

N° d'ordre 1322

50376
1986
17

50376
1986
17

T H E S E

présentée à

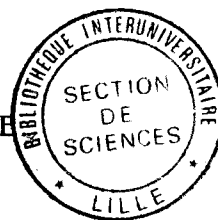
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR 3ème CYCLE

par

Claude LEFEBVRE



COMPORTEMENT, EN CULTURES EXPERIMENTALES,
DES DEUX GENERATIONS DIPLOIDES DU
GRACILARIA VERRUCOSA (HUDSON) PAPENFUSS :
LE CARPOSPOROPHYTE A CARPOSPORES ET
LE TETRASPOROPHYTE IMMATURE

soutenue le 20 mars 1986, devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury :	L. LACOSTE	Professeur, Muséum de PARIS
	J. GODIN	Maître de Conférences, LILLE
	R. JACQUES	Directeur de Recherche, C.N.R.S., GIF-sur-YVETTE
	M-Th. L'HARDY-HALOS	Professeur, C.N.R.S., LE MANS
	R. PEREZ	Directeur de Laboratoire d'Algologie, I.F.R.E.M.E.R., NANTES
	M. BODARD	Professeur, LILLE

Travail réalisé au Laboratoire d'Algologie et de Biologie Végétale Marine de LILLE,
sous la direction du Professeur M. BODARD.

"Qui vit sans folie,
n'est pas si sage qu'il croit"

(M. de la ROCHEFOUCAULT)

... la mer est toute folie,
et grande est sa sagesse.

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

- o O o -

Ce travail a été réalisé sous la direction de M. le Professeur M. BODARD qui, malgré tous les aléas auxquels s'affrontent les jeunes chercheurs, a su me garder sa confiance. Qu'il en soit ici remercié.

M. le Professeur L. LACOSTE a accepté d'être le Président de cette Commission d'Examen. Je lui sais gré de l'aide précieuse qu'il m'a dispensée, tant dans l'expérimentation que dans la rédaction de cette étude. Tous ses conseils n'ont pu être approfondis ici ; ils le seront, je l'espère, dans des travaux futurs.

Ce travail et ce document ne seraient pas ce qu'ils sont sans José GODIN. Son aide, toujours constante, et ses conseils, toujours avisés, sont l'empreinte d'un esprit de pédagogie hors pair et un gage pour la formation scientifique. A lui toute ma reconnaissance pour son soutien amical et jamais dépourvu d'humour.

Je suis reconnaissante à Mme le Professeur M.-Th. L'HARDY-HALOS pour les critiques constructives qu'elle a émises lors de la correction du premier manuscrit. La rapidité de son jugement fut aussi un atout important pour la rédaction finale.

Je remercie M. le Directeur de Recherche R. JACQUES pour ses encouragements et pour avoir bien voulu donner son avis et ses appréciations sur les expériences relatives à la lumière.

Ma gratitude va également à M. le Directeur R. PEREZ qui, le premier, a bien voulu participer à ce Jury et s'intéresser aux applications pratiques des recherches menées par l'Equipe de Biologie des Populations.

Grâce à ces trop courtes lignes, il m'est enfin donné de remercier toute ma famille et particulièrement mes chers Parents pour leur soutien et leurs encouragements permanents. Sans doute est-ce leur forme d'esprit, ouvert et sans cesse curieux des choses de la nature, qui m'a menée jusqu'ici ; je leur en suis infiniment reconnaissante.

Je tiens à me tourner aussi vers mes collègues : Robert KLING, qui a bien souvent accepté de me communiquer une petite part de son immense savoir ; M. et Mme DUBOIS dont les connaissances sont à l'égal de leur gentillesse et de leur disponibilité ; Juliette BIDIET, Marc NOCHET qui se sont intéressés à mes travaux. Une motion particulière, enfin, pour Christophe DESTOMBE, dont l'esprit scientifique mais aussi l'amitié et l'humour sont presque devenus des paramètres influençant les modalités de Recherche de l'Equipe.

Je n'oublie pas les techniciens du Laboratoire : Jean DELVINQUIER pour son aide et son doigté lors de la préparation des milieux de culture ; Paule DANNOOT pour la patience qu'elle a montrée lors des innombrables nettoyages de boîtes de Pétri. Enfin, Michèle DELECOURT trouvera ici l'expression de toute ma reconnaissance pour son esprit professionnel et ses grandes capacités auxquels beaucoup font référence. Sans son immense gentillesse, ce document n'aurait pu être édité à temps. A elle tous mes sentiments amicaux.

Une grande pensée, enfin, à tous mes amis d'ici et de plus loin, qui toujours m'ont soutenue et dont la présence morale fut un réconfort de tous les instants.

INTRODUCTION

Gracilaria verrucosa (Hudson) Papenfuss est une Rhodophycophyte marine appartenant à l'ordre des Gigartinales et à la famille des **Gracilariaceae**. Cette espèce est exploitée dans de nombreux pays (HUGH 1984) pour l'extraction d'un polysaccharide pariétal : l'agar (KIM 1970). Paradoxalement, la biologie de cette algue reste mal connue, à la fois **in situ** et **in vitro**.

Le cycle sexué des Algues rouges présente une succession de deux générations diploïdes : l'une carposporophytique, l'autre tétrasporophytique ; la génération carposporophytique a l'avantage de multiplier le nombre potentiel de tétrasporophytes, par l'intermédiaire de spores diploïdes. Or, la plupart des recherches menées sur les populations de Gracilaire font référence, de façon ponctuelle, dans l'espace et dans le temps, aux stades adultes et non aux spores (PENNIMAN 1983). Depuis un an et demi, la phénologie d'une population de **Gracilaria verrucosa** du Cap Gris-Nez (Pas-de-Calais) est suivie (DESTOMBE **et al.**, à paraître), de manière à en comprendre le système de reproduction et de sélection : populationnelle ou métapopulationnelle (OLIVIERI et GOUYON 1984, COUVET **et al.** 1985). Dans ce cadre, l'étude de la dispersion et du devenir des spores et en particulier des spores diploïdes, les carpospores, apparaît comme une donnée de base.

La dissémination des spores d'algues a été étudiée par SUTO (1950) et d'autres auteurs dont la plupart se sont intéressés aux modulations de la libération des spores en fonction d'éléments extérieurs, variations de la pression osmotique (SEGAWA **et al.** 1955 a-b, SAWADA 1958) ou de l'intensité lumineuse (RAO et SUBBARANGAIAH 1981). Au niveau marégraphique où il se situe, **Gracilaria verrucosa** est soumis à des chocs divers plus ou moins importants. Aussi, nous avons cherché à connaître l'effet de différents facteurs : mécaniques (agitation et fragmentation), thermiques (températures extrêmes, sens de variation de l'amplitude thermique), lumineux (qualité de la lumière, énergie) sur le fonctionnement du carposporophyte, le devenir de la carpospore et le développement du tétrasporophyte.

L'estimation de l'influence de tous ces facteurs devrait aider à la compréhension de la biologie de la reproduction des individus au sein d'une population **in situ**. De plus, leur maîtrise nous permettrait d'optimiser les résultats obtenus **in vitro** dans la perspective de l'élaboration de pratiques culturales.

RECOLTE DU MATERIEL

ET

CONDITIONS STANDARDS DE CULTURE

A. - Récolte du matériel

La récolte de *Gracilaria verrucosa* s'effectue au Cap Gris-Nez (Pas-de-Calais), au lieu-dit : la "Sirène", lors des basses mers de vives eaux, environ une fois par mois. *G. verrucosa* y occupe l'horizon inférieur de la zone intertidale. Il y est soumis au mode battu et à l'action conjuguée de la houle et de la marée, maximale lors du flux et du reflux. Il affectionne cependant les lieux plus abrités, les cuvettes sableuses entourées de rochers.

On choisit les thalles gamétophytiques d'une taille supérieure à 15 cm, porteurs de cystocarpes et on les place aussitôt après leur cueillette dans un récipient isothermique en polystyrène, entre deux couches d'algues brunes (*Fucus* sp.). Ce procédé réduit la déshydratation et évite un choc thermique au cours du transport.

B. - Elimination nécessaire des épiphytes

Les thalles sont infestés de façon quasi-constante par des épiphytes divers. C'est pourquoi nous avons consacré une partie de notre travail à la mise au point d'une technique de nettoyage accessible et efficace (Ch. II).

C. - Conditions standards de culture

I - Milieu de culture

Pour la plupart des cultures (Ch. III et IV), le milieu standard utilisé est l'eau de mer naturelle. Pour limiter les contaminations, on la filtre à 0,45 μm (filtre à eau ESSER) et on y ajoute une solution d'oxyde de Germanium (3 mg.l^{-1}) pour éviter la prolifération des Diatomées (BIRD et al. 1977). La fréquence de renouvellement du milieu varie en fonction des essais.

2 - Lumière

Les cultures, dans les conditions standards, subissent des éclairagements de lumière blanche fluorescente (tubes GRO-LUX, SYLVANIA). Elles reçoivent une énergie de $3,5 \text{ W.m}^{-2}$ qui est mesurée grâce à une thermopile solarimétrique KIPP-ZONEN. La photopériode est de 12 heures d'éclairément suivies de 12 heures d'obscurité (12:12). Ces cultures sont comparées à des témoins placés en lumière naturelle (Ch. III et IV).

3 - Température

La température standard de culture s'élève à + 19°C (salle de culture thermostatée) tandis que les témoins sont laissés à la température ambiante du Laboratoire (Ch. III et IV).

4 - Récipients de culture

Des essais de culture dans différents types de récipients (Ch. III, IV) nous ont amenée à utiliser des boîtes de Pétri en polystyrène cristal "G.P.". Leur diamètre est de : soit 90 mm, soit 55 mm ; dans les premières, on place environ 20 ml de milieu, dans les secondes, environ 5 ml.

Les modalités particulières à chaque expérimentation seront exposées en tête du paragraphe correspondant.

CHAPITRE I

PARTICULARITES BIOLOGIQUES DU MATERIEL EXPERIMENTAL

I. - LE CYCLE SEXUE TRIGENETIQUE CARACTERISTIQUE DES RHODOPHYCEES ET SON INTERET (fig. 1)

Le cycle de *Gracilaria verrucosa* correspond au type II de la classification de UMEZAKI (1977) ; l'algue a trois générations successives : gamétophyte haploïde, carposporophyte diploïde porté par le gamétophyte femelle, tétrasporophyte diploïde. Les générations gamétophytiques et tétrasporophytiques sont morphologiquement identiques et le cycle est dit trigénétique à deux générations libres isomorphes.

Le cycle trigénétique compense l'absence de motilité des agents de dissémination (gamètes et spores) (SEARLES 1980). A l'émission d'un grand nombre de spores haploïdes, issues du tétrasporophyte, s'ajoute celle d'une multitude de spores diploïdes issues du carposporophyte, ce qui accroît les chances d'installation, de maintien et de dispersion d'une population. Alors que des cycles mono- ou digénétiques produisent un zygote par fécondation, le cycle trigénétique des Rhodophycées a l'avantage de multiplier chaque zygote en autant de copies qu'il y a de carpospores dans le carposporophyte correspondant (L'HARDY-HALOS comm. pers., 1986).

II. - CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET ANATOMIQUES DU TETRASPOROPHYTE ET DES GAMETOPHYTES MALES ET FEMELLES

A. - Morphologie (Pl. I)

Le thalle adulte, gamétophytique ou tétrasporophytique, se présente sous la forme d'une touffe de frondes cylindriques ramifiées, de couleur brun rouge, insérées sur un disque basal. Les axes principaux mesurent de 10 à plus de 100 centimètres et portent des ramifications secondaires, tertiaires, rarement quaternaires ; le disque basal a un diamètre de 1 à 3 cm.

B. - Anatomie

1 - Le disque basal

Le disque basal est formé de files cellulaires s'étalant sur le substrat, en ordre régulier, radial, par divisions transversales ou subdichotomiques des cellules périphériques (KLING comm. pers., 1986). Parmi celles-ci viennent s'insinuer quelques files naissant des étages supérieurs du disque (OLIVEIRA 1968).

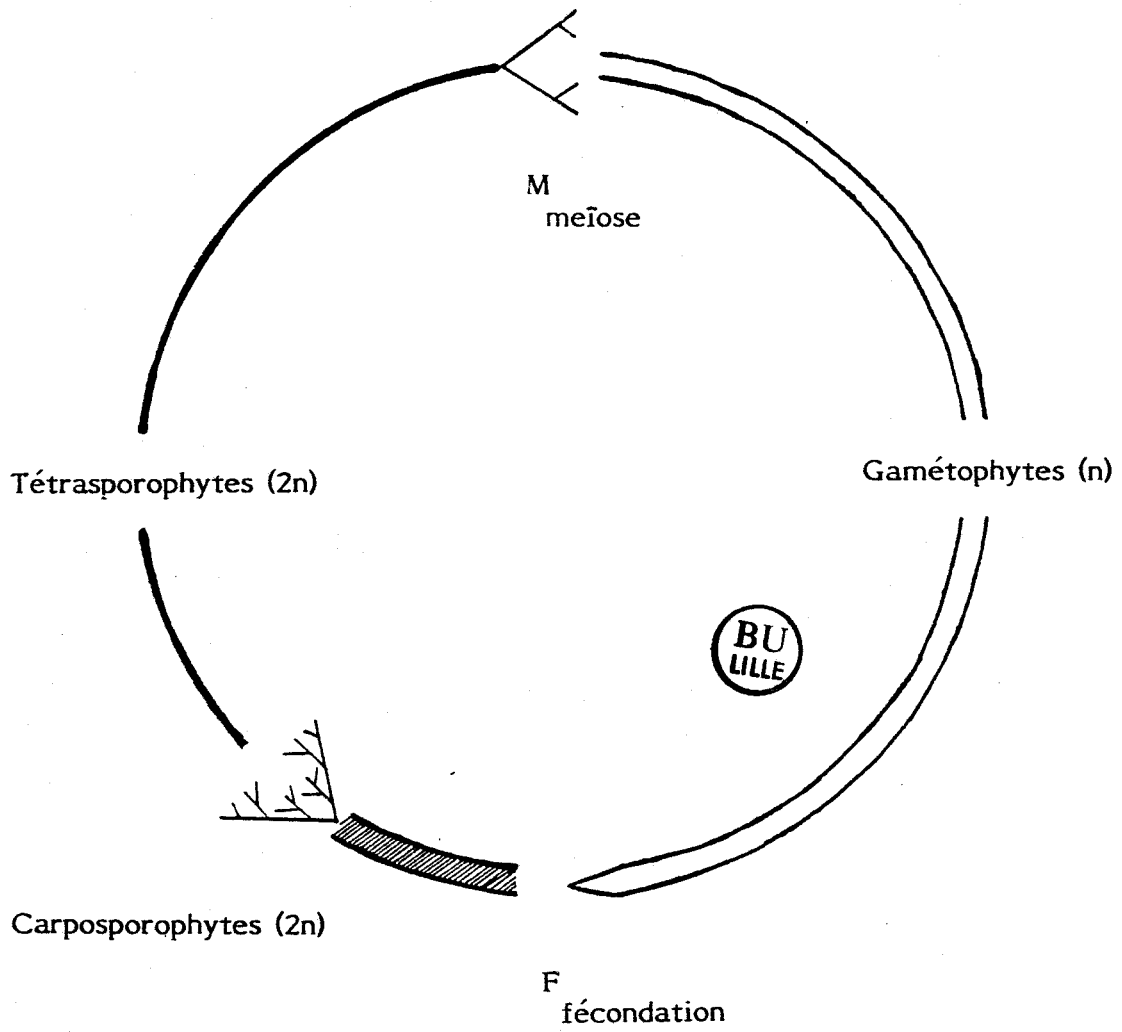


Figure 1 - Cycle trigénétique de *Gracilaria verrucosa*.

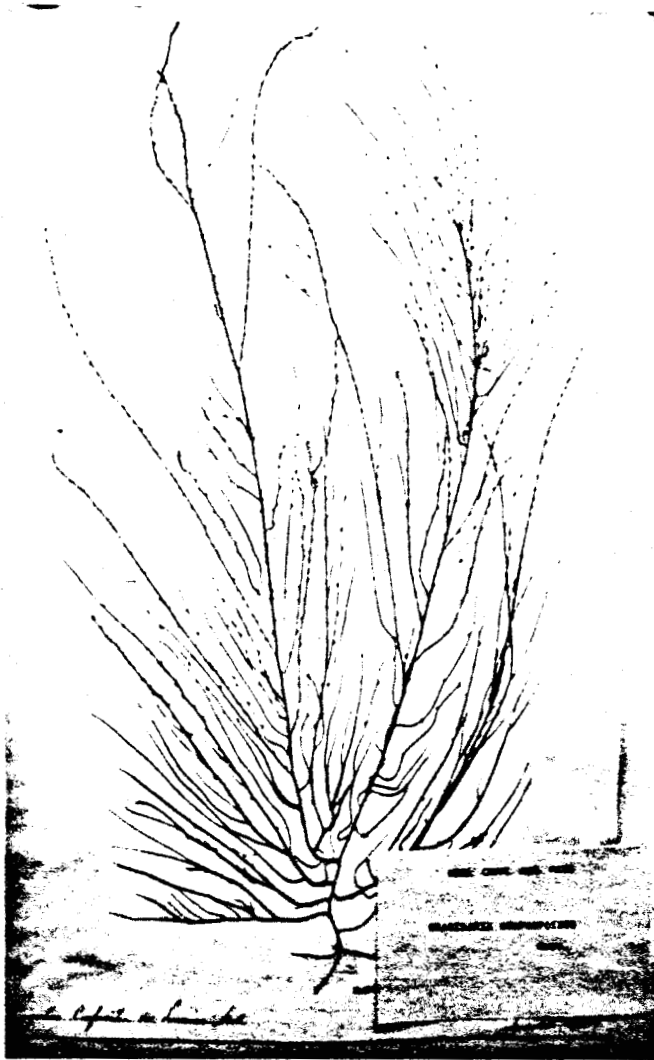


Planche 1 - *Gracilaria verrucosa* : thalle gamétophytique femelle fécondé.
Echantillon du Muséum - (Photo Ch. DESTOMBE).

2 - La fronde (fig. 2)

Une coupe transversale, faite dans une partie quelconque de la fronde dressée d'un tétrasporophyte ou d'un gamétophyte, montre de l'extérieur vers l'intérieur :

- un cortex : ensemble d'aspect palissadique (KLING 1978) constitué de petites cellules (\emptyset 5 μ m) très pigmentées et à divisions anticlines régulières. Cette couche est le plus souvent monostrate, mais à proximité du disque, le nombre des assises augmente.
- une zone subcorticale à petites cellules pigmentées, de taille variable, plus volumineuses que les précédentes, disposées en une seule couche (LAOKOLE 1985) ;
- une moëlle parenchymateuse, constituée de grandes cellules sub-isodiamétriques (# 10 à 30 μ m \emptyset), peu colorées, reliées entre elles par de nombreuses synapses.

III. - CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET ANATOMIQUES DE LA GENERATION CARPOSPOROPHYTIQUE

Le carposporophyte comporte un appareil végétatif haploïde : le cystocarpe (en grec, organe constituant le fruit) et les tissus annexes, et un appareil reproducteur diploïde : le gonimoblaste (en grec, tissu jeune fertile). Les carposporophytes résultent de la fécondation d'un carpogone par une spermatie. BIRD *et al.* (1977) et DESTOMBE (comm. pers., 1985) les voient apparaître sous leur forme juvénile, une quinzaine de jours après la mise en présence de thalles mâles et femelles fertiles. Ils se répartissent sur tout le gamétophyte et sont néanmoins plus nombreux dans les parties distales. Leur nombre n'est pas constant et nous avons pu en compter de quelques unités jusqu'à plus d'une centaine sur une même fronde. Leur taille peut varier entre quelques centaines de microns et 2 millimètres. Ils sont présents toute l'année, avec une prédominance lors des périodes estivales.

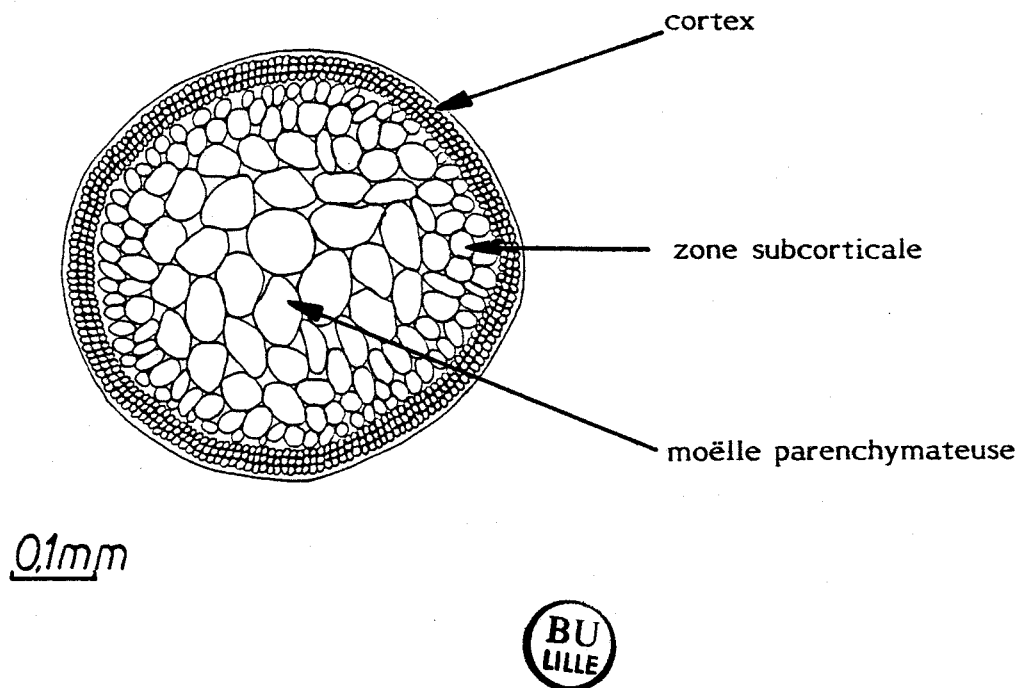


Figure 2 - Coupe transversale de fronde de *Gracilaria verrucosa*. (X150)

A. - Localisation des rameaux carpogoniaux et fécondation des carpogones

Chez certaines espèces de Gigartinales, le rameau carpogonial, situé à la périphérie interne de la fronde, est formé par une cellule support qui produit une ou plusieurs cellules stériles et un carpogone surmonté d'un trichogyne (SJOESTEDT 1926, BODARD comm. pers., 1985) difficilement observable (OLIVEIRA 1968). Selon SJOESTEDT (1926), le rameau carpogonial de **G. verrucosa** serait une structure fugace qui disparaîtrait rapidement quand la fécondation n'a pas lieu.

Selon OLIVEIRA (1968), après la fécondation, on obtient un "procarpe (*sensu lato*)" car **Gracilaria** ne présente jamais de véritable cellule auxiliaire (EDELSTEIN et al. 1978) ; ce rôle est dévolu aux cellules basales des rameaux végétatifs sortant de la cellule-support riche en réserves (OLIVEIRA 1968). Chez **Gracilaria verrucosa** du Cap Gris-Nez, on n'observe la présence de la génération carposporophytique qu'à partir de ce stade "procarpe".

B. - Formation du zygote diploïde et développement du gonimoblaste (fig. 3)

Après ces étapes, il apparaît un ensemble volumineux, de forme irrégulière et que l'on peut rapprocher de la "fusion cell" de SJOESTEDT (1926). Toutefois, les éléments la constituant sont différents puisqu'il s'agit ici de la fusion : du "procarpe", du zygote, des rameaux végétatifs et de la cellule-support (OLIVEIRA 1968). Le noyau diploïde (le zygote, *sensu stricto*) se divise alors dans cette cellule de fusion tandis que carpogone et trichogyne dégénèrent. Le gonimoblaste résulte des divisions de la partie supérieure de la cellule de fusion ; il est constitué de cellules irrégulières et à contenu riche. TSEKOS et SCHNEPF (1983) posent alors le problème du devenir des noyaux originels haploïdes de la cellule de fusion.

C. - Le carposporophyte et la carpospore in situ (fig. 3)

Le gonimoblaste donne naissance aux cellules-mères à partir desquelles se forment des rangées de filaments pluricellulaires dont les cellules distales s'arrondissent et deviennent successivement des carposporocystes. A maturité, chaque carposporocyste libère la carpospore qu'il contient.

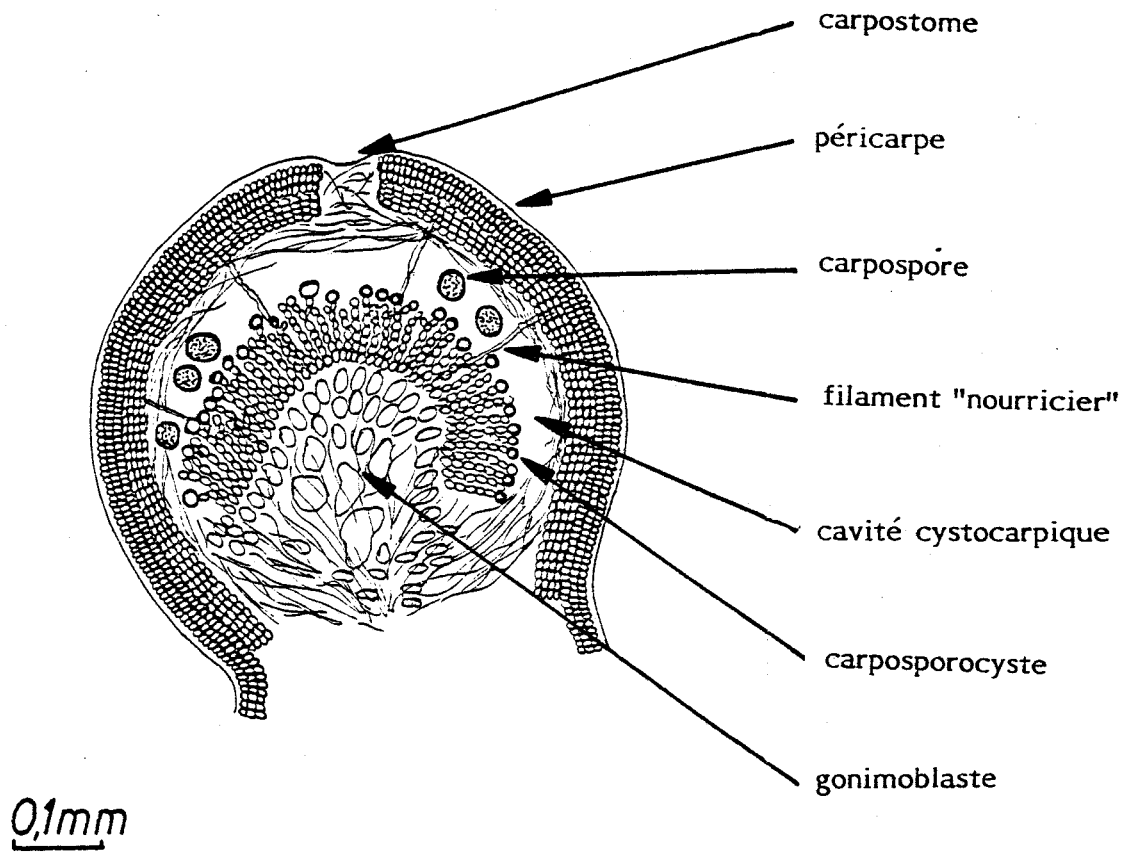


Figure 3 - Cystocarpe de *Gracilaria verrucosa*.

La carpospore est une cellule sphérique, pourvue d'un cytoplasme dense et granuleux, fortement pigmentée et riche en grains d'amidon floridéen. Le noyau, nettement visible, forme une tâche claire centrale. OLIVEIRA (1968) note l'absence de vacuoles. Ce dernier caractère s'applique aux carpospores en bon état et les distingue des cellules non viables, d'emblée reconnaissables à leur importante vacuolisation. Après sa libération par le cyste, la carpospore demeure dans la cavité cystocarpique et s'entoure de mucilage avant d'être expulsée. Au moment de son émission dans le milieu, elle aura alors une taille supérieure à celle qu'elle avait dans le carposporocyste.

D. - Développement des structures annexes (fig. 3)

1 - Structure protectrice haploïde

- Le péricarpe

Le développement du gonimoblaste s'accompagne d'un accroissement en dôme du cortex. Cette protubérance résulte des divisions répétées des cellules initiales corticales qui engendrent des "files cellulaires" pigmentées. Plus tard, en se séparant par rupture de la masse gonimoblastique, ces assises constitueront la paroi (*sensu lato*) du cystocarpe : le péricarpe cortical de TSEKOS et SCHNEPF (1983).

- Le carpostome

Le dôme s'ouvre par un carpostome situé au sommet du cystocarpe et visible dès le début de sa formation (OLIVEIRA 1968). A maturité, les carpospores sortent par ce pore qui peut toutefois être obstrué par divers mécanismes : "bouchons" de mucilage mêlé de spores ou développement anarchique des assises péricarpiques. Dans les deux cas, on observe des spores mûres qui, prisonnières, s'accumulent dans la cavité cystocarpique.

2 - Les "filaments nourriciers", leur origine, leur fonction.

Chez *Gracilaria verrucosa*, des filaments unisériés relient le gonimoblaste au péricarpe. Leur nombre, qui est stable pour une même espèce mais varie d'une espèce à l'autre, constitue un caractère systématique exploité par EDELSTEIN et ses

collaborateurs en 1978. Selon OLIVEIRA (1968), ce sont des filaments "nourriciers" assurant le transfert de substances nutritives du péricarpe aux cellules-mères. Celles-ci la transmettraient aussitôt aux carposporophytes en chaînes. D'abord petites et riches en matières nutritives, les cellules gonimoblastiques se vacuolisent, augmentent de volume et s'appauvrissent corrélativement en cytoplasme (SJOESTEDT 1926). BIRD et McLACHLAN (1984) pensent que les "filaments nourriciers" permettent au péricarpe de relayer le gonimoblaste dans ses fonctions.

E. - Les sécrétions mucilagineuses

1 - Origine et chronologie des sécrétions

On sait que l'appareil de Golgi des carpospores de **G. verrucosa** "fabrique" des substances de nature polysaccharidique (KLING, comm. pers., 1985) isolées dans des vésicules dont certaines migrent vers la paroi.

TSEKOS et SCHNEPF (1983) observent des zones à vésicules golgiennes réagissant positivement au P.A.S. (Periodic Acid Schiff), dans les cellules corticales du péricarpe de **Gigartina teedii**. Cette réaction caractérisant la présence de polysaccharides, ils en déduisent que le Golgi est plus impliqué dans la production de mucilage que dans l'élaboration des substances de la paroi cellulaire. De son côté, BONEY en 1981 a trouvé deux types de mucilages lors de la tétrasporogénèse de **Palmaria palmata** : l'un P.A.S. positif, l'autre P.A.S. négatif. Selon lui, le premier serait issu des vésicules formées aux extrémités des citernes golgiennes. Celles-ci migrent vers le plasmalemme des spores et déchargent leur contenu. Ce type de mucilage pourrait alors être le matériau propulseur. Le second viendrait des grandes vésicules du Golgi, formerait l'enveloppe mucilagineuse de la spore nouvellement libérée et se dilaterait au contact de l'eau.

2 - Le rôle du mucilage

La libération des carpospores, chez **Gracilaria verrucosa**, apparaît souvent comme un processus "explosif", une décharge forcée hors du cystocarpe, accompagnée invariablement par une extrusion de mucilage. La force nécessaire viendrait de l'expansion du mucilage, sous l'effet de son hydratation dans un espace confiné (BONEY 1981). Les carpospores sortent les unes après les autres dans une légère gaine

mucilagineuse qui peut les relier entre elles jusque vingt-quatre heures après leur expulsion (OZA 1975).

Selon les auteurs, la gaine mucilagineuse de la carpospore lui procure de nombreux avantages lors de sa "migration" dans le milieu marin :

- le mucilage intervient dans la flottabilité ; il permet à la spore de faire fluctuer sa densité (OKUDA et NEUSHUL 1981) ; le volume varie avec la maturité (BONEY 1981) et peut atteindre celui de la spore (NGAN et PRICE 1979) ;
- par ailleurs, il joue un rôle de barrière : physique, contre l'effet abrasif des grains de sable, chimique, contre les fortes variations de salinité (BONEY 1981) et abiotique contre les microorganismes, à un moment où la spore est particulièrement sensible à toutes ces attaques. LARPENT-GOURGAUD et DUCHER (1977) ont montré des relations syntrophiques entre bactéries et algues. En fait, il nous est nettement apparu que de nombreux microorganismes étaient libérés dans le milieu en même temps que les carpospores et leur restaient intimement liés ; on peut donc penser que la présence du mucilage permet la limitation du développement des parasites au pourtour de la cellule ; la moindre imperfection dans la qualité du couvert mucilagineux entraînerait alors le déplacement du fragile équilibre en faveur des organismes devenus prédateurs de la spore.

Dès la sédimentation, la carpospore doit trouver un support favorable à sa fixation sous peine de disparaître dans les heures ou les jours qui suivent. Au moment où elle se pose, le mucilage joue un rôle important : il sert d'adhésif biologique (CHAMBERLAIN et EVANS 1973) capable de s'adapter à la nature du substrat (OLIVEIRA et al. 1980). Initialement, les spores adhèrent aux substrats solides par liaisons chimiques (CHARTERS et al. 1972, BONEY 1981). Ceci permet à la spore de *Ceramium* d'avoir un premier point de contact avec le substratum (CHAMBERLAIN et EVANS 1973). Deux types de mucilages se succèdent alors : un mucilage fibrillaire entoure initialement la cellule et laisse la place à un autre, plus dense, granuleux, considéré comme le véritable matériel adhésif de la spore. Chez *Gracilaria verrucosa*, le premier attachement au support est ponctuel et fragile puisqu'un léger mouvement du récipient crée une oscillation de la spore autour d'un axe ; il s'étale ensuite, devient rapidement tenace et l'on voit la carpospore rester immobile même en eau agitée. CHARTERS et al. (1972) affirment que la spore est alors capable de résister à une force plus de 100 fois supérieure à son poids.

La fixation est une étape critique pour la survie et le devenir de l'individu car elle précède impérativement la première division ; si on la perturbe ou que l'on gêne son déroulement, par aspiration des carpospores à la pipette par exemple, il s'ensuit une mort rapide chez **G. verrucosa** tandis que DION (1979) constate, dans ces conditions, un développement anormal des carpospores de **Gigartina**.

Ainsi, selon sa nature, le mucilage des Algues apparaît comme un agent d'expulsion, de transport ou de fixation des cellules reproductrices. L'abondant mucilage sécrété par **Gracilaria verrucosa** au moment de la carposporogénèse assure certainement des rôles successifs et mériterait une analyse cytochimique précise.

CHAPITRE II

MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE ORIGINALE

POUR LE NETTOYAGE DES THALLES

I. - LES ESSAIS PRELIMINAIRES (fig. 4)

Les Gracilaires sont le plus souvent couvertes d'épiphytes [Diatomées, Algues rouges et vertes (STOKKE 1957), Idotées, Gammare, Protozoaires ciliés] et d'un mucilage d'origine bactérienne probable. La contamination est maximale sur les thalles âgés, mais en période estivale, elle existe à tous les stades du développement de l'algue. Avant la mise en culture des spores, il convient donc de nettoyer efficacement la surface du thalle femelle et du carposporophyte, sans léser les spores qu'il contient.

A. - Traitement mécanique et résultat

Dès leur arrivée au Laboratoire, les Gracilaires sont rincées à l'eau de mer filtrée afin d'éliminer les vases et la faune macroscopique qui les recouvrent. Puis elles sont mises en aquarium d'eau de mer et placées en température standard de culture et sous faible intensité lumineuse (inférieure à 2 W.m^{-2}). Après une période de stockage de quelques jours, les thalles sont débarrassés des autres agents indésirables par essuyage avec un papier absorbant ou brossage au pinceau fin (MSHIGENI et LORRI 1977, KLING 1978). Ces techniques "mécaniques" s'avèrent peu efficaces puisque la plupart des épiphytes végétaux y résistent. D'autres procédés ont donc été utilisés.

B. - Traitement chimique et résultat

En vue d'obtenir des cultures d'algues de type axénique, KLING (comm. pers., 1982) préconise l'emploi d'un mouillant : le mercryl (30 % en eau de mer filtrée 0,2 μm - 20 min) avant une désinfection de la surface des thalles avec des solutions antibiotiques.

L'essai au mercryl s'est soldé par un échec. Les conditions d'utilisation s'avèrent efficaces pour nettoyer des algues mais létales pour les spores.

Nous avons essayé plusieurs temps de trempage dans des solutions de mercryl à différentes doses (tab. 1) pour déterminer la concentration critique pour les spores. Le mercryl montre de réelles propriétés antifongiques, mais aux fortes concentrations

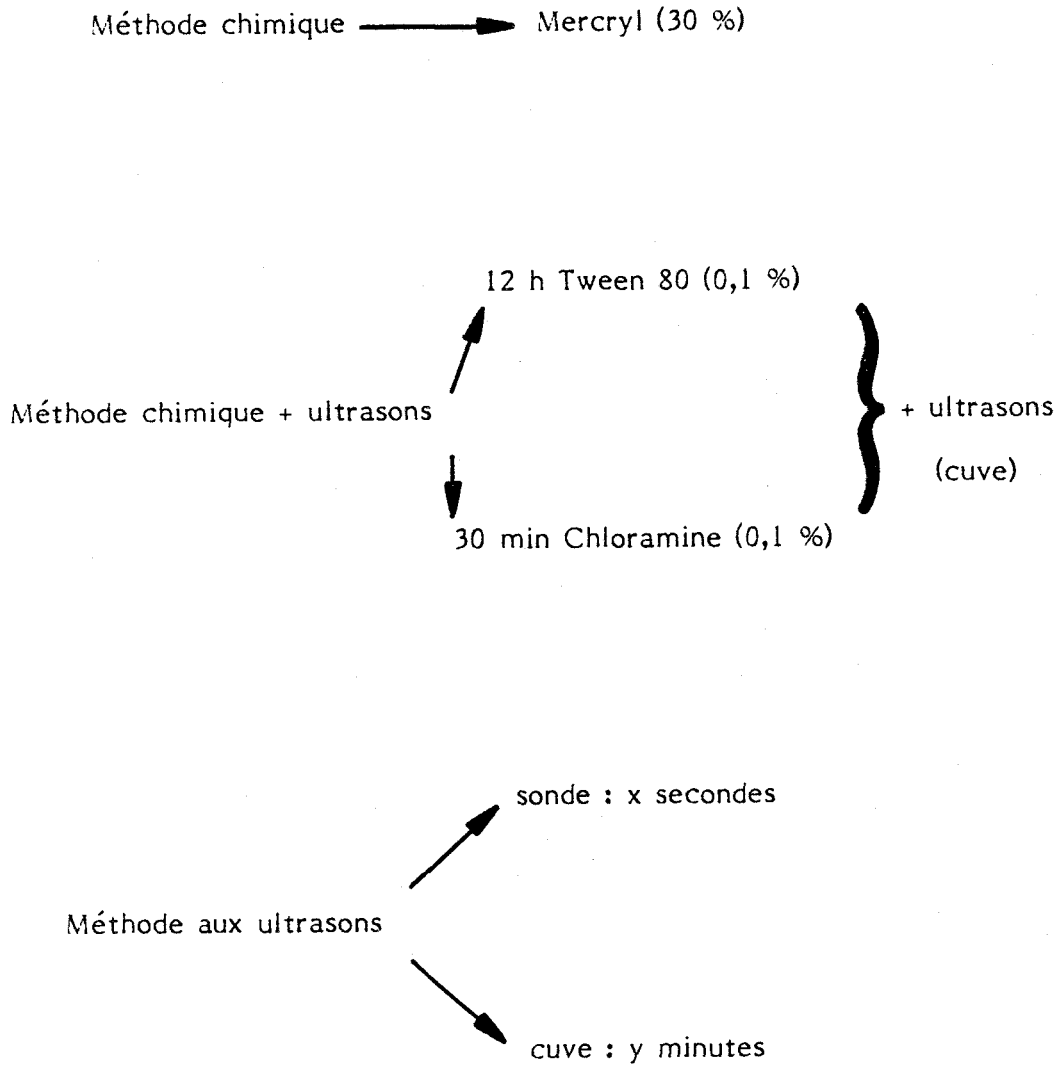


Figure 4 - Méthodes utilisées pour le nettoyage de la surface des thalles.

Temps de trempage des thalles	Taux de survie après :	Concentration de la solution de mercryl			
		30 %	20 %	10 %	0 % (témoin)
20 min	3 jours	0	2 à 3 % (divisions 0 à +) Ciliés : +	10 % (divisions +) Ciliés : +	30 % (divisions ++) Diatomées, Ciliés : +++++
	9 jours	-	0 Ciliés : ++	3 % (quelques stades 4 \varnothing) Ciliés : +	12 % ("morula" 10 \varnothing) Diatomées, Ciliés : +++++
10 min	3 jours	0	2 à 3 % (divisions 0 à +) Ciliés : ++	6 % (divisions ++)	
	9 jours	-	0 Ciliés : ++	0 Ciliés : +++	
5 min	3 jours	0	5 % (divisions 0 à +) Ciliés : ++	15 % (divisions ++) Ciliés : +++	
	9 jours	-	0 Ciliés : +++	8 % ("morula" 2 à 5 \varnothing) Ciliés : +++++	

Tableau I - Suivi de la survie des carpospores après différents temps de trempage des thalles support des cystocarpes, dans des solutions de mercryl.

Légende : + : peu
 ++ : quelques
 +++ : beaucoup
 +++++ : très grand nombre

(30 %), il augmente la mortalité des carospores ; aux concentrations plus faibles (10 à 20 %), sa toxicité baisse vis-à-vis des cellules, mais la faune et les protozoaires ciliés en particulier, ne sont plus éliminés.

Un "savon" tel que le mercryl permet donc un nettoyage efficace de la surface des thalles, mais son innocuité vis-à-vis des carospores n'a pu être démontrée.

C. - Association d'un traitement chimique et d'un traitement aux ultrasons.

Résultats

Un procédé associant produits chimiques et méthode physique a aussi été essayé. On connaît différents traitements chimiques pour tenter la réalisation de la culture axénique d'algues. LOISEAUX et ROZIER (1978), sur *Pilayella*, préconisent un prétraitement de 12 h dans 0,1 % Tween 80. Le chlore actif, à partir d'hypochlorite de Na, est classiquement utilisé selon la littérature (BODARD 1973), pour le nettoyage des algues. Nous avons donc employé parallèlement la méthode chimique de LOISEAUX et ROZIER (1978) et une méthode personnelle : trempage des thalles pendant 30 min dans une solution à 0,1 % de chloramine, libérant du chlore actif, puis rinçage abondant à l'eau de mer filtrée. Les Gracilaires sont ensuite passées dans une cuve à ultrasons (Ultrasons P Selecta - Model S13 - puissance 100 W).

Dans les deux cas de prétraitement par le Tween ou le chlore suivi de sonnication, on observe que :

- la surface des thalles apparaît généralement lisse et libre de tout parasite. POLNE *et al.* (1980) font toutefois remarquer que des épiphytes bien incrustés sont capables de résister à de très longues périodes d'ultrasons ; nous avons vérifié ce fait surtout en période estivale ;
- de tels prétraitements ont l'inconvénient de provoquer une dépigmentation des algues, à moyen terme ;
- les spores extraites et mises en culture sont très peu viables. Le taux de survie est cependant légèrement supérieur à celui obtenu avec le mercryl.

II. - INTERET DU TRAITEMENT AUX ULTRASONS (fig. 4)

En 1975, GALE, le premier, se sert des ultrasons pour décrocher des algues de leur substratum ; LOISEAUX et ROZIER (1978) usent d'une sonde à ultrasons pour le nettoyage de *Pilayella* tandis que POLNE *et al.* (1980) utilisent une cuve à ultrasons. Nous avons repris ces deux variantes pour éliminer les épiphytes de *G. verrucosa*.

A. - Traitement des carposporophytes récoltés sur le terrain

1 - Sonde à ultrasons

Les morceaux d'algues sont placés dans un bécher rempli d'eau de mer dans lequel vient tremper la sonde. La puissance de l'appareil est réglée à 1/3 et le temps de contact s'étend de quelques secondes à deux minutes. Les vibrations de la sonde provoquent une augmentation de la température de l'eau qui peut s'élever rapidement à 42°C voire 59°C. Pour limiter de telles variations, nous avons donc placé le bécher dans un bain-marie rempli de glace pilée.

2 - Cuve à ultrasons

Les algues, dans un bécher rempli d'eau de mer filtrée, sont plongées dans l'eau de la cuve pendant des périodes variables en fonction de l'état des spores extraites après le traitement.

Avec la sonde à ultrasons, quel que soit le temps de contact imposé, à la température contrôlée ou non , on observe toujours une dépigmentation quasi-immédiate et irréversible des thalles et les spores sont mortes.

Contrairement aux méthodes précédentes (produits chimiques, sonde à ultrasons), les résultats obtenus avec la cuve à ultrasons sont de très bonne qualité et n'ont pas d'effet rémanent (POLNE *et al.* 1980) ; nous avons donc mis au point un procédé original pour assurer la propreté des thalles de *Gracilaria* utilisés au cours de nos expériences. Après vérification au microscope de l'état des spores extraites à la suite du traitement, on détermine le temps de contact. POLNE *et al.* (1980) traitent en trois fois deux minutes ; avec notre matériel, le traitement en 3 fois 1 minute s'avère être le compromis optimal pour le nettoyage de surface et la viabilité des spores.

B. - Traitement des tétrasporophytes obtenus au Laboratoire

Des séquences très courtes, de 3-4 secondes dans la cuve à ultrasons, ont été couramment utilisées pour nettoyer les cultures, sans dommage pour les individus.

CHAPITRE III

RESULTATS ORIGINAUX SUR L'EMISSION

ET LE COMPORTEMENT DES CARPOSPORES IN VITRO

I. - EMISSION DES CARPOSPORES MURES

Certains auteurs extraient les spores par des moyens mécaniques pour les mettre en culture (BONEY 1978), mais la plupart laissent la libération se dérouler librement. Cette dernière méthode a l'avantage de se rapprocher des phénomènes naturels et nous l'avons utilisée pour une étude de l'influence de divers facteurs sur le fonctionnement du carposporophyte. Parmi les plus importants, nous avons envisagé l'effet de facteurs physiques : agitation, lumière et température, et de facteurs biologiques : relations entre le carposporophyte et le thalle parent support. Nous avons ensuite porté notre attention sur le comportement de la carpospore en culture **in vitro**.

A. - L'émission naturelle et sa sensibilité à divers facteurs de l'environnement

I - Influence de facteurs physiques

La lumière et la température seraient des facteurs essentiels contrôlant le développement du thalle (JONES 1959 a-b) ; de même, le passage de l'eau courante à l'eau calme des cultures en Laboratoire provoquerait l'émission des carpospores de **Gracilaria verrucosa** du Japon (SAWADA 1958). Il était intéressant d'évaluer l'influence de ces facteurs physiques sur le comportement du carposporophyte des **G. verrucosa** de la Manche.

a) Agitation (fig. 5)

- Modalités expérimentales

Un thalle femelle fécondé est découpé en morceaux portant chacun un cystocarpe. On mélange l'ensemble de façon à homogénéiser la distribution. On prélève alors, "au hasard", les carposporophytes qui seront placés en nombre égal dans deux béchers de 100 ml remplis d'eau de mer filtrée (+GeO₂) puis mis en conditions standards de culture. L'un des deux récipients, est placé sur une plaque à agitation magnétique. L'autre, gardé comme témoin, est laissé au repos.

Au bout de 3 jours, une évaluation de la quantité de spores libérées se fait sur un prélèvement de 10 ml de milieu à proximité des fragments.

Conditions de culture : Lumière blanche fluorescente : 12:12- 3,5 W.m⁻² - + 19°C

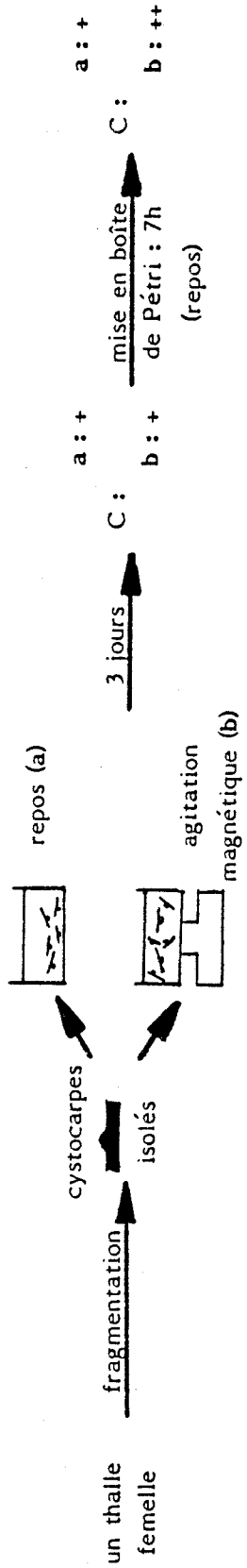


Figure 5 - Protocole utilisé pour l'étude de l'influence sur la libération des spores, du passage de l'agitation au repos. Résultats.

Légende : C : comptages

+ : quelques spores libérées

++ : beaucoup de spores libérées



Ensuite, témoins et fragments-test sont déposés dans des boîtes de Pétri (\emptyset 90 mm) contenant du milieu frais et replacés dans les mêmes conditions ; 7 heures plus tard, le nombre de spores émises est à nouveau recensé.

- Résultats

A terme, le passage de l'agitation au calme a un effet sur la libération des carpospores. Après trois jours passés dans l'une de ces conditions, les cystocarpes émettent des spores en quantités comparables. Toutefois, les deux lots, agités et non agités, placés ensuite dans une eau non perturbée, présentent alors des différences de comportement notables : les carposporophytes qui ont subi des mouvements d'eau pendant les trois jours précédents libèrent en quelques heures deux fois plus de carpospores que ceux constamment au calme.

- Interprétations

On peut émettre quelques hypothèses pour expliquer les raisons de telles réponses :

- + l'agitation de l'eau provoque une oxygénation et un brassage des substances nutritives ; les conditions de milieu étant améliorées, la maturation des spores est accélérée ;
- + les secousses dues au mouvement de l'eau facilitent la rupture des liaisons entre le cyste et la spore mûre et favorisent la libération des carpospores.

Dans la nature, cette influence positive du passage de l'agitation au calme peut jouer un rôle dans la répartition des individus. La Gracilaire est capable d'émettre ses spores dans le courant, mais elle est néanmoins sensible à l'arrêt quasi-brutal du mouvement de l'eau qui provoque une libération accélérée de carpospores sédimentant rapidement autour des pieds-mères.

b) Lumière

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons souvent noté la production de spores à l'obscurité. La lumière a-t-elle une influence sur le mécanisme de libération des carpospores ?

α) Etude de l'influence de la lumière après une courte période obscure

- Modalités expérimentales (fig. 6)

Les fragments isolés d'un même thalle sont mélangés pour homogénéiser l'échantillonnage, et distribués en deux lots X et Y composés chacun de 120 cystocarpes et placés respectivement dans une grande boîte de Pétri (\emptyset 90 mm). Le lot X est exposé à une lumière blanche fluorescente (Gro-lux, Sylvania) continue, sous une énergie de $3,5 \text{ W.m}^{-2}$. Le lot Y est mis à l'obscurité. L'expérience se déroule dans les conditions de température standard.

Après 24 heures de culture, les cystocarpes de chaque lot sont prélevés "au hasard", placés isolément dans une petite boîte de Pétri, et répartis en deux séries : X1 et X2, Y1 et Y2. X1, dont les cystocarpes viennent de subir 24 heures de lumière, est mis à l'obscurité tandis que X2 reste éclairé ; le protocole s'inverse pour les échantillons de la série Y. Ces nouvelles conditions lumineuses sont appliquées 5 min, 10 min, 15 min, ... jusqu'à 60 min. A la fin de chacune de ces tranches de 5 min, on prélève "au hasard" 5 boîtes de Pétri dans les séries X1, X2 et Y1, Y2. Le cystocarpe contenu dans chaque boîte est enlevé et les spores libérées sont comptées.

- Résultats

La figure 7 représente les courbes de fréquence relative de libération de carpospores, cumulées par tranches de 15 min, soit de carposporophytes laissés 24 heures à l'obscurité puis mis brutalement en lumière blanche ("choc lumineux"), soit d'autres échantillons ayant subi le traitement inverse ("choc obscur"). Chaque cas est juxtaposé avec les réponses données par les témoins restés en conditions constantes ($24:0 - 3,5 \text{ W.m}^{-2}$ ou $0:24 ; + 19^\circ\text{C}$).

La comparaison des résultats obtenus chez les deux témoins montre que ceux-ci se comportent de manière identique (différence non significative au seuil de 5 %). Un point d'inflexion s'observe au bout de 15 min ; il sépare deux périodes : au cours de la première, près de 16 % des spores sont libérées, puis le rythme ralentit et 7 à 13 % de cellules sont émises pendant la seconde phase. A partir de 30 min, les deux courbes sont régulièrement croissantes.

L'étude de l'évolution suivie au cours du temps par les échantillons utilisés indique que :

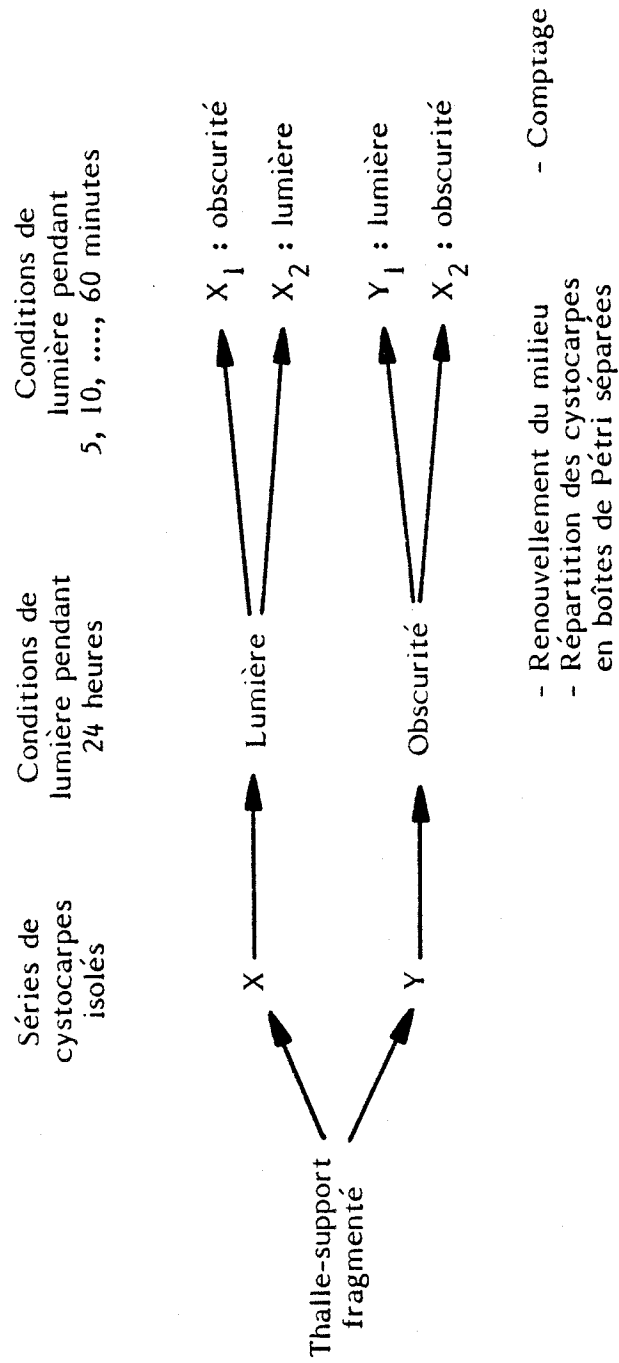
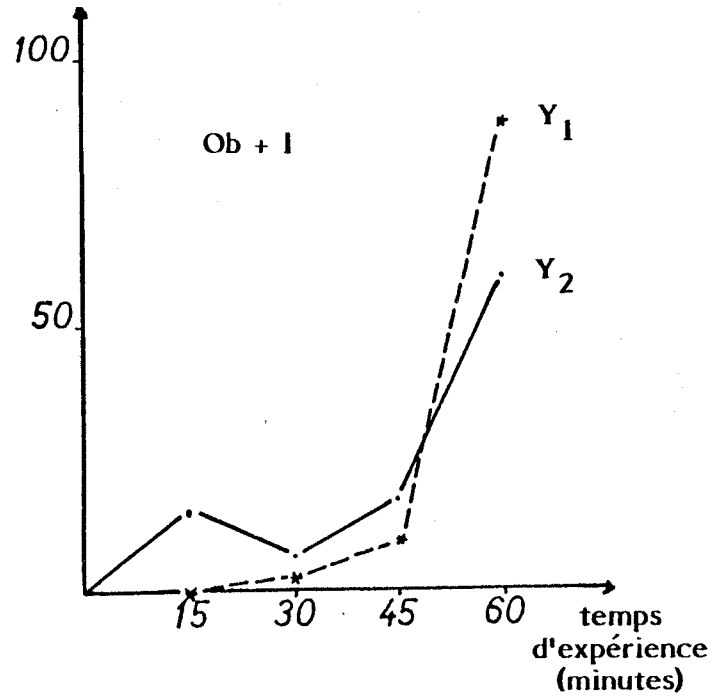


Figure 6 - Protocole utilisé pour la mise en évidence de l'influence de la lumière sur l'émission des spores, après une courte période obscure.

fréquences
relatives
(%)



fréquences
relatives
(%)

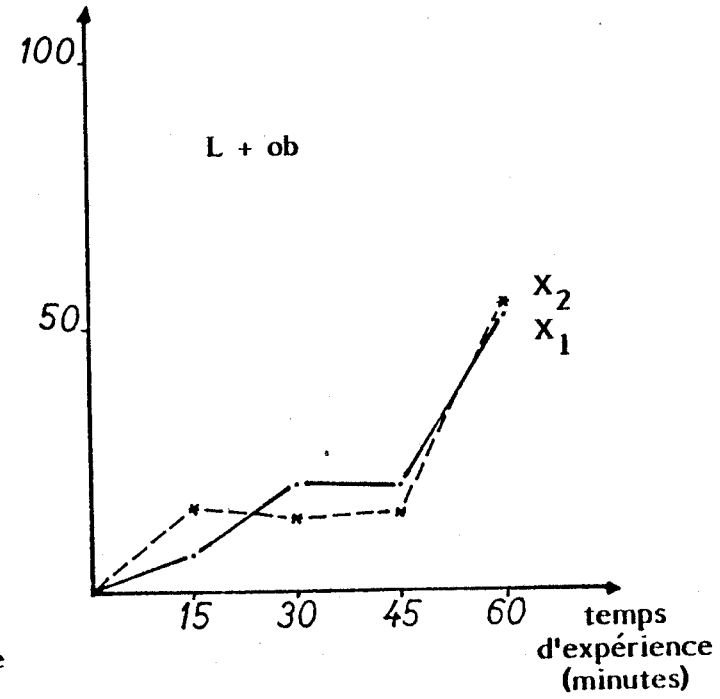


Figure 7 - Modifications de la libération des spores après :

Lot Y : [Ob + I] : 24h Obscurité + 0 à 60 min lumière. (Y₁) ; Témoin Obscurité (Y₂)

Lot X : [L + ob] : 24h Lumière + 0 à 60 min obscurité (X₁) ; Témoin Lumière (X₂)

- après 24 heures d'obscurité, 20 min d'illumination fluorescente blanche sont nécessaires avant que la libération des carpospores débute ; le phénomène s'accélère ensuite régulièrement et suit une courbe croissante en "J" ;
- lors du passage de la lumière à l'obscurité, l'émission de spores commence dès les 5 premières minutes, elle s'accélère jusqu'à 30 min, après quoi elle ralentit pour réaugmenter fortement à partir de 45 min.

La comparaison des courbes témoin-obscurité et choc lumineux montre une différence statistiquement établie ; au contraire, les courbes témoin-lumière et choc obscur n'en indiquent pas. Par ailleurs, l'évolution des cystocarpes ayant subi un choc lumineux est significativement dissemblable de celle des carposporophytes passés de la lumière à l'obscurité. Ces derniers échantillons se comportent, en outre, de façon comparable aux deux témoins, sauf au point 30 min où l'écart avec le témoin-obscurité est dû à la forte amplitude des réponses obtenues à l'obscurité.

- Interprétations

Différentes interprétations peuvent être avancées pour expliquer l'allure des courbes :

- si les témoins conservés constamment, tantôt à la lumière, tantôt à l'obscurité et dans les mêmes conditions pour tous les autres paramètres, suivent des courbes de libération identique, c'est que ce phénomène est indépendant du facteur lumineux et suit un rythme propre au cystocarpe ;
- si les courbes témoin-lumière, témoin-obscurité et choc obscur ne présentent pas entre elles de différence significative, c'est que seul le choc lumineux modifie le rythme d'émission.

β) Etude de l'influence de la lumière après une longue période obscure

- Modalités expérimentales

Les thalles de *G. verrucosa* résistent à de longues périodes d'obscurité. On ignorait toutefois si le passage brutal à la lumière avait un effet sur le fonctionnement du carposporophyte. Pour limiter les réponses à celles dues à la lumière, nous avons utilisé des conditions de température constante à + 19°C.

Un thalle femelle fécondé est fragmenté ; chaque tronçon porte un seul cystocarpe. Les morceaux, placés isolément en boîtes de Pétri (\emptyset 55 mm) sont mis à l'obscurité pendant 3 semaines. Cette période passée, on change le milieu et l'on compte les spores libérées tandis que les carposporophytes sont placés en conditions standards de culture. Le renouvellement du milieu de culture et le comptage des spores s'effectuent ensuite quotidiennement.

- Résultats (tab. 2)

Un retour à la lumière, après une longue période obscure, influence la maturation du carposporophyte.

Condition	Préculture (Lumière 12:12)		Obscurité (0:24)		Lumière (12:12)	
	Temps	t_0	20 jours	+ 24 h	5 jours	9 jours
Nombre de cystocarpes actifs		6	0	1	4	10
Nombre de cystocarpes NON actifs		7	13	12	9	3
Nombre total de cystocarpes en expérience		13	13	13 (R)	13 (R)	13 (R)

Tableau 2 - Influence de la lumière sur le fonctionnement du carposporophyte, après une longue période obscure.

R : renouvellement du milieu

On vérifie le fonctionnement des cystocarpes avant la mise en culture : 6 sur 13 émettent alors des spores. Après 20 jours d'obscurité à + 19°C, on change le milieu. Aucune spore n'est comptée. Les fragments sont remis dans les mêmes conditions pour 24 heures. Passé ce délai, on renouvèle l'eau de mer filtrée. Un seul des carposporophytes, initialement productifs, a émis quelques carpospores. Placés en

lumière blanche fluorescente, les échantillons mettront ensuite 5 jours avant que quatre d'entre eux, actifs à t_0 , émettent à nouveau, et 9 jours pour que dans six autres boîtes on observe la présence de spores.

Un long séjour à l'obscurité ne semble donc pas inhiber de manière irréversible le fonctionnement du carposporophyte puisque des spores sont encore émises après ces conditions. Le phénomène est toutefois perturbé, d'une part puisque la majorité des carposporophytes n'est plus productive en fin de période obscure et d'autre part, puisqu'il faut attendre plusieurs jours avant que de nouvelles cellules soient libérées. Le retour à la lumière semble favoriser la maturation des assises gonimoblastiques puisque des cystocarpes, initialement non productifs, émettent en grand nombre après 9 jours d'illumination. Par contre, l'un des échantillons, actif avant l'expérience, ne produit plus de carpospores après 3 semaines d'obscurité et 9 jours de lumière. On peut penser qu'il est en phase de dégénérescence et est devenu trop âgé pour libérer des spores.

L'éclairement joue donc un rôle sur le fonctionnement des carposporophytes. Ce rôle semble stimulateur et accélérateur de la maturation des carpospores et son influence se prolonge même au delà des phases obscures de plusieurs semaines ; ce fait rappelle donc l'hypothèse de SUTO (1950) selon laquelle l'induction de la libération des spores serait due à un effet cumulatif de la lumière.

c) Température

α) **Choc thermique à la lumière**

BIRD (1974-76) puis McLACHLAN et EDELSTEIN (1977) insistent sur la résistance des algues du genre **Gracilaria** aux basses températures et montrent qu'elles sont capables de se régénérer après être restées dans une eau voisine de 0°C pendant une période indéfinie. Au cours de l'hiver 1984-85, une vague de froid intense a frappé la côte française de la Manche à la Mer du Nord. Les algues en place ont supporté des températures inférieures à 0°C au cours de la marée basse puis du transport. Nous avons donc mené des expériences pour vérifier si la résistance du thalle aux grands froids s'appliquait aussi au carposporophyte et à son fonctionnement.

- Modalités expérimentales

L'état de maturité de quelques carposporophytes est vérifié sur un thalle puis on fait deux lots de cystocarpes isolés. Le premier est mis dans les conditions standards de culture, le second est mis en conditions témoins. Le reste du thalle est conservé à la pénombre, à + 5°C. Le milieu est renouvelé toutes les 24 h et la libération des spores est suivie chaque jour.

- Résultats (fig. 8)

La vérification, par extraction des carpospores, de la maturité de carposporophytes ayant subi une période de froid intense, montre la présence de spores très nombreuses mais en forme d'amande, mal pigmentées, très vacuolisées.

Il faut attendre 7 jours de culture, à la lumière et à + 19°C, avant que l'émission naturelle ait lieu et libère ces carpospores non viables. 24 heures plus tard, des carpospores rondes, bien pigmentées et viables sont émises, mêlées à des magmas de cellules atypiques identiques aux précédentes et qui seront encore rejetées au cours des 2 jours suivants, mais de façon sporadique. Dans le même temps (7ème jour), le thalle conservé à + 5°C et faible luminosité, n'émet toujours pas de carpospores ; la dissection des cystocarpes montre alors qu'ils contiennent des cellules "en amande" et aussi des spores rondes mais très vacuolisées. Les potentialités synthétiques du gonimoblaste sont donc retardées, voire troublées, mais non inhibées. Une des frondes est prélevée sur le thalle et placée à + 19°C. Des carpospores viables apparaissent alors 6 jours plus tard. Le délai de production est légèrement inférieur à celui observé lors du précédent choc thermique. La redifférenciation des carposporocystes a pu débiter lors du séjour à + 5°C et le passage brutal à + 19°C a ensuite accéléré le phénomène.

En conclusion, il apparaît que les très basses températures, proches du gel, perturbent le mécanisme de la libération et lèsent les carpospores. Le retour à des températures supérieures permet une lente remise en fonctionnement des assises gonimoblastiques qui s'effectue de façon synchrone pour tous les lots mis dans les mêmes conditions.

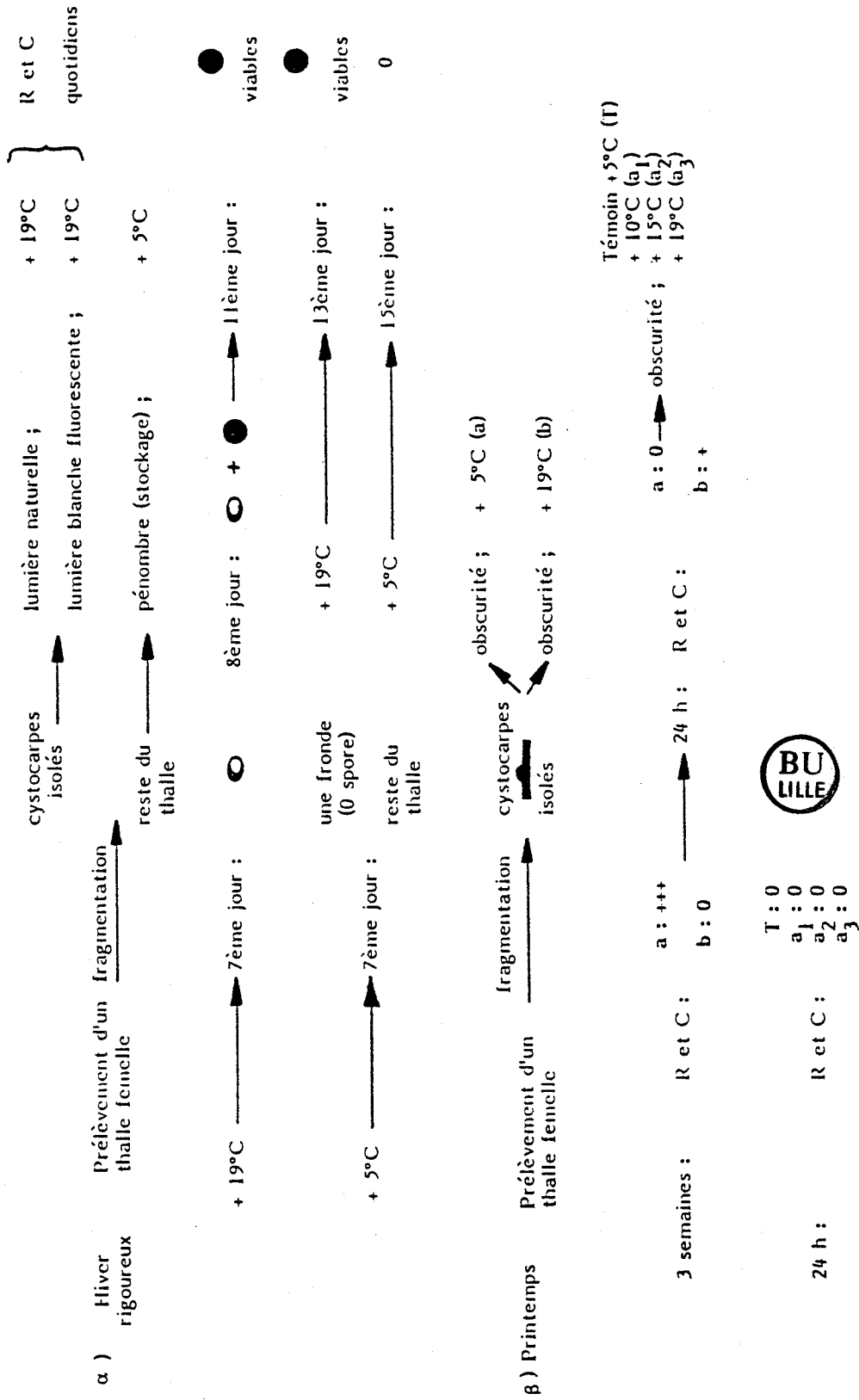


Figure 8 - Protocoles utilisés pour la mise en évidence de l'influence de chocs thermiques à la lumière (α) ou à l'obscurité (β), sur la libération naturelle des carpospores. Résultats.

Légende : R : renouvellement du milieu
 C : comptage
 + : quelques carpospores libérées
 +++ : très grand nombre de carpospores libérées

β) Chocs thermiques à l'obscurité

- Modalités expérimentales

Dans la nature, les algues peuvent être soumises à des variations thermiques brutales d'amplitude variable, négatives ou positives selon la saison. Nous avons tenté d'évaluer la sensibilité du carposporophyte à de telles conditions sur une période de plusieurs jours ou sur une séquence de quelques heures. Pour distinguer les réponses dues à la lumière de celles dues à la température, il était nécessaire de mener les expériences à l'obscurité.

Un thalle femelle, porteur de cystocarpes matures, est prélevé au Cap Gris-Nez alors que la température de la Manche avoisine + 12°C. Apporté au Laboratoire, on le sectionne en tronçons à un seul carposporophyte que l'on place isolément dans de petites boîtes de Pétri, puis on les met en culture à l'obscurité soit à + 5°C, soit à + 19°C. Trois semaines plus tard, les fragments sont changés de milieu et le nombre de spores libérées est compté. Le lot de carposporophytes placés à + 19°C est conservé à la même température tandis que le lot à + 5°C est distribué en 4 séries, mises respectivement à + 10°C, + 15°C, + 19°C ou gardées à + 5°C. Après 24 heures, on supprime les cystocarpes et on recense les carpospores émises pendant cette période.

- Résultats

Les cystocarpes montrent un comportement différent selon les variations thermiques qu'on leur fait subir. Dans notre expérience, on applique une amplitude de 7°C, c'est-à-dire que la température de récolte étant à + 12°C, on a placé les carposporophytes soit à + 19°C, soit à + 5°C.

Après trois semaines de traitement à l'obscurité, on observe la présence de carpospores en grand nombre (près de 1500) dans les boîtes mises à + 5°C, alors que l'on n'en recense aucune à + 19°C. On pourrait croire à un bon fonctionnement des cystocarpes par abaissement de la température et à un mauvais par élévation, mais on peut toutefois s'interroger sur la production de spores sur une courte durée. On réitère l'expérience, cette fois sur un laps de temps court, 24 heures. Au cours de cette période, à + 5°C le carposporophyte fonctionne lentement et aucune spore n'est émise ; à + 19°C, par contre, il émet plus vite et libère une trentaine de cellules qui flottent dans le milieu.

Aux deux températures, les assises gonimoblastiques sont bien actives mais pas à la même vitesse. Selon les conditions thermiques, la chronologie du fonctionnement varie et le devenir des spores également : la différence d'effectif, en fin d'expérience, est probablement due aux attaques parasitaires qui sont accélérées aux températures élevées.

Au cours du rythme nycthéral, de faibles variations de température se produisent naturellement ; une question se posait donc à propos de la réponse du carposporophyte à des variations thermiques de petite ou moyenne amplitude, sur une courte séquence temporelle. On a alors amené les échantillons, précédemment conservés à + 5°C, à des températures de + 10°C, + 15°C, + 19°C pendant 24 heures. La variation a été appliquée dans un sens croissant, plus proche des conditions naturelles pour ces algues récoltées au printemps. Un témoin est conservé à + 5°C. Au bout d'une journée, dans tous les cas, on n'observe pas de spores. Sur une période courte, des variations thermiques de faible amplitude ne modifient donc pas le fonctionnement du carposporophyte.

d) Conclusion

Dans la nature, les algues sont soumises à des facteurs en perpétuelle variation : agitation de l'eau, température, lumière. Généralement, la transition d'un état à l'autre est progressive mais des passages plus brutaux peuvent se produire. L'arrêt de l'agitation accélère la libération, comme l'avait pressenti SAWADA (1958), de même que le passage de l'obscurité à la lumière et que l'élévation de la température, ce qui corrobore les observations de RAO et SUBBARANGAIAH (1981).

Dans le cas d'un passage à une condition favorable et quel que soit le facteur externe impliqué, les carposporophytes de **Gracilaria verrucosa** répondent en libérant très vite les carpospores matures qui étaient stockées dans la cavité cystocarpique. Un retour à des conditions moins clémentes provoque un ralentissement du fonctionnement du gonimoblaste sans préjudice sur une activité ultérieure. Dans un milieu où certains éléments sont franchement hostiles au bon développement des carposporophytes, l'émission des spores s'arrête ; elle ne pourra reprendre qu'après un nouveau changement de facteurs, cette fois plus propices, et après un temps de latence de 5 à 9 jours, nécessaire à la formation de nouvelles carpospores.

2 - Influence des facteurs biologiques

Dans la nature, la fécondation peut avoir lieu tout au long du gamétophyte femelle pourvu qu'il soit mature, mais on ignorait encore si la position du cystocarpe influait sur la production des spores. De plus, la morphologie de l'algue peut être considérablement modifiée par arrachage des portions de frondes et on ne connaissait pas l'influence de la fragmentation du thalle support sur le comportement du carposporophyte.

- Protocole expérimental commun (fig. 9)

Un thalle femelle fécondé est choisi en fonction de deux critères : l'un relatif à la longueur des frondes (environ 20 cm), l'autre au nombre de cystocarpes (70 à 80 sur l'axe principal). Quatre frondes sont prélevées et ont pour nomenclature : A, T, 1 et 2 ; les axes secondaires sont éliminés. Chaque fronde est soit gardée entière (témoin = T), soit sectionnée en deux parties approximativement de même taille et portant un même nombre de cystocarpes. L'un des segments est conservé entier, l'autre est fractionné de façon à isoler chaque carposporophyte et le morceau de thalle support qui le porte. Chaque portion "entière" est placée dans une boîte de Pétri de diamètre 90 mm tandis que les cystocarpes isolés sont regroupés par 7 dans des boîtes de Pétri de diamètre 55 mm. Les boîtes sont placées en conditions standards de culture, sauf celle de la fronde T qui est mise en conditions témoins.

Au bout de 24 heures, tous les échantillons sont transférés dans du milieu frais. Le comptage des carpospores est alors effectué dans les boîtes d'où les carposporophytes viennent d'être ôtés. Contrairement au protocole de RAO (1976), nous avons pris en compte les éventuelles spores dégénérées qui appartiennent à la production totale libérée au cours des 24 heures précédentes. Dans la mesure du possible, la manipulation se répète chaque jour, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de carpospores émises pendant plusieurs cycles photopériodiques successifs.

a) Position du cystocarpe sur le thalle support

- Modalités expérimentales

La fronde A est sectionnée, approximativement en son milieu, en deux parties : la fraction basale est appelée AB. la fraction distale AD.

Conditions de culture :A, 1 et 2 : lumière blanche fluorescente, $12:12 - 3,5 \text{ W.m}^{-2} - + 19^\circ\text{C}$

T : lumière naturelle, température du Laboratoire

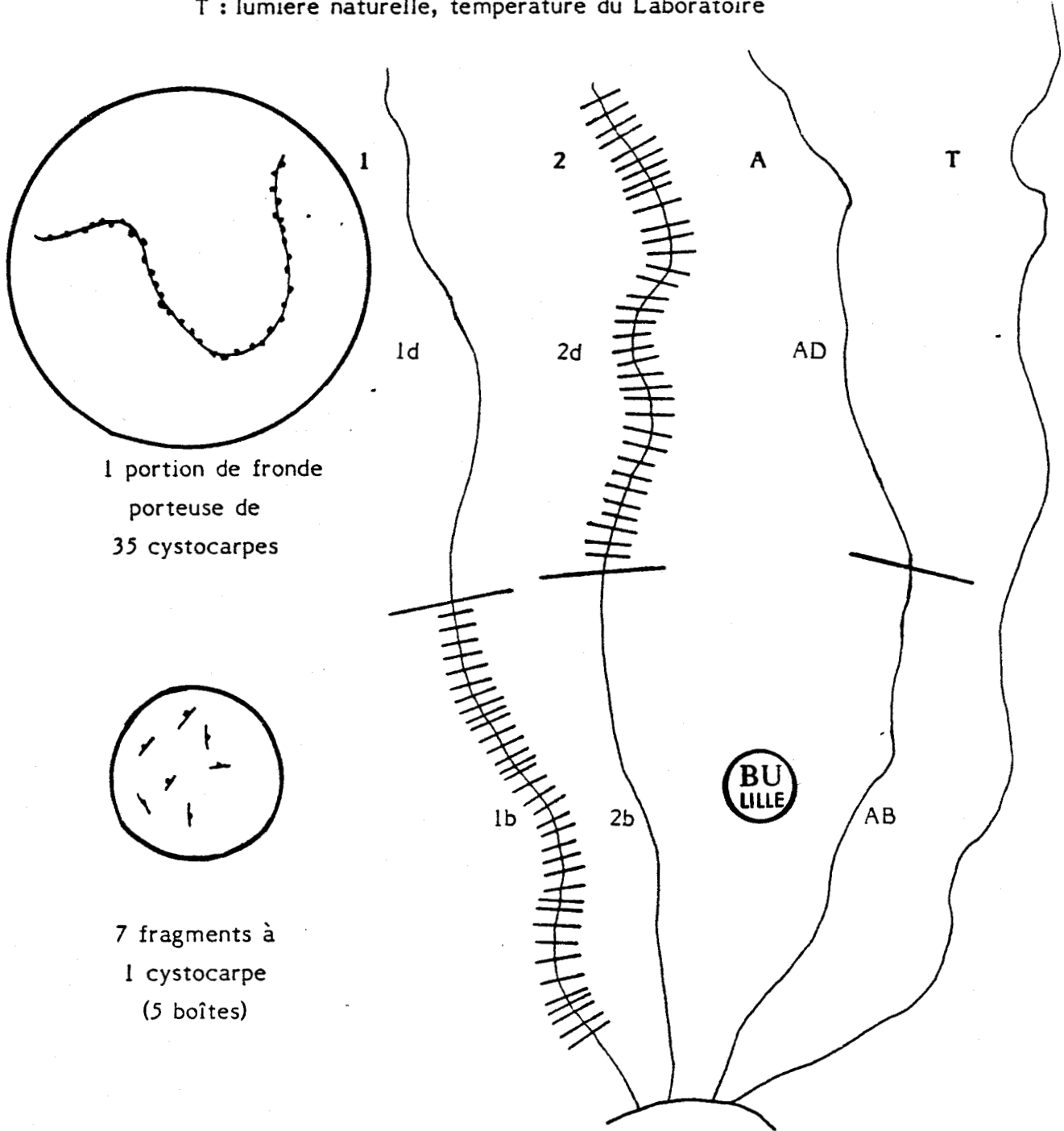


Figure 9 - Protocole utilisé pour la mise en évidence de l'influence de la position du cystocarpe et de la fragmentation du thalle support, sur le fonctionnement du carposporophyte.

- Résultats

Pour un temps donné, la production de carpospores et le temps de fonctionnement sont influencés par la position du cystocarpe sur le thalle-support.

La partie distale de la fronde A émet 19 fois plus de spores et en 4 fois moins de temps que la partie basale. Le témoin libère environ 2 fois plus de spores que la section distale de A en 1,3 fois plus de temps. La **figure 10** représente les histogrammes de fréquence relative de libération de spores au cours du temps, respectivement de T, AD et AB. Le regroupement des fréquences par tranche de 6 jours permet de remarquer que AH suit une loi normale dans la période 6 à 66 jours ; au cours des 6 premiers et 3 derniers jours, les libérations de spores s'effectuent de façon anarchique, les effectifs représentés ne dépassant pas 2 % du total, ils ne seront pas pris en considération lors des calculs ultérieurs.

L'observation de la forme des histogrammes de AH montre la présence de trois pics. La question s'est donc posée de savoir si ces points pouvaient correspondre à des "cohortes" de spores libérées en même temps. Pour trouver une réponse, CASSIE (1954) préconise une méthode simple utilisant un papier semi-logarithmique sur lequel on reporte les fréquences relatives cumulées de courbes répondant à une loi normale.

La **figure 11** représente la courbe d'émission des spores de AH selon la méthode de CASSIE (1954) : dans sa portion 6 à 66 jours, elle montre deux points d'inflexion aux 24 et 48^{ème} jours. Ces points indiquent la présence de 3 "cohortes" successives dont on a recalculé l'équation des droites représentatives. Ces "cohortes" correspondent à trois périodes importantes d'émission qui s'étendent chacune sur environ 24 jours.

La partie AB, de son côté, répond significativement, au seuil de 5 %, à une loi de Poisson de paramètre $m = 0,4$, et ne présente qu'une seule "cohorte" qui s'étale sur 18 jours.

Les calculs des droites de régression sur la partie normale de la courbe donnée par AD et sur tout le temps de fonctionnement de AB, donnent respectivement :

$$AD : y = - 17,99 + 1,87 x \quad r = 0,99$$

$$AB : y = 18,39 + 5,38 x \quad r = 0,86$$

Fréquences relatives
de carpospores libérées
(%)

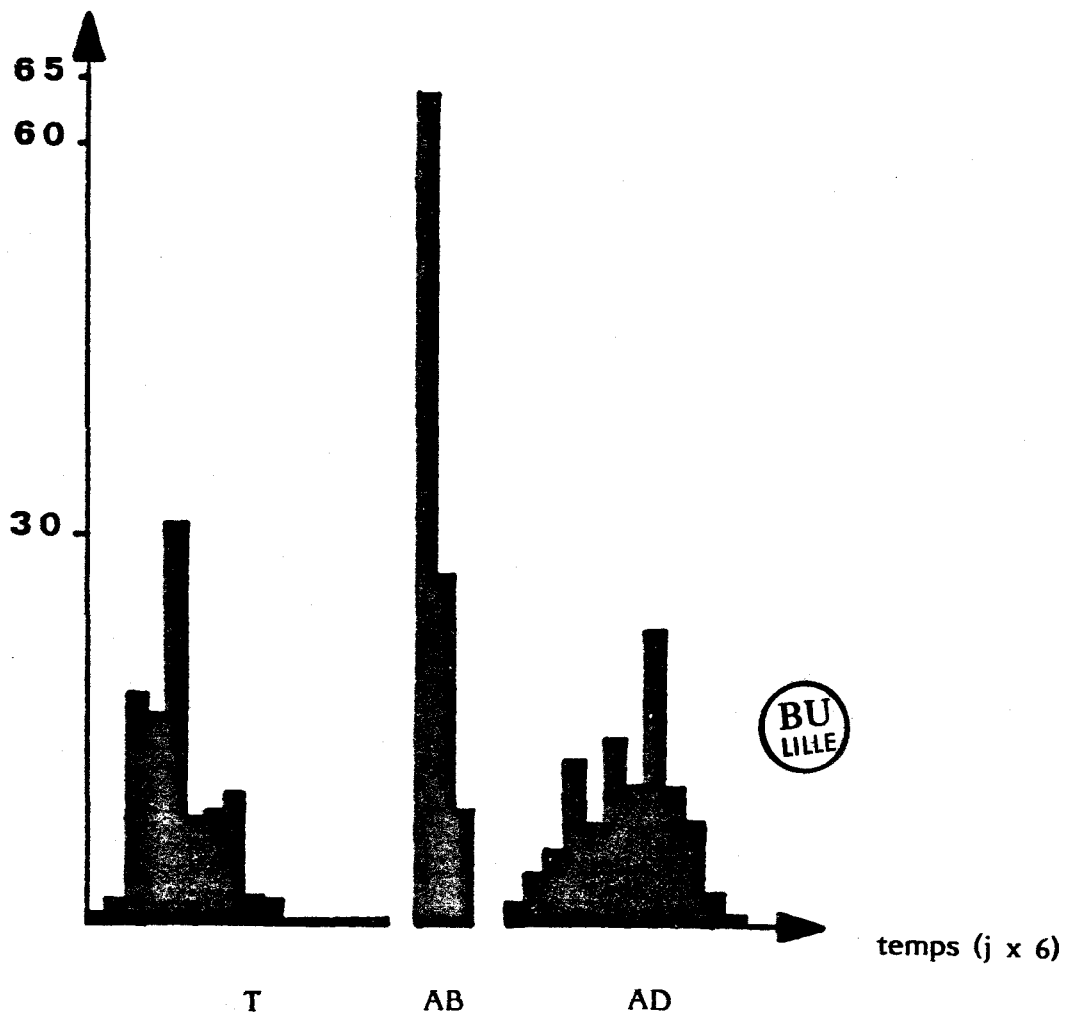


Figure 10 - Histogrammes de fréquence relative de spores libérées, au cours du temps, par des carposporophytes portés par des frondes gardées entières (T) ou sectionnées (AB : partie basale ; AD : partie distale).

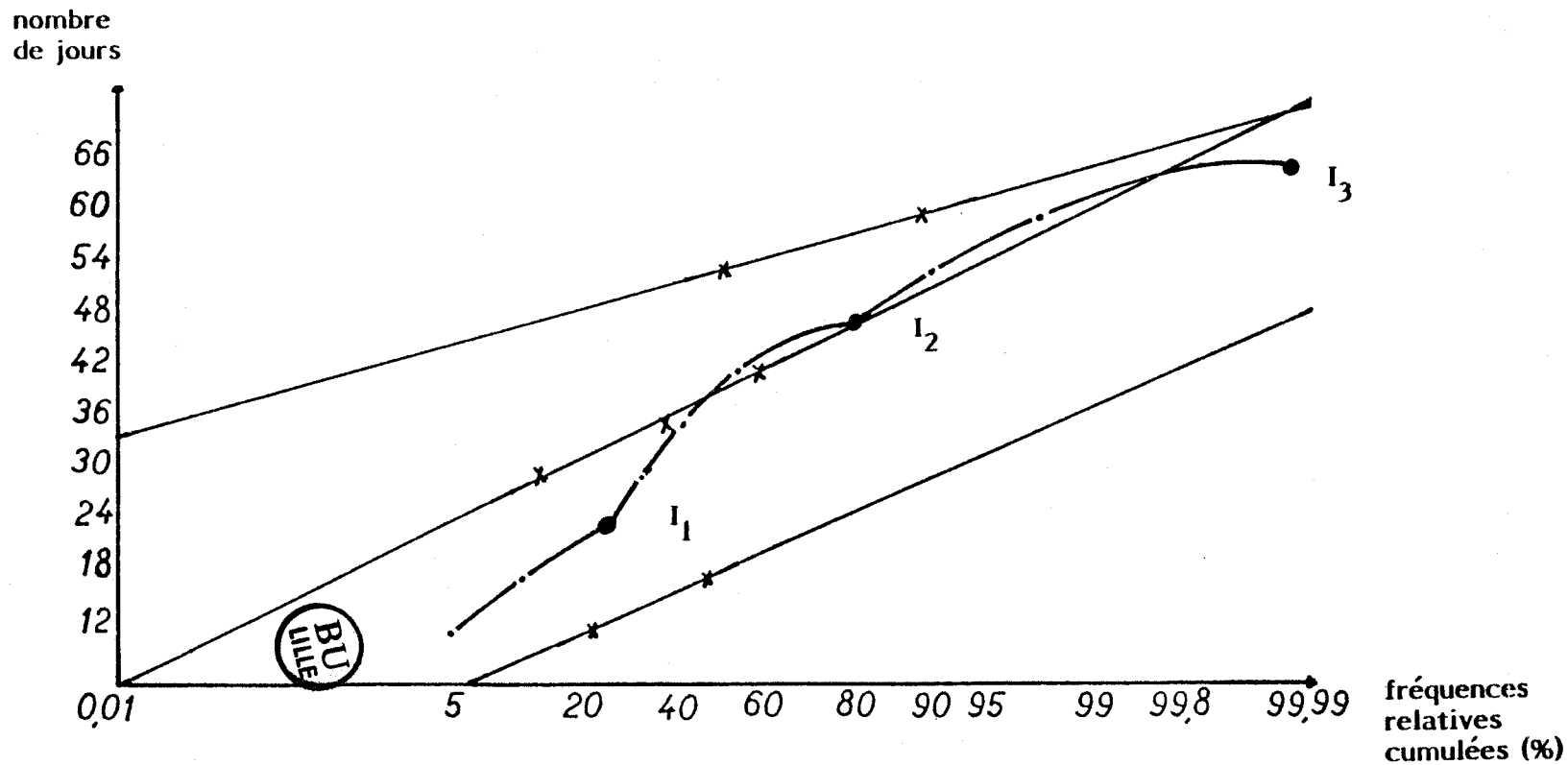


Figure 11 - Méthode de CASSIE (1954) appliquée au temps et à la quantité de spores libérées par l'ensemble des carposporophytes de la partie distale (AD) de la fronde A.
3 "cohortes" : I₁, I₂, I₃.

Le témoin, quant à lui, ne fait apparaître, à aucun moment, de courbe répondant à une loi quelconque.

A partir des équations de régression, on obtient le temps nécessaire pour passer des 50 % aux 80 %. AB émet ses spores plus vite que AH puisque 50 % de sa production totale est libérée en 6 jours tandis que AH donne le même résultat en 34 jours. De même, il faudra presque 6 nouveaux jours pour que AB émette 80 % de ses carpospores alors que AH fonctionnera encore 18 jours avant d'atteindre le même taux.

De par la forme même de la courbe, il apparaît que la partie basale (AB) est, dès le début de l'expérience, dans une phase d'activité décroissante, la portion distale (AH), par contre, voit globalement la succession de trois étapes de libération des spores : une phase de maturation (6 jours), puis une phase de fonctionnement optimal (60 jours), enfin une phase de dégénérescence (3 jours). Les cystocarpes des régions basales et distales d'une même fronde répondent à une même loi évolutive de type normal, mais ils fonctionnent en déphasage. Le fonctionnement des carposporophytes, le long du thalle-support, ne s'effectue donc pas de façon synchrone mais progressive de la base vers le sommet des frondes avec, en outre, des temps d'activité pouvant se superposer étroitement, ce qui explique la difficulté de mise en évidence de courbes normales représentatives de la production de spores chez la fronde entière témoin. Enfin, la quantité de carpospores émises varie beaucoup d'une fronde à l'autre du fait même des différences de maturité des cystocarpes respectivement portés.

b) Fragmentation du thalle

- Modalités expérimentales

Chaque axe 1 et 2 est segmenté de manière à obtenir deux parties possédant chacune 35 cystocarpes ; on leur donne la nomenclature b (bas) : 1b, 2b et d (distal) : 1d et 2d. Les sections basales 1b et distales 2d sont morcelées de façon à isoler chaque cystocarpe ; à l'inverse, les zones distales 1d et basales 2b sont conservées entières.

- Résultats

La **figure 12** représente les fréquences relatives cumulées du nombre de spores, au cours du temps, pour les parties basales et distales sectionnées (1b, 2d) ou entières (2b, 1d) des frondes 1 et 2. Les points obtenus s'alignent selon la forme caractéristique de la courbe de croissance avec souvent une phase de démarrage, généralement de courte durée, suivie par une imposante phase de fonctionnement actif, et, enfin, une phase de ralentissement, se prolongeant en plateau. Les deux périodes extrêmes, démarrage et ralentissement ne répondent pas à une loi normale au contraire de la phase de fonctionnement ; la somme de leurs effectifs respectifs représente rarement plus de 5 % du total, on admettra donc leur mise à l'écart lors des calculs ultérieurs.

Une analyse de variance, pour le paramètre : "fragmentation", est réalisée entre les différents échantillons, sur l'ensemble des points répondant à la loi normale ; on compare donc entre elles les étapes dites de fonctionnement actif. Au seuil de 5 %, il n'apparaît pas de différence significative, toutefois on remarque un net effet positif en faveur des portions fragmentées (**tab. 3**).

La fragmentation des thalles support joue donc éventuellement un rôle influant sur le fonctionnement des assises gonimoblastiques des cystocarpes de **G. verrucosa**.

Morceaux	1d : 10 087
	2d : 10 168
Entiers	2b : 3 002
	1d : 8 344

Tableau 3 - Production moyenne de carpospores par cystocarpe ; le thalle support étant fragmenté (morceaux) ou gardé entier.

L'étude des courbes de fréquences relatives cumulées apporte d'autres indications. Les parties entières (1d, 2b) sont chacune dotées d'une période de démarrage tandis que 1b et 2d, dont les cystocarpes sont isolés, en sont dépourvues.

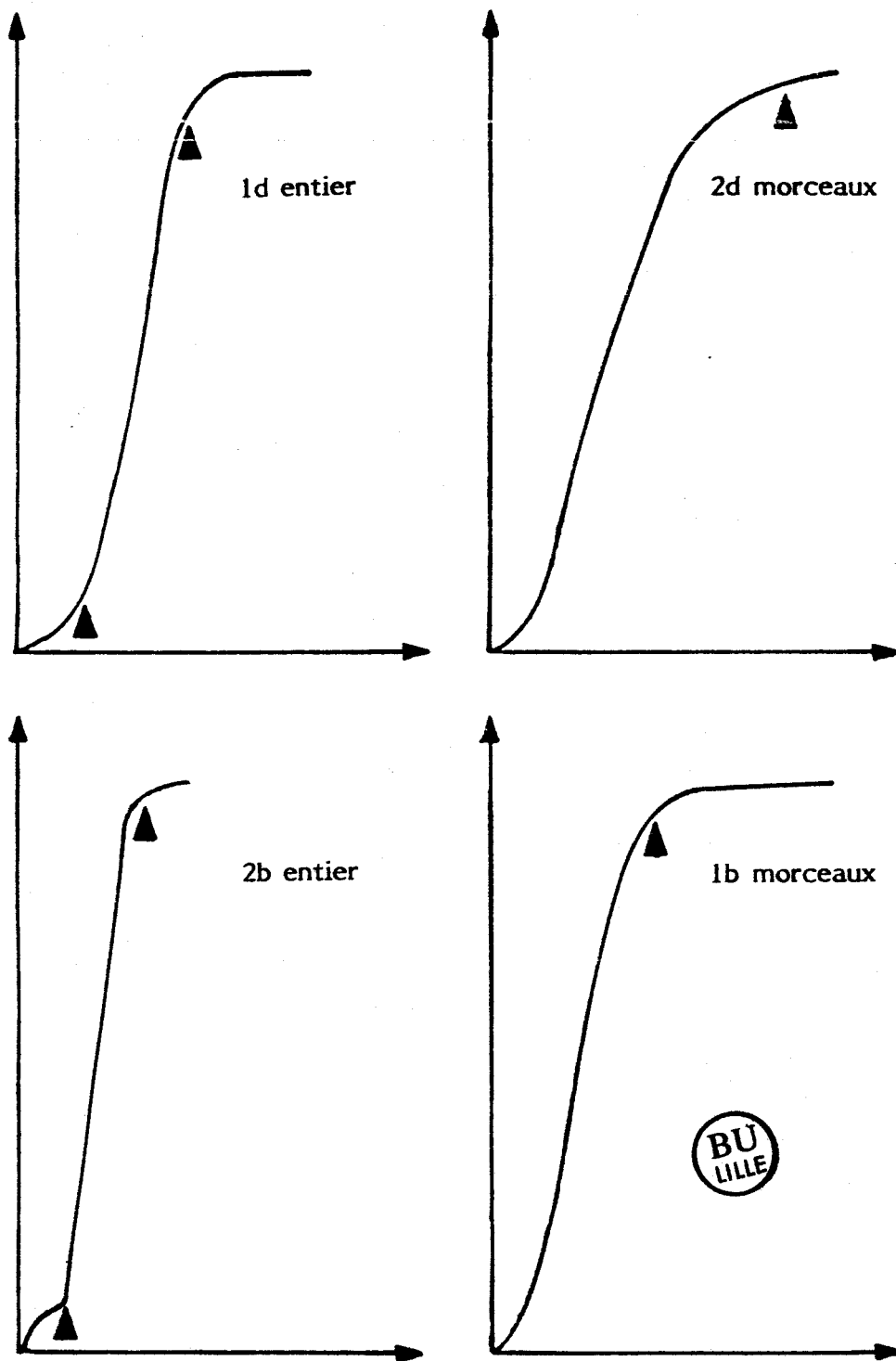


Figure 12 - Fréquences relatives cumulées de libération des spores au cours du temps, de 1b, 1d, 2b, 2d.

▲...▲: Phase de fonctionnement optimal

(%) L (jours)

La fragmentation des thalles provoque donc une mise en route immédiate de la phase active de fonctionnement. La "dégénérescence", correspondant à la phase de ralentissement, est un phénomène commun à tous les échantillons, seule varie son étendue dans le temps : chez les cystocarpes isolés, elle s'allonge de 20 à 50 %.

La **figure 13** donne les histogrammes des fréquences relatives des spores libérées par portion de fronde. On retrouve, chez 1d et 2b, l'illustration de la phase de démarrage, mais dans la phase de fonctionnement actif des pics apparaissent chez tous les échantillons. La méthode de CASSIE (1954) nous aide, à nouveau, à interpréter ces fluctuations et permet de faire apparaître des points d'inflexions limitant les cohortes dont on calcule l'équation des droites représentatives. La fronde 1 possède deux points pour chacune de ses parties basale et distale ; la fronde 2, par contre, libère ses spores issues de la base en un seul ensemble tandis qu'il s'en succède trois pour les spores issues du sommet. Chacune de ces "cohortes" s'étend sur une durée de 24 à 30 jours.

Les équations de régression calculées à partir des courbes normales, donnent des pentes inférieures à 2 pour les portions fragmentées alors qu'elles sont plus fortes (2,5 à 4) pour les parties entières. Ces dernières fonctionnent donc sur une période courte tandis que les cystocarpes isolés émettent leurs spores de façon plus étalée dans le temps.

c) Discussion

Le **tableau 4** récapitule les résultats obtenus avec quatre axes principaux porteurs de cystocarpes et issus du même thalle.

L'effectif obtenu n'est pas toujours significativement différent entre les portions basale et distale, segmentées ou non, des frondes, mais isoler les carposporophytes les uns des autres provoque l'élimination d'une phase de démarrage, synchronise le fonctionnement des assises gonimoblastiques et en allonge le temps d'exercice. La comparaison des résultats donnés par les portions dites entières de frondes (2b et 1d) avec le témoin gardé intact, montre que le simple fait de segmenter un thalle en deux parties provoque déjà un début de synchronisation dans les processus de libération.

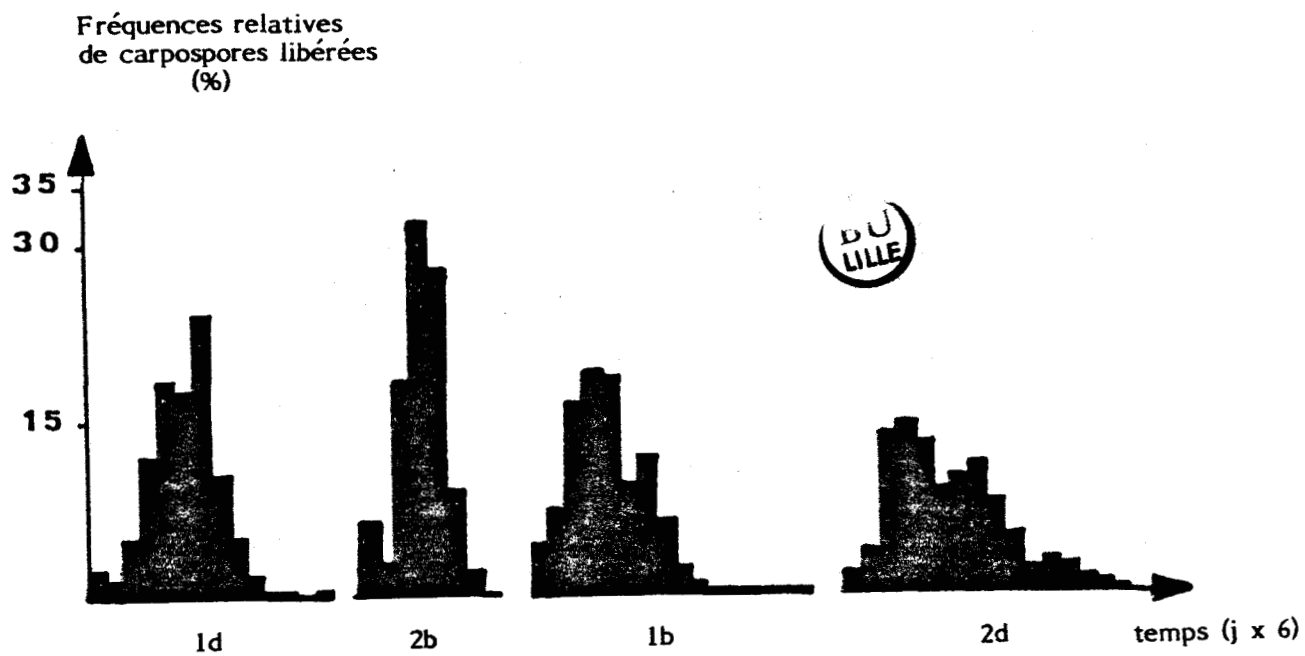


Figure 13 - Histogrammes des fréquences relatives de carspores libérées par l'ensemble des carposporophytes de portions de frondes au cours du temps.

	Témoïn entier	AB portion	AD portion	1b isolé	1d portion	2b portion	2d isolé
Production de carpospores par cystocarpe	# 5996	# 92	# 1903	# 10 086	# 8344	# 3002	# 10 168
Temps de démarrage (1)	?	-	6 j	-	6 j	6 j	-
Temps de fonctionnement (2)	?	-	60 j	60 j	48 j	30 j	78 j
Temps de dégénérescence (3)	?	18 j	3 j	33 j	27 j	9 j	18 j
% effectif (1)		-	1,55	-	2,50	6,72	-
% effectif (2)		-	96,37	98,42	95,28	91,36	97,76
% effectif (3)		100	2,08	1,58	2,22	1,92	2,24
Nombre de "cohortes"	?	1	3	2	2	1	3

Tableau 4 - Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les carposporophytes d'un même thalle. Les carposporophytes sont portés soit par une fronde entière (témoïn), soit par des portions de frondes (AB, AD, 1d, 2b), ou bien ils sont isolés (1b, 2d).

Au cours des phases de fonctionnement actif, des "cohortes" apparaissent avec des périodes successives s'étalant sur 24 à 30 jours. La mise en évidence d'un tel rythme nous autorise à penser que la libération des carpospores de **Gracilaria verrucosa** de la Manche répond à des cycles proches des cycles lunaires ; tout porte à croire, cependant, que des rythmes circadiens (DESTOMBE, à paraître) interagissent étroitement à l'intérieur de ces cycles. L'ensemble de ces hypothèses corrobore donc celle de NGAN et PRICE (1983) qui présentaient que l'émission des spores de cette algue était liée au rythme des marées.

Le disque basal donne naissance à des frondes qui n'apparaissent pas toutes en même temps. La maturité sexuelle, la fécondation, la formation et le fonctionnement des cystocarpes s'étagent le long de chacun des axes, de la base vers le sommet (NGAN et PRICE 1983) et en fonction du temps. A partir de ces observations, on peut donner un ordre dans la "généalogie" des différentes frondes étudiées. La fronde "A" possède des carposporophytes dégénérescents à sa base tandis que ceux du haut sont encore productifs ; elle pourrait donc être plus âgée que "2" dont la partie basale fonctionne longtemps (36 jours) et dont la partie distale est très active. La fronde "1" serait la plus récente puisque la base émet des cellules en nombre et sur un temps peu différent du haut qui est, sans doute, en cours de maturation. La fronde témoin, quant à elle, est difficile à situer par rapport aux autres puisque la chronologie du fonctionnement des cystocarpes qu'elle porte, n'a pu être mise en évidence.

d) Conclusion

Des facteurs physiques interviennent dans les phénomènes de libération des carpospores de **G. verrucosa**, mais des facteurs biologiques régissent le comportement des carposporophytes.

Il est difficile de prévoir ou de constater le début de la libération des carpospores (SAWADA 1958) de même que la quantité émise : ces données varient selon la position et l'état de maturité du cystocarpe et donc, dépendent de l'âge de la fronde gamétophytique. Toutefois, la chronologie du fonctionnement des carposporophytes reste identique quelle que soit leur position ; des rythmes dans la libération des spores montrent que ce processus pourrait être lié aux cycles lunaires. Enfin, la fragmentation des axes du thalle-support provoque l'homogénéisation du déroulement de la libération et l'élimination d'une phase de démarrage. Dans la nature, une telle

réponse peut être un avantage dans une situation critique pour l'algue comme l'arrachage de fractions de frondes au cours des tempêtes : les morceaux à carposporophytes, entraînés au loin, sont capables de libérer immédiatement les carpospores matures contenues dans la cavité cystocarpique par un procédé de colonisation, parade à un état écologique défavorable pour le thalle-parent. La dissémination s'accroît ainsi dans le temps et dans l'espace.

B. - La libération forcée des carpospores

La culture axénique de frondes est extrêmement difficile (KLING 1978) ; nous nous sommes donc tournée vers la libération forcée des spores, la perspective envisagée étant la possibilité d'avoir des cultures unialgales de *G. verrucosa* via les carpospores non contaminées et isolées en milieu stérile.

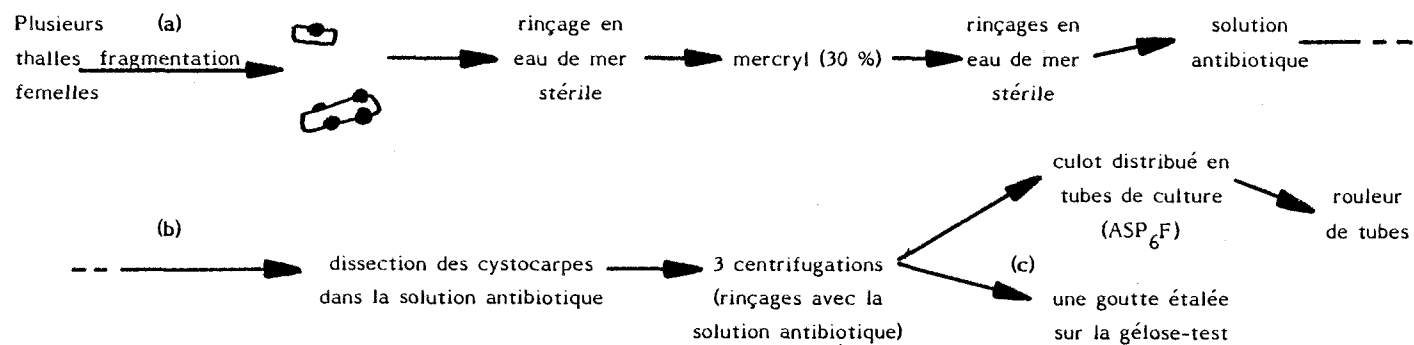
Une décontamination intensive de la surface du thalle mère et, en particulier, des cystocarpes, un nettoyage des spores elles-mêmes, puis une culture en milieu contrôlé et stérile s'avéraient indispensables. Nous nous sommes inspirée des procédés mis au point par KLING (comm. pers., 1983).

I - Modalités expérimentales (fig. 14)

a) Stérilisation de la surface des thalles

Pour ZOBELL et ses collaborateurs (1935), les algues représentent un support pour les bactéries marines. En effet, l'examen microscopique des thalles nous montre l'existence d'un couvert bactérien quasi-permanent. L'emploi des ultrasons permet de décrocher en partie ce tapis de bactéries qui résiste cependant plus facilement au niveau du carpostome. Là, le mucilage, émis en même temps que les spores, forme une sorte de gangue favorable aux proliférations bactériennes. L'élimination des épiphytes nécessite donc un nettoyage intensif. Pour cela, on a utilisé les actions successives d'un mouillant puis d'une solution d'antibiotiques (nystatine 1 %, érythromycine 1 %, rifampicine 0,5 %). Toutes les manipulations s'effectuent sous la hotte à flux laminaire et les verreries et solutions employées sont stérilisées respectivement par autoclavage et par filtration à 0,2 μm sous pression. Après la sonnication initiale, les thalles femelles sont découpés en morceaux de 1 à 2 cm de longueur ; chacun portant un ou plusieurs cystocarpes. Le tout est placé

Conditions de culture : Lumière blanche continue - + 19°C



TEMOINS : a et b, en conditions NON stériles
c, milieu de culture = eau de mer filtrée (0,2 µm)

Figure 14 - Protocole utilisé pour la libération forcée.

Légende : a : stérilisation de la surface des thalles
b : obtention des carpospores
c : mise en culture

d'abord dans de l'eau de mer stérile puis passé rapidement dans une solution de mercryl (30 %) dans de l'eau de mer. Après plusieurs rinçages avec de l'eau de mer stérile, les fragments sont mis dans une boîte de Pétri contenant la solution antibiotique filtrée.

b) Obtention des spores

Les tronçons à cystocarpes, après leur nettoyage externe, sont prélevés et recueillis un à un dans une salière remplie du mélange antibiotique. On appuie doucement, au moyen d'une pince courbe, sur le cystocarpe afin d'en faire sortir les spores par le carpostome ; elles jaillissent alors en longs chapelets pigmentés. Les spores sont aspirées avec une pipette Pasteur et mises en tube à centrifugation.

c) Mise en culture

Quand tous les cystocarpes ont été vidés de leur contenu, le mélange cellules-antibiotique est centrifugé par 3 fois 5 min, à raison de 1500 tours par min. Le surnageant est rejeté à chaque fois et remplacé par du milieu antibiotique frais. Après la dernière centrifugation, le culot est distribué dans des tubes de culture (22 x 160 mm) contenant déjà 2 ml d'un milieu synthétique ASP6F (KLING 1978) permettant de réaliser des cultures dans des conditions de milieu standards. La répartition des spores s'effectue de façon à avoir une densité d'ensemencement proche de celle utilisée par BINGHAM et SCHIFF (1973) pour la culture de *Prasiola stipitata*, en mettant environ 10^{-5} spores par ml de milieu final de culture. Cette concentration ainsi que l'état des cellules sont vérifiés en prélevant 0,1 ml du mélange et en le plaçant sur une cellule de comptage de type Mariotte. On s'assure de la stérilité du milieu final en étalant une goutte sur une gélose-test préconisée par KLING (comm. pers., 1983). L'ensemble des tubes, après avoir été bouchés stérilement, est placé en culture sur un rouleur de tubes à rotation lente ($10 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$) et formant un angle de 30° avec la verticale. La lumière est blanche, fluorescente (Gro-lux, Sylvania), continue et d'intensité inférieure à $4 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, la température est proche de $+ 19^\circ\text{C}$.

Aux troisième et sixième jours, on prélève 0,1 ml du milieu de chaque tube pour une étude microscopique. Au delà de cette date, on utilise une loupe binoculaire pour observer les jeunes Gracilaires à travers la paroi du tube. L'évolution du développement des spores est suivie pendant deux semaines.

Les résultats de cette manipulation sont comparés à ceux donnés par un témoin : le thalle parent, après sonnication est découpé comme précédemment ; les spores immédiatement extraites dans des conditions non stériles sont ensuite mises en tubes de culture contenant 2 ml d'eau de mer filtrée (0,2 µm). La densité d'ensemencement est la même que dans le procédé stérile.

2 - Résultats

Le **tableau 5** donne les résultats comparés du devenir des spores obtenues par libération forcée en conditions stériles et non stériles. La "gélose-test" permet de vérifier la stérilité du milieu dans le temps, par comparaison avec les "tubes témoins" dont l'ensemencement a été réalisé non stérilement. Dès le temps initial de mise en culture (to), la quantité de spores vivantes dans le milieu des "tubes - test" est très inférieure à celle des "tubes témoins". On a donc recherché, dans le protocole de libération en milieu stérile, les causes de mortalité des carpospores.

a) Recherche des causes éventuelles de mortalité des spores

α) Choc thermique

La libération forcée des spores, en conditions stériles, nécessite l'exploitation d'un très grand nombre de cystocarpes (plusieurs centaines). Ceci implique un temps d'extraction long. Elle s'effectue dans une salle exigüe où l'air est stérilisé par une hotte à flux laminaire dont le moteur peut amener la température de + 20°C à + 35°C en trois heures. On sait, depuis TSEKOS **et al.** (1974) que l'optimum thermique de viabilité des carpospores de **Gracilaria verrucosa** est de 21,1°C. A des températures proches de 30°C leur état physiologique peut donc être déficient. Pour estimer le rôle de l'élévation de température sur la viabilité des spores, on a procédé à des extractions dans une salle à 30°C selon un protocole excluant la stérilité. On compte alors 30 % de spores pigmentées mais le plus souvent vacuolisées. Après quelques jours, le nombre total de survivants est faible (environ 5 %) et seules les

Tubes de culture	"Tubes-test"	"Tubes témoins"	Gélose-test
to	<ul style="list-style-type: none"> - Csp mortes, très nombreuses, dpm, déformées pour la plupart. - Csp ⁺ pm, très peu nombreuses (1 à 12 pour 0,5 ml de milieu de culture, souvent très vacuolisées. - Grosses cellules non pm, probablement issues du gonimoblaste, généralement entourées d'un magma mucilagineux. - Massifs pluricellulaires, pm, souvent isolés mais parfois insérés dans l'ensemble gonimoblastique rejeté. Ce sont déjà des "morula". 	<ul style="list-style-type: none"> - # 10 % Csp mortes. - # 90 % Csp pm, non vacuolisées. - Grosses cellules non pm, probablement issues du gonimoblaste. - "morula" [±] isolées. 	0 contamination
6 jours	<ul style="list-style-type: none"> - Csp pm en nombre décroissant. - Divisions des Csp pm fixées à la paroi du tube. - Massifs de "morula" subsistent, fixés ou non à la paroi du tube. 	<ul style="list-style-type: none"> - 40 % Csp encore vivantes. La plupart est fixée à la paroi du tube et a commencé de se diviser ; le reste flotte dans le milieu, porté par un tapis mucilagineux. - Développement des proliférations bactériennes. 	0 contamination
10 jours	<ul style="list-style-type: none"> - Seuls subsistent les tétrasporophytes issus des Cps fixées, dès le début, à la paroi du tube (# 0,01 % de l'ensemencement). - Massifs de "morula" se sont tous fixés à la paroi et continuent leur développement. 	<ul style="list-style-type: none"> - Presque tous les individus vivants se sont fixés à la paroi du tube et se sont divisés. - Le milieu se trouble et prend une teinte verdâtre (probablement due à des proliférations de Cyanobactéries). 	0 contamination
20 jours	<ul style="list-style-type: none"> - 100 % individus sont dpm de façon irréversible ; ils sont morts. 	<ul style="list-style-type: none"> - Développement des individus, tous fixés et divisés. - Milieu très trouble, verdâtre. 	Début de développement bactérien
30 jours		<ul style="list-style-type: none"> - Début de dépigmentation. - Milieu verdâtre. 	Pollution bactérienne
45 jours		<ul style="list-style-type: none"> - Dépigmentation totale. - Milieu complètement pollué. 	Pollution bactérienne

Tableau 5 - Suivi du devenir des carpospores obtenues par des méthodes de libération forcée, en milieu stérile (tubes-test) et milieu non stérile (tubes témoins). La gélose-test sert de repère pour la stérilité du milieu test.

Légende : Csp : carospore.
pm : pigmentées.
dpm : dépigmentées.

carpospores qui ont pu se fixer se sont divisées. L'effet des hautes températures, pendant un temps prolongé, paraît donc néfaste à la survie des carpospores et peut être une des explications à la forte mortalité initiale des cellules.

β) Méthodes de stérilisation

Lors de la stérilisation de la surface du thalle, deux types de produits sont utilisés : le mercryl et les antibiotiques, respectivement sur les thalles et les carpospores. Nous avons essayé de connaître l'impact de chacune de ces solutions sur l'état du milieu de culture et de la viabilité des spores.

- Le mercryl :

En ce qui concerne le mercryl, des essais effectués avec un temps de contact réduit à 1 ou 2 min ont donné des résultats comparables à ceux des manipulations précédentes : les spores mises en culture sont, pour la plupart, dépigmentées. Un réel effet rémanent du mercryl sur la survie des spores semble donc s'exercer, peut-être par une filtration rapide de ses principes actifs à travers la paroi du cystocarpe. En revanche, malgré la réduction du temps de contact, son action apparaît très efficace sur l'inhibition du développement d'éventuels champignons : à aucun moment le milieu synthétique ou la gélose-test n'a montré de développement de filaments d'origine fongique.

- Les solutions antibiotiques :

La concentration employée est faible (0,5 % à 1 %, selon le produit) ; malgré cela, l'action sur les proliférations bactériennes est efficace puisqu'elle se poursuit sur une période supérieure à 20 jours comme l'indique l'état de la gélose-test. Un témoin réalisé sans apport antibiotique donne le même taux de mortalité des spores ; il n'y a donc pas d'effet négatif de ces substances sur la viabilité des spores.

L'extraction des spores n'élimine donc pas toute possibilité de survie. En conditions non stériles, un développement rapide de populations bactériennes ne paraît pas abaisser le taux de viabilité des spores ou gêner leurs divisions.

γ) Immaturité des carpospores et absence de contact

En libération forcée, plusieurs types cellulaires peuvent se retrouver dans le milieu de culture : cellules gonimoblastiques, carposporocystes, carpospores immatures et matures, "morula".

Les cellules gonimoblastiques et tout le cortège de carposporocystes, parfois encore liés les uns aux autres, ne se développent pas normalement, contrairement aux observations de SAWADA (1958).

Les carpospores typiques, rondes, bien pigmentées se fixent généralement très vite à la paroi du tube, se divisent et le contact est nécessaire au déclenchement des mitoses.

Les "morula" sont groupées et collées par une sorte de mucilage ou émises avec une portion de gonimoblaste expulsé dans le milieu. KLING (comm. pers., 1983) assimile ces futurs tétrasporophytes à des "traînants" issus de carpospores matures non libérées et dont les premières divisions auraient eu lieu à l'intérieur même de la cavité cystocarpique. De tels individus, déjà à l'état de massif cellulaire, montreraient une résistance accrue lors des différents traitements.

L'une des causes de la mortalité des spores extraites et mises en culture pourrait donc être le défaut de maturité de la plupart des cellules. En effet, il est vraisemblable que ces spores qui ont dû poursuivre leur maturation hors du cystocarpe, ne sont pas dotées des mêmes capacités de développement que celles restées jusqu'à leur totale maturité au contact des structures nourricières. Enfin, la fixation des carpospores apparaît comme une condition **sine qua non** pour leur survie et leur développement ultérieur.

b) Facteurs de mortalité des "morula"

La dépigmentation de toutes les "morula" après 20 à 45 jours de culture, selon le cas, peut avoir plusieurs causes : la première serait d'ordre nutritif, la seconde serait due à la lumière.

α) Appauvrissement du milieu

Le milieu de culture n'ayant pas été renouvelé au cours de l'expérience, on peut craindre un appauvrissement du milieu synthétique stérile ; par contre, en milieu eau de mer filtrée, on sait qu'un certain équilibre nutritionnel s'installe grâce à la présence d'organismes formant une microchaîne alimentaire dont le fonctionnement pourrait restituer les éléments nutritifs indispensables aux algues.

β) Effet de la lumière

Un autre facteur de létalité peut être l'utilisation de lumière continue. En effet, JONES (1959b) affirme que la lumière peut être un élément limitant la distribution d'une population d'algues car de fortes intensités (150 W.m^{-2}) sont rapidement dommageables pour les spores. Dans notre cas, l'énergie dispensée est faible, mais le rythme circadien préconisé par KIM (1970) n'est pas respecté. On peut donc penser que l'absence de photopériode est néfaste au développement des cellules par perturbation de la photosynthèse.

c) Conclusion

En conclusion, les manipulations en milieu stérile donnent des informations appréciables pour des cultures unialgales axéniques, dans le contexte d'une étude ponctuelle du développement des spores (pour la microscopie, par exemple). Dans sa forme actuelle, le protocole paraît toutefois difficilement applicable aux exigences de cultures industrielles d'algues. En effet, ces procédés font appel à des techniques longues et compliquées souvent drastiques, où la viabilité des spores obtenues est aléatoire tandis que les témoins montrent un taux de survie plus important. Ces techniques exigent une grande quantité de matériel femelle fécondé car le contenu de très nombreux cystocarpes est nécessaire pour atteindre la densité d'ensemencement adéquat. En outre, après de tels traitements, le gonimoblaste est partiellement voire totalement expulsé, et en aucun cas nous n'avons pu observer un nouveau fonctionnement.

Dans les expériences ultérieures, nous avons donc utilisé des spores obtenues par libération naturelle.

II. - ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA CARPOSPORE IN VITRO

La spore assure la dispersion du patrimoine génétique de l'algue. On détermine son existence entre le moment où elle est libérée par le cyste et celui où elle se fixe et se divise pour la première fois, après avoir sédimenté et s'être posée sur le substrat.

Chez **Gracilaria verrucosa**, la durée de vie de la carpospore est fugace et s'étend de quelques heures à quelques jours. Nous nous sommes intéressée aux modalités du comportement de cette cellule, entre sa libération dans le milieu et sa fixation au substratum. Au cours de cette étape, elle peut en effet se trouver dans une des trois situations suivantes : elle peut soit disparaître, soit rester en suspension dans le milieu, soit sédimenter immédiatement et se fixer. Les raisons de ces éventualités sont difficiles à analyser mais la plupart de celles qu'on peut évoquer semblent liées aux caractéristiques de la cellule : viabilité potentielle, taille et quantité de mucilage qui l'entoure ; ces deux derniers facteurs étant en relation étroite avec le taux et la vitesse de sédimentation (SAWADA *et al.* 1972, CHARTERS *et al.* 1972, 1973, COON *et al.* 1972).

A. - Viabilité

On a peu de renseignements, dans la littérature, à propos de la viabilité de la carpospore de **Gracilaria**. En fait, si l'on étudie la mortalité -et non la viabilité-, celle-ci apparaît comme un événement délicat à cerner, fonction des qualités génétiques de la cellule et de facteurs externes. La mort d'une carpospore peut se produire avant ou pendant la sédimentation et même après la fixation.

Dans les conditions naturelles, il existe des spores rondes, bien pigmentées, et d'autres de forme variable, plus ou moins vacuolisées. Les premières, qui répondent aux critères de cellule viable, restent sensibles aux attaques extérieures ; dans les conditions de culture habituelle, certaines se désintègreront en quelques heures, leur place antérieure étant matérialisée par un halo d'origine bactérienne. Les secondes, non viables, disparaissent plus rapidement et présentent le même halo.

B. - Taille

La taille de la carpospore de *Gracilaria verrucosa* paraît varier selon la situation géographique de la population d'origine. Au Cap Gris-Nez, son diamètre atteint environ 25 μm , ce qui est comparable aux résultats obtenus en Australie par NGAN et PRICE (1979) mais supérieur à ceux donnés par BIRD et al. (1977) au Canada (20 μm).

C. - Sédimentation

La sédimentation représente le phénomène le plus important de la vie de la carpospore, après sa libération et avant sa fixation. De nombreux auteurs se sont penchés sur le problème posé par la sédimentation des spores de Rhodophycées et ont établi des formules exprimant les vitesses de sédimentation de certaines spores (SAWADA et al. 1972, CHARTERS et al. 1972, 1973, COON et al. 1972). Ces formules ne concernent que la vitesse de sédimentation à un moment donné ; pour notre part, nous avons suivi ce processus au cours du temps.

Chez *Gracilaria verrucosa*, les carpospores n'ont que des mouvements passifs (OLIVEIRA 1968). On pourrait donc les apparenter aux aplanospores (SUTO 1950) dont la sédimentation est liée à la taille de la cellule et à la quantité de mucilage qui l'entoure (BONEY 1978, 1981, NGAN et PRICE 1979). Elle est aussi fonction de facteurs externes tel que le courant ou le mouvement des vagues. Ces derniers éléments ne sont pas encore complètement évalués sur les côtes de la Manche et leur variabilité est si grande que nous nous sommes intéressée à la sédimentation des carpospores dans une eau au repos.

- Modalités expérimentales

Les carpospores observées sont issues des cystocarpes -isolés ou portés par des portions entières de frondes- dont le mode de fonctionnement a été étudié précédemment (Ch. III, I). Les comptages des spores flottantes ou tout juste posées (non encore fixées) sont réalisés au microscope inversé grâce à une grille de comptage.

Les recensements s'effectuent aux temps :

- t_0 : qui correspond au moment où les cystocarpes viennent d'être enlevés de la boîte de Pétri,
- 1, 2, 4, 8 jours : jusqu'à ce que l'on n'observe plus de spore flottante.

- Résultats

Chez *G. verrucosa*, certaines carpospores peuvent sédimenter en moins de 10 minutes après avoir été libérées dans une eau au repos (CHEN et REN 1983) ; en fait, nous avons pu en observer qui étaient capables de flotter quelques heures et jusqu'à plus de 10 jours avant de se fixer.

Le **tableau 6** récapitule les taux de sédimentation, au cours du temps, des spores issues des échantillons Témoin, 1 d, 2 b, 2 d et 1 b étudiés précédemment. Ils sont calculés à partir du nombre de spores fixées au moment de l'observation ($t_n = 4$ jours, par exemple) rapporté au nombre des cellules déjà sédimentées lors du comptage précédent ($t_{n-1} = 2$ jours, pour le même exemple) ; au temps t_0 , on évalue la quantité de carpospores fixées par rapport à l'ensemencement. A l'intérieur de chaque échantillon, les séries sont comparées entre elles pour chaque période de comptage (t_0 , 1 jour, 2 jours, ...) : si la différence n'est pas significative, au seuil de 5 %, on peut donner une moyenne ; si au contraire elle est différente, on ne peut calculer de moyenne et l'on doit poser le sigle "≠".

Lots d'observation	Dates d'observation				
	t_0	1 j	2 j	4 j	8 j
Témoin (entier)	38,4	≠	≠	≠	≠
1 d (entier)	36,2	≠	≠	≠	-
2 b (entier)	39,1	≠	≠	≠	≠
2 d (morceaux)	35,3	41,5	37,3	≠	≠
1 b (morceaux)	35,9	45,1	45,1	≠	≠

Tableau 6 - Taux de sédimentation (%), au cours du temps, des carpospores obtenues à partir de frondes gardées entières ou morcelées.

Au temps t_0 , et quelle que soit leur origine (échantillon et époque de libération) la sédimentation des spores s'effectue de façon statistiquement comparable : # 37 %. Au cours des deux premiers jours de culture, les carpospores issues des portions morcelées 1 b et 2 d se comportent de façon homogène et sédimentent à raison de 37 à 45 % des spores restantes, tandis que celles obtenues à partir des parties entières et de la fronde témoin sédimentent irrégulièrement. Après 4 jours, les taux de sédimentation diffèrent dans tous les cas. Au bout de 8 jours, près de 100 % des cellules sont fixées sauf quelques unes qui ont été émises en début et fin de fonctionnement (Ch. III, I).

Ces faits amènent plusieurs remarques :

- quel que soit l'âge du cystocarpe, le pourcentage de carpospores capables de sédimenter rapidement après l'émission (0 à 24 heures) est quasi-constant (# 37 %) ;
- la fragmentation des frondes a provoqué la synchronisation du processus de libération chez tous les carposporophytes isolés. Elle montre un effet "secondaire" puisque près des 4/5 des spores libérées sédimentent massivement en moins de quarante huit heures tandis que les spores issues des portions entières sédimentent irrégulièrement ;
- la présence de spores encore flottantes après plus de 8 jours de culture laisse supposer des variations de densité au cours du temps (BONEY 1981), soit par augmentation de la quantité de mucilage, soit par changement de volume. Au cours de la période de fonctionnement actif, les spores émises sont plus grosses, plus denses et plus viables (SEGAWA *et al.* 1955a) que celles libérées en début et fin d'activité (petites, souvent flottantes et à viabilité limitée). D'après OKUDA et NEUSHUL (1981), la taille des spores, leur densité et la quantité de mucilage qui les entoure, varient en réponse aux conditions du milieu.

D. - Influence d'un facteur externe : la lumière et sa qualité, sur la sédimentation et la viabilité de la carpospore

Jusqu'à présent, l'effet de la qualité de la lumière dans la vie des algues a été principalement rapporté à l'induction de la fertilité et de la production de spores chez *Closterium* (DUBOIS-TYLSKI *et al.* 1973), *Laminaria* (LUNING *et* DRING 1975),

Gracilaria (BIRD et al. 1977), mais on ignorait encore son influence sur la viabilité et la sédimentation des carpospores de **Gracilaria verrucosa**. Nous nous sommes donc intéressée au comportement de la carpospore en réponse à différents éclairagements du spectre visible.

1 - Modalités expérimentales (fig. 15)

Des essais préliminaires ont été réalisés en utilisant des tubes fluorescents à large spectre (Sylvania XL). L'un est dit bleu et émet principalement du bleu (45 %) mais aussi du vert et du violet (respectivement 25,5 et 17 %) ; l'autre est jaune et distribue des gammes d'onde correspondant à l'orange (34 %), le jaune (25 %), le rouge (25,5 %), d'après GODIN (1985). Les carpospores obtenues en lumière blanche fluorescente sont ensuite placées sous l'un ou l'autre des tubes colorés ($3,5 \text{ W.m}^{-2} - 12:12$). Les individus, recensés au moment de leur mise en culture, sont suivis quotidiennement au cours des 10 premiers jours.

Après cette première approche, il était nécessaire de mieux cerner l'aspect qualitatif du problème. Pour cela, nous avons combiné l'emploi de lampes à arc au xénon et chlorure de césium haute pression (Philips - CSX 450W) et de filtres interférentiels (MTO - Intervex A, DA et M). L'éclairage transmis par chacun de ces filtres est centré sur une longueur d'onde ; la bande passante étant inférieure à 20 nm, on considère les éclairagements comme monochromatiques. Nous avons ainsi couvert le spectre visible de 400 à 685 nm. Afin d'homogénéiser les conditions de culture, nous avons travaillé à la même énergie que dans les conditions standards ($3,5 \text{ W.m}^{-2}$). On tiendra compte, néanmoins, que les éclairagements appliqués ne sont pas isoquantiques pour toutes les bandes passantes.

Dans le protocole utilisé, les cystocarpes d'un même thalle femelle émettent librement leurs spores, soit dans les conditions d'éclairage standard, soit à l'obscurité. Au bout de vingt-quatre heures, on récupère les carpospores libérées et on les répartit dans des boîtes de Pétri (\emptyset 55 mm) ; dans chacune d'elles, on compte la quantité de sporesensemencées.

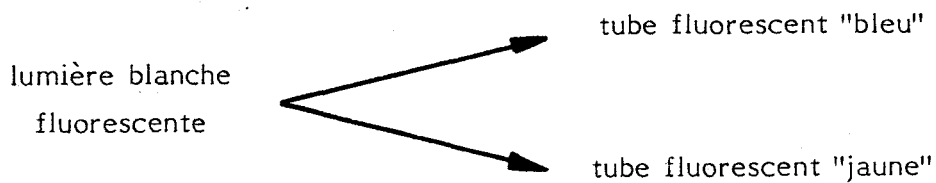
Les boîtes (par séries de 3 répétitions) sont placées sous les bandes passantes utilisées pendant 12 heures, puis à l'obscurité pendant encore 12 heures. Pour chaque condition initiale de libération, à l'obscurité ou en condition standard, on

Intensité lumineuse - Photopériode : $3,5 \text{ W.m}^{-2}$ - $12:12$

α) Essais préliminaires

LIBERATION NATURELLE

MISE EN CULTURE

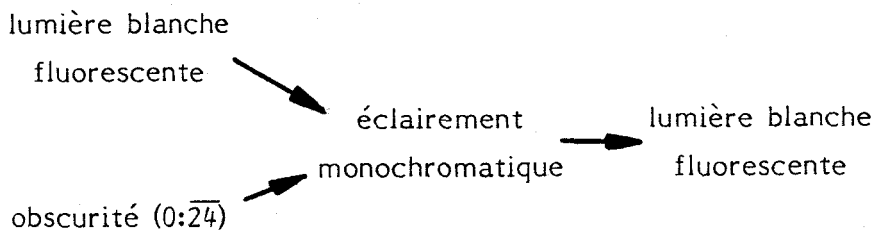


β) Eclairages monochromatiques

LIBERATION NATURELLE

24 h

MISE EN CULTURE



TEMOINS :

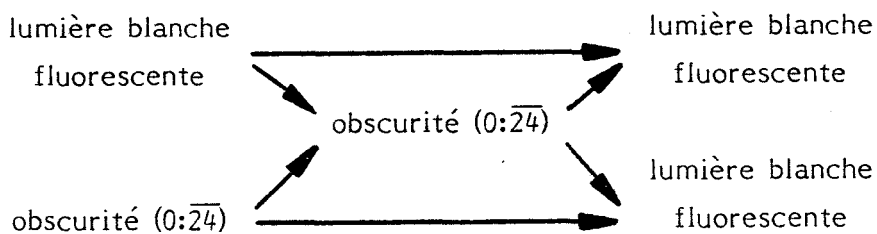


Figure 15 - Protocoles utilisés pour la mise en évidence de l'influence de la qualité de la lumière sur la sédimentation et la viabilité des carospores de *Gracilaria verrucosa*.

garde deux témoins : l'un est conservé à l'obscurité, l'autre à la lumière blanche. Au bout d'un cycle photopériodique, la quantité d'individus vivants et leur sédimentation sont évaluées.

2 - Résultats

a) Résultats préliminaires

La mise en culture de carpospores de *G. verrucosa*, sous des tubes colorés à large bande spectrale, donne des indications à propos de l'influence de la qualité de la lumière sur la sédimentation et la viabilité.

Dans le "bleu", la sédimentation a lieu en 6 à 10 jours ; en revanche, l'évolution du taux de viabilité au cours du temps, est proche de celle observée en lumière blanche.

Dans le "jaune", la sédimentation est plus rapide que précédemment et se produit en 3 à 4 jours, mais le taux de viabilité est deux fois plus faible.

Certaines gammes du spectre ont donc une influence sur la sédimentation et la viabilité des carpospores. Les éclaircissements bleus ne semblent pas favorables à la sédimentation au contraire des "jaunes" qui en accélèrent la vitesse. Les premiers semblent propices à la viabilité et ont un effet comparable à celui de la lumière blanche, tandis que les seconds paraissent inefficaces.

Ces premiers résultats ont été confirmés avec des bandes spectrales plus étroites.

b) Eclairements monochromatiques

α) Action des éclairements monochromatiques sur des carpospores émises à la lumière

Des carpospores libérées en lumière blanche fluorescente puis mises en culture sous un éclairage monochromatique (12:12) montrent au bout d'un cycle photopériodique, des taux de sédimentation et de viabilité différents selon la gamme d'onde reçue.

Le **tableau 7** indique les modifications de la vitesse de sédimentation et du taux de viabilité, en fonction des couleurs reconstituées, par rapport à la lumière blanche fractionnée et pour une énergie égale. En fait, il s'agit ici de valeurs minimales obtenues par défaut, puisque les gammes couvertes grâce à l'addition des bandes passantes, ne constituent que des portions des couleurs respectives.

Couleur	Longueur d'onde (nm)	Sédimentation	Viabilité
Violet	380 - 430	X 4	X 2
Bleu	430 - 490	X 11	X 6
Vert	490 - 560	X 90,5	X 2
Jaune	560 - 590	X 0,25	N.S.
Orange	590 - 630	X 18,5	N.S.
Rouge	630 - 800	X 88	X 1,5

Tableau 7 - Modifications de la vitesse de sédimentation et de la viabilité, en fonction des couleurs reconstituées par rapport à la lumière blanche fractionnée et à énergie égale, après un cycle photopériodique 12:12.

N.S. : différence non significative, au seuil de 5 %.

Le passage de la lumière à l'obscurité n'implique pas de modification dans la façon de sédimenter pour les spores mises dans ces conditions par rapport à celles restées en lumière blanche. En revanche, le transfert de la lumière blanche aux bandes de couleur verte et rouge accélère considérablement la sédimentation ; le phénomène est moins stimulé avec l'orange, le bleu, le violet. Avec le jaune, la sédimentation est particulièrement ralentie.

Pour la viabilité, l'influence du bleu domine par rapport au violet, au vert, au rouge et encore plus par rapport au jaune et à l'orange.

La sédimentation et la viabilité des carpospores varient donc en fonction de la nature de la couleur reconstituée ; de plus, à l'intérieur de chacune de ces gammes, on trouve des bandes d'onde auxquelles les cellules sont plus ou moins sensibles (fig. 16).

Les pourcentages de spores sédimentées sont statistiquement comparables entre les séries (tab. 8) et donnent une moyenne de 73,4 %, sauf entre environ 575 et 604 nm où le taux diminue jusqu'à 0 %.

Longueur d'onde (nm)	Ecart à la valeur centrée (nm) ($\Delta\lambda$)	Taux de sédimentation (%)
403	2	91
418	6	84,1
442	14	57,5
460	9	100
482	2	65
503	4	52,8
525	3	67,6
545	3	83,9
572	10	100
580	9	4,8
595	10	9,1
612	8	0
631	9	66,5
661	10	78,3
681	11	78,3

Tableau 8 - Taux de sédimentation de carpospores survivantes après un cycle photopériodique (12:12) de lumière monochromatique. Carpospores libérées à la LUMIERE blanche.

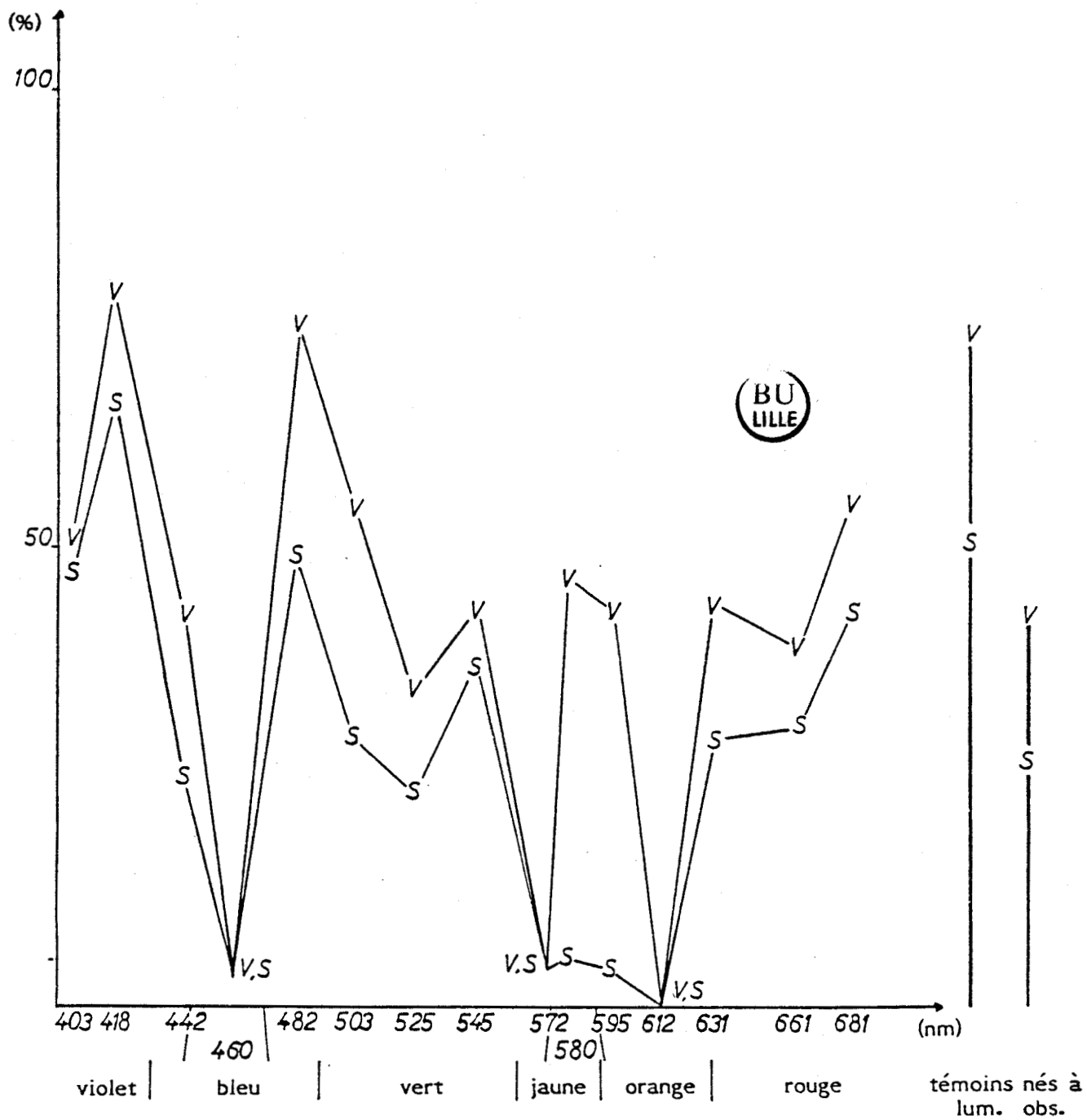


Figure 16 - Taux de viabilité (V) et de sédimentation (S) des carpospores en fonction de la longueur d'onde des radiations.

En ce qui concerne la viabilité, il en est tout autrement. La courbe prend une forme brisée avec des pics (à 418 et 482 nm) comparables à la valeur obtenue chez le témoin lumière blanche, et des creux rejoignant parfois l'axe des abscisses (612 nm), ce qui correspond à une mortalité totale. Pour toutes les bandes passantes, les réponses sont homogènes, sauf au niveau de la bande centrée sur 545 nm.

β) **Action des éclairagements monochromatiques sur des carpospores émises à l'obscurité**

Le **tableau 9** indique les taux moyens d'individus vivants et fixés issus de carpospores libérées à l'obscurité puis ayant subi des éclairagements monochromatiques centrés sur les longueurs d'onde : 418, 482, 681 nm. Parallèlement, on donne les résultats obtenus pour les mêmes bandes passantes avec des carpospores émises à la lumière blanche.

(%)	Témoin lumière blanche	Témoin obscurité	418 nm	482 nm	681 nm
O : S/E	15,6	0,5	0,6	2,6	4,4
O : V/E	56,4	48	28,4	47,3	39,2
L : S/E	28,3	26,9	65,9	48,7	43,1
L : V/E	73,2	42,7	78,3	74,9	54,9

Tableau 9 - Taux moyens d'individus vivants et de carpospores sédimentées, issus de cellules libérées à l'obscurité (O) ou à la lumière (L) et ayant subi différents éclairagements monochromatiques.

S/E : taux moyens d'individus sédimentés par rapport à l'ensemencement
 V/E : " " " vivants " " "

Dans le cas des spores nées à l'obscurité, on observe une augmentation significative de la vitesse de sédimentation en fonction de la valeur de la longueur d'onde. Le passage à la lumière blanche accélère fortement la vitesse de sédimentation par rapport à la radiation la plus favorable (681 nm). Restées à l'obscurité, les spores sédimentent de façon comparable à celles placées sous la bande violette (418 nm).

On ne distingue pas de différence statistique entre les taux de viabilité obtenus dans les différentes gammes d'onde utilisées et chez les témoins.

γ) Comparaison de l'action des éclairagements monochromatiques sur des carpospores émises à la lumière ou à l'obscurité

- Sédimentation

Les spores libérées à la lumière blanche et laissées dans les mêmes conditions sédimentent beaucoup plus vite que celles obtenues à l'obscurité et qui y demeurent.

Les cellules émises en milieu éclairé puis passées à l'obscurité, se posent sur le substrat plus rapidement que celles qui ont subi le processus inverse.

Une période d'éclairage blanc, au moment de la libération, suivie par un passage de 12 heures sous des éclairagements monochromatiques (418, 482 ou 681 nm) provoque une sédimentation des spores beaucoup plus rapide que dans le cas d'une libération à l'obscurité et l'écart entre les résultats s'accroît quand la valeur de la longueur d'onde tend vers le bleu-violet.

- Viabilité

Les carpospores gardées à la lumière blanche dès leur libération ont, au bout de vingt quatre heures, un taux de viabilité supérieur à celui obtenu en obscurité constante.

Emises à la lumière puis transférées en milieu obscur, les carpospores ont un taux de survie comparable à celui atteint avec le protocole inverse (45 %).

Des carpospores libérées en lumière blanche, à qui l'on impose des éclairagements monochromatiques (418, 482, 681 nm) ont des taux de viabilité supérieurs à ceux des cellules obtenues à l'obscurité. L'écart entre les valeurs respectives n'est pas significatif dans le rouge, par contre il le devient dans le bleu-violet.

L'ensemble des résultats relatifs à la lumière sera discuté dans un chapitre ultérieur (Ch. IV, III).

CHAPITRE IV

RESULTATS ORIGINAUX SUR LE DEVELOPPEMENT

DES JEUNES TETRASPOROPHYTES IN VITRO

Les premières étapes du développement du thalle de certaines algues rouges sont connues depuis longtemps (CHEMIN 1937), mais on a peu de données quantitatives sur la viabilité et le devenir du jeune tétrasporophyte de **Gracilaria verrucosa**. Nous avons donc suivi, pendant plusieurs semaines, l'évolution d'une population du stade carpospore au stade jeune tétrasporophyte.

- Protocole expérimental commun (fig. 17)

Les premières manipulations sont identiques à celles employées lors de l'étude de la sédimentation des spores (Ch. III, II) ; cette fois, ce sont à la fois les carpospores flottantes et les individus fixés et divisés qui font l'objet de nos comptages aux temps : t_0 , puis 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64ème jours. A cette occasion, toutes les anomalies éventuelles touchant au développement des thalles sont aussi notées. Les conditions de culture sont standards. Après 8 à 10 jours de culture, le milieu est renouvelé et l'est ensuite chaque semaine.

I. - CONDITIONS DE VIABILITE DES INDIVIDUS

A. - Modalités expérimentales

Le taux de viabilité est calculé à partir des séries d'échantillons issus des cystocarpes -isolés ou portés par une portion de fronde- dont le mode de fonctionnement a été étudié précédemment (Ch. II, II).

B. - Résultats

A chaque comptage (1 jour, 2 jours, ...) et dans chaque échantillon, on compare entre eux les pourcentages réalisés en rapportant le nombre d'individus vivants au temps t_n à leur nombre au temps t_{n-1} . On établit ensuite une comparaison entre toutes les séries. Si les différences ne sont pas significatives à un même temps de comptage pour tous les échantillons, au seuil de 5 %, on donne une moyenne ; si au contraire elles le sont, on ne peut calculer de moyenne et l'on doit poser le sigle "≠". Le **tableau 10** récapitule ces données. Les moyennes obtenues ne sont pas significativement différentes entre elles, on peut donc considérer que la viabilité des jeunes tétrasporophytes est soumise, au cours du premier mois suivant leur

ECHANTILLON = B₁, par exemple

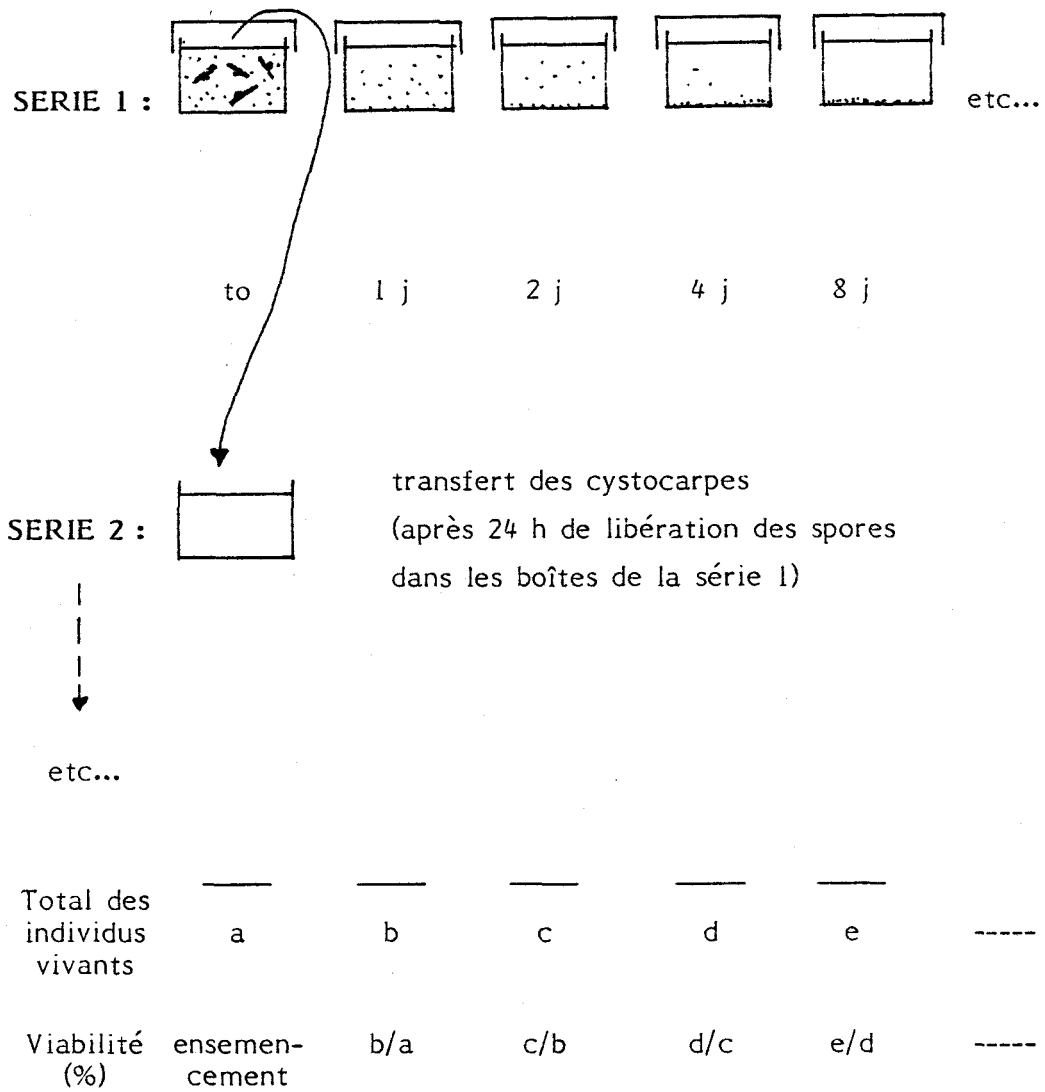


Figure 17 - Protocole utilisé pour le suivi du devenir des tétrasporophytes issus des carpospores.

"naissance", à une régression géométrique de raison 0,62 et dont le report en courbe (fig. 18) présente une allure exponentielle décroissante. Au cours du second mois, la régression devient irrégulière.

Comptage	1 jour	2e j.	4e j.	8e j.	16e j.	32e j.	64e j.
Taux de viabilité (%)	49,4	65,2	58,5	63,9	67,9	67	≠

Tableau 10 - Taux moyen de viabilité des individus issus de cystocarpes isolés ou portés par des frondes entières.
(x % = 100 X Nb indiv. vivants à tn/Nb indiv. vivants à tn-1).

La comparaison des droites de régression représentant la sédimentation (Ch. III, II) et la viabilité (fig. 18), calculées sur la période 0 à 2 jours, montre que le taux de viabilité diminue environ 2 fois plus vite que le taux de sédimentation. Cette période passée, la plupart des carpospores vivantes sont fixées et la mortalité ralentit corrélativement.

C. - Discussion

Viabilité et fixation sont donc très liées chez la carpospore de *G. verrucosa* pendant les quatre premiers jours ; on retrouve le même processus chez *Chondrus crispus* (CHEN et McLACHLAN 1972), chez qui plus de 75 % de l'ensemencement disparaît pendant cette période. La capacité de fixation des aplanospores d'algues est la plus forte juste après la sporulation et se perd en quelques heures (SUTO 1950). Chez *G. verrucosa* (CHEN et REN 1983) et chez *G. foliifera* (McLACHLAN et EDELSTEIN 1977), le potentiel de fixation, et donc de division, peut se conserver de 24 heures à plusieurs jours. Nos observations vont dans le sens de ces affirmations.

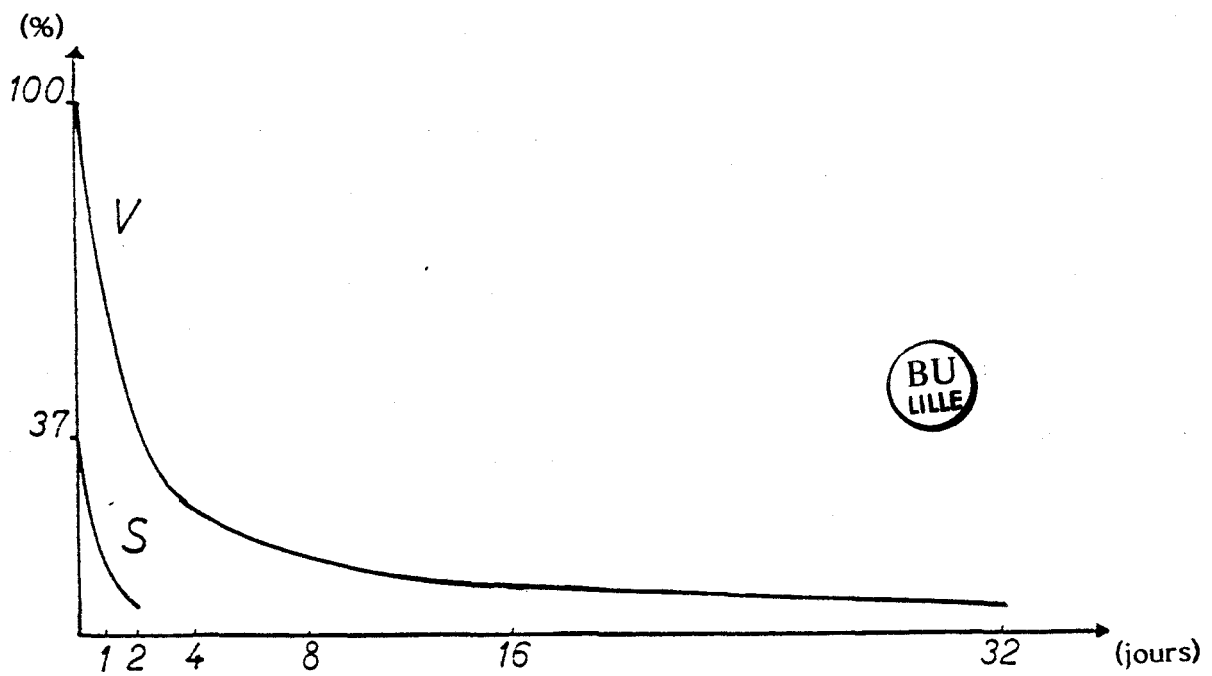


Figure 18 - Courbes de décroissance de la viabilité et de la sédimentation des individus, au cours du temps.

II. - CONDITIONS DU DEVELOPPEMENT - RESULTATS ET DISCUSSION

Le développement du jeune tétrasporophyte s'effectue généralement à partir d'une seule carpospore en culture *in vitro* ; des particularités peuvent, pourtant, se présenter ; nous en avons étudié certaines d'entre elles.

A. - Développement typique (Pl. 2, 3, 4, 5)

Le temps de latence entre libération et première division peut varier de 15 minutes à 24 heures (CHEN et REN 1983). Cette première division, verticale, sépare la carpospore en deux parties. Elle est suivie par deux cloisonnements rapides, perpendiculaires ou légèrement obliques par rapport au premier plan de division. On observe aussi un déroulement différent : le premier clivage divise la carpospore en deux parties inégales à l'intérieur desquelles d'autres cloisonnements vont intervenir selon un processus le plus souvent asynchrone. Ce comportement incite donc KLING (comm. pers. 1984) à penser que la carpospore de **Gracilaria verrucosa**, comme celle de **Champia parvula** (BOILLOT 1961), est dotée d'une polarité dès les tout premiers stades de son développement.

Les divisions se succèdent ensuite "sans ordre défini" (CHEMIN 1937) et sans augmentation de taille de l'individu. Il apparaît ainsi une forme hémisphérique, légèrement élargie à la base, que CHEMIN (1937) compare à une "morula" animale et qui correspond, selon lui, au type **Dumontia** ou type hémisphérique de OLTMANNNS, in BOILLOT (1961), ou corps sphérique de CHEN et REN (1983). Au cours de cette étape WEST et CRUMP (1974), DION (1979) chez **Gigartina** sp., et CHEN et REN (1983) chez **Gracilaria verrucosa**, observent la présence d'individus non fixés et non viables, issus de développements tératologiques. Pour notre part, nous n'en avons pas décelé dans nos cultures. Ultérieurement, le développement se ralentit mais le volume de la "morula" s'accroît. Les cellules périphériques prolifèrent régulièrement (OLIVEIRA 1968) et forment, en 2 à 8 jours, un disque clair de 28 à 30 μm sous lequel on ne trouve jamais de rhizoïde. Ce disque, fixé de façon tenace au substrat, est capable de résister plusieurs secondes à l'action des ultrasons. A son sommet s'érigent 3 à 5 cellules dont une, plus grande, en forme de cône inversé et de couleur plus foncée, deviendra l'initiale de la pousse dressée ; le stade thalle est alors atteint.

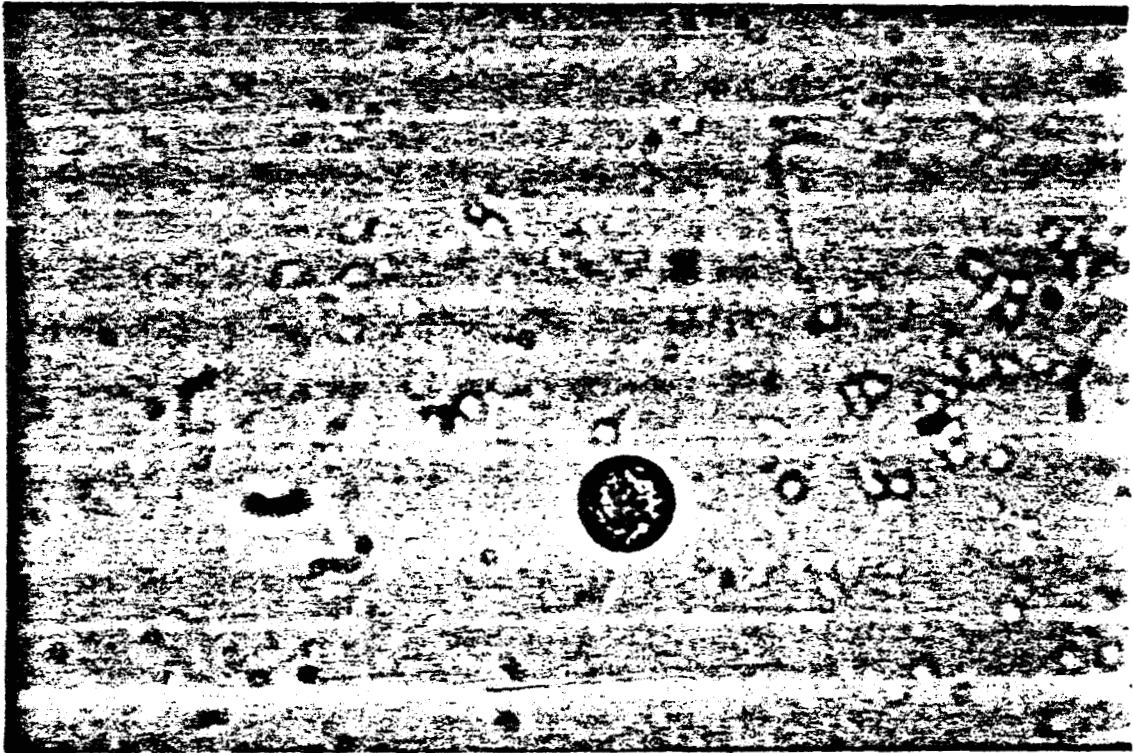


Planche 2 - Carpospore fixée non divisée (grandissement direct : x 400).

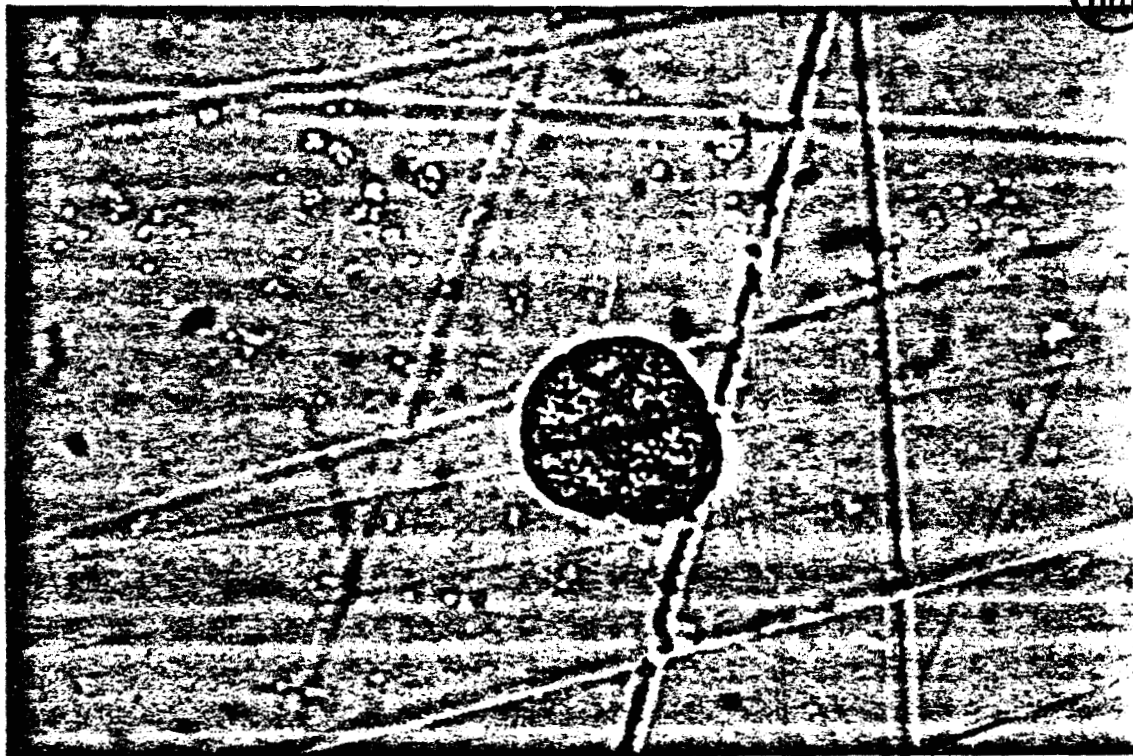


Planche 3 - Tétrasporyte au stade 2 divisions (grandissement direct : x 400).

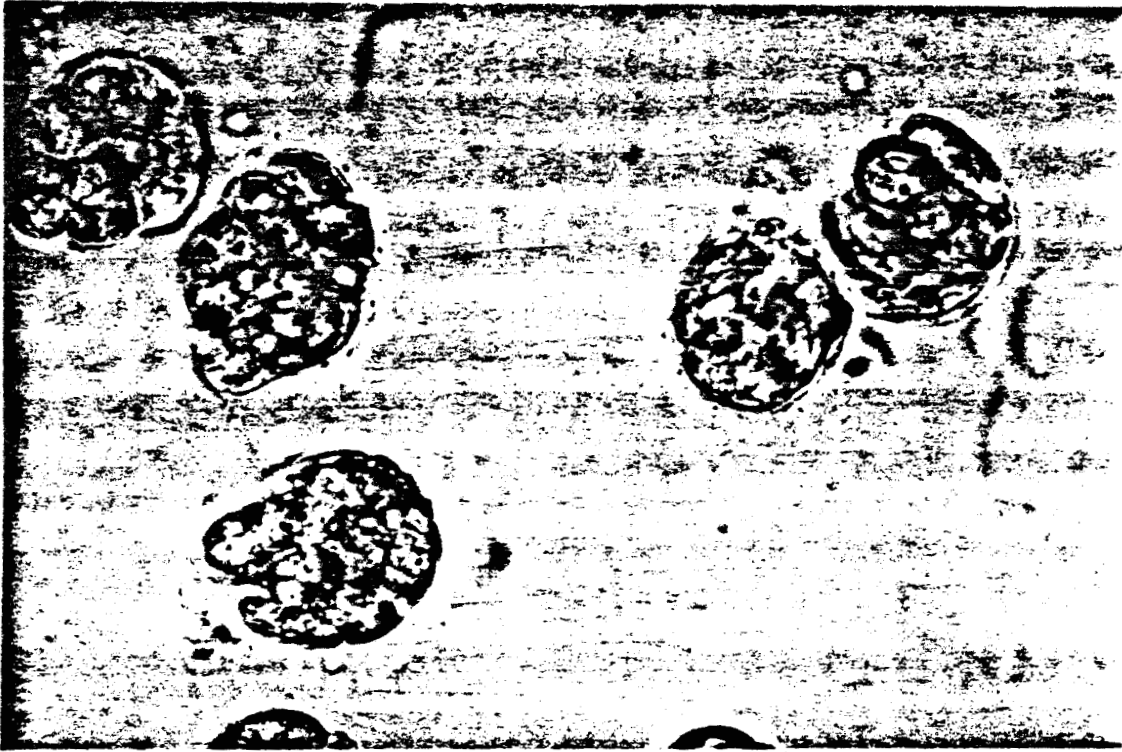


Planche 4 - Tétrasporephyte au stade "morula" (grandissement direct : x 400).



Planche 5 - Tétrasporephyte au stade lère fronde (grandissement direct : x 40).

Au bout de quelques jours de culture apparaissent fréquemment à la surface du massif cellulaire de longs poils hyalins unicellulaires. Ils sont peut-être à rapprocher de ceux observés par CHEMIN (1937). Leur paroi est épaisse et leur contenu presque entièrement vacuolaire à l'exception d'un peu de cytoplasme concentré au sommet. KYLIN (1932) leur attribue un rôle "nourricier" puisqu'ils n'existent qu'en eau de mer non enrichie en KNO_3 . A notre avis, cette conclusion est un peu hâtive, car les poils hyalins sont couramment observés en milieu fortement nitraté.

Le processus de développement du jeune thalle se poursuit. Le disque basal parenchymateux avec son dôme central a alors l'allure du type évolutif "**discalis mediatus**" de INOH selon OGATA *et al.* (1972). 16 à 35 jours plus tard, une fronde est visible. Ce premier axe ne se forme pas toujours et certains tétrasporophytes demeurent de plusieurs semaines à plusieurs mois sous la forme de disque basal. Quand la première jeune fronde est brisée, d'autres frondes sont initiées sur le disque ; elles s'érigeront le plus souvent en son centre ou, parfois sur ses marges. Sur les thalles non lésés, l'apparition des nouvelles pousses est généralement différée. Après quelques mois, le tétrasporophyte est mature ; le comportement de ce thalle adulte fera l'objet d'une étude ultérieure.

La dépigmentation des frondes commence après 14 semaines de culture en lumière blanche fluorescente et 16 semaines en lumière naturelle, mais les disques basaux ne sont pas affectés ; ce fait corrobore les observations de McLACHLAN et EDELSTEIN (1977). Deux à trois mois plus tard, tous les individus, quel que soit leur stade de développement, sont dépigmentés. Plusieurs facteurs peuvent intervenir pour provoquer cette dégénérescence, parmi eux, on peut proposer :

- le milieu : malgré son renouvellement hebdomadaire, il semble, d'après OLIVEIRA (1968), qu'un manque d'aération et d'agitation amène un développement lent et une altération précoce des algues. Quelques boîtes contenant des individus âgés de 10 jours sont donc placées dans un aquarium rempli d'eau de mer agitée par air pulsé. En une dizaine de jours apparaissent des frondes dont la taille atteint rapidement le double de celles obtenues sans agitation, mais cet avantage est compensé par une multiplication intense d'autres espèces ;
- la prolifération des épiphytes : lors de la libération des carpospores, des épiphytes sont entraînés dans le même mouvement. Grâce aux nettoyages de routine et à l'addition d'oxyde de germanium, on peut en limiter la prolifération. Certaines espèces sont plus résistantes : **Pilayella** et diverses algues coccoïdes. en

particulier sont capables de cerner rapidement les disques basaux et de gêner considérablement leur développement. D'autres encore, les Cyanobactéries notamment, semblent se comporter en prédatrices des "morula" et des jeunes thalles.

Cette description représente le schéma classique du devenir de la carpospore de *G. verrucosa* en culture *in vitro*, mais des cas de développement "anormal" s'observent fréquemment.

B. - Développement "atypique"

1 - Cellules surnuméraires (fig. 19)

Après la fixation des carpospores, dans 1 à 10 % des cas, on peut observer la présence de cellules surnuméraires, non pigmentées accolées aux spores et disparaissant dans les heures qui suivent en laissant à la place un "halo" bactérien. La carpospore, de son côté, enregistre un retard dans sa première division qui ne peut s'effectuer qu'après la séparation des deux individus ; elle se développe ensuite comme une spore banale. Pour expliquer ce phénomène, on peut émettre l'hypothèse que le gonimoblaste libère des cellules appariées dont l'une n'est pas viable ; il s'agit peut-être de cellules végétatives, mais plus probablement de carposporocystes entraînés par les carpospores mûres.

2 - Accolements d'individus (Pl. 6)

Les accolements d'individus (la "coalescence" des anglo-saxons) est un phénomène couramment observé chez la plupart des algues rouges (TVETER et MATHIESON 1976, RUENESS 1978, DION 1979, RIETEMA et KLEIN 1981). Ce type d'association peut s'effectuer à trois moments de la vie du jeune tétrasporophyte :

- avant la fixation : des carpospores libérées en grand nombre par un même cystocarpe, restent accolées entre elles grâce au mucilage et forment un ensemble qui sédimente rapidement, c'est le "radeau" de JONES (*in* TVETER et MATHIESON 1976) ;

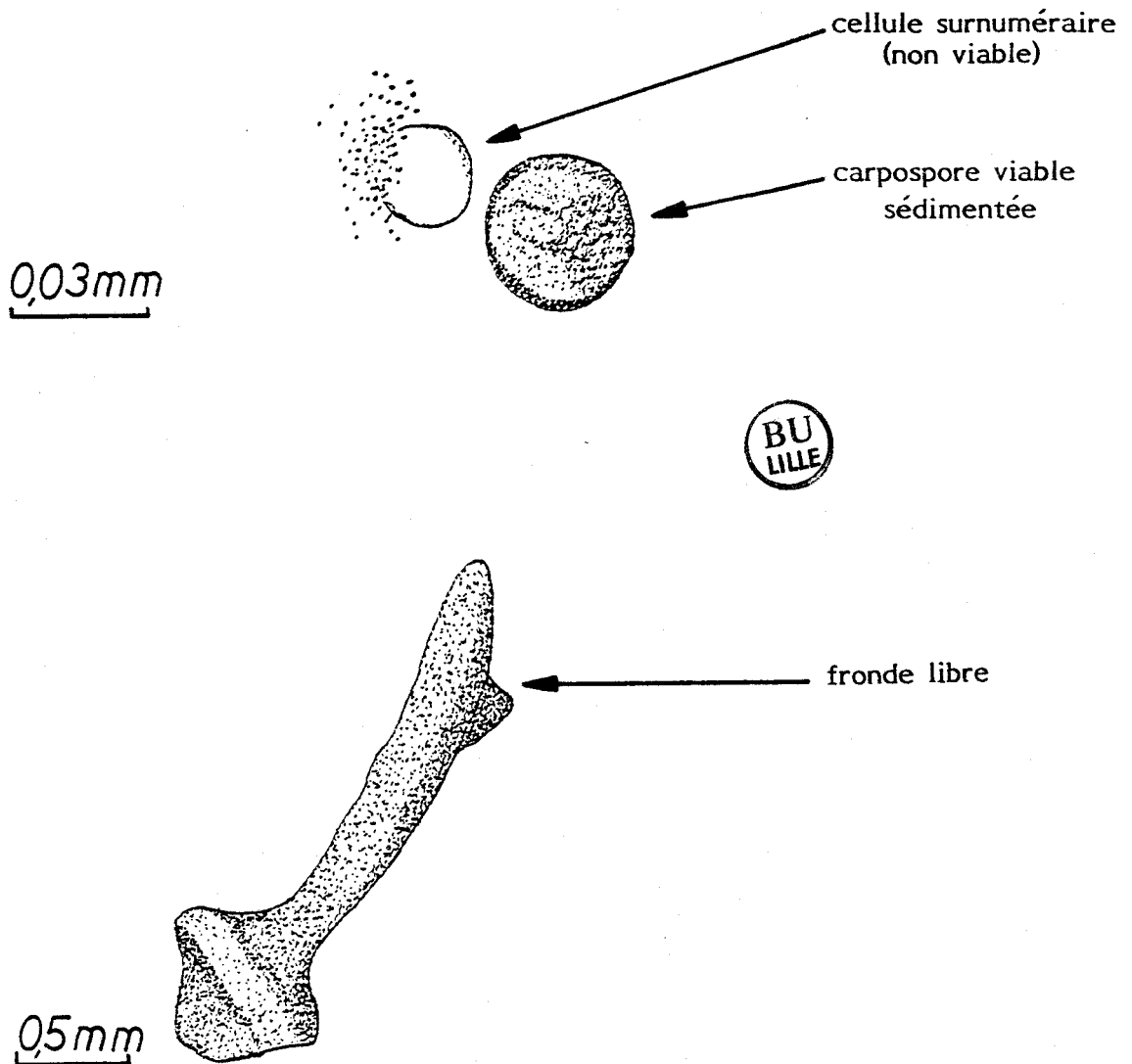
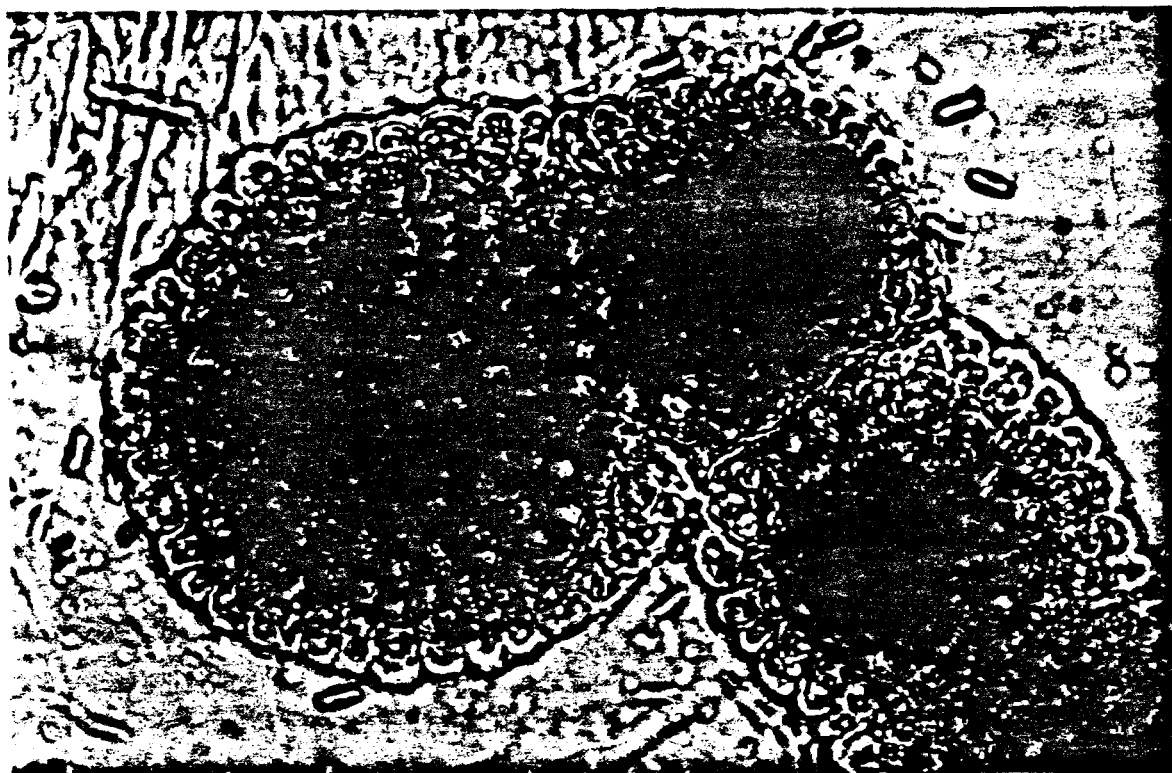


Figure 19 - Développements atypiques de tétrasporophytes : cellules surnuméraires et frondes libres.

Planche 6 - Développement atypiques des tétrasporophytes : accolements d'individus (grandissement direct : x 40).



- lors de la fixation : deux ou plusieurs carpospores, issues éventuellement de cystocarpes qui peuvent être différents, sont capables de s'associer au cours de leur fixation sur le substratum. Dans les conditions de l'expérience, il n'est pas possible de déterminer l'origine exacte des spores ainsi accolées, mais il est vraisemblable qu'elles proviennent, dans la majorité des cas, d'un même cystocarpe ;
- au cours des étapes ultérieures : des "morula" et même de jeunes thalles (dressés ou non) peuvent s'accoler tardivement du fait de l'expansion du disque basal ;

Les accolements d'individus peuvent donc se réaliser à toutes les phases du développement. On remarque comme CHEN et REN (1983), qu'ils concernent jusqu'à 5 % des individus vivants lors des premiers stades (0-16 jours), mais peuvent s'étendre à 8 % au cours des deux semaines suivantes.

Alors que dans le premier cas les associations sont très solides, dans le second cas, de brefs passages aux ultrasons suffisent pour disloquer les groupes. Au stade "morula", des synapses secondaires "semblent avoir été observées" chez *Gracilaria* (OLIVEIRA 1968) et chez *Chondrus crispus* (TVETER et MATHIESON 1976) ; leur présence expliquerait la grande résistance des liaisons. A des stades plus tardifs, la création de véritables jonctions serait vraisemblablement plus difficile, les liaisons resteraient plus superficielles et, donc, plus fragiles.

Les carpospores, obtenues à partir de portions de fronde portant chacune 35 carposporophytes qui émettent leurs spores dans le même espace (boîte de Pétri, \emptyset 90 mm), s'associent préférentiellement quand elles sont émises au cours des phases de fonctionnement optimal des cystocarpes. Les quantités de couples sont statistiquement identiques à celles des groupements multiples. Le nombre d'associations augmente au cours du développement des thalles par "coalescence" des disques.

Les spores issues de carposporophytes isolés par fragmentation, puis regroupés par 7 dans une petite boîte de Pétri (\emptyset 55 mm), s'accolent tout au long du temps de libération. Le nombre des agrégats reste constant dans le temps et il y a deux fois plus d'individus groupés par deux qu'associés autrement.

Les frondes qui s'érigent sur des disques accolés apparaissent deux fois plus vite que sur les disques isolés. Leur emplacement ne semble pas déterminé, et on les trouve à des endroits quelconques de l'assemblage. Ce comportement est contraire à celui de *Gigartina stellata* (RUENESS 1978) chez qui les frondes naissent en fonction des conditions de culture soit à partir du centre des disques respectifs soit en cercles concentriques au niveau des lignes de fusion.

Reflet de la méthode d'ensemencement, la "coalescence" varie selon la densité et le traitement appliqué aux frondes support. En effet, les carposporophytes portés par des portions entières émettent leurs spores au fur et à mesure de leur maturation. Au moment de l'émission optimale, elles sortent rapidement et en grand nombre. On a donc autant de chances d'avoir des associations par paires que des agrégats. Par contre, les cystocarpes isolés libèrent leurs carpospores immédiatement mais sur une période plus longue. La dispersion est plus régulière et la probabilité d'avoir des couples est supérieure à celle d'obtenir des agrégats.

Les associations d'individus ont des perspectives écologiques intéressantes : d'une part, elles permettent aux carpospores de sédimenter rapidement ; d'autre part, elles favorisent la production de frondes dans des délais plus courts, comme l'avaient observé TVETER et MATHIESON (1976) et DION (1979) ; enfin, il n'apparaît pas d'incompatibilité génétique entre individus issus de cystocarpes différents. La naissance d'axes mitoyens permet de poser des hypothèses sur la construction de frondes à cellules d'origines différentes, si toutefois la présence de synapses secondaires est vérifiée.

3 - Frondes libres (fig. 19)

SIMONETTI et al. (1970), BIRD (1974-76), TRONO et al. (1981) signalent la présence de frondes "libres" de *Gracilaria*, c'est-à-dire non fixées à un substrat immobile et flottant dans le milieu naturel ; l'origine de tels individus reste cependant hypothétique :

- d'après nos observations en culture *in vitro*, les premiers clivages de la spore (carpospore et, peut-être tétraspore) sont strictement dépendants du phénomène de contact. La nature et la taille du support sont très diversifiées et peuvent être organique, minérale, macro ou microscopique, fixe ou mobile. Ainsi, un grain de sable ou une fibre de coton peut convenir. De même, des individus sont

susceptibles de se développer *in situ* sur le thalle gamétophytique, soit à la périphérie du carpostome, soit à l'intérieur même de la cavité cystocarpique. Ils seront libérés dans le milieu par désagrégation du thalle, émission libre ou forcée. Enfin, le processus d'accolement des carpospores est parfois suffisant pour induire les premières divisions avant toute fixation. Dans tous les cas, on obtient des ensembles plus ou moins sphériques, libres, à partir desquels s'érigent des frondes sans emplacement déterminé. On remarque alors, comme KIM (1970), que l'attachement ultérieur au substratum reste possible si le milieu est suffisamment au repos. La fixation est effective en moins de 6 jours mais demeure fragile. Une nouvelle séparation d'avec le support favorise l'apparition de néoformations d'ordres différents. Ceci s'accorde avec les observations de BIRD (1974-76) selon lesquelles les *Gracilaria* des populations flottantes sont plus branchues que ceux des populations fixées ;

- les frondes libres seraient d'une origine secondaire et plus tardive. Normalement, une carpospore fixée donne une "morula" qui se développe en disque parenchymateux ; ce stade disque peut-être éludé, dans 30 à 40 % des cas (CHEN et REN 1983) et la "morula" donne alors directement naissance à une jeune fronde. L'attachement de telles plantules au substratum est rare et fragile. Les individus flottants de ce type sont communs dans nos milieux de culture ;
- enfin, les frondes, libres, pourraient aussi résulter des fragmentations de thalles adultes. Les tronçons obtenus sont capables de reconstituer un apex et un disque (KLING et BODARD 1974).

Ces populations non fixées et issues de thalles adultes demeurent stériles selon SIMONETTI *et al.* (1970) et BIRD (1974-76) tandis que celles issues de stades jeunes détachés de leur substrat deviennent fertiles en quelques semaines dans les cultures de BIRD *et al.* (1977). On peut donc imaginer que les Gracilaires libres, issues de thalles adultes sont un moyen de multiplication végétative. En revanche, les jeunes thalles libres, obtenus sans passage par le stade disque (*sensu lato*) sont un moyen de dispersion et d'accélération de la production sexuée. Chez *Gracilaria verrucosa* du Cap Gris-Nez, nous avons rencontré, *in vitro*, ces différents types de comportement ; la durée de nos cultures ne nous a néanmoins pas permis de vérifier les hypothèses relatives à la fertilité ou la stérilité des populations "libres".

III. - ANALYSE DE L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LE DEVELOPPEMENT DU JEUNE TETRASPOROPHYTE IN VITRO

A. - Rôle du substrat

Chez *Gigartina agardhii*, la vaisselle utilisée pour les cultures *in vitro* a une influence sur la survie et la fixation des spores (WEST et CRUMP 1974). Chez les algues rouges, les premières divisions semblent dépendre du contact de la cellule avec le substrat (DION 1979, RIETEMA et KLEIN 1981) ; chez *G. verrucosa*, nous avons montré que le phénomène de fixation était indispensable à la survie de la spore (Ch. III, II) ; le support a-t-il un effet sur le devenir des carpospores et des tétrasporophytes de *Gracilaria verrucosa* ?

1 - Modalités expérimentales

Pour orienter le choix du récipient et du substratum à utiliser, nous avons essayé plusieurs types de substrat :

- des boîtes de Pétri en polystyrène cristal, type "G.P", de diamètre 55 mm ;
- des boîtes à contact en polystyrène, type "Nuncatom", de diamètre 60 mm ;
- des boîtes de Pétri en pyrex, de diamètre 55 mm ;
- des salières en demi-cristal ;
- des lames-support de microscopie, soit laissées telles quelles, soit dépolies à la meule sur une face.

Les expériences sont menées en conditions standards de culture et varient selon le matériel utilisé.

Dans le cas des boîtes de Pétri et salières, on y place des cystocarpes pendant quelques heures. Après avoir enlevé les carposporophytes, on évalue le nombre de carpospores libérées. Les comptages des cellules vivantes et l'observation de leur développement s'effectuent ensuite tous les deux jours.

L'utilisation des lames-support est différente puisqu'on les place à plat, côte à côte de façon à couvrir le fond d'un aquarium de 2 litres ; la face dépolie, quand elle existe, étant dirigée vers les thalles. Huit jours plus tard, on émerge les

lames et l'on compte au microscope inversé la quantité de tétrasporophytes correspondant au nombre minimum de carpospores fixées respectivement sur les verres polis et dépolis.

2 - Résultats

a) Comparaison entre deux types de boîtes de Pétri en polystyrène

Dans les premiers jours, les taux de spores fixées sont statistiquement comparables dans les boîtes "G.P." et "Nuncatom". Au bout de 16 jours, 30 à 60 % d'entre elles se sont développées en "morula" sur le fond des boîtes "G.P." mais seulement 4 à 8 % ont survécu dans les boîtes "Nuncatom".

b) Comparaison entre boîtes de Pétri en pyrex et salières en demi-cristal

Le taux de jeunes tétrasporophytes survivants n'est que de 20 % après 8 jours de culture dans les salières et tombe à 0 % après 12 jours ; dans les boîtes de Pétri en pyrex, 50 % de l'ensemencement a survécu après deux semaines.

c) Comparaison entre boîtes de Pétri en pyrex et en polystyrène "G.P."

Ces deux types de récipients s'avèrent les mieux tolérés, à court et à long termes. La comparaison ne permet pas de mettre en évidence la supériorité de l'un ou l'autre de ces matériaux, pyrex et polystyrène "G.P."

d) Comparaison entre lames-support en verre poli et dépoli

Après huit jours de culture, on recense le nombre de "morula" fixées sur les lames en verre poli ou dépoli, placées au fond d'un aquarium. La quantité de tétrasporophytes fixés est plus élevée sur les lames érodées que sur les lames lisses ; on y reconnaît des "morula" formées et même des disques développés. La fixation des spores et leur développement sont donc facilités sur les lames dépolies.

3 - Conclusion

Dans les cultures *in vitro* non stériles, plusieurs types de substrats de fixation sont généralement employés. Différents essais nous ont permis d'étudier leurs caractéristiques et de hiérarchiser les matériaux.

Pour un volume d'ensemencement égal, deux paramètres peuvent influencer la fixation des spores : la composition du substratum et sa forme. Les spores se fixent aux substrats solides principalement par liaisons chimiques (CHARTERS et al. 1972), elles sont donc particulièrement sensibles à la matière du support. Dans le cas des salières et des boîtes "Nuncatom", on peut craindre que des composés toxiques (en particulier à base de plomb dans le cas du demi-cristal), soient relargués par le récipient. Par ailleurs, la forme même des boîtes peut avoir un effet mécanique, une importante tension superficielle par exemple, qui gêne la sédimentation. Pour leur plus grande facilité d'emploi, nous avons préféré les boîtes "G.P." aux boîtes en pyrex, pour les cultures *in vitro*.

En ce qui concerne les ensemencements sur lames, DION (1979) observe que les jeunes stades de *Gigartina stellata* se développent très bien sur le verre, dont la surface est pourtant naturellement "antifouling". Nos expériences chez *Gracilaria verrucosa* mettent en évidence la supériorité du verre dépoli. Déjà WEST et CRUMP (1974) avaient montré que les spores de *Gigartina agardhii* se fixent solidement dans les rayures du verre ; dans nos cultures, ce comportement se retrouve vis-à-vis des rayures, qu'elles soient faites dans le verre ou dans le plastique.

B. - Rôle de la lumière

L'activité de certaines longueurs d'onde lumineuses sur la croissance de quelques Rhodophycées a été étudiée (DIXON 1970, LARPENT-GOURGAUD et al. 1972) mais la réponse de jeunes tétrasporophytes de *Gracilaria verrucosa* à de telles stimulations n'était pas encore connue. Nous nous sommes donc intéressée au comportement d'individus dont les carpospores originelles ont subi des éclaircissements dans le spectre visible.

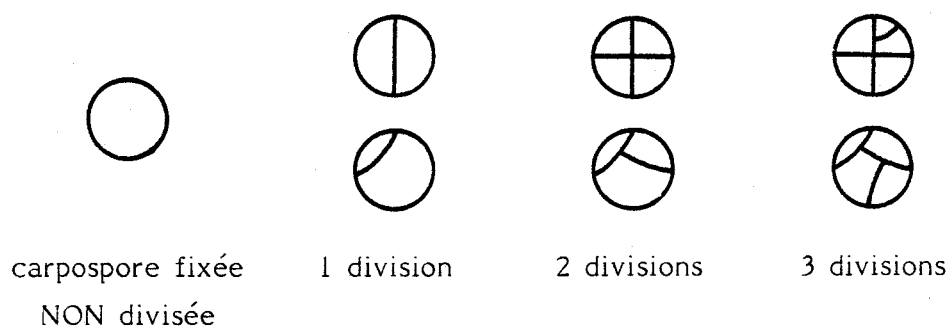
1 - Modalités expérimentales

Nous avons réalisé des premiers essais en utilisant des tubes fluorescents à large spectre (Sylvania XL). Les spores ensemencées en conditions standards sont ensuite placées soit en lumière "bleue", soit en lumière "jaune". On suit leur devenir tous les jours, pendant les 10 premiers jours, puis tous les 30 jours pendant 3 mois.

A partir de ces travaux préliminaires, des expériences plus fines ont été menées. Le protocole initial est celui appliqué aux carpospores (Ch. III, II-D), c'est-à-dire qu'après avoir subi 12 heures d'éclairages monochromatiques appartenant au spectre visible, puis 12 heures d'obscurité, les cellules sont comptées et le taux de viabilité est établi par rapport à l'ensemencement. Par ailleurs, on évalue le taux de segmentation en comptant le nombre de clivages sur les tétrasporophytes et en le rapportant au nombre d'individus fixés (cf. exemple de calcul fig. 20). Les boîtes de Pétri sont ensuite replacées en conditions standards et le milieu est renouvelé chaque semaine.

Dix jours puis un mois plus tard, on dénombre les thalles vivants et l'on prend la mesure du plus grand et du plus petit échantillon, à la chambre claire.

Exemples de types de segmentation :



Exemple de calcul de la vitesse de segmentation à partir des observations :

100	individus	NON	divisés	-----	100 X 0 = 0
130	"	1	division	-----	130 X 1 = 130
80	"	2	divisions	-----	80 X 2 = 160
12	"	3	"	-----	12 X 3 = 36
<u>322</u>	individus fixés				<u>326</u>

Taux de segmentation : $326 / 322 = 1,01$ division par individu fixé

Figure 20 - Méthode de calcul du taux de segmentation des individus fixés, après 24 h de culture.

2 - Résultats

a) Résultats préliminaires (fig. 21)

Dans le "bleu", les "morula" se forment plus tardivement que dans le "jaune" ou le blanc. En une dizaine de jours, elles deviennent des disques parenchymateux à base très large. Au bout de 35 jours de culture environ, leur sommet initie des frondes courtes, presque toujours uniques.

Cultivée en lumière "jaune", la carpospore se transforme rapidement en "morula" sur laquelle s'érige la première fronde dès le 4ème jour de culture.

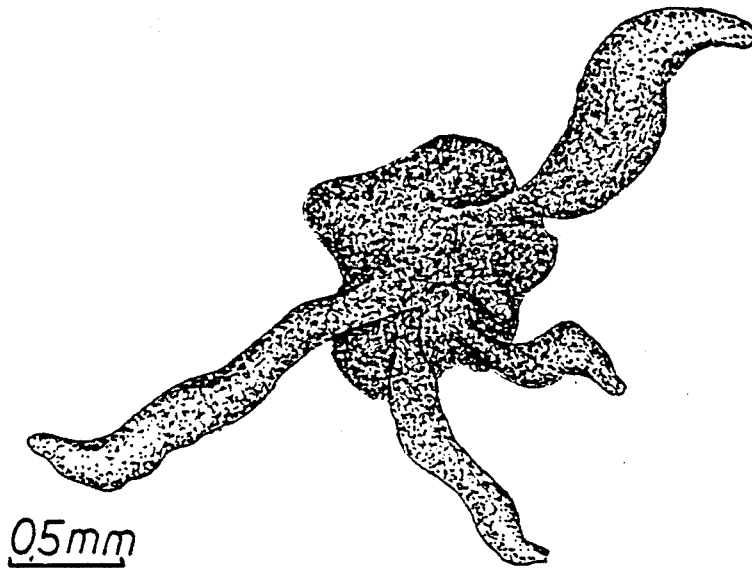
Les tétrasporophytes évoluent différemment au cours du temps, selon les conditions dans lesquelles ils ont été placés : après deux mois, sous l'effet de la lumière "jaune", la plupart des frondes et des disques basaux blanchissent alors que la lumière "bleu" permet de conserver les thalles en bon état pendant trois mois.

La morphologie et le développement des jeunes tétrasporophytes de **Gracilaria verrucosa** varient selon la qualité de la lumière reçue. LARPENT-GOURGAUD **et al.** (1972) montrent qu'au contraire les thalles de **Acrochaetium sp.** restent morphologiquement identiques, quels que soient les types de lumière.

Le fait que les radiations proches du bleu stimulent l'accroissement du disque basal est à rapprocher des observations de DUCHER **et al.** (1975) qui remarquent une augmentation du nombre des mitoses chez **Acrochaetium sp.** soumis à cette bande spectrale.

La lumière "jaune" favorise la croissance des frondes, mais elle comprend en fait 25,5 % de radiations rouges (GODIN 1985), ce qui nous permet de rapprocher les réponses de la Gracilaire à celles de **Trentepohlia effusa** (CHOWDARY **et JOSE** 1978) ; dans les deux cas, la croissance est accélérée par la lumière rouge.

A partir de ces constatations, nous avons suivi de façon plus systématique et plus précise, le comportement des tétrasporophytes issus de carpospores traitées par des éclairagements monochromatiques différents.



Tube "jaune" : Disque basal souvent peu développé - Frondes multiples et souvent de grande taille.



Tube "bleu" : Disque basal large - Fronde généralement unique et de petite taille.

Figure 21 - Aspect des tétrasporophytes après un mois de culture en lumière "jaune" ou "bleue".

b) Influence des éclairagements monochromatiques appliqués aux carpospores, sur le développement des tétrasporophytes qui en sont issus

α) Etude du taux de division

Après un cycle photopériodique (12:12) de lumière monochromatique, les individus fixés se sont divisés plus ou moins rapidement, selon la longueur d'onde qu'ils ont reçue.

- Chez les individus nés à la lumière blanche :

A une énergie équivalente à celle de la fraction monochromatique de la lumière blanche (tab. 11), il apparaît que la segmentation est accélérée dans le vert, le violet, le bleu, le rouge tandis que les radiations jaune et orange ralentissent le processus.

Couleurs	Nombre de divisions (24 h)	Taille moyenne (10 j)	Taille moyenne (1 mois)
Violet	X 2	X 2	X 2
Bleu	X 2	X 2,5	X 2
Vert	X 1,5	X 2,5	X 2,5
Jaune	-	X 2,5	X 2,5
Orange	-	N.S.	N.S.
Rouge	X 2	X 4	X 5

Tableau 11 - Coefficients d'accroissement des taux de division et des tailles moyennes des individus ayant initialement subi un éclairagement monochromatique avec une énergie équivalente à celle de la fraction correspondante de la lumière blanche.

N.S. : différence non significative, au seuil de 5 %.

La **figure 22** montre qu'il existe des variations dans la stimulation du phénomène mitotique tout au long du spectre et à l'intérieur même de chaque couleur : les individus placés dans le bleu 442 nm se comportent comme les témoins, tandis que ceux qui ont reçu des radiations violettes 403 nm se divisent plus. Sous les autres radiations du spectre, on compte beaucoup moins de mitoses que dans le violet (403 nm). De 508 à 620 nm (jaune-orangé), la segmentation semble totalement inhibée.

- Chez les individus nés à l'obscurité :

A 418 et 681 nm, la vitesse de segmentation est supérieure à celle des témoins lumière blanche mais statistiquement comparable à celle des individus nés à la lumière et qui ont reçu les mêmes éclairagements. Par contre, chez les témoins obscurité et à 482 nm, on n'observe que de très rares divisions.

β) Taille des "morula" et vitesse d'apparition des frondes

Deux éléments sont étudiés pour mesurer l'influence de la qualité de l'éclairage appliqué à la carpospore sur le développement ultérieur du tétrasporophyte : l'augmentation de la taille moyenne des "morula" et des disques basaux après 10 et 32 jours de culture ainsi que la vitesse d'apparition des frondes en fonction de la qualité de la lumière dont l'effet est exprimé par rapport à la fraction correspondante de la lumière blanche.

- Augmentation de la taille moyenne des individus (fig. 23)

- Nés à la lumière blanche :

Après 10 jours et 1 mois de culture (**tab. 11**), les coefficients d'accroissement de la taille moyenne sont comparables entre eux dans chaque couleur, mais des réponses différentes s'observent entre couleurs. Avec des radiations oranges, on ne distingue aucun effet stimulateur, alors qu'avec : le bleu, le vert, le jaune, la taille des "morula" est augmentée ; avec les longueurs d'onde correspondant au rouge, l'accroissement est beaucoup plus important qu'avec les autres couleurs au bout du premier mois de culture.

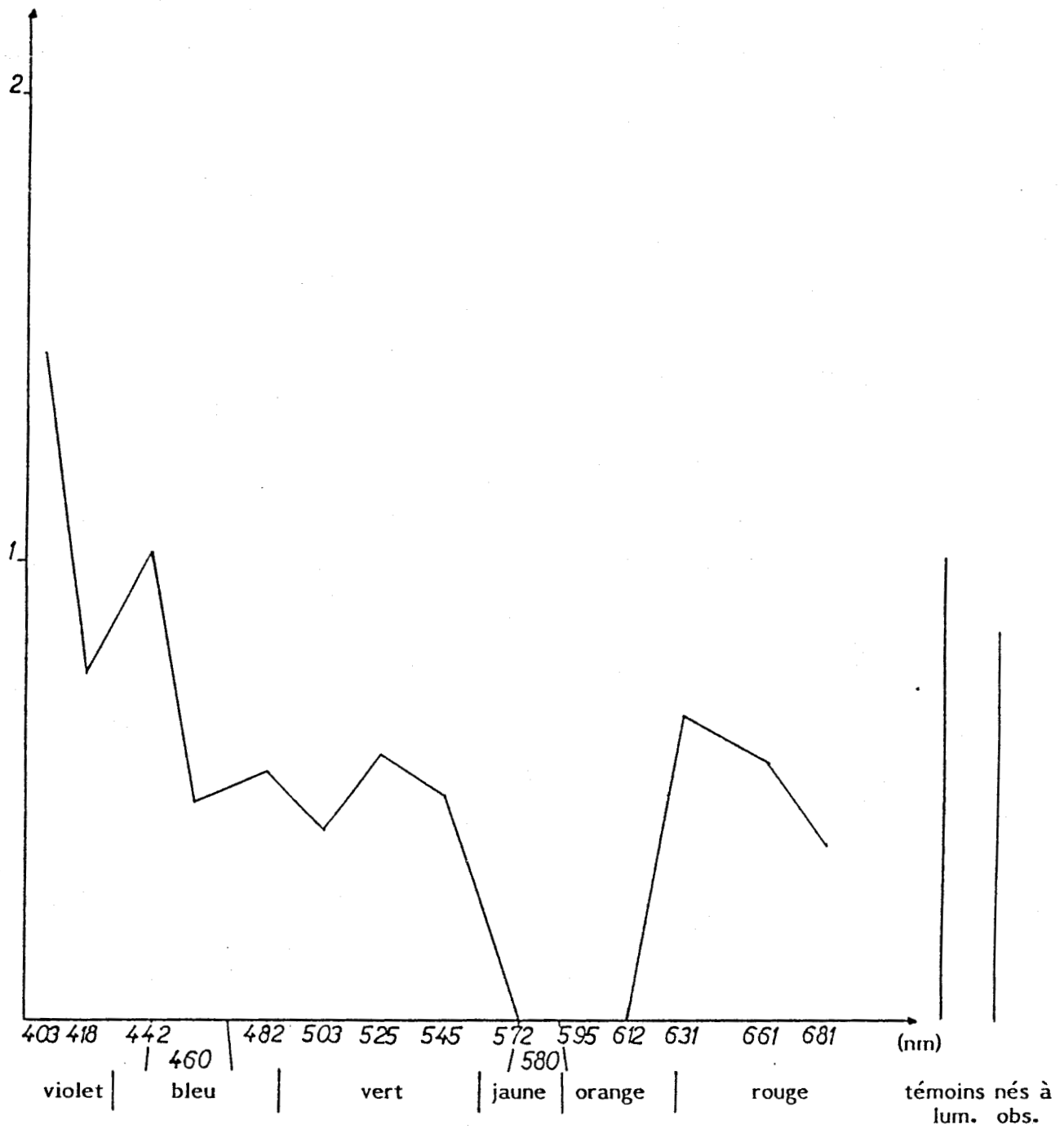


Figure 22 - Courbes des taux de division des individus en fonction des bandes d'onde initialement reçues.

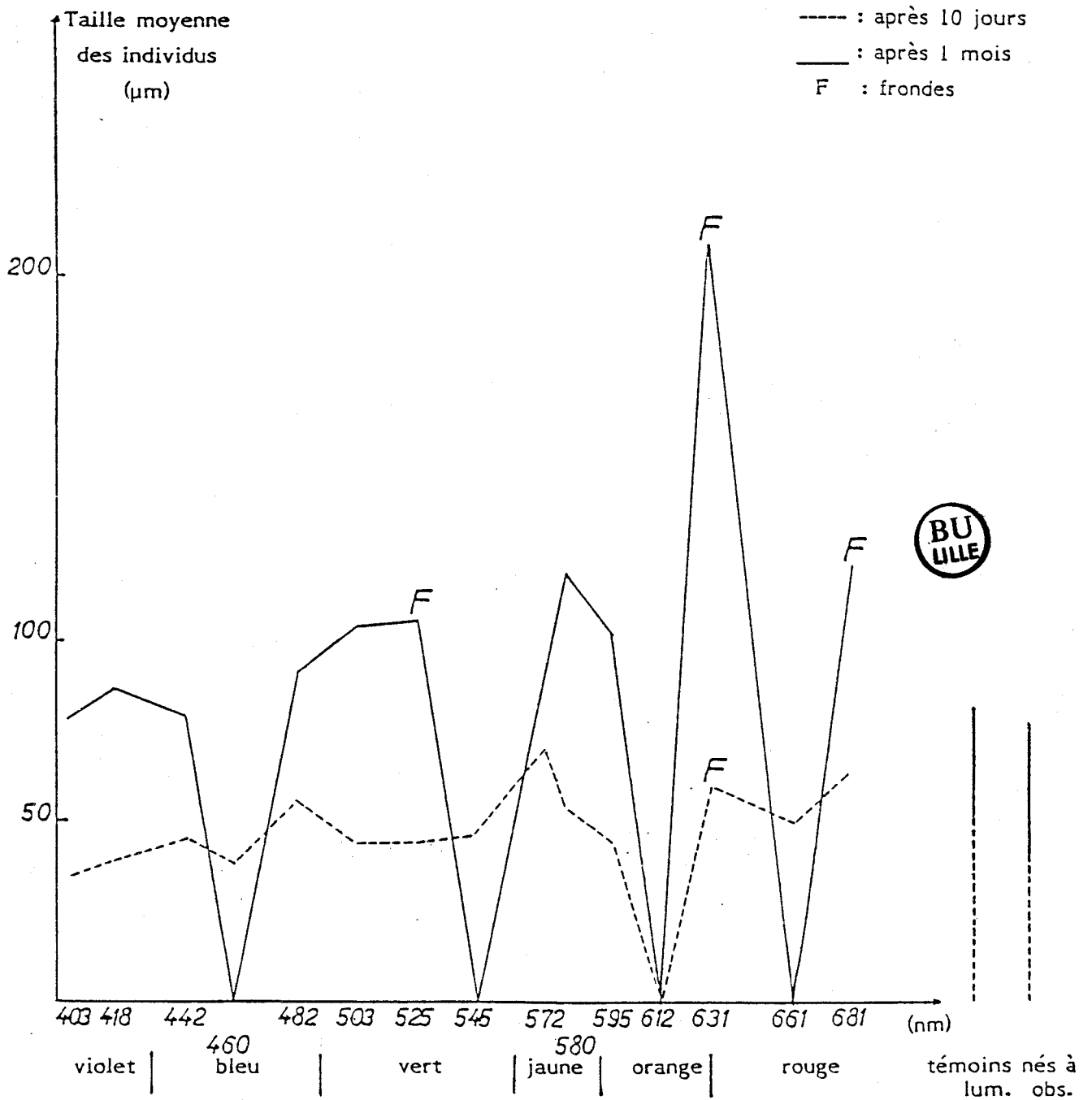


Figure 23 - Courbes de taille moyenne des individus (jeunes tétrasporophytes) après 10 jours et 1 mois de culture.

La comparaison des coefficients obtenus pour chaque couleur, l'un à propos du nombre de divisions après 24 heures, l'autre de la taille de l'individu après 10 jours et après un mois de culture en lumière blanche, montre que l'effet provoqué par une radiation monochromatique appliquée initialement sur la carospore, se répercute pendant au moins un mois sur le développement du tétrasporophyte. Cet effet est :

- + immédiat et positif mais n'évolue pas dans le temps (violet et bleu) ;
- + immédiat, positif et s'accroît dans le temps (vert et rouge) ;
- + retardé mais positif et n'apparaissant qu'au bout de quelques jours (jaune) ;
- + immédiat et négatif mais levé par une période plus ou moins longue d'exposition à la lumière blanche (orange).

- Nés à l'obscurité :

A 418 et 482 nm et chez les témoins, la taille moyenne des tétrasporophytes est sensiblement égale à celle des individus nés à la lumière et qui ont reçu les mêmes éclairagements monochromatiques. Ce n'est pas le cas à 681 nm où la taille atteinte est très inférieure. On retrouve donc ici trois types d'effet. Certains sont comparables aux précédents mais ne dépendent pas obligatoirement des mêmes longueurs d'onde :

- + immédiat, positif mais n'évolue pas dans le temps (violet) ;
- + retardé mais positif et n'apparaissant qu'au bout de quelques jours (bleu) ;
- + immédiat et positif sur les toutes premières divisions, il freine ensuite le développement du tétrasporophyte.

Chez les témoins, après plusieurs cycles photopériodiques de lumière blanche, les tétrasporophytes atteignent une taille similaire à celle des individus nés à la lumière.

- Vitesse d'apparition des frondes

Chez les tétrasporophytes nés à la lumière, les premières frondes apparaissent après 10 jours de culture chez quelques rares témoins lumière blanche ; par contre, de nombreux individus ayant initialement reçu des radiations rouges comportent une à plusieurs frondes par disque. Chez les échantillons ayant subi les

autres gammes spectrales et chez ceux qui sont nés à l'obscurité, il faudra attendre au moins un mois (vert) pour observer l'initiation des frondes.

γ) Viabilité des tétrasporophytes

Une étude comparée, analogue à celle réalisée sur le développement, a été effectuée sur la viabilité des tétrasporophytes nés à la lumière (tab. 12).

Couleur	"24h" /ensemencement	"10 jours" /ensemencement	"1 mois" /ensemencement
Violet	X 2	X 7	X 5,5
Bleu	X 6	X 2	X 5
Vert	X 2	X 7	X 5
Jaune	N.S.	N.S.	N.S.
Orange	N.S.	X 2,5	X 2
Rouge	X 1,5	X 9	X 5,5

Tableau 12 - Modifications du taux de viabilité des individus ayant initialement subi un éclairage monochromatique avec une énergie équivalente à celle qu'ils auraient reçue en lumière blanche pour la même couleur.

N.S. : différence non significative, au seuil de 5 %.

Après 10 jours et 1 mois de culture, les taux de viabilité sont peu différents entre eux pour la plupart des couleurs, sauf dans le bleu où le taux de viabilité est augmenté, et le rouge où il est diminué.

Le comportement des individus varie beaucoup selon la bande passante qu'ils ont initialement reçue, mais on peut distinguer quatre types d'effet provoqués par les radiations :

- + immédiat et positif, l'effet s'accroît au cours des 10 premiers jours avant de s'atténuer plus ou moins fortement dans les semaines suivantes (violet, vert et rouge) ;
- + immédiat très positif, l'effet est amoindri au bout de 10 jours avant de reprendre un sens progressif au cours des semaines suivantes (bleu) ;
- + retardé et faiblement positif, l'effet s'exprime après plusieurs jours d'exposition à la lumière blanche (orange) ;
- + pas d'effet (jaune).

Chez les individus nés à l'obscurité, dans tous les cas la viabilité est beaucoup plus faible que chez leurs homologues libérés à la lumière.

c) Discussion à propos de l'influence du facteur lumière sur la carospore et le tétrasporophyte

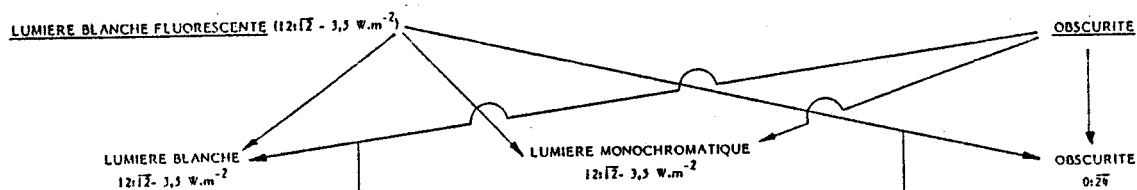
Le stade carospore de *G. verrucosa* est sensible à la lumière et l'influence de ce facteur se répercute ensuite sur le devenir du tétrasporophyte (fig. 24).

Chez la carospore, la lumière favorise la sédimentation et la viabilité. Elle est efficace dès la libération tandis que l'obscurité affaiblit la capacité de fixation et augmente fortement la mortalité.

L'importance des stimuli lumineux se fait encore sentir au cours des heures qui suivent la sporulation. Un transfert des carospores entre deux conditions, quelles qu'elles soient, a des répercussions sur le comportement de la cellule puis sur le devenir du tétrasporophyte :

- le passage d'un éclaircissement initial vers l'obscurité provoque la chute du taux de viabilité mais ne gêne pas la sédimentation et les premières divisions. Ceci explique les observations de BIRD *et al.* (1977) qui, ayant placé des cystocarpes en lumière blanche, voient les spores libérées se développer à l'obscurité. Après plusieurs jours, les tétrasporophytes survivants sont aussi nombreux que ceux dont les spores d'origine sont restées à la lumière, mais leur taille est plus petite ;

LIBERATION NATURELLE



Nés à la LUMIERE BLANCHE			Nés à l'OBSCURITE			Nés à la LUMIERE BLANCHE			Nés à l'OBSCURITE			Nés à la LUMIERE BLANCHE			Nés à l'OBSCURITE			
S	D	V	S	D	V	S	D	V	S	D	V	S	D	V	S	D	V	
TEMOINS			○	○	○	VIOLET	●	●	(418 nm)	○	●	○	○	○	○	○	○	○
						BLEU	●	●	(482 nm)	○	○	○						
						VERT	●	●										
						JAUNE	○	○										
						ORANGE	●	○										
						ROUGE	●	●	(681 nm)	○	●	○						

APRES 10 JOURS ET APRES 1 MOIS DE CULTURE EN LUMIERE BLANCHE FLUORESCENTE (12hLZ - 3,5 W.m⁻²)

Nés à la LUMIERE BLANCHE		Nés à l'OBSCURITE		Nés à la LUMIERE BLANCHE		Nés à l'OBSCURITE		Nés à la LUMIERE BLANCHE		Nés à l'OBSCURITE								
T	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V							
TEMOINS (1 m. : frondes rares)		10 j	○	VIOLET	10 j	●	●	(418 nm)	10 j	●	○	10 j	-	-	10 j	-	○	
		1 m.	○	1 m.	●	●	1 m.	●	○	1 m.	●	○	1 m.	-	-	1 m.	-	○
				BLEU	10 j	●	●	(482 nm)	10 j	●	○							
				1 m.	●	●	1 m.	●	○									
				VERT	10 j	●	●											
				1 m.	●	F●												
				JAUNE	10 j	●	-											
				1 m.	●	-												
				ORANGE	10 j	-	●											
				1 m.	-	●												
				ROUGE	10 j	●	F●	(681 nm)	10 j	-	○							
				1 m.	●	F●	1 m.	-	○									

LEGENDE : effet POSITIF ● effet NEGATIF ○ écart avec le TEMOIN (%) : [1 - 5[SANS effet : -
 ● [5 - 20[
 ● [20 - 50[
 ● [50 - 100[
 F : frondes

Figure 24 - Influence du facteur lumière sur la sédimentation, la viabilité et les premières divisions de la carpospore de *Gracilaria verrucosa*, puis sur le devenir du tétrasporophyte qui en est issu.

Légende : S : taux de sédimentation
 D : taux de division
 V : viabilité
 T : taille

- le passage de l'obscurité initiale à la lumière blanche permet aux cellules de se poser rapidement. En quelques heures, grâce à l'influence de l'éclairement blanc, elles sont capables de récupérer le "retard" provoqué par l'absence de lumière au moment de leur libération. Leurs premières divisions sont ralenties mais cultivés en lumière blanche, les tétrasporophytes se développent aussi bien que ceux qui sont nés à la lumière bien que leur taux de viabilité reste toujours plus faible. Enfin, la lumière joue un rôle sur l'individu à l'intérieur même du cystocarpe : après plusieurs jours d'obscurité constante, les spores que libère un carposporophyte ne sédimentent jamais et meurent (Ch. III, I) ;
- dans les deux cas, la qualité de l'éclairement est capable de modifier la réponse des individus et cette réponse varie selon que l'éclairement monochromatique est appliqué :
- + après une période de lumière blanche : quelle que soit la gamme d'onde imposée, la sédimentation est quasi-homogène, sauf dans la bande 508-620 nm (jaune-orangé) qui semble inefficace, voire peu favorable au processus. Comme dans les expériences préliminaires, les premières divisions sont favorisées par les bandes d'ondes 400 à 450 nm (bleu-violet) ; ceci laisse supposer que chez *G. verrucosa*, comme chez *Acrochaetium* (DUCHER et al. 1975) et *Draparnaldia* (LARPENT et JACQUES 1972), les éclaircements bleus stimulent le phénomène mitotique et donc l'initiation (GODIN 1985). Le taux de viabilité est fonction de la longueur d'onde et varie tout au long du spectre visible. Plus tard, après une longue période de lumière blanche, les individus issus du traitement dans le bleu dominant par leur nombre, mais leur taille est alors très inférieure à ceux qui ont initialement reçu les éclaircements rouges (631 nm). Même à long terme, les bandes d'ondes bleues favorisent donc la viabilité tandis que les rouges accélèrent le développement et la croissance. Ces faits sont en accord avec les observations des expériences préliminaires, du moins en ce qui concerne l'ensemble des gammes utilisées correspondant à la couleur bleue. En revanche, les résultats s'opposent paradoxalement avec ceux du tube "jaune" : l'effet positif qui est noté provient alors des éclaircements rouges (25,5 %), capables à eux seuls de stimuler fortement le dépôt des cellules puis le développement des tétrasporophytes ;

+ après une phase initiale d'obscurité : les carpospores, placées 12 heures sous des éclairagements monochromatiques, ont un taux de sédimentation qui s'accroît avec la valeur de la longueur d'onde et qui est maximal avec les radiations rouges ; au contraire, les premières divisions sont plutôt favorisées par les radiations violettes (418 nm). Après quelques jours de culture en lumière blanche, les individus se comportent à l'inverse de ceux dont les spores d'origine ont été libérées à la lumière. Cette fois, c'est l'effet positif apporté par les longueurs d'onde les plus basses (418 et 482 nm) qui s'amplifie dans le temps tandis que celui des éclairagements rouges (681 nm) demeure déficient. Dans tous les cas, la viabilité reste faible par rapport aux spores libérées en lumière blanche, quelles que soient les conditions ultérieures de culture.

L'explication de toutes ces réponses est donnée par la **figure 25**, qui représente le tracé de la courbe d'absorbance des pigments hydro- et liposolubles contenus dans **Gracilaria verrucosa**. Ce tracé peut être mis en parallèle avec celui des courbes de viabilité et de sédimentation des carpospores (**fig. 16**) et celui des tailles moyennes atteintes par les individus qui en sont issus, après 10 jours et un mois de culture (**fig. 23**).

Les courbes des **figures 16** et **23** évoluent de façon quasi-parallèle, sauf pour les bandes jaune-orangées (508-620 nm) dans le cas de la sédimentation et de la viabilité, et suivent la courbe d'absorbance des pigments : les pics observés au niveau des longueurs d'onde 418 et 482 nm, se situent dans la zone d'excitation des pigments liposolubles et de la chlorophylle en particulier (GODIN 1985) ; à 545 nm, on atteint la bande correspondant aux pigments hydrosolubles (phycobilines), et à 580 et 681 nm, on retrouve les pigments liposolubles. Par contre, aux longueurs d'onde 508-620 nm (jaune-orangé), soit dans les zones du spectre qui correspondent à des absorbances de pigments en faible concentration ou moins actifs, la viabilité et surtout la sédimentation sont peu stimulées.

d) Conclusion

C'est donc l'appareil pigmentaire des carpospores de **Gracilaria verrucosa** qui est responsable de la variation des réponses face aux différents types d'éclairément : la survie des cellules demeure indépendante de la longueur d'onde reçue tandis que la sédimentation varie avec la qualité de la lumière. Enfin, une libération à l'obscurité hypothèque la viabilité des spores mais pas le potentiel de

..... : Pigments LIPOSOLUBLES (solvant = acétone)
 ---- : Pigments HYDROSOLUBLES

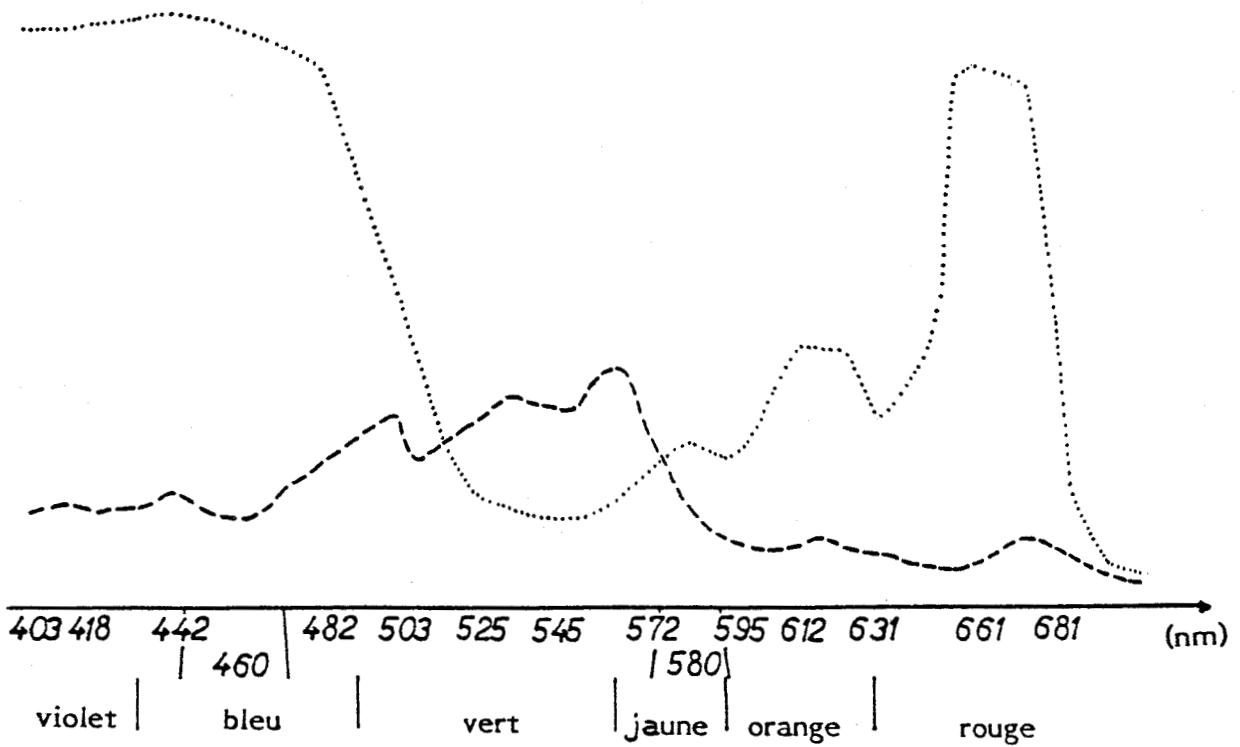


Figure 25 - Courbes d'absorbance des pigments de *Gracilaria verrucosa*.

sédimentation. Dans la nature, une telle sensibilité aux stimuli lumineux représente un avantage énorme pour la population des Gracilaires et l'on peut émettre plusieurs hypothèses qui mériteraient d'être vérifiées :

- libérées la nuit ou à marée haute, les carpospores sédimentent en recevant des radiations bleues, dominantes le matin et les plus pénétrantes dans l'eau. Elles ont alors toute capacité pour se diviser rapidement ;
- libérées le soir ou à marée basse, elles reçoivent au moment de leur sédimentation, des radiations rouges, rasantes le soir, moins pénétrantes dans l'eau, mais très actives sur leur développement ultérieur.

La carpospore de la Gracilaire est donc "opportuniste" vis-à-vis du facteur lumière et profite de toutes les sollicitations, soit pour sa viabilité, soit pour son développement.

Plus tard, les phénomènes de blanchiment qui s'observent plus rapidement chez les individus cultivés sous les tubes "jaunes" que chez ceux des tubes "bleus", seraient là encore intimement liés à l'influence de la qualité de la lumière sur la quantité de pigments contenus dans le thalle (JONES 1959b, BEER et LEVY 1983).

Les travaux menés jusqu'à présent s'intéressaient à l'influence de la qualité de la lumière sur le thalle des algues rouges, et de *Gracilaria verrucosa* en particulier (JONES 1959 b, KLING 1974). En nous intéressant au stade carpospore nous avons montré que les spores comme le thalle entier pouvaient répondre, grâce à leur appareil pigmentaire, à toutes les stimulations du spectre visible. Nos résultats confirment ceux de KLING (à paraître) obtenus avec un nombre plus élevé de cycles photopériodiques d'éclairements monochromatiques appliqués à des carpospores.



C. - Influence de la température

1 - Modalités expérimentales

La température joue un rôle considérable dans la croissance de *G. verrucosa* (BIRD et al. 1977). Il était intéressant de comparer le développement de jeunes tétrasporophytes issus d'une même population de carpospores mais cultivés dans des conditions thermiques différentes : les uns à + 19°C, les autres à + 8°C. Dans les deux cas, les conditions d'éclairement sont standards. Les comptages s'effectuent aux temps t_0 , lors de la mise en culture, puis 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64ème jours. Le milieu est renouvelé chaque semaine.

2 - Résultats (Pl. 7)

Dans des conditions d'éclairement identiques pour toutes les carpospores, celles libérées à + 19°C puis mises en culture à + 8°C sédimentent de façon statistiquement comparable et dans le même temps (0 à 8 jours), que celles laissées à + 19°C.

Au cours des deux premières semaines, les taux de viabilité de toutes les séries ne diffèrent pas, au seuil de 5 %. Par contre, au bout d'un mois, à + 8°C, on retrouve 40 % d'individus de plus qu'à + 19°C ; après 3 mois de culture, à + 8°C, 80 % des tétrasporophytes présents le premier mois, sont encore vivants.

Les jeunes tétrasporophytes ont une morphologie différente selon la température de culture. A + 19°C, une fronde apparaît en quelques jours sur le disque basal qui ne s'accroît que très lentement. Dans le même temps, à + 8°C, on n'observe pas de fronde mais le disque atteint un diamètre ($\approx 250 \mu\text{m}$) double de celui obtenu aux températures élevées.

Au bout de 2 à 3 mois, les frondes, et parfois les disques basaux, des échantillons cultivés à + 19°C, blanchissent tandis que les spécimens gardés à + 8°C demeurent sous forme de grands disques très pigmentés, capables d'initier de jeunes frondes en quelques jours si on les replace à + 19°C.

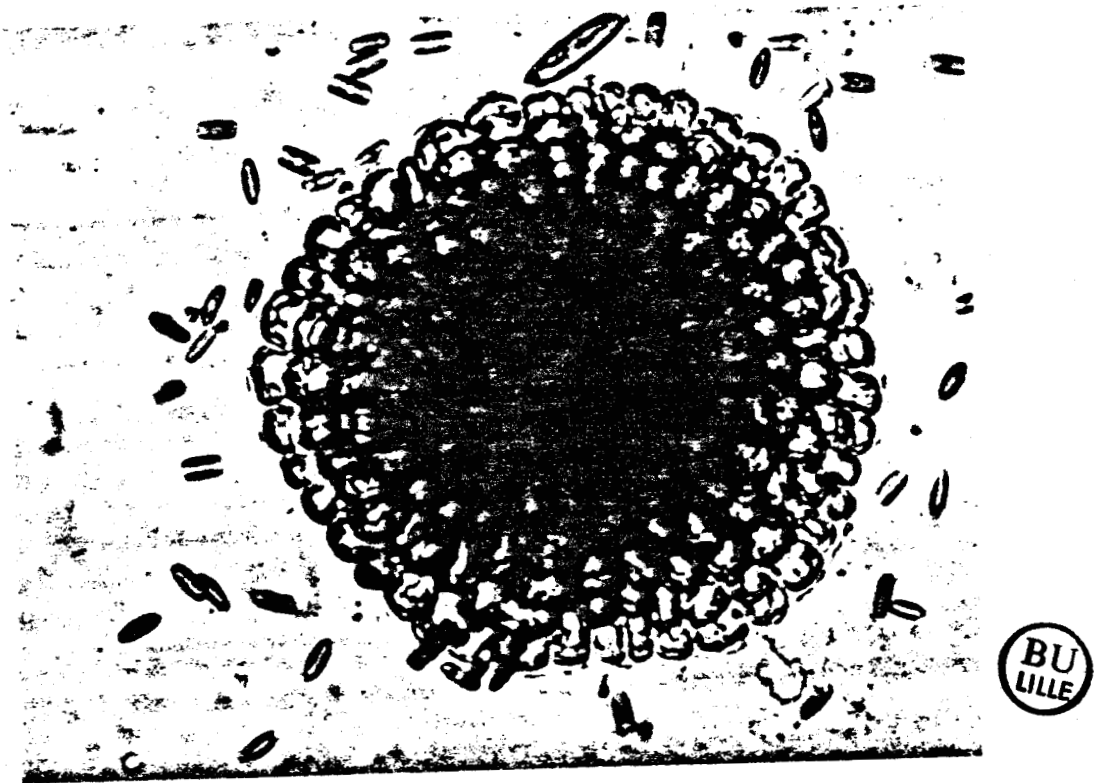


Planche 7 - , Cultures à basses températures (+ 8°C) de tétrasporophytes (milieu de culture sans GeO_2) - (grandissement direct : x 40).

Enfin, les thalles conservés à + 19°C, sont souvent gênés par des proliférations épiphytiques, alors qu'à + 8°C, l'invasion de celles-ci est manifestement très ralentie.

3 - Discussion

L'influence de la température sur le développement des tétrasporophytes montre donc plusieurs aspects :

- une température élevée facilite la croissance des frondes de *G. verrucosa* ; elle est optimale à + 20°C (KIM 1970) et minimale à + 10 ou + 15°C (STOKKE 1957). Une température de + 8°C est défavorable à l'apparition de frondes, mais induit le développement d'un disque basal résistant aux herbivores (LITTLER et LITTLER 1983), à l'action des vagues, et assurant la pérennité du thalle dans des conditions thermiques difficiles.
- le stockage à basse température constitue une formule pratique pour la conservation des thalles ; ils sont peu exigeants dans ces conditions et les changements de milieu ne sont guère nécessaires (McLACHLAN et EDELSTEIN 1977). Alliées aux conditions d'éclairement que nous avons expérimentées (lumière blanche fluorescente, 3,5 W.m⁻², 12:12 les basses températures permettent au jeune tétrasporophyte d'élargir son disque basal et donc d'augmenter le nombre potentiel de frondes en multipliant la quantité des initiales apicales. Celles-ci, selon KLING (comm. pers. 1985), seraient inhibées dans leur développement tant que la croissance du disque est active. Un retour aux températures plus élevées stimule l'induction de très nombreuses frondes, et freine le développement du disque.

CONCLUSION

Les observations faites sur le terrain et au Laboratoire permettent de mieux comprendre la biologie d'une population de Gracilaire, d'expliquer son évolution en fonction des théories avancées par les divers auteurs, et d'appliquer enfin les connaissances acquises à l'élaboration de pratiques culturelles.

I. - ETUDES SUR LE TERRAIN

Dans le Pas-de-Calais, les marées basses ont lieu en début de matinée et en fin d'après-midi. Pour les algues du bas estran, l'étal de marée basse correspond à un moment de calme après l'agitation due au jusant. On peut penser qu'un grand nombre de carpospores sera alors rapidement libéré et que le phénomène sera plus amplifié le matin, lors du passage de l'obscurité au jour, que le soir. Les spores reçoivent des radiations de type bleu puis rouge -le matin- ou rouge puis bleu -le soir- qui accélèreraient la sédimentation et les premières divisions. Dans ce cas, de jeunes tétrasporophytes entourent rapidement les thalles parents gamétophytiques (femelles). On peut alors supposer que la population subit une sélection populationnelle.

A marée haute ou montante ou descendante, les mouvements d'eau provoquent fréquemment la rupture des thalles ; les cystocarpes émettent alors activement leurs spores, sans phase de démarrage. On peut considérer ceci comme un phénomène de compensation grâce auquel le carposporophyte libère très rapidement ses spores dans un site déjà propice à l'espèce. D'autre part, les carposporophytes "isolés" fonctionnent plus longtemps et les chances de dispersion et de découverte de lieux favorables à la colonisation sont augmentées. Les carpospores, émises à partir de fragments flottants près de la surface, recevraient ainsi plus de radiations rouges qui accélèrent leur sédimentation et donc leur descente vers des étages où les gammes d'onde bleu-vertes dominant. Leur implantation pourrait s'effectuer, selon le courant de marée, à un niveau différent de leur zone d'origine. Dans cette optique, la sélection serait plutôt métapopulationnelle.

Dans les deux cas, si les conditions thermiques sont peu clémentes, le jeune tétrasporophyte s'établit sous la forme d'un disque qui lui permet : d'une part, de résister aux attaques prédatrices ou mécaniques, d'autre part, d'augmenter le nombre des initiales, c'est-à-dire les frondes potentielles qui apparaîtront après le retour à une température plus élevée.

II. - ETUDES AU LABORATOIRE

De par sa situation marégraphique, *Gracilaria verrucosa* est soumise à l'influence de divers facteurs biologiques et physiques qui conditionnent le phénomène d'émission des carpospores ainsi que leur devenir.

Dans la nature, les carposporophytes d'un même thalle émettent leurs spores de façon asynchrone et progressive, de la base vers le sommet des frondes. Le fonctionnement, identique pour tous, comporte trois étapes étalées sur plusieurs semaines :

- une phase de démarrage pouvant durer jusqu'à 6 jours ;
- une phase de fonctionnement optimal durant laquelle l'émission des spores se déroule suivant les cycles lunaires mais dépend des conditions de milieu ;
- une phase de dégénérescence du cystocarpe au cours de laquelle l'émission des spores ralentit.

Au Laboratoire, le carposporophyte, la carpospore et le jeune tétrasporophyte se comportent différemment selon les paramètres du milieu.

A. - Emission des carpospores

Le passage de l'agitation au calme accélère la libération des spores. La fragmentation du thalle porteur supprime la phase de démarrage, mais la quantité de cellules émises et le temps de libération sont augmentés.

Une brusque variation de température ne perturbe pas l'émission des spores ; par contre, un changement prolongé de conditions thermiques entraîne son accélération, quand la température s'accroît, et son ralentissement quand la température s'abaisse. Une température proche du gel arrête le fonctionnement du cystocarpe ; ce blocage est réversible puisqu'un retour à des températures plus favorables (comprises entre 18 et 22°C environ) provoque la réactivation des assises génératrices de carpospores.

Une période obscure de quelques heures ne modifie pas le rythme de libération des spores mais le brusque passage de l'obscurité à la lumière en augmente la vitesse.

B. - La carpospore

Dans un milieu calme, les carpospores sédimentent en quelques heures. Celles qui sont issues de carposporophytes "isolés" par fragmentation du thalle sédimentent et se fixent plus rapidement sur le substrat.

Le facteur lumière joue un rôle essentiel sur le comportement de la carpospore. Ainsi, une spore émise à l'obscurité sédimente mal, même une fois transférée sous la lumière blanche. A l'inverse, une spore émise en lumière blanche conserve toutes ses potentialités, même placée à l'obscurité. Nées à la lumière blanche puis exposées quelques heures à des éclairements vert ou rouge, les carpospores sédimentent mieux que les témoins. A l'obscurité, défavorable à la sédimentation, une température basse permet néanmoins à la spore de survivre quelques jours.

C. - Le jeune tétrasporophyte

Le type de lumière, qui a été appliqué à la carpospore dans les heures qui ont suivi sa libération, influe sur le rythme des premières divisions, la viabilité et le développement ultérieur du jeune tétrasporophyte. Une libération à l'obscurité est suivie d'un mauvais développement, tandis qu'une libération à la lumière blanche augmente le taux de division si les spores sont ensuite soumises à des éclairements violet, bleu, vert ou rouge. Les bandes d'onde rouges accélèrent l'induction des frondes qui s'effectue en quelques jours, alors que les autres gammes d'onde et la lumière blanche la ralentissent (un mois de délai). Toutes les radiations, sauf le jaune, favorisent la viabilité.

Une température basse gêne l'apparition des frondes mais optimise le développement du disque basal.

III. - APPLICATIONS POSSIBLES AU NIVEAU DES PRATIQUES CULTURALES

Nous avons pu mettre au point des pratiques culturales permettant d'augmenter la production de carpospores par fragmentation des thalles à cystocarpes, transfert d'un milieu agité à un milieu calme, de l'obscurité à la lumière (fig. 26). Placées ensuite sous un éclairement riche en bandes d'ondes rouges, les spores sédimentent, se fixent et se divisent rapidement. Cultivées ensuite sous de la lumière blanche et dans

des conditions thermiques favorables, les "morula" donnent des frondes en quelques jours. Dans ces conditions, le disque basal est quasi-inexistant et des cultures flottantes agitées sont envisageables. Pour obtenir des cultures fixées (sur filin, par exemple), il suffira de soumettre les spores nouvellement libérées à des radiations bleu-vertes qui leur feront produire un grand disque basal. Enfin, l'utilisation des basses températures permet le stockage des stades discoïdes, lesquels occupent un volume faible et requièrent un minimum de soins.

Ainsi, l'étude du carposporophyte et de la libération des spores met en évidence l'intérêt de cette génération diploïde spécifique des algues rouges. Les nombreuses carpospores qui multiplient le génôme du zygote à des milliers d'exemplaires en donnant des individus diploïdes aptes à la colonisation, peuvent être le point de départ de cultures industrialisées. Les travaux actuellement en cours sur les spores haploïdes compléteront nos connaissances des différentes stratégies de reproduction de **Gracilaria verrucosa**. L'analyse de la biologie des populations de cette espèce, la maîtrise de son cycle sexué et la sélection des individus productifs devraient conduire ultérieurement à l'affinement des pratiques culturales.

LIBERATION DES CARPOSPORES

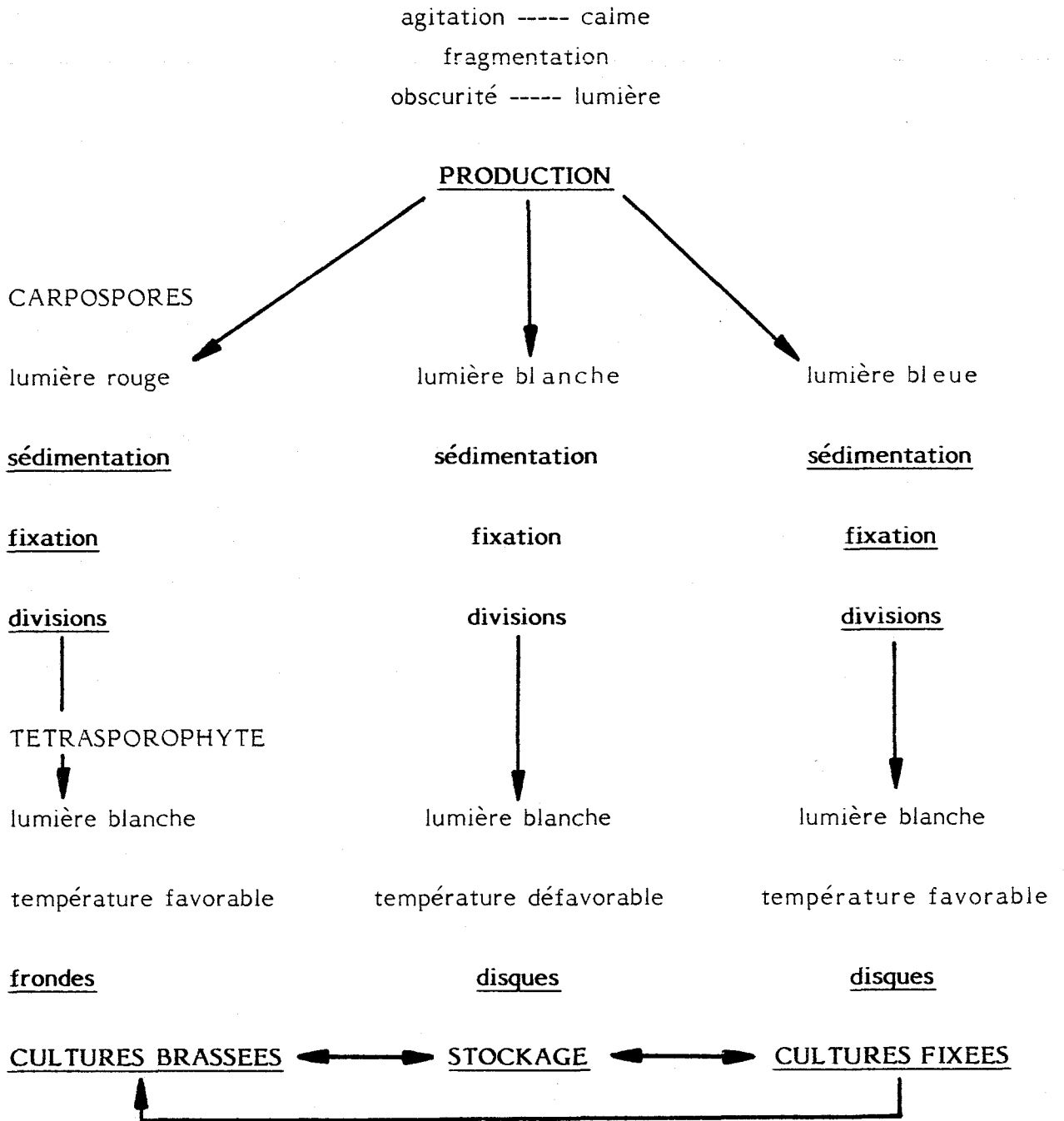


Figure 26 - Résumé des méthodes pouvant être utilisées pour l'obtention et la mise en culture d'un grand nombre de jeunes tétrasporophytes.

B I B L I O G R A P H I E

- BEER S. et I. LEVY
Effects of photon fluence rate and light spectrum composition on growth, photosynthesis and pigment relations in *Gracilaria* sp.
J. Phycol., 1983, 19 (4) : 516-522.
- BINGHAM S.E. and J.A. SCHIFF
Conditions for attachment of single cells released from mechanically-disrupted thalli of *Prasiola stipitata* Suhr.
Biol. Bull., 1973, 145 : 425.
- BIRD N.
Studies on *Gracilaria* : ecology of an attached population of *Gracilaria* sp. at Barrachois harbour, Colchester Co., N.S.
Proc. N.S. Inst. of Sci., 1974-76, 27 : 144-158.
- BIRD N., J. McLACHLAN and D. BRUND
Studies on *Gracilaria*. 5 - In vitro life history of *Gracilaria* sp. from the maritime provinces.
Can. J. Bot., 1977, 55 : 1282-1290.
- BIRD C.J. and J. McLACHLAN
Taxonomy of *Gracilaria* : evaluation of some aspects of reproductive structure.
Hydrobiologia, 1984, 116/117 : 41-46.
- BODARD M.
Réflexions sur les cultures d'Algues rouges à partir de boutures.
Bull. Soc. Phycol. Fr., 1973, 18 : 20-29.
- BOILLOT A.
Recherches sur le mode de développement des spores et la formation de la fronde adulte chez les Champiacées (Rhodophycées, Rhodyméniales).
Rev. Gén. Bot., 1961, 68 : 686-718.
- BONEY A.D.
The liberation and dispersal of carpospores of the red alga *Rhodymenia pertusa* (Postels et Rupr.) J. Ag.
J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1978, 32 : 1-6.
- BONEY A.D.
Mucilage : the ubiquitous algal attribute.
Br. Phycol. J., 1981, 16 (2) : 115-132.
- CASSIE R.M.
Some uses of probability paper in the analysis of size frequency distributions.
Austr. J. Mar. and Fr. Water, 1954, 5 : 513-522.
- CHAMBERLAIN A.H.L. and L.V. EVANS
Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*.
Protoplasma, 1973, 76 : 139-159.
- CHARTERS A.C., M. NEUSHUL and D.A. COON
Effect of water motion on algal spore attachment.
7th Int. Seaweed Symp., Sapporo Univ. Tokyo Press, 1972, p. 243-247.
- CHARTERS A.C., M. NEUSHUL and D.A. COON
The effect of water motion on algal spore adhesion.
Limnol. and Oceanogr., 1973, 18 (6) : 884-896.
- CHEMIN M.E.
Le développement des spores chez les Rhodophycées.
Rev. Gén. Bot., 1937, 49 : 205-234, 353-374, 424-448.
- CHEN L.C.M. and J. McLACHLAN
The life history of *Chondrus crispus* in culture.
Can. J. Bot., 1972, 50 : 1055-1060.

- CHEN M. and G. REN
Studies on the culture of sporelings of *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss.
I - The process of germination of spores.
11th Int. Seaweed Symp., Chine, 1983, in press.
- CHOWDARY Y.B.K. and G. JOSE
Effect of red and far-red light on the germination of swarmers of *Trentepohlia effusa* (Kremp.) Hariot.
Biochem. Physiol. Pflanzen, 1978, **173** : 377-380.
- COON D.A., M. NEUSHUL and A.C. CHARTERS
The settling behavior of marine algal spores.
7th Int. Seaweed Symp., Tokyo Univ. Press, 1972, p. 237-242.
- COUVET D., P.H. GOUYON, F.*KJELLBERG, I. OLIVIERI, D. POMENTE et G. VALDEYRON
De la métapopulation au voisinage : la génétique des populations en déséquilibre.
Comm. pers., 1985, sous presse.
- DION P.
Etude biologique de *Gigartina stellata* (Stackhouse) Batters et de *Petrocelis cruenta* J. Agardh (Rhodophycées, Gigartinales).
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université P. et M. Curie, Paris VI, 1979, 72 p.
- DIXON Ph.D.
Growth and reproduction in red algae in relation to light and dark cycles.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1970, **175 (2)** : 763-780.
- DUBOIS-TYLSKI T., R. JACQUES et L. LACOSTE
Action des radiations monochromatiques sur la multiplication végétative et la sexualisation du *Closterium moniliferum* (Bory) Ehrog.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1973, série D, **276** : 1165-1168.
- DUCHER M., M. LARPENT-GOURGAUD et J.P. LARPENT
La notion de photopériodisme chez trois Chlorophycées et une Rhodophycée.
Nova Hedwigia, 1975, **26** : 373-383.
- EDELSTEIN T., L.C.M. CHEN and J. McLACHLAN
Studies on *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) : reproductives structures.
J. Phycol., 1978, **14** : 92-100.
- GALE W.F.
Ultrasonic removal of epilithic algae in a bar-clamp sampler.
J. Phycol., 1975, **11 (4)** : 472-473.
- GODIN J.
Biologie des *Laurencia* du littoral boulonnais.
Thèse d'Etat, Université de LILLE I, 1985, 260 p.
- HUGH D.J.
Marine phycoculture and its impact on the seaweed colloid industry.
Hydrobiologia, 1984, **116/117** : 351-354.
- JONES W.E.
The growth and fruiting of *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss.
J. Mar. Biol. Ass. U.S., 1959a, **38** : 47-56.
- JONES W.E.
Experiments on some effects of certain environmental factors in *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss.
J. Mar. Biol. Ass. U.K., 1959b, **38** : 153-167.

- KIM D.H.
Economically important seaweeds, in Chile. I - **Gracilaria**.
Bot. Mar., 1970, **XIII** : 140-162.
- KLING R.
Action des métaux et de diverses lumières colorées sur le **Gracilaria verrucosa** (Hudson) Papenfuss (Gigartinales, Gracilariacées).
Soc. Phycol. de France, 1974, **19** : 49-65.
- KLING R., M. BODARD
Les néoformations chez les Algues rouges.
Soc. Phycol. de France, 1974, **19** : 31-35.
- KLING R.
Recherches des conditions optimales de croissance de **Gracilaria verrucosa** (Hudson) Papenfuss (Gigartinales, Gracilariacées).
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université de Lille I, 1978, 157 p.
- KYLIN H.
Die Florideenordnung Gigartinales.
Lund. Univ. Arssk., 1932, **2-28 (8)** : 20-61.
- LAOKOLE A.
Essais de caractérisation des sexes et des générations de **Gracilaria verrucosa**.
D.E.A., Université de Lille I, 1985, 47 p.
- LARPENT J.P. et R. JACQUES
Croissance, chlorophylles et phytochrome chez le **Draparnaldia mutabilis** (Roth) Cedergen cultivé en radiations monochromatiques.
C. R. Acad. Sci Paris, 1972, série D, **274** : 1297-1299.
- LARPENT-GOURGAUD M., J.P. LARPENT et R. JACQUES
Action de quelques radiations monochromatiques sur la croissance du thalle d'une Rhodophycée.
C. R. Acad. Sc. Paris, 1972, **274** : 2988-2990.
- LARPENT-GOURGAUD M. et M. DUCHER
Isolement et identification des bactéries contaminantes d'une espèce de Rhodophycées : **Acrochaetium** sp. Essais d'obtention de cultures axéniques.
Bull. Soc. Phycol. Fr., 1977, **22** : 35-40.
- LITTLER M.M. and D.S. LITTLER
Heteromorphic life-history strategies in the brown alga **Scytosiphon lomentaria** (Lyngb.) Link.
J. Phycol., 1983, **19 (4)** : 425-431.
- LOISEAUX S. et C. ROZIER
Culture axénique de **Pylaiella littoralis** (L.) Kjellm. (Phéophycées).
Rev. Algol., 1978, N.S., **13 (4)** : 333-340.
- LUNING K. and M.J. DRING
Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of **Laminaria saccharina** grown in blue and red light.
Mar. Biol., 1975, **29** : 195-200.
- McLACHLAN J. and T. EDELSTEIN
Life history and culture of **Gracilaria foliifera** (Rhodophyta) from South Devon.
J. Mar. Biol. Ass. U.K., 1977, **57** : 577-586.
- MSHIGENI K.E. and W.S.M. LORRI
Spore germination and early stages of development in **Hypnea valentiae** (Turner) Montagne (Rhodophyta, Gigartinales).
Bot. Mar., 1977, **20 (6)** : 381-383.

- NGAN Y. and I.R. PRICE
Systematic significance of spore size in the Florideophyceae (Rhodophyta).
Br. Phycol. J., 1979, 14 : 285-303.
- NGAN Y. and I.R. PRICE
Periodicity of discharge in tropical Florideophyceae (Rhodophyta).
Br. Phycol. J., 1983, 18 : 83-95.
- OGATA E., T. MATSUI and H. NAKAMURA
The life cycle of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae, Gigartinales) *in vitro*.
Phycologia, 1972, 11 (1) : 75-80.
- OKUDA T. and M. NEUSHUL
Sedimentation studies of red algal spores.
J. of Phycol., 1981, 17 : 113-118.
- OLIVEIRA J.C.
Recherches sur le développement et les organes reproducteurs des *Gracilaria* de la Manche.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Faculté des Sciences de Paris, 1968, 49 p.
- OLIVEIRA L., D.C. WALKER and T. BISALPUTRA
Ultrastructural, cytochemical and enzymatic studies on the adhesive "plaques" of the brown algae *Laminaria saccharina* and *Nereocystis luetkeana*.
Protoplasma, 1980, 104 (1-2) : 1-15.
- OLIVIERI I. and P.H. GOUYON
Seed dimorphism for dispersal : theory and observations.
Comm. pers., 1984, in press.
- OZA R.M.
Studies on Indian *Gracilaria*. I - Carpospore and tetraspore germination and early stages of development in *Gracilaria corticata* J. Ag.
Bot. Mar., 1975, 18 : 199-201.
- PENNIMAN C.A.
Ecology of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the great bay estuary, New Hampshire.
Thesis Univ. New Hampshire, 1983, 73 p.
- POLNE M., A. GIBOR and M. NEUSHUL
The use of ultrasound for the removal of macro-algal epiphytes.
Bot. Mar., 1980, 23 : 731-734.
- RAO M.U.
Spore liberation in *Gracilaria corticata* J. Agardh growing of Mandapam.
J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1976, 21 : 91-98.
- RAO U. and G. SUBBARANGAIAH
Effects of environmental factors on the diurnal periodicity of tetraspores of some Gigartinales (Rhodophyta).
10th Int. Seaweed Symp., Ed. W. de Gruyter and Co, Berlin, N.Y., 1981, p. 209-214.
- RIETEMA H. and A.W.O. KLEIN
Environmental control of the life cycle of *Dumontia contorta* (Rhodophyta) kept in culture.
Mar. Ecol., 1981, 4 : 23-29.
- RUENESS J.
A note on development and reproduction in *Gigartina stellata* (Rhodophyceae, Gigartinales) from Norway.
Br. Phycol. J., 1978, 13 : 87-90.

- SAWADA T.
Studies on the carpospore liberation in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss.
III - Carpospore liberation not accompanied with the drying.
Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 1958, 16 : 387-396.
- SAWADA T., S. KOGA and S. UCHIAYAMA
Some observations on carpospore adherence in *Polysiphonia japonica* Harvey.
Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 1972, 26 (1-4) : 223-226.
- SEARLES R.B.
The strategy of the red algal life history.
Amer. natur., 1980, 115 : 113-120.
- SEGAWA S., E. OGATA and T. SAWADA
Studies on the carpospore liberation in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss.
I - Carpospore liberation accompanied with the half-drying.
Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 1955a, 15 : 235-243.
- SEGAWA S., E. OGATA and T. SAWADA
Studies on the carpospore liberation in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss.
II - On the mechanism of carpospore liberation.
Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 1955b, 15 : 245-254.
- SIMONETTI G., G. GIACCONE and S. PIGNATTI
The seaweed *Gracilaria confervoides*, an important object for autoecologic and cultivation research in the northern Adriatic sea.
Helgol. Wiss. Meers., 1970, 20 : 89-96.
- SJOESTEDT L.G.
Floridean studies.
Lund. Univ. Arssk., NF II, 1926, 2-22 (4) : 1-95.
- STOKKE K.
The red alga *Gracilaria verrucosa* in Norway.
Nytt. Mag. Bot., 1957, 5 : 101-111.
- SUTO S.
Studies on shedding, swimming and fixing of the spores of seaweeds.
Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 1950, 16 : 1-9.
- TRONO G.C. Jr. and R. AZANZA-CORRALES
The seasonal variation in the biomass and reproductive states of *Gracilaria* in Manila Bay.
10th Int. Seaweed Symp., De Gruyter and Co., Berlin-N.Y, 1981, 743-748.
- TSEKOS I. und S. KARATAGLIS
Der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Karposporen-Keimlingen der Rhodophyceae *Gracilaria confervoides* (L.) Gréville.
Bot. Mar., 1974, XVII : 223-226.
- TSEKOS I. and E. SCHNEPF
The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) : auxiliary cell, cystocarpic plant.
Flora, 1983, 173 : 81-96.
- TVETER E. and A.C. MATHIESON
Sporeling coalescence in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae).
J. Phycol., 1976, 12 : 110-118.
- UMEZAKI I.
Life histories in the Florideophyceae and their evolution.
Acta Phytotax. Geobot., 1977, 28 (1-3) : 1-18.

- WEST J.A. and E. CRUMP
The influence of substrate and spore concentration on spore survival and germination in *Gigartina agardhii* and *Petrocelis franciscana*, Rhodophyta. *J. Phycol.*, 1974, 10 (suppl.) : 12.
- ZOBELL C.E. and E.C. ALLEN
The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J. Bact.*, 1935, 29 : 239-251.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	2
RECOLTE DU MATERIEL ET CONDITIONS STANDARDS DE CULTURE	
A. - <u>Récolte du matériel</u>	3
B. - <u>Elimination nécessaire des épiphytes</u>	3
C. - <u>Conditions standards de culture</u>	3
1 - Milieu de culture	3
2 - Lumière	4
3 - Température	4
4 - Récipients de culture	4
CHAPITRE I	
PARTICULARITES BIOLOGIQUES DU MATERIEL EXPERIMENTAL	
I. - LE CYCLE SEXUE TRIGENETIQUE CARACTERISTIQUE DES RHODOPHYCEES ET SON INTERET	5
II. - CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET ANATOMIQUES DU TETRASPOROPHYTE ET DES GAMETOPHYTES MALES ET FEMELLES	5
A. - <u>Morphologie</u>	5
B. - <u>Anatomie</u>	5
1 - Le disque basal	5
2 - La fronde	8
III. - CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET ANATOMIQUES DE LA GENERATION CARPOSPOROPHYTIQUE	8
A. - <u>Localisation des rameaux carpogoniaux et fécondation des carpogones</u>	10
B. - <u>Formation du zygote diploïde et développement du gonimoblaste</u>	10
C. - <u>Le carposporophyte et la carpospore in situ</u>	10

D. - <u>Développement des structures annexes</u>	12
1 - Structure protectrice haploïde	12
2 - Les "filaments nourriciers", leur origine, leur fonction	12
E. - <u>Les sécrétions mucilagineuses</u>	13
1 - Origine et chronologie des sécrétions	13
2 - Le rôle du mucilage	13

CHAPITRE II

MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE OPTIMALE POUR LE NETTOYAGE DES THALLES

I. - LES ESSAIS PRELIMINAIRES	16
A. - <u>Traitement mécanique et résultat</u>	16
B. - <u>Traitement chimique et résultat</u>	16
C. - <u>Association d'un traitement chimique et d'un traitement aux ultrasons. Résultats</u>	19
II. - INTERET DU TRAITEMENT AUX ULTRASONS	20
A. - <u>Traitement des carposporophytes récoltés sur le terrain</u>	20
1 - Sonde à ultrasons	20
2 - Cuve à ultrasons	20
B. - <u>Traitement des tétrasporophytes obtenus au Laboratoire</u>	21

CHAPITRE III

RESULTATS ORIGINAUX SUR L'EMISSION ET LE COMPORTEMENT DES CARPOSPORES IN VITRO

I. - EMISSION DES CARPOSPORES MURES	22
A. - <u>L'émission naturelle et sa sensibilité à divers facteurs de l'environnement</u>	22
1 - Influence de facteurs physiques	22
a) Agitation	22
b) Lumière	24
c) Température	30
d) Conclusion	34

2 - Influence des facteurs biologiques	35
a) Position du cystocarpe sur le thalle support	35
b) Fragmentation du thalle	40
c) Discussion	43
d) Conclusion	46
B. - <u>La libération forcée des carpospores</u>	47
1 - Modalités expérimentales	47
a) Stérilisation de la surface des thalles	47
b) Obtention des spores	49
c) Mise en culture	49
2 - Résultats	50
a) Recherches des causes éventuelles de mortalité des spores	50
b) Facteurs de mortalité des "morula"	53
c) Conclusion	54
II. - <u>ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA CARPOSPORE IN VITRO</u>	55
A. - <u>Viabilité</u>	55
B. - <u>Taille</u>	56
C. - <u>Sédimentation</u>	56
D. - <u>Influence d'un facteur externe : la lumière et sa qualité, sur la sédimentation et la viabilité de la carpospore</u>	58
1 - Modalités expérimentales	59
2 - Résultats	61
a) Résultats préliminaires	61
b) Eclaircissements monochromatiques	62

CHAPITRE IV

RESULTATS ORIGINAUX SUR LE DEVELOPPEMENT DES JEUNES TETRASPOROPHYTES IN VITRO

I. - CONDITIONS DE VIABILITE DES INDIVIDUS	68
A. - Modalités expérimentales	68
B. - Résultats	68
C. - Discussion	70

II. -	CONDITIONS DU DEVELOPPEMENT - RESULTATS ET DISCUSSION ...	72
A. -	<u>Développement typique</u>	72
B. -	<u>Développement "atypique"</u>	76
1 -	Cellules surnuméraires	76
2 -	Accolements d'individus	76
3 -	Frondes libres	80
III. -	ANALYSE DE L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LE DEVELOPPEMENT DU JEUNE TETRASPOROPHYTE <u>IN VITRO</u>	82
A. -	<u>Rôle du substrat</u>	82
1 -	Modalités expérimentales	82
2 -	Résultats	83
a)	Comparaison entre deux types de boîtes de Pétri en polystyrène	83
b)	Comparaison entre boîtes de Pétri en pyrex et salières en demi-cristal	83
c)	Comparaison entre boîtes de Pétri en pyrex et en polystyrène "G.P."	83
d)	Comparaison entre lames-support en verre poli et dépoli	83
3 -	Conclusion	84
B. -	<u>Rôle de la lumière</u>	84
1 -	Modalités expérimentales	85
2 -	Résultats	86
a)	Résultats préliminaires	86
b)	Influence des éclaircissements monochromatiques appliqués aux carpospores, sur le développement des tétrasporephytes qui en sont issus	88
c)	Discussion à propos de l'influence du facteur lumière sur la carpospore et le tétrasporophyte	94
d)	Conclusion	97
C. -	<u>Influence de la température</u>	100
1 -	Modalités expérimentales	100
2 -	Résultats	100
3 -	Discussion	102

CONCLUSION

I. - ETUDES SUR LE TERRAIN	103
II. - ETUDES AU LABORATOIRE	104
A. - <u>Emission des carpospores</u>	104
B. - <u>La carpospore</u>	105
C. - <u>Le jeune tétrasporophyte</u>	105
III. - APPLICATIONS POSSIBLES AU NIVEAU DES PRATIQUES CULTURALES	105
 BIBLIOGRAPHIE	 108

TABLE DES TABLEAUX

Tab. 1 -	Suivi de la survie des carpospores, après différents temps de trempage des thalles support des cystocarpes, dans des solutions de mercryl	18
Tab. 2 -	Influence de la lumière sur le fonctionnement du carposporophyte, après une longue période obscure	29
Tab. 3 -	Production moyenne de carpospores par cystocarpes ; le thalle support étant fragmenté (morceaux) ou gardé entier	41
Tab. 4 -	Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les carposporophytes d'un même thalle. Les carposporophytes sont portés soit par une fronde entière (témoin), soit par des portions de frondes (AB, AD, 1d, 2b), ou bien ils sont isolés (1b, 2d)	45
Tab. 5 -	Suivi du devenir des carpospores obtenues par des méthodes de libération forcée, en milieu stérile (tubes-test) et milieu non stérile (tubes témoins). La gélose-test sert de repère pour la stérilité du milieu test	51
Tab. 6 -	Taux de sédimentation (%), au cours du temps, des carpospores obtenues à partir de frondes gardées entières ou morcelées	57
Tab. 7 -	Modifications de la vitesse de sédimentation et de la viabilité, en fonction des couleurs reconstituées par rapport à la lumière blanche fractionnée et à énergie égale, après un cycle photopériodique 12:12	62
Tab. 8 -	Taux de sédimentation de carpospores survivantes après un cycle photopériodique (12:12) de lumière monochromatique. Carpospores libérées à la LUMIERE blanche	63
Tab. 9 -	Taux moyens d'individus vivants et de carpospores sédimentées, issus de cellules libérées à l'obscurité (O) ou à la lumière (L) et ayant subi différents éclairagements monochromatiques	65
Tab. 10 -	Taux moyen de viabilité des individus issus de cystocarpes isolés ou portés par des frondes entières	70
Tab. 11 -	Coefficients d'accroissement des taux de division et des tailles moyennes des individus ayant initialement subi un éclairagement monochromatique avec une énergie équivalente à celle qu'ils auraient reçue en lumière blanche pour la même couleur	88
Tab. 12 -	Modifications du taux de viabilité des individus ayant initialement subi un éclairagement monochromatique avec une énergie équivalente à celle qu'ils auraient reçue en lumière blanche pour la même couleur	93

TABLE DES FIGURES

Fig. 1 - Cycle trigénétique de <i>Gracilaria verrucosa</i>	6
Fig. 2 - Coupe transversale de fronde de <i>Gracilaria verrucosa</i>	9
Fig. 3 - Cystocarpe de <i>Gracilaria verrucosa</i>	11
Fig. 4 - Méthodes utilisées pour le nettoyage de la surface des thalles	17
Fig. 5 - Protocole utilisé pour l'étude de l'influence sur la libération des spores, du passage de l'agitation au repos	23
Fig. 6 - Protocole utilisé pour la mise en évidence de l'influence de la lumière sur l'émission des spores, après une courte période obscure	26
Fig. 7 - Modifications de la libération des spores	27
Fig. 8 - Protocoles utilisés pour la mise en évidence de l'influence de chocs thermiques à la lumière ou à l'obscurité, sur la libération naturelle des carpospores	32
Fig. 9 - Protocole utilisé pour la mise en évidence de l'influence de la position du cystocarpe et de la fragmentation du thalle support, sur le fonctionnement du carposporophyte	36
Fig. 10 - Histogrammes de fréquence relative de spores libérées, au cours du temps, par des carposporophytes portés par des frondes gardées entières (T) ou sectionnées (AB : partie basale ; AD : partie distale)	38
Fig. 11 - Méthode de CASSIE (1954) appliquée au temps et à la quantité de spores libérées par l'ensemble des carposporophytes de la partie distale (AD) de la fronde A	39
Fig. 12 - Fréquences relatives cumulées de libération des spores au cours du temps	42
Fig. 13 - Histogrammes des fréquences relatives de carpospores libérées par l'ensemble des carposporophytes de portions de frondes au cours du temps	44
Fig. 14 - Protocole utilisé pour la libération forcée	48
Fig. 15 - Protocoles utilisés pour la mise en évidence de l'influence de la qualité de la lumière sur la sédimentation et la viabilité des carpospores de <i>Gracilaria verrucosa</i>	60
Fig. 16 - Taux de viabilité (V) et de sédimentation (S) des carpospores en fonction de la longueur d'onde des radiations	64
Fig. 17 - Protocole utilisé pour le suivi du devenir des tétrasporophytes issus des carpospores	69

Fig. 18 - Courbes de décroissance de la viabilité et de la sédimentation des individus, au cours du temps	71
Fig. 19 - Développements atypiques de tétrasporophytes : cellules surnuméraires et frondes libres	77
Fig. 20 - Méthode de calcul du taux de segmentation des individus fixés, après 24 h de culture	85
Fig. 21 - Aspect des tétrasporophytes après un mois de culture en lumière "jaune" ou "bleue"	87
Fig. 22 - Courbes des taux de division des individus en fonction des bandes d'onde initialement reçues	90
Fig. 23 - Courbes de taille moyenne des individus (jeunes tétrasporophytes) après 10 jours et 1 mois de culture	91
Fig. 24 - Influence du facteur lumière sur la sédimentation, la viabilité et les premières divisions de la carpospore de <i>Gracilaria verrucosa</i> , puis sur le devenir du tétrasporophyte qui en est issu	95
Fig. 25 - Courbes d'absorbance des pigments de <i>Gracilaria verrucosa</i>	98
Fig. 26 - Résumé des méthodes pouvant être utilisées pour l'obtention et la mise en culture d'un grand nombre de jeunes tétrasporophytes	107

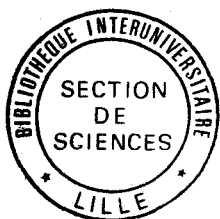


TABLE DES PLANCHES

Planche 1 - <i>Gracilaria verrucosa</i> . Thalle gamétophytique femelle fécondé. Echantillon du Muséum	7
Planche 2 - Carpospore fixée non divisée	73
Planche 3 - Tétrasporyte au stade 2 divisions	73
Planche 4 - Tétrasporyte au stade "morula"	74
Planche 5 - Tétrasporyte au stade 1ère fronde	74
Planche 6 - Développement atypique de tétrasporytes : accolements d'individus	78
Planche 7 - Culture à basse température (+ 8°C) de tétrasporytes	101



**"Comportement, en cultures expérimentales,
des deux générations diploïdes
du Gracilaria verrucosa (Hudson) Papenfuss :
le carposporophyte à carpospores et
le tétrasporophyte immature.**

Résumé

Gracilaria verrucosa est une Rhodophycée marine exploitée dans de nombreux pays (HUGHS 1984) pour l'extraction d'agar (KIM 1970). Paradoxalement, sa biologie reste mal connue. Nos travaux portent sur la génération carposporophytique qui présente l'avantage de multiplier le nombre potentiel de tétrasporophytes par l'intermédiaires de spores diploïdes, les carpospores.

Nous avons étudié l'effet des principaux facteurs auxquels est soumise cette algue dans son milieu naturel, pour cerner la biologie de sa reproduction au sein d'une population in situ et pour adapter les résultats obtenus in vitro à l'élaboration de pratiques culturales.

Le fonctionnement des carposporophytes d'un même thalle est asynchrone, mais identique avec la succession de 3 étapes dont l'une, dite de fonctionnement optimal, suit les cycles lunaires. La fragmentation des thalles à cystocarpes, le passage de l'agitation au calme, de l'obscurité à la lumière, augmentent la production de carpospores. Nous avons pu montrer que celles-ci, comme le thalle entier (KLINC 1978), répondent, grâce à leur appareil pigmentaire, aux stimulations lumineuses et, particulièrement, aux éclaircissements riches en bleus ou en rouges. Ces différents facteurs influent sur la libération et la sédimentation des carpospores qui peuvent se fixer soit rapidement autour des pieds parents, soit plus tardivement et plus loin.

On peut donc émettre des hypothèses sur le mode de reproduction et de sélection de la population : selon l'état de maturation du carposporophyte et le moment de libération de la carpospore, cette sélection peut être populationnelle ou métapopulationnelle.

En outre, l'étude de la biologie de la génération diploïde nous a permis de mettre au point des techniques pour obtenir un grand nombre d'individus. Selon les pratiques, ceux-ci seront soit des thalles fixés ou flottants, comportant un disque et une fronde, et rapidement exploitables, soit uniquement des disques à utiliser comme matériel de stockage.

Mots-clés : Gracilaria - Ecophysiologie - Rhodophycophyta - Cultures - Agarophyte - Carposporophyte - Biologie des Populations - Tétrasporophyte