratation. Réhydratées en chambre noire, à la lumière jaune d'une lampe au sodium, elles deviennent capables de germer dans toutes les conditions : lumière blanche, rouge clair, rouge sombre et même obscurité complète. Dans ce cas la germination s'arrête au stade "2 jeunes individus" courts, de couleur vert pâle, dépourvus de pyrénoîdes. La possibilité de synthétiser de la chlorophylle à l'obscurité est connue chez plusieurs genres d'Algues vertes cultivées sur milieu organique (Chlamydomonas, Scenedesmus...) et dans quelques cas très particuliers de Spermatophytes (embryons de Citrus, de Pinus, de Picea....).

Si l'on prend la précaution de réhydrater les zygospores en présence d'un éclairement inactinique (lampe Philips "verte" PF 710 B) elles ne germent plus ni à l'obscurité ni en lumière rouge sombre.

La lumière a incontestablement une grande influence sur la germination des zygospores ; cependant, les expériences de réversion de l'effet de la lumière rouge clair par un bref éclairement rouge sombre dans le cas des zygospores conservées à la lumière, n'ont pas donné de résultats nets et cohérents, et aucun effet phytochrome n'a pu être mis en évidence, tout au moins dans nos conditions d'expériences.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION DE L'ETUDE CYTOLOGIQUE.

L'étude ultrastructurale de l'individu végétatif a apporté quelques précisions aux observations des auteurs qui avaient déjà étudié le genre Closterium. Les images de pores que nous avons pu obtenir confirment les conclusions de MIX sur la structure de la paroi particulière à ce genre. Des plasmalemmasomes, des structures paracristallines intraplastidales rarement observées chez les Algues ont été rencontrées. La structure de l'isthme n'avait pas été souvent observée ; elle est d'ailleurs fort simple et consiste en la juxtaposition de parois d'épaisseur inégale, sans formations en biseau.

Au niveau de l'individu en cours de sexualisation en réponse à l'influence de la lumière, nous avons pu mettre en évidence un enrichissement en amidon, la disparition des structures pseudogranaires dans le plaste, l'accumulation dans le cytoplasme de globules lipidiques de grande taille, et l'activation de l'appareil sécrétoire, caractères que l'on peut observer également dans les cellules soumises à un milieu hypertonique.

La formation des papilles de conjugaison et celle de la vésicule de conjugaison mucilagineuse constituée par la modification des parois dans la partie terminale des papilles présentent des caractéristiques propres à cette espèce, et qui peuvent faire l'objet d'une comparaison avec ce qui se passe chez d'autres Zygophycées.

LING et TYLER (1972) distinguent chez les Desmidiées Placodermes deux modes de conjugaison. Dans le premier cas, s'édifie un véritable tube de conjugaison ("cellulose bounded space") ; dans le second cas la conjugaison se fait dans une vésicule mucilagineuse. Tout en gardant cette distinction fondamentale, il est possible de l'étendre à l'ensemble des Zygophycées en précisant que l'origine et le mode de formation de la vésicule sont très variables.

a) Le tube de conjugaison :

La présence d'un canal nettement limité par une paroi cellulosique résistante, provenant de la fusion des papilles de conjugaison allongées en doigt de gant semble fréquente chez les Desmidiées Saccodermes. C'est la seule formation qui puisse être appelée "tube de conjugaison" si l'on suit la nomenclature de LING et TYLER ; elle persiste autour de la zygospore en la maintenant solidaire des gamétocystes. FRITSCH (1965) en donne de nombreux exemples, les plus connus étant Spirogyra, Zygnema... (Zygnématacées). Un tube de conjugaison semblable à celui des Zygnématacées se retrouve chez la plupart des Mésotaeniacées : Netrium digitus (BIEBEL, 1964), Mesotaenium kramstaï (STARR et RAYBURN, 1964) et chez quelques Desmidiacées : Closterium parvulum type et var., pour lequel COOK (1963) précise : "the conjugation tube completely separates the parental semicells and possesses a distinct wall which is comparable in thickness to that of the vegetative cells" et Closterium rostratum (DUBOIS-TYLSKI, 1973) sont pourvus d'un tel tube.

Le tube de conjugaison bien structuré peut être remplacé par des vésicules mucilagineuses de formes et d'origines variées.

b) Les vésicules de conjugaison :

1) C'est à l'intérieur d'une vésicule mucilagineuse préformée, nettement délimitée, maintenant les gamétocystes appariés, que se développent les papilles de conjugaison, qui présentent un stade à calotte réfringente avant de fusionner. L'enveloppe de cette vésicule persiste autour de la jeune zygospore. Le seul exemple de ce type semble être jusqu'à présent *Micrasterias papillifera* étudié par KIES (1968).

2) La vésicule mucilagineuse préformée qui maintient les gamétocystes n'a pas de limite nette. Les papilles s'y accroissent, présentent un stade à calotte réfringente, puis les protoplastes y fusionnent. Roya obtusa (KIES, 1967), Pleurotaenium ehrenbergii (LING et TYLER, 1972) présentent ce type de conjugaison. Il semble que ce soit également le cas chez Closterium evesiculatum où COOK (1963) décrit un "conjugating tube mucilaginous without a definite wall, not persisting".

3) La vésicule mucilagineuse qui maintient les gamétocystes est <u>sécrétée</u> <u>extemporanément par les papilles</u> elles-mêmes au cours de leur accroissement. Elles présentent une calotte réfringente fugace. Cette vésicule n'a pas de limite nette et elle disparaît pratiquement au moment de la conjugaison qui a lieu ainsi sans grande protection dans le milieu extérieur. *Closterium ehrenbergii* (LIPPERT, 1967), *Closterium moniliferum* (LIPPERT, 1967 ; DUBOIS-TYLSKI, 1973) présentent ce type de conjugaison. Cet appareil mucilagineux a été improprement appelé "tube de conjugaison" par FRITSCH (1965), CHADEFAUD (1960), LIPPERT (1967) et nous-même (1972). LING et TYLER (1972) ont attiré l'attention sur la non homologie de cette formation avec le tube de conjugaison des Zygnématacées, contrairement à l'opinion de TASSIGNY (1971).

4) Le terme "vésicule de conjugaison" devient extrêmement large lorsque les protoplastes fusionnent dans le mucilage sécrété entre les parois des gamétocystes chez Cosmarium botrytis (STARR, 1954a), Mesotaenium dodekaedron (GEITLER, 1965), Staurastrum gladiosum (FRITSCH, 1965) et peut être Closterium littorale (PICKETT-HEAPS et FOWKE, 1971).

5) Le terme ultime de la simplification est atteint chez Spirotaenia condensata (HOSHAW et HILTON, 1966) où la paroi tout entière des gamétocystes se gélifie ; les protoplastes fusionnent à l'intérieur d'un mucilage non structuré.

Ces variantes mineures dans le processus de la conjugaison vont de pair avec un degré plus ou moins grand de protection des gamètes; elles montrent la diversité des procédés à travers la classe des Zygophycées, sans rapport apparent avec les divisions systématiques admises par KRIEGER (1937) ou plus récemment par MIX (1972) d'après la structure des parois, bien que OKADA (1953, cité par BOURRELLY, 1972) ait préconisé une nouvelle classification fondée uniquement sur le mode de formation des zygotes.

Le faible degré de protection des gamètes du C. moniliferum est probablement lié à la sécrétion d'une <u>enveloppe callosique</u> autour de la jeune zygospore dès les premières heures de sa formation. C'est la première fois qu'un tel type d'enveloppe est mentionné autour d'un méiosporocyste d'Algue. Il était déjà connu chez certaines Hépatiques, chez les Sélaginelles et autour des macro et microsporocytes des Spermatophytes. Il est probablement l'expression d'une préadaptation au milieu aérien, idée déjà émise par STEINECKE (1924) (cité par FRITSCH, 1965).

Les Zygophycées constituent un groupe d'Algues vertes dépouvues de cellules mobiles. P. BOURRELLY nous avait suggéré de rechercher éventuellement dans les cellules gamètes des vestiges d'un appareil cinétique, dont la présence de vacuoles contractiles dans la jeune zygospore aurait pu rendre l'existence probable. Malheureusement, nous n'avons pu mettre en évidence de telles structures, ce qui ne prouve nullement qu'elles n'existent pas.

La zygospore mûre a montré, sur des images obtenues par M. ABADIE, des structures rarement observées chez les Algues, mais fréquentes chez les Spermatophytes : corps prolamellaire, phytoferritine, et d'autres particulières à ce matériel : présence d'une poche à déchets et d'une "zone gazeuse".

La germination de la zygospore n'avait pas fait l'objet jusqu'à présent d'une étude en microscopie électronique. Elle a permis de montrer l'évolution du système vacuolaire dans la vésicule de germination où coexistent vacuoles contractiles à contenu clair et vacuoles nutritives à contenu très dense. La métaphase observée n'a pas montré de cinétochore structuré. La dégénérescence d'un des noyaux des jeunes individus issus de la germination a pu être observée. Les jeunes "gones" sont caractérisés par la fréquence des inclusions paracristallines intraplastidales que l'on peut y observer. Leur structure rappelle de façon frappante celle des "stromacentres" observés par GUNNING (1965) dans les plastes d'Avoine. Elles pourraient être les précurseurs des pyrénoïdes qui se reforment *de NOVO* à ce stade.

L'étude cytologique nous a montré des modifications de la morphologie et de l'infrastructure en rapport avec les différents stades de la sexualisation et nous a amenée à essayer de définir le déterminisme de cette sexualisation.

SEXUALISATION ET ECOPHYSIOLOGIE DU C. MONILIFERUM.

Si nous reprenons les diverses hypothèses avancées pour expliquer la sexualisation des Desmidiées rappelées dans l'introduction, celle de COMERE (1906) accordant un rôle prépondérant à l'élévation de température et à l'assèchement du milieu ne peut être retenue pour cette souche. Nous avons vu que la sexualisation n'avait lieu de manière satisfaisante que dans les limites de température permettant la multiplication végétative, et qu'à 14°C on pouvait encore obtenir des zygospores abondantes. Quant à l'assèchement du milieu, il n'agit pas par l'augmentation de la pression osmotique, qui se révèle défavorable à la sexualisation comme nous l'avons montré par l'addition de mannitol au milieu de culture.

L'hypothèse de SCHREIBER (1925) faisant intervenir de manière prépondérante la carence en produits nutritifs et en particulier en azote a été réfutée dans le cas des souches axéniques de C. moniliferum, qui continuent de sexualiser malgré une augmentation importante de la teneur en nitrate du milieu de culture ; la carence en nitrate seule n'induit d'ailleurs jamais la sexualisation des souches non axéniques en l'absence d'un éclairement convenable.

Notre étude nous a montré qu'il n'y avait pas d'antagonisme entre multiplication végétative et sexualisation. Au contraire, tous les facteurs qui inhibent cette multiplication ont également un effet négatif sur la sexualisation. VILLERET (1966) avait déjà remarqué que "dans les conditions naturelles, l'observation des oeufs est souvent liée à un développement quantitatif important de l'espèce", cette abondance augmentant les chances de rencontre entre les individus compatibles.

La température, le pH, la composition du milieu ont, dans les limites où ils permettent une multiplication végétative active, peu d'influence sur la sexualisation. L'assèchement du milieu, l'élévation de sa pression osmotique et la diminution de sa teneur en nitrate ont probablement un rôle accessoire en favorisant la mise en place de structures cytoplasmiques analogues à celles des cellules sexuelles : augmentation de la teneur en amidon dans les plastes, régression des vacuoles, accumulation de globules lipidiques intracytoplasmiques. Le facteur externe déterminant semble être, pour cette espèce, et en accord avec la très ancienne hypothèse de KLEBS, la lumière ; le rôle de l'assèchement serait ainsi indirect : il provoquerait l'augmentation de l'éclairement au niveau des cellules en diminuant l'épaisseur de la couche liquide qui les surmonte.

La lumière joue un rôle quantitatif. L'éclairement trophique doit être fourni pendant un minimum de 12 à 14 h, avec une énergie de 10 000 à 12 500 ergs. $cm^{-2}.s^{-1}$. Au-delà de cette intensité, les plastes se décolorent et la multiplication est inhibée. Cet éclairement trophique est d'autant plus efficace qu'il est plus riche en radiations rouges (lampes du type Gro-lux par exemple).

La lumière joue également un rôle qualitatif, plus difficile à mettre en évidence. Un éclairement d'appoint fourni après une période trophique minimale, avec une faible énergie, pendant un temps relativement long (de l'ordre de 6 heures favorise la sexualisation dans les zones bleu-vert et rouge sombre du spectre. Un éclairement monochromatique seul permet difficilement la sexualisation : il faut fournir des énergies très importantes (de l'ordre de 15 000 ergs.cm⁻².s⁻¹ en continu dans le bleu 445 nm par exemple).

L'éclairement blanc continu est également favorable à la sexualisation pourvu que l'intensité n'en soit pas trop élevée (< 10 000 ergs.cm⁻².s⁻¹). Au-delà, l'induction sexuelle persiste mais des accidents de conjugaison empêchent la formation de zygospores normales.

Il est difficile de dissocier chez cette espèce les rôlesrespectifs de la photosynthèse et du photopériodisme. En outre, la bipartition qui précède la conjugaison complique encore cette dissociation : si l'éclairement est trop faible, la quantité de réserves accumulées lors de l'appariement "se dilue" entre les cellules-filles, d'où la nécessité d'un éclairement intense et prolongé. D'autres espèces de *Closterium* (par exemple *Closterium rostratum*) qui ne nécessitent pas de bipartition préalable à l'émission des papilles de conjugaison, constitueraient sans doute un matériel plus favorable pour la démonstration d'un photopériodisme.

Bien que les interruptions de nuits longues critiques par des éclairements rouge clair et rouge sombre n'aient pas donné de résultats concluants, on peut cependant, par analogie avec le comportement de certaines plantes à fleurs (Jusquiaze, Pavot) émettre l'hypothèse que Closterium moniliferum est une Algue "de jour long". Lorsque les cellules ont accumulé suffisamment de réserves, elles prennent un aspect sombre et dense, et certaines d'entre elles, rarement toutes, s'apparient. L'appariement s'accompagne de l'excrétion de mucilage qui maintient les cellules accolées. Il est peu probable que ce mucilage renferme des substances stimulantes pour la sexualisation du partenaire, ou alors en quantités minimes. Si elles existent, ces substances sont inaptes à déclencher la sexualisation dans une cellule qui n'a pas subi un traitement photopériodique approprié.

L'observation sur le terrain montrant que dans une population desmidiale de nombreuses espèces sexualisent en même temps, P. BOURRELLY nous avait suggéré de rechercher éventuellement l'influence réciproque des espèces en sexualisation.

Nous avons mélangé sur le même milieu des populations de *Closterium* venus (qui sexualise indifféremment avec 12 h ou 18 h d'éclairement blanc journalier), de *C. moniliferum* (qui sexualise abondamment avec 18 h d'éclairement à 2500 lux) et de *C. acutum* (dont nous n'avons que très rarement obtenu les zygospores, en jour long). Les trois souches ont été isolées à partir de la même mare de Wardrecques.

Lorsque le mélange reçoit 12 h d'éclairement blanc journalier avec une intensité de 2500 lux, seul C. venus produit des zygospores après 10 jours de culture, les autres espèces n'en produisent pas. Lorsque le mélange reçoit 18 h d'éclairement blanc journalier avec une intensité de 2500 lux, C. venus et C. moniliferum sexualisent, ce dernier à partir du 7ème jour de culture. C. venus ne sexualise qu'à partir du 10ème jour et C. acutum n'est aucunement stimulé.

Il semble donc peu probable que des substances hormonales soient excrétées abondamment dans le milieu ; de toute façon, elles seraient étroitement spécifiques, ce qui est d'ailleurs le cas chez les rares Algues où l'on a pu les mettre en évidence.

Cependant, une stimulation mutuelle par l'émission de la papille de conjugaison s'exerçant à très courte distance entre des cellules appariées n'est pas à exclure : bien que très rarement, il arrive que l'on observe l'émission de deux papilles de conjugaison par l'individu central lorsque trois cellules sexuellement induites se trouvent associées. D'autre part, une cellule sexuellement induite

146

isolée de son partenaire avant l'émission d'une papille de conjugaison n'en forme pas et retourne à l'état végétatif. La croissance des papilles a lieu à travers un mucilage diffus (mis en évidence par le "Calcofluor-white") qui maintient les cellules rapprochées. Est-ce le mucilage seul qui stimule l'émission des papilles, ou les substances excrétées ? Pourquoi les papilles ne se forment-elles que sur les faces internes des cellules ? A ce niveau, la concentration de l'hypothétique substance excrétée est-elle multipliée par deux ? Autant de questions dont la réponse semble bien aléatoire, à cause des infimes quantités probablement mises en jeu, et surtout du fait que nos souches sont homothalliques.

Pourtant, la sexualisation en masse de nombreuses espèces de Desmidiées peut très bien s'expliquer sans faire intervenir de substance hormonale diffusible dans le milieu. Elle peut être provoquée par le même facteur externe, agissant en même temps sur des espèces différentes adaptées aux mêmes conditions climatiques, et réagissant en particulier de la même façon à l'intensité de l'éclairement et à la durée du jour.

Sans prétendre généraliser le déterminisme de l'induction sexuelle par la lumière à toutes les Desmidiées nous pensons que l'Algue C. moniliferum, ainsi que plusieurs autres isolées dans la région du Nord (C. nostratum, C. acutum, Spirogyra sp.) sont des plantes "de jour long"; d'autres (C. venus) n'ont pas d'exigences photopériodiques strictes. Il est d'ailleurs possible que l'espèce moniliferum, tout comme elle semble présenter des écotypes adaptés à des eaux plus ou moins eutrophes ou oligotrophes, puisse présenter également des écotypes adaptés à des longueurs de jour variables, ce qui expliquerait sa répartition cosmopolite, seules étant exclues de son aire les régions arctiques. Cette exclusion peut d'ailleurs s'expliquer par l'inaptitude des zygospores à la germination après un séjour au froid.

Notre hypothèse pourrait également expliquer pourquoi on observe le plus souvent les zygospores sur le bord des pièces d'eau, là où l'eau est peu profonde, et très rarement au centre, dans l'eau profonde. Sans sous-estimer l'effet de l'élévation de température et de l'augmentation de l'intensité de l'éclairement qui favorisent la photosynthèse, de l'enrichissement en sels minéraux par la dessiccation, de l'élévation de la pression osmotique, de la diminution de la teneur en azote, qui induisent dans les cellules des structures cellulaires quasi sexuelles,

147

nous suggérons l'influence de "déclencheur" de la sexualisation que pourraient exercer les radiations rouge clair d'abord (permettant l'accumulation d'amidon pendant la période trophique), puis rouge sombre pendant l'allongement de la durée du jour ; les radiations rouges étant rapidement absorbées par l'eau ne pourraient agir qu'à travers une faible épaisseur. D'après BOURRELLY, c'est au printemps et en automne que l'on observe le plus fréquemment des zygospores de Desmidiées ; or c'est également en ces saisons que la lumière solaire est la plus riche en radiations rouges.

Mais nous répétons que ces conditions ne sont nullement généralisables à toutes les espèces de Desmidiées ; chacune réagit probablement d'une manière qui lui est propre. Cela expliquerait les observations de RINO au Mozambique (communication personnelle), où des zygospores de Desmidiées peuvent être trouvées à n'importe quel moment de l'année. Dans ce cas, comme chez les Spermatophytes qui fleurissent à tout moment de l'année sous l'équateur, le facteur "durée du jour" n'est pas déterminant dans la sexualisation.

Contrairement à l'opinion des anciens auteurs, nous ne pensons pas que les zygospores soient une forme de résistance à la saison froide ; l'expérience montre que les cellules végétatives persistent très longtemps au froid et à l'obscurité, alors que les zygospores ne germent plus. Les zygospores sont essentiellement une forme de résistance à la dessiccation (CHADEFAUD (1960) dans une note infrapaginale, envisageait d'ailleurs cette éventualité), qui coîncide sous nos climats avec la saison où la durée du jour est la plus longue. Ces zygospores peuvent germer après un temps de latence relativement court (1 mois et demi) dès qu'elles sont réhydratées. Les jeunes individus issus de la germination peuvent d'ailleurs conjuguer immédiatement s'ils sont suffisamment éclairés.

En outre, STARR (1954 a et b) a été le premier à montrer l'existence de souches hétérothalliques chez les Desmidiées. Dans les conditions naturelles, il va de soi que même si toutes les conditions favorables à la sexualisation sont réunies, celle-ci ne pourra avoir lieu que si les souches en présence sont génétiquement compatibles.

BIBLIOGRAPHIE.

- AACH H.G., 1952 Uber Wachstum und Zusammensetzung von Chlorella pyrenoidosa bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. Arch. Mikrobiol., 17, 213-246.
- ABADIE M. et DUBOIS-TYLSKI Th., 1974 Etude ultrastructurale de la zygospore mûre de l'Algue Desmidiée Closterium moniliferum (Bory) Ehrbg. Ann. Sci. nat. Bot., 15, 181-194.
- ABBAS A. et GODWARD M.B.E., 1963 Effects of experimental culture in Stigeoclonium. Br. phycol. Bull., 2, 281-282.
- ALLORGE P. et LEFEVRE M., 1925 Algues de Sologne. Bull. Soc. bot. Fr., Session Extraordinaire, 72, 122-150.
- ALLORGE V. et ALLORGE P., 1930 Hétérocontes, Euchlorophycées et Conjuguées de Galice. *Rev. algol.*, 5, 327-382.
- ATKINSON A.W. Jr., GUNNING B.E.S. et JOHN P.C.L., 1972 Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other Algae. Ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C-acetate studied in synchronous cultures. *Planta*, 107, 1-32.
- BARTELS P.G. et HOSHAW R.W., 1968 Cylindrical structures in the chloroplasts of Sirogonium melanosporum. Planta, 94, 73-77.
- BECH-HANSEN C. et FOWKE L.C., 1972 Mitosis in Mougeotia. Canad. J. Bot., <u>50</u>, 1811-1816.
- BERKALOFF C., 1967 Modifications ultrastructurales du plaste et de divers autres organites cellulaires au cours du développement et de l'enkystement du Protosiphon botryoides (Chlorophycées). J. Microscopie, 6, 839-852.
- BERKALOFF C., 1970 Essai d'isolement des globules pigmentés extraplastidiaux de l'Algue Protosiphon botryoides. C.R. Acad. Sci. Paris (D), <u>271</u>, 1518-1521.
- BERTAGNOLLI B.L. et NADAKAVUKAREN M.J., 1970 An ultrastructural study of pyrenoids from Chlorella pyrenoidosa. J. Cell Sci., 7, 623-630.

BIEBEL P., 1964 - The sexual cycle of Netrium digitus. Amer. J. Bot., 51, 697-704.

BIEBEL P., 1973 paru en 1975 - Morphology and life cycles of Saccoderm Desmids in culture. Nova Hedwigia, 42, 39-57.

- BISALPUTRA T., SHIELDS C.M. et MARKHAM J.W., 1971 In situ observations of the fine structure of Laminaria gametophytes and embryos in culture. I. Methods and the ultrastructure of the zygote. J. Microscopie, 10, 83-98.
- BISALPUTRA T.F. et WEIER T.E., 1964 The pyrenoid of Scenedesmus quadricauda. Amer. J. Bot., 51, 881-892.
- BLONDON F. et JACQUES R., 1970 Action de la lumière sur l'initiation florale du Lolium temulentum L. C.R. Acad. Sci. Paris (D), 270, 947-950.
- BONNER J., HEFTMANN E. et ZEEVAART J.A.D., 1963 Suppression of floral induction by inhibitors of steroid biosynthesis. *Plant. Physiol.*, 38, 81-88.
- BOURRELLY P., 1972 Les Algues d'eau douce. T.I. : les Algues vertes. Boubée, Paris.
- BRANDHAM P.E., 1965a Polyploidy in Desmids. Canad. J. Bot., 43, 405-417.
- BRANDHAM P.E., 1965b The occurrence of parthenospores and other haploid resistant spores in Desmids. Trans. amer. microsc. Soc., 84, 478-484.
- BRANDHAM P.E., 1967a Time-lapse studies of conjugation in Cosmarium botrytis. I. Gamete-fusion and spine formation. Rev. algol., 8, 312-316.
- BRANDHAM P.E., 1967b II. Pseudo-conjugation and an anisogamous mating behavior involving chemotaxis. Canad. J. Bot., 45, 483-493.
- BRANDHAM P.E. et GODWARD M.B.E., 1965a The inheritance of mating type in Desmids. New Phytologist, 64, 428-435.
- BRANDHAM P.E. et GODWARD M.B.E., 1965b Meiosis in Cosmarium botrytis. Canad. J. Bot., 43, 1379-1385.
- BRANDHAM P.E. et GODWARD M.B.E., 1965c Ultrastructure of the nucleus of the green alga Closterium ehrenbergii. J. roy. microsc. Soc., 84, 499-507.
- BRANDHAM P.E. et GODWARD M.B.E., 1965d Mitotic peaks and mitotic time in the Desmidiaceae. Arch. Mikrobiol., 51, 393-398.
- BRĂTEN T., 1973 Autoradiographic evidence for the rapid disintegration of one chloroplast in the zygote of the green alga Ulva mutabilis. J. Cell Sci., 12, 385-389.
- BRÅTEN T. et NORDBY Ø., 1973 Ultrastructure of meiosis and centriole behaviour in Ulva mutabilis Føyn. J. Cell Sci., 13, 69-81.
- BROWN R.M. et ARNOTT H.J., 1970a Structure and function of the algal pyrenoid. I. Ultrastructure and cytochemistry during zoosporogenesis of Tetracystis excentrica. J. Phycol., 6, 14-22.
- BROWN R.M., FRANKE W.W., KLEINIG H., FALK H. et SITTE P., 1970b Scale formation in Chrysophycean algae. I. Cellulosic and non cellulosic wall components made by the Golgi apparatus. J. Cell Biol., 45, 246-271.

- BUDD T.W., TJOSTEM J.L. et DUYSEN M.E., 1969 Ultrastructure of Chlorella pyrenoidosa as affected by environmental changes. Amer. J. Bot., 56, 540-545.
- BUER F., 1964 Licht und electronenmikroskopische Untersuchungen an Zellwänden und Gallerten einiger Zygnemataceen. Flora, 154, 349-375.
- BURGESS J. et FLEMING E.N., 1974 Ultrastructural studies of aggregation and fusion of plant protoplasts. *Planta*, 118, 183-193.
- BUVAT R., 1969 La cellule végétale. Hachette, Paris.
- BUVAT R. et MOUSSEAU A., 1960 Origine et évolution du système vacuolaire dans la racine de Triticum vulgare ; relation avec l'ergastoplasme. C.R. Acad. Sci. Paris (D), 251, 3051-3053.
- BYRNE J.E. et CRAIGIE J.S., 1971 Evidence for a phytochrome mediated response of gametogenesis in the brown alga Laminaria longicruris. Canad. Soc. Pl. Physiol. regional Meeting Abstracts, jan, 3.
- CANTINO E.C. et TRUESDELL L.C., 1972 Myelin-like "artifacts" in the zoospores of Blastocladiella emersonii. Trans. brit. mycol. Soc., 59, 129-132.
- CASTENHOLZ R.W., 1964 The effect of daylength and light intensity on the growth of littoral marine diatoms in culture. *Physiol. Plant.*, 17, 951-963.
- CATESSON A.M., 1973 Observations cytochimiques sur les tubes criblés de quelques Angiospermes. J. Microscopie, 16, 95-104.
- CAVALIER-SMITH T., 1970 Electron microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of Chlamydomonas reinhardii. Nature, 228, 333-336.
- CHADEFAUD M., 1960 Traité de Botanique systématique. Tome I. Les végétaux non vasculaires. Cryptogamie. Masson et Co, Paris.
- CHAPMAN A.R.O. et BURROWS E.M., 1970 Experimental investigations into the controlling effects of light conditions on the development and growth of Desmarestia aculeata (L.) Lamour. Phycologia, 9, 103-108.
- CHARDARD R., 1964 Etude de l'ultrastructure de deux Algues Zygophycées : Mesotaenium caldariorum et Penium margaritaceum. Rev. Cyt. Biol. veg., 27, 77-93.
- CHARDARD R., 1965 Nouvelles observations sur l'infrastructure de deux Algues Desmidiales Cosmarium lundellii et Closterium acerosum. Rev. Cytol. Biol. vég., 28, 15-30.
- CHARDARD R., 1966 Aspects infrastructuraux de l'autoantagonisme chez deux Desmidiales (Algues Zygophycées). Rev. Cyt. Biol. vég., 29, 335-355.
- CHARDARD R., 1970 Action des solutions hypertoniques sur l'ultrastructure d'une Algue verte : Cosmarium lundellii Delp. Bull. Soc. bot. Fr. Mem. (Colloque de Cytologie expérimentale), 59-81.

- CHARDARD R., 1971a Ultrastructure des plastes d'une Desmidiale (Closterium acerosum) cultivée en lumière atténuée. C.R. Acad. Sci. Paris (D), 273, 569-571.
- CHARDARD R., 1971b Ultrastructure du pyrénoîde d'une Desmidiale (Closterium acerosum Ehrenb.) cultivée en lumière atténuée. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 273, 1190-1192.
- CHARDARD R., 1973 paru en 1975 Action de la lumière et de l'obscurité sur la structure des plastes de Cosmarium lundellii et de Closterium acerosum (Desmidiaceae). Beik, Nova Hedwigia, 42, 59-81.
- CHARDARD R., 1975 Origine des microfibrilles de la paroi chez Closterium acenosum Ehrenb. (Algue verte), rôle de l'appareil de Golgi. C.R. Acad. Sci. Paris (D), 280, 25-28.
- CHARRET R. et FAURE-FREMIET E., 1967 Technique de rassemblement de microorganismes : préinclusion dans un caillot de fibrine. J. Microscopie, 6, 1063-1988
- CHESNOY L. et JONSSON S., 1973 Etude ultrastructurale du développement du zygote calcicole d'une Chlorophycée marine, le Monostroma grevillei (Thuret) Wittrock. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 276, 299-302.
- CHOUARD P., 1936 Nouvelles recherches expérimentales sur l'action de la folliculine sur la floraison des Reines Marguerites et de plusieurs autres plantes. C.R. Soc. Biol., 122, 823-825 (Cité par LACOSTE, 1965).
- CHOUARD P., 1937 Action combinée de la folliculine et la durée d'éclairement sur la floraison des Reines Marguerites. C.R. Soc. Biol., <u>126</u>, 509-512. (Cité par LACOSTE, 1965).
- CHRISTENSEN J.E., HORNER H.T. et LERSTEN N.R., 1972 Pollen wall and tapetal orbicular development in Sorghum bicolor (Graminae). Amer. J. Bot., <u>59</u> 43-58.
- COESEL P.F.M. et TEIXEIRA R.M.V., 1974 Notes on sexual reproduction in Desmids. II. Experiences with conjugation experiments in unialgal cultures. Acta Bot. Neerl., 23, 603-611.
- COLE K. et LIN S.C., 1970 Plasmalemmasomes in sporelings of the brown alga Petalonia debilis. Canad. J. Bot., 48, 265-268.
- COMERE J., 1906 Observations sur la périodicité du développement de la flore algologique dans la région toulousaine. *Bull. Soc. bot. France*, <u>53</u>, 390-407.
- COOK P.W., 1963 Variation in vegetative and sexual morphology among the small curved species of *Closterium*. *Phycologia*, 3, 1-18.
- COOMBS J., LAURITIS J.A., DARLEY W.M. et VOLCANI B.E., 1968 Effets of colchicine on wall formation in Navícula pellículosa (Breb.) Hilse. Z. Pflanzenphysiol., 59, 274-284.

- COSSON J., 1973 Influence des conditions de culture sur le développement de Laminaria digitata (L.) Lam. Phéophycées, Laminariales. Bull. Soc. phycol. Fr., 18, 104-112.
- COUTE A. et RINO J.A., 1975 Structure de la membrane de Cosmaríum anthophorum Couté et Rousselin. Protistologica, XI, 75-81.
- DASHEK W.V. et ROSEN W.G., 1966 Electron microscopical localization of chemical components in the growth zone of Lily pollen tubes. *Protoplasma*, <u>61</u>, 192-204.
- DE BARY A., 1858 Untersuchungen über die Familie der Conjugaten. Leipzig., 1-91.
- DEHORTER B., 1972 Biologie et physiologie de la reproduction sexuée du Nectria galligena Bres. Thèse Doct. Sci. nat., 3ème Cycle, Lille.

DELAHAYE E. et DUBOIS-TYLSKI Th., 1965 - Florule algologiques des cuvettes à Sphaignes de la forêt de Saint-Amand-Les-Eaux. Bull. Soc. bot. Nord Fr., 18, 93-96.

DEXHEIMER J., 1972 - Quelques aspects ultrastructuraux de la sécrétion de mucilage par les glandes digestives du Drosera rotundifolia L. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 275, 1983-1986.

DODGE J.D., 1973 - The fine structure of algal cells. Academic Press London.

DODGE J.D. et BIBBY B.T., 1973 - The Prorocentrales (Dinophyceae). I. A comparative account of fine structure in the genera Prorocentrum and Exuviella. Bot. J. linn. Soc., 67, 175-187.

DODGE J.D. et CRAWFORD R.M., 1971 - A fine structural survey of dinoflagellate pyrenoids and food reserves. *Bot. J. linn. Soc.*, 64, 105-115.

- DRAWERT H. et KALDEN G., 1967 Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. XIII. Der Gestaltwandel des Nucleolus im Interphasekern von Micrasterias rotata. Mitt. Staatinst. allg. Bot. Hamburg, 12, 21-27.
- DRAWERT H. et MIX M., 1961a Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. II. Hüllgallerte und Schleimbildung bei Micrasterias, Pleurotaenium und Hyalotheca. Planta, 56, 237-261.
- DRAWERT H. et MIX M., 1961b Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. III. Der Nucleolus im Interphasekern von Micrasterias rotata. Flora, 150, 185-190.
- DRAWERT H. et MIX M., 1961c Licht und electronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. V. Ueber die Variabilität der Chloroplastenstruktur bei Micrasterias rotata. Planta, 56, 648-665.
- DRAWERT H. et MIX M., 1961d Licht und electronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. VI. Der Einfluss von Antibiotika auf die Chloroplastenstruktur bei Micrasterias rotata. Planta, 57, 51-70.

- DRAWERT H. et MIX M., 1962 Licht und elektronenmikroskopische untersuchungen an Desmidiaceen. Die struktur der Pyrenoide von Micrasterias rotata. Planta, 58, 50-74.
- DRING M.J., 1967 Phytochrome in the red alga Porphyra tenera. Nature, 215, 1411-1412.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1966 Peuplement algal d'une aulnaie à Sphaignes. Bull. Soc. bot. Nord Fr., 19, 180-187.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1969 Florule algologique d'un marais d'Ardenne. Rev. algol., 9, 316-325.
- DUBOIS-TYLSKI Th. et LACOSTE L., 1969 Action de la température et de l'éclairement sur la reproduction sexuée d'un Closterium du groupe moniliferum. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 270, 302-305.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1972 Le cycle de Closterium moniliferum in vitro. Bull. Soc. bot. Fr., Mémoires, 183-200.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1973 La conjugaison en culture in vitro chez Closterium rostratum Ehrbg. Bull. Soc. bot. Fr., 120, 33-42.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1973 paru en 1975 Aspects ultrastructuraux de l'induction sexuelle chez Closterium moniliferum (Bory) Ehrbg. (Desmidiaceae). Beih. Nova Hedwigia, 42, 91-101.
- DUCELLIER F., 1915 Contribution à l'étude du polymorphisme et des monstruosités chez les Desmidiacées. Bull. Soc. bot. Genève, 2ème série, 7, 75-118.
- DURANT J.P., SPRATLING L. et O'KELLEY J.C., 1968 A study of light intensity periodicity and wavelength on zoospore production by Protosiphon botryoides Klebs. J. Phycol., <u>4</u>, 356-362.
- DUTHIE H.C., 1965 A study of the distribution and periodicity of some algae in a bog pool. J. Ecol., 53, 349-359.
- EDWARDS P., 1970 Field and cultural observations on the growth and reproduction of Polysiphonia denudata from Texas. Br. phycol. J., 5, 145-153.
- ELLIS R.J. et MACHLIS L., 1968 Control of sexuality in Golenkinia. Amer. J. Bot., 55, 600-610.
- ESCHRICH W. et CURRIER H.B., 1964 Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Technol.*, <u>39</u>, 303-307.
- EVANS J.H., 1959a Value of a simple observational technique for determining the fat contents of algal cells. *Nature*, 184, 1137-1138.
- EVANS J.H., 1959b The survival of freshwater Algae during dry periods. II. Drying experiments. J. Ecol., <u>47</u>, 55-71.
- FORSTER H., 1957 Das Wirkungsspektrum der Kopulation von Chlamydomonas eugametos. Z. Naturforsch., 12b, 765-770.
- FOWKE L.C. et PICKETT-HEAPS J.D., 1971 Conjugation in Spirogyra. J. Phycol., 7, 285-294.
- FOWKE L.C. et SETTERFIELD G., 1969 Multivesicular structures and cell wall growth. Canad. J. Bot., 47, 1873-1877.
- FOX J.E., 1957 Sexuality in Closterium moniliferum. Phycol. Soc. Amer. News Bull., 10, 72-73.
- FOX J.E., 1958 Meiosis in Closterium. Phycol. Soc. Am. News Bull., 11, 63.
- FRANKE W.W., KRIEN S. et BROWN R.M. Jr., 1969 Simultaneous glutaraldehyde osmium tetroxyde fixation with postosmication, an improved fixation procedure. *Histochemie*, 19, 162-164.
- FREY-WYSSLING A., GRIESHABER E. et MUHLETHALER K., 1963 Origin of spherosomes in plant cells. J. Ultrastruct. Res., 8, 506-516.
- FRIEDBERG I., GOLDBERG I. et OHAD I., 1971 A prolamellar body like structure in Chlamydomonas reinhardii. J. Cell Biol., 50, 268-275.
- FRIEND D.S., 1969 Cytochemical staining of multivesicular body and golgi vesicles. J. Cell Biol., 41, 269-279.
- FRITSCH F.E. et RICH F., 1913 A four years observation of a freshwater pond. Ann. Biol. lacustre, VI, 1-83.
- FRITSCH F.E., 1948 The structure and reproduction of Algae. Cambridge University Press.
- FUSEY P., 1947 Emploi de l'extrait de Levure dans la culture des Algues d'eau douce. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 225, 199-201.
- GAGNIEU A., 1949 L'observation des chromosomes. S.E.D.E.S., Paris.
- GARNER W.W. et ALLARD H.A., 1920 Effects of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. J. agric. Res., 18, 553-607.
- GEITLER L., 1965 Mesotaenium dodekaedron n. sp. und die Gestalt und Entstehung seiner Zygoten. Osterr. bot. Z., 112, 344-358.
- GENEVES L., 1973 Elaboration de polysaccharides destinés à s'incorporer dans la paroi, au cours de la méiose, dans les anthères du Ribes rubrum L. (Grossulariacées). C.R. Acad. Sci., Paris (D), 277, 169-172.
- GENTNER W.A., TAYLORSON R.B. et BORTHWICK H.A., 1975 Photopériodisme du Pavot, Papaver somniferum. Bull. Stupef. E.U., <u>27</u>, 23-32.

- GERRATH J.F., 1969 Penium spinulosum (Wolle) comb. nov. (Desmidiaceae) : a taxonomic correction based on cell wall ultrastructure. Phycologia, 8, 109-118.
- GIBBS S.P., 1968 Autoradiographic evidence for the in situ synthesis of chloroplast and mitochondrial RNA. J. Cell Sci., 3, 327-340.
- GILES K.L., 1970 The phytochrome system, phenolic compounds and aplanospore formation in a lichenized strain of *Trebouxia*. Canad. J. Bot., <u>48</u>, 1343-1346.
- GODWARD M.B.E., 1948 The iron alum acetocarmine method for Algae. Nature, <u>161</u>, 203.
- GODWARD M.B.E., 1966 The chromosomes of Algae. Arnold, London.
- GODWARD M.B.E. et JORDAN E.G., 1965 Electron microscopy of the nucleolus of Spirogyra britannica and Spirogyra ellipsospora. J. roy. microsc. Soc., 84, 347-360.
- GOODAY G.W., 1968 Hormonal control of sexual reproduction in Mucor mucedo. New Phytologist, 67, 815-821.
- GOODENOUGH U.W., 1970 Chloroplast division and pyrenoid formation in Chlamydomonas reinhardi. J. Phycol., 6, 1-6.
- GOODWIN T.W., 1971 Algal carotenoids, p. 315-356. In : Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. T.W. GOODWIN edit. Academic Press, London, New York.
- GRIFFITHS D.J., 1970 The pyrenoid. Bot. Rev. U.S.A., 36, 29-58.
- GUNNING B.E.S., 1965 The structure of the prolamellar body. Protoplasma, <u>55</u>, 111-130.
- GUNNING B.E.S., STEER M.W. et COCHRANE M.P., 1968 Occurence, molecular structure and induced formation of the "stromacentre" in plastids. J. Cell Sci., 3, 445-456.
- GUERIN-DUMARTRAIT E. et MOYSE A., 1970 Structure des lamelles chloroplastiques de Chlorella pyrenoidosa soit au cours d'une culture synchrone soit en fonction de la carence en azote puis de la levée de carence. Bull. Soc. phycol. Fr., 15, 74-79.
- HALPERIN W. et JENSEN W.A., 1967 Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in Carrot cell cultures. J. Ultrastruct. Res., 18, 428-443.
- HANIC L.A. et CRAIGIE J.S., 1969 Studies on the algal cuticle. J. Phycol., 5, 89-102.
- HARTMANN K.M., 1966 A general hypothesis to interpret high energy phenomena of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. Photobiol.*, 5, 349-366.

- -HARWOOD J.L., SODJA A., STUMPF P.K. et SPURR A.R., 1971 On the origin of oil droplets in maturing Castor Bean seeds *Ricinus communis*. *Lipids*, <u>6</u>, 851-854.
- HASKINS R., 1963 Morphology, nutrition and host range of a species of Pythium Canad. J. Microbiol., 9, 451-457.
- HAUPT W. et SCHONBOHM E., 1970 Light oriented chloroplast movement, 283-307. In : Photobiology of microorganisms. P. HALLDAL edit. Wiley Interscience London.
- HEITZ B., 1971 Structure du cytoplasme des tubes polliniques du Linum austriacum L. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 272, 934-937.
- HELLEBUST J.A., 1974 Extracellular products, 838-863. In : Algal Physiology and Biochemistry, W.D.P. STEWART edit. University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- HENDRIX J.W., 1964 Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of Pythium and Phytophtora. Science, 5, 1028-1029.
- HESLOP. HARRISON J. et DICKINSON H.G., 1969 Time relationship of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspore in Lilium. Planta, 84, 199-214.
- HILL G.J.C. et MACHLIS L., 1970 Defined media for growth and gamete production by the green alga Oedogonium cardiacum. Plant Physiol., 46, 224-226.
- HOFFMAN L.R., 1967 Observations on the fine structure of Oedogonium. Microtubular elements in the chloroplasts of Oe. cardiacum. J. Phycol., 3, 212-221.
- HOFFMAN L.R., 1968 Observations on the fine structure of Oedogonium. V. Evidence for de novo formation of pyrenoids in zoospores of Oe. cardiacum. J. Phycol., 4, 212-218.
- HOLDSWORTH R.H., 1968 The presence of a crystalline matrix in pyrenoids of the diatom Achnanthes brevipes. J. Cell Biol., 37, 831-837.
- HOLDSWORTH R.H., 1971 The isolation and partial characterization of the pyrenoid of Eremosphaera viridis. J. Cell Biol., 51, 499-513.
- HOLMES W.L. et DI TULLIO N.W., 1962 Inhibitors of cholesterol biosynthesis which act at or beyond the mevalonic acid stage. Amer. J. clin. Nutr., <u>10</u>, 310-322.
- HOMFELD H., 1929 Beitrag zur Kenntnis der Desmidiaceen Nordwestdeutschlands, besonders ihrer Zygoten. *Pflanzenforschung XII*.
- HOSHAW R.W., 1965 A cultural study of sexuality in Sirogonium melanosporum. J. Phycol., 1, 134-138.

HOSHAW R.W. et HILTON R.L. Jr., 1966 - Observations on the sexual cycle of the Saccoderm Desmid Spirotaenia condensata. J. Arizona Acad. Sci., 4, 88-92.

- HUGUENIN B. et BOCCAS B., 1971 Rôle de quelques facteurs dans la formation et la germination des oospores chez le Phytophtora palmivora Butl. Ann. Phytopathol., 3, 353-371.
- HSIAO S.I.C. et DRUEHL L.D., 1971 Environmental control of gametogenesis in Laminaria saccharina. I. The effets of light and culture media. Canad. J. Bot., 49, 1503-1508.
- HSIAO S.I.C. et DRUEHL L.D., 1973 Environmental control of gametogenesis in Laminaria saccharina. IV. In situ development of gametophytes and young sporophytes. J. Phycol., 9, 160-164.
- HUSTEDE H., 1964 Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über den Generationswechsel zwischen Derbesia neglecta Berth. und Bryopsis halymeniae Berth. Botanica mar., 6, 134-142.
- HYGEN G., 1948 Fotoperiodiske reaksjonen hos alger. Blyttia, 6, 1.
- ICHIMURA T., 1972 Sexual cell division and conjugation papilla formation in sexual reproduction of Closterium strigosum. Proc. 7th. int. Seaweed Symp. Sapporo, Jap., 208-214.
- INGOLD C.T., 1969 Effect of blue and yellow light during the later developmental stages of Sphaerobolus. Amer. J. Bot., 56, 759-766.
- JACQUES R., 1969 Action de la lumière rouge sur la croissance : spectre d'action et rôle du phytochrome. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 269, 1260-1263.
- JACQUES R. et LECHARNY A., 1976 Photomorphogenèse du Chenopodium polyspermum L. p. 421-427. In : Etudes de Biologie végétale, Hommage au Professeur P. CHOUARD. R. JACQUES edit. Paris.
- JENSEN W.A., 1962 Botanical histochemistry. Freeman and Co, San Francisco, London.
- JENSEN W.A., 1965 The composition and ultrastructure of the nucellus in Cotton. J. Ultrastruct. Res., 13, 112-128.
- JENSEN W.A. et FISCHER B.D., 1968 Cotton embryogenesis. The entrance and discharge of the pollen tube in the embryo-sac. *Planta*, 78, 158-183.
- JORDAN E.G., 1970 Ultrastructural aspects of cell wall synthesis in Spirogyra. Protoplasma, 69, 405-416.
- JORDAN E.G., 1974 Nuclear envelope projections from pronuclei of Spirogyra zygotes. Protoplasma, 79, 31-40.
- JORDAN E.G. et GODWARD M.B.E., 1969 Some observations on the nucleolus in Spirogyra. J. Cell Sci., 4, 3-15.
- JOYON L. et FOTT B., 1964 Quelques particularités infrastructurales du plaste des Carteria (Volvocales). J. Microscopie, 3, 159-166.

- KAIN J.M., 1964 Aspects of the biology of Laminaria hyperborea. III. Survival and growth of gametophytes. J. mar. biol. Ass., 44, 415-433.
- KALLIO P., 1946 paru en 1948 Artificially produced binuclear, diploid and anuclear Desmids. Arch. Soc. zool. bot. fenn. Vanamo, 1, 42-44.
- KALLIO P., 1953 The effect of continued illumination on the Desmids. Arch. Soc. zool. bot. fenn. Vanamo, 8, 58-74.
- KARLING J.S., 1924 A preliminary account of the influence of light and temperature on growth and reproduction in Chara fragilis. Bull. Torrey bot. Club, 51, 469-488.
- KIERMAYER 0., 1968 The distribution of microtubules in differentiating cells of Micrasterias denticulata. Planta, <u>83</u>, 223-236.
- KIERMAYER O. et DORDEL S., 1976 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Cytomorphogenese von Micrasterias denticulata Breb. Einfluß von Vitalcentrifugierung auf Formbildung und Feinstuktur. Protoplasma, 87, 179-190.
- KIERMAYER O. et STAEHELIN L.A., 1972 Fine structure of the cell wall and plasma membrane in Micrasterias denticulata Breb. after freeze etching. Protoplasma, 74, 227-237.
- KIES L., 1964 Über die experimentelle Auslösung von Fortpflanzungsvorgangen und die Zygotenkeimung bei Closterium acerosum (Schrank) Ehrenbg. Arch. Protistenk., 107, 331-350.
- KIES L., 1967 Über Zellteilung und Zygotenbildung bei Roya obtusa (Breb.) West et West. Mitt. Staatinst. allg. Bot. Hamburg, 12, 35-42.
- KIES L., 1968 Über die Zygotenbildung bei Micrasterias papillifera Breb. Flora, 157, 301-313.
- KIES L., 1970a Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Bildung und Struktur der Zygotenwand bei Micrasterias papillifera (Desmidiaceae). I. Das Exospor. Protoplasma, 70, 21-47.
- KIES L., 1970b Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Bildung und Struktur der Zygotenwand bei Micrasterias papillifera (Desmidiaceae). II. Die Struktur von Mesospor und Endospor. Protoplasma, <u>71</u>, 139-146.
- KIES L., 1973 paru en 1975 Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Konjugation bei Micrasterias papillifera (Desmidiaceae). In : Beih. Nova Hedwigia, 42, 139-154.
- KING G.C., 1960 The cytology of the Desmids. The chromosomes. New Phytol., <u>59</u>, 65-72.

KLEBAHN H., 1891 - Studien über Zygoten. I. Keimung von Closterium und Cosmarium. Jahrb. Wiss. Bot., 22, 415-443.

- KLEBS G., 1896 Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Fischer Jena.
- KLING R., 1974 Action des métaux et de diverses lumières colorées sur le Gracilaria verrucosa (Hudson) Papenfuss (Gigartinales, Gracilariacées). Bull. Soc. phycol. Fr., 19, 49-65.
- KNAGGS F.W., 1966 Observations on the relationship between reproduction and environment. I. Relationship between the energy of incident light and tetrasporangium production (Rhodochorton purpureum). Nova Hedwigia, 11, 405-411.
- KOPCEWICZ J., 1972 Oestrogens in the long day plants Hyoscyamus niger and Salvia splendens grown under inductive and non-inductive light conditions. New Phytologist, 71, 129-134.
- KOWALLIK K., 1969 The crystal lattice of the pyrenoid matrix of Prorocentrum micans. J. Cell Sci., 5, 251-269.
- KOWALLIK W., 1970 Light effects on carbohydrate and protein metabolism in Algae. p. 165. In : Photobiology of microorganisms, P. HALLDALL edit. Wiley Interscience, London.
- KREBS I., 1952 Beitrage zur Kenntnis der Desmidiaceen Protoplasten. Osterr. Akad. Wiss. Math. Naturw., Abt. I, 160, 578-618.
- KRIEGER W., 1937 Die Desmidiaceen. In : "Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Leipzig.
- KUROGI M., 1959 Influence of light on the growth and maturation of Conchocelisthallus of Porphyra. I. Effect of photoperiod on the formation of monosporangia and liberation of monospores. Bull. Tohoku reg. Fish. Res. Lab., 15, 33-42.
- KUROGI M. et SATO S., 1967 Effect of photoperiod on the growth and maturation of Conchocelis-thallus of Porphyra umbilicalis (L.) Kütz and Porphyra pseudocrassa Yamada et Mikami. Bull. Tohoku reg. Fish. Res. Lab., 27, 111-120.
- LACOSTE L., 1965 Biologie naturelle et culturale du genre Leptosphaeria Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse de Doctorat ès-Science, Toulouse.
- LAMPORT D.T.A., 1965 The protein content of primary cell walls. Adv. bot. Res., 2, 151-218.
- LARPENT-GOURGAUD M., LARPENT J.P. et JACQUES R., 1971 Croissance et ramification des thalles du Caespitella pascheri Vischer, du Chlorormidium flaccidum (Kütz) A. Br., du Draparnaldia mutabilis (Roth.) Cederg, cultivés en radiations monochromatiques. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 272, 815-818.

- LARPENT J.P. et JACQUES R., 1972 Croissance, chlorophylles et phytochrome chez le Draparnaldia mutabilis (Roth.) Cederg cultivé en radiations monochromatiques. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 274, 1297-1299.
- LEADBETTER B.S.C. et MANTON I., 1971 Fine structure and light microscopy of a new species of Chrysochromulina (C. acantha). Arch. Mikrobiol., <u>78</u>, 58-69.
- LEAGUE E.A. et GREULACH V.A., 1955 Effects of daylength and temperature on the reproduction of Vaucheria sessilis. Bot. Gaz., 117, 45-51.
- LEFEVRE M., 1934 Sur la diversion et l'élongation des cellules dans le genre Closterium Nitzsch. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 198, 1166-1168.
- LEFEVRE M., 1937 Technique des cultures cloniques de Desmidiées. Ann. Sc. nat. Bot., 10ème série, 19, 325-340.
- LEFEVRE M., 1939 Recherches expérimentales sur le polymorphisme et la tératologie des Desmidiées. Encyclopédie Biologique, XIX, Lechevalier, Paris.
- LEFEVRE M. et BOURRELLY P., 1938 Sur la valeur systématique des productions verruqueuses de la membrane chez les Closterium. Bull. Soc. bot. Fr., <u>85</u>, 686-690.
- LEFEVRE M. et MANGUIN E., 1938 Sur la persistance pendant l'hiver d'Algues d'eau douce à l'état végétatif. *Rev. gen. Bot.*, 50, 501-526.
- LEMBI C.A. et LANG N.J., 1965 Electron microscopy of Carteria and Chlamydomonas. Amer. J. Bot., 52, 464-477.
- LENZENWEGER R., 1968 Der Verlauf der Zygotenkeimung bei Micrasterias rotata (Grev.) Ralfs. Arch. Protistenk., 111, 1-11.
- LEWIN R.A., 1950 Gamete behaviour in Chlamydomonas. Nature, 166, 76.
- LHOTSKY 0., 1948 The production of chlamydospores by Closterium moniliferum (Bory) Ehrbg. Studia Botanica Cechoslovaca, 9, 155-159.
- LHOTSKY 0., 1973 paru en 1975 The production of chlamydospores in the genus Closterium (Desmidiaceae) in nature. Beih. Nova Hedwigia, 42, 163-169.
- LING H.V. et TYLER P.A., 1972 The process and morphology of conjugation in Desmids, especially the genus Pleurotaenium. Br. phycol. J., 7, 65-79.
- LING H.V. et TYLER P.A., 1972 Zygospore germination in Pleurotaenium. Arch. Protistenk., 114, 251-255.
- LIPPERT B.E., 1967 Sexual reproduction in Closterium moniliferum and Closterium ehrenbergii. J. Phycol., 3, 182-198.
- LIPPERT B.E., 1973 paru en 1975 Some factors affecting conjugation in Closterium (Desmidiaceae). In : Beih. Nova Hedwigia, 42, 171-177.

- LUNING K. et DRING M.J., 1972 Reproduction induced by blue light in female gametophytes of Laminaria saccharina. Planta, 104, 252-256.
- LUNING K. et DRING M.J., 1975 Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of Laminaria saccharina grown in blue and red light. Mar. Biol. (Germ.), 29, 195-200.
- LUNNEY C.Z. et BLAND C.E., 1976 An ultrastructural study of zoosporogenesis in Pythium proliferum de Bary. Protoplasma, 88, 85-100.
- MACHLIS L., 1973 The effects of Bacteria on the growth and reproduction of Oedogonium cardiacum. J. Phycol., 9, 342-344.
- Mc LEAN R.J. et PESSONEY G.F., 1970 A large-scale quasi crystalline lamellar lattice in chloroplasts of the green alga Zygnema. J. Cell Biol., 48, 395-405.
- MAHER M., 1947 The role of certain environmental factors in growth and reproduction of Protosiphon botryoides Klebs. III. Reproduction. Bull. Torrey bot. Club., 74, 156-179.
- MANTON I., 1966 Observations on scale production in Prymnesium parvum. J. Cell Sci., 1, 375-380.
- MARCHANT R. et ROBARDS A.W., 1968 Membrane systems associated with the plasmalemma of plant cells. Ann. Bot., 32, 457-471.
- MATILE P., 1968 Aleurone vacuoles as lysosomes. Z. Pflanzenphysiol., 58, 365-368.
- MAYER F. et CZYGAN F.C., 1969 Anderungen der Ultrastrukturen in den Grünalgen Ankistrodesmus braunii und Chlorella fusca var. rubescens bei Stickstoffmangel. Planta, 86, 175-185.
- MAYHOUB H., 1974 Observations et explications au sujet de l'écologie et de la répartition du Pseudobryopsis myura (Ag.) Berthold. (Codiales, Bryopsidacées). Bull. Soc. phycol. Fr., 19, 164-167.
- MAYHOUB H., 1975 Nouvelles observations sur le cycle de développement du Calosiphonia vermicularis (J. Ag.) Scl. Rhodophycées Gigartinales. C.R. Acad. Sci., Paris (D), <u>280</u>, 2441-2443.
- MAZIA D., BREWER P.A. et ALFERT M., 1953 The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.*, 104, 57-67.
- MENKE W., 1960 Das allgemeine Bauprinzip des Lamellarsystems der Chloroplasten. Experientia (Basel), 16, 537-538.
- MILLER P.M., 1956 Spectrographic analysis of water-agar, potato-dextrose agar and V-8 juice agar. *Phytopathol.*, 46, 526.
- MIX M., 1967 Zur Feinstruktur der Zellwande in der gattung Penium (Desmidiaceae). Ber. Deutsch. Bot. Ges., <u>80</u>, 715-721.

- MIX M., 1969 Zur Feinstruktur der Zellwände in der gattung Closterium (Desmidiaceae) unter besonderer Berücksichtigung des Porensystems. Arch. Mikrobiol., <u>68</u>, 306-325.
- MIX M., 1972 Die Feinstruktur der Zellwände bei Mesotaeniaceae und Gonatozygaceae mit einer vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Wandtypen der Conjugatophyceae and über deren systematischen Wert. Arch. Mikrobiol., 81, 197-220.
- MIX M., 1973 paru en 1975 Die Feinstruktur der Zellwände der Conjugaten und ihre systematische Bedeutung. Beih. Nova Hedwigia, 42, 179-194.
- MOHR H., 1972 Lectures on morphogenesis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MOLLENHAUER H.H. et TOTTEN C., 1971 Studies on seeds. II. Origin and degradation of lipid vesicles in Pea and Bean cotyledons. J. Cell Biol., 48, 395-405.
- MOORE R.T. et Mc ALEAR J.H., 1961 Fine structure of Mycota 5. Lomasomes, previously uncharacterized hyphal structures. *Mycologia*, 53, 194-200.
- MORQUER R., 1931 Recherches morphogénétiques sur le Dactylium macrosporum. Thèse de Doctorat ès-Sciences. Toulouse.
- MULLER D., 1962 Uber jahres und lunarperiodische Erscheinungen bei einigen Braunalgen. Botanica mar., 4, 140-155.
- NABORS M.W., KUGRENS P. et ROSS C., 1974 Photodormant lettuce seeds : phytochrome induced protein and lipid degradation. *Planta*, 117, 361-365.
- NAGATA T. et TAKEBE I., 1970 Cell wall regeneration and cell division in isolated Tobacco mesophyll protoplasts. *Planta*, 92, 301-308.
- NAKAHARA H. et NAKAMURA Y., 1971 The life-history of Desmarestia tabacoides Okamura. Bot. Mag. Tokyo, 84, 69-75.
- NEEB 0., 1952 Hydrodictyon als Objekt einer vergleichenden Untersuchung physiologischer Großen. Flora, Jena, 139, 39-95.
- NEILSON A.H., BLANKLEY W.F. et LEWIN R.A., 1973 Growth with organic carbon and energy sources. p. 275-285. In : Handbook of Phycological methods, edit. J.R. STEIN. Cambridge University Press.
- NELSON R.R., HUISINGH D. et WEBSTER R.K., 1967 Sexual differenciation in Cochliobolus carbonarum as influenced by inhibition and repair of steroid biosynthesis. Phytopathology, 57, 1081-1085.
- NEWCOMB E.H., 1967 Fine structure of protein storing plastids in Bean root tips. J. Cell Biol., 33, 143-164.
- NORTHCOTE D.H., GOULDING K.J. et HORNE R.W., 1960 The chemical composition and structure of the cell wall of Hydrodictyon africanum Yaman. Biochem. J., 77, 503-508.

- NOUGAREDE A. et LESCURE A.M., 1970 Structure et comportement des dictyosomes et des corps multivésiculaires en liaison avec le plasmalemme dans les suspensions cellulaires issues du cambium d'Acer pseudoplatanus L. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 271, 916-919.
- OHAD I., SIEKIEVITZ P. et PALADE G.E., 1967 Biogenesis of chloroplast membranes.
 I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (Chlamydomonas reinhardi). J. Cell Biol., 35, 521-552.
- O'KELLEY J.C., DURANT J.P. et STOCKDALE D.L., 1974 Blue and green light effect and their photoreversibility upon zoospore production and the synchronized cycle in *Protosiphon botryoides* Klebs. *Photochem. Photobiol.*, <u>20</u>, 47-51.
- PEREZ R., 1971 Influence de quelques facteurs physiques sur le développement de Laminaria digitata (L.) Lamour. Bull. Soc. phycol., <u>16</u>, 89-105.
- PICKETT-HEAPS J.D., 1968 Microtubule-like structures in the growing plastids or chloroplasts of two Algae. *Planta*, 81, 193-200.
- PICKETT-HEAPS J.D., 1972 Cell division in Cosmarium botrytis. J. Phycol., <u>8</u>, 343-360.
- PICKETT-HEAPS J.D. et FOWKE L.C., 1970a Cell division in Oedogonium. II. Nuclear division in Oedogonium cardiacum. Austral. J. biol. Sci., 23, 71-92.
- PICKETT-HEAPS J.D. et FOWKE L.C., 1970b Mitosis, cytokinesis and cell elongation in the Desmid Closterium littorale. J. Phycol., 6, 189-215.
- PICKETT-HEAPS J.D. et FOWKE L.C., 1971 Conjugation in the desmid Closterium littorale. J. Phycol., 7, 37-50.
- PIHAKASKI K., 1972 On the thickness of the Hepatic oil-body membrane. Ann. Acad. Sci. fenn, A4, 190, 1-5.
- PRAT R. et ROLAND J.C., 1971 Etude ultrastructurale des premiers stades de néoformation d'une enveloppe par les protoplastes végétaux séparés mécaniquement de leur paroi. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 273, 165-168.
- PREVOST-MONNOT F., 1974 Recherches sur la sporulation de Pilobolus kleinii Van Thiegh. (Mucorale) et sa photoinduction. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris.
- PRINGSHEIM E.G., 1918 Die Kultur der Desmidiaceen. Ber. Deut. Bot. Ges., <u>36</u>, 482-485. Cité par ELLIS J. et MACHLIS L., 1968.
- PRINGSHEIM E.G., 1967 Pure cultures of algae. Hafner Publishing Co. New York, London.
- PUISEUX-DAO S. et LEVAIN N., 1963 Etude cytologique d'une Mougeotia (Conjugatophycées). J. Microscopie, 2, 461-484.

- RAYBURN W.R., 1974 Sexual reproduction in Pandorina unicocca. J. Phycol., 10, 258-265.
- RENTSCHLER H.G., 1967 Photoperiodische Induktion der Monosporenbildung bei Porphyra tenera Kjellm (Rhodophyta-Bangiophyceae). Planta, 76, 65-74.
- RETALLACK B. et BUTLER R.D., 1970 The development and structure of pyrenoids in Bulbochaete hiloensis. J. Cell Sci., <u>6</u>, 229-241.
- RETHY R., 1968 Red (R), far-red (F.R.) photoreversible effects on the growth of Chara sporelings. Z. Pflanzenphysiol., 59, 100-102.
- RICHARDS O.W., 1941 The staining of acid fast tubercle Bacilli. Science, <u>93</u>, 100.
- RICHARDSON W.N., 1970 Studies on the photobiology of Bangia fuscopurpurea. J. Phycol., 6, 215-219.
- RICHARDSON N. et DIXON P.S., 1968 Life history of Bangia fuscopurpurea (Dillw.) Lyngb. in culture. Nature, 218, 496-497.
- RICHTER G. et KIRSCHTEIN M.J., 1966 Regeneration und Photosynthese. Leistungkern-haltinger Zell-Teilstücke von Acetabularia in blauer roter Strahlung. Z. Pfl. Physiol., 54, 106-117.
- ROBARDS A.W., 1968 On the ultrastructure of differentiating secondary xylem in Willow. Protoplasma, 65, 449-464.
- ROBARDS A.W. et ROBINSON C.L., 1968 Further studies on phytoferritin. Planta (Berl.), 82, 179-188.
- ROBERT D., 1971 Etude en microscopie électronique des modalités d'édification des parois microsporales chez le Selaginella selaginoides L. Mise en place du feuillet externe. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 273, 332-335.
- ROLAND J.C. et VIAN B., 1970 Précisions sur la localisation et les caractères ultrastructuraux de polysaccharides acides dans les cellules végétales. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 271, 572-575.
- ROSEN W.G., GAWLIK S.R., DASHEK W.V. et SIEGESMUND K.A., 1964 Fine structure and cytochemistry of *Lilium* pollen tubes. *Amer. J. Bot.*, <u>51</u>, 61-71.
- ROWLEY J.R. et SOUTHWORTH D., 1967 Deposition of sporopollenin on lamellae of unit membrane dimensions. *Nature*, 213, 703-704.
- ROZUMEK K.E., 1968 Der Einfluß der Umveltfaktoren Licht und Temperatur auf die Ausbildung der Sexualstadien bei der Diatomee Rhabdonema adriaticum Kütz. Beitr. Biol. Pfl., 44, 365-388.
- SAGER R. et GRANICK S., 1953 Nutritional studies with Chlamydomonas reinhardi. Ann. N.Y. Acad. Sci., 56, 831-838.
- SAGER R. et GRANICK S., 1954 Nutritional control of sexuality in Chlamydomonas reinhardi. J. Gen. Physiol., 37, 729-742.

- SAGROMSKY H., 1961 Durch Licht-Dunkel-Wechsel induzierter Rhythmus der Entleerung der Tetrasporangien von Nitophyllum punctatum. Publ. Staz. zool. Napoli, 32, 29-40.
- SALVADOR G., LEFORT-TRAN M., NIGON V. et JOURDAN F., 1971 Structure et évolution du corps prolamellaire dans les proplastes d'Euglena gracilis. Exper. Cell Res., 64, 457-462.
- SCHAFER E., 1975 A new approach to explain the "high irradiance responses" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. J. math. Biol. Germ., 2, n° 1, 41-56.
- SHAW G., 1971 The chemistry of sporopollenin. In : Sporopollenin, BROOKS J. et al. edit. Academic Press, London.
- SCHNEIDER M.J., BORTHWICK H.A. et HENDRICKS S.B., 1967 Effect of radiation on flowering of Hyoscyamus niger. Amer. J. Bot., 54, 1241-1249.
- SCHREIBER E., 1925 Zur Kenntnis der Physiologie und Sexualität höherer Volvocales. Zeitschr. für Bot., 17, 337-376.
- SCHWARZENBACH A.M., 1971 Observations on spherosomal membranes. Cytobiologie, 4, 145-147.
- SHIHIRA I., 1958 The effect of light on gamete liberation in Monostroma. Bot. Mag., 71, 265-310.
- SHUMWAY L.K., WEIER T.E. et STOCKING G.R., 1967 Crystalline structures in Vicia faba chloroplasts. Planta, 76, 182-189.
- SIRONVAL C., 1957 La photopériode et la sexualisation du Fraisier des quatre saisons à fruits rouges (métabolisme chlorophyllien et hormone florigène). C.R. de recherches. Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, Bruxelles, 18, 1-229.
- SMITH C.G., 1974 The ultrastructural development of spherosomes and oil bodies in the developing embryo of Crambe abyssinica. Planta, 119, 125-142.
- SOROKIN H.P., 1967 Spherosomes and the reserve fat in plant cells. Amer. J. Bot., 54, 1008-1016.
- SPOEHR N.A. et MILNER H.W., 1949 The chemical composition of Chlorella ; effect of environmental conditions. *Plant Physiol.*, 24, 120-149.
- SRIVASTAVA L.M. et PAULSON R.E., 1968 The fine structure of the embryo of Lactuca sativa. II. Changes during germination. Canad. J. Bot., 46, 1447-1454.
- STARR R.C., 1954a Heterothallism in Cosmarium botrytis. Amer. J. Bot., <u>41</u>, 601-607.
- STARR R.C., 1954b Inheritance of mating type and a lethal factor in Cosmarium botrytis var. subtumidum Wittr. Proc. Nat. Acad. Sci., 40, 1060-1063.

- STARR R.C., 1955a Zygospore germination in Cosmarium botrytis var. subtumidum. Amer. J. Bot., 42, 577-581.
- STARR R.C., 1955b Asexual spores in Closterium didymotocum. New Phytol., <u>57</u>, 187-190.
- STARR R.C., 1955c Isolation of sexual strains of placoderm desmids. Bull. Torrey bot. Club, 82, 4, 261-265.
- STARR R.C., 1958 The production and inheritance of the triradiate form in Cosmarium turpinii. Amer. J. Bot., <u>45</u> (3), 243_248.
- STARR R.C., 1959 Sexual reproduction in certain species of Cosmarium. Archiv Protistenk. :, 104, 155-164.
- STARR R.C., 1964 The culture collection of algae at Indiana University. Amer. J. Bot., 51, 1013-1044.
- STARR R.C. et RAYBURN W.R., 1964 Sexual reproduction in Mesotaenium kramstai. Phycologia, 4, 23-26.
- STARR R.C., 1970 Control of differenciation in Volvox. Developmental Biology Supplement, 4, 59-100.
- STEELE R.L., 1965 Induction of sexuality in two centric diatoms. *Bioscience*, 15, 298.
- STEWART W.D.P., 1974 Algal physiology and biochemistry. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- SZASZ K. et BARSI E.S., 1971 Stimulatory effect of red light on the polysaccharide accumulation in the leaves. *Phytosynthetica Tchecosl.*, 5, 71-73.
- SZOSTAK J.W., SPARKUHL J. et GOLDSTEIN M.E., 1973 Sexual induction in Eudorina : effects of light, nutrients and conditioned medium. J. Phycol., <u>9</u>, 215-218.
- TAKATORI S. et HIMAHORI K., 1971 Light reactions in the control of oospore germination of Chara delicatula. Phycologia, 10, 221-228.
- TASSIGNY M., 1971a La sexualité des Desmidiées. Année Biologique, 10, 403-430.
- TASSIGNY M., 1971b Observations sur les besoins en vitamines des Desmidiées (Chlorophycées Zygnématales). J. Phycol., U.S.A., 7, 213-215.
- TASSIGNY M., 1972 Facteurs inducteurs de la sexualité chez Mesotaenium kramstai Lem. et Cosmarium formosulum Hoff. (Chlorophycées Zygophycées). Bull. Soc. phycol. Fr., 19, 183-190.
- TASSIGNY M., 1973 paru en 1975 Observations des variations qualitatives des populations de Desmidiées dans quelques étangs mésotrophes et dystrophes. Beih. Nova Hedwigia, 42, 283-316.

- TAYLOR A.O. et BONNER B.A., 1967 Isolation of phytochrome from the Alga Mesotaenium and Liverwort Sphaerocarpos. Plant Physiol., 42, 762-766.
- TERBORGH J.W., 1965 Effects of red and blue light on the growth and morphogenesis of Acetabularía crenulata. Nature, 207, 1360-1363.
- TERBORGH J.W. et THIMANN K.V., 1965 The control of development in Acetabularia crenulata by light. Planta, 64, 241-253.
- TRAINOR F.R., 1959 A comparative study of sexual reproduction in four species of Chlamydomonas. Amer. J. Bot., 46, 65-70.
- TRAINOR F.R. et BURG C., 1965 Scenedesmus obliquus sexuality. Science, <u>148</u>, 1094-1095.
- TRANSEAU E.N., 1916 The periodicity of freshwater Algae. Amer. J. Bot., <u>3</u>, 121-133.
- VAN DER WOUDE W.J., MORRE D.J. et BRACKER C.E., 1971 Isolation and characterization of secretory vesicles in germinated pollen of Lilium Longiflorum. J. Cell Sci., 8, 331-351.
- VIALA G. et VIDAL G., 1972 Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez le Leptosphaeria typhae. Physiol. veg., <u>10</u>, 481-494.
- VIAN B. et ROLAND J.C., 1972 Différenciation des cytomembranes et renouvellement du plasmalemme dans les phénomènes de sécrétions végétales. J. Microscopie, 13, 119-136.
- VIDYAVATINIZAM J., 1973a Conjugation studies in Closterium acerosum Ehrenb. Phykos, 12, 61-71.
- VIDYAVATINIZAM J., 1973b Cellular events of conjugation in Cosmarium auriculatum Reinsch. var. bogoriense Bern. Phykos, 12, 72-78.
- VILLERET S., 1953 Contribution à la biologie des Algues de tourbières à Sphaignes. Thèse, Paris.
- VILLERET S., 1966 La reproduction sexuée des Algues d'eau douce, sa signification écologique. C.R. 91ème Congrès Soc. sav. Rennes, <u>91</u>, 35-40, Gauthier-Villars, Paris.
- VON STOSCH H.A. et DREBES G., 1964 Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Zentrischen Diatomeen. IV. Die Planktondiatomee Stephanopyrix twrrisihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. Helgoländer Wiss.Meeresunters. 11, 209-257.

- VON WETTSTEIN D., 1959 In : The plastids, their chemistry, structure, growth and inheritance, J.T.O. KIRK et R.A.E. TILNEY-BASSETT, edit. Freeman and Co Publ. London.
- WARIS H., 1953 The significance for algae of chelating substances in the nutrient solution. *Physiol. Plant.*, <u>6</u>, 538-543.
- WARIS H. et ROUHIAINEN I., 1970 Permanent and temporary morphological changes in Micrasterias. Ann. Acad. Sci. fenn. A4, Biologica, 167, 1-13.
- WATERKEYN L. et BIENFAIT A., 1971 Primuline induced fluorescence of the first exine elements and Ubisch bodies. In : Sporopollenin Symposium 1970, J. BROOK et al. edit. Academic Press, London, New York.
- WATERKEYN L. et BIENFAIT A., 1967 Les émergences callosiques et silicifiées des feuilles de Sélaginelles. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 264, 1608-1611.
- WEBER A., 1969 Uber die Chloroplastenfarbstoffe einiger Conjugaten. Flora, <u>160</u>, 457-473.
- WERNER D., 1971 Der Entwicklungscyclus mit Sexual phase bei der marinen Diatomee Coscinodiscus asteromphalus. III. Differenzierung und Spermatogenese. Arch. Mikrobiol., 80, 134-146.
- WEST J.A., 1968 Morphology and reproduction of the red alga Acrochaetium pectinatum in culture. J. Phycol., <u>4</u>, 89-99.
- WEST J.A., 1969 The life histories of Rhodochorton purpureum and R. tenue in culture. J. Phycol., 5, 12-21.
- WEST W. et G.S., 1904 à 1911 A monograph of the British Desmidiaceae. 4 tomes. Ray Society London.
- WEST W. et G.S. et CARTER S., 1923 A monograph of the British Desmidiaceae. Tome 5, Ray Society London.
- WILBOIS A.D., 1958 Sexual isolation in Pandorína morum Bory. Ph. D. Thesis Indiana University.
- YATSU L.Y., JACKS T.Z. et HENSARLING T.P., 1971 Isolation of spherosomes (oleosomes) from Onion, Cabbage and Cottonseed tissues. *Plant Physiol.*, <u>48</u>, 675-682.
- YATSU L.Y. et JACKS T.J., 1972 Spherosomes membranes, half unit membranes. Plant Physiol., 49, 937-943.
- YEH Pao Zun et GIBOR A., 1970 Growth patterns and motility of Spirogyra sp. and Closterium acerosum. J. Phycol., <u>6</u>, 44-48.
- ZAFARALLA M.T. et PANTASTICO J.B., 1971 Cytochemical and developmental studies on callose formation in three species of Caulerpa. Philippine Agriculturist, 54, 7-8, 345-358.