

n° d'ordre : 710

50376  
1978  
65

50376  
1978  
65

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE

par

ROBERT KLING

RECHERCHES DES CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE DE

GRACILARIA VERRUCOSA (HUDS.) PAPENF.

(GIGARTINALES, GRACILARIACEES)



Membres du Jury : MM. E.-J. BOUNOT Président  
M. BODARD Rapporteur  
M. DENIZOT Examineur  
L. IACOSTE Examineur  
Mme M.-Th. L'HARDY-HALOS Examineur

Soutenue le 12 juillet 1978



030 026671 0

## REMERCIEMENTS

Avant de laisser libre cours au regard critique et intéressé du lecteur, je lui saurais gré d'accepter, l'espace d'un instant, que je lui dévoile les sentiments de reconnaissance qui m'animent.

Cette gratitude, je l'éprouve, de façon immédiate, envers Monsieur le Professeur BODARD, qui m'a accueilli dans le Laboratoire, qui m'a confié ce sujet et qui, par sa ténacité à trouver, m'a rendu tenace à chercher. Ce sentiment de profonde reconnaissance m'est également inspiré par son ouverture d'esprit, son sens du dialogue et par l'amitié qu'il m'a portée.

Ma gratitude va également à l'"Equipe" qui se propose de juger et de critiquer les pages qui vont suivre :

à Monsieur le Professeur BONNOT qui a accepté la responsabilité de la présidence et qui s'est plu, en d'autres circonstances, à partager certaines de mes préoccupations concernant la gracilaire.

à Monsieur le Professeur LACOSTE, qui veut bien se prêter à l'examen de l'ouvrage, et dont les compétences, surprenantes de prime abord, dans la photobiologie de végétaux pourtant non pigmentés, m'ont aidé.

à Madame l'HARDY-HALOS, dont les connaissances phycologiques seront précieuses dans l'analyse de ce document et dont les nombreuses publications relatives aux morphoses chez certaines rhodophycées m'aident à bien poser certains problèmes afférents à la genèse des formes, notamment chez *Gracilaria verrucosa*.

à Monsieur DENIZOT enfin, qui, en m'enseignant le certificat d'océanographie à Montpellier, m'a introduit avec passion et amitié dans les arcanes des sciences de la Mer et de la Phycologie.

Reconnaissant, je le suis, pour Monsieur DELVINQUIER, le coéquipier de mon travail, qui s'est attelé avec minutie et compétence à l'avancement des expériences, en réalisant entre autres, plusieurs centaines de pesées.

Mon coeur, surabonde des mêmes sentiments, pour Madame DANOOT. Sa patience à remettre vingt et vingt fois sur le métier l'ouvrage

d'une verrerie à nettoyer, a rendu mes recherches possibles.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe de Monsieur le Professeur LECLERC, de l'Institut Pasteur, notamment à Monsieur DELATTRE pour le concours irremplaçable qu'il m'a apporté dans la mise au point d'une stratégie antibactérienne.

Mon épouse, qui a connu les joies et les déceptions de ce travail, qu'elle soit remerciée du fond du coeur pour son soutien moral, mais aussi matériel, surtout lors d'une première mise en forme du document manuscrit.

Que soit également remerciée, Mademoiselle DELECOURT pour son courage persévérant et pour sa compétence lors de la mise en page et de la dactylographie du mémoire.

Je remercie aussi tous les chercheurs qui m'ont aidé de leurs conseils : Monsieur GODIN, Madame DUBOIS-TYLSKI, toujours disponible à partager sa passion du monde végétal, Madame DELRÔT, Monsieur JEAN, que je remercie pour la lecture et les critiques du document.

Enfin, je voudrais tourner mon regard vers mon Maître et Ami, Monsieur le Professeur Jacques ROUX. A l'image du grand LINNE, que préoccupait autant l'approfondissement du savoir botanique, que le sort matériel des étudiants qui lui étaient confiés, il a su, d'un même élan, m'initier à la connaissance motivée du monde végétal et alléger certains fardeaux propres à une vie estudiantine. Qu'il voit ici, l'hommage de ma reconnaissance la plus profonde.

## AVANT - PROPOS

L'étude de la morphogénèse des plantes supérieures présente de nombreuses difficultés. Les Thallophytes, par contre, et plus particulièrement les Algues, peuvent être considérées, de par la relative simplicité du plan d'organisation de leur thalle, comme un matériel expérimental de choix, pour l'étude des équilibres corrélatifs, présidant à la mise en place des différentes parties du végétal. Dans le cadre d'une telle recherche, les Rhodophycées à cladothalle s'avèrent particulièrement intéressantes.

Cette étude est envisagée chez *Gracilaria verrucosa*, dont l'intérêt biologique et économique est considérable ; mais pour mener à bien une telle investigation, il paraît indispensable que le végétal soit maintenu dans des conditions physico-chimiques définies et stables.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes proposés de réaliser la culture *in vitro* de *Gracilaria verrucosa*. L'objectif d'une telle méthode, est de veiller par des moyens appropriés, à ce que les cultures soient dépourvues de tout autre organisme animal, végétal, ou bactérien, et de déterminer les conditions optimales de croissance et de développement, par une variation connue et contrôlée des principaux paramètres physico-chimiques.

Cette démarche expérimentale, dont nous venons d'exposer à grands traits le fil conducteur et que nous serons amenés à détailler plus amplement dans un prochain chapitre, consacré aux méthodes et aux techniques, a été et reste le moteur de nombreux travaux, consacrés à répondre aux grandes questions, que soulèvent la croissance et le développement des algues.

Dans ce sens, il peut être utile de situer notre travail, si modeste que soit sa portée, par rapport à l'immense édifice consacré à la culture des algues, qui sous l'impulsion de FAMINTZIN (1871) fut construit patiemment par plusieurs générations de chercheurs, que ne rebutaient ni l'effort ni l'échec.

Dieu dit : "Que les eaux qui sont sous le ciel s'amassent en une seule masse et qu'apparaisse le continent et il en fut ainsi. Dieu appela le continent "terre" et la masse des eaux "mers" et Dieu vit que cela était bon.

La Genèse 9-10

## ERRATUMS

---

Les critiques et suggestions émises par les Membres du Jury lors de la soutenance de Thèse nous ont conduit à apporter au texte les corrections suivantes :

- page 20, alinéa 4, lire :

"Comme nous avons constaté que la dimension des segments placés en culture restait invariable pendant le temps de culture que nous nous étions fixé, la croissance des proliférations a été mesurée en milligrammes de matière sèche rapportés au poids sec du segment qui leur avait donné naissance". Les pesées sont réalisées à l'aide d'une balance Sartorius qui permet d'apprécier le dixième de milligramme avec une sensibilité de 0,05 mg.

- page 59, alinéa 3, ligne 4 : après McBRIDE et al. 1974, ajouter : TRIPODI et BETH (1976).

- page 157, après THOMAS E.A. et B.E. TREGUNNA, 1968. - ajouter :

TRIPODI G. et K. BETH, 1976. - Unusual cell structures in tumor-like formations of *Gracilaria* (Rhodophyta). *Arch. Mikrobiol.* 108 : 167-174.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

## 11 - HISTORIQUE

Notre ambition, n'est pas de vouloir tracer une revue bibliographique complète, de l'ensemble des travaux de culture d'algues marines réalisés de 1871 à nos jours, d'autres auteurs s'y sont employés, comme BAUDRIMONT (1961), KUFFERATH (1929), PROVASOLI et al. (1957), KNAGGS (1969) ; elle est plutôt de dégager, à la faveur de la citation d'un certain nombre de travaux, les lignes de force qui ont amené les auteurs à compléter, à modifier, voire à innover de nouvelles stratégies, pour répondre à telle ou telle question, que leur posait l'organisme vivant qu'ils se proposaient d'étudier.

Deux tendances, marquent les recherches sur la mise au point des milieux de culture marine. La première, initiée par les travaux de MIQUEL en 1890, est celle consacrée à la mise au point de milieux, à partir d'eau de mer naturelle que l'on enrichit en substances variées ; la seconde, plus pionnière que la précédente, et que PERRIER a mise en vedette à l'occasion de la Foire Mondiale de Paris en 1890, est celle qui s'attache à la réalisation de milieux marins artificiels.

### 111 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ENRICHIE"

Lorsque MIQUEL en 1890, proposa une formule d'eau de mer enrichie en plusieurs sels minéraux destinés à apporter les éléments indispensables à la croissance des Diatomées ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ , P, N,  $\text{Si}^{++}$ ), l'analyse chimique des végétaux avait fait de grands progrès et avait permis un inventaire très complet de l'ensemble des éléments rentrant dans la constitution des plantes. De plus, trente ans venaient de s'écouler, lorsque, pour la première fois, le physiologiste allemand J. SACHS (1860), mit au point une technique de culture dans une solution de sels minéraux, et l'histoire des sciences nous apprend, combien cette période de recherche fut féconde du point de vue de la mise au point de formules de liquides synthétiques, qui permirent la reconnaissance du caractère nécessaire, de certains éléments pour la croissance des organismes vivants : que l'on songe aux travaux de KNOP (1884), de LIEBIG (1844) mais aussi à ceux de RAULIN (1870), qui montrèrent le rôle nécessaire du zinc au développement d'*Aspergillus niger*.

Les travaux de MIQUEL ne tarderont pas à faire école. Dès 1910 ALLEN et NELSON reprennent le milieu de MIQUEL et le modifient après



avoir démontré le rôle stimulateur des nitrates sur la croissance. Ce milieu leur permet de cultiver des algues aussi diverses que les diatomées, les Chlorophycées filamenteuses, les Laminaires et même les Algues rouges. Ces auteurs ont aussi le mérite d'avoir montré combien l'eau de mer vieillie est plus efficace sur le développement des algues, que l'eau de mer prélevée sur la côte, immédiatement avant la fabrication du milieu de culture. KILLIAN (1911), KETCHUM et REDFIELD (1938) et MATUDAIRA (1942) proposent également une formulation modifiée du milieu de MIQUEL. Un tableau récapitulatif simplifié (tab. 1) de ces différents milieux, permet de dégager la leçon de tous ces travaux. Il révèle en effet que seul les substances minérales, servent à l'enrichissement de l'eau de mer et que les successeurs de MIQUEL ont tendance à réduire cet apport.

#### 112 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ENRICHIE A L'EXTRAIT DE TERRE"

Pour la culture d'une algue d'eau douce (*Cosmarium*) l'idée de FOEYN (1934), déjà préconisée par PRINGSHEIM (1912), d'ajouter de l'extrait de terre au milieu, permet de réduire les risques de précipitation au cours de l'autoclavage et d'accroître parallèlement le taux de croissance des organismes. La présence dans l'extrait de terre de vitamines, de substances de croissance, d'acides humiques, que l'on sait maintenant être de bons chélateurs, d'ions métalliques comme le fer, fut progressivement démontrée par les auteurs (PRINGSHEIM 1936, von STOSCH 1962), et permit d'en expliquer l'effet stimulant. Pour réaliser le milieu marin à l'extrait de terre, FOEYN (1934) fait appel à un milieu marin composé par SCHREIBER en 1927, et le dénomme pour cette raison "Erdschreiber".

Dans le sillon tracé par FOEYN s'engagèrent par la suite un grand nombre de chercheurs : les uns se contentent d'utiliser l'Erdschreiber tel quel, les autres proposent de nouvelles formulations, dont la tabulation simplifiée figure dans le tableau 2.

Les milieux à l'extrait de terre permirent la culture d'un nombre élevé d'algues aussi diverses que *Cladophora* et *Ulva* (FOEYN 1934), *Acetabularia* (HÄMMERLING, 1934), *Dunaliella* sp. et *Protocentrum* (GROSS, 1934 1937), *Peridinium trochoideum*, *Exuviella baltica* et *Synecosphae-*

TABLEAU 1

MILIEUX "EAU DE MER ENRICHIE EN SELS MINÉRAUX"

	MIQUEL 1890	ALLEN et NELSON 1910	KILLIAN 1911	KETCHUM et REDFIELD 1938	MATUDAIRA 1942
Na <sup>+</sup>	+	+			
Ca <sup>++</sup>	+	+	+	+	+
Mg <sup>++</sup>	+			+	
K <sup>+</sup>	+		+	+	+
Br <sup>+</sup>	+				+
I <sup>-</sup>	+				+
Cl <sup>-</sup>	+				
PO <sub>4</sub> <sup>---</sup>	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+		+		+
Fe <sup>+++</sup>	+	+	+	+	+
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	+			+	
Eau de mer	+	+			



TABLEAU 2

REVUE HISTORIQUE SOMMAIRE DES PRINCIPAUX MILIEUX MARINS SEMI-ARTIFICIELS ET ARTIFICIELS

AUTEURS	EAU DE MER	SELS MINERAUX	OLIGO ELEMENTS	EXTRAIT de TERRE	VITAMINES ou (et) EXTRAITS NATURELS ou (et) BORMONES	TAMPONS	CHELATEURS	SUBSTANCES ORGANIQUES	ALGUES CULTIVEES et (ou) INTERET DE LA CULTURE
<b>I - MILIEUX "MIQUEL"</b>									
MIQUEL (1890)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
OLTHAMNS (1892)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
MOLL (1892)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
ALLEN et NELSON (1910)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	Diatomées : importance de l'ion $NO_3^-$
FILLIAN (1911)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	Rhodophycées
SCHREIBER (1927)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
KETCHUM et REDFIELD (1938)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
MATUDAIRA (1942)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
<b>II - MILIEUX A "L'EXTRAIT DE TERRE"</b>									
FAYN (1934)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
BARKER (1935)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
SWEENEY (1951)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
BAJO et SWEENEY (1955)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	EDTA	_____	
WILSON et COLLIER (1955)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
<b>III - MILIEUX "EAU DE MER ENRICHIE"</b>									
DROOP (1954)	_____	_____	_____	_____	extrait de foie	_____	_____	glucose-peptones	
SWEENEY (1954)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	EDTA	_____	EDTA et vitamine B <sub>12</sub> remplacent avantageusement l'extrait de terre
PROVASOLI et al. 1957	_____	_____	_____	_____	_____	TRIS	EDTA	Foie, glutamate, glycine	
IWASAKI (1961)	_____	_____	_____	_____	_____	TRIS	EDTA	gluconobasohate	culture de <i>Porphyra</i> <i>tenax</i>
<b>IV - MILIEUX "EAU DE MER ARTIFICIELLE"</b>									
FERRIER (1890)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	culture pour huître
MIQUEL (1890, 1893)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
ALLEN (1914)	_____	_____	_____	_____	extrait d'ulve	_____	_____	_____	auxotrophie de <i>Thalassiosira</i> <i>granulata</i> vis-à-vis de la vitamine de FUNK
LEVRING (1946)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	phénilalanine, asparagine	les substances organiques stimulantes mais non nécessaires
CHU	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
BUTNER et al. 1950	_____	_____	_____	_____	_____	_____	EDTA	_____	
LEWIN (1955)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	EDTA	asparagine	
RYTHER (1954)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
DROOP (1957)	_____	_____	_____	_____	_____	TRIS	EDTA	_____	
PROVASOLI (1957, 1964)	_____	_____	_____	_____	_____	TRIS	EDTA ou succinyl ou NTA	_____	
FRIS (1959, 1961, 1962, 1963, 1966, 1967)	_____	_____	_____	_____	_____	TRIS	NTA	_____	



*ra carterae* (BRAARUD, 1951). Cette grande diversité d'algues cultivées, traduisait l'énorme avantage des milieux à l'extrait de terre, mais la difficulté insurmontable était la disparité d'origine de ces extraits. Cet inconvénient, conduisit progressivement les chercheurs, à substituer à l'extrait de terre, des substances organiques et des chélateurs définis, soit dans leur origine, soit dans leur composition chimique.

### 113 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ENRICHIE EN SUBSTANCES MINÉRALES ET ORGANIQUES"

Les premières tentatives dans cette voie nouvelle, furent réalisées par DROOP (1957) qui, tout en conservant l'extrait de terre comme source d'enrichissement, ajoute au milieu de l'extrait de foie, des tryptones (bactotryptones) et du glucose.

PROVASOLI (1957) suivra la même voie en composant les milieux A.S.W. Ces milieux, bien qu'étant constitués à base d'eau de mer, présentent des innovations : enrichissement du milieu en métaux (Mn, Fe) dont la stabilité est assurée grâce à leur complexation par l'EDTA ; stabilisation du pH par l'introduction, dans le milieu, d'une substance tampon (le Tris) ; apport de substances organiques -extrait de foie, acides aminés, glucose et de vitamines (une quinzaine)-. Ces innovations seront pleinement réalisées dans le milieu dénommé AS W3. Un autre milieu, de formulation plus simple, sera proposé par l'auteur sous le sigle AS W8. Ces milieux permettront à PROVASOLI de cultiver *in vitro* : *Ulva* sp. et *Phormidium persicinum* (PINTNER-PROVASOLI 1958).

Avec les travaux d'IWASAKI (1961), l'extrait de terre ne rentre plus dans la définition du milieu de culture, où il est remplacé par un apport de glycérophosphate et de fer chélaté par l'EDTA, tandis qu'est dévolu au Tris le rôle de tamponner efficacement le milieu. Par ailleurs, l'auteur réalise l'enrichissement de ses milieux de culture en sels minéraux, par un apport de nitrate et de phosphate. Ainsi constitués, ces milieux seront dénommés SWI et SWII pour rappeler leur appartenance aux milieux "eau de mer enrichie". Il est intéressant de faire remarquer que ces milieux permirent à IWASAKI la culture fructueuse d'une algue rouge : *Porphyra tenera*.

## 114 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ARTIFICIELLE"

Parallèlement à ces recherches, centrées sur la constitution de milieux de culture marins diversement enrichis, se développait un courant drainé par l'ambition de fabriquer une eau de mer artificielle. Ce courant, naquit au moment même où la technique Eiffel de constructions métalliques dressait, face à un public international que réunissait à Paris la Foire Internationale de 1890, et à une centaine de mètres au-dessus du niveau de la mer, ses prouesses d'équilibre. En effet, c'est à la même exposition que PERRIER présenta son aquarium marin rempli d'eau de mer artificielle, dans lequel il plaça des huîtres. N'était la surprise de PERRIER de constater le développement d'algues vertes appartenant au genre *Ulva*, l'évènement eut été anecdotique ; cette observation, par contre, permet d'attribuer à la réalisation de PERRIER un caractère pionnier.

Pourtant, ce mouvement eut été incapable de progrès, s'il n'avait été supporté par l'essor de l'océanographie physique. C'est en effet à partir de 1800, que commencent les grandes explorations scientifiques des océans et des mers, qui trouvent leur apogée dans la grande expédition du Challenger, navire anglais, qui sillonna tous les océans du globe de 1873 à 1876 et rapporta une moisson de données dont celles relatives à la composition chimique des océans, publiées par DITTMAR (1884), huit ans après le retour au port du grand voilier.

ALLEN ET NELSON (1910), se basant sur un travail de VAN'T HOFF (1905, cit. PROVASOLI et al. 1975), relatif à la détermination de la concentration moléculaire de l'eau de mer, réalisent un milieu marin artificiel, qu'ils enrichissent des solutions minérales de MIQUEL et cultivent avec succès une diatomée du genre *Coscinodiscus*.

A la suite de la publication des travaux de DITTMAR (ib.), ALLEN (1914) compose un nouveau milieu enrichi en phosphates, en nitrates, en fer et tamponné par une solution de bicarbonate de sodium. La culture, sans succès, d'une diatomée appartenant au genre *Thalassiosira*, fut reprise avec fruit, mais après addition au milieu de culture de quelques millilitres d'eau de mer.

ALLEN réalisa plusieurs expériences, pour déterminer la nature de la substance responsable de ce succès : le Brome, l'iode, l'or, l'aluminium, le strontium et le lithium ne donnèrent aucun résultat ; un

extrait aqueux d'Ulve se révéla positif, alors que les cendres de l'algue étaient inopérantes ; par ailleurs, des peptones préalablement livrées à une fermentation putride, produisirent également la croissance algale, tandis que les acides aminés et les acides organiques restaient sans effet. Cet auteur comprit alors, que cet effet était dû à une substance sécrétée par les bactéries. A la même époque, les travaux de FUNK (1912, cité DEBRE et DESBUQUOIS, 1964), relatifs à la mise en évidence dans un extrait de riz complet, d'une substance azotée appelée "vitamine" étaient connus d'ALLEN et lui suggérèrent la nature vitaminique de la substance "X" présente dans l'extrait putride de peptones.

A peine inventé, le milieu "eau de mer artificielle" venait de démontrer expérimentalement la nature auxotrophique des algues, et de prouver par là, la valeur de la méthode. ALLEN et NELSON traçaient ainsi la voie d'investigation des besoins nutritifs des algues, dans laquelle allait s'engager un grand nombre de chercheurs et qui, sous l'impulsion de PROVASOLI, aux Etats-Unis, de DROOP en Angleterre et de FRIES en Suède, conduisit à la formulation de nombreux milieux "eau de mer artificielle" et à l'exploration des domaines variés de la nutrition des algues, relatifs à l'influence des substances minérales (PEACH et DRUMONT 1924, BARKER 1935, CHU 1946, LEVRING 1946, KYLIN 1941, 1942, 1945), à l'interaction entre ions (PROVASOLI, Mc LAUGHLIN et DROOP 1957), au choix de la substance tampon (PROVASOLI et PINTNER 1953, HUTNER 1948, LEWIN 1954, FRIES 1963, PROVASOLI 1964, LEVRING 1946) à l'influence des vitamines (PROVASOLI, Mc LAUGHLIN et DROOP 1957, HENKEL 1952, FRIES 1959, 1960, 1961, 1964, IWASAKI 1965, DROOP 1957, BOALCH 1961, TATEWAKI et PROVASOLI 1963) à l'action des substances oligodynamiques de croissance (KYLIN 1942, 1945, HENKEL 1952, CONRAD et al. 1959, IWASAKI 1965...) et à l'effet des substances organiques (PROVASOLI, McLAUGHLIN et DROOP 1957, LEVRING 1946, DROOP 1957, PROVASOLI et al. 1957, PROVASOLI 1964, FRIES 1963, KYLIN 1942).

La présentation simplifiée de l'ensemble des acquisitions, relatives à la constitution des milieux de culture d'algues et résumée dans le tableau 2, permet d'apprécier plus aisément les progrès réalisés depuis MIQUEL jusqu'à nos jours. Ce tableau, nous apprend que la complexité dans la formulation des milieux marins artificiels atteint son

apogée dans les laboratoires HASKINS de l'école américaine de PROVASOLI, dans les laboratoires Millport de DROOP en Ecosse et dans les laboratoires de FRIES à Stockholm en Suède. Ajoutons que la mise au point des milieux ASP aux Etats-Unis et du milieu ASP<sub>6</sub>F en Suède, ont permis à PROVASOLI (1964) et à FRIES (1959, 1961, 1964, 1966a, 1967) de préciser avec succès, les besoins nutritifs d'un grand nombre de Rhodophycées. Enfin, plus près de nous, on peut citer la mise au point par COSSON (1973) d'un milieu semi-synthétique dérivé du milieu ES et qui permit à cet auteur de cultiver avec succès des algues brunes du genre *Laminaria*.

Face aux nombreux travaux, que nous venons d'exposer à grands traits, cette étude tend à réaliser un milieu de culture défini selon les critères physico-chimiques habituels, qui permette d'aborder, dans les meilleures conditions, l'étude de la morphogenèse expérimentale de *Gracilaria verrucosa*.

Dans la pléthore de milieux proposés par les auteurs, nous avons fait un choix concernant les milieux de base. Ceux auxquels nous avons fait appel sont le milieu ASW<sub>3</sub> modifié, le milieu ASP<sub>6</sub>F (modifié BODARD), le milieu KG (formulé par nous-même et basé sur des analyses chimiques de l'eau de mer effectuées à Wimereux par DELEERSNYDER et GLACON, 1973).

Nous nous proposons d'étudier, dans le présent travail, le rôle de quelques paramètres physico-chimiques (pH, macroéléments, microéléments, hormones de croissance, vitamines) et écophysiologiques (température, salinité, lumière).

"La Science n'est pas un état, c'est une action, un échange, un enrichissement mutuel entre ce qui est acquis et ce qui est en cours d'acquisition. C'est une manière de relation entre l'esprit et l'entourage qui lui correspond, dans l'état où l'ont amené ceux qui ont vécu avec nous. Elle est un phénomène vivant qui subsiste et s'épanouit, bien que ses composants et compositeurs soient éphémères. C'est un nouvel exemple de la manière dont l'espèce humaine crée des états de la vie dont les humains constituent les éléments.

P. VERHOYE

Nous n'irons plus au ciel, p.102



## CHAPITRE 2

"MATERIEL" ET METHODES

Les résultats relatifs à l'influence des principaux paramètres écophysologiques et physicochimiques sur l'édification et sur la croissance du thalle de *Gracilaria verrucosa* ne sauraient être convenablement interprétés et appréciés, si n'étaient précisés préalablement le type de matériel utilisé et les conditions expérimentales qui ont conduit à ces résultats.

## 21 - LE "MATÉRIEL"

### 211 - HISTORIQUE DE LA NOMENCLATURE

Le *Gracilaria verrucosa* est décrit pour la première fois sous le nom *CERAMIANTHUM* par DONATI en 1750. Neuf ans après que LINNE (1753) eut posé les fondements de la nomenclature binaire dans le *Systema Plantarum*, HUDSON (1762) en Grande-Bretagne, nomme et décrit un *Fucus verrucosa* et un *Fucus confervoïdes* que les caractères morphologiques rapprochent de l'algue décrite par DONATI. On retrouve le binôme "*Fucus confervoïdes*" sous la plume de LINNE, dans la deuxième édition du *Species Plantarum* en 1763. A cette époque, la systématique des algues avait fait peu de progrès et était encore tributaire des travaux de A.L. de JUSSIEU (1789), qui répartissait les algues en deux groupes : les Byssi et les Fuci.

Ce n'est qu'à l'aube du XIXème siècle, avec les recherches de LAMOUREUX (1813), qu'une vraie classification des algues est proposée et que les grandes divisions -algues vertes, rouges et brunes- sont reconnues. Ces recherches le conduisirent également à délimiter des genres nouveaux à l'intérieur du grand groupe des *Fucus*, dont l'hétérogénéité avait été reconnue par J. STACKOUSE (1809). A la suite des travaux de LAMOUREUX (1813) le *Fucus confervoïdes* de LINNE fut successivement appelé *Gracilaria* (GREVILLE 1830) et *Cordylecladia* (AGARDH 1852). DAWSON (1949) s'appuyant sur des différences structurales du cystocarpe, divise le genre *Gracilaria* en *Gracilaria* et *Gracilariopsis*.

Enfin PAPPENFUSS (1950), propose, sous le binôme *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Pappenf., une combinaison nouvelle, car HUDSON (1762) avait décrit dans son ouvrage un *Fucus verrucosa* qu'il appellera quelques pages plus loin *Fucus confervoïdes*.

Dans la suite du texte, pour éviter des répétitions inutiles, *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. sera tout simplement appelé *Gracilaria* ou gracilaire.

## 212 - POSITION SYSTEMATIQUE DE *Gracilaria verrucosa*

Le thalle adulte de *G. verrucosa* offre l'aspect de touffes constituées chacune par des frondes cylindriques de couleur brune, longues de 5 à 20 cm voire plus, portant des rameaux secondaires et tertiaires également cylindriques. Les frondes principales du thalle s'insèrent sur un disque circulaire qui fixe l'algue sur le substrat rocheux. Une coupe transversale dans une fronde quelconque du thalle montre de l'extérieur vers l'intérieur : un cortex constitué de deux rangées de petites cellules ( $\approx 5\mu\text{m } \phi$ ), contenant chacune plusieurs rhodoplastes pariétaux. La régularité des divisions anticlines des cellules du cortex, lui donne un aspect palissadique ; une région subcorticale constituée de deux ou trois assises de cellules plus volumineuses que précédemment et dont le cytoplasme renferme des rhodoplastes ; une moëlle parenchymateuse sans axe visible, constituée de grandes cellules subisodiamétriques, ( $\approx 30\mu\text{m } \phi$ ) reliées entre elles par de nombreuses synapses secondaires.

L'organe femelle est constitué d'un rameau carpogonial tricellulaire. Quant aux cellules auxiliaires, ce sont des cellules végétatives banales, difficilement reconnaissables avant la fécondation. Le procarpe de *Gracilaria* est donc un procarpe à cellule auxiliaire non différenciée. Après la fécondation, le rameau carpogoniale, la cellule auxiliaire et les cellules végétatives voisines fusionnent en une grande cellule, dite cellule de fusion, qui est à l'origine du gonimoblaste. L'évolution du gonimoblaste et des cellules végétatives du cortex conduit à la formation d'une structure globuleuse appelée le cystocarpe. Une coupe transversale à travers un cystocarpe mûr, montre de l'extérieur vers l'intérieur : une enveloppe épaisse -le péricarpe- constituée de nombreuses assises de petites cellules renfermant des rhodoplastes ; un tissu parenchymateux qui donne naissance à de nombreuses rangées de filaments pluricellulaires, dont les cellules distales se constituent en carposporocyste, qui à maturité libère les carpospores. Celles-ci sortent du cystocarpe à travers un conduit creux appelé carpostome. Le péricarpe et le

gonimoblaste sont reliés entre eux par des filaments unicellulaires, appelés filaments nourriciers.

Les organes reproducteurs mâles de la gracilaire se forment dans des cryptes ou cavités ovoïdes ménagées dans la région corticale du thalle. Chaque crypte ou conceptacle est tapissée, sur sa face interne, de cellules qui évoluent chacune en un spermatocyste. A maturité, chaque spermatocyste libère une spermatie qui sort du conceptacle par l'ostiole.

Les thalles fertiles du tétrasporophyte présentent, à maturité, des tétrasporocystes qui se caractérisent par leur division cruciée. Ces tétrasporocystes sont le siège de la méiose qui conduit à la formation de tétraspores.

### 213 - APERCU SOMMAIRE DE L'ÉCOLOGIE DE *Gracilaria*

S'il est important, pour l'expérimentateur de connaître le plus exactement possible la position taxonomique de l'être vivant qu'il veut étudier, il est non moins important pour lui, d'apprécier les relations qui lient cet être à son milieu et aux autres êtres vivants peuplant ce milieu.

#### 2131. Répartition géographique du genre *Gracilaria*

La centaine d'espèces que comprend le genre, se répartit dans la province néritique de tous les océans et de presque toutes les mers du globe, sous les latitudes s'étendant des régions subarctiques aux régions antarctiques. Cette répartition latitudinale est aussi de règle chez *Gracilaria verrucosa*, dont les populations s'observent du 60° latitude nord au 40° latitude sud, de l'Océan Atlantique à l'Océan Pacifique, en passant par l'Océan Indien.

Sur les Côtes de la France, le genre est représenté par neuf espèces, dont une seule - *G. verrucosa* (Huds.) Papenf. - se développe sur les Côtes Nord-Ouest de la Manche. Sur la Côte d'Opale, entre Boulogne et le Cap Gris-Nez, *G. verrucosa* forme des populations qui se développent entre les niveaux moyens et inférieurs de l'étage littoral, dans les anses et les cuvettes rocheuses ensablées sur le fond desquelles les individus se fixent par un disque aplati. GEHU (1964) avait décrit le *Gracilaria* dans le *Polyideto-Gracilarietum*, association végétale des

algues rouges de la base de l'étage médiolittoral. BODARD (1975, communication personnelle) a fait des relevés dont le détail figure dans le tableau 3.

L'ubiquité de *Gracilaria verrucosa* est due à son aptitude à supporter de fortes variations des facteurs écologiques [température (eurythermie), salinité (euryhalinité) et éclairément].

### 2132. Le milieu de vie de *Gracilaria verrucosa*

Les facteurs écologiques, qui président au développement de *Gracilaria* de la Côte d'Opale, découlent des propriétés physiques et chimiques des eaux de mer en général, mais dépendent aussi de l'océanographie régionale. Ces facteurs écologiques sont essentiellement : la température, la salinité, le pH, les conditions d'éclairément, la dynamique des eaux. L'étude de ces paramètres relevant d'un traité est exclue dans le cadre de ce travail, aussi nous limiterons-nous à une présentation sommaire de quelques uns de ces paramètres tels qu'ils sont connus sur nos Côtes.

Température, salinité : des mesures hebdomadaires de température et de salinité effectuées par GLACON (1977) à l'Institut de Biologie Maritime de Wimereux de 1968 à 1974, nous ont servi à construire le diagramme T.S. des moyennes mensuelles de température et de salinité calculées sur six années. Ce diagramme (fig. 1) montre, d'une part, que la salinité des eaux de surface oscille en moyenne entre 33 ‰ et 34 ‰, soit une faible variation, tandis que la température varie entre 6°C et 18°C en moyenne, soit une forte variation ; il révèle, d'autre part, que température et salinité, ne sont pas indépendantes, mais varient dans le même sens.

Ces données numériques, relatives à la température et à la salinité, révèlent une faible variation de salinité mais une forte variation de température. GEHU (1964) faisait déjà remarquer que la relative pauvreté de la flore algologique de la côte boulonnaise, par rapport à la flore bretonne, était liée aux températures relativement plus basses que sur les côtes bretonnes.

Le pH : le pH de l'eau de mer est généralement voisin de 8 ( $8,1 \leq \text{pH} \leq 8,3$ ). Cette constance remarquable de la quantité d'ions

TABLEAU 5 - RELEVÉ PHYTOLOGIQUE (BODARD, 1975) 15

Surface	1600 cm <sup>2</sup>	2 m <sup>2</sup>	1 m <sup>2</sup>	2 m <sup>2</sup>	75 cm <sup>2</sup>
Date	7/9	27/8	6/9	6/9	27/8
Pente	0 %	légère < 10 %	plat	faible	plat
Exposition	lumière forte	lumière abri partiel d'un rocher 30 cm	lumière forte	lumière forte	lumière sous abri partiel d'un rocher
Orientation	sous W	pente → E	sous W	sous W	sous W
Substrat	sable	sable sur rocher	sable sur rocher	rochers	sable sur rocher
Recouvrement	100 %	70 %	60 %	80 %	50 %
Hauteur par rapport aux B.M.V.E.	0	+ 50 cm	+ 10 cm	+ 35 cm	+ 50 cm
<i>Chondrus crispus</i> (L.) Lyngbye.	L. sup	4.3	1.1	5.5	4.3
<i>Gracilaria verrucosa</i> (Hudson) Papenfuss.	5.5	2.2	2.2	(bords)	+
<i>Plocamium coccineum</i> (Hudson) Lyngbye.	1.1	+	4.3(3)	2.2	1.1
<i>Rhodothamniella floridula</i> (Dillwyn) J. Felzmann	4.3	3.3	3.4	+	3.3
<i>Ceramium rubrum</i> (Hudson) C. Agardh	2.3	+		+	+
<i>Cladophora rupestris</i> (L.) Kützinger.	1.1	2.2			
<i>Polyides rotundus</i> (Gmelin) Greville	+ (j)	+	2.1 (j)		2.1
<i>Ulva rigida</i> C. Agardh	+ (e) (7)		2.1	1.1	
<i>Ulva lactuca</i> L.	1.1	1.1			2.2
<i>Griffithsia flocculosa</i> (Ellis) Battenberg		1.3			1.1
<i>Cladophora pellucida</i>		1.2			
<i>Rhodymenia palmata</i> (L.) J. Agardh		2.1	+ (j) (e) (5)		2.2(2)
<i>Polysiphonia nigrescens</i> (Dillwyn) Greville		4.3			
<i>Cystoclonium purpureum</i> (Hudson) Batters.		1.3			
<i>Phyllophora membranifolia</i> (Goodenough et Woodward) J. Agardh		+			
<i>Fucus serratus</i>		+			+
<i>Ulva</i> sp.		+ (e) (1)			
<i>Chaetomorpha melagnonium</i>			+	3.1	2.2
<i>Ahnfeltia plicata</i>			1.2	4.3	2.2
<i>Corallina officinalis</i>			3.3	2.2	+
<i>Laminaria digitata</i>	L. rochers	L. inf	1.2	+ (j) bords	
<i>Laminaria saccharina</i>	L. rochers		3.2(3)		
<i>Gymnogongrus devonensis</i> (Greville) Schotter			2.2	2.2	
<i>Eryopsis pennata</i>			+ (j)		
<i>Membranoptera alata</i>				+ (e) (6)	
<i>Phyllophora epiphylla</i> (Müller) Batters.				+	
<i>Porphyra umbilicalis</i> (L.) J. Agardh	+ (e) (7)				
Rhodophycées sp. filamenteuses (4)	+				
Rhodophycées sp. encrustantes rouges (4)				+	
Rhodophycées sp. encrustantes roses (4)			+		
<i>Acrochaetium</i> sp.				+ (e)	
<i>Laminaria</i> sp.		+ (j)			

(1) sur *Polysiphonia nigrescens* ; (2) sur *Fucus serratus* ;  
 (3) présence de plantules ; (4) détermination en cours ;  
 (5) sur *Laminaria digitata* ; (6) sur *Chondrus crispus* ;  
 (7) sur *Gracilaria verrucosa*.

Le premier relevé peut être retrouvé sur plus de 100 m<sup>2</sup>.



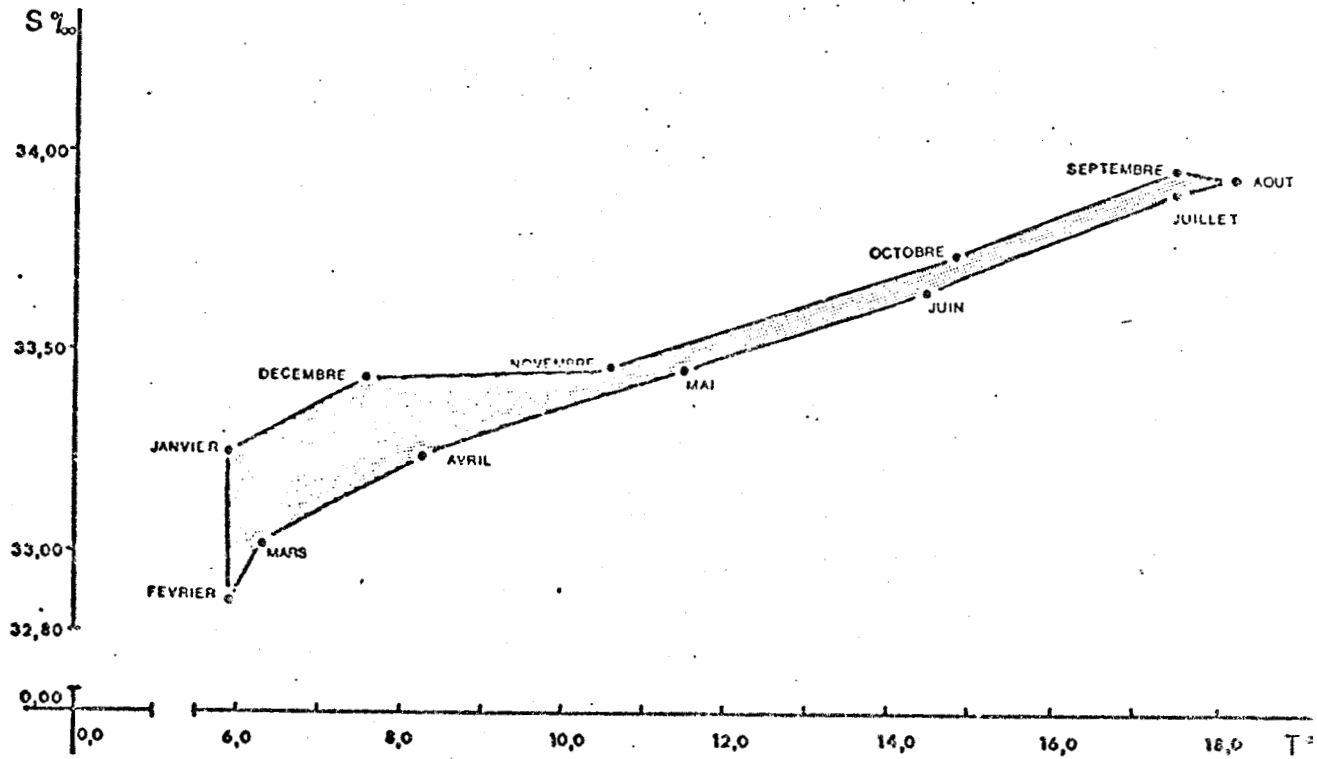


FIG. 1 : DIAGRAMME T-S (TEMPÉRATURE ET SALINITÉ) : ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ DANS LES EAUX DE LA MANCHE-OUEST AU COURS DES ANNÉES 1968 À 1974 (D'APRÈS DES MESURES EFFECTUÉES PAR GLACON À WIMEREUX À LA STATION DE BIOLOGIE MARITIME).  
 LÉGENDE : T°C = TEMPÉRATURE  
 S‰ = SALINITÉ

hydrogènes libres dans l'eau de mer est essentiellement due au système tampon bicarbonates  $\rightleftharpoons$  carbonates.

Des mesures bihebdomadaires du pH couvrant les années 1972, 1973 et 1974, ont été effectuées par GLACON (1977) à Wimereux. Nous avons utilisé ces données, pour calculer la moyenne mensuelle du pH. Cette valeur oscille entre 7,9 et 8,10. Afin de rechercher une relation possible entre le pH et la salinité, la température et le mois de l'année, nous avons construit l'abaque de la figure 2. L'analyse de ce graphique, montre tout d'abord que température et salinité sont deux paramètres liés, puisque, durant les mois de l'été la salinité est plus élevée que durant les mois d'hiver. Si par ailleurs on recherche l'existence d'une relation entre le pH et la température, on note que le pH a tendance, si l'on excepte le mois d'avril, à prendre les valeurs les plus élevées au cours des mois d'été, et les plus basses au cours des mois d'hiver.

La lumière : le rayonnement solaire, en pénétrant dans l'eau de mer, s'altère quantitativement et qualitativement. L'altération quantitative du rayonnement solaire, se traduit par une diminution progressive de l'éclairement énergétique avec la profondeur. Contrairement aux eaux du large, qui se comportent comme un filtre bleu-vert (IVANOFF 1975), la transparence des eaux côtières est plus grande pour le vert et le vert-jaune que pour le bleu, en raison de la présence, dans l'eau, de "substances jaunes" dont l'origine semble être terrigène et phytoplanctonique.

Les algues qui se développent dans la zone de balancement des marées de nos côtes sont soumises au régime général d'éclairement tel qu'il vient d'être très succinctement décrit. Elles subissent, de par le caractère fortement turbide des eaux -dû au plancton et à la mise en suspension de nombreuses particules argileuses- et en raison des fluctuations de la hauteur de la masse d'eau dans laquelle elles sont immergées, un régime d'éclairement fortement contrasté. C'est le cas pour *Gracilaria*, qui à marée basse, se trouve dans des nappes d'eau profondes d'une cinquantaine de centimètres, tandis qu'à marée haute, il est immergé sous une colonne d'eau de plus de 5 mètres de hauteur.

Hydrodynamique : la Gracilaire, en croissant dans les cuvettes de la zone battue de l'estran, est évidemment soumise aux efforts



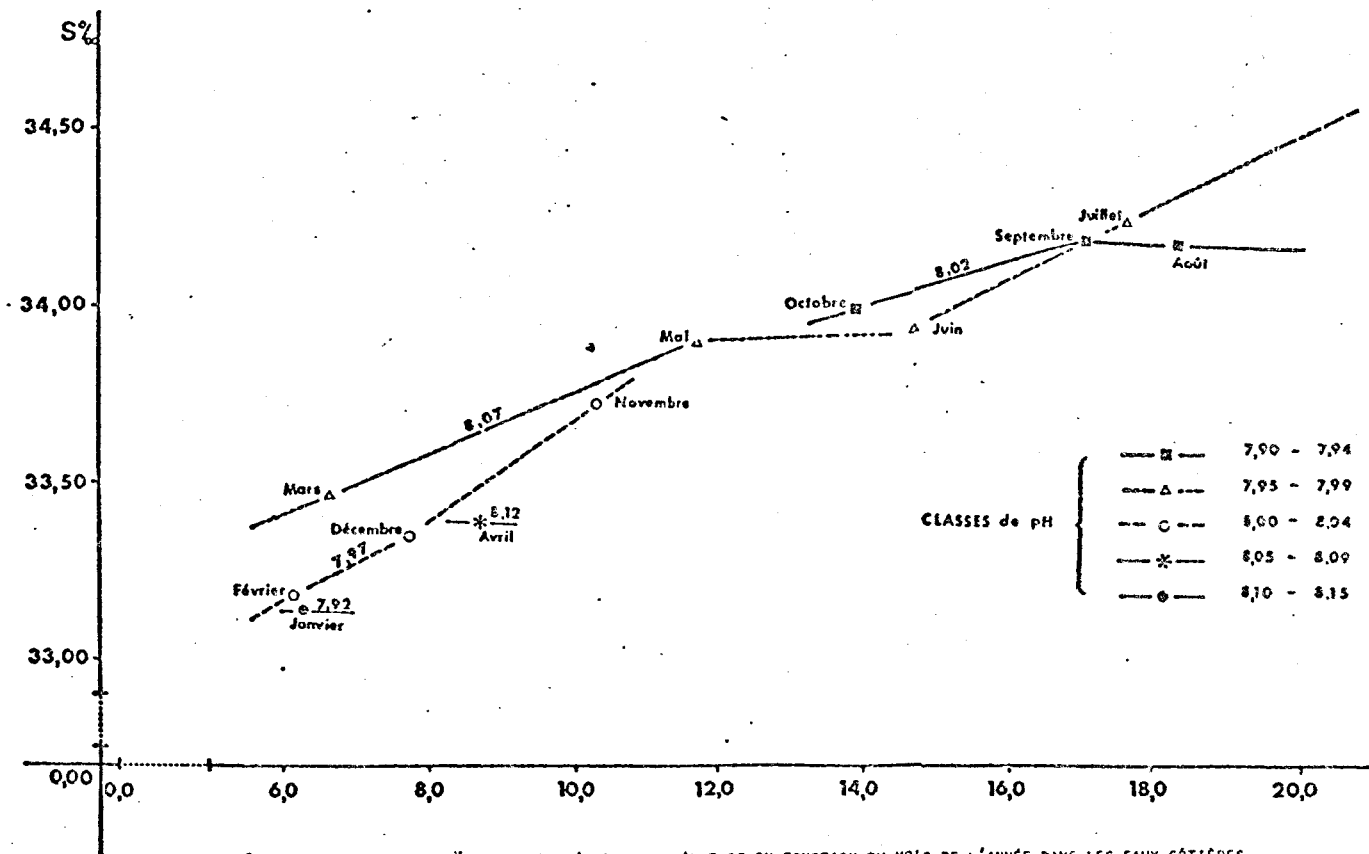


FIG 2 : RELATION ENTRE LE pH, LA SALINITÉ ET LA TEMPÉRATURE EN FONCTION DU MOIS DE L'ANNÉE DANS LES EAUX CÔTIÈRES SUPERFICIELLES PRÈS DE LA STATION DE BIOLOGIE MARITIME DE WIMEREUX (D'APRÈS DES MESURES EFFECTUÉES PAR GLACON AU COURS DES ANNÉES 1972-1974).  
LÉGENDE : CHAQUE COURBE DE pH REPRÉSENTE LA VALEUR CENTRALE D'UNE CLASSE DE pH DONNÉE, DONT L'INTERVALLE COMPREND 0,04 UNITÉS DE pH.

mécaniques conjugués de la houle et de la marée. Si l'intensité de cet effort s'annule lors des basses mers, il est maximal lors du flux et du reflux lorsque les vagues déferlent sur l'estran.

L'analyse sommaire des principaux facteurs écologiques, que nous venons de réaliser, montre que, hormis le pH et la salinité, *Gracilaria* se développe dans un milieu écologique fortement contrasté, qui traduit l'éminente adaptabilité de cette algue, et qui confirme sa forte valence écologique.

## 22 - MÉTHODES

### 221 - RECOLTE ET CONSTITUTION DES LOTS DESTINÉS A LA CULTURE

Les plants de *Gracilaria* sont récoltés lors des marées de vives-eaux du printemps et de l'automne et placés dans des récipients en plastique entre les thalles humectés d'algues brunes, pour assurer, dans les meilleures conditions, le transport de la récolte de la côte jusqu'au laboratoire à Lille. Au Laboratoire, les plants sont placés sous une rampe lumineuse constituée par des tubes fluorescents blancs, dans des aquariums contenant de l'eau de mer que l'on renouvelle une fois par semaine. Les travaux préliminaires de culture de *Gracilaria* ayant révélé une forte activité morphogène des fragments de thalle (KLING et BODARD, 1974), nous ont conduits à utiliser des segments de thalle comme "matériel" de culture. Les segments sont découpés, à l'aide d'un trocart, dans la région proximale des rameaux primaires, qui ont été préalablement isolés, émondés et nettoyés.

Ces segments, lorsqu'on les place en culture, manifestent une activité morphogène polarisée qui se traduit par la formation, à la périphérie de la section distale, de un ou plusieurs ramules. La formation et la croissance de ces ramules dépend des conditions expérimentales qui sont imposées aux segments, mais également des facteurs morphogénétiques endogènes liés à la position qu'occupaient ces segments dans les rameaux primaires avant la segmentation. En effet, la croissance apicale de *Gracilaria* conduit à supposer l'existence d'un gradient morphogénétique entre le sommet et la base du rameau primaire. Pourtant des expériences faites dans ce sens (KLING 1977, sous presse)

n'ont pas réussi à confirmer cette hypothèse. On peut donc considérer, en première approximation, que les segments présentent tous les mêmes potentialités morphogénétiques et que leur évolution, en milieu de culture, est sous la dépendance des seuls paramètres physicochimiques et écophysiologiques.

#### 222 - CHOIX DU CRITERE DE CROISSANCE

On peut penser que la formation et le devenir des ramules, dont nous avons parlé plus haut, sont sous la dépendance de deux mécanismes bien distincts : un mécanisme de différenciation grâce auquel une cellule corticale devient la cellule apicale de la future ramification secondaire, un mécanisme de croissance au cours duquel les divisions successives de la cellule apicale néoformée et l'allongement des cellules-filles, issues de ces divisions, conduisent à la croissance du ramule néoformé.

Ainsi, en appréciant le comportement des segments en culture, par la seule mesure de la croissance des rameaux néoformés, nous sommes conscients de la perte d'information relative à la différenciation dont dépend nécessairement leur croissance.

Cependant, pour des raisons de commodité, nous nous sommes limités à l'appréciation de la seule croissance de ces ramules, croissance qui est exprimée en milligrammes (mg) de matière sèche obtenue par mg de matière sèche mise en culture. Les pesées sont réalisées à l'aide d'une balance SARTORIUS qui permet d'apprécier le dixième de milligramme avec une sensibilité de 0,05 mg.

#### 223 - CONDITIONS DE CULTURE

L'objet du présent paragraphe est de décrire les conditions générales de culture, nous réservant de préciser, dans chaque chapitre, les modalités opératoires particulières, lorsque cela s'avèrera nécessaire.

Les algues sont cultivées dans des boîtes de Roux ou des fioles de Fourneau que l'on place sur des étagères horizontales, sous une rampe lumineuse constituée de tubes fluorescents (Sylvania F 20 T 12) dont le flux lumineux, reçu au niveau des cultures, est dirigé normalement par rapport à la surface des étagères. Celles-ci sont disposées dans des enceintes climatisées dont la température est régulée

avec une précision de  $\pm 1$  degré.

Les milieux de culture utilisés sont :

- . l'eau de mer,
- . l'eau de mer enrichie : ASW3 modifié (tableau 4),
- . le milieu de PROVASOLI modifié par FRIES (1963) et dénommé ASP<sub>6</sub>F (tableau 5).
- . le milieu dénommé KG (tableau 17, ch. 5).

### 2231. Définition d'un délai de culture

Il importait, avant d'entreprendre l'étude expérimentale de l'influence des divers paramètres, sur la croissance de *Gracilaria* cultivée *in vitro*, de définir le délai de culture nécessaire pour atteindre le taux de croissance le plus élevé.

Ce délai a été mesuré chez des individus cultivés respectivement en milieu renouvelé et en milieu non renouvelé.

Les échantillons destinés à être soumis à une culture en milieu renouvelé (ASW<sub>3</sub> : tab. 4) sont placés dans une fiole de Roux modifiée permettant d'assurer le renouvellement du milieu à l'aide d'une pompe péristaltique (type MASTERFLEX). Cette pompe assure une circulation du milieu de culture pendant deux cycles de 10 mn par jour. Le débit est calculé de telle sorte qu'après une semaine, les 100 ml de milieu introduits dans la fiole soient entièrement renouvelés. L'expérience est conduite à 20°C sous un flux lumineux incident blanc de 5 W. m<sup>-2</sup> (tubes fluorescents Sylvania GroLux). La croissance est mesurée en prélevant une quarantaine d'individus respectivement après 15, 20, 30, 45 et 60 jours de culture.

Les résultats sont exprimés dans le graphique de la figure 3. Dans le lot cultivé en milieu renouvelé, la croissance, toujours supérieure à celle observée chez le lot cultivé en milieu stagnant, présente un taux qui est maximal entre 20 et 30 jours de culture.

Les résultats observés plus haut montrent que le développement des thalles placés dans un milieu de culture régulièrement renouvelé est supérieur à celui des thalles placés dans des conditions de confinement. Cette observation est confirmée par les travaux de JOHNS (1959), KIM (1970) et EDELSTEIN et al. (1976). Cependant, devant la difficulté technique à réaliser un dispositif de renouvellement de

TABLEAU 4  
MILIEUX ASW3 ET ASW3 MODIFIÉ

Sels	ASW3	ASW3 modifié
eau de mer	1000 ml	1000 ml
KNO <sub>3</sub>	200 mg	(+)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mg	(+)
Mn (MnCl <sub>2</sub> )	0,4 mg	
Fe (FeCl <sub>3</sub> )	0,1 mg	
Vit.* ASP6	1 ml	1 ml
extrait de foie	10 mg	(-)
NaH glutamat	500 mg	(-)
glycine	500 mg	(-)
TRIS	1 g	(+)
extrait de terre	40 ml	(+)
oligoéléments du milieu ASP6	(-)	1 ml
GeO <sub>2</sub>		1 mg
pH	7,6	7,8

\*Vit. : solution de vitamines du milieu ASP6



## MILIEUX ASP6 ET ASP6F

		ASP6		ASP6F	
Sels	H <sub>2</sub> O	1000	ml	1000	ml
	NaCl	24	g	(+)	
	KCl	0,7	g	(+)	
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	6	g	8	g
	CaCl <sub>2</sub>	0,415	g	(+)	
	NaNO <sub>3</sub>	300	mg	(+)	
	Na <sub>2</sub> glycérophosphate, 5H <sub>2</sub> O	100	mg	(+)	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	70	mg	(-)	
	KJ			0,065	mg
	KBr			96,9	mg
	TRIS	1	g		
	pH	7,6		7,6	
	Oligoéléments	B (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	2	mg	1
Fe (Cl <sup>-</sup> )		2	mg	1	mg
Mn ( " )		1	mg	5	µg
Zn ( " )		0,5	mg	0,25	mg
Co ( " )		0,01	mg	(-)	
Cu ( " )		0,02	mg	10	µg
Mo (NaMoO <sub>4</sub> )		0,5	mg	0,25	mg
Vitamines	B <sub>12</sub>	0,05	µg	1	µg
	Thiamine, HCl	0,2	mg	(+)	
	Acide nicotinique	0,1	mg	(+)	
	Putrescine, 2HCl	0,04	mg	(+)	
	Ca-pantothénate	0,1	mg	(+)	
	Riboflavine	5	µg	(+)	
	Acide p-aminobenzoïque	0,01	mg	(+)	
	Pyridoxine, 2HCl	0,04	mg	(+)	
	Biotine	0,5	µg	(+)	
	Inositol	1	mg	(+)	
	Acide folique	2,5	µg	(+)	
	Acide folinique	0,2	µg	(-)	
	Acide orotique	0,26	mg	(+)	
	Thymine	0,8	mg	(+)	
Pyridoxamine, 2HCl	0,02	mg	(+)		
Choline-citrate	0,5	mg	(+)		



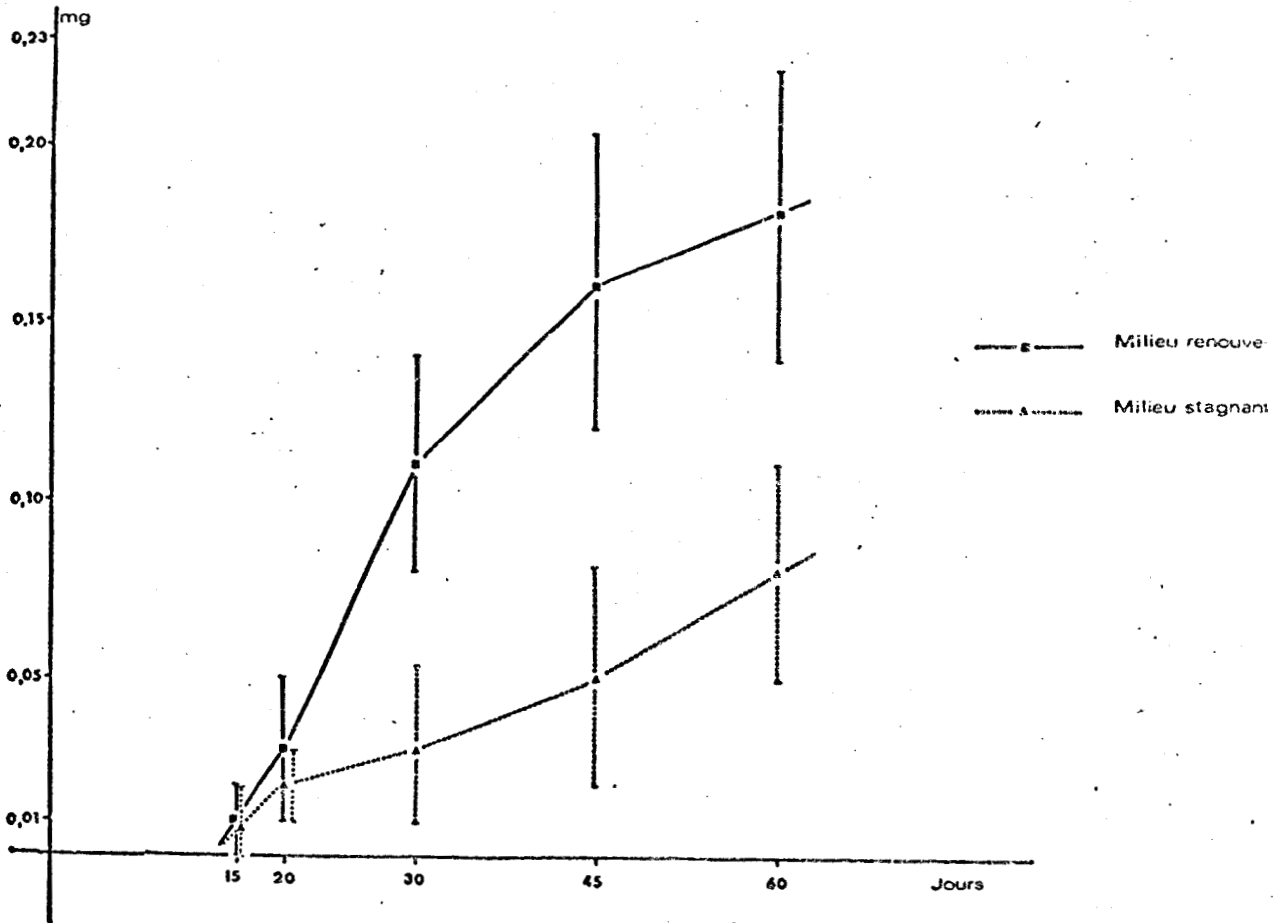


FIG. 3 : CROISSANCE COMPARÉE DES THALLES DE *G. verticosa* EN MILIEU RENOUVÉ ET EN MILIEU STAGNANT, EN FONCTION DU TEMPS.

LÉGENDE : LE DOUBLE DE L'ERREUR STANDARD EST FIGURÉ PAR UN TRAIT VERTICAL DE PART ET D'AUTRE DE CHAQUE POINT EXPERIMENTAL.

milieux dans des expériences comprenant souvent plus de 15 niveaux d'essais, nous avons choisi les conditions de culture en milieu confiné et un temps de culture égal au moins à 30 jours.

### 2232. Choix d'une longueur de segment

Des cultures préliminaires, réalisées avec des segments de 1 et 2 cm de longueur, ont révélé l'influence de la taille du segment inoculé sur la croissance des proliférations. Ces résultats nous ont conduits à définir une longueur qui permette d'obtenir une croissance la plus élevée dans un intervalle de fluctuation le plus étroit possible. Dans ce but on cultive aux conditions habituelles de température, d'éclairage et de temps, quatre lots constitués respectivement de segments mesurant 20, 10, 5 et 2 mm de longueur.

Les résultats sont exprimés sur les figures 4A et 4B. L'application du test F (chapitre 2 : Annexes 1 et 2) montre que le F est égal à 10,21. Or la probabilité, pour que le F (3;126), lu dans les Tables, soit égal ou plus grand que 3,95, est égale à 0,01 soit :

$$P \{F_{3;126} \geq 3,96\} = 0,01$$

Ce résultat conduit à rejeter au seuil de 1 % l'hypothèse d'homogénéité de la série des moyennes. On compare alors, par le test T, les moyennes deux à deux. Le T calculé et la probabilité attachée à cette valeur sont consignés dans la figure 4A. Il découle de cette comparaison que les plus fortes croissances s'observent chez les segments qui mesurent respectivement 2 et 5 mm de longueur.

Si on compare la fluctuation d'échantillonnage des moyennes de poids, on constate que l'intervalle de fluctuation varie en raison inverse de la taille : plus la taille diminue et plus cet intervalle grandit (fig. 4A). Or, s'il est important de définir une taille qui conduise à une croissance maximale, il est non moins important de disposer d'une population dont la croissance soit homogène. Pour cette raison, nous avons opté pour une longueur de segment égale à 10 mm.



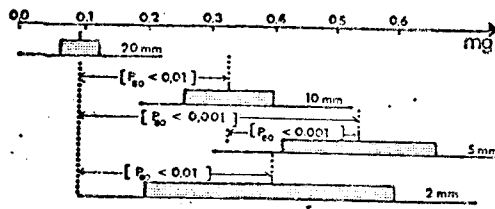


FIG. A : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS DES LOTS.  
 LÉGENDES: LA MOYENNE EST FIGURÉE PAR UN PETIT TRAIT VERTICAL DE PART ET D'AUTRE DUQUEL LE DOUBLE DE L'ERREUR STANDARD DE LA MOYENNE EST FIGURÉE EN POINTILLÉS.  
 LE DEGRÉ DE SIGNIFICATION P POUR UN NOMBRE DE DEGRÉS DE LIBERTÉ DDL = N<sub>1</sub> + N<sub>2</sub> - 2 SOIT PDDL EST NOTÉ ENTRE CROCHETS.

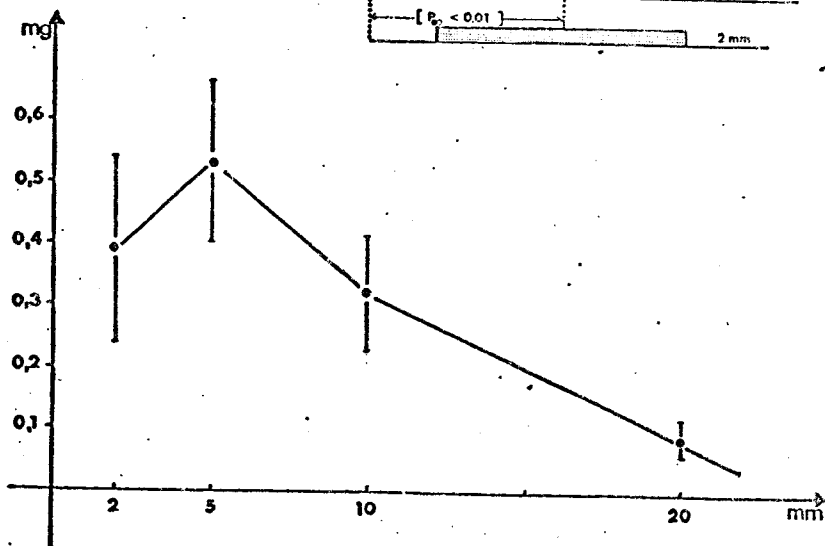


FIG. B : COURBE DE CROISSANCE.

FIG. A : INFLUENCE DE LA TAILLE DES SEGMENTS DE THALLE DE *G. verticillata* SUR LA CROISSANCE



### 2233. Conditions de culture : axénie

Les difficultés extrêmes que nous avons rencontrées dans la réalisation de l'axénie nous ont conduit à traiter ce problème dans le prochain chapitre. Qu'il suffise d'indiquer ici que la double exigence d'une culture stérile et unialgale n'a pu être remplie dans le cadre du présent travail. Cet échec nous oblige évidemment à considérer les résultats exposés par la suite avec beaucoup de prudence.

#### 224 - METHODES D'APPRECIATION DES RESULTATS

L'objet de ces méthodes est de rechercher, à l'aide de tests statistiques (voir Annexes 1 et 2) dans quelle mesure les différences observées entre moyennes, sont dues ou non aux seules fluctuations d'échantillonnage.

Cependant l'application de ces tests n'est possible que sous réserve de normalité du caractère étudié et d'égalité des variances. Bien que ces conditions soient généralement remplies en biologie, il nous a paru utile de vérifier, ne serait-ce qu'une fois la normalité du caractère poids.

#### 225 - NORMALITE DU CARACTERE POIDS

L'ajustement d'une série statistique à la loi normale, repose sur le principe suivant : on compare, dans chaque classe, les effectifs observés aux effectifs théoriques. Les fréquences théoriques de chaque classe sont calculées en développant la formule de la loi normale :

$$P_i = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{t_0}^{t_1} e^{-\frac{t^2}{2}}$$

où  $P_i$  : la fréquence théorique

$t$  : écart réduit =  $\frac{X_i - m}{s}$  avec  $m$  : la moyenne  
 $s$  : l'écart-type

$t_1$  : écart réduit correspondant à la limite supérieure de classe

$t_0$  : écart réduit correspondant à la limite inférieure de classe.

L'évaluation d'une limite acceptable des différences entre deux effectifs, est réalisée à l'aide du test de PEARSON.

La réalisation du test de normalité est effectuée sur un échantillon d'une centaine de segments prélevés au hasard dans une population de 1000 segments de thalle. L'accroissement de poids de chaque segment est mesuré après un mois de culture. Les mesures sont regroupées en 12 classes, avec un intervalle de classe égal à 0,1 mg.

Les calculs sont réalisés sur une calculatrice programmable Texas SR 56 et détaillés dans le tableau 6. Dans ce tableau, les classes où les effectifs sont inférieurs à 5, sont regroupés avec la classe suivante de façon que les effectifs des nouvelles classes soient au moins égaux à 5. Le polygone des fréquences cumulées et le polygone des fréquences théoriques sont construits sur la figure 5.

Les effectifs théoriques étant calculés à partir des trois variables  $m$ ,  $n$ ,  $s$  : la moyenne ( $m$ ), le nombre de classes ( $n$ ), l'écart-type ( $s$ ), conduisent à définir pour la loi du  $\chi^2$  un nombre de degrés de liberté égal à  $12 - 3 = 9$ .

Pour la loi du  $[\chi^2_9]$  l'intervalle d'acceptation  $I$  au seuil de 5 % est  $[0 ; 16,92]$  et au seuil de 20 %  $[0 ; 12,242]$ .

Comme le  $\chi^2$  observé (voir colonne 5 du tableau 6) est égal à 11,80, l'hypothèse de normalité de la distribution du caractère "poids" n'est pas infirmée. On considérera donc, par la suite, dans l'application des tests statistiques aux résultats expérimentaux que le caractère poids est distribué normalement.

TABLEAU 6

TEST. DE NORMALITÉ DU CARACTÈRE "POIDS"

Centre de classe mg	Effectifs observés (ni)	Probabilité théorique Pi	Effectif théorique NPi	$\chi^2 = \frac{(n - NPi)^2}{NPi}$	Fréquences observées $F = \frac{n}{N}$	Fréquences observées cumulées
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
0,05	2	0,039	10,12	0,001	0,02	0,022
0,15	8	0,071			0,09	0,109
0,25	14	0,109	10,028	1,573	0,15	0,265
0,35	17	0,108	9,936	5,022	0,18	0,446
0,45	10	0,158	14,536	1,415	0,12	0,554
0,55	12	0,151	13,892	0,258	0,13	0,685
0,65	7	0,123	11,316	1,646	0,08	0,761
0,75	10	0,035	7,820	0,608	0,11	0,870
0,85	8	0,051	4,692		0,09	0,957
0,95	1	0,026	2,392	0,760	0,01	0,967
1,05	0	0,011	1,012		0,0	0,967
1,15	2	0,004	0,368		0,02	0,989
TOTAL	91			11,80	1	



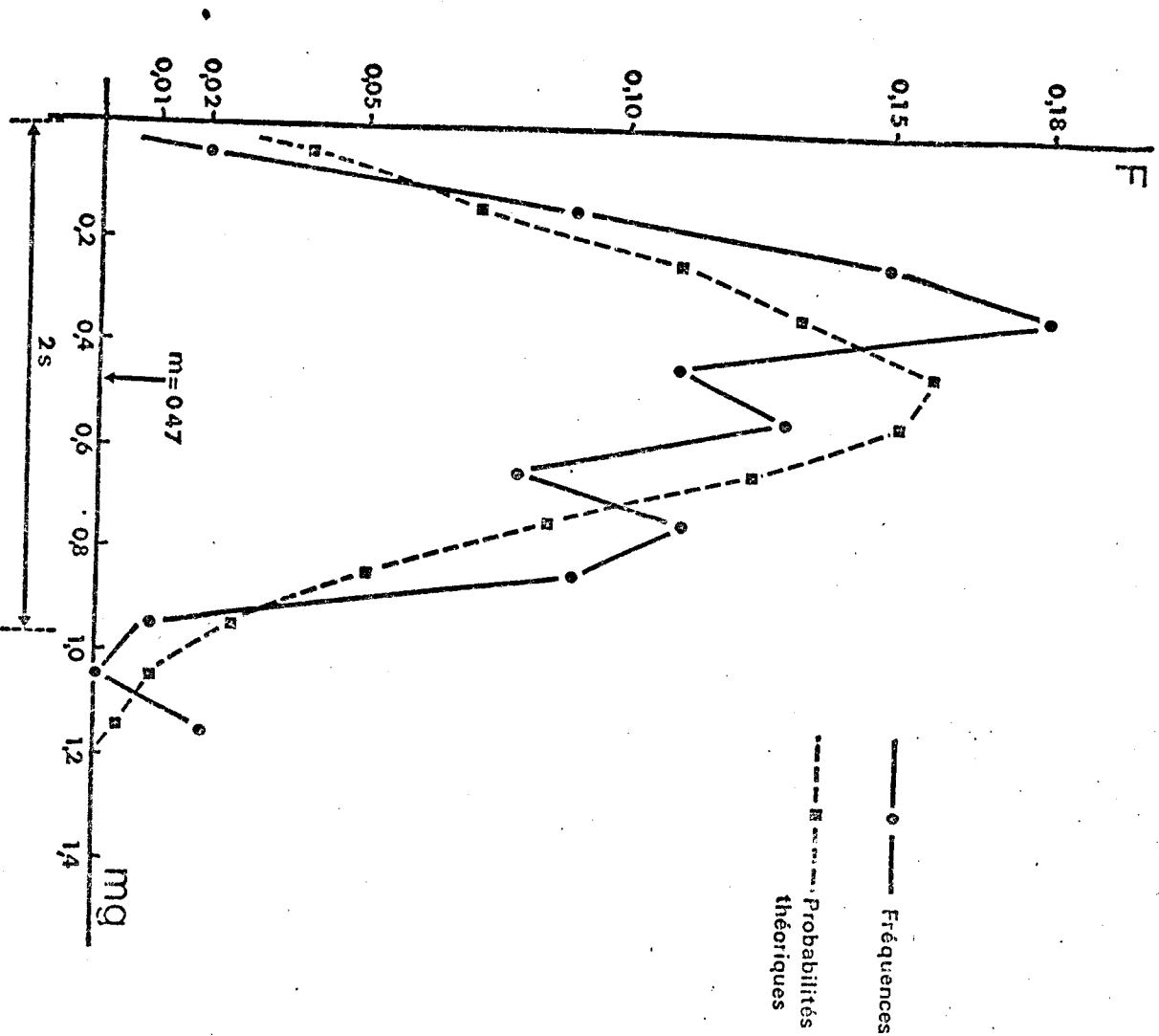


FIG. 5 : COURBES DES FRÉQUENCES ET DES PROBABILITÉS THÉORIQUES

LÉGENDE : LA COURBE DES FRÉQUENCES EST CALCULÉE PAR LA  
RELATION  $F = \frac{N}{N}$  (COLONNE 6 TABLEAU 6)

OÙ N = NOMBRE D'INDIVIDUS D'UNE CLASSE DE  
TAILLE

N = NOMBRE TOTAL D'INDIVIDUS DE L'ÉCHAN-  
TILLON

LA COURBE DES PROBABILITÉS THÉORIQUES EST  
CALCULÉE EN APPLIQUANT LA RELATION (CF.  
COLONNE 3 TABLEAU 6

$$P_1 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{T_0}^{T_1} \frac{1}{e} - \frac{T^2}{2}$$

OÙ T REPRÉSENTE L'ÉCART-RÉDUIT.



## ANNEXE N°1

1 - TEST DU F DE SNEDECOR (à 1 facteur contrôlé : le caractère "poids")

11 - Le principe du test est d'exprimer la dispersion des moyennes en terme de fluctuation d'échantillonnage, c'est-à-dire de rechercher si les différences observées entre les moyennes sont dues au hasard (c'est l'hypothèse nulle :  $H_0$ ), ou si elles sont dues au facteur contrôlé (c'est l'hypothèse alternative :  $H_1$ ).

Dans l'hypothèse nulle ( $H_0$ ), la variance de la série des moyennes  $\left[ \frac{1}{S} \sum \frac{s_i^2}{n_i} \right]$  de chaque colonne : le rapport F de ces deux valeurs est alors égal à 1.

$$\text{soit } F = \frac{s_m^2}{\frac{1}{C} \sum \frac{s_i^2}{n_i}} = 1 \quad (1)$$

Dans l'hypothèse alternative ( $H_0 \neq H_1$ ) la variance de la série des moyennes ( $s_m^2$ ) diffère plus ou moins de la valeur moyenne des variances des moyennes  $\left[ \frac{1}{C} \sum \frac{s_i^2}{n_i} \right]$  : le rapport F diffère alors plus ou moins de 1. La signification de cette différence est appréciée à l'aide des tables de F. (Tables statistiques de l'Institut de Statistique de l'Université de Paris, éditées in *Rev. stat. Appl.*, vol. 7, n°4, 1959).

12 - Calcul de la valeur F. Le calcul de la valeur du rapport F à partir des (N) valeurs de poids mesurés sur les ( $n_i$ ) individus répartis en (C) colonnes de ( $n_i$ ) individus chacune, est réalisé sur la calculatrice programmable (Texas SR 56). On compose un programme qui permet de calculer :

- . l'écart-type (s) et la moyenne (m) de chaque colonne (C) de mesures,
- . le rapport F,
- . la variance résiduelle ( $s_r^2$ ),
- . la variable t nécessaire pour la comparaison des moyennes telle que :

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{s_r^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad \text{où } m_1 > m_2$$

avec  $m_1$  = moyenne de la colonne 1

$m_2$  = moyenne de la colonne 2

$n_1$  = effectif de la colonne 1

$n_2$  = effectif de la colonne 2

La bonne composition du programme est testée à l'aide d'un exemple où la valeur du F est connue d'avance.

### 13 - Application du test

Pour la loi de F ( $c - 1 ; N - c$ ) à ( $c - 1 ; N - c$ ) degrés de liberté (ddl) où  $c$  est le nombre de niveaux d'expériences et  $N$  l'effectif total de la population testée, on choisit un intervalle d'acceptation  $I$  tel que la probabilité d'égaliser ou de dépasser une certaine valeur  $x$  soit plus petite (ou égale) que 0,05, soit en termes condensés :

$$P \{F (c - 1, N - c) > x\} \leq 0,05$$

On réalise le programme, on calcule les variables (12) et on conclut : si  $F_{obs} \notin I$  on rejette l'hypothèse  $H_0$  (soit  $P > 0,05$ ) sinon on l'accepte.

## ANNEXE N°2

## 2 - TEST DU T DE STUDENT

21 - Principe : considérant la différence  $m_1 - m_2 = d$  entre deux moyennes on se propose de tester l'hypothèse  $H_0 = m_1 - m_2 = 0$  au seuil de 5 %.

## 22 - Application du test

- . on choisit le seuil d'acceptation  $\alpha$  ( $\alpha > 0$ )
- . on calcule le caractère  $t$  (cf. programme analyse de variance) tel que :

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{s^2_r \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

- . on lit dans les tables la valeur  $t$  correspondant à un nombre de degrés de liberté :  $ddl = n_1 + n_2 - 2$
- . on conclut : si la probabilité  $P$ , pour que le  $t$  égale ou dépasse une certaine valeur  $t_\alpha$  (au seuil  $\alpha = 0,05$ ), est inférieure à  $0,05$ , on rejette l'hypothèse  $H_0$  et on conclut que la différence  $\Delta = m_1 - m_2$  entre les deux moyennes  $m_1$  et  $m_2$  est significative au seuil de 5 %.

23 - Présentation des calculs : ils sont présentés de deux façons selon que l'on compare toutes les moyennes entre elles, deux à deux, ou selon que l'on recherche la plus différence significative ( $\Delta$ ) au seuil de 5 %.

## 231. Comparaison des moyennes 2 à 2.

- . on calcule la valeur  $t$  à l'aide du programme (12) d'analyse de variance (11)
- . on lit dans le tableau du  $t$  la valeur  $t$  au seuil de 5 %
- . on conclut que la différence  $d$  est significative au seuil de 5 %, si  $P \{t \geq t_\alpha\} \leq 0,05$



232. Recherche de la plus petite différence significative ( $\Delta$ )

Cette différence doit être telle que :

$$t_{0,05} = \frac{\Delta}{\sqrt{s_r^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad \text{où : } \Delta = m_1 - m_2$$

- on calcule alors la valeur  $\Delta$ , en sachant que pour  $n > 30$ ,

$$t_{0,05} = 2$$

$$\Delta = 2 \sqrt{s_r^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

- on conclut : si les différences entre les moyennes sont telles que :  $d \geq \Delta$ , elles sont significativement différentes au risque de 5 %, dans le cas contraire ( $d < \Delta$ ) on admettra qu'elles ne le sont pas.

*"Vous mesurer à votre plus petit geste, c'est estimer le pouvoir de l'océan à la fragilité de son écume. Vous juger sur vos défaillances c'est blâmer les saisons pour leur inconstance. Oui, vous êtes un océan.*

*Et cependant les bateaux échoués attendent le flux sur vos rivages, car de même qu'un océan, vous ne pouvez accélérer vos marées".*

G. KHALIL

Le Prophète, p.86

## CHAPITRE 3

CONDITIONS D'UNE  
CULTURE AXENIQUE

## 31 - NATURE DU PROBLÈME

L'étude des besoins nutritifs d'un être vivant, requiert à l'évidence, qu'il soit soustrait à l'influence directe ou indirecte de tout autre organisme vivant animal, végétal ou bactérien. Dans une culture d'algue, cet objectif est atteint, lorsque le thalle se développe dans des conditions unialgale et axénique.

Les travaux ne manquent pas, pour montrer que la sécrétion, au sein des eaux marines, de substances diverses (antibiotiques, hormones, vitamines, enzymes, substances organiques diverses, etc...) d'origine biologique, qu'AUBERT (1971) appelle "télémediateurs chimiques", conduit à une véritable régulation de la vie biologique marine, qui peut s'exercer au niveau de mécanismes biologiques divers (nutrition, reproduction, auto-défense, etc...) (AUBERT, 1971).

Ainsi AUBERT (1971) montre, que la proximité d'un péridinien avec une diatomée antibiotico-productrice, arrête chez cette dernière la synthèse d'une telle substance, et que plus de 30 % des espèces phytoplanctoniques sont capables de synthétiser des antibiotiques, et de les excréter dans le milieu ambiant. L'existence d'une telle activité a également été démontrée, chez les bactéries marines (ROSENFELD et ZOBELL 1947, KRASSIL'NIKOVA 1961, GAUTHIER 1970), chez les coraux (BURKHOLDER et al. 1958), chez les mollusques (PRESCOTT et al. 1966) et chez les algues pluricellulaires (AUBERT et al. 1970, CONOVER et SIEBURTH 1964, HARRIS 1971, SIEBURTH 1968, MAUTNER et al. 1953, GUILLARD et HELLEBUST 1971, ALLEN et DAWSON 1960, PRATT 1944).

Par ailleurs, de nombreuses expériences ont prouvé l'action stimulante, sur la croissance des algues, des eaux marines superficielles côtières. Cette action, constatée dès le début des années quarante de ce siècle par DE VALERA (1940) et KYLIN (1941), relevait de l'excrétion par les bactéries et les algues de substances "ectocrines" (LUCAS 1947) aux propriétés variées (BENTLEY 1958, BERGLUND 1969, FRIES 1970, LEFEVRE et al. 1949, LEVRING 1945, RICE 1954). La nature indolique de quelques unes de ces substances a été montrée (BENTLEY 1958, 1959). D'autres travaux ont permis d'identifier des acides aminés tel que le tryptophane (PALMORK 1963). Par ailleurs, ont également été décelées des vitamines telles que la cyanocobalamine et ses analogues (ERICSON et LEWIS, 1953; PROVASOLI, 1958).

## 32 - HISTORIQUE SOMMAIRE DES MÉTHODES DE STÉRILISATION UTILISÉES PAR LES AUTEURS

La stérilisation des algues a été recherchée essentiellement selon trois types de traitement, physiques, chimiques et antibiotiques.

### 321 - TRAITEMENTS PHYSIQUES

C'est par des méthodes physiques que les premiers auteurs ont obtenu des cultures pures d'algues. Une des premières a consisté à isoler et à cultiver les algues sur milieu solide. Cette méthode fut introduite par BEIYERINCK (1893), lorsqu'il cultiva pour la première fois sur milieu gélatiné plusieurs algues vertes unicellulaires des genres *Scenedesmus*, *Chlorella*, etc.. CHODAT et GRINTZESCO (1900) utilisent des plaques de porcelaine dégourdie, pour isoler stérilement, des algues unicellulaires. Ces cultures pures ont été présentées par l'auteur, à l'exposition universelle de Genève. RADAIS (1900), s'inspirant de la technique de CHODAT, utilise comme substrat une bougie filtrante qu'il ensemence avec les algues.

La précision qu'il fallait accorder à l'expression "culture pure" n'étant pas toujours définie, PRINGSHEIM (1926) se proposa de définir six types de culture : Erhaltungskultur (culture d'entretien), Rohkultur (culture brute), Anhaufungskultur (culture en masse), Artreinkultur (culture monospécifique), Clonkultur, Einzelkultur (culture clonale, unialgale), Absolutreinkultur (culture absolument pure = culture axénique). Cette terminologie avait l'avantage, de distinguer les cultures unialgales, des cultures unialgales stériles. Ces techniques d'isolement sur milieu solide, si elles ont permis de faire un grand pas, vers la réalisation de cultures monospécifiques, se révélèrent rapidement insuffisantes, dans la recherche de cultures stériles. Aussi, CHU (1946) réalise des lavages successifs suivis de plusieurs sub-cultures pour isoler dans des conditions axéniques, une diatomée du genre *Nitzschia*. Cependant, cette méthode ne permet pas toujours d'atteindre l'axénie ; aussi, certains auteurs firent appel à des techniques utilisant des rayonnements particulièrement actifs sur les germes bactériens, tels que les rayons ultra-violets et les rayons gammas (VAN BAALEN 1961, LANGE 1971).

## 322 - TRAITEMENTS CHIMIQUES

L'utilisation de substances chimiques, bactéricides était directement liée aux progrès de la médecine dans la lutte contre les maladies infectieuses. On sait combien la chimiothérapie est redevable aux brillants travaux, qu'entreprit EHRLICH (1906) au début de ce siècle, sur les colorants vitaux et sur leur fixation sélective sur les tissus.

Ces substances chimiques (acides organiques, phénols, alcools, aldéhydes, métaux, métalloïdes, colorants, agents tensioactifs, ammoniums quaternaires) appelées antiseptiques, actives à l'encontre des bactéries et des champignons, le sont également à l'encontre des algues. Aussi, ont-elles le plus souvent été utilisées dans les solutions de lavage et en traitements de courte durée. Ainsi, TATEWAKI et PROVASOLI (1963) testent l'influence d'un grand nombre de ces produits sur la stérilisation des algues. FRIES (1963) utilise, avec succès, un mélange iodé - le IODOPAX- en appoint à un traitement antibiotique. Enfin, BODARD (1973) rince successivement les thalles, avec une solution iodée et une solution d'hypochlorite de calcium.

## 323 - TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES

Un des premiers chercheurs à utiliser les antibiotiques pour stériliser les algues, fut FISCH (1950), qui réalisa une culture stérile de zoospores d'*Enteromorpha intestinalis*, en les traitant avec de la pénicilline. PROVASOLI et al. (1951) obtient le même résultat chez *Euglena gracilis* avec la streptomycine. Par un mélange de ces deux antibiotiques, SPENCER (1952) réalise une culture stérile de Diatomées. PROVASOLI (1958b) stérilise des fragments de thalle d'Ulves en les traitant par un mélange d'antibiotiques, qui associe la pénicilline et le chloramphénicol, à la polymixine et à la néomycine.

FRIES (1960) en soumettant une algue rouge du genre *Goniotrichum* à un mélange de streptomycine et de phénoxy méthylpénicilline, obtient également des cultures stériles.

Ainsi, ouverte par les travaux de FISH (ib.), la voie de l'antibiothérapie devait être suivie par de nombreux auteurs (BOALCH 1961-a, TATEWAKI et PROVASOLI 1963, FRIES 1963, DROOP 1967, BERLAND et MESTRINI 1969, BERGLUND 1969, DRUEHL et HSIAO

1969 , SHEPHARD 1970 , McLACHLAN et al. 1971 , MACHLIS 1973 , JONES et al. 1973 , VAN DER VELDE 1973 , BODARD 1973 ; LARPENT et al. 1977 , LOISEAUX 1978).

### 33 - MÉTHODES UTILISÉES DANS NOS PROPRES EXPÉRIENCES

Comme il s'agissait de définir le comportement et le devenir des fragments de Gracilaire cultivés *in vitro*, nous nous sommes proposés, de rechercher et de définir les voies, qui nous permettraient de réaliser des cultures stériles de ces fragments. Pour cela, nous avons utilisé conjointement des méthodes physiques, chimiques et antibiotiques.

#### 331 - METHODES PHYSIQUES

Les techniques auxquelles nous faisons appel sont essentiellement des techniques de brossage dans de l'eau de mer filtrée sur du papier Whatmann n°2 et contenant 1 % de Tween 80, suivies de lavages successifs dans de l'eau de mer filtrée et stérilisée par autoclavage.

#### 332 - METHODES CHIMIQUES

Lorsque les frondes ont été brossées et lavées, elles sont débitées en segments. Ces segments sont recueillis dans des solutions de lavage non stériles contenant un antiseptique. Les antiseptiques que nous avons utilisés sont essentiellement un produit iodé (Iodopax)<sup>1</sup> et des ammoniums quaternaires. Ces traitements sont toujours de courte durée.

D'autres substances antiseptiques, notamment l'azide de sodium, ont, par contre, été utilisées en traitement prolongé.

#### 333 - METHODES ANTIBIOTIQUES

Les segments qui ont été lavés, en chambre stérile, par la solution antiseptique, sont rincés par de l'eau de mer stérile, et placés dans une solution, renfermant un ou plusieurs antibiotiques, pendant un intervalle de temps plus ou moins prolongé.

<sup>1</sup> transmis gracieusement par L. FRIES.

### 34 - LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE NOTRE RECHERCHE DES MOYENS DE STÉRILISATION DES THALLÉS DE LA GRACILAIRE.

On peut considérer 2 étapes dans la réalisation de ce travail :

- une étape préliminaire, consacrée à définir l'efficacité de plusieurs antibiotiques, en fonction de leurs concentrations, de leurs associations et du temps de contact ;
- une étape destinée à explorer les possibilités offertes par la réalisation d'antibiogrammes et l'utilisation de substances antibiotiques nouvelles.

#### 341 - EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Lorsque nous avons commencé nos travaux de recherche sur la culture *in vitro* de la Gracilaire, nous avons utilisé une technique de stérilisation préconisée par BODARD (1973) qui associe à un trempage rapide (20 secondes) des fragments dans une solution hypochlorite de sodium à 0,5 %, un passage dans un mélange d'antibiotiques (chloramphénicol 250 mg/l ; streptomycine 333 mg/l ; polymyxine 50 mg/l ; néomycine 15 mg/l ; nystatine 120000 Up/l) pendant trois heures.

Si ce traitement avait l'avantage de réduire le développement bactérien dans l'eau de mer stérile, il ne permettait cependant pas d'obtenir des fragments de thalle stériles.

Nous avons alors entrepris toute une série d'expériences dont l'objet était de rechercher l'action d'antiseptiques et d'antibiotiques divers, utilisés soit seuls, soit en association.

Ces solutions sont testées en suivant un protocole qui, pour l'essentiel, suit le schéma suivant : broissage des frondes dans l'eau de mer filtrée et contenant du tween 80 à la concentration de 1 % ; segmentation des frondes ; lavages répétés des segments dans l'eau de mer stérile ; passage de brève durée dans une solution antiseptique ; rinçage à l'eau de mer stérile ; incubation dans une solution antibiotique stérile pendant un temps donné ; rinçage des thalles à l'eau de mer stérile ; test de stérilité sur milieux solides ou liquides enrichis en substances organiques.

Les associations figurant dans le tableau 7 ont été utilisées dans



TABLEAU 7

UTILISATION DE DIVERSES ASSOCIATIONS ANTIBIOTIQUES POUR L'ISOLEMENT  
DE G. VERRUCOSA EN CULTURES STÉRILES

Types d'associations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Antibiotiques</b>													
<b>BETA-LACTAMATES</b>													
. pénicilline	+		+	+	+	+	+	+	+				+
. méthicilline										+	+	+	
<b>OLIGOSACCHARIDES</b>													
. néomycine	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
. streptomycine		+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
. kanamycine													
. gentamycine		+			+			+					+
<b>CHLORAMPHENICOL</b>													
. chloramphénicol			+		+	+							+
<b>TETRACYCLINES</b>													
. doxycycline (vibramycine)										+	+	+	
. chlortétracycline (auréomycine)													+
<b>POLYPEPTIDES</b>													
. polymyxine				+			+		+	+	+	+	
. colimycine								+					+
<b>MACROLIDES</b>													
. érythromycine										+	+	+	
. rifampicine													
<b>ANTIFONGIQUES</b>													
. nystatine	+			+		+	+		+				+
<b>ANTIBIOMIMETIQUES</b>													
. acide nalidixique		+											
. sulfamides : sulfamérazine									+	+	+	+	+
. sulfamides associés : bactrim													+
. azide de sodium													

de nombreuses expériences, qui se sont toutes révélées infructueuses, et qui pour cette raison, ne seront pas détaillées ici. Devant ces échecs, nous avons alors entrepris une nouvelle série d'expériences, basées d'une part sur un antibiogramme réalisé sur des souches bactériennes non isolées et d'autre part sur un antibiogramme réalisé sur des souches isolées. Les expériences que nous détaillerons dans la suite du texte, en raison de l'intérêt qu'elles présentent, sont les suivantes :

- . antibiogramme accéléré,
- . expériences basées sur les données de l'antibiogramme accéléré,
- . expériences relatives à l'emploi de la nystatine dans la lutte contre la flore fongique,
- . expériences relatives à l'emploi d'une nouvelle substance antibactérienne : l'azide de sodium,
- . antibiogramme réalisé par l'Institut Pasteur,
- . expériences préliminaires basées sur les données de l'antibiogramme réalisé par l'Institut Pasteur.

Enfin, une discussion générale, faisant suite à l'exposition de ces travaux, en dégagera les faits essentiels.

#### 342 - REALISATION D'UN ANTIBIOGRAMME ACCELERE

Pour réaliser cet antibiogramme, on utilise la méthode des disques. Le milieu de culture est constitué par le milieu solide de Mueller Hinton (MH). Ce milieu est préparé en mettant 37 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau de mer. Le pH est ajusté à 7,6. La suspension ainsi obtenue, est portée à ébullition, jusqu'à complète dissolution et autoclavée à 115°C pendant 15 minutes. Après autoclavage, le milieu est coulé en boîtes de Pétri. Les boîtes sont séchées pendant 30 minutes, dans une enceinte produisant un flux d'air laminaire stérile. L'inoculum est préparé à partir d'une suspension bactérienne, obtenue en plaçant des fragments de thalle non stériles, dans des tubes (16 x 160) contenant 5 ml d'un milieu nutritif, formulé de la façon suivante :

. extrait de levure (Merck)	0,5 g %
. glucose	0,5 g %
. hydrolysate de caséine (DIFCO)	0,3 g %
. peptonestrypsiques de viande (Merck)	0,3 g %

. eau de mer filtrée	100 ml
. pH	7,6

Les fragments sont incubés à 20°C, jusqu'à l'apparition d'une opalescence légère. L'ensemencement est réalisé en inondant chaque boîte, par 5 ml d'inoculum, dont on réaspire l'excès avec une pipette stérile. On dispose dans chaque boîte 6 disques d'antibiotiques. Les tests sont réalisés en double exemplaire. Les boîtes sont séchées dans un flux d'air stérile pendant 15 minutes et placées à 20°C pendant 5 jours. Les résultats sont exprimés dans le tableau 8.

Bien qu'il faille considérer un antibiogramme "accéléré" avec beaucoup de prudence, les résultats indiquent que les aminosides, les tétracyclines, les macrolides et le chloramphénicol présentent une activité bactéricide, sur certaines souches bactériennes qui, pour la plupart, se montrent résistantes aux bétalactamates et aux sulfamides.

#### 343 - EXPERIENCES BASEES SUR LES DONNEES DE L'ANTIBIOGRAMME ACCELERE

A la suite de ces résultats, une première expérience est réalisée, avec une association d'antibiotiques comprenant la carbénicilline, la gentamycine et la streptomycine. La carbénicilline est utilisée dans l'association, en raison de son activité bactéricide, sur un grand nombre de germes GRAM (-) et GRAM (+).

Un milieu antibiotique et un milieu test, sont destinés à contrôler la stérilité et formulés dans le tableau 9. Ces milieux sont stérilisés par filtration. Le milieu antibiotique est recueilli dans des fioles de Fourneaux (capacité 135 ml), à raison de 50 ml par fiole et le milieu-test est distribué stérilement (distributeur Repipette autoclavable), dans des tubes (16 x 150 mm), à raison de 4 ml par tube. Avant d'être placés dans la solution antibiotique, les thalles sont brossés dans l'eau de mer filtrée, contenant 1 % de tween 80, coupés en segments de 2 cm de longueur -40 segments au total-, et lavés à l'eau de mer stérile. Pendant le traitement, les fioles sont placées sur un agitateur rotatif et maintenues à la température de 20°C ± 1.

TABLEAU 8  
ANTIBIOGRAMME ACCÉLÉRÉ

	charge des disques en µg	Concentration minimale inhib. µg/ml
<b>BETALACTAMATES</b>		
Benzylpénicilline	10	souches résistantes (R)
Méthycilline	10	souches résistantes (R)
<b>AMINOSIDES</b>		
Streptomycine	30	souches sensibles (4µg) souches résistantes
Gentamycine	30	souches sensibles (3µg)
<b>TETRACYCLINES</b>		
Tétracycline	30	souches sensibles (4µg)
<b>MACROLIDES</b>		
Erythromycine	15	souches résistantes souches sensibles (0,25µg)
Chloramphénicol	30	souches sensibles (30µg) souches sensibles (2µg)
<b>SULFAMIDES</b>	?	souches résistantes



## TABLEAU 9

## MILIEU "ANTIBIOTIQUE" ET MILIEU "TEST"

Antibiotiques	Milieu antibiot.	Milieu test
Carbénicilline	50 mg %	
Gentamycine	20 mg %	
Streptomycine	20 mg %	
Glucose	50 mg %	50
Peptones tryptiques de viande <sup>(1)</sup>	50 mg %	50
Hydrolysate de caséine <sup>(2)</sup>	50 mg %	50
Extrait de levure <sup>(1)</sup>	50 mg %	50
Eau de mer	100 ml	100 ml
pH	7,8	

(1) produits MERCK.

(2) produits DIFCO

Après 8 heures de traitement, on prélève 20 segments, on les rince à l'eau de mer stérile et on les place individuellement dans des tubes contenant le milieu test. Les segments restant, sont rincés avec de l'eau de mer stérile, contenant 1 % de tween 80, et placés dans une nouvelle fiole, renfermant un milieu antibiotique préparé extemporanément. Après 48 heures de traitement, ces segments sont isolés dans des tubes contenant le milieu test.

## RESULTATS

Les segments, ayant subi un traitement antibiotique de 2 jours, sont tous infectés après 6 jours de test. Cette contamination bactérienne se manifeste par une opalescence plus ou moins prononcée, du milieu test. Le lot issu du traitement antibiotique de 4 jours, présente 15 segments stériles, après 6 jours de test, mais ces segments se polluent progressivement, si bien qu'au bout de 60 jours de test, il n'en reste plus un seul stérile. De plus, après un mois de culture, on voit également se développer dans les tubes, des champignons filamenteux du genre *Penicillium*.

## DISCUSSION

Les résultats exprimés plus haut, indiquent que deux jours de traitement sont insuffisants, pour stériliser les algues. D'autre part, chez le lot traité pendant quatre jours, l'infection plus lente à se manifester, mais totale au bout de deux mois, montre que le traitement antibiotique présente un effet, qui s'apparente à une bactériostase, plus qu'à une bactéricidie.

Bien que cette expérience se soit soldée par un échec, elle confirme ce que d'autres auteurs avaient observé : la lenteur du développement de la flore bactérienne marine (FRIES, 1963 ; TATEWAKI et PROVASOLI, 1963).

## 344 - INFLUENCE DE LA NYSTATINE SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE

Face au développement fongique relativement important, constaté dans l'expérience précédente, nous nous sommes tout d'abord proposés, de rechercher l'influence de la nystatine -qui est une substance antifongique- sur le développement des champignons.

On réalise une gamme de concentration (100 - 50 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de nystatine dans un milieu gélosé formulé comme suit :

A	}	Extrait de levure	0,5 %
		Peptones de viande	0,3 %
		Glucose	0,5 %
		Agar	1 %
		Eau de mer	100 ml
		pH	7,8
B	}	Nystatine	100 $\mu\text{g/ml}$
		"	50 $\mu\text{g/ml}$
		"	10 $\mu\text{g/ml}$

Le mélange (A) est autoclavé à 115°C pendant 20 minutes. La nystatine, après avoir été solubilisée dans une solution de soude (NaOH 1N), est stérilisée par filtration, et incorporée au mélange (A) juste avant la solidification. Le milieu gélosé est coulé dans des boîtes de Pétri plastiques stériles. Pour chaque concentration en nystatine, un double essai est réalisé.

## RESULTATS

Après une dizaine de jours, on constate que 50 et 10 µg/ml de nystatine n'entravent pas le développement fongique. Par contre, à la concentration de 100 µg/ml, on note qu'il est considérablement réduit.

Dans la suite de nos travaux, nous nous sommes alors proposés, d'inclure la nystatine à la solution antibiotique à raison de 150 µg/ml.

### 345 - INFLUENCE DE L'AZIDE DE SODIUM SUR LA STERILISATION DES THALLES

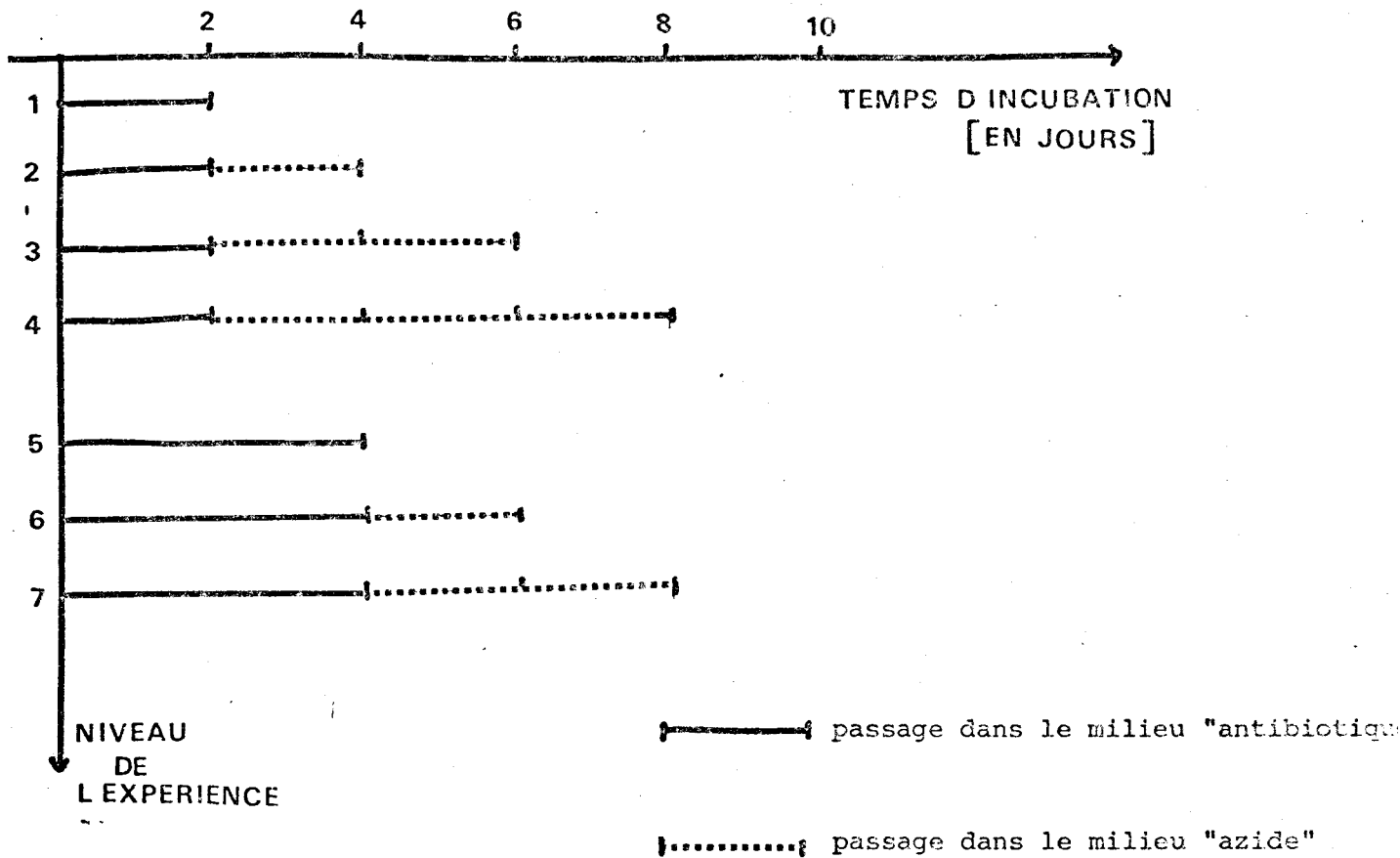
L'expérience exposée plus haut (voir 343) s'étant révélée infructueuse, un nouveau protocole de stérilisation, qui associe le traitement antibiotique défini au paragraphe (343) à un traitement à l'azide de sodium, dont l'activité fortement bactéricide s'était manifestée dans des expériences préalables, s'avérait nécessaire.

Les milieux que nous avons utilisés pour réaliser cette expérience figurent dans le tableau 10 a, b, c.

TABLEAU 10  
MILIEU "ANTIBIOTIQUE, MILIEU "AZIDE" ET MILIEU "TEST"

Antibiotiques	Milieu (mg %) antibiotique (a)	Milieu (mg %) azide (b)	Milieu (mg %) test (c)
Carbénicilline	50	--	--
Gentamycine	20	--	--
Streptomycine	20	--	--
Nystatine	15	--	--
Azide de sodium	--	10	--
Glucose	50	30	50
Peptone tryptique de viande	50	50	50
Hydrolysate de caséine	50	50	50
Extrait de levure	50	50	50
Eau de mer	100 ml	100 ml	100 ml
pH	7,8	7,8	7,8

Ces milieux sont stérilisés par filtration. Les milieux "antibiotiques" et "azide" sont recueillis dans des erlemeyers à col large (capacité 500 ml) à raison de 100 ml par récipient. Le milieu test est distribué dans des tubes (16 x 160) à raison de 5 ml par tube. Les protocoles expérimentaux 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 sont exprimés dans le diagramme ci-dessous :



Pour chaque niveau expérimental, on utilise un échantillon de 20 segments. Les échantillons destinés à subir un traitement antibiotique de 4 jours, sont placés dans une nouvelle solution antibiotique, au bout de 2 jours.

#### RESULTATS

Après quinze jours d'incubation dans le milieu test, on dénombre la quantité de segments stériles. Les résultats sont consignés dans la figure 6. Les résultats relatifs au traitement azide, montrent sans ambiguïté, son rôle dans la stérilisation des thalles. Malheureusement, chez ces thalles, on note une très forte dépigmentation, qui se manifes-



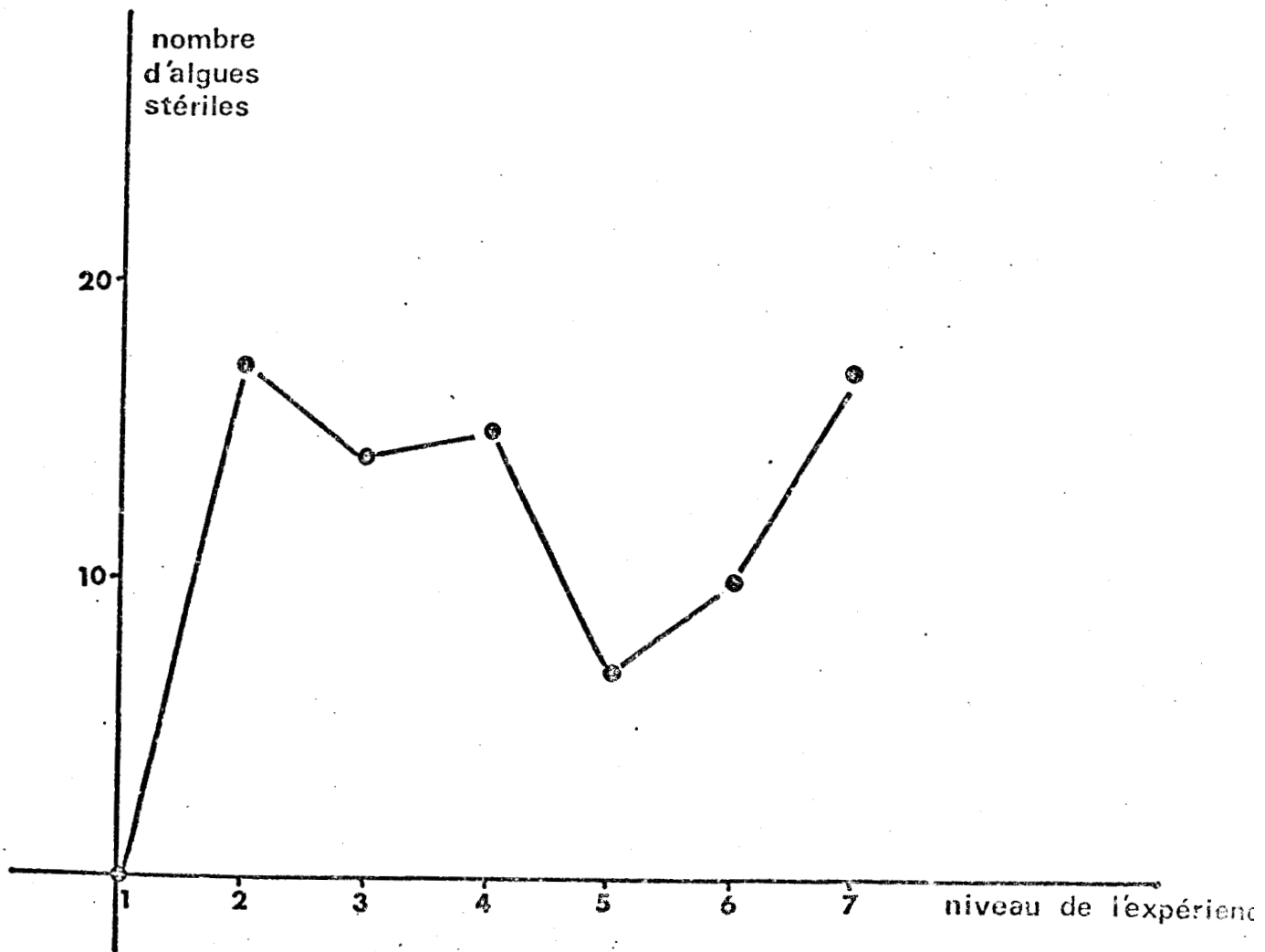


FIG. 6 : INFLUENCE DE L'AZIDE DE SODIUM SUR LA STÉRILISATION DES FRAGMENTS DE THALLE DE *G. verrucosa*

te surtout, chez les segments des niveaux expérimentaux 3, 4, 6 et 7. Après un mois de culture des segments issus du niveau 2, il ne reste plus que 8 segments stériles dont 4 sont totalement dépigmentés. Les quatre segments stériles et pigmentés, sont remis en culture dans un nouveau milieu d'incubation, pendant un mois; mais à notre grande surprise, ils se sont tous infectés au bout de dix jours.

Une fois de plus, les résultats traduisent l'effet bactériostatique de l'azide, qui contribue fortement à retarder le développement bactérien, sans cependant l'entraver totalement. Placés devant un tel résultat, force était de constater l'inefficacité du traitement. La seule possibilité qui nous restait alors, suite à ces expériences, était celle d'isoler les bactéries ayant survécu au traitement antibiotique, et de réaliser un antibiogramme complet, afin de déterminer quels antibiotiques conviendraient le mieux pour les éliminer.

#### 346 - ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES ET REALISATION D'UN ANTIBIOGRAMME

Lorsque l'on compare le développement bactérien, dans le milieu test (tableau 9), ensemencé avec un fragment de thalle non stérilisé, avec le développement observé dans le même milieu, ensemencé d'un fragment de thalle ayant subi le traitement antibiotique décrit plus haut (voir 343), pendant 48 heures, on remarque que le fragment non stérile, conduit à un développement bactérien plus rapide et plus dense, que le fragment stérile. Cette observation montre que les antibiotiques utilisés dans le traitement, ont bien détruit une partie de la flore bactérienne initiale.

Puisque l'efficacité partielle du traitement antibactérien était démontrée, il ne nous restait plus qu'à imaginer une nouvelle démarche expérimentale. Vingt quatre fragments sont incubés dans le milieu antibiotique (tableau 10a), pendant 48 heures, et placés dans des tubes (16 x 160 mm), contenant 5 ml de milieu test (tableau 10c). Après 20 jours de culture, on prélève au hasard 8 tubes sur le lot des 24. A cette fin, on numérote les tubes de 1 à 24 et on extrait les huit premiers numéros d'une table de nombre aléatoires. Deux des huit tubes sont scellés dans la flamme d'un bec bunsen. L'ensemble des huit tubes, est

confié au service de microbiologie de l'Institut Pasteur, pour leur détermination et la réalisation d'un antibiogramme.

## RESULTATS

Les résultats relatifs à l'isolement et à l'antibiogramme figurent dans le tableau 11 a, b.

Les résultats relatifs aux isolements, montrent que cinq espèces bactériennes ont survécu au traitement antibiotique, et traduisent donc l'efficacité de l'association utilisée. Ceux relatifs à l'antibiogramme montrent que les bactéries, toutes gram négatif résistent à la plupart des antibiotiques testés, notamment aux aminosides et aux bêtalactames. Les macrolides, par contre, se révèlent actifs sur au moins quatre des germes présents dans les cultures. Quant à la rifampicine, elle est le seul antibiotique auquel toutes les souches soient sensibles. La résistance bactérienne aux bêtalactames et aux aminosides, se comprend, si on admet que le traitement antibiotique préalable, qui associe une pénicilline à la gentamycine et à la streptomycine, sélectionne les souches résistantes à ces substances.

### 347 - EXPERIENCES DESTINEES A TESTER L'INFLUENCE DE LA RIFAMPICINE SUR LA STERILISATION DES THALLES

#### 3471. Influence de la rifampicine<sup>1</sup>, utilisée dans une association quaternaire

Les résultats de l'antibiogramme ayant montré que la rifampicine était active sur les cinq souches bactériennes, l'utilisation de cet antibiotique était fortement recommandée.

250 fragments prélevés dans la région apicale des plus jeunes frondes, sont placés après un lavage préalable, dans une solution antibiotique (tableau 12a) et cultivés à l'obscurité à 23°C. La solution antibiotique est renouvelée tous les 48 h. Après 2, 4, 6 jours de traitement, on prélève 48 fragments, dont 24 sont destinés à l'étude de la survie et 24 au test de stérilité. Après quatre jours d'incubation dans la solution antibiotique, les fragments sont placés pendant une nuit, dans l'eau de mer stérile renfermant 0,1 % de tween 80, soniqués pendant 15 secondes, rincés à l'eau de mer stérile et ensemencés

<sup>1</sup> gracieusement transmise par les Laboratoires LEPETIT.

## TABLEAU 11a

## ISOLEMENTS BACTÉRIENS

Des échantillons en tubes scellés (n°2 et 3) et non scellés (n°7, 8, 9, 12, 13, 18) ont étéensemencés sur les milieux suivants :

- a) gélose TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile salts, pour l'isolement des *Vibrio*) : aucune culture ;
- b) gélose douce<sup>(\*)</sup> : aucune culture (sauf tube 13 : légère culture), (sub-culture négative) ;
- c) gélose de ZoBell : culture positive pour tous les tubes, monomorphe ou oligomorphe, très différente des cultures polymorphes habituellement obtenues à partir d'eau de mer brute. Majorité de pigmentés en jaune - 5 types de colonies ont été isolés :

Type	Fréquence	Aspect sur gélose de ZoBell	Gram
A	+++	jaunes, muqueuses	bacilles Gram - flexueux
B	++++	jaunes, irrégulières (swarming)	bacilles Gram - flexueux
C	+	jaunes pâle, petites	bacilles Gram -
D	++	jaunes, muqueuses petites	bacilles Gram
E	++	blanches, régulières	coccobacilles Gram -

Ces germes sont oxydase + et ne fermentent pas le glucose. Leur résistance à divers antibiotiques est portée dans le tableau 11b.

(\*) même formule que gélose de ZoBell sauf eau de mer remplacée par eau distillée.

TABLEAU 11b  
ANTIBIOGRAMMES<sup>1</sup>

	charge /disque	A	B	C	D	E
<b>Bêta lactamates :</b>						
<b>- Pénicillines</b>						
Pénicilline G.	6	R (64)	R	R	R	R
Ampicilline	10	R (80)	16	R	R	R
Epipicilline	25	R (250)	50	R	R	R
Oxacilline	5	R (250)	R	R	R	R
Carbénicilline	100	128	40	130	R (2000)	R (2000)
Méthicilline	5	R (250)	R	R	R	R
<b>- Céphalosporines</b>						
Céphaloridine	30 ui	R (500)	R	R	R	R
Céphacétryle						
Céphapyrine						
<b>- Aminosides</b>						
Streptomycine	10 ui	R (1000)	R	R	R	2
Kanamycine	30 ui	R (500)	R	R	R	13
Amikacine	10	R (250)	R	R	R	44
Gentamicine	10 ui	R (200)	R	R	R	3
Tobramycine	10	R (100)	R	R	R	4
- Chloramphénicol	30	15	8	0.2	R	2
<b>- Tétracyclines</b>						
Tétracycline	30 ui	R (250)	R	6	R	R
Minocycline	30 ui	R (250)	6	R	R	R
<b>- Macrolides</b>						
Erythromycine	15 ui	0.05	0.1	0.25	0.1	R (250)
Spiramycine	100	0.3	0.5	R (250)	0.5	R
Lincomycine	15	0.1	0.2	R (500)	0.1	R
Clindamycine	2 ui	S	S	R	S	R
Pristinamycine	15	2	0.5	0.2	0.9	R (250)
- Rifampicine	5	S (1)	S (2)	S (2)	S (2)	S (2)
- Fucidine	10	64	0.25	0.75	12	R (1000)
<b>Polypeptides</b>						
Colistine	50	R	R	R	R	S
Polymixine	50	R	R	R	R	S
<b>- Triméthoprime +</b>						
Sulfaméthoxazole	300	R	R	S	R	R
Furanes		R (125)	R	R	R	R
Ac. nalidixique	30	R (125)	25	R	R	R
Ac. pipémidique	20	R (125)	R	R	R	R
Ac. oxolinique	30	R (64)	16	R	R	1



<sup>1</sup> Les résultats exposés dans les tableaux 11a et 11b ont été obtenus dans les laboratoires de l'Institut Pasteur.  
N.B. - Sauf indication contraire, les charges sont exprimées en µg, et toutes concentrations en µg/ml.

TABLEAU 12

FORMULATION DE MILIEUX "ANTIBIOTIQUES" ET DE MILIEUX TESTS

Milieu antibiotique (a)		Milieu Zobell (b)	
Carbénicilline	0,5 mg/ml	-	-
Streptomycine	0,2 mg/ml	-	-
Gentamycine	0,2 mg/ml	-	-
Rifampicine	0,02 mg/ml	-	-
Nystatine	0,150 mg/ml	-	-
Bactopectone	5 g/l	5	g/l
Extrait de levure	0,1 g/l	0,1	g/l
PO <sub>4</sub> Fe <sub>3</sub>	0,1 g/l	0,1	g/l
H <sub>2</sub> O	250 ml	250	ml
Eau de mer	750 ml	750	ml
pH	7,8	7,8	

	Solution antibiotique premier passage (c)	Solution antibiotique deuxième passage (d)	Solution test (e)
Carbénicilline	0,5 mg/ml	-	-
Streptomycine	0,2 mg/ml	-	-
Gentamycine	0,2 mg/ml	-	-
Nystatine	0,150 mg/ml	-	-
Rifampicine	-	0,02 mg/ml	-
Erythromycine	-	0,01 mg/ml	-
Casamino acids	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Extrait de levure	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Eau de mer	+	+	-
ASP <sub>6</sub> F	-	-	1000 ml
pH	7,8	7,8	7,8



dans une nouvelle solution antibiotique. A la fin du traitement, les thalles sont rincés à l'eau de mer stérile et placés dans des tubes à essai -à raison d'un fragment par tube-, contenant chacun 4 ml du milieu Zobell (tableau 12b), en vue de tester leur stérilité. Après une semaine de contact avec ce milieu, l'infection bactérienne se manifeste dans toutes les séries.

Le résultat observé, laisse à penser, que l'utilisation de la rifampicine en association quaternaire, est fortement déconseillée. Nous avons donc été amené à définir un nouveau protocole, destiné à tester l'influence de la rifampicine utilisée en association avec l'érythromycine seule -association dont l'effet synergique a été reconnu (CHASSAGNE et al. 1967)-, et après un passage préalable dans une solution antibiotique, renfermant de la carbénicilline, de la gentamycine, de la streptomycine et de la nystatine.

*3472. Influence de la rifampicine utilisée dans une association binaire, après un traitement antibiotique préalable des thalles*

La formulation des milieux antibiotiques et du milieu test, est exprimée dans le tableau 12 c, d, e. Le milieu Zobell, dont la concentration en substances organiques s'est montrée peu favorable à la survie de la gracilaire, lorsqu'elle y était cultivée de façon prolongée, est remplacé par le milieu 6F/CA/YE (LARPENT-GOURGAUD et DUCHER, 1977) (tableau 12e).

Après un passage de 48 h dans la solution antibiotique (tableau 12c), les fragments sont placés sur un Vortex, en agitation forcée pendant 15 secondes, rincés à l'eau de mer et placés dans la solution (tableau 12d) pendant 2, 4, 6 et 8 jours. Cette solution est renouvelée tous les deux jours. A l'issue du traitement antibiotique (d), soit après 2, 4, 6 et 8 jours, les thalles sont rincés. Une partie du lot subit le traitement du "dip and drag" prôné par TATEWAKI et PROVASOLI (1963), traitement, qui consiste à tirer les fragments par un mouvement de va-et-vient, dans un mélange d'eau de mer et d'agar (1 %). Après ce passage dans l'agar, dont le rôle est d'éliminer les organismes vivants à la surface du thalle, les fragments sont à nouveau rincés et placés, un à un, dans les tubes à essai contenant chacun 4 ml

de milieu-test (tableau 12 e). Pour chaque période de traitement antibiotique, on prévoit 24 fragments dont 12 sont destinés à subir la technique du "dip and drag".

#### RESULTAT

Dans le lot issu du traitement antibiotique (12c), l'effet stérilisant s'avère inopérant. Dans les lots ayant été soumis à une antibiothérapie de 2, 4, 6 et 8 jours, on note la présence de champignons levuriformes et d'une bactérie mobile, après quatre jours seulement d'incubation dans le milieu-test.

Cependant, un seul fragment qui a subi le traitement antibiotique (12d), pendant quatre jours, est resté stérile après 23 jours d'incubation dans le milieu-test. La stérilité est confirmée par l'étalement sur du milieu-test solide (agar 1 %) de quelques gouttes du milieu d'incubation issu du tube où fut cultivé pendant 23 jours le fragment stérile ; en effet, après 12 jours de culture à 23°C, on n'observe aucune colonie bactérienne. Quant au segment stérile, il est placé dans un nouveau tube contenant du milieu-test. Après 10 jours de culture, ce tube est resté limpide. La stérilité de ce fragment, dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, n'est donc pas infirmée. Cependant, sa forte dépigmentation, ne permet pas d'affirmer à ce jour, qu'il est viable. Seule la manifestation d'une activité prolifératrice en apportera la certitude.

En conclusion, la rifampicine utilisée en association binaire, ne permet pas d'isoler dans les conditions expérimentales définies ci-dessus, des fragments stériles de *Gracilaria*, en quantités suffisantes. Ces résultats ne sont évidemment pas en accord avec ce que laissait prévoir l'antibiogramme de l'Institut Pasteur. Ils montrent également, que la stérilisation des thalles de gracilaire, reste une voie semée d'embûches.

Le développement important d'une flore fongique, restait prévisible, si l'on sait qu'une dizaine de jours de traitement des thalles à la nystatine, sont nécessaires pour éliminer ce type d'organisme. Dans la mesure où l'association de nystatine avec la rifampicine et l'érythromycine n'est pas inhibitrice de l'activité antibiotique de ces substances, celle-là s'avèrera fortement recommandée. Par ailleurs,



s'il faut remarquer que la technique du "dip and drag" s'est révélée inopérante dans l'obtention de fragments stériles, elle s'est par contre montrée très efficace, pour éliminer les champignons levuriformes, qui s'étaient développés sur les fragments.

Donc, si l'antibiothérapie basée sur la rifampicine ne permet pas d'isoler un nombre important de fragments stériles, elle offre cependant une chance sur cent, de commencer une culture de thalles stériles, dans la mesure où le fragment stérile, en manifestant une activité prolifératrice, rend le repiquage des rameaux possible.

### 35 - DISCUSSION

Comme nous venons de l'exposer ci-dessus, les recherches que nous avons effectuées pour obtenir des fragments de thalle stériles ont été menées en 2 étapes. Bien qu'elles se soient toutes deux soldées par l'échec, il reste justifié d'en dégager la leçon.

Lorsque nous avons entrepris de stériliser les thalles de graci-laire, nous ne soupçonnions pas quel "obstacle formidable" serait la réalisation d'un tel objectif. TATEWAKI et PROVASOLI (1963), PROVASOLI (1974, communication personnelle) l'avaient déjà pressenti, au point qu'ils n'hésitaient pas à considérer la purification des algues comme un "formidable obstacle" (en anglais dans le texte original).

Cette difficulté qui a également été signalée par d'autres auteurs (FRIES 1974, JONES et al. 1973) est liée à deux types de problèmes ; ceux d'une part, qui se rapportent à la composition du milieu, ceux d'autre part qui se rapportent au "matériel".

#### 351 - LE MILIEU

L'activité bactériostatique et bactéricide d'un antibiotique dépend essentiellement de la dose à laquelle il est employé. L'utilisation de l'antibiogramme, offre évidemment la possibilité de définir la dose minimale inhibitrice et c'est ce que nous avons fait, et décrit plus haut. Les différents constituants du milieu, agissent également sur l'action antibiotique. Ainsi, les sels, tels que le chlorure de sodium, sont défavorables à la fixation sur le site d'action des anti-

nosides, tels que la streptomycine et la gentamicyne. D'autre part, l'action optimale d'un antibiotique dépend également du pH. LITWACK et PRAMER (1957) ont montré, dans le cas de la streptomycine, que son absorption par la cellule est maximale à pH 6,0 et minimale à pH 8,0. La forte salinité et le pH alcalin de nos milieux ne permettent donc pas aux aminosides de déployer une activité antibactérienne maximale. L'importance des paramètres physico-chimiques sur l'activité des antibiotiques a également été montrée par JONES et al. (1973), BERLAND et MAESTRINI (1969).

La chance de survie pour un individu d'une population bactérienne soumise à un traitement antibiotique est d'autant plus faible, que le nombre d'individus de cette population est réduit : si l'effet bactéricide d'une substance s'exerce sur 99,9 % des individus, il reste 1 bactérie vivante sur 1000, 10 sur 10 000 etc... Bien que nous n'ayons pas cherché expérimentalement, à définir la densité optimale de l'inoculum, nous avons toujours veillé, à limiter la densité algale, par unité de volume de solution antibiotique. C'est ainsi que le poids frais d'algues placées dans 100 ml de milieu antibiotique n'a jamais excédé 1,5 g%.

Utiliser une association de plusieurs antibiotiques, dans la lutte contre les germes bactériens, offre l'avantage de réduire les risques d'apparition, dans la population bactérienne traitée, de souches résistantes à tous les antibiotiques à la fois, à la condition que ces antibiotiques se rattachent à des familles différentes. Par contre, l'inconvénient d'utiliser plus de deux antibiotiques, réside dans le fait, qu'il peut se manifester des phénomènes d'antagonisme qui limitent, voire annulent, l'activité de l'une ou l'autre de ces substances antibactériennes. Cependant, la plupart des chercheurs qui stérilisent les algues par l'antibiothérapie, font appel à des associations binaires, ternaires, quaternaires ou plus. FRIES (1963) utilise un mélange de pénicilline et de streptomycine ; PROVASOLI (1958b) un mélange de pénicilline, chloramphénicol, polymyxine et de néomycine ; DROOP (1967) associe pénicilline, chloramphénicol et néomycine ; VAN DER VELDE (1973) préconise un mélange de pénicilline, kanamycine, globénicol et néomycine. Enfin, TATEWAKI et PROVASOLI (1963) réalisent une association de neuf antibiotiques.

## 352 - LE "MATERIEL"

Il est à remarquer que les travaux de stérilisation réalisés par les auteurs ont généralement été suivis de succès chez les algues unicellulaires et chez les algues filamenteuses (MACHLIS 1973, SOLI 1963, DROOP 1967, BERLAND et MAESTRINI 1969, SPENCER 1952, FRIES 1963, TATEWAKI et PROVASOLI 1963, JONES et al. 1973, LOISEAUX 1978). Bien que des cultures stériles de thalles pluricellulaires massifs aient été réalisées, notamment chez *Nemalion* (FRIES 1963), *Ulva* (PROVASOLI 1958), *Fucus* et *Acetabularia* (SHEPHARD 1970), la stérilisation de ces thalles constitue un handicap majeur. Cette difficulté tient au fait, que ces algues constituent un support idéal pour les bactéries marines, dont la plupart vivent fixées (ZOBELL et al. 1935).

Cette épibiose bactérienne, qui est souvent responsable de certains mécanismes régulateurs de la croissance (LANGE 1971, LANGE 1970, PROVASOLI et PINTNER 1964, MACHLIS 1973) et de la reproduction (MACHLIS 1973), conduit à des associations bactéries-algues étroites (BELLY et al. 1973, PROVASOLI 1964), où le développement bactérien est limité grâce à la production par l'algue de substances antibiotiques (AUBERT et al. 1970, SIEBURTH 1964, HARRIS 1971, LEFEVRE 1964, ALLEN et DAWSON 1960, GUPTA et SHRIVASTAVA 1965). Chez *Gracilaria verrucosa*, HORNSEY et HIDE (1974) ont mis en évidence une activité antibiotique qui se manifeste spécialement en automne et en hiver. L'association étroite bactéries-algues et la sécrétion d'antibiotiques peut expliquer la résistance de certaines souches bactériennes à bon nombre d'antibiotiques (TATEWAKI et PROVASOLI 1963) et l'inefficacité d'un certain nombre d'entre eux.

Enfin, quelques travaux font état de l'existence de particules virales ou bactériennes dans les cellules des thalles d'algues (LEE 1971, MATTOX et al. 1972, PICKETT-HEAPS 1972, PEARSON et NORRIS 1974, FELICINI et PERRONE 1972, McBRIDE et al. 1974). Le dernier travail cité retient toute notre attention ; en effet, ces auteurs rapportent l'existence chez *Gracilaria verrucosa* de structures semblables à des galles -qui ont été décrites pour la première fois par CHEMIN (1931) et que nous avons observées sur des thalles récoltés à Wimereux- induites soit par des particules virales soit par des bactéries du type AGROBACTERIUM.

"Oui j'aime la mer dans sa fureur. C'est alors qu'elle jubile. C'est alors qu'elle triomphe et c'est alors qu'il faut la regarder. Mille fois je l'ai vue ainsi et toujours avec le même plaisir. Les creux, les lames ! Et dans la houle bondissante, verte, argentée, tous les engrossements de l'eau primordiale ! Et pour peu que surgisse le soleil dans ce bouleversement, c'est une fête violente où des millions de bombardes sonnent l'incroyable, l'invincible jeunesse de l'univers.

X. GRALL

Billet d'Olivier

## CHAPITRE 4

# INFLUENCE DES PARAMETRES ECOPHYSIOLOGIQUES SUR LA CROISSANCE

## 41 - ACTION DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITE SUR LA CROISSANCE DE GRACILARIA CULTIVÉ IN VITRO

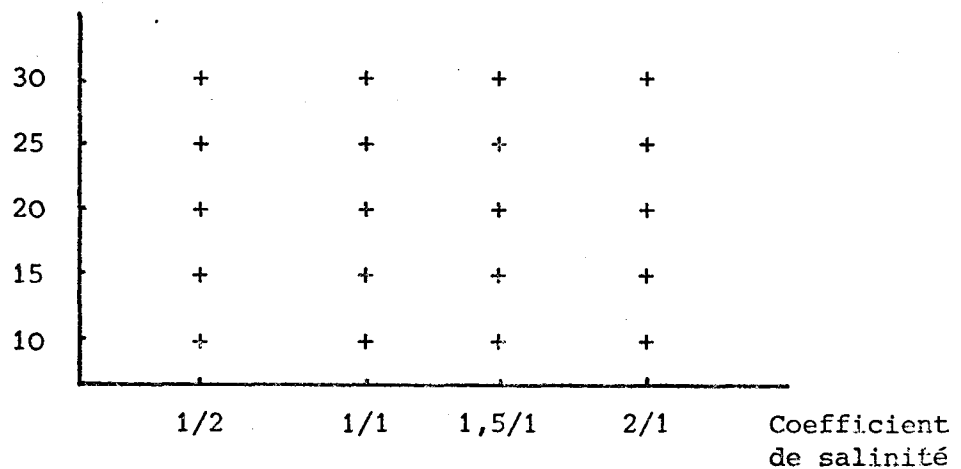
La présentation sommaire que nous fîmes plus haut (Ch. 2) de l'écologie de *Gracilaria* nous permet, tout d'abord, de montrer l'importance de la température et de la salinité sur le développement de cette algue, de décrire ensuite l'évolution annuelle de ces facteurs, au sein des eaux de la Manche Ouest-Nord, de noter enfin l'importance des variations thermiques et de la relative constance de la salinité de ces eaux. Bien que des auteurs aient montré l'existence d'une interaction de la lumière et de la température, d'une part, (SOROKIN C. et KRAUSS R.W. 1962, BEINHAEUER 1957, cit. STEINER 1969) de la température et de la salinité, d'autre part, (BOALCH 1961b) dans les mécanismes photosynthétique et respiratoire des algues, l'objectif des expériences qui vont être présentées ci-dessous, est de déterminer exclusivement l'action sur la croissance des paramètres température et salinité.

### 411 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

L'expérience s'effectue dans des fioles de Fourneau (100 ml). L'eau de mer constitue le milieu de salinité 1/1 (soit environ 34 ‰). Par dilution avec de l'eau distillée, on réalise le milieu 1/2. Par évaporation lente à la température de 30°C on réalise les milieux 1,5/1 et 2/1. Pour vérifier l'influence de la température d'évaporation sur le développement des thalles, on réalise un témoin eau de mer 1/1, chauffé pendant le même intervalle de temps et dont le volume est maintenu constant par addition d'eau distillée.

Chaque lot est constitué par une quarantaine de segments, qui sont cultivés pendant 40 jours en lumière blanche (tubes fluorescents Sylvania, type Grolux). L'éclairage au niveau des paillasse est de 5.W.m<sup>-2</sup>. Les couples (température - salinité) que nous avons testés sont représentés dans la grille ci-après.

Température



412 - LES RESULTATS SONT EXPRIMES DANS LE TABLEAU 13 ET SUR LES FIGURES 7 et 8 (a, b)

4121. L'hypothèse ( $H_0$ ) d'homogénéité des moyennes est éprouvée par le test de F, F dont la valeur est égale à 18,75. Dans les tables statistiques on lit :

$$P \{F_{24,00} > 1,79\} = 0,01$$

Comme le F se situe à l'extérieur de l'intervalle (0 ; 1,79) défini par la probabilité  $P = 0,01$  on rejette au seuil de 1 % l'hypothèse  $H_0$ .

A l'aide du test de  $t$ , on compare les moyennes 2 à 2. La probabilité P telle que le  $t$  égale ou dépasse une certaine valeur lue dans les tables est consignée sur la figure 9.

#### 4122. Influence de la température

Si les algues, dans l'eau de mer de salinité 1/1 manifestent (fig. 7 et 8b) une croissance maximale à 25°C, celle-ci est par contre nulle, à la température de 30°C. Quant aux algues cultivées respectivement à 15°C et 20°C, les différences de croissance constatées ne sont pas significatives.

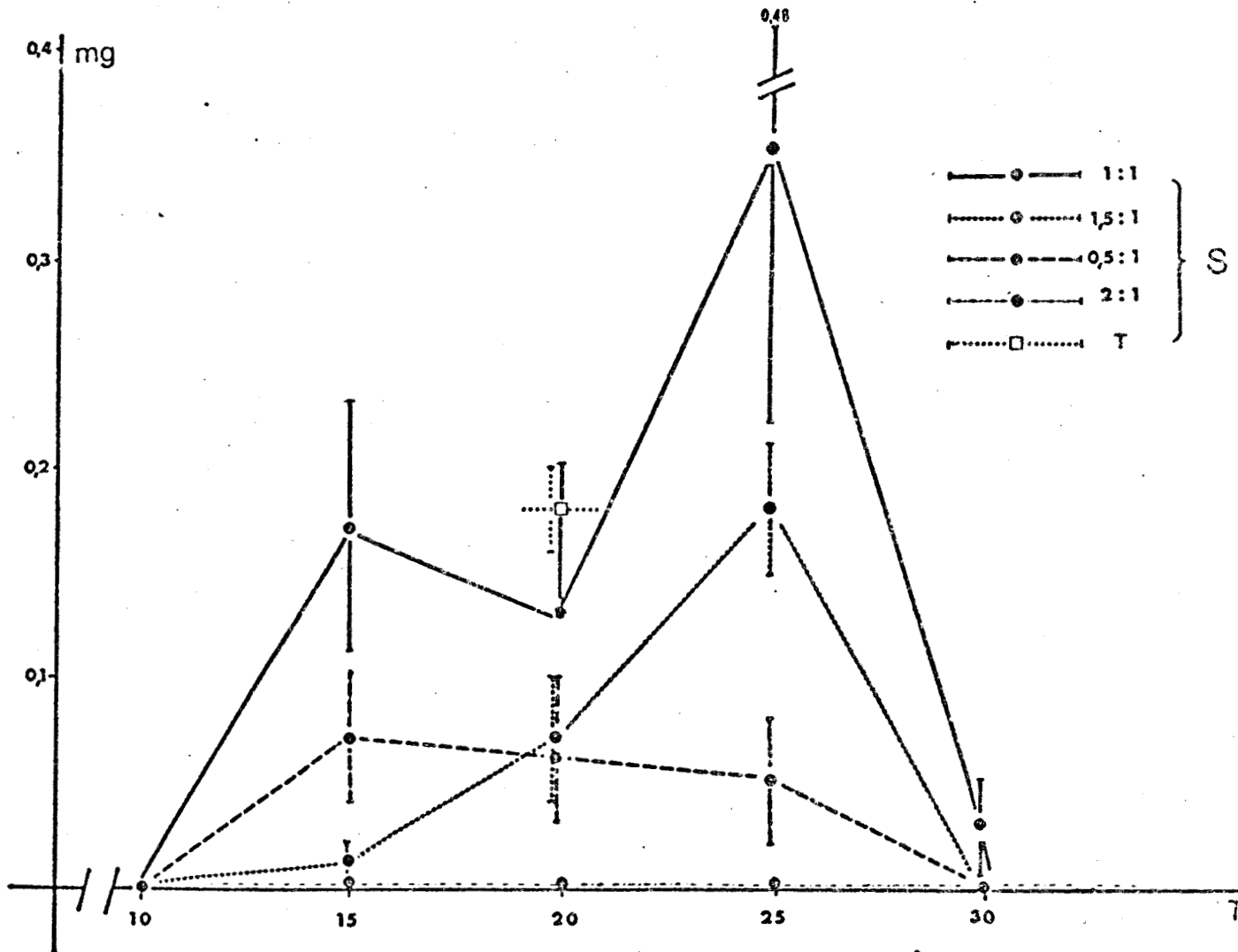


FIG. 7 : INFLUENCE COMPARÉE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*

LÉGENDE : - TEMPÉRATURE (T°C)

- SALINITÉ (S) : EXPRIMÉE EN FACTEURS DE DILUTION OU DE CONCENTRATION PAR RAPPORT À CELLE DE L'EAU DE MER

- LE DOUBLE DE L'ERREUR-STANDARD EST FIGURÉ PAR UN TRAIT VERTICAL DE PART ET D'AUTRE DU POINT EXPÉRIMENTAL SAUF AU POINT D'ABSCISSE 20°C ET D'ORDONNÉE 0,13 MG DE LA COURSE CORRESPONDANT À UN FACTEUR DE SALINITÉ 1/1.



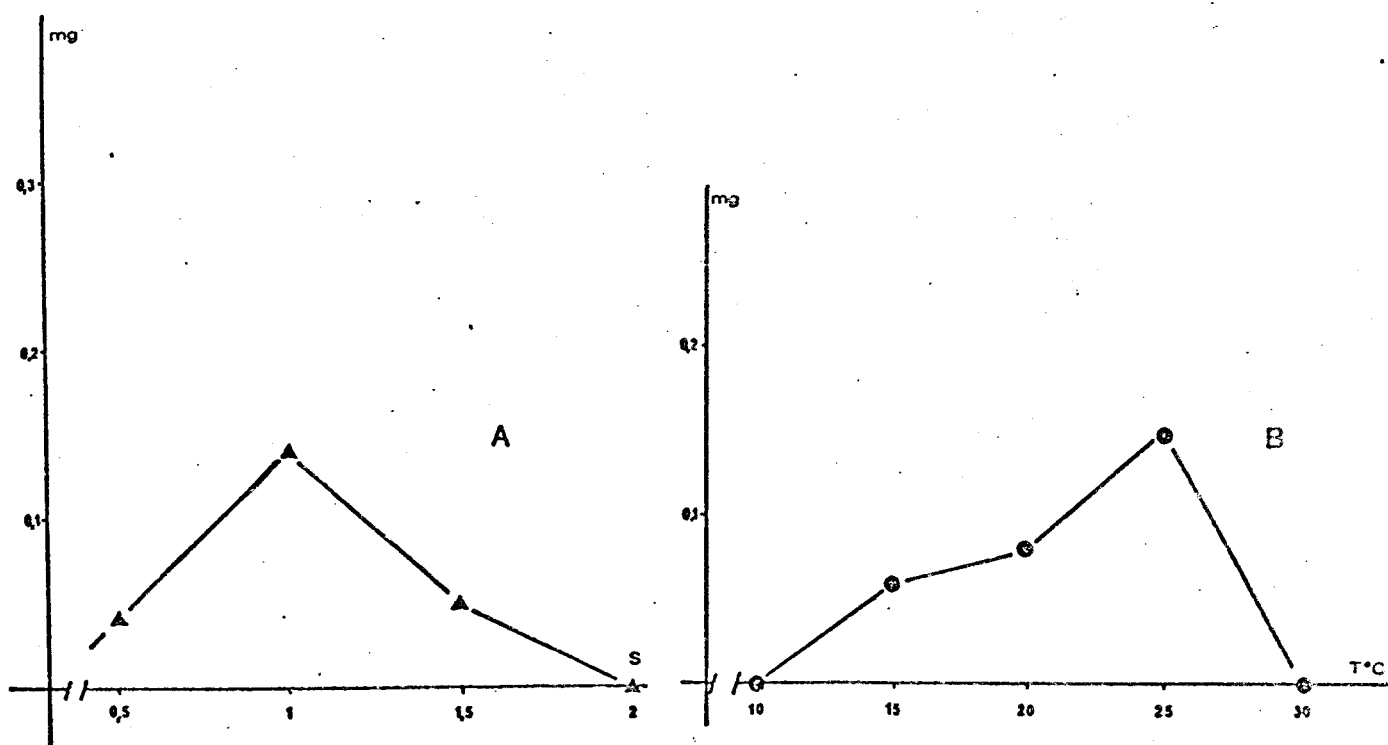


FIG. 8 : INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ SUR LA CROISSANCE DU *G. verrucosus*

FIG. A : LES VALEURS PORTÉES EN ABCISSE REPRÉSENTENT LES FACTEURS DE DILUTION OU DE CONCENTRATION D'UNE SALINITÉ (S) ÉGALE À CELLE DE L'EAU DE MER (ENVIRON 36 ‰)

FIG. B : EN ORDONNÉE = CROISSANCE EXPRIMÉE EN MILLIGRAMMES (MG)  
EN ABCISSE = LA TEMPÉRATURE (T°C)



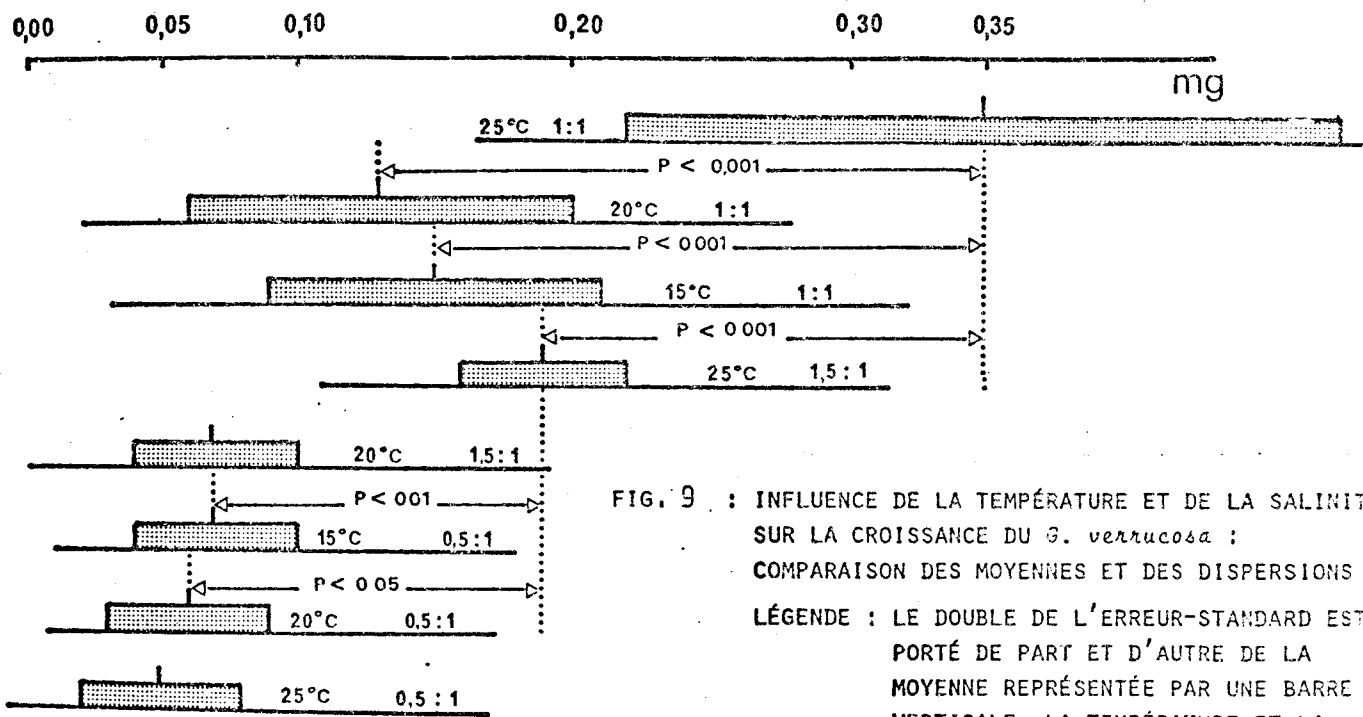


FIG. 9 : INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ SUR LA CROISSANCE DU *S. verrucosa* : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS

LÉGENDE : LE DOUBLE DE L'ERREUR-STANDARD EST PORTÉ DE PART ET D'AUTRE DE LA MOYENNE REPRÉSENTÉE PAR UNE BARRE VERTICALE. LA TEMPÉRATURE ET LA SALINITÉ SONT PRÉCISÉES DANS CHAQUE CAS.

LA SIGNIFICATION DES DIFFÉRENCES, ENTRE 2 MOYENNES DONNÉES, LORSQUE  $P \leq 0,05$ , EST INDIQUÉE ENTRE DEUX FLÈCHES.



TABLEAU 13

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE (T°C) ET DE LA SALINITÉ (S)  
SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*

T°C	S <sup>(*)</sup>	nombre d'échantillons par lot (ni)	moyenne et erreur-standard (mg)
10	0,5	34	0
	1	32	0
	1,5	29	0
	2	41	0
15	0,5	39	0,07 ± 0,03
	1	42	0,17 ± 0,06
	1,5	40	0,01 ± 0,01
	2	40	0
20	0,5	39	0,06 ± 0,03
	1	37	0,13 ± 0,07
	1,5	40	0,07 ± 0,03
	2	40	0
25	0,5	42	0,05 ± 0,03
	1	38	0,35 ± 0,13
	1,5	41	0,18 ± 0,03
	2	37	0
	0,5	40	0
	1	35	0,03 ± 0,02
	1,5	39	0
	2	39	0

(\*) : la salinité est exprimée en facteur de dilution  
ou de concentration par rapport à la salinité  
de l'eau de mer qui est voisine de 36 ‰.



### 4123. Influence de la salinité

L'analyse des graphiques (fig. 7 et 8a) montre que la croissance maximale se manifeste dans le milieu de salinité 1/1 (34 ‰). Bien que les salinités 0,5 (17 ‰) et 1,5 (51 ‰) exercent un effet inhibiteur sur le développement des thalles, elles ne sont pas létales. Par contre, les thalles ne survivent pas dans le milieu de salinité 2/1 (68 ‰).

### 4124. Interaction entre la température et la salinité

S'il est vraisemblable de supposer que la résistance des thalles aux variations de salinité est fonction de la température, la coïncidence des optimums de croissance dans les milieux de salinité 1/1 et 1,5/1 (fig. 7), ne permet pas de retenir cette hypothèse.

## 413 - DISCUSSION

### 4131. Influence de la température

La résistance thermique de *Gracilaria* est positive de 10°C à 30°C. A 10°C les thalles restent pigmentés mais ne se développent pas. Entre 15°C et 20°C la croissance est suboptimale tandis qu'à 25°C elle est optimale. Selon CAUSEY et al. (1944) le développement optimal du *Gracilaria* se situe entre 20°C et 28°C. Des travaux d'EDELSTEIN et al. (1976) il ressort que *Gracilaria* croît entre 15°C et 28°C, mais que les modalités de cette croissance dépendent des conditions d'éclairage. Ainsi des plantes cultivées sous une lumière artificielle de 9720 lux, pendant 18 heures, présentent une croissance optimale entre 20-22°C, par contre, les plantes cultivées entre les mois de janvier et de mai, sous la lumière du jour, dont l'intensité énergétique n'est pas précisée, manifestent une activité de croissance optimale à 25°C et suboptimale à 28°C.

La comparaison de ces données avec les nôtres montre que, dans les deux cas, la tolérance thermique de *Gracilaria* se situe dans la même gamme de température. Des divergences apparaissent, lorsque l'on compare l'optimum de température indiqué par EDELSTEIN et al. (cit.) et celui que nous avons observé. Selon EDELSTEIN, sous un éclairage artificiel de 9720 lux ( $\approx 50 \text{ W.m}^{-2}$ ), pendant 18 heures, cet opti-

mum se situe à 20° - 22°C. Dans notre cas, sous un éclairage artificiel de 5 W.m<sup>-2</sup> pendant 12 heures, il se situe à 25°C. L'analyse des conditions expérimentales, révèle que cette divergence découle vraisemblablement de l'application de conditions lumineuses différentes : en effet, dans les expériences d'EDELSTEIN, les algues sont soumises à une intensité lumineuse plus élevée et à une photopériode plus longue.

Faut-il conclure, suite à ces remarques, que le comportement d'une algue, à une température donnée, dépend exclusivement de la lumière ? Cette hypothèse ne peut être retenue si on se réfère aux travaux de FRIES (1966b). Cultivant deux algues rouges, dans des conditions axéniques et non axéniques, cet auteur constate que les basses températures (10, 15°C) sont plus favorables aux cultures non axéniques, alors que les températures plus élevées (20, 25°C) favorisent une croissance optimale, chez des thalles cultivés axéniquement. Bien que ne disposant pas de cultures axéniques, les résultats obtenus sont en désaccord, avec ceux décrits par FRIES chez les algues cultivées non axéniquement. Là aussi l'explication est à rechercher dans les modalités de l'expérience, en effet, FRIES cultive les algues dans le milieu ASP<sub>6</sub>F, qui est plus favorable au développement bactérien, que l'eau de mer non enrichie, dont nous nous sommes servis dans nos cultures.

La répartition géographique de *Gracilaria*, dans tous les océans du globe et sous presque toutes les latitudes, nous a conduit à supposer la forte valence écologique de ce thallophyte. Cette hypothèse est tout à fait confirmée puisque les connaissances acquises expérimentalement, jointes à ce que nous observons dans le milieu naturel, traduisent la grande tolérance thermique de l'algue qui survit dans une gamme de températures comprise entre + 4°C à + 30°C.

Comme les températures supérieures à 30°C sont rarement atteintes dans les eaux superficielles des océans et des mers ouvertes (IVANOFF 1972), les populations de Gracilaire s'étendent des eaux tropicales jusque dans les eaux tempérées froides, du 40° latitude Nord au 40° latitude Sud. De plus, leur grande résistance thermique conduit ces populations à coloniser un niveau du domaine benthique, où les conditions thermiques sont des plus contrastées, notamment sur les côtes du Boulonnais.

### 4132. Influence de la salinité

Les résultats relatifs à l'influence de la salinité sur le développement de *Gracilaria*, que nous avons présentés plus haut, découlent d'une méthode, qui a ses limites. En effet, diluer ou concentrer l'eau de mer, c'est diluer ou concentrer parallèlement les substances nutritives -macroéléments, microéléments, vitamines- si bien que l'effet observé, à savoir la croissance des thalles, résulte de causes multiples : causes agissant sur la pression osmotique d'une part, causes agissant sur la nutrition d'autre part. Pourtant, sachant que le chlorure de sodium représente plus de 65% des sels dissous dans l'eau de mer, on peut conclure, en première approximation, que la pression osmotique développée dans le milieu, est le seul facteur qui soit soumis à variation, dans le protocole expérimental.

*Gracilaria* tolère des variations de salinité dans une gamme allant de 17 ‰ à 51 ‰. Cependant, une croissance optimale s'observe exclusivement pour des salinités voisines de 34 ‰ (fig. 7 et 8a). Dans le travail déjà cité d'EDELSTEIN et al. (1976), ces auteurs ont recherché l'influence de la salinité sur la croissance des thalles. Les salinités testées par ces auteurs sont respectivement de 10 ‰, 20 ‰ et 30 ‰ (eau de mer non diluée). A 10 ‰ les algues se dépigmentent et cessent de croître, à 20 ‰ elles verdissent et prolifèrent faiblement, à 30 ‰, qui est la salinité de l'eau de mer non diluée, la croissance est optimale. Ce dernier résultat corrobore ce que nous avons observé nous-mêmes, à savoir que l'eau de mer non diluée, constitue le milieu de salinité optimale, pour le développement des thalles. Cependant, pour d'autres auteurs (CAUSEY et al. 1946, STOKKE 1957), l'optimum de croissance chez *Gracilaria* se situe à 25 ‰ de salinité. Les travaux de ZAVODNIK (1975) abondent également dans le sens de nos résultats, c'est-à-dire que la productivité algale est faible aux salinités faibles et maximale dans une eau de mer non diluée.

L'influence de la salinité a été recherchée chez d'autres algues : BIEBL (1958) montre que *Rhodymenia pseudopalmata* tolère des variations du taux de salinité comprises entre 14‰ et 48‰. Si l'optimum de croissance chez *Fucus serratus* se situe à 16‰, la reproduction ne peut se dérouler normalement qu'à 34‰ (BURROWS 1964). *Ectocarpus* prolifère dans des eaux dont le taux de salinité se situe entre

8 ‰ et 60 ‰ (BOALCH 1961). L'influence indirecte ou directe de la salinité sur les mécanismes physiologiques a été étudiée par plusieurs auteurs. La salinité agit indirectement sur la respiration, par le fait qu'elle diminue la solubilité de l'oxygène (NATH 1967, IVANOFF 1972) tout en favorisant la solubilité du gaz carbonique, elle agit également par voie indirecte sur le processus photosynthétique (ZAVODNIK 1975). Ces travaux rendent plus compréhensibles l'effet indirect des fortes et des faibles salinités sur la croissance, dans la mesure où elles altèrent la respiration ou la photosynthèse.

L'analyse des courbes de la figure 7 ne permet pas d'affirmer que la résistance aux variations de salinité soit dépendante de la température. Cette dépendance a cependant été clairement démontrée chez *Ectocarpus*, qui supporte de plus fortes salinités à 20°C qu'à 15°C (BOALCH 1961).

La croissance du Gracilaire maintenu pendant 30 jours dans des eaux de salinité comprise entre 17 ‰ et 51 ‰ confirme son aptitude à se développer dans les flaches de l'étage médiolittoral où les variations de salinité, liées à l'évaporation et aux précipitations atmosphériques, sont les plus fortes.

## 42 - ACTION DU PH SUR LA CROISSANCE

Nous savons que le pH des eaux marines, généralement voisin de 8,0 est maintenu constant grâce au système tampon carbonates-bicarbonates et que cette constance se vérifie dans les eaux de la Manche. Il nous a paru utile, cependant, de tester le comportement du *Gracilaria* lorsqu'il était cultivé en milieu acide ou basique.

On utilise l'eau de mer non enrichie, tamponnée par le TRIS (1 ‰) et l'eau de mer non tamponnée. Les algues sont cultivées, dans des fioles de Fourneau - à raison d'une quarantaine par fiole - contenant chacune 50 ml de milieu. Les conditions d'éclairage sont identiques à celles décrites plus haut (411). Les cultures sont conduites à 20°C ± 1 pendant trente jours. Les pH que nous avons testés sont respectivement : 5,0 ; 6,0 ; 7,0 ; 8,2 ; et 9,0.

## 422 - RESULTATS

Les résultats apparaissent dans le tableau 14 et sur la figure 10. L'analyse des données révèle un optimum de croissance à pH 8,2 en présence du Tris. Si aux pH 7,0 et 9,0 la croissance n'est pas négligeable, aux pH 6,0 et 5,0 par contre, elle est quasiment nulle et de plus, les algues sont totalement dépigmentées.

L'hypothèse (Ho) d'homogénéité de la série des moyennes est éprouvée par le test de F qui est égal à 20,65. Au F lu dans les tables correspond une probabilité P telle que :

$$P \{F_{4,00} \geq 3,02\} = 0,01$$

On rejette donc l'hypothèse Ho et on compare, à l'aide du test t, les moyennes 2 à 2. Le degré de signification des différences entre les moyennes est porté graphiquement sur la figure 10b. Lorsque le seuil de signification est inférieur à 5 % la signification n'y est pas précisée.

## 423 - DISCUSSION

La photosynthèse des algues marines, notamment celle du Gracilaire, est optimale entre pH 8,0 et 8,5 (BLINKS 1963) ; les pH supérieurs à 9,00 sont rarement favorables au processus photosynthétique, sauf chez quelques genres tels que *Corallina* sp. qui supporte un pH voisin de 10. Quant aux pH inférieurs à 7,00, ils sont franchement toxiques (DROOP 1955). Comparant la croissance des thalles cultivés à pH 8,2 dans l'eau de mer tamponnée, à celle que l'on observe chez les segments cultivés au même pH, mais dans l'eau de mer non tamponnée, on peut être, à premier abord, surpris de la différence de croissance constatée. Ce résultat laisse à penser, que le Tris exerce une action favorable sur la prolifération des thalles. Cet effet du Tris s'explique, si l'on se réfère à un travail d'OGATA (1966), qui a montré que le Tris favorisait la dissolution du gaz carbonique dans le milieu de culture. Si on admet que dans l'eau de mer de pH 8,0, la nutrition carbonée des algues se réalise généralement par diffusion active de l'ion  $\text{HCO}_3^-$  (RAVEN 1970), il devient évident que l'action conjuguée d'un pH basique voisin de 8 et du Tris est d'augmenter la concentration en ions  $\text{HCO}_3^-$  et de favoriser par voie de conséquence la photosynthèse.



TABLEAU 14

INFLUENCE DU PH SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*

pH	nombre d'échantillons par lot	moyenne et erreur-standard
5,00	36	0,01 ± 0,01
6,00	40	0,02 ± 0,02
7,00	39	0,19 ± 0,06
8,2	36	0,31 ± 0,06
9,0	38	0,23 ± 0,07
Témoin <sup>(*)</sup>	37	0,12 ± 0,06

(\*) : eau de mer de pH égal à 82 et sans Tris



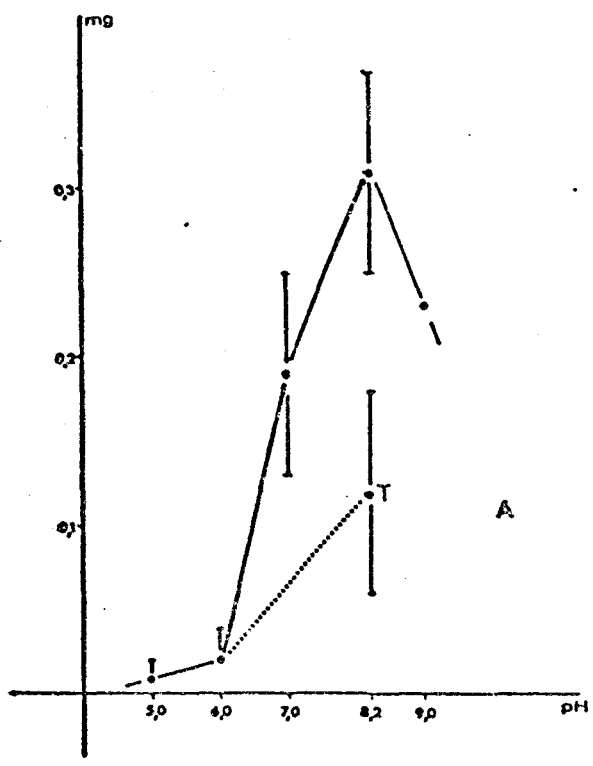


FIG. A : LE POINT EXPÉRIMENTAL CORRESPONDANT AU TÉMOIN EST PRÉCISÉ PAR LA LETTRE (T).

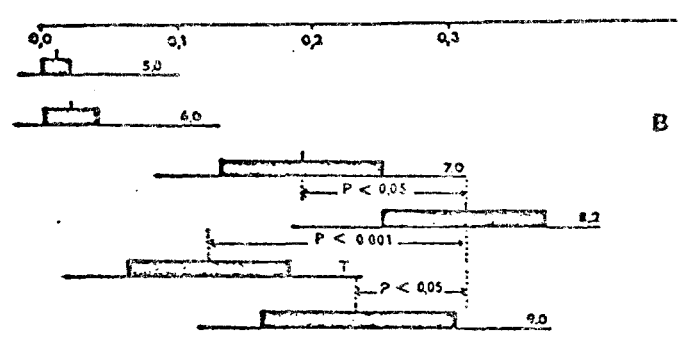


FIG. B : LE DOUBLE DE L'ERREUR-STANDARD DE LA MOYENNE EST PORTÉ DE PART ET D'AUTRE DE LA MOYENNE FIGURÉE PAR UN TRAIT VERTICAL. LE PH EST RAPPELÉ SUR LE TRAIT HORIZONTAL PORTANT LA MOYENNE ET LA DISPERSION RESPECTIVE À CE PH.



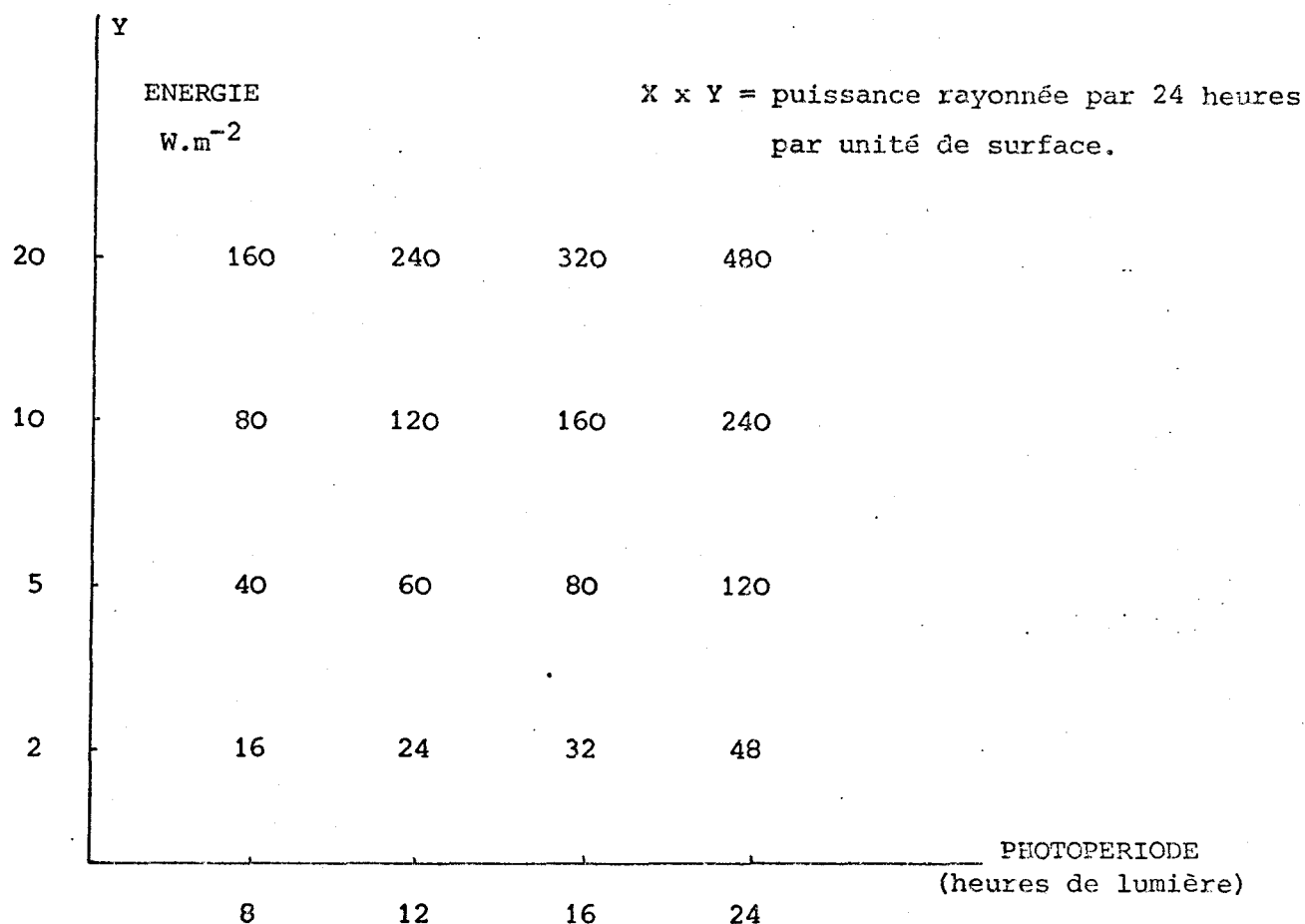
Les expériences relatives à l'influence du pH sur la croissance du *Gracilaria*, que nous venons de réaliser, montrent, que cette algue supporte des variations de pH nettement plus élevées, que celles qui ont été mesurées sur les côtes du Boulonnais (fig. 10a). Cependant, ces mesures qui ont été effectuées dans les eaux du large, n'excluent pas que *Gracilaria*, en se développant dans les cuvettes de l'étage médiolittoral, où le reflux abandonne une faible masse d'eau, soit soumis à des variations plus importantes de pH, dues notamment à l'évaporation et aux fluctuations thermiques. Les résultats que nous venons d'exposer montrent, en tout cas, que cette algue est parfaitement adaptée à subir de telles fluctuations.

#### 43 - ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA CROISSANCE DU THALLE DE GRACILARIA

Les expériences relatives à l'influence de la lumière sur la croissance des thalles de *Gracilaria*, ont été menées dans le but, de déterminer le rôle respectif de l'éclairement de la périodicité du rayonnement et des bandes spectrales.

Les thalles sont placés pendant 40 jours dans des boîtes de Roux -à raison d'une quarantaine de fragments par récipient- contenant chacune 200 ml de milieu ASW<sub>3</sub> modifié (tableau 4, chapitre 2). Les conditions de température sont celles décrites plus haut (421).

La source lumineuse est constituée par des tubes fluorescents (Sylvania), dont l'éclairement est mesuré à l'aide d'une thermopile (Kipp et Zonen). Les différents niveaux énergétiques testés sont obtenus en utilisant des étagères mobiles comportant des plateaux peints en noir dont la distance à la source lumineuse est réglable. Les couples (photopériode, éclairement) que nous avons testés figurent dans la grille ci-après.



Les expériences relatives aux bandes spectrales sont conduites avec des tubes fluorescents colorés (type Sylvania), sous une photopériode de 12 heures de lumière.

Différents niveaux énergétiques sont testés : 2,5 ; 10 et 20  $W.m^{-2}$  sous les tubes bleu, vert et jaune ; 2,5 ; 10 et 15  $W.m^{-2}$  sous les tubes rouges.

La courbe de répartition spectrale du flux énergétique de chaque tube coloré (fournie par le constructeur) est tracée sur la figure 11. La lecture du graphique montre, d'une part, que les bandes passantes des tubes colorés sont respectivement de 240 nm dans le bleu, 140 nm dans le vert, 200 nm dans le jaune, 120 nm dans le rouge, d'autre part, que les courbes se chevauchent.

L'utilisation de tubes fluorescents colorés, dont les bandes spectrales sont relativement larges et dont les courbes d'émission spectrales respectives présentent des chevauchements importants, confère à nos expériences un caractère purement préliminaire et leur impose un

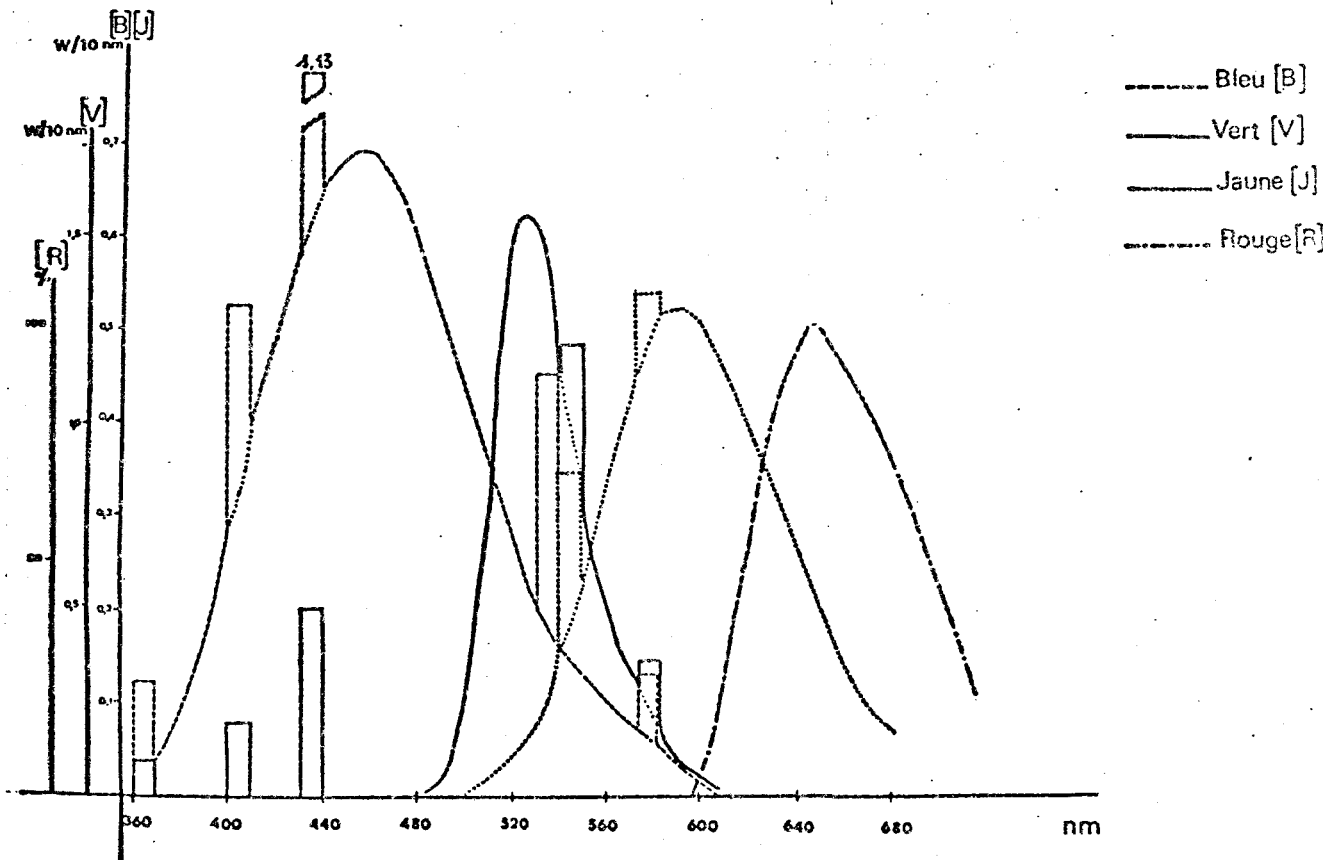


FIG. 11 : COMPARAISON DES DISTRIBUTIONS SPECTRALES DES TUBES COLORÉS -BLEU, VERT, JAUNE, ROUGE- (SYLVANIA, F40 XL) D'APRÈS LES DONNÉES DU FABRICANT

LÉGENDE : EN ORDONNÉE ON A PORTÉ LES ÉCHELLES RESPECTIVES CORRESPONDANT AUX LUMIÈRES BLEU (B) , JAUNE (J), VERT (V) ET ROUGE (R) .

LES PUISSANCES SONT EXPRIMÉES EN WATT PAR BANDE DE 10 NM OU EN ÉNERGIE RELATIVE EXPRIMÉE EN %, EN ABSCISSE, LES LONGUEURS D'ONDE SONT EXPRIMÉES EN NM.

objectif limité qui est de rechercher l'influence des différentes régions bleu, vert, jaune, rouge du spectre visible sur la croissance. D'autre part, nous nous étions proposés de réaliser simultanément des cultures en lumière blanche sous des éclairagements énergétiques identiques. Le dérèglement d'une enceinte, au cours de l'expérience, ne nous ayant pas permis de réaliser cette culture témoin sous lumière blanche, nous nous sommes proposés d'utiliser des résultats obtenus par ailleurs en lumière blanche mais sur un matériel récolté à une époque différente.

#### 431 - ACTION DE L'ECLAIREMENT ENERGETIQUE ET DE LA PHOTOPERIODE

Les résultats s'expriment dans le tableau 15 et dans les figures 12, 13, 14. Dans le tableau 15, nous avons porté les résultats numériques obtenus en fonction du niveau énergétique. Les moyennes et leur dispersion au seuil de 5 %, sont représentées graphiquement sur la figure 12.

L'application du test de F à la série des moyennes conduit au calcul du F, qui est égal à 8,17. On lit dans les tables F (15;∞) = 2,51. La probabilité  $P \{F_{15,00;\infty} > 2,51\} < 0,001$  conduit à rejeter l'hypothèse d'homogénéité des moyennes au seuil de 1 %.

En appliquant le test du T, on recherche la plus petite différence significative ( $\Delta$ ) au seuil de 5 % entre les moyennes comparées 2 à 2. Cette valeur  $\Delta$  égale à 0,12 est représentée graphiquement sur la figure 12. Le graphe de la figure 13 est construit pour rechercher l'influence de la photopériode et de l'éclairagement, sur la croissance. Le graphe de la figure 14 représente le taux moyen de croissance par temps d'éclairagement.

#### 432 - ACTION DES BANDES SPECTRALES (BLEU, VERT, JAUNE, ROUGE)

L'ensemble des résultats est consigné sur le tableau 16 et sur les figures 15 et 16. L'analyse statistique des résultats conduit à  $F = 8,17$  dont la probabilité P est telle que :  $P \{F_{14,00} > 2,04\} < 0,01$  et à  $\Delta_{0,05} = 0,08$  (au seuil de 5 %). Cette différence  $\Delta$  est représentée sur la figure 15.

TABLEAU 15

INFLUENCE DE LA PHOTOPÉRIODE ET DE L'ÉCLAIREMENT SUR LA CROISSANCE  
DE *G. VERRUCOSA*

photopériode	éclairage [W.m <sup>-2</sup> ]	puissance consommée par 24h [Wh.m <sup>-2</sup> .J <sup>-1</sup> ]	nombre d'échantillons par lot	moyenne et erreur-standard
8 : $\overline{16}$	2	16	40	0,21 ± 0,04
	5	40	42	0,31 ± 0,04
	10	80	40	0,49 ± 0,07
	20	160	40	0,50 ± 0,14
12 : $\overline{12}$	2	24	44	0,40 ± 0,09
	5	60	40	0,45 ± 0,09
	10	120	40	0,46 ± 0,10
	20	240	35	0,34 ± 0,07
16 : $\overline{8}$	2	32	40	0,24 ± 0,04
	5	80	40	0,37 ± 0,06
	10	160	36	0,27 ± 0,07
	20	320	41	0,51 ± 0,11
24 : $\overline{0}$	2	48	40	0,29 ± 0,08
	5	120	40	0,33 ± 0,10
	10	240	39	0,18 ± 0,08
	20	480	40	0,23 ± 0,07



TABLEAU 16

INFLUENCE COMPARÉE DE DIVERSES LUMIÈRES FLUORESCENTES COLORÉES  
(BLEU, VERT, JAUNE, ROUGE) SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*  
SOUS UN PHOTORÉGIME DE 12H DE LUMIÈRE PAR JOUR

couleur	éclairage [w.m <sup>-2</sup> ]	nombre d'échantillons par lot	moyenne et erreur-standard
BLEU	2	40	0,02 ± 0,03
	5	36	0,23 ± 0,05
	10	38	0,15 ± 0,04
	20	39	0,17 ± 0,08
VERT	2	36	0,06 ± 0,03
	5	35	0,08 ± 0,03
	10	41	0,22 ± 0,06
	20	38	0,20 ± 0,06
JAUNE	2	41	0,04 ± 0,03
	5	36	0,10 ± 0,03
	10	36	0,24 ± 0,05
	20	40	0,33 ± 0,08
ROUGE	2	31	0,02 ± 0,02
	5	38	0,13 ± 0,09
	10	40	0,25 ± 0,14
	15	41	0,20 ± 0,04
TEMOIN (blanc)	2	44	0,40 ± 0,09
	5	40	0,45 ± 0,09
	10	40	0,46 ± 0,10
	20	35	0,34 ± 0,07





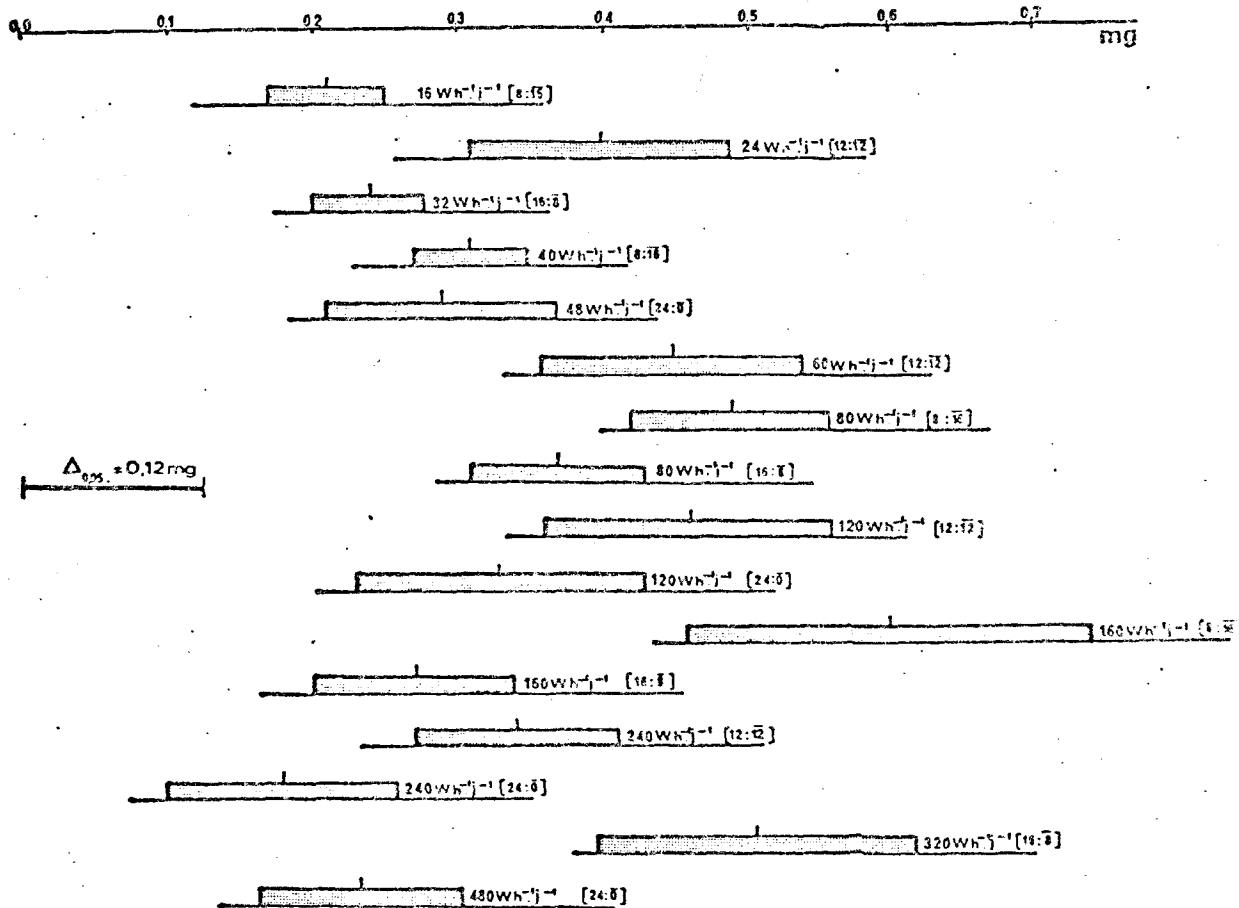


FIG. 12 : INFLUENCE DE L'ÉCLAIREMENT SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa* : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS

LÉGENDE : - LA PLUS PETITE DIFFÉRENTE SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5 % ( $\Delta_{0,05}$ ) EST PRÉCISÉE GRAPHIQUEMENT  
 - LE RÉGIME PHOTOPÉRIODE EST RAPPELÉ ENTRE CROCHETS POUR CHAQUE NIVEAU D'ÉCLAIREMENT.  
 - LA LONGUEUR DE LA PÉRIODE D'OBSCURITÉ EST INDICUÉE PAR UN CHIFFRE PORTANT TRAIT HORIZONTAL.

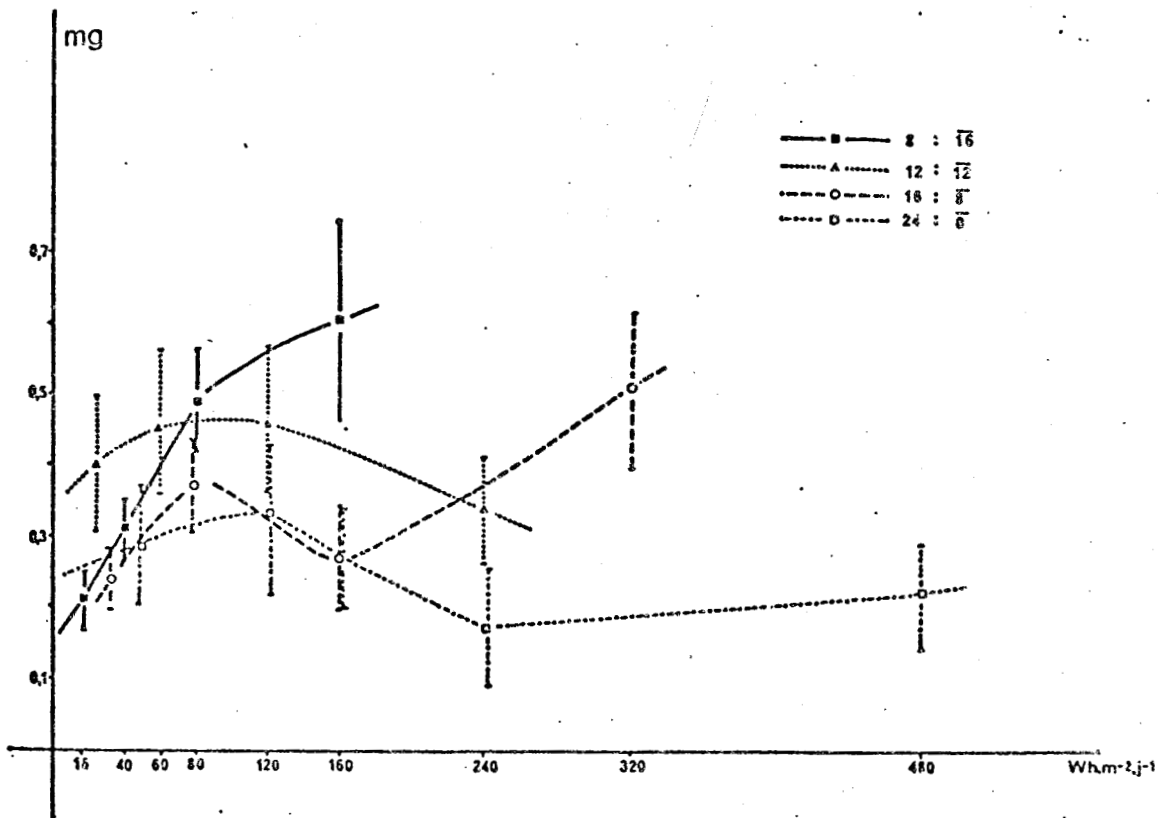
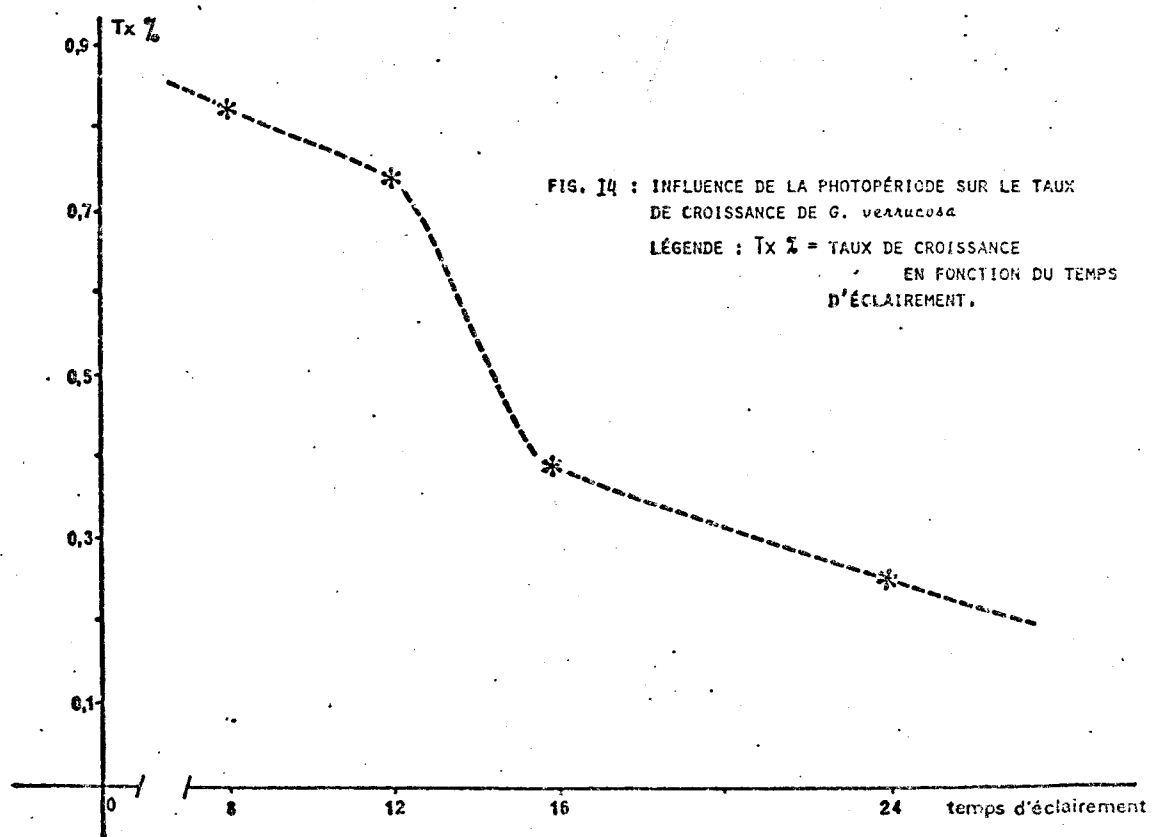


FIG. 13 : INFLUENCE DE L'ÉCLAIREMENT ET DE LA PHOTOPÉRIODE SUR LA CROISSANCE DE *G. vermicularis*

LÉGENDE : - LES PUISSANCES D'ÉCLAIREMENT SONT EXPRIMÉES EN WATT-HEURE PAR MÈTRE-CARRÉ ET PAR JOUR (Wh.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>)

- LA PÉRIODE D'OBSCURITÉ EST PRÉCISÉE PAR UNE BARRE HORIZONTALE AU-DESSUS DU CHIFFRE INDICANT LA DURÉE DE CETTE PÉRIODE

- LA CROISSANCE EST EXPRIMÉE EN MILLIGRAMMES (MG).



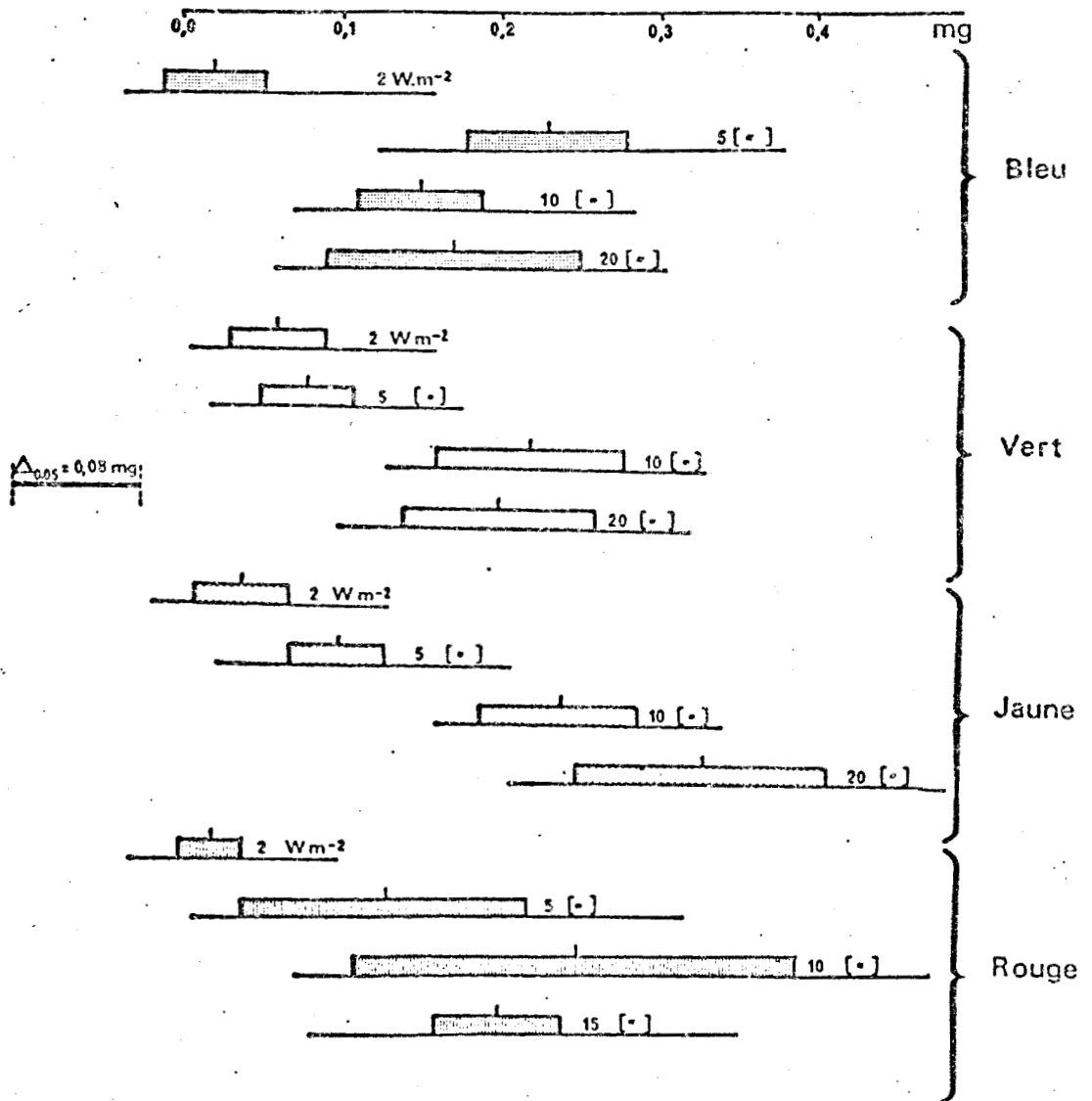


FIG. 15 : INFLUENCE DE DIVERSES LUMIÈRES COLORÉES SUR LA CROISSANCE DU *G. vertucosa* : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS

LÉGENDE : LA PLUS PETITE DIFFÉRENCE SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5 % ( $\Delta 0.05$ ) EST REPRÉSENTÉE GRAPHIQUEMENT À GAUCHE DE LA FIGURE.

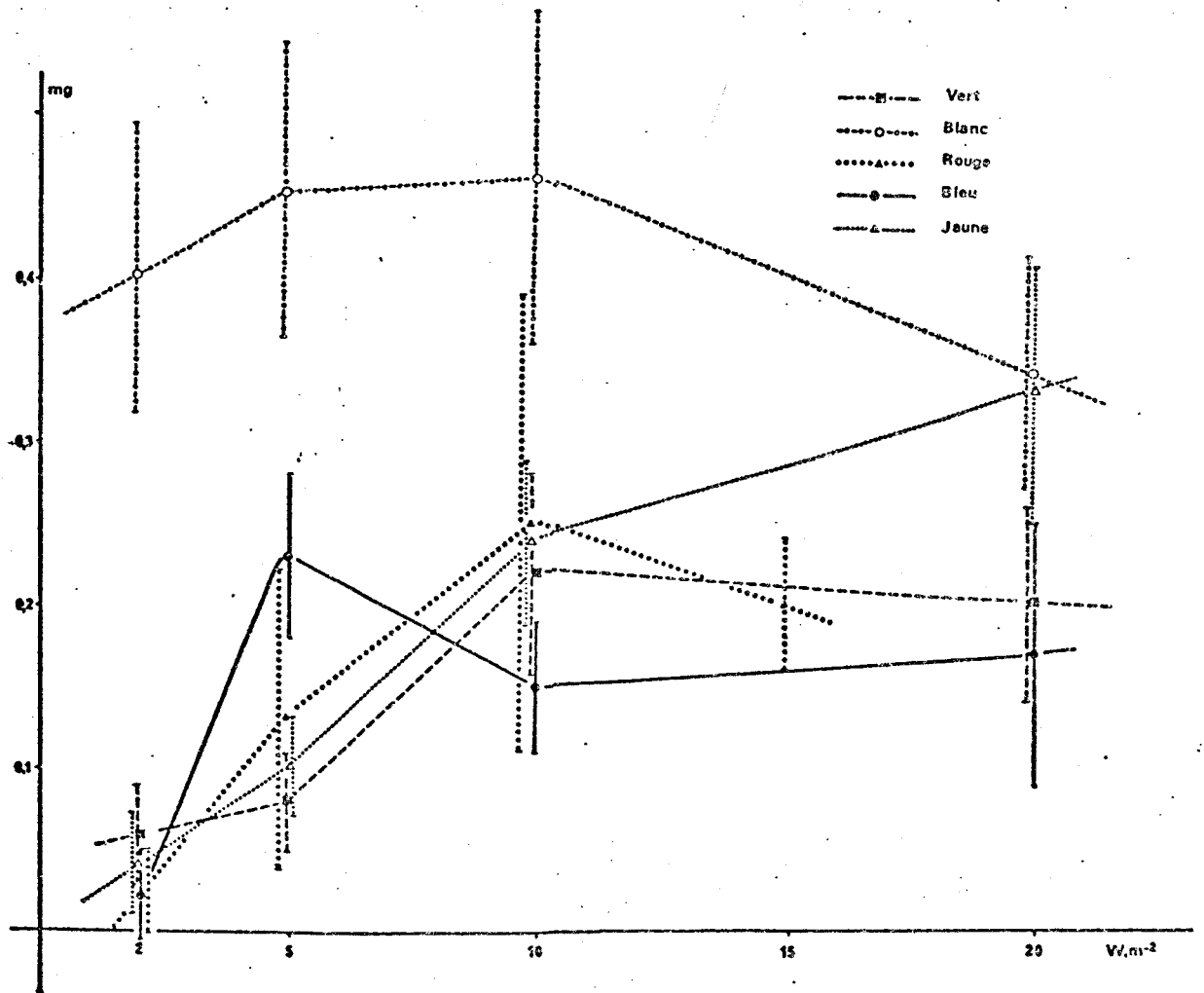


FIG. 16 : INFLUENCE COMPARÉE DE DIVERSES LUMIÈRES COLORÉES SUR LA CROISSANCE DU *G. verrucosus* EN FONCTION DE LA PUISSANCE D'ÉCLAIREMENT (W.m<sup>-2</sup>).

## 433 - DISCUSSION

## 4331. Influence de l'énergie

L'analyse de la figure 12 et 13 et du tableau 15, montre une croissance optimale de 80 à 320  $\text{W.m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  avec un maximum à 160 et révèle l'effet inhibiteur des puissances supérieures à 320. Ces données sont sensiblement en accord avec les travaux réalisés par BIRD et McLACHLAN (1977) sur les spores de *Gracilaria verrucosa*. Ces auteurs observent un développement optimal des spores cultivées à 20°C, sous une photopériode de 12 heures de lumière et sous une énergie d'éclairement comprise entre 7,5 et 9  $\text{W.m}^{-2}$  (soit entre 90 et 108  $\text{W.m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ ), lorsque ces spores étaient préalablement cultivées pendant 3 semaines à 25°C, sous un éclairage énergétique de 6  $\text{W.m}^{-2}$ , pendant 12 heures par jour. De même OGATA et al. (1972) obtient des plantes adultes à partir de spores de *Gracilaria*, cultivées sous 5000 lux en régime photopériodique de 12 heures de lumière ( $\approx 300 \text{ W.m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ ).

Par contre, nos résultats ne s'accordent pas avec ceux d'EDELSTEIN et al. (1976). Ces auteurs cultivent des plantes entières de *Gracilaria verrucosa* -à raison de 100 g d'algues par récipient- dans de l'eau de mer en renouvellement constant dont la température est de 20°C. Sous un éclairage continu en lumière blanche artificielle de 11800 lux (soit environ 60  $\text{W.m}^{-2}$ ), le taux de croissance est de 100 % en poids frais (la teneur en eau du Gracilaire est d'environ 85 %) après 15 jours, de 80 % au bout d'un mois. Ces résultats sont évidemment hors de proportion avec les nôtres et ne trouvent d'explication que dans les modalités de culture : ces auteurs utilisent, d'une part, des plantes entières, d'autre part, ils cultivent les algues dans de l'eau de mer constamment renouvelée.

L'importance du niveau énergétique de l'éclairement sur le développement du thalle des Rhodophycées a été recherchée par plusieurs auteurs. WAALAND et CLELAND (1972) montrent que le port branchu du *Griffithsia pacifica* s'observe exclusivement aux fortes intensités lumineuses ( $\approx 3000 \text{ lux}$ ). L'influence de l'éclairement énergétique sur la morphogenèse et plus précisément sur la modification de l'angle de ramification d'*Acrochaetium* sp. a été démontrée par LARPENT-GOURGAUD (1973).

## 4332. Influence de la photopériode

Cette influence ressort de l'analyse des graphes (fig. 13, 14). L'analyse de ces figures montre tout d'abord qu'aux niveaux d'éclairement respectifs de 80, 120, 160 et 240  $\text{W.m}^{-2} \text{ j}^{-2}$ , 8 et 12 heures de lumière par jour conduisent à une croissance significativement supérieure à celle observée sous 16 et 24 heures. De plus, la figure 14 révèle que le taux de croissance par unité d'énergie consommée est supérieure à  $8 : \overline{12}$  et  $12 : \overline{12}$ , qu'à  $16 : \overline{8}$  et  $24 : \overline{0}$ .

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence, chez *Gracilaria*, d'un mécanisme régulateur de la croissance, autre que le mécanisme photosynthétique et que l'on peut attribuer au photopériodisme. La certitude de l'existence d'un effet périodique, ne saurait cependant être acquise, sans une caractérisation précise de cet effet dont les critères sont, d'une part, l'induction et la poursuite de cet effet sous une photopériode non inductrice, d'autre part, la sensibilité de l'induction à l'interruption de la période d'obscurité.

Si l'existence d'un photopériodisme chez *Gracilaria verrucosa* n'a pas été démontrée à ce jour, l'influence de la longueur du jour sur la croissance des thalles a cependant été recherchée. Ainsi EDELSTEIN et al. (1976) montrent que la photopériode  $18 : \overline{6}$  sous un éclairage de 41800 lux conduit à une croissance similaire à celle obtenue sous un éclairage continu. Ces travaux traduisent, une fois de plus, un désaccord profond avec nos propres résultats.

Les travaux relatifs à la mise en évidence d'un photopériodisme chez les Rhodophycées ne sont pas très nombreux. RENTSCHLER (1967) démontre l'existence d'un effet photopériodique inducteur de la formation des monospores chez *Porphyra tenera*. MURRAY et DIXON (1972) recherchent l'existence d'un tel effet chez *Porphyropsis coccinea* sans pouvoir le mettre en évidence. WAALAND et al. (ib.) note l'existence chez *Griffithsia pacifica*, d'un rythme circadien qui agit sur la division cellulaire, indépendamment du rythme photopériodique imposé au thalle par l'expérimentateur. Par ailleurs, l'influence de la photopériode sur le développement de la phase Conchocelis du *Porphyra tenera* a été recherchée par IWASAKI (1961) ; si des périodes d'éclairage de 8 à 12 heures favorisent la formation normale des frondes, ce développement est limité lorsque la durée de l'éclairage dépasse 13 heures.

### 4333. Influence des bandes spectrales

L'analyse de la figure 16 montre d'emblée la grande efficacité de la lumière bleu sous un éclairage énergétique de  $5 \text{ W.m}^{-2}$ . Cette efficacité n'est atteinte sous les tubes vert, jaune et rouge qu'à  $10 \text{ W.m}^{-2}$ . L'optimum de croissance est atteint sous les tubes jaunes, à  $20 \text{ W.m}^{-2}$ . Pour cette même valeur de l'éclairage, on note un effet de saturation sous les tubes vert, bleu et rouge. Entre 2 et  $10 \text{ W.m}^{-2}$ , on remarque le parallélisme des résultats obtenus respectivement avec les lumières rouge, jaune et bleu et la comparaison entre les moyennes montrent qu'entre ces valeurs énergétiques, elles ne sont pas significativement différentes.

Par ailleurs, si on compare l'influence des lumières colorées sur la croissance à celle de la lumière blanche, on remarque qu'à tous les niveaux énergétiques testés, l'effet de cette lumière est supérieur, sauf au niveau énergétique de  $20 \text{ W.m}^{-2}$  où la lumière blanche produit le même effet que la lumière jaune. L'optimum de croissance observé à  $20 \text{ W.m}^{-2}$  sous la lumière jaune s'explique, si l'on rappelle que l'énergie lumineuse absorbée de façon maximale entre 500 et 600 nm par la phycoérythrine, peut servir à la photosynthèse, donc à la synthèse des substances organiques nécessaires à la croissance des thalles. L'effet stimulant observé à  $5 \text{ W.m}^{-2}$  sous la lumière bleu suggère le rôle des phycobilines et des caroténoïdes -que l'on sait présents chez les Rhodophycées en quantités non négligeables- et dont l'absorbance est maximale dans le bleu-vert.

Des expériences réalisées par LARPENT-GOURGAUD (1973), LARPENT et DUCHER (1975), ont montré l'action spécifique d'un rayonnement bleu monochromatique (= 476 nm), sur la morphogénèse et plus particulièrement sur la division cellulaire du thalle d'*Acrochaetium* sp.

L'influence de la lumière bleu sur des mécanismes aussi divers que la morphogénèse et la reproduction, a été démontrée chez de nombreuses algues (HARRIES 1932, TERBORGH 1965, RICHTER et al. 1966, WALLEN et al. 1971, LÜNING et DRING 1972).



## 434 - CONCLUSION

En conclusion à ces expériences, sur le rôle de la lumière sur la croissance et sur le développement de *Gracilaria verrucosa*, on peut retenir les faits suivants :

- a) L'éclairement énergétique optimum pour la croissance du thalle de *Gracilaria verrucosa* est de  $20 \text{ W.m}^{-2}$ .
- b) Les photopériodes les meilleures sont de 8 et 12 heures de lumière par jour.
- c) Les bandes spectrales les plus efficaces se situent dans les régions bleu et jaune du spectre visible.

De nouvelles expériences seront nécessaires pour préciser, d'une part, le rôle du photopériodisme dans la croissance et le développement du thalle, pour rechercher, d'autre part, l'effet de certaines radiations, notamment dans la bande bleu du spectre visible, sur les mécanismes morphogénétiques qui président à la croissance de la Gracilaire. Cependant, celles que nous avons conduites dans le présent travail, corroborent l'aptitude écologique de cette algue, à subir des altérations qualitatives et quantitatives non négligeables du spectre visible.

Ces variations qualitatives et quantitatives du flux lumineux sont précisément celles auxquelles l'algue est soumise dans son habitat qui est l'étage médiolittoral inférieur, où l'éclairement passe des niveaux les plus atténués lors des hautes mers.

*"... Les vents portent dans leur gorge la grande voix de la mer. Je vous dirai des marées, je vous dirai des souffles.....*

*Les vents me disent que le monde est beau, que rien n'est fixé pour toujours, que la vie est un mouvement musical et perpétuel. Et il arrive aussi que les vents, soufflant en bonnes brises, sont doux comme des trouvères et tendres comme les balades. Je vous les dirai..."*

X. GRALL

"Les Vents m'ont dit"

## CHAPITRE 5

# INFLUENCE DE LA SOURCE CARBONÉE SUR LA CROISSANCE

Dans l'impossibilité de résoudre le problème de la stérilisation des segments de Gracilaire, nous nous sommes limités à rechercher l'action du carbone minéral sur la croissance de cette algue. Sachant que la nutrition carbonée des algues marines se réalise essentiellement sous la forme  $\text{HCO}_3^-$  (THOMAS et TREGUNNA 1968), nous nous sommes proposés d'étudier l'action sur la croissance de l'ion bicarbonate, introduit dans le milieu sous la forme  $\text{HCO}_3\text{Na}$ .

## 51 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le milieu de base, destiné à recevoir des concentrations croissantes en ion  $\text{HCO}_3^-$ , est le milieu KG (tableau 17), dont la composition en sels, est basée sur l'analyse des principaux éléments contenus dans l'eau de mer à Wimereux (DELEERSNYDER et GLACON 1973). Ce milieu est enrichi des vitamines et des oligo-éléments du milieu ASP<sub>6</sub>F. Les thalles sont cultivés, à raison d'une quarantaine par niveau d'expérimentation, dans des fioles de Fourneau contenant chacune 50 ml de milieu et placés sous une rampe lumineuse fluorescente blanche (Sylvania, GroLux) produisant un flux lumineux d'intensité égale, au niveau de la paillasse, à  $5 \text{ W.m}^{-2}$ . Après 20 jours de culture les milieux sont renouvelés. Les concentrations en  $\text{HCO}_3^-$  que nous avons testées figurent ci-dessous :

Milieu	$\text{HCO}_3^-$ m M/l.	$\text{HCO}_3\text{Na}$ mg/l
T	0	0
1	2	168,0
2	4	336,0
3	8	672,1
4	16	1344,2
T	32	2688,3

## TABLEAU 17

## MILIEU DÉNOMMÉ KG

Sels	Concentration en mg ou g par litre	
Cl Na	20	g
Ca Cl <sub>2</sub>	1,118	g
SO <sub>4</sub> Mg	8	g
Cl <sub>2</sub> Mg	2,589	g
KCl	763,33	mg
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	0,506	mg
Na NO <sub>3</sub>	2,823	mg
Na NO <sub>2</sub>	0,0286	mg
Cl NH <sub>4</sub>	0,111	mg
IK	0,078	mg
BrK	0,066	mg
oligo-éléments (cf. milieu ASP <sub>6</sub> F)		
vitamines ( idem )		
TRIS ( idem )		
Ge O <sub>2</sub> <sup>(*)</sup>	1	mg
pH	7,8	

(\*) substance inhibitrice du développement des diatimées



## 52 - RÉSULTATS

Les résultats de l'expérience sont exprimés dans le tableau 17 et sur les figures 17 et 18. Leur analyse statistique montre que le F est égal à 18,30. Comme la probabilité P est telle que :

$$P \{F_{5,00} > 3,02\} = 0,01$$

on infirme au seuil de 1 % l'hypothèse ( $H_0$ ) d'homogénéité des moyennes. Les moyennes sont comparées deux à deux. La probabilité P telle que :

$$P \{t > t_{0,05}\} < 0,05$$

est représentée graphiquement sur la figure 17.

## 53 - DISCUSSION

La courbe du graphique de la figure 18 montre que l'optimum de croissance est atteint lorsque la concentration en  $\text{HCO}_3^-$  égale  $16 \text{ mM.l}^{-1}$ . Au delà de cette concentration le bicarbonate agit défavorablement sur la croissance. Les accroissements de poids, observés dans le milieu témoin et dans le milieu où la concentration en  $\text{HCO}_3^-$  est égale à  $2 \text{ mM.l}^{-1}$ , ne sont pas significativement différents. Ce résultat ne doit pas étonner, si l'on sait que le milieu témoin, en étant placé dans une atmosphère non privée de  $\text{CO}_2$ , réagit par sa phase aqueuse avec le gaz carbonique de l'air pour former du bicarbonate et du carbonate.

Si les milieux enrichis respectivement de 2 et 4 mM de bicarbonate conduisent à des résultats significativement différents, il n'en est plus de même, lorsque l'on confronte les données des milieux contenant respectivement 4 et  $8 \text{ mM.l}^{-1}$  de  $\text{HCO}_3^-$ . Par contre, la croissance des thalles, dans le milieu dont la concentration en bicarbonate est de 16 mM, conduit à une moyenne de poids, qui est très significativement différente de toutes les autres.

Si le milieu contenant 16 mM de bicarbonate a l'avantage de conduire à une croissance optimale, il faut tout de même remarquer qu'après une semaine de culture, on voit apparaître un précipité blanc (carbonate de calcium et de magnésium) qui s'observe également dans le milieu contenant 32 mM de bicarbonate.

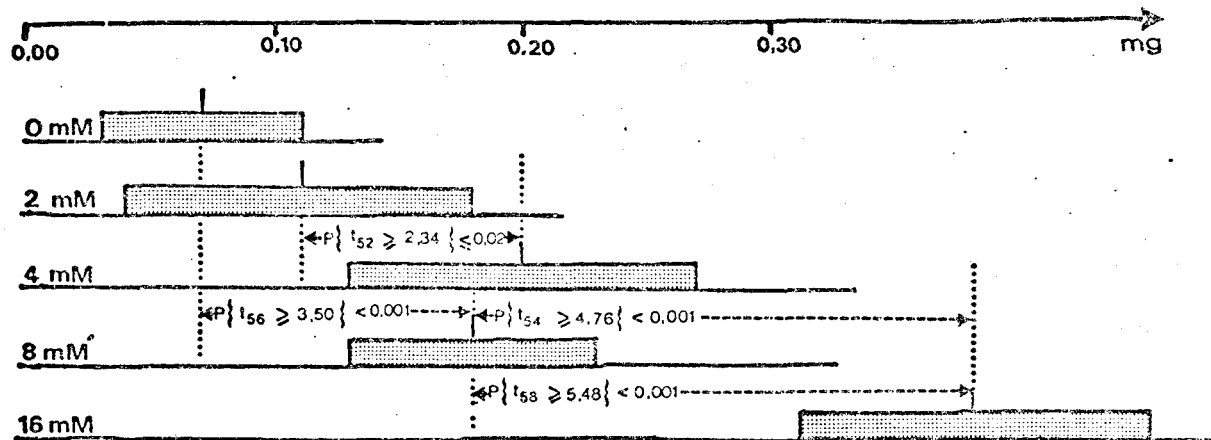


FIG. 17 : INFLUENCE DU CARBONE SUR LA CROISSANCE DU GRACILARIA : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS.

LÉGENDE - P : TAUX DE PROBABILITÉ

TDDL : VARIABLE DE STUDENT LUE DANS LA TABLE POUR UN NOMBRE DE DEGRÉ DE LIBERTÉ (DDL) ÉGAL À  $N_1 + N_2 - 2$

MM : CONCENTRATION DU MILIEU EN MILLIMOLE DE  $[\text{HCO}_3^-]$

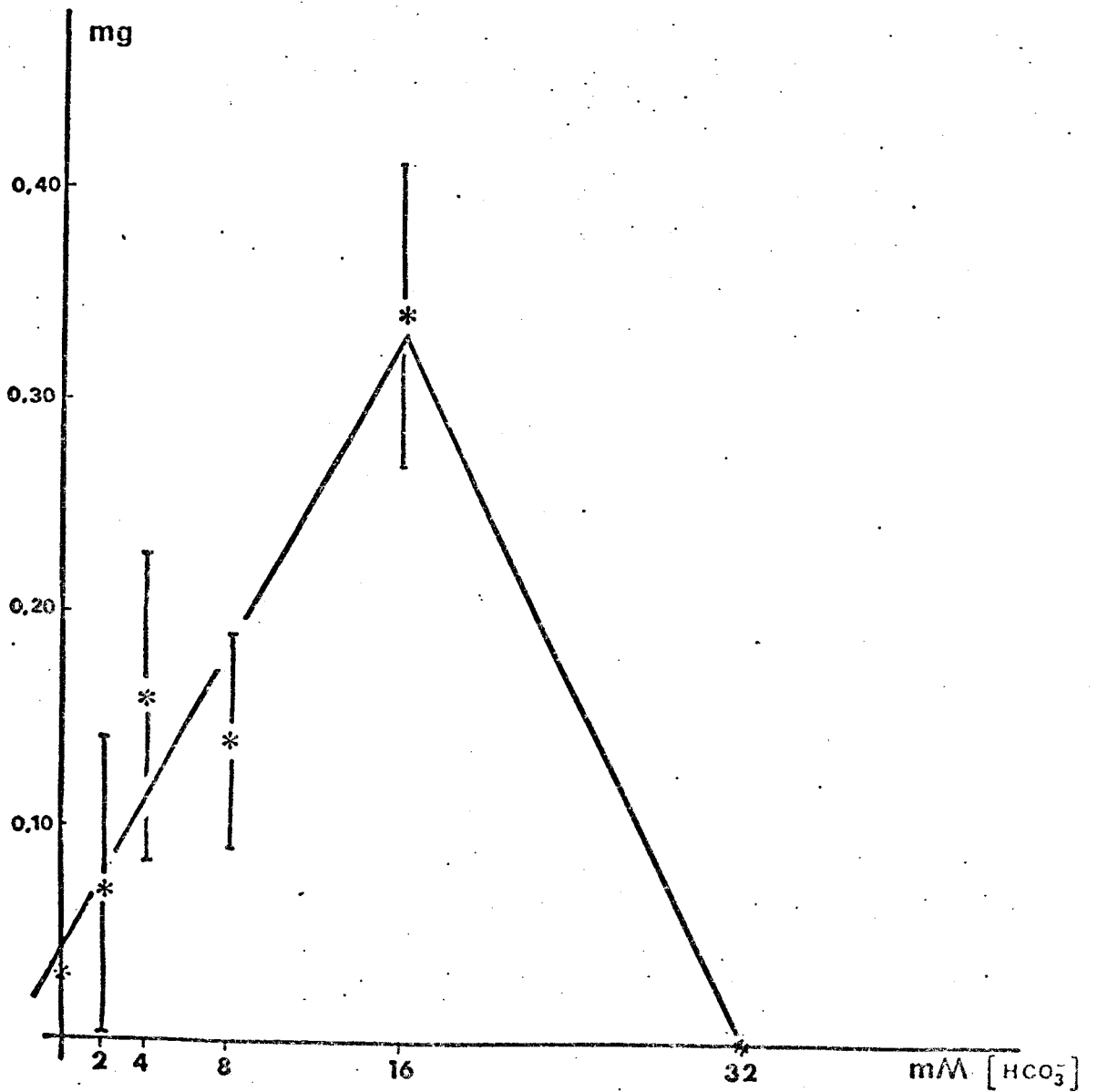


FIG. 18. INFLUENCE DU CARBONE SUR LA CROISSANCE : L'ERREUR STANDARD DE LA MOYENNE APPARAÎT EN TRAIT VERTICAUX DE PART ET D'AUTRE DES POINTS EXPÉRIMENTAUX.



Les travaux relatifs à l'influence du bicarbonate sur la croissance des Rhodophycées sont peu nombreux, et rares sont les auteurs, qui l'utilisent dans la formulation de leur milieu (MATUDAIRA 1942, WILSON et COLLIER 1955, LEVRING 1946, PROVASOLI et al. 1957).

OGATA (1966), étudiant l'influence du tampon Tris sur la photosynthèse de *Porphyra tenera*, montre qu'en l'absence de ce tampon, la concentration optimale en bicarbonate est de 10 m M/l ; il remarque par contre qu'elle n'est plus que de 2,5 m M/l lorsque le milieu est tamponné par 7,5 m M/l de Tris. La concentration de notre milieu en Tris étant de 8,2 m M/l, on peut remarquer que l'optimum de croissance est atteint avec une concentration presque 10 fois supérieure à celle utilisée par OGATA.

La différence constatée dans le comportement de ces deux algues, pourrait être attribuée au fait, qu'elles n'occupent pas le même milieu de l'étage littoral. *Porphyra* colonise les rochers de la partie supérieure de l'étage littoral et est, de ce fait, régulièrement émergée lors des basses mers. *Gracilaria*, au contraire, n'est jamais émergé. On peut donc penser que chez *Porphyra*, la diffusion du gaz carbonique de l'air, dans les cellules, joue un rôle aussi important, dans le processus photosynthétique, que la diffusion active de l'ion  $\text{HCO}_3^-$ .

Par contre, nos résultats se rapprochent davantage de ceux obtenus par OGATA (1966) chez une algue brune : le *Petalonia fascia*. Chez cette algue, l'activité photosynthétique est la plus fortement stimulée dans une eau de mer contenant 7,5 m M de tampon Tris et 10 m M de bicarbonate.

Les travaux plus nombreux, relatifs à l'influence du carbone organique, sur le développement des algues en culture, ont pu être menés à bien par les auteurs, grâce à la réalisation de cultures stériles. Dans le cadre de ces recherches, l'aptitude des algues à absorber le carbone organique sous différentes formes -acides organiques et leurs sels, hydrates de carbones, alcools, cétones, etc...- et à l'utiliser comme source d'énergie, a été démontrée par plusieurs auteurs. Ainsi le glucose ou l'acétate favorise la croissance des Volvocales (PRINGSHEIM 1951). L'éthanol et le glucose sont assimilés par *Chlorella vulgaris* (STREET et al. 1958). *Trilliella intricata* et *Erythrotrichia carnea* sont insensibles aux oses, mais voient leur croissance stimulée par

l'acétate (FRIES 1973). L'acétate, le glucose et le saccharose stimulent la respiration chez *Enteromorpha compressa* et chez *Phyllophora nervosa* (LITVINENKO 1961). Chez *Gonio-trichum*, la croissance est stimulée par le glucose, le saccharose, le fructose, le galactose et le glycérol, tandis que chez *Nemalion*, cet effet se manifeste en présence de glycérol et de galactose (FRIES 1973). Cet auteur a également montré que les algues rouges, ne répondent positivement à la présence des oses dans le milieu de culture, qu'en présence de lumière (FRIES 1973). L'action des carbohydrates sur des processus autres que celui de la photosynthèse a été reconnue : ainsi *Desmaretia ligulata* cultivé axéniquement donne un sporophyte normal lorsque le milieu est additionné de glucose (NAKAHARA et TATEWAKI 1971).

En conclusion à ce travail, on peut noter l'influence favorable sur la croissance de *Gracilaria* de l'ion bicarbonate ajouté au milieu, à la concentration de 15 m M/l.

Enfin, seule la réalisation de cultures axéniques, permettra de préciser la nature photohétérotrophe de cette algue.

CHAPITRE 6

INFLUENCE DE LA SOURCE AZOTEE  
SUR LA CROISSANCE

L'azote est présent dans les eaux marines où il décrit un cycle sous les formes organiques (environ 150 µg/l, IVANOFF 1972) et minérales. Les formes inorganiques de l'azote sont représentées par les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). La concentration en ions nitrates des eaux marines couvre plus de 90 % de la concentration totale en azote minéral (500 µg/l). Ces valeurs traduisent la relative pauvreté en azote des eaux marines.

Dans le présent chapitre, nous nous proposons d'étudier l'influence de diverses concentrations en azote organique et minéral, sur la croissance du Gracilaire. L'azote minéral est testé sous les trois formes ioniques suivantes :  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NO}_2^-$ , tandis que l'azote organique, l'est par l'arginine, dont l'influence particulièrement positive sur la croissance d'une Rhodophycée, a été démontrée par FRIES (1963).

## 61 - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Nous avons vu plus haut que la concentration en azote minéral des eaux marines est voisine de 500 µg/l. Nous avons retenu cette valeur comme point d'origine de la gamme de concentration que nous avons représentée dans le tableau 18.

On utilise le milieu  $\text{ASP}_6\text{F}$  dont on substitue le nitrate de sodium par chacun des sels figurant dans le tableau 18. Quant au milieu témoin, c'est ce même milieu dépourvu d'azote. La température est maintenue à  $20^\circ\text{C} \pm 1$ . L'illuminance émise par les tubes fluorescents blancs (Sylvania, type Grolux) est de  $5 \text{ W.m}^{-2}$  au niveau des fioles. L'apparition sur le fond des fioles, après 15 jours de culture, d'un tapis d'algues vertes et brunes plus ou moins dense, nous a conduit à renouveler, après trois semaines de culture, les fioles et les milieux de culture.

Chaque lot est constitué de 40 segments que l'on place en culture pendant 40 jours. Après ce délai, les segments sur lesquels les épiphytes végétaux sont trop nombreux, sont éliminés, tandis que les autres sont pesés.



TABLEAU 18

SYNOPTIQUE DES DIVERSES SOURCES AZOTÉES TESTÉES,  
AINSI QUE DE LEURS CONCENTRATIONS

Azote (N) mg/l	Sel mg/l	NO <sub>3</sub> Na	ClNH <sub>4</sub>	NO <sub>2</sub> Na	ARG
0,5		3,04	1,91	2,46	5,08
5		30,35	19,10	24,64	50,8
50		303,53	191,03	246,40	508,0
500		3035,3	1910,3	2464,0	5080,0

## 62 - RÉSULTATS

Les résultats sont représentés dans le tableau 19 et sur la figure 19. L'analyse statistique des résultats conduit à une valeur de  $F$  égale à 9,73. La probabilité attachée à cette valeur est telle que :

$$P \{F_{10, \infty} > 2,96\} < 0,01$$

Ce résultat infirme l'hypothèse ( $H_0$ ) d'homogénéité des moyennes au seuil de 1 %. La plus petite différence significative au seuil de 5 % ( $\Delta 0,05$ ) est recherchée en appliquant le test de  $t$ . Le calcul conduit à une valeur de  $\Delta 0,05$  égale à 0,06. Cette valeur est représentée graphiquement sur la figure 19.

L'analyse de la figure 19 montre que l'ion  $\text{NO}_3^-$ , seul, conduit à un optimum de croissance à des concentrations en azote comprises entre 0,5 et 5 mg par litre. Dans cet intervalle de concentrations, le *Gracilaire* se montre indifférent à l'ion  $\text{NH}_4^+$ , tandis que l'arginine et l'ion  $\text{NO}_2^-$  exercent une action franchement inhibitrice. L'analyse statistique des résultats révèle que la croissance observée dans les milieux "nitrate" (0,5 et 5 mg/l) n'est pas significativement différente de celle constatée dans le milieu témoin ( $P \{t_{79} \geq 1,29 \geq 20 \%$ ). Par ailleurs, les algues cultivées dans le milieu témoin, croissent mieux que celles cultivées dans les milieux contenant 50 mg et plus d'azote, introduit sous les formes minérales  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  et sous la forme organique (arginine).

## 63 - DISCUSSION

L'expérience que nous avons menée pour tester l'influence sur la croissance de l'azote, montre que cette algue se développe le mieux, dans les milieux faiblement azotés. Ce résultat confirme les conclusions de JONES et al. (1959), qui faisait remarquer que la croissance de *Gracilaria*, cultivé dans le milieu naturel, était maximale lorsque les quantités d'azote dissoutes dans l'eau de mer, étaient les plus faibles (0,5 - 5 mg N/l). DEBOER (1977) recherchant l'influence de la source azotée sur la croissance de *Gracilaria foliifera*, abonde dans le même sens et note que les thalles prolifèrent au maximum en présence de 1,0  $\mu\text{M}$ /l d'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), soit environ 36  $\mu\text{g}$ /l.

TABLEAU 19

INFLUENCE COMPARÉE DE DIVERSES SOURCES AZOTÉES  
SUR LA CROISSANCE DES THALLES DE *G. verrucosa*.

Source azotée	mg/l d'azote	nombre d'individus par lot	poids moyen et dispersion (erreur standard)
No <sub>3</sub> Na	0,5	43	0,20 ± 0,03
	5	38	0,20 ± 0,03
	50	35	0,12 ± 0,04
	500	39	0,07 ± 0,11
No <sub>2</sub> Na	0,5	40	0,08 ± 0,03
	5	38	0,0
	50	39	0,0
	500	36	0,0
Cl NH <sub>4</sub>	0,5	39	0,15 ± 0,04
	5	40	0,12 ± 0,04
	50	39	0,05 ± 0,03
	500	39	0,0
Arginine	0,5	40	0,05 ± 0,03
	5	41	0,05 ± 0,03
	50	40	0,0
	500	38	0,0
Témoin	0	38	0,16 ± 0,03



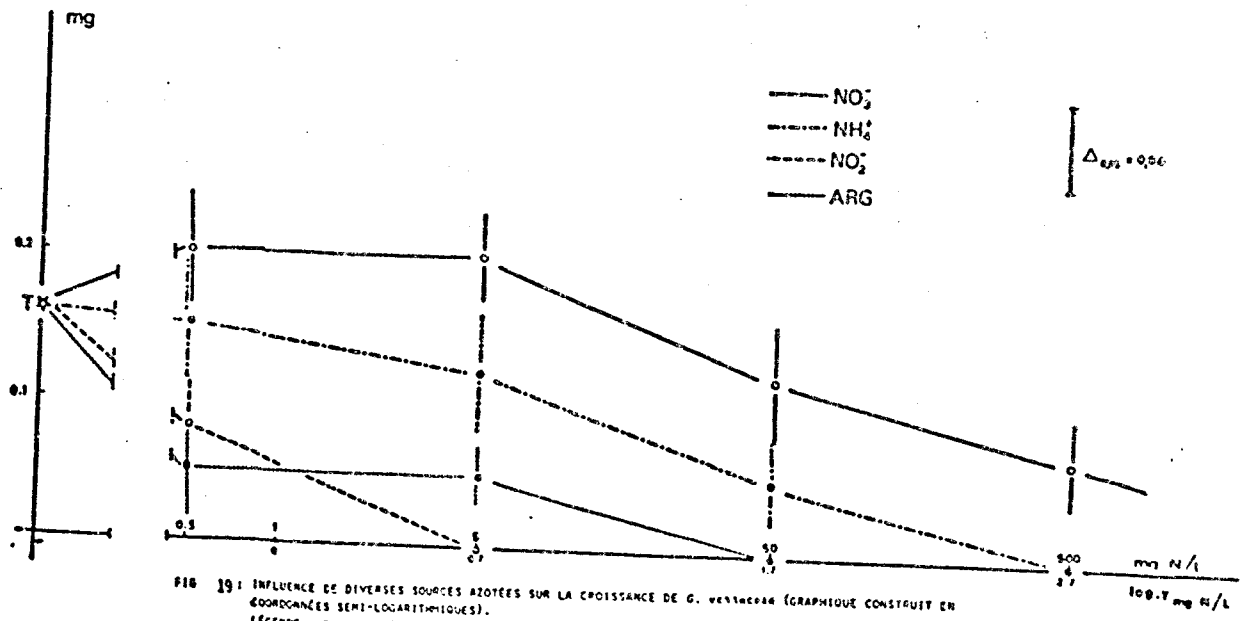


FIG 19 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES AZOTÉES SUR LA CROISSANCE DE *G. ventricosa* (GRAPHIQUE CONSTRUIT EN COORDONNÉES SEMI-LOGARITHMIQUES).  
 LÉGENDE : EN ORDONNÉE : ÉCHELLE MÉTRIQUE PORTANT LES POIDS (MG)  
 EN ABSCISSE : ÉCHELLE LOGARITHMIQUE : T = CONCENTRATION EN AZOTE (N) EXPRIMÉE EN MG D'AZOTE PAR LITRE (L).





On peut se demander, dans quelle mesure, la Gracilaire montre une préférence pour l'une ou l'autre forme de l'azote. Si l'on se réfère aux résultats exprimés dans la figure 19, on note que jusqu'à la concurrence de 0,5 mg N/l, la croissance, en présence de l'ion ammonium, n'est pas significativement réduite par rapport à celle que l'on observe en présence de l'ion nitrate.

L'utilisation de l'ion nitrite ou de l'arginine comme source azotée, semble, par contre, devoir être écartée des cultures du Gracilaire. On peut penser, en ce qui concerne l'arginine, que l'effet toxique observé n'est pas dû exclusivement à cet acide aminé. En effet, les milieux enrichis en arginine, favorisent plus que tous les autres la multiplication bactérienne, qui n'est pas sans ralentir la croissance des thalles.

A la suite des travaux de SCHREIBER (1927), nombreux sont les auteurs qui préconisent l'utilisation de l'ion nitrate comme source azotée. Les doses généralement utilisées se situent entre 7 et 50 mg d'azote par litre (FRIES 1963, IWASAKI 1967, BOALCH 1961, HENKEL 1952, PINTNER et PROVASOLI 1958, LEVRING 1946, ANDERSON 1942, KYLIN 1927, ALGEUS 1946).

Chez une algue verte du genre *Closterium*, DUBOIS-TYLSKI (1977) a montré le rôle de la concentration en nitrate du milieu sur la multiplication végétative et sur la sexualisation. Si les concentrations élevées en ion  $\text{NO}_3^-$  ( $5,3 \cdot 10^{-3}$  M.l<sup>-1</sup> d'azote) favorisent la multiplication végétative, les doses les plus faibles ( $1,3 \cdot 10^{-3}$  M/l d'azote) par contre contribuent à l'induction de la sexualisation.

Chez les algues brunes 7 mg/l d'azote produisent un développement optimal (BOALCH 1961). Chez *Goniostrichum*, la production végétale est la plus forte en présence de 16 mg/l d'azote lorsqu'il est introduit dans le milieu de culture sous la forme d'ion nitrate (FRIES 1963). *Nemalion*, par contre, exige 50 mg/l d'azote du même ion (FRIES 1963). Quant à *Rhodocytus*, pour une même concentration en azote, seule l'arginine produit le même effet.

FRIES (1963) a également montré l'aptitude des Rhodophycées à utiliser l'ion ammonium comme source azotée. Cette observation est confirmée par HENKEL (1952) chez *Bangia* et par IWASAKI (1967) chez *Conchoce-*

lis. On peut formuler les mêmes conclusions à l'égard des algues vertes (ANDERSON 1942). Lorsque l'on compare plus particulièrement nos travaux à ceux de FRIES, on peut remarquer que la nitratophilie de *Gracilaria* et de *Goniostrichum* sont similaires. Enfin, la tolérance des Rhodophycées, vis-à-vis de l'ion ammonium, mise en évidence par FRIES, se confirme également chez la Gracilaire.

En conclusion à ces expériences, on peut retenir les faits suivants :

- le développement optimal de *Gracilaria* s'observe en présence des formes nitrate et ammonium de l'azote ;
- les concentrations optimales en azote sont celles qui se rapprochent le plus de celles des eaux marines (0,5 mg/l).

## CHAPITRE 7

INFLUENCE DU PHOSPHORE  
SUR LA CROISSANCE

Le caractère d'absolue nécessité du phosphore dans l'alimentation des végétaux et l'analyse chimique des eaux marines qui révéla la présence de phosphore, conduisit les chercheurs, dès la fin du XIXème siècle, à l'introduire dans la formule de leurs milieux marins naturels ou artificiels.

On sait que le phosphore est engagé, au sein des eaux marines, dans un véritable cycle où il apparaît successivement sous les formes organique et minérale. L'analyse chimique de l'eau de mer (IVANOFF 1972), montre que la concentration en phosphore organique est généralement voisine de 10 µg/l tandis que la concentration en phosphore inorganique est d'environ 100 µg/l.

L'objet du présent travail est de rechercher l'influence des formes organique et inorganique du phosphore sur la croissance du Gracilaire.

## 71 - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Nous avons utilisé comme source de phosphore inorganique le phosphore dipotassique ( $K_2 HPO_4$ ) et comme source de phosphore organique le  $\beta$ - $Na_2$  glycérophosphate de sodium.

La gamme de concentrations en phosphore que nous avons testée est figurée ci-dessous :

Phosphore mg/l	$K_2 HPO_4 \cdot 3H_2O$ mg/l (1)	$\beta$ - $Na_2$ glycérophosphate mg/l (2)	Glycérol mg/l (3)
0,1	0,74	0,60	0,30
1	7,37	6,01	2,97
10	73,68	60,07	29,73
50	368,42	300,37	148,67

TABLEAU 20

## INFLUENCE COMPARÉE DE DIVERSES SOURCES PHOSPHORÉES

SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*

Source phosphorée	mg L <sup>-1</sup> de phosphore	Nombre d'individus par lot	Poids moyen et erreur-standard
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	29	0,77 ± 0,22
	1	27	0,64 ± 0,14
	10	22	0,43 ± 0,16
	50	26	0,50 ± 0,09
B-Na <sub>2</sub> -glycérophosphate	0,1	23	0,64 ± 0,15
	1	21	0,73 ± 0,17
	10	23	0,61 ± 0,19
	50	22	0,58 ± 0,17
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + glycérol.	0,1	24	0,51 ± 0,12
	1	19	0,57 ± 0,14
	10	27	0,37 ± 0,08
EM <sup>(*)</sup>		26	0,43 ± 0,15
6F <sup>(**)</sup>		26	0,52 ± 0,14

(\*) eau de mer

(\*\*) milieu ASP<sub>6</sub>F

Comme l'utilisation du  $\beta$ - $\text{Na}_2$  glycérophosphate, introduit simultanément dans le milieu de culture du phosphate et du carbone à raison de 19,37 mg de carbone pour 100 mg de  $\beta$ - $\text{Na}_2$ -glycérophosphate, on réalise un milieu formulé avec du glycérol et du phosphate, dont les teneurs en phosphate et en carbone sont équivalentes à celles du milieu formulé avec du glycérophosphate.

Les segments de thalle sont placés dans des fioles de Fourneau, contenant chacune 25 ml de milieu de culture. Le milieu  $\text{ASP}_6\text{F}$ , dépourvu de  $\beta$ - $\text{Na}_2$ -glycérophosphate constitue le milieu de base, dont le pH est fixé à 7,8. Chaque concentration en phosphore du milieu est testée sur une trentaine de segments. La culture est réalisée à  $20^\circ\text{C} \pm 1$  sous un éclairage blanc de  $5 \text{ W.m}^{-2}$ , pendant 40 jours. L'eau de mer et le milieu  $\text{ASP}_6\text{F}$  dépourvu de phosphore constituent les milieux témoins.

## 72 - RÉSULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 20 et sur les figures 20 et 21. Leur signification statistique est recherchée par le test de F et le test de t. Le F calculé est égal à 2,25. Dans la table de F on lit :  $F_{12,304} \approx F_{12,00} = 2,18$  au point 1 %. La probabilité P attachée à la valeur du F calculé est telle que :

$$P \{F > 2,18\} < 0,01.$$

Aussi, les moyennes sont-elles significativement différentes au seuil de 1 %. Leur comparaison deux à deux, est réalisée à l'aide du test de t. Lorsque les différences entre deux moyennes sont significatives au seuil de 5 %, celles-là sont représentées graphiquement sur la figure 21.

L'analyse des données du tableau 20 montre que le nombre d'échantillons pesés (ni) est dans chaque colonne inférieur à la valeur 30. Ceci résulte du fait que nous avons systématiquement éliminé les segments sur lesquels des algues vertes s'étaient trop densément développées.

Du tableau 20 et des figures 20 et 21, il ressort que l'optimum de croissance est atteint dans tous les cas pour des concentrations en phosphore ne dépassant pas 1 mg/l. Dans les milieux enrichis en glycé-

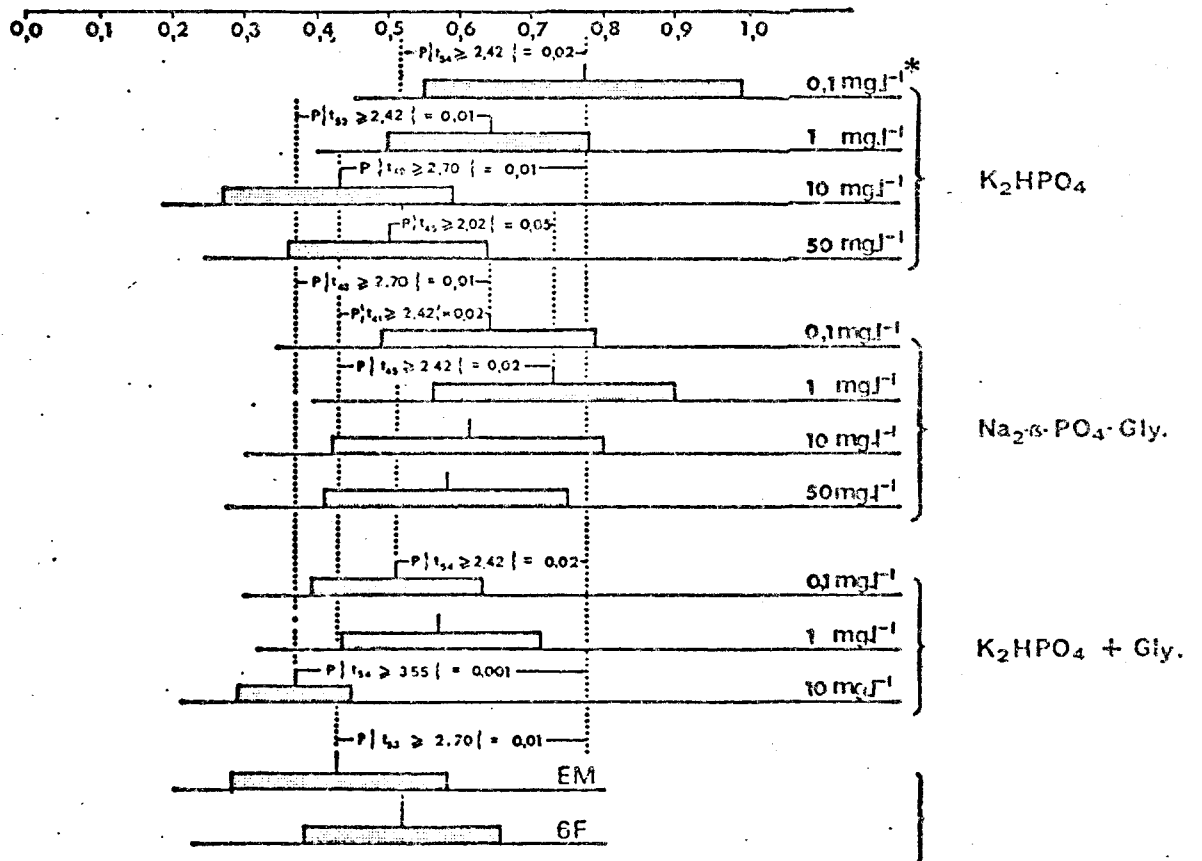


FIG. 20 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES PHOSPHORÉES SUR LA CROISSANCE DE *G. verucosa* : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS.

LÉGENDE : \* :  $mg.l^{-1}$  : CONCENTRATION DU MILIEU EN MILLIGRAMMES PAR LITRE DE PHOSPHORE.  
 $Na_2\beta-PO_4-GLYC.$  :  $\beta$ -GLYCÉROPHOSPHATE DE SODIUM.  
 GLY. : GLYCÉROL.  
 EM : EAU DE MER  
 6F : MILIEU ASP6F



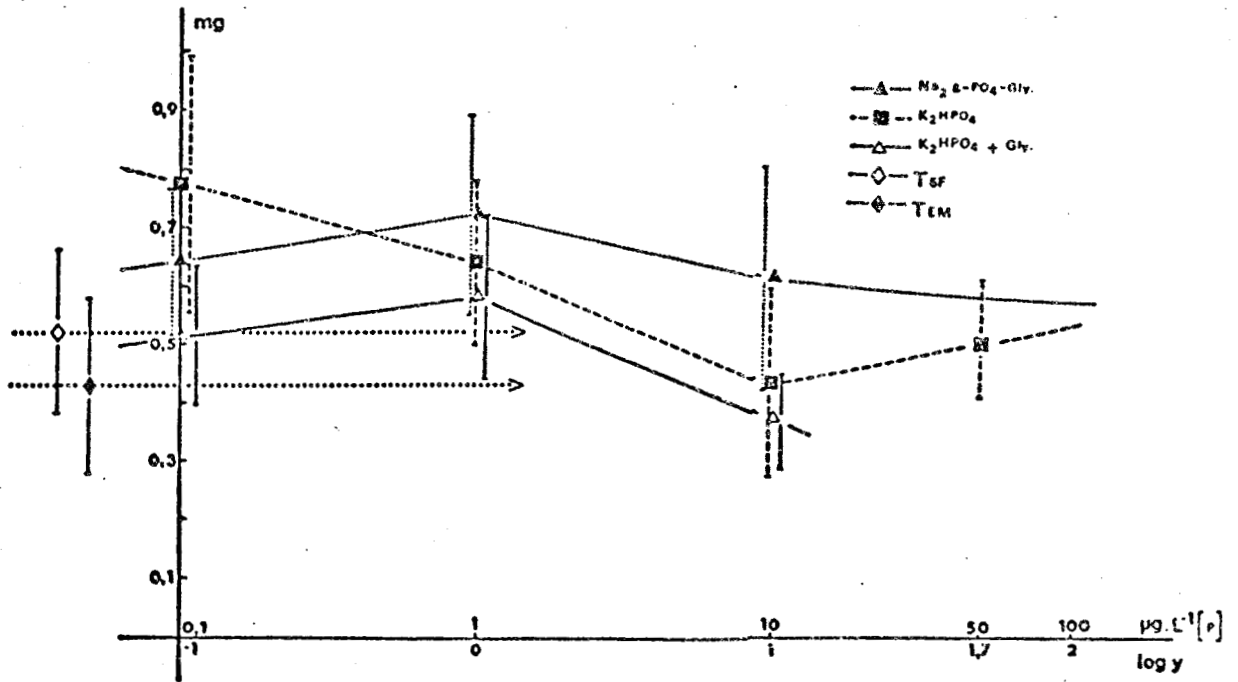


FIG 21: INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES PHOSPHORÉES SUR LA CROISSANCE DE *G. vernekeri* (GRAPHIQUE CONSTRUIT EN COORDONNÉES SEMI-LOGARITHMIQUES).

LEGENDE : EN ORDONNÉE : ÉCHELLE MÉTRIQUE PORTANT LES POIDS (MG)

EN ABSCISSE : ÉCHELLE LOGARITHMIQUE : Y : CONCENTRATION EN  $\mu\text{g.L}^{-1}$  DE PHOSPHORE.

$\text{Na}_2 \beta\text{-PO}_4\text{-GLYC.}$  :  $\beta$ -GLYCÉROPHOSPHATE DE SODIUM.

GLYC. : GLYCÉROL.

TEM. : TÉMOIN EAU DE MER

TSF : TÉMOIN ASP6F

NOTA : L'ERREUR-STANDARD DE LA MOYENNE EST REPRÉSENTÉE PAR UN TRAIT VERTICAL DE PART ET D'AUTRE DU POINT EXPÉRIMENTAL.



rophosphate d'une part, en phosphate et en glycérol d'autre part, l'optimum de croissance n'est atteint que pour 1 mg de phosphore par litre, tandis qu'en présence de phosphate seul cet optimum est atteint à la concentration de 0,1 mg/l de phosphore.

L'analyse de la figure 21 conduit aux constatations suivantes : pour une concentration de 0,1 mg/l de phosphore, la croissance dans le milieu phosphate est significativement différente de celles observées respectivement dans l'eau de mer ( $P = 0,01$ ) et dans le milieu de Fries ( $P = 0,02$ ). De même, à la concentration de 1 mg/l de phosphore, le milieu glycérophosphate conduit à une croissance des thalles, significativement différente ( $P = 0,02$ ) de celle constatée dans l'eau de mer. On note, par ailleurs, qu'à la dose de 10 mg/l de phosphore, le milieu glycérophosphate conduit au même résultat que le milieu  $ASP_6F$  dépourvu de phosphore. Lorsque l'on compare les résultats acquis respectivement dans le milieu  $ASP_6F$  carencé en phosphore et dans l'eau de mer ( $P = 0,90$ ), dont la concentration en phosphore est voisine de 0,1 mg/l, on remarque que les croissances sont similaires ( $P = 0,05$ ).

### 73 - DISCUSSION

Les résultats présentés plus haut montrent que la croissance optimale du Gracilaire s'observe aux plus faibles concentrations en phosphore, à savoir 0,1 mg/l de phosphore inorganique et 1 mg/l de phosphore organique. Le développement optimum de Gracilaria chez des individus cultivés en mer, a également été constaté par JONES (1959) aux périodes de l'année où la concentration en phosphore était la plus faible. La comparaison entre les moyennes de poids mesurés respectivement sur les lots cultivés dans le milieu  $ASP_6F$  dépourvu de phosphore et dans l'eau de mer, révèle une croissance similaire dans l'un et l'autre cas. Le caractère d'absolue nécessité du phosphore dans le milieu de culture semble donc infirmé. En fait, ce résultat s'explique fort bien si on suppose que les algues, mises en culture, disposent d'une réserve de phosphore intracellulaire dont l'épuisement ne se manifeste pas au bout des 40 jours de culture.

L'influence du phosphore sur le développement des algues a été étudié par plusieurs auteurs. FRIES (1963) étudie le rôle du phosphore

organique et inorganique sur la croissance de trois algues rouges (*Goniotrichum*, *Trailliella*, *Nemalion*) cultivées axéniquement. Ces travaux mènent l'auteur aux conclusions suivantes : *Goniotrichum* présente une croissance maximale en présence de glycérophosphate de sodium à la concentration de 4,45 à 8,9 mg/l de phosphore ; *Trailliella* montre la même préférence pour le phosphore organique et atteint une croissance maximale en présence de 4,45 mg/l de phosphore ; quant à *Nemalion*, il préfère également le phosphore organique à la concentration de 14,35 mg/l de phosphore. Si on compare nos résultats à ceux de FRIES, on remarque d'abord que chez le Gracilaire, cette exigence vis-à-vis du phosphore organique, est inexistante aux faibles concentrations (0,1 mg/l), tandis qu'elle se manifeste aux plus fortes concentrations (1-10 mg/l) où la croissance est plus élevée dans le milieu glycérophosphate que dans le milieu phosphate.

Les travaux réalisés par IWASAKI (1967) sur la phase Conchocelis de *Porphyra tenera*, traduisent aussi la dépendance de ce thalle vis-à-vis du phosphore. Dans ces expériences, l'auteur teste respectivement l'influence du phosphate monopotassique ( $H_2PO_4$ ) et du glycérophosphate. Les résultats obtenus avec le phosphate monopotassique traduisent l'existence d'un optimum de croissance, pour une concentration en phosphore égale à 10 mg/l. A la concentration de 100 mg/l, la croissance est par contre fortement inhibée. En présence du glycérophosphate, l'optimum de croissance s'étend dans une gamme de concentrations comprise entre 1 et 100 mg/l de phosphore. Ces expériences prouvent que la tolérance des thalles vis-à-vis du phosphore organique, est plus grande que celle vis-à-vis du phosphore inorganique.

Ces résultats vont dans le sens de ce que nous avons observé dans notre propre travail. Chez *Gracilaria*, en effet, la tolérance au phosphore inorganique est également moins élevée (0,1 - 1 mg/l) que la tolérance au phosphore inorganique (0,1 - 50 mg/l). L'existence d'un optimum de croissance, à de faibles concentrations en phosphore, s'est également manifestée chez des algues n'appartenant pas aux Rhodophycées. CHU (1942) note que chez les Diatomées et chez les algues vertes, des concentrations en phosphore comprises entre 0,1 et 0,2 mg/l sont généralement optimales. Si nous n'avons pas cherché à préciser la tolérance de *Gracilaria* aux formes  $\alpha$ -ou  $\beta$ -du glycérophosphate, d'autres au-

teurs s'y sont employés par ailleurs et sur d'autres matériels. BERGLUND (1969) montre que la forme  $\alpha$ -du glycérophosphate conduit *Enteromorpha linza* à une meilleure croissance que la forme  $\beta$ . Chez *Gonio-trichum elegans* et chez *Nemalion helminthoides*, par contre, la forme  $\alpha$  inhibe totalement la croissance (FRIES 1973). Cet effet est également signalé chez les Phéophycées (PEDERSEN cité FRIES 1973).

En conclusion, des expériences relatives à l'influence du phosphore sur la croissance des thalles de *Gracilaria*, que nous avons menées, se dégagent les faits suivants :

- 1°) la croissance des thalles est optimale, aux faibles concentrations du milieu en phosphore (0,1 - 1 mg/l). Cette observation confirme l'aptitude écologique de *Gracilaria* à se développer au maximum, dans des eaux dont la concentration en phosphore est réduite (JONES 1959) ;
- 2°) aux concentrations en phosphore comprises entre 1 et 50 mg/l, le  $\beta$ - $\text{Na}_2$ -glycérophosphate est moins toxique que le phosphate bipotassique.

"Lorsque vous travaillez, vous êtes une flûte à travers laquelle le murmure des heures se transforme en musique.

Lequel d'entre vous voudrait être un roseau, muet et silencieux, alors que tout chante à l'unisson ?

On vous a dit que le travail est une malédiction et le labeur une infortune.

Mais je vous dis que lorsque vous travaillez vous accomplissez une part du rêve le plus lointain de la terre, qui vous fut assignée lorsque ce rêve naquit.

Et en vous gardant unis au travail, en vérité, vous aimez la vie,

Et aimer la vie à travers le travail, c'est être initié au plus intime secret de la vie".

G. KHALIL

Le Prophète, p. 26

## CHAPITRE 8

INFLUENCE DES VITAMINES, DES  
SUBSTANCES DE CROISSANCE ET DES  
OLIGOELEMENTS SUR LA CROISSANCE DE  
GRACILARIA VERRUCOSA.

## 81 - LES VITAMINES

L'importance des vitamines exogènes sur le développement des algues, a été présentée par les auteurs au fur et à mesure que la culture de ces végétaux, dans les milieux artificiels, devenait possible. Si ALLEN (1914) est le premier chercheur à supposer le rôle probable des substances oligodynamiques - analogues à la "vitamine" (B1) de FUNK (cité par DEBRE et DESBUQUOIS, 1964) - dans le développement des algues en culture, l'auxotrophie au sens strict, n'est démontrée qu'en 1937 par LWOFF et DUSI. HUTNER (1948) note également que la vitamine B12 (cyanocobalamine) est un facteur de croissance chez *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. Par la suite, les travaux de PROVASOLI et PINTNER (1953), LEWIN (1954), DROOP (1954 et 1955) et SWEENEY (1951) montrent que l'auxotrophie est généralement répandue chez les Thallophytes chlorophylliens et qu'elle se manifeste le plus fréquemment vis-à-vis de la cyanocobalamine (= B12), de la thiamine (= B1) et de la biotine (= B8). Ces travaux conduisent les chercheurs à formuler des milieux dont la composition en vitamines devient de plus en plus complexe.

Dans ce travail préliminaire de culture de *Gracilaria*, nous nous proposons d'étudier exclusivement l'influence de la vitamine B12 et de la vitamine C. Ce choix est justifié par le fait que ces substances sont présentes en quantités non négligeables dans l'eau de mer. Leur synthèse est réalisée par les bactéries, le phytoplancton et les algues macroscopiques (ERICSON et LEWIS 1953) qui les excrètent dans le milieu ambiant. Cette excrétion confère aux eaux côtières (zone à *Fucus* et à *Ascophyllum*) des propriétés biogènes que KYLIN (1941) a mises en évidence chez des cultures de zygotes d'*Enteromorpha* et d'*Ulva*.

## 811 - MATERIEL ET METHODES

Le milieu de base destiné à recevoir des concentrations croissantes en vitamines (B12 et C) est le milieu ASP<sub>6</sub>F. L'expérience relative à la vitamine B12 conduit à utiliser les milieux témoins suivants : l'eau de mer, le milieu ASP<sub>6</sub>F sans vitamines, le milieu ASP<sub>6</sub>F sans vitamines B12 (mais contenant toutes les autres vitamines à la solution formulée par FRIES (cit.)). Dans l'expérience relative à la vitamine C, les milieux témoins sont : l'eau de mer, le milieu ASP<sub>6</sub>F sans vitamines

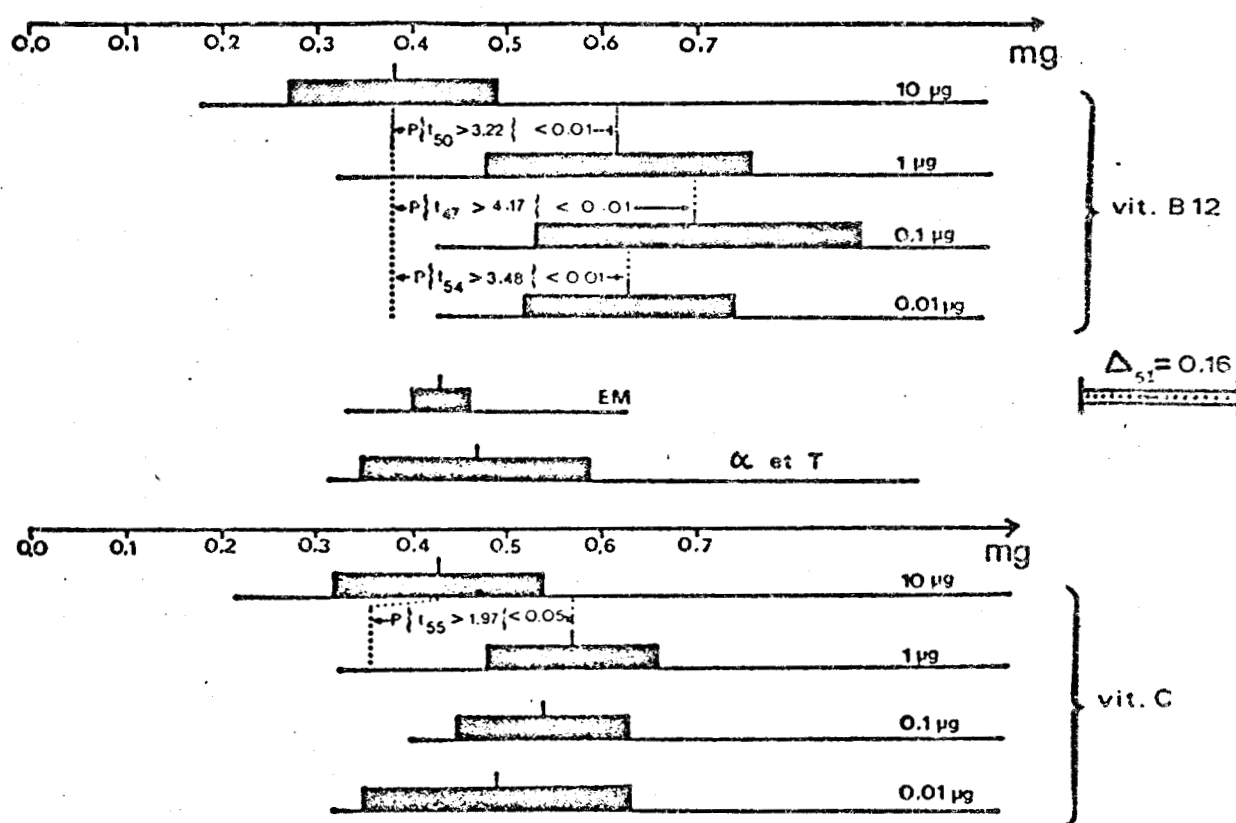


FIG. 22 : INFLUENCE DES VITAMINES SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucoosa* : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS

LÉGENDE : P : TAUX DE PROBABILITÉ

$t_{DDL}$  : VARIABLE DE STUDENT LUE DANS LA TABLE POUR UN NOMBRE DE DEGRÉS DE LIBERTÉ (DDL) ÉGAL À  $n_1 + n_2 - 2$

$\square$  : MILIEU CONTENANT TOUTES LES VITAMINES AU MILIEU ASP<sub>6</sub>F EXCEPTÉ LA VITAMINE B12

T : TÉMOIN SANS VITAMINES

EM : EAU DE MER

C, Les gammes de concentrations en vitamines B12 et C testées sont : 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 µg/l. Les conditions expérimentales relatives aux récipients, au pH, à la température et à la lumière sont celles que nous avons définies dans le chapitre 7.

## 812 - RESULTATS

L'hypothèse d'homogénéité (Ho) des moyennes est éprouvée par le test de Snedecor, qui conduit à une valeur de F égale à 2,57. Dans les tables statistiques on lit :

$$P \{F_{11,00} > 2,34\} < 0,01$$

Ainsi l'hypothèse d'homogénéité de la série des moyennes est rejetée au seuil de 1 %. Les moyennes sont comparées entre elles en recherchant la plus petite différence significative au seuil de 5 % ( $\Delta_{0,05}$ ). Cette valeur est représentée graphiquement sur les figures 22a et b.

Les résultats sont consignés numériquement dans le tableau 21 et graphiquement sur les figures 22 et 23. La courbe de croissance relative à la vitamine B12 (fig. 23) passe par un maximum à la concentration de 0,1 g/l et par un minimum au point d'abscisse (10 g/l). Les résultats du test t montrent (fig. 22a) que les concentrations 1 ; 0,1 et 0,01 µg/l conduisent au même effet. Par contre, les milieux contenant respectivement 1 ; 0,1 et 0,01 µg/l de vitamine B12 produisent chacun une croissance des thalles, qui est significativement différente de celle observée dans le milieu témoin ASP<sub>6</sub>F et dans l'eau de mer.

L'analyse du graphique, relatif à la vitamine C (fig. 23) montre que les effets observés de 0 à 1 µg/l ne sont pas significativement différents entre eux. D'autre part, pour une concentration de 10 µg/l, la croissance est équivalente à celle observée dans l'eau de mer.

## 813 - DISCUSSION

### 8131. Influence de la vitamine B12

Les résultats que nous avons exposés plus haut montrent que les concentrations optimales en cyanocobalamine du milieu se situent entre 0,01 et 1 µg/l. Le rôle de la vitamine B12, dans la croissance



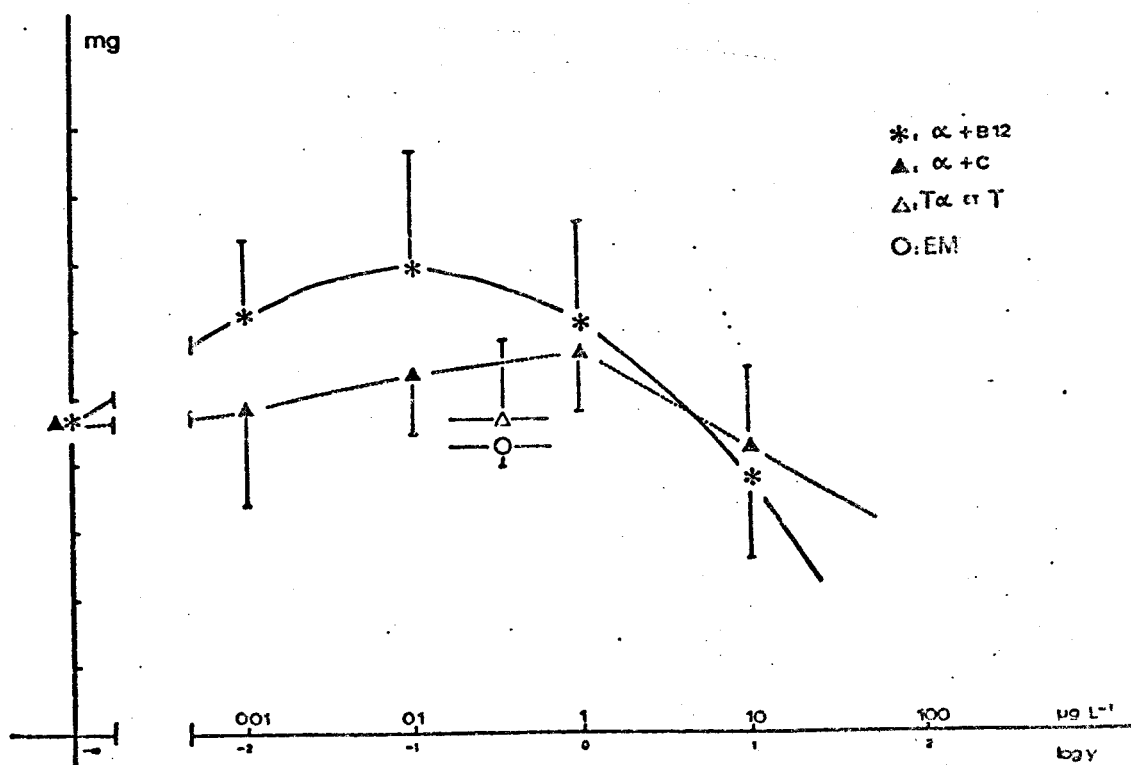


FIG. 23 : INFLUENCE DES VITAMINES SUR LA CROISSANCE DE *G. verucosa* (GRAPHIQUE CONSTRUIT EN COORDONNÉES SEMI-LOGARITHMIQUES).

LÉGENDE : Y : CONCENTRATION EN VITAMINES DU MILIEU EXPRIMÉE EN  $\mu\text{g L}^{-1}$

\* : SOLUTION VITAMINES DU MILIEU ASPGF EXCEPTÉ LA VITAMINE B12

▲ : MILIEU ASPGF SANS VITAMINES

EM : EAU DE MER

NOTA : LES TRAITES VERTICAUX REPRÉSENTENT L'ERREUR STANDARD DE LA MOYENNE.

des algues et plus particulièrement des algues rouges, a été recherché par plusieurs auteurs. TATEWAKI et PROVASOLI (1963) ont déterminé chez *Antithamnion* un optimum de concentration en vitamine B12 qui se situe entre 1 et 10 µg/l. La même observation est faite chez *Conchocelelis* par IWASAKI (1965). Si on compare ces résultats aux nôtres, on remarque que ces algues exigent des concentrations en vitamine B12 près de dix fois plus élevées, que celles qui ont été déterminées plus haut chez *Gracilaria*. Nos données sont plus en accord, par contre, avec celles qui figurent dans les travaux de FRIES (1959) sur *Goniotrichum*. Cette algue présente, en effet, une croissance maximale en présence de 1 µg/l de vitamine B12. Par ailleurs, les recherches de FRIES (1964), PROVASOLI (1964) et FRIES (1959) ont démontré l'exigence absolue en vitamine B12 de plusieurs algues rouges.

Cette exigence en vitamine B12 (ou cyanocobalamine) n'est cependant pas générale aux algues et plusieurs auteurs : DROOP (1957), TATEWAKI et PROVASOLI (1963), IWASAKI (1965), FRIES (1960, 1964), PINTNER et PROVASOLI (1958), PROVASOLI (1964) ont montré l'aptitude de certains thalles à utiliser des analogues de la vitamine B12. Cette aptitude n'a pas été recherchée chez la Gracilaire.

### 8132. Influence de la vitamine C

Les lots cultivés en présence de la vitamine C ne conduisent pas à des résultats significativement différents de celui observé chez le témoin. L'action stimulante de la vitamine C, non démontrée dans notre travail, l'a été par d'autres auteurs chez d'autres algues. ALGEUS (1946) note que des concentrations en vitamine C comprises entre 1 et 100 mg % stimulent la croissance de nombreuses Chlorophycées unicellulaires. Chez *Goniotrichum elegans*, 20 mg/l de cette vitamine exercent une activité stimulante sur la croissance et FRIES (1974) suggère que cet effet est à mettre en relation avec le pouvoir réducteur de cette substance.

Les expériences que nous avons réalisées pour rechercher l'influence des vitamines B12 et C sur la croissance du thalle de *Gracilaria*, si elles démontrent l'action stimulante de la vitamine B12 à des doses comprises entre 0,01 et 1 µg/l, infirment au contraire une

TABLEAU 21

INFLUENCE DES VITAMINES SUR LA CROISSANCE DES THALLES DE  
*G. verrucosa*

	Concentrations µg/l	ni	$m \pm \frac{ts^*}{\sqrt{n}}$
Vitamine B12	0,01	30	0,63 ± 0,11
	0,1	23	0,70 ± 0,17
	1	26	0,62 ± 0,14
	10	26	0,38 ± 0,13
Vitamine C	0,01	29	0,49 ± 0,14
	0,1	25	0,54 ± 0,09
	1	27	0,57 ± 0,09
	10	30	0,43 ± 0,11
Témoin α sans B12		26	0,47 ± 0,12
Témoin sans vitamines		24	0,47 ± 0,12
Eau de mer		26	0,43 ± 0,03

\*:  $\frac{ts}{\sqrt{n}}$  = erreur standard de la moyenne

$\sqrt{n}$

t : variable de Student

s : écart-type observé

$n_i$  : nombre d'individus par lot



telle action de la vitamine C.

L'auxotrophie de la Gracilaire, vis-à-vis de la vitamine B12, n'est pas confirmée ici, cependant, seule une culture axénique réalisée sur des fragments carencés en cette vitamine permettra de trancher.

## 82 - SUBSTANCES DE CROISSANCE

La présence de phytohormones chez les algues est relatée dans une littérature abondante. Les premiers travaux relatifs à la mise en évidence de phytohormones endogènes chez les Phycophytes remontent aux années quarante de ce siècle. Ainsi, VAN OVERBUCK (1940), en utilisant le test avoine démontre l'existence d'une auxine (AIA) chez une Phéophycée. Les travaux qui suivirent (WILLIAMS 1949, BENTLEY 1958, AUGIER 1965, MOSS 1965, SCHIEWER 1967, CONRAD et SALTMAN 1962, DAWES 1971, PROVASOLI 1964, ...), mirent en évidence une activité auxinique dans tous les grands groupes d'algues. Des travaux analogues sont effectués pour rechercher la présence de kinétines endogènes (BENTLEY et al. 1968, HUSSAIN et al. 1969, AUGIER 1974). De même, les recherches conduites sur les gibbéréllines permirent d'affirmer l'existence de telles substances dans le thalle de nombreux Thallophytes chlorophylliens (RADLEY 1961, MOWAT 1965, JENNINGS 1967-1968, AUGIER 1972 cité AUGIER 1974).

Dans le cadre de la discussion, nous aurons l'occasion de détailler amplement l'aboutissement de ces recherches. D'ores et déjà, on peut affirmer que les exemples abondent en faveur de l'existence d'une activité régulatrice des phytohormones d'origine exogène sur la croissance et sur le développement des Phycophytes.

### 821 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous nous sommes proposés de tester l'influence d'une auxine (AIA), d'une cytokinine (kinétine) et d'une gibbérélline (GA3) sur le développement et sur la croissance des thalles de *Gracilaria*.

Le milieu de base destiné à recevoir les solutions hormonales est

TABLEAU 22

## INFLUENCE DES HORMONES DE CROISSANCE

Hormones et témoins	Concentrations 5,7 x [...] M.L <sup>-1</sup>	n <sub>i</sub>	m ± $\frac{ts}{\sqrt{n}}$ **
Acide indoylacétique (AIA)	[10 <sup>-8</sup> ]	24	0,76 ± 0,15
	[10 <sup>-7</sup> ]	29	0,43 ± 0,10
	[10 <sup>-6</sup> ]	19	0,56 ± 0,13
	[10 <sup>-5</sup> ]	21	0,75 ± 0,16
Gibberelline GA <sub>3</sub>	[10 <sup>-8</sup> ]	19	0,60 ± 0,12
	[10 <sup>-7</sup> ]	23	0,74 ± 0,12
	[10 <sup>-6</sup> ]	24	0,65 ± 0,12
	[10 <sup>-5</sup> ]	24	0,56 ± 0,14
Kinétine	[10 <sup>-8</sup> ]	24	0,76 ± 0,13
	[10 <sup>-7</sup> ]	21	0,61 ± 0,15
	[10 <sup>-6</sup> ]	27	0,65 ± 0,14
	[10 <sup>-5</sup> ]	24	0,17 ± 0,07
EM		26	0,43 ± 0,15
ASP <sub>6</sub> F		27	0,52 ± 0,14

\*\* :  $\frac{ts}{\sqrt{n}}$  = erreur standard de la moyenne

t : variable de Student

s : écart-type observé

n<sub>i</sub> : nombre d'individus par lot



le milieu ASP<sub>6</sub>F. Pour chaque hormone, on réalise une solution-mère (100 ml) contenant  $5,7 \cdot 10^{-4}$  M/l de substance dans de l'eau distillée. L'auxine (AIA) est solubilisée dans 3 ml d'alcool éthylique (90°) que l'on complète à 100 ml avec de l'eau distillée. La kinétine est solubilisée à chaud dans l'eau distillée. La gibbérelline (GA<sub>3</sub>) est solubilisée à froid dans l'eau distillée.

A partir de ces trois solutions, on réalise une gamme de milieux dont les concentrations molaires et pondérales sont exprimées ci-dessous :

M/l \ mg/l	AIA	GA <sub>3</sub>	Kinétine
$5,7 \cdot 10^{-8}$	0,01	0,02	0,01
$5,7 \cdot 10^{-7}$	0,1	0,20	0,12
$5,7 \cdot 10^{-6}$	1	1,99	1,23
$5,7 \cdot 10^{-5}$	10	19,86	12,27

On utilise des fioles de Fourneau (capacité 100 ml) à raison de 25 ml de milieu par fiole. Les algues sont éclairées par de la lumière fluorescente blanche (Sylvania, Grolux), dont la puissance est de  $5 \text{ W.m}^{-2}$  au niveau des paillasse. Après 20 jours de culture les lots constitués de 30 segments sont placés dans de nouvelles fioles contenant le même milieu. Les segments qui sont trop envahis par des algues épiphytes sont éliminés. L'expérience est arrêtée après 40 jours de culture et les segments sont pesés.

## 822 - RESULTATS

Les résultats sont consignés respectivement dans le tableau 22 et sur les figures 24 et 25. L'analyse statistique des données montre que les moyennes sont significativement différentes au seuil de 1 % ( $F = 10,15$  et  $P \{F_{15,00} > 2,51\} < 0,01$ ). On calcule alors la plus petite différence significative entre deux moyennes, au seuil de 5 % ( $\Delta_{0,05}$ ). Cette valeur est figurée graphiquement sur la figure 25.

Chez les segments cultivés en présence de l'auxine, la croissance est maximale à la fois aux concentrations les plus faibles ( $5,7 \cdot 10^{-8}$ )

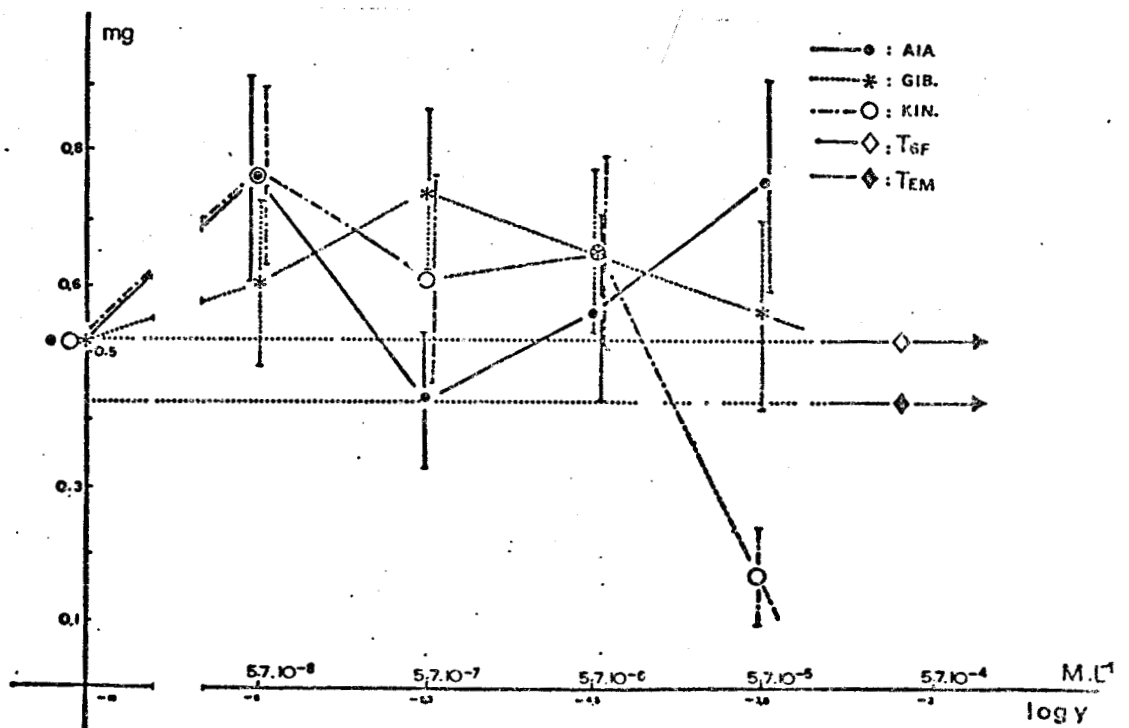


FIG. 24 : INFLUENCE DES HORMONES SUR LA CROISSANCE DE *G. verucosa* (GRAPHIQUE CONSTRUIT EN COORDONNÉES SEMI-LOGARITHMIQUES)

LÉGENDE : Y : NOMBRE DE MOLES D'HORMONES PAR LITRE (M.L<sup>-1</sup>)

AIA : ACIDE INDOYACÉTIQUE

GIB : GIBBÉRELLINE GA<sub>3</sub>

KIN : KINÉTINE

TGF : TÉMOIN ASP<sub>6</sub>F

TEM : TÉMOIN EAU DE MER

NOTA : LES TRAITES VERTICAUX DE PART ET D'AUTRE DE CHAQUE POINT EXPÉRIMENTAL REPRÉSENTENT L'ERREUR-STANDARD DE LA MOYENNE.

et les plus élevées ( $5,7 \cdot 10^{-5}$ ) ; tandis qu'elle est minimale à  $5,7 \cdot 10^{-5}$  M/l.

Chez ceux, cultivés en présence de la gibbérelline, la croissance est maximale à la concentration  $5,7 \cdot 10^{-7}$ .

Enfin, chez les segments cultivés en présence de la kinétine, celle-ci exerce une action stimulante à la concentration de  $5,7 \cdot 10^{-8}$  M/l. Par contre, on note l'effet franchement inhibiteur sur la croissance, du milieu contenant  $5,7 \cdot 10^{-5}$  M/l.

### 8221. Influence de l'auxine (AIA)

Les expériences que nous avons réalisées conduisent à des résultats aberrants que nous ne nous hasarderons pas à interpréter. Le rôle des auxines et plus particulièrement de l'AIA est pourtant prouvé dès 1937 par YIN chez *Chlorella vulgaris*. L'action stimulante de l'AIA sur la division cellulaire apparaît également chez *Euglena gracilis* (1938-1939). Des concentrations de  $10^{-10}$  et  $10^{-11}$  g/ml en AIA stimulent l'allongement et la division d'*Euglena gracilis* (BENTLEY 1958). Les travaux de THIMANN et BETH 1959, KYLIN 1942, AUGIER 1974, abondent dans le même sens. L'effet stimulant de ces substances sur la croissance et le développement des Rhodophycées a également été démontré.

Ainsi, 0,02 mg/l d'AIA stimulent la croissance de *Conchocelelis* (IWASAKI 1965). Des concentrations en AIA comprises entre 0,1 et 5 mg/l produisent le même effet chez *Pterocladia capillacea* (FELLICINI et ARRIGONI 1967, NASR et BEKHEET 1969). Chez d'autres algues, cet effet est fonction de la concentration, mais aussi de la région du thalle sur laquelle elle est appliquée.

### 8222. Influence de la gibbérelline (GA<sub>3</sub>)

L'expérience que nous avons menée pour tester l'influence de cette gibbérelline sur la croissance, montre un effet optimum entre  $5,7 \cdot 10^{-7}$  et  $5,7 \cdot 10^{-6}$  M/l (soit entre 0,2 et 1,92 mg/l). Ces données sont en accord avec les expériences qu'a réalisées JENNINGS (1971) sur *Gracilaria verrucosa*. Testant l'influence de deux gibbérellines (GA<sub>3</sub> et GA<sub>7</sub>) sur la croissance de cette algue, l'auteur montre que GA<sub>3</sub> exerce



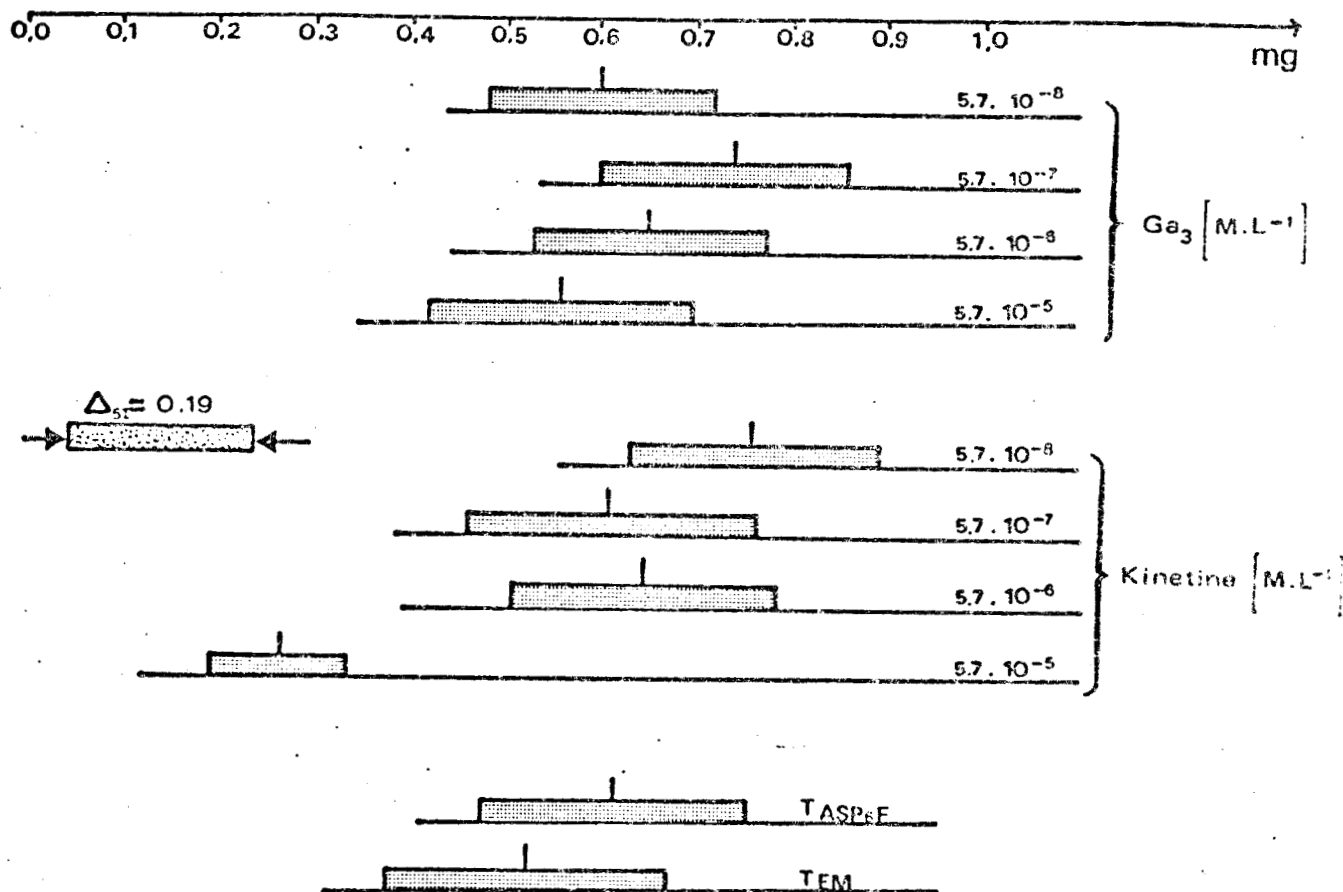


FIG. 25 : INFLUENCE DES HORMONES (GIBBÉRELLINE [GA<sub>3</sub>] ET KINÉTINE) SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa* : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS

LÉGENDE : GA<sub>3</sub> : GIBBÉRELLINE [GA<sub>3</sub>]

TASP<sub>6F</sub> : TÉMOIN ASP<sub>6F</sub>

TEM : TÉMOIN EAU DE MER

$\Delta_{5\%}$  : PLUS PETITE DIFFÉRENCE SIGNIFICATIVE ENTRE DEUX MOYENNES, AU SEUIL DE PROBABILITÉ  $p = 0.05$ .

un effet stimulant entre 0,02 et 0,5 mg/l, tandis que GA<sub>7</sub> manifeste la même action entre 0,05 et 10 mg/l. Des concentrations comprises entre 0,4 et 1 mg/l en GA<sub>3</sub> accélèrent également la croissance de *Porphyra tenera* (IWASAKI 1965). Par contre, des doses plus faibles (0,001 et 0,1 mg/l) en GA<sub>3</sub> produisent le même effet stimulant chez *Porphyra leucosticta* (AUGIER 1972, ib.) et chez *Petroglossum nicaeense* (AUGIER 1972, ib.). L'effet stimulant des gibbérellines, tel qu'il vient d'être décrit chez les Rhodophycées, se manifeste également dans d'autres groupes d'algues, notamment chez les algues vertes (FERNANDEZ et al. 1968, GUO et al. 1959, KIM et al. 1961, JENNINGS 1968, AUGIER 1972, ib.).

### §223. Influence de la kinétine

L'analyse des résultats que nous avons effectuée plus haut montre un effet stimulant à la concentration de  $5,7 \cdot 10^{-8}$  M/l (0,02 mg/l), tandis que la dose de  $5,7 \cdot 10^{-5}$  M/l est franchement toxique. Cet effet des faibles concentrations en kinétine, sur la croissance et sur la morphogénèse, a été montré chez d'autres algues rouges, notamment chez *Porphyra tenera* (IWASAKI 1965) où la croissance est accrue en présence de 0,1 à 0,2 mg/l de kinétine et chez *Petroglossum nicaeense* où le même effet s'observe en présence de 0,08 mg/l.

Le rôle de la kinétine sur la croissance et sur la division cellulaire a également été montré chez les algues n'appartenant pas aux Rhodophycées, à des concentrations comprises entre 1 et 20 ppm (KIM 1961).

Le même effet est observé chez *Acetabularia* à la concentration de  $10^{-7}$  M/l par SPENCER (1968).

On peut également citer les travaux de PROVASOLI (1957, 1958b) sur *Ulva lactuca*, dont la croissance est stimulée par 10 à 100 mg/l de kinétine ; ceux d'AUGIER (ib.), dont l'intérêt est de montrer qu'une même concentration de kinétine appliquée sur les algues dans le milieu naturel, peut avoir un effet différent de celui observé chez des échantillons cultivés et traités au laboratoire. Enfin, l'action de la kinétine s'est révélée positive chez *Pylaiella* et *Ectocarpus* (PEDERSEN 1968).

### 8224. Comparaison des effets observés respectivement avec la gibbérelline (GA<sub>3</sub>) et la kinétine

Les résultats relatifs à l'auxine étant aberrants, nous les écarterons de la comparaison des effets observés avec chacune des hormones. L'analyse des figures 24 et 25 montre qu'il faut dix fois moins de kinétine que de gibbérelline, pour atteindre ce même niveau de croissance.

En conclusion, les expériences que nous avons menées, relativement à l'influence d'une auxine (AIA), d'une gibbérelline (GA<sub>3</sub>) et d'une cytokinine (kinétine), sur la croissance de la Gracilaire, permettent d'affirmer qu'à l'exclusion de l'AIA, la gibbérelline et la cytokinine, lorsqu'elles sont utilisées aux concentrations respectives de  $5,7 \cdot 10^{-7}$  M/l et  $5,7 \cdot 10^{-8}$  M/l, stimulent la croissance des thalles.

## 83 - OLIGOÉLÉMENTS (RÔLE DU FER)

Les nombreuses analyses chimiques de l'eau de mer qui ont été réalisées, montrent que les eaux marines contiennent la plus grande majorité des corps chimiques énoncés dans le tableau de Mendeleïev.

La mise au point des milieux marins synthétiques a permis de mesurer l'importance que jouent, dans les processus biologiques, les éléments chimiques présents dans l'eau de mer à l'état de trace (entre 1 mg/kg et  $10^{-10}$  mg/kg, IVANOFF 1972). S'il est admis, à ce jour, que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le cobalt sont des éléments indispensables pour le développement de toute algue cultivée *in vitro*, par contre, le cobalt, le bore, le silicium, le vanadium et l'iode ne sont nécessaires qu'à quelques unes d'entre elles (O'KELLEY 1974). L'objet du présent travail n'est pas de rechercher le rôle de chaque oligoélément rentrant dans la constitution du milieu ASP<sub>6</sub>F (modifié BODARD 1973, tab. 23), il est simplement d'étudier le rôle du fer, dont on sait qu'il intervient dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction liées à la photosynthèse et à la respiration, dans la croissance des thalles de la Gracilaire.

TABLEAU 23  
COMPOSITION SOLUTION OLIGOÉLÉMENTS

mg/l	(ASP <sub>6</sub> F modifié BODARD 1973)	
NTA	50	
+ Fe	1	
+ Mn	0,005	
+ Cu	0,01	
+ B	1	
+ Mo	0,25	
→ Co		0,001
+ Zn	0,25	
→ AL		0,003
→ Li		0,001
→ Sr		0,002
(Br	65)	
(I	0,05)	
→ V		0,001

Légende : → = éléments introduits par BODARD



## 831 - MATERIEL ET METHODES

L'expérience est réalisée dans des fioles de Fourneau contenant chacune 25 ml de solution minérale. Le milieu ASP<sub>6</sub>F dépourvu de fer, constitue le milieu de base. On teste les concentrations en fer (mg/l) suivantes : 0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 50 et 100. Chaque dose est testée sur une quarantaine de segments. Les cultures sont réalisées à 25°C, en lumière blanche (5 W.m<sup>-2</sup>) produite par des tubes fluorescents (Sylvania, type Grolux).

## 832 - RESULTATS

L'analyse statistique des résultats montre que l'hypothèse d'homogénéité (H<sub>0</sub>) des moyennes ne peut être rejetée au seuil de 5 %. En effet, le calcul montre que :  $F = 2,30$  et que :

$$P \{F_{2,120} > 2,30\} > 0,05$$

L'application du test de t confirme ce résultat, sauf lorsque l'on compare les moyennes de poids observées respectivement dans le milieu dépourvu de fer et le milieu contenant 10 mg/l de ce métal ( $P \{t_{80} > 2,00\} = 0,05$ ).

Les résultats sont consignés sur la figure 26 et dans le tableau 24. Leur analyse montre que l'optimum de croissance est atteint en présence de 10 mg/l de fer. Si les résultats observés aux concentrations 0 ; 0,1 et 1 mg/l, ne sont pas significativement différentes -ce que le test du F laissait prévoir- on note toutefois qu'une telle différence existe ( $P = 0,05$ ) entre les croissances observées respectivement aux concentrations en fer égales à 10 et 0 mg/l. Les concentrations supérieures à 10 mg/l se révèlent franchement toxiques. Cette toxicité se manifeste par l'absence d'une activité régénératrice et par une dépigmentation prononcée des thalles.

## 833 - DISCUSSION

Les expériences que nous avons réalisées pour tester l'influence du fer sur la croissance des thalles segmentés de la Gracilaire, si elles permettent d'affirmer que 10 mg/l de ce métal constituent une concentration optimale, elles ne font pas apparaître en revanche le

TABLEAU 24

INFLUENCE DU FER SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*

élément fer mg/l	Cl <sub>3</sub> Fe mg/l	NTA mg/l	nombre de segments par lot	moyenne et erreur-standard
0	0	0	30	0,14 ± 0,02
0,1	0,483	0,50	26	0,17 ± 0,07
1	4,83	50	28	0,17 ± 0,09
10	48,3	500	27	0,22 ± 0,08
50	241,5	2500	29	0
100	483	5000	30	0



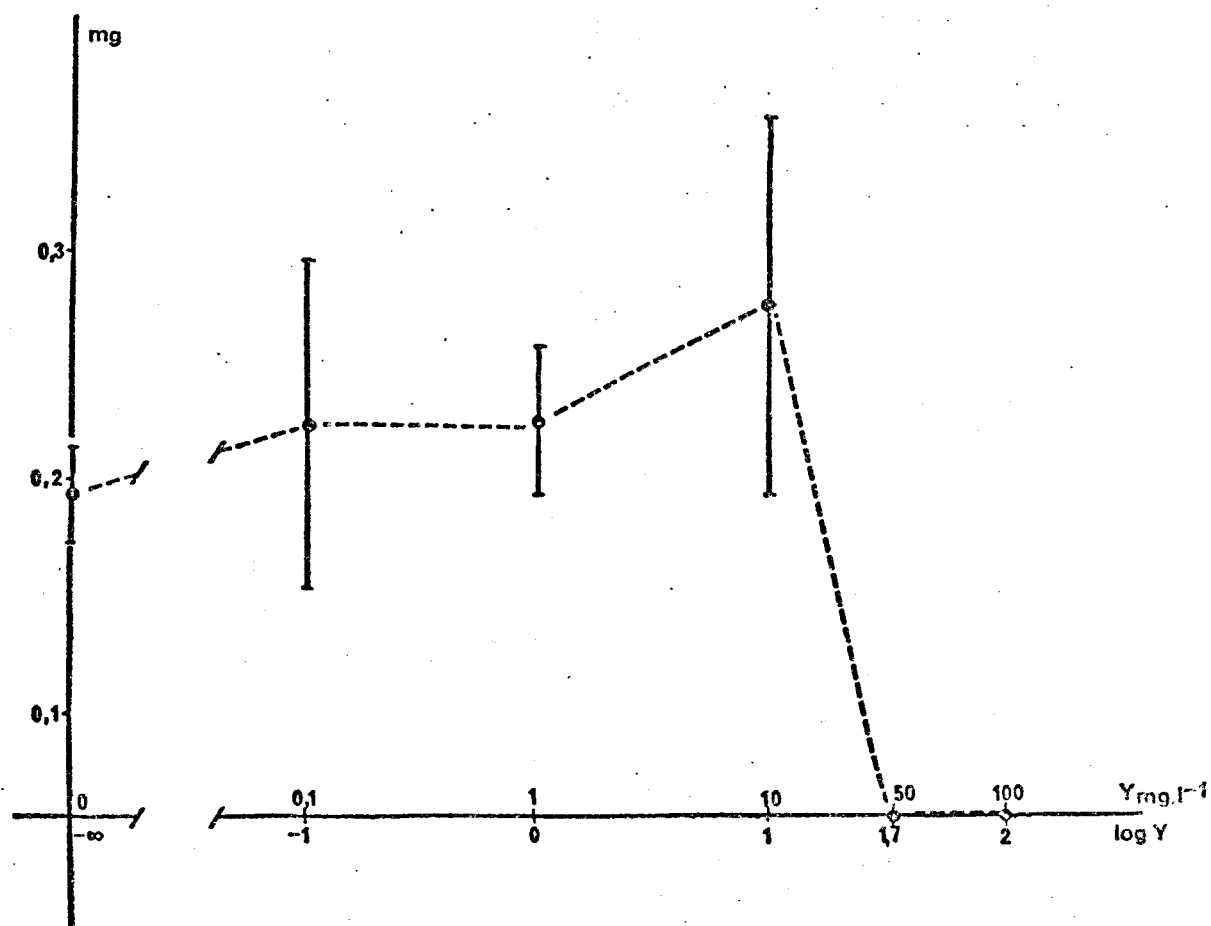


FIG. 26 : INFLUENCE DU FER SUR LA CROISSANCE DE *G. verrucosa*.  
 EN ORDONNÉE (ÉCHELLE MÉTRIQUE) : LA CROISSANCE EST EXPRIMÉE EN MG DE POIDS SEC  
 EN ABCISSE (ÉCHELLE LOGARITHMIQUE) : Y = CONCENTRATION DU MILIEU (MG/L) EN FER

caractère d'absolue nécessité de cet élément chez les thalles cultivés *in vitro*. Les milieux dosés à plus de 10 mg/l. exercent un effet toxique que l'on ne peut pas rapporter avec certitude à ce métal. Bien que les expériences de FRIES (1963), relatives à l'influence de divers chélateurs sur la croissance du *Nemalion* sp., montrent que le NTA, à la dose de 100 mg/l, conduit à une croissance supérieure à celle observée en présence de verséno1, on ne peut exclure l'existence d'un effet délétère du NTA lorsqu'il est utilisé à plus de 100 mg/l.

Les travaux d'IWASAKI (1967), relatifs à l'influence des oligoéléments sur la croissance du *Conchocelis* (phase *Conchocelis* du *Porphyra*), révèlent chez cette bangiale l'existence d'une croissance maximale à des concentrations en fer du milieu voisin de 0,5 mg %. De tels résultats furent également obtenus par LEVRING (1946) chez *Ulva* sp. Dans son milieu ASP<sub>6</sub>F, qui contient 1 mg/l de fer, FRIES (1963) cultive plus d'une dizaine de Rhodophycées.

Chez la Gracilaire, par contre, l'optimum de croissance est décalé vers des concentrations en fer dix fois plus élevées. Il est intéressant de noter que cette tolérance de la Gracilaire, vis-à-vis du fer, conduit cette algue à supporter des concentrations vingt fois supérieures à celles des eaux côtières de la Côte Nord-Ouest de la Manche (0,02 - 0,5 mg/l).

En conclusion, des expériences que nous avons menées pour rechercher l'influence du fer sur la croissance de la Gracilaire, se dégage l'existence d'une tolérance à des concentrations en cet élément du milieu comprises entre 0,0 et 10 mg/l. Le caractère de nécessité absolue en cet élément n'a pu être mis en évidence ici. Seules des expériences conduites sur des segments de thalle carencés en fer soumis à plusieurs repiquages seront en mesure d'apporter une réponse claire à ce problème.



*"On vous a dit aussi que la vie est obscurité,  
et dans votre fatigue vous répétez ce que  
disent les las.*

*Et je vous dis que la vie est réellement ob-  
scurité sauf là où il y a élan,*

*Et tout élan est aveugle sauf là où il y a  
savoir,*

*Et tout savoir est vain sauf là où il y a  
travail,*

*Et tout travail est vide sauf là où il y a  
amour".*

G. KHALIL

Le Prophète, p.27

CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce travail consacré à l'étude de l'influence de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance des segments de thalle de Gracilaire cultivé *in vitro*, on est tout naturellement conduit à porter à la fois un regard en arrière et un regard en avant.

Un regard en arrière, qui nous amène à reconnaître, dans le travail réalisé, un certain nombre d'acquisitions dont il importe de souligner l'intérêt, mais aussi de peser la valeur eu égard aux difficultés rencontrées.

Un regard en avant qui doit nous conduire, à partir des jalons posés, à définir un nouveau champ d'exploration en vue d'atteindre les perspectives que nous nous étions fixées en abordant le présent travail.

1°) L'étude du comportement de Gracilaria cultivé *in vitro*, permet de dégager un certain nombre de lignes de forces. C'est tout d'abord une grande capacité d'adaptation de ce végétal à des variations importantes des paramètres écophysologiques (température, salinité, pH, lumière). C'est aussi l'aptitude de ce thallophyte à se développer de façon optimale en présence des plus faibles concentrations en azote et phosphore (0,5 à 1 mg/l), tandis que le carbone minéral joue un rôle non négligeable à des concentrations cependant inusitées dans les milieux marins synthétiques habituels.

De plus, on peut noter que la température et la lumière sont les facteurs essentiels au développement des thalles et que la vitamine B12, la gibbérelline et la kinétine sont en mesure de stimuler leur croissance.

Enfin, si on confronte nos résultats avec les données de la littérature, il est à constater que la Gracilaire des Côtes de la Manche manifeste les mêmes exigences que les Gracilaires des Côtes américaines et canadiennes.

2°) Les résultats que nous avons présentés plus haut sont le fruit d'une méthode expérimentale, dont la mise en oeuvre suggère quelques remarques relatives d'une part au matériel biologique, d'autre part

aux techniques employées.

L'emploi de segments prélevés indifféremment sur des gamétophytes mâles ou femelles et sur des tétrasporophytes, à différentes périodes de l'année, ne peut apporter qu'une réponse globale sur les potentialités morphogénétiques et sur les modalités de croissance de *Gracilaria verrucosa*, tandis que restent inconnues les relations qui sont susceptibles d'exister entre ces potentialités et la position occupée par un individu dans le cycle biologique de l'algue.

Les résultats exprimés au cours de ce travail ont été acquis à la suite du seul ensemencement primaire ; ce n'est pas suffisant pour préciser le caractère de nécessité absolue d'un élément. Seuls les repiquages successifs des portions néoformées du thalle peuvent conduire à de telles conclusions.

On peut s'étonner, d'autre part, que les techniques de stérilisation aient été mises en oeuvre, avant même que les thalles de la Gracilaire n'eussent été isolés en culture unialgale. L'expérience, cependant, nous a montré qu'il était quasi impossible de réaliser de telles cultures sans les avoir, au préalable, soumises à l'antibiothérapie dont un des effets est précisément de réduire considérablement le développement de la flore algale associée.

3°) Les jalons, qui ont été posés au cours de ce travail, conduisent à définir un certain nombre de projets de recherche, centrés d'une part, sur le thème "Culture et développement" et d'autre part, sur le thème "Morphogenèse".

L'exploration de la première voie de recherche aura pour objectif :

- de définir un milieu optimum, chez des échantillons isolés axé-  
niquement, après un certain nombre d'ensemencements successifs,  
des portions régénérées du thalle ;
- de préciser l'influence de la composition spectrale de la lumière,  
grâce à des moyens appropriés (cellule de culture, filtres..).  
Cette étude sera conduite en relation avec des mesures photomé-

triques prises dans les eaux côtières de la Manche, à l'aide d'une station autonome de mesure du rayonnement solaire, mise au point dans le cadre d'un projet de fin d'études d'Ingénieurs électriciens, de l'Institut Supérieur d'Electronique du Nord (I.S.E.N.) ;

- de rechercher les corrélations qui sont susceptibles d'exister, entre la position occupée par un individu dans le cycle biologique de la Gracilaire et son aptitude prolifératrice. D'ores et déjà, on peut affirmer que cette recherche n'est pas sans intérêt, du point de vue de certaines applications en aquaculture marine, dans le mesure où elle permettrait de montrer qu'un individu gamétophytique serait plus prolifique qu'un individu tétrasporophytique, ou vice versa.

Quant au thème "Morphogenèse", il se situe au centre de nos activités. Certains travaux ont déjà montré l'existence, chez les thalles de Gracilaria, de phénomènes de polarité, de dominance apicale, de corrélations du type apex-marge. La poursuite de tels travaux, dans des conditions expérimentales mieux maîtrisées, laisse envisager une meilleure connaissance des mécanismes morphogénétiques présidant à la mise en place du thalle de Gracilaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- AGARDH J.G., 1852. - Species, genera et ordines algarum. II (2) : 702.
- ALGEUS S., 1946. - Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie der Chlorophyceen. *Bot. Notiser*, Lund, p. 129-280.
- ALLEN E.J., 1914. - On the culture of the plankton diatom *Thalassiosira gravida* Cleve in artificial sea-water. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 10 : 417-439.
- ALLEN M.B. et E.X. DAWSON, 1960. - Production of Antibacterial substances by benthic Tropical marine algae. *Journal bact.* 79 : 459-460.
- ALLEN E.J. et E.W. NELSON, 1910. - On the artificial culture of marine plankton organisms. *J. mar. Biol. Assoc. U.K.* 8 : 421-474.
- ANDERSON M., 1942. - Einige ernährungsphysiologische Versuche mit *Ulva* und *Enteromorpha*. *Fysiogr. Sällsk. Förhandl.* 12 : 42-52
- AUBERT M., D. PESANDO et J.M. PINCEMIN, 1970. - Mise en évidence d'un inhibiteur de synthèse métabolique d'une diatomée produit par un péridinien (étude "in vitro"). *Rev. Intern. Océanogr. méd.* 17 : 5-21.
- AUBERT M., 1971. - Télémédiateurs chimiques et Equilibre biologique océanique. *Ibid.* 21 : 5-15.
- AUGIER H., 1965. - Contribution à l'étude des facteurs de croissance des algues rouges. *Bull. Inst. Océanogr., Monaco*, 65 (1341) : 1-18.
- AUGIER H., 1974. - Les phytohormones des Algues. II - Etude physiologique. *Ann. Sci. Naturelles, Bot.*, 12 (15) : 119-180.
- BARKER H.A., 1935. - The culture and physiology of the marine Dinoflagellates. *Arch. Mikrobiol.* 6 : 157-181.
- BATTERTON J.C. et C. VAN BAALLEN, 1968. - Phosphorus deficiency and phosphate uptake in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Can. J. Microbiol.* 14 : 341-348.
- BAUDRIMONT R., 1961. - Influence de divers milieux de culture sur le développement de quelques Ulvacées. *Le Botaniste* 44 : 77-192.

- BELLY R.T., M.R. TANSEY et T.D. BROCK, 1973. - Algal excretion of  $^{14}\text{C}$  Labeled compounds and Microbial interaction in *Cyanidium caldarium*. *J. Phycol.* 9 : 123-127.
- BENTLEY J.A., 1958. - Role of plant hormone in algal metabolism and ecology. *Nature, Lond.*, 181 : 1499-1502.
- BENTLEY J.A., 1959. - Plant hormones in marine phytoplankton, zooplankton and sea-water. *Inst. Océanogr. Congr. Pret.*, p. 910-912.
- BENTLEY-MOWAT J.A. et S.M. REID, 1968. - Investigation of the radish leaf bioassay for kinetins and demonstration of kinetin-like substances in algae. *Ann. Bot.* 32 : 23-32.
- BERGLUND H., 1969. - On the cultivation of multicellular marine green algae in axenic culture. *Svensk. Botanisk Tidskrift.* 63 : 251-263.
- BERGLAND A.R. et S.Y. MAESTRINI, 1969. - Action de quelques antibiotiques sur le développement de cinq diatomées en culture. *J. Exp. mar. Biol. Ecol.* 3 : 62-75.
- BIEBL R., 1958. - Temperatur- und osmotische Resistenz von Meerésalgen der bretonischen Küste. *Protoplasma* 50 : 217-242.
- BIEBL R., 1962. - Temperaturresistenz tropischen Meerésalgen (Verglichen mit jener von Algen in temperierten Meeresgebieten). *Bot. Mar., Allem.*, 4 : 341-254.
- BIRD N., D. GRUND et J. McLACHLAN, 1977. - Studies on *Gracilaria*. - 5. In vitro life history of *Gracilaria* sp. from the Maritime Provinces. *Can. J. Bot.* 55 (10) : 1282-1290.
- BLINKS L.R., 1963. - The effect of pH upon the photosynthesis of littoral marine algae. *Protoplasma* 57 : 126-136.
- BLUM J.J., 1966. - Phosphate uptake by phosphate starved *Euglena*. *J. gén. Physiol.* 49 : 1125-1127.
- BOALCH G.T., 1961a. - Studies on *Ectocarpus* in culture : I - Introduction and methods of obtaining unialgal and bacteria free cultures. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 41 : 279-286.
- BOALCH G.T., 1961b. - Studies on *Ectocarpus* in culture : II - Growth and Nutrition of bacteria free culture. *Ibid.* 41 : 289-304.



- BODARD M., 1973. - Réflexions sur les cultures d'Algues rouges à partir de boutures. *Bull. Soc. Phycol. Fr.* 18 : 20-30.
- BRAARUD T., 1951. - Salinity as an ecological factor in marine phytoplankton. *Plant. Physiol.* 4 : 28-34.
- BURKHOLDER P.R. et BURKHOLDER L.M., 1958. - Antimicrobial activity of horny corals. *Science* 127 : 1174-1175.
- BURROWS E.M., 1964. - Ecological experiments with species of *Fucus*. *Proc. 4th. Intern. Symp. Biarritz, 1961.* - Pergamon Press, 1964, 467 p. (166-170).
- CAUSEY N.B., J.P. PRYTHERCH, J. McCASKILL, H.J. HUMM et F.A. WOLF., 1946. - Influence of environmental factors upon the growth of *Gracilaria confervoides*. *Bull. Duke Univ. Mar. Ster.* 3 : 19-24.
- CHASSAGNE P., L. GEORGES-JANET et J.P. DEVAUX, 1967. - Les Antibiotiques et leurs usages thérapeutiques dans la pratique médicale quotidienne. *Lib. Malvine, Paris*, 451 p. (p.117).
- CHEMIN E., 1931. - Sur la présence de galles chez quelques Floridées. *Rev. Algol.* 5 : 315-325.
- CHODAT R. et J. GRINTZESCO, 1900. - Sur les méthodes de culture pure des Algues vertes. *Congrès Int. Bot. Paris*, p. 157.
- CHU S.P., 1942. - The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planctonic algae. *J. Ecology* 30 : 284-325.
- CHU S.P., 1946. - The utilisation of organic phosphorus by phytoplankton. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 26 : 285-295.
- CONOVER J.T. et J. McN. SIEBURTH, 1964. - Effect of *Sargassum* distribution on its epibiota and antibacterial activity. *Bot. mar.* 6 : 147-157.
- CONRAD H.M. et P. SALTMANN, 1959. - Effects of auxin and gibberellic acid on the growth of *Ulothrix*. *Nature* 184 : 556-557.
- CONRAD H.M. et P. SALTMANN, 1962. - Growth Substances. In : LEWIN R.A., 1962. - *Physiology and Biochemistry of Algae.* Acad. Press New York, 929 p. (p. 663-669).

- COSSON J., 1973. - Influence des conditions de culture sur le développement de *Laminaria digitata* (L.) Lam. (Phéophycées, Laminariales). *Bull. Soc. Phycol. Fr.* 18 : 104-113.
- DAWES C.J., 1971. - Indole-3-acétique acid in the green algal coenocyte *Caulerpa prolifera* (Chlorophycées, Siphonales). *Phycologia* 10 : 375-379.
- DAWSON E.Y., 1949. - Studies of Northeast Pacific *Gracilariaceae*. Allan Hancock. Fond. Publ. 7, p. 40.
- DEBOER J.A., 1977. - Effect of nitrogen enrichment on growth rate and phycocolloid content in *Gracilaria foliifera* and *Neogardhiella baileyi*. IXe Int. Seaweed Symp. Santa Barbara, Californie (publ. juillet 1978) - Contribution n°000.
- DEBRE R. et G. DESBUQUOIS, 1964. - La Médecine, In : *Histoire générale des Sciences* 3 (II), 1080 p. (p. 820).
- DELEERSNYDER M. et R. GLACON, 1973. - Sur la régulation osmotique et ionique de quelques Nephtyides. *Cah. Biol. mar.* 14 : 329-333.
- DE VALERA M., 1940. - Note on the difference in growth of *Enteromorpha* species in various culture media. *Kungl. Fysiogr. Sällsk. Luns. Förhanlinger* 10 (5) : 52-58.
- DITTMAR W., 1884. - On the alkalinity of ocean water : Rept Challenger expdt (1871-1876). *Chem.* 1 : 203.
- DONATI V., 1750. - *Storia naturale marina dell'Adriatico*. Venezia.
- DROOP M.R., 1954. - A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure cultures. *J. mar. biol. Assoc. U.K.* 33 : 511-514.
- DROOP M.R., 1955. - Some new supra-littoral protista. *Ibid.* 34 : 233-245.
- DROOP M.R., 1957. - Vitamin B12 in marine ecology. *Nature, Lond.*, 180 : 1041-1042.
- DROOP M.R., 1967. - A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br. phycol. Bull.* 3 : 295-297.

- DRUEHL D.L. et S.I.C. HSIAO, 1969. - Axenic cultures of Laminariales in defined media. *Phycol.* 8 : 1-47.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1977. - Influence de la teneur en nitrate du milieu sur la sexualisation du *Closterium moniliferum* (Bory) Ehrenbg. (Algue Desmidiacée). *Bull. Soc. Phycol. Fr.* 22 : 27-31.
- EDELSTEIN J., C.J. BIRD et J. McLACHLAN, 1976. - Studies on *Gracilaria*. 2 - Growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.* 54 : 2275-2290.
- EHRlich P., 1906. - Weigerst Verdienste um die histologische Wissenschaft. In : WEIGERT C., 1906. - *Gesammelte Abhandlungen, Berlin*, 1, 584 p. (p. 138-141).
- ERICSON L.E. et L. LEWIS, 1953. - On the occurrence of vitamine B12-factors in marine algae. *Ark. Kemi.* 6 : 427.
- FAMINTZIN H., 1871. - Die anorganische Salze als ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Studium der Entwicklungsgeschichte der niederen Pflanzenformen. *Bot. Zeitg.* 29 : 781.
- FELICINI G.P. et D. ARRIGONI, 1967. - Ricerche sulla regenerazione in coltura di *Pterocladia capillacea* (Gmel.) Born. et Thur. *Giorn. bot. ital.* 101 : 199-217.
- FELICINI G.P. et C. PERRONE, 1972. - Sulla formazione die galle nella rigenerazione die *Pterocladia capillacea* (Gmel.) Born. et Thur. in coltura. *Ibid.* 106 : 351-358.
- FERNANDEZ A., W. BALLONI et R. MATERASSI, 1968. - Sul comportamento di alcuni ceppi di microalghe nei confronti delle sostanze di crescita. *Agric. Ital.* 68 (6) : 281-286.
- FISH G.R., 1950. - A method of obtaining bacteria free cultures of a marine flagellate and *Enteromorpha intestinalis* using penicillin. *Madd. från Got. bot. Träd.* 18 : 82-89.
- FØYN B., 1934. - Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyce *Cladophora subriana* Kützing. *Arch. Protistenk.* 83 : 1-56.
- FRANKLIN T.J. et G.A. SNOW, 1971. - Biochemistry of Antimicrobial Action. Chapman & Hall, London.

- FRIES L., 1959. - *Goniotrichum elegans* : a marine red alga requiring vitamine B12. *Nature* 183 : 558-559.
- FRIES L., 1960. - The influence of different B12 analogues on the growth of *Goniotrichum elegans* (Chauv.). *Physiol. Plant.* 13 : 264-275.
- FRIES L., 1961. - Vitamin requirements of *Nemakion multifidum*. *Experientia* 17 : 75-76.
- FRIES L., 1963. - On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plant.* 16 : 695-708.
- FRIES L., 1964. - *Polysiphonia urceolata* in axenic culture. *Nature* 202 : 110.
- FRIES L., 1966a. - Influence of iodine and bromine on growth of some red algae in axenic culture. *Physiol. Plant.* 19 : 800-808.
- FRIES L., 1966b. - Temperature optima of some red algae in axenic culture. *Bot. Mar.* 9 : 12-14.
- FRIES L., 1967. - The sporophyte of *Nemakion multifidum* (Weber et Mohr). *J. Ag. Svensk. Botn. Tidsk.* 61 : 457-462.
- FRIES L., 1970. - The influence of microamounts of organic substances other than vitamins on the growth of some red algae in axenic culture. *Br. phycol. J.* 5 : 39-46.
- FRIES L., 1973. - Requirements for organic substances in Seaweeds. *Bot. Mar.* 16 : 19-31.
- FRIES L., 1974. - Growth stimulation of axenic red algae by simple phenolics compounds. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 15 : 1-9.
- GAUTHIER M., 1970. - Propriétés antibactériennes des microorganismes marins. *Thèse, Univ. Sciences, Nice, n°2, 116 p.*
- GEHU J.M., 1964. - L'algologie marine dans le Nord de la France. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 90e sess. extr., p. 368.
- GLACON R., 1977. - Communication personnelle.
- GOTTING K.J., 1963. - Zur Reinkultur von *Dunaliella*. *Helgoländer Wiss. Meeres.* 8 : 404-425.
- GREVILLE R.K., 1830. - *Flora Edinensis*, Edinburgh, p. 121.

- GROSS F., 1934. - Zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Noctiluca miliaris*. *Arch. Protistenk.* 83 : 178-196.
- GROSS F., 1937. - Note on the culture of some marine plankton organisms. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 21 : 756-768.
- GUILLARD R.R.L. et J.A. HELLEBUST, 1971. - Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis ponchettii*. *J. Phycol.* 7 : 330-338.
- GUPTA A.B. et G.C. SHRIVASTAVA, 1965. - On antibiotic properties of some Fresh water Algae. *Hydrobiologia* 25 : 285-288.
- HÄMMERLING J., 1934. - Über die Geschlechtsverhältnisse von *Acetabularia mediterranea* und *A. wettsteinii*. *Arch. Protistenk.* 83 : 57-97.
- HARRIES R., 1932. - An investigation by cultura methods of some of the factors influencing the development of the gametophytes and the early stages of the sporophytes of *Laminaria digitata*, *L. saccharina*, *L. Cloustonii*. *Ann. Bot.* 46 : 893-928.
- HARRIS D.O., 1971. - Growth inhibitors produced by *Platydorina caudata* Kofoid. *Pl. Physiol., Lancaster*, 45 : 210-214.
- HENKEL R., 1952. - Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Meeresalgen, insbesondere *Bangia pumila*. *Meeresforsch.* 8 : 192-211.
- HORNSEY I.S. et D. HIDE, 1974. - The production of antimicrobial compounds by British marine algae. I - Antibiotic-producing marine algae. *Br. phycol. J.* 9 (4) : 353-361.
- HUDSON G., 1762. - *Flora anglica*. London Ed., 1, p. 470-474.
- HUSSAIN A. et A.D. BONEY, 1969. - Isolation of kinetin-like substances from *Laminaria digitata*. *Nature, Lond.*, 223 : 504-505.
- HUTNER S.H., 1948. - Essentiality of constituents of sea water for growth of a marine diatom. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 10 : 136-141.
- IVANOFF A., 1972. - Introduction a l'océanographie : propriétés physiques et chimiques des eaux de mer. Vuibert, Paris, 1, 206 p. (p. 109-110).
- IVANOFF A., 1975. - Introduction à l'océanographie : propriétés physiques et chimiques des eaux de mer. *Ibid.*, 2, 340 p. (p. 214).

- IWASAKI H., 1961. - The life cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole* 121 : 173-177.
- IWASAKI H., 1965. - Nutritional studies on the edible seaweed *Porphyra tenera*. I - The influence of different B12 analogues, plant hormones, purines and pyrimidines on the growth of *Conchocelis*. *Plant and Cell Physiol.* 6 (2) : 325-336.
- IWASAKI H., 1967. - Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera*. II - Nutrition of *Conchocelis*. *J. Phycol.* 3 : 30-34.
- JENNINGS R.C. et A.J. McCOMB, 1967. - Gibberellins in the red alga *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamour. *Nature, Lond.*, 215 : 872-873.
- JENNINGS R.C., 1968. - Gibberellins as endogenous growth regulators in green and brown algae. *Planta, Berl.*, 80 (1) : 34-42.
- JENNINGS R.C., 1971. - Studies on the regulation of algal growth by gibberellin. *Austral. J. biol. sc.* 24 : 1115-1124.
- JONES W.E., 1959. - The growth and fruiting of *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 38 : 47-56.
- JONES A.K., E. MURIEL, E. RHODES et S.C. EVANS, 1973. - The use of antibiotics to obtain axenic culture of algae. *Br. phycol. J.* 8 : 185-196.
- JUSSIEU A.L., 1789. - *Genera Plantarum secundum ordine naturales disposita*. Paris.
- KESSLER E. et F.C. CZYGAN, 1965. - *Chlorella zofingiensis* : Isolierung neuer Stämme und ihre physiologisch-biochemischen Eigenschaften. *Ber. dt. bot. Ges.* 78 : 342-347.
- KETCHUM B.H. et A.C. REDFIELD, 1938. - A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. *Biol. Bull., Woods Hole*, 75 : 165-169.
- KILLIAN K., 1911. - Beiträg zur Kenntnis der Laminarien. *Zeitg. bot.* 3 : 433-494.
- KIM W.K., 1961. - Promotion of algal growth by AIA, GA and kinetin. *Plant Physiol.* 36 (14) : 45.

- KIM D.H., 1970. - Economically important seaweeds in Chile. I - *Gracilaria*. *Bot. Mar.* 13 : 140-162.
- KLING R. et M. BODARD, 1974. - Les néoformations chez les algues rouges. *Bull. Soc. phycol. Fr.* 19 : 31-35.
- KLING R., 1977. - Mise en évidence d'une activité polarisée chez *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (Gigartinales, Gracilariacées). *Bull. Soc. bot. N. Fr.* (à paraître).
- KNAGGS F.W., 1969. - A review of florideophycidean life histories and of the culture techniques employed in their investigation. *Nova Hedwigia* 18 (24) : 293-330.
- KNOP W., 1884. - Bereitung einer concentrirten Nd'hrstofflösung für Pflanzen. *Landw. Versuchstat.* 30 : 292-294.
- KRASSIL'NIKOVA E.N., 1961. - Propriétés antibiotiques des microorganismes marins isolés à différentes profondeurs. *Mikrobiologia* 30 : 635-791.
- KUFFERATH H., 1929. - La culture des Algues. *Rev. alg., Paris*, 4 (1-4), 127-246.
- KYLIN A., 1966. - The influence of photosynthetic factors and metabolic inhibitors on the uptake of phosphate in P-deficient *Scenedesmus*. *Physiol. Pl.* 19 : 644-649.
- KYLIN A. et J.E. TILLBERG, 1967. - The relation between total phosphorylation, level of ATP and O<sub>2</sub> evolution in *Scenedesmus* as studied with DCMU and Antimycin A. *Zeitg. Pfl. Physiol.* 58 : 165-174.
- KYLIN H., 1927. - Über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf einige Meeresalgen. *Bot. Not.*, p. 243-254.
- KYLIN H., 1941. - Biologische Analyse des Meereswassers. *Kungl. Fysiogr. Sällsk. Förhandl.* 11 (21) : 217-232.
- KYLIN H., 1942. - Über den Einfluss von glucose, ascorbinsäure und heteroauxin auf die Keinslinge von *Ulva* und *Enteromorpha*. *Ibid.* 12 : 135-148.
- KYLIN H., 1945. - Weitere Angaben über die Ernährung von *Ulva lactuca*. *Ibid.* 15 : 22-26.

- KYLIN H., 1956. - Die Gattungen der Rhodophyceen. CWK Gleerups Förlag., Lund, 678 p. (p. 579).
- LAMOUREUX J.V., 1813. - Essai sur les genres de la famille des Thalassiphytes non articulés. Muséum, Paris, 20.
- LANGE W., 1970. - Cyanophyta-bacteria systems : effects of added carbon compounds or phosphate on algal growth at low nutrient concentration. *J. phycol.* 6 : 230-234.
- LANGE W., 1971. - Enhancement of algal growth in Cyanophyta-bacteria systems by carbonaceous compounds. *Can. J. Microbiol.* 17 : 303-314.
- LARPENT J.P. et M. GOURGAUD, 1973. - Lumière et morphogenèse du thalle de l'*Acrochaetium* sp. (Rhodophytes). *Experientia, Suisse*, 29 (9) : 1160-1161.
- LARPENT J.P. et M. DUCHER, 1975. - Lumière et développement chez une Rhodophycée. *C.R. séances Soc. Biol.* 169 (6) : 1501-1506.
- LARPENT J.P., M. GOURGAUD et M. DUCHER, 1977. - Isolement et identification des bacteries contaminantes d'une espèce de Rhodophycées : *Acrochaetium* sp. : essais d'obtention de cultures axéniques. *Bull. Soc. Phycol. Fr.* 22 : 35-40.
- LEE R.E., 1971. - Systemic viral material in the cells of the freshwater red alga *Sirodotia tenuissima* (Holden) Skuja. *J. Cell. Sci.* 8 : 623-631.
- LEFEVRE M., H. JAKOB et M. NISBET, 1949. - The action of substances excreted in culture by certain species of algae on the metabolism of other algal species. *Proc. Intern. Assoc. Limnol.* 10 : 259-264.
- LEFEVRE M., 1964. - Extracellular products of algae In : JACKSON D.F., 1964. - *Algae and Man*. Plenum Press. N.Y., p. 337-367.
- LEVRING T., 1945. - Some culture experiments with marine plankton diatoms. *Göteborgs Vetensk. Samh. Handl.* 3 (12) : 1-18.
- LEVRING T., 1946. - Some culture experiments with *Ulva lactuca*. *Kungl. Fysiogr. Sällsk. Förhandl.* 16 (7) : 45-56.



- LEWIN R.A., 1954. - A marine *Stichococcus* sp. which requires vitamin B12. *J. gen. Microbiol.* 10 : 93-96.
- LEWIN R.A., 1955. - Culture of *Prasiola stipitata* Suhr. *Can. J. Res.* 33 : 5-10.
- LIEBIG J., 1844. - Chimie appliquée à la physiologie végétale et à l'agriculture. 2e éd. Paris, Defortin, Masson, 544 p. (p. 136-180).
- LINNE C.V., 1763. - Species plantarum. Stockolm éd. 2, t. 2, p. 1629.
- LITVINENKO G., 1961. - The effect of organic substances on the photosynthesis and respiration of algae of the Black sea. *Fiziol. Rastenii* 7 : 386-388.
- LITWACK G. et D. PRAMER, 1957. - Absorption of Antibiotics by Plant Cells. III - Kinetics of streptomycin Uptake. *Arch. Biochem. Biophys.* 68 : 396-402.
- LOISEAUX S., 1978. - Culture axénique de *Pylaiella littoralis*. Journée d'Etude du 17 février 1978 : Sur quelques problèmes de physiologie cellulaire chez les algues (2 pages, à paraître).
- LUCAS C.E., 1947. - The ecological effects of external metabolites. *Biol. Rev.* 22 : 270-295.
- LÜNING K. et M.J. DRING, 1972. - Reproduction induced by blue light in female gametophytes of *Laminaria saccharina*. *Planta* 104 : 252-256.
- LWOFF A. et H. DUSI, 1937. - La pyrimidine et le thiazol, facteurs de croissance pour le flagellé *Polytomella coeca*. *C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, 205 : 630.
- MACHLIS L., 1973. - The effects of bacteria on the growth and reproduction of *Oedogonium cardiacum*. *J. phycol.* 342-344.
- MATUDAIRA T., 1942. - On inorganic sulphides as a growth-promoting ingredient for diatom. *Proc. Imp. Acad. Japan*, 18 : 107-116.
- MATTOX K.R., K.D. STEWART et D.G.L. FLOYD, 1972. - Probable virus infections in four genera of Green algae. *Canad. J. Microbiol.* 18 : 1620-1621.
- MAUTNER H., G.M. GARDNER et R. PRATT, 1953. - Antibiotic Activity of Seaweed Extracts. II - *Rhodomela larix*. *J. amer. pharm. Ass. Sci. Ed.* 42 : 294-296.

- McBRIDE D.L., P. KUGRENS et J.A. WEST, 1974. - Light and electron microscopic observations on red algal galls. *Protoplasma, Wien*, 79 : 249-264.
- McLACHLAN L.C., M. CHEN et T. EDELSTEIN, 1971. - The culture of four species of *Fucus* under laboratory conditions. *Can. J. Bot.* 49 (8) : 1463-1469.
- MIQUEL P., 1890. - De la culture artificielle des Diatomées. *Le Diatomiste* 1 : 73.
- MOSS B., 1965. - Apical dominance in *Fucus vesiculosus*. *New Phytol.* 64 : 387-392.
- MOWAT J.A., 1965. - A survey of result on the occurrence of auxins and gibberellins in algae. *Bot. Mar.* 8 : 149-155.
- MURRAY S.N., P.S. DIXON et J.L. SCOTT, 1972. - The life history of *Porphyropsis coccinea*. *Br. Phycol. J.* 7 : 323-333.
- NAKAHARA H. et N. TATEWAKI, 1971. - Some differences in nutritional requirements between different generations of brown algae, *Desmarestia*. *Bot. Mag., Tokyo*, 84 : 435-437.
- NASR A.H. et I.A. BEKHEET, 1969. - The effect of some organic micro-nutrients on some marine algae from Alexandria. *Hydrobiologia* 34 (3-4) : 295-304.
- NATH H., 1967. - Der Einfluss verschiedener Sauerstoffspannungen und Salzgehalte auf die Sauerstoffaufnahme mariner Braun- und Grünalgen. *Bot. Mar.* 10 : 198-239.
- NOLL F., 1892. - Über die Cultur von Meeresalgen in Aquarien. *Flora* 75 (2) : 281-301.
- OGATA E., 1966. - Photosynthesis in *Porphyra tenera* and Some other Marine Algae as affected by Tris (hydroxymethyl)-aminomethane in Artificial Media. *Bot. Mag., Tokyo*, 79 : 271-282.
- OGATA E., T. MATSUI et H. NAKAMURA, 1972. - The life cycle of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae-Gigartinales) in vitro. *Phycologia* 11 : 75-80.
- O'KELLEY J.C., 1974. - Inorganic nutrients, In : STEWART W.D.P., 1974. - Algal Physiology and Biochemistry. *University of California Press, Botanical Monographs* 10 : 989 p. (p. 610-625).

- PALMORK K.H., 1963. - Studies of the dissolved organic compounds in the sea. *Report on Norv. Fish. and Mar. Invest.* 13 : 120-125.
- PAPENFUSS G.F., 1950. - Review of genera of algae described by Stackhouse. *Hydrobiol., Acta hydrobiol. Limn. et Protist.* 2 (3) : 195 et 203.
- PEACH E.A. et J.C. DRUMMOND, 1924. - On the culture of the marine diatom *Nitzschia closterium* (F.) *minutissima* in artificial sea water. *Biochemic. J.* 18 : 464-468.
- PEARSON B.R. et R.E. NORRIS, 1974. - Intranuclear virus-like particles in the marine alga *Platimonas* sp. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* 13 : 5-9.
- PEDERSEN M., 1968. - *Ectocarpus fasciculatus* : marine brown alga requiring kinetin. *Nature* 218 (5143) : 776.
- PERRIER E., 1890. - De l'emploi de l'eau de mer artificielle pour la conservation des animaux marins et en particulier des Huîtres dans les grands aquariums. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 110 : 1076-1079.
- PERRONE C., 1973. - Note ecologica su *Petroglossum nicaense* (Duby) Schotter (Phylloporaceae). *Giorn. bot. ital.* 2 : 47-57.
- PICKETT-HEAPS J.D., 1972. - A possible virus infection in the green alga *Oedogonium*. *J. Phycol.* 8 : 44-47.
- PIRSON A., C. TICHY et G. WILHELMI, 1952. - Stoffwechsel und Mineral-salzernährung einzelliger grüenalgen. I - Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus*. *Planta* 40 : 199-253.
- PINTNER I.J. et L. PROVASOLI, 1958. - Artificial cultivation of a red pigmented marine blue-green alga *Phormidium persicinum*. *J. gen. Microbiol.* 18 : 190-197.
- PRATT R., 1944. - Chlorellin and antibacterial substance from *Chlorella*. *Science* 99 : 351-352.
- PRESCOTT C., B. LI, W.G. JAHNES et E.C. MARTINO, 1966. - Antimicrobial agents from Mollusks. *N. Y. Acad. of Sci., ser. II*, 24 (5) : 504-509.

- PRINGSHEIM E.G., 1912. - Die Kultur von Algen in Agar. *Beitr. Biol. Pfl.* 811 : 305-332.
- PRINGSHEIM E.G., 1926. - Kulturversuche mit Chlorophyllführenden Mikroorganismen. 5 - Methoden und Erfahrungen. *Ibid.* 14 : 283-312.
- PRINGSHEIM E.G., 1951. - Methods for the cultivation of Algae, In : SMITH G.M., 1951. - Manual of Phycologia. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts, p. 347-357.
- PRINGSHEIM E.G., 1936. - Das Rätsel der Erdabkochung. *Beitr. Bot. Zentralb.* 55 : 100-121.
- PROVASOLI L., I.J. PINTNER et L. PACKER, 1951. - Use of antibiotics in obtaining pure cultures of algae and protozoa. *Proc. Amer. Soc. Protoz.* 2 : 6.
- PROVASOLI L. et I.J. PINTNER, 1953. - Ecological implications of in vitro nutritional requirements of algal flagellates. *Ann. New York Acad. Sci.* 56 (5) : 839-851.
- PROVASOLI L., J.J.A. McLAUGHLIN et M.R. DROOP, 1957. - The development of artificial media for marine algae. *Arch. Microbiol.* 25 : 392-428.
- PROVASOLI L., 1958a. - Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Ann. Rev. Microbiol.* 12 : 279-308.
- PROVASOLI L., 1958b. - Effect of plant hormones on *Ulva*. *Biol. Bull.* 114 (3) : 375-384.
- PROVASOLI L., 1964. - Growing Marine Seaweeds. *Proc. 4th Intern. Symp. Seaweed 1961, Biarritz*. Pergamon Press, Paris, 1964, p. 9-17.
- PROVASOLI L. et I.J. PINTNER, 1964. - Symbiotic relationship between microorganisms and seaweeds. *Amer. J. Bot.* 51 : 681.
- RADAIS M., 1900. - Sur la culture des Algues à l'état de pureté. *Cong. Int. Bot., Paris*, p. 163.
- RADLEY M., 1956. - Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature, Lond.*, 178 : 1070-1071.
- RAULIN J., 1870. - Etude chimique sur la végétation. *Thèse doct., Paris*.

- RAVEN J.A., 1970. - Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. *Biol. Rev.* 45 : 167-221.
- RENTSCHLER H.G., 1967. - Photoperiodische Induktion der monosporenbildung bei *Porphyra tenera* Kjellm. *Planta* 76 : 65-74.
- RICE T.R., 1954. - Biotic influences affecting population growth of planktonic algae. *Fish. Bull. U.S.* 54 : 227-245.
- RICHTER G. et M.J. KIRSCHSTEIN, 1966. - Regeneration und Photosyntheseleistung kernhaltiger Zell-Teilstücke von *Acetabularia* in blauer roter Strahlung. *Z. Pfl. Physiol.* 54 : 106-117.
- ROSENFELD D.W. et C.E. ZOBELL, 1947. - Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bact.* 54 : 393-398.
- RYTHER J., 1954. - The ecology of phytoplankton blooms in Moriches Bay and Great South Bay, Long Island. New York. *Biol. Bull., Woods Hole*, 106 (2) : 198-209.
- SACHS J., 1860. - Über die Erziehung von Landpflanzen im Wasser. *Bot. Zietg.* 13 : 113-117.
- SCHREIBER E., 1927. - Die Reinkultur von marinen Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meereswasser. *Wiss. Meeresunters. Abt. Helgoland N.F.*, 16 : 1-34.
- SCHIEWER V., 1967. - Auxinvorkommen und Auxinstoffwechsel bei mehrzelligen Ostseealgen. I - Zum Vorkommen von Indol-3-essigsäure. *Planta, Berl.*, 74 : 313-323.
- SHEPHARD D., 1970. - Axenic Culture of *Acetabularia* in a synthetic medium, In : PRESCOTT D., 1970. - *Methods in Cell Physiology*. Academic Press N.Y., 4 : 46-69.
- SIEBURTH J. Mc. N., 1964. - Antibacterial substances produced by marine algae. *Devs ind. Microbiol.* 5 : 124-134.
- SIEBURTH J. Mc. N., 1968. - The influence of algal antibiosis on the ecology of marine microorganisms. *Adv. Microbiol. Sea*, 1 : 63-94.
- SOLI G., 1963. - Axenic cultivation of a pelagic diatom, In : OPPENHEIMER C., 1963. - *Marine Microbiology*, p.121-126.

- SOROKIN C. et R.W. KRAUSS, 1962. - Effects of temperature and illumination on *Chlorella* growth uncoupled from cell division. *Pl. Physiol.*, Lancaster, 37 : 37-42.
- SPENCER C.P., 1952. - On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J. mar. biol. Ass., U.K.*, 31 : 97-106.
- SPENCER T., 1968. - Effect of kinetin on the phosphatase enzymes of *Acetabularia*. *Nature, Lond.*, 217 (5123) : 62-64.
- STACKHOUSE J., 1809. - Tentamen marino-cryptogamicum. *Mem. Soc. Natur., Moskva*, 2 : p. 59 et 92-93.
- STEWART W.D.P., G.P. FITZGERALD et R.H. BURRIS, 1970. - Acetylene reduction assay for determination of phosphorus availability in Wisconsin lakes. *Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A.*, 66 : 1104-1111.
- STEWART W.D.P. et G. ALEXANDER, 1971. - Phosphorus availability and nitrogenase activity in aquatic blue-green algae. *Freshwater Biol.* 1 : 389-404.
- STOKKE K., 1957. - The red alga *Gracilaria verrucosa* in Norway. *Nytt. Mag. bot.* 5 : 101-111.
- STOSCH H.A. (von), 1962. - Kulturexperiment und Ökologie bei Algen. *Kieler Meeres. Forsch.* 18 : 13-27.
- STREET H.E., D.J. GRIFFITHS, C.L. THRESHER et M. OWENS, 1958. - Ethanol as a carbon source for growth of *Chlorella*. *Nature, Lond.*, 182 : 1360.
- SWEENEY B.M., 1954 . - Culture of the dinoflagellate *Gymnodinium* with soil extract. *Amer. J. Bot.* 38 : 669-677.
- SWEENEY B.M., 1951 . - *Gymnodinium splendens*, a marine dinoflagellate requiring B<sub>12</sub>. *Ibid.* 41 : 821-824.
- TATEWAKI M. et L. PROVASOLI, 1963. - Vitamin requirements of three species of *Antithamnion*. *Bot. Mar.* 6 : 193-230.
- TERBORGH J., 1965. - Effects of red and blue light on the growth and morphogenesis of *Acetabularia crenulata*. *Nature, Lond.*, 207 : 1360-1363.

- THIMANN K.V. et K. BETH, 1959. - Action of auxins on *Acetabularia* and the effect of enucleation. *Nature, Lond.*, 183 : 946-948.
- THOMAS E.A. et B.E. TREGUNNA, 1968. - Bicarbonate ion assimilation in photosynthesis by *Sargassum muticum*. *Can. J. Bot.* 46 : 411-415.
- VAN BAALEN Ch., 1961. - Studies on marine blue-green algae. *Bot. Mar.* 4 : 129-139.
- VAN DER VELDE H.H., 1973. - The natural occurrence in red algae of two phycoerythrins with different molecular weights and spectral properties. *Bioch. Biophys. Act.* 303 : 246-257.
- VAN HEURCK H., 1908. - Prodrôme de la Flore des Algues Marines des Îles Anglo-normandes et des Côtes nord-ouest de la France. Jersey, 120 p. (p. 58-59).
- VAN OVERBEEK J., 1940. - Auxins in marine algae. *Plant Physiol.* 15 : 291.
- WAALAND S.D. et R. CLELAND, 1972. - Development in the red alga *Griffithsia pacifica*. *Planta* 105 : 196-204.
- WALLEN D.G. et G.H. GEEN, 1971. - Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.* 10 (1) : 44-51.
- WILSON W.B. et A. COLLIER, 1955. - Preliminary notes on culturing *Gymnodinium brevis* Davis. *Science, Lancaster, Pa.*, 121 (3142) : 394-395.
- ZAVODNIK N., 1975. - Effects of Temperature and Salinity variations on Photosynthesis of some littoral Seaweeds of the North Adriatic Sea. *Bot. mar.* 18 : 245-250.
- ZOBELL C.E. et E.C. ALLEN, 1935. - The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journ. Bact.* 29 : 239-251.

# TABLE DES MATIERES

	PAGE
AVANT - PROPOS	
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION .....	1
11 - HISTORIQUE .....	2
111 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ENRICHEE" ...	2
112 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ENRICHEE A L'EXTRAIT DE TERRE" .....	3
113 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ENRICHEE EN SUBSTANCES MINERALES ET ORGANIQUES" ...	6
114 - LES MILIEUX : "EAU DE MER ARTIFICIELLE"	7
CHAPITRE 2	
"MATERIEL" ET METHODES .....	10
21 - LE "MATÉRIEL" .....	11
211 - HISTORIQUE DE LA NOMENCLATURE .....	11
212 - POSITION SYSTEMATIQUE DE <i>Gracilaria verrucosa</i> .....	12
213 - APERCU SOMMAIRE DE L'ECOLOGIE DE <i>Gracilaria</i> .....	13
2131. Répartition géographique du genre <i>Gracilaria</i> .....	13
2132. Le milieu de vie de <i>Gracilaria verrucosa</i> .....	14



22 - MÉTHODES .....	19
221 - RECOLTE ET CONSTITUTION DES LOTS DESTINES A LA CULTURE .....	19
222 - CHOIX DU CRITERE DE CROISSANCE .....	20
223 - CONDITIONS DE CULTURE .....	20
2231. <i>Définition d'un délai de culture</i> ..	21
2232. <i>Choix d'une longueur de segment</i> ..	25
2233. <i>Conditions de culture : axénie</i> ..	27
224 - METHODES D'APPRECIATION DES RESULTATS ..	27
225 - NORMALITE DU CARACTERE POIDS .....	27

## ANNEXE N°1

1 - TEST DU F DE SNEDECOR .....	31
---------------------------------	----

## ANNEXE N°2

2 - TEST DU T DE STUDENT .....	33
--------------------------------	----

## CHAPITRE 3

### CONDITIONS D'UNE CULTURE

AXENIQUE .....	35
----------------	----

31 - NATURE DU PROBLÈME .....	36
-------------------------------	----

32 - HISTORIQUE SOMMAIRE DES MÉTHODES DE STÉRILISATION UTILISÉES PAR LES AUTEURS .....	37
--	----

321 - TRAITEMENTS PHYSIQUES .....	37
-----------------------------------	----

322 - TRAITEMENTS CHIMIQUES .....	38
-----------------------------------	----

323 - TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES .....	38
---------------------------------------	----

33 - MÉTHODES UTILISÉES DANS NOS PROPRES EXPÉRIENCES .....	39
331 - METHODES PHYSIQUES .....	39
332 - METHODES CHIMIQUES .....	39
333 - METHODES ANTIBIOTIQUES .....	39
34 - LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE NOTRE RECHER- CHE DES MOYENS DE STÉRILISATION DES THALLES DE LA GRACILAIRE .....	40
341 - EXPERIENCES PRELIMINAIRES .....	40
342 - REALISATION D'UN ANTIBIOGRAMME ACCELERE	42
343 - EXPERIENCES BASEES SUR LES DONNEES DE L'ANTIBIOGRAMME ACCELERE .....	43
344 - INFLUENCE DE LA NYSTATINE SUR LE DEVE- LOPPLEMENT FONGIQUE .....	46
345 - INFLUENCE DE L'AZIDE DE SODIUM SUR LA STERILISATION DES THALLES .....	47
346 - ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES ET REALISATION D'UN ANTIBIOGRAMME .....	50
347 - EXPERIENCES DESTINEES A TESTER L'INFLUEN- CE DE LA RIFAMPICINE SUR LA STERILISA- TION DES THALLES .....	51
3471. <i>Influence de la rifampicine, uti-     lisée dans une association qua-     ternaire</i> .....	51
3472. <i>Influence de la rifampicine, uti-     lisée dans une association binai-     re, après un traitement antibio-     tique préalable des thalles</i> .....	55
35 - DISCUSSION .....	57
351 - LE MILIEU .....	57
352 - LE "MATERIEL" .....	59

## CHAPITRE 4

### INFLUENCE DES PARAMETRES ECOPHYSIOLOGIQUES SUR LA CROISSANCE ..... 60

#### 41 - ACTION DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALI- NITÉ SUR LA CROISSANCE DE GRACILARIA CULTIVÉ IN VITRO ..... 61

##### 411 - CONDITIONS EXPERIMENTALES ..... 61

##### 412 - LES RESULTATS SONT EXPRIMES DANS LE TA- BLEAU 13 ET SUR LES FIGURES 7 et 8 (a,b) 62

4121. *L'hypothèse (Ho) d'homogénéité des  
moyennes est éprouvée par le test  
de F, F dont la valeur est égale  
à 18,75* ..... 62

4122. *Influence de la température* ..... 62

4123. *Influence de la salinité* ..... 67

4124. *Interaction entre la température  
et la salinité* ..... 67

##### 413 - DISCUSSIONS ..... 67

4131. *Influence de la température* ..... 67

4132. *Influence de la salinité* ..... 69

#### 42 - ACTION DU PH SUR LA CROISSANCE ..... 70

##### 422 - RESULTATS ..... 71

##### 423 - DISCUSSION ..... 71

#### 43 - ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA CROISSANCE DU THALLE DE GRACILARIA ..... 74

##### 431 - ACTION DE L'ECLAIREMENT ENERGETIQUE ET DE LA PHOTOPERIODE ..... 77

##### 432 - ACTION DES BANDES SPECTRALES (BLEU, VERT, JAUNE, ROUGE) ..... 77

433 - DISCUSSION .....	85
4331. <i>Influence de l'énergie</i> .....	85
4332. <i>Influence de la photopériode</i> ....	86
4333. <i>Influence des bandes spectrales</i> .	87
434 - CONCLUSION .....	88

## CHAPITRE 5

INFLUENCE DE LA SOURCE CARBONÉE SUR LA CROISSAN- CE .....	90
51 - MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	91
52 - RÉSULTATS .....	93
53 - DISCUSSION .....	93

## CHAPITRE 6

INFLUENCE DE LA SOURCE AZOTÉE SUR LA CROISSANCE ...	98
61 - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES .....	99
62 - RÉSULTATS .....	101
63 - DISCUSSION .....	101

## CHAPITRE 7

INFLUENCE DU PHOSPHORE SUR LA CROISSANCE .....	106
71 - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES .....	107

72 - RÉSULTATS .....	109
73 - DISCUSSION .....	112

## CHAPITRE 8

INFLUENCE DES VITAMINES, DES SUBSTANCES DE CROIS- SANCE ET DES OLIGO- ELEMENTS SUR LA CROISSANCE DE GRACILARIA VERRUCOSA ....	116
81 - LES VITAMINES .....	117
811 - MATERIEL ET METHODES .....	117
812 - RESULTAT .....	119
813 - DISCUSSION .....	119
8131. <i>Influence de la vitamine B<sub>12</sub></i> ....	119
8132. <i>Influence de la vitamine C</i> .....	121
82 - SUBSTANCES DE CROISSANCE .....	123
821 - CONDITIONS EXPERIMENTALES .....	123
822 - RESULTATS .....	125
8221. <i>Influence de l'auxine (AIA)</i> .....	127
8222. <i>Influence de la gibbèrelline (GA<sub>3</sub>)</i>	127
8223. <i>Influence de la kinétine</i> .....	129
8224. <i>Comparaison des effets observés                 respectivement avec la gibbèrel-                 line (GA<sub>3</sub>) et la kinétine</i> .....	130
83 - OLIGOÉLÉMENTS (RÔLE DU FER) .....	130
831 - MATERIEL ET METHODES .....	132

832 - RESULTATS .....	132
833 - DISCUSSION .....	132

CONCLUSION GENERALE .....	136
---------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE .....	140
---------------------	-----

# TABLE DES TABLEAUX

	PAGE
TABLEAU 1 : MILIEUX "EAU DE MER ENRICHIE EN SELS MINÉRAUX .....	4
TABLEAU 2 : REVUE HISTORIQUE SOMMAIRE DES PRINCIPAUX MILIEUX SEMI-ARTIFICIELS ET ARTIFICIELS .....	5
TABLEAU 3 : RELEVÉ PHYTOSOCIOLOGIQUE ÉFFECTUÉ PAR BODARD (1975) .....	15
TABLEAU 4 : MILIEUX ASW <sub>3</sub> ET ASW <sub>3</sub> MODIFIÉ .....	22
TABLEAU 5 : MILIEUX ASP <sub>6</sub> ET ASP <sub>6</sub> F .....	23
TABLEAU 6 : TEST DE NORMALITÉ DU CARACTÈRE "POIDS".	29
TABLEAU 7 : UTILISATION DE DIVERSES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES POUR L'ISOLEMENT DE <i>G. verrucosa</i> EN CULTURES STÉRILES .....	41
TABLEAU 8 : ANTIBIOGRAMME ACCÉLÉRÉ .....	44
TABLEAU 9 : MILIEU "ANTIBIOTIQUE" ET MILIEU "TEST".	45
TABLEAU 10 : MILIEU "ANTIBIOTIQUE", MILIEU "AZIDE" ET MILIEU "TEST" .....	47
TABLEAU 11 <sup>a</sup> : ISOLEMENTS BACTÉRIENS .....	52
TABLEAU 11 <sup>b</sup> : ANTIBIOGRAMME .....	53
TABLEAU 12 (a,b,c,d,e) : FORMULATION DE MILIEUX "ANTIBIOTIQUES" ET DE MILIEUX TESTS ...	54
TABLEAU 13 : INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ SUR LA CROISSANCE .....	66
TABLEAU 14 : INFLUENCE DU PH SUR LA CROISSANCE .....	72
TABLEAU 15 : INFLUENCE DE LA PHOTOPÉRIODE ET DE L'ÉCLAIREMENT SUR LA CROISSANCE .....	78

TABLEAU 16 : INFLUENCE DE DIVERSES LUMIÈRES COLORÉES SUR LA CROISSANCE .....	79
TABLEAU 17 : MILIEU KG .....	92
TABLEAU 18 : SYNOPTIQUE DES DIVERSES SOURCES AZOTÉES TESTÉES, AINSI QUE DE LEURS CONCEN- TRATIONS .....	100
TABLEAU 19 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES AZOTÉES SUR LA CROISSANCE .....	102
TABLEAU 20 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES PHOSPHO- RÉES SUR LA CROISSANCE .....	108
TABLEAU 21 : INFLUENCE DES VITAMINES SUR LA CROIS- SANCE DES THALLES DE <i>G. verrucosa</i> .....	122
TABLEAU 22 : INFLUENCE DES HORMONES DE CROISSANCE ..	124
TABLEAU 23 : COMPOSITION DE LA SOLUTION D'OLIGO- ÉLÉMENTS DU MILIEU ASP <sub>6</sub> F (MOD. BODARD),	131
TABLEAU 24 : INFLUENCE DU FER SUR LA CROISSANCE DE <i>G. verrucosa</i> .....	133



# TABLE DES FIGURES

	PAGE
FIGURE 1 : DIAGRAMME T-S DES EAUX MARINES SUPERFICIELLES À WIMEREUX .....	16
FIGURE 2 : RELATION ENTRE LE PH, LA SALINITÉ ET LA TEMPÉRATURE EN FONCTION DU MOIS DE L'ANNÉE, DANS LES EAUX CÔTIÈRES À WIMEREUX ..	18
FIGURE 3 : INFLUENCE DU RENOUVELLEMENT DU MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DE <i>G. verrucosa</i>	24
FIGURE 4 : INFLUENCE DE LA TAILLE DES SEGMENTS SUR LA CROISSANCE .....	26
FIGURE 5 : COURBE DES FRÉQUENCES ET DES PROBABILITÉS THÉORIQUES .....	30
FIGURE 6 : INFLUENCE DE L'AZIDE SUR LA STÉRILISATION DE <i>G. verrucosa</i> .....	49
FIGURE 7 : INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ SUR LA CROISSANCE .....	63
FIGURE 8 : IDEM	64
FIGURE 9 : IDEM	65
FIGURE 10 : INFLUENCE DU PH SUR LA CROISSANCE DE <i>G. verrucosa</i> .....	73
FIGURE 11 : DISTRIBUTION SPECTRALE DE TUBES FLUORESCENTS COLORÉS (SYLVANIA) .....	76
FIGURE 12 : INFLUENCE DE L'ÉCLAIREMENT SUR LA CROISSANCE DE <i>G. verrucosa</i> .....	80
FIGURE 13 : INFLUENCE DE "L'ÉCLAIREMENT" ET DE LA "PHOTOPÉRIODE" SUR LA CROISSANCE .....	81
FIGURE 14 : INFLUENCE DE LA PHOTOPÉRIODE SUR LE TAUX DE CROISSANCE .....	82

FIGURE 15 : INFLUENCE DE DIVERSES LUMIÈRES COLORÉES SUR LA CROISSANCE .....	83
FIGURE 16 : INFLUENCE DE DIVERSES LUMIÈRES COLORÉES SUR LA CROISSANCE EN FONCTION DE L'ÉCLAI- REMENT .....	84
FIGURE 17 : INFLUENCE DU CARBONE SUR LA CROISSANCE : COMPARAISON DES MOYENNES .....	94
FIGURE 18 : INFLUENCE DU CARBONE SUR LA CROISSANCE ..	95
FIGURE 19 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES AZOTÉES SUR LA CROISSANCE .....	103
FIGURE 20 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES PHOSPHORÉES SUR LA CROISSANCE : COMPARAISON DES MOYENNES .....	110
FIGURE 21 : INFLUENCE DE DIVERSES SOURCES PHOSPHORÉES SUR LA CROISSANCE : RÉSULTATS GRAPHIQUES.	111
FIGURE 22 : VITAMINES ET CROISSANCES : COMPARAISON DES MOYENNES ET DES DISPERSIONS .....	118
FIGURE 23 : VITAMINES ET CROISSANCE : RÉSULTATS GRAPHIQUES .....	120
FIGURE 24 : INFLUENCE DES HORMONES SUR LA CROISSAN- CE : RÉSULTATS GRAPHIQUES .....	126
FIGURE 25 : INFLUENCE DES HORMONES SUR LA CROISSAN- CE : COMPARAISON DES MOYENNES ET DISPER- SIONS .....	128
FIGURE 26 : INFLUENCE DU FER SUR LA CROISSANCE : RÉSULTATS GRAPHIQUES .....	134

## TABLE DES ABREVIATIONS

AIÁ	:	acide 3-indolylacétique
GA <sub>3</sub>	:	gibbérelline
NTA	:	acide nitrilotriacétique
TRIS	:	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
vit. B <sub>12</sub>	:	cyanocobalamine
vit. C	:	L + acide ascorbique