

503  
19  
25

50376  
1986  
25

N° d'ordre : 673

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

NATURELLES

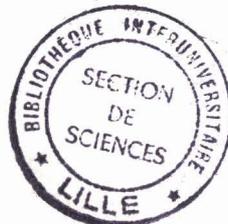
par

DANIEL CHRISTIAEN

STRUCTURES ET FONCTIONS DES POLYOSIDES MATRICIELLES  
DE LA PAROI DE GRACILARIA VERRUCOSA.

Membres du Jury : MM. MONTREUIL J.	Président
BODARD M.	Rapporteur
DEMARTY M.	Rapporteur
YAPHE W.	Rapporteur
JOSELEAU J.P.	Examineur
FOURNET B.	Examineur

Soutenue le : lundi 24 mars 1986



à EDITH

*pour MYRIEL  
et ALEXIS*

*Au terme de ce travail, je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.*

*Monsieur le Professeur BODARD en m'accueillant dans son laboratoire et en me confiant ce sujet, a su me donner l'autonomie nécessaire à l'efficacité de mes recherches.*

*Je voudrais remercier Monsieur le Professeur MONTREUIL qui a accepté de présider ce jury. Sa présence témoigne de l'intérêt qu'il a toujours manifesté aux problèmes des polysaccharides de la paroi des algues. J'en suis particulièrement honoré. Pour les mêmes raisons, ces remerciements s'adressent tout naturellement à Monsieur le Professeur FOURNET dont la compétence et les conseils ont guidé régulièrement notre réflexion.*

*Ma considération va tout entière à Monsieur YAPHE, de qui j'ai appris, lors de mon stage dans son laboratoire, des techniques et un savoir faire qui ont enrichi mes résultats. Sa gentillesse et sa grande compréhension s'ajoutent à ses qualités scientifiques qui font mon admiration. Ses critiques et ses commentaires m'ont fourni une aide appréciable tout au long de mon travail.*

*L'amical soutien de Monsieur DEMARTY m'a offert la référence scientifique permanente, bien au-delà de son parrainage CNRS. Je lui suis sincèrement reconnaissant de la confiance qu'il me fait en acceptant de suivre mes recherches.*

*La sympathie de Monsieur le Professeur JOSELEAU, souvent exprimée lors de différentes rencontres scientifiques, me touche d'autant plus que sa spontanéité à examiner ce manuscrit a été sans réserve. Je suis donc particulièrement sensible à sa présence dans le jury de cette thèse.*

*L'Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux, m'a donné le cadre, les moyens et l'ambiance indispensables pour mener à bien ce projet. Chacun se reconnaîtra dans ces remerciements mais je tiens à faire une mention particulière à Marie-Claire VERDUS à qui je dois la microscopie électronique et Henri MORVAN dont l'amitié et la complémentarité scientifique ont permis la création de l'Equipe.*

*Yannis KARAMANOS et Thierry STADLER sont les compagnons de route dont l'amitié m'est réconfortante.*

*Serge MOREAU, pour la RMN et Jean-François MAINGONNAT pour la viscosimétrie, m'ont fait bénéficier de leurs compétences scientifiques et techniques et je les en remercie.*

*La logistique administrative a été assurée par Catherine CHARLEY avec le sourire.*

*Je voudrais enfin exprimer ma gratitude à mes parents pour leur confiance et leur présence en ce moment privilégié.*

**TABLE DES MATIERES**

I<sup>ère</sup> PARTIE : GENERALITES ET POSITION DU SUJET

I - GRACILARIA VERRUCOSA .....	5
A - Position taxonomique .....	5
B - Répartition écophysiological .....	6
C - Composition chimique .....	8
II - L'AGAR .....	10
A - Biochimie .....	10
B - Variations quantitatives et qualitatives de l'agar .....	17
C - Propriétés physico-chimiques .....	21
1. Solide .....	21
2. Sol .....	21
3. Gel .....	22
4. Mécanisme de gélification .....	23
D - Variations des propriétés physico-chimiques .....	25
III - L'AGAR DANS LA PAROI CELLULAIRE .....	26
IV - ROLE DES POLYOSIDES MATRICIELS .....	28

II<sup>ème</sup> PARTIE : MATERIEL ET METHODES

I. - CONDITIONS GENERALES .....	31
A - Préparation des échantillons .....	31
B - Cultures .....	31
1. Conditions de croissance .....	31
2. Conditions de non-prolifération .....	32
C - Extraction de l'agar .....	32
II. - CONDITIONS PARTICULIERES .....	32
A - Recherche des facteurs limitants de la synthèse d'agar .....	32
1. La température .....	32
2. La lumière .....	33
3. Cultures alternées .....	33
C - Extraction fractionnées de l'agar .....	33
III - CONTROLES BIOCHIMIQUES .....	33
A - Dosages biochimiques .....	33
B - Spectroscopie Infrarouge .....	35
C - Chromatographie sur Couche Mince .....	35

D - Gel filtration .....	36
E - Chromatographie d'échange d'anions .....	36
F - Chromatographie en phase gazeuse .....	36
G - Spectroscopie RMN du C <sup>13</sup> .....	37
IV - ISOLEMENT DE PAROIS .....	37
V - CONTROLES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE .....	38
VI - MESURES DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ...	38
A - Forces de gel .....	38
B - Viscosimétrie .....	39
C - Taux de gonflement .....	39
<u>III<sup>ème</sup>PARTIE : ETUDE DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES DE DEVELOPPEMENT DE LA PAROI. - SYNTHESE D'AGAR -.</u>	
I - DESCRIPTION DE L'ETAT INITIAL .....	44
A - Rappels anatomiques .....	44
B - Cytologie .....	44
C - Ultrastructure de la paroi .....	47
D - Ultrastructure des parois après extraction de l'agar .....	52
II - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURES SUR L'ETAT STRUCTUREL DE LA PAROI ET DU CYTOPLASME .....	56
A - Le cytoplasme .....	56
B - Isolement de paroi .....	59
III - VARIATIONS DE LA PRODUCTION D'AGAR AVEC LA PHYSIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DU THALLE .....	61
A - L'agar en phase de croissance .....	61
1. La croissance .....	61
2. L'agar .....	61
B - L'agar en phase stationnaire de croissance .....	67
1. La phase stationnaire de croissance .....	67
2. L'agar .....	73
C - Facteur limitant la synthèse d'agar .....	73
1. Influence de la température .....	73
2. Influence de la lumière .....	79
D - Cycle de production-croissance .....	85
1. La croissance .....	85
2. Rendements en agar .....	85
Conclusion .....	88

IV<sup>ème</sup> PARTIE : SUIVI BIOCHIMIQUE DE LA SYNTHÈSE D'AGAR

Hypothèse .....	96
I - RAPPEL DES FAITS .....	96
A - Variations saisonnières .....	96
B - Séparations biochimiques .....	101
II - CULTURES CONTROLÉES .....	102
A - Fractionnement sur DEAE Séphadex A50 .....	102
B - RMN du carbone 13 .....	109
III - EXTRACTIONS FRACTIONNÉES .....	112
A - Variations quantitatives .....	112
B - Variations qualitatives .....	114
C - Conséquences ultrastructurales .....	125

V<sup>ème</sup> PARTIE : PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

I - FORCES DE GEL .....	136
II - VISCOSIMÉTRIE .....	136
III - TAUX DE GONFLEMENT .....	141
IV - RÔLE DE LA PAROI DANS LA RÉGULATION DE LA PRESSION OSMOTIQUE .....	142
A - Suivi microscopique .....	144
B - Rendements en agar .....	146

CONCLUSION GÉNÉRALE .....	150
---------------------------	-----

**TABLE DES FIGURES**

FIGURE 1 : Formule de l'agarobiose (d'après HIRASE et ARAKI 1954). . . . .	12
FIGURE 2 : Formule de l'agarose (d'après ARAKI 1958). . . . .	13
FIGURE 3 : Structures chimiques de l'agar-agar proposées par DUCKWORTH et YAPHE (1971). . . . .	15
FIGURE 4 : Mécanisme de gélicification de l'agarose, d'après REES (1969). . . . .	24
FIGURE 5 : Variations des rendements en agar (exprimés en % de matière sèche) et des teneurs de matière sèche (exprimées en % du poids frais), de <i>Gracilaria Verrucosa</i> , en fonction des saisons. . . . .	43
FIGURE 6 : Coupes transversales et longitudinale d'une fronde de <i>Gracilaria Verrucosa</i> (d'après KIM 1970). . . . .	45
FIGURE 7 : Ultrastructure de la paroi de <i>Gracilaria Verrucosa</i> . . . . .	57
FIGURE 8 : Diagramme des masses de matières fraîches, de matière sèche, d'agar et des sucres doses dans celui-ci, obtenu après culture de 10 g d'algues pendant 2 mois. . . . .	80
FIGURE 9 : Croissance pondérale de <i>Gracilaria Verrucosa</i> dans différentes conditions de température, d'éclairément et de photopériode. . . . .	81
FIGURE 10 : Variations de la matière sèche (en % du poids frais) des axes primaires et des ramifications, et du poids frais du thalle, en fonction du temps dans des conditions de culture alternée (18°C et 17 W.m <sup>-2</sup> puis 5°C et 5 W.m <sup>-2</sup> ). . . . .	86
FIGURE 11 : Variations de l'agar des axes primaires en valeur relative (en % de matière sèche) et en valeur absolue (en grammes) en fonction du temps dans les conditions de culture alternée (18°C et 17 W.m <sup>-2</sup> puis 5°C et 5 W.m <sup>-2</sup> ). . . . .	87
FIGURE 12 : Evolution des rendements en agar au cours du temps (2 jours, 8 jours, 15 jours, 1 mois) en régime alterné de culture (A : croissance puis non prolifération, B : non prolifération puis croissance). . . . .	90
FIGURE 13 : Evolution schématique de la matière fraîche, de la matière sèche et de l'agar de <i>Gracilaria Verrucosa</i> dans différentes configurations de culture. . . . .	91
FIGURE 14 : Evolution du poids frais, de la matière sèche et de l'agar de <i>Gracilaria Verrucosa</i> sur un cycle annuel. . . . .	93
FIGURE 15 : Variations saisonnières des poids de matière sèche et des rendements en agar chez <i>Gracilaria Verrucosa</i> , poids de matière sèche, rendements en agar. . . . .	97

FIGURE 16 : Variations saisonnières de la composition biochimique de l'agar chez <i>Gracilaria Verrucosa</i> . . . . .	97
FIGURE 17 : Comparaison de la teneur en 3.6 anhydrogalactose et de celle en sulfate avec la force de gels d'agar, extrait de thalles récoltés dans la nature. . . . .	100
FIGURE 18 : Fractionnement sur DEAE SEPHADEX A50 d'agars extraits de thalles récoltés dans la nature à différentes époques de l'année. . . . .	103
FIGURE 19 : Quantité de sucres totaux de 3.6 anhydrogalactose et des acides uroniques, des éluats d'agars chromatographies sur DEAE SEPHADEX A50 issus de thalles récoltés dans la nature à différentes époques de l'année. . . . .	104
FIGURE 20 : Histogrammes des quantités de sucres éluées sur colonne de DEAE SEPHADEX A50 après chromatographie de solutions d'agar issus de thalles en cultures contrôlées. . . . .	105
FIGURE 21 : Quantité de sucres totaux, de 3.6 anhydrogalactose, des éluats d'agars chromatographies sur DEAE SEPHADEX A50, issus de thalles cultivés sous diverses conditions. . . . .	108
FIGURE 22 : Spectres RMN $^{13}\text{C}$ de solutions d'agar issues de thalles cultivés dans différentes conditions (enregistré à 80°C avec 1589 balayages, largeur spectrale 12500 Hz, temps d'acquisition 0.655 s, délai de relaxation 1.5 s). . . . .	110
FIGURE 23 : Evolution des rendements en agar extrait à différentes températures de thalles cultivés en conditions contrôlées. . . . .	113
FIGURE 24 : Spectres infrarouges de films d'agars extraits à différentes températures, de thalles en cultures contrôlées. . . . .	115
FIGURE 25 : Chromatographie en couche mince de solutions d'agar extrait à différentes températures de thalles en cultures contrôlées. . . . .	116
FIGURE 26 : Chromatographie de gel filtration de solutions d'agar extrait à différentes températures. Fraction 20°C. . . . .	117
FIGURE 27 : Chromatographie de gel filtration de solutions d'agar extrait à différentes températures. Fraction 40°C. . . . .	118
FIGURE 28 : Chromatographie en phase gazeuse des fractions légères et lourdes de l'agar extrait dans l'eau à 40°C, séparées par gel filtration (G25), avant hydrolyse ou non par l'ATFA (4N, 4h). . . . .	119

FIGURE 29 : Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE SEPHADEX A50 de solutions d'agar extrait à 20°C (élution eau distillée, NaCl 3M, détection : phénol sulfurique). Fraction 20°C. ....	121
FIGURE 30 : Spectroscopie RMN <sup>13</sup> C de solutions d'agars extraits à différentes températures. A : Echantillon extrait à 40°C, B : Echantillon extrait à 60°C (Enregistré à 80°C, 29699 balayages, temps d'acquisition 0,655 s., largeur spectrale 10 000). ....	122
FIGURE 31 : Spectroscopie RMN <sup>13</sup> C de solutions d'agars extraits à différentes températures. A : Echantillon extrait à 80°C, B : Echantillon extrait à 100°C (Enregistré à 80°C, 46327 balayages, largeur spectrale 23809 Hz, temps d'acquisition 0,655 s.). ....	123
FIGURE 32 : Spectres RMN d'agar obtenus par extractions fractionnées. Echantillons 100°C, Fractions solubles dans l'éthanol 50 %. ....	124
FIGURE 33 : Spectre RMN <sup>13</sup> C d'échantillon d'agar extrait à 80°C de thalles cultivés en condition de croissance (A) et en non prolifération (Enregistré à 80°C, A : 4427 balayages, B : 46327, largeur spectrale 15151, temps d'acquisition 0,655). ....	126
FIGURE 34 : Viscosité apparente de gels d'agar à 1 % (p/v) à 60°C extraits de thalles cultivés en conditions contrôlées. Système cylindres co-axiaux. ....	139
FIGURE 35 : Viscosité apparente représentée en coordonnées logarithmiques d'un gel d'agar à 1 % (p/v) à 60°C extrait d'un thalle en croissance. ....	140
FIGURE 36 : Rendements en agar de thalles cultivés en conditions contrôlées, dans des milieux de concentrations salines différentes (0.3M en NaCl, eau de mer (EM), une fois et deux fois molaire en NaCl) après 6 heures et 6 jours de traitement. ....	147

**TABLE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1 : Culture de thalles en conditions de températures, de lumières et de photopériodes contrôlées. Résumé des conditions et symbolisations. ....	34
TABLEAU 2 : Variation des rendements en agar extrait de parois isolées, en fonction des conditions de culture. ....	60
TABLEAU 3 : Variation de la biomasse et de la matière sèche des axes primaires et des ramifications en conditions de croissance. ....	62
TABLEAU 4 : Variations nettes de la masse de matière fraîche, de la masse de matière sèche et des quantités d'eau des ramifications de thalles cultivés en condition de croissance. ....	63
TABLEAU 5 : Variations nettes de la masse de matière fraîche, de la masse de matière sèche et des quantités d'eau des axes primaires de thalles cultivés en condition de croissance. ....	64
TABLEAU 6 : Variation des rendements en agar et de sa qualité biochimique en condition de croissance des thalles. ....	65
TABLEAU 7 : Variations nettes des quantités de matière sèche, d'agar, de sucres totaux et de 3.6-anhydrogalactose de thalles en croissance. ....	66
TABLEAU 8 : Production d'agar et de matière sèche dans les ramifications en fonction du temps en condition de croissance. ....	68
TABLEAU 9 : Production d'agar et de matière sèche dans les axes primaires en fonction du temps en condition de croissance. ....	69
TABLEAU 10 : Variation de la biomasse et de la matière sèche des axes primaires et des ramifications en conditions de non prolifération. ....	70
TABLEAU 11 : Variations nettes de la masse de matière fraîche, de la masse de matière sèche et des quantités d'eau des axes primaires de thalles cultivés en condition de non prolifération. ....	71
TABLEAU 12 : Variations nettes de la masse de matière fraîche, de la masse de matière sèche et des quantités d'eau des ramifications de thalles cultivés en condition de non prolifération. ....	72
TABLEAU 13 : Variation des rendements en agar et de sa qualité biochimique en condition de non prolifération. ....	74
TABLEAU 14 : Production d'agar et de matière sèche dans les axes primaires en fonction du temps en condition de non prolifération. ....	75

TABLEAU 15 : Production d'agar et de matière sèche dans les ramifications en fonction du temps en condition de non prolifération. ....	76
TABLEAU 16 : Variations nettes des quantités de matière sèche, d'agar de sucres totaux et de 3.6-anhydrogalactose de thalles en condition de non prolifération. ....	77
TABLEAU 17 : Variation de la biomasse, de la matière sèche, des rendements en agar et de la qualité biochimique de celui-ci en fonction de la température de culture de <b>Gracilaria Verrucosa</b> (19 échantillons). ....	78
TABLEAU 18 : Variations de la biomasse, de la matière sèche et des rendements en agar en fonction des conditions de culture. ....	82
TABLEAU 19 : Variations des rendements en agar et de la qualité biochimique de celui-ci en fonction des conditions de culture de <b>Gracilaria Verrucosa</b> . ....	83
TABLEAU 20 : Variations en valeur absolue de la matière sèche et de l'agar en fonction des conditions de culture de <b>Gracilaria Verrucosa</b> . ....	84
TABLEAU 21 : Variations des rendements en agar et de la qualité biochimique de celui-ci en fonction du temps et des conditions de culture. ....	89
TABLEAU 22 : Teneurs en esters sulfatés, en acides uroniques, en 3.6-anhydrogalactose de l'agar en fonction des saisons. ....	99
TABLEAU 23 : Fractionnement d'agars extraits de thalles cultivés dans différentes conditions, sur DEAE SEPHADEX A 50. Quantité recueillie après chaque élution (en mg). ....	106
TABLEAU 24 : Attribution des signaux RMN C13 des spectres d'agar. ....	111
TABLEAU 25 : Forces de gels d'agar extraits de thalles cultivés sous différentes conditions de croissance (sol. 1 % p/v dans eau distillée). ....	137
TABLEAU 26 : Taux de gonflements de poudres sèches d'agar mises en solution dans des milieux de concentrations salines différentes. ....	143

**TABLE DES PLANCHES**

PLANCHE I	- Cellules du cortex. ....	46
PLANCHE II	- Organites cellulaires. ....	48
PLANCHE III	- Paroi du thalle adulte témoin. ....	49
PLANCHE IV	- Paroi après extraction de l'agar. ....	53
PLANCHE V	- Influence des conditions de culture sur l'état du cytoplasme et de la paroi. ....	58
PLANCHE VI	- Extractions fractionnées de l'agar. Conditions de croissance. ....	127
PLANCHE VII	- Extractions fractionnées de l'agar. Phase stationnaire de croissance. ....	129
PLANCHE VIII	- Extractions fractionnées de l'agar. Hautes températures. ....	130
PLANCHE IX	- Action de la pression osmotique. ....	145

## **INTRODUCTION**

L'étude de la paroi végétale subit actuellement une évolution conceptuelle qui amène les physiologistes à la considérer comme un organite cellulaire à part entière. Sa localisation à la périphérie du plasmalemme et sa structure fibrillaire l'ont conduite à être réduite, en premier lieu, à un simple rempart, limitant physiquement les expansions du volume cytoplasmique et assurant le maintien de la forme cellulaire.

Cependant, la matrice pariétale, phase amorphe dans laquelle baignent les fibres squelettiques, peut intervenir dans la régulation des équilibres biologiques entre le milieu extérieur et le cytoplasme. ALBERSHEIM et DARVILL (1985) en viennent à penser que la paroi des cellules végétales constitue une source abondante d'informations, eu égard à la complexité des polysaccharides qui la constitue. Leur équipe a en effet mis en évidence, ce qu'ils appellent des "oligosaccharines", sortes d'hormones ou substances de régulation commandant la croissance, la différenciation ou la défense de la plante contre les maladies.

Ces découvertes sont en fait le résultat de travaux, un peu partout dans le monde et en France, sur l'ultrastructure, la biochimie et la physico-chimie des parois des cellules végétales et leur rôle physiologique dans le développement des végétaux.

La localisation de la paroi à l'interface cellule milieu, fait en effet de celle-ci un compartiment privilégié, dans lequel un certain nombre d'échanges nutritionnels et informationnels s'effectuent. Cette nouvelle école de pensée a suscité un grand nombre de recherches qui permettent de comprendre les phénomènes de régulations ioniques et hydriques (DEMARTY et al. 1978, MORVAN C. 1977) et de régulations biochimiques, du type éliciteur (ESQUERRE TUGAYE et MAXAU 1974, MORVAN H. 1982).

Mais la plupart des résultats concernent les végétaux supérieurs. Or, les algues marines présentent, du point de vue physiologique, un intérêt particulier, dans la mesure où la forte amplitude des variations de leur milieu de vie implique des capacités adaptatives importantes. Le battement des marées modifie périodiquement l'ensemble des paramètres écophysologiques (température, lumière, pression osmotique, etc...) et exige une réponse modulée des organismes vivant dans cette zone pour contrebalancer, amortir ou s'opposer aux contraintes physico-chimiques

alternées qui s'exercent sur les cellules. La matrice mucilagineuse lui confère, à ce titre, des propriétés spécifiques susceptibles de compenser, au niveau du plasmalemme, les changements brusques des équilibres thermodynamiques. La paroi des algues marines constitue, pour ces raisons, un modèle particulièrement intéressant. Le faible degré de différenciation des tissus des thallophytes présente, en outre, l'intérêt de l'uniformité des réponses des cellules à l'évolution des contraintes du milieu.

**Gracilaria verrucosa** est une espèce algale largement distribuée dans la plupart des océans du globe. L'amplitude et la diversité des contraintes qu'elle doit supporter impliquent des facultés adaptatives importantes. Dans l'aire de récolte qui a servi à l'étude décrite dans ce mémoire, le milieu fortement contrasté dans lequel les thalles se développent traduit sa forte valence écologique. La Manche Orientale, d'où proviennent les échantillons étudiés est une région dont les paramètres climatiques (température et ensoleillement) sont fortement contrastés. Ces fluctuations induisent un rythme de croissance où alternent les thalles courts et trapus de l'hiver et les frondes longues et souples de l'été, sur lesquelles se différencieront les organes de reproduction. Ces formes biologiques affectent les structures pariétales des cellules selon les états de pérennisation et d'élongation.

Les algues marines se singularisent par l'importance quantitative de leurs parois cellulaires. KLOAREG (1984) estime de 30 à 50% la part de celles-ci par rapport à la masse sèche. Le squelette fibrillaire des parois baigne dans une phase matricielle, amorphe, dont la composition chimique fait l'originalité de l'espèce. La nature de ces phycocolloïdes est liée, en outre, à l'aire écologique où se répartissent les thalles (BODARD et al.1984) et à la physiologie de son développement. Les polysaccharides solubles qui constituent la phase matricielle interviennent pour 20 à 50% dans le bilan qualitatif. Leur importance pondérale et leur variabilité qualitative suggèrent un rôle physiologique non négligeable, susceptible d'intervenir dans les processus de régulation à court terme (régulations hydriques et ioniques), et à long terme (élongation cellulaire, pérennisation de l'espèce).

Chez les algues, la phase matricielle bénéficie, depuis longtemps, d'intenses recherches, car elle possède des propriétés gélifiantes qui intéressent l'industrie des colloïdes. Paradoxalement, le problème de leur production, n'a que rarement fait l'objet d'investigations en terme de physiologie de la paroi. Les polymères qui la constituent sont le plus souvent

des polysaccharides chargés (uroniques ou sulfatés), mais quelques espèces possèdent des polyosides neutres ou faiblement chargés. C'est le cas de l'agar des Gélidiales. La contribution de ce type de mucilage aux relations cellule-milieu fait appel à des mécanismes, physico-chimiques ou biologiques différents des alginates (polyuroniques) et des colloïdes sulfatés (Fucane, ascophyllane, porphyrane ou carraghénanes).

L'agar est l'un de ces mucilages, polysaccharidique, qui caractérise les Rhodophyceae de la famille des Gigartinales, représentées par *Gracilaria verrucosa* sur les côtes de la Manche orientale. Des variations saisonnières de la qualité et de la quantité de ce composé ont déjà été remarquées. Il est intéressant de vérifier si ces fluctuations, relevées par un certain nombre d'auteurs, sont en rapport avec les processus de croissance, d'échanges hydriques ou de résistance de l'algue à l'action de la houle. Dans ce cas, des conditions de cultures contrôlées sont susceptibles de reproduire les observations faites dans la nature.

Ces considérations amènent à poser les hypothèses de travail qui ont motivé cette étude.

En premier lieu, le passage d'une forme biologique à l'autre, au moment des changements de saisons, est vraisemblablement à l'origine de bouleversements pariétaux autorisant, soit la croissance, soit la pérennisation de l'espèce. Des marqueurs biochimiques caractériseraient alors l'un ou l'autre de ces états physiologiques.

L'étude présentée dans ce mémoire, a pour objectif, dans une première partie, de décrire l'évolution, à la fois quantitative et qualitative de l'agar dans la paroi de *Gracilaria verrucosa* par rapport au développement du thalle. S'il est possible de relier la qualité biochimique de l'agar à la croissance de l'algue, l'hétérogénéité de la molécule présentée par certains auteurs (DUCKWORTH et YAPHE 1971, IZUMI 1972), peut recouvrir des stades successifs dans la synthèse du colloïde. Chacune de ces étapes doit par conséquent être caractérisée par des fractions originales, qui seront autant de marqueurs de la réorganisation de la phase matricielle de la paroi. La seconde partie de ce mémoire présentera le fractionnement et la caractérisation des polymères de l'agar en fonction des conditions de leur production.

D'un autre point de vue, la structure primaire des colloïdes matriciels induit une conformation secondaire, dont les propriétés physico-chimiques expliqueraient l'adaptation des algues aux rigueurs de leur milieu de développement.

KLOAREG (1984) propose un modèle de compartimentation de la paroi des algues brunes qui présente les modes d'intervention de la paroi dans les phénomènes d'échanges entre le milieu extérieur et le cytoplasme. Ce modèle fait intervenir les charges fixes et libres dans les processus d'échanges cationiques. Ce modèle ne peut pas s'étendre au cas des polysides neutres ou faiblement chargés, tel que l'agar. Un autre système est donc à envisager. Dans une troisième partie, les propriétés physicochimiques consécutives aux modifications biochimiques de l'agar en fonction des états physiologiques de l'algue seront appréciées de manière à évaluer leurs rôles dans le fonctionnement de la paroi de *Gracilaria verrucosa*.

Il sera alors possible en conclusion de présenter un modèle global des propriétés de la matrice pariétale de cette espèce par rapport à son écophysiologie.

**GENERALITES ET POSITION DU SUJET.**

Le genre **Gracilaria**, largement distribué dans les océans du monde, est très utilisé comme source d'agar, un phycocolloïde gélifiant. Il convient donc de préciser, tout d'abord, sa position systématique de manière à définir l'espèce, dont l'appellation **verrucosa** est encore sujette à caution. D'après C. BIRD (1985, comm. pers.) l'espèce qui se développe en Manche est bien **Gracilaria verrucosa**.

L'étagement des algues, dans la zone de balancement des marées, traduit l'adaptation de ces végétaux à un environnement écophysologique particulier. Chaque espèce est, par conséquent, caractéristique du milieu dans lequel elle se développe. Sa composition chimique reflète cette adaptation et, à ce titre, la paroi et plus précisément la nature de la phase matricielle de la paroi peut constituer un marqueur.

**Gracilaria verrucosa** occupe une place originale sur l'estran, dans la mesure où elle se trouve rarement émergée. L'agar, par sa composition chimique, diffère notablement des autres phycocolloïdes. Ses propriétés chimiques et physiques sont donc spécifiques et justifient l'étude de leurs contributions dans la physiologie de la paroi cellulaire, par rapport aux modèles proposés pour les autres algues.

Cette première partie du mémoire se propose donc de situer la problématique de la nature biochimique et les propriétés physico-chimiques de l'agar dans la biologie et la physiologie de l'espèce.

## I - GRACILARIA VERRUCOSA.

### A - Position taxonomique

La situation taxonomique de **Gracilaria verrucosa** est toujours sujette à controverses, comme en témoigne l'histoire cahotique de son appellation dans la nomenclature scientifique à travers l'évolution de la systématique.

Une première description de l'espèce par DONATI (1780) apparaît sous le nom de **Ceramianthenum**. Avec l'avènement de la nomenclature binaire (LINNE 1753), HUDSON (1762) détermine deux espèces aux caractères morphologiques semblables à ceux du **Ceramianthenum** de DONATI : **Fucus verrucosa** et **Fucus confervoïdes**. C'est sous cette dernière appellation que

l'espèce sera désignée dans la deuxième édition du *Species Plantarum* de LINNE (1763). LAMOUREUX (1813) propose une vraie classification des algues qui le conduit à définir des genres nouveaux à l'intérieur du groupe des *Fucus*. GREVILLE (1830) nomme alors le *Fucus confervoïdes*, *Gracilaria* et AGARDH (1852) *Cordylecladia*. PAPENFUSS (1950) fixe enfin le statut de l'espèce sous le binôme *Gracilaria verrucosa*.

### B - Répartition écophysiological.

Les populations de *Gracilaria verrucosa* sont largement représentées du 60° de latitude nord au 40° de latitude sud, de l'Océan Atlantique à l'Océan Pacifique, en passant par l'Océan Indien (KLING 1978).

Sur les côtes de la France, le genre est représenté par neuf espèces, dont une seule, *Gracilaria verrucosa* (Huds) Papenfuss, se développe sur le littoral de la Manche orientale. Entre Boulogne et le Cap Gris-Nez, elle forme des populations qui prolifèrent entre les niveaux moyens et inférieurs de l'étage littoral, dans les anses et les cuvettes rocheuses ensablées, sur le fond desquelles les individus se fixent par un disque aplati.

L'étendue de l'aire de répartition de l'espèce dans le monde est due à son aptitude à supporter de fortes variations des facteurs écologiques.

KLING (1978) a noté, à partir des relevés effectués par GLACON (1977) à la Station Marine de Wimereux, les variations de température, de salinité, de pH, de lumière et d'hydrodynamie de l'eau de mer où sont récoltés les échantillons.

La salinité des eaux de surface oscille en moyenne entre 33‰ et 34‰, soit une faible variation. Cependant, à marée basse, sous la double action de la température et du vent, l'évaporation de l'eau des cuvettes qui maintiennent les thalles immergés, tend à augmenter la concentration en sels. A l'inverse, les précipitations diluent le milieu. Le caractère aléatoire du phénomène rend difficile la mesure, mais le volume des dépressions et la courte durée d'exposition limitent les conséquences osmotiques sur le végétal.

La température passe, en moyenne, de 6°C en hiver à 18°C en été, soit une amplitude très importante, responsable selon GEHU (1964) de la relative pauvreté de la flore algale de la côte boulonnaise.

Le pH est compris entre 7,9 et 8,1 et suit un cycle saisonnier, où les valeurs les plus élevées s'observent en été et les plus basses en hiver.

Les algues qui se développent dans la zone de balancement des marées des côtes du Nord de la France subissent, par le caractère fortement turbide des eaux - dû au plancton et à la mise en suspension de nombreuses particules argileuses - et en raison des fluctuations de la hauteur d'eau dans laquelle elles sont immergées, un régime d'éclairement très varié. Ces variations périodiques, à court terme, s'additionnent à celles, à plus long terme, dues à l'alternance des saisons qui affectent l'énergie incidente du rayonnement solaire. Des relevés mensuels font apparaître, en moyennes quotidiennes, un minimum de 7400 lux en février et un maximum de 50267 Lux en juin (BODARD et CHRISTIAEN 1978).

D'un point de vue hydrodynamique, la Gracilaire, en croissant dans les cuvettes de la zone battue de l'estran, est soumise aux efforts mécaniques conjugués de la houle et de la marée. Si l'intensité de cet effort s'annule lors des basses mers, elle est maximale lors du flux et du reflux, quand les vagues déferlent.

L'analyse sommaire des principaux facteurs écologiques, montre que *Gracilaria verrucosa*, se développe dans un milieu fortement contrasté, qui traduit l'adaptabilité de cette espèce, et qui confirme sa grande amplitude écologique.

Les thalles de Gracilaire prolifèrent dans nos régions sous la forme de longues frondes, dès le printemps et en été. Cette croissance coïncide avec l'augmentation de la température et de l'éclairement (CHRISTIAEN 1981). CONOVER (1958), BIRD (1975) et BIRD et al. (1977a) ont fait des observations semblables pour un certain nombre d'espèces de *Gracilaria*. De même, KIM et HUMM (1965) et CAUSEY et al. (1946) notent que la croissance de *G. foliifera* et de *G. verrucosa* se limite à la période de températures élevées. PENNIMAN (1983) trouve également une corrélation positive entre la température de l'eau et la croissance de *G. tikvahiae*. De la même façon, en culture, les températures inférieures à 12°C limitent

l'accroissement de biomasse (EDELSTEIN et al. 1976, BIRD et al. 1979). Par contre, LINDSAY et SAUNDERS (1980) et WHYTE et al. (1981) ont montré que la croissance est davantage corrélée à l'irradiance qu'à la température de l'eau de mer. En aquaculture, cependant, LAPOINTE et al. (1976) estiment qu'une telle relation peut s'établir soit avec la température soit avec la lumière. En fait, suivant que l'un ou l'autre facteur (température ou lumière) est optimal, l'évolution du végétal épousera plus étroitement les variations du paramètre limitant. Cette explication permet ainsi de comprendre les résultats de WHYTE et al. (1981) sur *Gracilaria verrucosa* et de LAPOINTE (1981) sur *G. foliifera* pour qui l'intensité lumineuse détermine la croissance des thalles.

L'azote inorganique en solution limite rapidement le développement des Gracilaires (PENNIMAN 1983). DEBOER et al. établissent à 1,0 - 1,5  $\mu\text{M}$  le seuil de saturation dans le thalle. Néanmoins, HANISAK (1982) estime que 2% est la concentration minimale en azote, en-dessous de laquelle le thalle devient carencé. LAPOINTE et RYTHER (1979) proposent la mesure du C/N pour déterminer les équilibres favorables à la croissance (C/N > 10 indique N limitant). PENNIMAN (1983) observe des variations très nettes de ce rapport selon un rythme saisonnier, sans que celui-ci puisse vraiment être relié à la croissance des thalles. De fait, LAPOINTE et TENORE (1981) nuancent l'intérêt de ce rapport, en limitant son application, en culture, aux faibles concentrations en azote.

### C - Composition chimique.

Un cycle annuel de l'évolution du poids de matière sèche chez *Gracilaria verrucosa* a été décrit par plusieurs auteurs (BIRD et al. 1977, HOFFMANN 1978, LAPOINTE et RYTHER 1979, CHRISTIAEN 1981, PENNIMAN 1983). La courbe qui traduit cette variation est en opposition de phase avec celle de la croissance saisonnière (exprimée en poids de matière fraîche). Les travaux de WHYTE et ENGLAR (1979b) et WHYTE et al. (1981) font état des mêmes phénomènes, mais, contrairement aux auteurs précédents, signalent des différences entre les thalles gamétophytiques et tétrasporophytiques.

Le contenu en cendres suit également un cycle saisonnier (WHYTE et ENGLAR 1976, 1979c, 1980b, HOFFMANN 1978, LAPOINTE et RYTHER 1979, LAPOINTE 1981). Chez *Gracilaria verrucosa* les valeurs atteintes (6,2 - 13%,

YANG 1982) sont sensiblement plus faibles que celles d'autres espèces (BIRD et al. 1977, PENNIMAN 1983). La relation entre croissance et teneur en minéraux est controversée et semble, a priori, dépendre des espèces considérées (LAPOINTE et RYTHER 1979, LAPOINTE 1981, PENNIMAN 1983).

La plupart des algues ont la propriété d'accumuler de l'azote inorganique intracellulaire (CHAPMAN et CRAIGIE 1977, ASARE 1979, ROSENBERG et RAMUS 1982a, GAGNE et al. 1982, BIRD et al. 1982), des composés azotés de faible poids moléculaire (LAYCOCK et CRAIGIE 1977, LAYCOCK et al. 1981, ROSENBERG et RAMUS 1982a) aussi bien que des protéines. Selon la méthode d'appréciation du contenu protéique (KJELDAHL, LOWRY), cette variété de produits de stockage est source de confusion. PENNIMAN (1983) décrit un cycle saisonnier de la teneur en protéines, élevée en hiver et basse en été. Cependant, le milieu particulièrement eutrophe de sa zone d'étude, conduit à surévaluer ses résultats, par rapport à ceux obtenus par d'autres auteurs (HOYLE 1978b, ASARE 1979, ROSENBERG et RAMUS 1982b) qui signalent cependant le même type d'évolution des quantités de protéines. BIRD et al. (1977) et PENNIMAN (1983) établissent une corrélation positive entre contenus en protéines et en sucres solubles sur *Gracilaria tikvahiae*, opposée à celle définie par CHRISTIAEN (1981) sur *Gracilaria verrucosa*. LINDSAY et SAUNDERS (1980) et CHRISTIAEN (1981) estiment à 3,5 - 4,0 % le contenu en réserves azotés de *Gracilaria verrucosa*.

La plupart des espèces du genre *Gracilaria* montre une variation saisonnière du contenu en agar (YOUNG 1974, HOYLE 1978a, 1978b, LINDSAY et SAUNDERS 1979, 1980, WHYTE et ENGLAR 1979a, 1981, ABBOT 1980, BIRD et al. 1981, YANG 1982). Les minima sont observés en été et les maxima en hiver. Cependant, DELOACH et al. (1946) et KIM et HUMM (1965) établissent une variation inverse. Les comparaisons entre les rendements en agar des différentes espèces sont limitées par la diversité des techniques d'extraction, les variations saisonnières, les différences d'extractibilité et les confusions possibles d'espèces. En particulier, le traitement alcalin utilisé dans certains protocoles d'extraction peut influencer les rendements en agar selon l'espèce utilisée (DURAIRTNAM et SANTOS 1981, YOUNG 1974, MATSUHASHI et HAYASHI 1972).

Les variations saisonnières des rendements en agar sont inversement corrélés au contenu protéique (HOYLE 1978b, DEBOER 1979, BIRD et al. 1981, CHRISTIAEN 1981). L'élévation de température ou de l'intensité lumineuse affecte négativement le contenu en agar (LIU et al. 1981, YANG 1982, PENNIMAN 1983, STADLER 1984). Par contre, JOHN et ASARE (1975) montrent une influence inverse, semblable à celle observée chez un certain nombre de carraghénophytes (RAMA RAO et KRISHNAMURTHY 1978).

## II - L'AGAR

### A - Biochimie

Ce sont des pêcheurs asiatiques qui ont découvert par hasard le produit gélifiant qui sortait des algues lors de la cuisson de leur repas de poissons. Les Malaisiens l'appelaient agar-agar, mais c'est sous le nom de "mousse de chine" qu'il fut présenté au général MORIN en 1856.

PAYEN (1859) en fit l'analyse élémentaire et proposa  $C_6H_{10}O_5$  comme formule globale, sous le nom scientifique de gélose. Il tenta alors de découvrir l'origine de cette substance, qu'il trouva chez une espèce marine appelée "algue de Java", ou *Gelidium corneum*. Il entreprit ensuite d'extraire la gélose des tissus de ce thalle, ce qu'il fit en les portant à ébullition dans l'eau. Le liquide, décanté, prend en gelée diaphane par le refroidissement.

La nature glucidique soupçonnée par PAYEN, fut précisée grâce aux travaux de BAUER (1884) qui identifia, dans les produits d'oxydation par l'acide nitrique, la présence d'acides galactarique et oxalique. L'agar fut, dès lors, considéré comme un galactane, et L'UDTKE (1929) confirma cette thèse en isolant du D-galactose par hydrolyse totale. Puis, PIRIE (1936) séparait, par acétolyse le D- d'un L-galactose dont l'existence fut vérifiée par HANDS et PEAT en 1938. L'hydrolyse de l'agar par les acides minéraux libère, outre le galactose, de l'acide lévulinique. Les travaux de PERCIVAL et al. (1938) permettent d'interpréter ce dernier comme le produit de dégradation du 3,6-anhydrogalactose.

Les ions sulfates, précipités avec le barium par NEUBERG et OHLE (1921), ont été attribués, par PERCIVAL (1944), à des groupements ester sulfonique, substituant un polysaccharide acide de l'agar. Ce polymère,

séparé par dialyse et remis en solution, ne forme plus de gel (PERCIVAL 1944). Ce composé correspond à la fraction chargée : "agaropectine" isolée, par acétylation, d'une fraction neutre : "agarose", (ARAKI 1937).

La méthanolyse d'un agar méthylé fait apparaître du 3,6-anhydro-2-O-méthyl-L-galactose, isolé sous forme de diméthyl acétal. ARAKI et HIRASE (1953) en déduisirent que le 3,6-anhydro-L-galactose est lié au D-galactose en C1 et C4. La perméthylation de l'agar hydrolysé par l'acide sulfurique à 6% (ARAKI et HIRASE 1953) révèle la présence de 2,4,6-tri-O-méthyl-D-galactose (65%) et de 3,6-anhydro-2,4-di-O-méthyl-L-galactose (13%). Ce résultat permet aux auteurs d'établir que les unités D-galactose se présentent sous la forme pyrane et sont liés en C1-C3. HIRASE et ARAKI (1954) proposent alors le D-galactopyranosyl-3,6-anhydro-L-galactose comme formule de l'agarobiose (Fig.1). ARAKI (1966) précisa que le peu d'ester sulfonique de l'agar était fixé sur le C6 du L-galactose, et que celui-ci pouvait constituer le précurseur du 3,6-anhydro-L-galactose. Le même disaccharide fut obtenu à partir du mucilage de *Gloiopeltis furcata* (HIRASE et al. 1958), par l'action d'une enzyme extraite de *Pseudomonas kyotensis*.

ARAKI et ARAI (1956) identifièrent un nouveau disaccharide : le néoagarobiose, issu de l'hydrolyse par l'enzyme extraite de *Pseudomonas kyotensis* et séparé par chromatographie sur colonne de charbon. Il s'agit d'un isomère de l'agarobiose : le 3,6-anhydro-L-galactosyl-D-galactose. A partir des travaux de ARAKI et ARAI (1957) qui isolèrent un tétrasaccharide par hydrolyse enzymatique, ARAKI (1958) suggéra que le polysaccharide de base de l'agar est un polymère linéaire : l'agarose, formé d'une combinaison de ces deux disaccharides comme unités de répétition (Fig.2). ARAKI (1969) propose la structure de l'agaropectine en montrant qu'elle serait composée des mêmes unités de répétition que l'agarose, mais le galactose sulfate remplacerait le L-galactose. Elle posséderait des résidus d'acide pyruvique. HIRASE (1957) avait, en effet, mis en évidence de l'acide pyruvique par chromatographie sur papier de l'hydrolysât d'un agar par l'acide dilué. Il démontra, par une dégradation contrôlée, que l'acide pyruvique faisait partie intégrante de la molécule et qu'il s'agissait du 3,6-anhydro-4-O-(4,6-(1-carboxyéthylidène) -  $\beta$ -D-galactopyranosyl)-L-galactose-di-méthyl-acétal, dont l'existence fut confirmée par YOUNG et al. (1971).

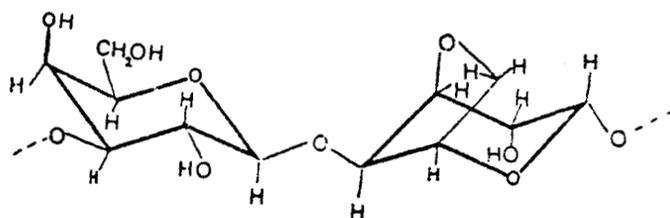


Fig. 1 : Formule de l' agarobiose  
3,6 anhydro-4-O-β-D-galactopyranosyl)-L-galactose  
d'après HIRASE et ARAKI (1954)

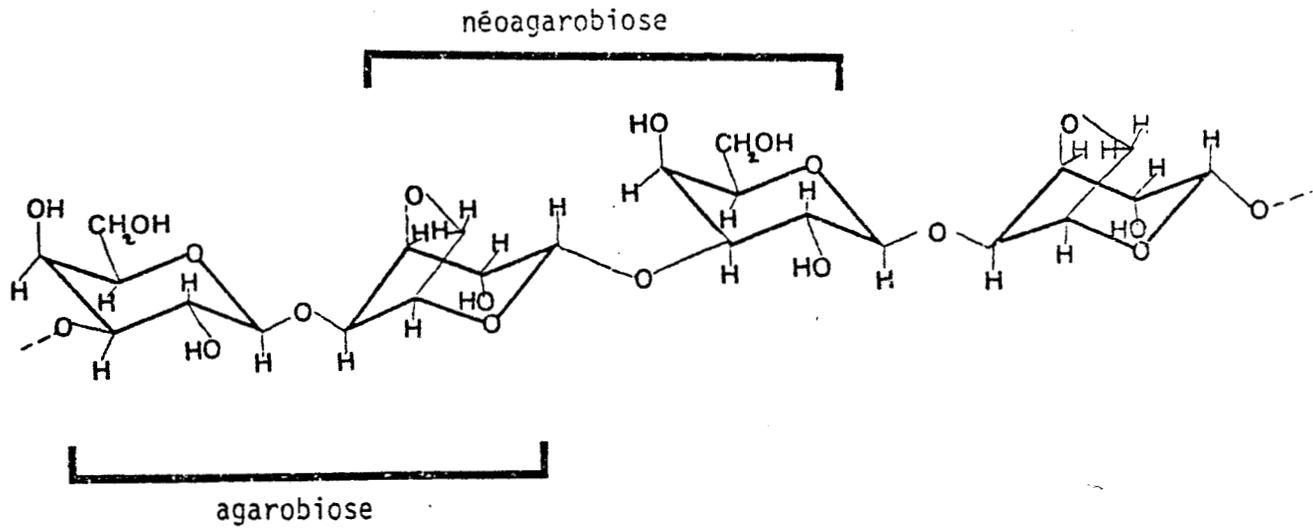
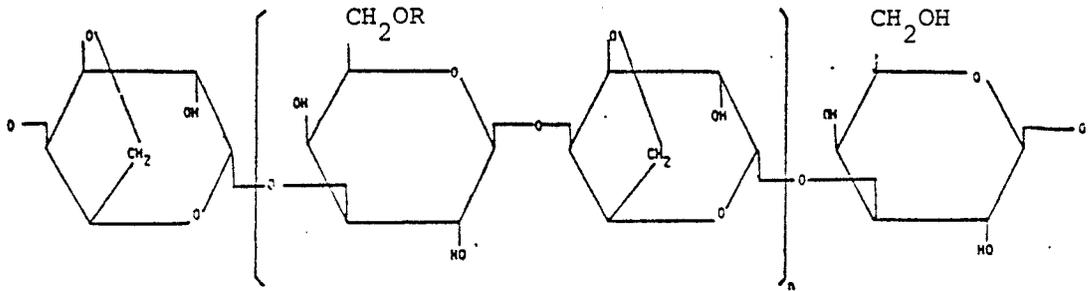


Fig. 2 : Formule de l' agarose  
d'après ARAKI (1958)

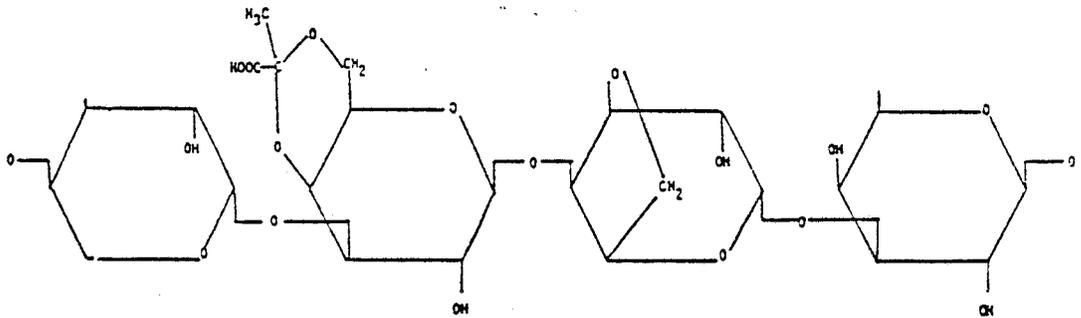
En 1957, le **Manual of Microbiological methods** définit pour la première fois l'agar : "l'agar est un phycocolloïde dérivé des Rhodophycées qui forme un gel entre 33 et 39°C et fond à 70°C". Mais YAPHE (1960) jugea cette définition insuffisante et proposa : "l'agar est un mélange de polysaccharides dérivés de certaines espèces agarophytes contenant l'unité agarose".

Les connaissances sur la molécule d'agar ont évolué depuis l'hypothèse des deux polysaccharides (neutre-chargé) émise par ARAKI (1937). Elle fut considérée comme une grossière simplification par DUCKWORTH et YAPHE (1971) qui ont séparé plus efficacement les polymères de l'agar, en utilisant les différences de solubilité des fractions en fonction de la température, puis en passant les produits sur DEAE cellulose. Par ces techniques, ils ont mis en évidence l'hétérogénéité de l'agar et montré qu'il est en fait substitué, à des degrés variables, par des groupements chargés : sulfoniques, et neutres : éther-méthyliques. IZUMI (1972) a obtenu cinq fractions de l'agar de **Gracilaria verrucosa**, par chromatographie sur DOWEX (1x2). L'analyse, montre que les éluats contiennent des proportions croissantes de galactose, d'acides uroniques et de résidus sulfatés, et des proportions décroissantes de 6-O-méthyl-galactose et de 3,6-anhydrogalactose dans l'ordre d'élution de la colonne. La somme des contenus molaires en anhydrogalactose et en résidus sulfates de toutes les fractions s'élève approximativement à la moitié du contenu molaire en hexoses totaux. IZUMI (1970) suggérait déjà que l'agar était une famille de polysaccharides, variant entre deux extrêmes de macromolécules : l'une, formée de galactose non sulfaté, plus ou moins méthylé, composé de séquences répétées d'agarobiose ; et l'autre de galactose sulfaté, non méthylé avec des proportions inférieures en anhydrogalactose. Cette définition de la structure a été corrigée par les travaux de DUCKWORTH et YAPHE (1971). Pour ces auteurs, elle présente trois extrêmes dans sa conformation : agarose neutre, agarose pyruvate peu sulfaté et galactane sulfaté (Fig.3). Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs. HONG et al. (1969) et GORDON et al. (1977) ont analysé les produits d'hydrolyses enzymatiques (enzymes extraites de **Pseudomonas atlantica** YAPHE 1957), d'une part en chromatographie sur couche mince, d'autre part en RMN du  $^{13}\text{C}$ .

## AGAROSE NEUTRE



## AGAROSE PYRUVATE



## GALACTANE SULFATE

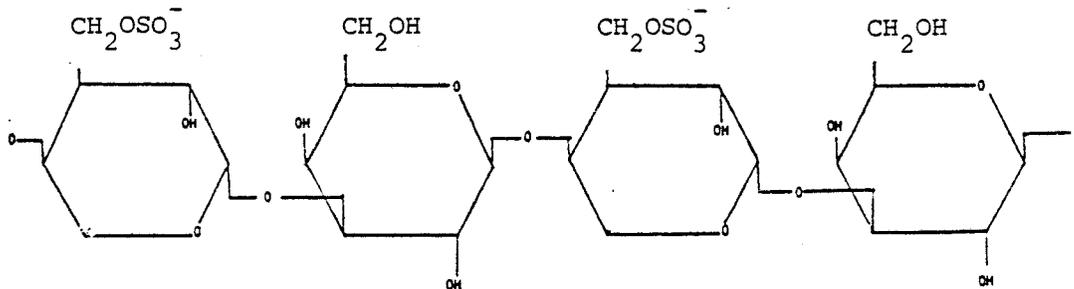


Fig. 3 : Structures chimiques de l'agar  
d'après DUKWORTH et YAPHE (1971)  
( R= H ou =  $\text{CH}_3$  )



La spectroscopie RMN du carbone 13 des galactanes des algues rouges s'est rapidement révélée une technique simple et riche en enseignements sur la structure des polysaccharides.

Les premiers travaux réalisés sur des composés témoins ont permis d'observer les déplacements chimiques dus aux méthylations ou aux glycosylations. Les méthyls éthers du méthyl-3,6-anhydro-D-galactopyranoside (SHASHKOV et al. 1977), du méthyl-D-galactopyranoside (SHASHKOV et al. 1978b) et du méthyl-L-galactopyranoside (USOV et YAROTSKI 1977) ont ainsi été étudiés. L'influence de la sulfatation des polymères a été démontrée sur des témoins glucose et galactose monosulfate (HONDA et al. 1973, ARCHIBALD et al. 1981, ROCHAS et al. 1983), sur des méthyl-3-O-méthyl-D-galactopyranoside-4-sulfate (SHASHKOV et al. 1978a). Cependant, l'interprétation de ces spectres ne peut être étendue directement à ceux des polymères entiers.

HAMER et al. (1977) ont caractérisé les produits d'hydrolyse enzymatique de l'agarose par RMN  $^{13}\text{C}$  en limitant leur analyse aux carbones anomériques. Ils ont mis en évidence les différences de signaux dues à l'extrémité réductrice de l'agarobiose et du néoagarobiose.

Des oligosaccharides plus complexes ont été étudiés après dégradation enzymatique, MORRICE et al. 1983 sur des porphyranes à l'aide d'une agarase, BELLION et al. 1981, 1982, ROCHAS et al. 1983 sur des carraghénanes à l'aide de  $\kappa$  ou  $\lambda$  carraghénases. MILLER et FURNEAUX 1982 ont publié les attributions des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  de l'agarobiose, du 6-O-méthyl-agarobiose, du carrabiose et du carrabiose-4-sulfate.

Le fait que le signal du C1 du galactose occupe la même position dans les spectres de l'agarose et des carraghénanes, mais que celui du 3,6-anhydrogalactose diffère dans ces deux types de polysaccharides permet de distinguer aisément ces deux phycocolloïdes (YAROTSKY et al. 1977). Par cette méthode, BHATTACHARJEE et YAPHE (1979), VILLARROEL et ZALUNGO (1981), BRASCH et al. 1983, ont classé les phycocolloïdes d'un certain nombre d'algues rouges par rapport à leurs réponses en RMN  $^{13}\text{C}$ .

De même, le L-galactose-6-sulfate, considéré comme le précurseur du 3,6-anhydro-L-galactose peut être repéré en RMN par la disparition de

signaux spécifiques des carbones substitués par les sulfates, après traitement alcalin (USOV et al. 1978, BRASCH et al. 1981 a et b, USOV et al. 1983).

Une étude semblable, entreprise par BELLION et al. (1983), a permis de formuler des hypothèses intéressantes sur la biosynthèse des  $\kappa$  et  $\lambda$  carraghénanes (BODEAU-BELLION 1983).

A partir des modèles étudiés en spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  sur des témoins méthylés ou désulfatés, il est possible d'attribuer l'ensemble du spectre d'un polymère (12 pics). USOV et al. (1980) publient les spectres interprétés de la majorité des galactanes des algues rouges. Dans le cas précis de l'agar, BRASH et al. (1981b), NICOLAISEN et al. (1980), PERLIN et HAMER (1979), complètent les attributions de l'agarose, NICOLAISEN et al. (1980), du 6-O-méthyl-galactose et BRASH et al. (1981b) du porphyran. LAHAYE et al. (1985) ont étudié les spectres d'agars sulfatés et désulfatés et déduits la structure des polysaccharides précurseurs de l'agarose.

En fait, la structure exacte de la molécule demeure encore confuse, car son étude se heurte au fait que l'origine des échantillons est très hétérogène et que la physiologie de l'espèce influe sur sa composition.

### B - Variations quantitatives et qualitatives de l'agar.

Les résultats des travaux sur les variations des colloïdes sont très contradictoires. Il apparaît néanmoins que les teneurs en agar varient au sein d'une même espèce suivant la localisation géographique et suivant le stade de développement.

MARSCHALL et al. (1949) ont été les premiers à penser que l'alternance des saisons et celle des générations pouvaient influencer la force de gel d'un phycocolloïde. BLACK et al. (1965), FULLER (1971) et RIGNEY (1971), vérifièrent cette hypothèse et isolèrent, de *Chondrus crispus*, deux types de carraghénanes liés au rythme saisonnier. MOLLION (1977) obtint les mêmes résultats pour les carraghénanes de *Hypnea musciformis* et *H. cervicornis*.

De nombreux auteurs, DELOACH et al. (1946), HUMM (1951), KIM et HUMM (1965), UMAMAHESWARA (1969), JOHN et ASARE (1975), PENNIMAN (1977), HOYLE 1978b ; CHRISTIAEN 1981 ; DIEPH MINH TAM et EDWARDS

1982), ont signalé que le contenu en agar de différentes espèces de *Gracilaria* subissait des variations saisonnières. OZA (1978) a observé, tout au long de l'année, des variations du rendement et de la force de gel d'agars extraits de *Gracilaria corticata*. Plus récemment, WHYTE et al. (1981) ont mis en évidence un cycle saisonnier de la production et de la qualité de l'agar de *Gracilaria verrucosa* sur une période d'une demi-année. Le sens des variations qualitatives et quantitatives est cependant très controversé : DELOACH et al. (1946) ont montré que les rendements les plus importants apparaissent en août et que la force de gel est maximale en juin ; au contraire, HUMM (1951) a précisé que la force de gel des agars de différentes espèces de *Gracilaria* récoltées de septembre à novembre est plus élevée. Ces deux auteurs admettent cependant l'existence d'une relation entre l'augmentation de biomasse et la diminution des rendements en agar. Cette observation n'est pourtant pas généralisable à toutes les espèces de *Gracilaria* puisque UMAMAHESWARA (1969) chez *Gracilaria foliifera* et JOHN et ASARE (1975) chez *Gracilaria dentata* ont signalé une correspondance entre croissance et production d'agar.

Il est difficile de faire une synthèse de ces travaux tant la disparité des techniques mises en oeuvre est grande. MUTTUTAMBY et NEUSON (1981) ne relèvent pas de variations de la teneur en colloïde après extraction avec attaque alcaline. Or, précisément, le traitement alcalin est connu pour renforcer la force de gel au détriment du rendement global.

McCANDLESS et RICHER (1972) montrèrent chez une carraghénophyte que le produit libéré par le tétrasporophyte était plus visqueux que celui extrait d'un mélange de pieds indifférenciés de cette espèce. C'est en 1973 que McCANDLESS et al. démontrèrent l'existence de  $\lambda$  carraghénane au niveau du tétrasporophyte et de  $\kappa$  carraghénane au niveau du gamétophyte. Cette année là, PICKMERE et al. (1973) observaient le même phénomène dans le genre *Gigartina*, puis McCANDLESS et al. (1975) sur *Irideae cordata*.

Contrairement aux carraghénophytes, il ne semble pas avoir de différences de rendement en agar entre les générations de Gracilaire (CHRISTIAEN 1981, PENNIMAN 1983). Cependant, KIM et HENRIQUEZ (1979), WHYTE et ENGLAR (1979b) et WHYTE et al. (1981) observent des différences entre les gamétophytes et les tétrasporophytes. Ces derniers ont montré que les rendements et la force du gel des plantes cystocarpiques

sont supérieures à ceux des plantes tétrasporophytiques et végétatives chez **Gracilaria verrucosa**. Ces résultats sont en accord avec les travaux de KIM et HENRIQUES (1979), excepté pour la force de gel qui est plus faible chez les thalles cystocarpiques. Par contre, PENNIMAN trouve peu de variations entre les différents stades du cycle de **Gracilaria foliifera** (PENNIMAN 1977) et de **Gracilaria tikvahiae** (PENNIMAN 1983). De même, HOYLE (1978a) ne relève pas de différence significative de rendement en agar et de force de gel entre les pieds mâles, femelles et tétrasporophytiques de **Gracilaria bursapastoris** et de **Gracilaria coronopifolia**. Néanmoins, la confirmation statistique de ces résultats se heurte à la faible représentation simultanée des différentes générations de l'algue.

La teneur en hexoses fluctue en fonction de l'algue : 65% pour **Gelidium amansii**, 48% pour **Gracilaria confervoïdes** (HONG et al. 1969). Ces auteurs ont précisé que, selon les espèces, la concentration en galactose pouvait passer de 27 à 41% et celle du méthyl-galactose de 2 à 21%, tandis que la teneur en anhydrogalactose variait peu. Ils ont établi une corrélation entre la taxonomie des agarophytes et le type de polysaccharide. Par ailleurs, les résidus peuvent substituer la molécule à des degrés divers. ARAKI et al. (1967) rapportent que certaines espèces, et parmi elles, les **Gracilaria**, avaient des teneurs variables en 6-O-méthyl-galactose. GUISELEY (1970) a vérifié ce point en analysant plus de cinquante échantillons de **Gracilaria** et a évalué l'incidence de ces variations sur la température de gélification des solutions d'agar. ARAKI et al. (1967) décrivent du 4-O-méthyl-galactose, du 2-O-méthyl-D-galactose et de faibles proportions de L-galactose et de D-xylose. Par contre, DUCKWORTH et YAPHE (1971) font remarquer que, si les teneurs en D-galactose et en 6-O-méthyl-galactose fluctuent largement, le rapport molaire entre le 3,6-anhydrogalactose et le total D-galactose, 6-O-méthyl-galactose, reste toujours voisin de 1. Des analyses chimiques de polymères de l'agarose ont révélé l'existence de 4-O-méthyl- $\alpha$ -L-galactopyranose, probablement lié en C6 du -D-galactopyranose (CRAIGIE et WEN 1984). TURVEY et WILLIAMS signalent en outre la présence de L-galactose en l'absence de 3,6-anhydro-L-galactose et de L-galactose-6-sulfate. LAHAYE et al. (1986) ont mis en évidence l'hétérogénéité de l'agar de différentes espèces de **Gracilaria** en analysant en RMN  $^{13}\text{C}$  les produits d'extraction fractionnée, dans l'eau et l'éthanol, et détecté, selon les espèces, du

2-O-méthyl-3,6-anhydro-L-galactose, et des polymères sulfatés, non déplacés par le traitement alcalin.

ASARE (1979, 1980) et CHRISTIAEN (1981) montrent que les contenus en 3,6-anhydro-galactose et en sulfate varient avec les saisons. PENNIMAN (1983) met en évidence un cycle semblable chez *Gracilaria tikvahiae*. Cependant, l'utilisation systématique du traitement alcalin dans la procédure d'extraction suivie par PENNIMAN (1983), limite les comparaisons puisque l'action des hydroxydes libère le sulfate en C6 du L-galactose pour former le pont 3,6-anhydro (McCANDLESS 1981). L'accroissement du 3,6-anhydrogalactose et la baisse concomitante des teneurs en sulfate des agars extraits en utilisant cette technique ont été démontré pour un certain nombre d'espèces de *Gracilaria* (HONG et al. 1969, DUCKWORTH et al. 1971, TAGAWA et KOJIMA 1972, YOUNG 1974, WHYTE et ENGLAR 1976, 1979b, 1980).

Les différences des teneurs en 3,6-anhydrogalactose et en ester sulfate, dues à la ploïdie des thalles sont controversées. WHYTE et ENGLAR (1979a) et WHYTE et al. (1981) plaident en faveur de variations de composition entre agars issus de plants végétatifs, cystocarpiques et tétrasporophytiques. PENNIMAN (1983) ne décèle, par contre, aucune différence significative.

Les facteurs du milieu semblent jouer un rôle important dans le contrôle des synthèses de colloïde. Ainsi, NEISH et SCHACKLOCK (1971) ont remarqué qu'en milieu enrichi en azote les algues avaient une croissance rapide avec accumulation de protéines, au détriment des polysaccharides (effet NEISH). De même, PATWARY et VAN DER MEER (1983) relèvent une corrélation négative entre le contenu en azote de *Gracilaria tikvahiae* et la teneur en agar. Selon HOYLE (1978c), cette relation entre biomasse et agar serait purement accidentelle et ce serait la teneur en azote qui gouvernerait les rendements en colloïde. STADLER (1984) a contribué à éclaircir le rôle de l'azote, en montrant que celui-ci favorisait la croissance de l'algue, par l'augmentation de la matière sèche représentée essentiellement par les assimilats photosynthétiques, masquant, en conséquence, la synthèse nette d'agar puisque celle-ci est habituellement exprimée par rapport à la quantité de matière sèche du thalle. En cultures contrôlées, CRAIGIE et al. (1984),

indiquent que l'apport azoté influence la concentration en dérivés méthylés : 6-O-méthyl-D-galactose et 4-O-méthyl-L-galactose.

La température influence également le métabolisme de l'agar. Cependant, à l'inverse de WANG et YANG (1980) qui trouvent une corrélation négative entre la température et la teneur en mucilage, JOHN et ASARE (1978) observent les rendements les plus élevés lorsque la température de l'eau est à son maximum. CRAIGIE et WEN (1984) démontrent que la qualité de l'agar (consistance du gel) est inversement proportionnelle à la température de culture. La méthylation du C2 du L-galactose est particulièrement affectée par la croissance des tissus à température élevée. Alliée à une sulfatation plus importante, cette méthylation abaisse la qualité du gel d'agar.

### C - Propriétés physico-chimiques.

Les propriétés de l'agar sont à considérer selon qu'il est sous forme solide, sol ou gel. (SELBY et SELBY 1959).

#### 1.- Solide.

A 25° C l'agar sec est pratiquement insoluble dans l'eau. Il se dissout très légèrement dans l'éthanolamine et complètement dans la formamide. Si l'agar est floclé à chaud par 5 à 10 volumes d'éthanol puis égoutté mais non séché, il se solubilise dans l'eau à température ambiante et formera un gel. L'agar ainsi floclé est aussi soluble à 25° C dans d'autres solvants, mais la gélification n'a lieu qu'en présence d'eau. L'agar est dispersé colloïdalement dans l'eau ou d'autres solvants à 97-100° C. Des solutions dans l'eau sont obtenus, à 100° C, jusqu'à des concentrations en agar de 8% (p/v). Au de là de 15%, il faut élever la température à 120° C, mais dès 13%, la phase devient microscopiquement hétérogène et la force de gel n'augmente pas. Des mélanges entre 0 et 5% sont obtenus facilement en chauffant au bain-marie et en agitant.

#### 2.- Sol.

La viscosité dépend fortement de l'espèce dont est tiré l'agar et du procédé d'extraction. Pour des concentrations de 1 et 1,5%, la viscosité à 45° C d'une solution d'agar est relativement constante du pH 4,5 au pH 9, sans influence très nette du vieillissement et de la force ionique entre pH6 et

8. Dès que la gélification commence, la viscosité, à température constante, augmente avec le temps.

L'agar est le seul des polysaccharides gélifiant pour lequel la gélification intervient à une température très au-dessous du point de fusion. Beaucoup d'usages de l'agar dépendent de cette propriété appelée l'hystérésis. Les températures de gélification varient selon les espèces d'algues dont les gels dérivent, et sont pratiquement constantes à l'intérieur de l'espèce, à l'exception de *Gracilaria verrucosa* dont les variations saisonnières de la qualité sont de l'ordre de 20%. GUISELEY (1970) a pu établir que la température de gélification augmentait avec la teneur en dérivés méthylés. La gélification est réduite par l'influence des ions  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{--}$ . Les études de viscosité, de diffraction et de force de gel montrent que les vibrations ultrasoniques, la radiation gamma, ainsi qu'une agitation intensive et les hautes températures réduisent la longueur des chaînes du polymère.

### 3.- Gel.

L'agar est probablement l'agent formateur de gel le plus puissant qui soit connu, puisque la gélification est perceptible à une concentration de 0,04%. Il est par conséquent largement utilisé depuis l'augmentation de la texture d'une solution jusqu'aux gels forts, en plus de ses propriétés de rebondissement, d'élasticité et de la permanence et de la réversibilité des gels d'agar. La température de fusion est fonction de la concentration, de l'origine et du poids moléculaire ainsi que de la température de gélification. En général, une solution à 1,5% a un point de fusion compris entre 80 et 97°C. La force de gel dépend également de l'origine de l'échantillon et de la concentration en agar.

Près de la neutralité, l'agar est compatible avec la plupart des autres gommes polysaccharidiques et les protéines, d'où leur large usage dans les glaces, les moulages dentaires, etc... L'alginate de sodium et l'amidon diminuent la force des gels d'agar, tandis que la dextrine et le saccharose l'augmentent. Avec le caroube la synergie est telle que 0,15% de cette gomme élève le point de rupture du gel de 50 à 200%. Le fait que peu de microorganismes métabolisent l'agar ou élaborent des enzymes qui le dégradent, peut expliquer la stabilité plus grande des gels d'agar comparée aux gels d'autres colloïdes naturels. Les gels d'agar ne vieillissent que

légèrement. Après 1h à 25°C la force augmente d'environ 1% par heure pendant 8h, puis croît à un taux moins élevé et devient stable vers la 15<sup>ème</sup> heure.

Le potentiel électroosmotique d'un gel d'agar à 4% est de 0,018 volt. L'indice de réfraction varie de 1,33810 pour une concentration de 0,5% à 1,34185 à 5%.

#### 4.- Mécanisme de gélification.

ARNOTT et al. (1974) ont montré, par diffraction des rayons X, que la molécule d'agarose adopte une conformation en double hélice dans le processus de gélification. Déjà REES (1965) le suggérait en expliquant que la forme du cycle pyranosyl du 3,6-anhydrogalactose impose une structure hélicoïdale à la molécule.

La gélification, qui est en fait une précipitation, est obtenue avec les composés peu solubles de la fraction peu sulfatée de l'agar, c'est-à-dire l'agarose. Les chaînes sont initialement sous forme de pelote statistique (état sol) et elles adoptent, progressivement et de manière réversible, une configuration en hélices. Lorsque la densité d'hélices est suffisante pour qu'il y ait interpénétration et apparition d'un réseau continu, le "point gel" est atteint. La densité du réseau augmente ensuite, parallèlement à celle des associations d'hélices et, lorsque l'état d'agrégation est assez grand, il y a expulsion de solvant par contraction des mailles du réseau, ce qui constitue l'étape finale du processus qui est la synérèse. (Fig.4).

Les sulfates interfèrent de deux manières dans la formation du gel. Quand ils se substituent au pont anhydro, ils diminuent le pas de la chaîne hélicoïdale et par conséquent la force de gel décroît. Un sulfate en C2 du D-galactose empêche la formation du gel au niveau de l'agrégat par répulsions électrostatiques. De même les acides pyruviques n'ont pas d'incidence sur la formation du Gel I mais inhibent les agrégations du Gel II (YAPHE et DUCKWORTH 1972). Les méthoxyls, plus hydrophobes, fixeraient la conformation plus rigidement que les groupements hydroxyls (DUCKWORTH et YAPHE 1972).



### D - Variations des propriétés physico-chimiques.

Des variations saisonnières de la force de gel d'agar ont été remarqué sur un certain nombre d'espèces de *Gracilaria* (KIM et HUMM 1965, OZA 1978, LINDSAY et SAUNDERS 1980, YANG et al. 1981, CHRISTIAEN 1981, YANG 1982, NELSON et al. 1983, PENNIMAN 1983). Si elle varie également selon les espèces (NELSON et al. 1983), elle ne paraît pas liée aux générations (HOYLE 1978a, PENNIMAN 1983), bien que KIM et HENRIQUEZ (1979) et WHYTE et al. (1981) l'observent sur d'autres espèces de *Gracilaria*. Les gels obtenus à partir d'agar extrait de *Gracilaria verrucosa* et *G. sojestedtii* (ABBOTT 1980, DURAIRATNAM et SANTOS 1981) sont généralement plus fort que ceux de *G. tikvahiae* (BIRD et McLACHLAN 1982, PENNIMAN 1983) et de *G. bursapastoris* (HOYLE 1978a, 1978b).

La force de gel dépendrait, selon TSUCHIYA et HONG (1966), de la proportion d'agarose dans la molécule par rapport à l'agaropectine. REES (1969) a précisé qu'elle était liée au nombre de ponts 3,6-anhydro-galactose qui accentuent le pas de l'hélice en imprimant une torsion à l'hétérocycle. Ces ponts anhydro se formeraient par élimination du sulfate en C6 du L-galactose. Mais la relation entre la teneur en sulfates, la force de gel et la teneur en 3,6-anhydrogalactose n'est pas toujours évidente chez les *Gracilaria*. CHOU (1973), YANG (1982) et PENNIMAN (1983) ont montré l'existence d'une relation entre le contenu en 3,6-anhydrogalactose et la force de gel chez plusieurs espèces de Gracilaires. Par contre, BIRD et al. (1981) sur *Gracilaria tikvahiae* et NELSON et al. (1983) sur *Gracilaria edulis* et *G. lichenoides*, prétendent qu'il n'y aurait aucun lien entre la force de gel et la teneur en 3,6-anhydrogalactose. La même opposition se retrouve pour la corrélation entre la teneur en sulfate et la force de gel. Elle est négative pour PENNIMAN (1983) et positive pour BIRD et al. (1981).

La plupart des auteurs s'accordent pour établir une corrélation négative entre force de gel et rendements en colloïde (MATSUHASSHI 1977, BIRD et al. 1981 et PENNIMAN 1983).

PENNIMAN (1983), note une variation significative de la viscosité d'une solution d'agar (5 - 20 cp), indépendante des générations de l'algue, comparable à celle décrite par YOUNG (1974) et WHYTE et ENGLAR (1976, 1979b). En général, le prétraitement alcalin lors de l'extraction diminue la viscosité de la solution résultante (WHYTE et ENGLAR 1976, 1979b).

### III - LOCALISATION DE L'AGAR DANS LA PAROI CELLULAIRE.

L'étude structurale de la paroi apporte de précieux renseignements sur la localisation des polysaccharides gélifiants. Comme pour les végétaux supérieurs, la paroi des algues rouges peut-être schématiquement ramenée à un système à deux phases : une phase cristalline encore appelée squelette, dispersée au sein d'une phase amorphe, la matrice extracellulaire. Observée en microscopie photonique, elle présente deux régions distinctes : la paroi **sensu stricto** formée d'une succession de couches concentriques disposées autour de chaque cellule, et les espaces intercellulaires qui sont remplis par la matrice.

Etudiée en microscopie électronique, la phase squelettique apparaît opaque aux électrons. Chez les Rhodophycées, elle est essentiellement composée de xylanes, de mannanes (PERCIVAL 1970) et de cellulose (ROSS 1953 ; 1% à 8% de la matière sèche). Cependant, la présence de cellulose ne peut-être généralisée à l'ensemble des algues rouges (PRESTON 1968). Ainsi, contrairement aux résultats obtenus par ROSS (1953), FREI et PRESTON (1964b) ne trouvent pas trace de cellulose chez *Porphyra ombilicalis*. Elle est par contre toujours présente dans la couche la plus interne des Floridéophycées (MYERS et al. 1956). En ce qui concerne le genre *Gracilaria* LAHAYE (1985 comm. pers.) témoigne de sa présence chez *G. tikvahiae*.

Les composants de la phase squelettique sont organisés en réseaux de micro-fibrilles, généralement orientés tangentiellement par rapport à la surface de la cellule. Chez *Gracilaria verrucosa*, les fibres sont déposées en strates concentriques alternant avec des amas denses issus de vésicules périplasmiques (VERDUS et al. 1986). L'organisation est en relation directe avec la croissance de l'algue : elle détermine l'orientation des microfibrilles et l'épaisseur des couches par apposition de strates nouvelles. Ceci se traduit à l'observation par des zones bien distinctes (DAWES et al. 1961 , McCANDLESS et al. 1977, AKATSUKA et IWAMOTO 1979) : la strate interne, la plus récente, la strate médiane puis la strate externe, la plus dense en microfibrilles chez *Gracilaria verrucosa*. Cette disposition des strates est différente de ce qui est observé habituellement chez les autres algues.

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

Les mucilages forment un continuum apparemment amorphe depuis le plasmalemma jusqu'à la cellule voisine. Ils sont différents dans les cellules corticales, médulaires et épidermiques. Ces polysaccharides se retrouvent également dans la matrice inter-cellulaire. KLOAREG 1984 assimile la phase matricielle à un réseau maillé dont l'armature est constituée par des mucilages fibrillaires et les vides remplis par des polysaccharides solubles.

Les différences de structures observées dans l'épaisseur de la paroi en microscopie ne sont pas dues à un changement d'orientation des microfibrilles, donc à une différence d'organisation du matériel fibrillaire.

Ce dernier est en effet entrecroisé au hasard sur toute l'épaisseur des parois (DAWES et al. 1961). Une modification du rythme de dépôts qui se traduit par une zone plus claire sur les clichés pourrait expliquer cette stratification, à l'image de ce qui est rencontré chez certains végétaux supérieurs (REIS 1984). Il n'y aurait pas dans ce cas de véritable différenciation entre paroi primaire et secondaire.

Les travaux de YOUNG (1980) sur *Antithamnion* montrent que les dépôts de type "amas denses" commencent dès les jeunes stades de développement et continuent pendant la phase d'élongation cellulaire. Leur orientation au cours du temps font suggérer à cet auteur une similitude avec le mode de dépôt dans les parois des plantes supérieures. Par contre, chez les végétaux supérieurs, les couches secondaires se mettent en place uniquement après l'élongation cellulaire (ESAU 1965). Ces couches, chez les macroalgues, ne peuvent donc pas être considérées en définitive comme des dépôts secondaire *sensu stricto*.

Chez *Gracilaria verrucosa* (VERDUS et al. 1985) de tels dépôts sont retrouvés sur des coupes effectuées sur les parties âgées du thalle. Il est intéressant de noter que cet épaissement des parois s'effectue essentiellement dans les plantes cultivées dans des conditions défavorables à la croissance.

#### IV - ROLE DES POLYOSIDES MATRICIELS

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

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

L'existence d'une corrélation entre le niveau bathymétrique et la résistance à la dessiccation a conduit certains auteurs à penser que les colloïdes hydroscopiques de la paroi s'opposent à l'évaporation de l'eau (De LESTANG 1974, QUILLET et De LESTANG 1972).

L'épaisseur des parois, la capacité de rétention d'eau de la phase matricielle ou des mécanismes physiologiques permettent donc à la paroi de tamponner au niveau cellulaire les variations de potentiels hydriques résultant des changements d'hygrométrie.

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

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

La régulation des échanges ioniques a fait l'objet d'une étude récente chez les Fucales. KLOAREG (1984) a tenté de mettre en évidence le rôle supporté par les fucoïdanes dans la régulation physiologique des flux ioniques comme échangeurs d'anions, sans besoin énergétique. Cependant,

rien ne permet pour l'instant de dire que les fucanes ont un comportement échangeur spécifique. De toute façon, ce comportement de la paroi comme résine échangeuse d'ions n'est pas généralisable au cas de l'agar qui est un composé peu chargé. Il faut envisager d'autres mécanismes dans ce cas.

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

## CONCLUSION

*Gracilaria verrucosa* est donc une espèce qui se développe dans une région où l'amplitude des facteurs climatiques est grande. Ces variations saisonnières influencent donc le métabolisme de l'algue et il est naturel de penser que la paroi puisse être affectée par l'orientation des biosynthèses en fonction des saisons.

Le battement des marées, par contre, doit être moins fortement ressenti par les thalles puisqu'ils se développent dans des cuvettes qui retiennent l'eau à marée basse. Néanmoins, des variations de salinité existent, et les cellules doivent mettre en oeuvre des moyens pour lutter contre les variations de pression osmotique.

En conséquence, la nature chimique des polysides matriciels, dont les fluctuations ont été mises en évidence, peut être le reflet de la physiologie du développement des thalles de cette espèce et les propriétés physico-chimiques qui en découlent peuvent permettre de comprendre les capacités adaptatives de l'algue aux contraintes du milieu.

## MATERIEL ET METHODES

## I - CONDITIONS GENERALES

### A - Préparation des échantillons.

Des échantillons de *Gracilaria verrucosa* sont récoltés au "Cran aux oeufs" près du "Cap Gris Nez" dans le Nord de la France. Les thalles nettoyés aux ultrasons dans une cuve BRANSONIC (1min), sont rincés à l'eau de mer filtrée à 0,2 $\mu$ m puis essorés par centrifugation (5min, 200 rpm). Deux lots sont séparés selon les besoins et pesés (Poids de matière fraîche de départ). Une part aliquote est prélevée pour mesurer le poids de matière sèche de départ, après lyophilisation.

### B - Cultures.

Les algues sont cultivées dans des cuves en matière plastique de 50 litres, recouvertes d'un film transparent en cellophane pour limiter l'évaporation. Une alimentation en air comprimé assure le maintien du taux de dioxyde de carbone dissous et l'agitation du milieu. L'eau de mer est renouvelée deux fois par semaine afin que les éléments minéraux du milieu ne s'épuisent pas. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents SYLVANIA type "GROLUX", couplés à une horloge programmable qui contrôle la durée de l'éclairage.

Les mesures de croissance sont réalisées en déterminant l'augmentation du poids de matière fraîche par pesée, après élimination de l'eau superficielle par centrifugation à 160 tours/min. dans une essoreuse THOMAS. La teneur en matière sèche est calculée après lyophilisation pendant 24 heures.

Des prélèvements sont effectués tout au long des cultures, après 1 jour, 2 jours, 1 semaine, 1 mois et 2 mois de culture.

#### 1. Conditions de croissance

Les conditions de croissance des thalles ont été définies par rapport à celles observées dans la nature. La température maximale de l'eau de mer relevée en été est de 18°C. Une pièce climatisée, réglée à 18°C  $\pm$  2°C, dans laquelle est assuré un éclairage de 17W/m<sup>2</sup> à raison de 16h par jour permet de contrôler les paramètres climatiques, en reproduisant ceux qui caractérisent la côte boulonnaise.

## 2. Conditions de non-prolifération

En hiver, la température de l'eau de mer descend jusqu'à 5°C. Un éclairage de 7W/m<sup>2</sup> pendant 8H par jour est maintenu dans une chambre froide régulée à 5°C±2°C. Ces conditions simulent le climat hivernal, pour lesquelles les thalles sont en phase stationnaire de croissance.

### C - Extraction de l'agar.

A chaque prélèvement, les algues fraîches sont rincées à l'eau distillée, nettoyées par sonication et pesées après centrifugation à 160 tours/min. pendant 15 secondes. Les échantillons ainsi préparés sont congelés et lyophilisés pendant 24h à 8°C. De 1 à 5 grammes d'algues sèches sont placés dans 200 à 500 ml d'eau distillée à 100°C, remués constamment à l'aide d'un agitateur mécanique pendant six heures. La décoction est passée au travers d'un tissu propre pour séparer la solution de la plus grosse partie des débris de thalle. Elle est ensuite filtrée sous pression sur filtres SARTORIUS, depuis 12 µm jusqu'à 0,45 µm. Le filtrat est ensuite successivement congelé et décongelé pour éliminer la majeure partie des impuretés solubles. Le reliquat est repris par l'alcool absolu qui le deshydrate et dans lequel il est pulvérisé à l'aide d'un mixer. L'agar en poudre est recueilli sur le filtre en verre frité (n°3) d'un Büchner. Remis en solution dans l'eau distillée, dialysé, il sera congelé et lyophilisé. L'agar sec, pesé, servira à calculer le rendement de l'extraction qui sera exprimé en pourcentage d'agar sec par rapport à la masse d'algue sèche utilisée.

## II - CONDITIONS PARTICULIÈRES

### A - Recherche des facteurs limitants de la synthèse d'agar.

#### 1. La température.

De manière à étudier l'influence de la température sur la croissance des thalles de *Gracilaria verrucosa* et les rendements en agar, des cultures ont été réalisées à 5°C et à 18°C. La photopériode est alors fixée à 12h de lumière par 24h et à 17 W.m<sup>-2</sup>, dans des enceintes climatisées. L'augmentation de biomasse, de poids de matière sèche et les rendements en agar sont calculés par rapport à un échantillon témoin, après deux mois de culture.

## 2. La lumière.

La température étant fixée à 5°C (température pour laquelle le maximum de rendement en agar est observé) différentes durées de photopériode et différentes énergies lumineuses ont été testées sur des cultures de Gracilaire. Deux photopériodes, 16 :  $\overline{8}$  et 8 :  $\overline{16}$  et deux énergies, 17W. m<sup>-2</sup> et 7W. m<sup>-2</sup> ont été retenues. Les deux conditions ont été croisées et comparées à des lots témoins cultivés à 18°C, sous une photopériode de 12h de lumière par 24h et une énergie lumineuse de 17W.m<sup>-2</sup>. Le tableau 1 résume les conditions utilisés et leur symbolisation employée dans le reste de l'exposé. L'expérience est poursuivie pendant 2 mois et les mesures de croissance et de rendements en agar sont effectués comme dans le cas général.

## 3. Cultures alternées.

Le régime alterné de culture est défini comme la succession dans le temps soit : de conditions de croissance ( 18°C, 16 :  $\overline{8}$ , 17W. m<sup>-2</sup>) puis de conditions de non-prolifération (5°C, 8 :  $\overline{16}$ , 7W. m<sup>-2</sup>), chacune pendant un mois ; soit : de conditions de non-prolifération (5°C, 8 :  $\overline{16}$ , 7W. m<sup>-2</sup>) puis de conditions de croissance ( 18°C, 16 :  $\overline{8}$ , 17W. m<sup>-2</sup>). Comme dans les cas précédents, des prélèvements réguliers sont effectués pour évaluer l'évolution des différents composés de l'algue.

### C - Extractions fractionnées de l'agar.

Dans ce protocole, l'agar est extrait par solubilisation dans de l'eau distillée, agitée mécaniquement, pendant une nuit à 20-25°C, puis successivement à 40, 60, 80 et 100°C pendant 3h et ensuite autoclavé 1h à 121°C.

Chaque décoction recueillie est filtrée sur filtres SARTORIUS jusqu'à 3µm, congelée puis lyophilisée pendant 72h.

Les lyophilisats sont alors pesés. Par rapport au poids de matière sèche ayant servi à l'extraction, cette mesure exprime le rendement de chacune des étapes de l'extraction.

## III - CONTROLES BIOCHIMIQUES

### A - Dosages biochimiques.

La teneur en glucides des extraits est estimée par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique (TILLSMAN et PHILIPPI 1929, modifiée par RIMINGTON 1931). L'agar étant essentiellement composé de galactose, celui-ci est utilisé comme témoin.

TABLEAU 1

CULTURE DE THALLES EN CONDITIONS DE TEMPERATURES,  
 DE LUMIERES ET DE PHOTOPERIODES CONTROLEES.  
 RESUME DES CONDITIONS ET SYMBOLISATIONS.

Energie Lumineuse	5 W.m <sup>-2</sup>	17 W.m <sup>-2</sup>		Soleil
Températures	5°C	5°C	18°C	20°C
Photopériodes				
16: 8	516N	516E	-	-
8:16	508M	508E	-	-
12:12	-	-	1812E	2012S



La technique de DUBOIS et al. (1956), est utilisée pour doser les sucres en sortie de colonne de chromatographie (Gel filtration ou échange d'anions).

La quantité de 3,6-anhydrogalactose est appréciée par la méthode colorimétrique au résorcinol décrite par YAPHE (1960).

L'estimation de la quantité de sulfate est réalisée avec du rhodizonate de sodium qui donne un composé coloré en présence d'ions  $Ba^{++}$ . Quand du sulfate inorganique est présent, du sulfate de barium se forme et l'intensité de la coloration diminue. La quantité de sulfates peut-être calculée par différence (TERHO et HARTIALA 1971). Une hydrolyse des esters sulfoniques est donc nécessaire. Celle-ci est obtenue en présence d'acide chlorhydrique 1N, pendant une heure à 100°C.

Le carbazol en milieu sulfurique permet de doser les acides uroniques (DISCHE 1947). Comme les hexoses donnent, avec le réactif, une coloration jaunâtre qui interfère avec celle des acides uroniques, MONTREUIL et SPIK (1963) conseillent une formule de correction :

$$\frac{\beta a - \alpha d}{\frac{ca}{50} - \frac{bd}{200}} \quad \text{avec :}$$

$\beta$  = absorbance de 1ml de la solution à doser au carbazol  
 $a$  = absorbance de 200 g d'oses à l'orcinol  
 $\alpha$  = absorbance de 1ml de la solution à doser à l'orcinol  
 $d$  = absorbance de 200 g d'oses au carbazol  
 $c$  = absorbance de 50 g d'uroniques au carbazol  
 $d$  = absorbance de 200 g d'uroniques à l'orcinol

### B - Spectroscopie Infrarouge.

La spectroscopie infra-rouge est une méthode simple et rapide pour caractériser l'agar (CHRISTIAEN et BODARD 1983).

L'échantillon est mélangé soigneusement avec du KBr et broyé finement au mortier puis compressé sous forme de pastille à l'aide d'une presse. Le spectre est obtenu sur un spectroscope BECKMAN, par un défilement de 4000 à 600  $cm^{-1}$  pendant 12mn.

### C - Chromatographie sur Couche Mince.

Une chromatographie sur couche mince de gel de Silice sur feuille d'aluminium est effectuée après le dépôt de 10 $\mu$ g de produit en solution aqueuse, et 3h de migration dans le système solvant : Ethanol, Butanol, Eau, Acide acétique, Pyridine (100/10/30/3/10). La plaque est séchée et le

chromatogramme révélé par pulvérisation d'une solution d'orcinol 0,2% dans de l'acide sulfurique (p/v). La réaction colorée se développe après quelques minutes de séjour dans une étuve à 105° C.

#### D - Gel filtration.

La séparation des fractions lourdes et légères de certains extraits est obtenue par le passage sur une colonne (30x2 cm) remplie de séphadex G25 équilibrée dans l'eau distillée. L'élution est suivie par un réfractomètre interférentiel KNAUER. Des fractions de 2 ml sont collectées.

#### E - Chromatographie d'échange d'anions.

Le fractionnement des polymères neutres et chargés de l'agar est réalisé sur une colonne (50X3 cm) remplie de gel de DEAE séphadex A50, stabilisé dans l'eau distillée. Une jacquette autour de la colonne permet de maintenir la température du système au-dessus de 40° C, de manière à éviter la prise en gel des solutions d'agar chromatographiées.

Une solution aqueuse de 20 ml contenant 20 mg d'agar sont appliqués sur la colonne et l'élution est réalisée par le passage successif d'eau distillée (150 ml à 50° C), puis de solutions de NaCl (100ml) de concentrations molaires croissantes (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 3M). Des fractions de 5ml sont récoltées et la détection se fait par le phénol sulfurique (DUBOIS et al. 1956).

Les fractions sont rassemblées en fonction de l'élution, dialysées, puis lyophilisées pour déterminer le rendement de la chromatographie et les quantités de produits obtenus dans chaque cas. Des dosages biochimiques peuvent ensuite être effectués sur chaque échantillon.

#### F - Chromatographie en phase gazeuse.

Les monosaccharides sont identifiés sous forme d'acétates d'alditol. Les monosaccharides libérés par hydrolyse par de l'acide trifluoroacétique 4N, 4H à 100° C sont réduits par le borohydrure de potassium durant 4h à température ambiante. La réaction est arrêtée par de la résine Dowex 50x8 (forme H<sup>+</sup>) et le borate formé éliminé par plusieurs codistillation avec du méthanol contenant 1% d'acide acétique. Le résidu sec est repris par de l'eau distillée et lyophilisé. La peracétylation est réalisée avec un mélange pyridine/ anhydride acétique (v/v), à température ambiante, durant une nuit. Après évaporation du mélange réactionnel, le résidu sec est repris par du dichlorométhane, contenant 1% d'anhydride acétique. Les acétates

d'alditol sont caractérisés et dosés par un chromatographe en phase gazeuse GIRDEL 300 sur une colonne capillaire (diamètre intérieur 0,3 mm) TP Sil 5 CB (CHROMPACK). La pression du gaz vecteur est de 0,45 bar, la température de l'injecteur 240°C, celle du détecteur 240°C et la température du four est programmée après un palier à 130°C de 130 à 240°C, 2°C/min., 10 min. à 240°C.

### G - Spectroscopie RMN du C<sup>13</sup>

Des spectres RMN du carbone 13 sont obtenus par l'analyse de solution de 10mg de sucres dans D<sub>2</sub>O, sur un spectroscope BRUKER 400 MHz à 100.62 MHz. Les spectres RMN <sup>13</sup>C découplés du proton sont enregistrés à 80°C. Les attributions des pics sont repérés par rapport à un témoin DMSO interne, fixé à 39.6 ppm d'un témoin TMS externe.

### IV - ISOLEMENT DE PAROIS.

L'isolement des parois de *Gracilaria verrucosa* s'inspire de la technique mise au point sur les Fucales par KLOAREG (1984). Cependant, la Gracilaire possède une cuticule résistante et élastique difficile à rompre et qui rend le broyage au POLYTRON pratiquement inefficace.

Les algues sont donc lyophilisées et broyées dix minutes dans un broyeur à billes RETSCH. Une poudre fine et homogène est ainsi obtenue. Les phycobillines qui sont des protéines solubles sont extraites par un tampon tris-HCl à pH 6,7. Le contenu cellulaire est dispersé par sonication (plusieurs fois 1mn, registre 4-"high"), après plasmolyse dans une solution de sorbitol 3M. La presse de FRENCH qui provoque une alternance de compression et de décompression, fragmente les amas cellulaires restant et fait éclater les cellules ( 4 passages, 2500 psig, régime médium). Les parois sont débarassées des contaminations de membranes par un lavage avec un détergeant. Le triton X-100 à 0,1% a été utilisé. La chlorophylle est éliminée par un passage dans l'acétone. A chaque étape, les parois sont lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée, puis centrifugées. Le surnageant est éliminé. Un contrôle en microscopie optique est effectué à intervalles réguliers pour juger de l'efficacité du traitement. Quand la préparation paraît débarassée de toute trace cytoplasmique, les parois sont lyophilisées 24h à 5°C. Une poudre blanchâtre est alors obtenue, pesée, et l'agar peut être extrait directement par solubilisation à 100°C et séparé des résidus fibrillaires par filtration.

## V - CONTROLES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les fragments de thalle et les résidus récupérés après extraction et filtration de l'agar sont fixés par une solution de glutaraldéhyde à 3% (v/v) dans le tampon cacodylate de sodium 0,2M à pH 7,4 (1v) additionné d'eau de mer (2v), pendant 2h30 à 20°C. Les échantillons sont ensuite postfixés par l'acide osmique à 1% dans l'eau de mer pendant 2h à 4°C. Ils sont deshydratés par l'acétone et inclus dans la résine à faible viscosité selon SPURR (1969). Les coupes semi-fines sont colorées par le bleu de toluidine ou par le rouge de ruthénium. Les coupes fines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb ou par la technique à l'acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent selon THIERY (1967). L'acide périodique a été utilisé de façon classique à 1% et à 5% pour mieux démasquer la structure fibrillaire. Les coupes sont examinées sur un microscope électronique JEOL "JEM 100 CX" opérant à 80 KV.

## VI - MESURES DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.

### A - Forces de gel.

Il existe différentes méthodes de détermination de la force de gel. Le principe est toujours le même : mesure de la force de pression nécessaire pour briser un gel, dans les conditions suivantes :

- Concentration : 1,5% (p/v)
- Epaisseur : 3cm
- Température : 20°C

Une solution d'agar à 1,5% est préparée par dissolution dans de l'eau distillée bouillante pendant trente minutes, puis versée dans un récipient et laissée à refroidir à 20°C pendant 15h pour obtenir la pleine force du gel. Des témoins du commerce (Agar DIFCO) sont pris comme référence.

En l'absence de gélomètre, une balance ROBERVAL peut être utilisée. La solution à tester est placée d'un côté, de l'autre un béccher équilibre les plateaux. Une tige de 1cm<sup>2</sup> de section, fixée à une potence indépendante, est ajustée à la surface du gel. De l'eau est ajoutée goutte à goutte dans le béccher du côté de la tare jusqu'à ce que la tige traverse le gel. Le volume d'eau ajoutée, traduit en Kg/cm<sup>2</sup>, la force du gel.

## B - Viscosimétrie.

Des solutions d'agar sont préparées à une concentration de 1% (p/v) puis maintenue à 60° C.

Les échantillons sont placés dans le double entrefer d'un Rhéomat CONTRAVES qui est un viscosimètre à cylindre coaxiaux fonctionnant à vitesse imposée. Cette vitesse et la géométrie du corps de mesure (1 stator et 1 rotor) fixent le gradient de vitesse de cisaillement auquel est soumis le produit. La mesure du couple résistant fournit la tension de cisaillement. La viscosité apparente du produit est le rapport entre la tension de cisaillement et le gradient de vitesse de cisaillement. La viscosité des différents produits étant relativement faible à la température de mesure (60° C), un corps de mesure à double entrefer a été utilisé. L'opération a lieu sur 20 ml de solution à 60° C et permet d'obtenir les courbes d'écoulement. L'évolution de la viscosité apparente est représentée en fonction du gradient de vitesse de cisaillement.

Une deuxième technique, plus proche des conditions naturelles dans les quelles se trouvent le gel dans la paroi, permet d'obtenir le cisaillement minimum pour provoquer l'écoulement du colloïde. Les mesures ont été effectuées sur un viscosimètre CARIMED (CS 100). Ce viscosimètre fonctionne à couples imposés. Deux systèmes différents permettent de mesurer soit la vitesse de cisaillement, soit le déplacement angulaire. Ce dernier système permet de déceler les faibles déplacements du corps de mesure, en l'occurrence un cône d'angle au sommet 178° et d'un diamètre de 2 cm. La géométrie du cône permet de traduire ce couple en tension de cisaillement. Le plan de mesure est porté à une température proche de 65° C. Une goutte de solution d'agar en surfusion est déposée et le cône est mis en place. Le plan est alors ramené à 20° C. Une tension de plus en plus élevée est imposée au système par pas de 216 dyn/cm<sup>2</sup>, jusqu'à rupture du gel. Le temps d'application du couple est de l'ordre de 2 minutes. L'expérience est renouvelée à plusieurs reprises sur 3 échantillons de chaque conditions de culture des thalles dont a été extrait l'agar.

## C - Taux de gonflement.

Le taux de gonflement d'un gel est sa capacité à absorber et à retenir l'eau d'imbibition. L'eau de synérèse qui apparait après la prise en gel, traduit l'excès de solvant qui ne peut être admis par le colloïde. La mesure du taux de gonflement peut donc être obtenue en calculant la différence de

poids d'un gel d'agar consécutive à l'expression de l'eau de synérèse. Celle-ci est accentuée en congelant les échantillons puis en les décongelant.

Des échantillons ont été préparés à partir d'agars extraits de thalles cultivés dans différentes conditions, et solubilisés dans des milieux à base d'eau de mer de concentrations variables ( eau distillée, 1/2 concentration eau de mer, eau de mer, NaCl 1M et NaCl 2M).

**ETUDE DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES DE DEVELOPPEMENT DE  
LA PAROI. - SYNTHESE D'AGAR -.**

L'interprétation des données des variations saisonnières de l'agar extrait de *Gracilaria verrucosa* dans son habitat naturel pose le problème du cycle de production du phycocolloïde et des mécanismes physiologiques qui en déterminent la synthèse dans la paroi.

A partir de relevés trimestriels effectués sur une année (CHRISTIAEN 1981), il est possible de construire la courbe des variations des teneurs en agar et la courbe de la matière sèche des algues échantillonnées. Elles permettent d'appréhender les grandes tendances métaboliques de l'algue au cours de son développement. De fait, la courbe des rendements en agar est toujours décalée dans le temps par rapport à la courbe de croissance. Ce décalage pourrait signifier, en terme de synthèses, que l'algue constitue en phase de croissance des réserves carbonnées qui contribueraient à l'augmentation de la biomasse. La quantité d'agar augmenterait peu pendant la croissance. L'agar serait alors synthétisé plus rapidement dans un deuxième temps pour atteindre un optimum de production après la période de croissance. Au cours de cette période, il n'y aurait plus de synthèse de matière sèche (hors agar), ce qui expliquerait l'augmentation des rendements en colloïdes.

L'exemple tiré de la **Figure 5** illustre bien ce qui vient d'être dit. La zone A fait apparaître une augmentation des teneurs de matière sèche et d'agar. La zone B, contigüe, met en évidence un gain de matière sèche et une diminution des rendements en colloïdes. Par conséquent, le moment de l'analyse détermine le sens des relations entre croissance et production d'agar.

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

Il s'agit donc de définir les principes métaboliques qui président à l'évolution de la matrice pariétale. Il semble évident que les facteurs favorisant l'élongation ou la différenciation de la paroi affecteront les

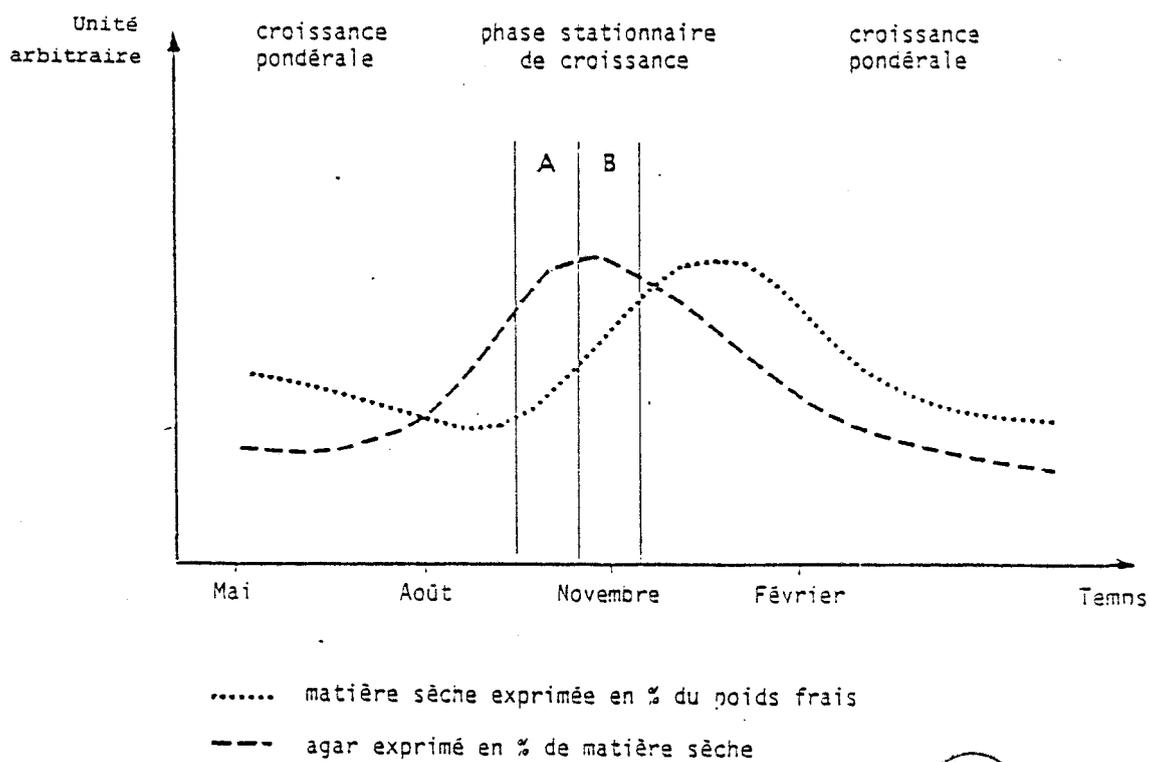


Fig. 5 : Variations des rendements en agar (en % de matière sèche) et des teneurs de matière sèche (en % du poids frais) de *Gracilaria verrucosa*, en fonction des saisons

composés qui la constitue. Les matériaux nouveaux qui s'incorporent sont d'origine cytoplasmique et résultent de l'activité photosynthétique. En conséquence, l'étude peut se limiter à évaluer l'effet de la lumière et de la température sur le métabolisme pariétal. STADLER (1984) a par ailleurs montré l'influence de l'engraissement azoté sur la production d'agar chez *Gracilaria verrucosa*.

## I. - DESCRIPTION DE L'ETAT INITIAL

### A - Rappels anatomiques

Le thalle adulte de *Gracilaria verrucosa* se présente sous l'aspect de touffes constituées de frondes cylindriques brun-rouges dont la longueur varie de 3 à 5 cm en hiver et jusqu'à 20 cm en été. Ces frondes principales se divisent en rameaux secondaires et tertiaires de même forme. L'ensemble est retenu sur le substrat rocheux par l'intermédiaire d'un disque circulaire.

Une coupe transversale de l'une des frondes montre de l'extérieur vers l'intérieur : un anneau périphérique de deux rangées de petites cellules (5  $\mu\text{m}$ )(Fig. 6). KLING (1978) remarque la régularité des divisions anticlines qui donne un aspect palissadique à cette région. Une série de deux ou trois assises de cellules plus volumineuses, à rhodoplastes, concentrique à la première zone corticale, représente la zone subcorticale (Pl.I, fig.1). Au centre, une moelle parenchymateuse se forme par l'association de grandes cellules (130  $\mu\text{m}$ ) reliées entre elles par de nombreuses synapses .

### B - Cytologie(Planches I et II)

Le cytoplasme des cellules de *Gracilaria verrucosa* est rarement observé dans un état turgescent. Les cellules corticales et subcorticales présentent peu de vacuoles et celles-ci sont toujours de petite taille ( Pl.I, Fig.2). Les cellules médullaires, très grandes, possèdent de grandes vacuoles ; leur cytoplasme, pauvre en ribosomes, est réduit à une mince couche à la périphérie cellulaire.

Les cellules du cortex sont caractérisées par un cytoplasme très dense et opaque aux électrons, et par la présence de rhodoplastes peu nombreux mais de grande taille, à thylakoïdes très rapprochés les uns des autres (Pl. II, Fig.3). L'amidon extraplastidial occupe une partie importante de la

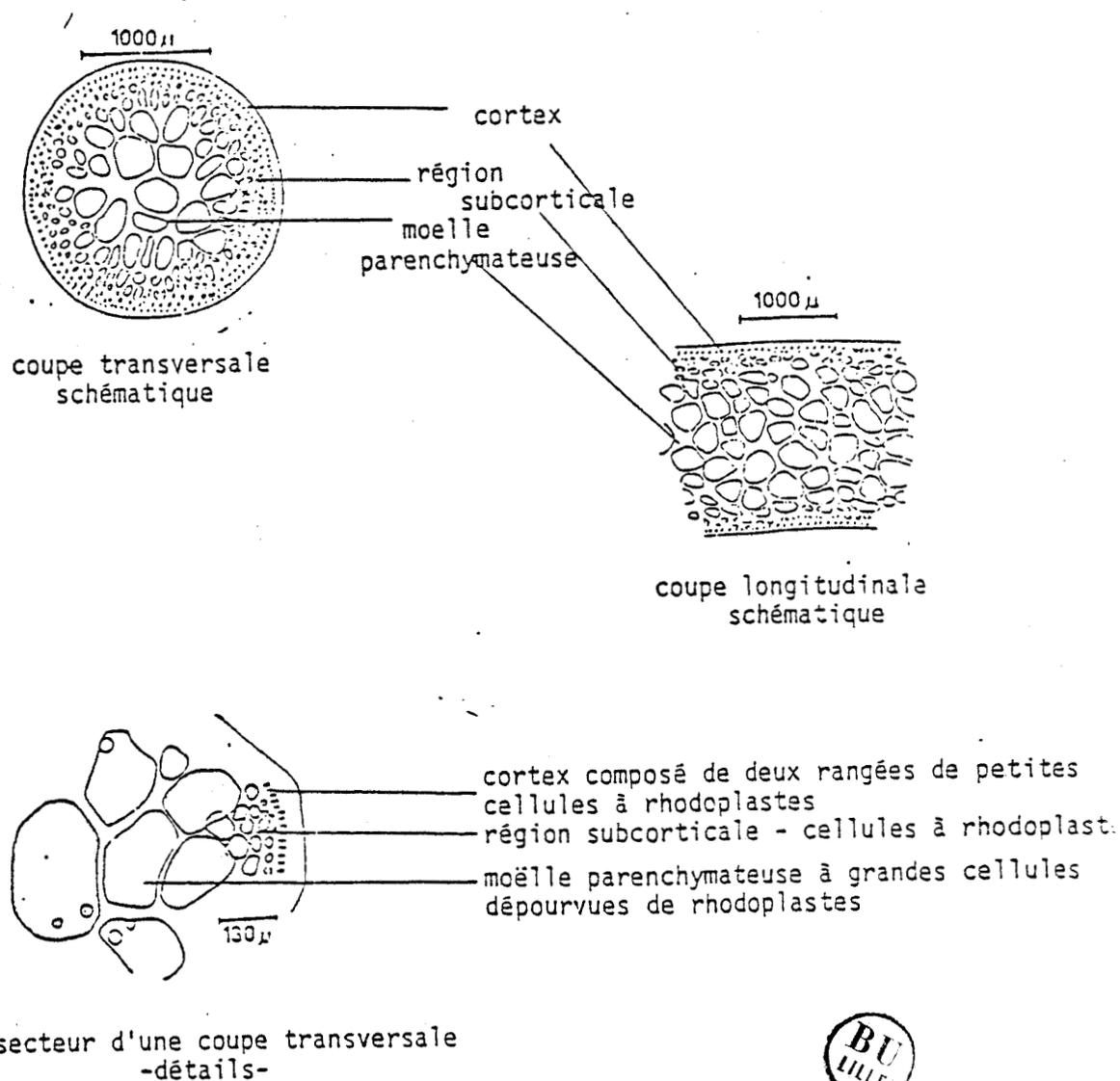


Fig. 6 : Coupes transversales et longitudinales d'une fronde de *Gracilaria verrucosa*.

d'après KIM (1970)

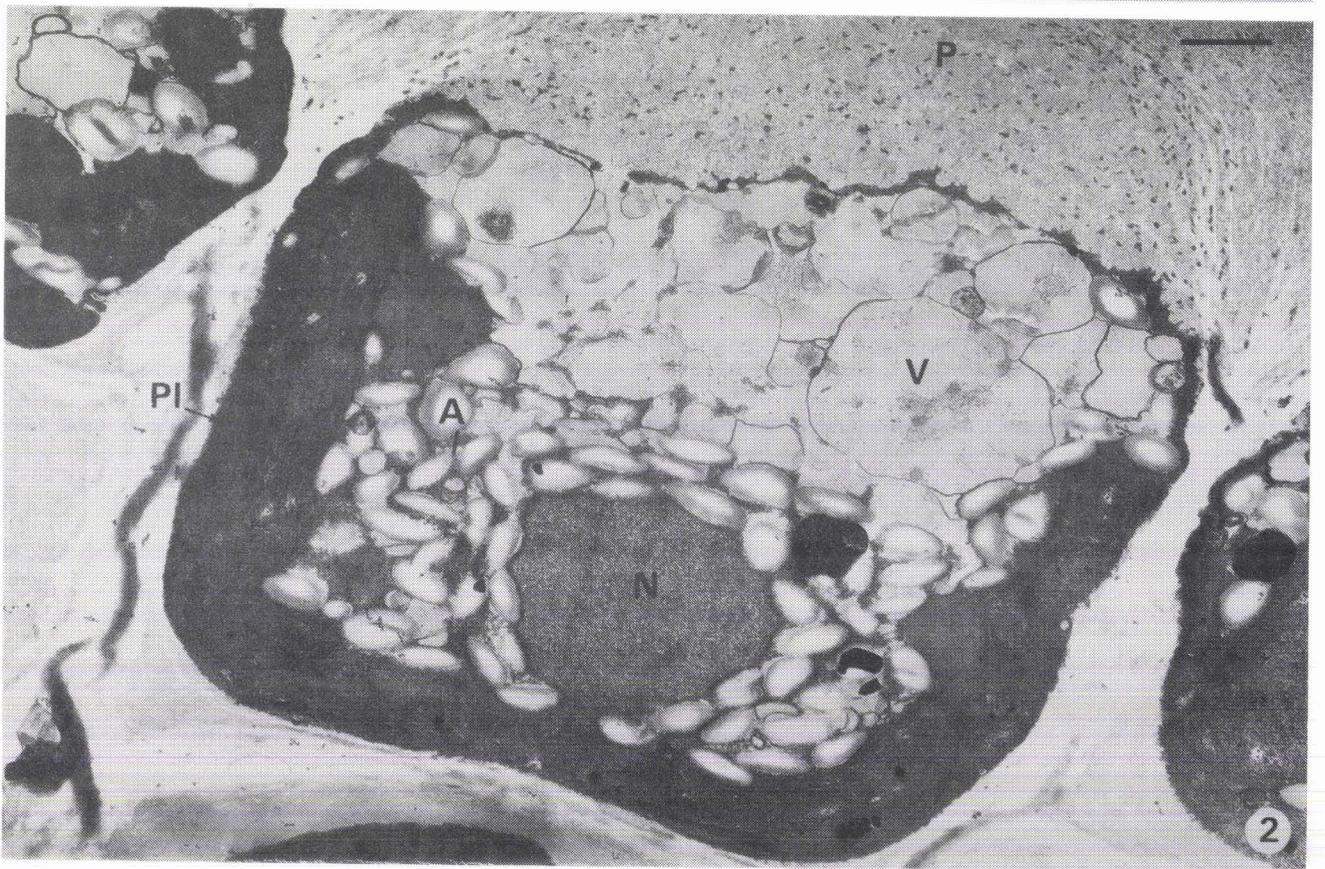
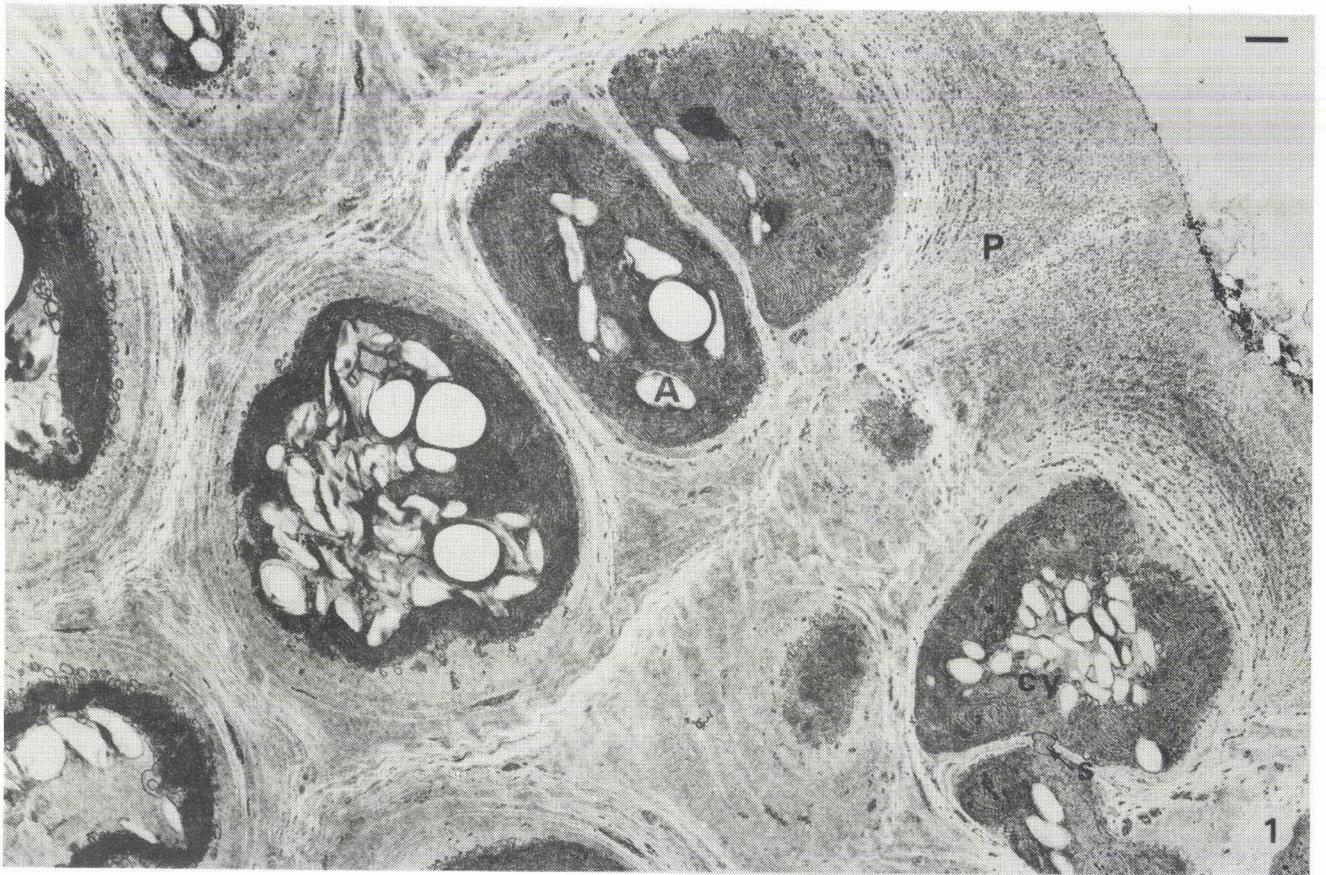


PLANCHE I

BU  
LILLE

## PLANCHE I - CELLULES DU CORTEX

Fig. 1. - Vue d'ensemble de la zone corticale montrant l'importance des parois. x 6000.

Fig. 2. - Coupe d'une cellule corticale de thalle cultivé en conditions de croissance. Les plastes et les grains d'amidon sont rassemblés vers la partie interne du thalle. x 12000.

Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Abréviations : A, amidon ; cy, cytoplasme ; N, noyau ; P, paroi ; Pl, plaste ; s, synapse ; V, vacuole.

Echelle : 1  $\mu$ m

cellule chez les algues en période de croissance (Pl. I, Fig.2) ; il est généralement situé entre les plastes et le noyau. Certaines cellules sont binuclées. Des mitochondries sphériques, à crêtes tubulaires apparaissent par place (Pl.II, Fig.4). L'appareil de Golgi est peu abondant. Seuls quelques dictyosomes sont observés (Pl.II, Fig.5). Des vésicules, vraisemblablement d'origine golgienne, sont nombreuses au voisinage du plasmalemme, témoignant d'une activité sécrétrice de polysaccharides (Pl.II, Fig.6). Le plasmalemme est toujours très sinueux.

### C - Ultrastructure de la paroi de la plante adulte

(Planche III).

La plupart des études ultrastructurales réalisées sur des algues rouges portent essentiellement sur l'arrangement de la phase squelettique : MYERS et al. (1956), MYERS et PRESTON (1959 a et b), DAWES et al. (1961), BISAPULTRA et al. (1967), McBRIDE et COLE (1971, 1972), LICHTLE (1975), TRIPODI et DE MASI (1975), MSHIGENI (1977), BOROWITZKA (1978), YOUNG (1980), GRETZ et al. (1982). Cependant McCANDLESS et al. (1977) étudient l'effet de l'extraction des carraghénanes sur l'ultrastructure de la paroi de *Chondrus crispus*. La plupart de ces travaux concernent donc des algues productrices de carraghénanes. Par contre, les agarophytes ont été beaucoup moins étudiées (DAWES et al. 1961 étude de *Gelidium cartilaginum*). Une approche analogue à celle de McCANDLESS et al. (1977) a été employée pour étudier la paroi de *Gracilaria verrucosa* en raison de l'importance de la substance matricielle par rapport à la partie fibrillaire.

La paroi cellulaire des algues est formée d'une succession de strates concentriques disposées autour de chaque cellule (paroi *stricto sensu*) et de la substance matricielle qui occupe les espaces intercellulaires. Chez *Gracilaria verrucosa*, plusieurs couches, de structure différente, sont reconnues du plasmalemme vers l'extérieur de la paroi (Pl;III, Fig.7).

#### - Zone périplasmique

La zone périplasmique est vraisemblablement la partie la plus active de la paroi et le lieu de sa construction. Le plasmalemme montre une intense activité (Pl.III, Fig.7 et 8). Il présente de nombreuses invaginations au niveau desquelles sont implantées des microfibrilles polysaccharidiques fortement réactives à la technique de THIERY (Pl.III, Fig.9 et 10). De nombreuses vésicules claires et des vésicules à contenu fibrillaire se

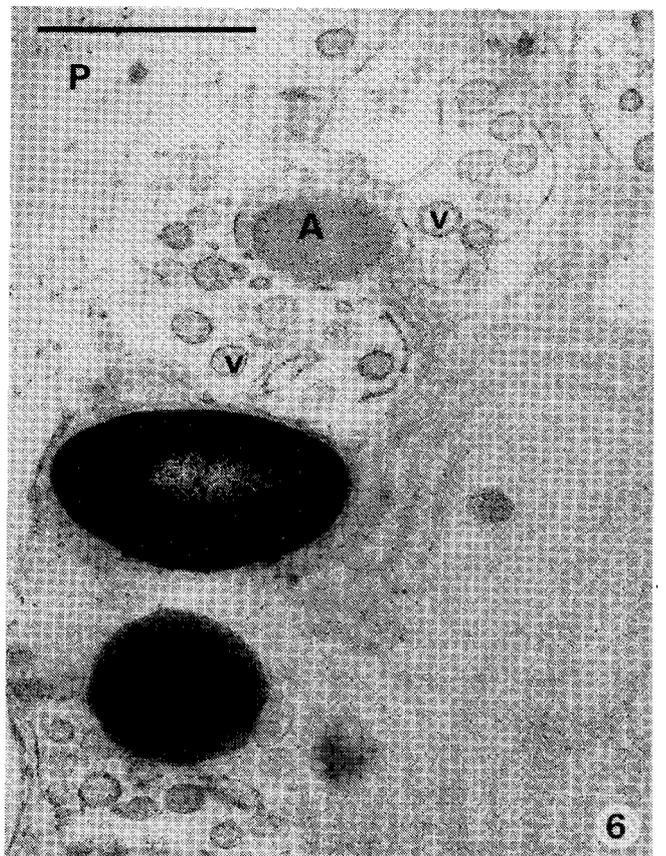
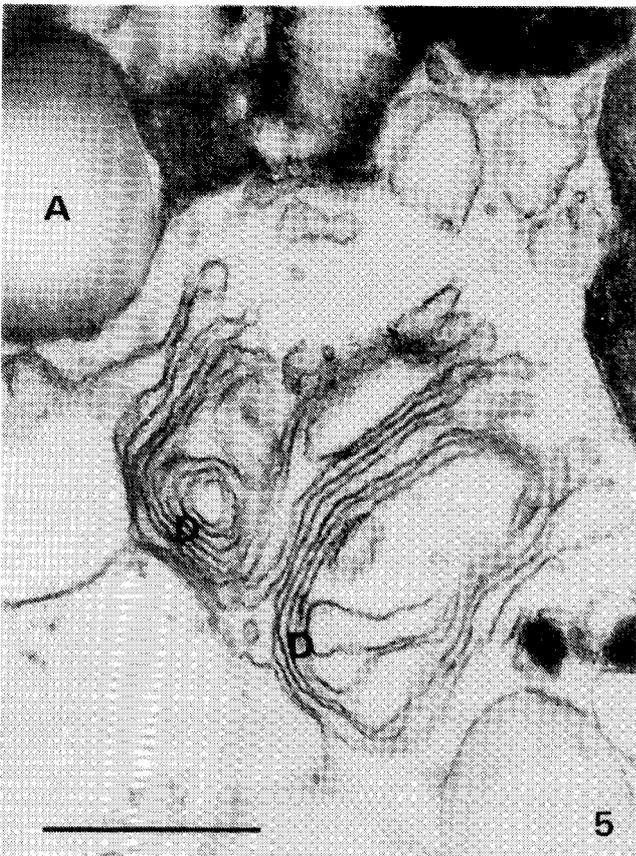
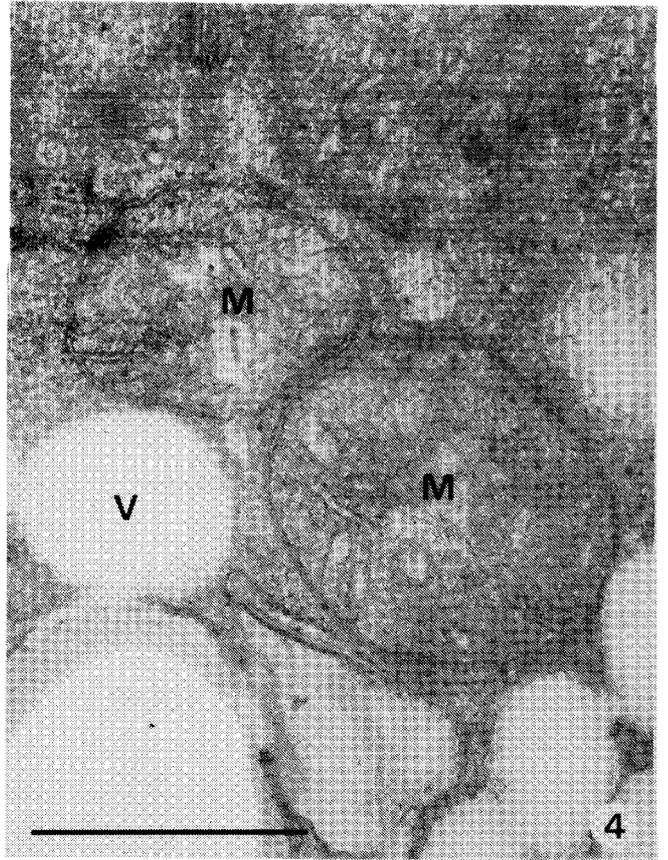
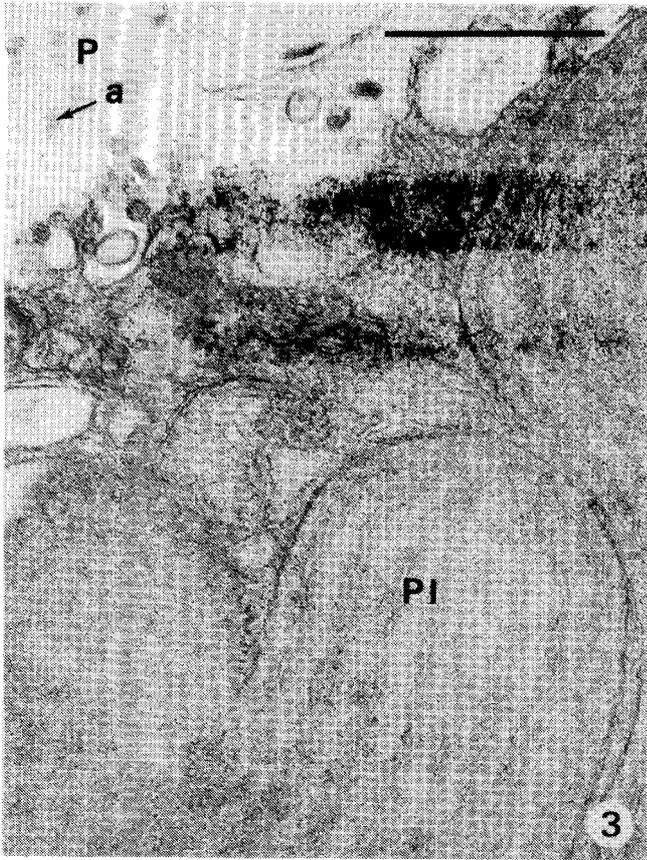


PLANCHE II

## PLANCHE II - ORGANITES CELLULAIRES

Fig. 3. - Coupe de cellule corticale avec un plaste à thylakoïde périphérique caractéristique des Algues rouges. Formation de vésicules au dépend du plasmalemme. x 60000.

Fig. 4. - Mitochondries à crêtes tubulaires. x 75000.

Fig. 5. - Deux dictyosomes émettant des vésicules golgiennes. x 60000.

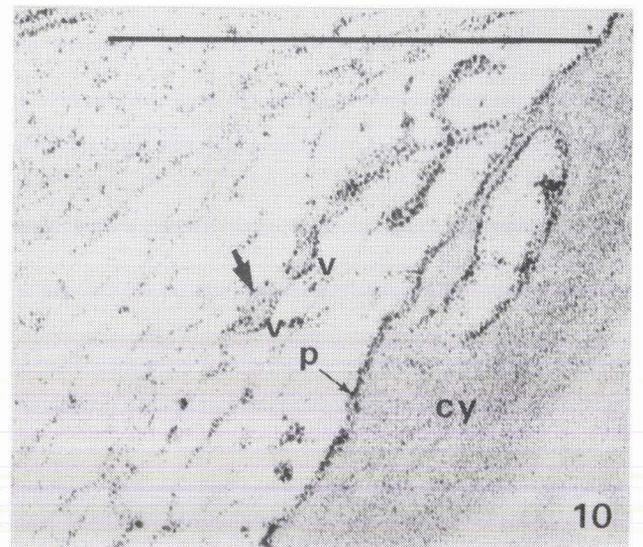
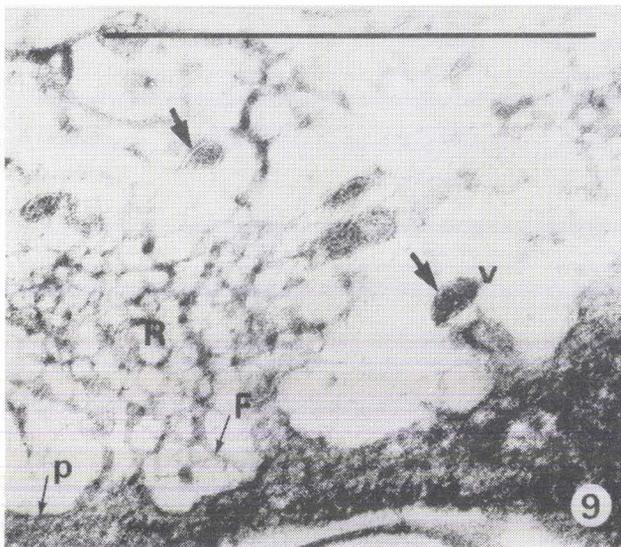
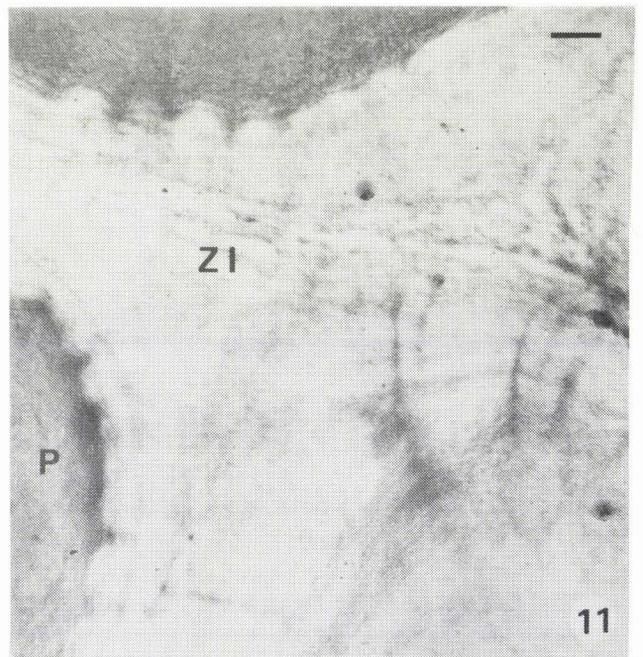
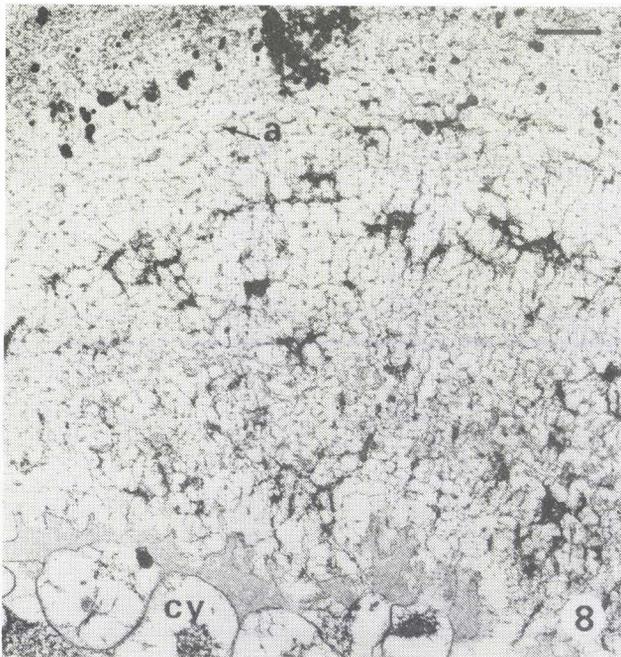
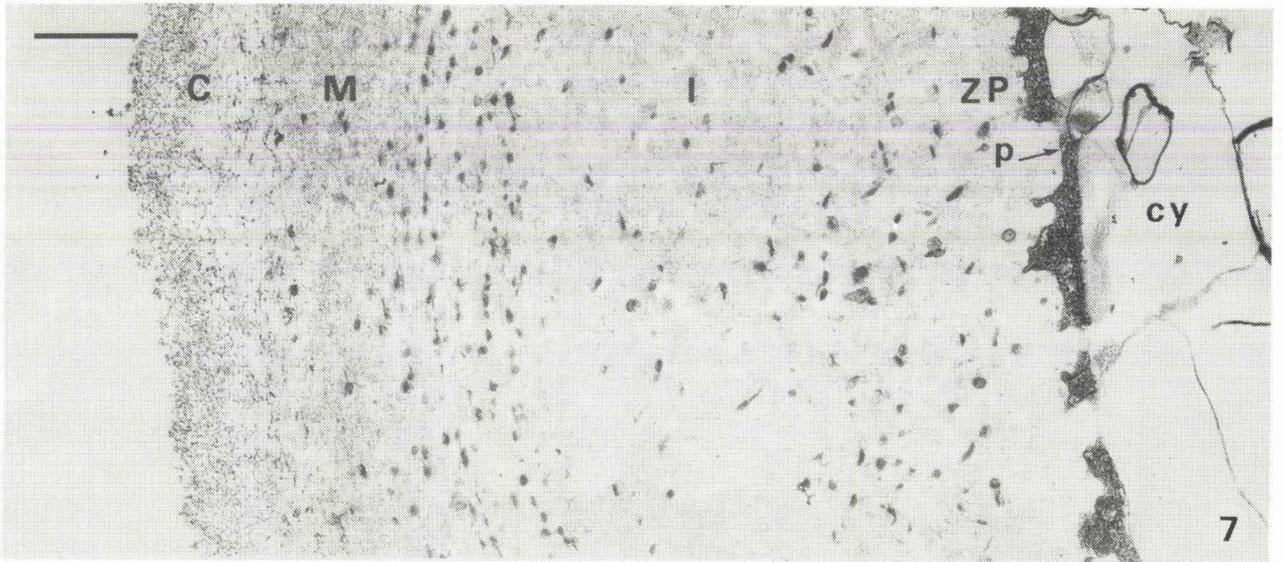
Fig. 6. - Nombreuses vésicules golgiennes groupées dans la zone périphérique du cytoplasme et paraissant se déverser à l'extérieur de la cellule. Grains d'amidon fortement réactifs au test de Thiéry. x 60000.

Fig. 3 à 5 : Contrastant acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Fig. 6. - PATAg.

Abréviations : a, amas dense ; A, amidon ; D, dictyosome ;  
M, mitochondrie ; P, paroi ; Pl, plaste ; v,  
vésicule golgienne ; V, vacuole.

Echelle : 0.5  $\mu$ m.



BU  
LILLE

PLANCHE III

### PLANCHE III - PAROI DU THALLE ADULTE TÉMOIN

Fig. 7. - Coupe transversale de la paroi externe. Plusieurs couches s'observent du plasmalemme (p) à la partie externe de la paroi : la zone périplasmique (ZP), la zone interne (I), la zone moyenne (M). La paroi externe est bordée par une couche cuticulaire (C). Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb. x 28000.

Fig. 8. - Zone interne de la paroi montrant la phase fibrillaire disposée en réseau. Vésicules périplasmiques (v) et amas denses (a) sont très faiblement contrastés. Contrastant : acide périodique 5 %, thiocarbohydrazide, protéinate d'argent. x 38000.

Fig. 9. - Zone périplasmique : fibrilles polysaccharidiques (F) attachées au plasmalemme (p) et substance matricielle paraissant émises par exocytose. Les vésicules périplasmiques (v) nettement délimitées par une membrane (flèche) se forment par la séparation d'une proéminence du plasmalemme. R, fibrilles disposées en réseau. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb. x 132000.

Fig. 10. - La réactivité de la membrane des vésicules périplasmiques (v) est la même que celle du plasmalemme (p). Le contenu des vésicules n'est pas réactif. Contrastant : acide périodique 5 %, thiocarbohydrazide, protéinate d'argent. x 132000.

Fig. 11. - Zone intercellulaire (ZI) faiblement contrastée et paroi *sensu stricto* de cellules corticales âgées (P) dont la partie externe montre une disposition plissée. Contrastant : acide périodique 1 %, thiocarbohydrazide, protéinate d'argent. x 13400.

Abréviations : a, amas dense ; C, couche cuticulaire ; cy, cytoplasme ; F, fibrille ; I, zone interne de la paroi ; M, zone moyenne de la paroi ; p, plasmalemme ; P, paroi ; R, fibrilles en réseau ; v, vésicule périplasmique ; ZP, zone périplasmique.

Echelle : 0.5  $\mu$ m

trouvent dans le cytoplasme périphérique et se déversent par exocytose dans le périplasma (Pl.III, Fig.10). Au niveau du plasmalemme peut être observé la formation d'enclaves cytoplasmiques proéminentes à l'origine des vésicules périplasmiques dont le contenu est bien contrasté par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Pl.III, Fig.9). Leur membrane présente la même réactivité que le plasmalemme au test de THIERY. L'existence de ces vésicules a été décrite chez des Rhodophycées productrices de carraghénanes : *Laurencia* (BISALPUTRA et al. 1967), *Polysiphonia* (LICHTLE 1974), *Antithamnion* (YOUNG 1980) chez qui ce phénomène est intense et conduit à la formation de véritables "canaux" fortement osmiophiles dans la partie interne de la paroi des cellules âgées.

A la limite du périplasma et de la paroi proprement dite, les fibrilles polysaccharidiques se disposent progressivement en réseau et paraissent anastomosées. Des vésicules périplasmiques sont incluses dans les mailles du réseau.(Pl.III, Fig.9).

- Zone interne de la paroi.

L'examen des coupes semi-fines en microscopie photonique permet de différencier nettement la partie interne de la paroi. Le rouge de ruthénium, qui colore sélectivement les matières pectiques, la colore très vivement, montrant ainsi qu'elle est composée en grande partie par la substance amorphe. En microscopie électronique, la partie interne de la paroi proprement dite présente une structure lâchement fibrillaire. Les fibrilles enrobées dans la matrice amorphe apparaissent très peu contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Pl.III, Fig.7). Par contre, elles sont fortement réactives aux tests de mise en évidence des polysaccharides, notamment après une oxydation périodique drastique. La phase squelettique fibrillaire n'est pas homogène. Elle est répartie en strates concentriques de densité inégale, formant par place des amas de fibrilles très serrées et très fortement réactives (Pl.III, Fig.8). Dans cette zone, de nombreuses fibrilles sont orientées dans le sens radial. Les vésicules périplasmiques, bien visibles sur la Fig.7 de la Pl.III sont nettement limitées par une membrane. La phase matricielle amorphe, bien que de nature polysaccharidique, n'est pas contrastée par la technique de THIERY (Pl.III, Fig.8), alors qu'elle est très faiblement osmiophile sur la Fig.7.

- Zone moyenne de la paroi.

La phase fibrillaire devient de plus en plus dense; les fibrilles sont plus tassées et se disposent en strates concentriques très serrées entre lesquelles les amas denses dérivés des vésicules périplasmiques sont toujours bien visibles mais dont la membrane devient indiscernable. Les parois des cellules âgées montrent un aspect caractéristique : l'ensemble des strates fibrillaires prend une disposition plissée qui s'accroît avec le vieillissement cellulaire (Pl.III, Fig.11). Cette partie de la paroi est moins riche en substance matricielle que la zone interne. Cela se traduit par une moindre coloration par le rouge de ruthénium et par une coloration bleue intense par le bleu de toluidine. La paroi **sensu stricto** apparaît donc composée de deux couches de coloration différente.

- Zone externe de la paroi.

Cette couche enveloppe l'ensemble du thalle et peut être considérée comme une zone cuticulaire bien qu'elle n'ait pas la même composition biochimique que la cuticule des végétaux terrestres. Elle apparaît en bleu vif après coloration au bleu de toluidine et incolore avec le rouge de ruthénium. Sa structure est très finement granulaire. Chez **Gracilaria verrucosa** (Pl.III, Fig.7), elle ne forme pas une strate nettement délimitée comme cela se voit chez d'autres algues rouges, **Laurencia** (BISAPULTRA et al. 1967), **Porphyra** (HANIC et CRAIGIE 1969), **Polysiphonia** (LICHTEN 1974), **Antithamnion** (YOUNG 1980). La zone cuticulaire ne renferme jamais d'amas denses.

- Zone intercellulaire.

Les zones intercellulaires, très riches en substance matricielle, sont fortement colorées par le rouge de ruthénium et provoquent le virage au rose du bleu de toluidine. Ces espaces intercellulaires ne sont cependant pas totalement dépourvus de fibrilles. Celles-ci sont disposées de façon grossièrement parallèles entre elles. Comme dans la zone moyenne de la paroi, les fibrilles des parties corticales âgées prennent une disposition générale plissée (Pl.III, Fig.11).

## D - Ultrastructure des parois après extraction de l'agar.

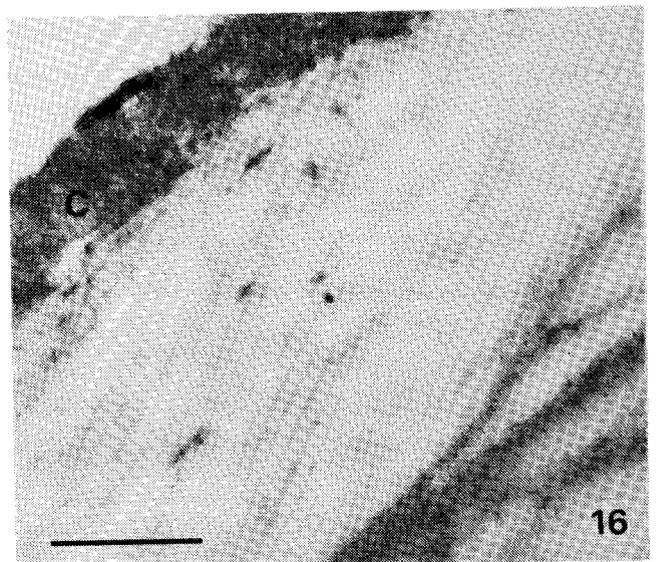
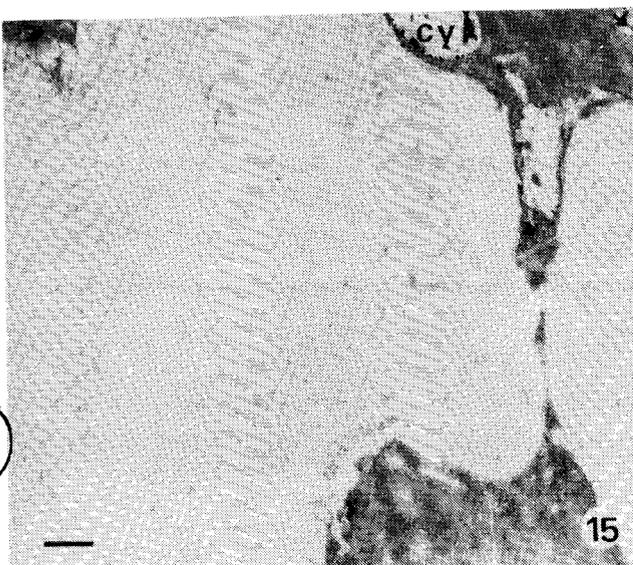
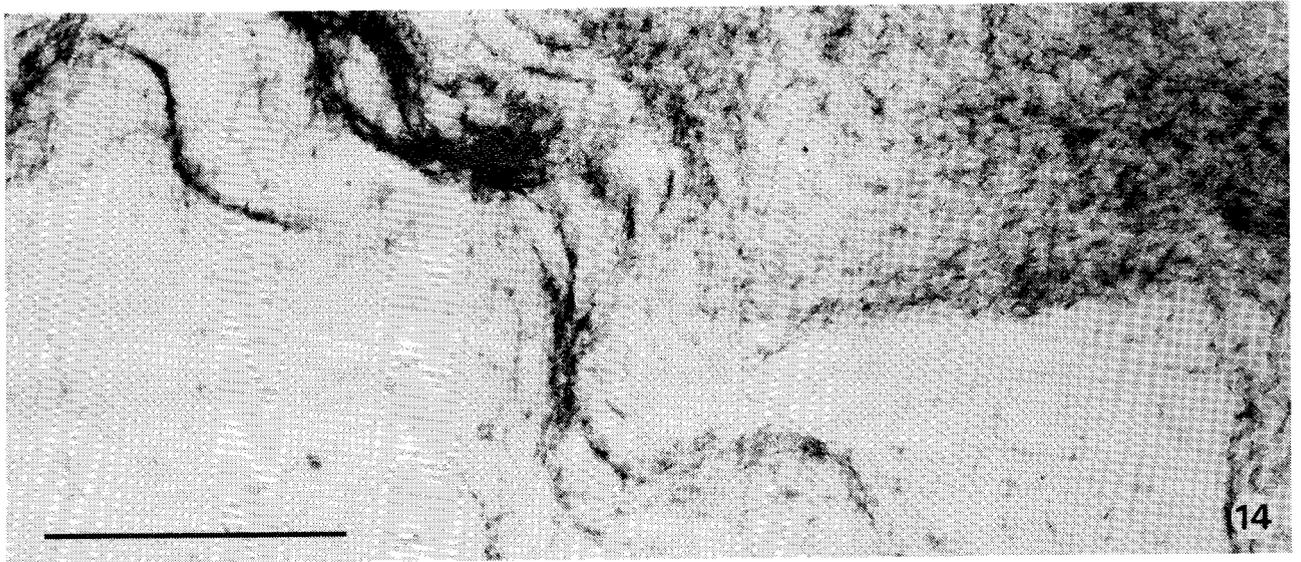
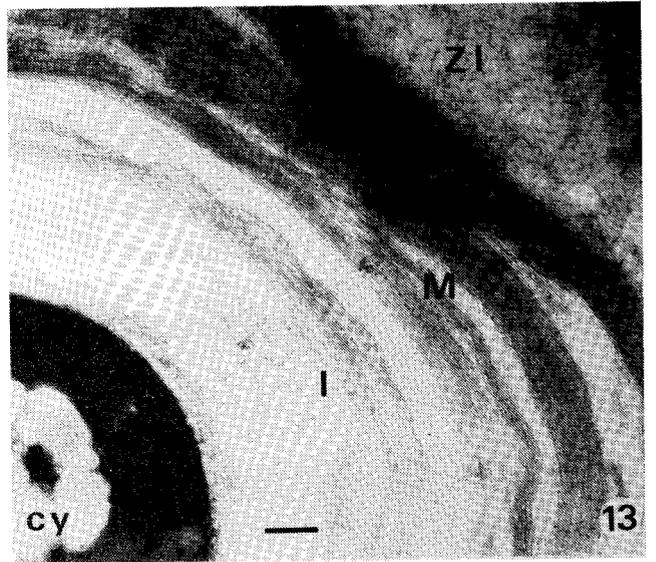
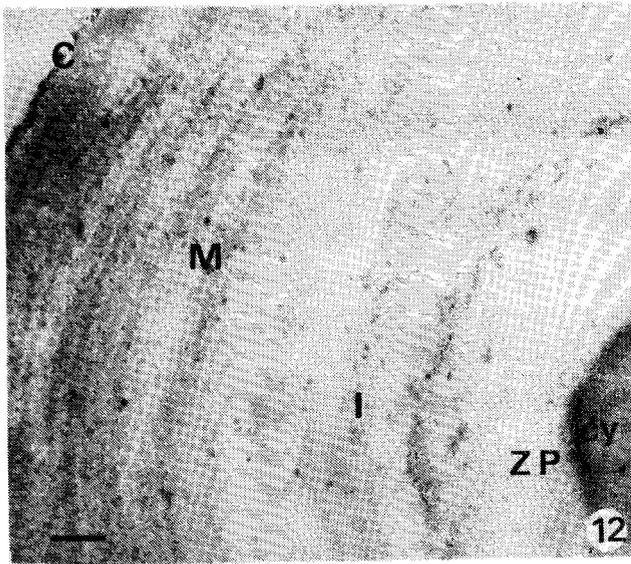
(Planche IV).

L'examen des coupes effectuées après l'extraction de l'agar selon la technique décrite par CRAIGIE et LEIGH (1978) et celle développée au laboratoire, exposée dans le chapitre Matériel et Méthodes, montre l'élimination de la matrice amorphe et d'une partie du squelette fibrillaire. Cependant, la paroi n'apparaît pas très désorganisée. Dans ces conditions, le bleu de toluidine ne colore plus que la zone cuticulaire et le rouge de ruthénium ne produit aucune coloration.

Après extraction de l'agar par la technique du laboratoire (CHRISTIAEN 1981), la zone périplasmique et la zone interne sont les plus fortement modifiées (Pl.IV, Fig.12). Les vésicules périplasmiques très altérées, tout comme le cytoplasme, restent cependant visibles. La phase fibrillaire n'est pas totalement éliminée. Elle demeure sous la forme de courts fragments de fibrilles. Les amas denses persistent aussi. Dans la zone moyenne, les fibrilles sont très irrégulièrement solubilisées. Certains fragments de paroi montrent des strates successives où les fibrilles apparaissent très désorganisées, séparées par des strates à structure fibrillaire nettement respectée (Pl.IV, Fig.13). Par contre la zone cuticulaire est inchangée. Il se produit fréquemment des déchirures entre la paroi **sensu stricto** et la cuticule. Dans les espaces intercellulaires, la dissolution de la matrice met très nettement en évidence les fibrilles (Pl.IV, Fig.14). A la limite de la paroi proprement dite, la disposition en réseau des fibrilles se distingue aisément, y compris dans la partie où elles sont tassées en strates parallèles. Les fibrilles des zones intercellulaires sont disposées en réseau à mailles régulières.

La technique de CRAIGIE, beaucoup plus drastique, désorganise et extrait en partie la phase fibrillaire de la paroi (Pl.IV, Fig.15). Il ne persiste que de très courts fragments de fibrilles, parfois simplement des amas granuleux. La disposition stratifiée des fibrilles ne se retrouve plus. Il devient impossible de distinguer les différentes zones de la paroi. Seule, la couche cuticulaire est respectée par ce type d'extraction (Pl.IV, Fig.16). Les parties intercellulaires sont également fortement désorganisées.

L'étude ultrastructurale des échantillons ayant subi l'extraction de l'agar révèle des différences entre les deux techniques utilisées. La technique de CRAIGIE aboutit à une dénaturation beaucoup plus importante



BU  
LILLE

PLANCHE IV

## PLANCHE IV - PAROI APRÈS EXTRACTION DE L'AGAR

Fig. 12 à 14 : Coupes de fragments de thalles après extraction de l'agar selon la technique de Christiaen. Contrastant : acide périodique 1 %, thiocarbohydrazide, protéinate d'argent.

Fig. 12. - Coupe de paroi externe (cf. fig. 1). cy, cytoplasme dénaturé ; zone périplasmique (ZP), zone interne (I) et zone moyenne (M) de la paroi sont nettement modifiées par l'extraction de l'agar. La zone cuticulaire (C) n'est pas altérée. x 15400.

Fig. 13. - L'extraction de l'agar-agar fait apparaître des différences de réactivité entre les strates fibrillaires. cy, cytoplasme ; I, zone interne et M, zone moyenne de la paroi ; ZI, zone intercellulaire. x 13400.

Fig. 14. - Phase fibrillaire de la zone intercellulaire avec parties fibrillaires denses et plissées, et espaces à fibrilles lâchement réticulées. x 80000.

Fig. 15 et 16 : Coupes de fragments de thalle après extraction de l'agar selon la technique de Craigie.

Fig. 15. - Les fibrilles sont désorganisées. Les résidus de la phase squelettique apparaissent sous forme granulaire ; cy, cytoplasme dénaturé. Contrastant : acide périodique 1 %, thiocarbohydrazide, protéinate d'argent. x 13400.

Fig. 16. - Paroi externe montrant la zone cuticulaire (C) intacte malgré l'utilisation d'une technique drastique d'extraction de l'agar. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb. x 40000.

Abréviations : C, couche cuticulaire ; cy, cytoplasme ; I, zone interne de la paroi ; M, zone moyenne de la paroi ; ZI, zone intercellulaire ; ZP, zone périplasmique.

Echelle : 0.5  $\mu$ m

des parois et des espaces intercellulaires que celle adoptée au laboratoire. Ces techniques diffèrent par l'utilisation de tissus broyés ou intacts et par la température d'extraction. Celle qui a été utilisée dans ce travail est plus douce et respecte davantage le squelette fibrillaire. L'étude quantitative de l'agar récupéré dans les deux cas montre que les deux méthodes ont le même rendement en produit final purifié. Cependant, l'aspect ultrastructural des coupes est différent. Les fibrilles sont très fragmentées par la technique de CRAIGIE. Il est possible que cette fragmentation et la dénaturation des fibrilles par la chaleur et la pression les rendent plus difficilement discernables; mais il se peut aussi qu'elles soient entraînées en même temps que les produits hydrosolubles et qu'elles soient éliminées au cours de la phase de purification de l'agar. Si le broyage des tissus et l'utilisation de températures élevées paraissent faciliter l'extraction de la substance matricielle, ils n'ont pas d'influence sur le rendement final en colloïde pur. Il semble donc que les deux techniques permettent de mobiliser tous les polysaccharides hydrosolubles.

Au niveau du plasmalemme, l'émission des vésicules périplasmiques ressemble parfois à la formation de plasmalemmasomes comme il est observé chez les végétaux supérieurs. Cependant, il ne s'agit pas du même phénomène car, chez la Gracilaire, ces vésicules persistent dans toute l'épaisseur de la paroi **sensu stricto**. Elles sont plus abondantes dans les parois des cellules externes que dans celles des cellules médullaires et présentent un aspect très caractéristique (Pl.III, Fig.9) surtout dans les parois des cellules jeunes. Leur rôle a été peu étudié. COTTLER (1971) chez **Chondrus crispus**, émet l'hypothèse que ces véritables évaginations cytoplasmiques qu'il propose de nommer "plasmalemmavillii" sont à l'origine du dépôt des carraghénanes dans les parois. Cependant, chez **Gracilaria verrucosa**, leur coloration est toujours différente de celle de la matrice, leur contenu n'est pas extrait en même temps que l'agar et le fait qu'elles demeurent sous forme d'amas denses dans les parois âgées paraît en contradiction avec l'hypothèse de COTTLER. YOUNG (1980) observe chez **Antithamnion** l'accumulation de "canaux" émis par le plasmalemme et qui convergent vers la paroi. Cet auteur interprète ce phénomène comme une possibilité de secondarisation de la paroi.

La nature des fibrilles squelettiques n'est pas clairement élucidée chez les algues rouges. Si plusieurs auteurs ont démontré la présence dans la paroi de faibles quantités de cellulose, NAYLOR et RUSSEL-WELLS (1934), ROSS (1953), YOUNG (1966), d'autres tels McCANDLESS et al. (1977)

mettent en doute son existence dans les fibrilles chez les mêmes espèces. Il est à souligner que la quantité de cellulose, lorsqu'elle existe, est faible et ne permet pas une réaction colorée nette par l'action du chlorure de zinc iodé ou par l'acide sulfurique et l'iode. Bien que l'aspect ultrastructural des fibrilles ressemble beaucoup à celui des plantes supérieures, il n'est pas possible d'affirmer qu'il s'agit de cellulose. En effet, certaines Rhodophytes possèdent des xylanes susceptibles de former des microfibrilles (GRETZ et al. 1982). Seule une analyse chimique très fine des composés restant en place après dissolution de la matrice permettra de connaître la nature des microfibrilles.

Chez les algues rouges, les fibrilles sont généralement disposées en filet réticulé (CRONSHAW et al. 1958, MYERS et PRESTON 1959b, DAWES et al. 1961, McCANDLESS et al. 1973). Selon DAWES et al. (1961), le modèle microfibrillaire général chez les Rhodophytes pour la paroi proprement dite est formé d'une strate externe de matériel mucilagineux et d'une strate interne de microfibrilles arrangées en filet et enveloppées dans la matrice amorphe. Or, chez *Gracilaria verrucosa*, la disposition générale est inversée. La partie interne de la paroi est constituée essentiellement de mucilage enrobant une structure fibrillaire en filet très lâche, alors que la partie externe de la paroi est organisée en strates de fibrilles réticulées mais très denses, tassées en strates parallèles. Des images comparables sont obtenues chez *Chondrus crispus* (McCANDLESS et al., 1977). KLOAREG (1984) classe les Rhodophytes dans le type III : microfibrilles disposées en lamelles tangentiellement à la surface de la cellule et, à l'intérieur de chaque lamelle, microfibrilles disposées sans direction préférentielle par opposition au type I (polyosides cristallins non organisés en microfibrilles) et au type II (microfibrilles sans orientations préférentielle, y compris par rapport à la surface de la cellule).

La zone circulaire qui enveloppe le thalle s'avère la partie la plus résistante de la paroi (Pl. IV, Fig. 16). Elle n'est pas dénaturée par l'extraction de l'agar et elle ne présente pas de réaction positive aux tests de mise en évidence des polysaccharides. HANIC et CRAIGIE (1969) ont montré chez toutes les espèces qu'ils ont examinées qu'il s'agit d'une couche de moins de 1 µm d'épaisseur renfermant environ 80% de protéines.

En conclusion, l'emploi parallèle de deux méthodes d'extraction de l'agar permet de mettre en évidence d'importantes différences dans l'aspect ultrastructural de la paroi et ce en dépit de la similitude des rendements

d'extraction du colloïde purifié. Une grande partie du surcroît de constituant arrachée à la paroi par la technique la plus drastique est probablement perdue au cours de la phase de purification. L'égalité des rendements en agar purifié montre bien que la totalité du colloïde extractible a été recueillie quelle que soit la procédure utilisée. La méthode du laboratoire (CHRISTIAEN 1981) respecte davantage la structure fibrillaire de la paroi et, de ce fait, elle présente moins de risques de contamination de l'agar par des fragments polysaccharidiques après l'étape de purification. En outre, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par McCANDLESS et al.(1977) chez *Chondrus crispus*, chez qui la partie hydrosoluble de la matrice est constituée par des carraghénanes, permet d'affirmer que l'organisation générale de la paroi des algues rouges ne varie guère, quelle que soit la nature chimique du colloïde qui forme l'essentiel de la matrice pariétale.(Fig.7)

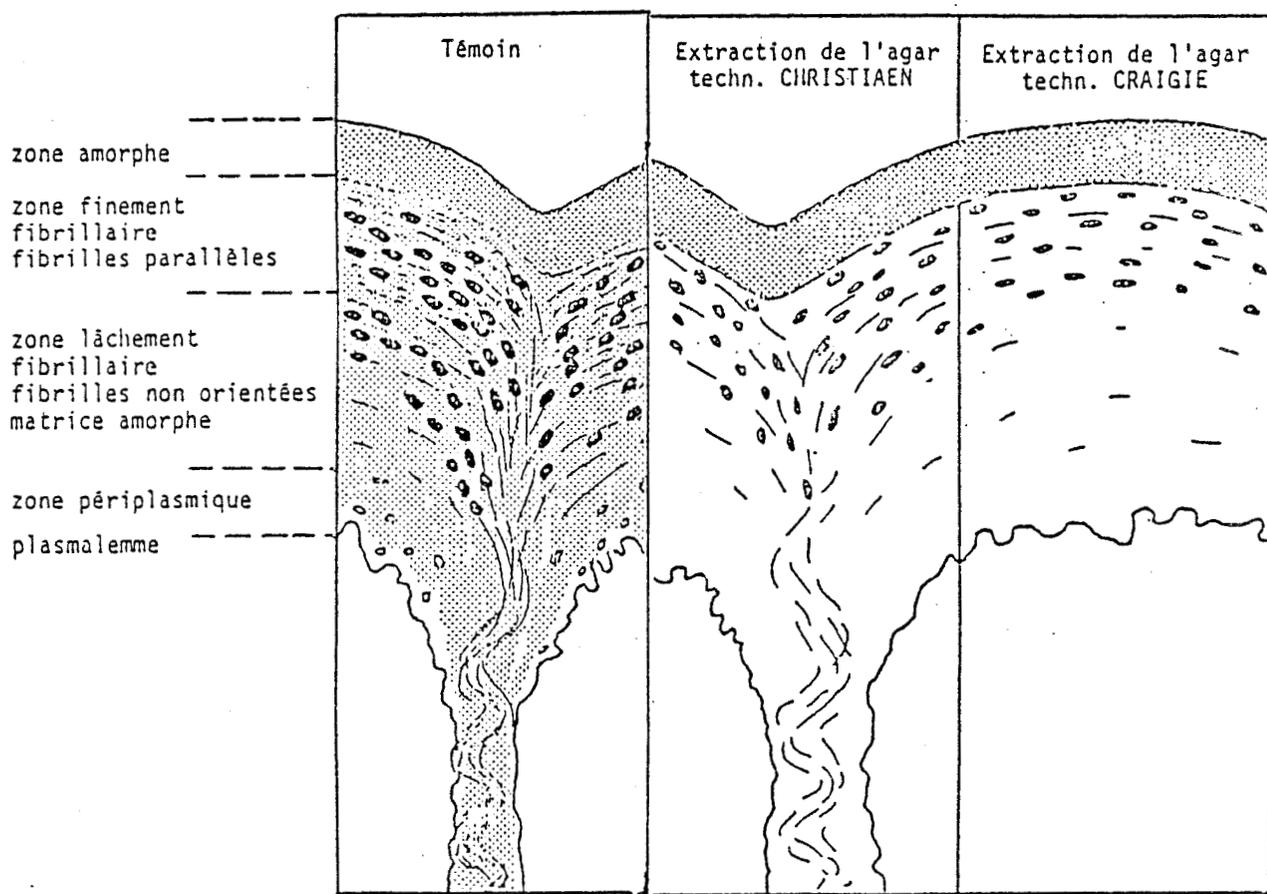
## II - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR L'ETAT STRUCTUREL DU CYTOPLASME ET DE LA PAROI.

### A - Le cytoplasme (Planche V).

Un échantillon témoin, cultivé 8 jours en lumière atténuée présente, d'un point de vue cytologique, un cytoplasme très vacuolisé et pratiquement dépourvu d'amidon (Pl.V, Fig.17). En condition de croissance, de nombreux grains d'amidon occupent l'essentiel du cytoplasme (Pl.V, Fig.18). Les chloroplastes se répartissent près de la membrane plasmique et sont concentrés vers l'intérieur du thalle. L'activité du plasmalemmes se traduit par l'intensité de l'émission de vésicules à contenu polysaccharidique.

Les parois des tissus jeunes, tels que les apex des ramifications, présentent un aspect lâche, peu contrasté et peu organisé.

En condition de non prolifération, les cellules observées en microscopie électronique permettent de remarquer la migration des chloroplastes à la périphérie des cellules vers l'extérieur du thalle (Pl.V, Fig.18). Le cytoplasme ne présente plus de réserve d'amidon aussi abondante qu'en période de fort éclaircissement (Pl.V, Fig.19). Il semble néanmoins qu'une adaptation photosynthétique déjà mentionnée à propos de pigments photorécepteurs relais, apparaisse en fin de culture, permettant la reconstitution de grains d'amidon.(Pl.V, Fig.20).



Persistance de quelques fibrilles et d'une partie de la matrice amorphe. La paroi n'est pas désorganisée.



Fig. 7 : Ultrastructure de la paroi de *Gracilaria verrucosa*

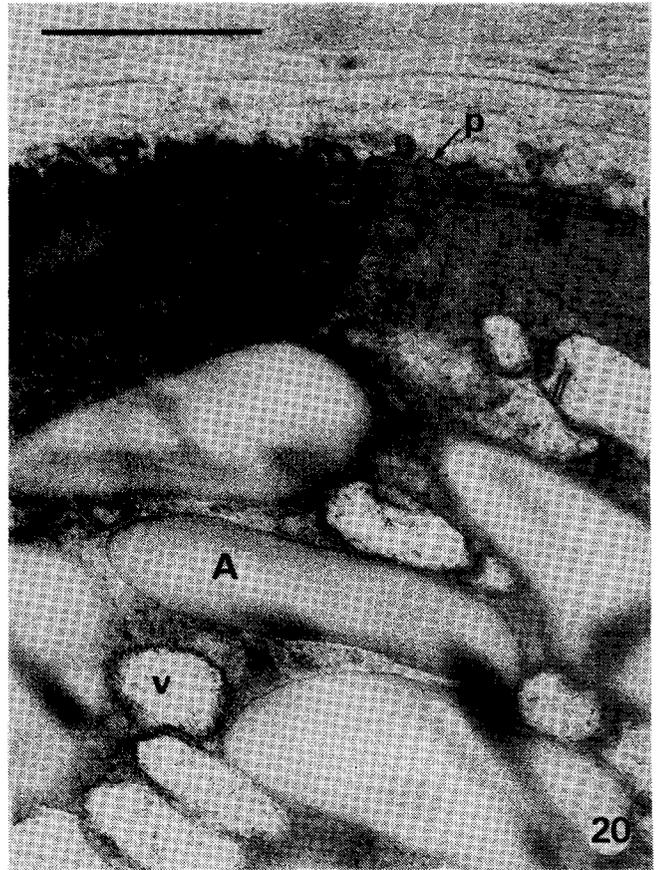
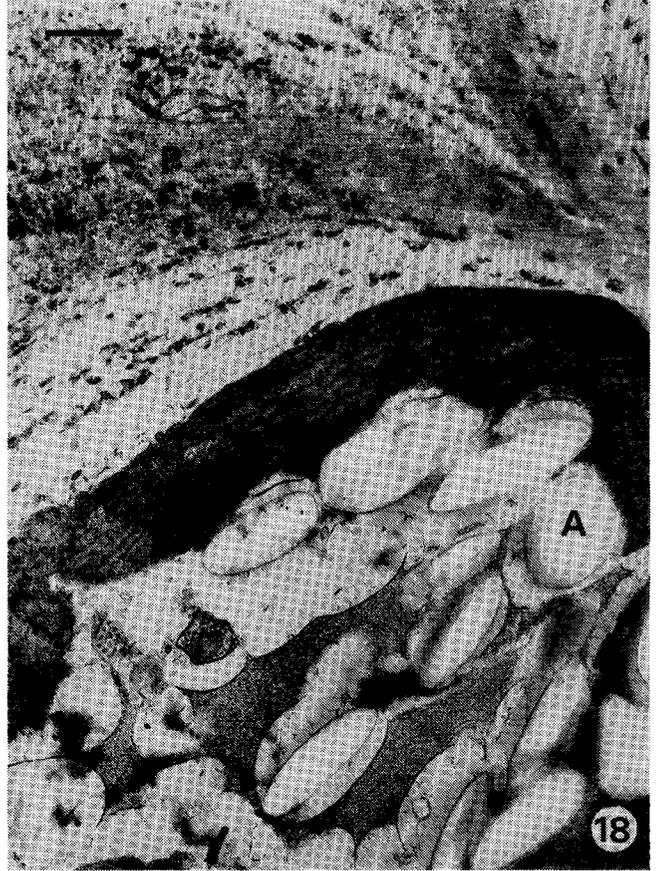


PLANCHE V - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR L'ÉTAT  
DU CYTOPLASME ET DE LA PAROI.

Fig. 17. - Prélèvement effectué après 8 jours de culture en lumière atténuée. Le cytoplasme est très vacuolisé et pratiquement dépourvu d'amidon. x 20000.

Fig. 18. - Prélèvement après 39 jours de culture dans les conditions de croissance. Les chloroplastes sont riches en plastoglobules lipidiques ; les grains d'amidon sont nombreux et de grande taille ; le cytoplasme renferme en outre des polysaccharides fibrillaires. x 20000.

Fig. 19. - Prélèvement après 53 jours de culture (39 jours en conditions de non-prolifération. Le cytoplasme présente peu d'amidon et de nombreuses vésicules probablement d'origine golgienne. x 28000.

Fig. 20. - Prélèvement après 67 jours de culture (39 jours en conditions de croissance suivis de 28 jours en conditions de non-prolifération. L'amidon est de nouveau abondant, de même que les vésicules cytoplasmiques à contenu polysaccharidique fibrillaire. x 58000.

Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Abréviations : A, amidon ; p, plasmalemme ; P, paroi ; Pl, plaste ; v, vésicule à contenu polysaccharidique.

Echelle : 0.5  $\mu$ m

L'activité des vésicules à contenu polysaccharidique persiste, assurant, semble-t-il, un lien biosynthétique entre l'amidon et la paroi, comme en témoigne la présence de certaines d'entre elles au contact des grains d'amidon puis au niveau du plasmalemma (Pl.V, Fig.20). De fait, la paroi paraît plus épaisse et plus contrastée qu'en période de croissance.

### B - Isolement de paroi

Des thalles de *Gracilaria verrucosa* sont cultivés en condition de croissance ou en phase stationnaire pendant un mois. Les parois des cellules des thalles en fin de culture sont isolées selon le protocole de KLOAREG (1984), modifié par STADLER (1984) et décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Les poids de matière sèche de parois isolées diffèrent peu suivant les conditions de culture (5,02 g pour 100g frais cultivés en condition de croissance contre 4,7g en phase stationnaire).(Tab.2). Les erreurs inhérentes aux nombreuses manipulations et transferts qu'exige cette technique ne permettent pas de dégager de différence significative.

Par contre, l'analyse des rendements en agar apporte de précieux renseignements. Les teneurs sont de 69% pour des parois isolées à partir de thalles cultivés en phase stationnaire contre 51% pour des parois obtenues à partir de thalles en croissance (Tab.2). La composition chimique de la paroi varie donc entre les deux types de conditions de culture : lorsque les conditions de culture sont défavorables à la croissance, il y a plus d'agarose proportionnellement à la matière sèche des parois.

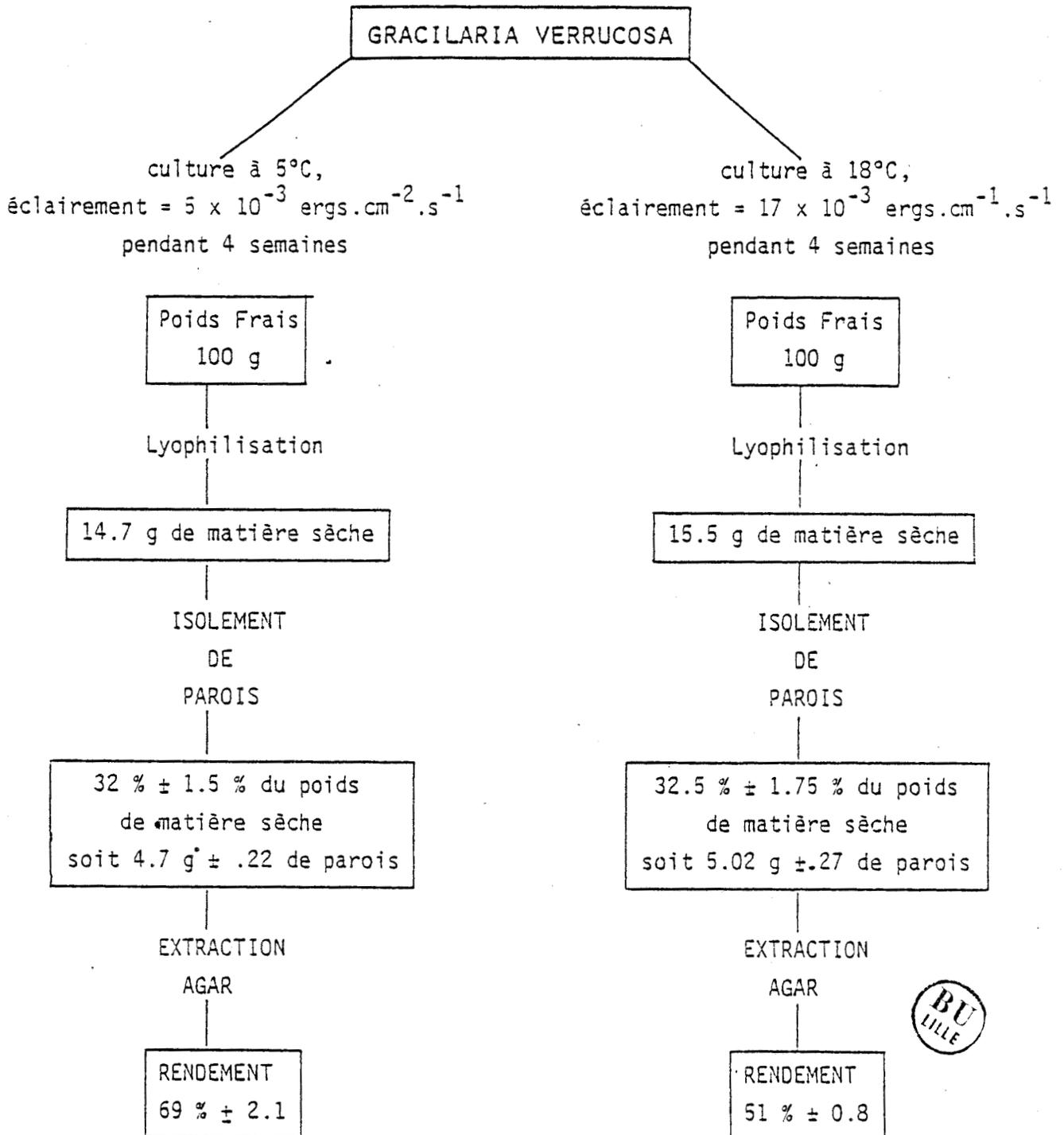
Quelques réserves doivent cependant être émises. En effet, les quantités totales d'agar, obtenues à partir des parois et rapportées à 100 g de poids frais, sont inférieures aux valeurs obtenues par une extraction directe de l'agar sur la matière sèche. Cette différence peut être attribuée à la perte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

La présence d'amidon dans les thalles doit être également soulignée car elle pourrait avoir une importance dans les expériences à venir. Des préparations en microscopie optique de surnageants, prélevés au cours des différentes étapes d'isolement de parois, révèlent de nombreux grains d'amidon colorés en bleu sombre par le lugol. Ce phénomène est beaucoup

TABLEAU 2

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

N = 3



plus marqué dans les thalles en condition de croissance. Cet amidon pourrait donc jouer un rôle important dans les variations de matière sèche relevées au cours de l'année et expliquer que des teneurs plus importantes de matière sèche soient notées en croissance qu'en phase stationnaire en culture *in vitro* (15,45 % contre 14,7% dans notre expérience).

### III - VARIATIONS DE LA PRODUCTION D'AGAR AVEC LA PHYSIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DU THALLE.

#### A - L'agar en phase de croissance des thalles.

##### 1. La croissance

Des thalles de *Gracilaria verrucosa* cultivés dans une eau de mer tempérée à 18-20°C sont dans des conditions favorables à la croissance. De même, les photopériodes "jour long" qui correspondent à un éclairage de 16h par 24h, et les énergies lumineuses incidentes de 17W/m<sup>2</sup> permettent l'augmentation de la biomasse. Celle-ci croît de 43,7% en 39 jours. (Tab.3). Elle est caractérisée par une synthèse de matière sèche qui représente 38% du gain de poids frais total et une entrée d'eau pour les 62% complémentaires.

Sur le plan anatomique, de nombreuses ramifications apparaissent sur le thalle. Elles participent pour moitié à l'accroissement de biomasse, mais seulement pour 25% au gain de matière sèche. Elles contiennent, par contre, jusqu'à 84,5% de l'eau du thalle. (Tab.4). Inversement les axes primaires accumulent la majeure partie de la matière sèche synthétisée (67%). Proportionnellement, l'entrée d'eau est moins forte que dans les parties jeunes. (Tab.5).

##### 2. L'agar.

La quantité d'agar extraite, rapportée au poids de matière sèche diminue entre le début et la fin de la culture ; elle chute de 30 à 23% en 31 jours de culture (Tab.6). Cette mesure exprime le rendement en agar. Néanmoins, la comparaison entre l'augmentation nette de matière sèche et la variation nette des masses d'agar extrait (Tab.7) indique une synthèse continue de polymères pariétaux, puisqu'il y a un gain net de 1,61 g par rapport aux 5,13 g existants au début de l'expérimentation. Celle-ci est masquée par l'accumulation des réserves amylières observée en microscopie électronique (Pl.V, Fig.18).

TABLEAU 3

VARIATIONS DE LA BIOMASSE ET DE LA MATIERE SECHE  
 DES AXES PRIMAIRES ET DES RAMIFICATIONS EN  
 CONDITIONS DE CROISSANCE (1).

JOURS	Variations de la Biomasse	Masse de matière sèche	
		Axes Primaires	Ramifications
	Grammes	%	%
0	100	17,27 $\pm$ 0,24	-
12	110,80	18,76 $\pm$ 0,06	13,45 $\pm$ 0,10
25	120,12	21,88 $\pm$ 0,13	16,99 $\pm$ 0,14
39	143,72	24,30 $\pm$ 0,38	18,25 $\pm$ 0,21

(1) : 17 w/m<sup>2</sup>, 18 °C, 16 : 8



TABLEAU 4

VARIATIONS NETTES DE LA MASSE DE MATIERE FRAICHE,  
 DE LA MASSE DE MATIERE SECHE ET DES QUANTITES  
 D'EAU DES RAMIFICATIONS DE THALLES CULTIVES  
 EN CONDITION DE CROISSANCE (1).

Durée de culture	Masse de matière fraîche totale(2)	Masse de matière fraîche des ramifications(2)	Masse de matière sèche des ramifications(2)	Masse d'eau des ramifications
Témoin	100	0	0	0
12	+ 10.80	+ 4.32 ± 0.54	+ 0.58	+ 3.74
25	+ 20.12	+ 9.89 ± 0.36	+ 1.68	+ 8.21
39	+ 43.70	+ 21.55 ± 0.70	+ 3.93	+ 17.62

(1) = éclaircissement =  $17 \text{ W.m}^{-2}$  température :  $18^{\circ}\text{C}$ , 16:É

(2) = en grammes



TABLEAU 5

VARIATIONS NETTE DE LA MASSE DE MATIERE FRAICHE,  
 DE LA MASSE DE MATIERE SECHE ET DES QUANTITES  
 D'EAU DES AXES PRIMAIRES DE THALLES CULTIVES  
 EN CONDITION DE CROISSANCE (1).

JOURS	Masse de matière fraîche totale (2) des thalles	Masse de matière fraîche des axes primaires (2)	Masse de matière sèche des axes primaires (2)	Masse d'eau des axes primaires (2)
Témoin	100	100	17,27	82,73
12	+ 10.80	+ 6.48 ± 0.54	+ 2.71	+ 3.77
25	+ 20.12	+ 10.33 ± 0.36	+ 6.87	+ 3.46
39	+ 43.70	+ 22.15 ± 0.70	+ 12.41	+ 9.74

(1) = éclairément :  $17 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $18^\circ\text{C}$ ,  $16:8$

(2) = en grammes



TABLEAU 6

VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR  
 ET DE SA QUALITE BIOCHIMIQUE EN  
 CONDITION DE CROISSANCE DES THALLES (1).

Jours	Agar	Oses totaux A	3.6-anhydrogalactose B	$\frac{A-B}{B}$
	% (2)	% (3)	% (3)	
0	29.70 $\pm$ .97	100.0 $\pm$ 0.2	48.5 $\pm$ 0.15	1.06
12	22.40 $\pm$ .56	96.4 $\pm$ 0.2	46.8 $\pm$ 1.30	1.06
25	25.90 $\pm$ .42	93.4 $\pm$ 0.1	39.5 $\pm$ 0.60	1.36
39	22.96 $\pm$ .22	91.3 $\pm$ 3.1	36.2 $\pm$ 0.30	1.52

(1) = éclaircissement =  $17 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $18^{\circ}\text{C}$ , 16:8.

(2) = exprimé en % de matière sèche

(3) = exprimé en % agar



TABLEAU 7

VARIATIONS NETTES DES QUANTITES DE MATIERE SECHE, D'AGAR  
 DE SUCRES TOTAUX ET DE 3.6-ANHYDROGALACTOSE  
 DE THALLES EN CROISSANCE (1).

Jours	Matière sèche	Agar	Oses totaux A	3.6-anhydrogalactose B	$\frac{A-B}{B}$
	grammes	grammes	grammes	grammes	
Témoin	17.27	5.13	5.13	2.49	1.06
12	+ 2.71	- 0.73	- 0.89	- 0.43	1.06
25	+ 6.87	+ 0.93	+ 0.53	- 0.09	1.36
39	+ 12.41	+ 1.61	+ 1.02	- 0.05	1.52

(1) = éclaircement =  $17 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $18^\circ\text{C}$ ,  $16:\bar{8}$



Dans le détail, la production d'agar est deux fois plus faible dans les ramifications (Tab.8) que dans les axes primaires (Tab.9). Elle ne représente que 10 à 15% du gain de matière sèche des ramifications. Elle est, par contre, de 25 à 30%, dans les axes primaires. En outre, la variation des quantités d'agar exprimée par rapport à la variation de la quantité de matière sèche, qui représente la vitesse de synthèse de l'agar, est stable dans les ramifications, mais diminue de moitié dans les axes primaires (Tab.8 et 9). Ce résultat traduit bien l'activité des jeunes tissus qui doivent assurer la construction des parois des nouvelles cellules, dans lesquelles les voies de biosynthèse s'équilibrent. Dans les tissus plus âgés, le métabolisme est plutôt orienté vers la constitution de réserves.

Sur le plan biochimique, la composition osidique des extraits subit des réarrangements qualitatifs (Tab.6 et 7). Globalement la teneur en 3,6-anhydrogalactose demeure constante, mais la quantité de galactose croît, diminuant le rapport entre les deux sucres, quotient qui peut être utilisé comme paramètre d'évaluation de l'agarose.

## B - L'agar en condition de non-prolifération

### 1. La phase stationnaire de croissance

La croissance des thalles de *Gracilaria verrucosa* est arrêtée pour des températures de l'eau de mer inférieures à 5°C. De même, les photopériodes "jour court" qui n'offrent que 8h de lumière par 24h et les faibles éclairages (7W/m<sup>2</sup>) limitent le développement pondéral de ces algues.

En effet, dans ces conditions, le poids frais diminue de plus de 7% sur la période d'analyse, tandis que le poids de matière sèche reste constant (Tab.10). La perte de biomasse est donc due essentiellement à un départ d'eau qui affecte particulièrement les axes primaires (9,51g en fin de culture)(Tab.11 et 12).

Aucune ramification nouvelle n'apparaît sur le thalle. Celles présentent en début de culture maintiennent leur rapport poids frais/ poids sec observé en condition de croissance (Tab.10). Le thalle devient plus rigide et de couleur plus sombre. Des mesure de teneur en phycoérythrine, réalisées par STADLER (1984) indiquent en effet une concentration de ces pigments en condition de lumière limitante.

TABLEAU 8

PRODUCTION D'AGAR ET DE MATIERE SECHE DANS LES RAMIFICATIONS  
 EN FONCTION DU TEMPS EN CONDITION DE CROISSANCE.  
 (pour 100 g de thalles frais au départ)

Durée de culture	Masse totale d'agar	(1) Agar	(2) Matière sèche	(1) Agar
	grammes	grammes	grammes	(2) Matière sèche
25 jours	0.27	0.27	1.68	0.16
39 jours	0.50	0.23	2.25	0.14

(1) Agar = Variation de la masse d'agar entre deux prélèvements

(2) Matière sèche = Variation de la masse de matière sèche entre deux prélèvements.



TABLEAU 9

## PRODUCTION D'AGAR ET DE MATIERE SECHE DANS LES AXES PRIMAIRES

EN FONCTION DU TEMPS EN CONDITION DE CROISSANCE.

(pour 100 g de thalles frais au départ)

Durée de culture	Masse totale d'agar	(1) Agar	(2) Matière sèche	(1) Agar Matière sèche (2)
	grammes	grammes	grammes	
25 jours	0.93	0.93	2.71	0.34
39 jours	1.61	0.68	4.16	0.16

(1) Agar = Variation de la masse d'agar entre deux prélèvements

(2) Matière sèche = Variation de la masse de matière sèche entre deux prélèvements.



TABLEAU 10

VARIATIONS DE LA BIOMASSE ET DE LA MATIERE SECHE  
 DES AXES PRIMAIRES ET DES RAMIFICATIONS EN  
 CONDITIONS DE NON PROLIFERATION (1).

JOURS	Variations de la Biomasse	Masse de matière sèche	
		Axes Primaires	Ramifications
	Grammes	%	%
14	93.3	25.05 ± .20	18.63 ± .15
28	92.7	26.56 ± .07	19.00 ± .14

(1) = éclaircement =  $5 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $5^{\circ}\text{C}$ , 8:16  
 Témoin = 100



TABLEAU 11

VARIATIONS NETTES DE LA MASSE DE MATIERE FRAICHE,  
 DE LA MASSE DE MATIERE SECHE ET DES QUANTITES  
 D'EAU DES AXES PRIMAIRES DE THALLES CULTIVES  
 EN CONDITION DE NON PROLIFERATION (1).

JOURS	Masse de matière fraîche totale (2) des thalles	Masse de matière fraîche des axes primaires (2)	Masse de matière sèche des axes primaires (2)	Masse d'eau des axes primaires (2)
Témoin	100	100	17.27	82.73
14	- 6.70	- 7.19 ± 2.38	- 0.89	- 6.30
28	- 7.30	- 9.69 ± 0.54	+ 0.18	- 9.51

(1) éclaircissement =  $5 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $5^{\circ}\text{C}$ , 8:16

(2) en grammes



TABLEAU 12

VARIATIONS NETTES DE LA MASSE DE MATIERE FRAICHE,  
 DE LA MASSE DE MATIERE SECHE ET DES QUANTITES  
 D'EAU DES RAMIFICATIONS DE THALLES CULTIVES  
 EN CONDITION DE NON PFOLIFERATION (1).

Durée de culture	Masse de matière fraîche totale (2)	Masse de matière fraîche des ramifications(2)	Masse de matière sèche des ramifications(2)	Masse d'eau des ramifications
Témoin	100			
14	- 6.70	- 1.19	+ 0.31	0.88
28	- 7.30	- 2.39	+ 0.62	1.77

(1) =  $5 \text{ w.m}^{-2}$ , température =  $5^{\circ}\text{C}$ , 8:16

(2) = en grammes



## 2. L'agar.

Les rendements en agar en fin de culture sont plus élevés (28,75%) (Tab.13) que ceux obtenus lorsque l'algue est en croissance (22,9%) (Tab.6). L'accroissement net pondéral est de 3,29g. La production d'agar dans les axes primaires devient prépondérante par rapport aux autres synthèses puisqu'elle est près de 2 fois supérieure à la production totale de matière sèche (agar inclus), ce qui suggère une mobilisation des réserves (Tab.14).

Dans les ramifications, la production d'agar est deux fois plus faible qu'en condition de croissance, mais elle représente alors 50% de la production de la matière sèche des jeunes pousses. (Tab.15).

Globalement, les rendements en agar s'accroissent lorsque les conditions de culture limitent la croissance des thalles. La part de l'agar dans la matière sèche a tendance à évoluer, tandis que l'amidon disparaît significativement du cytoplasme.

Sur le plan chimique, l'incorporation de précurseurs de l'agarose, transférés du cytoplasme en même temps que s'élimine l'amidon, modifie le rapport entre les deux sucres constitutifs de l'agarose qui évolue en augmentant la proportion de galactose, le 3,6-anhydro-galactose restant constant alors qu'en conditions de croissance ce résidu avait tendance à disparaître (Tab.16). Les antécédents cytoplasmiques, en particulier la richesse en réserve carbonnée, influent, par conséquent sur la qualité de l'agar synthétisé.

### C - Facteurs limitants la synthèse d'agar

L'apparente relation entre croissance et synthèse de phycocolloïde est insuffisante pour expliquer ce dualisme. La température comme effecteur enzymatique et l'éclairement (énergie et photopériode) comme effecteur photosynthétique sont deux facteurs susceptibles d'intervenir, de près ou de loin sur le métabolisme de l'agar.

Des essais ont été effectués en fixant tour à tour les paramètres de culture. L'influence sur le sens des synthèses pariétales est étudié.

#### 1. Influence de la température

Pour une même énergie lumineuse ( $17W/m^2$ ) et une même photopériode (12h de jour par 24h), la température de culture influence grandement l'évolution de la biomasse et des rendements en agar (Tab.17).

TABLEAU 13

VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR  
 ET DE SA QUALITE BIOCHIMIQUE EN  
 CONDITION DE NON PROLIFERATION (1).

Jours	Agar	Oses totaux A	3.6-anhydrogalactose B	A - B B
	% (2)	% (3)	% (3)	
14	28.60 $\pm$ .65	83.1 $\pm$ 1.0	30.1 $\pm$ 2.00	1.76
28	28.75 $\pm$ .50	82.1 $\pm$ 1.0	29.2 $\pm$ 0.60	1.81

(1) =  $\text{éclairement} = 17 \text{ W.m}^{-2}$ , température = 18°C, 16:8

(2) = exprimé en % de matière sèche

(3) = exprimé en % agar



TABLEAU 14

PRODUCTION D'AGAR ET DE MATIERE SECHE DANS LES AXES PRIMAIRES  
 EN FONCTION DU TEMPS EN CONDITION DE NON PROLIFERATION  
 (pour 100 g de thalles frais au départ)

Temps de culture	Masse totale d'agar	(1) Agar	(2) Matière sèche	(1) Agar
	grammes	grammes	grammes	Matière sèche
14 jours	2.98	1.37	-	-
24 jours	3.25	0.37	0.18	2.06

(1) Agar = Variation de la masse d'agar entre deux prélèvements

(2) Matière sèche = Variation de la masse de matière sèche entre deux prélèvements.



TABLEAU 15

PRODUCTION D'AGAR ET DE MATIERE SECHE DANS LES RAMIFICATIONS  
 EN FONCTION DU TEMPS EN CONDITION DE NON PROLIFERATION  
 (pour 100 g de thalles frais au départ)

Temps de culture	Masse totale d'agar	(1) Agar	(2) Matière sèche	(1) Agar Matière fraîche
	grammes	grammes	grammes	
14 jours	0.75	0.16	0.31	0.52

(1) Agar = Variation de la masse d'agar entre deux prélèvements

(2) Matière sèche = Variation de la masse de matière sèche entre deux  
prélèvements.



TABLEAU 16

VARIATIONS NETTES DES QUANTITES DE MATIERE SECHE, D'AGAR,  
DE SUCRES TOTAUX ET DE 3.6-ANHYDROGALACTOSE DE THALLES  
EN CONDITION DE NON PROLIFERATION (1).

Jours	Matière sèche	Agar	Oses totaux A	3.6-anhydrogalactose B	A-B B
	grammes	grammes	grammes	grammes	
Témoin	17.27	5.13	5.13	2.49	1.06
14	+ 11.52	+ 2.98	+ 1.61	- 0.04	1.75
24	+ 12.59	+ 3.35	+ 1.83	- 0.02	1.81

(1) = éclaircissement =  $5 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $5^\circ\text{C}$ , 8:16



TABLEAU 17

VARIATIONS DE LA BIOMASSE, DE LA MATIÈRE SÈCHE, DES RENDEMENTS EN AGAR  
 ET DE LA QUALITÉ BIOCHIMIQUE DE CELUI-CI EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE  
 DE CULTURE DE *Gracilaria verrucosa* ( 19 ÉCHANTILLONS)

Température de la culture		18°C	5°C	
Variation de la masse de matière sèche		%	+41.0	-13.4
Masse de matière sèche	mg.g <sup>-1</sup> (1)	290 <sup>±</sup> 18	277 <sup>±</sup> 31	
Rendement en agar	%	14.6 <sup>±</sup> 2.9	35.7 <sup>±</sup> 5.9	
Sucres totaux	mg.g <sup>-1</sup> (2)	919 <sup>±</sup> 29	694 <sup>±</sup> 39	
3,6 anhydro-galactose	mg.g <sup>-1</sup> (2)	272 <sup>±</sup> 5	396 <sup>±</sup> 10	
<u>oses totaux - 3,6 anhydro-gal</u> 3,6 anhydro- Gal		2.40	0.75	

(1) exprimé en mg.g<sup>-1</sup> de matière fraîche

(2) exprimé en mg.g<sup>-1</sup> d'agar sec



Ces derniers sont plus élevés (35,7%) quand l'algue est cultivée à 5°C que lorsqu'elle est placée à 18°C (14,6%). Dans les mêmes conditions, le poids de matière fraîche, respectivement, diminue de 13,4% et augmente de 41%.

En valeur relative, le poids de matière sèche apparaît constant (280 mg.g<sup>-1</sup>), or il évolue en valeur absolue, selon le régime de température (2,4 g à 5°C contre 4,1 g à 18°C pour 10 g d'algues fraîchesensemencées. (Fig.8). L'algue synthétise donc de la matière sèche à 18°C. Cette dernière conserve, d'une part son rapport à la matière fraîche et, d'autre part, entre pour partie dans la composition des parois nouvellement formées. Le reste constitue, pour l'essentiel, les assimilats photosynthétiques.

## 2. Influence de la lumière.

Les courbes de croissance (Fig.9) établies en mesurant la biomasse au cours du temps sous différentes conditions de lumière, traduisent des comportements physiologiques contrastés.

L'influence négative des basses températures sur la croissance se retrouve chez les échantillons faiblement éclairés (508E, 516N, 508N) (Tab.18). La perte de poids frais est sensible dès le début de l'expérimentation. L'algue réagit en perdant de l'eau, puis trouve un équilibre qui la maintient à poids constant jusqu'à la fin de la culture.(Fig.9).

Par contre, l'éclairement intense renverse la tendance précédemment décrite, puisque même à 5°C (516E), la biomasse, après un temps de latence, croît de façon continue tout au long de la période d'étude.(Fig.9)

Les témoins, 1812E et 2012S cultivés respectivement à 18°C et 20°C, sous des photopériodes 12 : 12 ne présentent pas de retard de croissance au début de culture, mais la courbe d'évolution du poids de matière fraîche s'infléchit au cours du temps, et ce d'autant plus tôt que la température de culture est élevée.(Fig.9).

Les fortes intensités lumineuses (17W/m<sup>2</sup>) peuvent donc être considérées comme activant la photosynthèse favorisant ainsi la croissance de l'algue et de la matière sèche (de +11 à +27,5%)(Tab.18). Dans ce cas, une température basse (5°C) associée à un éclairement intense et long n'est pas un facteur limitant. Parallèlement, les rendements en agar sont relativement faibles (de 23 à 27%) (Tab.19), bien que la quantité de colloïde augmente en valeur absolue (Tab.20). La synthèse d'agar est moins importante que l'accumulation de l'amidon, mais elle ne peut être négligée.

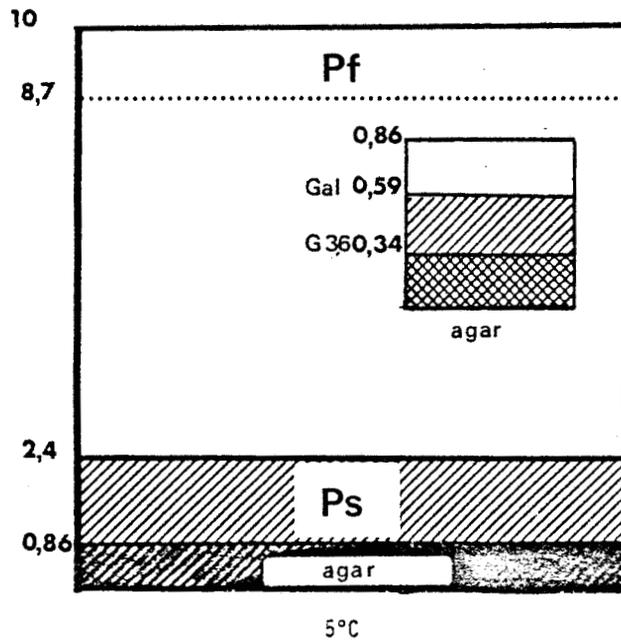
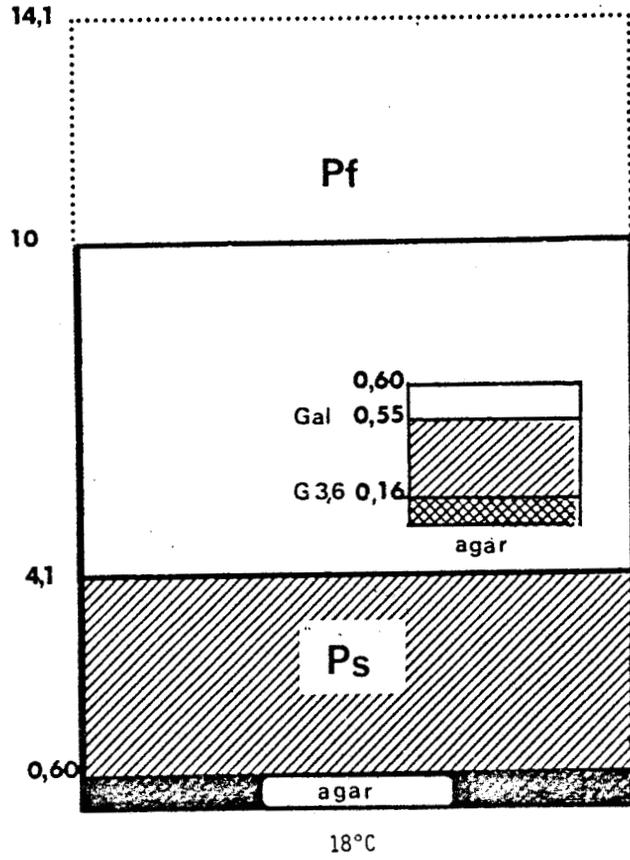


Fig. 8 : Diagramme des masses de matière fraîche, de matière sèche, d'agar et des sucres dosés dans celui-ci, obtenu après culture de 10 g d'algues pendant 2 mois.

..... biomasse finale  
 Pf : poids frais  
 Ps : matière sèche



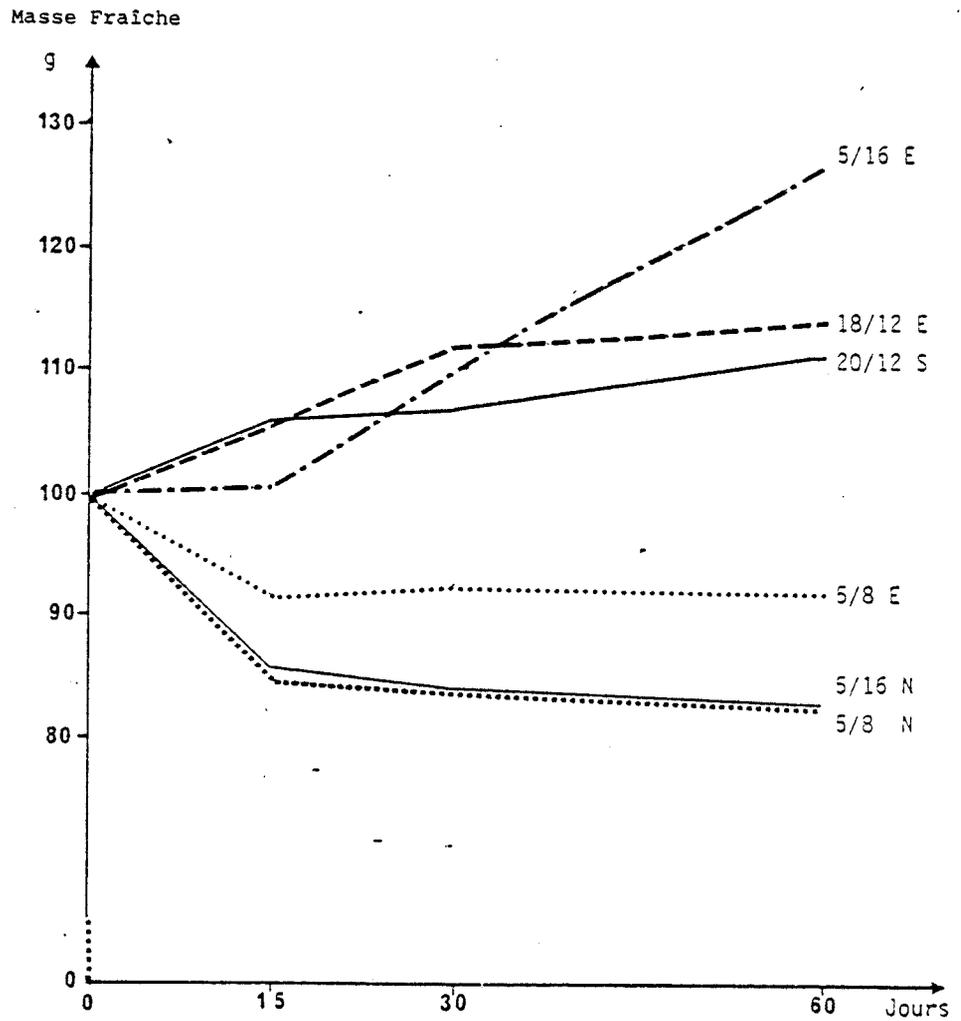


Fig. 9 : Croissance ponderale de *Gracilaria verrucosa* dans differentes conditions de température, d' eclairement et de photoperiode.

TABLEAU 18

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

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

E = 17 W.m<sup>-2</sup>

N = 6 W.m<sup>-2</sup>

(1) = exprimé en mg.g<sup>-1</sup> de matière fraîche

S = lumière solaire

Température : 5 = 5°C

18 = 18°C

20 = 20°C

Photopériode : 16 = 16: 8

08 = 8:16



TABLEAU 19  
 VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR ET DE LA QUALITE BIOCHIMIQUE  
 DE CELUI-CI EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE DE *GRACILARIA VERRUCOSA*

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

(1) = exprimé en mg.g<sup>-1</sup> de matière fraîche

(2) = exprimé en mg.g<sup>-1</sup> d'agar sec

S = lumière solaire

Température : 5 = 5°C  
18 = 18°C

Photopériode : 16 = 16:8  
08 = 8:16

Energie Lumineuse : E = 17 w.m<sup>-2</sup>  
N = 7 w.m<sup>-2</sup>



TABLEAU 20

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

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

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

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

Température : 5 = 5°C  
18 = 18°C

Photopériode : 16 = 16:8  
08 = 8:16

Energie Lumineuse : E = 17 w.m<sup>-2</sup>  
N = 7 w.m<sup>-2</sup>



Dans des conditions d'éclairement faible ( $7W/m^2$ ) la photopériode n'influence plus la production de matière sèche ou de colloïde ( $180 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière sèche pour 31,9% d'agar contre  $180 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  pour 31,4%)(Tab.20), mais modifie sa qualité biochimique en ramenant le rapport galactose/3,6-anhydrogalactose près de 1.(Tab.19).

### D - Cycle de croissance - production.

Les résultats présentés jusqu'à présent décrivent deux évolutions différentes de thalles cultivés en condition de croissance ou non. De manière à relier les phénomènes observés à propos du métabolisme de la phase matricielle de la paroi de *Gracilaria verrucosa*, les mêmes échantillons ont été cultivés alternativement et de façon croisée selon les deux modes de culture.

#### 1. La croissance.

L'étude de l'influence du régime de culture sur l'évolution de la biomasse des algues et de la matière sèche n'a été envisagée, pour les mêmes échantillons, que dans le cas de la succession, condition de croissance ( $18^\circ \text{C}$ ,  $17W/m^2$ ,  $16:8$ ) suivie de condition de production d'agar ( $5^\circ \text{C}$ ,  $7W/m^2$ ,  $8:16$ ).

Sur les 39 jours de croissance, l'augmentation de la biomasse suit une progression géométrique puisqu'elle double entre deux prélèvements (Fig.10). La même loi est applicable à l'accroissement du poids de matière sèche.

Le passage aux conditions opposées, conduit, dès les premiers jours de culture, à une diminution sensible du poids de matière fraîche qui demeure ensuite constant. Cette chute de biomasse brusque est due, pour l'essentiel, à un départ massif d'eau, comme il a été décrit plus haut. En effet, le poids de matière sèche se stabilise autour des valeurs relevées en fin de première période.(Fig.10)

#### 2. Production d'agar.

Les rendements en agar diminuent régulièrement pendant toute la durée de la première phase et augmentent notablement dès le début de la deuxième pour se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérimentation à un niveau élevé (29%).(Fig.11).

En valeur absolue, la quantité d'agar extrait baisse par rapport au témoin au tout début de l'expérience puis la synthèse reprend

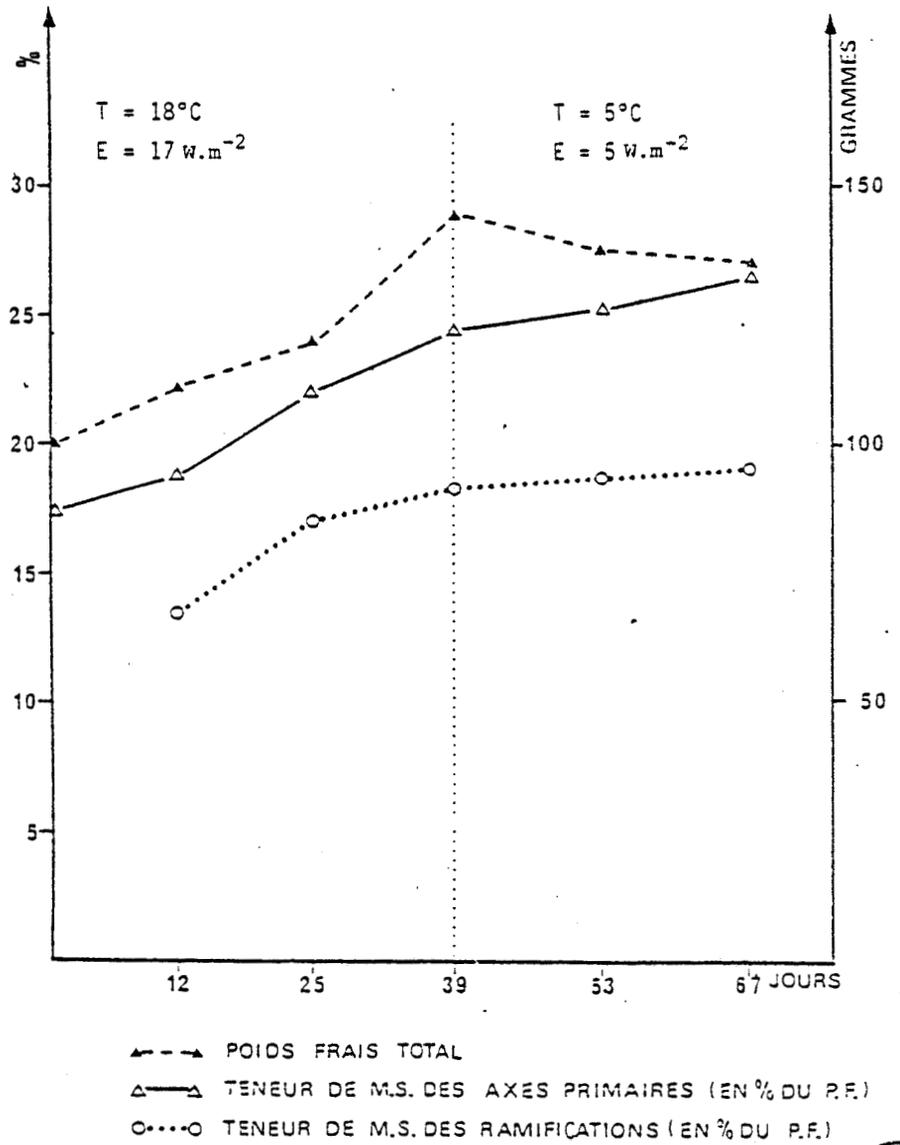


Fig. 10 : Variations de la matière sèche (en % du poids frais) des axes primaires et des ramifications et du poids frais du thalle, en fonction du temps dans des conditions de culture alternée ( $18^{\circ}\text{C}$  et  $17 \text{ W.m}^{-2}$  puis  $5^{\circ}\text{C}$  et  $5 \text{ W.m}^{-2}$ ).

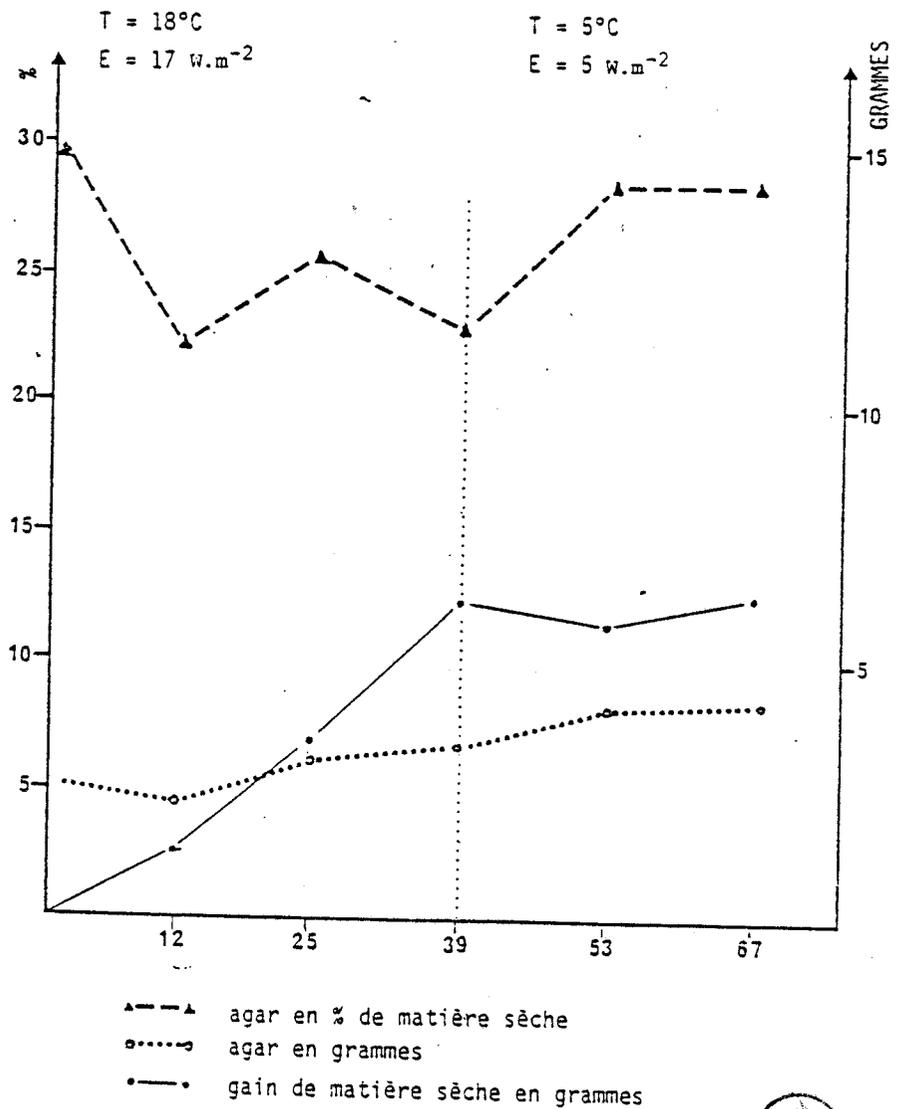


Fig. 11 : Variations de l'agar des axes primaires en valeur relative (% de matière sèche) et en valeur absolue (en grammes) en fonction du temps, dans des conditions de culture alternée (18°C et 17 W.m<sup>-2</sup> puis 5°C et 5 W.m<sup>-2</sup>).

progressivement pour s'accélérer après la fin de la période de croissance des thalles alors que dans le même temps, la quantité de matière sèche stagne. La biosynthèse de l'agar s'effectue donc aux dépens des réserves accumulées en phase de croissance (Fig.11).

L'examen des dosages des oses révèle un parallélisme entre la production d'agar et la quantité de sucres totaux des extraits. La progression des deux mesures est quasi proportionnelle. Le 3,6-anhydrogalactose est le résidu glucidique le plus affecté par la culture, puisque sa teneur diminue tout au long de l'expérience, mais cette chute se redresse sensiblement après la phase de croissance des algues. **Tab.21**

Dans une deuxième expérience, des extractions d'agar ont été effectuées sur des thalles dont les conditions de culture ont été interchangées à mi-période (1 mois). Des prélèvements ont été réalisés à différents moments et les quantités d'agar obtenues sont reportées sur les histogrammes de la Fig.12

L'augmentation des rendements, à chaque prélèvement apparaît nettement en conditions de non-prolifération des thalles. Passés en condition de croissance ceux-ci libèrent alors de moins en moins de colloïde.

Si les thalles sont d'abord placés en condition de croissance, les rendements ont tendance à diminuer au cours du temps. Remises en condition de non-prolifération, les algues libèrent de plus en plus d'agar à l'extraction.

La question est donc de savoir si c'est l'accessibilité du colloïde qui varie selon son métabolisme ou s'il est synthétisé et dégradé selon les conditions physiologiques du développement de l'algue.

## Conclusion

Il est maintenant possible de définir la suite physiologique qui aboutit, pour la cellule, à accumuler de l'agar riche en agarose dans la paroi. La **Figure 13** schématise le processus :

- Lorsque les conditions sont favorables à la croissance, le poids de matière fraîche augmente. Il se caractérise par une entrée d'eau, d'autant plus importante que le tissu est jeune, et une augmentation de la matière sèche. Celle ci est représentée par l'accumulation d'assimilats photosynthétiques qui masque la synthèse d'agar. Cette dernière apparaît

TABLEAU 21  
 VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR ET DE LA QUALITE  
 BIOCHIMIQUE DE CELUI-CI EN FONCTION DU  
 TEMPS ET DES CONDITIONS DE CULTURE

Jours	Agar	Oses totaux	3.6-anhydrogalactose	A - B
	% (1)	A % (2)	B % (2)	B
0 (3)	29.70 ± .97	100.0 ± 0.2	48.5 ± 0.15	1.06
12 (3)	22.40 ± .56	96.4 ± 0.2	46.8 ± 1.30	1.06
25 (3)	25.90 ± .42	93.4 ± 0.1	39.5 ± 0.60	1.36
39 (3)	22.96 ± .22	91.3 ± 3.1	36.2 ± 0.30	1.52
-----				
53 (4)	28.60 ± .65	83.1 ± 1.0	30.1 ± 2.00	1.76
67 (4)	28.75 ± .50	82.1 ± 1.0	29.2 ± 0.60	1.81

(1) exprimé en % de matière sèche

(2) exprimé en % d'agar

(3) éclaircissement =  $17 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $16: \overline{8}$

(4) éclaircissement =  $5 \text{ W.m}^{-2}$ , température =  $8: \overline{16}$



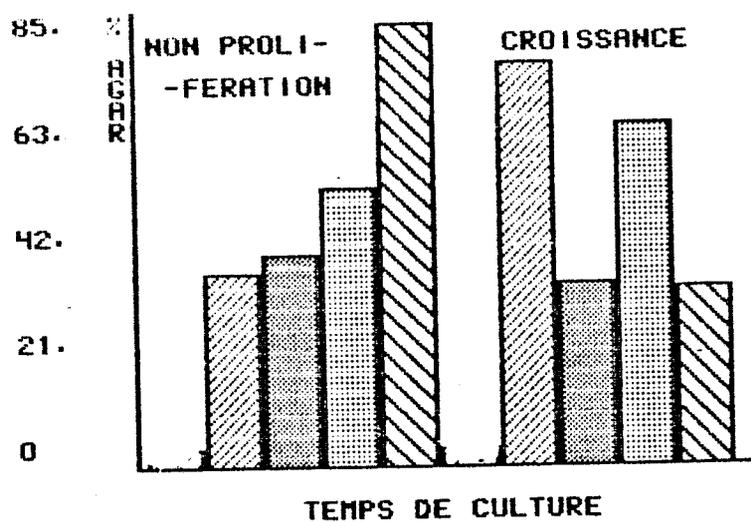
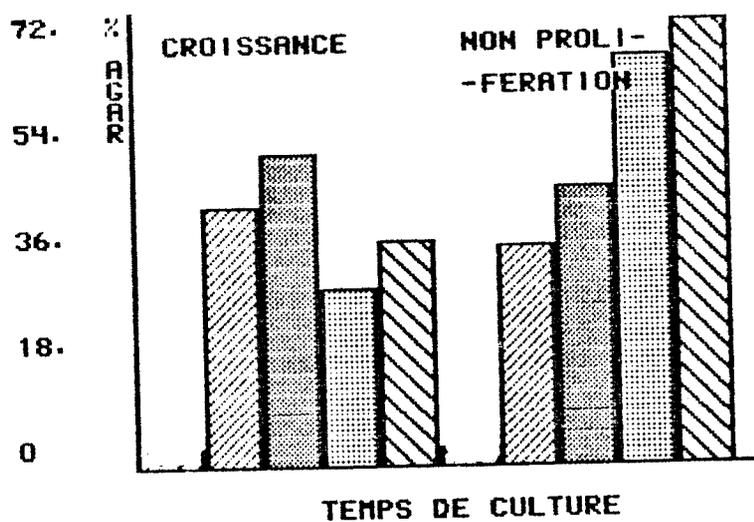
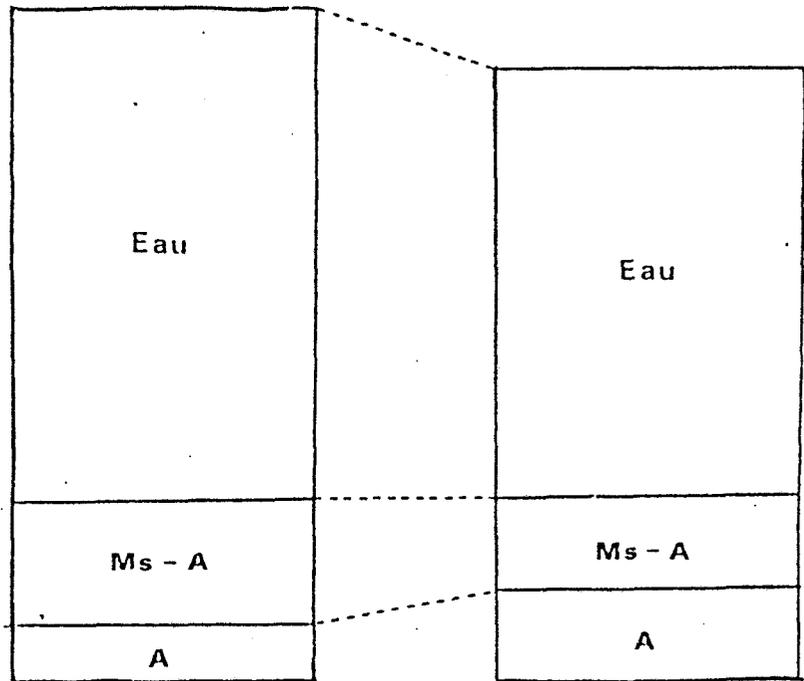


Fig. 12 : Evolution des rendements en agar au cours du temps (2 jours, 8 jours, 15 jours, 1 mois) en régime alterné de culture (A : croissance puis non prolifération, B : non prolifération puis croissance).



'ETE'

Ms, MF augmentent

A croît légèrement

A/Ms diminue

Ms/MF reste constant

'HIVER'

MF diminue

Ms baisse légèrement

A, A/Ms augmentent

Ms/MF reste constant

Ms = matière sèche

MF = matière fraîche

A = agar



Fig. 13 : Evolution schématique de la matière fraîche, de la matière sèche et de l'agar de *Gracilaria verrucosa* dans différentes configurations de culture

plus nettement quand les réserves en amidon saturent le cytoplasme. De nombreuses vésicules à contenu polysaccharidique migrent alors vers la paroi dans laquelle elles s'intègrent. Ces polysaccharides peuvent être considérés comme des polymères précurseurs d'agarose. Ils sont moins riches en 3,6-anhydrogalactose et contribuent à augmenter le rapport Galactose/3,6-anhydrogalactose. (Fig.13).

- En phase stationnaire, le poids frais diminue puis se stabilise. La synthèse d'agar s'intensifie et en raison de l'épuisement de l'amidon, les rendements des extractions croissent. Parallèlement, la transformation des précurseurs incorporés augmente les teneurs en 3,6-anhydrogalactose. L'extraction libre alors d'avantage d'agarose. (Fig.13).

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

Cette différence explique le décalage des courbes de la figure 5 :

- d'une part, l'accroissement de la biomasse est sensible aux conditions du milieu : température, éclaircissement et nutrition azotée. L'augmentation du poids de matière fraîche résulte d'une entrée d'eau et d'une synthèse de matière sèche qui est probablement représentée en majeure partie par de l'amidon floridéen. (Fig.14).

- d'autre part, cette phase préliminaire de constitution de réserves amylières est suivie d'un accroissement des quantités d'agar. La synthèse du colloïde est plus importante que la synthèse de matière sèche après la phase de prolifération du thalle, lorsque les conditions de température, de lumière et d'éclaircissement sont défavorables à la croissance. Il apparaît alors clairement qu'une redistribution de la matière sèche se produit en direction des colloïdes pariétaux. Ce phénomène est généralement masqué par l'expression des résultats en valeurs relatives. Le raisonnement en valeurs absolues a permis de lever certaines incertitudes. (Fig.14).

Tout se passe donc comme si les constituants de la paroi évoluaient en fonction des conditions de développement de la cellule : la croissance ou la différenciation. Ainsi, la composition chimique des polyosides matriciels de la paroi se modifierait au cours du temps de manière à permettre, sous une forme encore à définir, l'élongation cellulaire. Puis, la secondarisation qui

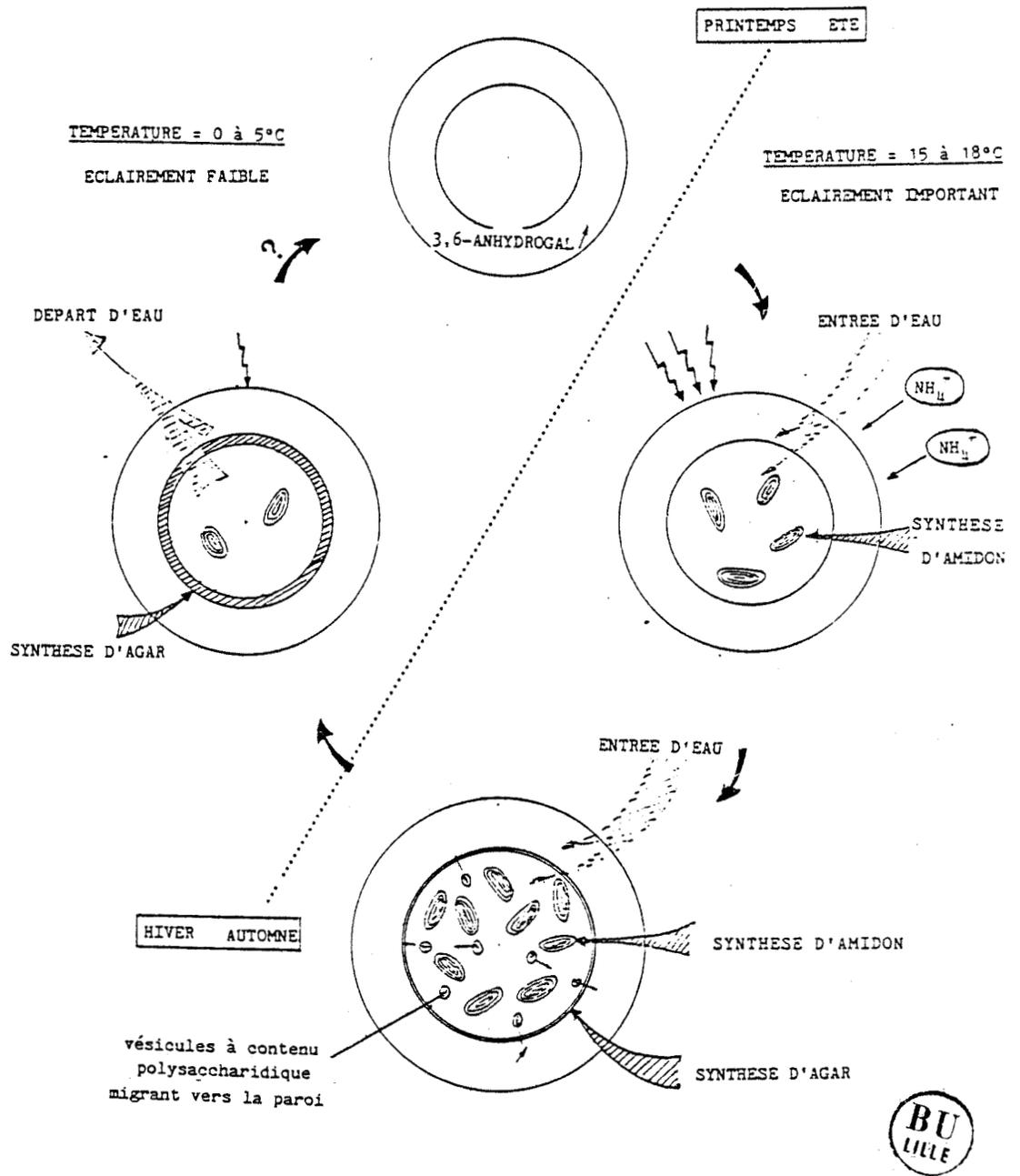


Fig. 14 : Evolution du poids frais, de la matière sèche et de l'agar de *Gracilaria verrucosa* sur un cycle annuel.

suit, avec les réserves émises plus haut, favoriserait le retour à un état d'équilibre physiologique compatible avec la perennisation de la plante.

Un regard plus finaliste sur l'évolution du phycocolloïde et son incidence sur les structures pariétales, amène à considérer l'éthologie de cette algue rouge.

En effet, les propriétés physiques des gels obtenus par la remise en solution des extraits sont influencées, en particulier, par les teneurs en 3,6-anhydrogalactose et en sulfate. L'augmentation de la force de gel observée avec les proportions élevées en agarose doit retentir sur les propriétés mécaniques de la cellule et par extension sur celles de l'ensemble du thalle.

De fait, à l'observation macroscopique, les échantillons cultivés en condition de non-prolifération paraissent plus rigides et cassants que ceux en phase de croissance, plus souples et élastiques. Cela semble correspondre aux observations faites dans la nature, où, en hiver les **Gracilaria** présentent l'aspect des échantillons cultivés en conditions de non-prolifération, et prennent la forme de touffes courtes et trapues. En outre, une coupe transversale d'une des frondes montre que les cellules corticales, petites et aux parois épaisses, occupent la majeure partie de l'espace et ce, d'autant plus que la section s'approche du disque basal où elles occupent l'ensemble des assises cellulaires (GODIN 1984, comm. pers.).

Par contre en été, les thalles s'allongent en longues frondes souples. Les cellules corticales sont repoussées à la périphérie et le centre est occupé par de grandes cellules médullaires gorgées d'eau, aux parois fines. Les organes sexuels s'organiseront le long des thalles, et, en particulier, les tétraspores libérées, laisseront autant de cicatrices fragilisant les tissus qui disparaîtront pour laisser la place à des fragments dont la différenciation décrite ci-dessus et le renforcement des structures pariétales permettront à l'algue de passer la mauvaise saison.

**SUIVI BIOCHIMIQUE DE LA SYNTHÈSE D'AGAR**

## Hypothèse

L'analyse quantitative et qualitative des résultats obtenus sur l'agar extrait de thalles en conditions de croissance ou en phase stationnaire, suggère une évolution chimique des polysaccharides de la matrice pariétale.

La phase de croissance se caractérise par une accumulation de matière sèche représentée essentiellement par de l'amidon. Le devenir de ces réserves peut être assimilé, au moins en partie, à la construction de la paroi. La différenciation de celle-ci consisterait alors à transformer les précurseurs, incorporés progressivement dans la paroi, en composés de plus en plus associés à la phase squelettique.

Si tel est le cas, des fractions polysaccharidiques originales doivent marquer chacune des étapes du métabolisme pariétal. Cette hypothèse doit d'abord être vérifiée sur des échantillons récoltés dans la nature de manière à relier le développement de la paroi à l'écophysiologie de l'algue. Des cultures contrôlées permettront ensuite d'étayer les réflexions tirées des cycles saisonniers de production d'agar, en analysant sur le plan biochimique, les produits obtenus dans chaque condition et isolés selon leurs caractéristiques physico-chimiques.

## I - RAPPEL DES FAITS

### A - Variations saisonnières

Des relevés trimestriels dans la nature ont permis de dresser les courbes des variations saisonnières du poids de matière sèche et des rendements en agar. (CHRISTIAEN 1981).

L'évolution des valeurs des poids de matière sèche passe par un minimum durant les mois d'été (de juin à septembre) pour atteindre un maximum en hiver (Fig.15) alors que les rendements en agar les plus élevés apparaissent en automne, c'est-à-dire après la période de pleine croissance de l'algue. Pour comprendre ce phénomène, il faut rapprocher ces résultats de ceux de NEISH et SCHACKLOCH (1971) obtenus en culture industrielle. Ces auteurs ont remarqué qu'après enrichissement en azote favorisant la croissance des algues, le métabolisme s'orientait vers la production de colloïde dès que cet apport cessait. Les résultats de NEISH et

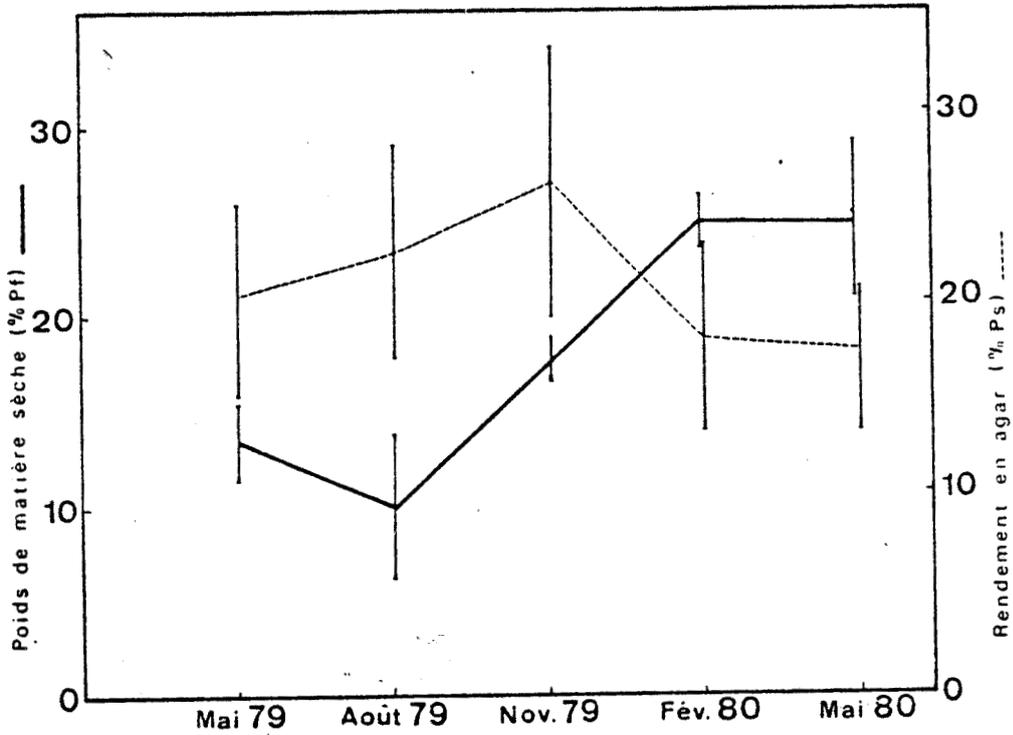


Fig. 15. — Variations saisonnières des poids de matière sèche et des rendements en agar chez *Gracilaria verrucosa*. —, poids de matière sèche. ---, rendements en agar.

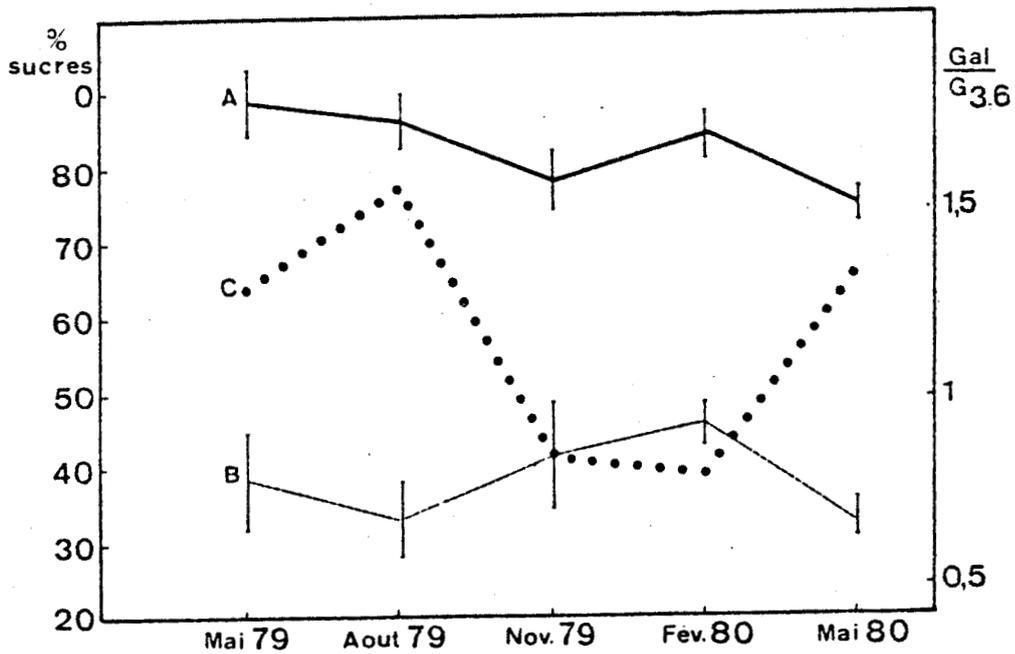


Fig. 16 — Variations saisonnières de la composition biochimique de l'agar chez *Gracilaria verrucosa*. A, sucres neutres; B, 3,6-anhydrogalactose (ces valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité d'agar sec et selon les mois de récolte). C, rapport galactose/3,6-anhydrogalactose.

BU  
LILLE

SCHACKLOCH, en culture, permettent d'expliquer ce qui est constaté dans la nature : les facteurs de croissance affectent négativement l'accumulation d'agar dans les parois.

E fait, les rendements en agar et les poids de matière sèche suivent des cycles décalés dans le temps. Le même phénomène est remarqué par WHYTE et al. (1981), mais la courte période d'analyse (5 mois) empêche les auteurs d'observer la périodicité annuelle des variations. Vers la fin de l'hiver (février), la courbe des rendements en agar s'infléchit, traduisant une dégradation du colloïde compatible avec l'augmentation de l'élasticité de la paroi, favorable à l'élongation cellulaire. Au cours de l'été, tout en poursuivant légèrement sa croissance, l'algue reprendrait la biosynthèse de l'agar jusqu'à la fin de l'automne où les rendements seraient plus élevés, ce qui se traduirait également par une augmentation globale du poids de matière sèche. Dès lors, l'algue pourrait affronter les rigueurs de l'hiver, protégée par le colloïde de ses parois (BOOTH 1953). Un autre cycle débutera par une nouvelle mobilisation des polysaccharides pariétaux.

Sur le plan biochimique, les périodes printanière et estivale ne semblent pas être favorables à la biosynthèse d'un colloïde de qualité. (Fig.16). La teneur en galactose augmente au détriment de celle en 3,6-anhydrogalactose. Une relation inverse se retrouve en saison hivernale où la part relative du galactose diminue au profit du 3,6-anhydrogalactose. Ainsi, le rapport entre le galactose et le 3,6-anhydrogalactose n'est pas constant et témoigne d'une variation compensée entre ces deux résidus.

Les teneurs en sulfate varient peu en regard des autres composés bien que les quantités triplent entre novembre et juin (2,5 à 7,5%) (Tab.22).

Les forces de gel mesurées sur des agars remis en solution (1%,p/v) traduisent une proportionalité avec les effets combinés de l'augmentation du 3,6-anhydrogalactose et la diminution du taux de sulfate dans les échantillons (Fig.17). WHYTE et al. (1981) observent la même convergence de l'influence de la teneur en ces deux composés et la force de gel.

Il existerait donc une cinétique continue dans la biosynthèse de l'agar à partir du galactose, lequel se transformerait en 3,6-anhydrogalactose au cours du temps, selon des conditions qui restent à préciser. Cette idée peut

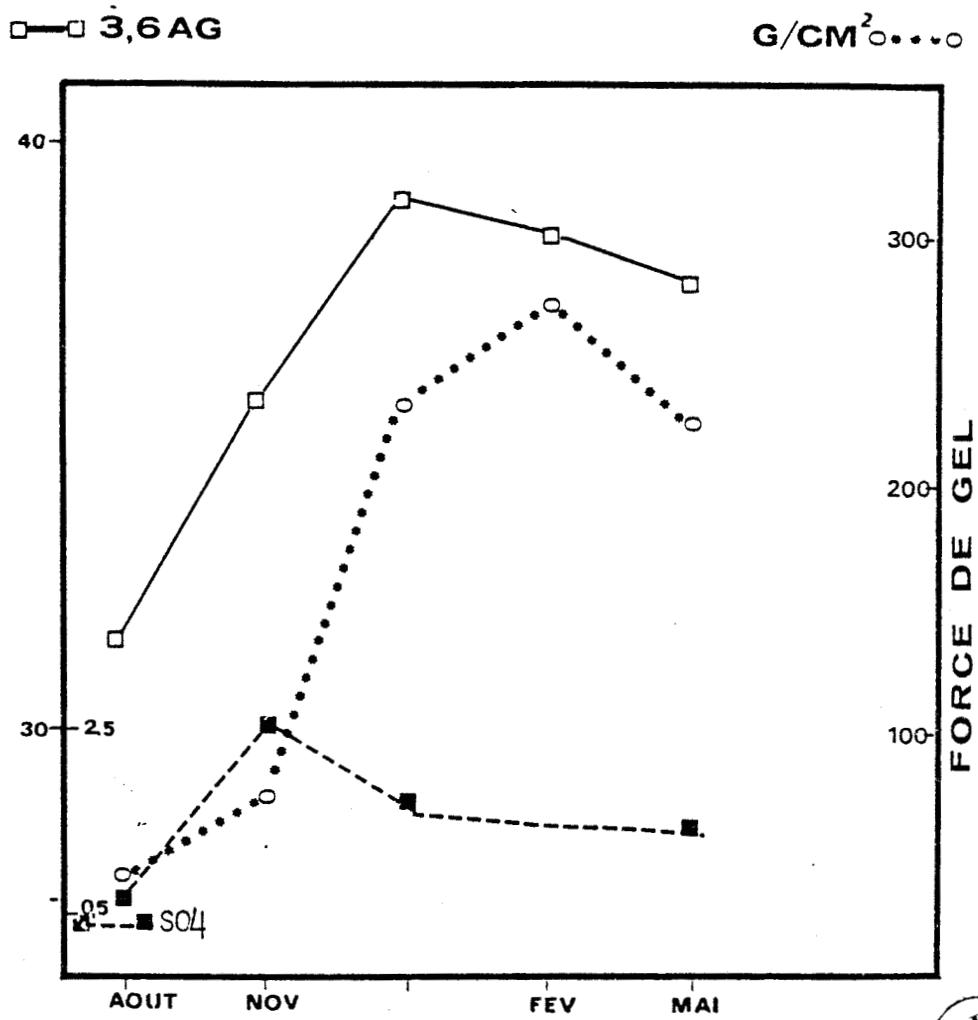
TABLEAU 22

TENEURS EN ESTERS SULFATES, EN ACIDES URONIQUES,  
 EN 3.6-ANHYDROGALACTOSE DE L'AGAR  
 EN FONCTION DES SAISONS



Prélèvements	Teneur (mg.g <sup>-1</sup> Agar sec)		
	Date	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	GlcAU
Mai 79	13	26	388
Août 79	8	4	339
Novembre 79	25	25	424
Février 80	14	52	468

(Les esters sulfates sont mesurés sous forme de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> par le rhodizonate de sodium, les acides uroniques (GlcAU) par le carbazole et le 3,6 G par le résorcinol. Les résultats sont exprimés en mg.g<sup>-1</sup> MS d'agar).



BU  
LILLE

Fig. 17: Comparaison de la teneur en 3.6 anhydrogalactose et de celle en sulfate avec la force de gels d'agar, extraits de thalles récoltés dans la nature.

constituer une interprétation de l'effet "NEISH" d'une part, et une explication de l'hétérogénéité de l'agar (DUCKWORTH et YAPHE 1971, IZUMI 1972) d'autre part. Les résultats publiés par ces auteurs traduisent en quelque sorte, un modèle instantané de la molécule, variable selon la période, ce qui constitue un argument en faveur d'une cinétique de synthèse de l'agar. Cette nouvelle conception de la molécule d'agar va à l'encontre des modèles statiques proposés jusqu'ici et suggère un modèle évolutif lié aux conditions de milieu de vie de l'algue (conditions climatiques, géographiques ou écologiques). Par ailleurs, ARAKI (1966) pense que le sulfate en C6 du galactose est le précurseur du pont 3,6-anhydrogalactose. TAGAWA et al. (1963), DUCKWORTH et al. (1971) ont vérifié ce point en notant l'augmentation du 3,6-anhydrogalactose après un traitement alcalin. Depuis, CRAIGIE et WONG (1978) ont mis en évidence une sulfohydrolase responsable de la formation, après désulfatation, du pont anhydro chez les carraghénophytes. Néanmoins, une faible proportion d'esters sulfates et leur faible variation dans le temps caractérisent *Gracilaria verrucosa*. Bien que ASARE (1980) ait constaté des fluctuations plus importantes du taux de sulfate de l'agar de *Gracilaria tikvahiae*, l'ampleur reste en deçà des synthèses de 3,6-anhydrogalactose. Il faut donc imaginer un processus d'incorporation progressif de polymères précurseurs au sein de la paroi à partir du cytoplasme. En amont, l'augmentation des teneurs en amidon n'est peut-être pas étrangère à l'apparition de tels précurseurs ainsi que le montre JOSELEAU (1984) pour *Hevea* pour lequel il note l'existence d'une relation entre la diminution des quantités d'amidon, en réponse à une importante activité amylasique, et la synthèse de gommes. Tout se passerait donc comme si une partie de l'amidon, stocké pendant la phase de croissance, intervenait dans les synthèses de colloïdes pariétaux.

### B - Séparations biochimiques

L'hypothèse d'un continuum biosynthétique trouve des arguments dans le fractionnement de l'agar sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE séphadex A 50). Les polymères de l'agar sont, dans ce cas, retenus plus ou moins fortement sur le gel de chromatographie, et seront déplacés par le passage de solutions de force ionique croissante. Le profil d'éluion obtenu traduit alors la distribution des polymères selon leur charge. Les galactanes sulfates, considérés comme les précurseurs de l'agarose sont ainsi élués

avec les tampons de concentration molaire élevée. Inversement, la fraction non retenue sur la colonne correspond à l'agarose.

Ce fractionnement, effectué sur des échantillons extraits de thalles récoltés dans la nature à différentes périodes de l'année, présente un profil d'élution qui caractérise l'état biochimique de la phase matricielle extractible de la paroi de *Gracilaria verrucosa*.

En effet, les fractions chargées sont particulièrement abondantes pour les polymères obtenus depuis la fin de l'hiver jusqu'au début de l'automne suivant, correspondant à la période de croissance du thalle (février à septembre). A l'inverse, l'agarose est le composé majeur des agars extraits en hiver (novembre). (Fig.18).

Dans le détail, l'analyse biochimique, d'une part, confirme la présence d'agarose dans les fractions éluées par l'eau distillée (Gal/3,6 AG=1) et traduit, d'autre part, une diminution des proportions relatives du 3,6-anhydrogalactose par rapport au galactose, avec l'élévation de la force ionique d'élution. (Fig.19). Par ailleurs, selon la date de prélèvement, la répartition du 3,6-anhydrogalactose avec le fractionnement présente une distribution plus ou moins homogène. En fait, en hiver la quantité de ce résidu est importante quelque soit la fraction, alors qu'elle se distribue inégalement en période de croissance. Cette apparente dispersion semble confirmer l'apparition du composé à partir d'une désulfatation progressive du galactose-6-sulfate.

## II - CULTURES CONTROLEES

### A - Fractionnement sur DEAE Séphadex A50.

Les échantillons d'agar extraits de thalles cultivés en conditions contrôlées de température et de lumière ont été fractionnés sur DEAE séphadex A 50. Comme précédemment la distribution des pics d'élution diffère selon le régime de culture. (Fig.20).

La part relative de l'agarose (fraction éluée à l'eau distillée) à l'agaropectine (autres fractions) s'inverse selon que les thalles, dont l'agar est extrait, ont été cultivés en condition de croissance ou non (37 mg d'agarose pour 51 mg d'agaropectine en phase de croissance, contre respectivement 53 et 34 mg en phase stationnaire). (Tab.23).

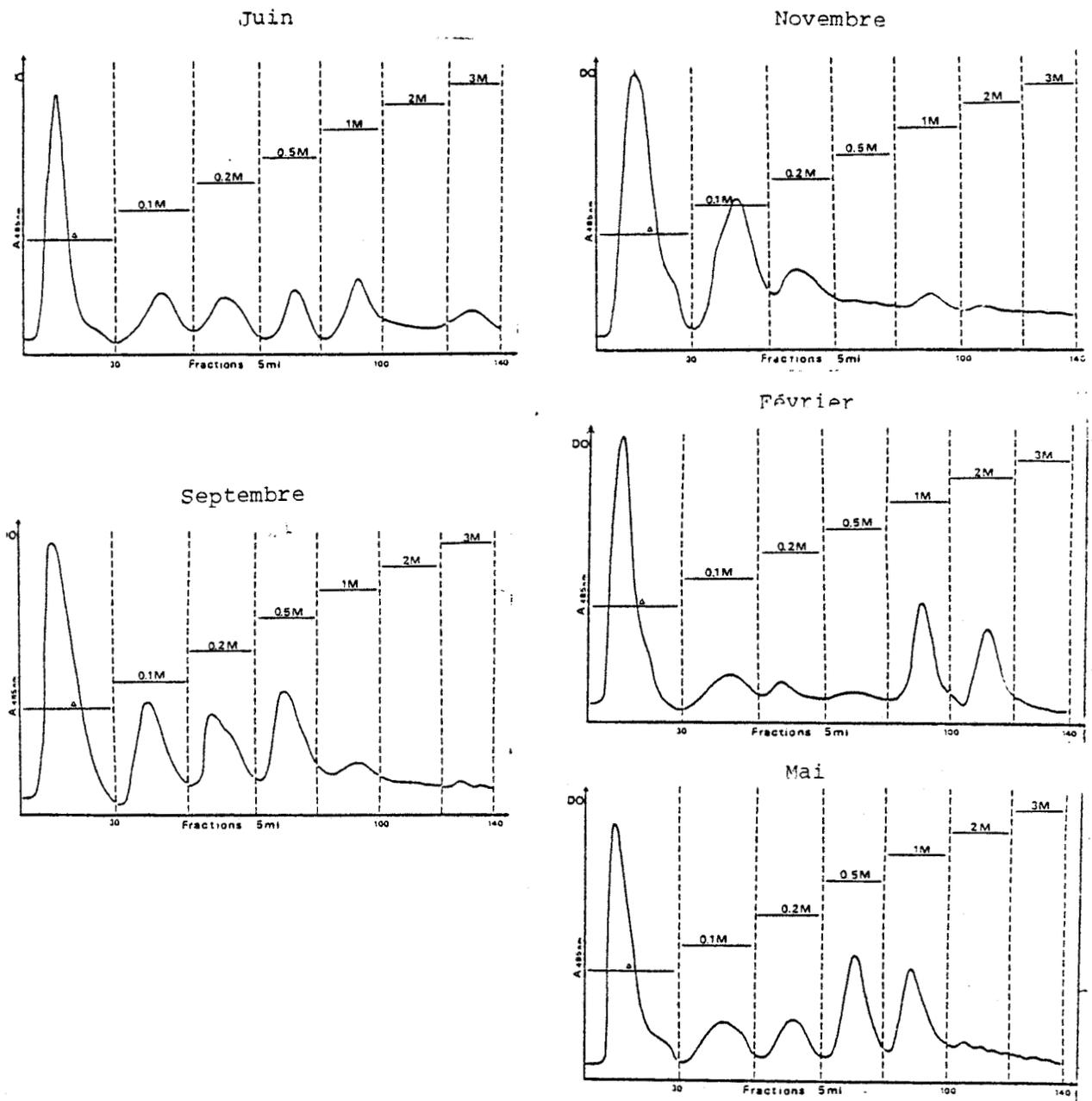


Fig. 18: Fractionnement sur DEAE SEPHADEX A50 d'agars extraits de thalles récoltés dans la nature à différentes époques de l'année.

Echantillon : 20 mg/20 ml

Elution :

150 ml eau distillée

100 ml 0.1 M NaCl

100 ml 0.2 M NaCl

100 ml 0.5 M NaCl

100 ml 1 M NaCl

100 ml 2 M NaCl

100 ml 3 M NaCl

Détection : Phénol sulfurique



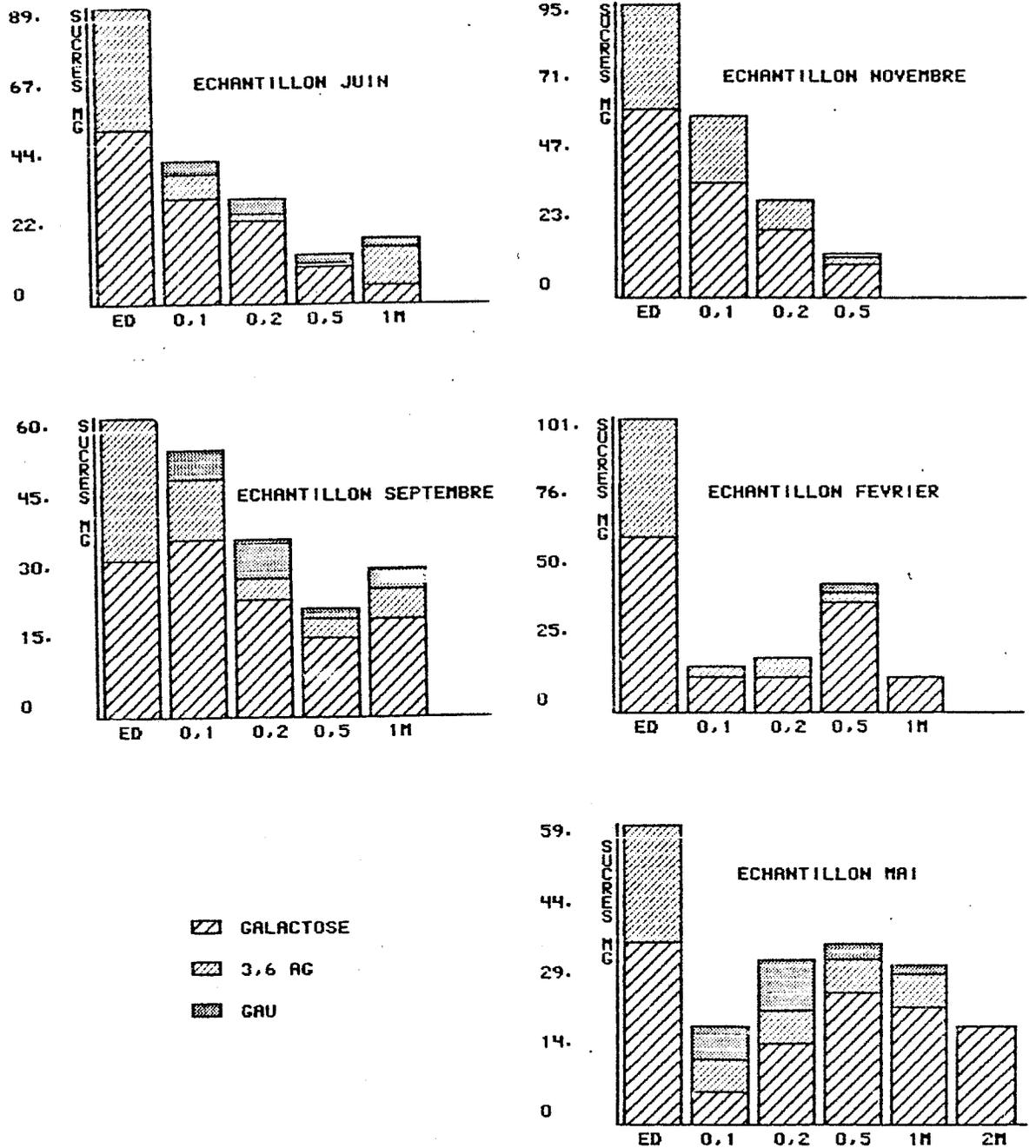


Fig. 19 : Quantité de sucres totaux, de 3.6-Anhydro-galactose et d'acides uroniques, des éluats d'agars chromatographies sur DEAE SEPHADEX A50 issus de thalles récoltés dans la nature à différentes époques de l'année.

Dosages : Hexoses totaux : Orcinol sulfurique  
 3.6-Anhydro-galactose : Résorcinol  
 Acides uroniques : Carbazol

Fractions : Eau distillée (1), 0.1 M NaCl (2), 0.2 M NaCl (3),  
 0.5 M NaCl (4), 1 M NaCl (5), 2 M NaCl (6),  
 3 M NaCl (7).

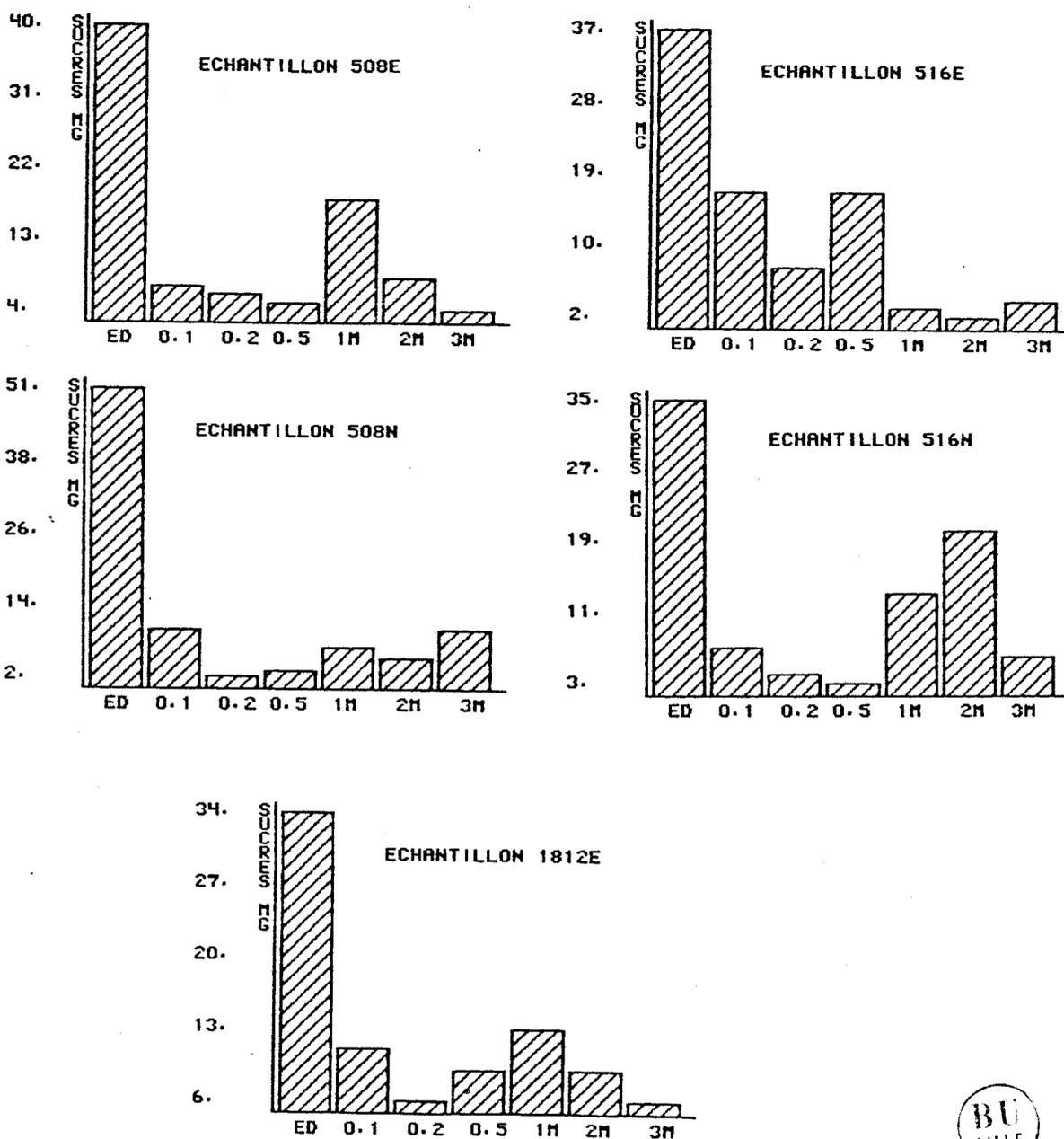


Fig. 20 : Histogrammes des quantités de sucres éluées sur colonne de DEAE SEPHADEX A50 après chromatographie de solutions d'agar issues de thalles en cultures contrôlées.

Elution : Eau distillée (2) ; 0.1 NaCl (3) ; 0.2 NaCl (4) ; 0.5 NaCl (5) ; 1M NaCl (6) ; 2 M NaCl (7) ; 3 M NaCl (8).

Détection : Phénol sulfurique

Température : 5 = 5°C ; 18 = 18°C

Photopériode : 08 = 8:16 ; 16 = 16:8

Energie lumineuse : E = 17w.m<sup>-2</sup> ; M = 7w.m<sup>-2</sup>



TABLEAU 23

FRACTIONNEMENT D'AGARS EXTRAITS DE THALLES CULTIVES  
 DANS DIFFERENTES CONDITIONS, SUR DEAE SEPHADEX A 50.  
 QUANTITE RECUEILLIE APRES CHAQUE ELUTION (EN mg).

Conditions de culture					
Elution NaCl (M.L <sup>-1</sup> )	516E	516N	508E	508N	1812E
0	37	35	40	51	34
0.1	17	7	7	10	11
0.2	8	4	6	2	6
0.5	17	3	5	3	9
1	3	13	18	7	13
2	2	20	8	5	9
3	4	6	4	10	6

Température : 5 = 5°C  
 18 = 18°C

Photopériode : 16 = 16 :  $\bar{8}$   
 08 = 8 :  $\bar{16}$

Energie Lumineuse : E = 17 w.m<sup>-2</sup>  
 N = 7 w.m<sup>-2</sup>

En particulier, il semble que les courtes photopériodes favorisent l'accumulation relative d'agarose et ce, d'autant plus que l'énergie incidente est faible (Fig.21). Ainsi, quand les trois conditions réduisant le développement de la biomasse algale ( $5^{\circ}\text{C}$ , 8:16,  $7\text{W.m}^{-2}$ ) sont réunies, la fraction neutre représente plus de 60,9% de l'agar extrait. Dès que l'éclairement des cultures augmente, la part des fractions chargées croît. Il semble donc que la lumière soit le facteur déterminant pour la synthèse d'agarose. En effet, dès que cet effecteur n'est plus limitant, soit par élévation de l'énergie, soit par allongement de la photopériode, des molécules chargées apparaissent dont l'abondance relative croît avec l'intensité de l'éclairement. A l'évidence, une relation entre l'activité photosynthétique et l'accumulation des polysaccharides pariétaux solubles, semble pouvoir s'établir. Les vésicules migrant depuis les grains d'amidon du cytoplasme jusqu'à la paroi pourraient contenir des produits de la photosynthèse, précurseurs chargés de l'agarose.

Dès que cesse la stimulation lumineuse, ces précurseurs poursuivent leur métabolisme, dont le terme semble être l'agarose. Ces composés disparaissent donc peu à peu au profit de la fraction neutre qui prédomine en effet dans les extraits de thalles cultivés en condition de lumière limitante.

Les dosages des oses de chacun des éluats confirment que la fraction neutre représente l'agarose. En effet, le rapport entre galactose et 3,6-anhydrogalactose est toujours voisin de l'unité (le galactose est exprimé comme la différence entre oses totaux dosés par l'orcinol sulfurique et le 3,6-anhydrogalactose dosé par le résorcinol).

En condition de lumière limitante, le 3,6-anhydrogalactose est peu ou pas représenté dans les fractions chargées. Si le L-galactose-6-sulfate peut-être considéré comme le précurseur du 3,6-anhydrogalactose, la distribution qualitative des oses dans les éluats plaide en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'agarose est le terme ultime de la biosynthèse du phycocolloïde. Ainsi, les assimilats photosynthétiques passés dans la paroi, grâce aux vésicules, ont déjà quasiment été transformés en agarose.

A l'inverse, en condition de croissance les thalles libèrent un agar où le 3,6-anhydrogalactose se répartit sur les fractions éluées aux faibles

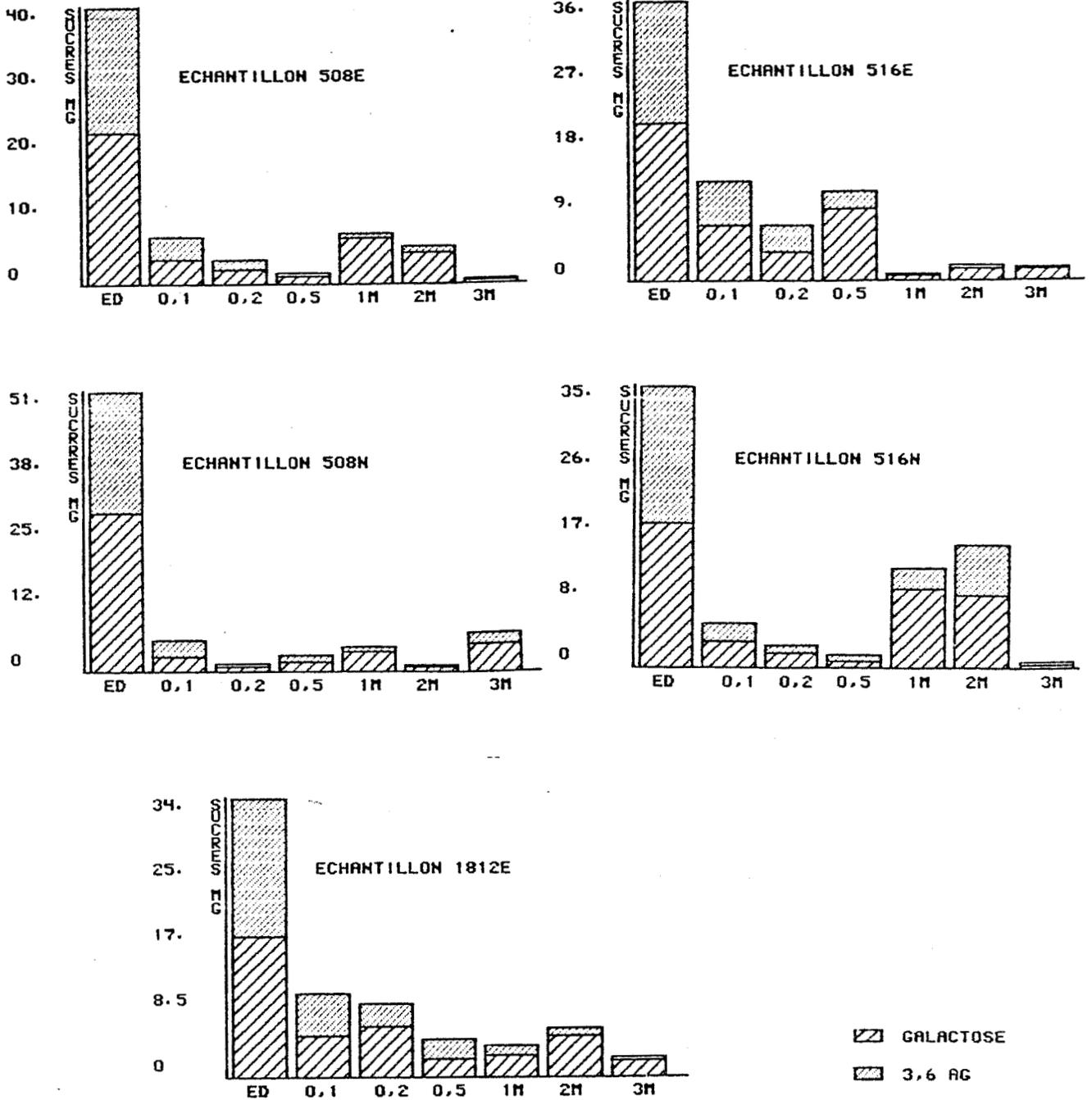


Fig. 21 : Quantité de sucres totaux, de 3.6-Anhydro-galactose, des éluats d'agars chromatographies sur DEAE SEPHADEX A50, issus de thalles cultivés sous diverses conditions.

Elution : Eau distillée (1) ; 0.1 NaCl (2) ; 0.2 NaCl (3) ; 0.5 NaCl (4) ; 1M NaCl (5) ; 2M NaCl (6) ; 3M NaCl (7).

Dosages : Hexoses totaux : orcinol sulfurique

3.6-Anhydro-galactose : résorcinol

forces ioniques. Parallèlement, les oses chargés sont plus abondants et leur proportion par rapport au 3,6-anhydrogalactose croît avec la force ionique d'éluion.

Ainsi, les oses chargés semblent représenter les précurseurs biosynthétiques pendant la phase de croissance des algues. Ils sont métabolisés progressivement en agarose qui devient le polymère dominant quand l'apport en provenance du cytoplasme cesse et que la transformation du galactose sulfate est achevée.

### B - RMN du carbone 13

La résonance magnétique nucléaire du carbone 13 est une méthode d'investigation spectroscopique qui a été appliquée par USOV et al. (1983) aux polysaccharides pariétaux mucilagineux des algues marines. Cette technique, très performante, permet de reconstituer la structure chimique des polymères organiques, dans la mesure où chaque carbone de la molécule peut être repéré spécifiquement selon sa fréquence de résonance dans un champ magnétique puissant. Les différences observées sur le spectre, d'un atome à l'autre, sont dues à l'environnement nucléaire de l'atome considéré. Ainsi, selon le substituant, ou l'influence de ce'ui-ci sur les atomes voisins, le pic de résonance se déplace vers les hautes ou les basses énergies.

Dans le cas des polysaccharides, et précisément celui de l'agarose, l'agarobiose qui représente l'unité disaccharidique de répétition, apparaît, sur le plan spectroscopique, avec douze pics de taille équivalente pour les douze carbones de la molécule. YAPHE et LAHAYE (1984) ont ainsi décrit les agars d'espèces diverses qu'ils ont pu caractériser par cette méthode.

Les échantillons d'agar préparés à partir de thalles cultivés en conditions contrôlées ont été analysés avec cette technique.

L'agar de *Gracilaria verrucosa* donne un spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  à douze pics, correspondant à chacun des carbones du disaccharide. Leur attribution a été déterminée par rapport à ceux décrits dans la littérature (USOV 1983, LAHAYE et YAPHE 1985). (Tab.24). Un pic supplémentaire à 59.6 ppm révèle, en outre, la présence d'un ether méthyl. La présence de pics en surnombre, plus petits à 69.08 ppm pour le G'4, 71.9 pour le G'6 et à 73.69 pour le G'5, correspondant aux déplacements des carbones homologues du D-galactose, permettent de situer le méthyl sur le carbone 6 du D-galactose.(Fig.22).

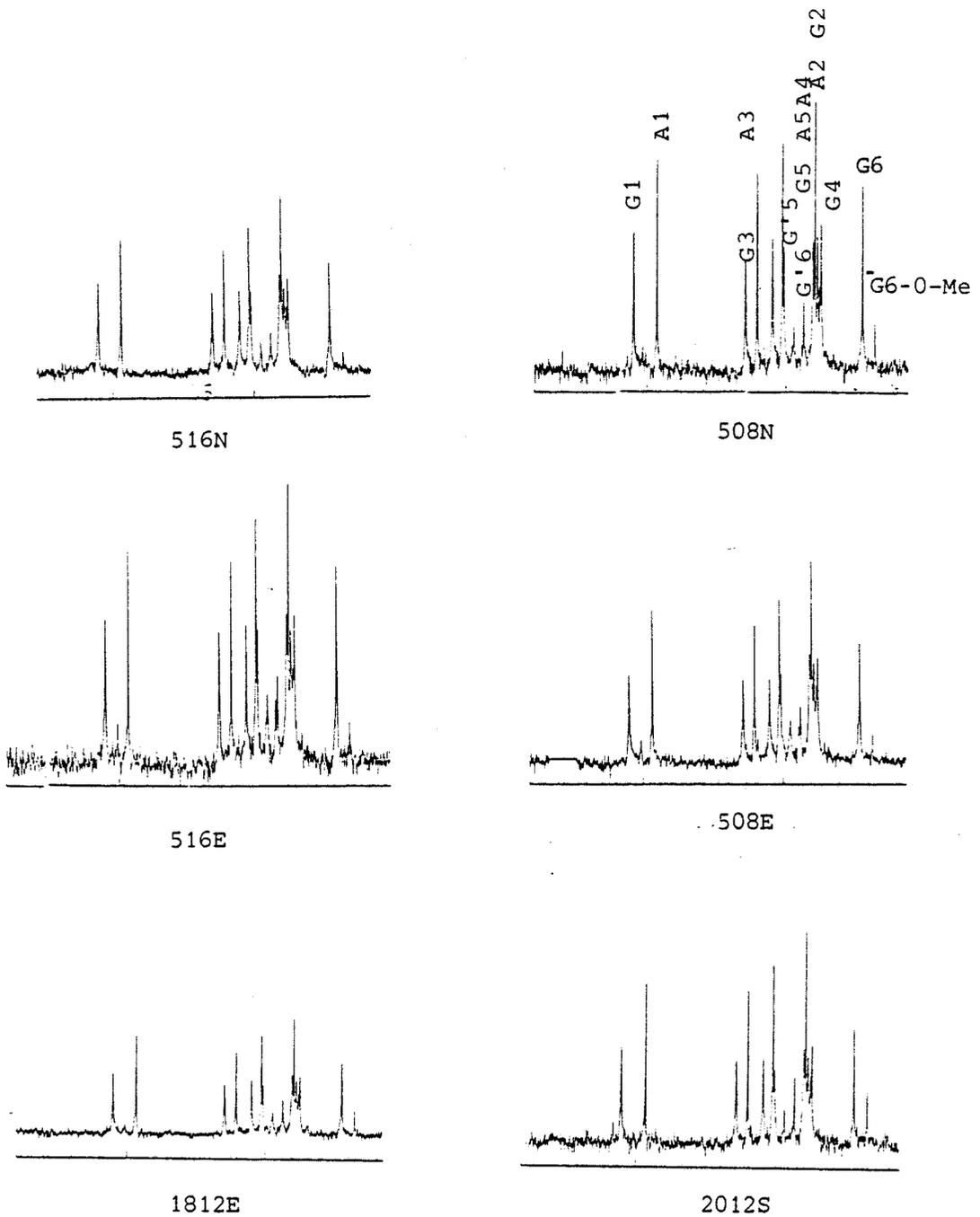


Fig. 22 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  de solutions d'agar issues de thalles cultivés dans différentes conditions. (enregistré à  $80^\circ\text{C}$  avec 1589 balayages, largeur spectrale 12500 Hz, temps d'acquisition 0.655 s, délai de relaxation 1.5 s).

Température : 5 =  $5^\circ\text{C}$   
18 =  $18^\circ\text{C}$

Photopériode : 16 = 16 :  $\overline{8}$   
08 = 8 :  $\overline{16}$

Lumière : E =  $17 \text{ w.m}^{-2}$   
N =  $7 \text{ w.m}^{-2}$

TABLEAU 24

Attribution des signaux RMN  $^{13}\text{C}$   
des spectres d'agar d'après  
USOV (1983).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Me
D-Gal	102.4	70.2	82.2	68.4	75.3	61.4	
Me-D-Gal	102.4	70.1	82.2	68.6	73.6	71.8	59.1
SO <sub>4</sub> -D-Gal	102.6	70.1	82.2	68.4	73	67.5	
3,6-AG <sup>1</sup>	98.4	69.8	80.1	77.4	75.6	69.3	
D-Gal <sup>2</sup>	193.7	70.5	81.1	69.1	75.9	61.8	
SO <sub>4</sub> -L-Gal	101.2	69.8	71	69.1	67.7	67.5	

1 : AG = Anhydrogalactose

2 : Galactose du polymère sulfaté



Cependant, l'intensité de ce pic varie selon l'origine des échantillons. Les thalles cultivés en condition de croissance ont un taux de méthylation estimé à deux fois celui observé pour des thalles en phase stationnaire. En effet, le rapport entre les intensités des pics à 59.6 et celui du C1 du D-galactose à 102.4 ppm, peu influencé par les perturbations dues au méthyl, permet d'apprécier les proportions relatives de la méthylation selon les différentes conditions de culture. ( $C6/C1 = 0,33$  en condition de non prolifération et  $0,56$  en condition de croissance.).

Ainsi, suite aux résultats obtenus par fractionnement, où il avait pu être fait état d'une désulfatation progressive, pour aboutir à la formation d'agarose, la RMN révèle une méthylation qui serait présente sur l'agarose en phase de croissance des thalles.

### III - EXTRACTIONS FRACTIONNEES

Les étapes du développement des thalles de *Gracilaria verrucosa* sont caractérisées par des états chimiques particuliers de la phase matricielle de la paroi cellulaire. Il doit donc être possible d'isoler des fractions originales, caractéristiques de l'état physiologique de la paroi. En effet, selon le degré et le type de substitution de la molécule le caractère hydrophyle de l'agar doit être plus ou moins marqué. En conséquence, leur solubilité dans l'eau peut varier selon la température d'extraction (20, 40, 60, 80, 100 et 120°C). Il est ainsi possible d'établir un profil d'extraction propre à chaque type d'agar et d'isoler des fractions marquantes du métabolisme pariétal.

#### A - Variations quantitatives

Les profils d'extraction (Fig.23) à différentes températures de solubilisation font apparaître principalement des fractions mobilisables à des températures plus élevées (100°C et 120°C) en condition défavorable à la croissance, que dans le régime inverse, puisque la majorité de l'extraction, dans ce cas, est obtenue à 80°C.

Ces variations de rendements peuvent être reliées à l'évolution qualitative de certains polymères précurseurs de l'agarose que leur taille, leur charge ou leurs substitutions rendent plus ou moins mobiles à l'extraction.

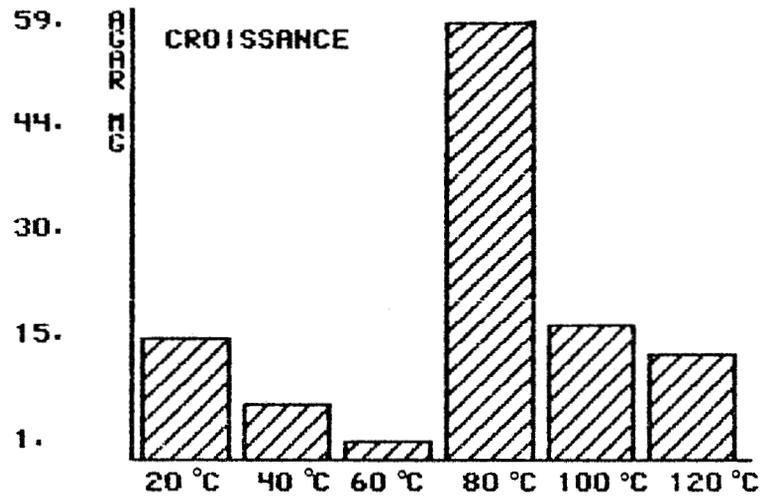
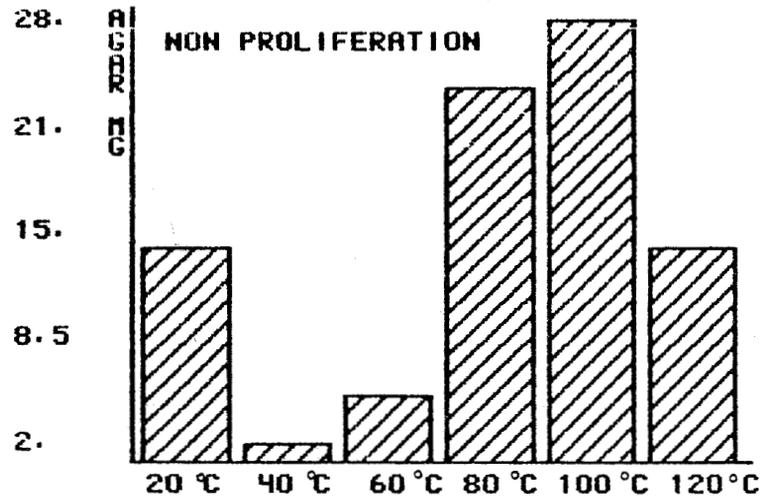


Fig. 23: Evolution des rendements en agar extrait à différentes températures de thalles cultivés en conditions contrôlées. A ( $5^{\circ}\text{C} - 8:6 - 7\text{w.m}^{-2}$ ) ; B ( $18^{\circ}\text{C} - 16:8 - 17\text{w.m}^{-2}$ ).

## B - Variations qualitatives

La spectroscopie infrarouge ne permet pas la mise en évidence de différence entre les échantillons provenant des différentes cultures. Les pics caractéristiques de l'agar (1070, 930 et 870  $\text{cm}^{-1}$ , CHRISTIAEN et BODARD 1981) apparaissent, en se renforçant à partir des extraits à 40°C.(Fig.24).

Contrairement à ce qu'observe LAHAYE et al. (1985), les précurseurs de l'agarose n'apparaissent donc pas de façon caractéristique à 20°C mais à 40°C. L'extraction plus douce, réalisée sans broyage préalable des échantillons, dans cette manipulation en est vraisemblablement la cause. La chromatographie sur couche mince des produits obtenus en fin de période de croissance ou de phase stationnaire, laisse apparaître des composés qui migrent avec le front du solvant, ce qui les apparentent à des mono ou dimères. Ceux-ci sont essentiellement présents dans les fractions à 20°C ou 40°C, quelles que soient les conditions de culture. Néanmoins, une croissance rapide favorise l'apparition de composés légers dans les extraits. Le changement de conditions de culture affecte assez peu la composition du mélange des fractions légères ou lourdes. Cependant, l'arrêt de la croissance des thalles fait disparaître les fractions légères, comme si ces dernières s'étaient incorporées dans les polymères de plus haut poids moléculaire. A l'inverse, le transfert des thalles en phase stationnaire dans des conditions favorables à la croissance semble permettre la libération de fractions plus légères, notamment à 20 et 40°C (Fig.25). En effet, le fractionnement des produits solubles à 20°C sur couche mince et par filtration sur gel (Fig.26) mobilise une fraction légère majeure, monosaccharidique, et une fraction lourde moins abondante. Le rapport quantitatif s'inverse pour la même séparation des échantillons mobilisés à 40°C.(Fig.27). Les températures d'extraction plus élevées ne libèrent que des fractions lourdes.

La fraction légère a été isolée par tamisage moléculaire sur une colonne de séphadex G25. Une ambiguïté sur l'identification de certains composés nécessitait de faire l'analyse en chromatographie en phase gazeuse. Sans hydrolyse, peu de produits sont identifiés.(Fig.28). Par contre, après action de l'acide trifluoroacétique (4N, 4H, 100°C), du mannose peut être mis en évidence, avec un peu de galactose et de

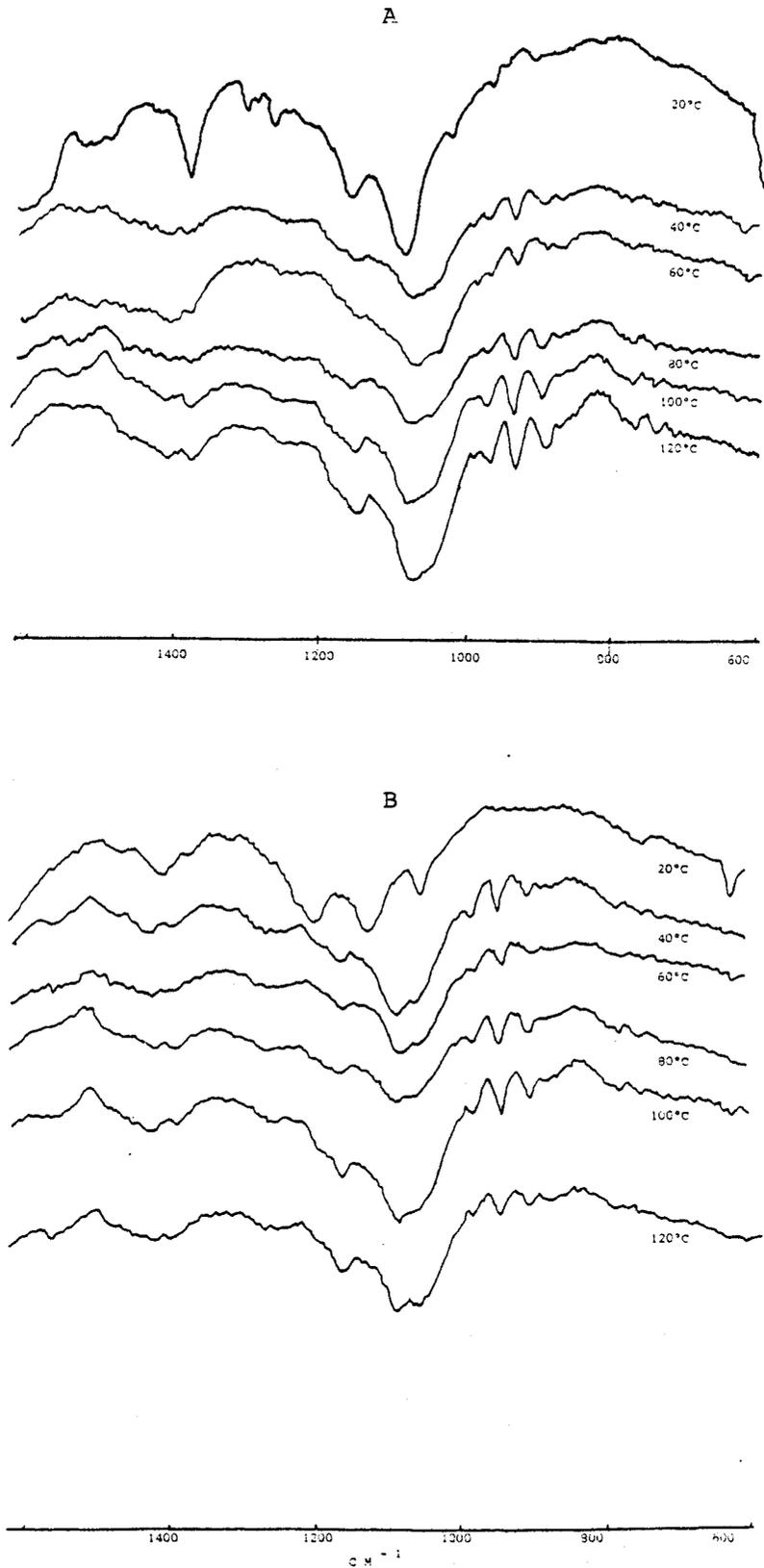


Fig. 24 : Spectres infrarouges de films d'agars extraits à différentes températures, de thalles en cultures contrôlées.  
 A (5°C - 8:16 - 7w.m<sup>-2</sup>) ; B (18°C - 16:8 - 17w.m<sup>-2</sup>).

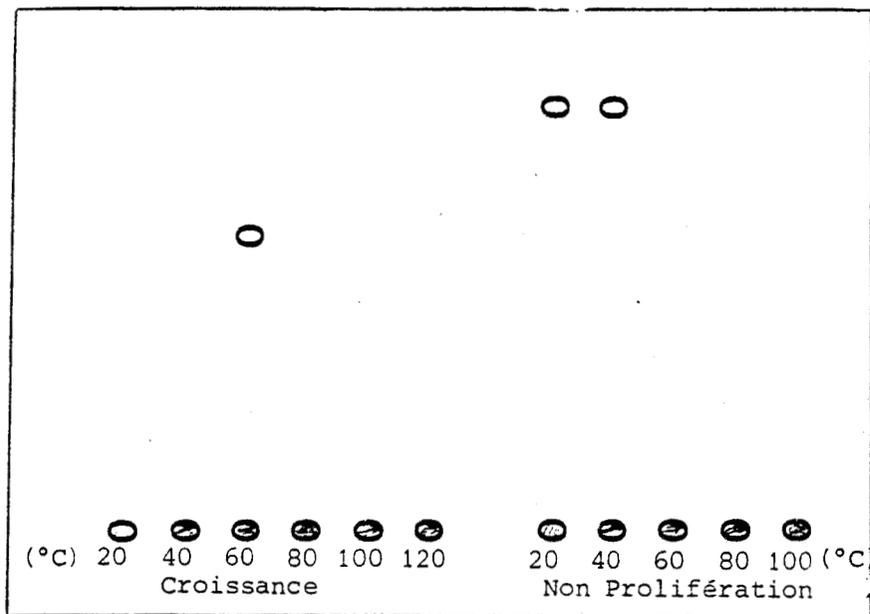
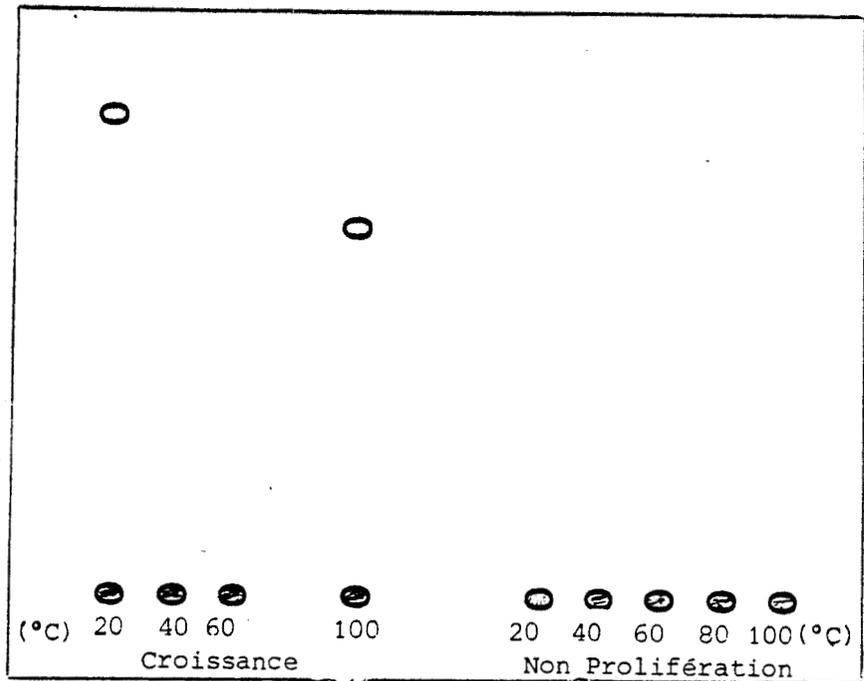


Fig. 25 : Chromatographie en couche mince de solutions d'agar extrait à différentes températures de thalles en cultures contrôlées. (Dépôt 10  $\mu$ g - Migration 3 H - Solvant : éthanol/butanol/eau/acide acétique/pyridine ; 100/10/30/3/10. Révélation orcinol sulfurique 20 % (p/v) à 110°C).

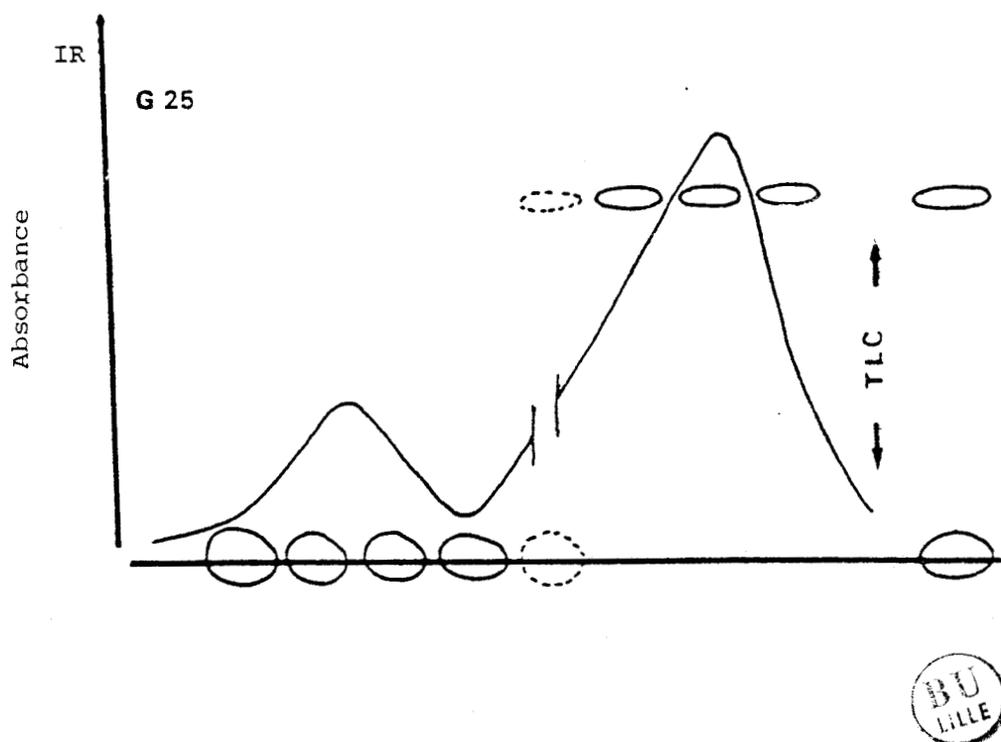
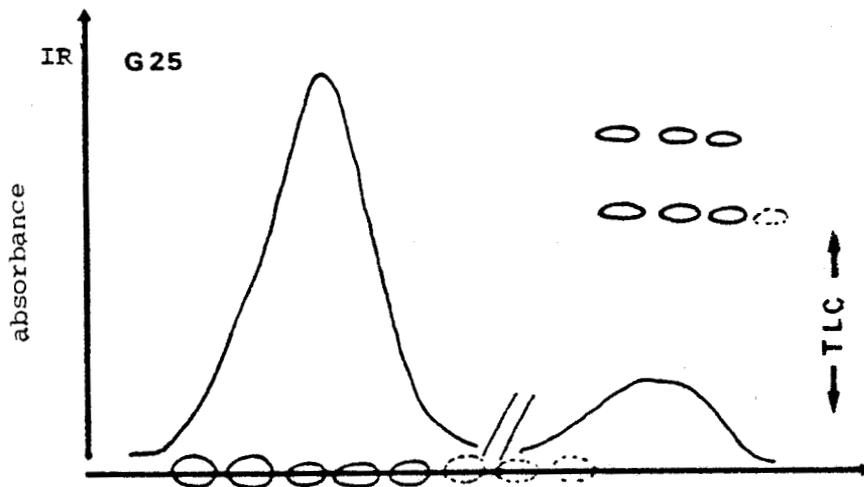


Fig. 26: Chromatographie de gel filtration de solutions d'agar extrait à différentes températures. Fraction 20°C.

Séphadex G25 ; Elution : eau distillée ; Fraction : 5 ml ;  
Détection : réfractomètre interférenciel KNAUER.



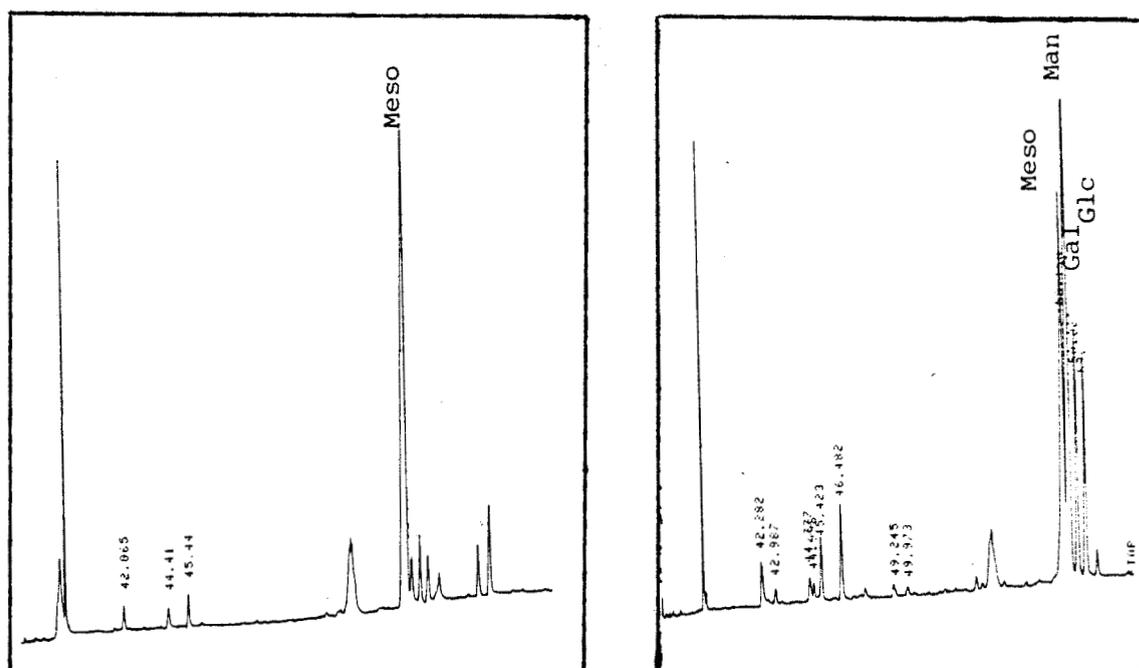
BU  
LILLE

Fig. 27 : Chromatographie de gel filtration de solutions d'agar extrait à différentes températures. Fraction 40°C.

Séphadex G25 ; élution : eau distillée ; fraction : 5 ml ;  
détection : réfractomètre interférenciel.

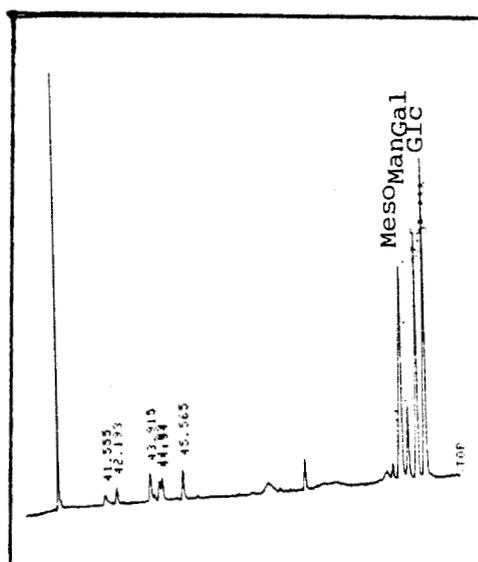
TLC = Chromatographie sur couche mince de silice - solvant (100/10/  
30/3/10).

Révélation au réactif à l'orcinol sulfurique.



Fraction légère avant  
Hydrolyse

Fraction légère après  
Hydrolyse



Fraction lourde hydrolysée



Fig. 28 : Chromatographie en phase gazeuse des fractions lourdes et légères de l'agar extrait dans l'eau à 40°C, séparées par gel filtration (G25), avant Hydrolyse ou non par l'ATFA (4N, 4h). Chromatographe GIRDEL 300, colonne capillaire silicone OV 101.

glucose. (Fig.28) Des traces de pentoses (xylose, arabinose) sont également libérés ; ils sont plutôt apparentés aux polymères de la paroi fibrillaire.

La fraction légère est donc représentée par des oligomères de galactose, dont l'appartenance aux précurseurs de l'agar est plausible. Le glucose est vraisemblablement une contamination par l'amidon du cytoplasme, dont le faible poids moléculaire a favorisé la diffusion dans le milieu d'extraction. Le mannose, dont l'origine est encore incertaine, pourrait ne pas être étranger aux mannoglycérates, proches de l'amidon floridéen, décrits dans la littérature . (Fig.28 ).

La fraction lourde hydrolysée, libère principalement du galactose et du glucose. (Fig.28). Ce dernier, comme précédemment, a vraisemblablement pour origine l'amidon, libéré sous forme d'oligomères de taille intermédiaire, suffisante pour qu'ils ne soient pas entraînés par le solvant de migration sur couche mince. Cette fraction, plus riche en galactoses chargés (élués par NaCl 3M sur DEAE sephadex A50) peut être considérée comme précurseur de l'agarose (Fig.29); elle n'est cependant pas en quantité suffisante pour être caractérisée comme tel.

A partir des extraits à 40°C et jusqu'à ceux à 80°C, les charges qui les retiennent sur des échangeurs d'anions plaident en faveur de la présence des polymères précurseurs d'agarose. Leur abondance relative dans les fractions mobiles à 80°C, caractéristique des échantillons cultivés en été, s'accorde avec les hypothèses de leur incorporation lors des phénomènes de croissance cellulaire.

La spectroscopie RMN du carbone 13 confirme l'absence de composés assimilables à l'agar dans les extraits recueillis à température inférieure à 40°C. Des pics en surnombre sont visibles à 103.6 : G'1 ; 69.6 : G'2 ; 84.9 : G'3 ; 69.0 : G'4 ; 75.8 : G'5 ; 61.7 et à 101.1 : A'1 ; 69.2 : A'2 ; 70.9 : A'4 ; 78.9 : A'4 ; 70.0 : A'5 ; 67.7 : A'6. (Fig.30) La méthylation du carbone 6 du D-galactose est quasi permanente, mais semble se démasquer de plus en plus avec l'élévation de la température d'extraction. (Fig.31). Néanmoins, après fractionnement par l'éthanol 50% par la méthode décrite par LAHAYE et al. (1986), les extraits à 100°C de thalles en non-prolifération ne présentent pas de pics assimilables au C6-O-Me-galactose, alors qu'ils s'observent dans les mêmes extraits de thalles en croissance. (Fig.32). En condition de

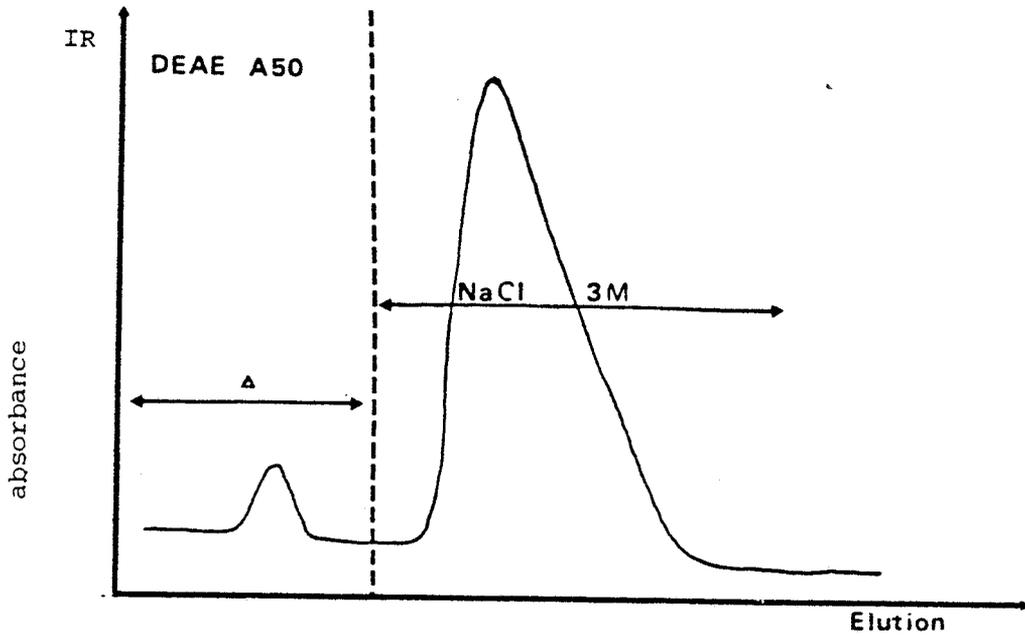


Fig. 29 : Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE SEPHADEX A50 de solutions d'agar extrait à 20°C (élution eau distillée, NaCl 3M, détection : phénol sulfurique). Fraction 20°C.

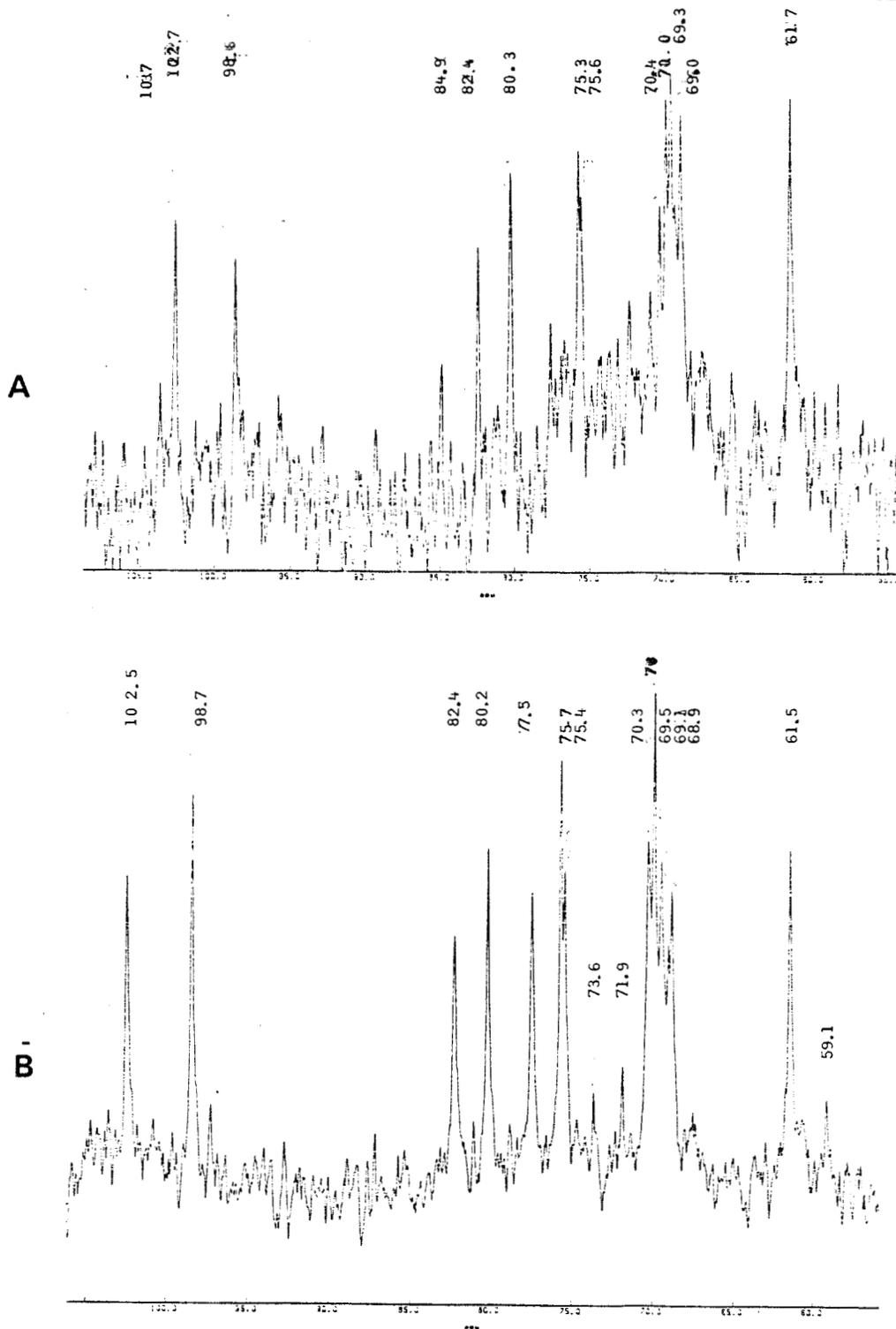


Fig. 30 : Spectroscopie RMN <sup>13</sup>C de solutions d'agar extraits à différentes températures.

A : Echantillon extrait à 40°C.

B : Echantillon extrait à 60°C.

(Enregistré à 80°C, 29699 balayages, temps d'acquisition 0.655 s., largeur spectrale 10 000.



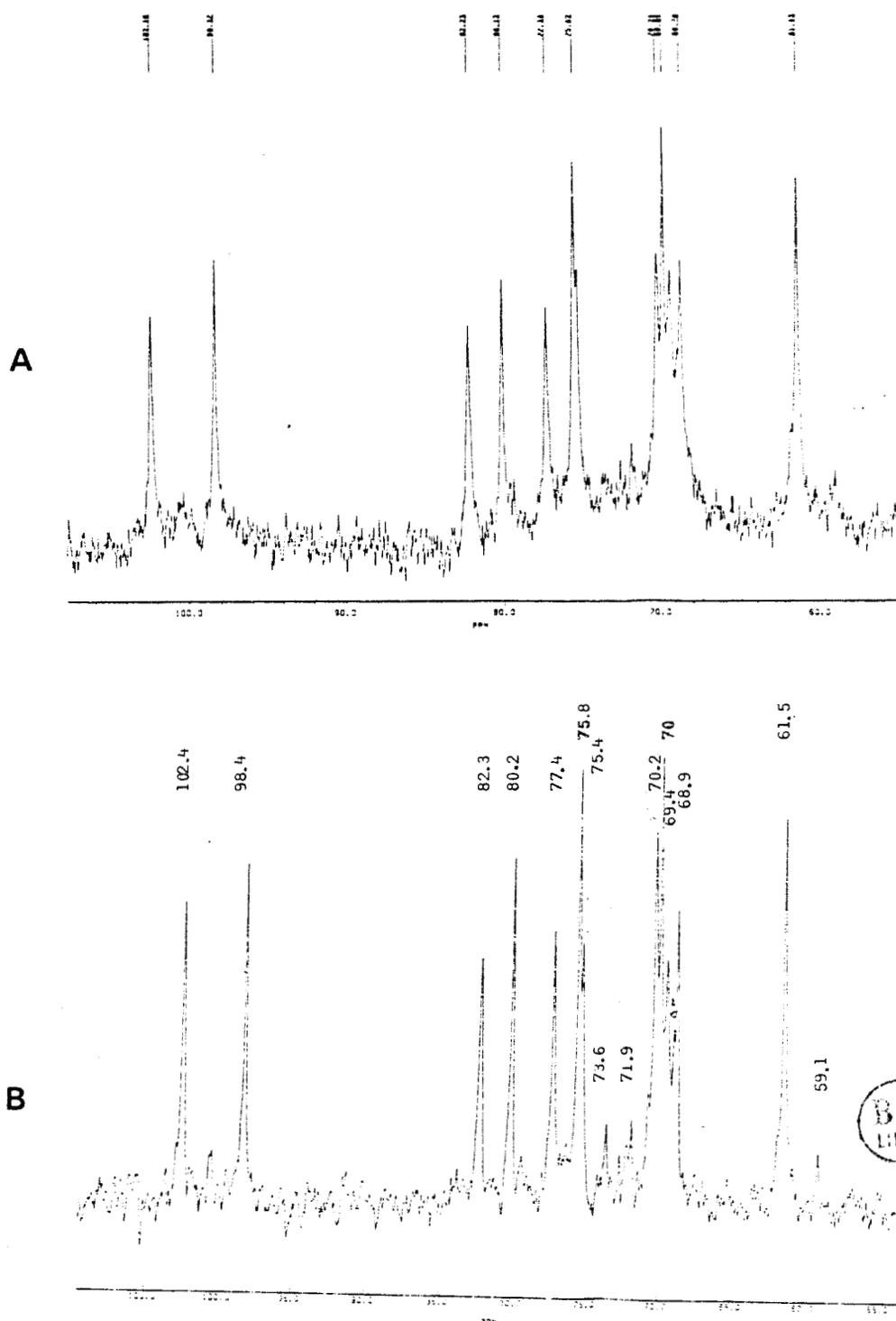


Fig. 31 : Spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  de solutions d'agar extraits à différentes températures

A : Echantillon extrait à 80°C.

B : Echantillon extrait à 100°C.

(Enregistré à 80°C, 46327 balayages, largeur spectrale 23809 Hz, temps d'acquisition 0.655 s.)

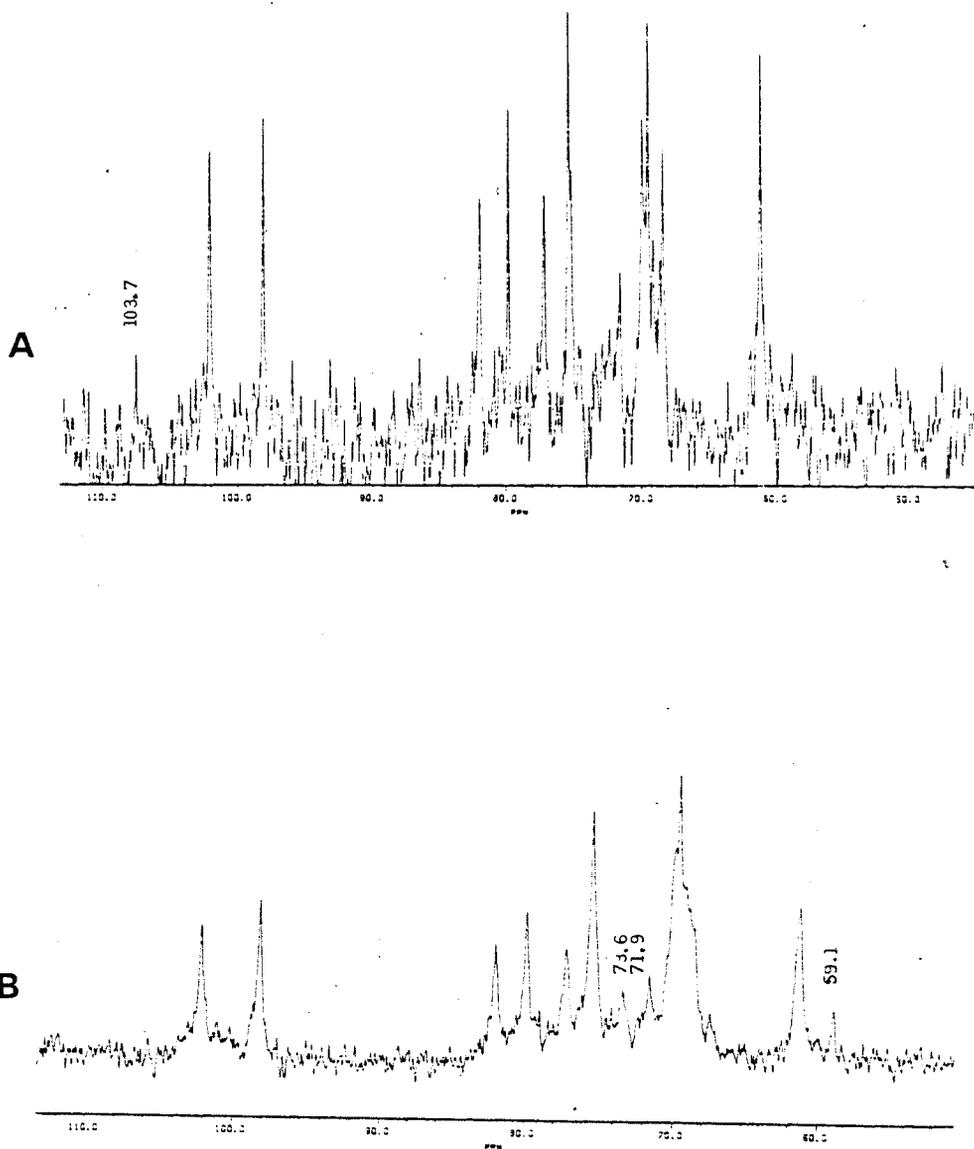


Fig. 32 : Spectres RMN d'agar obtenus par extracteurs fractionnés  
Echantillons 100°C, Fractions solubles dans l'éthanol 50 %.

- A. Agar de thalles en non prolifération (enregistrement à 60°C, 2 329 balayages, largeur spectrale 25 000, temps d'acquisition 0,655 s.)
- B. Agar de thalles en croissance (enregistrement à 60°C, 10 546 balayages, largeur spectrale 25 000, temps d'acquisition 0,655 s.)



croissance, l'abondance de précurseurs est sensible jusqu'aux extraits obtenus à 80°C, contrairement à ce qui est obtenu en condition de non prolifération puisque dans ce cas, les spectres sont débarrassés des pics supplémentaires. (Fig.33).

Un tel mélange de polymères chargés dans les thalles en croissance peut expliquer leur plus forte hydrophilie et par conséquent leur plus grande extractibilité. A ce titre, ces polymères sulfatés constituent une étape particulière de l'anabolisme de la phase matricielle de la paroi de *Gracilaria* en phase de croissance.

Tout se passe donc comme si, en phase de croissance, la matrice pariétale était plutôt constituée de polymères solubles et mobiles, autorisant les réarrangements imposés par l'élongation cellulaire, précurseurs de polymères plus hydrophobes et donc plus liés à la paroi squelettique quand la cellule cesse son étirement. Les propriétés physiques du gel confèrent alors à la cellule des propriétés mécaniques susceptibles de constituer une barrière protectrice face aux contraintes extérieures.

### C - Conséquences ultrastructurales

La paroi cellulaire des thalles cultivés pendant un mois en condition de croissance, observée en microscopie électronique, présente une structure assez lâche et peu dense sans discontinuité nette entre les cellules (Pl.VI, Fig.21.). Cette électronographie constitue le témoin auquel seront comparées les parois après extraction de l'agar par solubilisation à différentes températures. Le même échantillon est étudié tout au long de la série de manipulations. Les algues ayant été lyophilisées, ce sont donc des cytoplasmes réhydratés qui ont été observés, ce qui explique leur aspect compact. Les grains d'amidon abondent autour des chloroplastes.

Après 12 heures de macération dans l'eau distillée à la température du laboratoire, la zone interne de la paroi se gonfle jusqu'à doubler de volume par rapport au témoin (Pl.VI, Fig.22). Des séparations dans la partie médiane de la zone fibrillaire apparaissent, tendant à désolidariser les cellules entre elles. Quelques grains d'amidon montrent des plages d'hydrolyse, ce qui explique la présence de glucose dans l'analyse des extraits obtenus à 20°C.(Pl.VI, Fig.23).

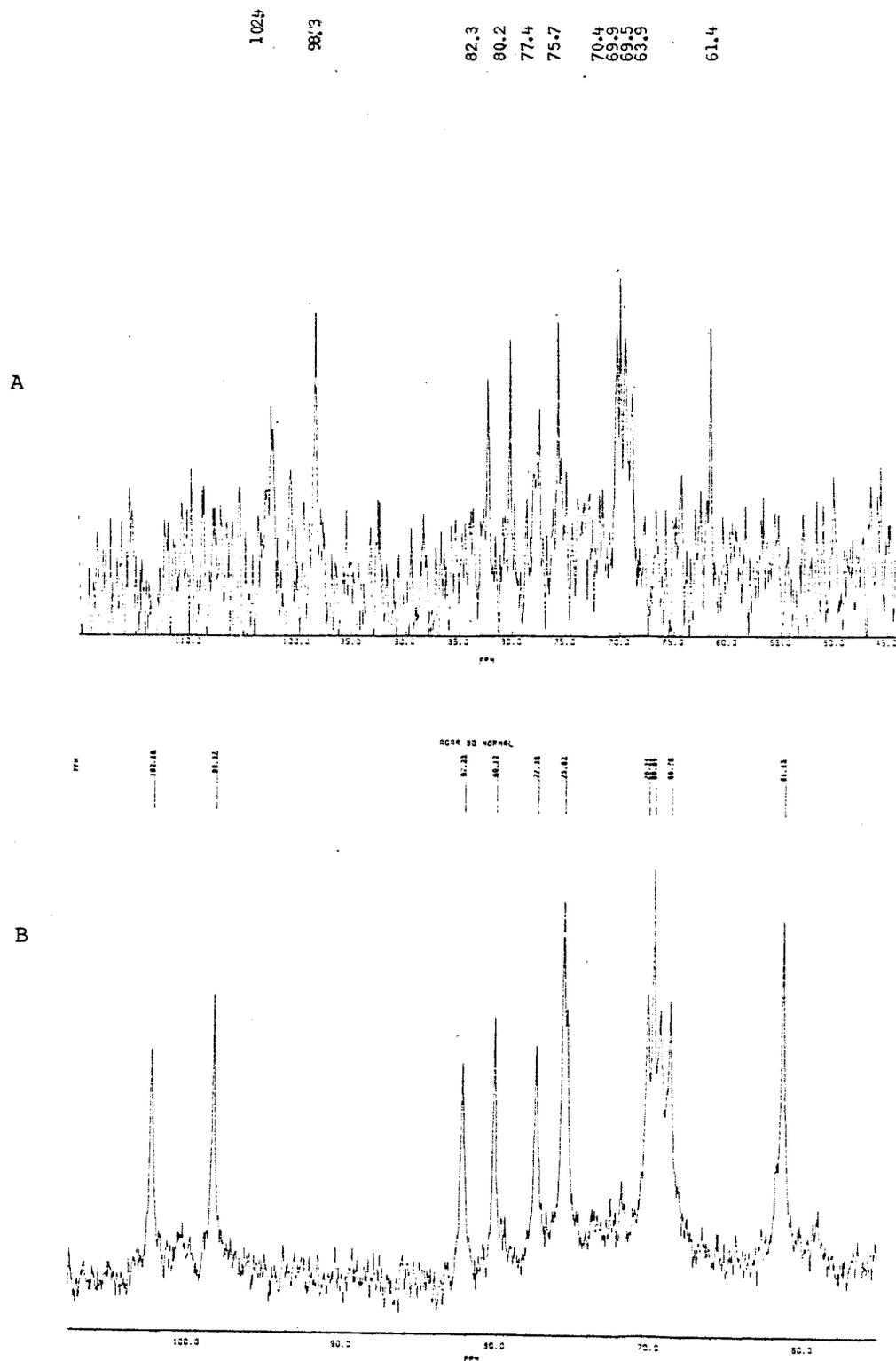
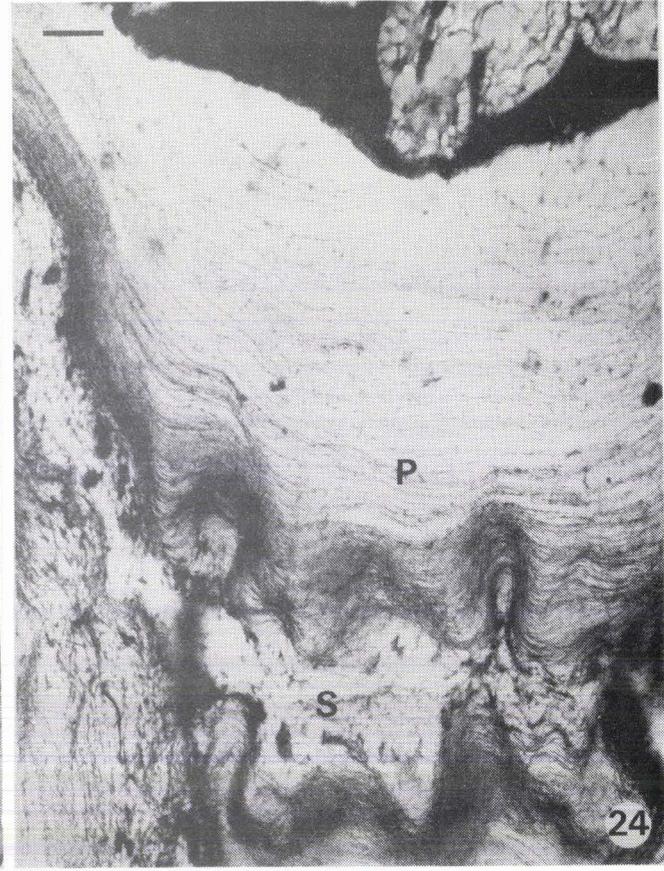
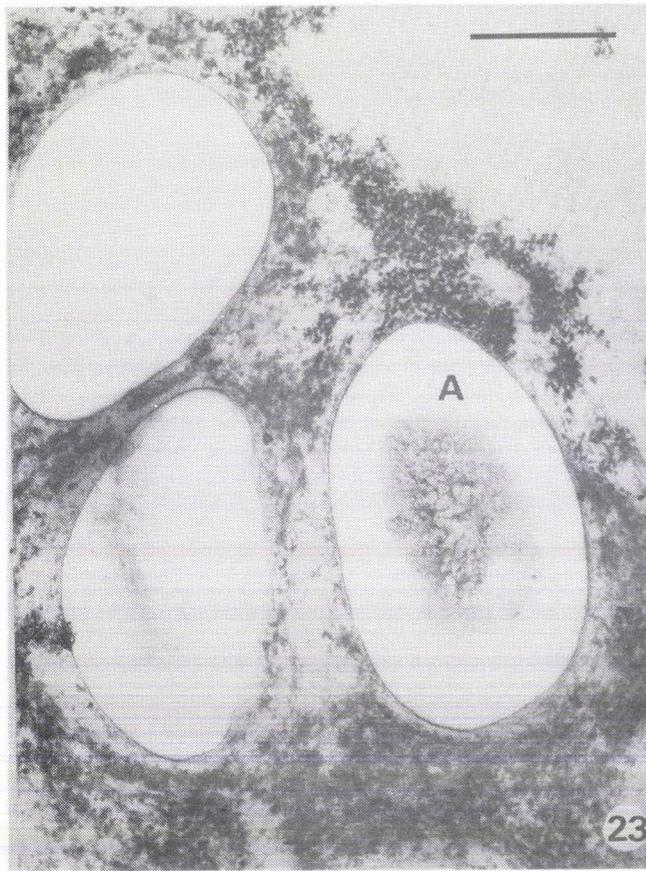
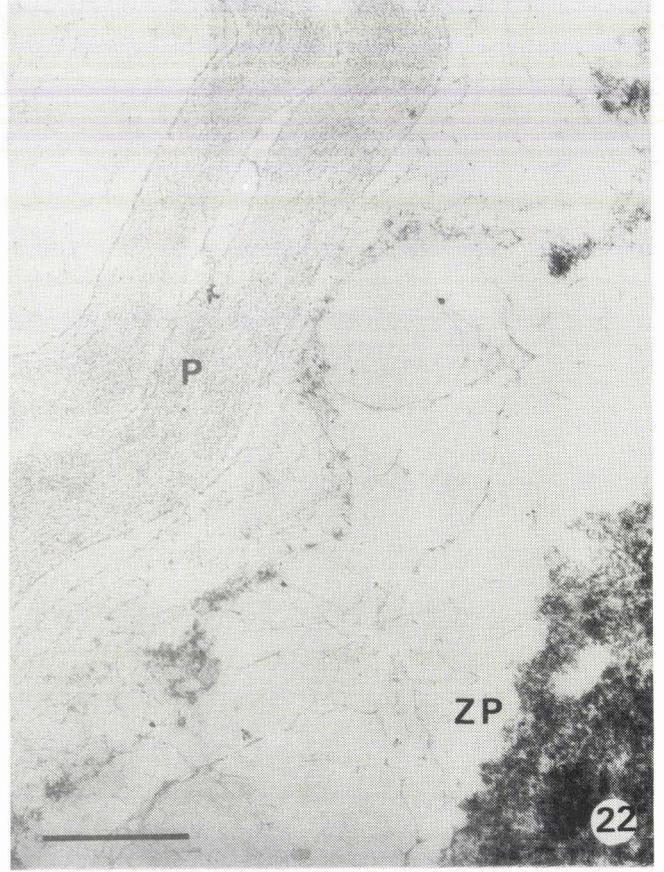
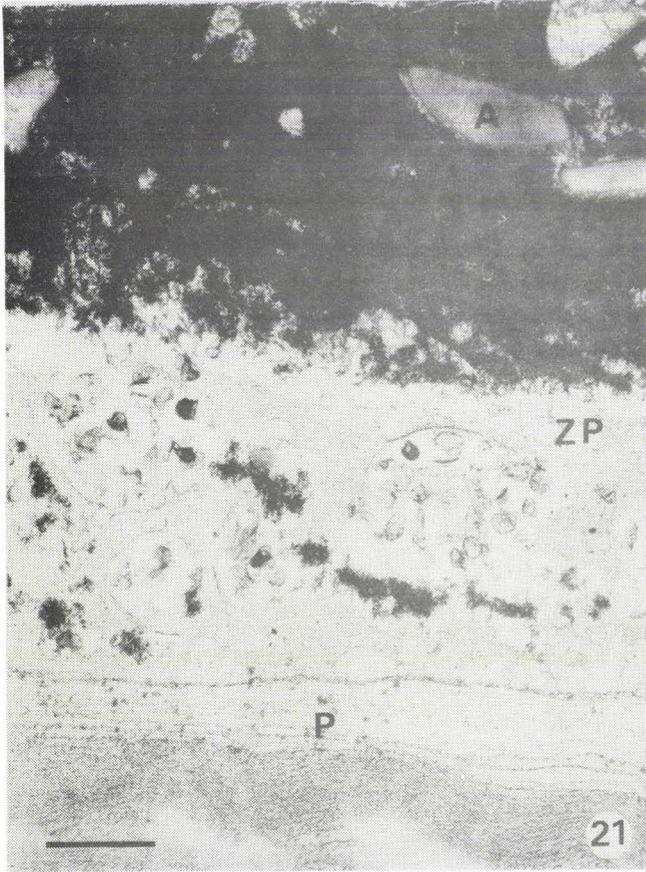


Fig. 33 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'échantillon d'agar extrait à 80°C de thalles cultivés en condition de croissance (A) et en non prolifération (B).

(Enregistré à 80°C, A : 4427 balayages, B : 46327, largeur spectrale 15151, temps d'acquisition 0.655)



BU  
LILLE

PLANCHE VI - EXTRACTIONS FRACTIONNÉES DE L'AGAR.  
CONDITIONS DE CROISSANCE.

Fig. 21. - Témoin : zone externe de la paroi à structure lâchement fibrillaire et renfermant de nombreuses vésicules et amas denses. x 28000.

Fig. 22. - Extraction de l'agar à froid. On observe le gonflement de la zone interne de la paroi et le début de la séparation de deux cellules adjacentes. x 40000.

Fig. 23. - Extraction de l'agar à froid. Quelques grains d'amidon présentent un début d'hydrolyse. x 40000.

Fig. 24. - Extraction de l'agar à 40°C. L'amidon très fortement dégradé est déjà en partie solubilisé. Les cellules se séparent nettement au niveau de la zone intercellulaire. x 15000.

Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Abréviations : A, amidon ; cy, cytoplasme ; P, paroi ; S, séparation entre deux cellules ; Zp, zone périplasmique.

Echelle : 0.5  $\mu$ m.

Après extraction à 40°C, les cellules se séparent franchement au niveau des espaces intercellulaires. La zone interne paraît gonfler encore ; peu à peu les fibrilles squelettiques des zones interne et moyenne sont démasquées, pour apparaître clairement dès 60°C. L'amidon est très dégradé et en grande partie solubilisé. Après le traitement à 60°C, il a totalement disparu. (Pl. VI, Fig. 24).

Le chauffage à 80°C modifie profondément la structure fibrillaire. Les zones intercellulaires qui se présentent normalement en réseau régulier sont désorganisées. Les fibrilles prennent un aspect lâchement ondulé, souple, se tassent les unes contre les autres par endroits, s'écartant ailleurs. (Pl. VIII, Fig. 29).

Ce phénomène se poursuit à 100°C pour aboutir à la formation de paquets de fibrilles courtes, très séparés et fragmentés à l'intérieur d'une zone devenue complètement claire, à 120°C. (Pl. VIII, Fig. 30).

Les parois de cellules de thalles cultivés en phase stationnaire se caractérisent par des fibrilles très serrées. En outre, la condensation de la substance matricielle contribue à l'aspect très dense de la paroi observée en microscopie électronique. (Pl. VII, Fig. 25).

Le cytoplasme doit son apparence opaque aux électrons aux grands chloroplastes. Les grains d'amidon sont abondants. Le régime d'éclairement faible n'a, par conséquent, pas inhibé la photosynthèse, à moins que l'origine des échantillons, récoltés au printemps, donc déjà riches en réserves glucidiques, et soumis à des faibles températures, ait réduit leur catabolisme. STADLER (1984) a noté, cependant, qu'en régime de lumière limitante, des pigments relais (phycoérythrine) apparaissent. De plus, la limitation de l'énergie lumineuse semble compensée, en partie, par l'abondance des plastes.

L'extraction à l'eau froide (20°C), contrairement à ce qui a été observé précédemment, n'affecte que très peu la paroi. En particulier, le gonflement est plus réduit et les cellules ne se séparent pas. Cependant, l'amidon commence à se dégrader. (Pl. VII, Fig. 26).

A 40°C, la dégradation de l'amidon s'accroît nettement. La zone interne de la paroi se gonfle. Ce phénomène est particulièrement visible sur

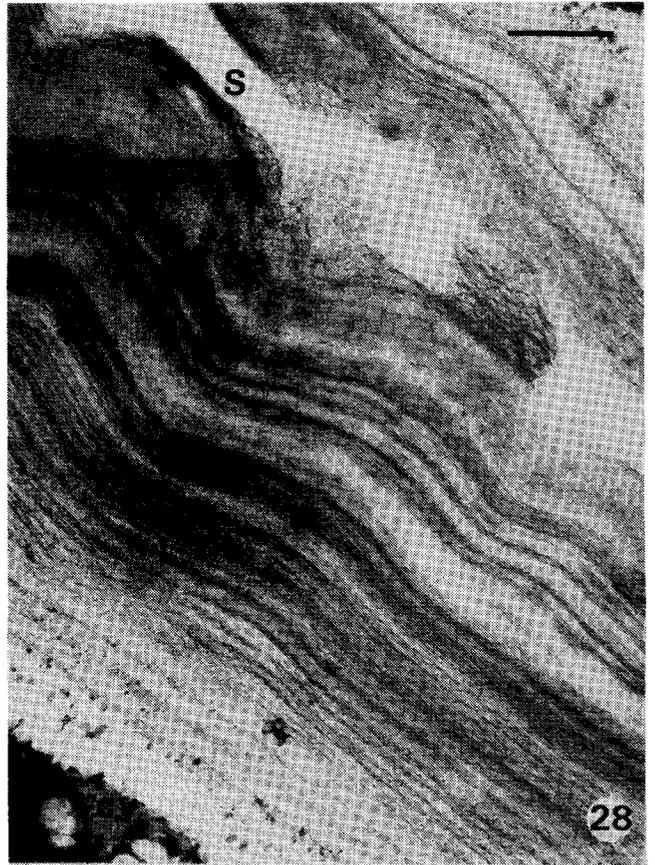


PLANCHE VII

BU  
LILLE

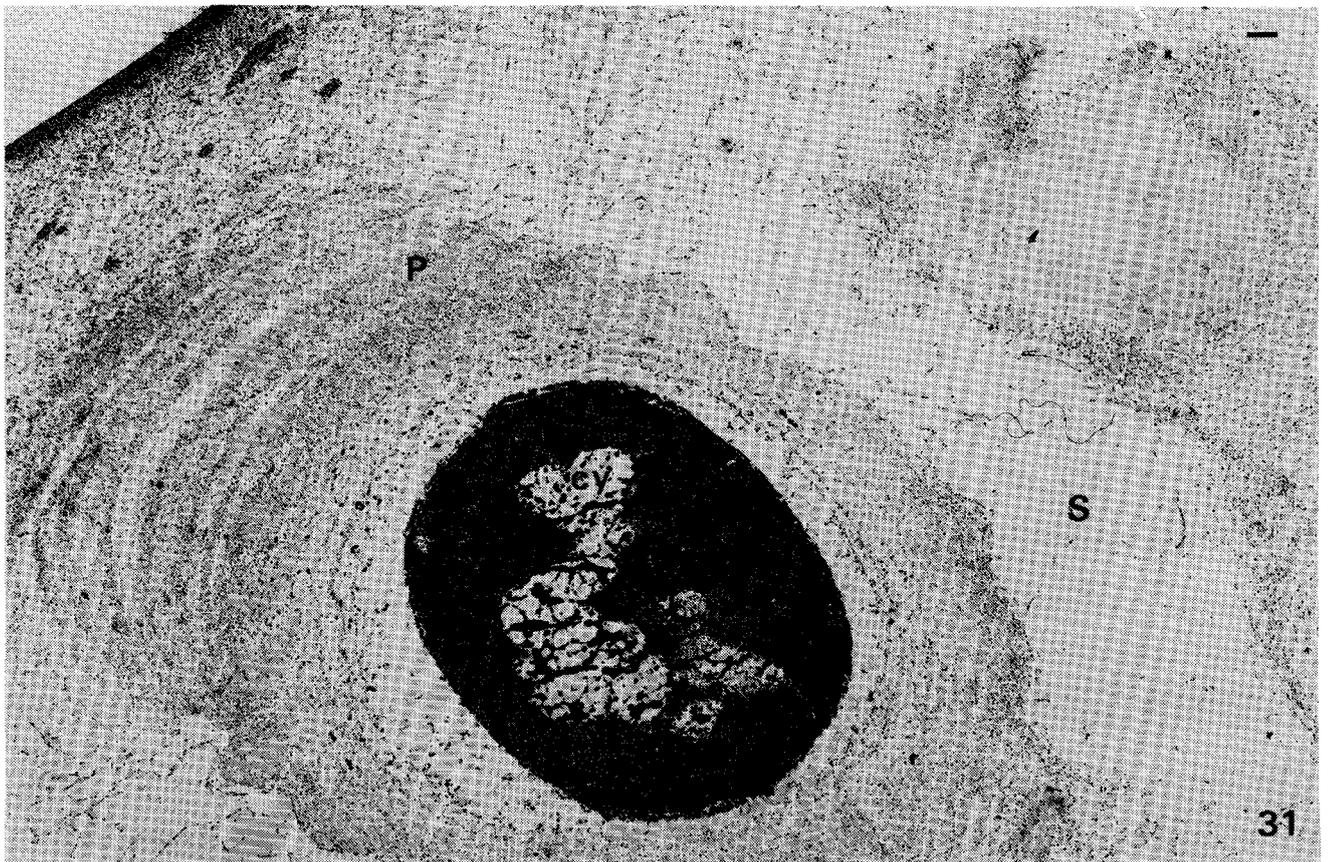
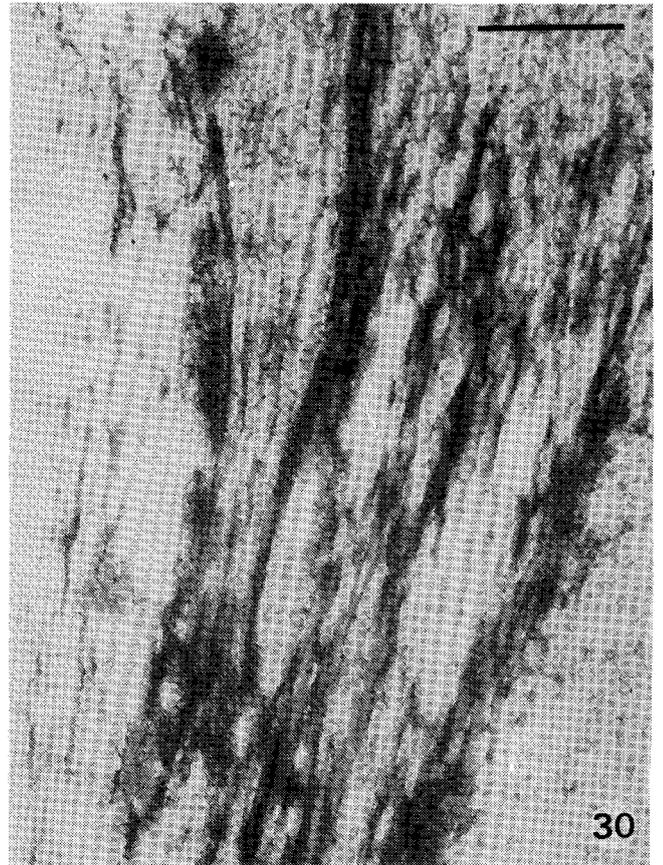
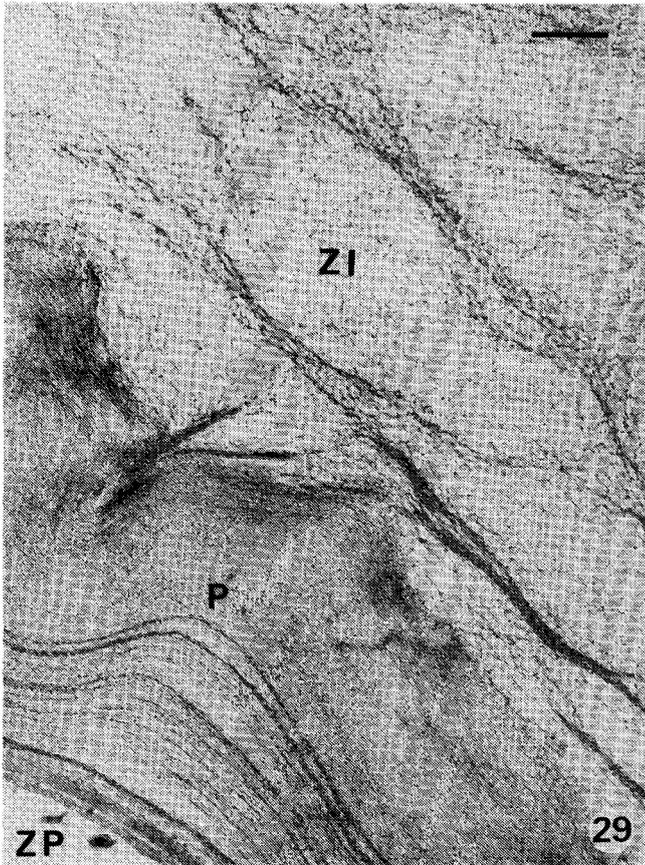
PLANCHE VII - EXTRACTIONS FRACTIONNÉES DE L'AGAR.  
PHASE STATIONNAIRE DE CROISSANCE.

- Fig. 25. - Témoin : toute l'épaisseur de la paroi est opaque aux électrons. x 30000.
- Fig. 26. - Extraction de l'agar à froid. Les grains d'amidon sont légèrement hydrolysés. x 28000.
- Fig. 27. - Extraction de l'agar à 40°C. La dégradation et la dissolution de l'amidon sont très avancées. On observe le gonflement de la zone interne de la paroi. x 28000.
- Fig. 28. - Extraction de l'agar à 60°C. Les cellules se séparent au niveau de la zone intercellulaire par rupture de faisceaux de fibrilles. x 28000.

Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Abréviations : A, amidon ; cy, cytoplasme ; P, paroi ; S, séparation entre deux cellules.

Echelle : 0.5  $\mu$ m.



BU  
LILLE

PLANCHE VIII - EXTRACTIONS FRACTIONNÉES DE L'AGAR.  
HAUTES TEMPÉRATURES.

Fig. 29 et 30 : Conditions de croissance.

Fig. 29. - Extraction de l'agar à 80°C. Les fibrilles des zones intercellulaire et moyenne de la paroi deviennent souples et malléables. x 20000.

Fig. 30. - Extraction de l'agar à 120°C. La matrice a été complètement extraite. Les fibrilles désorganisées et cassées sont groupées en amas irréguliers. x 40000.

Fig. 31. - Phase stationnaire de croissance. Extraction de l'agar à 100°C. Les cellules se séparent nettement les unes des autres. On observe la rupture des fibrilles en très courts fragments. x 8000.

Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Abréviations : C, zone cuticulaire ; cy, cytoplasme ; P, paroi ; S, séparation entre deux cellules ; ZI, zone intercellulaire ; ZP, zone périplasmique.

Echelle : 0.5  $\mu$ m.

la Pl.VII, Fig.27 car, consécutivement à la prise de volume de cette zone, la zone fibrillaire moyenne se trouve comprimée contre la zone intercellulaire.(Pl.VII, Fig.27).

Après le passage à 60°C, la zone intercellulaire se rompt. La séparation des cellules intervient donc plus tardivement que précédemment. De plus, cette rupture est due à des cassures nettes au niveau des fibrilles, ce qui n'a pas été observé lorsque les thalles ont été cultivés en condition de croissance.(Pl.VII, Fig.28).

Les cassures pariétales se poursuivent à 80°C et aboutissent à l'isolement des cellules qui s'observe bien à 100°C.(Pl.VIII, Fig.31). Elles sont entourées par les fibrilles fragmentées. Celles-ci prendront, à 120°C, l'allure déjà décrite dans la série précédente.

L'examen des micrographies, confirme largement et permet de mieux comprendre les résultats obtenus sur le plan biochimique. En effet, l'extraction des polysaccharides matriciels demande plus d'énergie quand les parois proviennent de thalles cultivés en phase stationnaire. Or, la zone interne de la paroi semble effectivement moins hydrophile, dans ce cas, puisqu'elle n'augmente pratiquement pas de volume au début de l'extraction.

De plus, la séparation des cellules et la dégradation des fibrilles interviennent plus tardivement.

Les différences qualitatives des agars extraits dans chacune des séries, semblent donc liées aux propriétés physiques de la phase matricielle assurant une résistance et une rigidité plus grandes des parois des cellules de thalles cultivés en phase stationnaire. La rupture des structures plus nette dans ce cas, plaide également en faveur de cette interprétation.

A l'inverse, le caractère hydrophile de la zone interne de la paroi apparaît dès le début de l'extraction. Les polysaccharides sont ainsi plus solubles (les polymères sont plus sulfatés et moins méthylés), ce qui explique que le maximum de produits d'extraction soit recueilli à 80°C. Les propriétés mécaniques qui en découlent apparaissent dans la souplesse et l'élasticité des structures pariétales au cours de leur désorganisation progressive chez les thalles cultivés en condition de croissance.

La filiation entre les polymères sulfatés et l'agarose au sein de la phase matricielle de la paroi correspond à l'évolution des différents états physiologiques du développement de *Gracilaria Verrucosa*.

En phase de croissance, la zone interne de la paroi semble plus hydrophile. En microscopie électronique, elle paraît, en effet, gonflée et gorgée d'eau. A l'extraction, les polysaccharides solubles qui la constituent sont facilement déplacés. Ces polymères représentent la fraction majeure de l'agar. Néanmoins, la teneur en sulfate des polymères reste toujours relativement faible. Il semble donc que les galactanes sulfates sont intégrés progressivement dans la paroi où ils sont ensuite transformés en continu en agarose. Les produits obtenus sous différents régimes d'éclairement permettent de donner une explication au phénomène. Les fortes intensités lumineuses et les longues photopériodes favorisent l'accumulation de grains d'amidon. La vitesse de synthèse de ces réserves glucidiques est alors plus grande que l'anabolisme de l'agar. Le nombre de vésicules à contenu polysaccharidique et l'activité intense du plasmalemme en direction de la paroi, témoignent de l'incorporation de précurseurs d'agarose dans la matrice pariétale. L'abondance de ces polymères dans les extraits se trouve ainsi expliquée. Par contre, quand les conditions d'éclairement s'affaiblissent soit par la diminution de l'intensité lumineuse, soit par le raccourcissement de la photopériode, un équilibre entre les vitesses de synthèses d'amidon et d'agar s'observe, et dans ce cas, les quantités de 3.6-anhydrogalactose formées, sont relativement plus importantes et le fait de retrouver ce résidu glucidique neutre, retenu sur DEAE avec les fractions chargées, témoigne de son association au sein d'un polymère sulfaté. La désulfatation progressive forme de plus en plus de 3.6-anhydrogalactose et explique le déplacement des fractions chromatographiques sur échangeurs d'anions, vers celle éluee dans l'eau distillée, quand la photosynthèse est réduite.

En hiver, les conditions de synthèse d'amidon sont limitées. L'accumulation d'agarose se perçoit, en microscopie électronique, par l'aspect plus dense aux électrons de la paroi, comme si le réseau matriciel était plus serré, plus hydrophobe et plus associé aux fibres squelettiques. L'agar est alors moins mobile à l'extraction, bien que tout peut être extrait, comme en témoigne l'augmentation des rendements et les figures en microscopie.

La RMN du carbone confirme les interprétations données à propos de la cinétique du métabolisme de l'agar, en mettant en évidence des précurseurs dans les fractions solubles dans l'eau tiède et de l'agarose déplacé dans l'eau bouillante. Cette technique d'analyse apporte une précision supplémentaire en faisant apparaître une méthylation sur le C6 du D-galactose plus importante sur les polymères extraits de thalle en croissance. Il semble que ce soit une différenciation particulière aux parois de cellule en élongation qui pourrait affecter certaines propriétés physiques des colloïdes matriciels.

En résumé, la zone interne de la paroi intègre, via le cytoplasme, des polymères sulfatés consécutivement à une synthèse importante d'amidon, qui caractérise la phase de croissance de l'algue. Dans le même temps, ces précurseurs s'enrichissent en 3.6-anhydrogalactose et forment ainsi de plus en plus d'agarose. Quand les conditions du milieu deviennent défavorables au développement des algues, l'accumulation d'agarose se poursuit et celui-ci devient le composé majeur. Une gangue épaisse et compacte entoure alors les cellules qui prennent toutes l'aspect de cellules de type cortical, au moment de la mauvaise saison.

Les propriétés physiques des gels qui découlent des transformations moléculaires retentissent vraisemblablement sur les propriétés mécaniques des thalles.

**ASPECTS PHYSICOCHEMISTIQUES DE L'AGAR DANS LA PAROI.**

Le mécanisme de gélification de l'agarose met en jeu les propriétés de la structure secondaire des polysaccharides (REES 1969). YAPHE et DUCKWORTH (1972) signalent l'interférence des substituants de la molécule dans la cohésion du réseau tridimensionnel du gel.

L'évolution de la molécule, lors du développement du thalle, doit donc avoir des conséquences sur les propriétés physicochimiques de la paroi. En particulier, la force de gel et la viscosité des polyosides matriciels sont des propriétés susceptibles d'intervenir dans les processus de pérennisation ou de croissance du thalle. En effet, un gel dur renforcera les propriétés mécaniques de la paroi, qui, allié à une différenciation du thalle en cellules de type "corticale" (GODIN 1985, comm. pers.), petites, à parois épaisses, assurera une protection accrue du thalle. D'un autre côté, la diminution de la viscosité de l'agar offrira une phase aux propriétés physiques compatibles avec les réaménagements pariétaux qui ont lieu lors de la croissance cellulaire.

En outre, la prise en gel de l'agar se fait en présence de grandes quantités d'eau, par rapport à la masse sèche de polysaccharides. Les phénomènes d'échanges hydriques et ioniques empruntent peut être cette propriété pour réguler les variations de potentiels hydriques et ioniques et la pression osmotique.

Il est relativement aisé de mesurer la force d'un gel d'agar, son taux de gonflement et son comportement rhéologique, une fois le colloïde extrait et remis en solution. Ces méthodes se heurtent néanmoins au fait que les interprétations, au niveau physiologique, sont limités par la concentration de l'échantillon ou les température de mesures. Les résultats obtenus ne considèrent, par conséquent, que les différences observées entre les produits ainsi que les comportements apparents qu'ils exhibent dans les conditions expérimentales.

Cette étude est complétée par une observation en microscopie électronique de l'état qu'adoptent les parois faces aux contraintes qui leurs sont imposées.

## I - VARIATION DE LA FORCE DE GEL

Les forces de gels d'agar obtenus par la resolubilisation dans l'eau des extraits (1g/100ml) recueillis à partir de thalles cultivés en conditions contrôlées, ont été mesurées.

Les algues en croissance libèrent un gel dont la résistance à la pénétration d'une section d'1 cm<sup>2</sup> est nettement plus faible (300g/cm<sup>2</sup>) que celle d'un agar d'une algue en phase stationnaire (600g/cm<sup>2</sup>) (Tab.25). Le phénomène avait déjà été décrit pour des échantillons récoltés dans la nature (cf. Part. I) pour lesquels une relation avec la teneur en sulfate et en 3,6-anhydrogalactose semblait pouvoir être établie (Fig.17). Considérant le galactose-6-sulfate comme un précurseur dans la série métabolique conduisant à la formation d'agarose, sa modification, en milieu alcalin, doit donc améliorer la force de gel. En effet, après traitement sodique (NaOH, 1,5%, 90°C, 3h) de l'agar extrait de thalles en croissance, les gels obtenus offrent des résistances comparables à celles mesurées sur les solutions d'agar de thalles en phase stationnaire. (Tab.25).

La phase matricielle de la paroi de *Gracilaria verrucosa* acquiert ainsi, lors des conditions de non prolifération des propriétés mécaniques qui renforcent la résistance des cellules aux déformations.

La différenciation des thalles par la multiplication des cellules de type cortical, à parois épaisses, notamment à la partie basale des frondes, est accompagnée d'une rigidité accrue des structures pariétales. Cette convergence qualitative contribue apparemment à assurer des conditions de vie pérenne lors de la mauvaise saison. Des fragments courts et rigides, plus ou moins ensablés dans les cuvettes littorales, ont remplacé les frondes longues et souples du printemps et de l'été. Les cryptes gamétophytiques, les verrues gonimoblastiques et les cicatrices des tétrasporocystes, ont été autant de points de rupture du thalle, et seule la partie basale subsiste pour la saison suivante.

## II - VISCOSIMETRIE.

Le mot "rhéologie" a été proposé par E.C. BINGHAM (1928) pour désigner "la science qui étudie les déformations et l'écoulement de la matière". Plus exactement, l'objet de la rhéologie est l'étude du comportement mécanique, c'est-à-dire des relations entre les déformations et

TABLEAU 25

FORCES DE GELS D'AGAR EXTRAIT DE  
 THALLES CULTIVES SOUS DIFFERENTES  
 CONDITIONS DE CROISSANCE  
 (Sol 1 % p/v dans eau distillée)

Conditions de culture	Croissance	Non prolifération
a/ Avant traitement alcalin	250 g/cm <sup>2</sup>	660 g/cm <sup>2</sup>
a/ Après traitement alcalin (1)	680 g/cm <sup>2</sup>	630 g/cm <sup>2</sup>

(1) Traitement alcalin (NaOH 1.5 %, 3 h. à 90°C en présence de BH<sub>4</sub>Na).



les contraintes de la matière. En s'appuyant sur la connaissance de ce comportement, la répartition non uniforme des contraintes et des déformations dans un corps sous l'effet des forces extérieures peut être calculée grâce à la mécanique des milieux continus.

Cette méthode offre donc le moyen de mesurer et de décrire les réponses du comportement d'un gel d'agar soumis à une contrainte extérieure (ici un cisaillement) en fonction de sa qualité biochimique.

Le comportement rhéologique des solutions est voisin : la viscosité apparente diminue avec le gradient de cisaillement (Fig.34) et suit assez bien une loi en puissance et les indices de structures sont proches.(Fig.35). Ils manifestent de la visco-élasticité. Ils sont rhéofluidisants.

En condition de croissance cette loi en puissance donne :

$$\eta_{app} = 0,066 \cdot \dot{\gamma}^{-0,0850} \text{ ou } \tau = 0,066 \cdot \dot{\gamma}^{0,915}$$

et en condition de non prolifération :

$$\eta_{app} = 0,1108 \cdot \dot{\gamma}^{-0,0795} \text{ ou } \tau = 0,1108 \cdot \dot{\gamma}^{0,92}$$

où  $\eta_{app}$  = viscosité apparente en poise

$\dot{\gamma}$  = gradient de vitesse cisaillement en s<sup>-1</sup>

et exposant = indice de structure

Par contre, les viscosités apparentes pour un même gradient de cisaillement vont sensiblement du simple au double entre les échantillons extraits de thalles en condition de croissance et ceux extraits de thalles en phase de non prolifération.

Les expériences menées avec le viscosimètre CARIMED, à 20°C, sur des solutions d'agar à 1% (p/v), donc sur des gels voisins de l'état de la matrice pariétale *in vivo* donnent d'autres types d'informations. Dans ces conditions, en effet, il n'y a pas d'écoulement mais rupture brutale et irréversible du gel. La reproductibilité de la mesure permet d'exclure l'éventualité de glissements relatifs du produit par rapport à la paroi du corps de mesure.

Les individus cultivés en condition de non prolifération produisent un gel qui se rompt pour des tensions supérieures à 4300 dyn/cm<sup>2</sup>, tandis que ceux issus de thalles en croissance ne résistent pas au-delà de 2400 dyn/cm<sup>2</sup>. La

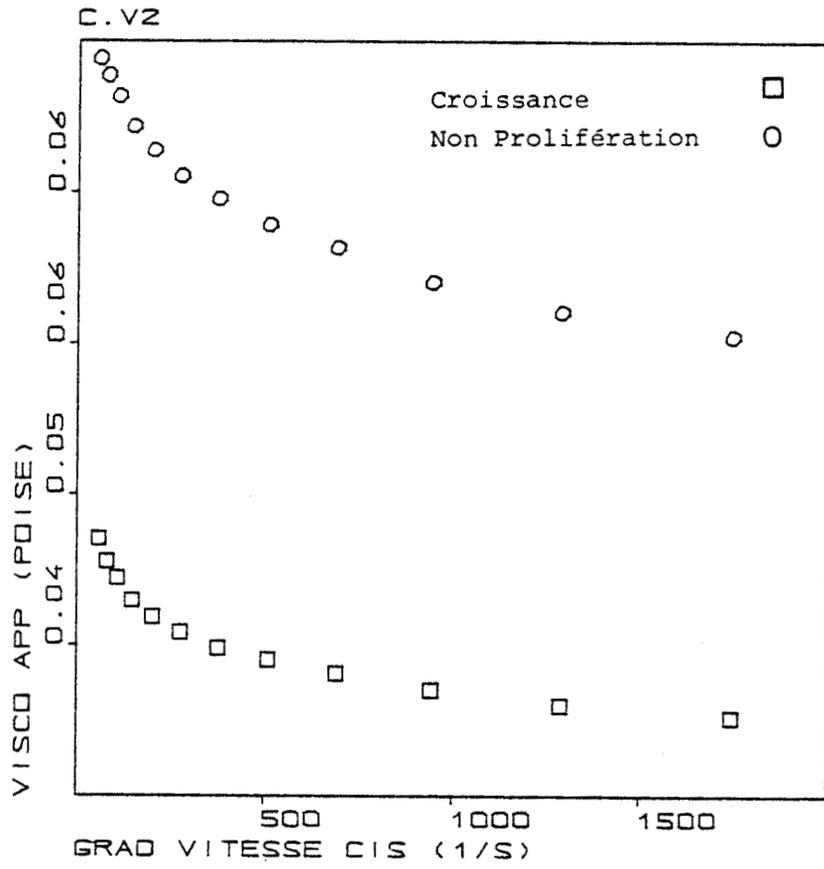


Fig. 34: Viscosité apparente de gels d'agar à 1 % (p/v) à 60°C extraits de thalles cultivés en conditions contrôlées. Système cylindres co-axiaux.

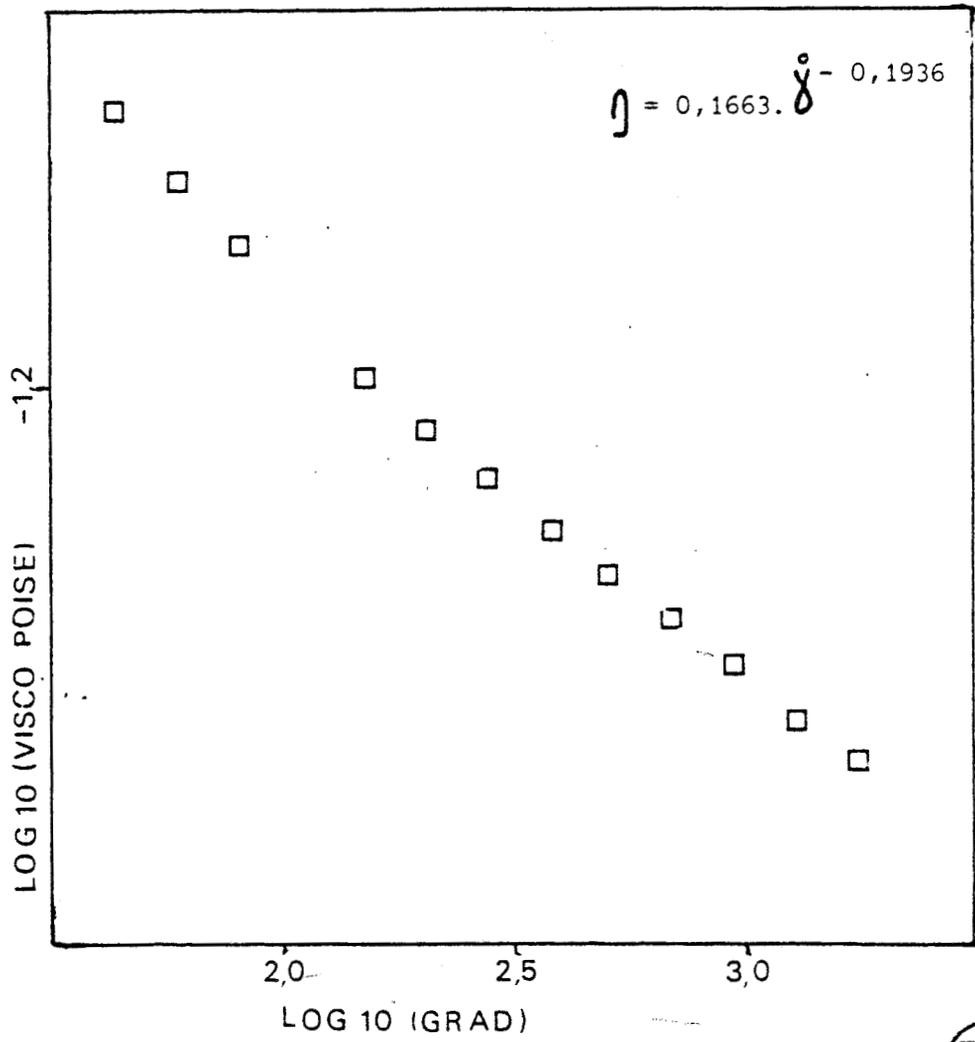


Fig. 35 : Viscosité apparente représentée en coordonnées logarythmiques d'un gel d'agar à 1 % (p/v) à 60°C extrait d'un thalle en croissance.

matrice pariétale est donc plus fragile en condition de croissance cellulaire. Cette propriété autorise les réarrangements pariétaux en période d'élongation.

Bien que les conditions d'étude "in vitro", ne reproduisent pas les conditions "in vivo", pour des raisons de concentration et de température, les résultats obtenus permettent d'imaginer les conséquences dans la paroi des propriétés viscométriques observées.

Pour interpréter, d'un point de vue physiologique, les mesures obtenues, le comportement bien connu des polymères cytosquelettiques du cytoplasme constitue un modèle intéressant et au moins un terme de comparaison. Lors des processus de division cellulaire, la dispersion des microtubules en macromolécules solubles ont tendance à augmenter la viscosité du milieu. Lors de la reconstitution du cytosquelette, la concentration relative de la solution a tendance à diminuer influençant dans le même sens la viscosité.

Dans le cas de la paroi, la concentration de la phase matricielle augmente en condition de croissance, par l'incorporation des précurseurs. Leur intégration dans les polymères en place, lors du retour aux conditions de non prolifération, diminue la concentration en colloïdes libres, comme décrit précédemment. Cependant, le nombre d'hydroxyles non substitués croît, favorisant la formation de ponts hydrogènes inter-chaînes et la viscosité apparente du système augmente avec la structuration du gel.

L'état d'agrégation des polysaccharides n'est évidemment pas le seul paramètre en jeu. Pour décrire de façon plus complète le phénomène, il faudrait tenir compte des liaisons avec les fibrilles squelettiques, elles-mêmes évoluant lors des processus d'élongation.

Il n'en demeure pas moins que l'ensemble des résultats décrits converge pour attribuer un rôle non négligeable à l'agar dans la physiologie de la paroi de *Gracilaria verrucosa*.

### III - TAUX DE GONFLEMENT

Des poudres d'agar mises en solutions par dispersion dans l'eau bouillante ont été, après refroidissement, congelées puis décongelées. Dans ce processus l'eau libre du gel est libérée. Il reste alors de l'eau plus ou moins liée au colloïde qui sera considérée comme l'eau de gonflement.

Un agar du commerce (DIFCO), solubilisé dans des solutions salines de concentrations différentes, a un taux de gonflement plus élevé dans l'eau distillée que dans de l'eau contenant du NaCl 2M. (Tab.26). Dans ce cas, le polysaccharide libère deux fois moins d'eau. Dans les conditions intermédiaires, les différences sont moins significatives.

Des agars extraits de *Gracilaria verrucosa* en condition de croissance ou de non prolifération, exprime un taux de gonflement beaucoup moins marqué que celui de l'agar du commerce. (Tab.26). Il n'y a pas, en outre, de différence significative, entre les colloïdes extraits de thalles en croissance ou non.

Néanmoins, sur le plan physiologique, cette propriété de l'agar permet de proposer un mécanisme de lutte contre les variations de pressions osmotiques. Dans le cas d'une forte dilution du milieu, les colloïdes auront tendance à absorber un maximum d'eau contribuant à freiner le flux hydrique vers la cellule. Dans le cas inverse, d'une part la matrice s'opposera à l'entrée d'eau salée du milieu entre ses mailles par manque d'affinité pour ce type de solution, et d'autre part à limiter l'évasion d'eau du cytoplasme en gonflant au contact du plasmalemme. Ce système à deux faces constitue, en outre, un gradient continu entre le milieu extérieur et la cellule contribuant à tamponner la solution du compartiment pariétal de manière à amortir les variations de pression osmotique.

#### IV - ROLE DE LA PAROI DANS LA REGULATION DE LA PRESSION OSMOTIQUE

L'étude des constituants chimiques de la phase matricielle de la paroi de *Gracilaria verrucosa* fait état de l'évolution des rapports quantitatifs et qualitatifs des différents composés en liaison avec la physiologie du développement de l'algue. Il s'agit de variations sur des cycles longs, alors que celles sur des alternances plus courtes n'ont pas encore été étudiées. Or, les espèces marines qui se développent dans la zone de balancement des marées, sont soumises à des contraintes du milieu extérieur très contrastées.

La présence de polyélectrolytes forts dans les parois est décrite chez les végétaux peuplant la zone intertidale. Ce sont des polysaccharides sulfurylés, non seulement chez les phéophycées (fucoïdanes), les chlorophycées (galacto-arabino-xylanes et galacto-xylo-rhamnanes), et les

TABLEAU 26

TAUX DE GONFLEMENTS DE  
POUDRES SECHES D'AGAR MISES  
EN SOLUTION DANS DES MILIEUX DE  
CONCENTRATIONS SALINES DIFFERENTES.

Milieu de gonflement	Eau distillée	Eau de Mer diluée (1/2)	Eau de Mer	1M NaCl	2M NaCl
Agar (DIFCO)	27.35	21.85 g	24.25 g	17.95 g	15.55 g
Agar de thalles en croissance	24.05	-	22.10 g	-	20.00 g
Agar de thalles en non prolifé- ration	24.20	-	22.30 g	-	21.00 g

a - exprimé en quantité d'eau retenue (g).

rhodophycées (porphyranes, carraghénanes), mais aussi chez les angiospermes marines *Zoostera* et *Posidonia* (pectines sulfurylées) MACKIE et PRESTON (1972).

L'agar des gigartinales échappe à cette règle. La répartition écophysiological de ces espèces, au niveau de cuvettes qui ne laissent que rarement émerger les thalles de *Gracilaire*, explique que l'ampleur des chocs osmotiques soit moins important que chez certaines espèces largement découvertes à marée basse. Néanmoins, une adaptation particulière doit permettre de répondre aux variations de salinité du milieu.

Des thalles de *Gracilaria*, préalablement cultivés, pendant un mois, en condition de croissance ou en phase stationnaire, ont été plongés 6 heures ou une semaine dans des milieux eau de mer plus ou moins concentrés en Na Cl. Ces deux périodes ont été choisies, la première parce qu'elle correspond à l'intervalle des marées, la seconde pour noter l'éventualité d'une adaptation à plus long terme.

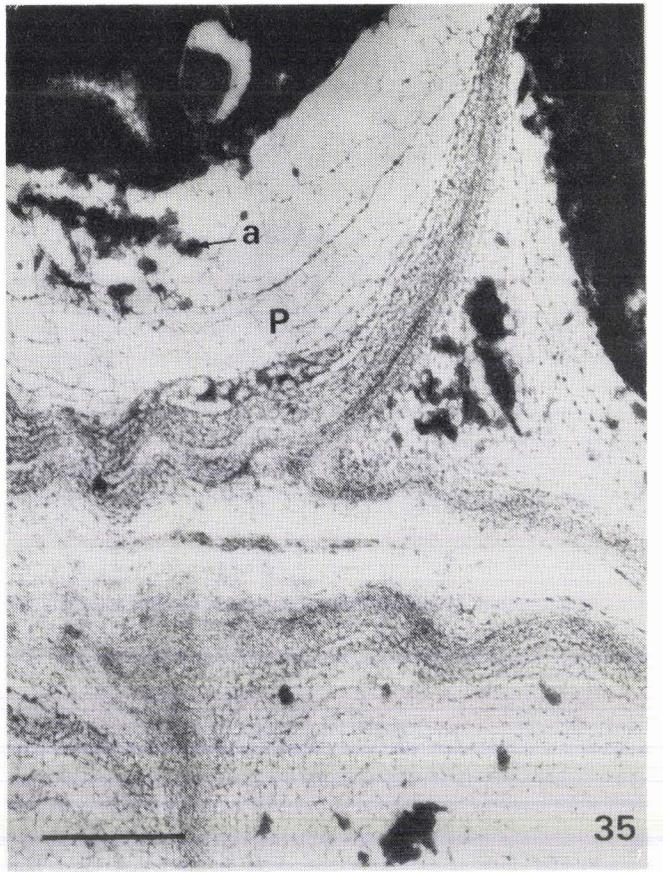
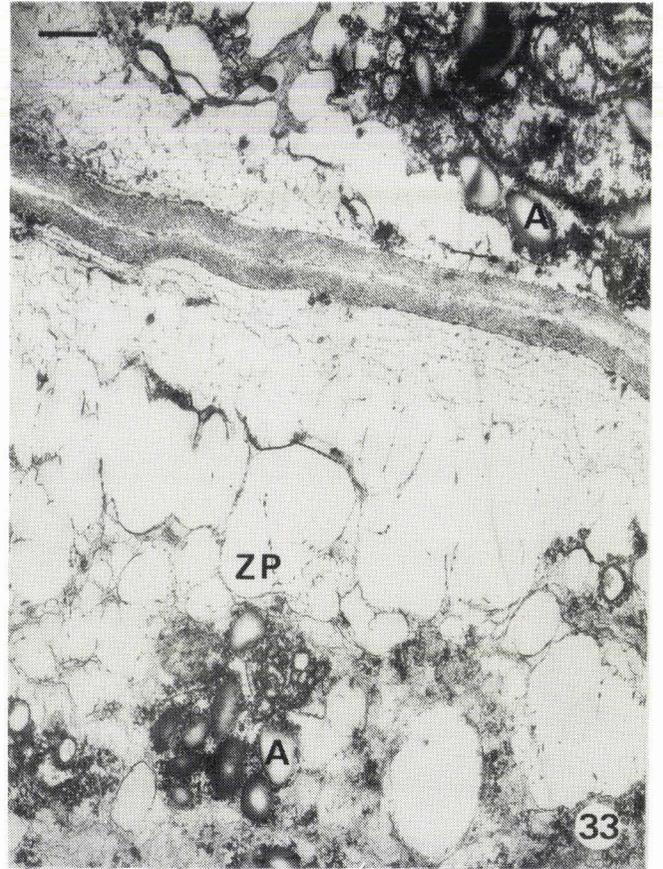
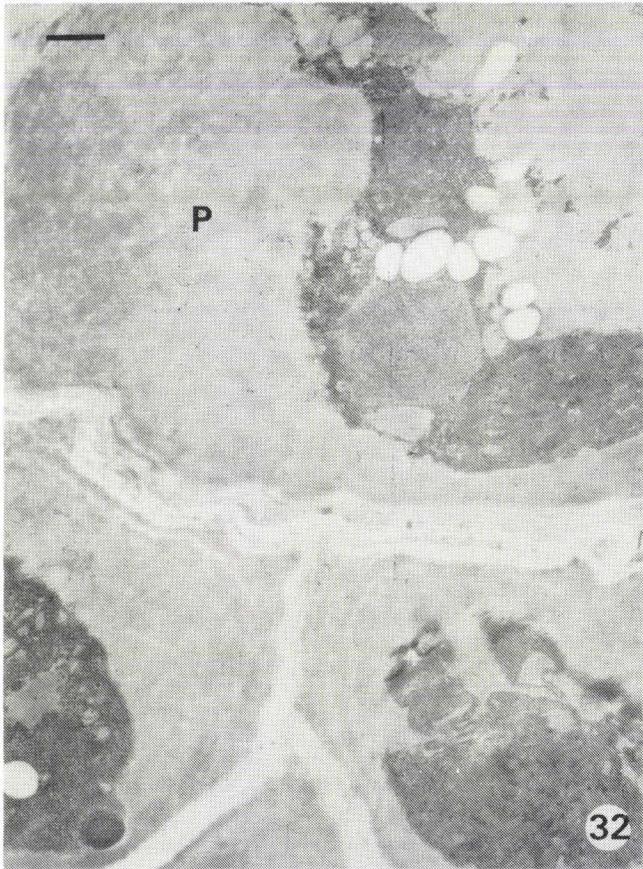
#### A - Suivi ultrastructural.

A régime de salinité égal, les séries cultivées en condition de croissance ne diffèrent pas de celles en phase de non-prolifération. De même, globalement, les courtes ou longues périodes de traitement ne permettent pas de distinguer de différences significatives.

Il semble donc que les propriétés des polysaccharides matriciels ne dépendent pas de façon absolue, pour leur adaptation aux variations de pression osmotique, de la constitution chimique qui caractérise l'état de développement de la paroi.

En outre, quel que soit le cas de figure observé, la cellule est toujours plus ou moins plasmolysée. Par contre, aucun espace périplasmique "vide" ne peut être décrit. En effet, indépendamment du sens dans lequel s'exerce la pression osmotique, ce sont toujours les colloïdes de la phase matricielle qui retiennent l'eau.

Ainsi, en milieu hypotonique (0,3M) par rapport à l'eau de mer, le cytoplasme est déjà plasmolysé (Pl.IX, Fig.32). La paroi, dans sa zone interne, semble combler le vide qui devrait entourer le plasmalemme. Quand le traitement est prolongé sur 6 jours, la paroi antérieurement formée



BU  
LILLE

PLANCHE IX

## PLANCHE IX - ACTION DE LA PRESSION OSMOTIQUE.

Fig. 32. - Concentration du milieu de culture en NaCl 0.3M, conditions de croissance, 6 heures de culture. On observe le gonflement de la partie interne de la paroi. Le cytoplasme comprimé prend un aspect plasmolysé. x 15000.

Fig. 33. - Mêmes conditions de culture que précédemment, 6 jours de culture.  
La zone interne de la paroi est fortement dilatée. On y remarque l'inclusion de fragments cytoplasmiques. La disposition des groupes de fibrilles lui confère un aspect alvéolaire. Le plasmalemma est discontinu et difficile à localiser en certains endroits, cet aspect traduisant le mauvais état physiologique du thalle. x 15000.

Fig. 34. - Concentration du milieu de culture en NaCl 2M, conditions de non prolifération, 6 heures de culture. La partie centrale des grains d'amidon a été hydrolysée et a disparue. x 40000.

Fig. 35. - Concentration du milieu de culture en NaCl 2M, conditions de croissance, 6 jours de culture. Rétention de fragments cytoplasmiques dans la matrice de la zone interne de la paroi. x 40000.

Fig. 32, 33 et 35 : Contrastant acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Fig. 34. - PATAg.

Abréviations : a, amas dense ; A, amidon ; cy, cytoplasme ; P, paroi ; ZP, zone périplasmique.

Echelle : 0.5  $\mu$ m.



présente une structure normale (Pl.IX, Fig.33). Par contre, la zone interne forme des alvéoles avec de longues travées cytoplasmiques. De nombreux amas denses y sont également inclus.

En milieu hypertonique, (1M, 2M), des fragments cytoplasmiques ainsi que des vésicules, sont prisonniers dans la paroi (Pl.IX, Fig.35). Quand la salinité augmente, l'amidon se dégrade, surtout dans les cellules médullaires (Pl.IX, Fig.34).

Dans toutes les conditions donc, même en milieux très dilués, les cellules ne sont jamais franchement turgescentes, au moins au sens où il est entendu chez les phanérogames. La limite de la paroi est toujours très floue. L'espace périplasmique paraît constitué d'agar à faible concentration dans l'eau, ce qui permet une dispersion homogène des fibrilles et une élasticité de la paroi.

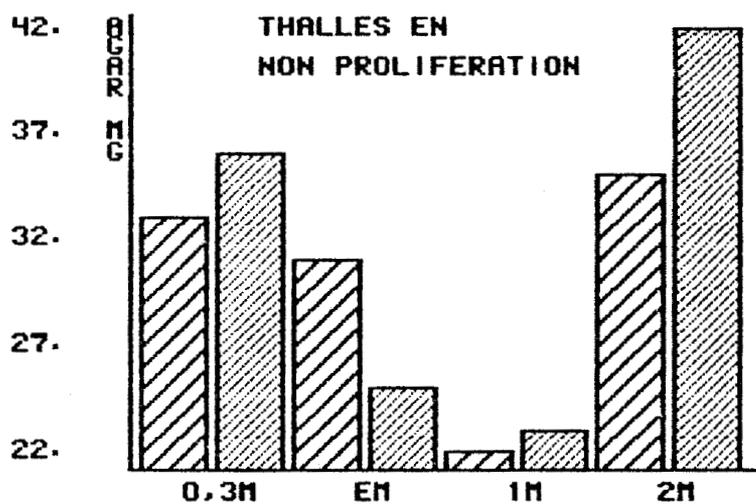
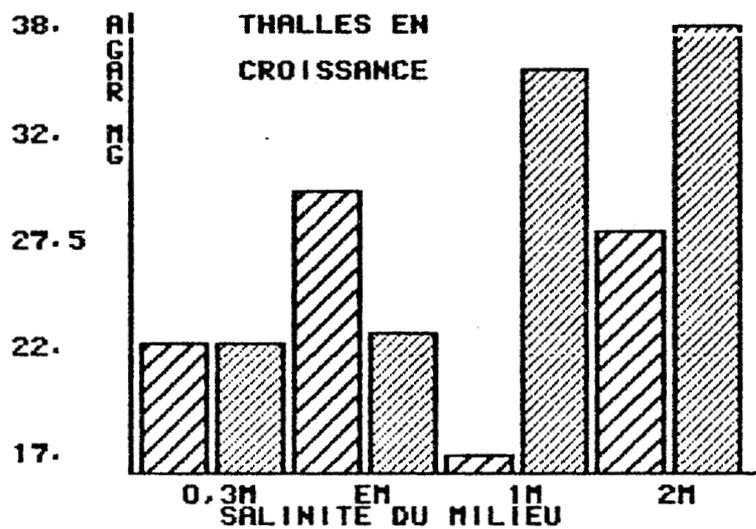
Cultivé dans l'eau de mer à concentration saline normale (30 à 35g/l), le cytoplasme a également toujours l'aspect plasmolysé. Le gonflement et l'accumulation d'eau dans la paroi, particulièrement dans la zone interne, compensent apparemment la turgescence constatée habituellement chez d'autres végétaux.

Les mouvements d'ampleur plus ou moins importante que subit alors la paroi, emprisonneraient des fragments de cytoplasme, responsables des figures observées.

L'agar par son caractère hydrophile jouerait donc un rôle tampon dans les régulations des flux hydriques responsables du rééquilibrage des pressions osmotiques. Le maintien d'une pression osmotique interne élevée pourrait assurer la régulation des flux ioniques en l'absence de composés polyélectrolytes échangeurs d'ions dans la paroi. L'hydrolyse des réserves carbonées en conditions extrêmes (2M) compenserait les débordements éventuels de la barrière physique que constituent les colloïdes de la matrice pariétale.

#### B - Influence sur les rendements d'extraction.

Peu d'informations sont tirées de l'analyse des rendements d'extraction d'agar des thalles cultivés en conditions de croissance ou de non prolifération et dans des milieux de forces osmotiques variées.(Fig.36).



▨ 6 HEURES

▩ 6 JOURS

BU  
LILLE

Fig. 36 : Rendements en agar de thalasses cultivés en conditions contrôlées, dans des milieux de concentrations salines différentes (0.3M en NaCl, Eau de Mer (EM), une fois et deux fois molaire en NaCl) après 6 heures et 6 jours de traitement.

Les différences dues aux facteurs de croissance sur la production d'agar sont semblables à celles déjà observées par ailleurs. (Fig.12). Néanmoins, il semble que les concentrations salines élevées (2M) augmentent les quantités de résidus secs extraits, et ce, d'autant plus que le temps d'application du traitement est plus long (6 jours). Or, l'hydrolyse de l'amidon, observé en microscopie libère du glucose qui surévalue les rendements obtenus dans ce cas. Apparemment, ce monosaccharide participe plus à l'élévation de la pression osmotique interne, pour compenser celle du milieu externe, qu'à une intégration au métabolisme de la phase matricielle de la paroi.

En conséquence, la réaction aux variations de pression osmotique des colloïdes pariétaux semble se limiter à une régulation des flux hydriques liée aux propriétés hydrophiles des polysaccharides. La qualité de ceux-ci n'affecte pas notablement le pouvoir hygroscopique de la paroi.

Cette étude montre donc que la paroi de *Gracilaria verrucosa* réagit aux variations de salinité du milieu, en piégeant l'eau au sein de la phase matricielle. En conséquence, les figures de plasmolyse observées en microscopie électronique, diffèrent de celles décrites chez les végétaux supérieurs où la contraction du cytoplasme ménage un "vide" entre la paroi squelettique et le plasmalemma. Chez cette algue, le "vide" est occupé par le mucilage gonflé d'eau. La zone interne de la paroi se comporte à la manière d'une éponge dont les alvéoles se gorgent d'eau, puis la restitue en conservant leur structure sous l'effet d'une pression externe.

La paroi constitue donc un compartiment qui fonctionne comme une chambre de compensation, en "éclusant" les variations de flux hydriques. L'image du milieu extérieur vu par le cytoplasme est par conséquent perçue à travers l'écran tamponné de la paroi.

## CONCLUSION.

Globalement les propriétés physico-chimiques de l'agar en solution sont compatibles avec les hypothèses formulées à propos du rôle de la matrice pariétale dans les phénomènes de pérennisation ou de croissance.

En effet, aux gels forts de la phase de non prolifération succèdent des solutions colloïdales dont la viscosité basse peut autoriser les

remaniements, les étirements et les coulissements des fibrilles squelettiques, lors de l'élongation cellulaire.

Le 3,6-anhydrogalactose, par la torsion de l'hétérocycle du pont 3,6, favorise l'aggrégation des hélices polysaccharidiques nécessaire à la formation du gel. (REES 1969). Le sulfate interfère par répulsion électrostatique et encombrement stérique sur l'association des chaînes. L'agarose neutre, riche en hydroxyls libres, offre de nombreuses possibilités de ponts hydrogènes interchaîne qui renforcent la cohésion du réseau. Ainsi la disparition du sulfate et l'apparition du pont 3,6 consécutive, combinent leurs effets pour augmenter la force de gel.

A l'inverse, les précurseurs de l'agarose, polymères de galactoses sulfatés, diminuent la force de gel et la viscosité. L'augmentation de la teneur en méthyls, sur la fraction neutre de l'agar, a pour conséquence de réduire le nombre de liaisons ponts-hydrogènes. Ce fait a pour conséquence de faire chuter la viscosité de la solution colloïdale.

Les échanges hydriques et ioniques subissent également les conséquences des changements qualitatifs et structuraux des polymères du gel. Le relâchement ou le ressèment du réseau matriciel favorise ou non les flux d'eau et de substances nutritives, un peu à la manière d'un tamis moléculaire.

Il est ainsi possible d'imaginer que l'épaississement de la paroi, du à l'accumulation d'agarose dans la phase matricielle augmente la réticulation du système et limite, de cette manière, l'accessibilité du cytoplasme aux solutions du milieu extérieur. La dispersion du réseau, encore à démontrer, favoriserait le phénomène inverse.

## **CONCLUSION**

L'idée qui a motivé cette recherche est de considérer l'agar, composé majeur de la phase matricielle de la paroi de *Gracilaria verrucosa*, comme un marqueur biochimique des états physiologiques du développement de cette algue marine.

Les variations quantitatives et qualitatives de ce colloïde extrait d'agarophytes diverses, dans la nature ou en culture intensive, justifie la vérification de cette hypothèse de travail. En effet, la fraction soluble de la matrice pariétale est en fait un mélange de macromolécules qui n'est pas parfaitement défini. La question est donc de savoir si l'ensemble des polymères constitutifs obéit aux mêmes fluctuations et, delà, si chacun de ces composés ne représente pas une étape de la biosynthèse de l'agar. En outre, les modifications qualitatives, dues à l'apparition ou à la disparition de certains substituants ont-elles des conséquences sur les propriétés physico-chimiques des molécules?

La cohérence des données expérimentales permet-elle alors de comprendre la physiologie de la paroi, à travers le comportement d'un de ses constituants majeurs, c'est à dire, les remarquables propriétés d'adaptation aux variations périodiques des conditions de l'environnement (à court terme comme à long terme) et de là justifier sa répartition écophysiologique?

Pour répondre à ces questions, la stratégie d'investigation consiste à contrôler successivement les paramètres de développement du thalle de *Gracilaria verrucosa* et de noter leurs incidences sur le colloïde par rapport à l'évolution biologique de l'échantillon.

Les conditions de culture des thalles sont ainsi sélectionnées par rapport à l'induction qu'elles donnent au métabolisme pariétal. L'influence de la température, de l'intensité lumineuse et de la photopériode sont mesurés. Parallèlement, un suivi ultrastructural du cytoplasme et de la paroi témoigne de l'évolution et de l'adaptation de la cellule dans son ensemble.

Le choix des techniques employées pour extraire l'agar est guidé par le souci de préserver l'intégrité du matériel et celui de récupérer l'ensemble des fractions, soit sur des thalles entiers, en fonction des types et de l'âge des tissus, soit à partir de parois isolées.

Il reste alors à séparer les différents constituants du mélange extrait et à les caractériser par des méthodes biochimiques adaptées. Puisque la composition des polymères varie depuis un galactane chargé jusqu'à l'agarose neutre, le fractionnement par échange d'ions se justifie. Cependant, l'hybridation possible des deux types de molécules dans un même polymère nécessite l'intervention de techniques plus discriminantes. La RMN permet cette reconnaissance, mais pour être performante la purification des espèces chimiques en mélange est indispensable.

Aucune méthodologie fiable ne permet l'analyse des caractéristiques physico-chimiques du colloïde "in vivo". L'analyse de ces propriétés effectuée en solution donne néanmoins des arguments à une interprétation modélisée du comportement des polysaccharides de la phase matricielle dans des conditions définies de milieu et d'état physiologique des cellules.

A partir de ces hypothèses de travail et avec l'aide de la stratégie méthodologique qui viennent d'être rappelées, il est possible d'établir une relation entre le contenu polysaccharidique de la phase extractible de la matrice pariétale et l'état de croissance ou non du thalle de *Gracilaria verrucosa*.

La mise en culture dans des conditions contrôlées permet de dégager le concept que les résultats acquis dans la nature figurent des instantanés d'un métabolisme permanent de la molécule d'agar, débutant par la biosynthèse de polymères chargés qui évoluent progressivement en agarose, considéré comme le produit terminal. Les conditions imposées se traduisent donc, à la fois sur la réponse physiologique de l'algue, en terme de croissance, et sur le métabolisme des composés pariétaux, ces deux aspects interférant constamment et conférant à l'algue son pouvoir d'adaptation.

La synthèse d'agar semble liée à la constitution de réserves carbonées qui interviennent pendant la période de croissance de l'algue. Cette phase de développement rapide de l'algue, conditionnée par les paramètres de culture, est suivie d'une phase de maturation caractérisée par l'accumulation d'agar, lors du retour à des conditions moins favorables à la croissance.

La phase matricielle de la paroi de *Gracilaria verrucosa* évolue donc de manière à favoriser l'expansion cellulaire, en déterminant des propriétés physico-chimiques propres à autoriser les réarrangements pariétaux. La qualité biochimique de l'agar extrait des parties jeunes du thalle (les

ramifications secondaires) plaide en faveur de cette interprétation. Inversement, la proportion croissante d'agar riche en 3,6-anhydrogalactose, va dans le sens d'un renforcement des propriétés mécaniques du gel, de manière à ce que l'espèce, ainsi protégée, se pérennise en attendant le retour de conditions favorables à la croissance.

En effet, l'abondance de polymères chargés affaiblit les propriétés mécaniques de la paroi (force de gel) et améliore la viscosité du système, propice à l'étirement des fibres squelettiques. De même, l'hydrophilie de la matrice augmente et favorise la formation d'un gradient hydrique dans le sens milieu-cellule, responsable de l'élévation du potentiel hydrique nécessaire à l'élongation cellulaire. L'incorporation des polysaccharides précurseurs de l'agarose compense l'accroissement des surfaces pariétales.

La transformation progressive du colloïde en agarose, conduit ultérieurement au renforcement de la paroi qui s'épaissit. En effet, le L-galactose se désulfate régulièrement et laisse la place à des quantités croissantes de 3,6-anhydrogalactose. Ce composé intervient sur la structure secondaire de la macromolécule en augmentant le pas de l'hélice en même temps que l'hydrophobie de l'ensemble. La cohérence entre les deux phases de la paroi se renforce et accentue la résistance du thalle.

De cette manière, toutes les conditions favorables à la croissance de l'algue (température, lumière, engrais) contribuent à augmenter les teneurs relatives en composés chargés. Corrélativement, les propriétés physiques du colloïde évoluent de manière à autoriser les réaménagements pariétaux consécutifs. Les différences entre parties jeunes en croissance (ramifications) et parties matures du thalle, déjà différenciées, s'expliquent de la même façon. La teneur en eau plus élevée des axes secondaires par rapport aux axes primaires est due à leur richesse en molécules chargées, particulièrement hydrophiles, nécessaires à l'élongation.

L'intervention du colloïde dans les échanges hydriques entre la cellule et le milieu extérieur est désormais un peu mieux comprise. Cette activité est essentiellement due aux propriétés hydrophiles remarquables de l'agar (taux de gonflement). Ce caractère fortement hygroscopique est sans doute à l'origine de l'adaptabilité de l'espèce à de fortes variations de concentration du milieu, et peut expliquer la valence écologique de l'espèce.

La rétention d'eau, importante dans la zone moyenne de la paroi, permet de créer un compartiment tampon, véritable écluse qui rééquilibre les niveaux d'eau entre la cellule et le milieu extérieur, contrariant les flux hydriques dus aux variations de pressions osmotiques.

Ainsi, quelle que soit la concentration du milieu extérieur, le cytoplasme paraît toujours en légère plasmolyse, tandis que la matrice pariétale se gonfle selon les caractéristiques des solutions en contact avec la cellule.

La structure du réseau de la matrice pariétale, plus ou moins serrée selon l'état physiologique du thalle, favorise le maintien de l'intégrité des tissus lors de la mauvaise saison grâce à un gel fort, ou l'étirement des fibres squelettiques en augmentant la fluidité du système lors de la croissance cellulaire.

Bien que les définitions se rapportant à l'agar aient beaucoup évolué depuis que les techniques d'investigations, notamment la RMN, ont modifié l'approche structurale de ce polysaccharide, seul l'agarose répond strictement à la polymérisation du dimère :  $\beta$ -3,6-anhydrogalactose-(1-3)- $\beta$ -D-galactose. Les autres composés qui apparaissent dans les extraits peuvent être attribués à ce que l'on appelle agar, mais leurs structures dépendront du mode d'extraction, de la qualité de celle-ci, de l'espèce agarophyte, de la période de l'analyse ou des conditions de culture de l'algue. Cela signifie que les résultats obtenus pour une espèce donnée à un moment donné, ne sont pas généralisables, non seulement aux autres espèces, mais également au sein de la même espèce. Ils sont différents selon la variété, le lieu et le moment de la récolte, l'âge et la nature des tissus dont l'agar est extrait.

Le métabolisme de l'agar est donc en étroite relation avec la physiologie du développement du thalle. Une variabilité "phénotypique" ou "génotypique" peut apparaître à travers le type de colloïde présent dans la paroi cellulaire, en ce sens que, suivant la nature des substituants de la molécule et le devenir métabolique de celle-ci, les thalles peuvent s'adapter aux conditions écophysologiques qui caractérisent le lieu de leur prolifération. Ainsi, l'étendue de la diversité morphologique de *Gracilaria verrucosa* peut être le reflet de son adaptation aux phénomènes mécaniques, en opposant aux contraintes du milieu une souplesse ou une rigidité du thalle due, en grande partie, à la nature chimique des

polysaccharides pariétaux de la phase matricielle, et aux propriétés physiques qui en découlent.

Ces réflexions conduisent à reconsidérer la famille de composés extraits des algues agarophytes et à proposer, à l'instar des carraghénanes, un terme générique pour désigner l'agar. La nomenclature scientifique justifie l'emploi d'agarane pour dénommer les macromolécules constituées de la succession de D et L-galactose. Des classes de produits pourraient alors être définies, selon la substitution en résidu sulfate, pyruvate ou méthyl, voire certaines ramifications de la chaîne de galactane.

Ainsi, la molécule d'agar, selon le degré et le type de substitution qui la caractérise au moment de son extraction, peut être considérée non seulement comme un marqueur de l'état physiologique de l'algue et/ou de l'activité pariétale mais également comme un élément de classification taxonomique.

Cette étude a donc permis d'associer l'hétérogénéité de l'agar à une suite biosynthétique. Il convient maintenant de préciser la chronologie et le sens de ce métabolisme. Pour cela, l'imagerie moléculaire qui marque les étapes physiologique du développement du thalle doit être précisée. Il est donc nécessaire d'améliorer les techniques d'investigations biochimiques. Des méthodes spectroscopiques telles que l'infrarouge de diffusion à transformée de FOURRIER ou le RAMAN laser, alliée à la RMN, sont susceptibles, après des premiers essais prometteurs, d'offrir de nouvelles résolutions des structures polysaccharidiques.

L'appréhension des voies de synthèse de l'agar nécessite, dans un premier temps, de vérifier la dépendance vis à vis de l'amidon et de la photosynthèse. Si la présence de réserve carbonée est nécessaire pour qu'il y ait synthèse de colloïde dans la paroi, l'amidon pourrait être le premier précurseur de l'agar. La convergence de vésicules à contenu polysaccharidique au contact des grains d'amidon vers la paroi, plaide en faveur de cette hypothèse. Il devrait donc être possible d'identifier dans le cytoplasme des polymères qui, après transformation dans la paroi sont à l'origine de l'agarose, dont les activités enzymatiques restent à définir.

Les protoplastes de *Gracilaria Verrucosa*, mis au point au laboratoire, offrent à cette étude un matériel de choix pour décrire les premiers événements de la reconstitution de la paroi.

La recherche d'enzymes agarolytiques entreprise par ailleurs, constitue autant d'outils d'investigation pour repérer de telles molécules *in situ*, par marquages spécifiques en microscopie électronique.

Les propriétés physico-chimiques n'ont été qu'abordées dans cette recherche et méritent d'être approfondies. En particulier, les mécanismes de régulation ionique doivent être précisés. Il est évident que l'agarose constitue un modèle extrême, fonctionnant vraisemblablement comme un tamis moléculaire, et que le mélange de polymères interfère sûrement sur les échanges cellule-milieu.

Il reste enfin que l'initialisation de la croissance cellulaire, à l'instar des "oligosaccharines" d'ALBERSHEIM (1985), peut être due également à des oligomères intégrés dans la molécule d'agar sous forme d'hybrides, au sens où l'entend BELLION *et al.* (1983) et libérés à des moments privilégiés de la vie de la paroi de manière à véhiculer une information spécifique jusqu'au génome de la cellule.

Le fait de disposer d'une suspension cellulaire ouvre des possibilités d'investigations susceptibles de répondre aux questions qui viennent d'être formulées. Le contrôle de la biosynthèse de l'agarose dans un système biotechnologique de production de colloïde gélifiant, est, de plus, l'un des termes qui conditionne le succès de cette entreprise.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT I.A., 1980.- Seasonal population Biology of some carrageenophytes and agarophytes.  
**Pacific Seaweed Aquaculture** : 45-53.
- AGARDH J.G., 1852.- Species, genera et ordines algarum.  
II (2) : 702
- AKATSUKA I. and K. IWAMOTO, 1979.- Histochemical localization of agar and cellulose in the tissue of *Gelidium pacificum* (Gelidiaceae, Rhodophyta).  
**Bot. Mar.**, 22 : 367-370.
- ALBERSHEIM and DARVILL, 1985.- Les Oligosaccharines.  
**Pour la Science**, 97 : 18-26.
- ARAKI C., 1937.- Acetylation of agar-like substance of *Gelidium amansii*.  
**J. Chem. Soc. Jpn.**, 58, 1338-1350.
- ARAKI C., 1956.- Structure of the agarose constituent of agar-agar.  
**J. Chem. Soc. Jap.**, 29 : 543-544.
- ARAKI C., 1958.- Seaweed polysaccharides.  
**Proc. Int. Congr. Biochem. 4th Congr. Symp.**, 1 : 1-16.
- ARAKI C., 1966.- Some recent studies on polysaccharides of agarophytes.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.**, 5 : 3-19.
- ARAKI C. and K. ARAI, 1956.- Studies on the chemical constitution of agar-agar. Isolation of a new crystalline disaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar.  
**Bull. chem. Soc. Jap.**, 29 : 339.
- ARAKI C. and K. ARAI, 1957.- Studies on the chemical constitution of Agar-agar. XX. Isolation of a tetrasaccharide by enzymatic hydrolysis of Agar-agar.  
**Bull. Chem. Soc. Jap.**, 30 (3) : 287-293.
- ARAKI C., ARAI K. and S. HIRASE, 1967.- Studies on the chemical Constitution of agar-agar. XXIII Isolation of D. xylose, 6-0 the D galactose, 4-0-methyl L galactose and 0-M. pentose.  
**Bull. chem. Soc. Jap.**, 40 : 959-962.
- ARAKI C., HIRASE S. and T. ITO, 1958.- Chemical constituents of the mucilage of *Gloiopeltis furcata*.  
**Abstr 3rd Int. Seaw. Symp. Galway Ireland.** : 81-82.
- ARCHIBALD P.J., FENN M.D. and A.B. ROY, 1981.- <sup>13</sup>C-NMR studies of D-glucose and D-galactose monosulphates.  
**Carbohydr. Res.**, 93 : 117-190.
- ARNOTT S., FULMER A., SCOTT W.E., DEA I.C.M., MOORHOUSE R. and D.A. REES, 1974.- The agarose double helix and its function in agarose gel structure.  
**J. Mol. Biol.**, 90 : 269-284.

- ARNOTT S., SCOTT W.E., REES D.A. and C.G.A. McNAB, 1974.-  
i-Carrageenan : Molecular structure and packing of polysaccharide double  
helices in oriented fibres of divalents cation salts.  
**J. Mol. Biol.**, 90 : 253-267.
- ASARE, S.O., 1979.- Nitrogen relations in selected macroalgae from Camp  
Varnum and Ninigret Pond in Rhode Island.  
**Ph.D. Thesis. University of Rhode Island.** 175pp.
- ASARE S.O., 1980.- Seasonal changes in Sulphate and 3,6 anhydrogalactose  
content of phycocolloides from two Red Algae.  
**Bot. Mar.**, 23 (9) : 595-598.
- BELLION C. G. BRIGAND J.-C. PROME, D. WELTI and S. BOCIEK., 1983.-  
Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des  
carraghénanes par spectroscopie de R.M.N.-13C.  
**Carbohydr. Res.** 119:31-48
- BELLION. C. G.K. HAMER and W. YAPHE, 1981.- Analysis of k-i-hybrid  
carrageenans with k-carrageenase and C-NMR.  
**Proc. Int. Seaw. Symp.** 10 : pp. 379-384.
- BELLION C. G. K. HAMER and YAPHE W., 1982.- The degradation of  
Eucheuma spinosum and Eucheuma cottonii carrageenane by i-carrageenases  
and k-carrageenases from marine bacteria.  
**Can. J. Microbiol.** 28:874-880.
- BHATTACHARJEE. S.S., W. YAPHE and G.K. HAMER., 1979.- Study of  
agar and carrageenan by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.** 9:379-385. Science Press, Princeton. NJ.
- BIRD C., 1975.- Culture and field studies on the growth and reproduction  
of GRACILARIA sp. on the maritimes.**Thesis.**
- BIRD N., D. GRUND et J. Mc LACHLAN, 1977.- Studies on Gracilaria. 5. In  
vitro life history of Gracilaria sp. from the Maritime Provinces.  
**Can. J. Bot.** 55 (10) : 1282-1290
- BIRD, N.L., L.C.-M. Chen and J. Mc LACHLAN, 1979.- Effects of  
temperature, light and salinity on growth in culture of Chondrus crispus,  
Furcellaria lumbricalis, Gracilaria tikvahiae (Gigartinales, Rhodophyta),  
and Fucus serratus (Fucales, Phaeophyta).  
**Bot. Mar.** 22 : 521-527
- BIRD, K.T., M.D. HANISAK and J. RYTHER, 1981.- Chemical quality and  
production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different  
nitrogen enrichment conditions.  
**Bot. Mar.** 24 : 441-444.
- BIRD, C.J. and J. McLACHLAN, 1982.- Some underutilized taxonomic  
criteria in *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales).  
**Bot. Mar.** 25 : 595-598.
- BISALPTRA T., RUSANOWSKI P.C. and W.S. WALKER, 1967.- Surface  
activity, cell wall and fine structure of pit connection in red alga *Laurencia*  
*spectabilis*.  
**J. Ultrastruct. Res.**, 20 : 277-289.

- BLACK W.A.P., BLAKEMORE W.R., COLOUHOUN J.A. and E.T. DEWAR., 1965.- The evaluation of some red marine algae as a source of carrageenan and of its K. and L. components.  
**J. Sci. Food. Agric.**, 16: 573-585.
- BODARD M. and D. CHRISTIAEN., 1978.- Essais d'extraction et d'analyses biochimiques d'agar-agar à partir de GRACILARIA VERRUCOSA (Huds) PapenFuss.  
**Bull. Soc. Phyc. Fr.**, 23: 11-17.
- BODARD M. and D. CHRISTIAEN., 1978.- Culture, exploitation et biochimie des algues rouges fournisseurs d'agar-agar et carraghenanes.  
**Rapport DGRST 76 70 274** : 1-48.
- BODARD M., CHRISTIAEN D. and T. FOUCHER., 1981.- Culture, exploitation et biochimie des algues rouges fournisseurs d'agar-agar et carraghenanes.  
**Rapport DGRST 76 70 274 (2)** :68.
- BODARD M., CHRISTIAEN D. and VERDUS M.C., 1984.- Mise au point sur les phycocolloïdes.  
**Bull. Soc. Bot. N. Fr.**, 36 (1-2) : 1-14.
- BODEAU-BELLION. C., 1983- Analisis of carrageenan structure.  
**Physiol. Vég.** 21:785-793.
- BOOTH E., 1953.- Seaweed as a fertilizer.  
**Organic gardening.**, 21 (6) : 14-17.
- BOROWITZKA M.A., 1978.- Plastid development and floridean starch grain formation during carposporogenesis in the Coralline red alga *Lithotrix aspergillum* Gray.  
**Protoplasma**, 95 :217-228.
- BRASCH. D. J., H. M. CHANG, C. T. CHUAH and L. D. MELTON., 1981a.- The galactan sulfate from the edible, red alga *Porphyra columbina*.  
**Carbohydr. Res.** 97:113-125.
- BRASH D.J., CHUAH C.T. and L.D. MELTON, 1981b.- A <sup>13</sup>C-NMR study of some agar related from new Zealand seaweeds.  
**Austral. J. Chem.**, 34 :1095-1105.
- BRASH D.J., CHUAH C.T. and L.D. MELTON, 1983.- The agar-type polysaccharide from the red alga *Gracilaria secundata*.  
**Carbohydr. Res.**, 115: 191-198.
- CAUSEY N.B., PRYTHERCH J.P., McCACKILL J., HUMM H.J. and F.A. WOLF, 1946.- Influence of environmental factors upon the growth of *Gracilaria confervoïdes*.  
**Bull. Duck. Univ. Mar. Stn.**, 3: 19-24.
- CHAPMAN A.R.O. and J.S. CRAIGIE, 1977.- Seasonal growth in *Laminaria longicruris* : relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen.  
**Mar. Biol.**, 40 : 107-205.
- CHOU K.C., 1973.- The studies of the extraction of agar from *Gracilaria*.  
**J. Fish. Soc. Taiwan**, 2 : 40-43.

CHRISTIAEN D., 1981.- Etude biochimique de l'agar-agar de *Gracilaria verrucosa* (Gracilariacées Gigantinales). Facteurs biologiques et physicochimiques influençant sa qualité et sa production industrielle. Thèse 3ème cycle USTL., 103.

CHRISTIAEN D. et M. BODARD, 1983.- Spectroscopie infrarouge de films d'agar de *Gracilaria verrucosa*.  
**Bot. Mar.** 26 : 425-427.

CONOVER, J.T., 1958.- Seasonal growth of benthic marine plants as related to environmental factors in an estuary.  
**Contrib. Mar. Sci.** 5:97-147

COTTLER, M.H., 1971.- Plasmalemmal extensions in *Chondrus Crispus*.(L.) Stackh.  
**J. Ultrastruct. Res.**, 37:31-36

CRAIGIE, J.S. and C. LEIGH, 1978.- Carrageenans and agars.  
In : Handbook of Phycological Methods. Eds HELLEBUST J.A. and CRAIGIE J.S., 110-131, Cambridge University Press, 512 p.

CRAIGIE J.S. and K.F. WONG, 1978.- Carrageenan biosynthesis.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.** 9 : 369-377.

CRAIGIE and ZONG C., WEN, 1984.- Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (RHODOPHYCEAE).  
**Can. J. Bot.**, 62:1665-1670

CRAIGIE, J.S., WEN, Z.C. and VAN DER MEER, J.P., 1984.- Interspecific, Intraspecific and Nutritionally-Determined Variations in the Composition of Agars from *Gracilaria verrucosa* spp.  
**Bot. Mar.**, 27 : 55-61

CRONSHAW, J., PRESTON, R.D., 1958.- A reexamination of the fine structure of the walls of vesicles of the green alga *Valonia*.  
**Proc. Roy. Soc.**, B148, 137-148

DAWES C.J., SCOTT F.M. and E. BOWLER, 1961.- Light and electron microscopic survey of algal cell-walls. I. Pheophyta and Rhodophyta.  
**Ann. J. Bot.**, 48 : 925-933.

DEBOER J.A., 1979.- Effects of nitrogen enrichment on Growth rate and phycocolloid content in *Gracilaria foliifera* and *Neogardhiella baileyi*.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.**, 9 : 263-273.

DEBOER J.A., 1982.- Environmental control of phycocolloid content in red algae.  
**1st Phycological Congress.** St John's.

DEBOER J.A. and J.H. RYTHER, 1977.- Potential yields from a waste recycling algal mariculture system. in "The marine Plant ... A potential Ec. Resource" : 1-24.

DEBOER J.A., GUIGLI H.S., THOMAS I. and C.F. D'ELIA, 1978.- Nutritional studies of two red algae. I. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration.  
**J. Phycol.**, 14 : 261-266

- DEBOER J.A., LAPOINTE B.E. and C.F. D'ELIA, 1980  
Effects of nitrogen concentration on growth rate and carrageenan production in *Neogardhiela baileyi*  
Marine polyculture based on Natural food and recycled wastes, ed. RYTHER
- DELOACH W.S., WILTON O.C., McCASKILL J., HUMM H.J. and F.A. WOLF, 1946.-*Gracilaria confervoides* as a source of agar.  
**Duke. Mar. Lab. Bull.**, 3 : 25-30
- DEMARTY M., MORVAN C., THELLIER M., 1978.- Exchange properties of isolated cell walls of *Lemna minor*.  
**L. Plant. Physiol.**, 62:477-481
- DIEP MINH TAM and P. EDWARDS, 1982.- Seaweeds of economic importance in Thailand. Part 2 : Analysis of agar from *Gracilaria*.  
**Bot. Mar.**, 25 : 459-465.
- DONATI V., 1750.- Storia naturale marina dell'Adriatico.  
Venezia
- DISCHES, Z., 1962.- Color reactions of carbohydrates.  
**In Methods on Carbohydrate Chemistry**. 1 : 477-514.
- DUBOIS, M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH, 1956.- Colorimetric method for determination of sugars and related substances.  
**Anal. Chem.** 28:350-356
- DUCKWORTH M. and W.YAPHE, 1971.- Preparation of agarose by fractionation from the spectrum of polysaccharides in agar.  
**Anal. Biochem.**, 44 : 636-641.
- DUCKWORTH M. and W.YAPHE, 1971.- The structure of agar. Part 1. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides.  
**Carbohydr. Res.**, 16 : 189-197.
- DUCWORTH M. and W. YAPHE, 1971.- The structure of agar. II: The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar.  
**Carbohydr. Res.**, 16:435-445.
- DUCKWORTH M., HONG K.C. and W. YAPHE, 1971.- The agar polysaccharides of *Gracilaria* sp.  
**Carbohydr. Res.**, 18: 1-9.
- DURAIRATNAM M. and N. de Q. SANTOS, 1981.- Agar from *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Gracilaria sjoestedii* Kylin from Northeast Brasil.  
**10th Int. Seaweeds Symp.** : 669-674.
- EDELSTEIN T., BIRD C.J. and J. McLACHLAN, 1976.- Studies on *Gracilaria* : II: Growth under Greenhouse conditions.  
**Can. J. Bot.**, 54,19 : 2275-2290.
- ESAU C., 1965.- Plant anatomy.  
Ed. WILEY and Sons. 2<sup>eme</sup> ed. New York.

- ESQUERRE TUGAYE MT., MAXAU D., 1974.- Effect of a fungal disease on extension of the plant cell wall glycoprotein.  
**J. Exp. Bot.**, 25:509-513
- FORBES I. A. and PERCIVAL, E.G.V., 1939.  
**J. Chem. Soc.** : p. 1844
- FREI E. and R.D. PRESTON, 1961.- Variance in the structural polysaccharides of algal cell walls.  
**Nature (London)**, 196 : 130-134.
- FREI, E., PRESTON, R.D., 1964a.- Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell-walls. I. Xylan in siphonous green algae.  
**Proc. Roy. Soc.**, B, 160, 293-313
- FREI E. and R.D. PRESTON, 1974.- Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. II. Association of oxylen and mannan in *Porphyra umbilicalis*.  
**Proc. Roy. Soc. Lond.**, ser. B, 160 :314-327.
- FULLER S.W., 1971.- Some factors affecting the concentration and properties of carrageenan in *Chondrus crispus* stackhouse.  
**Ph. D. Thesis.** Univ. of New Hampshire, U.S.A.
- GAGNE J.A., MANN K.H. and A.R.O. CHAPMAN, 1982.- Storage patterns on growth on storage in *Laminaria longicruris* in relation to differing patterns of availability of nitrogen in the water.  
**Mar. Biol.**, 69 : 91-101.
- GEHU J.M., 1964.- L'algalogie marine dans le Nord de la France.  
**Bull. Soc. Bot. Fr.**, 90e sess. extr., p. 368
- GLACON R., 1977.- Communication personnelle.
- GORDON K.H., BHATTACHARJEE S. and W. YAPHE, 1977.- Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy.  
**Carbohydr. Res.**, 54 : C7-C10.
- GORDON-MILLS E.M. and E.L. McCANDLESS, 1977.- Carrageenans in the cell walls of *Chondrus crispus* Stock (Rhodophyceae, Gigartinales). II. Birefringence.  
**Phycologia**, 16 (2) :169.
- GRETZ M.R., SOMMERFELD M.R. and J.M. ARONSON, 1982.- Cell wall composition of the generic phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta).  
**Bot. Mar.**, 25:529-535.
- GREVILLE R.K., 1830.- Flora Edinensis.  
Edinburgh, p. 121
- GUISELEY K.B., 1970.- The relationship between methoxyl content and gelling temperatures of agarose.  
**Carbohydr. Res.**, 13 : 247-250.
- HAMER G.K., BHATTACHARGEE S.S. and W. YAPHE, 1977.- Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy.  
**Carbohydr. Res.**, 54 : C7-10.

- HANIC L.A. and J.S. CRAIGIE, 1969.- Studies on the algal cuticle.  
**J. Phycol.**, 5: 89-102.
- HANISAK M.D., 1982.- The nitrogen status of *Gracilaria tikvahiae* in natural and mariculture systems as determined by tissue analysis.  
**1st Phycol. Congress.** St John's.
- HIRASE S., 1957.- Pyruvic acid as a constituent of agar.  
**J. Chem. Soc. Jap.**, 63 : 68-78.
- HIRASE S. et C. ARAKI, 1961.- Isolation of 6-O-Me-D-galactose from the agar of *Ceramium boydenii*  
**Bull. Chem. Soc. Jap.**, 34 : 1048.
- HIRASE S., ARAKI C. and T. ITO, 1958.- Isolation of agarobiose derivative from the mucilage of *Glocopeltis furcata*.  
**Bull. Chem. Soc. Jap.**, 31 : 428-431.
- HOFFMAN, W.E., 1978.- Photosynthetic rhythms and primary production of two Florida benthic red algal species, *Bostrychia binderi* Harvey (Ceramiales) and *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Gigartinales).  
**M.A. Thesis.** University of South Florida, Tampa. 57pp.
- HONDA. S. H. YUKI and K.TAKIURA, 1973.- Fourier-transform <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectra of D-glucose 3-and 6-sulfates.  
**Carbohydr. Res.** 28:150-153.
- HONG K.C., GOLDSTEIN M.E. and W. YAPHE, 1969.- A chemical and enzymic analysis of the polysaccharides from *Gracilaria*.  
**Proc. 6th Int. Seaweed Symp.**, Madrid :473-482.
- HOYLE M.D., 1978a.- Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapasteuris* "Gmelin" Silva, and *G.coronipifolia* J. Ag.) from Hawaii. I: Yield and gel strength in the gametophyte and tetrasporophyte generations.  
**Bot. Mar.**, 21 : 343-347.
- HOYLE M.D., 1978b.- Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapasteuris* "Gmelin" Silva, and *G.coronipifolia* J. Ag.) from Hawaii.II: Seasonal aspects.  
**Bot. Mar.**, 2 : 347-352.
- HOYLE M.D., 1978c.- Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii.  
**J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 35 :273-283.
- HUMM H.J., 1951.- The seaweed resources of North Carolina.  
in TAYLOR ed. Survey of marine fisheries of North Carolina: 231-250.
- HUDSON G., 1762.- Flora anglica.  
**London Ed.**, 1 : 470-474.
- IZUMI K., 1970.- A new method for fractionation of agar.  
**Agr. Biol. Chem. Jap.**, 34:1739-1740.
- IZUMI K., 1972.- Chemical heterogeneity of the agar from *Gracilaria verrucosa*.  
**J. Biochem. Jap.**, 72 (1):135-140.

- JOHN, D.M. and S.O. ASARE, 1975.- A preliminary study of the variations in yield and properties of phycocolloids from Ghanaian seaweeds.  
**Mar. Biol.** 30:325-330
- JOSELAU J.P. and G. ULMANN, 1984.- Biochemical studies of the site of gum formation in *Acacia Senegal*.  
**3rd Cell Wall Meeting (Poster)**, Fribourg : 48.
- KAUSS H., 1976.- Osmotic regulation in Algae.  
**Progression Phytochemistry**, 5 : 1-29.
- KIM D.H., 1970.- Economically important seaweeds, in Chile. \_I) *Gracilaria*.  
**Bot. Mar.**, 13 : 140-162.
- KIM D.H. and P. HENRIQUES, 1977.- Agar-agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa*. I: Yields and gel strengths.  
**J. Phycol.** (suppl.) : 13-35.
- KIM D.H. and N.P. HENRIQUEZ, 1978.- Yields and gel strength of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae).  
**Proc. IXth Int. Seaweed Symp.**, 9: 257-262.
- KIM, D.H. and N.P. HENRIQUEZ, 1979.- Yields and gel strengths of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa* (Florideophyceae).  
**Proc. Int. Seaweed Symp.** 9:257-262
- KIM, C.S. and H.J. HUMM, 1965.- The red alga *Gracilaria foliifera*, with special reference to the cell wall polysaccharides.  
**Bull. Mar. Sci.** 15:1036-1050
- KLING R., 1978.- Recherches des conditions optimales de croissance de *Gracilaria verrucosa* (Huds) Papenfuss. Gigartinales, Gracilariacées).  
**Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle.** LILLE.
- KLOAERG B., 1984.- Composition chimique et propriétés d'échange des parois cellulaires des algues brunes.  
**Thèse de Docteur es-Sci. nat.**, 252 p., U.S.T. de Bretagne occidentale.
- KLOAERG B., 1984.- Isolation and analysis of cell walls of the brown marine algae *Pelvetia canaliculata* and *Ascophyllum nodosum*.  
**Physiol. Vég.**, 22 (1) :1-10.
- LAHAYE M., ROCHAS C. and YAPHE W., 1986.- A New Procedure for Determining the Heterogeneity of Agar Polymers in the Cell Walls of *GRACILARIA* spp (GRACILARIACEAE, RHODOPHYTA).  
**Can., J., Bot.**, sous press.
- LAMOUREUX J.V., 1813.- Essai sur les genres de la famille des Thalassiphytes non articulés.  
**Muséum**, Paris, 20
- LAPOINTE B.E., 1981.- The effects of light and nitrogen on growth, pigment content and biochemical composition of *Gracilaria foliiferavar. Angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta).  
**J. of Phycol.**, 17 : 90-95.

- LAPOINTE B.E. and J.H. RYTHER, 1979.- The effects of nitrogen and sea water flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliiferavar. Angustissima* in mass out door cultures.  
**Bot. Mar.**, 22 : 529-537.
- LAPOINTE B.E., WILLIAMS L.D. OLDMAN J.C. and J.H. RYTHER, 1976.- The mass outdoor culture of macroscopic marine algae.  
**Aquaculture**, 8 : 9-21.
- LAPOINTE, B.E. and K.R. TENORE, 1981.- Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. I. Interaction of biochemical composition.  
**J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 53 : 135-152
- LAYCOCK, M.V. and CRAIGIE, J.S., 1977.- The occurrence and seasonal variation of gigartinine and L-citrullinyl-L-arginine in *Chondrus crispus* Stackh.  
**Can. J. Biochem.** 55:27-30
- LAYCOCK, M.V., MORGAN, K.C. and CRAIGIE, J.S., 1981.- Physiological factors affecting the accumulation of L-citrullinyl-L-arginine in *Chondrus crispus*.  
**Can. J. Bot.** 59:522-527
- †LESTANG de G. et M. QUILLET, 1974.- Comportement du fucoïdane sulfurylé de *Pelvetia caniculata*(Dcne et Thur) vis à vis des cations de la mer : propriétés d'échanges, renouvellement des radicaux, coenzyme d'activation des sulfates. Intérêt fonctionnel.  
**Physiol. veg.**, 12 (2) : 199-227.
- LICHTLE C., 1974.- Etude ultrastructurale de la paroi du *Polysiphonia elongata* (Harv.) rhodophysée, floridée, à l'aide d'actions ménagées d'enzymes.  
**J. Microscopie Biol. Cell.**, 23 :93-104.
- LINDSAY, J.G. and R.G. SAUNDERS, 1979.- Experiments with *Gracilaria* in a floating algal culture system.  
**Fish. Develop. Rep.** No. 17. Mar. res. Branch, Ministry of Environ. 40pp
- LINDSAY, J.G. and R.G. SAUNDERS, 1980.- Evaluation of enclosed floating culture of *Gracilaria*.  
**Fish. Develop. Rep.** No. 27. Mar. Res. Branch, Ministry of Environ. 42pp
- LINNE C.V., 1763.- *Species plantarum*.  
Stockolm éd. 2, t. 2, p. 1629
- LIU, C.-Y., C.-Y. WANG and S.-S. YANG, 1981.- Seasonal variation of the chlorophyll contents of *Gracilaria* cultivated in Taiwan.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.** 10:455-460
- MACKIE M. and PRESTON R.D., 1974.- Cell wall and intercellular region polysaccharides. in : *Algal physiology and biochemistry*. ed. STEWARD W.D.P., Blackwell Sc. Publ. Oxford. p. 40-85
- Mc BRIDE D.L. et K. COLE, 1971.- Electron microscopic observations on the differenciation and release of monospores in the marine red alga *Smithora naiadum*  
**Phycologia**, 10 : 49-61

- Mc BRIDE D.L. et K. COLE, 1972.- Ultrastructural observations on germinating monospores in *Smithora naiadum* (Rhodophyceae, Bangiophycidae)  
**Phycologia**, 11 : 181-191.
- MARSHALL S.M., NEWTON L. and A.P. ORR, 1949.- A study of certain British seaweed and their utilisation in the preparation of agar.  
**London H.M.S.O.**
- MATSUHASHI, T., 1977.- Acid pretreatment of agarophytes provides improvement in agar extraction  
**J. Food Sci.** 42:1396-1400
- MATSUHASHI, T. and K. HAYASHI, 1972.- Agar processed from *Gracilaria foliifera* of Florida.  
**Agric. Biol. Chem.** 36:1543-1552
- MATSUKA T., 1977.- Acid pretreatment of agarophytes provides improvement in agar extraction  
**J. Food Sci.**, 42 (5) :1396-1399.
- Mc CANDLESS E.L., 1981.- Biological control of carrageenan structure: effect conferred by the phase of life cycle of the carrageenophytes.  
**Proc. 8th Int. Seaweed Symp.**, Bangor:1-18.
- Mc CANDLESS E.L., OKADA W.T., LOTT I.N.A., WOLLMER C.M. and E.M. GORDON MILLS, 1977.- Structural studies of *Chondrus crispus* : the effect of extraction of carrageenan.  
**Can. J. Bot.**, 55 : 2053-2064.
- Mc CANDLESS, E.L., J.S. CRAIGIE and J.A. WALTER, 1973.- Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*.  
**Planta**, 112 : 201-212
- Mc CANDLESS, E.L., J.S. CRAIGIE and J.E. HANSEN, 1975.- Carrageenans of gametangial and tetrasporangial stages of *Iridaea cordata* (Gigartinaceae).  
**Can. J. Bot.**, 53 : 2315-2318
- Mc CANDLESS, E.L., OKADA, W.T., LOTT, J.N.A., VOLLMER, C.M., GORDON, MILLS, E.M., 1977.- Structural studies of *Chondrus crispus* : the effect of extration of carrageenan.  
**Can. J. Bot.**, 55, 2053-2064
- Mc CANDLESS, E.L., RICHTER, S.M., 1972.- Studies of carrageenan synthesis.  
**Proc. Int. Seaweed. Symp.**, 7, 477-484
- MILLER. I. J. and R. H. FURNEAUX, 1982.- Agars from New Zealand red algae in the family Gelidiaceae : a structural study.  
**New Zealand J. Sci.** 25 : 15-18.
- MOLLION J., 1977.- Recherches sur les Carraghenanes et leur extraction : Variations saisonnières du Carragheenana de *Hypnea*.  
**Thèse de 3ème cycle** , LILLE.

- MONTREUIL J. and G. SPIK, 1963.- Microdosage des glucides. Monographie n°1.  
Méthodes colorimétriques des glucides totaux, Lille: 1-131.
- MORRICE L.M., Mc LEAN M.W., LONG W.F. and F.B. WILLIAMSON, 1983.- Porphyran primary structure. An investigation using B-Agarase I from *Pseudomonas atlantica* and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy.  
*Eur. J. Biochem.*, 133 :673-684.
- MORVAN C., 1977.- Etude de quelques propriétés physicochimiques de la paroi chez *Lemna minor*.  
Thèse de 3ème cycle. Université de Rouen, France.
- MORVAN H., 1982.- Libération de polymères pectiques acides au cours de la croissance de la suspension cellulaire de silène.  
*Physiol. Veg.*, 20 (4) : 671-678.
- MSHIGENI, K.E., 1977.- On the ultrastructure of the cell wall and pit plugs of *Chondrococcus hornemannii* (Rhodophytes, Cryptomonales).  
*Bot. marina*, 20, 345-346
- MUTTUTAMBY D.T. and NEUSON de QUEIROZ SANTOS, 1981.- Agar from *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Gracilaria sjoestedtii* Kylin from Northeast Brasil.  
10th Int. Seaweeds Symp., p. 6690-674
- MYERS A., PRESTON R.D. and G.W. RIPLEY, 1956.- Fine structure in the red algae. I - X-ray and electron microscope investigation in *Griffithsia flocculosa*.  
*Proc. Roy. Soc. Lond.*, ser. B., Biol. Sci., 144 : 450.
- MYERS, A., PRESTON, R.D., 1959a.- Fine structure in the red algae. II. The structure of the cell wall of *Rhodymenia palmata*.  
*Proc. Roy. Soc. B*, 150, 447-456
- MYERS, A., PRESTON, R.D., 1959b.- Fine structure in the red algae. III. A general survey of cell-wall structure in the red algae.  
*Proc. Roy. Soc. B*, 150, 456-459
- NAYLOR G.L. and B. RUSSEL-WELLS, 1934.- On the presence of cellulose and its distribution in the cell-walls of brown and red algae.  
*Ann. Bot.*, 48 (191) :635-641.
- NEISH A.C. and P.F. SHACKLOK, 1971.- Greenhouse experiments on the propagation of strain T4 of Irish Moss.  
Tech report Nat. Res. Coun. Can., 14 :1-25.
- NELSON S.G., YANG S.S., WANG G.Y. and Y.M. CHIANG, 1983.- Yield and quality of agar from species of *Gracilaria* (Rhodophyta) collected from Taiwan and Micronesia.  
*Bot. Mar.*, 26 : 361-366.
- NICOLAISEN F.M., I. MEYLAND and K. SCHAUMBURG, 1980a.-  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra at 67.9 MHz of aqueous solutions of agarose and partly 6-O-methylated agarose at 90°C.  
*Acta Chem. Scand.* B34:103-107.

- NORTHCOTE, D.H., 1972.- Chemistry of the plan cell wall.  
**Ann. Rev. Plant. Physiol.**, 23, 113-132
- NORTON T.A., MATHIESON A.C. and M. NEUSHUL, 1982.- A review of some aspects of form and function in Seaweeds.  
**Bot. Mar.**, 25 : 501-510.
- OZA R.M., 1978.- Studies on Indian *Gracilaria*. IV: Seasonal variation in agar and gel strength of *Gracilaria corticata* J. Ag. occuring on the coast of Veraval.  
**Bot. Mar. Allem.**, 21 (3) : 165-167.
- PAPENFUSS G.F., 1950.- Review of genera of algae described by stackhouse.  
**Hydrobiol, Acta Limn et Protist**, 2 (3) :195-203.
- PATWARY M.U. and J.P. VAN DER MEER, 1983.- Growth experiments on morphological mutants of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae).  
**Can. J. Bot.**, 61 (6) : 1654-1659.
- PAYEN M., 1859.- Sur la gélose et les nids de Salagane.  
**C.R. Acad. Sci.**, 49: 521-530.
- PENNIMAN C.A., 1977.- Seasonal chemical and reproductive changes in *Gracilaria foliifera* (Forssk) Borg from Great Bay, New Hampshire.  
**J. Phycol.**, 13 (suppl.) : 53.
- PENNIMAN C.A., 1983.- Ecology of *Gracilaria Tikvahiae* Mc Lachlan (gigartinales, Rhodophyta) in the great bay estuary, New Hampshire.  
**Thèse, Biol.**, Univ. of Maine at Orono, USA.
- PERCIVAL E., 1970.- Algal polysaccharides.  
The carbohydrates : chem. and biochem. Ed PIGMAN HORTON & HEZRP :537-568
- PERCIVAL E.G.V., 1944.- Esterical sulfate content of agar specimens.  
**Nature**, 154 : 673-674.
- PERLIN. A.S. and G.K. HAMER, 1979.- Characterization of carbohydrate polymers by carbon-13 NMR spectroscopy.  
**Carbon-13 NMR in polymer sci.** ACS Symp. Ser. 103 pp 123-141.
- PICKMERE S.E., PARSONS M.J. and R.W. BAILEY, 1973.- Composition of GIGARTINA carrageenan in relation to sporophyte and gametophyte states of the life cycle.  
**Phytochemistry**, 12 :2441-2444.
- PIRIE N.W., 1936.- The preparation of hepta-acetyl-D-L-Galactose by acetolysis of agar.  
**Biochem. J.**, 30 :369-373.
- PRESTON R.D., 1968.- Plants without cellulose.  
**Scient. Am.**, 218 (6) : 102-108.
- QUILLET M. and G. de LESTANG, 1972.- Sur les radicaux "sulfuryl" des mucilages des algues marines.  
**Bull. Soc. Sci. Anjou, N.S.**, 8 : 55-66.

- RAMA RAO, K. and V. KRISHNAMURTHY, 1978.- Studies on Indian Hypneaceae I. Seasonal variation in phycolloid content in two species of *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyceae).  
**Bot. Mar.** 21:257-259
- REES D.A., 1965.- Carbohydrate sulfates.  
**Am. Rep. Prog. Chem.**; Chem. Soc. London, 62 : 469-487.
- REES D.A., 1969.- Conformational analysis of polysaccharides.II: Alternating copolymers of the agar-carrageenan chondroitin type by model building in the computer with calculation of the helical parameters.  
**J. Chem. Soc.**, B: 217-226.
- REES, D.A. and E. CONWAY, 1962.- The structure and the biosynthesis of porphyran : a comparison of some samples.  
**Biochem. J.**, 84, 411-416
- REIS D., 1984.- Assembly changes induced in cell wall following on osmotic shock.  
**3th Cell Wall Meeting** : 75, Fribourg.
- RIGNEY J.A., 1971.- Chemical investigation of *Chondrus crispus*.  
**Progr. Rep.** 39, Indust. Dev. Branch Dept. Fish and Forestry. Ohawa, CANADA
- RIMINGTON C., 1931.- The carbohydrate complex of the serum proteins. II: Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of Glucosaminodimannox from protein of ox blood.  
**Biochem. J.**, 25: 1062.
- ROCHAS C., RINAUDO M. and M. VINCENDON, 1983.- Spectroscopy characterization and conformation of oligo kappa carrageenans.  
**Int. J. Biol. Macromol.**, 5: 111-115.
- ROSENBERG G. and J. RAMUS, 1982.- Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae) : Photosynthesis and antenna composition.  
**Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 8: 233-241
- ROSENBERG G. and RAMUS S., 1982.- Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae) : soluble nitrogen and reserve carbohydrates.  
**Mar. Biol.**, 66 : 251-259.
- ROSS A.G., 1953.- Some typical analysis of red seaweeds.  
**J. Sci. Food Agric.**, 4 : 333-335.
- SELBY H.H. and T.A. SELBY, 1959.- Industrial Gums.  
**Acad. Press.** New York and London, 2: 15-49.
- SHASHKOV A.S.A.I. USOV and S.V. YAROTSKY, 1977.- Carbon-13 NMR spectra of methyl 3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galactopyranoside and its methyl ethers.  
**Bioorgan. Khim.** 3:46-49 (in Russ.).

- SHASHKOV, A.S.A.I. USOV and S.V. YAROTSKY, 1978a.- Polysaccharides of algae. XXIV. Application of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy for structural analysis of polysaccharides of the agar group.  
**Biorgan. Khim.** 4:74-81 (in Russ.).
- SHASHKOV, A.S.A.I., USOV. S.V. YAROTSKY and A.B. RABOVSKY, 1978b.- Synthesis and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of mono- and dimethyl ethers of methyl  $\alpha$ -D-galactopyranoside.  
**Biorgan. Khim.** 4:1489-1494.
- SPURR A.R., 1969.- A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.  
**J. Ultrastruct. Res.**, 26 : 31-43.
- STADLER T., 1984.- Physiologie de la production d'agar dans les parois de *Gracilaria verrucosa*.  
Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle. LILLE
- TAGAWA S. and Y. KOJIMA, 1972.- The alkali-treatment of the mucilage of *Gracilaria verrucosa*.  
**Proc. Int. Seaweed Symp**, 7: 447-450.
- TAGAWA S., KOJIMA Y. and T. OGATA, 1963.- Chemical studies on agar preparation from imported agar seaweeds.  
II: On the agar prepared from *Gracilaria verrucosa* harvested in Chile.  
**J. Shimonoseki Univ. Fish.**, 13 (1): 13-21.
- TERHO T.T. and K. HARTIALA, 1971.- Method for determination of the sulfate content of Glycosaminoglycans.  
**Anal. Biochem.**, 41: 471-476.
- THIERY J.P., 1967.- Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.  
**J. Microsc.**, 6 : 987-1018
- TILLSMANS J. and K. PHILIPPI, 1929.- The carbohydrate content of the important proteins of foodstuff and a colorimetric procedure or the determination of nitrogen free sugar in protein.  
**Biochem.**, 215 :36-60.
- TRIPODI G. et F. de MASI, 1975.- Cytological localization of polysaccharidic molecules in some red algae.  
**J. Submicro. Cytol.**, 7 : 197-209.
- TSUCHIYA Y. and K.C. HONG, 1966.- Agarose and agaropectine in *Gelidium* and *Gracilaria* agar.  
**Tohoku J. Agric. Res.** : 16-141.
- UMAMAHESWARA RAO M., 1969.- Agar and algin-yielding seaweeds of India.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.**, 6: 715-721.

USOV A.I., IVANOVA E.G. and A.S. SHASHKOV, 1983.- Polysaccharides of algae. XXXIII: Isolation and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds.  
**Bot. Mar.**, 26: 285-294.

USOV, A.I. and S. V. YAROTSKY, 1977.- Synthesis of methyl 3-O-methyl- and 3,6-di-O-methyl- -D-galactopyranosides.  
**Bioorgan. Khim.** 3 : 746-751 (in Russ).

USOV A.I., YAROTSKY S.V. and A.S. SHASHKOV, 1980.-  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of red algal galactans.  
**Biopolymers**, 19: 977-990.

USOV, A.I., V. V. BARBAKADZE S.V. YAROTSKY and A.S. SHASHKOV, 1978a.- Polysaccharides of algae. XXVIII. Application of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy for structural studies of galactan from the red seaweed *Grateloupia divaricata* Okam.  
**Bioorgan. Khim.** 4:1507-1512 (in Russ).

VERDUS M.C., CHRISTIAEN D, STADLER T., MORVAN H., 1986.- Etude ultrastructurale et cytochimique de la paroi cellulaire chez *Gracilaria Verrucosa* (rhodophyceae)  
**Can. J. Bot.** (sous presse).

VILLARROEL. I., H. and A.B. ZANLUNGO, 1981.- Structural studies on the porphyran from *Porphyra columbina* (Montagne).  
**Carbohydr. Res.**, 88 : 139-145.

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

WHYTE J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1976.- Propagation in tanks and chemical composition of the marine alga *Gracilaria* sp. Fisheries and Marine Service, Technical Report n° 623 :1-31.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1979a.- Agar elaborated by *Gracilaria* sp. from the coast of British Columbia.  
Part I. Properties of agars isolated from algae collected at Bamfield Inlet, Wiseman's Bay and Nuttal Bay.  
**Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 860.** 16pp

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1979b.- Agar elaborated by *Gracilaria* sp. from the coast of British Columbia.  
Part II. Variations in agar quality with season and reproductive condition of the alga from Haines Island.  
**Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 864.** 23pp.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1979c.- Chemical composition of natural and cultured *Gracilaria* sp. (Florideo-phyceae).  
**Proc. Int. Seaweed Symp.** 9 : 437-443

WHYTE J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1980.- Chemical composition and quality of agars in the morphotypes of *Gracilaria* from British Columbia.  
**Bot. Mar.**, 23: 277-283.

- WHYTE J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1981a.- The agar component of the red seaweed *Gelidium purpurascens*.  
**Phytochem.**, 20: 237-240.
- WHYTE J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1981b.- Agar from an intertidal population of *Gracilaria* sp.  
**10th Int. Seaweed Symp.** Berlin New-York : 537-542.
- WHYTE J.N.C., ENGLAR J.R., SAUNDERS R.G. and J.C. LINDSAY, 1981.- Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria verrucosa* type.  
**Bot. Mar.**, 24: 493-501
- YANG S.S., WANG C.Y. and WANG H.H., 1981.- Seasonal variation of agar-agar produced in Taiwan area.  
**Int. Seaweed Symp.**, 10 : 737-742;
- YANG, S.-S., 1982.- Seasonal variation of the quality of agar-agar produced in Taiwan.  
pp. 65-80 in R.T. Tsuda and Y.-M. Chiang, eds. Proc. Rep. of China-U.S. Utilization of Economic Algae. Univ. Guam Mar. Lab., Guam.
- YAPHE W., 1957.- The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae).  
**Can. J. Microbiol.**, 3: 987-997.
- YAPHE W., 1960.- Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in Marine algal polysaccharides.  
**Anal. Chem.**, 32 (10) :1327.
- YAPHE W. and M. DUCKWORTH, 1972.- The relationship between structures and biological properties of Agars.  
**Proc. 7th Int. Seaweed Symp** : 15-22.
- YAROTSKY, S.V., A.S. SHASHKOV and A.I. USOV, 1977.- Analysis of <sup>13</sup>C-NMR spectra of some red seaweed galactans.  
**Bioorgan. Khim.** 3 : 1135-1137 (in Russ).
- YOUNG E.G., 1966.- The chemical nature of the insoluble residu after severe extraction in some Rhodophyceae and Phaeophyceae.  
**Proc. Int. Seaweed Symp.** 5 : 337-346.
- YOUNG, K.S., 1974.- An investigation of agar from *Gracilaria*. sp.  
**Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.** No. 454. 18pp
- YOUNG D.N., 1980.- Unusual cell wall ultrastructure in ANTITHAMNION (Rhodophyta).  
**Br. Phycol. J.**, 15 : 119-124.
- ZIMMERMAN V., 1978.- Physics of turgor and osmoregulation.  
**Ann. Rev. Plant. Physiol.**, 29 : 121-148.

