

50376
1984
287

50376
1984
287

N° d'ordre : 1241

UNIVERSITE 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 3ème CYCLE

par

T h i e r r y S T A D L E R

ETUDES PHYSIOLOGIQUES DE LA PRODUCTION
D'AGAR DANS LES PAROIS DES CELLULES DE
GRACILARIA VERRUCOSA

Membres du Jury : MM. BODARD M.	Président
KLOAREG B.	Rapporteur
FOURNET B.	Examineur
GUDIN C.	Examineur



Soutenue le : mardi 18 décembre 1984

RESUME

Depuis peu, les chercheurs s'intéressent aux relations de la cellule avec le milieu extérieur. A ce titre, la paroi des algues, qui constitue le compartiment le plus externe de la cellule, représente un domaine d'investigation nouveau. De récentes études biochimiques et ultrastructurales montrent que les polysaccharides qu'elle contient participent activement à la physiologie de l'algue : régulation de la pression osmotique et échanges nutritionnels. Les propriétés physiques et mécaniques des parois sont de plus liées à la structure et à la composition de ces molécules.

Le but de ce travail est d'étudier les conditions physiologiques de la mise en place des polyosides de la phase matricielle dans une algue rouge productrice d'agar-agar : *Gracilaria verrucosa*.

Les données de la littérature laissent croire à un antagonisme entre la croissance et la production d'agar. En fait, ce phénomène peut être interprété comme un décalage dans le temps entre la production de biomasse et la synthèse de colloïdes.

L'augmentation de biomasse est sensible aux effecteurs de croissance : température, lumière et nutrition azotée. Au cours de cette période, l'algue constitue des réserves d'amidon floridéen. Cette étape est suivie d'une synthèse d'agar qui s'accumule dans les parois après la phase de prolifération. Il apparaît clairement qu'une redistribution de la matière sèche se produit en direction des colloïdes pariétaux.

La biosynthèse d'agar est caractérisée par une augmentation de la teneur en galactose. Dans des conditions défavorables à la croissance, les molécules sont plus riches en 3,6-anhydrogalactose. Ces substitutions, qui ont une incidence sur la structure secondaire et tertiaire du colloïde, dans le sens de l'amélioration du gel, sont compatibles avec les propriétés mécaniques observées à l'échelle macroscopique sur les thalles.

Mots-clés : Agar - colloid - *Gracilaria* - cell wall - Nitrogen - seaweeds - Rhodophyta.

TABLE DES MATIERES

- o O o -

INTRODUCTION	1
1ère partie : HISTORIQUE	
I. - STRUCTURE DE LA PAROI	3
A. - La phase squelettique	4
B. - La phase matricielle	4
C. - Stratification et dépôts secondaires	6
II. - AGAR-AGAR	7
A. - Structure de la molécule	7
B. - Propriétés de l'agar-agar	7
III. - ROLE DES POLYOSIDES MATRICIELS	9
A. - La régulation hydrique	9
B. - Régulation des "relations ioniques"	10
C. - Régulation "mécanique"	10
IV. - VARIATION DE COLLOÏDES DANS LES ALGUES	11
2ème partie : HYPOTHESES DE TRAVAIL ET PRINCIPES METHODOLOGIQUES	
I. - HYPOTHESES DE TRAVAIL	13
II. - PRINCIPES METHODOLOGIQUES	16
A. - Expression des résultats	16
B. - La culture d'algues	16
C. - Isolement de parois	17
D. - Extraction de l'agar	19

E. - Dosages des sucres	20
F. - Dosage des phycoérythrines	20
G. - Dosage de l'azote	21
H. - Dosage des protéines	23
I. - Contrôle en microscopie électronique	23

3ème partie : CHAPITRE I

Isolement de parois de Gracilaria verrucosa

I. - MATERIEL ET METHODES	24
II. - RESULTATS ET DISCUSSION	24

CHAPITRE II

Influences de la température et de la lumière sur la production et la qualité de l'agar-agar de Gracilaria verrucosa.

I. - MATERIEL ET METHODES	27
II. - RESULTATS	28
III. - DISCUSSION	33
IV. - CONCLUSION	39

CHAPITRE III

Influence de l'engraisement azoté sur la production d'agar-agar de Gracilaria verrucosa.

I. - MATERIEL ET METHODES	41
II. - RESULTATS	42

III. - DISCUSSION	55
IV. - CONCLUSION	64

CHAPITRE IV

Production d'agar-agar en relation avec l'âge et la croissance du
thalle de Gracilaria verrucosa.

I. - MATERIEL ET METHODES	67
II. - RESULTATS	67
III. - DISCUSSION	79
IV. - CONCLUSION	86
CONCLUSION GENERALE	88
BIBLIOGRAPHIE	91

TABLE DES TABLEAUX

- o O o -

Tableau 1 -	Variation des rendements en agar extrait de parois isolées, en fonction des conditions de culture	25
Tableau 2 -	Conditions expérimentales à l'étude de l'influence de l'énergie lumineuse et de la photopériode	29
Tableau 3 -	Variations de la biomasse, de la matière sèche, des rendements en agar et de la qualité biochimique de celui-ci en fonction de la température de culture de Gracilaria verrucosa (19 échantillons)	30
Tableau 4 -	Variations de la biomasse, de la matière sèche et des rendements en agar en fonction des conditions de culture	32
Tableau 5 -	Variations des rendements en agar et de la qualité biochimique de celui-ci en fonction des conditions de culture de Gracilaria verrucosa	34
Tableau 6 -	Variations en valeur absolue de la matière sèche et de l'agar en fonction des conditions de culture de Gracilaria verrucosa	35
Tableau 7 -	Variations de la biomasse en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	43
Tableau 8 -	Variations de la matière sèche en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	44
Tableau 9 -	Variations en valeur absolue du poids de matière sèche en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	45
Tableau 10 -	Variations de l'azote en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	46
Tableau 11 -	Variations de la phycoérythrine en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	47

Tableau 12 - Variations des teneurs en protéines en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	48
Tableau 13 - Variations de l'agar en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	49
Tableau 14 - Variations en valeur absolue de l'agar en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	50
Tableau 15 - Variations des teneurs en sucres totaux de l'agar en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	52
Tableau 16 - Variations du 3.6-anhydrogalactose en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	53
Tableau 17 - Variations du rapport oses totaux - 3.6-anhydrogalactose/3.6-anhydrogalactose en fonction des conditions de culture et de l'enrichissement en azote du thalle	54
Tableau 18 - Variations de la biomasse totale, de la matière sèche des axes primaires et de la matière sèche des ramifications en fonction du temps et des conditions de culture	69
Tableau 19 - Evolution en valeur absolue du poids frais total et du poids frais, du poids de matière sèche et du poids d'eau des axes primaires par rapport à un échantillon témoin de départ	70
Tableau 20 - Evolution en valeur absolue du poids frais total et du poids frais, du poids de matière sèche et du poids d'eau des ramifications par rapport à un échantillon témoin de départ	71
Tableau 21 - Rapport de production de matière sèche et de matière fraîche entre les axes primaires et les ramifications dans des conditions de culture favorables à la croissance	73
Tableau 22 - Variations des rendements en agar et de la qualité biochimique de celui-ci en fonction du temps et des conditions de culture	75

Tableau 23 -	Evolution en valeur absolue de la matière sèche des axes primaires, de l'agar, des sucres totaux et du 3.6-anhydrogalactose en fonction du temps et des conditions de culture par rapport à un échantillon témoin de départ	76
Tableau 24 -	Production d'agar et de matière sèche dans les ramifications en fonction du temps et des conditions de culture	78
Tableau 25 -	Production d'agar et de matière sèche dans les axes primaires en fonction du temps et des conditions de culture	80

TABLE DES FIGURES

- o O o -

Figure 1 -	Ultrastructure de la paroi de Gracilaria verrucosa	5
Figure 2 -	Molécule d'agarose	8
Figure 3 -	Variations des rendements en agar et des teneurs de matière sèche de G. verrucosa en fonction des saisons	14
Figure 4 -	Spectre d'absorbance de la R-phycoérythrine	22
Figure 5 -	Croissance pondérale de Gracilaria verrucosa dans différentes conditions de température, d'éclairement et de photopériode	31
Figure 6 -	Diagramme des poids de matières fraîches, de matières sèches, d'agar et des sucres dosés dans celui-ci, obtenu après culture de 10 g d'algues pendant 2 mois	36
Figure 7 -	Evolution schématique de la matière fraîche, de la matière sèche et de l'agar de Gracilaria verrucosa dans différentes configurations de culture	38
Figure 8 -	Croissance pondérale (en grammes) de Gracilaria verrucosa en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	56
Figure 9 -	Variations de la matière sèche en valeur relative (en % du poids frais) et en valeur absolue (grammes) de Gracilaria verrucosa en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	57
Figure 10 -	Variations des teneurs d'azote et de phycoérythrine (en % de matière sèche) de Gracilaria verrucosa cultivé à 18°C et sous une éclairage de $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, en fonction du prétraitement en azote	59
Figure 11 -	Variations de l'agar en valeur relative (en % de la matière sèche) et en valeur absolue (grammes) de Gracilaria verrucosa en fonction des conditions de culture et du prétraitement en azote	60

- Figure 12 -** Variations des teneurs d'azote et de phycoérythrine (en % de matière sèche) de *Gracilaria verrucosa* cultivé à 5°C et sous un éclairage de 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, en fonction du prétraitement en azote 62
- Figure 13 -** Variations des teneurs d'azote et de phycoérythrine (en % de matière sèche) de *Gracilaria verrucosa* cultivé à 18°C et sous un éclairage de 1×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, en fonction du prétraitement en azote 63
- Figure 14 -** Coupes transversales de thalles examinées en microscopie électronique 68
- Figure 15 -** Variations de la matière sèche (en % du poids frais) des axes primaires et des ramifications, et du poids frais du thalle, en fonction du temps dans des conditions de culture alternée (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) 74
- Figure 16 -** Variations de l'agar des axes primaires en valeur relative (en % de matière sèche) et en valeur absolue (en grammes) en fonction du temps dans des conditions - de culture alternée (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) 77
- Figure 17 -** Variations du poids frais des thalles, du poids frais, du poids d'eau et de matière sèche des axes primaires (en grammes) en fonction du temps, dans des conditions de culture alternée (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) 81
- Figure 18 -** Figure récapitulative de l'évolution (en grammes) du poids frais, du poids de matière sèche et du poids d'eau des axes primaires et des ramifications en fonction du temps, dans des conditions de culture alternée (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) 82

Figure 19 - Variations du poids frais des thalles, du poids frais, du poids d'eau et de matière sèche des ramifications (en grammes) en fonction du temps, dans des conditions de culture alternée (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) 84

Figure 20 - Evolution du poids frais, de la matière sèche et de l'agar de *Gracilaria verrucosa* sur un cycle annuel 90

REMERCIEMENTS

- o O o -

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire d'Algologie et de Biologie végétale marine de l'Université de Lille I, dirigé par Monsieur le Professeur M. BODARD. Je lui exprime ici toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire.

Je suis particulièrement reconnaissant envers les membres de l'équipe "Polysaccharides des Végétaux cultivés *in vitro*", en la personne de D. CHRISTIAEN, H. MORVAN et M.C. VERDUS, qui m'ont prodigué tout au long de cette étude conseils et aide tant sur le plan scientifique et technique que sur le plan "humain".

Je tiens également à remercier B. KLOAREG d'avoir accepté de rapporter ce travail, et de l'accueil qu'il m'a réservé à la Station Marine de Roscoff, pour l'étude de la technique d'isolement de parois de Fucales.

J'adresse mes vifs remerciements à Messieurs les Membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de juger cette Thèse.

J'exprime ma gratitude à mes parents et à ma famille, à Véronique BOUTIN, à tous mes amis, aux membres du Laboratoire et à mes collègues d'internat qui m'ont soutenu dans ce travail.

Je remercie M. DELECOURT, la Secrétaire, pour la qualité de son travail et pour son énergie.

INTRODUCTION

Les algues constituent depuis longtemps un matériel d'étude privilégié pour les physiologistes cellulaires. Leur structure simple, uniforme et la taille relativement grande des cellules sont autant d'éléments qui ont déterminé ce choix.

Les chercheurs se sont intéressés aux relations de la cellule avec le milieu extérieur. A ce titre, la paroi des algues qui constitue le compartiment le plus externe de la cellule représente un domaine d'investigation nouveau. En effet, elle a souvent été perçue comme une enveloppe inerte présentant peu d'intérêt et si le rôle de soutien des polysides qu'elle contient est bien connu, le rôle des polysides matriciels l'est beaucoup moins. Or de récentes études biochimiques et ultrastructurales suggèrent que ces polysaccharides participent activement chez les algues à la physiologie de la cellule : ils interviendraient dans les échanges nutritionnels et dans la régulation de la pression osmotique interne. De plus, les propriétés physiques et mécaniques des parois sont intimement liées à la structure et à la composition de ces molécules. Ainsi, les modifications de composition des polysides observées pendant la croissance entraînent des bouleversements de la paroi. Une partie des polysides est libérée dans le milieu extérieur : elle influence la croissance des cellules qui les produisent (MORVAN 1982) dans la mesure où l'évolution des propriétés mécaniques et des charges des polysaccharides modifie l'image qu'a la cellule de son environnement ionique et/ou nutritionnel. Ces remaniements intéressent particulièrement les physiologistes, car ils témoignent au travers des modifications de propriétés d'une adaptation poussée des algues à leur environnement.

L'équipe au sein de laquelle le présent travail a été réalisé a axé particulièrement ses recherches sur la structure, le rôle, la physiologie et la production des polysaccharides pariétaux des végétaux cultivés *in vitro*. Son but est d'étudier les polysides de la phase squelettique et de la phase matricielle, leur évolution dans le temps, leur rôle et les conditions physiologiques de leur mise en place.

Parmi les modèles végétaux qui peuvent être utilisés pour de telles investigations, les algues rouges sont un matériel particulièrement apprécié car elles produisent dans leur paroi cellulaire des polysaccharides aux propriétés gélifiantes intéressant l'industrie des colloïdes. L'agar-agar est l'un de ces mucilages, principalement extrait d'une Rhodophycée : *Gracilaria verrucosa*. Cette espèce fait

l'objet, depuis plusieurs années, de nombreuses études morphogénétiques et biochimiques. Il importait donc de relier les transformations de ce colloïde au cours du temps aux conditions physiologiques du développement de l'algue. Ce mémoire constitue une approche de la Physiologie de la production d'agar dans les parois des cellules de *Gracilaria verrucosa*.

Pour bien comprendre le rôle physiologique de l'agar-agar, une revue bibliographique analysera dans une première partie les travaux relatifs à ce type de mucilage. Ils seront interprétés comme une vision qu'a le cytoplasme du milieu extérieur à travers la paroi. Les problèmes liés à l'évolution des structures pariétales lors de la croissance, en fonction des paramètres physico-chimiques de culture, de l'âge et de l'état physiologique des thalles seront évoqués. Ils serviront à définir les hypothèses de travail qui ont motivé les expérimentations présentées dans la troisième partie du mémoire. Dans cette partie, nous essayerons en particulier d'isoler des parois de Gracilaires afin de définir ce que signifient les variations de rendement en agar au niveau pariétal. Les rôles des facteurs physiques du milieu seront ensuite analysés : la température et l'éclairement contrôlent-ils la production et la qualité biochimique de l'agar ? La nutrition azotée sera également traitée : l'azote agit-il uniquement comme effecteur de croissance, ou bien exerce-t-il un rôle direct sur la production de colloïdes ? Enfin, une étude comparative de l'agar extrait en fonction de l'âge des tissus permettra de mieux comprendre l'évolution de la paroi au cours de la croissance de l'algue. La quatrième partie discutera les résultats obtenus et la conclusion sera une tentative de synthèse sur l'ensemble des phénomènes liés à la physiologie de la production d'agar dans les parois des cellules de *Gracilaria verrucosa*.

1ère PARTIE

HISTORIQUE

La nécessité d'une revue hexaustive de l'ensemble des travaux sur les mucilages des macroalgues n'est plus d'actualité depuis que des publications récentes et régulières ont grandement traité la question (PERCIVAL 1970, 1979 ; TURVEY 1978 ; CHAPMAN et CHAPMAN 1980 ; McCANDLESS 1982 ; BODARD *et al.* 1983 ; KLOAREG 1984). La bibliographie présentée dans ce manuscrit est donc volontairement limitée aux seules Rhodophycées lorsque la littérature le permet. L'étude s'intéresse à la paroi cellulaire du point de vue de la physiologie des constituants polyosidiques. L'interprétation des rôles physiologiques propres à ces composés sera appréciée comme le mode de relation privilégié du cytoplasme avec son milieu et réciproquement. Cette attitude "mécaniste" d'observation des échanges cellule-milieu devrait permettre de mieux comprendre le sens et l'évolution de ces phénomènes. Elle présente l'avantage de considérer la paroi, et donc les polysaccharides qui la constituent, comme un compartiment cellulaire à part entière ayant une fonction d'interface entre le milieu et le cytoplasme.

La conceptualisation de ce point de vue exige la connaissance de l'agencement et de la composition des structures pariétales, lors de modifications dues à un déplacement des équilibres physico-chimiques du milieu. Les nouveaux états d'équilibre thermodynamique admis par la paroi permettront de comprendre l'adaptation de la cellule à son nouvel environnement.

Cette historique résume l'état actuel des connaissances sur la structure de la paroi, de manière à situer les composés mucilagineux qu'elle contient. L'agar-agar sera défini puis envisagé du point de vue physiologique à travers la description des rôles et des variations des polyosides matriciels de la paroi.

I. - STRUCTURE DE LA PAROI

L'étude ultrastructurale de la paroi apporte de précieux renseignements sur la localisation des polysaccharides *in vivo*. Schématiquement, la paroi des algues rouges peut être ramenée à un système à deux phases : une phase cristalline encore appelée squelette dispersée au sein d'une phase amorphe, la matrice extracellulaire. Observée en microscopie optique, elle présente deux régions distinctes : la paroi **sensu stricto** formée d'une succession de couches stratifiées noyées dans la matrice extracellulaire, et les espaces intercellulaires qui sont remplis par la matrice.

A. - La phase squelettique

C'est la partie opaque aux électrons en microscopie électronique. Chez les Rhodophycées, elle est essentiellement composée de xylanes, de mannanes (PERCIVAL 1970) et de cellulose (ROSS 1953 ; 1 % à 8 % de la matière sèche). Cependant, la présence de cellulose ne peut être généralisée à l'ensemble des algues rouges (PRESTON 1968). Ainsi, contrairement aux résultats obtenus par ROSS (1953), FREI et PRESTON (1964) ne trouvent pas trace de cellulose chez *Porphyra ombilicalis*. Elle est par contre toujours présente dans la couche la plus interne des Floridéophycidées (MYERS et al. 1956). En ce qui concerne *Gracilaria verrucosa*, aucune référence ne fait état de cellulose.

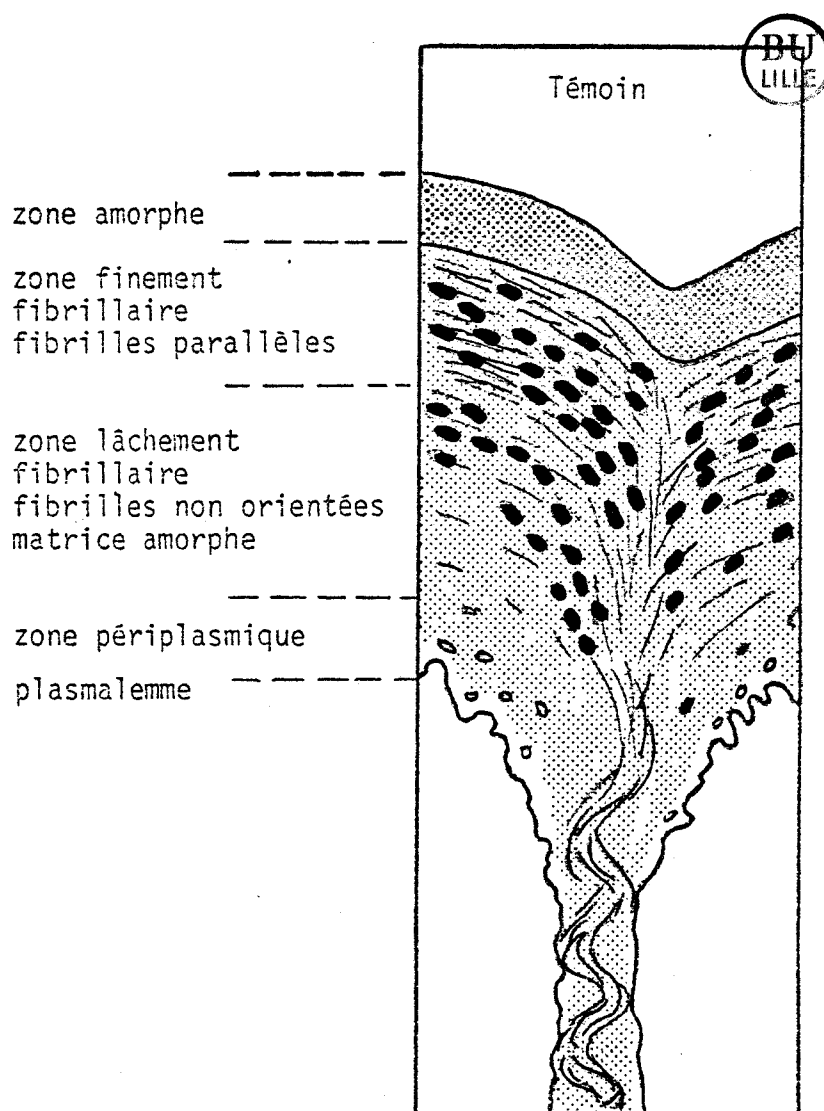
Ces composants de la phase squelettique sont organisés en réseaux de micro-fibrilles généralement orientées tangentiellement par rapport à la surface de la cellule. Chez *Gracilaria verrucosa*, les fibres sont déposées en strates concentriques alternant avec des amas denses issus de vésicules périplasmiques (VERDUS et al. 1984). L'organisation est en relation directe avec la croissance de l'algue : elle détermine l'orientation des micro-fibrilles et l'épaisseur des couches par apposition de strates nouvelles. Ceci se traduit à l'observation par des zones bien distinctes (DAWES et al. 1961 ; McCANDLESS et al. 1977 ; AKATSUKA et IWAMOTO 1979) : la strate interne, la plus récente, la strate médiane puis externe la plus dense en micro-fibrilles chez *Gracilaria verrucosa* (fig. 1). Cette disposition des strates est différente de ce qui est observé habituellement chez les autres algues.

B. - La phase matricielle

La matrice contient des polysaccharides gélifiants encore appelés mucilages (MACKIE et PRESTON 1974). Ils sont regroupés sous la dénomination générale de polysides matriciels.

Les mucilages forment un continuum apparemment amorphe depuis le plasmalemme jusqu'à la cellule voisine. Comme dans le cas de la trame fibrillaire, leur épaisseur et leur composition varient suivant la localisation dans la paroi. Elles sont différentes dans les cellules corticales, médullaires et épidermiques. On retrouve également ces polysaccharides dans la matrice inter-cellulaire.

FIGURE 1
ULTRASTRUCTURE DE LA PAROI DE GRACILARIA VERRUCOSA
(d'après VERDUS 1984)



En résumé, la phase matricielle peut être assimilée à un réseau maillé dont l'armature est constituée par des mucilages fibrillaires dont les vides sont remplis par un mucilage amorphe (KLOAREG 1984).

C. - Stratification et dépôts secondaires

La structure bipartite de la paroi, observée chez certains thalles, pourrait préfigurer la distinction entre paroi primaire déposée pendant la phase de croissance et d'élongation et paroi secondaire mise en place plus tardivement. Cependant, les différences observées en microscopie ne sont pas dues à un changement d'orientation des microfibrilles, donc à une différence d'organisation du matériel fibrillaire. Ce dernier est en effet entrecroisé au hasard sur toute l'épaisseur des parois (DAWES et al. 1961). Une modification du rythme de dépôts qui se traduit à l'observation par une zone plus claire pourrait expliquer cette stratification, à l'image de ce qui est rencontré chez certains végétaux supérieurs (REIS 1984). Il n'y aurait pas dans ce cas de véritable différenciation entre paroi primaire et paroi secondaire.

De récents travaux viennent renforcer cette dernière hypothèse. Chez *Antithamnion* (YOUNG 1980), le mode de dépôt est similaire à celui rencontré dans les parois secondaires des plantes supérieures, mais les phases diffèrent. Ainsi, les dépôts chez cette espèce commencent dès les jeunes stades de développement et continuent pendant la phase d'élongation cellulaire. Par contre, chez les végétaux supérieurs, les couches secondaires se mettent en place uniquement après l'élongation cellulaire (ESAU 1965). Ces couches, chez les macroalgues, ne peuvent donc pas être considérées en définitive, comme des dépôts secondaires *sensu stricto*.

Chez *Gracilaria verrucosa* (VERDUS et al. 1984), de tels dépôts sont retrouvés sur des coupes effectuées sur les parties âgées de thalles. Il est intéressant de noter que cet épaissement des parois s'effectue dans les plantes cultivées dans des conditions défavorables à la croissance. Ces dépôts pourraient favoriser la pérennité de l'espèce en renforçant la protection vis-à-vis des agressions physico-chimiques et mécaniques du milieu.

II. - AGAR-AGAR

A. - Structure de la molécule

L'agar fut découvert par PAYEN en 1859. Ce dernier détermina la nature glucidique du colloïde et le dénomma "gélose". Les travaux d'ARAKI ont été déterminants dans la connaissance de la molécule. ARAKI (1937) définit deux fractions : l'agarose et l'agaropectine. L'hydrolyse sulfurique à 6 % révèle la présence de 2, 4, 6 tri-0-méthyl-D-galactose (65 %) et de 3,6-anhydro 2, 4 di-0-méthyl-L-galactose (13 %). Cet auteur établit que les unités de D-galactose se présentent sous la forme pyranique et sont liées en C1-C3. Il donna en 1956 la structure de l'agarose. Il montra en 1966 que le peu d'ester sulfurique de l'agar est fixé en C6 au L-galactose. Enfin, il proposa pour la structure de l'agaropectine une répétition des mêmes unités que l'agarose, mais dans laquelle le L-galactose serait remplacé par du galactose sulfate, et certains D-galactoses par l'acide pyruvique. Depuis, les études d'IZUMI (1970) et de YAPHE et DUCKWORTH (1971) ont montré que ce gélifiant recouvre une famille de polysaccharides qui passe d'un galactane sulfate à une molécule neutre d'agarose riche en 3,6-anhydrogalactose. Le motif de base est constitué de deux sous-unités de galactose alternativement reliées par des liaisons β -1-4 et α -1-3 (YAPHE 1960). Le modèle idéal est représenté par l'agarose qui est un 3,6 anhydro-4-0-(D-galactopyranosyl)-L galactose (fig. 2). Des esters sulfates et des éthers méthyliques peuvent se substituer sur le carbone 6.

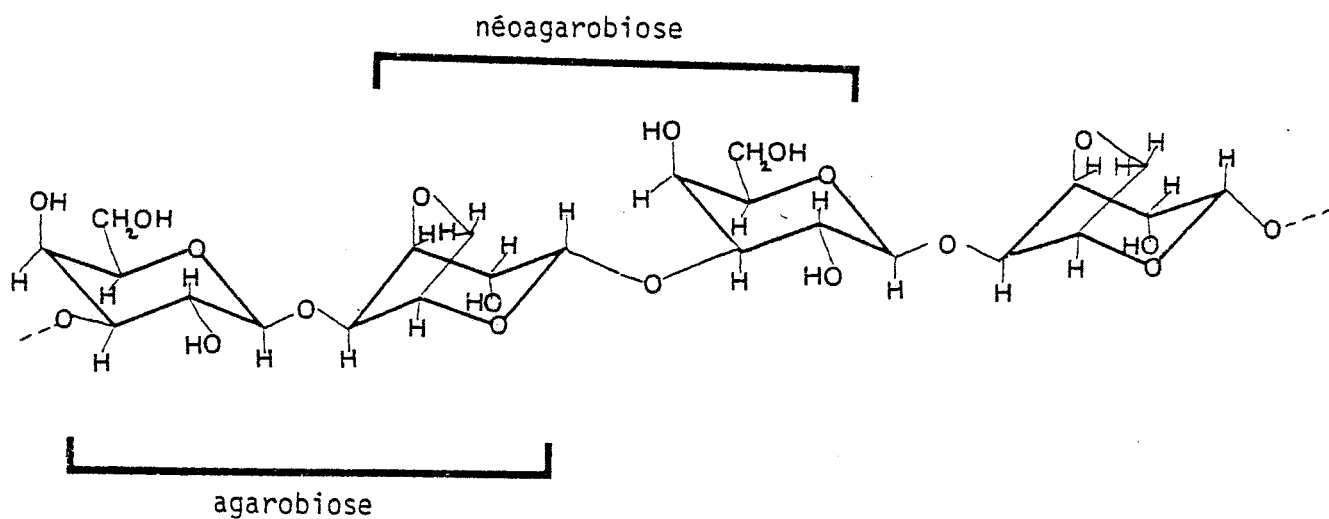
Ce colloïde est principalement extrait des *Gelidium*, de quelques espèces de *Gracilaria* dont *Gracilaria verrucosa*, d'*Acanthopeltis japonica* et *Ahnfeltia plicata* (CHAPMAN et CHAPMAN 1980).

B. - Propriétés de l'agar-agar

L'agar-agar est un polysaccharide qui possède des propriétés gélifiantes : le gel est obtenu lorsque la température redevient inférieure à 40-50 degrés centigrades. Cette température de gélification est en relation étroite avec la teneur en substituants méthyl (GUISELEY 1970). Par contre, le point de fusion se situe autour de 90-100°C ce qui est un caractère marqué d'hystérèse.

FIGURE 2

MOLECULE D'AGAROSE



La force de gel varie selon les espèces (NELSON et al. 1983) et selon les saisons (CHRISTIAEN 1981 ; NELSON et al. 1983). Elle dépendrait, selon TSUCHIYA et HONG (1966), de la proportion d'agarose dans la molécule par rapport à l'agaropectine. Cette notion de force de gel a été précisée par REES (1969) : elle est liée au nombre de ponts 3,6-anhydrogalactose qui accentuent le pas de l'hélice en imprimant une torsion à l'hétérocycle. Ces ponts 3,6-anhydrogalactose se formeraient par élimination d'un sulfate en C6. Mais la relation entre la teneur en sulfates, la force du gel et la teneur en 3,6-anhydrogalactose n'est pas toujours évidente chez les Gracilaires (DUCKWORTH et al. 1971). Selon NELSON et al. (1983), il n'y aurait apparemment aucun lien entre la force du gel et la teneur en 3,6-anhydrogalactose chez *Gracilaria edulis* et *Gracilaria lichenoides*. Par contre, CHOU (1973) et YANG (1982) ont montré l'existence d'une relation entre le contenu en 3,6-anhydrogalactose et la force du gel chez plusieurs espèces de Gracilaires. Il est difficile de trancher dans l'état actuel des connaissances, car les techniques de dosage qui diffèrent selon les auteurs ne permettent guère de comparaisons.

III. - ROLE DES POLYOSIDES MATRICIELS

Les algues sur l'estran sont soumises à d'importantes modifications chimiques et physiques du milieu liées à l'alternance émergence-immersion. Il semblerait que les polyosides de la paroi soient utilisés par la cellule pour réguler ces contraintes imposées par le milieu.

A. - La régulation hydrique

La paroi des algues marines semble jouer un rôle important dans la régulation de la turgescence et de la pression osmotique interne. Ainsi, plus la paroi est épaisse et rigide, plus la pression osmotique interne est élevée (KAUSS 1976). De plus, la paroi est composée de polysaccharides qui présentent un fort caractère hydrophile. Ils forment avec l'eau une matrice qui est certainement impliquée dans des processus de régulation de turgescence à court terme (KAUSS 1976).

Selon ZIMMERMAN (1978), la paroi pourrait également être impliquée dans les mécanismes de reconnaissance de variations de pression osmotique externe. Cependant, aucune expérience n'a pu à ce jour confirmer ou infirmer cette théorie.

QUILLET et DE LESTANG (1972) ont noté que la teneur en sulfates des fucoidanes, qui augmente depuis les bas niveaux (*Laminaria*) jusqu'aux hauts niveaux (*Pelvetia*), contribue à augmenter la résistance à la dessiccation et aux fortes pressions osmotiques liées aux alternances émergence-immersion.

B. - Régulation des "relations ioniques"

Ce point particulier a fait l'objet d'une étude récente chez les Fucales. KLOAREG (1984) a tenté de mettre en évidence le rôle supporté par les fucoidanes dans la régulation physiologique des flux ioniques comme échangeurs d'ions, sans besoin énergétique. Cependant, rien ne permet pour l'instant de dire que les fucanes ont un comportement échangeur spécifique. De toute façon, ce comportement de la paroi comme résine échangeuse d'ions n'est pas généralisable au cas de l'agar qui est un composé peu chargé. Il faut donc pour ce cas particulier envisager un rôle mécanique.

C. - Régulation "mécanique"

Les propriétés mécaniques de la paroi sont fonction de la proportion entre les polymères squelettiques et matriciels (NORTHCOTE 1982). Ces derniers pourraient intervenir en tant que lubrifiant facilitant les coulissements des fibres squelettiques au cours de l'élongation cellulaire. Les gels peuvent également jouer un rôle de protection mécanique : ils sont suffisamment fluides et élastiques pour amortir les chocs dus aux mouvements (NORTON et al. 1982). Corollaire logique, il existerait une relation entre la structure des gels pariétaux et l'exposition de l'algue. Une rigidité plus importante des tissus est en effet relevée chez les Rhodophycées en mode abrité qu'en mode battu (REES et CONWAY 1972). Enfin, la rigidité des gels pourrait constituer un contrôle biologique de la croissance et assurer la pérennité de l'algue en renforçant ses propriétés mécaniques. Cette théorie est bien illustrée par les variations du rapport mannuronique/guluronique (M/G) dans les différentes parties de la laminaire en fonction de leurs rôles respectifs. Ainsi, la fronde souple est riche en blocs MM et le stipe rigide riche en blocs GG .

IV. - VARIATIONS DE COLLOIDES DANS LES ALGUES

Les résultats des travaux sur les variations de colloïdes sont très contradictoires et il est difficile de faire la part des choses. Il apparaît néanmoins que les teneurs en agar varient au sein d'une même espèce suivant la localisation géographique et suivant le stade de développement. Ainsi WHYTE *et al.* (1981) ont montré que les rendements et la force du gel des plantes cystocarpiques sont supérieurs à ceux des plantes tétrasporophytiques et végétatives chez *Gracilaria verrucosa*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de KIM et HENRIQUES (1979), excepté pour la force de gel qui est plus faible chez les plantes cystocarpiques. Par contre, PENNIMAN (1977) trouve peu de variations entre les différents stades du cycle de *Gracilaria foliifera*. De même, HOYLE (1978-a) ne relève pas de différence significative de rendement en agar et de force de gel entre les pieds mâles, femelles et tétrasporophytiques de *Gracilaria bursapastoris* et de *Gracilaria coronopifolia*. Cette dernière expérience est cependant critiquable dans la mesure où les prélèvements ont été effectués à un seul moment de l'année, et dans la mesure où les écarts-types des résultats sont très grands.

Les facteurs climatiques pourraient être également à l'origine de variations de rendement en agar. En effet, de nombreux auteurs s'accordent à penser que la production de colloïdes suit des cycles saisonniers (UMAMAHESWARA RAO 1969 ; JOHN et ASARE 1975 ; OZA 1978 ; HOYLE 1978b ; CHRISTIAEN 1981 ; DIEPH MINH TAM et EDWARDS 1982). Mais il est difficile de faire une synthèse de ces travaux et d'en tirer une réflexion générale. Une grande disparité dans les techniques d'analyse est en effet observée, notamment pour les extractions de colloïdes. Par exemple, MUTTUTAMBY et NEUSON (1981) ne relèvent pas de variations de la teneur en colloïdes après extraction avec attaque alcaline. Or l'attaque alcaline à la soude est connue pour renforcer la force du gel au détriment du rendement global. Ces dosages ne sont donc pas représentatifs de l'agar "in vivo".

Le courant de pensée actuel est cependant en faveur d'une biosynthèse des polysaccharides sous contrôle de certains paramètres du milieu. Elle peut se résumer à deux voies métaboliques alternatives : croissance ou élaboration de mucilage.

Cette hypothèse est étayée par les travaux de NEISH et SCHACKLOCK (1971) qui ont remarqué qu'en milieu enrichi en azote, les algues avaient une croissance rapide avec accumulation de protéines, au détriment de la synthèse des polysaccharides (effet NEISH). De même, MOSHIN et PATWARY (1983) relèvent une corrélation négative entre le contenu en azote de *Gracilaria tikvahiae* et la teneur en agar. Selon HOYLE (1978), cette relation entre biomasse et agar serait purement accidentelle et ce serait la teneur en azote qui gouvernerait les rendements en colloïdes. Le lien entre l'azote et la production de colloïdes n'est par conséquent pas encore clairement défini.

Il semblerait que la température joue également un rôle important dans le contrôle des synthèses de colloïdes. Mais à l'inverse de WANG et YANG (1980) qui trouvent une corrélation négative entre la température et la teneur en mucilage, JOHN et ASARE (1978) observent les rendements les plus élevés lorsque la température de l'eau est à son maximum. Le type d'influence n'est toujours pas connu.

La revue bibliographique qui vient d'être faite, met en évidence un grand nombre de contradictions et l'absence de théorie précise sur la physiologie de la production d'agar dans les parois des cellules de *Gracilaria verrucosa*.

La synthèse des travaux sur ce sujet permet néanmoins de formuler certaines hypothèses qui serviront à la définition des protocoles expérimentaux.

2ème PARTIE

HYPOTHESES DE TRAVAIL

et

PRINCIPES METHODOLOGIQUES

I. - HYPOTHESES DE TRAVAIL

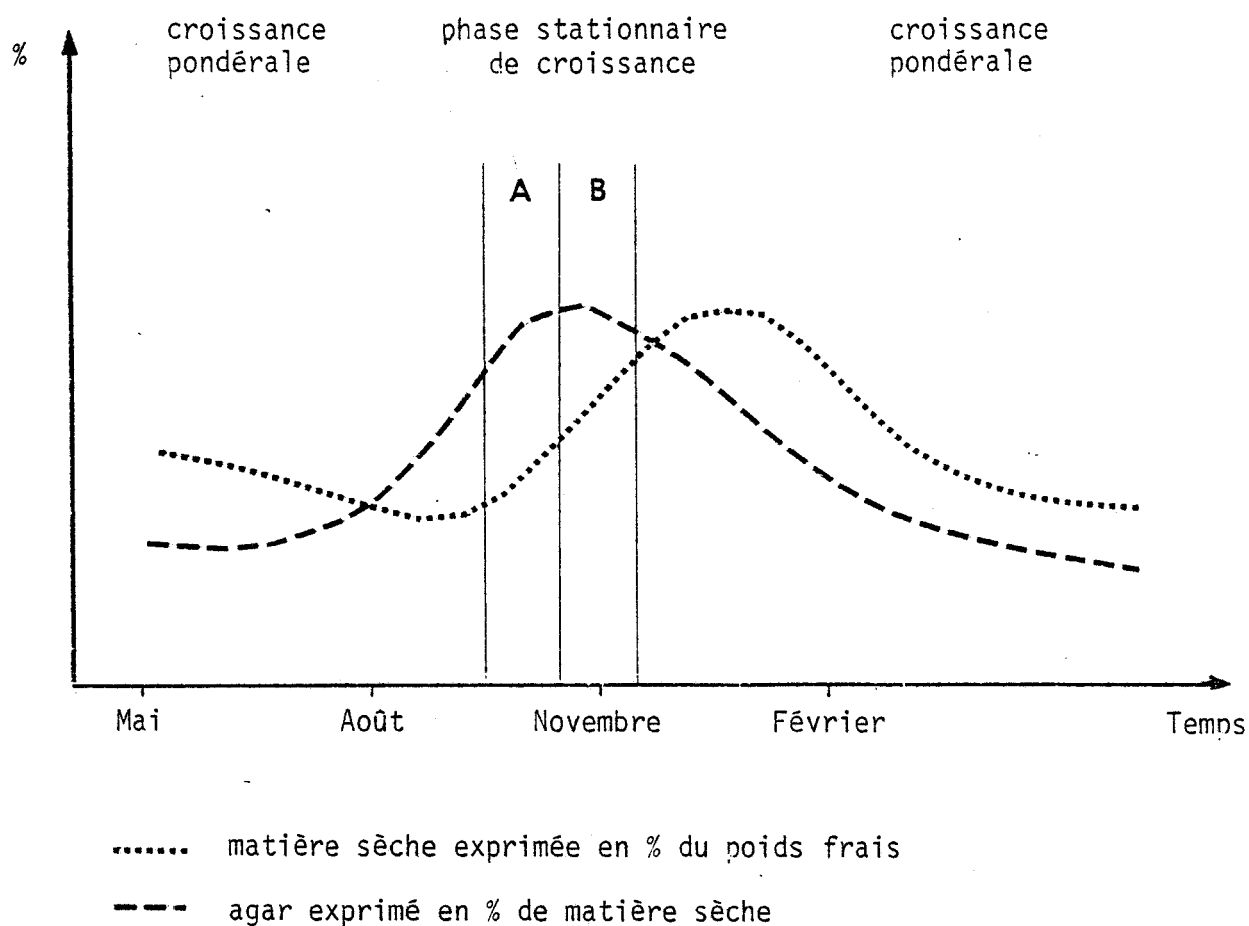
L'interprétation des données des variations saisonnières d'agar obtenues par CHRISTIAEN (1981) sur *Gracilaria verrucosa* dans son habitat naturel permet de dégager une hypothèse sur les mécanismes physiologiques qui déterminent la synthèse de colloïdes. Cette hypothèse s'appuie sur les courbes de la **figure 3** qui représentent les variations des teneurs d'agar et de matière sèche (en %). Elles sont établies sur une année à partir de relevés trimestriels. Elles permettent d'appréhender les grandes tendances métaboliques de l'algue au cours de son développement. De fait, la courbe des rendements en agar est toujours décalée dans le temps par rapport à la courbe de croissance. Ce décalage pourrait signifier, en terme de synthèses, que l'algue constitue en phase de croissance des réserves carbonées qui contribueraient à l'augmentation de biomasse. La quantité d'agar augmenterait peu pendant la croissance. L'agar serait alors synthétisé plus rapidement dans un deuxième temps pour atteindre un optimum de production après la période de croissance. Au cours de cette période, il n'y aurait plus de synthèse de matière sèche (hors agar), ce qui expliquerait l'augmentation des rendements en colloïdes.

Cette vision physiologique permet de lever certaines contradictions dénoncées plus haut. En effet, les résultats décrits dans la littérature ne prennent leur entière signification que s'ils sont compris par rapport à la période de prélèvement des échantillons. De fait, selon le stade de développement de l'algue et donc selon les saisons, les relations entre les différentes composantes de l'algue peuvent se modifier voir totalement s'inverser, d'où l'imbroglio.

L'exemple tiré de la **figure 3** illustre bien ce qui vient d'être dit. La zone A fait apparaître une augmentation des teneurs de matière sèche et d'agar. La zone B, contigüe, met en évidence un gain de matière sèche et une diminution des rendements en colloïdes. Par conséquent, le moment de l'analyse détermine le sens des relations entre la croissance et la production d'agar.

FIGURE 3

VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR (EXPRIMES EN % DE MATIERE SECHE)
 ET DES TENEURS DE MATIERE SECHE (EXPRIMEES EN % DU POIDS FRAIS),
 DE *GRACILARIA VERRUCOSA*, EN FONCTION DES SAISONS



La théorie qui vient d'être présentée demandait à être vérifiée. Elle constitue l'hypothèse de travail autour de laquelle sont articulées toutes les recherches décrites dans ce mémoire. La première étape consiste donc à montrer s'il y a accumulation d'agar dans la paroi des Gracilaires placées dans des conditions défavorables à la croissance. Seule la comparaison entre les teneurs en colloïdes dans des parois isolées de thalles cultivés dans des conditions simulant le printemps ou l'hiver pouvait en donner l'assurance. Cette étude qui permet de s'affranchir des variations dues au cytoplasme, lève ainsi toute hypothèque. Elle conditionne l'opportunité de la suite des manipulations. Une investigation en microscopie électronique de cette zone, complète et étaye nos résultats.

Ce point résolu, il importait de concevoir une expérimentation dans laquelle les conditions naturelles de développement sont reproduites "in vitro". Un contrôle rigoureux de la température, de l'énergie lumineuse et de la durée d'éclairement et de l'engraissement en azote permet d'évaluer leur influence sur la production de colloïdes. En effet, de nombreux auteurs s'accordent à montrer l'antagonisme croissance-production d'agar qui s'exprime en fonction des paramètres du milieu. Il était donc important de dégager les effets inducteurs ou limitants de manière à préciser les processus physiologiques qui en découlent.

La compréhension plus détaillée de ces phénomènes nécessite en outre la définition des transferts de matière sèche du cytoplasme vers la paroi selon le stade de développement du thalle. Des expériences ont ainsi été menées sur des Gracilaires de manière à dégager le rôle de la photosynthèse et de la nutrition azotée sur la production de colloïdes.

Enfin, si l'activité pariétale est un phénomène continu déphasé dans le temps par rapport à la croissance cellulaire, la culture d'algues en conditions alternées "printemps-hiver" devrait mettre en évidence les remaniements des composés colloïdaux de la paroi au cours des différentes saisons.

A partir de ces hypothèses de travail, un certain nombre de principes méthodologiques ont été proposés.

II. - PRINCIPES METHODOLOGIQUES

A. - Expression des résultats

Une nouvelle démarche pour l'expression des résultats a été adoptée. Généralement, les auteurs utilisent des valeurs relatives, c'est-à-dire des pourcentages. Ces résultats représentent les variations des divers éléments constitutifs de l'algue (agar, matière sèche....), les uns par rapport aux autres, mais traduisent mal les synthèses. Par exemple, une augmentation de la teneur de matière sèche par rapport au poids frais traduit-elle une synthèse de matière sèche? Est-ce le résultat d'un départ d'eau ou le résultat de ces deux processus combinés ?

Chaque mesure est donc rapportée à la biomasse des algues en culture au moment du prélèvement. La valeur absolue ainsi obtenue est comparée aux valeurs de départ, et la différence traduit l'évolution dans le temps de chaque élément de l'algue en fonction des facteurs du milieu.

Les résultats seront présentés en valeurs absolues et en valeurs relatives pour bien mettre en évidence les différences d'information apportées selon le mode d'expression.

B. - La culture d'algues

L'idée principale était de recréer les conditions extrêmes de température et d'éclairement relevées sur nos côtes au cours des différentes saisons, afin d'induire des modifications dans la paroi. Une température de 5°C, une photopériode de 8:16 et un éclairement de 5×10^{-3} ergs. cm⁻².s⁻¹ simulent "l'hiver", contre 18°C, 16:8 et 17×10^{-3} ergs. cm⁻². s⁻¹ pour le "printemps".

Les algues sont récoltées au "Cran aux Oeufs" près du Cap Gris-Nez. Les échantillons sont débarrassés de leurs épiphytes et nettoyés aux ultrasons (15 secondes dans une cuve BRANSONIC). Les Gracilaires sont cultivées dans des cuves en plastique dont la taille est fonction de l'ensemencement de manière à ce qu'il ne dépasse pas 10 kg par mètre cube d'eau. Ces cuves sont recouvertes de cellophane pour limiter l'évaporation qui est à l'origine d'hypersalinité. Une alimentation en air comprimé assure le maintien du taux de dioxyde de carbone dissous et l'agitation du milieu. L'eau de mer est renouvelée deux fois par semaine afin que les éléments

minéraux du milieu ne s'épuisent pas. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents SYLVANIA type "GROLUX", couplés à une horloge programmable qui contrôle la durée d'éclairage.

Les mesures de croissance ont fait l'objet d'un soin particulier afin que les résultats conservent une signification statistique. Le poids frais est déterminé par pesée après élimination de l'eau superficielle par centrifugation à 160 tours/mn dans une essoreuse THOMAS. La teneur en matière sèche est calculée après lyophilisation pendant 24 heures.

C. - Isolement de parois

Les grands principes d'isolement de parois de Fucales sont respectés. Les algues sont broyées grossièrement au POLYTRON. Le contenu cellulaire est dispersé par sonication dans le milieu, après plasmolyse dans un tampon trois fois molaire. La presse de French qui provoque une alternance de compression et de décompression fragmente les amas pluricellulaires restant. A chaque étape, les parois sont lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée, puis centrifugées. Le surnageant est éliminé. Un contrôle en microscopie optique est effectué à intervalles réguliers pour juger de l'efficacité du traitement. Après lyophilisation, les parois se présentent sous la forme d'une poudre blanchâtre.

Dans une manipulation préliminaire, nous avons tenté d'appliquer cette technique d'isolement de parois mise au point pour les Fucales (KLOAREG 1984) sur le *Gracilaria verrucosa*. Le broyage au "polytron" a donné de médiocres résultats. La Gracilaire possède en effet une cuticule résistante et élastique difficile à rompre. Un broyage dans un mortier sur du matériel congelé à l'azote liquide n'a pas apporté d'amélioration. A la fin du traitement, les cellules étaient encore associées en amas de 5 ou 6. De plus, les algues restaient pigmentées par les phycoérythrones.

Le protocole originel a donc été modifié, essentiellement dans les premières étapes. Le matériel d'étude est lyophilisé puis broyé dans un broyeur à bille (RETSCH). Sous cette forme, il présente deux avantages par rapport au matériel frais. D'une part les isollements sont effectués directement sur de la matière sèche, et d'autre part la poudre obtenue est très fine et très homogène. Les phycoérythrones qui sont des protéines solubles sont extraites par un tampon tris HCL pH 6,7, de préférence à une eau distillée additionnée de formol préconisée dans la méthode

originelle. De plus, le chlorure de calcium qui sert à protéger la structure des alginates n'est plus utilisé, et le sorbitol remplace le glucose pour la plasmolyse. Ce dernier, risque en effet, d'interférer, dans des analyses, avec les sucres libérés par l'algue dans le surnageant.

Compte tenu de ces remarques, le protocole suivant a été utilisé :

- nettoyer les algues aux ultrasons et lyophiliser pendant 24 h à 5°C ;
- broyer le lyophilisat pendant 10 mn au broyeur à billes ;
- resolubiliser un gramme de poudre pendant 3 heures à 4°C dans un pot à centrifuger contenant 60 ml d'eau distillée ;
- centrifuger à 750 t/mn pendant 15 mn. Eliminer le surnageant ;
- reprendre le culot par 60 ml de tampon Tris-HCl pH 6,7 pendant 30 mn (4°C) pour extraire les protéines solubles (phycoérythrine, enzymes) ;
- centrifuger à 750 t/mn pendant 15 mn . Récupérer le culot ;
- répéter l'opération trois fois ;
- ajouter 30 ml d'eau distillée et passer aux ultrasons 2 fois 1 mn, registre 4-"high" ;
- compléter à 60 ml, homogénéiser et centrifuger à 750 t/mn ;
- plasmolyser le culot pendant 12 heures dans 25 ml de sorbitol 3 M ;
- décanter, éliminer le surnageant ;
- rincer 4 fois avec 40 ml d'eau distillée et centrifuger à 500 t/mn pendant 10 mn ;
- éliminer le surnageant (amidon entre autre) ;
- ajouter 30 ml d'eau. Passer 4 fois aux ultrasons pendant 1 mn (registre 4" high") ;
- centrifuger à 750 t/mn pendant 10 mn ;
- plasmolyser le culot dans 25 ml de sorbitol 3 M pendant 2 heures ;
- centrifuger à 1000 t/mn pendant 10 mn ;
- laver le culot avec 40 ml d'eau et centrifuger à 350 t/mn pendant 10 mn ;
- ajouter 30 ml d'eau distillée. Passer aux ultrasons 2 fois 1 mn ;
- centrifuger à 500 t/mn pendant 10 mn et laver 4 fois le culot avec 60 ml d'eau distillée ;
- effectuer 4 passages à la presse de French, pression 2500 psig, régime médium ;
- centrifuger à 500 t/mn pendant 10 mn. Eliminer le surnageant ;

- ajouter 30 ml d'eau distillée . Passer 2 fois aux ultrasons pendant 1 mn ;
- reprendre le culot pendant 12 heures par une solution de triton X-100 à 0,1% ;
- centrifuger et rincer 4 fois avec 60 ml d'eau distillée ;
- passer 2 fois aux ultrasons pendant 1 mn (registre 4 high) ;
- centrifuger à 500 t/mn pendant 10 mn ;
- reprendre le culot par 60 ml d'acétone. Centrifuger à 500 t/mn pendant 10 mn ;
- laver 4 fois avec 60 ml d'eau distillée. Centrifuger à 500 t/mn pendant 10 mn ;
- lyophiliser 24 heures à 5°C.

D. - Extraction de l'agar

L'extraction d'agar est une étape clef de chaque expérience. La technique de CRAIGIE et LEIGH (1978) a été retenue moyennant quelques modifications. Elle a l'avantage d'être reconnue comme un "standard international". De plus, les résultats obtenus par cette technique d'extraction drastique peuvent être comparés avec ceux de méthodes plus douces, comme celle mise au point au laboratoire par CHRISTIAEN (1978) (VERDUS et al. 1984).

Les algues fraîches sont rincées à l'eau distillée, nettoyées par sonication et pesées après centrifugation à 160 tours/mn pendant 15 secondes. Des échantillons de 15 grammes sont congelés à - 80°C, puis lyophilisés pendant 24 heures à 15°C. Le lyophilisat est pesé pour déterminer le pourcentage de matière sèche, puis il est réduit en poudre pendant deux minutes dans un broyeur à bille (RETSCH). Les pigments et les phénols sont solubilisés par l'acétone puis l'éthanol et éliminés. 1,3 à 1,5 grammes de poudre sont placés dans 25 ml d'acétone. Après décantation, le surnageant est évacué. Le culot est repris par de l'éthanol 80 % bouillant puis filtré sous pression avec un filtre sans cendre WHATMAN 44. La poudre récupérée sur le filtre est déshydratée par l'éthanol absolu et séchée pendant 24 heures dans une étuve à 60°C.

Un gramme de cette poudre est réhydraté pendant 12 heures dans 75 ml d'eau bi-distillée pH 6,3. Le tout est autoclavé trois heures à 121°C. La solution est ensuite filtrée sous pression à 12 µm dans un dispositif de filtration préalablement chauffé à

120°C pour éviter les problèmes de colmatage. Le filtrat est récupéré dans des boîtes de Pétri en pyrex. Après la prise en masse à la température de la pièce, le gel est congelé 24 heures, puis décongelé. Il est rincé quatre fois avec de l'eau distillée puis déshydraté avec de l'éthanol absolu. Le poids d'agar est calculé après 24 heures dans une étuve à 60°C.

E. - Dosages des sucres

Des dosages biochimiques des composés de l'agar sont réalisés pour appuyer les argumentations. Le 3,6-anhydrogalactose est dosé selon la méthode au résorcinol de YAPHE (1960). Les oses totaux sont dosés par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique de TILLSMAN et PHILIPPI (1929) modifiée par RIMINGTON (1931). La quantité de galactose est estimée en soustrayant la quantité de 3,6-anhydrogalactose à la quantité d'oses totaux.

F. - Dosage des phycoérythrine

Les phycoérythrine sont extraites sur du matériel frais congelé à l'azote liquide puis conservé à - 80°C :

- 250 mg sont broyés dans un mortier à 4°C avec du sable de Fontainebleau ;
- 6 ml d'eau sont additionnés ;
- le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 10 mn ;
- 1 ml de surnageant est prélevé et sa densité optique est mesurée à 565 nm.

La concentration est obtenue par la formule :

$$C = \frac{D.O. \times 1\ 000}{8.1 \times PF \cdot ml^{-1} \times \% MS}$$

coefficient d'extinction spécifique = 81 %.cm-1

C en mg de phycoérythrine/gramme de matière sèche

M.S. = matière sèche

P.F. = poids de matière fraîche

Un défilement de spectre effectué sur un échantillon montre que les pics d'absorbance maximum (fig. 4) sont identiques à ceux relevés dans la littérature (BISIACCHI 1975).

G. - Dosage de l'azote

Les teneurs en azote du thalle sont dosées par une ultramicro-méthode au Nessler (STRAUCH 1965). Cette méthode colorimétrique est dérivée de celle de Kjeldahl.

Le protocole est le suivant :

- Mettre 5 mg de poudre d'algue dans un tube en pyrex de 25 ml.
- Ajouter 0.2 ml de réactif de minéralisation. Le réactif de minéralisation est composé de 2 g de sélénium, de 250 ml d'acide sulfurique concentré et de 250 ml d'une solution saturée de sulfate de potassium.
- Minéraliser 1 heure à 320°C.
- Ajuster le volume à 10 ml avec de l'eau désionisée.
- Prélever 3 ml de solution. Ajuster le volume à 4 ml avec de l'eau déminéralisée. Ajouter 0.4 ml de réactif de Nessler en agitant vivement.

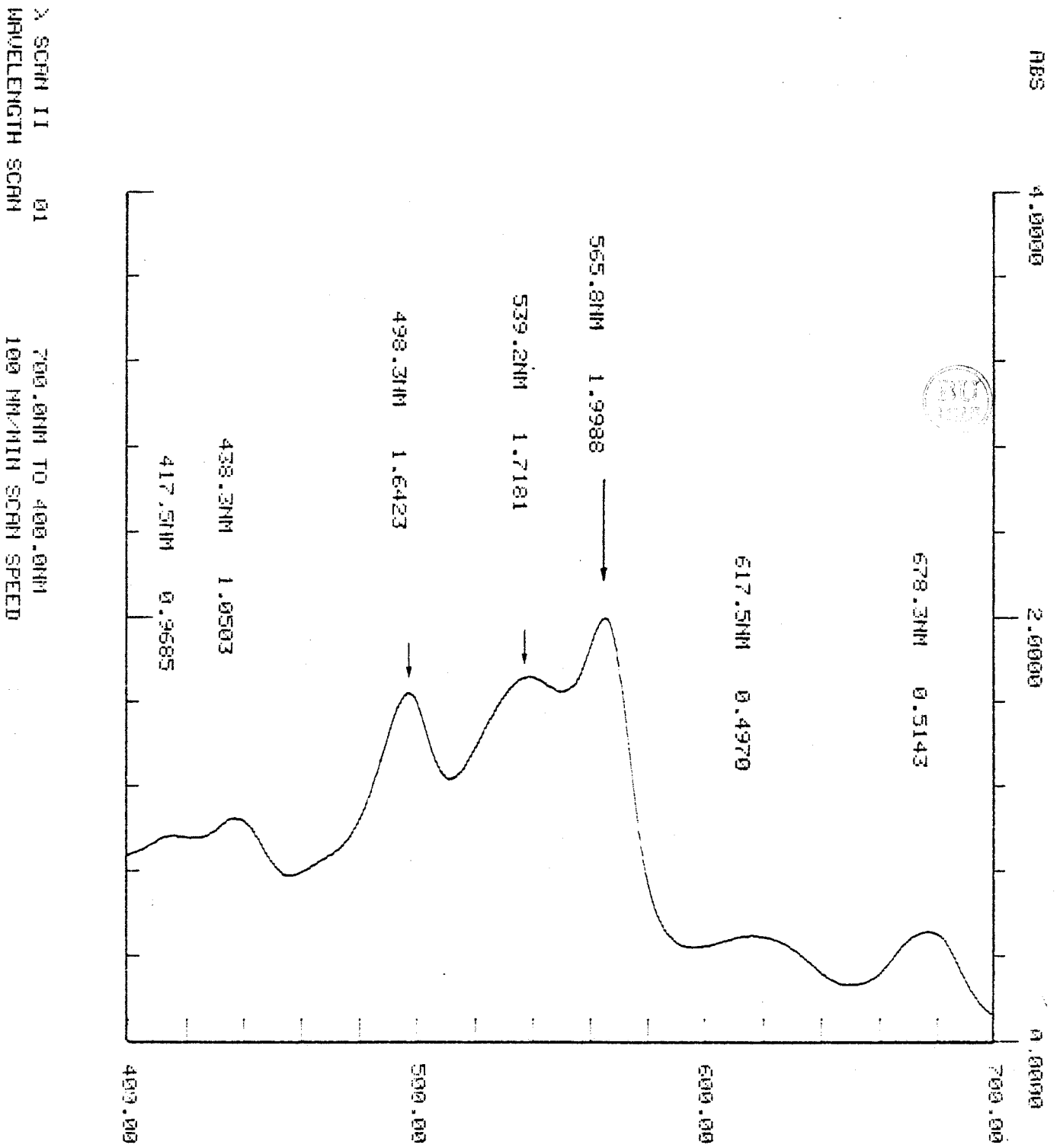
La méthode originelle préconise 2 ml de réactif de Nessler. Ce volume a entraîné, dans des manipulations préliminaires, une précipitation instantanée. Cette dernière disparaît pour des valeurs inférieures à 0.5 ml. A la suite d'essais, la valeur de 0.4 ml a été retenue.

L'intensité maximale de coloration est obtenue au bout de 10 mn. La couleur est stable pendant 3/4 d'heures environ à la température ambiante. La mesure de l'intensité de coloration est examinée à 500 nm. Les D.O. obtenues sont reportées sur une courbe étalon de sulfate d'ammonium qui est réalisée pour chaque série de dosage.

Cette technique de dosage d'azote, rapide à mettre en oeuvre, est reproductible dans le temps, mais surestime les quantités d'azote d'un facteur 1,2 en comparaison des résultats obtenus avec un ANALYSEUR CARLO ERBA MOD 1106.

FIGURE 4

SPECTRE D'ABSORBANCE DE LA R- PHYCOERYTHRINE



H. - Dosages des protéines

Les protéines sont extraites comme suit :

- mettre 100 mg de matériel sec dans 20 ml d'acétone à 80 % ;
- agiter pendant 10 mn et centrifuger à 10 000 g pendant 10 mn ;
- reprendre le culot par 10 ml de T.C.A. à 10 % ;
- précipiter une nuit en chambre froide (4°C) puis centrifuger à 10 000 g pendant 10 mn ;
- reprendre le culot par 10 ml d'éthanol à 80 % saturé en acétate de sodium, puis centrifuger à 10 000 g ;
- reprendre le culot par 10 ml d'alcool absolu, laisser reposer 10 mn puis centrifuger à 10 000 g ;
- sécher le culot ;
- dissoudre dans 5 ml NaOH 1N, mettre au bain-marie à 80°C pendant 30 mn, puis laisser refroidir ;
- centrifuger à 10 000 g 10 mn et récupérer le surnageant qui contient les protéines ;
- rincer deux fois le culot avec de l'eau distillée et ajuster le volume à 50 ml : la concentration de soude est alors de 0,1 N ;
- les protéines sont alors dosées par coloration au "bleu de comassie G250" (BRADFORD 1976). La D.O. est lue à 595 nm .

I. - Contrôle en microscopie électronique

Les échantillons prélevés sont fixés par une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans le tampon cacodylate de sodium 0,2 M à pH 6,7 (1 volume) additionné d'eau de mer (2 volumes), pendant deux heures à 4°C. Ils sont ensuite postfixés par l'acide osmique à 1 % dans l'eau de mer à 4°C. Ils sont déshydratés par l'acétone et inclus dans la résine à faible viscosité selon SPURR (1969). Les coupes fines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Elles sont examinées sur un microscope électronique JEOL "JEM 100 CX".

3ème PARTIE

CHAPITRE I

ISOLEMENT DE PAROIS
DE GRACILARIA VERRUCOSA

Le pourcentage d'agar dans les thalles varie au cours des saisons. Ces variations se caractériseraient essentiellement par des modifications pariétales avec notamment une augmentation de colloïdes durant les périodes hivernales. Cette hypothèse qui conditionne la suite de nos travaux demandait à être vérifiée.

Cette accumulation d'agar devrait se traduire dans les faits par une augmentation du poids de matière sèche des parois et/ou une augmentation des teneurs en colloïdes qu'elles contiennent. L'isolement des parois est donc le moyen le plus approprié pour s'affranchir de l'évolution propre au cytoplasme (amidon notamment). La comparaison des rendements en agar de parois de thalles cultivés dans des conditions simulant l'hiver ou le printemps devrait apporter une réponse.

Nous avons donc mis au point un protocole expérimental d'isolement de parois, inspiré de celui utilisé pour les Fucales (KLOAREG 1984).

I - MATERIEL ET METHODES

Des thalles de *Gracilaria verrucosa* sont cultivés pendant un mois dans des conditions qui simulent le "printemps" ou "l'hiver" (cf. p. 16). Ces thalles serviront de matériel d'étude pour l'isolement des parois (cf. p. 17)

II - RESULTATS ET DISCUSSION

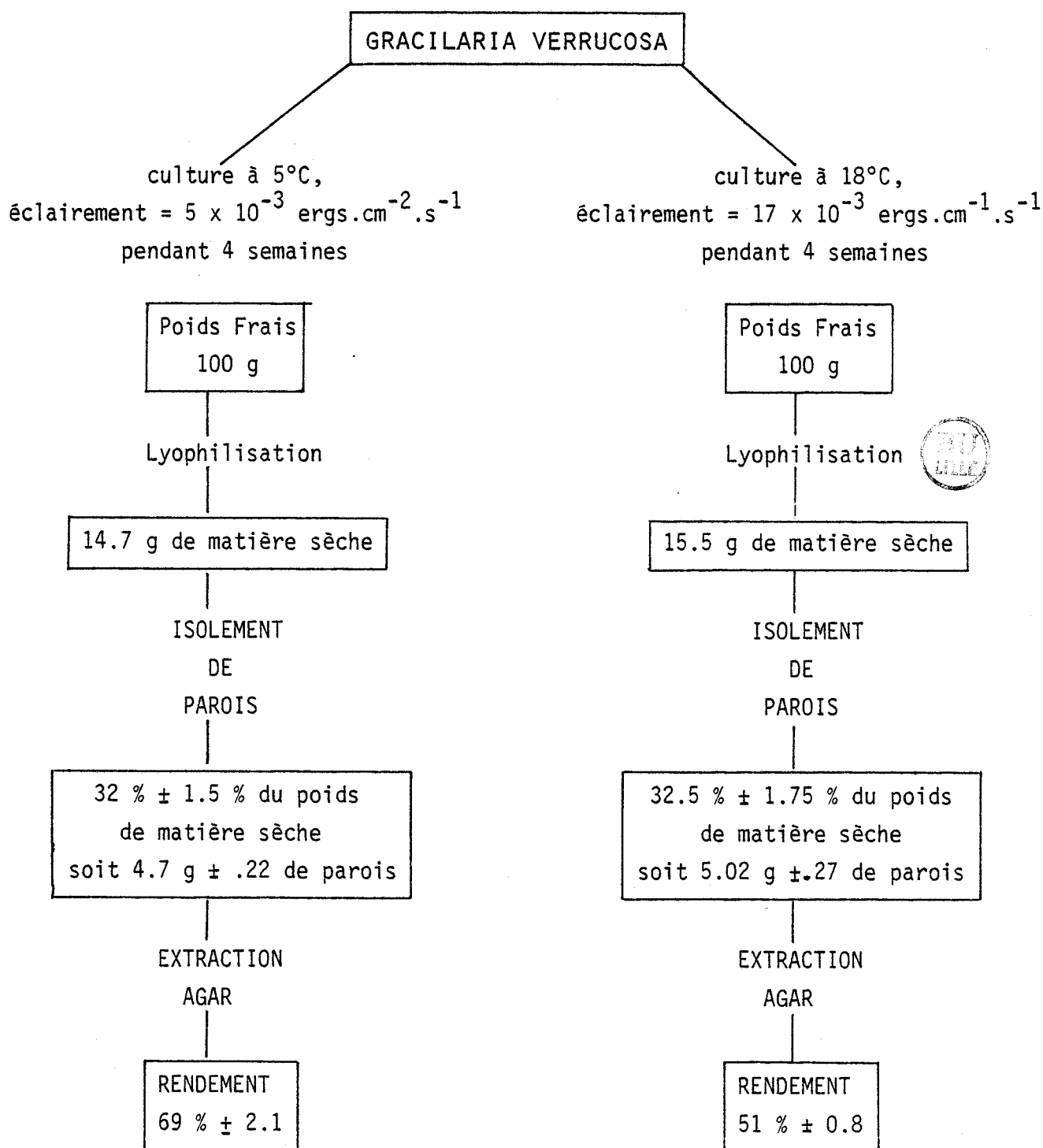
Les poids de matière sèche de parois isolées diffèrent peu suivant les conditions de culture (5,02 grammes à 18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ pour 100 g frais, et 4,7 grammes à 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) (tab. 1). Les erreurs inhérentes aux nombreuses manipulations et transferts qu'exigent cette technique ne permettent pas de dégager de différence significative.

Par contre, l'analyse des rendements en agar apporte de précieux renseignements. Les teneurs sont de 69 % pour des parois isolées à partir de thalles cultivés à 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ contre 51 % pour des parois obtenues à partir de thalles cultivés à 18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ (tab. 1). La composition chimique de la paroi varie donc entre l'été et l'hiver : lorsque les conditions de culture sont défavorables à la croissance, il y a plus d'agarose proportionnellement à la matière sèche des parois.

TABLEAU 1

VARIATION DES RENDEMENTS EN AGAR EXTRAIT DE PAROIS
ISOLEES, EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE

N = 3



Quelques réserves doivent cependant être émises. En effet, les quantités totales d'agar, obtenues à partir des parois et rapportées à 100 g de poids frais, sont inférieures aux valeurs obtenues par une extraction directe de l'agar sur la matière sèche. Cette différence peut être attribuée à la perte d'une partie des sucres solubles qui sont éliminés dans le surnageant. Cette perte peut être accentuée par les traitements successifs aux ultrasons.

Les résultats d'extraction présentent cependant des écarts suffisamment importants (environ 18 %) pour rester significatifs et renforcer notre hypothèse de travail.

La présence d'amidon dans les thalles doit être également soulignée car elle pourrait avoir une importance dans les expériences à venir. Des préparations en microscopie optique de surnageants, prélevés au cours des différentes étapes d'isolement de parois, révèlent de nombreux grains d'amidon colorés en bleu par le lugol. Ce phénomène est beaucoup plus marqué dans les thalles cultivés à 18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ que dans le cas des algues cultivées à 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹. Cet amidon pourrait donc jouer un rôle important dans les variations de matière sèche relevées au cours de l'année et expliquer que des teneurs plus importantes de matière sèche soient notées en été qu'en hiver en culture "in vitro" (15.45 % contre 14.7 % dans notre expérience).

Les variations de la composition chimique de la paroi en fonction des conditions de culture étant désormais un fait acquis, on peut envisager le rôle des facteurs du milieu (azote) et des facteurs physiques (température et lumière) sur les synthèses de colloïdes.

CHAPITRE II

INFLUENCES DE LA TEMPERATURE
ET DE LA LUMIERE SUR LA PRODUCTION
ET LA QUALITE DE L'AGAR-AGAR
DE GRACILARIA VERRUCOSA

Des essais de mise en culture de *Gracilaria verrucosa*, espèce commune sur les côtes de la Manche orientale, (BODARD et CHRISTIAEN 1978, BODARD et al. 1981) ont été effectués simultanément à l'étude des conditions d'extraction de son agar (CHRISTIAEN et BODARD 1978). Des analyses, réalisées sur des échantillons prélevés tout au long de l'année, ont montré que les teneurs en colloïdes varient en fonction des saisons (CHRISTIAEN 1981, WHYTE et al. 1981). L'expérience précédente a précisé ce que signifient ces variations au niveau pariétal : les parois des Gracilaires sont plus riches en agar en hiver qu'en été. Les paramètres, température et lumière qui caractérisent ces dernières, seraient donc impliqués dans la biosynthèse de colloïdes. De fait, WANG et YANG (1980) trouvent une corrélation entre la température, l'ensoleillement et la production d'agar.

Le rôle de la température est étudié dans une première expérience, dans des conditions d'éclairement et de photopériode favorables à la croissance du végétal. Ces deux derniers paramètres feront l'objet d'une seconde expérimentation, compte tenu des résultats acquis dans la précédente.

I. - MATERIEL ET METHODES

Les échantillons récoltés en septembre sont lavés et conditionnés en 36 lots de 10 grammes. La moitié d'entre eux est placée dans des aquariums de 10 litres d'eau de mer dont la température est maintenue constante à 5°C. L'autre moitié est cultivée selon le même principe, à 18°C. Quelles que soient les conditions de température, les algues sont éclairées 12 heures par jour. L'énergie mesurée au niveau des thalles est de 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹.

L'expérience est menée pendant deux mois, de manière à tenir compte de l'acclimatation des végétaux dans leurs nouvelles conditions de culture et à permettre l'activation et le fonctionnement des phénomènes biologiques de croissance et de production.

Passée cette période, les thalles sont récoltés, essorés et pesés de manière à obtenir le poids de matière fraîche qui, comparé au poids d'ensemencement, permet de calculer l'augmentation relative de la biomasse. Une part est prélevée et lyophilisée pendant 24 h pour déterminer le poids de matière sèche. L'agar contenu dans les échantillons est extrait (cf. p. 19). Le poids de poudre sèche, comparé à celui de l'algue, sert à calculer le rendement de l'extraction.

Compte-tenu des résultats obtenus à basse température (5°C), les conditions suivantes (**tab. 2**) ont été utilisées dans une deuxième expérimentation pour étudier l'influence de l'énergie lumineuse et de la photopériode.

Les teneurs en sucres totaux et en 3,6-anhydrogalactose sont déterminées (cf. p. 20).

II. - RESULTATS

Les résultats présentés dans le **tableau 3** montrent que les rendements en agar sont plus élevés (35.7 % en moyenne) quand l'algue est cultivée à 5°C que lorsqu'elle est placée à 18°C (14.6 %). Dans les mêmes conditions, la biomasse diminue de 13.4 %, d'une part, et augmente de 41 %, d'autre part.

Du point de vue biochimique, il semble que le galactose se transforme en 3,6-anhydrogalactose. Autrement dit, selon la définition de YAPHE et DUCKWORTH (1971), les proportions relatives en galactanes sulfates et agaroses neutres varient en fonction de la condition physiologique à laquelle l'algue est soumise, ici la température.

Pour des algues cultivées sous différentes conditions de lumière et de photopériode, les accroissements de biomasse les plus forts sont obtenus après de longues périodes d'éclairement et des intensités lumineuses de 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ (**fig. 5**).

Par ailleurs, de faibles énergies (6×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ ; 5/08N, 5/16N) masquent l'influence de la photopériode sur la croissance (**tab. 4**). La lumière peut donc être considérée comme un facteur limitant. Le pourcentage de matière sèche varie peu dans toutes les expérimentations (de 18,0 % à 21,5 %) (**tab. 4**), et les rendements en agar évoluent de façon opposée, par rapport à la croissance de l'algue : 27 % d'agar pour un gain en poids frais de 27.5 % contre 31.9 % pour une perte en poids frais de 17 %. De plus, dans une situation favorable à la croissance, l'élévation de température se traduit par une baisse des rendements en agar.

TABLEAU 2
 CONDITIONS EXPERIMENTALES A L'ETUDE DE L'INFLUENCE
 DE L'ENERGIE LUMINEUSE ET DE LA PHOTOPERIODE¹

Photopériode	Energie lumineuse N = $6 \cdot 10^3 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Energie lumineuse E = $17 \cdot 10^3 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
8 h de lumière par 24 h	5/08 N	5/08 E
16 h de lumière par 24 h	5/16 N	5/16 E



Témoins : 18°C, 12 h de lumière/24 h, $17 \cdot 10^3 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (18/12 E)
 20°C, 12 h de jour/24 h (20/12 S)

¹ : température maintenue à 5°C

TABLEAU 3

VARIATIONS DE LA BIOMASSE, DE LA MATIERE SECHE, DES RENDEMENTS EN AGAR
 ET DE LA QUALITE BIOCHIMIQUE DE CELUI-CI EN FONCTION DE LA TEMPERATURE
 DE CULTURE DE GRACILARIA VERRUCOSA (19 ECHANTILLONS)

Température de culture	Variation du poids de matière fraîche		Rendement en agar %	Sucres totaux		3.6-anhydrogalactose mg.g^{-1} (2)	oses totaux	
	%	mg.g^{-1} (1)		mg.g^{-1} (2)	mg.g^{-1} (2)		3.6-anhydrogalactose	3.6-anhydrogalactose/ 3.6-anhydrogalactose
18°C	+ 41.0	290 ± 18	14.6 ± 2,9	919 ± 29	272 ± 5	2.40		
5°C	- 13.4	277 ± 31	35.7 ± 5,9	694 ± 39	396 ± 10	0.75		

(1) exprimé en mg.g^{-1} de matière fraîche

(2) exprimé en mg.g^{-1} d'agar sec



FIGURE 5

CROISSANCE PONDERALE DE GRACILARIA VERRUCOSA DANS DIFFERENTES
CONDITIONS DE TEMPERATURE, D'ECLAIREMENT ET DE PHOTOPERIODE

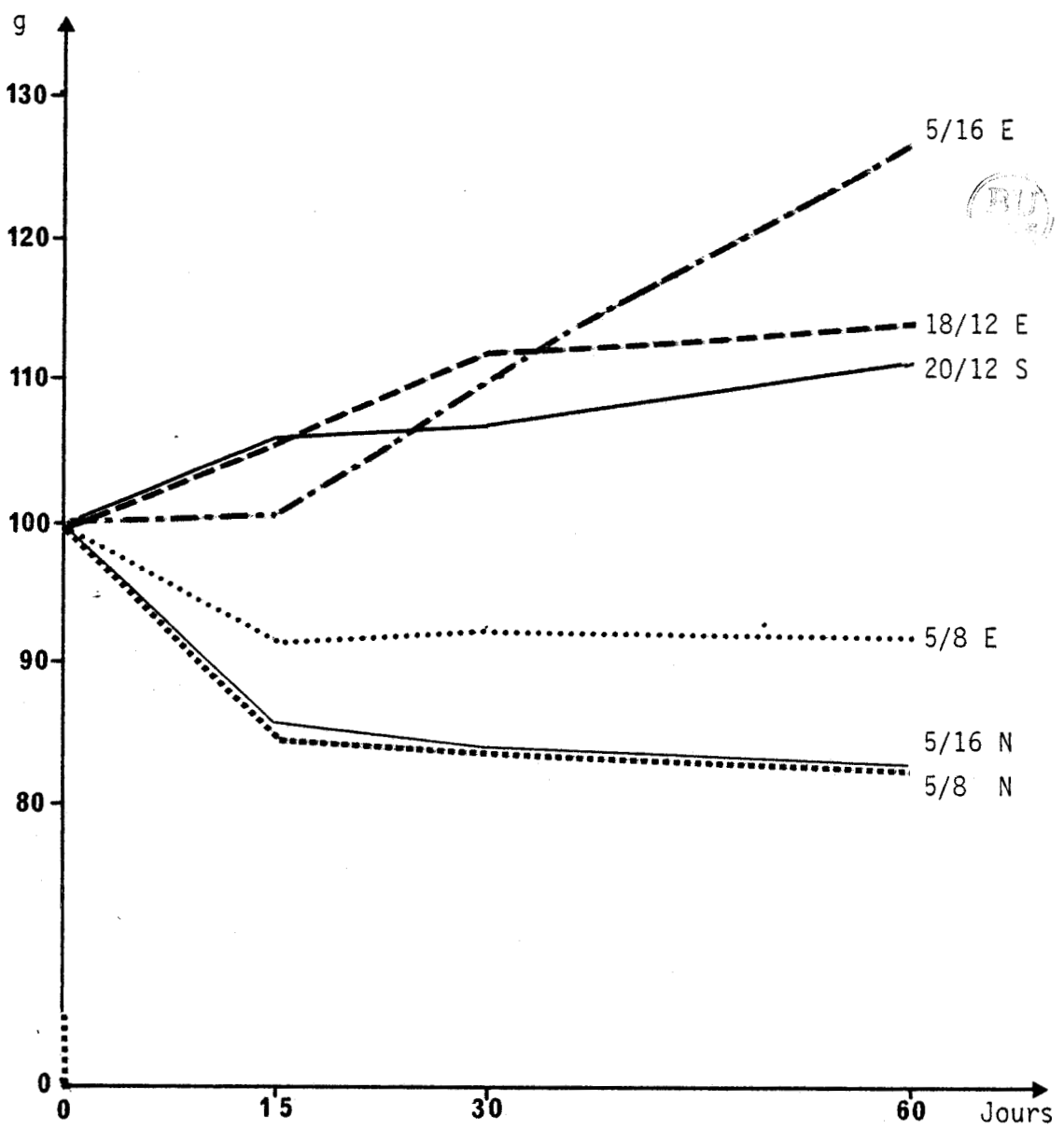


TABLEAU 4

VARIATIONS DE LA BIOMASSE, DE LA MATIÈRE SÈCHE ET DES RENDEMENTS
EN AGAR EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE

Conditions de culture	Variation du poids de matière fraîche	Poids de matière sèche	Rendement en agar
	%	mg.g ⁻¹ (1)	%
5/16 E	+ 27.5	191.3 ± 8.5	27.0 ± 1.17
18/12 E	+ 14.2	201.3 ± 13.5	25.6 ± 1.52
20/12 S	+ 11.0	215.0 ± 12.6	23.6 ± 1.38
5/08 E	- 7.8	207.0 ± 3.7	27.4 ± 1.10
5/16 N	- 17.0	180.0 ± 4.7	31.9 ± 0.98
5/08 N	- 17.5	180.6 ± 6.9	31.4 ± 1.94

$$E = 17.10^3 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

$$N = 6.10^3 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

(1) = exprimé en mg.g⁻¹ de matière fraîche

S = lumière solaire

Les résultats mentionnés dans le **tableau 5** font état d'un faible rapport (oses totaux - 3,6-anhydrogalactose) /3,6-anhydrogalactose, témoignant d'une meilleure qualité du gel lorsque les rendements en agar sont plus élevés.

III. - DISCUSSION

Les mesures de matière sèche et d'agar, corrigées en valeurs absolues, sont représentées sur la **figure 5** pour la première expérience et regroupées dans le **tableau 6** pour la seconde.

Les faibles températures (5°C) provoquent une baisse du poids frais. De plus, les quantités d'agar obtenues sont plus importantes à 5°C qu'à 18°C. Ainsi, les conditions thermiques induisent soit la croissance du végétal, soit l'augmentation des teneurs en colloïdes dans les parois. Cette relation entre croissance et production avait déjà été remarquée par DELOACH *et al.* (1946), HUMM (1951) et CHRISTIAEN (1981). Par ailleurs, WHYTE *et al.* (1981) n'avaient pas noté d'influence de la température sur les rendements d'extraction, étant donné la faible amplitude thermique relevée sur toute la durée de leur expérimentation.

En valeur relative, le poids de matière sèche apparaît constant (280 mg.g⁻¹), or il évolue en valeur absolue, selon le régime de température (2.4 g à 5°C contre 4.1 g à 18°C pour 100 g d'algues fraîchesensemencées) (**fig. 6**). L'algue synthétise donc de la matière sèche qui entre pour partie dans la composition des parois nouvellement formées. Mais compte-tenu de l'accroissement très élevé (+ 71 % de matière sèche par rapport aux algues cultivées à 5°C), elle accumule aussi vraisemblablement des assimilats photosynthétiques.

Par contre, le poids total d'agar des thalles cultivés à 18°C est inférieur à celui des cultures à 5°C (0.60 g contre 0.86 g). Aussi deux hypothèses peuvent être formulées :

- il y a accumulation d'agar dans les parois en période hivernale et dégradation partielle en phase de croissance ;

- selon KLOAREG (1984), les modifications structurales de la molécule d'agar peuvent changer la mobilisation ou l'accessibilité du mucilage lors de l'extraction.

TABLEAU 5

VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR ET DE LA QUALITE BIOCHIMIQUE
DE CELUI-CI EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE DE *GRACILARIA VERRUCOSA*

Conditions de culture	Rendement en agar	Sucres totaux	3.6-anhydro galactose	oses totaux
	%	mg.g ⁻¹ (1)	mg.g ⁻¹ (2)	3.6-anhydrogalactose/ 3.6-anhydrogalactose
5/16 E	27.0 ± 1.17	860	313	1.75
18/12 E	25.6 ± 1.52	789	337	1.34
20/12 E	23.6 ± 1.38	930	346	1.69
5/08 E	27.4 ± 1.10	833	319	1.60
5/16 N	31.9 ± 0.98	842	343	1.46
5/08 N	31.4 ± 1.94	807	334	1.41

E = $17.10^3 \text{ ergs cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

N = $6.10^3 \text{ ergs cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

(1) = exprimé en mg.g⁻¹ de matière fraîche

(2) = exprimé en mg.g⁻¹ d'agar sec

S = lumière solaire

TABLEAU 6

VARIATIONS EN VALEUR ABSOLUE DE LA MATIERE SECHE ET DE L'AGAR EN
FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE DE *GRACILARIA VERRUCOSA*

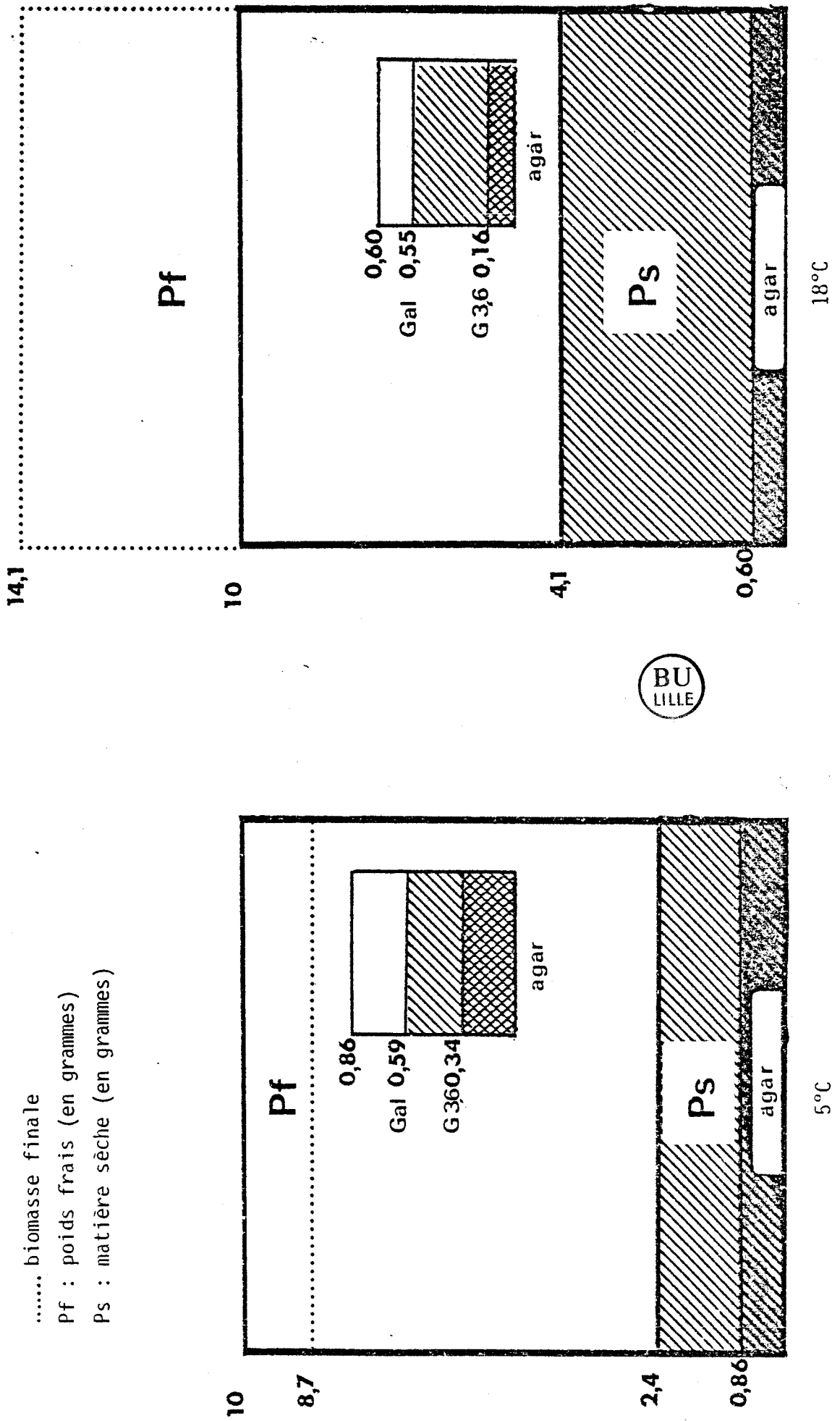
Conditions de culture	Variation du poids de matière fraîche	Poids de matière sèche	Poids d'agar
	%	en grammes(1)	en grammes(2)
5/16 E	+ 27.5	24.4	6.58
18/12 E	+ 14.2	23.0	5.89
20/12 S	+ 11.0	23.9	5.41
5/08 E	- 7.8	18.5	5.07
5/16 N	- 17.0	14.9	4.76
5/08 N	- 17.5	14.9	4.64



(1) Poids de matière sèche : {100 g de départ + (100 g x % de croissance)} x % de matière sèche.

(2) Poids d'agar = poids de matière sèche en valeur absolue x % d'agar.

FIGURE 6 - DIAGRAMME DES POIDS DE MATIERES FRAICHES, DE MATIERES SECHES, D'AGAR ET DES SUCRES DOSES DANS CELUI-CI, OBTENU APRES CULTURE DE 10 g D'ALGUES PENDANT 2 MOIS



Sans répondre définitivement à ces questions, les différences de rendement en agar, extrait de parois isolées, plaident en faveur d'une accumulation de colloïde. Par ailleurs, la quantité de galactose (**fig. 6**) est identique dans les 2 cas en accord avec de précédentes observations (CHRISTIAEN 1981). Le facteur variant est le taux de 3,6-anhydrogalactose qui double entre 18°C et 5°C. La teneur en 3,6-anhydrogalactose et la qualité de gel évoluent parallèlement selon WHYTE et al. (1981). Une proportion élevée en 3,6-anhydrogalactose, qui favorise l'association des chaînes polysaccharidiques (REES 1974), devrait rendre le mucilage moins accessible à l'extraction et plus sensible aux pertes. Or, c'est le phénomène inverse qui est observé.

Enfin, aucun élément physiologique n'argumente, à ce jour, dans le sens de la seconde hypothèse.

Dans la deuxième expérience, les éclaircissements importants (17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) en activant la photosynthèse favorisent la croissance de l'algue et l'augmentation de la matière sèche (5/16E, 20/12S, 18/12E). Dans ce cas, une température basse associée à une intensité lumineuse élevée et à une période d'éclaircissement longue n'est pas facteur limitant. Parallèlement, les rendements en agar sont faibles (23.6 % à 27 %), alors que la quantité de colloïdes augmente en valeur absolue. La synthèse de matière sèche est donc accompagnée par une synthèse d'agar (**tableau 6**).

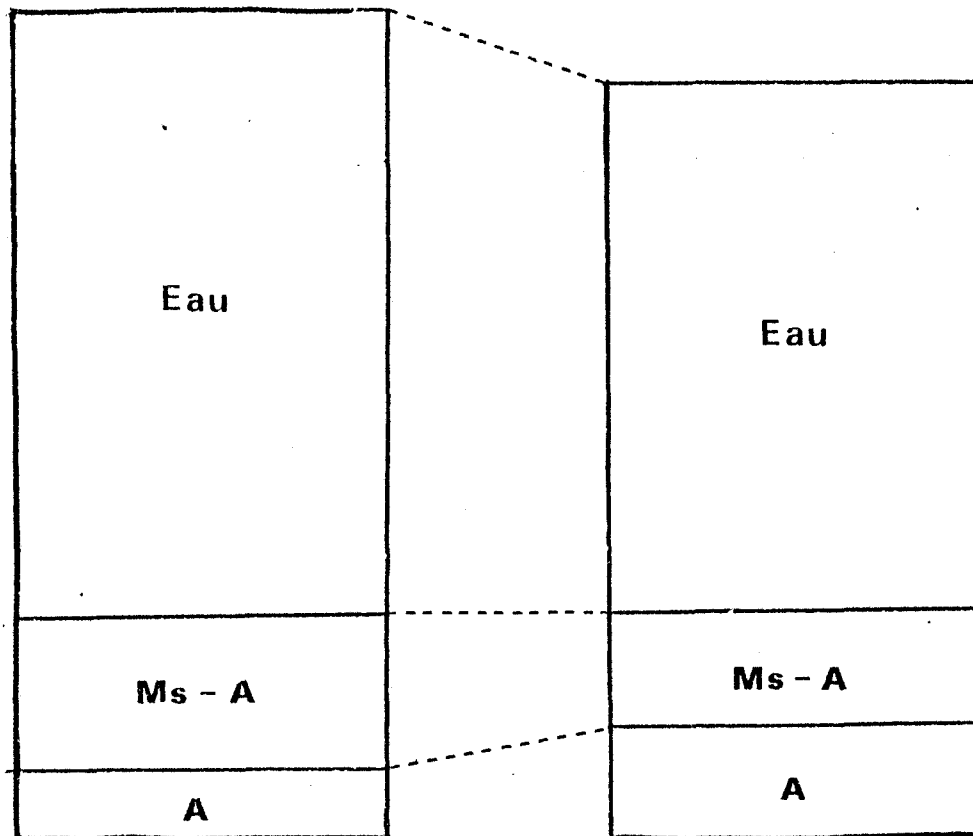
Dans des conditions d'éclaircissement limitant (5/08N, 5/16N), la photopériode n'influence plus la production de matière sèche ou de colloïde, mais elle modifie sa qualité biochimique [rapport (oses totaux - 3,6-anhydrogalactose)/3,6-anhydrogalactose] (**tab. 5**). Dans ce cas, la production d'agar et de matière sèche est faible, mais le pourcentage d'agar par rapport au poids de matière sèche augmente. Une partie de la matière sèche se transformerait donc en colloïdes.

L'ensemble de ces interprétations peut être résumé dans la **figure 7** :

. en conditions printanières (température élevée, longue période de jour, soleil), la quantité d'eau dans le thalle augmente proportionnellement à la quantité de matière sèche et, dans une moindre mesure la part du colloïde croît ;

FIGURE 7 - EVOLUTION SCHEMATIQUE DE LA MATIERE FRAICHE, DE LA MATIERE SECHE ET DE L'AGAR DE GRACILARIA VERRUCOSA DANS DIFFERENTES CONFIGURATIONS DE CULTURE.

Ms = matière sèche
 MF = matière fraîche
 A = agar



'ETE'

Ms, MF augmentent

A croît légèrement

A/Ms diminue

Ms/MF reste constant

'HIVER'

MF diminue

Ms baisse légèrement

A, A/Ms augmentent

Ms/MF reste constant



. en conditions hivernales (basses températures, courte période de jour, faible éclairement), la quantité d'agar progresse par rapport à la matière sèche qui reste globalement inchangée.

D'un point de vue physiologique, ces résultats semblent en accord avec les hypothèses de départ. En saison froide, l'algue a donc tendance à accumuler dans ses parois, au détriment d'autres composés, un colloïde aux qualités chimiques conférant au gel des propriétés physiques compatibles avec une résistance de type mécanique (en effet, à l'observation macroscopique, les thalles cultivés à 5°C apparaissent plus fermes et rigides que ceux cultivés à 18°C).

Même si le déterminisme biologique qui préside à ces transformations est encore inconnu, des phénomènes semblables s'observent chez des espèces qui ont à résister mécaniquement à la houle, telles que les Laminaires qui ont un rapport acide guluronique/acide mannuronique qui croît avec l'âge des tissus.

IV. - CONCLUSION

Un éclairement de 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ et une température de 18°C favorisent la croissance de la Gracilaire. Ce gain de poids frais se traduit par une importante accumulation de matière sèche et dans une moindre mesure par une synthèse de colloïdes.

Lorsque les conditions d'éclairement (17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) et de photopériode (16 h de lumière) qui autorisent une photosynthèse importante sont réunies, la température n'est plus facteur limitant pour la croissance ou la synthèse d'agar.

Par contre, la biomasse chute pour de basses températures associées à une faible intensité lumineuse. Dans ce cas, la durée de la photopériode n'a plus d'influence. La photosynthèse est ralentie, comme en témoignent les faibles quantités de matière sèche.

L'augmentation des quantités d'agar traduit une accumulation de colloïdes dans les parois. Cette accumulation peut être comprise comme le résultat d'une synthèse *de novo* d'agar, ou comme une synthèse à partir de la matière sèche déjà accumulée.

Ce point sera vérifié dans une expérience ultérieure.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'ENGRAISSEMENT AZOTE

SUR LA PRODUCTION D'AGAR-AGAR DE

GRACILARIA VERRUCOSA

La précédente expérience a mis en évidence l'influence des paramètres physiques, température et lumière, sur les synthèses de colloïde. Mais les facteurs chimiques du milieu, notamment les éléments minéraux, ont également une grande importance. HANISAK (1979) et LAPOINTE et RYTHIER (1979) ont montré que l'azote, en particulier, est souvent un facteur limitant de croissance des algues dans la nature.

Les Gracilaires le prélèvent rapidement dans l'eau de mer et l'accumulent principalement sous forme organique : acides aminés et protéines (BIRD 1982). Dans le "pool" protéique, une partie importante de l'azote se trouve dans les phycoérythrine (MORGAN et al. 1980). Cet azote serait réutilisé lorsque le milieu de culture est pauvre en éléments nutritifs (BRIAN 1981, BIRD et al. 1982).

DEBOER et al. (1978) ont établi l'existence d'une relation entre la teneur en azote du milieu et le gain de biomasse. Cette relation est vérifiée, selon MORGAN et SIMPSON (1981), lorsque l'éclairement n'est pas facteur limitant. Mais il y aurait également un lien entre la teneur en azote, la teneur en sucres totaux et en agar des thalles (BIRD et al. 1981-a). L'assimilation se ferait au détriment de la synthèse des colloïdes. De fait, NEISH et SHACKLOCK (1971) et DEBOER et al. (1976) relèvent de meilleurs rendements en carraghenanes chez *Chondrus crispus* cultivé en milieu non enrichi. La synthèse de glucides est dominante lorsque les faibles quantités d'azote du milieu limitent la croissance (LAPOINTE et al. 1979, MORGAN et SIMPSON 1981). L'apport d'engrais favoriserait donc la synthèse d'acides aminés et de protéines aux dépens des sucres (LAYCOCK et al. 1980). Ces derniers seraient utilisés dans la formation des acides aminés (BIRD et al. 1982).

L'expérimentation qui suit se propose de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'antagonisme croissance-production de colloïdes existe potentiellement dans la cellule. L'enrichissement en azote, en favorisant la croissance, accentuerait donc le phénomène.

En outre, le développement du thalle passe par la formation de ramifications. Leur constitution chimique différente des parties adultes de l'algue contribuerait à modifier l'appréciation des rendements en agar du thalle entier.

La question est donc de savoir si l'azote est un effecteur de croissance au même titre que les facteurs physiques, ou bien s'il exerce un rôle direct sur la production de colloïdes.

Une étude de la production d'agar dans des thalles cultivés, après enrichissement ou non en azote, est proposée ci-dessous.

I. - MATERIEL ET METHODES

Les algues récoltées dans la nature sont séparées en 2 lots. Le premier constitue le témoin. Le second est placé pendant 24 heures à l'obscurité dans une eau de mer enrichie en azote. Le chlorure d'ammonium (1 mM) a été choisi d'une part, parce qu'il est assimilé plus rapidement que la forme nitrate par la Gracilaire (D'ELIA et DEBOER 1978), et d'autre part parce qu'il favorise la photosynthèse (GIACCONE et al. 1979), et permet une croissance rapide (DEBOER et al. 1978). Par ailleurs, un délai d'immersion de 24 heures dans une eau de mer enrichie en ammonium (1 mM), à l'obscurité, double la quantité d'azote total dans le thalle (BIRD et al. 1982).

Le témoin et le lot d'algues enrichies sont alors séparés en 3 échantillons chacun et cultivés dans des conditions simulant le printemps et l'hiver (cf. p. 15).

De cette manière, le rôle de l'azote dans le thalle peut être étudié lorsque la température et la lumière ne sont pas facteurs limitants de croissance, puis quand ceux-ci sont défavorables au développement de l'algue.

Enfin, une troisième expérience est menée à l'obscurité (1×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) à la température de la pièce (environ 18°C). La photosynthèse n'est plus assurée et les assimilats photosynthétiques ne sont plus renouvelés. L'influence de l'azote seul pourra alors être jugée.

Durant toute l'expérimentation, l'eau de mer n'est plus enrichie. Elle est renouvelée de moitié une fois par semaine de manière à apporter le moins possible d'éléments minéraux nouveaux. Après quelques jours, le milieu est appauvri. Les algues doivent par conséquent, utiliser leurs réserves pour poursuivre la croissance. Un contrôle de pH et de salinité est effectué tous les deux jours.

Le suivi débute uniquement 48 h après le traitement de manière à permettre aux algues de s'adapter aux conditions nouvelles du milieu. Des prélèvements sont effectués après 3, 7, 14, 21 et 41 jours de culture. La croissance et la teneur de matière sèche sont calculées (cf. p. 17). L'agar est extrait. Les sucres totaux et le 3,6-anhydrogalactose sont dosés (cf. p. 20).

De plus, la quantité de pigments solubles (phycoérythrines) a été mesurée (cf. p. 20), car il existerait une relation avec la teneur en azote du thalle (BIRD et al. 1982, LAPOINTE 1981).

Les teneurs en azote du thalle sont dosées par une ultramicro-méthode au Nessler (STRAUCH 1965). Cette méthode colorimétrique est dérivée de celle de Kjeldahl (cf. p. 21).

Les protéines totales sont dosées par coloration au "bleu de comassie G250" (BRADFORD 1976, cf. p. 23).

II. - RESULTATS

1) 18°C et éclairement de 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹

Les thalles préalablement enrichis en azote présentent un gain de poids frais double de celui des algues témoin (+ 41 % en 28 jours contre + 21,6 % ; tab. 7).

Les teneurs de matière sèche baissent dans les 2 échantillons après 28 jours de culture (de 17,20 % à 14,29 % dans les thalles traités, et de 16,11 % à 14,11 % pour le témoin) (tab. 8). Par contre, les valeurs absolues augmentent : respectivement + 2.82 g et + 0,77 g (tab. 9).

Les teneurs en azote déclinent dans les thalles enrichis (4,51 % à 3,46 %) (tab. 10). Elles restent constantes dans le témoin. Par contre, les teneurs en phycoérythrines baissent (tab. 11). Le taux de protéines varie peu (tab 12).

De même, les rendements en agar sont relativement constants dans le témoin au cours de la culture (entre 23,63 % et 25,15 %). Ils passent de 31,9 % à 27,15 % dans les algues préalablement enrichies (tab. 13). En valeur absolue, et compte tenu des erreurs de mesure et de dosage, la quantité d'agar reste constante (tab. 14).

TABLEAU 7

VARIATIONS DE LA BIOMASSE¹ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	109.13	103.17	99.00	102.44	95.32	95.83
15	112.40	117.45	96.70	103.71	106.80	90.70
21	109.47	119.63	110.00	101.10	89.21	91.60
32	121.60	141.00	107.80	107.55	84.46	93.00

T = température

E = éclaircissement

1 = en grammes



TABLEAU 8

VARIATIONS DE LA MATIERE SECHE⁽¹⁾ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
Départ	16.70 ± .20	-	17.80 ± 0.81	-	-	-
1	17.20 ± .40	16.11 ± 0.36	16.60 ± 0.35	15.62 ± .58	15.55 ± 0.58	14.75 ± .23
3	16.60 ± .43	17.20 ± 0.25	18.00 ± 0.77	17.17 ± .92	16.06 ± 1.20	15.60 ± .87
7	15.87 ± .29	16.86 ± 0.82	16.53 ± 0.18	16.53 ± .31	15.60 ± 0.33	16.16 ± .38
15	15.93 ± .89	16.26 ± 0.05	16.60 ± 0.80	15.28 ± .80	15.42 ± 0.25	16.80 ± .68
21	16.00 ± .45	16.70 ± 0.75	16.82 ± 1.30	16.41 ± .75	16.06 ± 0.12	16.13 ± .30
32	14.29 ± .30	14.20 ± 1.00	15.64 ± 0.61	16.52 ± .40	16.02 ± 0.40	16.07 ± .61

(1) = exprimé en % de matière fraîche

T = température

E = éclaircissement



TABLEAU 9

VARIATIONS EN VALEUR ABSOLUE DU POIDS DE MATIERE SECHE¹ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoïn	+ Azote	Témoïn	+ Azote	Témoïn	+ Azote
3	16.60	17.20	18.00	17.17	16.06	15.60
7	16.68	17.32	16.36	16.93	14.87	15.48
15	17.90	19.09	16.05	15.84	16.47	15.23
21	17.51	19.97	18.05	16.59	14.33	14.77
32	17.37	20.02	16.86	16.69	13.51	14.89

T = température

E = éclairement

1 = en grammes



TABLEAU 10

VARIATIONS DE L'AZOTE⁽¹⁾ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoïn	+ Azote	Témoïn	+ Azote	Témoïn	+ Azote
Départ	3.90 ± .10	-	3.90 ± .36	-	3.80 ± .55	-
1	3.98 ± .20	4.51 ± .28	3.80 ± .15	4.19 ± .11	4.17 ± .16	4.66 ± .14
3	4.25 ± .35	4.26 ± .20	4.01 ± .16	4.18 ± .14	4.39 ± .05	4.99 ± .06
7	4.38 ± .11	4.40 ± .13	4.14 ± .25	4.06 ± .30	5.09 ± .30	5.00 ± .30
15	4.14 ± .35	4.33 ± .11	4.33 ± .24	4.47 ± .27	4.98 ± .13	5.45 ± .20
21	4.44 ± .33	4.10 ± .36	4.55 ± .25	4.88 ± .30	4.78 ± .30	5.13 ± .13
32	4.24 ± .24	3.46 ± .33	4.53 ± .26	4.60 ± .01	5.11 ± .31	5.24 ± .28

(1) = exprimé en % de matière sèche

T = température

E = éclaircissement



TABLEAU 11

VARIATIONS DE LA PHYCOERYTHRINE⁽¹⁾ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
Départ	17.16 ± 1.00	-	16.75 ± 0.85	-	17.69 ± 0.66	-
1	14.70 ± 1.70	17.23 ± 1.45	16.02 ± 0.81	20.38 ± 1.15	12.63 ± 0.33	15.55 ± 0.45
3	20.40 ± 2.60	15.20 ± 2.00	18.51 ± 0.83	18.78 ± 1.40	13.02 ± 0.82	17.39 ± 0.74
7	18.23 ± 2.00	16.05 ± 0.90	17.49 ± 0.42	14.28 ± 0.32	14.47 ± 1.25	15.34 ± 1.50
15	17.90 ± 0.40	14.52 ± 1.10	15.26 ± 1.00	14.53 ± 0.17	13.83 ± 1.15	15.78 ± 0.28
21	12.50 ± 1.20	14.25 ± 2.35	16.92 ± 0.24	17.37 ± 0.30	12.89 ± 1.10	14.18 ± 1.00
32	13.40 ± 2.05	12.50 ± 0.20	20.50 ± 2.60	18.21 ± 2.50	12.00 ± 1.60	13.67 ± 0.63

(1) = exprimé en % de matière sèche

T = température

E = éclaircissement



TABLEAU 12

VARIATIONS DES TENEURS EN PROTEINES⁽¹⁾ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
1	10.0 ± .28	11.75 ± 0.1	10.3 ± .1	9.85 ± .35
3	10.4 ± .14	10.80 ± 0.8	9.8 ± .2	9.70 ± .14
7	9.4 ± .10	10.80 ± 0.4	10.0 ± .3	9.80 ± .60
15	10.2 ± .30	10.90 ± 1.4	10.3 ± .5	10.90 ± .10
21	10.3 ± .20	10.60 ± 0.6	11.3 ± .1	10.30 ± .60
32	9.8 ± .40	10.50 ± 0.4	11.2 ± .2	10.40 ± .30

(1) = exprimé en % de matière sèche

T = température

E = éclaircissement



TABLEAU 13

VARIATIONS DE L'AGAR⁽¹⁾ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoins	+ Azote	Témoins	+ Azote	Témoins	+ Azote
1	23.63 ± 1.90	31.20 ± .10	24.37 ± .62	-	25.2 ± 0.6	27.8 ± 0.29
3	24.80 ± 0.20	31.45 ± .75	25.20 ± .80	27.30 ± 0.75	25.9 ± 1.0	30.8 ± 0.40
7	25.80 ± 0.30	31.60 ± .14	24.25 ± .05	30.50 ± 0.60	27.8 ± 1.6	30.4 ± 0.28
15	25.00 ± 0.22	26.80 ± .90	25.82 ± .38	30.70 ± 2.50	29.5 ± 1.0	32.0 ± 2.00
21	26.80 ± 0.60	29.49 ± .41	25.00 ± .98	32.57 ± 0.26	29.6 ± 0.8	34.0 ± 0.25
32	25.15 ± 0.35	27.15 ± .55	24.70 ± .48	34.10 ± 0.80	28.4 ± 1.1	35.4 ± 1.90

(1) = exprimé en % de matière sèche

T = température

E = éclaircissement



TABLEAU 14

VARIATIONS EN VALEUR ABSOLUE DE L'AGAR¹ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
3	4.71	5.40	4.53	4.69	4.15	4.80
7	4.31	5.47	3.97	5.16	4.13	4.70
15	4.47	5.11	4.14	4.86	4.85	4.87
21	4.69	5.88	4.50	5.40	4.24	5.02
32	4.37	5.43	4.16	5.69	3.83	5.27

T = température

E = éclaircissement

l = en grammes



Les teneurs en sucres totaux de l'agar extrait des Gracilaires prétraitées, très élevées au début (97,4 %) fléchissent en fin de culture (91,75 %) (tab. 15). Le phénomène inverse est observé pour le témoin (87,7 % au départ et 94,45 % après 4 semaines).

Les mêmes tendances sont retrouvées pour le 3,6-anhydrogalactose (tab. 16).

2) 5°C et éclairement de 5×10^{-3} ergs $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Le poids frais des thalles progresse de 7,5 % environ (tab. 7).

Les teneurs de matière sèche sont relativement constantes (tab. 8). Ces dernières diminuent rapidement en valeur absolue durant les 15 premiers jours (16,05 g contre 18 g au départ pour le témoin, et 15,84 g contre 17,17 g pour le lot enrichi), puis elles augmentent (tab. 9).

Parallèlement, les teneurs en phycoérythrine chutent durant les deux premières semaines de culture (tab. 11). Ce phénomène est plus marqué pour l'échantillon enrichi (20,38 % au départ et 14,53 % après 14 jours).

Les teneurs en azote progressent dans les deux lots d'algues (tab. 10).

Les rendements en agar augmentent au cours de la culture dans les thalles préalablement enrichis (tab. 13). La quantité d'agar passe de 5,16 g à 5,69 g (tab. 14). Dans le témoin, aucune variation n'est observée.

Les teneurs en sucres totaux sont toujours très élevées (tab. 15), sauf une baisse en fin de culture dans le témoin (93,6 %). Les teneurs en 3,6-anhydrogalactose évoluent de façon identique. Le rapport (oses totaux - 3,6-anhydrogalactose) / 3,6-anhydrogalactose augmente dans le témoin. Il est par contre constant pour les algues prétraitées. (tab. 17).

3) 18°C et éclairement de 1×10^{-3} ergs $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Le poids frais des algues diminue. La perte de biomasse est plus accentuée pour le témoin (respectivement - 15,54 % et - 7 %) (tab. 7).

TABLEAU 15

VARIATIONS DES TENEURS EN SUCRES TOTAUX⁽¹⁾ DE L'AGAR EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DE PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
1	87.70 ± 2.55	97.4 ± 0.10	90.0 ± 3.50	100.0 ± 2.72	98.50 ± 1.50	100.0 ± 1.65
3	89.30 ± 0.85	98.0 ± 0.50	94.0 ± 2.80	100.0 ± 5.00	98.50 ± 1.50	100.0 ± 5.00
7	92.75 ± 0.85	100.0 ± 0.50	100.0 ± 3.50	100.0 ± 3.20	98.70 ± 1.30	98.7 ± 0.20
15	97.00 ± 1.20	100.0 ± 1.40	97.7 ± 2.35	100.0 ± 1.65	96.10 ± 2.50	97.0 ± 5.00
21	93.60 ± 0.90	97.5 ± 1.00	95.3 ± 1.70	100.0 ± 4.20	98.65 ± 3.35	100.0 ± 3.40
32	94.45 ± 1.25	91.7 ± 0.35	93.6 ± 1.70	100.0 ± 4.00	91.90 ± 0.10	95.1 ± 1.85

(1) = exprimés en % d'agar

T = température

E = éclaircissement



TABLEAU 16

VARIATIONS DU 3.6-ANHYDROGALACTOSE⁽¹⁾ EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote	Témoin	+ Azote
1	42.00 ± 0.14	44.00 ± 0.10	42.60 ± 0.25	46.4 ± 0.25	44.10 ± 0.43	47.50 ± 0.14
3	42.80 ± 1.10	45.80 ± 0.60	43.20 ± 0.70	49.3 ± 1.40	43.50 ± 0.70	46.80 ± 1.40
7	44.90 ± 0.10	44.90 ± 0.35	48.30 ± 0.10	47.2 ± 0.80	42.90 ± 1.00	46.24 ± 0.60
15	46.40 ± 0.60	48.50 ± 0.15	44.60 ± 0.15	46.8 ± 0.95	42.30 ± 1.60	42.80 ± 1.20
21	42.80 ± 0.90	45.10 ± 0.14	42.60 ± 1.15	46.8 ± 0.80	45.10 ± 0.90	45.10 ± 0.58
32	45.01 ± 0.60	41.30 ± 1.10	40.15 ± 0.15	47.6 ± 0.15	43.78 ± 0.40	42.50 ± 0.60

(1) = exprimé en % d'agar

T = température

E = éclairement



TABLEAU 17

VARIATIONS DU RAPPORT OSES TOTAUX - 3.6-ANHYDROGALACTOSE/3.6-ANHYDROGALACTOSE EN FONCTION
DES CONDITIONS DE CULTURE ET DE L'ENRICHISSEMENT EN AZOTE DU THALLE

Jours	T = 18°C E = 17 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 5°C E = 5 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹		T = 18°C E = 1 x 10 ⁻³ ergs.cm ⁻² .s ⁻¹	
	Témoin	+ Engrais	Témoin	+ Engrais	Témoin	+ Engrais
1	1.09	1.21	1.11	1.15	1.23	1.10
3	1.09	1.14	1.17	1.15	1.26	1.14
7	1.06	1.22	1.08	1.12	1.30	1.13
15	1.09	1.06	1.19	1.14	1.27	1.26
21	1.18	1.16	1.24	1.25	1.19	1.22
32	1.10	1.22	1.33	1.13	1.10	1.24

T = température

E = éclairement

Les teneurs de **matière sèche** demeurent relativement constantes (**tab. 8**). Cependant, la matière sèche diminue en valeur absolue (13,51 g contre 16,06 g pour le témoin, et 14,89 g contre 15,60 g pour le lot enrichi) (**tab. 9**).

Les teneurs en **azote** augmentent dans les 2 cas (**tab. 10**).

Les teneurs en phycoérythrine chutent, mais plus rapidement dans les algues témoins pour atteindre respectivement 12 % et 13,67 % (**tab. 11**).

Le taux de protéines demeure inchangé (**tab. 12**).

Les rendements en **agar** augmentent ; ils passent de 25,2 % à 28,4 % chez le témoin et de 27,8 % à 35,4 % chez les thalles enrichis en azote (**tab. 13**). Cette augmentation du rendement en agar s'accompagne aussi d'une synthèse nette d'agar dans les algues prétraitées (**tab. 14**). Cette synthèse s'amorce également dans le témoin, mais s'arrête plus tôt. Les deux échantillons d'algues renferment un agar riche en sucres totaux (environ 100 %) (**tab. 15**). Les teneurs en 3,6-anhydrogalactose varient peu chez le témoin, mais baissent de 47,5 % à 42,5 % dans les algues prétraitées (**tab. 16**).

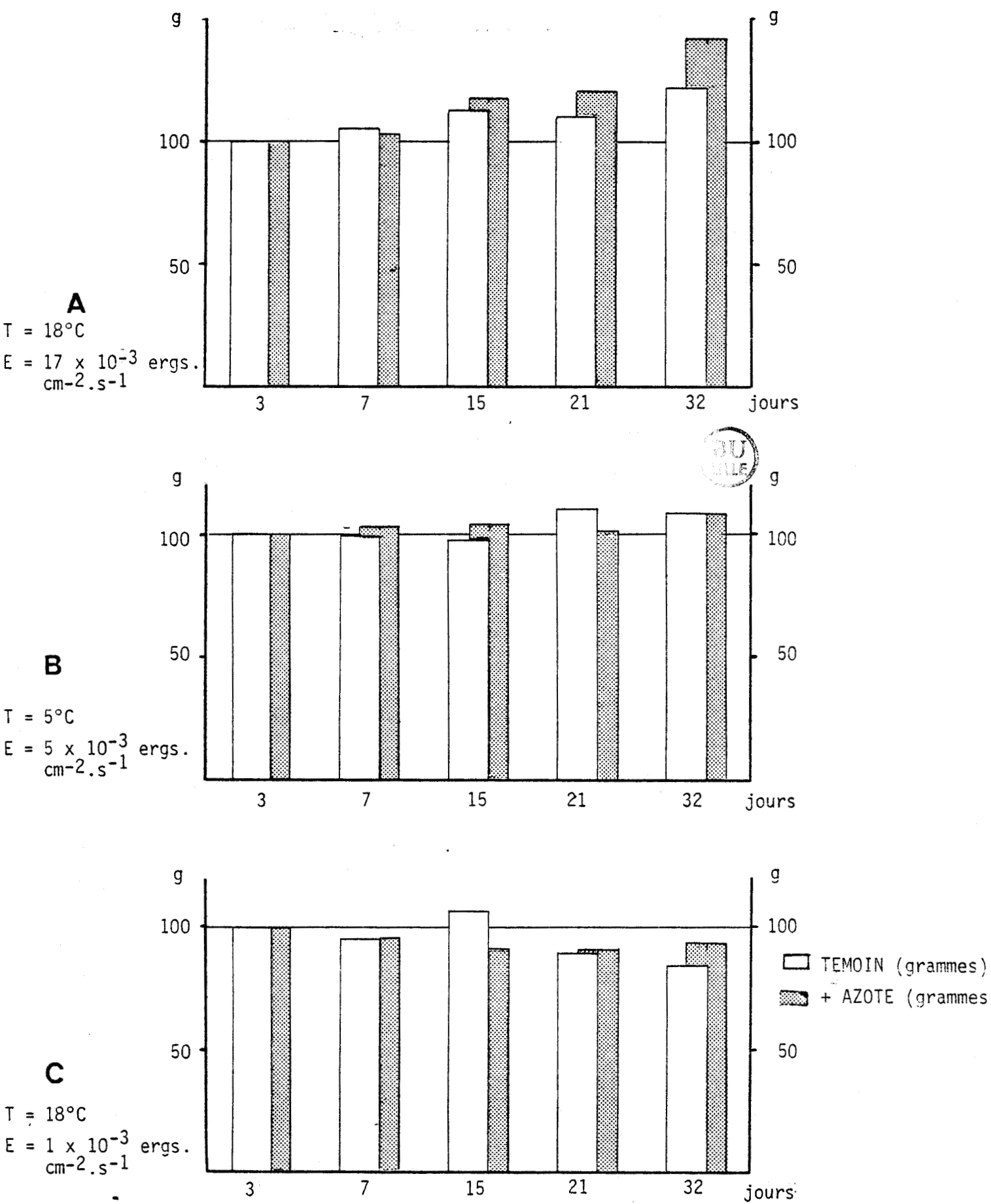
III. - DISCUSSION

A 18°C et pour un éclaircissement de 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, les algues préalablement enrichies en ammonium ont une croissance plus rapide que le témoin (**fig. 8**). Elle est caractérisée par une synthèse de matière sèche (**fig. 9**) qui est masquée en valeurs relatives par une entrée d'eau. L'apport d'azote augmente la capacité photosynthétique de l'algue et donc le carbone fixé disponible pour la croissance (CHAPMAN et al. 1978). Cette augmentation de matière sèche est beaucoup plus faible dans l'échantillon témoin.

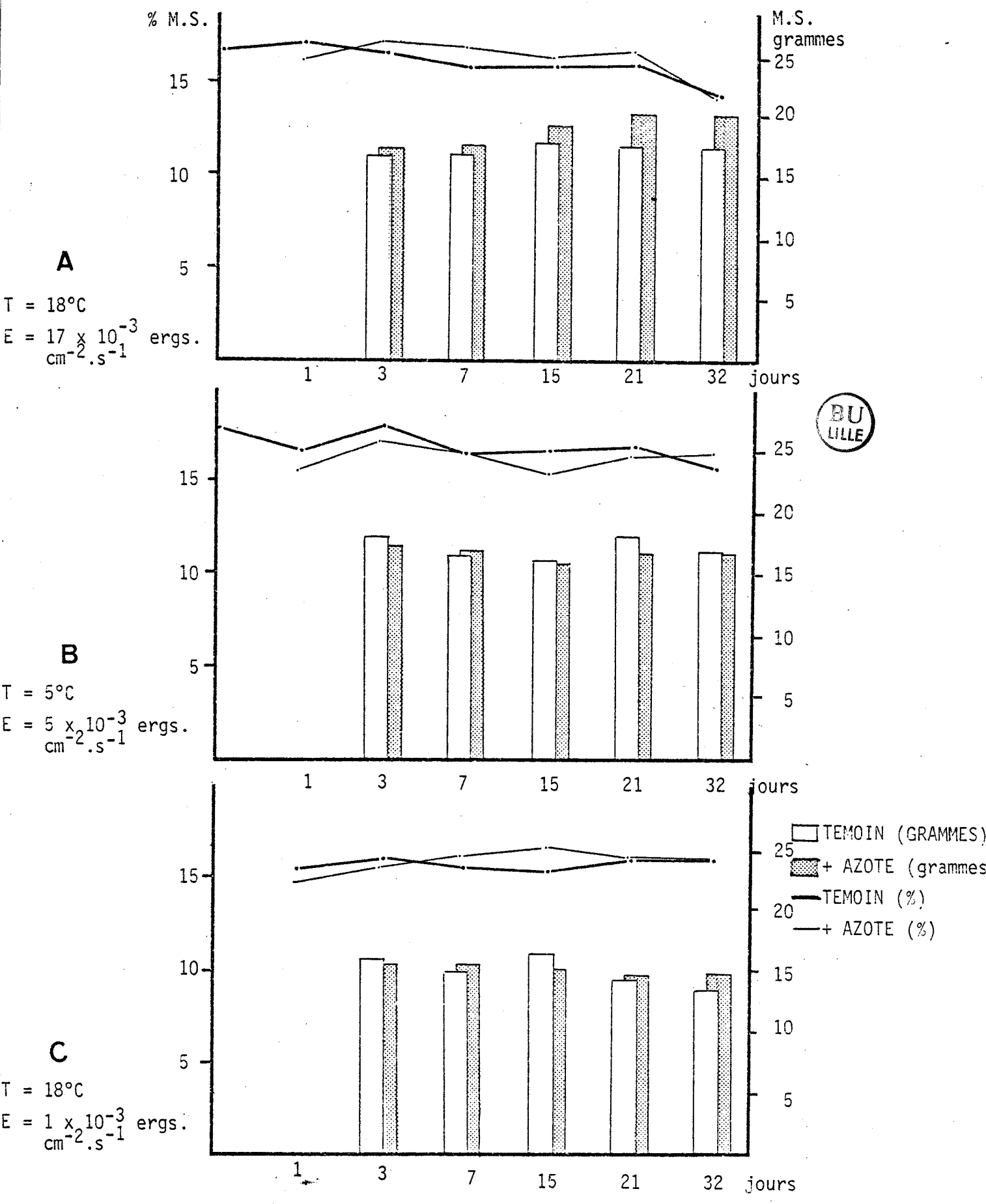
L'azote joue donc un rôle de facteur limitant sur la synthèse de matière sèche et sur la croissance lorsque les conditions de température et d'éclaircissement nécessaires au développement du végétal sont réunies.

FIGURE 8

CROISSANCE PONDERALE (EN GRAMMES) DE *GRACILARIA VERRUCOSA* EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE



VARIATIONS DE LA MATIERE SECHE EN VALEUR RELATIVE (EN % DU POIDS FRAIS)
 ET EN VALEUR ABSOLUE (GRAMMES) DE GRACILARIA VERRUCOSA EN FONCTION
 DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE



De plus, les teneurs en azote total diminuent dans les algues à forte croissance (fig. 10). Cette baisse serait proportionnelle, selon ROSENBERG et RAMUS (1982), à l'augmentation de biomasse. Dans les conditions de notre expérience, les quantités d'azote du milieu sont trop faibles pour permettre un renouvellement dans le thalle. La *Gracilaria* épuise donc ses réserves pour poursuivre la croissance.

Ce phénomène s'accompagne d'une diminution du taux de phycoérythrine dans les algues préalablement enrichies et dans le lot témoin. Cette relation entre la teneur en pigments hydrosolubles et le prétraitement en azote est également signalée par DEBOER et al. (1979). De même, ROSENBERG et RAMUS (1982) montrent que les quantités de phycoérythrine suivent les pics de nutriments dans le milieu de culture, et ce indépendamment de l'intensité lumineuse. Il semblerait donc, ainsi que le proposent BIRD et al. (1982), que les phycoérythrines constituent un "réservoir" d'azote, utilisé pour soutenir la croissance. Cette hypothèse reste néanmoins difficilement vérifiable, car les effets de l'éclairement ne peuvent pas être dissociés. Ainsi, GODIN (1984 comm. pers.) relève des valeurs de pigments dans *Laurencia pinnatifida* qui varient d'un facteur 2 en 3 heures, sous des éclairagements et des longueurs d'onde différentes. Eclairement et nutrition azotée seraient donc intimement liés dans les variations de pigments dans l'algue.

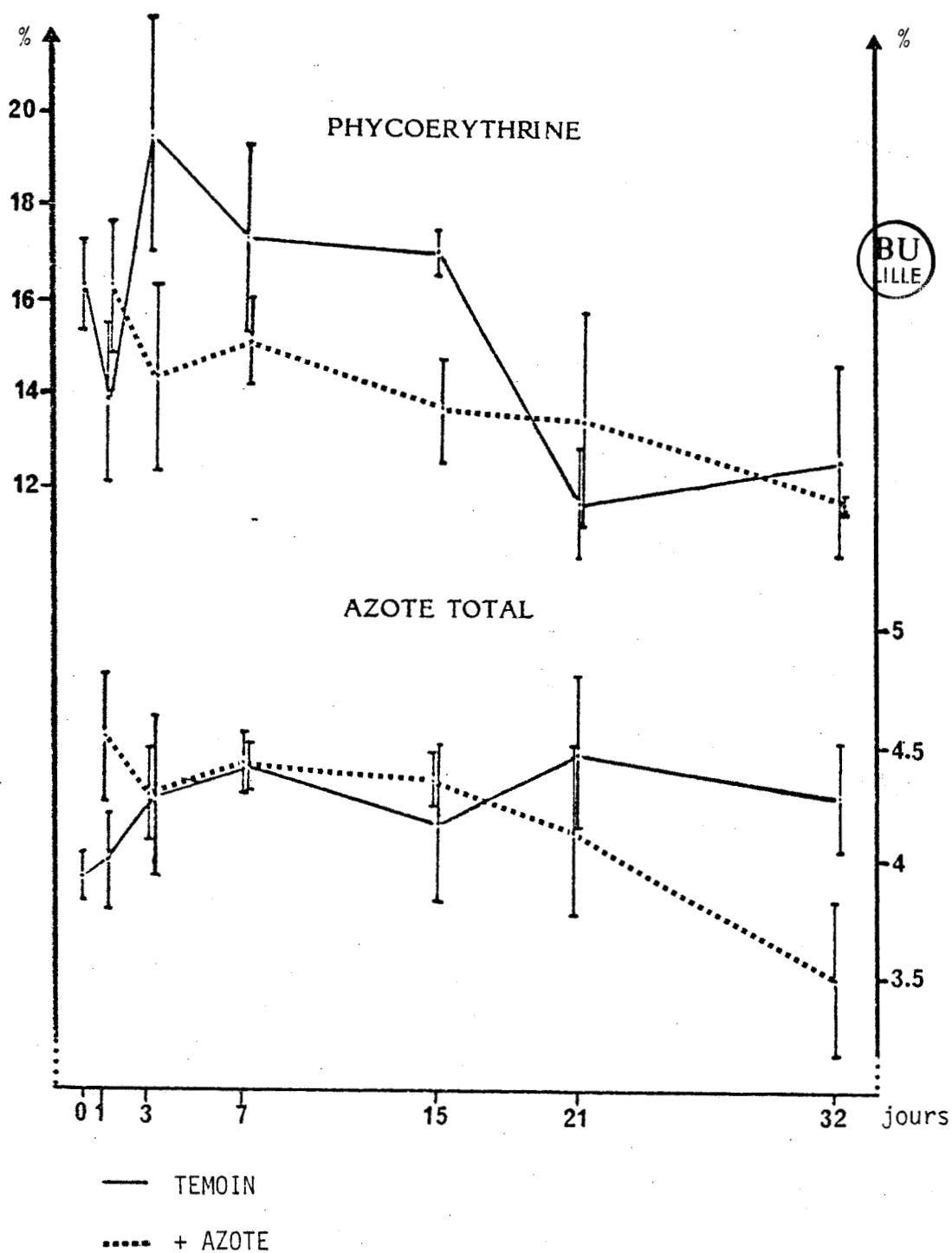
De plus, et contrairement à ce que trouvent BIRD et al. (1981a, 1981b), il n'y a pas, dans les conditions de notre expérience, de relation entre les teneurs en protéines et la quantité d'azote total dans le thalle. L'explication suivante peut être avancée :

- les protéines ne constitueraient pas chez *Gracilaria verrucosa* la forme majeure de stockage d'azote. Ce dernier, se trouverait essentiellement sous forme d'acides aminés. ROSENBERG et RAMUS (1982) montrent en effet que la fraction non protéique d'azote, vraisemblablement des acides aminés, est la forme la plus importante d'azote chez *Gracilaria foliifera*. Ces acides aminés libres représentent jusqu'à 40 % du total d'azote dans *Porphyra yezoensis* (OOHUSA et al. 1977).

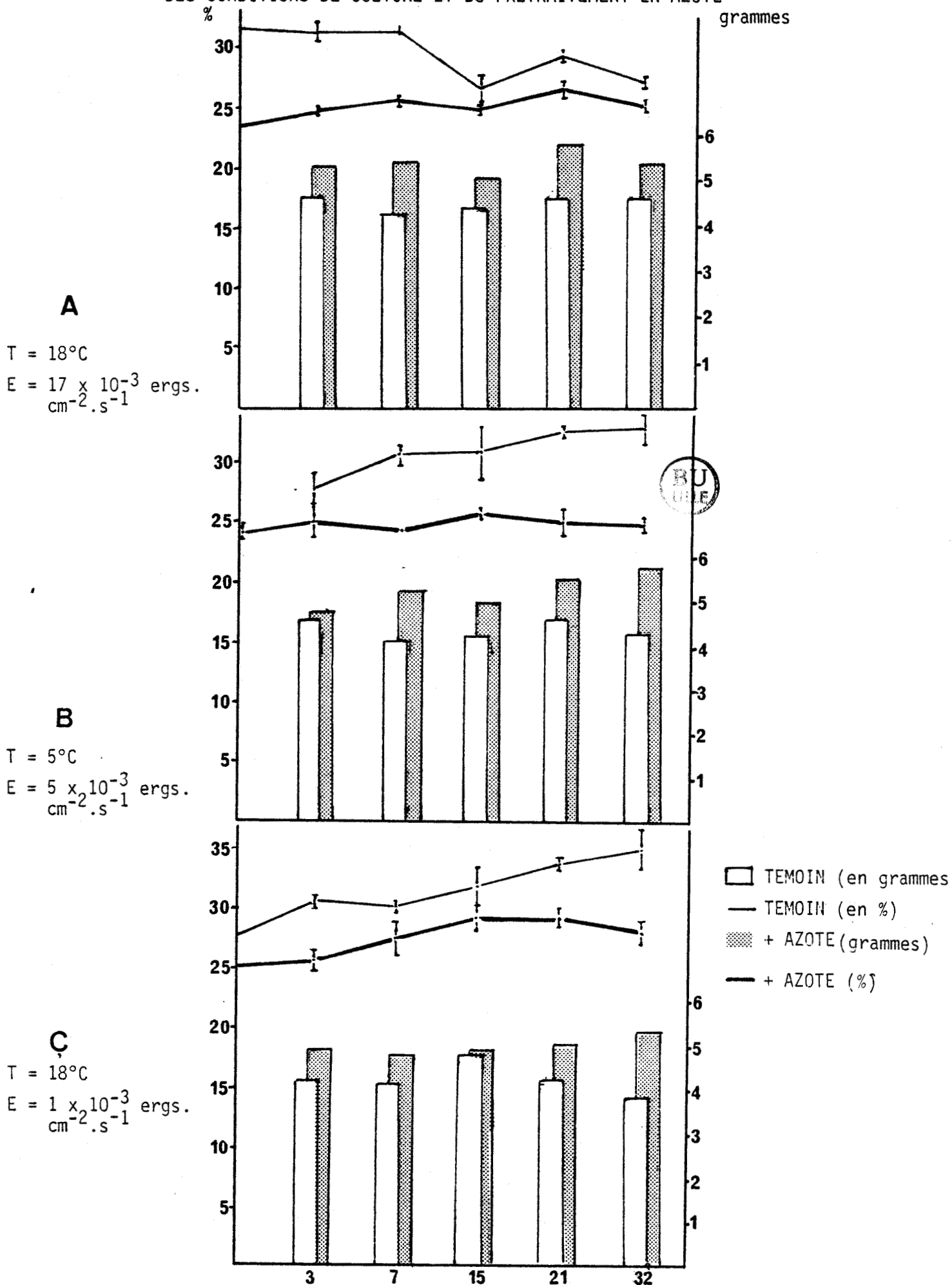
Au cours de la croissance, les rendements en agar des thalles prétraités diminuent (fig. 11 A). Cette baisse des teneurs en colloïdes peut donc être mise en relation avec l'azote : les algues enrichies en ammonium synthétisent plus de matière sèche que le témoin (fig. 9 A), ce qui se traduit par une baisse relative des teneurs en agar. Cette baisse est encore accentuée par le développement des ramifications qui sont moins riches en agar que les parties matures du thalle (STADLER 1984)

FIGURE 10

VARIATIONS DES TENEURS D'AZOTE ET DE PHYCOERYTHRINE (EN % DE MATIERE SECHE)
DE *GRACILARIA VERRUCOSA* CULTIVE A 18°C ET SOUS UN ECLAIREMENT DE
 $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, EN FONCTION DU PRETRAITEMENT EN AZOTE



VARIATIONS DE L'AGAR EN VALEUR RELATIVE (EN % DE LA MATIERE SECHE)
 ET EN VALEUR ABSOLUE (GRAMMES) DE *GRACILARIA VERRUCOSA* EN FONCTION
 DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU PRETRAITEMENT EN AZOTE



Cependant, en valeur absolue, cette relation n'est plus vérifiée car les quantités d'agar restent constantes. L'azote n'a donc pas d'effet direct sur la synthèse d'agar. CRAIGIE et al. (1984) parviennent à la même conclusion pour *Gracilaria foliifera*.

A 5°C et sous un éclaircissement de 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, les croissances du témoin et des thalles enrichis en azote sont limitées à 7 % environ (fig. 8 B). La température et la lumière sont donc les facteurs limitants. Durant cette période, l'algue accumule de l'azote (fig. 12). Ce phénomène est également signalé par LAPOINTE (1981) chez *Gracilaria foliifera* et par GAGNE et al. (1982) chez *Laminaria longicuris*. Cette accumulation d'azote n'a pas d'incidence semble-t-il sur les teneurs en phycoérythrine, qui baissent durant les 15 premiers jours dans le témoin, mais également dans les algues enrichies. Parallèlement à cette période correspond une forte diminution des quantités de matière sèche (fig. 9 B). Il y a donc une période transitoire d'adaptation du matériel pigmentaire aux nouvelles conditions d'éclaircissement. Ensuite, les teneurs en phycoérythrines augmentent fortement (fig. 12), et la synthèse de matière sèche reprend (fig. 9 B). Les conditions d'éclaircissement de 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ seraient donc suffisantes pour permettre le renouvellement en partie des assimilats photosynthétiques.

Il n'y a pas apparemment de relation entre les teneurs en azote du thalle et les rendements en agar lorsque les facteurs de température et de lumière limitent la croissance. Les quantités d'agar augmentent, notamment chez les algues préalablement enrichies en ammonium (fig. 10 B). Cette synthèse s'accompagne d'une légère augmentation des teneurs en sucres totaux.

A 18°C et sous un éclaircissement de 1×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, le poids frais des algues baisse (fig. 9 C). Cette diminution de biomasse est concomitante à une baisse du poids de matière sèche et suggère une utilisation des réserves carbonées par la plante (fig. 10 C). Ces dernières ne peuvent être renouvelées, car le faible éclaircissement de l'expérience bloque la photosynthèse, et donc le carbone fixé disponible pour la croissance. Pour preuve, les faibles teneurs en phycoérythrines (fig. 13) qui témoignent d'une photosynthèse apparente pratiquement nulle (RALPH et al. 1976). Le contenu en azote du thalle augmente régulièrement (fig. 13) alors que la biomasse diminue. La lumière est donc, dans ce cas, le facteur limitant de croissance.

FIGURE 12

VARIATIONS DES TENEURS D'AZOTE ET DE PHYCOERYTHRINE (EN % DE MATIERE SECHE)
 DE *GRACILARIA VERRUCOSA* CULTIVE A 5°C ET SOUS UN ECLAIREMENT DE
 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, EN FONCTION DU PRETRAITEMENT EN AZOTE

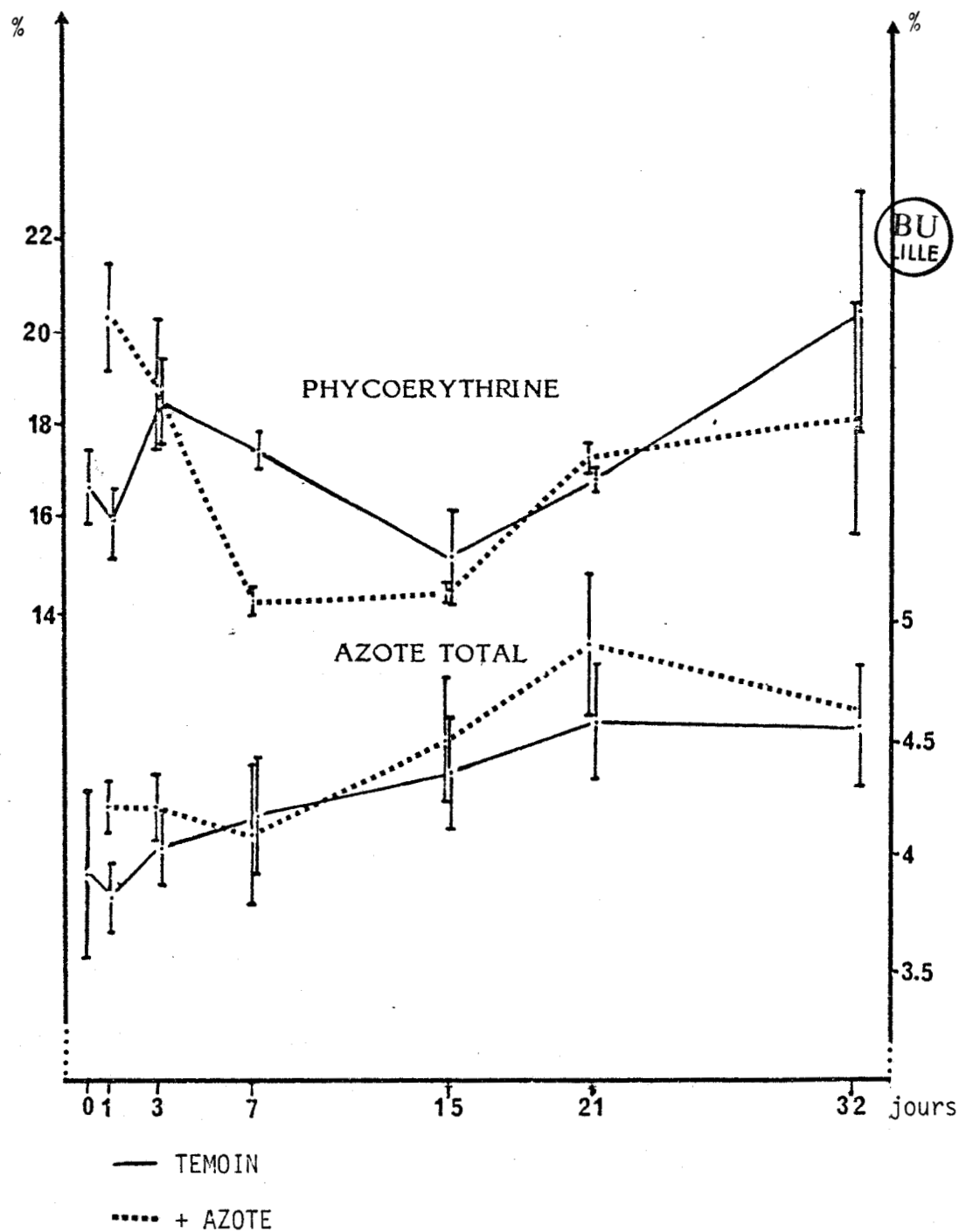
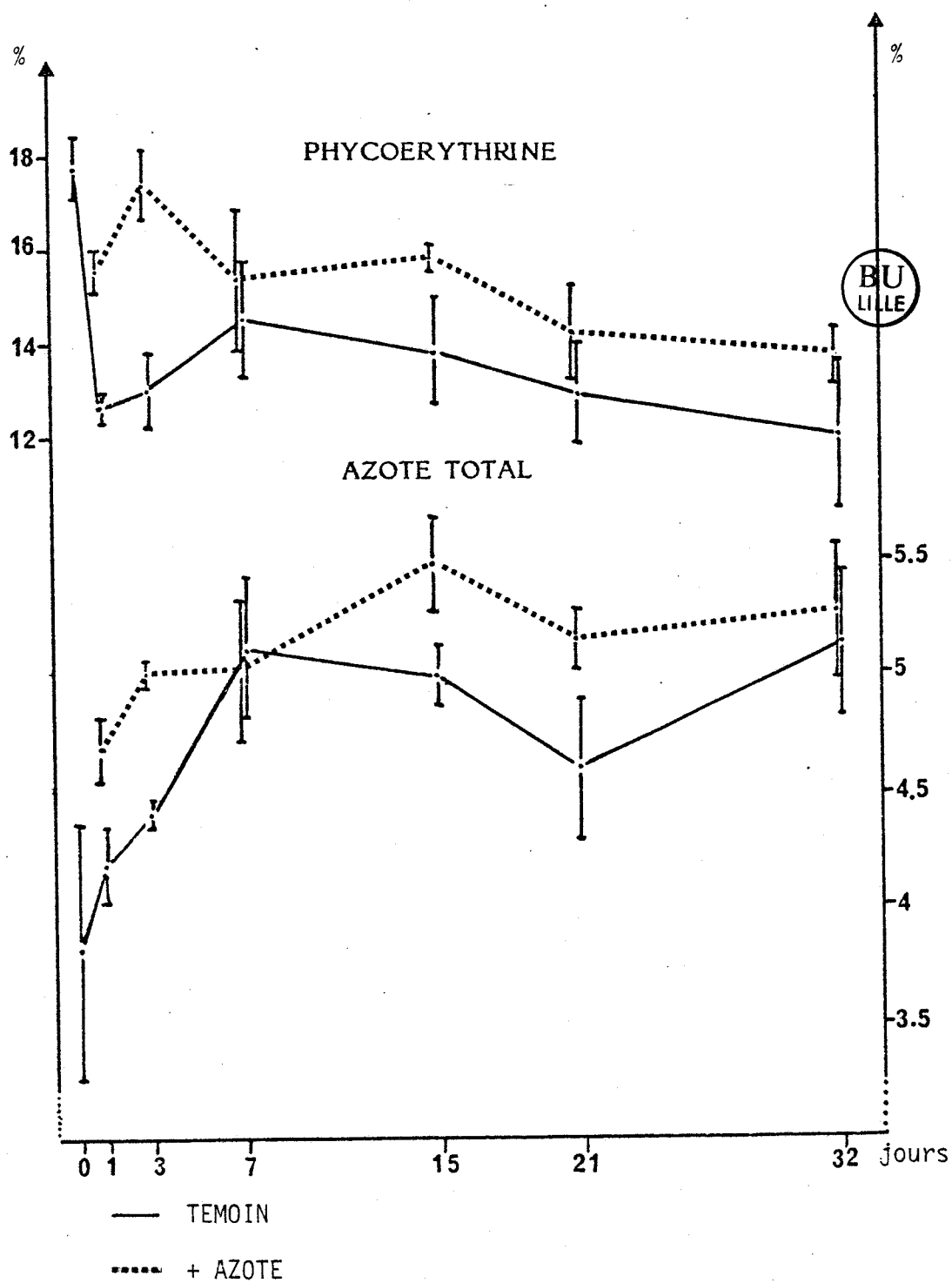


FIGURE 13

VARIATIONS DES TENEURS D'AZOTE ET DE PHYCOERYTHRINE (EN % DE MATIERE SECHE)
 DE *GRACILARIA VERRUCOSA* CULTIVE A 18°C ET SOUS UN ECLAIREMENT DE
 1×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, EN FONCTION DU PRETRAITEMENT EN AZOTE



Il est clair que le prétraitement en azote s'accompagne d'une synthèse nette d'agar au cours des trois premiers jours (fig. 11 C). Cependant, à long terme il semblerait que l'enrichissement en azote n'ait plus d'effet puisque la quantité de colloïdes reste constante. Cette synthèse s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'oses neutres qui se traduit par un rapport (oses totaux - 3.6-anhydrogalactose)/3.6 anhydrogalactose élevé. Le même phénomène s'amorce pour le témoin, mais s'arrête après 15 jours de culture.

IV. - CONCLUSION

Le rôle de l'azote sur la production de colloïdes et sur la croissance est un processus complexe qui fait intervenir un grand nombre de paramètres intimement liés.

De fait, la quantité d'azote disponible dans le milieu détermine les teneurs en pigments (RAMUS 1983), desquelles dépendent l'activité photosynthétique (RALPH et al. 1976). Mais ces teneurs en pigment dépendent également de l'intensité lumineuse (RAMUS 1983, WAALAND et al. 1974).

De plus, l'utilisation de l'azote du thalle est conditionnée par la qualité de l'éclairement. Ainsi l'incorporation d'azote sous forme d'acides aminés et de protéines est favorisée par les spectres bleus (BIRD et al. 1981). Cette incorporation d'azote dans les protéines se ferait au détriment de la synthèse des sucres (MORGAN et al. 1981).

Tout ces paramètres, éclairement, qualité de la lumière, disponibilité du milieu en azote, compliquent l'interprétation des résultats. Le fait que la croissance ne soit pas clairement définie accentue encore la difficulté : est-ce que l'augmentation de biomasse, suite à un enrichissement en azote, est due à une entrée d'eau, à une synthèse de matière sèche, au développement des ramifications et/ou au développement des parties mûres du thalle ?

Néanmoins, l'expérience montre que :

- Dans des conditions de température et d'éclairement favorables à la croissance, le prétraitement du thalle par l'azote accélère le développement du végétal. Les quantités d'agar augmentent peu après le troisième jour de culture, dans les échantillons enrichis ou non. L'azote n'aurait donc pas d'effet à long terme sur la synthèse de colloïdes. L'azote favorise la synthèse de matière sèche qui entraîne relativement une baisse du rendement en agar.

- Dans des conditions de culture où la température et/ou l'éclairement limitent la croissance, la quantité d'azote n'influe plus sur le développement de l'algue. Le thalle accumule de l'azote et parallèlement synthétise de l'agar.

Contrairement à ce qui est relevé dans la littérature (NEISH et al. 1971), l'azote ne semble pas influencer, dans un sens ou dans l'autre, la synthèse à long terme de colloïdes. Ce sont essentiellement les paramètres physiques de croissance qui conditionnent la production d'agar.

En fait, l'apport d'azote dans le milieu de culture, favorise surtout la croissance de l'algue et la synthèse de matière sèche (hors agar). Il intervient donc comme un facteur de croissance, et non comme un effecteur direct de la synthèse de l'agar.

CHAPITRE IV

PRODUCTION D'AGAR-AGAR EN RELATION AVEC

L'AGE ET LA CROISSANCE DU THALLE DE

GRACILARIA VERRUCOSA

Les précédentes expériences ont montré la difficulté d'interpréter les résultats lorsque la croissance n'est pas explicitement définie. Il est donc nécessaire de préciser les contributions respectives de la matière sèche et de l'eau dans les gains de biomasse. Une telle étude permettrait notamment d'expliquer les pertes de poids frais observées pour des algues cultivées dans des conditions simulant l'hiver.

Les ramifications sont également un élément constitutif de l'algue dont le rôle est sous-estimé. Elles sont susceptibles de modifier les résultats des mesures des différents composants, effectuées sur un thalle entier. Elles ont vraisemblablement une composition biochimique différente des parties plus âgées. Elles possèdent à priori des teneurs (en %) moins élevées de matière sèche du fait de la croissance rapide et des parois nouvellement formées. Cette différence est encore renforcée par les faibles teneurs en agar relevées chez les algues en croissance rapide.

Ces variations de composition suivant l'âge des parties du thalle ont une incidence sur les résultats d'autant plus marquée que le nombre de jeunes pousses est élevé. La manifestation directe serait une baisse des valeurs relatives de matière sèche et d'agar. Ce point méritait donc d'être vérifié par une étude comparative du comportement et de la composition en colloïdes et en matière sèche des jeunes pousses et des parties plus âgées du thalle.

Il est également intéressant d'associer une telle étude à une expérimentation en régime de cultures alternées, c'est-à-dire avec des algues cultivées dans des conditions favorables puis défavorables au développement du végétal. Les expériences précédentes montrent en effet que les algues en croissance accumulent de grandes quantités de matière sèche, vraisemblablement de l'amidon. Au cours de cette accumulation, la synthèse de colloïdes serait ralentie. Par contre, en phase stationnaire de croissance, la matière sèche diminue. Une partie serait utilisée comme source de carbone et/ou source d'énergie. Parallèlement, les teneurs en colloïdes augmentent dans les parois (cf. chap II et chap. III). Il importe donc d'établir une relation entre ces variations de matière sèche (agar non inclus) et les variations de colloïdes dans l'algue. Le principe expérimental consiste à cultiver, dans une première étape, des Gracilaires dans des conditions printanières de manière à permettre la constitution d'assimilats photosynthétiques. Dans une seconde étape, la croissance est freinée en conditions hivernales, dans le but d'étudier les variations de matière sèche suite à son utilisation par l'algue, et les répercussions au niveau de l'agar.

I. - MATERIEL ET METHODES

Les réserves carbonées et amylières des Gracilaires sont épuisées par un stockage de trois semaines en lumière atténuée (1.5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹) dans une eau de mer à la température de la pièce. A l'issue de cette période, un contrôle en microscopie optique permet de vérifier l'absence d'amidon dans les cellules (fig. 14). Les ramifications d'ordres primaire et secondaire sont alors séparées des thalles et congelées pour des analyses ultérieures.

Les parties mûres de thalles, exemptes de ramifications, sont cultivées pendant 39 jours dans des conditions qui simulent le printemps (cf. p. 16). Au delà, ces algues sont placées pendant 28 jours dans des conditions hivernales (cf. p. 16).

Des prélèvements de contrôle et des dosages sont réalisés après 12, 25, 39, 43 et 67 jours de culture. Le poids de matière fraîche est calculé (cf. p.17). Les ramifications sont prélevées sur 3 échantillons de thalle pour déterminer le poids de jeunes pousses par rapport à la biomasse totale. La part prise par les jeunes pousses dans la croissance de l'algue est déduite. Les échantillons de ramifications et d'axes primaires sont ensuite lyophilisés et soumis à l'extraction d'agar (cf. p. 19) (la faible masse de ramifications durant les premières étapes de l'expérience n'a pas permis l'extraction de colloïdes). Les quantités de sucres totaux et de 3,6-anhydrogalactose sont ensuite dosées (cf. p. 20) pour apprécier la qualité du gel.

Un contrôle en microscopie électronique a été effectué à chaque prélèvement sur un fragment d'axe primaire marqué (cf p. 23).

II. - RESULTATS

Dans des conditions de culture qui favorisent la croissance (température = 18°C, éclairage = 17×10^{-2} ergs.cm⁻².s⁻¹), la biomasse croît de 43,7 % en 39 jours (tab. 18). Cette croissance résulte d'une synthèse de matière sèche qui représente 38 % du gain de poids frais total, et d'une entrée d'eau qui représente les 62 % complémentaires (tab. 19 et 20).

Fig. 14 - Coupes transversales de thalles examinées en microscopie électronique.

a) Prélèvement effectué après 8 jours de culture en lumière atténuée. Le cytoplasme est très vacuolisé et pratiquement dépourvu d'amidon. G x 20 000.

b) Prélèvement après 39 jours de culture dans les conditions printanières. Les chloroplastes sont riches en plastoglobules lipidiques ; les grains d'amidon sont nombreux et de grande taille ; le cytoplasme renferme en outre des polysaccharides fibrillaires. G x 20 000.

c) Prélèvement après 53 jours de culture (39 jours en conditions printanières puis 14 jours en conditions hivernales). Le cytoplasme présente peu d'amidon et de nombreuses vésicules probablement d'origine golgienne. G x 28 000.

d) Prélèvement après 67 jours de culture (39 jours en conditions printanières suivis de 28 jours en conditions hivernales). L'amidon est à nouveau abondant, de même que les vésicules cytoplasmiques à contenu polysaccharidique fibrillaire.

A, amidon ; **C**, chloroplastes ; **P**, paroi ; **p**, plasmalemme ; **v**, vésicule à contenu polysaccharidique.

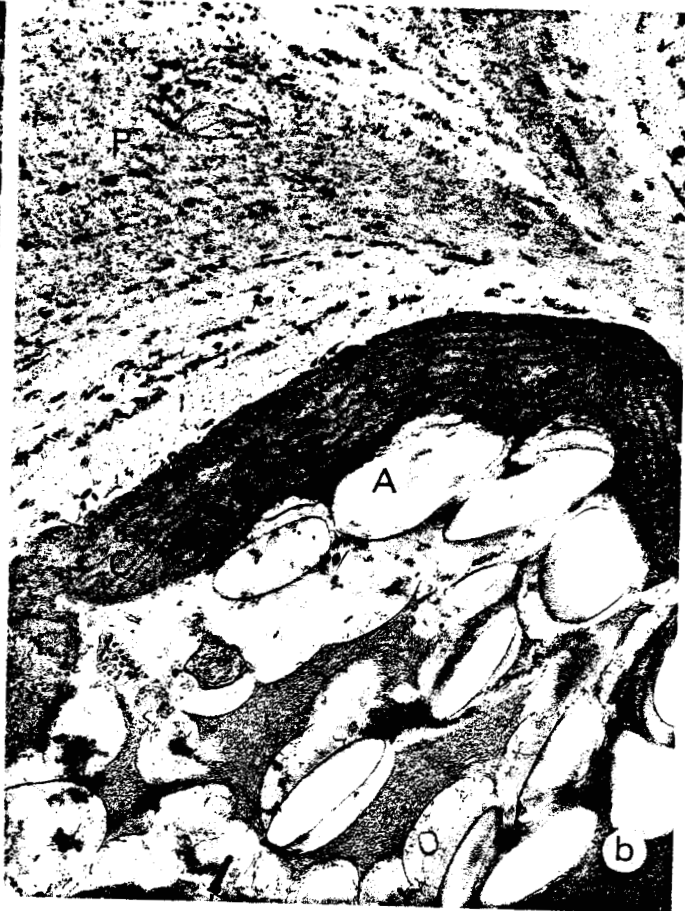


TABLEAU 18
 VARIATIONS DE LA BIOMASSE TOTALE, DE LA MATIERE SECHE
 DES AXES PRIMAIRES ET DE LA MATIERE SECHE DES RAMIFICATIONS
 EN FONCTION DU TEMPS ET DES CONDITIONS DE CULTURE

Jours	Variations du poids de matière fraîche	Poids de matière sèche des axes primaires	Poids de matière sèche des ramifications
	grammes	%	%
0	100.00	17.27 ± .24	-
12 (2)	110.80	18.76 ± .06	13.45 ± .10
25 (2)	120.12	21.88 ± .13	16.99 ± .14
39 (2)	143.72	24.30 ± .38	18.25 ± .21
53 (3)	137.00	25.05 ± .20	18.63 ± .15
67 (3)	136.40	26.56 ± .07	19.00 ± .14



- (2) éclaircement = $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température = 18°C, 16:8
- (3) éclaircement = $5 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température = 5°C, 8:16

TABLEAU 19

EVOLUTION EN VALEUR ABSOLUE DU POIDS FRAIS TOTAL ET DU POIDS FRAIS, DU POIDS DE MATIERE SECHE ET DU POIDS D'EAU DES AXES PRIMAIRES PAR RAPPORT A UN ECHANTILLON TEMOIN DE DEPART

Jours	Poids frais total (1) des thalles	Poids frais des axes primaires (1)	Poids de matière sèche des axes primaires (1)	Poids d'eau des axes primaires (1)
Témoin	100	100	17.27	82.73
12 (2)	+ 10.80	+ 6.48 ± 0.54	+ 2.71	+ 3.77
25 (2)	+ 20.12	+ 10.33 ± 0.36	+ 6.87	+ 3.46
39 (2)	+ 43.70	+ 22.15 ± 0.70	+ 12.41	+ 9.74
53 (3)	+ 37.00	+ 14.96 ± 2.38	+ 11.52	+ 2.40
67 (3)	+ 36.40	+ 12.46 ± 0.54	+ 12.59	- 0.13



(1) = en grammes

(2) = éclaircissement = $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température = 18°C, 16:8

(3) = éclaircissement = $5 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température = 5°C, 8:16

TABLEAU 20

EVOLUTION EN VALEUR ABSOLUE DU POIDS FRAIS TOTAL ET DU POIDS FRAIS, DU POIDS DE MATIERE SECHE ET DU POIDS D'EAU DES RAMIFICATIONS PAR RAPPORT A UN ECHANTILLON TEMOIN DE DEPART

Durée de culture	Poids frais total (1)	Poids frais des ramifications (1)	Poids de matière sèche des ramifications (1)	Poids d'eau des ramifications
Témoin	100			
12 (2)	+ 10.80	+ 4.32 ± 0.54	+ 0.58	3.74
25 (2)	+ 20.12	+ 9.89 ± 0.36	+ 1.68	8.21
39 (2)	+ 43.70	+ 21.55 ± 0.70	+ 3.93	17.62

53 (3)	+ 37.00	+ 22.74 ± 2.38	+ 4.24	18.50
67 (3)	+ 36.40	+ 23.94 ± 0.54	+ 4.55	19.40



(1) = en grammes

(2) = éclairement = 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, température = 18°C, 16:8

(3) = éclairement = 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, température = 5°C, 8:16

Les ramifications et les parties mûres du thalle interviennent chacune pour moitié dans le gain de poids frais de l'algue, mais leur contribution se fait sous une forme différente : la synthèse de matière sèche constitue l'essentiel du gain de biomasse des axes primaires (67 % soit 12,41 g ; **tab. 19**), alors que, dans les ramifications, l'eau est l'élément principal (84,5 % du gain de poids frais ; **tab. 20**).

Au cours de la croissance, la matière sèche augmente en valeur relative (+ 4,8 % dans les ramifications, et + 7 % dans les axes primaires) et en valeur absolue (respectivement + 3,93 g et + 12,44 g ; **tab. 19 et 20**). La masse sèche totale produite se répartit pour les 3/4 dans les axes primaires, et pour 1/4 dans les axes secondaires (**tab. 21**). Les jeunes pousses ont toujours des teneurs plus faibles de matière sèche (**fig. 15**). Par rapport à la matière sèche, les teneurs en agar des axes primaires passent de 30 % à 23 % en 31 jours de culture (**tab. 22**), tandis qu'en valeur absolue, la quantité d'agar augmente (+ 1,61 grammes pour 5,13 g au départ) (**tab. 23 ; fig. 16**). Il y a donc production nette d'agar, mais elle ne représente que 16 % du gain de matière sèche.

Les résultats de dosages effectués sur les ramifications sont statistiquement peu significatifs, compte tenu du faible nombre d'échantillons disponibles pour l'analyse (16,3 % de rendement en agar dans les ramifications après 25 jours de culture, 15 % après 39 jours et 17,8 % après 53 jours). Ils montrent toutefois de faibles teneurs en colloïdes dans les ramifications par rapport aux parties adultes du thalle. La production d'agar est deux fois plus faible que dans les axes primaires, mais elle représente 15 % du gain de matière sèche des ramifications (**tab. 24**).

Les quantités d'oses totaux augmentent en valeur absolue (6,15 g contre 5,13 g au départ ; **tab. 23**), mais baissent en valeur relative. La quantité de 3,6-anhydrogalactose demeure constante.

Dans des conditions de culture défavorables à la croissance (5°C, 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹), le poids frais diminue de 5 % (**tab. 18**). Au cours de cette période, les axes primaires et les ramifications se comportent différemment. Les valeurs relatives de matière sèche et d'eau sont constantes chez les jeunes pousses. Par contre, dans les axes primaires, la culture en conditions hivernales, provoque un départ d'eau important (7.23 g ; **tab. 19**) qui entraîne relativement une augmentation de la teneur en matière sèche (+ 2,26 %). Elle reste néanmoins constante en valeur absolue. Ce départ d'eau est responsable de la baisse de poids frais observée sur l'ensemble du thalle.

TABLEAU 21

RAPPORT DE PRODUCTION DE MATIERE SECHE ET DE MATIERE FRAICHE
ENTRE LES AXES PRIMAIRES ET LES RAMIFICATIONS DANS
DES CONDITIONS DE CULTURE FAVORABLES A LA CROISSANCE

Durée de culture (jours)	$\frac{\Delta mf I}{\Delta mf II}$	$\frac{\Delta ms I}{\Delta ms II}$
12	1,5	4,7
25	0,7	3,8
39	1,0	2,5



$\Delta mf I$ = variation du poids de matière fraîche des axes primaires entre 2 prélèvements.

$\Delta mf II$ = variation du poids de matière fraîche des ramifications entre 2 prélèvements.

$\Delta ms I$ = variation du poids de matière sèche des axes primaires entre 2 prélèvements.

$\Delta ms II$ = variation du poids de matière sèche des ramifications entre 2 prélèvements.

FIGURE 15

VARIATIONS DE LA MATIERE SECHE (EN % DU POIDS FRAIS) DES AXES PRIMAIRES ET DES RAMIFICATIONS, ET DU POIDS FRAIS DU THALLE, EN FONCTION DU TEMPS DANS DES CONDITIONS DE CULTURE ALTERNEE (18°C et $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ puis 5°C et $5 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

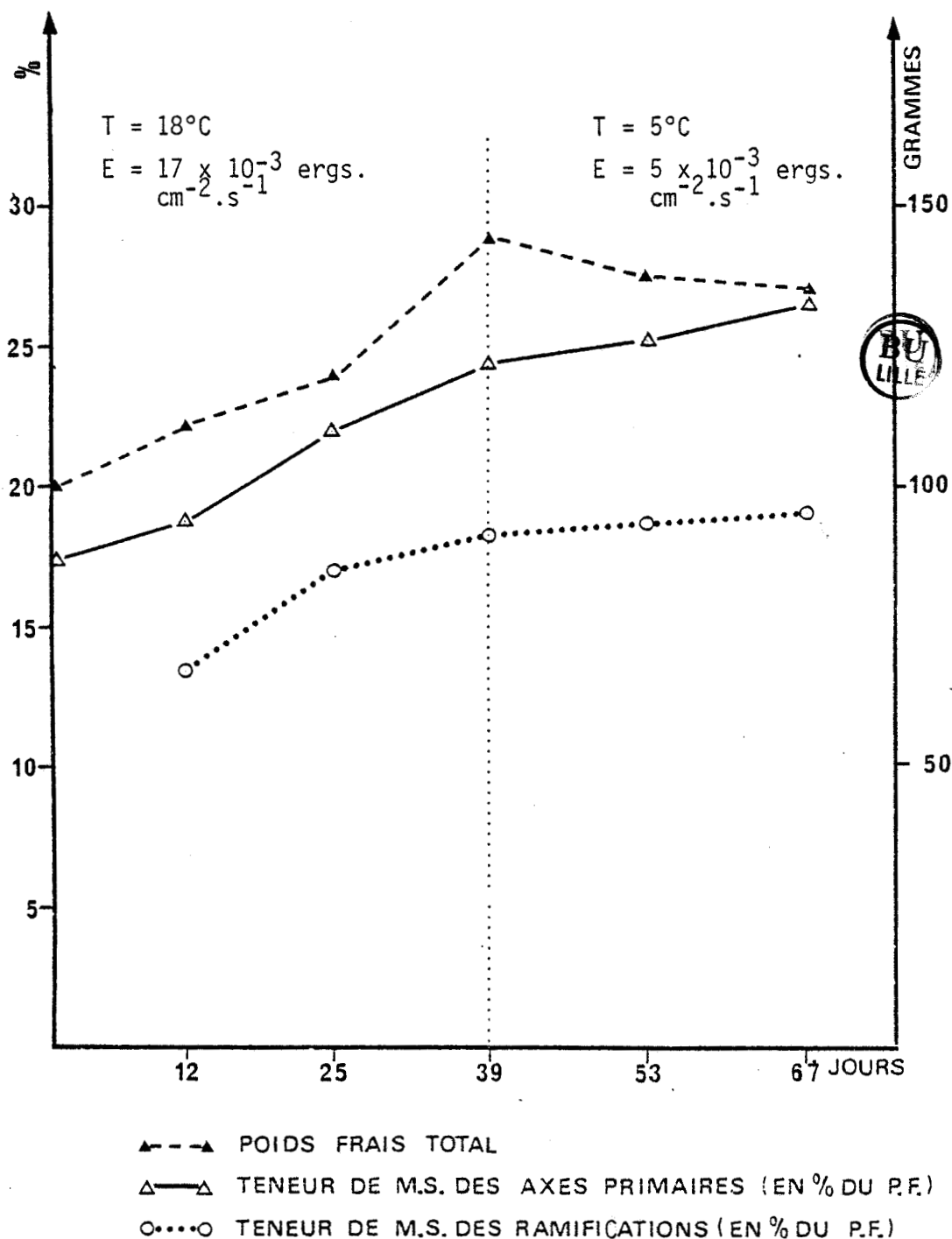


TABLEAU 22
 VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR ET DE LA QUALITE
 BIOCHIMIQUE DE CELUI-CI EN FONCTION DU
 TEMPS ET DES CONDITIONS DE CULTURE

Jours	Agar	Oses totaux	3.6-anhydrogalactose	oses totaux
	% (1)	% (2)	% (2)	3.6-anhydrogalactose/ 3.6-anhydrogalactose
0 (3)	29.70 ± .97	100.0 ± 0.2	48.5 ± 0.15	1.06
12 (3)	22.40 ± .56	96.4 ± 0.2	46.8 ± 1.30	1.06
25 (3)	25.90 ± .42	93.4 ± 0.1	39.5 ± 0.60	1.36
39 (3)	22.96 ± .22	91.3 ± 3.1	36.2 ± 0.30	1.52

53 (4)	28.60 ± .65	83.1 ± 1.0	30.1 ± 2.00	1.76
67 (4)	28.75 ± .50	82.1 ± 1.0	29.2 ± 0.60	1.81



(1) exprimé en % de matière sèche

(2) exprimé en % d'agar

(3) éclaircissement = 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, température = 18°C, 16:8

(4) éclaircissement = 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, température = 5°C, 8:16

TABLEAU 23

EVOLUTION EN VALEUR ABSOLUE DE LA MATIERE SECHE DES AXES PRIMAIRES,
DE L'AGAR, DES OSES TOTAUX ET DU 3.6-ANHYDROGALACTOSE EN FONCTION DU TEMPS
ET DES CONDITIONS DE CULTURE PAR RAPPORT A UN ECHANTILLON TEMOIN DE DEPART

Jours	Matière sèche	Agar	Oses totaux	3.6-anhydrogalactose	oses totaux
	grammes	grammes	grammes	grammes	3.6-anhydrogalactose/ 3.6-anhydrogalactose
Témoin	17.27	5.13	5.13	2.49	1.06
12 (1)	+ 2.71	- 0.73	- 0.89	- 0.43	1.06
25 (1)	+ 6.87	+ 0.93	+ 0.53	- 0.09	1.36
39 (1)	+ 12.41	+ 1.61	+ 1.02	- 0.05	1.52
53 (2)	+ 11.52	+ 2.98	+ 1.61	- 0.04	1.75
67 (2)	+ 12.59	+ 3.35	+ 1.83	- 0.02	1.81

(1) éclaircissement = 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, température = 18°C, 16:8

(2) éclaircissement = 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, température = 5°C, 8:16

FIGURE 16

VARIATIONS DE L'AGAR DES AXES PRIMAIRES EN VALEUR RELATIVE (EN % DE MATIERE SECHE) ET EN VALEUR ABSOLUE (EN GRAMMES). EN FONCTION DU TEMPS DANS DES CONDITIONS DE CULTURE ALTERNEE (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹)

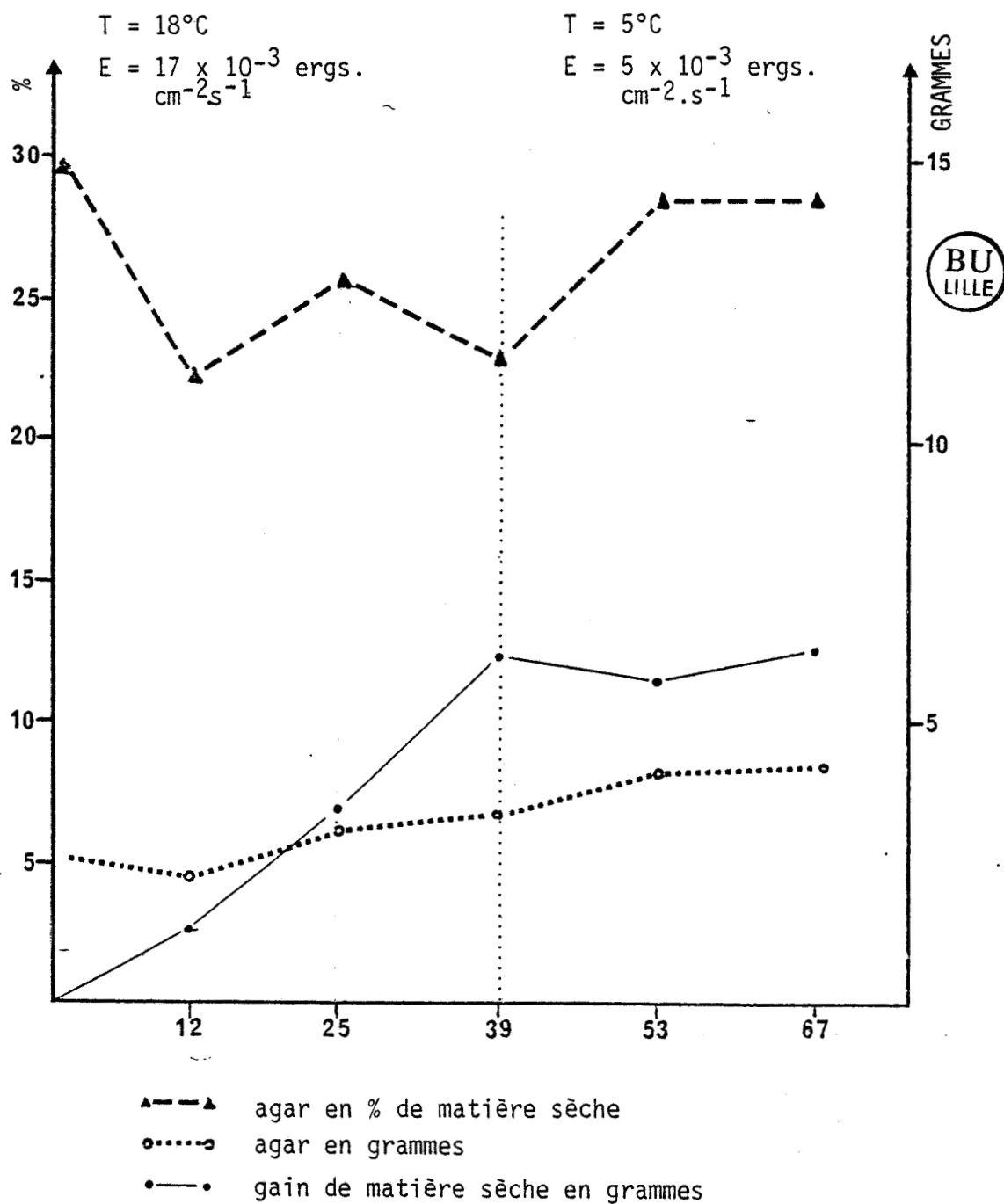


TABLEAU 24

PRODUCTION D'AGAR ET DE MATIERE SECHE DANS LES RAMIFICATIONS
 EN FONCTION DU TEMPS ET DES CONDITIONS DE CULTURE
 (pour 100 g frais de thalle au départ)

Temps de culture	Poids total d'agar	Δ Agar	Δ Matière sèche	Δ Agar
	grammes	grammes	grammes	Δ Matière sèche
25 jours	0.27	0.27	1.68	0.16
39 jours	0.50	0.32	2.25	0.14
59 jours	0.75	0.16	0.31	0.52



Δ Agar = variation du poids d'agar entre 2 prélèvements

Δ Matière sèche = variation du poids de matière sèche entre 2 prélèvements

La production d'agar se poursuit dans les axes primaires (la teneur en colloïdes passe de 22,96 % à 28,60 % en 14 jours (tab. 22) et le poids augmente de 1,37 g (tab. 25). Elle devient prépondérante par rapport aux autres synthèses : la production d'agar est près de dix fois supérieure à la production totale de matière sèche (agar inclus), ce qui suggère une mobilisation des réserves (tab. 24). La quantité d'oses totaux augmente de 0,81 g. Par contre, le poids de 3,6-anhydrogalactose reste constant. Dans les ramifications, la production d'agar est deux fois plus faible qu'en été, mais elle représente alors 50 % de la production de la matière sèche dans les jeunes pousses (tab. 24).

III - DISCUSSION

La croissance de *Gracilaria verrucosa* cultivé à 18°C et sous un éclaircissement de $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ peut être définie comme l'action combinée d'une synthèse de matière sèche et d'une entrée d'eau (fig. 16 ; fig. 17). Il est intéressant de relever le rôle important joué par les jeunes pousses qui contribuent pour moitié à l'accroissement de biomasse totale. Cependant, l'évolution de la matière sèche et celle concomitante de la teneur en eau des ramifications diffèrent en comparaison des parties mûres du thalle (fig. 18).

Dans les parties jeunes du thalle, les teneurs en eau sont toujours plus élevées que dans le reste de la plante. Ce phénomène est d'autant plus marqué que les pousses sont jeunes (86,65 % d'eau au bout de 12 jours contre 81,75 % après 39 jours). Ce fait est caractéristique des algues en forte croissance qui n'ont pas le temps d'accumuler des réserves carbonées.

Les clichés en microscopie électronique confirment ces résultats : le cytoplasme contient peu d'assimilats photosynthétiques (KLING 1984, comm. pers.). La paroi présente un aspect lâche, peu contrasté et peu organisé, et les teneurs en agar des ramifications et donc des parois sont très faibles. CRAIGIE et WEN (1984) aboutissent aux mêmes conclusions pour les teneurs en agar dans les jeunes pousses. Tous ces éléments plaident en faveur d'une hypothèse selon laquelle les parties de thalle en forte croissance possèdent une structure de paroi compatible avec l'élongation cellulaire. Celles-ci renferment en effet un agar avec un rapport (oses totaux - 3,6-anhydrogalactose)/3,6-anhydrogalactose élevé qui caractérise une faible force de gel (CHRISTIAEN et al. 1984).

TABLEAU 25

PRODUCTION D'AGAR ET DE MATIERE SECHE DANS LES AXES PRIMAIRES
 EN FONCTION DU TEMPS ET DES CONDITIONS DE CULTURE
 (pour 100 g frais de thalle au départ)

Temps de culture	Poids total d'agar	Δ Agar	Δ Matière sèche	Δ Agar
	grammes	grammes	grammes	Δ Matière sèche
25 jours	0.93	0.93	2.71	0.34
39 jours	1.61	0.68	4.16	0.16
53 jours	2.98	1.37	-	-
67 jours	3.25	0.37	0.18	9.70

Δ Agar = variation du poids d'agar entre 2 prélèvements

Δ Matière sèche = variation du poids de matière sèche entre 2 prélèvements

VARIATIONS DU POIDS FRAIS DES THALLES, DU POIDS FRAIS, DU POIDS D'EAU ET DE MATIERE SECHE DES AXES PRIMAIRES (EN GRAMMES) EN FONCTION DU TEMPS, DANS DES CONDITIONS DE CULTURE ALTERNEE (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹)

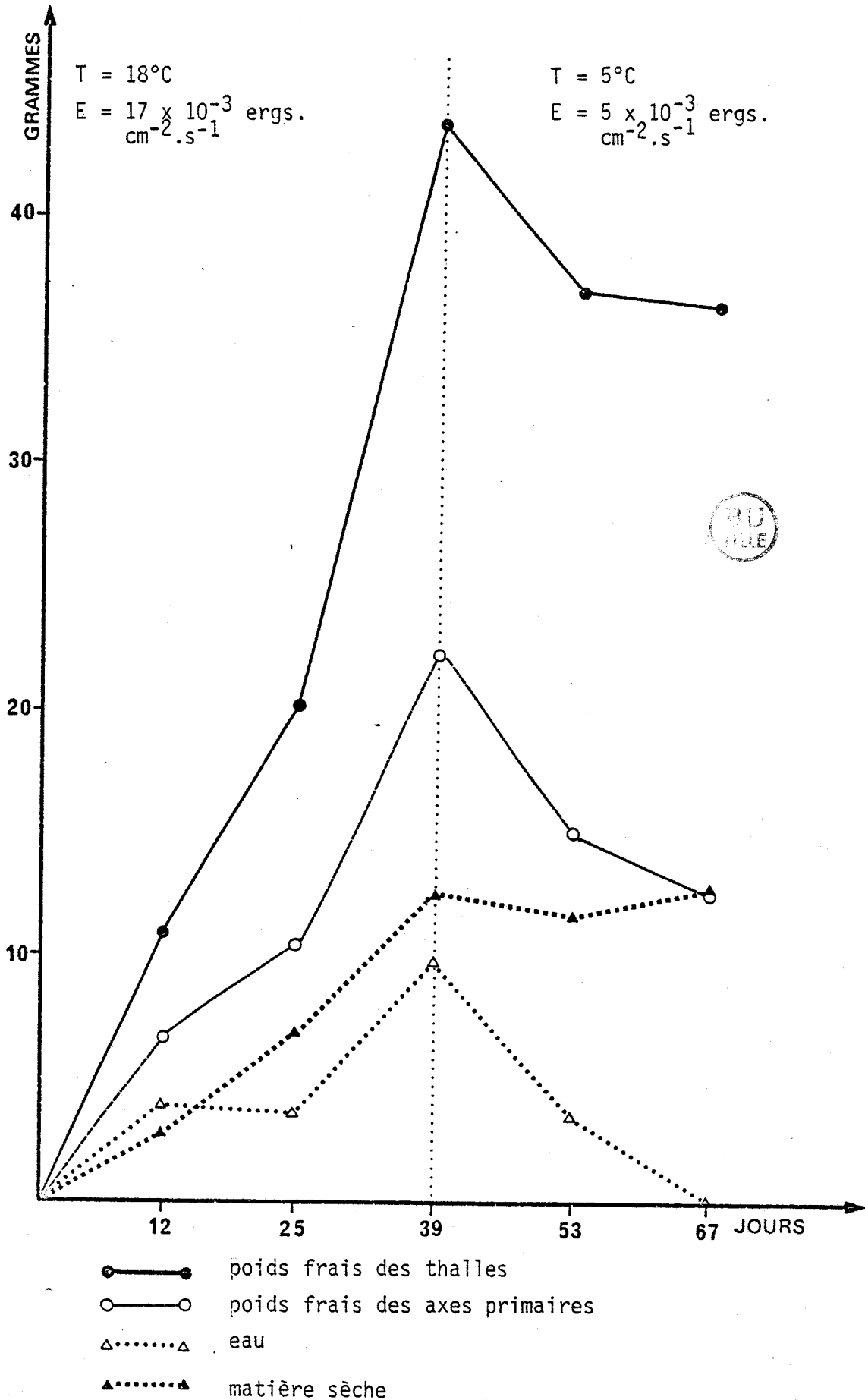
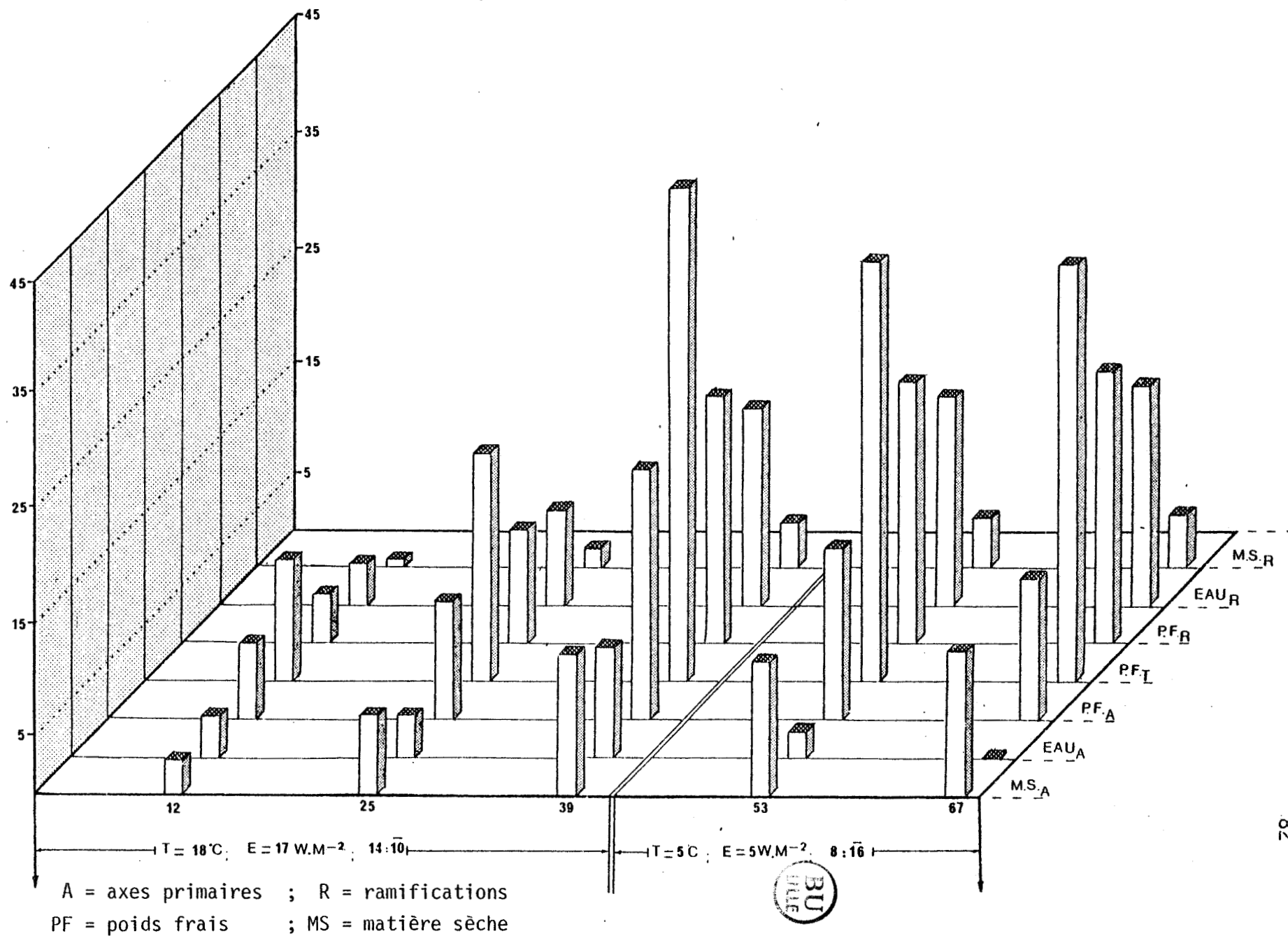


FIGURE 18 - FIGURE RECAPITULATIVE DE L'EVOLUTION (EN GRAMMES) DU POIDS FRAIS, DU POIDS DE MATIERE SECHE ET DU POIDS D'EAU DES AXES PRIMAIRES ET DES RAMIFICATIONS EN FONCTION DU TEMPS DANS DES CONDITIONS DE CULTURE ALTERNEE (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹)



Comme prévu, les jeunes pousses, beaucoup moins riches en matière sèche et en colloïdes que les parties âgées du thalle, contribuent au gain de biomasse et infléchissent les rendements en colloïdes et en matière sèche lors d'extractions effectuées sur des thalles entiers.

Il convient donc de définir avec soin les conditions de prélèvement du matériel d'étude avant de tirer des conclusions générales.

Dans les parties mûres du thalle, l'accumulation de matière sèche passe de 17,27 % à 24,3 % soit une synthèse de 12,41 g pour un poids de départ de 17,27 g. Il semblerait, à l'appui des clichés en microscopie électronique, que la synthèse d'amidon floridéen soit la principale responsable de l'augmentation des valeurs absolues et relatives de matière sèche (fig. 19). La synthèse a été favorisée par l'utilisation d'un éclaircissement élevé de $17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (TRIPODI et BETH 1976). Cette différence de niveau énergétique avec les conditions naturelles de vie de l'algue peut expliquer qu'une telle relation positive entre la teneur en matière sèche et la croissance ne soit pas relevée dans la nature (CHRISTIAEN 1981).

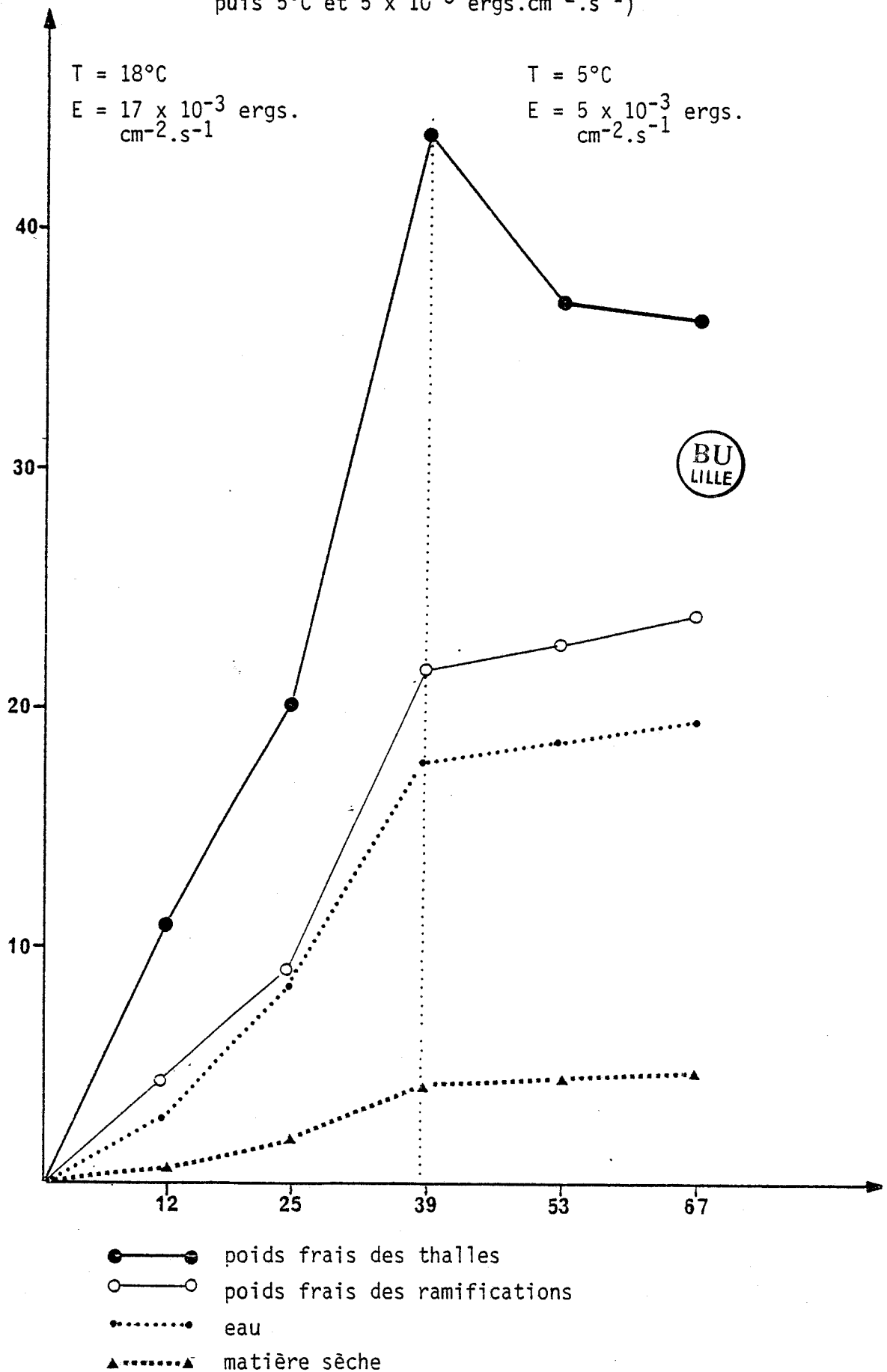
Cette accumulation d'amidon floridéen a été également signalée par ROSENBERG et RAMUS (1982) chez *Gracilaria foliifera* en fin de phase de croissance : elle représente jusqu'à 36 % du poids de matière sèche du thalle. L'ampleur du phénomène prend toute sa signification pour l'analyse des teneurs en colloïdes de l'algue, dans la mesure où elle modifie les valeurs relatives des rendements. Ces derniers sont généralement exprimés en % de matière sèche et donc également en fonction du contenu en amidon de l'algue.

Dans le cas présent, l'accumulation d'amidon dans l'algue entraîne une diminution des rendements en colloïdes qui pourtant augmentent en valeur absolue.

Cette synthèse de colloïdes en phase de croissance constitue donc un fait nouveau qui avait été masqué jusqu'à présent par l'expression des résultats en valeurs relatives. Elle ne débute, chez les axes primaires, qu'après une phase transitoire au cours de laquelle l'algue a reconstitué une partie de ses réserves carbonées. Cette phase transitoire est peut-être à l'origine des modifications structurales dans la paroi (rythmes de dépôt). Puis l'accumulation de matière sèche continue, mais elle est concomitante à une synthèse d'agar caractérisée par une augmentation de galactose. CRAIGIE et al. (1984) ont mis également en évidence cette relation entre la température et la teneur en galactose de l'agar.

FIGURE 19

VARIATIONS DU POIDS FRAIS DES THALLES, DU POIDS FRAIS, DU POIDS D'EAU ET DE MATIERE SECHE DES RAMIFICATIONS (EN GRAMMES) EN FONCTION DU TEMPS, DANS DES CONDITIONS DE CULTURE ALTERNEE (18°C et 17×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ puis 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹)



A 5°C et sous un éclaircissement de 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹, c'est-à-dire dans des conditions défavorables à la croissance, le poids frais de l'algue diminue. Une telle observation avait déjà été faite dans les expériences précédentes. La responsabilité de cette chute de biomasse est presque exclusivement le fait d'un départ d'eau dans les parties mûres du thalle.

Il est intéressant d'analyser séparément le comportement des ramifications et des parties mûres du thalle, qui s'avère encore plus différent que durant la phase de croissance (fig. 19).

En effet, le poids frais des jeunes pousses a tendance à se stabiliser. Parallèlement, les valeurs relatives et absolues de matière sèche demeurent pratiquement constantes. Les ramifications entrent donc dans une phase qui peut être qualifiée de stationnaire.

A l'inverse, dans les parties mûres du thalle, le poids frais diminue. Cette perte de biomasse est due à un départ d'eau. Ce dernier entraîne relativement une augmentation de teneur en matière sèche. Or, en valeur absolue, la quantité de matière sèche, agar non compris, diminue. Une partie a donc été utilisée comme source d'énergie et/ou source de carbone.

Cette fraction de matière sèche utilisée par la cellule est probablement constituée par de l'amidon. Ainsi, ROSENBERG et RAMUS (1982) montrent que les réserves amylofères de *Gracilaria foliifera* diminuent lorsque les conditions sont défavorables à la croissance. Elles sont complètement épuisées pendant l'hiver. Dans les conditions de notre expérience, la présence d'amidon après 14 et 28 jours de culture à 5°C et 5×10^{-3} ergs.cm⁻².s⁻¹ s'explique par la courte durée de l'expérimentation et par l'éclaircissement employé, qui est plus important que celui rencontré en hiver dans la nature.

L'évolution de l'agar dans l'algue est encore plus caractéristique. En effet, les augmentations de colloïdes en valeurs absolues indiquent une synthèse notable durant la phase hivernale. Cette synthèse de colloïdes est accompagnée par un épaissement des parois, visible en microscopie électronique. Ces dernières apparaissent plus contrastées que précédemment. De plus, la stratification constituée par les dépôts successifs de plusieurs couches de mucilages n'est pas sans rappeler la secondarisation des parois. Cette observation va dans le sens des travaux de YOUNG (1980) sur

Anthithamnion. Cet auteur met en évidence, chez cette algue rouge, des structures particulières qui ressemblent à des secondarisations de parois. Il hésite cependant à les dénommer ainsi *sensu stricto*, car les modalités de dépôts sont différentes des végétaux supérieurs.

Devant cette augmentation rapide des quantités de colloïdes dans la paroi et la baisse de quantités de matière sèche, la synthèse d'agar apparaît liée à l'évolution des réserves amylières de la Gracilaire. Cette idée est renforcée par l'expérience de SHEATH et al. (1979a) qui supposent que l'amidon floridéen de **Porphyridium** intervient essentiellement dans les synthèses de mucilages. Par contre, il ne jouerait pas de rôle important, en tant que substrat ou source d'énergie de la cellule, dans les processus de division (SHEATH et al. 1979b).

Une autre expérience vient renforcer l'argumentation en faveur d'une relation entre la teneur en amidon et la teneur en colloïdes. JOSELEAU (1984) montre chez **Hevea** l'existence d'une relation entre la diminution des quantités d'amidon, en réponse à une importante activité amylasique, et la synthèse de gommés. Tout se passe donc comme si une partie de l'amidon, stockée pendant la phase de croissance, intervient dans les synthèses de colloïdes. Cette hypothèse de travail est reprise sur le plan biochimique au laboratoire.

Comme précédemment, la quantité d'oses totaux augmente et celle de 3,6-anhydrogalactose demeure constante. Le rapport (oses totaux - 3,6-anhydrogalactose) / 3,6-anhydrogalactose résultant, supérieur à celui trouvé dans une expérience précédente (tab. 3, p. 29) ne contredit pas cependant nos hypothèses de départ. La valeur élevée obtenue pour le rapport (oses totaux - 3,6-anhydrogalactose) / 3,6-anhydrogalactose s'explique par la courte durée de l'expérimentation (1 mois) qui n'a pas permis aux algues d'achever les transformations pariétales.

IV. - CONCLUSION

L'expression des résultats en valeur relative apporte un cliché instantané sur les proportions des différentes composantes de l'algue, les unes par rapport aux autres, et les valeurs absolues traduisent les grandes orientations métaboliques de l'algue.

Un tissu jeune est plus pauvre en matière sèche et en agar qu'un tissu âgé. Le tissu jeune a donc un rendement en parois plus faible, d'où une paroi plus fine, et/ou un rendement en agar moindre, d'où une paroi moins rigide. Dans les deux cas, ces résultats renforcent l'idée que, dans les tissus jeunes, la structure de la paroi est compatible avec l'élongation cellulaire.

Il semblerait que la biosynthèse de l'agar se définisse par deux étapes de culture successives :

- En phase de croissance, les parties mûres du thalle accumulent en grande quantité des réserves carbonées sous forme d'amidon floridéen. Ce composé contribue à l'augmentation de matière sèche dans le thalle et masque en valeur relative les synthèses d'agar qui ont effectivement lieu.

Les synthèses de colloïdes et de matière sèche sont concomitantes, mais leurs courbes sont décalées dans le temps. Ce phénomène peut être expliqué par une vitesse de biosynthèse différente. Les températures élevées (18°C) et les éclaircissements importants ($17 \times 10^{-3} \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) favoriseraient préférentiellement la formation de réserves carbonées dans les axes primaires, sans nuire à la synthèse d'agar. Parallèlement, les ramifications riches en eau se développent et contribuent au gain de biomasse. Leur teneur en colloïdes par rapport à la matière sèche est toujours inférieure à celle des parties plus mûres du thalle.

- La seconde étape est caractérisée par une perte de biomasse. Cette baisse de poids frais est due presque exclusivement à un départ d'eau dans les parties âgées du thalle. La quantité d'agar augmente tandis que le poids de matière sèche total reste constant. Tout se passe donc comme si une partie de la matière sèche, vraisemblablement de l'amidon floridéen synthétisé pendant la phase de croissance, est utilisée lors de la biosynthèse des colloïdes qui s'accumulent en hiver dans les parois. De plus, il y a un ralentissement de moitié de la production d'agar dans les ramifications, pauvres en amidon. Ce ralentissement n'est pas observé dans les tissus âgés. Ces résultats plaident également en faveur d'une utilisation des réserves pour la synthèse de l'agar : seuls les tissus pourvus d'amidon continuent à synthétiser de l'agar. De nombreuses vésicules, contenant du matériel polysaccharidique, sont observées en microscopie électronique dans le cytoplasme des axes primaires (VERDUS et al. 1984). Ce matériel est transféré du cytoplasme vers la paroi. Sa nature biochimique n'est pas encore connue, pas plus que la manière dont est utilisé l'amidon floridéen.

CONCLUS ION GENERALE

Les données de la littérature laissaient croire à un antagonisme entre la croissance pondérale et la production de colloïdes. En fait, et conformément aux hypothèses de départ, ce phénomène peut être interprété comme une différence de vitesses de synthèse.

Ce décalage des courbes est maintenant bien expliqué :

- d'une part, l'accroissement de la biomasse est sensible aux conditions du milieu : température, éclaircissement et nutrition azotée. L'augmentation du poids de matière fraîche résulte d'une entrée d'eau et d'une synthèse de matière sèche qui est probablement représentée en majeure partie par de l'amidon floridéen.

- d'autre part, cette phase préliminaire de constitution de réserves amylières est suivie d'un accroissement des quantités d'agar. La synthèse du colloïde est plus importante que la synthèse de matière sèche après la phase de prolifération du thalle, lorsque les conditions de température, de lumière et d'éclaircissement sont défavorables à la croissance. Il apparaît alors clairement qu'une redistribution de la matière sèche se produit en direction des colloïdes pariétaux. Ce phénomène est généralement masqué par l'expression des résultats en valeurs relatives. Le raisonnement en valeurs absolues a permis de lever certaines incertitudes.

Tout se passe donc comme si les constituants de la paroi évoluaient en fonction des conditions de développement de la cellule : la croissance ou la différenciation. Ainsi, la composition chimique des polysides matriciels de la paroi se modifierait au cours du temps de manière à permettre, sous une forme encore à définir, l'élongation cellulaire. Puis, la secondarisation qui suit, avec les réserves émises plus haut, permettrait le retour à un état d'équilibre physiologique compatible avec la pérennisation de la plante.

L'évolution des fractions polysaccharidiques de l'agar de *Gracilaria verrucosa* au cours des saisons, mise en évidence par CHRISTIAEN et al. (1984), renforce cette théorie. Par ailleurs, l'observation de clichés de microscopie électronique révèle une migration de vésicules à contenu polysaccharidique, du cytoplasme vers la paroi (VERDUS comm. pers.).

Il reste à décrire, à travers la composition chimique de ces composés, les propriétés physico-chimiques susceptibles d'intervenir dans les mécanismes d'étirement, de coulissement ou de renforcement des structures pariétales.

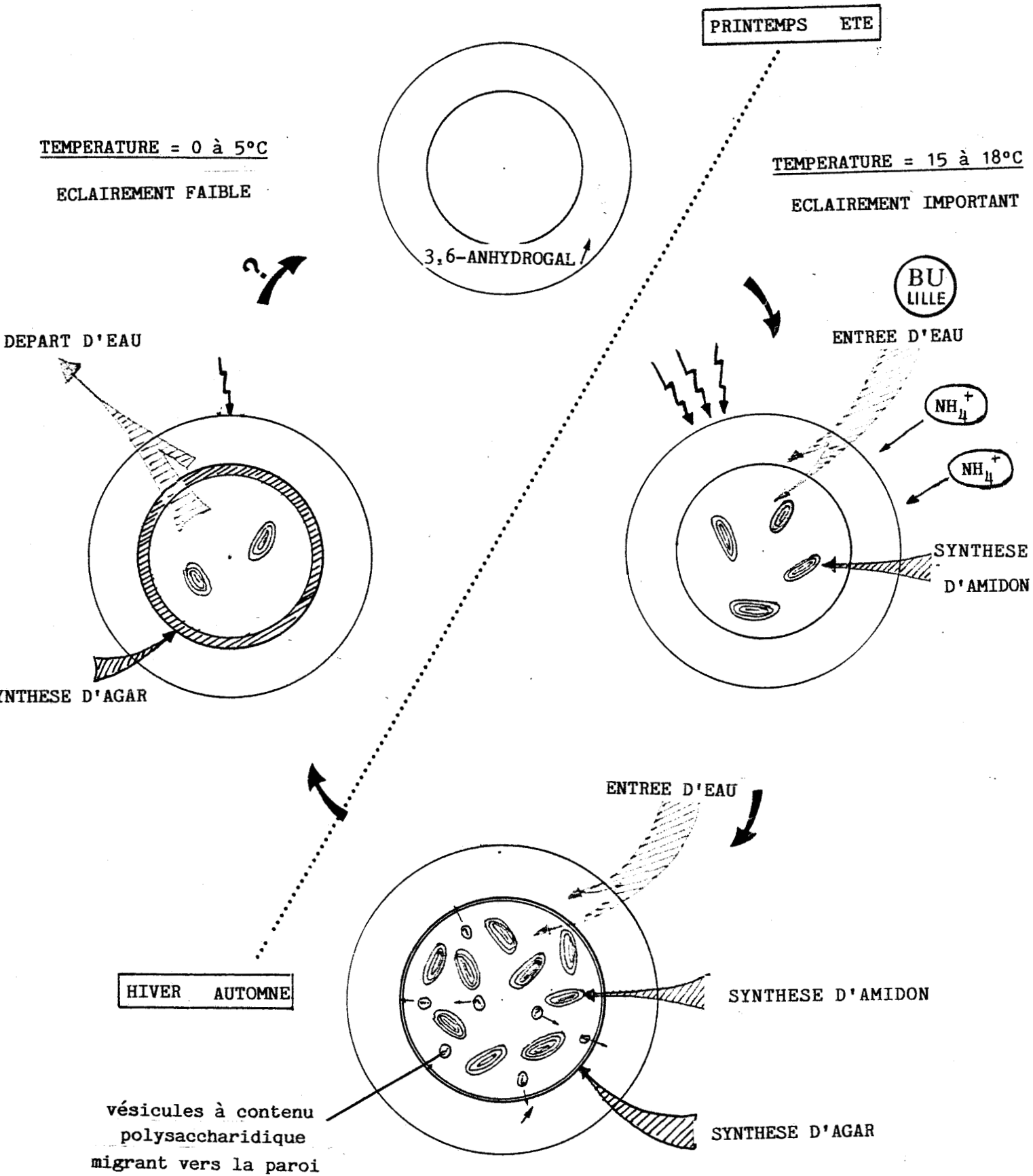
Cette étude apporte les premiers éléments de réponse. La biosynthèse d'agar, caractérisée par une augmentation du rapport (oses totaux - 3.6-anhydrogalactose) /3.6-anhydrogalactose, semble liée au métabolisme de l'amidon au niveau des précurseurs qui se déversent dans la paroi. Ces derniers se transforment en molécules plus riches en 3.6-anhydrogalactose quand les conditions du milieu deviennent défavorables à la croissance. Ces substitutions, qui ont une incidence sur les structures secondaire et tertiaire du colloïde, dans le sens de l'amélioration de la force du gel, sont en accord avec les propriétés mécaniques observées sur les thalles. Inversement, si l'existence de polymères plus sulfatés ou plus riches en composés uronosyls se vérifiait, la diminution de la rigidité des parois qui en résulterait serait compatible avec le grandissement cellulaire.

Cette vision physiologique permet de comprendre et d'interpréter le décalage entre les rendements élevés en agar et la croissance. Ce phénomène est fonction de la période de prélèvement et des conditions de culture. Les paramètres (température, éclaircissement, apport azoté...) de ces dernières sont autant de facteurs qui influencent la synthèse de la matière sèche et de l'agar (fig. 20). Leur action est illustrée par la figure 20 qui regroupe sous forme d'un cycle annuel, les résultats des synthèses d'agar et de matière sèche observées dans les différentes conditions expérimentales de notre travail.

L'exploitation des algues agarophytes devra prendre en compte les données sur la physiologie de la différenciation pariétale qui viennent d'être mises en évidence. Le forçage des cultures n'est pas le meilleur garant d'un bon rendement en agar. Il s'agit plutôt de trouver un moyen terme qui intègre, dans des cultures séquentielles, les conditions favorables à la photosynthèse et à la constitution de réserves d'amidon, et les conditions qui permettent un transfert de cette matière sèche vers les parois. La définition du milieu et des paramètres physiques de culture conditionnera les quantités et la qualité du produit fini.

FIGURE 20

EVOLUTION DU POIDS FRAIS, DE LA MATIERE SECHE ET DE L'AGAR DE GRACILARIA VERRUCOSA SUR UN CYCLE ANNUEL



BIBLIOGRAPHIE

ARAKI C.

Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii*.

J. Chem. Soc. Jap., 1937, 58 : 1338-1350.

ARAKI C.

Structure of the agarose constituent of agar-agar.

J. Chem. Soc. Jap., 1956, 29 : 543-544.

ARAKI C.

Some recent studies on polysaccharides of agarophytes.

Proc. Int. Seaweed Symp., 1966, 5 : 3-19.

AKATSUKA I. and IWAMOTO K.

Histochemical localization of agar and cellulose in the tissue of *Gelidium pacificum* (Gelidiaceae, Rhodophyta).

Bot. Mar., 1979, 22 : 367-370.

ASARE S.O.

Seasonal changes in sulfate and 3,6 anhydrogalactose content of phycocolloids from two red algae.

Bot. Mar., 1980, 23 : 595-598.

BIRD K.T., HANISAK M.D. and RYTHER J.

Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions.

Bot. Mar., 1981a, 24 : 441-444.

BIRD K.T., DAWES C.J. and ROMEO J.T.

Light quality effects on carbon metabolism and allocation in *Gracilaria verrucosa*.

Marine Biology, 1981b, 64 : 219-223.

BIRD K.T., HABIG H. and DEBUSK T.

Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta).

J. Phycol., 1982, 18 : 344-348.

BISIACCHI L.T. e KOSOVEL V.

Ricerche sui pigmenti fotosintetici di *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss. Dosaggio quantitativo della ficoeritrina.

Giorn. Bot. Ital., 1975, 109 : 205-219.

BODARD M. et CHRISTIAEN D.

Culture, exploitation et biochimie des algues rouges fournisseurs d'agar-agar et de carraghenanes.

Compte-rendu D.G.R.S.T., 1978, rapport n°1.

BODARD M., CHRISTIAEN D. et FOUCHER T.

Culture, exploitation et biochimie des algues rouges fournisseurs d'agar-agar et de carraghenanes.

Compte-rendu D.G.R.S.T., 1981, rapport n°2.

BODARD M., CHRISTIAEN D. et VERDUS M.C.

Mise au point sur les phycocolloïdes.

Bull. Soc. Bot. N. Fr., 1983, 36 (1-2) : 1-14.

BRADFORD M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism of protein utilizing the principle of protein -Dye Binding.

Anal. Biochem., 1976, 72 : 248-254.

Mc CANDLESS E.L., OKADA W.T., LOTT I.N.A., WOLLMER C.M. and GORDON-MILLS E.M.

Structural studies of *Chondrus crispus* : the effect of extraction of carrageenan.

Can. J. Bot., 1977, 55 : 2053-2064.

Mc CANDLESS E.L.

Polysaccharids of the seaweeds.

In : The biology of seaweeds, Eds. LOBBAN C.S. and WYNNE M.J.. **Botanical Monographs**, 1982, 17 : 559-588. Blackwell Sci. Pub. Oxford.

CHAPMAN A.R.O. and CRAIGIE J.S.

Seasonal growth in *Laminaria longicuris* : relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen.

Mar. Biol., 1977, 40 : 107-205.

CHAPMAN A.R.O., MARKHAM J.W. and LÜNING K.

Effects of nitrate concentration on the growth and physiology of *Laminaria saccharina* (Phacophyta) in culture.

J. Phycol., 1978, 14 : 125-128.

CHAPMAN A.R.O. and CRAIGIE J.S.

Seasonal growth in *Laminaria longicruris* : relations with reserve carbohydrate storage and production.

Mar. Biol., 1978, 46 : 209-213.

CHAPMAN V.J. and CHAPMAN D.J.

Seaweeds and their uses.

Eds. CHAPMAN and HALL, 1980, 334 p., London - New-York.

CHOU K.C.

The studies of the extraction of agar from *Gracilaria*.

J. Fish. Soc. Taiwan, 1973, 2 : 40-43.

CHRISTIAEN D.

Recherches sur l'extraction de l'agar-agar de *Gracilaria*

D.E.A., Université de Lille I, 1978.

CHRISTIAEN D. et BODARD M.

Essais d'extraction et d'analyses biochimiques d'agar-agar à partir de *Gracilaria verrucosa*.

Bull. Soc. Phycol. Fr., 1978, 18 : 20-29.

CHRISTIAEN D.

Etude biochimique de l'agar de *Gracilaria verrucosa* (Gracilariacées, Gigartinales). Facteurs biologiques et biochimiques influençant la qualité et la production industrielle.

Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, 1981, 103 p., Université de Lille I.

CHRISTIAEN D., MORVAN H., VERDUS M.C. and STADLER T.

Evolution of polysaccharidic fractions in the cell wall of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae).

Int. Workshop on Plant Polysaccharids, Structure and Function, Nantes, 1984, Abstract n°3, p. 196.

CRAIGIE J.S. and LEIGH C.

Carrageenans and agars.

In : *Handbook of Phycological Methods*. Eds HELLEBUIT J.A. and CRAIGIE J.S., 1978, 110-131, Cambridge University Press, 512 p.

CRAIGIE J.S. and WEN Z.C.

Effect of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae).

Can. J. Bot., 1984, 62 : 1665-1670.

CRAIGIE J.S., WEN Z.C. and VAN DER MEER J.P.

Interspecific, intraspecific and nutritionally determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* ssp.

Bot. Mar., 1984, 27 : 55-61.

DAWES C.J., SCOTT F.M. and BOWLER E.

Light and electron microscopic survey of algal cell-walls. I. Pheophyta and Rhodophyta.

Ann. J. Bot., 1961, 48 : 925-933.

DEBOER J.A., LAPOINTE D.E. and D'ELIA C.F.

Effects of nitrogen concentration on growth rate and carrageenan production in *Neogardhiella baileyi*.

In : Mar. Polyculture based on natural food chains and recycled wastes Woods Hole Ocean. Instit. Techn. Rep. WMOI, 76-92, Paper n°10.

DEBOER J.A., GUIGLI H.S., THOMAS I. and D'ELIA C.F.

Nutritional studies of two red algae. I - Growth rate as a function of nitrogen source and concentration.

J. Phycol., 1978, 14 : 261-266.

D'ELIA F. and DEBOER A.

Nutritional studies of two red algae. II - Kinetics of ammonium and nitrate uptake.

J. Phycol., 1978, 14 : 266-272.

DELOACH W.S., WILTON O.C., Mc CASKRILL J., HUMM H.J. and WOLF E.A.

Gracilaria confervoides as a source of agar.

Duke Mar. Lab. Bull., 1946, 3 : 25-30.

DIEP MINH TAM and EDWARDS P.

Seaweeds of economic importance in Thailand. Part 2 : Analysis of agar from *Gracilaria*.

Bot. Mar., 1982, 25 : 459-465.

ESAU K.

Plant anatomy. Ed. WILEY and SONS, 1965, 2e ed., New-York.

FREI E. and PRESTON R.D.

Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. II - Association of oxlyen and mannan in *Porphira ombilicalis*.

Proc. Roy. Soc. Lond., 1974, ser. B, 160 : 314-327.

GAGNE J.A., MANN K.H. and CHAPMAN A.R.O.

Storage patterns of growth on storage in *Laminaria longicruris* in relation to differing patterns of availability of nitrogen in the water.

Mar. Biol., 1982, 69 : 91-101.

GIACCONE G., PRINCI M., FEOLI E., LOKAR CASSINI L., RIZZI LONGO L. e TORTUL V.

Valutazione delle risorse vegetali lagunari del Basso Tineno e sperimentazione di coltivazione controllata dell'alga rossa *Gracilaria verrucosa* e di altre agarofite in Sicilia.

Convegno Scientifica Nazionale, P.F. Oceanografia e fondi Marine, Roma, 5-7 March 1979.

GUISELEY K.B.

The relation between methoxyl content and gelling temperatures of agarose. *Carbohyd. Res.*, 1970, 13 : 247-250.

HANISAK M.D.

Nitrogen limitation of *Codium fragile* spp. tomentosides as determined by tissue analysis.

Mar. Biol., 1979, 50 : 333-337.

HOYLE M.D.

Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapastoris* (Gmelin) Silua and *G. coronopifolia* J. Ag.) from Hawai. I - Yield and gel strength in the gametophyte and tetrasporophyte generations.

Bot. Mar., 1978a, 21 : 343-345.

HOYLE M.D.

Agar studies in two *Gracilaria* species [*G. bursapastoris* (Gmelin) Silua and *G. coronopifolia* J. Ag.] from Hawai. II - Seasonal aspects.

Bot. Mar., 1978b, 21 : 347-352.

HUMM H.S.

The seaweed research of North Caroline.

In : Survey of Marine fisheries of North Carolina. Ed. TAYLOR H.F., The University of North Carolina Press, 1951, 231-250.

IZUMI K.

A new method for fractionation of agar.

Agr. Biol. Chem. Jap., 1970, 34 : 1739-1740.

JOHN D.M. and ASARE S.O.

A preliminary study of variations and properties of phycocolloïds from Ghanaian seaweeds.

Mar. Biol., 1975, 30 : 325-330.

JOSELEAU J.P. and ULMANN G.

Biochemical studies of the site of gum formation in *Acacia Senegal*.

Third Cell Wall Meeting (Poster), 1984, Fribourg, p. 48.

KAUSS H.

Osmotic regulation in Algae.

Progressin Phytochemistry, 1976, V : 1-29.

KIM D.H. and HENRIQUEZ N.P.

Yields and gel strengths of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa* (Florideophyceae).

Proc. Int. Seaweeds Symp., 1979, 9 : 257-262.

KLOAREG B.

Propriétés et utilisations des polysaccharides des algues marines.

Penn ar Bed, 1982, 13 (108-109) : 53-60.

KLOAREG B.

Composition chimique et propriétés d'échange des parois cellulaires des algues brunes.

Thèse de Docteur es-Sciences naturelles, 1984, 252 p., U.S.T. de Bretagne occidentale.

LAPOINTE B.E. and RYTHER J.H.

The effects of nitrogen and sea water flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* in mass out door cultures.

Bot. Mar., 1979, 22 : 529-537.

LAPOINTE B.E.

The effects of light and nitrogen on growth, pigment content and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta).

J. of Phycol., 1981, 17 (1) : 90-95.

LAYCOCK M.V., MORGAN K.C. and CRAIGIE J.S.

Physiological factors affecting the accumulation of L-citrullinyl-L-arginine in *Chondrus* Stakh.

Can. J. Bot., 1980.

MACKIE M. and PRESTON R.D.

Cell wall and intercellular region polysaccharides.

In : *Algal physiology and biochemistry*. Ed. STEWARD W.D.P., 1974, p. 40-85. Blackwell Scientific publications, Oxford.

MORGAN K.C. and SIMPSON F.J.

The cultivation of *Palmaria palmata*. Effect of light intensity and nitrate supply on growth and chemical composition.

Bot. Mar., 1981, 24 : 273-277.

MORVAN H.

Libération de polymères pectiques acides au cours de la croissance de la suspension cellulaire de *Silène*.

Physiol. Vég., 1982, 20 (4) : 671-678.

MUTTUTAMBY D.T. and NEUSON de QUEIROZ SANTOS

Agar from *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Gracilaria sjoestedtii* Kylin from Northeast Brasil.

10th Int. Seaweeds Symp., 1981, p. 6690-674.

MYERS A., PRESTON R.D. and RIPLEY G.W.

Fine structure in the red algae. I - X-ray and electron microscope investigation in *Griffithsia flocculosa*.

Proc. Roy. Soc. London, 1956, ser. B., Biol. Sci., 144 : 450.

NEISH A.C. and SHACKLOCK P.F.

Greenhouse experiments on the propagation of strain T4 of Irish moss.

Natl. Res. Counc. Can., Atl. Reg. Lab., 1971, 14 : 25 p. (NRCC n°12253).

NELSON S.G., YANG S.S., WANG G.Y. and CHIANG Y.M.

Yield and quality of agar from species of *Gracilaria* (Rhodophyta) collected from Taiwan and Micronesia.

Bot. Mar., 1983, 26 : 361-366.

NORTHCOTE D.H.

Chemistry of the plant cell wall.

Ann. Rev. Plant. Physiol., 1972, 23 : 113-132.

NORTON T.A., MATHIESON A.C. and NEUSHUL M.

A review of some aspects of form and function in Seaweeds.

Bot. Mar., 1982, 25 : 501-510.

OOHUSA T., ARAKI S., SAKURAI T., SAITOH M., KIRITA M. and YAMASHITA T.

The diurnal variation in the cell size, in the physiological activity and in the contents of some cellular components of *Porphyra yezoensis* f. *narawaensis* in cultivation ground.

Bull. Jap. Soc. Fish., 1977, 44 : 299-303.

OZA R.M.

Studies on Indian *Gracilaria*. IV - Seasonal variation in agar and gel strength of *Gracilaria corticata* J. Ag. occurring on the coast of Veraval.

Bot. Mar., 1978, 21 : 165-167.

PATWARY M.U. and VAN DER MEER J.P.

Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). IX : Some properties of agars extracted from morphological mutants.

Bot. Mar., 1983, 26 : 295-299.

PAYEN M.

Sur la gélose et les nids de Salagane.

C. R. Acad. Sci., 1859, 49 : 521-530.

PENNIMAN C.A.

Seasonal chemical and reproductive changes in *Gracilaria foliifera* (Forssk.) Borg. from Great Bay, New Hampshire (U.S.A.).

J. Phycol., 1977, 13 (suppl.) : 53.

PERCIVAL E.G.V. and ROSS A.G.

Fucoidin : I - The isolation and purification of the fucoidin from brown seaweeds.

J. Chem. Soc., 1950, 717-720.

PERCIVAL E.

Algal polysaccharides.

In : The carbohydrates : chemistry and biochemistry. Eds. PIGMAN W., HORTON D. and HEZRP A., 1970, 2B, p. 537-568, Academic Press, London.

PERCIVAL E.

The polysaccharides of green, red and brown seaweeds. Their basic structure, biosynthesis and function.

· Br. Phycol. J., 1979, 14 : 103-117.

PRESTON R.D.

Plants without cellulose.

Scient. Am., 1968, 218 (6) : 102-108.

QUILLET M. et DE LESTANG G.

Sur les radicaux "sulfuryls" des mucilages des algues marines.

Bull. Soc. Et. Sci. Anjou, 1972, N.S., VIII : 55-56.



RALPH E., MOON J. and DAWES C.J.

Pigment changes and photosynthetic rates under selected wave lengths in the growing tips of *Euchema isiforme* (C. Agardh) J. Agardh var. *denedatum* Cheney during vegetative growth.

Br. Phycol. J., 1976, 11 : 165-174.

RAMUS J.

A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptations. II - Brown, green and red seaweeds.

J. Phycol., 1983, 19 : 173-178.

REES D.A. and CONWAY E.

The structure and the biosynthesis of porphyran : a comparison of some samples.

Biochem. J., 1962, 84 : 347-352.

REES D.A.

Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networks.

Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., 1969, 24 : 267-332.

REES D.A.

Shapely polysaccharides.

Biochem. J., 1972, 126 : 257-273.

REES D.A.

Stereochemistry and binding behaviour of carbohydrate chains.

In : Biochemistry of carbohydrates, Ed. WHELAU W.J., M.T.P., Int. Rev. Sci. Biochem., 1974, 5 : 1-41.

REIS D.

Assembly changes induced in cell wall following on osmotic shock.
3th Cell Wall Meeting, 1984, p. 75, Fribourg.

RIMINGTON C.

The carbohydrate complex of the serum proteins. II - Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of oxblood.

Biochem. J., 1931, 25 : 1062.

ROSENBERG G. and RAMUS S.

Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae) : soluble nitrogen and reserve carbohydrates.

Mar. Biol., 1982, 66 : 251-259.

ROSS A.G.

Some typical analysis of red seaweeds.

J. Sci. Food. Agric., 1953, 4 : 333-335.

SHEATH R.G., HELLEBUST J.A. and TAKASHI SAWA

Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta).

I. Changes during ageing batch culture.

Phycologia, 1979a, 18 (2) : 149-163.

SHEATH R.G., JOHAN A.H. and TAKASHI SAWA

Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta).

II. Changes during the cell cycle.

Phycologia, 1979b, 18 (3) : 185-190.

SPURR A.R.

A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.

J. Ultrastr. Res., 1969, 26 : 31-43.

STADLER T., CHRISTIAEN D., VERDUS M.C. et MORVAN H.

Production de phycocolloïdes en relation avec l'âge et la croissance de *Gracilaria verrucosa*.

Comm. Soc. Phycol. Fr., Paris, 16 mars 1984.

STRAUCH L.

Zeitschrift fur Klinische Chemic.

Ed. De GRUYTER W., 3ème année, 1965, V : 165-167, Berlin.

TILLSMANS J. and PHILIPPI K.

The carbohydrate content of the important proteins of foodstuffs and a colorimetric procedure for the determination of nitrogen free sugar in protein.

Biochem. Z., 1929, 215 : 36-60.

TRIPODI G. and BETH K.

Unusual cell structure in tumor like formation of *Gracilaria* (Rhodophyta).

Arch. Mikrobiol., 1976, 108 : 167-174.

TSUCHIYA M. and HONG K.

Proc. 5th Int. Seaw. Symp., 1966, p. 315, Halifax.

TURVEY J.R.

Biochemistry of algal polysaccharides.

In : Biochemistry of carbohydrates II. Ed. MANNERS D.J., 1978, 151-177, University Park Press, Baltimore.

UMAMAHESWARA RAO M.

Agar and algin-yielding seaweeds of India.

Proc. Int. Seaweed Symp., 1969, 6 : 715-721.

VERDUS M.C., CHRISTIAEN D., STADLER T. and MORVAN H.

Ultrastructural and cytochemical aspects of cell wall formation in *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae).

3th Cell Wall Meeting, 1984, p. 92, Fribourg.

YAPHE W. and DUCKWORTH M.

Relation between structures and biological properties of agars.

Proc. Int. Seaw. Symp., 1971, 7 : 15-22.

WAALAND R.J., WAALAND S.D. and BATES G.

Chloroplast structure and pigment composition in the red alga *Griffithsia pacifica* : regulation by light intensity.

J. Phycol., 1974, 10 : 193-199.

WAALAND R.J.

Commercial utilization.

In : The biology of seaweeds. Eds. LOBBAN C.S. and WYNNE M.J. - **Botanical Monographs**, 1981, 17 : 727-741.

WANG C.Y. and YANG S.S.

Seasonal variation of the quality of *Gracilaria* cultivated in Taiwan.
Proc. Natl. Sci. Counc. Rep. China, 1980, 4 : 78-86.

WHYTE J.N.C., ENGLAR I.R., SAUNDER R.G. and LINDSAY J.C.

Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative states of *Gracilaria* (*verrucosa* type).
Bot. Mar., 1981, 24 : 493-501.

YAPHE W.

Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides.
Anal. Chem., 1960, 32 : 1327.

YOUNG D.N.

Unusual cell wall ultrastructure in *Antithamnion* (Rhodophyta).
Br. Phycol. J., 1980, 15 : 119-124.

ZIMMERMANN V.

Physics of turgor and osmoregulation.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 1978, 29 : 121-148.