Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 78 (1968)

Artikel: Sensibilité au sulfanilamide de quelques algues vertes cultivées dans des conditions de carboautotrophie et de carbohétérotrophie

Autor: Schopfer, J.-F.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-54872

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Sensibilité au sulfanilamide de quelques algues vertes cultivées dans des conditions de carboautotrophie et de carbohétérotrophie

Par *J.-F. Schopfer*

(Institut de Botanique générale de l'Université de Genève)

Manuscrit reçu le 15 septembre 1967

Table des matières

I. Introduction
II. Matériel et méthodes
III. Croissance et développement des algues en milieu autotrophique pur, hétérotrophique pur et mixte
IV. Les cultures d'algues en présence de sulfanilamide
1. Les effets de la sulfanilamide sur les êtres vivants
2. Revue des travaux effectués sur les effets des sulfamidés sur les algues
3. La photosynthèse des algues en présence de sulfanilamide
4. Essai fait en vue de lever l'inhibition due à la sulfanilamide, par adjonction d'acides aminés et de bases puriques et pyrimidiques
5. Recherches sur le mode d'action de la sulfanilamide sur la «croissance» et le «développement» des algues
V. Conclusions
Bibliographie

I. Introduction

De très nombreuses études sur le comportement des algues ont été conduites avec ou sans sucre à la lumière du jour. Seul le régime autotrophique à la lumière artificielle constante présente en fait une simplicité de conditions recommandables.

L'addition de sucre, par contre, crée une complexité de conditions simultanées qui se prêtent mal à une analyse détaillée des processus métaboliques.

Nous avons cherché à établir plus de rigueur dans l'étude de la croissance en adoptan- des conditions plus simples qui ont d'ailleurs donné des résultats inattendus. Il apparaît toutefois qu'une rigueur satisfaisante ne pourra être obtenue qu'à la condit tion de cultiver les algues dans un milieu de valeur nutritive la plus constante possible.

Nous avons d'autre part greffé sur ces recherches métaboliques une étude de toxicologie concernant l'action du sulfanilamide sur le développement et la croissance de certaines algues. Cytostasique pour certaines espèces, cet antimétabolite est au contraire synergique pour d'autres espèces.

II. Matériel et méthodes

1. Les algues vertes unicellulaires

Nous avons étudié plusieurs espèces d'algues provenant toutes de l'algothèque de l'Institut de Botanique générale de Genève. Ce sont des cultures pures et certaines sont même des clones. Nous les citons dans leur ordre numérique, conformément au catalogue de cet institut:

N° 3 *Scenedesmus obtusiusculus* Chod.
N° 50 *Stichococcus diplosphaera* (Bialos.) Chod. (= *Diplosphaera Chodati* Bialos.)
N° 116 *Oocystis Naegeli* A. Br.
N° 172 *Pleurococcus*
N° 280 *Dictyococcus cinnabarinus* (Kol et F. Chod.) Vischer
N° 516 *Oocystis* sp. (Nomenclature selon Robert Chodat)
N° 574 *Chlorella rubescens* Chod.
N° 579 *Chlorella rubescens* Chod.

Le choix de ces algues a été fait pour des raisons à la fois pratiques et biologiques. Du point de vue pratique, nos méthodes de culture exigent des algues à développement pélagique, c'est-à-dire dont les individus ne se collent pas à la surface des flacons de culture au cours de leur développement; du point de vue biologique, ces espèces constituent un échantillonnage assez large de l'ordre des Chlorophycées. Elles se répartissent en espèces du type sensible et du type résistant aux sulfamidés et présentent chacune des types de développement physiologique assez différents.

Algue N° 3: *Scenedesmus obtusiusculus Chod.* Algues vivant par groupes de deux ou quatre cellules.

Algue N° 50: *Stichococcus diplosphaera* (Bialos.) Chod. (=*Diplosphaera Chodati* Bialos.) C'est une pleurococcacée (ordre des Ulotrichales), isolée en 1911 par Robert Chodat (Bialosuknia, 1909). Organisme fort plastique, sa division en une seule direction de l'espace le rapproche des Stichococcus, alors que la persistance des cellules filles en paquets de deux fait penser plutôt à des Chlorelles. Son comportement physiologique a déjà fait l'objet de travaux antérieurs (Chodat et Uehlinger, 1955; Uehlinger et Chodat, 1955).

Algue N° 116: *Oocystis Naegeli* A. Br. Espèce d'Oocystacée (ordre des Chlorococcales) de forme ellipsoïde, assez voisine des Chlorelles. Se reproduit par autospores, formées dans une cellule mère, en général au nombre de huit.

Algue N° 172: *Pleurococcus*. Pleurococcacée (ordre des Ulotrichales) isolée à partir d'un lichen. Cette espèce assez peu étudiée n'est pas d'une vigueur très marquée.

Algue N° 280: *Dictyococcus cinnabarinus* (Kol et F. Chod.) Vischer. Genre de Protococcacée isolée par F. Chodat du sol du Parc national suisse (Kol et Chodat, 1934). Cette algue a la propriété de former, en assez forte abondance, des caroténoïdes qui masquent rapidement la chlorophylle (Haag, 1942; Wenzinger, 1940).

Algue N° 516: *Oocystis* sp. Espèce indéterminée du genre Oocystis (ordre des Chlorococcales) utilisée à la place de l'algue N° 116 à cause de son pouvoir de multiplication plus élevé.

Algues N°s 574 et 579: *Chlorella rubescens* Chod. Il s'agit là de deux clones isolés à partir de l'algue N° 24 par triage monosporé, dont l'un est plus fortement carotinogène (579) que l'autre (574). C'est une Chlorellacée (ordre des Chlorococcales) de taille assez grande (Chodat, 1942), dont le chloroplaste est muni d'un pyrénoïde bien visible.

2. *Milieux de culture*

Nous avons choisi comme milieu de base pour la fourniture des éléments minéraux plastiques le Detmer liquide dilué au tiers (Detmer/3) dont la composition est la suivante (Pringsheim, 1951):

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	1 g
KCl	0,25 g
$MgSO_4$	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
Fe_2Cl_6	0,5 mg
H_2O distillée	ad 3 l

C'est un milieu relativement pauvre en éléments minéraux, si on le compare aux milieux proposés par les auteurs américains et japonais (Iwamura et al., 1955; Nihei et al., 1954; Emerson et Lewis, 1939) pour les cultures accélérées d'algues (Moyse et Yvon, 1956; Krauss, 1953). Nous l'avons choisi précisément à cause de ces faibles teneurs en éléments minéraux qui placent les algues dans une situation physiologique plus proche des conditions naturelles. Il est bien connu en effet qu'une trop grande abondance d'éléments azotés par rapport à la nutrition carbonée peut produire certains déséquilibres trophiques qui modifient profondément les propriétés physiologiques des espèces. Le milieu Detmer/3 maintient les cultures dans tous les cas au-dessous des seuils de saturation. Pour cette même raison, l'aération se fait par de l'air ambiant, sans adjonction de CO_2 (Chodat et Uehlinger, 1955).

Dans certaines expériences, nous avons ajouté un apport hétérotrophique de carbone sous forme de glucose à 2%.

La sulfanilamide introduite dans les milieux de culture pour en étudier les effets physiologiques l'a toujours été à raison de 0,1%.

Le tableau suivant exprime en mg/l et en méq/l les quantités de chacun des éléments fournis:

Tableau 1

Elément	En mg/l	Fourni sous forme de	En méq/l
N	39,6	NO^-_3	2,82
P	19,0	PO^{---}_4	0,204
S	22,1	SO^{--}_4	0,345
Mg	16,8	Mg^{++}	0,345
Fe	0,0565	Fe^{+++}	0,00034
K	67,6	K^+	1,73
Ca	56,5	Ca^{++}	0,706
Cl	39,8	Cl^-	1,12

3. *Méthodes de culture*

Nous avons utilisé pour nos cultures les trois types de méthodes mises au point à l'Institut de Botanique générale de Genève (Chodat et Bocquet, 1955; Chodat et al., 1960):

a) Cultures en flacons Erlenmeyer de 100 ml, contenant 50 ml de milieu. Les flacons sont stérilisés 30 min à l'autoclave à 110 °C, puis inoculés au moyen de 1 ml d'inoculum et placés sur une table en verre dans une chambre climatisée (20 °C; humidité 75 %). Les flacons sont éclairés par en dessous au moyen de tubes fluorescents «Philips lumière blanche du jour» ou Ateliers de Constructions électriques de Charleroi «ACEC type Phytor» (*Bouillenne*, 1960). Les flacons sont agités à la main chaque matin; il n'y a pas d'aération.

b) Cultures en tubes de 26 mm de diamètre, contenant 60 ml de milieu. La culture est aérée par une tubulure pénétrant jusqu'au fond du tube. Les bulles qui s'en échappent (2 bulles par seconde) agitent la culture tout en l'aérant. Ces tubes sont placés également en chambre climatisée à 22 °C et sont éclairés latéralement par des tubes fluorescents du même type que ci-dessus.

c) Cultures en phycogènes (Chodat et Uehlinger, 1955; Chodat et Bocquet, 1955), c'est-à-dire en ballons de 3 l, contenant 1,8 l de milieu, avec agitation du liquide au moyen d'une baguette de verre à palettes entraînée par un petit moteur (120 t/min), et aération par de l'air ambiant filtré à raison de 200 ml/min.

   L'aération est fournie par un compresseur lubrifié à l'eau, pour éviter toute formation de gouttelettes d'huile à machines pouvant venir modifier les conditions des expériences.

   Les phycogènes sont munis d'un dispositif de prélèvement stérile des algues, dispositif empêchant tout retour en arrière du liquide prélevé et par conséquent tout risque d'infection ou de modification du milieu de culture.

   Les ballons sont placés sur un banc ad hoc et éclairés par en dessous au moyen de tubes fluorescents «Philips lumière du jour», le tout fonctionnant en chambre climatisée à 22 °C ± 0°,2. Rappelons – fait bien connu – que l'éclairement fourni par un tube fluorescent n'a pas la même valeur tout le long du tube. Les différences en lux peuvent dépasser 20 à 30 %. Pour en tenir compte, les flacons sont permutés périodiquement de telle sorte que les éclairements moyens soient identiques pour tous les flacons.

4. *Les méthodes de mesure et d'analyse*

a) Mesure de la densité cellulaire des cultures par comptage des cellules à l'hémacytomètre (Uehlinger et Linder, 1955)

Cette méthode statistique donne le nombre de cellules par millimètre cube de culture. La précision de ces mesures est de ± 3 %.

b) Mesure du volume cellulaire frais des cultures («packed cell volume»; Tamiya et al., 1953)

La méthode consiste à centrifuger une partie aliquote du prélèvement dans un tube terminé par un capillaire de 1 mm de diamètre et 3 cm environ de longueur. Après centrifugation, les algues sont réunies en un culot au fond du capillaire. Le volume de ce culot a été déterminé à priori par calibrage au mercure, ce qui nous donne une formule reliant la hauteur du culot au volume des algues qu'il contient. Précision de la méthode: ± 7 à 8 %.

c) Mesure du poids sec des cultures

La méthode est celle des chimistes: une partie aliquote du prélèvement est filtrée sur un filtre en verre fritté de Jena (1 – G – 5. M) dont le diamètre des pores ne dépasse pas 1,5 micron. Après rinçage à l'eau distillée le filtre est séché à 105 °C pendant une nuit et son poids sec déterminé à la balance analytique à 0,1 mg près.

d) Mesure des dimensions des cellules

Pour la plupart des prélèvements a été faite une microphotographie au microscope optique Leitz équipé d'une chambre microphotographique Wild. Le grossissement linéaire du dispositif complet (objectif – oculaire – chambre photographique) est déterminé à priori (763 X). Les dimensions linéaires des cellules sont mesurées sur les tirages positifs de ces photographies (compte tenu d'un éventuel agrandissement). On en déduit le volume de la cellule, en admettant pour celle-ci une forme d'ellipsoïde de révolution:

$$V = 4/3\ \pi\ a^2 \cdot b$$

(a et b étant respectivement le petit et le grand axe de l'ellipsoïde, mesurés sur la photographie).

Les photographies procurent en même temps des documents permanents sur l'état physiologique des cellules dans la culture.

e) Mesure du pH des milieux de culture

Cette mesure se fait classiquement au moyen d'un pH-mètre Metrohm avec électrode en verre du type X.

f) Dosage de l'azote organique

L'azote organique est dosé par la méthode du microkjeldahl: une partie aliquote (25 cm^3) du prélèvement est mise à minéraliser dans un matras de 100 ml avec 5 gouttes de SO_4Cu à 20% et 5 gouttes de SO_4K_2 sat. comme catalyseurs, en milieu fortement acidifié par l'acide sulfurique conc. L'ammoniac formé est ensuite distillé en présence d'un excès de soude caustique et recueilli dans une fiole contenant exactement 10 ml HCl N/100. On contretitre l'acide chlorhydrique restant par NaOH N/100 en présence de rouge de méthyle.

La précision de la méthode a été déterminée à $\pm$ 2% par calcul statistique.

g) Dosage de l'azote minéral (nitrique NO_3^- et nitreux NO_2^-)

Au début de nos recherches, nous avions dosé les nitrates du milieu par la méthode colorimétrique de Lemoigne, Monguillon et Desveaux (1937), modifiée par Haag (Chodat et Olivet, 1940; Haag et Dalphin, 1943). Basée sur la réduction des nitrates par le zinc en un mélange de nitrite et d'hydroxylamine, suivie d'une oxydation de l'hydroxylamine en nitrite par l'iode, avec dosage colorimétrique des nitrites par la réaction de Griess, cette méthode s'est révélée peu précise dans nos expériences: un écart type de 8% sur une série de 5 mesures est beaucoup trop élevé pour ce genre de

Tableau 2

Essai N°	1	2	3	4	5	Moyenne
Solution	Detmer/3	Detmer/3	Detmer/3	Detmer/3	Detmer/3	
Densité optique par la méthode de Haag	51,0	58,5	48,5	53,0	50,0	**52,5**
Avec adjonction simultanément dans le milieu Detmer/3 de 135 mg/l de méthionine et de 145 mg/l de cystéine, les résultats sont les suivants:						
Densité optique par la méthode de Haag	38,5	24,8	27,0	29,7		**30,0**

mesures. D'autre part, l'adjonction de certains acides aminés soufrés (cystine et méthionine en particulier) interfère avec la réaction colorimétrique en diminuant la densité optique finale de 40% (pour les concentrations en acides aminés utilisées dans nos expériences). Tableau 2.

C'est pourquoi nous avons adopté par la suite la méthode de dosage du micro-devarda, consistant à réduire les nitrates en ammoniac en présence de l'alliage de Devarda en milieu alcalin (NaOH). L'ammoniac est distillé dans une fiole contenant une quantité déterminée de HCl N/100; l'acide restant après fixation de tout le NH_3 distillé est contretitré volumétriquement, par la soude caustique NaOH N/100.

Méthode très précise (écart type de moins de 1%) à condition de travailler sur une quantité suffisante de milieu Detmer/3 (au moins 20 à 25 ml correspondant à 6 à 8 mg de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$).

h) Extraction et dosage des chlorophylles *a* et *b*

25 ou 50 ml de la culture (selon sa densité cellulaire) sont centrifugés 15 min à 4000 tours (soit environ 3200 g); le liquide surnageant est décanté par aspiration; le culot d'algues est repris par très peu d'acétone dans un mortier avec une pointe de couteau de $CaCO_3$ pour empêcher les hydrolyses acides. Les algues sont broyées consciencieusement et la chlorophylle extraite par l'acétone, puis filtrée sur filtre Buchner. La chlorophylle est ensuite transférée dans 10 ml exactement d'éther de pétrole (P.E. 30 à 35°) que l'on lave soigneusement à l'eau distillée, puis sèche au sulfate de sodium anhydre.

Le dosage spectrophotométrique des chlorophylles *a* et *b* se fait selon la méthode de Comar et Zscheile (1942). Elle consiste à mesurer la densité optique à 6425 et 6600 angströms: D_{6425} et D_{6600}, et à appliquer les équations tirées des données expérimentales de mesure de l'absorption des chlorophylles *a* et *b* à ces longueurs d'onde:

conc. chy. $a = 9{,}23\ D_{6600} - 0{,}777\ D_{6425}$ en mg/l d'éther de pétrole
conc. chy. $b = 17{,}6\ D_{6425} - 2{,}81\ D_{6600}$ en mg/l d'éther de pétrole

Nous estimons que cette méthode est précise à $\pm$ 10% près, sans toutefois l'avoir vérifié statistiquement.

i) Mesure du pouvoir photosynthétique des algues

Le mesure de l'intensité photosynthétique des algues se fait selon la méthode directe de Warburg (Umbreit et al. 1949). Les algues de la prise échantillon sont concentrées par centrifugation, reprises dans le milieu W 9. On introduit 3 ml de la suspension concentrée d'algues dans l'auge de l'appareil manométrique. On mesure l'évolution gazeuse pendant 30 min à l'obscurité. On en déduit au moyen de la formule bien connue l'intensité de la photosynthèse et de la respiration de la suspension considérée.

k) Dosage colorimétrique de la sulfanilamide

La technique est basée sur la diazotation et la copulation de la fonction aminée libre avec le chlorhydrate de N-alphanaphtyléthylènediamine selon la méthode de Marshall.

Le dosage colorimétrique se fait au spectrophotomètre Unicam 535 nm et au colorimètre Coleman à 525 nm en se servant d'une courbe étalon établie auparavant avec des solutions titrées de sulfanilamide. Précision: cette méthode, comme tout dosage

chimique par colorimétrie, donne une précision de ± 2% que nous avons vérifiée statistiquement, pour autant que l'on respecte les principes de l'analyse colorimétrique.

5. *Expression des résultats*

Les notions de croissance et de développement sont bien connues des physiologistes. La seconde a donné naissance à la théorie stadiale, expression des phases successives (thermostade, photostade, spectrostade, etc.) que franchit la plante. La croissance, bien que liée à l'évolution de ces stades, en est relativement indépendante.

On retrouve ces deux notions dans les études allométriques de croissance de deux ou plusieurs organes par rapport à l'individu entier (Chodat, 1949). Il est cependant difficile de trouver une définition exacte de ces deux notions, les auteurs n'employant pas toujours ces termes dans le même sens.

Chez les thallophytes, par contre, on n'établit pas ou très rarement cette distinction: croissance et développement. La plupart des études physiologiques sur ces végétaux inférieurs portent sur l'un ou l'autre de ces aspects de l'évolution d'un être vivant ou des collections d'individus:

a) étude de l'augmentation du poids ou des dimensions d'une culture en fonction du milieu: cultures de bactéries, de champignons ou d'algues (Tamiya, 1950; Pratt et al., 1945; Myers et al., 1951);

b) étude de cycles vitaux de diverses espèces dans les conditions naturelles et expérimentales.

Chez les algues, à notre connaissance, seules les études de Tamiya et coll. ont porté à la fois sur ces deux éléments de la vie d'une population considérée dans son ensemble, d'une part, et l'évolution de chacun des individus de cette population d'autre part (Iwamura et al., 1955; Burlew, 1953). Ces études ont abouti à l'élaboration si fructueuse de la méthode des cultures synchronisées.

Il est bien évident que l'évolution de la population dans son ensemble est la somme des évolutions de chacun des individus pris en particulier; cependant les notions permettant de mesurer les grandeurs relatives à la population (poids sec, volume cellulaire frais) ne tiennent pas toujours compte de l'état correspondant de chacun des individus (ce que la méthode des cultures synchronisées tend à régulariser systématiquement). Le même poids sec peut être mesuré pour un petit nombre de grosses cellules ou pour un grand nombre de petites cellules. Ce poids sec exprimera la croissance de la culture sans se préoccuper de l'état de développement de chaque individu-cellule (Burlew, 1953, p. 76–85). Tamiya et coll. ont proposé une division du métabolisme photosynthétique. Le premier peut s'effectuer aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, alors que le second n'est possible qu'à la lumière et de plus qu'il est le seul à permettre une augmentation de poids sec de la culture en régime carboautotrophe.

Nos études sur l'évolution physiologique des cultures d'algues nous ont amené à proposer les définitions suivantes qui diffèrent un peu de celles de Tamiya, bien qu'elles s'en rapprochent beaucoup par certains côtés:

Nous appellerons *croissance* d'un être vivant l'ensemble des processus métaboliques conduisant à une augmentation ou à une réorganisation des réserves d'énergie de cet individu. A un moment donné, cette croissance est donc constituée par un ensemble de réactions biochimiques en équilibre dynamique.

Le *développement* est alors caractérisé par toute modification, apparition, ou disparition d'un ou plusieurs de ces processus métaboliques, c'est-à-dire par toute modification dans l'équilibre dynamique de l'ensemble des réactions biochimiques de cet être vivant. Cette modification se marque très souvent par un changement morphologique de l'individu. On appellera développement la succession de ces modifications.

Ces deux définitions sont générales et peuvent aussi bien s'appliquer au règne animal qu'au règne végétal, aux êtres unicellulaires que pluricellulaires.

Il est bien évident que, ces définitions étant générales, il est nécessaire de les préciser dans chaque cas particulier par la description des différentes étapes de la croissance et du développement. Considérons un exemple:

Pour une plante supérieure (céréale, par exemple), le développement passe par plusieurs phases bien connues (Stroun, 1956): phase de germination; phase d'allongement des tiges; formation de l'épi; floraison et maturation des caryopses, etc. Une analyse plus détaillée des modifications du métabolisme permettrait (et permet aux spécialistes) de distinguer certainement de plus nombreuses étapes encore. Notre but n'est point ici d'énumérer exhaustivement les phases propres à chaque type d'être vivant, mais de fournir une définition du développement plus générale, en ce sens qu'elle s'harmonise avec la définition de la croissance. Il est certain que pour un physiologiste des plantes, qui se base essentiellement sur les modifications morphologiques externes du végétal, le découpage de l'existence d'une plante en phases de développement sera différent de celui que ferait un biochimiste attaché à étudier les phénomènes enzymatiques de la même plante. Les étapes du biochimiste seront beaucoup plus nombreuses parce que plus définissables, mais on retrouvera certainement des corrélations entre les deux événements, marquant que les étapes physiologiques sont déterminées par les étapes biochimiques, elles-mêmes d'ailleurs prédéterminées par l'information héréditaire contenue dans la cellule-œuf originelle.

La croissance de cette plante au cours de toutes ces étapes sera mesurée par l'accumulation d'énergie, l'organisation des réserves et la formation de métabolites essentiels. Cette croissance ne comprend pas seulement les processus photosynthétiques pour les plantes à chlorophylle, ou les processus d'assimilation pour les êtres carbohétérotrophes, mais tous les processus métaboliques, y compris ceux-mêmes qui amèneront aux modifications du développement. Ainsi la formation du célèbre et si controversé «stimulus floral» fait partie de la croissance de la plante; la modification apportée par ce «stimulus» détermine, elle, une étape du développement. (Reprenant en le parodiant un peu le langage des mathématiciens, on pourrait dire que la vie, ou mieux le déroulement de la vie dans le temps étant une fonction, la croissance est la dérivée première de cette fonction, alors que le développement en est la dérivée seconde.)

La vie d'une chlorophycée unicellulaire est relativement simple: les résultats de Tamiya et ses collaborateurs montrent d'une façon claire et précise (Iwamura et al., 1955; Burlew, 1953) que l'on peut très bien différencier chez *Chlorella ellipsoidea* les phases de croissance et les étapes de développement répondant à la définition que nous en proposons; les étapes du développement peuvent être ramenées à trois:

1re étape: Après la division, des cellules obscures («dark cells») de forme petite, riches en chlorophylle et très actives photosynthétiquement, sont caractérisées par un métabolisme accumulateur d'énergie et transformateur d'éléments minéraux en aliments organiques de base (glucides, lipides, protides).

2e étape: Les cellules ayant grossi au cours de la première étape se sont transformées en cellules de lumière («light cells») plus grosses, mais chez lesquelles la photosynthèse diminue considérablement. La croissance au cours de cette deuxième étape est constituée par un métabolisme de réarrangement des substances organiques formées au cours de la première étape du développement; et c'est en particulier au cours de cette deuxième étape que se forment les éléments nécessaires à la multiplication de l'«information héréditaire», c'est-à-dire les nucléosides de base du DNA, transporteur de l'hérédité dans les chromosomes.

3e étape: Etape de division de la cellule en 2, 4 ou 8 cellules filles qui sont des «cellules obscures» qui recommencent le cycle. Il est bien entendu que cette division en 3 étapes du développement est

arbitraire, que l'on pourrait en augmenter le nombre; ce dernier dépend en fait du problème envisagé et toute discussion au sujet d'une étape en plus ou en moins serait pure dialectique. Ainsi Tamiya, dans des publications plus récentes, a distingué plusieurs autres étapes (D1, D2, D3, etc.) et il est bien évident que, pour un cytologiste, la division de la cellule mère se subdivise en plusieurs phases intermédiaires.

En ce qui concerne les cultures d'algues, un problème qui n'a été que rarement traité est celui du vieillissement des colonies: il s'agit là d'une étape du développement des algues qui vient se superposer à celles que nous venons de rappeler. C'est une notion qui se rapporte à la sociologie des colonies ou des cultures d'algues qui restent longtemps dans le même milieu. C'est une étape qui apparaît d'ailleurs lentement et progressivement: on devra ici aussi fixer arbitrairement le début de la sénescence d'une culture, par exemple à la fin de la période logarithmique de croissance.

Toutes ces remarques nous ont conduit à exprimer l'évolution d'une culture d'algues en milieu non renouvelé au moyen de plusieurs grandeurs déduites des résultats obtenus par les méthodes décrites plus haut:

Les premières de ces grandeurs se rapportent à la cellule; elles servent à décrire l'évolution de l'individu moyen (ou plutôt de la moyenne des individus) tout au long de la culture. Ce sont:

a) le volume d'une cellule, exprimé en microns cubes obtenu en divisant le volume cellulaire frais (méthode N° 2) en millimètres cubes par litre, par la densité cellulaire (méthode N° 1) exprimée par le nombre de cellules par millimètre cube et en multipliant ce quotient par 1000;

b) on peut admettre que la densité d'une algue est égale à 1 g/cm³. Alors le volume cellulaire (volume d'une cellule), exprimé en microns cubes, multiplié par 10^{-6} donne le poids frais d'une cellule en gammas;

c) le poids sec d'une cellule, exprimé en gammas (millièmes de milligramme), obtenu en divisant le poids sec de la culture (méthode N° 3) en milligrammes par litre, par la densité cellulaire (nombre de cellules par millimètre cube) et en multipliant le quotient obtenu par 10^{-3};

d) le pourcent d'eau de la cellule, obtenu en soustrayant le poids sec du poids frais de la cellule et en faisant le rapport de cette différence (qui mesure la quantité d'eau dans la cellule) au poids frais;

e) le pourcent de matière fraîche de la cellule, obtenu en faisant le rapport, exprimé en pourcent du poids sec au poids frais d'une cellule.
On pourrait ajouter à ces notions celles de la quantité de chlorophylle par cellule, de la quantité d'azote organique par cellule, etc. Nous ne l'avons pas fait pour ne pas surcharger l'interprétation des résultats obtenus.

Une autre série de grandeurs se rapporte à la démographie de la culture, c'est-à-dire à la population d'algues dans le récipient de culture, considérée dans son ensemble. Ce sont:

f) la densité cellulaire ou nombre de cellules par millimètre cube de culture, obtenue par comptage statistique (méthode N° 1);

g) le volume occupé par les algues ou volume cellulaire frais, exprimé en millimètres cubes par litre de culture, obtenu par centrifugation (méthode N° 2).
Ce chiffre mesure aussi le poids frais de la colonie d'algues en milligrammes par litre;

h) le poids de matière sèche de la population algologique, exprimé en milligrammes par litre de culture, obtenu par pesée (méthode N° 3).
Enfin d'autres grandeurs permettent de suivre le métabolisme organisateur de la culture. Ce sont:

i) la consommation du nitrate par la culture, obtenue en mesurant le NO_3^- non consommé dans le milieu de culture;

k) la quantité de chlorophylle formée, exprimée en milligrammes de chlorophylle ($a + b$ ou a et b séparées) par gramme, soit de poids sec, soit de poids frais de la culture. On peut facilement

exprimer ce taux de chlorophylle en gammas par cellule, mais cette grandeur n'a que peu de signification pour nos expériences;

l) le taux photosynthétique, exprimé en millimètres cubes d'oxygène dégagé dans les conditions de la mesure (méthode N° 9) pour une suspension d'algues contenant 100000 cellules par millimètre cube.

Toutes ces expressions fournissent une certaine indication de l'état du développement ou de la croissance, ou des deux à la fois, au cours de l'évolution de la culture. Nous reviendrons dans la discussion des résultats sur la signification de chacune des expressions ci-dessus et leur interprétation dans le cadre des définitions que nous avons essayé de poser plus haut.

III. Croissance et développement des algues en milieu autotrophique pur, hétérotrophique pur et mixte (autotrophique et hétérotrophique)

Dans une précédente publication (Chodat et Schopfer, 1960), nous avons tenté de montrer que l'appareil photosynthétique d'une algue ne peut pas dépasser certaines limites dans l'utilisation des diverses sources d'énergie et de matières qui lui sont offertes (CO_2 et lumière d'une part en autotrophie; carbone organique sous forme de glucose d'autre part). La conclusion de cette publication postulait un facteur limite d'utilisation de l'énergie mise à disposition de la cellule. Nous avions surtout essayé de montrer que le mode d'estimation de la croissance d'une culture peut conduire à des erreurs d'interprétation relative au comportement de cette culture: un «effet synergique» que l'on croyait constater en fin de culture correspondait en réalité à une dissipation et surtout à une mauvaise utilisation des ressources énergétiques offertes.

La «croissance» de la culture est estimée par le comptage du nombre total de cellules par unité de volume. En fin de culture, cette «croissance» est plus élevée dans un milieu mixte (c'est-à-dire où les algues sont à la fois autotrophiques et hétérotrophiques: lumière + glucose) que dans un milieu purement autotrophique (lumière sans sucre) ou purement hétérotrophique (glucose à l'obscurité); la valeur de la croissance en milieu mixte dépasse même la somme des croissances dans les deux milieux autotrophe et hétérotrophe (à l'exception toutefois des cultures aérées et agitées où la combinaison mixte produit une récolte finale plus faible que l'hétérotrophie pure).

Nous avons cultivé quatre espèces d'algues:

Algue N° 3 *Scenedesmus obtusiusculus*
Algue N° 24 *Chlorella rubescens*
Algue N° 50 *Stichococcus diplosphaera*
Algue N° 116 *Oocystis Naegeli*

Les cultures sont faites soit dans des Erlenmeyers de 100 ml, contenant 60 ml de milieu, soit dans des ballons de 3 l (appelés «Phycogènes») contenant 1,8 l de milieu, avec agitation et aération.

Le milieu de culture est le milieu minéral Detmer/3, auquel on peut ajouter une source hétérotrophe de carbone sous forme de glucose. Sur la base des compositions des milieux, nous avons distingué trois «régimes» que nous désignons symboliquement par des lettres majuscules:

Régime *A*: Carboautotrophie pure: croissance des algues en milieu minéral. L'énergie est fournie par la lumière (tubes fluorescents éclairant les cultures).

Régime H: Carbohétérotrophie pure: croissance des algues en milieu minéral sans lumière. La source d'énergie est fournie par du glucose à 2 %.

Régime M: Régime mixte: croissance en milieu minéral additionné de glucose (2 %), à la lumière. L'énergie est fournie par le glucose et par la lumière; les algues bénéficient à la fois de la carboautotrophie et de la carbohétérotrophie.

Au bout d'un certain temps, la culture est arrêtée et l'on mesure sa croissance par comptage du nombre de cellules par millimètre cube au moyen de l'hémacytomètre.

Le tableau 3 donne le résultat des expériences faites: les colonnes 5, 6 et 7 donnent le nombre d'algues par millimètre cube dans le milieu en fin d'expérience; la colonne 8 donne la somme calculée des «croissances» en milieu A et en milieu H.

Tableau 3

Résultats des expériences

N° expér.	N° de l'algue	Durée expér.	Lumière Lux	Croissance cell./mm³ A	H	M	(A)+(H) calculé	effet synergique S	Mode de culture
102-6	116	45 j	900	3 850	8 400	17 400	12 250	+ 42 %	Erlenmeyer
			3 000	5 750		18 700	14 150	+ 32 %	
102-9	116	60 j	900	7 000	5 300	17 700	12 300	+ 44 %	Erlenmeyer
			3 000	6 350		21 600	11 650	+ 85 %	
	3	60 j	900	12 450	9 200	39 000	21 650	+ 80 %	Erlenmeyer
			3 000	15 800		34 500	25 500	+ 38 %	
102-11	50	47 j	1 800	23 200	42 400	116 500	65 600	+ 79 %	Erlenmeyer
	24	47 j	1 800	5 250	227	7 450	5 477	+ 39 %	
102-13	116	21 j	2 500	6 500	13 050	9 100	19 550	− 53 %	Ballon 3 l.
		38 j	2 500	9 250	21 500	11 750	30 750	− 62 %	

Effet synergique $S = \frac{(M) - [(A) + (H)]}{(A) + (H)} \cdot 100$ en %

On peut constater que la récolte en milieu mixte M est plus grande que la somme des récoltes en milieu A et H, sauf pour les cultures aérées et agitées. En d'autres termes, le fait de combiner la carboautotrophie et la carbohétérotrophie en régime M peut produire une récolte supérieure à celle des régimes A ou H.

Dans le cas des cultures non agitées et non aérées, nous pourrions conclure, sur la base de l'examen de ces chiffres, qu'il y a un effet de synergie des deux systèmes de biosynthèse carboautotrophe et carbohétérotrophe dans le régime mixte.

Nous pourrions définir cet «effet synergique» par la formule arithmétique:

$$S = \frac{(M) - [(A) + (H)]}{(A) + (H)} \cdot 100 \text{ en pourcent}$$

dans laquelle (A), (H) et (M) représentent le nombre d'algues par millimètre cube dans chacun des milieux A, H et M respectivement en fin de culture.

La valeur de S est reportée dans la colonne 9 du tableau. Cet effet est positif pour les cultures en Erlenmeyers, mais négatif pour les cultures en ballon (qui sont agitées et aérées).

Discussion

L'interprétation donnée ci-dessus se base uniquement sur l'analyse arithmétique (calcul d'un pourcent) des résultats finals de l'expérience. Ce n'est en réalité qu'une apparence.

Une analyse plus approfondie des résultats doit faire appel aux mathématiques. Il est possible d'exprimer la croissance d'un végétal, et en particulier d'une culture d'algues, par une équation qui lie la grandeur mesurée, caractérisant la croissance (nombre de cellules par millimètre cube dans notre cas), au temps; l'équation la plus simple est celle de Blackman (1919) qui exprime que l'accroissement du nombre de cellules pendant un intervalle de temps déterminé est proportionnel au nombre de cellules au début de cet intervalle:

$$dN = k\,N\,dt$$

N = nombre d'algues par millimètre cube
t = temps en jours
k = coefficient de croissance (constant)

que l'on peut intégrer sous forme logarithmique ou sous forme exponentielle:

$$ln\ N/N_0 = k\ t$$

ou

$$N = N_0\ e^{k\ t}$$

Loi de Blackman

avec N_0 = nombre d'algues au temps t = o (inoculation)

Admettons que cette équation soit applicable aux essais que nous avons faits. Le nombre de cellules N est proportionnel à la quantité d'un certain «facteur de division» F; en première approximation, et comme hypothèse de travail, nous pourrions assimiler ce facteur F au nombre des chromosomes dans la cellule, dont on sait que le nombre par cellule est fixe, et par extension – mais cette proposition reste à prouver – à la quantité d'acide désoxyribonucléique ADN par cellule, dont on sait que la quantité double dans la cellule avant chaque division (travaux de Tamiya et coll.).

$$N = c\ F$$

ou sous forme différentielle:

$$dN = c\ dF$$

c est une constante

Dans le système de biosynthèse carboautotrophe A agissant isolément, la production de ce facteur F doit être proportionnelle au nombre N des cellules et au temps (q_A = coefficient de proportionnalité):

$$dF_A = q_A\ N\ dt$$

d'où:

$$dN = c\ dF_A = c\ q_A\ N\ dt$$

et, puisque

$$dN = k_A\ N\ dt$$

pour ce régime A:

$$k_A = c\ q_A$$

De même, pour le système de biosynthèse carbohétérotrophique (régime M), on doit avoir de la même façon:

$$dF_H = q_H \, N \, dt$$

et

$$k_H = c \, q_H$$

Supposons que les systèmes A et H fonctionnent parallèlement dans la même cellule, sans qu'il y ait des interférences entre eux, et que chacun d'eux travaille avec le même rendement que dans son système respectif isolé, la quantité de facteur F formée doit être théoriquement égale à la somme des quantités fournies par chacun des systèmes A et H isolément; désignons ce système théorique supposé par $(A + H)$:

$$dF_{A+H} = dF_A + dF_H = (q_A + q_H) \, N \, dt$$

or:

$$dN = c \, dF = (c \, q_A + c \, q_H) \, N \, dt$$

et:

$$dN = (k_A + k_H) \, N \, dt$$

Dans le système théorique supposé $A + H$, la croissance doit se faire aussi selon la loi logarithmique de Blackman:

$$dN = k_{A+H} \, N \, dt$$

En comparant cette formule à celle qui précède, on voit que, théoriquement, si les deux systèmes A et H, mis ensemble, travaillaient chacun indépendamment, on devrait avoir:

$$k_{A+H} = k_A + k_H$$

En d'autres termes:

en régime A, l'ensemble des processus de biosynthèse dans une cellule, en particulier ceux de synthèse du «facteur de division», fonctionnent avec comme seule source d'énergie la photosynthèse;

en régime H, l'ensemble de ces mêmes processus de biosynthèse dans une cellule utilise comme seule source d'énergie le carbone hétérotrophe du glucose, c'est-à-dire la respiration;

en régime M, l'ensemble de ces mêmes processus de biosynthèse bénéficie à la fois de ces deux sources d'énergie carboautotrophe et carbohétérotrophe.

Si, en régime M, la cellule utilise chacune des deux sources au même taux qu'elle le fait en régime A et en régime H seuls, c'est-à-dire si elle fonctionne comme le régime théorique $A + H$ défini ci-dessus, on peut dire qu'il y a simplement cumul des sources énergétiques, mais que la synergie est nulle, ni positive ni négative. La synergie est alors définie ici mathématiquement comme la différence entre la quantité de facteur de division produit par unité de temps en régime M, diminuée de la somme des quantités du même facteur synthétisées dans le même temps pour chacun des deux régimes A et H isolément.

Dans le régime M, chaque cellule a précisément à sa disposition les deux sources autotrophes et hétérotrophes. Nous pouvons donc dire que la synergie, telle que nous venons de la définir mathématiquement, sera:

nulle	si	$k_M = k_A + k_H$
positive	si	$k_M > k_A + k_H$
négative	si	$k_M < k_A + k_H$

Application aux expériences faites

Nous ferons les calculs en adoptant les logarithmes décimaux au lieu des logarithmes népériens. La loi de croissance s'écrit:

$$\log N/N_0 = k' t \qquad \text{avec } k' = 0{,}434\, k$$

$$k' = \frac{1}{t} \log N/N_0$$

1. Conditions non aérées et non agitées

Exemple: Expérience 102–6. Algue 116

Régime A (900 lux)	$t = 45$ j $N = 10$ $N^o = 3850$	$k'_A = \frac{1}{45} \log 385 = 0{,}057$
Régime H	$t = 45$ j $N = 10$ $N^o = 8400$	$k'_H = \frac{1}{45} \log 840 = 0{,}065$
Régime M (900 lux)	$t = 45$ j $N = 10$ $N^o = 17\,400$	$k'_M = \frac{1}{45} \log 1740 = 0{,}072$

Calcul théorique du système $A + H$ sans interférences:

$$k'_{A+H} = 0{,}057 + 0{,}065 = 0{,}122$$

D'une façon générale, on constate que:

$k_M < k_{A+H}$
$k_M > k_A$
$k_M > k_H$

pour toutes les expériences faites avec 4 espèces d'algues, pour les éclairements lumineux choisis, sans aération et sans agitation.

2. Conditions aérées et agitées

Exemple: Expérience 102–13. Algue 116

Régime A	$t = 38$ j $N = 10$ $N^o = 9250$	$k'_A = 0{,}078$
Régime H	$t = 38$ j $N = 10$ $N^o = 21\,500$	$k'_H = 0{,}090$
Régime M	$t = 38$ j $N = 10$ $N^o = 11\,750$	$k'_M = 0{,}081$

Calcul théorique du système $A + H$ sans interférences:

$$k'_{A+H} = 0{,}078 + 0{,}090 = 0{,}168$$

D'une façon générale, on constate que:

$$k_M < k_{A+H}$$
$$k_M > k_A$$
$$k_M < k_H$$

pour l'expérience faite, avec l'algue 116, pour l'éclairement choisi, avec aération et agitation.

Il semble donc bien que nos expériences prouvent ce fait, paradoxal à première vue, que l'apport simultané d'énergie carboautotrophique et carbohétérotrophique à une culture en milieu M – autrement dit la présence simultanée dans une cellule des deux systèmes de biosynthèses carboautotrophes et carbohétérotrophes – ne permet pas à chacun de ces deux systèmes A et H de biosynthétiser le facteur F avec le même rendement que lorsqu'ils fonctionnent séparément en milieu A et H. Cette conclusion est valable aussi bien pour les cultures agitées et aérées que pour celles non agitées ni aérées. Dans tous les cas étudiés, nous constatons que:

$$k_M < k_A + k_H$$

c'est-à-dire que la synergie est négative.

En réalité, cette loi de Blackman (1919) n'est valable que dans les premiers temps du développement de la culture. La consommation des éléments plastiques et oligodynamiques du milieu de culture produit un ralentissement de plus en plus marqué de la multiplication des cellules; Robertson (1908, 1923) a proposé une autre formule qui tient compte de cet épuisement progressif des aliments: l'hypothèse admise par cet auteur est que le facteur de proportionnalité k de la loi de Blackman n'est plus constant, mais est lui-même proportionnel au nombre de cellules qui peuvent encore être créées avec les ressources plastiques de la culture; on remplace dans l'équation de Blackman

k par $K\,(R–N)$

avec R = nombre maximum de cellules possible dans la culture lorsque tous les aliments sont épuisés

K = nouvelle constante de croissance

L'équation différentielle de la courbe de croissance s'écrit alors:

$$dN = K\,(R - N)\,N\,dt$$

Une intégration nous donne la loi de croissance dite de Robertson:

$$ln\,\frac{R - N_0}{N_0} + ln\,\frac{N}{R - N} = KRt$$

ou sous forme exponentielle:

$$N = \frac{N_0}{R - N_0}\,(R - N)\,e\,KRt$$

avec: N = nombre de cellules par millimètre cube au temps t
N_0 = nombre de cellules par millimètre cube au temps $t = 0$

R = nombre maximum de cellules par millimètre cube que permettent les réserves de nourriture
K = nouveau coefficient de croissance

Nous pouvons reprendre le même raisonnement que nous avons fait au sujet de l'équation de Blackman:

Si le nombre de cellules est proportionnel à la quantité F d'un «facteur de division», on a:

$$N = c\,F$$

et

$$dN = c\,dF$$

Dans chacun des systèmes de biosynthèse (A, ou H par exemple), nous pouvons ici aussi admettre que la production de ce facteur F est proportionnelle au nombre de cellules:

$$dF_A = q_A\,N\,dt$$

(le facteur de proportionnalité q n'est plus ici une constante, mais une fonction de N)

or: $dN_A = c\,dF_A = c\,q_A\,N\,dt$

d'autre part, l'équation différentielle de Robertson s'écrit:

$$dN_A = k_A\,(R - N)\,N\,dt$$

d'où:

$$K = \frac{c \cdot q_A}{R - N}$$

ou:

$$qA = \frac{K_A}{c}(R - N)$$

$(R - N)$ représente les réserves d'azote ou tout au moins de nourriture.

Transformons mathématiquement ces équations:

$$\frac{dF_A}{dt} = \frac{K_A}{c}(R - N)\,N$$

puis: $$\frac{dF_A/\,N}{dt} = \frac{K_A}{c}(R - N)$$

Cette dernière équation nous indique que: admettre la loi de croissance de Robertson, c'est admettre que la vitesse de biosynthèse du facteur F dans une cellule est linéairement proportionnelle à la quantité de nourriture, plus particulièrement azotée, restant dans le milieu (azote nitrique non consommé dans nos expériences en milieu Detmer/3).

$\frac{dF_A/\,N}{dt}$ représente la quantité de facteur F synthétisé par une cellule dans le temps dt.

Plus l'azote disparaît, plus la vitesse de formation du facteur F diminue. Cette formule est la même que celle d'une réaction monomoléculaire en cinétique chimique,

mais cela ne veut pas dire que la formation de ce facteur F soit une réaction monomoléculaire. Il n'y a là qu'une similitude de forme mathématique indiquant que les deux problèmes sont traités selon le même processus d'analyse.

Pour le milieu hétérotrophe pur H, on a de même, par le même raisonnement:

$$dF_H = q_H\, N\, dt$$
$$dN_H = c\, dF_H = c\, q_H\, N\, dt$$

Si les deux systèmes sont supposés travailler indépendamment (A et H) dans le système M, alors on doit avoir:

$$dF_{A+H} = dF_A + dF_H$$
$$dF_{A+H} = q_A\, N\, dt + q_H\, N\, dt$$
$$dN_{A+H} = c\, dF_{A+H} = (c\, q_A + c\, q_H)\, N\, dt$$

et $\quad dN_{A+H} = (K_A + K_H)\,(R - n)\, N\, dt \qquad$ d'autre part

dans le système mixte expérimental M, on a:

$$dN_M = K_M\,(R - N)\, N\, dt$$

on devrait constater expérimentalement que:

$$K_M = K_A + K_H$$

Application aux expériences faites

Nous ferons ici aussi les calculs en adoptant les logarithmes décimaux au lieu des népériens. L'équation de Robertson peut s'écrire:

$$\log \frac{R - N_0}{N_0} \cdot \frac{N}{R - N} = K'\, R\, t \quad \text{avec } K' = 0{,}434\, K$$

Exemple: Expérience 102–13. Algue 116

Au 38e jour, 85% de l'azote minéral a été transformé en azote organique. La densité de la culture étant de 21 500 algues par millimètre cube, nous pouvons admettre que le nombre maximum d'algues est de 24 000/mm³ (correspondant à 95% de l'azote minéral assimilé).

Calculons les valeurs de K'_A, K'_H et K'_M pour les différentes mesures de la densité cellulaire effectuées:

$$R = 24\,000 \text{ cell./mm}^3 \qquad \frac{R - N_0}{N_0} = 775$$
$$N_0 = 31 \text{ cell./mm}^3$$

Tableau 4

Temps t Jours	K'_A Expérience	K'_H Expérience	$K'_{A+H} = K'_A + K'_H$ Calculé	K'_M Expérience
12	$6{,}8 \cdot 10^{-6}$	$3{,}6 \cdot 10^{-6}$	$10{,}4 \cdot 10^{-6}$	$8{,}4 \cdot 10^{-6}$
21	$5{,}1 \cdot 10^{-6}$	$5{,}9 \cdot 10^{-6}$	$10{,}9 \cdot 10^{-6}$	$5{,}2 \cdot 10^{-6}$
38	$3{,}0 \cdot 10^{-6}$	$4{,}2 \cdot 10^{-6}$	$7{,}2 \cdot 10^{-6}$	$3{,}1 \cdot 10^{-6}$

Nous pouvons constater, tout au long de cette expérience, que:

$$K'_M < K'_{A+H}$$

Les mêmes calculs, effectués pour toutes les expériences que nous avons faites et qui sont reportées au tableau ci-dessus, montrent que cette relation:

$$K'_M < K'_{A+H}$$

est toujours vérifiée.

En adoptant l'équation de Robertson pour représenter la croissance d'une culture, nous constatons que nous arrivons à la même conclusion qu'en appliquant celle de Blackman:

Lorsque les deux systèmes de biosynthèse carboautotrophique et carbohétérotrophique fonctionnent simultanément dans une culture d'algues, le rendement de chacun d'eux est moins bon que s'il fonctionnait seul dans une culture soit purement autotrophique, soit purement hétérotrophique.

En d'autres termes: il se produit dans les cellules en régime mixte des interférences dans l'utilisation des deux sources d'énergie, conduisant à une mauvaise utilisation de l'énergie totale mise à disposition de la cellule.

Ou encore: le rendement global de l'utilisation des énergies carboautotrophe et carbohétérotrophe en régime mixte est moins bon que la somme des rendements d'utilisation de ces deux formes d'énergie en régime *A* et en régime *H* purs, respectivement.

Cette conclusion est l'inverse de celle que nous avions obtenue par l'analyse arithmétique des dénombrements des cellules en Erlenmeyers.

L'application de cette équation de Robertson aux cultures d'algues de nos essais nous a montré qu'elle nous donne une courbe de croissance qui se rapproche suffisamment des points expérimentaux mesurés. Elle donne une représentation du phénomène de croissance bien meilleure que la loi de Blackman.

En admettant que la croissance puisse être représentée par cette équation de Robertson, nous avons retrouvé dans les expériences les conclusions que nous avions pu obtenir en admettant l'expression logarithmique de Blackman, à savoir que:

Lorsque les systèmes de biosynthèse carboautotrophe et carbohétérotrophe fonctionnent simultanément dans une même cellule, leur rendement d'ensemble est plus petit que la somme des rendements qu'ils ont en fonctionnant isolément. Il n'y a pas synergie. L'un ou l'autre (ou les deux à la fois) des deux systèmes est gêné par l'existence ou le fonctionnement de l'autre.

On pourrait essayer d'expliquer cette diminution de rendement en faisant intervenir les phénomènes de photophosphorylation (photosynthèse) et de phosphorylation oxydative (respiration) qui dépendent toutes deux de la quantité totale d'ADP présente dans la cellule. Tel n'est pas notre but. Nous avons simplement voulu montrer que la représentation d'un phénomène par une équation mathématique a permis de donner de ce phénomène une tout autre interprétation que celle que la simple analyse arithmétique des résultats laissait à supposer.

Il n'est en tout cas pas possible, sur la base de nos seules expériences, de dire quel est le système de biosynthèse défavorisé, ou dans quelle proportion chacun des deux systèmes est utilisé par la cellule (Bristol-Roach, 1928).

Il nous paraît en outre intéressant de relever ici une observation remarquable en ce qui concerne le tableau des coefficients K' (page 32) calculés pour l'expérience 102–13 (cultures en milieu aéré et agité).

Le facteur K' évolue dans le temps de façon différente selon que l'on a affaire à une culture à la lumière (milieux A et M) ou à l'obscurité (milieu H):

A la lumière, le facteur K' prend rapidement une valeur assez élevée dès le début de la culture ($K'_A = 6{,}8\ 10^{-6}$ au 12e jour; $K'_M = 8{,}4\ 10^{-6}$ au 12e jour), puis décroît lentement au fur et à mesure que la culture vieillit.

A l'obscurité, le facteur K'_H reste assez faible au début de la culture (3,6 10^{-6} au 12e jour), puis augmente pour dépasser les valeurs de K' pour les cultures à la lumière au 21e jour. Sa valeur rediminue ensuite, mais proportionnellement beaucoup moins rapidement que pour les cultures à la lumière.

Rappelons que le coefficient K' représente une mesure du taux de croissance, puisque:

$$K' = \frac{1}{R - N} \cdot \frac{dN}{dt}$$

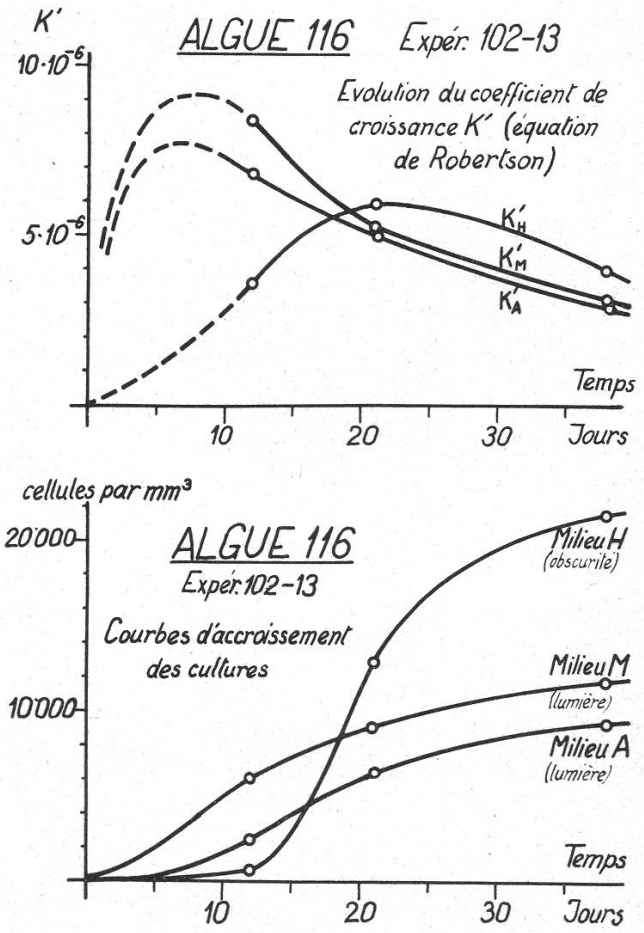


Figure 1

La figure 1 montre, d'une part, l'évolution des facteurs K' en fonction du temps, d'autre part, l'allure des courbes de croissance des cultures correspondantes; on voit d'une façon très nette que l'augmentation très lente du facteur K'_H en hétérotrophie pure se marque par une période de lag prolongée pour la culture.

Il apparaît donc que la division des cellules à la lumière démarrerait beaucoup plus rapidement qu'à l'obscurité. En carbohétérotrophie pure, la période de lag est beaucoup plus grande qu'en régime *A* ou *H*. La lumière représente en quelque sorte une source d'énergie qui permet à l'algue d'acquérir plus rapidement le pouvoir de se diviser que ne le lui permet une source d'énergie exogène telle que le glucose.

Ou, en d'autres termes, tout se passe comme si l'algue qui est par nature un organisme carboautotrophe préférait l'énergie photosynthétique pour ses besoins de division caryocinétique.

IV. Les cultures d'algues en présence de sulfanilamide

1. Les effets de la sulfanilamide sur les êtres vivants

C'est en 1935 que Domagk puis Tréfouel et coll. découvraient les propriétés bactériostatiques et thérapeutiques de ce que l'on a appelé plus tard les sulfamidés. En 1940, déjà, Woods (1940) publiait les résultats de ses travaux historiques sur le renversement de l'action bactériostatique de la sulfanilamide par l'acide paraminobenzoïque. On a admis dès ce moment que la ressemblance des structures chimiques de ces deux substances était la cause de cet antagonisme. Dans ce cas particulier, l'antagonisme est dit compétitif: c'est l'action de la substance prépondérante quantitativement dans le milieu qui l'emporte. Cette action peut être renversée en augmentant le taux de la substance minoritaire.

Le fait que l'acide paraminobenzoïque fait partie intégrante de l'acide folique explique une grande partie des effets de la sulfanilamide. L'acide folique est en effet une coenzyme qui intervient dans de nombreuses réactions biochimiques nécessitant l'incorporation d'un reste à un atome de carbone (méthyl, formyl, etc.). Le remplacement dans sa molécule de l'acide paraminobenzoïque par la sulfanilamide ne l'empêche pas de prendre sa place de coenzyme dans l'enzyme considérée, mais ne lui permet plus de jouer son rôle de fournisseur de restes à un atome de carbone.

L'action cytostasique de la sulfanilamide s'explique ainsi par le rôle que joue l'acide folique dans la biosynthèse des acides nucléiques au niveau de la formation des bases puriques et de la thymine (base pyrimidique) lors de la biosynthèse des nucléotides correspondants.

Nous ne pouvons que reprendre ci-après les schémas de biosynthèses de ces divers corps et leurs formules dans l'excellent ouvrage de J.-N. Davidson (1960), qui montrent bien le rôle de l'acide tétrahydrofolique.

Les figures 2, 3 et 4 résument certaines des opérations biochimiques auxquelles l'acide folique participe. Cette molécule est d'une part susceptible de s'enrichir de groupes méthényl, formyl, hydroxyméthyl (v. fig. 2) et d'autre part de transférer ces groupes aux précurseurs de nucléosides (désoxyuridine, glycinamideribotide et 5 aminoiminazole-carboxamide-ribotide). Ce rappel des beaux travaux exposés par Davidson suffit pour illustrer quelques-uns des points d'impact de l'acide folique dans le cas particulier de la biosynthèse des nucléosides.

La formule de l'acide 5, 6, 7, 8 – tétrahydrofolique développée à la figure 2 – permet enfin de situer la position centrale dans cette molécule de l'acide paraminobenzoïque.

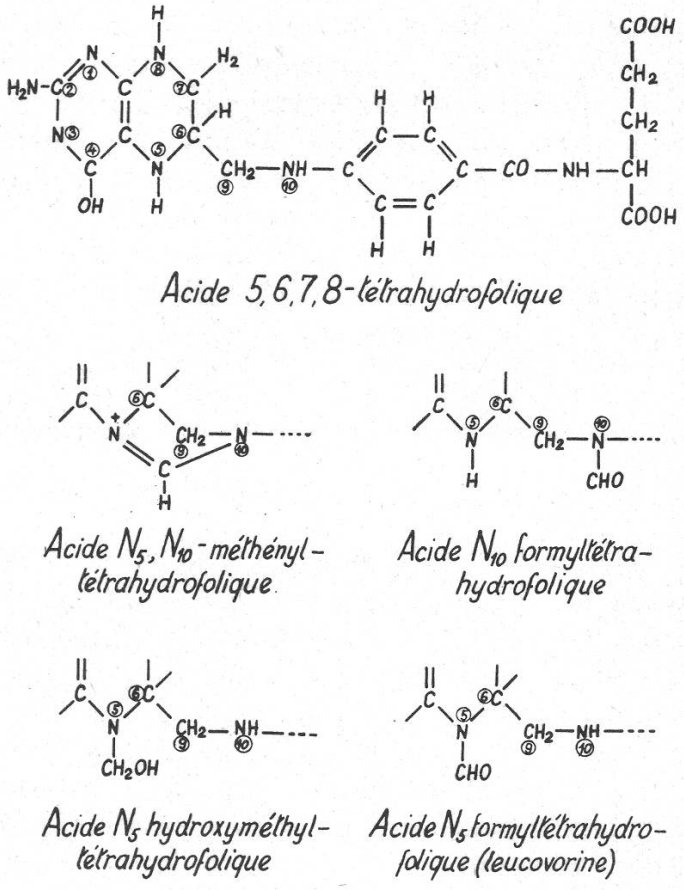


Figure 2

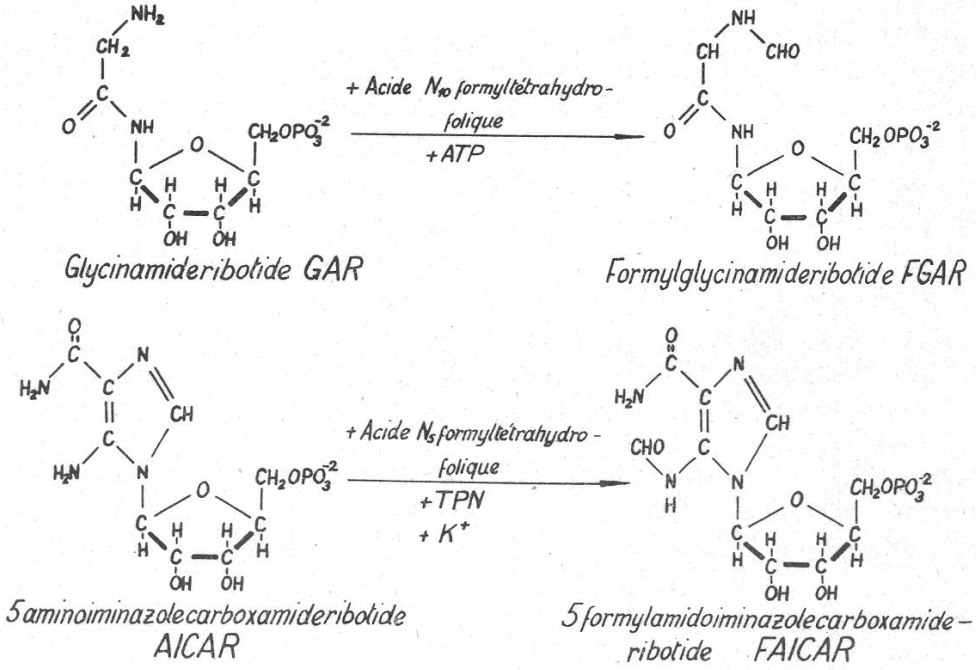


Figure 3

Comme nous le disions plus haut, lorsque des quantités massives de sulfanilamide sont présentes au moment de la biosynthèse de l'acide folique, elle peut se substituer à l'acide paraminobenzoïque; il résulte de cette substitution une molécule qui a perdu ses propriétés caractéristiques.

Les travaux de Davis (1951) ont également montré l'importance de l'acide folique dans la formation de la vitamine B_{12}. Il est certain que cet acide folique intervient dans de nombreuses autres réactions et que son spectre d'action doit être extrêmement varié. Il ne saurait être question d'en étudier tous les aspects dans ce modeste travail.

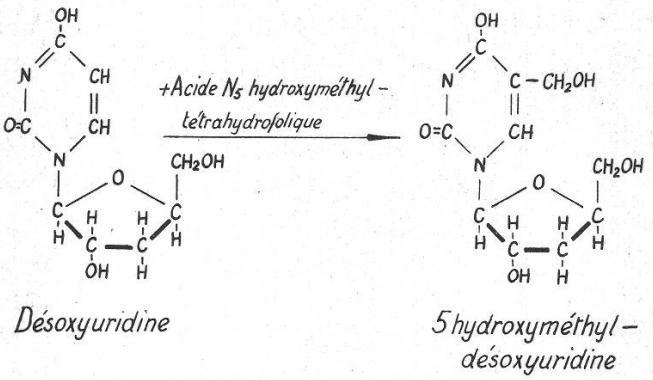


Figure 4

2. Revue des travaux effectués sur les effets des sulfamidés sur les algues

Les premiers travaux de F. Chodat et coll. sur l'influence des sulfamidés sur les algues vertes datent de 1939, soit peu de temps après la découverte des propriétés bactériostatiques de ces substances.

Le but de ces recherches était d'opérer sur un matériel dont il était plus aisé d'observer les modifications cytologiques et cytochimiques.

Les premières études (Chodat et Olivet, 1940, 1941) portèrent sur des algues exclusivement sensibles aux sulfamidés; les observations cytologiques étaient caractéristiques: présence de nombreuses cellules de grande taille n'ayant pas pu se diviser en cellules filles. «La sulfanilamide freine la sporulation et non la croissance des cellules.» Des algues à tendance filamenteuses (*Hormidium*) voient la longueur de leurs chaînes croître sous l'effet de la sulfanilamide; dans ce cas, la sulfanilamide empêchait la gélification des matières pectiques de la membrane extérieure de l'algue.

Le troisième travail (Chodat et Soloweitchik, 1942) met en évidence à la suite de la publication de Woods (1940) et du travail de Wiedling (1941), le rôle protecteur de l'acide paraminobenzoïque contre les effets de la sulfanilamide. En même temps il montre la résistance remarquable de l'algue N° 116 *Oocystis Naegli* aux effets de celle-ci. Wiedling (1941) avait montré que les diatomées sont sensibles à l'action des sulfamidés et que l'acide paraminobenzoïque est capable de renverser cette inhibition.

Un quatrième travail, très important, montrait que la «sulfanilamide retarde et entrave la dégénérescence lipidogène des cellules carencées en azote. La vitamine H' (acide paraminobenzoïque) annule la toxicité de la sulfanilamide, mais ne supprime

pas son rôle d'inhibiteur de la lipidogenèse.» Ce travail laissait pendante la question de savoir si la sulfanilamide pouvait céder aux algues l'azote de son amide.

En 1953, Blondel publie sa thèse; principalement consacrées aux algues résistantes, appelées «compensantes», ses recherches ont montré que le temps après lequel la sulfanilamide est introduite dans le milieu de culture, ou l'ampleur plus ou moins grande de l'inoculation jouent un grand rôle dans la capacité de compenser plus ou moins rapidement les effets de la sulfanilamide.

Les algues résistantes ou «compensantes» présenteraient dans les premiers jours de culture une sensibilité aux sulfamidés qu'elles surmonteraient ensuite. Le facteur responsable du taux de croissance normal serait endocellulaire. Les cultures seraient moins sensibles pendant la phase logarithmique de croissance. L'explication de ces phénomènes tiendrait en la mise en action de processus enzymatiques de synthèse dont la cellule ne se sert pas en milieu normal.

Signalons pour terminer un travail de Johnston (1959) sur les effets de certains antimétabolites sur le comportement d'algues marines. Cet auteur a utilisé cette méthode pour tester les besoins de croissance des diverses espèces étudiées. Il a montré que l'effet inhibiteur de la sulfanilamide est proportionnel à sa concentration et que certaines espèces (*Skeletonema*, *Navicula*, etc.) sont plus sensibles que d'autres (*Gymnodinium*, *Chromulina*), insensibles à des doses de 10^{-2} M. La vitamine B_{12} aurait, selon cet auteur, un effet protecteur envers la sulfanilamide; on sait en effet que l'acide paraminobenzoïque joue un rôle dans le métabolisme de la vitamine B_{12}.

3. La photosynthèse des algues en présence de sulfanilamide

Bien que l'on sache que la sulfanilamide doit ses propriétés cytostasiques à son effet antagoniste sur l'acide folique et par là sur la formation des acides désoxyribonucléiques de certaines souches de micro-organismes sensibles, il était nécessaire, en ce qui concerne les algues, d'étudier si la sulfanilamide avait une influence sur la photosynthèse des algues sensibles, puisque son action n'était connue que sur des êtres carbohétérotrophiques.

En effet, si la sulfanilamide montrait un effet inhibiteur sur le cycle de la photosynthèse de certaines souches d'algues, l'effet cytostasique constaté pourrait n'être qu'un effet secondaire, sans analogie avec celui que l'on constate chez les organismes hétérotrophes.

La mesure du taux photosynthétique des algues à l'appareil de Warburg a été faite pour trois espèces d'algues choisies parmi les mieux connues du point de vue de leur physiologie et de leurs réactions à la sulfanilamide:

Algue 3: Cette algue a été cultivée en milieu Detmer/3 (autotrophie) pendant 35 jours à la lumière artificielle (4000 à 5000 lux). Puis la culture est divisée en deux lots dont l'un est imprégné de sulfanilamide à raison de $1^0/_{00}$, et l'autre conservé comme témoin. Deux mesures ont été faites: la première après 35 heures et la seconde après 70 heures d'imprégnation à la sulfanilamide. Pour l'expérience, les algues ainsi traitées sont centrifugées, de façon que leur concentration soit suffisamment élevée, puis reprises dans le milieu tampon de Warburg N° 9.

Algue 50: Cette algue a été également cultivée en carboautotrophie pendant 9 jours, puis imprégnée de sulfanilamide à raison de $1^0/_{00}$ pendant 2 heures. Les mesures sont faites, après concentration des cellules, comme ci-dessus, et comparées aux mêmes mesures faites sur des cellules non intoxiquées. Le graphique de la figure 5 nous montre le déroulement de l'expérience en fonction du temps. On constate que les points représentatifs de la quantité d'oxygène évolué au cours des trois phases –

obscurité – lumière – obscurité – de l'expérience sont statistiquement indifférenciables pour les algues intoxiquées et pour celles non imprégnées de sulfanilamide.

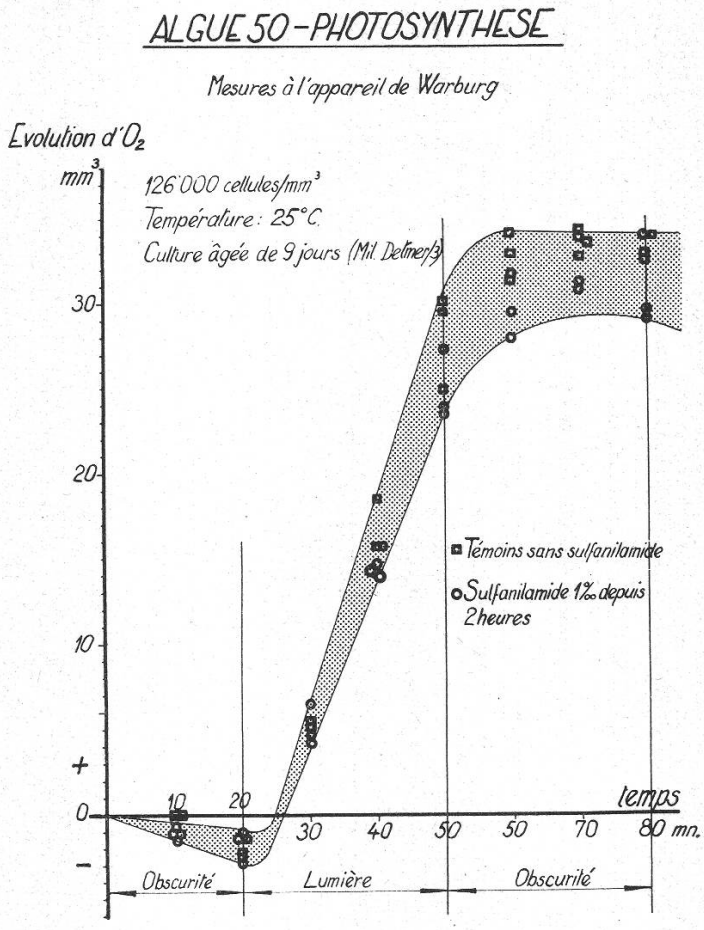


Figure 5

Algue 116: Cultivée pendant 36 jours en autotrophie pure dans les mêmes conditions que ci-dessus, puis imprégnée de sulfanilamide pendant 36 heures, l'algue 116 a été testée quant à son intensité photosynthétique selon la même méthode.

Les résultats des mesures sur ces trois souches sont reportés sur les graphiques de la figure 6:

En abscisses, on porte la concentration, en algues par millimètre cube, dans le milieu où ont été faites les mesures du taux photosynthétique.

En ordonnées, le taux photosynthétique des algues, exprimé par le volume (en mm^3) d'oxygène à pression et température standard, libéré en 10 minutes par $3 \cdot 10^8$ (300 millions) de cellules de l'algue, à la concentration et dans les conditions d'éclairement et de température de la mesure. Ce nombre de $3 \cdot 10^8$ cellules correspond à une concentration standard de 100000 cellules par millimètre cube dans les 3 ml de suspension d'algues introduites dans l'appareil de Warburg.

Par exemple l'expérience avec l'algue 116 nous a donné les résultats suivants: pour une concentration de 66 800 algues par millimètre cube, en présence de sulfanilamide, le volume d'oxygène dégagé par la photosynthèse de 3 cm^3 de cette suspension est de 12,83 mm^3 en 10 minutes. Ces 12,83 mm^3 d'oxygène ont été fournis par 66 800 $\times$ 3000 mm^3 $= 2 \cdot 10^8$ cellules. Le volume d'oxygène qui aurait été fourni par $3 \cdot 10^8$

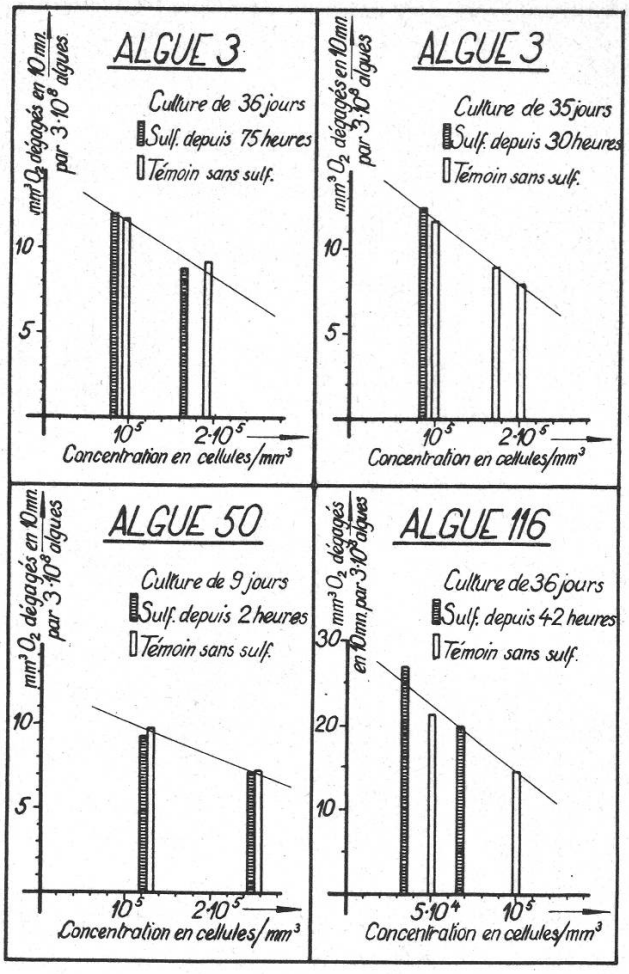


Figure 6

cellules, dans les mêmes conditions de température, concentration et éclairement, est de :

$$12{,}83 \frac{100\,000}{66\,800} = 19{,}22 \text{ mm}^3 \text{ en 10 minutes}$$

Cet artifice de calcul nous permet de pouvoir facilement comparer entre eux les résultats obtenus dans des expériences où les concentrations cellulaires étaient différentes.

Discussion

Nous pouvons constater d'emblée que lorsque la concentration des algues dans le milieu de mesure augmente, toutes autres conditions restant égales, l'intensité photosynthétique standard (0_2 produit par $3 \cdot 10^8$ cellules en 10 min) diminue. Cette diminution semble être proportionnelle, et même linéairement proportionnelle à l'augmentation de concentration dans les limites et les conditions des expériences faites, c'est-à-dire pour des éclairements moyens (3000 à 4000 lux) et des concentrations assez élevées (de l'ordre de 100 000 cellules par millimètre cube).

Planche 1

Algue 516 *(Oocystis sp.)*. Expérience 102–27. Milieu témoin (Detmer/3): 1 24e, 2 35e, 3 71e jour. Milieu avec sulfanilamide 1‰: 4 24e, 5 35e, 6 71e jour. Agrand. 900.

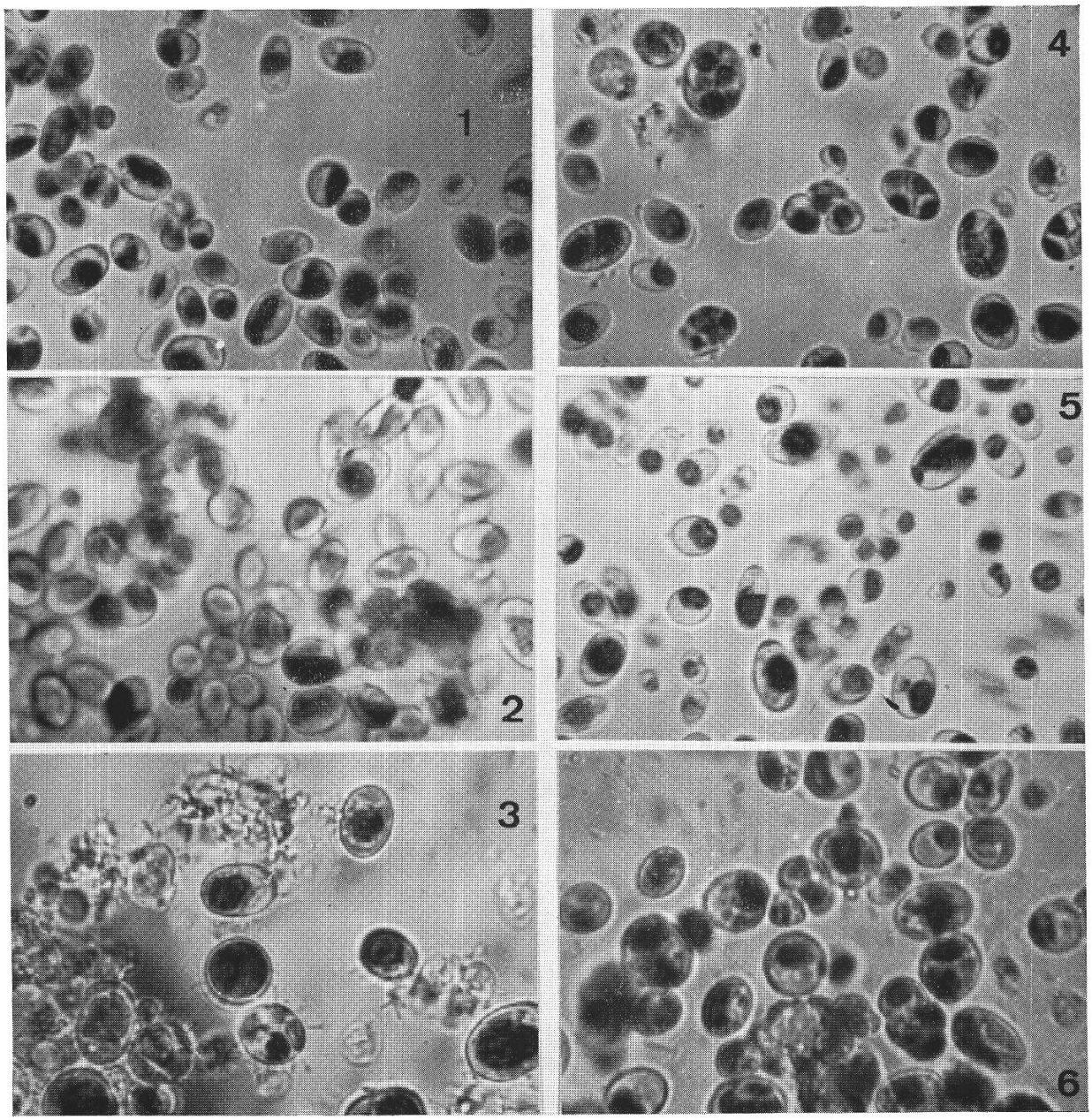


Planche 2

Algue 50 *(Diplosphaera Chodati)*. Expérience 102–23. Milieu témoin (Detmer/3): 1 20e, 2 34e, 3 68e jour. Milieu avec sulfanilamide 1‰: 4 20e, 5 34e, 6 68e jour. Agrand. 900.

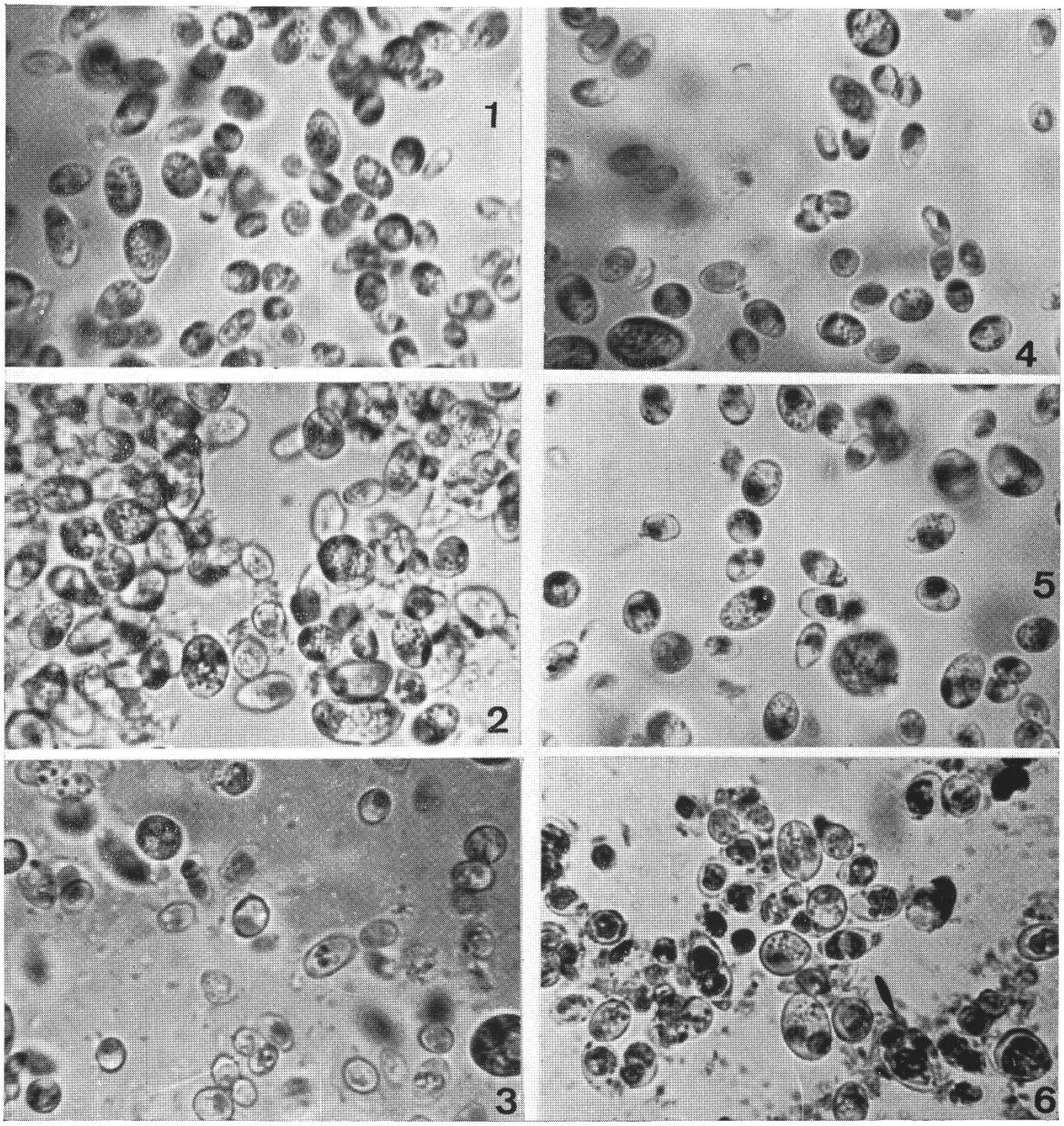


Planche 3

Algue 172 *(Pleurococcus)*. Expérience 102–2. Milieu témoin (Detmer/3): 1 48e, 2 55e, 3 62e jour. Milieu avec sulfanilamide 1‰: 4 48e, 5 55e, 6 62e jour. Agrand. 900.

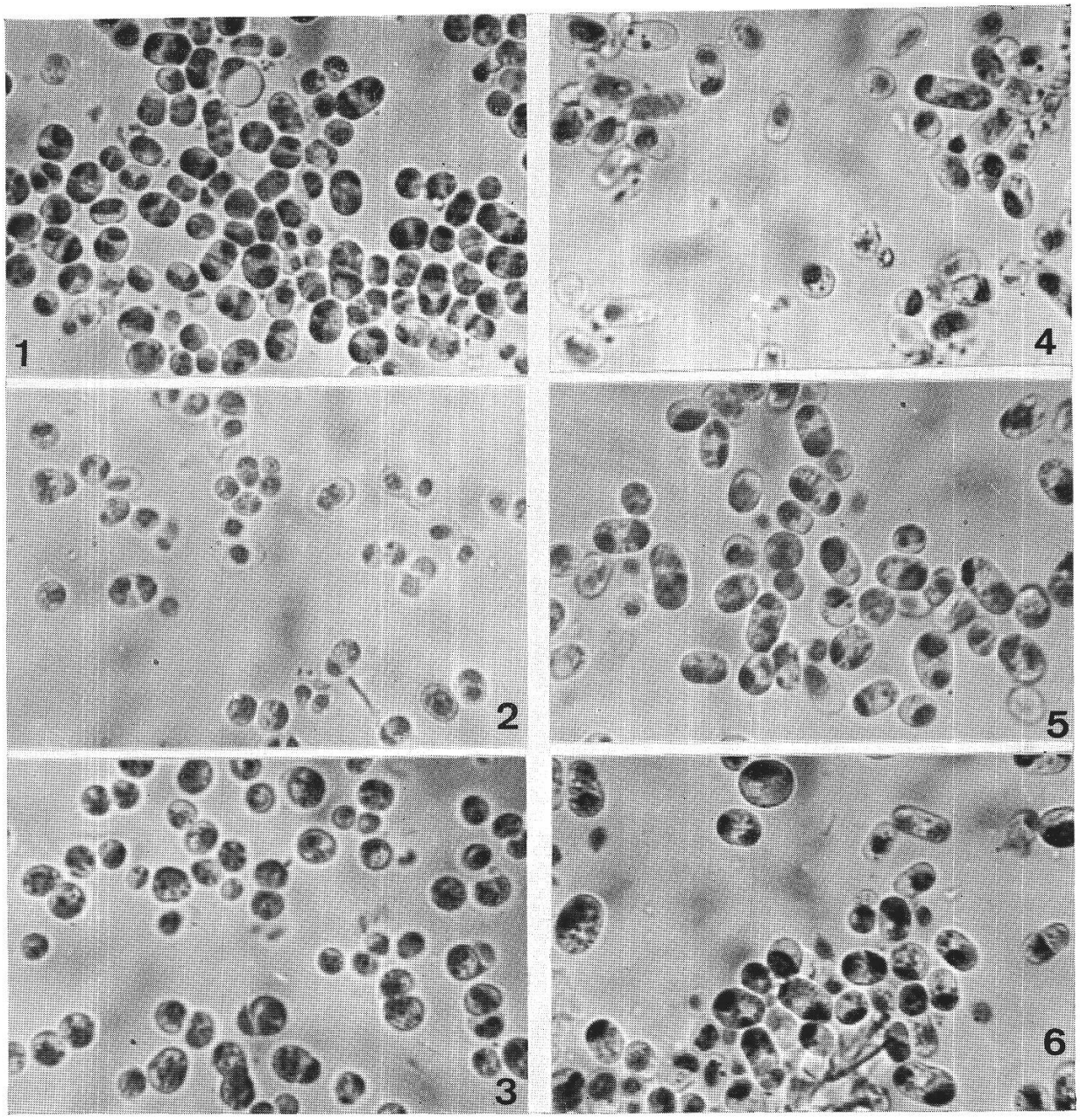
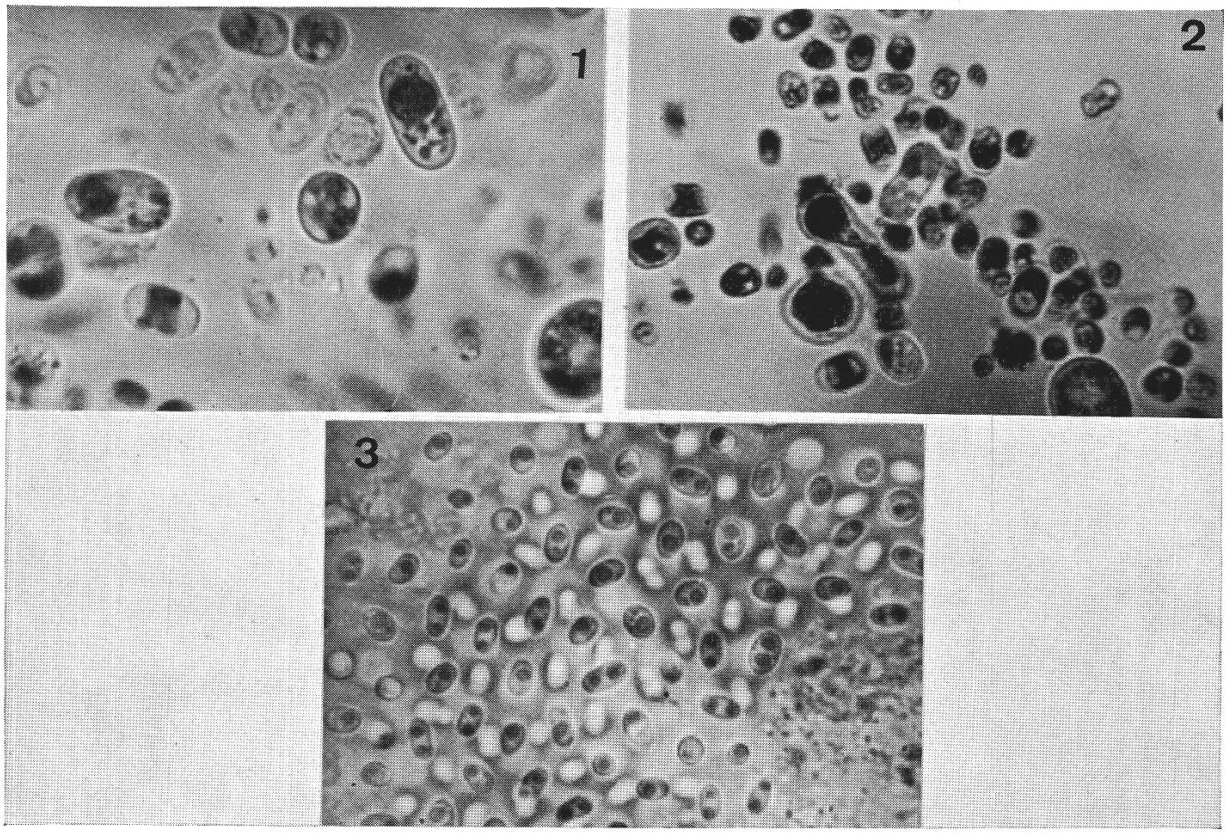


Planche 4

Algue 172 *(Pleurococcus)*. Expérience 102–26. 1 Milieu témoin: 71e jour. 2 Milieu avec sulfanilamide 1‰: 71e jour. 3 Milieu ayant reçu 0,1‰ de colchicine le 20e jour; 35e jour de culture. Agrand. 900.



Ce résultat, en apparence paradoxal, pourrait s'expliquer par le fait qu'avec l'augmentation du nombre des cellules, on réduit l'intensité d'éclairement de chaque cellule (fonction écran). D'autres circonstances, de nature compétitive, pourraient également être invoquées à cet égard.

Dans ces conditions, nos expériences montrent d'une façon indiscutable que la sulfanilamide n'a aucune influence sur l'intensité photosynthétique des algues, aussi bien sensibles (N°s 3 et 50) que résistantes (N° 116) à ce poison, lorsque ces algues sont cultivées en autotrophie.

Nous pouvons ainsi écarter l'hypothèse d'un effet cytostasique secondaire dû à un effet primaire de la sulfanilamide sur le cycle photosynthétique.

4. Essai fait en vue de lever l'inhibition due à la sulfanilamide, par adjonction d'acides aminés et de bases puriques et pyrimidiques

On suppose que l'action de la sulfanilamide, en tant qu'antagoniste de l'acide paraminobenzoïque dans le fonctionnement de l'acide folique, est, en particulier, de bloquer le système de synthèse de la méthionine et de l'adénine – ou plus exactement de l'adénosinemonophosphate – à côté d'autres composés.

Nous avons cherché à renverser l'effet de la toxicité de la sulfanilamide sur une algue sensible en ajoutant au milieu empoisonné des bases puriques et pyrimidiques, des acides aminés soufrés et un complexe d'acides aminés fourni par un hydrolysat de caséine.

En d'autres termes, nous nous proposions de substituer des bases puriques et pyrimidiques au mécanisme de biosynthèse des nucléosides, notamment de l'adénosine. Simultanément, il eût été possible de vérifier si cette adjonction compenserait l'échec de la biosynthèse de l'adénosine, bloquée par la sulfanilamide.

L'expérience a été réalisée comme suit:

Algue N° 280: *Dictyococcus cinnabarinus* (Kol et F. Chod.) Vischer
Milieu nutritif de base: Detmer/3 sans sucre.
Culture en Erlenmeyer de 100 ml.

Première opération: préparation d'une préculture de 23 jours en milieu Detmer/3 pur. Cette préculture a servi à l'inoculation des flacons d'expérience au moyen d'une quantité massive d'algues en plein développement logarithmique.

Deuxième opération: adjonction de sulfanilamide et de diverses substances au milieu. Chaque flacon est préparé avec 40 ml de milieu de culture avec les adjonctions éventuelles, puis est inoculé au moyen de 20 ml de préculture de l'algue. L'expérience porte donc sur 60 ml de milieu. La sulfanilamide est dissoute dans le milieu avant inoculation, de façon à obtenir une concentration de 1‰ dans les 60 ml du milieu, après inoculation. Les bases puriques et pyrimidiques et les acides aminés sont ajoutés en concentration telle qu'ils apportent dans la culture une quantité d'azote, sous forme organique, égale à la moitié de celle fournie, sous forme minérale, par le $Ca(NO_3)_2$, soit:

Substance	Concentration dans la culture
guanine	61 mg/l
adénine	55 mg/l
thymine	127 mg/l
cytosine	75 mg/l
uracile	113 mg/l
cystine + méthionine	135 mg/l de chacune
hydrolysat de caséine DIFCO	285 mg/l

Tableau 5

Algue 280 *Dictyococcus cinnabarinus*

Adjonction de bases puriques et pyrimidiques et d'acides aminés à des cultures imprégnées de sulfanilamide

Conditions initiales (au moment de l'introduction de 20 ml d'inoculum dans les flacons) valables pour chaque expérience:

Nombre de cellules par millimètre cube: 1400 cell. / mm^3 ± 150
Volume cellulaire frais de la culture: 243 mm^3/l
Poids sec de la culture: 41 mg/l

Estimations faites après 50 jours de culture

	Lumière										Obscurité			
Milieu de base	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3	Det/3
Sulfanilamide	Témoin	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	Témoin	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Adjonctions		—	Cas.	5 bases	Adén.	Thym.	Cyt.	Urac.	Guan.	Cys.Met.		—	5 bases	Cas.
en mg/l		—	285		55	127	75	113	61	135+135		—		285
Nombre de cellules par millimètre cube cell./mm^3	6900	1900	1900	1400	2350	1900	1800	1500	1700	1250	1750	1850	1350	1600
Vol. cell. frais de la culture mm^3/l	1151	618	850	758	733	694	728	561	990	733	382	352	498	363
Poids sec de la culture mg/l	264	116	220	212	140	132	92	104	180	92	28	44	84	40
Vol. moyen d'une algue en microns cubes μ^3	167	325	447	541	312	360	405	374	582	586	218	190	369	227
Poids sec moyen d'une algue gammas $\cdot 10^{-3}$	0,038	0,061	0,116	0,151	0,060	0,069	0,051	0,069	0,106	0,074	0,016	0,024	0,063	0,025

Pour chacune de ces adjonctions est prévu un lot de 2 flacons d'expérience.

Pour tester l'effet de la présence simultanée des cinq bases puriques et pyrimidiques, nous avons prévu un autre lot dans lequel les cinq bases ci-dessus sont mises ensemble, chacune à la concentration du tableau précédent (l'azote organique ainsi mis à la disposition de la culture est alors 2,5 fois l'azote minéral fourni).

Les flacons sont placés sur une table en verre, éclairée par en dessous en permanence par des tubes fluorescents, à une température de 20 °C et une humidité relative de 70 %. Quatre lots de flacons ont été placés à l'obscurité totale dans le même local climatisé: 1 lot témoin (Detmer/3), 1 lot avec 1 % de sulfanilamide et 2 lots avec sulfanilamide et adjonction respectivement de caséine d'une part et des cinq bases puriques et pyrimidiques d'autre part. Ces lots sont placés à l'abri de la lumière dans le but de déterminer si la sulfanilamide et/ou les substances ajoutées peuvent être utilisées par les cellules pour leur anabolisme.

Tous les flacons sont agités chaque jour, de la même façon et selon le même rythme.

Le tableau 5 donne les résultats obtenus après 50 jours de culture.

Discussion

Siva Sankar (1958) dans ses expériences sur *Neurospora crassa* en présence de sulfanilamide a pu mettre en évidence que l'acide paraminobenzoïque restaure le pouvoir de croissance du mycélium, de même que l'acide folique – ce qui est en accord avec ce que nous connaissons des antimétabolites. Il avait montré en outre que la méthionine, la valine, la leucine, la guanine, la thréonine, l'adénine et l'uracile ont peu d'effets seuls, mais qu'ils sont très actifs ensemble, autant que l'acide paraminobenzoïque (PAB). Il ajoutait que les acides aminés de la caséine pourraient avoir un rôle synergique pour d'autres acides aminés contre la sulfanilamide.

Les travaux de Chodat et Soloweitchik (1942, 1943) ont montré que l'acide paraminobenzoïque annule la toxicité de la sulfanilamide chez les algues vertes étudiées, mais qu'il ne supprime pas son rôle d'inhibiteur de la lipidogenèse. Par contre Blondel (1952) signale que l'acide folique ne protégerait pas aussi efficacement contre l'intoxication aux sulfamidés.

Chez l'algue 280, dans la présente expérience, aucune des adjonctions faites n'a annulé complètement la toxicité de la sulfanilamide. En particulier en ce qui concerne la division des cellules, l'effet cytostasique de la sulfanilamide reste entier, quel que soit la substance ou le mélange de substances ajoutées. En milieu témoin, il y a eu au moins 2 à 3 divisions cellulaires, alors qu'en milieu empoisonné il n'y en a eu pratiquement aucune, si ce n'est peut-être avec l'adénine.

Par contre, l'effet sur le volume cellulaire frais des cultures est différent:

La sulfanilamide n'arrête pas le métabolisme formateur de réserves et d'agrandissement des cellules de la culture; le volume cellulaire frais des algues intoxiquées a plus que doublé au cours de l'expérience, passant de 243 mm^3/l à 618 mm^3/l avec le poison seul et même à 850 mm^3/l avec adjonction de caséine et 990 mm^3/l avec adjonction de guanine. Cette différence est statistiquement significative. Les cellules grossissent: le volume moyen d'une cellule qui est de 167 nm^3 dans le milieu temoin passe à 325 nm^3 dans le milieu empoisonné et à 582 nm^3 avec adjonction de guanine. Cette différence a également été testée statistiquement (test *t* d'homogénéité de 2 échantillons) et trouvée significative. Ce métabolisme cytoplasmogène de la cellule ne semble pas perturbé par la sulfanilamide, tout au moins dans certaines limites; il ne paraît restreint que par la grandeur des cellules.

A l'obscurité, la croissance et le développement des algues ne montrent pas de différence entre le témoin et les milieux empoisonnés: ils sont nuls. Toutefois on constate une augmentation du volume cellulaire moyen, vraisemblablement par absorption d'eau de la cellule. L'adjonction des 5 bases puriques et pyrimidiques constitue un aliment assimilable par l'algue, alors que l'hydrolysat de caséine n'a produit aucun accroissement de poids sec de la culture.

En milieu éclairé empoisonné, l'adjonction de caséine ou des 5 bases simultanément, ainsi que de guanine, provoque une forte augmentation du poids sec d'une cellule par rapport à celui d'une algue empoisonnée par la sulfanilamide.

On peut en déduire que ce n'est pas la carence des bases puriques qui est cause de l'intoxication puisque leur adjonction ne fait pas revenir le taux de croissance au rythme normal. Quant au blocage, tel qu'il a été décrit sur le plan biochimique (lignes 6 et 7), il s'institue bien au niveau de la synthèse des bases puriques, mais à un moment où elles sont déjà couplées à un pentose. Une addition compensante de bases achevées et isolées est en définitive vaine, puisque ces bases ne se forment que dans le complexe prénucléosidique.

L'effet positif de détoxication obtenu par Siva Sankar vient de ce qu'il a joint le mélange d'acides aminés au mélange des bases, alors que nous n'avons utilisé que l'un ou l'autre de ces mélanges. Par ailleurs, Siva Sankar expérimentait avec *Neurospora crassa*.

5. *Recherches sur le mode d'action de la sulfanilamide sur la «croissance» et le «développement» des algues*

Nous avons entrepris une série d'expériences, tant sur des algues sensibles que sur des algues résistantes, pour tenter de préciser le mode d'action de la sulfanilamide en tant qu'antimétabolite, et, si possible, quelques-unes des modalités du système de compensation de l'appareil biosynthétique des algues compensantes.

Nous rapportons dans ce paragraphe les résultats des expériences d'abord pour les algues compensantes, puis pour les algues sensibles. L'exposé de ces résultats est suivi de leur discussion.

A. Algues résistant à la sulfanilamide (compensation)

Algue N° 116 (Oocystis Naegeli) Expérience 102–13

Les cultures ont été faites en ballons de 3 l, dans les milieux A, A_s, M, M_s, H et H_s. Adjonction de glucose (2%) dans les milieux H et M. La sufanilamide (1‰) a été ajoutée en début de culture. (Pour les symboles, v. chap. III, page 25. L'indice $_s$ signifie adjonction de sulfanilamide.)

L'accroissement des cultures en fonction du temps dans les différents milieux, exprimé par le nombre des cellules par millimètre cube, est représenté dans la figure 7.

Le tableau 6 donne en outre le poids sec moyen d'une cellule, la quantité d'azote organique formée par cellule, et le taux de chlorophylle rapporté au nombre de cellules de la culture (milligramme de chlorophylle par litre de culture, divisé par le nombre de cellules par millimètre cube). Nous répétons dans ce tableau le nombre total de

cellules par millimètre cube en fin de culture pour chaque milieu, afin de pouvoir plus facilement comparer les résultats relatifs à une cellule et ceux relatifs à la population tout entière.

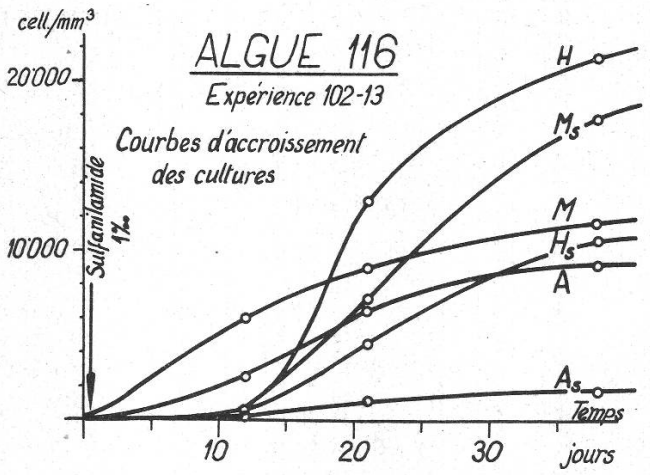


Figure 7

Tableau 6

Mesures en fin de culture (38e jour)

Milieu	Autotrophie		Mixte		Hétérotrophie	
	A	A_s	M	M_s	H	H_s
Poids sec d'une cellule gammas $\cdot 10^{-3}$	0,510	0,650	0,101	0,044	0,065	0,069
Azote organique formé par cellule gammas $\cdot 10^{-6}$	3,09	4,50	2,20	2,05	1,55	2,63
Chlorophylle formée par cellule gammas $\cdot 10^{-6}$	0,670	0,745	0,078	0,174	0,099	0,210
Nombre de cellules par millimètre cube	9250	1700	11 750	17 850	21 500	10 650

Discussion

a) Courbes d'accroissement de la culture

Nous constatons tout d'abord qu'en milieu mixte, l'algue «compense» totalement, puisque le nombre de cellules en milieu M_s est plus grand, à la fin de la culture, qu'en milieu M. Toutefois, il y a eu, en milieu empoisonné, une période de lag de plus longue durée qu'en milieu sans sulfanilamide: l'algue 116 a d'abord son développement freiné par la présence de cet antimétabolite; elle compense ce freinage et finit

par rattraper la culture non empoisonnée. Ce résultat est tout à fait conforme à ceux obtenus par Blondel (47).

En milieu hétérotrophe, l'algue «compense» plus difficilement semble-t-il le nombre de cellules en milieu H_s en fin de culture n'a pas dépassé ni même rattrapé celui en milieu H. Remarquons que les deux courbes présentent une longue période de lag assez semblable (voir fin du chap. III).

En milieu purement autotrophe, la compensation est moins bonne encore, bien qu'elle soit assez marquée toutefois. La sulfanilamide a été ajoutée en début de culture; les algues ont subi 7 divisions en moyenne en milieu A_s contre un peu plus de 10 en milieu A. On peut dire que l'algue a réagi au poison et partiellement compensé son effet cytostasique, sans parvenir en 38 jours à le faire complètement.

b) Azote organique synthétisé et poids sec des cellules

On constate que les cellules en milieu glucosé (M, M_s, H et H_s) contiennent beaucoup moins d'azote organique qu'en milieu minéral pur (A et A_s). Par contre le nombre des cellules dans ces cultures en milieu glucosé est beaucoup plus élevé qu'en milieu autotrophe. En outre, en milieu A_s, les algues contiennent plus d'azote organique formé qu'en milieu A et leur poids sec est aussi plus élevé en A_s qu'en A. Tout se passe comme si les cellules en milieu A_s avaient accumulé des réserves pour organiser leur prochain cycle de division.

Un résultat très net de cette expérience est que l'algue 116 en milieu glucosé, empoisonné ou non, a un poids sec et une réserve d'azote organique beaucoup plus faibles qu'en milieu autotrophe. Tout se passe comme si, avec une source de carbone hétérotrophe, l'algue dirigeait son métabolisme surtout dans le but de procéder à la division des cellules et qu'en milieu carboautotrophe, elle l'oriente dans le sens d'une accumulation de réserves organiques.

c) Quantité de chlorophylle synthétisée et conservée

Les essais de Blondel (1952) avaient montré que: «Les algues traitées aux sulfamidés et qui leur résistaient (plus ou moins bien) devenaient plus vertes et le restaient beaucoup plus longtemps que les cellules témoins.»

Les résultats de cette expérience 102–13 montrent que cet effet de conservation de la chlorophylle intracellulaire est très marqué, beaucoup plus d'ailleurs dans les milieux glucosés que dans les milieux autotrophes. Toutefois on remarque que les cellules en hétérotrophie, pour lesquelles la photosynthèse ne constitue pas une stricte nécessité, renferment beaucoup moins de chlorophylle que les cellules en autotrophie (6 à 10 fois moins) sans sulfanilamide.

On peut donc dire que l'algue 116 est capable de «compenser» l'effet de la sulfanilamide; mais cette compensation est nuancée selon le mode de culture de l'algue et les sources d'énergie et d'aliments qui lui sont fournis. L'hétérotrophie à la lumière (M_s) permet une compensation beaucoup plus rapide que celle à l'obscurité ou que l'autotrophie.

On remarque également la profonde différence qui existe entre la carboautotrophie et la carbohétérotrophie (v. chap. III). Si nous reprenons les définitions de «croissance et développement» que nous avons posées au chapitre II, § 5, nous pouvons dire que:

La carboautotrophie favorise surtout la «croissance» de la culture (accumulation de réserves carbonées et azotées dans la cellule, mais petit nombre de cellules au total).

La carbohétérotrophie permet un développement plus rapide de la culture (nombre total de cellules très élevé, mais chaque cellule possède peu de réserves azotées et carbonées).

Enfin la présence de sulfanilamide procure à l'algue 116 une protection efficace contre la destruction de la chlorophylle in vivo. Il est possible que cette protection soit purement physique, la sulfanilamide, par son absorption de l'énergie des rayons lumineux et son oxydation subséquente prévenant la destruction par photooxydation de la chlorophylle; mais cette action protectrice peut aussi être d'origine enzymatique. Cette expérience ne nous permet pas de conclure à ce sujet.

Algue N° 516 (Oocystis sp.) Expérience 102–27

La culture de cette algue a été faite en milieu Detmer/3 minéral pur. Il n'y a donc plus ici de comparaison avec les milieux *H* et *M*.

La sulfanilamide a été ajoutée dans le milieu de culture le 24e jour à raison de 1 g/l.

La figure 8 montre l'allure des courbes représentant la multiplication des cellules dans la culture et l'évolution dans le temps du poids sec des cultures.

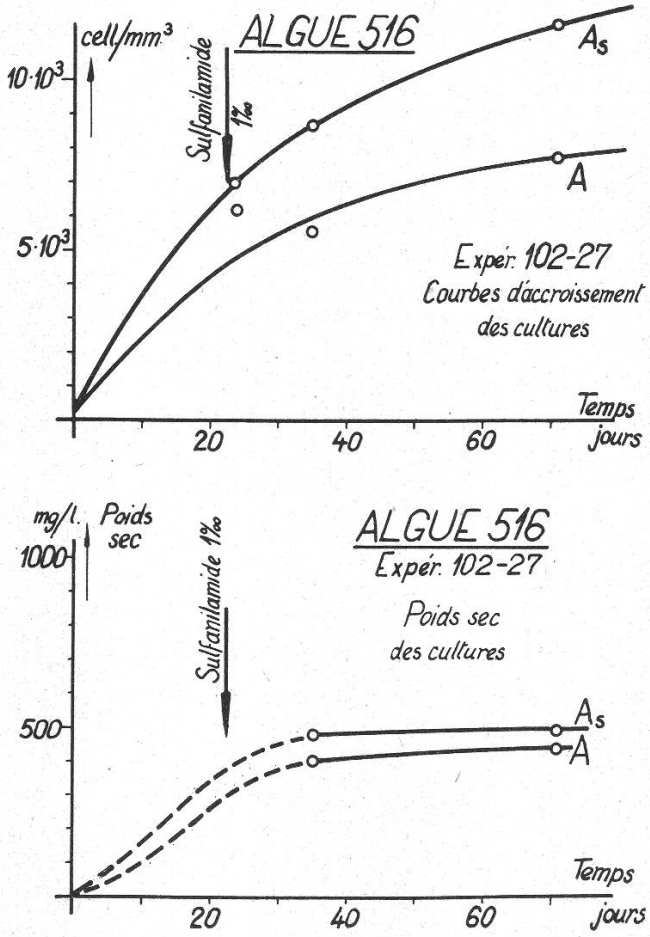


Figure 8

La figure 9 donne la courbe représentative du volume cellulaire frais et de la quantité d'azote non consommé restant dans le milieu sous forme de nitrates ou de nitrites.

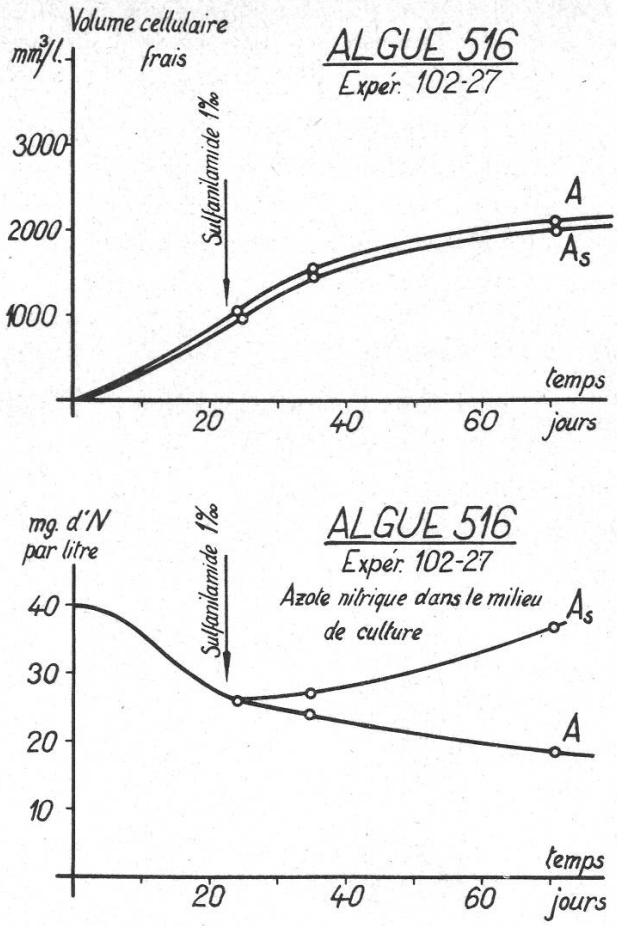


Figure 9

Le tableau 7 nous indique en fin de culture (71e jour) quels sont les taux de chlorophylle par cellule, le poids sec d'une cellule, son poids frais et l'azote organique accumulé en moyenne par une cellule.

Tableau 7

Expérience 102–27

Milieu	A	A_s
Poids sec d'une cellule gammas · 10^{-3}	0,614	0,403
Volume cellulaire frais d'une cellule microns ^{3}	300	172
Azote organique formé par cellule gammas · 10^{-6}	4,82	2,10
Chlorophylle formée par cellule gammas · 10^{-6}	1,09	1,66

Discussion

Les résultats obtenus avec l'algue 516 sont très proches de ceux obtenus avec l'algue 116, ce qui est naturel pour deux souches de la même espèce. On remarque cependant certaines différences notables.

a) Croissance et développement de la culture

L'algue 516 compense mieux que 116 et cette compensation est pour ainsi dire instantanée: on ne constate pas pour les cellules empoisonnées, par rapport aux cellules témoins, de retard dans la courbe d'accroissement; au contraire, la multiplication des cellules semble plus rapide dans le milieu empoisonné. Par contre, poids sec et volume cellulaire frais évoluent tout à fait parallèlement. On pourrait dire que la «croissance» des cellules n'est pas modifiée par la présence de sulfanilamide, mais que leur développement en est légèrement accéléré. Toutefois il faut remarquer que les cellules en milieu témoin ont un poids sec et un volume cellulaire, de même qu'un taux d'azote organique formé moyens plus élevés que les cellules ayant reçu la sulfanilamide. Il n'est pas invraisemblable d'estimer que les cellules en milieu témoin étaient dans un état de prédivision et celles en milieu empoisonné en état de postdivision, hypothèse qui nous paraît fortement étayée par le fait que les poids secs et frais des colonies sont semblables et que seul le nombre des cellules diffère.

Le poids sec d'une cellule de l'algue 516 est voisin de celui de l'algue 116 dans les mêmes conditions.

b) Synthèse et conservation de la chlorophylle

La quantité de chlorophylle par cellule au 71e jour est nettement plus grande dans le milieu empoisonné que dans le milieu témoin; cette différence est encore plus nette si l'on fait le rapport entre le taux de chlorophylle dans une cellule et le poids sec de cette cellule (rapport exprimé en pourcent):

$$\text{En milieu témoin:} \quad \frac{\text{chlorophylle}}{\text{poids sec}} = 0{,}178\,\%$$

$$\text{En milieu sulfamidé:} \quad \frac{\text{chlorophylle}}{\text{poids sec}} = 0{,}412\,\%$$

Ce résultat est net, bien que l'azote organique soit plus fort en milieu A_s qu'en milieu A. La présence de sulfanilamide dans le milieu se marque par la présence d'une quantité plus grande de chlorophylle dans les algues (conservation meilleure ou synthèse plus élevée). La planche 1 de photographies met bien en évidence cet effet remarquable de conservation de la chlorophylle et surtout du chloroplaste qui semble protégé contre la dégénérescence graisseuse caractéristique du vieillissement des cellules.

c) Consommation de l'azote nitrique du milieu

On remarque dans la figure 9 que l'azote minéral du milieu de culture n'est plus utilisé par l'algue en présence de sulfanilamide. Cette observation, nouvelle dans le cadre de cette étude, valable pour des algues compensantes, sera confirmée plus loin dans l'étude des algues sensibles.

L'algue 516 peut donc être considérée comme une algue parfaitement résistante, c'est-à-dire «compensante». L'adjonction de sulfanilamide au milieu de culture ne modifie pas la croissance ni le développement des cultures. Par contre, elle agit sensiblement sur le taux de chlorophylle qui est plus élevé en fin de culture et sur l'assimilation des nitrates qui est supprimée.

La question peut se poser de savoir si, contrairement aux travaux de Blondel (1952, p. 137), mais en confirmation de ceux de Chodat et coll., la sulfanilamide ne joue pas un rôle en tant que source d'azote pour la cellule. Nos expériences ne nous permettent pas de conclure sur ce point.

Algue N° 50 (Stichococcus diplosphaera) Expérience 102–23

Cette algue d'une espèce totalement différente, dont nous avons montré qu'elle était compensante, mais d'une façon moins efficace que l'algue *Oocystis*, a été cultivée en milieu Detmer/3, en ballons de 3 l. Adjonction de sulfanilamide le 20e jour (1‰).

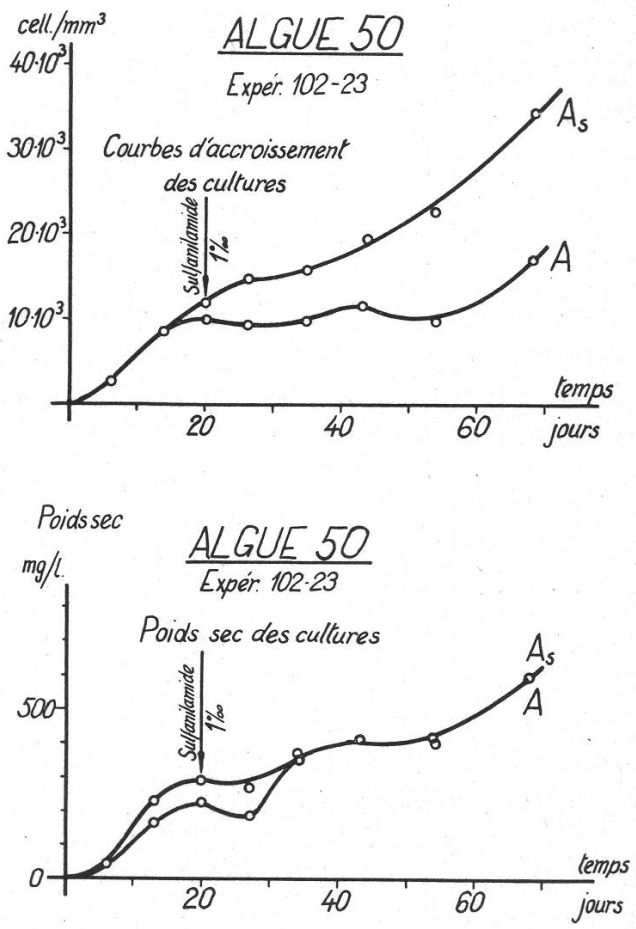


Figure 10

Les figures 10 et 11 montrent l'allure des courbes représentant l'évolution du nombre des cellules par millimètre cube de la culture, celle du poids sec et du volume cellulaire frais de la culture, ainsi que celle de l'azote minéral du milieu de culture.

Le tableau 8 donne la quantité de chlorophylle totale par litre de culture et la quantité de chlorophylle par cellule en fin de culture (43e, 54e et 68e jour).

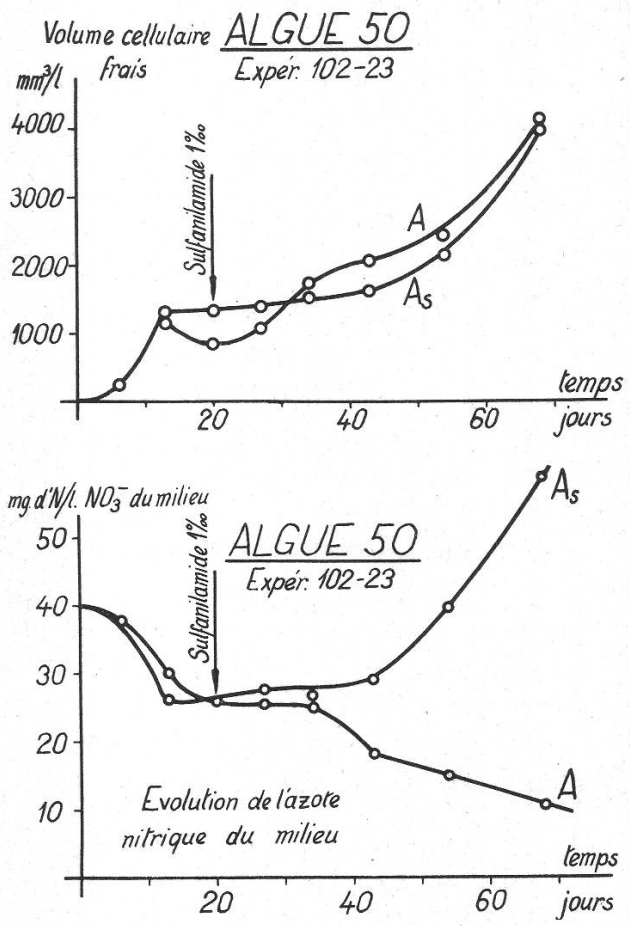


Figure 11

Tableau 8

Jours	43e jour		54e jour		68e jour	
Milieu	*A*	A_s	*A*	A_s	*A*	A_s
Quantité totale de chlorophylle mg/l	1,328	2,54	0,812	1,388	0,647	0,362
Quantité de chlorophylle par cellule gammas · 10^{-6}	0,117	0,129	0,084	0,061	0,038	0,010

La planche 2 nous montre l'allure des cellules aux 20e, 34e et 68e jours de la culture.

Discussion

Les résultats obtenus avec cette nouvelle espèce sont analogues à ceux obtenus avec les autres espèces compensantes, sauf en ce qui concerne la conservation de la chlorophylle.

a) Croissance et développement de la culture

Les courbes correspondant au nombre de cellules par millimètre cube, au poids sec et au poids frais de la culture, ont exactement le même aspect que celles reportées ci-dessus pour l'algue 516. Après l'adjonction de sulfanilamide au 20e jour, les cellules en milieu empoisonné se multiplient aussi bien que celles en milieu témoin. Le rythme de multiplication est même supérieur en milieu sulfamidé; poids sec et volume cellulaire frais de la culture évoluent exactement de la même façon chez les témoins et les traitées.

On pourrait donc dire que la «croissance» (au sens où nous l'entendons) de l'algue 50 n'est pas modifiée alors que son développement serait accéléré par la présence de sulfanilamide. Toutefois, la seule expérience que nous avons réalisée avec cette algue ne nous permet pas de conclure sur ce dernier point.

b) Conservation de la chlorophylle

L'évolution de la chlorophylle dans les cellules ne présente aucune analogie dans ce milieu autotrophique avec celle que l'on constatait pour les algues 116 ou 516: le taux de chlorophylle reste le même en milieu témoin et empoisonné, et la chute du taux de chlorophylle dans le temps est semblable dans les deux milieux. Il n'y a donc pas pour cette algue, pourtant résistante aux sulfamidés, d'effet de conservation de la chlorophylle. Cette résistance, observée pour les algues 116 et 516 *(Oocystis)* serait donc une propriété spécifique due au caractère héréditaire des propriété de la cellule et de son métabolisme vis-à-vis de la sulfanilamide. La conservation de la chlorophylle serait donc vraisemblablement sans relations avec le caractère de résistance aux sulfamidés, bien que toutes deux se manifestent en présence de sulfanilamide.

c) Consommation de l'azote minéral dans le milieu de culture

De même que pour l'algue 516, nous constatons que, dès l'adjonction de la sulfanilamide, l'azote nitrique du milieu n'est plus utilisé. Le relèvement de la courbe en fin de culture est le résultat d'une concentration du milieu par suite de l'évaporation de l'eau. La sulfanilamide semble donc bien avoir un effet sur l'assimilation de l'azote nitrique au niveau de son absorption par la membrane cellulaire.

L'algue 50 est donc une algue compensante, qui résiste à la sulfanilamide; le rythme de division des cellules n'est pas affecté par la présence du poison. Par contre, la présence de sulfanilamide ne protège pas cette espèce d'algues contre la disparition de la chlorophylle.

B. Algues sensibles à la sulfanilamide

Algue N° 3 (Scenedesmus obtusiusculus) Expérience 102–9

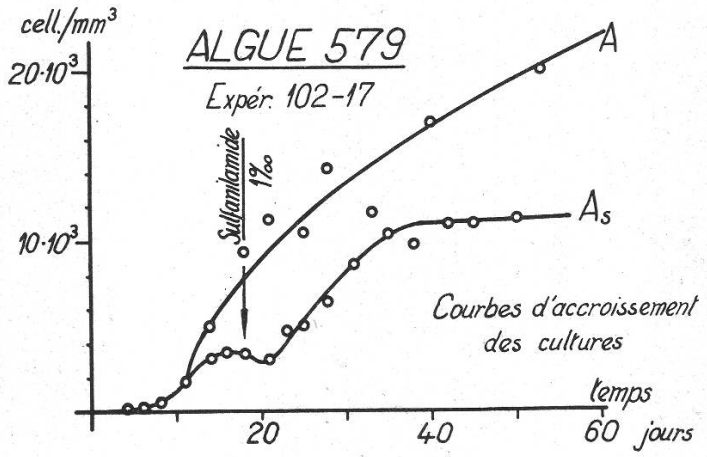
Cette algue a été cultivée dans le milieu de base Detmer/3. L'adjonction de glucose à l'obscurité ou à la lumière nous donne les trois types de milieux suivants: A et A_s; H et H_s; M et M_s. Pour les cultures en milieux éclairés (A et A_s; M et M_s), deux intensités d'éclairage différentes ont été expérimentées (mesures en lux au moyen du luxmètre Lange). La sulfanilamide est ajoutée au milieu de culture dès le début de la culture.

Le tableau 9 donne les résultats de l'analyse au bout de huit semaines de culture.

Tableau 9

Milieu de culture	A	A_s	A	A_s	M	M_s	M	M_s	H	H_s
Eclairement lux	770	870	6900	6400	820	860	6600	6300	0	0
Nombre de cellules par millimètre cube	12 450	1000	15 800	0	39 000	30	34 500	190	9200	200
Couleur de liquide intercellulaire	sans coul.	brun	sans coul.	brun	sans coul.	brun	sans coul.	brun	sans coul.	sans coul.

La signification des symboles désignant les milieux de culture est donnée au chapitre III.



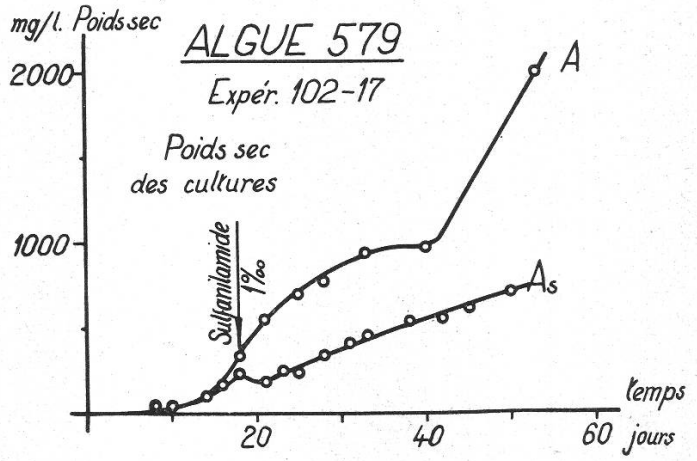


Figure 12

Discussion

L'algue N° 3 est tout à fait sensible à l'action de la sulfanilamide et ceci tout particulièrement dans les milieux hétérotrophiques: à la lumière, comme à l'obscurité, en présence de glucose il n'y a aucune multiplication des cellules appréciable. En auto-

trophie à faible lumière, on constate dans un cas qu'il pourrait y avoir éventuellement un tout petit départ de multiplication; insuffisant cependant pour parler de résistance. L'algue N° 3 imprégnée de sulfanilamide dès l'inoculation est incapable de compenser les effets cytostasique de cette dernière.

Nous pouvons constater dans cette expérience que l'oxydation de la sulfanilamide s'effectue aussi lorsque la culture ne se développe pas. Il s'agit donc bien là d'une photooxydation par la lumière et non d'une oxydation enzymatique par les cellules de la colonie.

Algue N° 579 (Chlorella rubescens) Expérience 102–17

Cette algue a été cultivée en milieu Detmer/3 purement minéral, en ballons «phycogènes» de 3 l contenant 1,8 l de milieu. La sulfanilamide a été ajoutée au milieu de culture le 18e jour de la croissance, toujours à raison de 1 g/l. Milieu de culture aéré et agité, éclairé selon les conditions standards décrites au chapitre II.

Les figures 12 et 13 montrent l'allure des courbes représentant, en fonction du temps, l'évolution: du nombre des cellules par millimètre cube, du poids sec et du volume cellulaire frais de la culture, de l'azote organique formé par les algues.

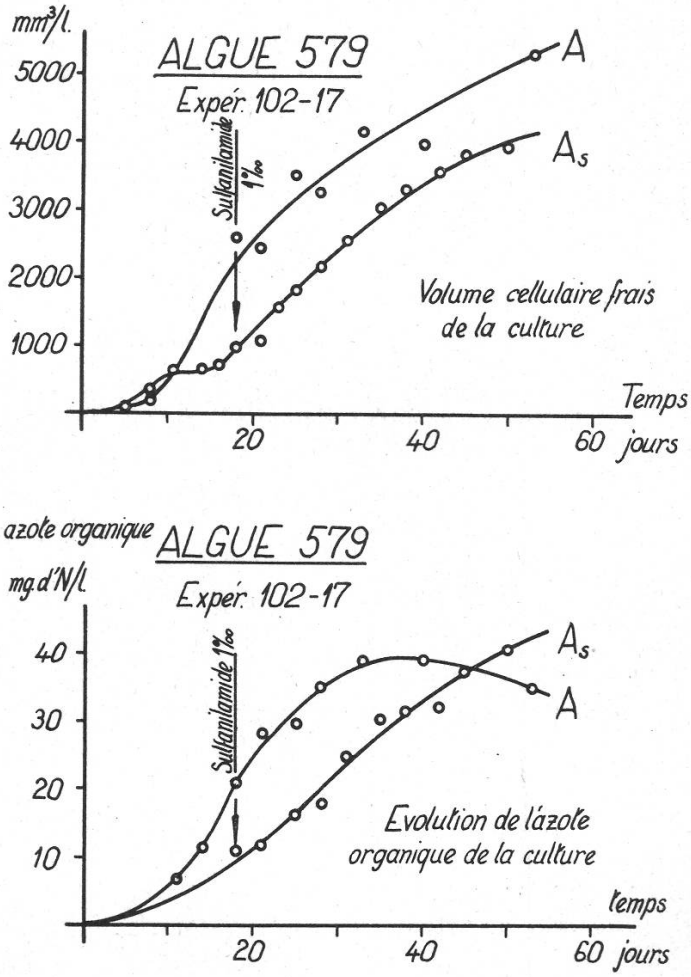


Figure 13

Discussion

Cette expérience a été réalisée avec adjonction de sulfanilamide après le départ de la multiplication des cellules. Les résultats observés présentent alors des caractéristiques remarquables:

a) Division des cellules de la culture («développement»)

Dans le milieu empoisonné, le nombre des cellules de la culture continue à augmenter pendant un certain temps après l'introduction de sulfanilamide, environ jusqu'au 35e jour. Le nombre des cellules est alors environ le double de ce qu'il était au moment de l'empoisonnement. Les divisions cessent à ce moment-là et le nombre des cellules reste stationnaire (environ 10500 cellules par millimètre cube). La sulfanilamide n'a donc pas un effet cytostasique immédiat, mais retardé. Ce phénomène est caractéristique d'une action du poison sur une étape intermédiaire des processus de formation des matériaux caryologiques ou plasmatiques nécessaires au doublement du matériel vivant de la cellule. La sulfanilamide n'a donc pas un effet sur les processus mêmes, les diverses phases de la division de la cellule. C'est, chez les algues aussi, un effet essentiellement biochimique.

b) Augmentation du poids sec et du volume cellulaire frais de la culture et synthèse intracellulaire de l'azote organique («croissance»)

L'adjonction de sulfanilamide n'a absolument pas stoppé la «croissance» de la culture, c'est-à-dire l'accumulation de réserves minérales et organiques au sein des cellules; tout au plus peut-on remarquer un certain retard dans le fonctionnement des cellules empoisonnées. Malgré l'arrêt des divisions cellulaires au 35e jour, le poids sec et le volume cellulaire frais de la culture avec sulfamidé ont continué à évoluer normalement et parallèlement au témoin jusqu'à l'interruption de la culture. Il en est de même de l'assimilation de l'azote minéral et sa transformation en azote organique: elles s'effectuent jusqu'à épuisement complet des réserves d'azote minéral du milieu Detmer/3.

On peut tirer de cette expérience la constatation que chez cette algue sensible la sulfanilamide est un agent qui inhibe secondairement le «développement» des algues mais n'en empêche pas la «croissance»: les phénomènes d'accumulation de réserves énergétiques et matérielles ne sont pas touchés, ou tout au moins ils continuent à s'effectuer, avec peut-être un certain ralentissement, alors que les phénomènes de division des cellules finissent par s'arrêter.

Le phénomène du doublement du nombre des cellules après empoisonnement pourrait s'expliquer par le fait que les cellules ont pu accumuler des réserves suffisantes des matériaux caryologiques indispensables pour permettre ce doublement des cellules; chaque cellule possédait, au moment de l'adjonction de sulfanilamide, une réserve de nucléotides suffisante pour une caryocinèse.

Algue N° 280. Dictyococcus cinnabarinus

Cette algue dont le comportement physiologique est très délicat est très sensible aux carences d'azote, ce qui se marque surtout par une disparition rapide de la chlorophylle dans les cellules au bout d'un certain temps.

Expérience 102–15

Dans cette première expérience, l'algue a été cultivée en milieu minéral pur (A et A_s), et en milieu minéral additionné de glucose (2 %), dit milieu mixte (M et M_s), dans des ballons de 3 l, avec agitation et aération.

La figure 14 montre les courbes de variation avec le temps du nombre de cellules par millimètre cube et du poids sec de ces cultures.

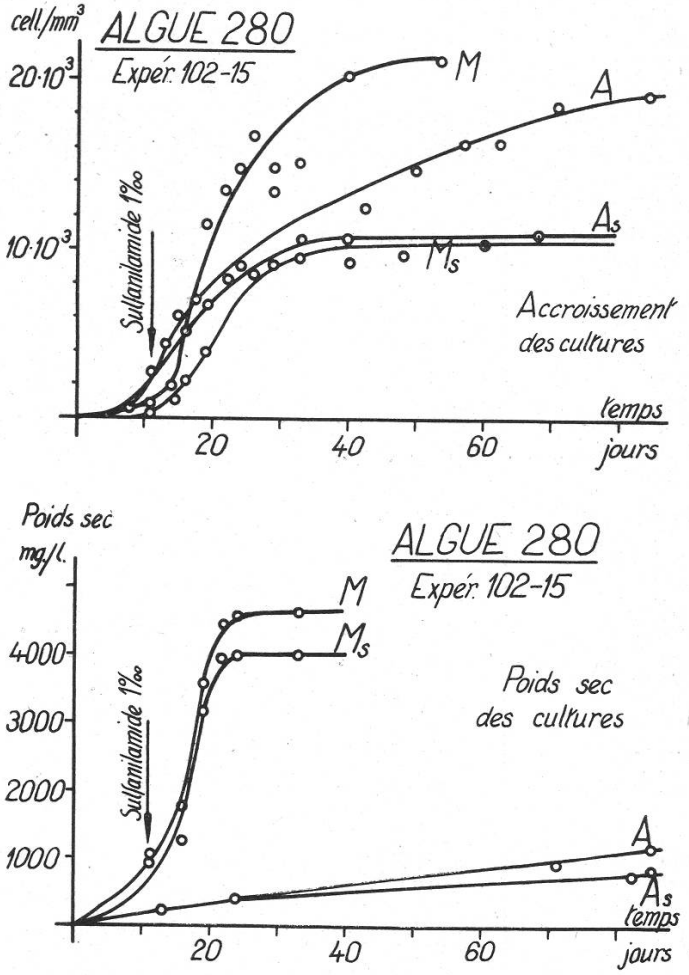


Figure 14

Discussion

a) Cultures en milieu autotrophique pur (A et A_s)
c'est-à-dire milieu Detmer/3 sans adjonction de source exogène de carbone organique.

La photosynthèse est le seul mécanisme de fourniture d'énergie et d'aliments carbonés.

Après introduction de la sulfanilamide, et d'une manière tout à fait analogue à celle constatée ci-dessus avec l'algue 579, les divisions se poursuivent pendant environ 15 jours; le nombre des cellules triple, puis les divisions cessent et leur nombre reste constant pour tout le reste de la culture.

Le poids sec, lui, ne cesse pas d'augmenter, mais son accroissement est plus lent en milieu empoisonné que dans le témoin.

Il y a de nouveau disjonction entre «croissance» et «développement»; la première n'est pas stoppée par la sulfanilamide; le second cesse lorsque les réserves de matériaux caryologiques ont été épuisées.

b) Cultures en milieu mixte (*M* et M_s)

c'est-à-dire en milieu Detmer/3 additionné de 2% de glucose, à la lumière.

Nous remarquons tout d'abord que le poids sec de la culture augmente beaucoup plus rapidement. Nous pouvons raisonnablement en conclure que la source exogène de carbone organique est utilisée beaucoup plus rapidement par la culture que la source autotrophe (CO_2).

La cytostasie s'effectue dans ce cas également après un certain délai d'une vingtaine de jours; toutefois, dans ce cas, le poids sec de la culture cesse aussi d'augmenter. On pourrait en conclure que, dans le cas de l'hétérotrophie, la sulfanilamide fait cesser l'assimilation de réserves énergétiques et pondérables. Nous pensons qu'il s'agit là d'un effet dépendant de l'épuisement des réserves carbonées du milieu: le régime d'hétérotrophie provoque chez ce *Dictyococcus* un appauvrissement des chloroplastes en chlorophylle suivi d'une dégénérescence caroténigène de ceux-ci; lorsque les réserves exogènes de carbone organique sont épuisées, il ne reste plus de chlorophylle pour permettre à la photosynthèse de prendre le relais et la formation des réserves («croissance») cesse par absence de photosynthèse.

Il n'est donc pas possible de tirer des conclusions positives de cette expérience faite en milieu mixte.

Une observation remarquable peut être reportée ici: en milieu purement autotrophe, la période de lag est nettement plus brève qu'en milieu mixte. Le «développement» des cultures, c'est-à-dire la division des cellules, se ferait beaucoup plus efficacement en autotrophie qu'en hétérotrophie, alors que c'est l'inverse qui se produit en ce qui concerne la «croissance» (augmentation de poids sec).

c) Evolution de la chlorophylle dans les cellules en milieu minéral carboautotrophique

En fin de culture, en milieux *A* et A_s, le dosage des chlorophylles nous a donné les résultats suivants (en milligrammes de chlorophylle par litre de culture):

Milieu autotrophique pur	7,88 mg/l
Milieu autotrophique + sulfanilamide	1,47 mg/l

Dans le cas de cette algue sensible aux sulfamidés, sur le plan de la reproduction caryocinétique, il n'y a aucun effet de conservation de la chlorophylle par la sulfanilamide.

Cette remarque nous confirme les observations faites précédemment au sujet de l'algue 50. Le phénomène de conservation de la chlorophylle par les sulfamidés serait un effet de ceux-ci sans relations directes avec le caractère de résistance ou sensibilité cytostasique aux sulfamidés.

Algue N° 172. Pleurococcus

Nous avons consacré à cette espèce deux expériences qui nous ont permis de mieux

encore mettre en évidence les caractéristiques du développement des algues sensibles, que nous avions observées avec les autres espèces.

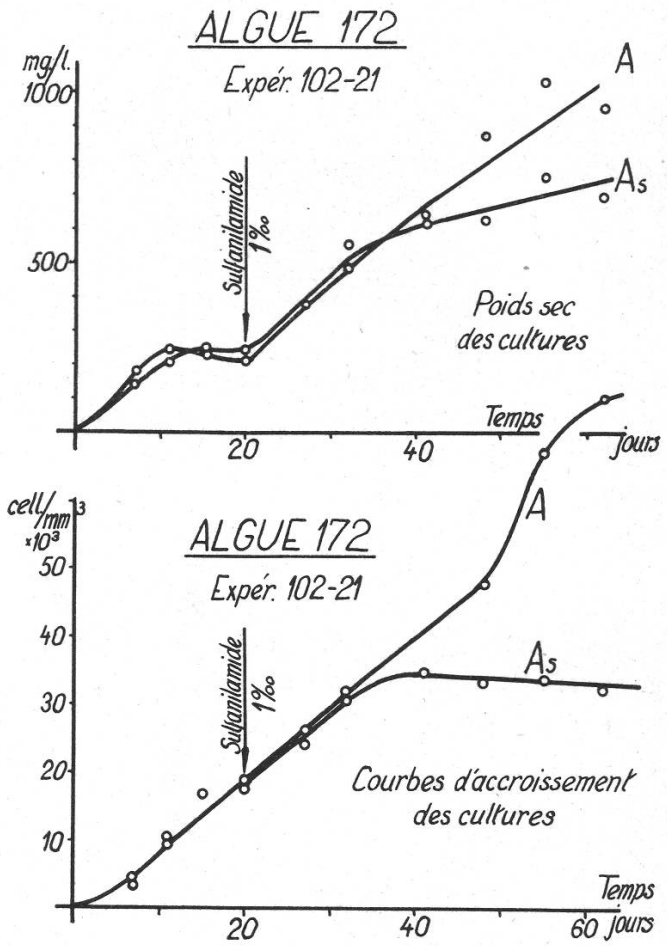


Figure 15

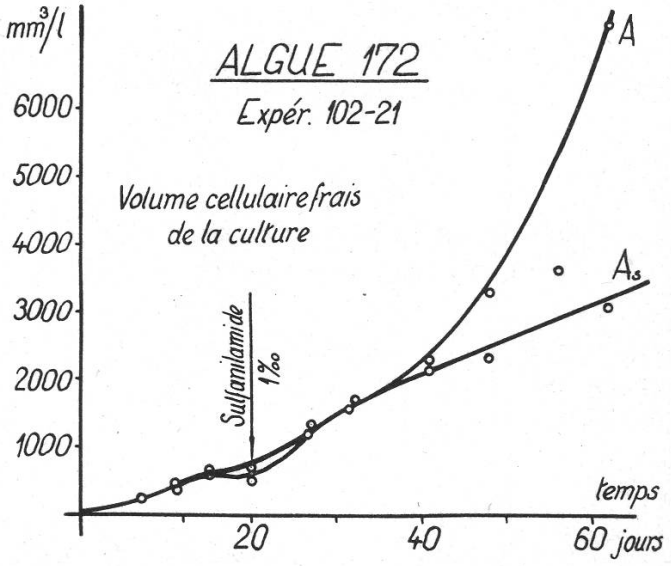


Figure 16

Expérience 102–21

Les cultures, effectuées dans des ballons de 3 l, avec 1,8 l de milieu aéré et agité, ont évolué conformément aux courbes des figures 15, 16 et 17 représentant respectivement le nombre de cellules par millimètre cube, le poids sec et le volume cellulaire frais de la culture en fonction du temps, ainsi que le volume moyen et le poids sec moyen d'une cellule. La planche 3 nous montre, à différents stades de la culture, l'aspect des cellules au microscope.

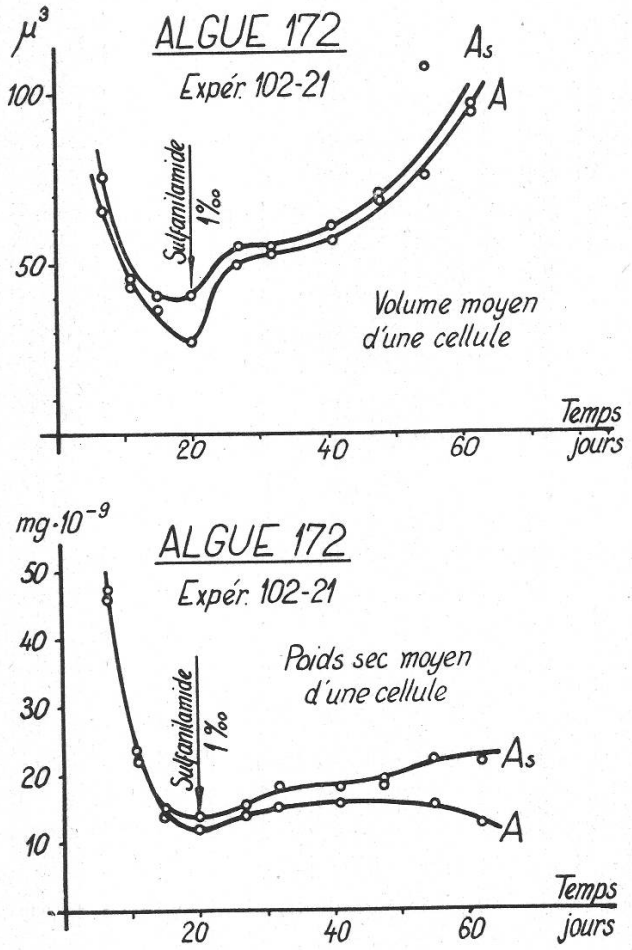


Figure 17

Discussion

L'étude assez approfondie de cette algue nous révèle certains aspects du comportement des algues sensibles que nous n'avions pas encore mis en évidence avec les autres espèces sensibles aux sulfamidés.

a) «Développement» des algues

Nous retrouvons dans cette première expérience, comme dans les deux suivantes, le même phénomène que pour les autres algues sensibles, à savoir que le nombre des cellules augmente encore pendant une vingtaine de jours après empoisonnement des

cultures, puis cesse après que le nombre en a à peu près doublé (17 500 par millimètre cube au 20e jour; 34 700 par millimètre cube au 40e jour). Il y a donc bien cystostasie, mais retardée, ce retard étant probablement dû à l'existence de réserves de matériaux caryologiques dans les cellules en pleine activité.

b) «Croissance» des algues

Ici aussi, nous constatons que le poids sec et le volume cellulaire frais des cultures empoisonnées continuent à augmenter, même après l'arrêt des divisions cellulaires, en conformité avec nos précédentes observations. La cytostasie n'empêche donc pas l'accumulation de réserves énergétiques dans les cellules (poids sec).

Nous avons toutefois poussé plus loin notre étude pour tenter de voir ce qui se passe au niveau de chaque cellule. Les courbes représentant le volume moyen d'une cellule au cours du temps sont remarquablement parallèles dans les milieux témoin et empoisonné. Le volume moyen (ou moyenne du volume des cellules) commence par diminuer pour atteindre un minimum au 20e jour, puis augmente à nouveau, selon une loi plus ou moins logarithmique jusqu'à la fin de la culture. Le poids frais des cellules évolue donc de la même façon dans les deux cas; la sulfanilamide ne semble que très peu modifier l'évolution moyenne des cellules de l'algue N° 172.

Si nous étudions par contre l'évolution du poids sec d'une cellule, nous trouvons une courbe ayant à peu près la même allure générale avec diminution rapide du poids sec d'une cellule durant les vingt premiers jours de la culture, suivie d'une légère augmentation. Toutefois, en fin de culture, il apparaît bien que les cellules ayant reçu de la sulfanilamide ont une accumulation plus forte de matières sèches, donc de réserves d'énergie, que les cellules témoins. Ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une disjonction entre la «croissance» et le «développement» de ces algues.

c) Effets tératologiques de la sulfanilamide

L'adjonction de sulfanilamide a produit, sur certaines cellules, des effets tératologiques qui se remarquent parfaitement sur les photographies de la planche 3: certaines cellules des cultures traitées sont nettement plus allongées que les cellules témoins: leur longueur est égale à environ trois fois leur largeur, alors que le rapport longueur/largeur des cellules témoins va de 1 à 2. Une telle observation nous paraît en parfait accord avec notre hypothèse rappelée ci-dessus: les cellules sont devenues incapables de se diviser; elles n'en continuent pas moins l'assimilation chlorophyllienne, et l'augmentation des réserves se marque par l'augmentation de la taille de la cellule.

Expérience 102–26

Cette dernière expérience a confirmé l'ensemble des résultats discutés ci-dessus concernant l'algue N° 172. Nous n'en donnons pas les résultats détaillés si ce ne sont deux photographies (planche 4) des algues au 71e jour de la culture, pour montrer d'autres figures tératologiques obtenues par le traitement à la sulfanilamide.

Dans le but de tenter d'éclaircir le mode d'action de la sulfanilamide sur la physiologie de cette algue, nous avons effectué au cours de cette expérience 102–26 une troisième culture qui avait reçu au 20e jour de la colchicine à raison de 0,1‰ (100 mg par litre); on sait que celle-ci a un effet antimitotique. A notre grande surprise, elle s'est comportée, à cette dose, comme un accélérateur de croissance; les cellules traitées à la colchicine se sont développées à un rythme beaucoup plus élevé que le témoin,

ainsi qu'en témoigne la courbe de développement de la figure 18. En même temps, l'azote minéral du milieu était consommé plus rapidement. Les cellules étaient petites, de forme très régulière et avec une architecture très particulière (planche 3).

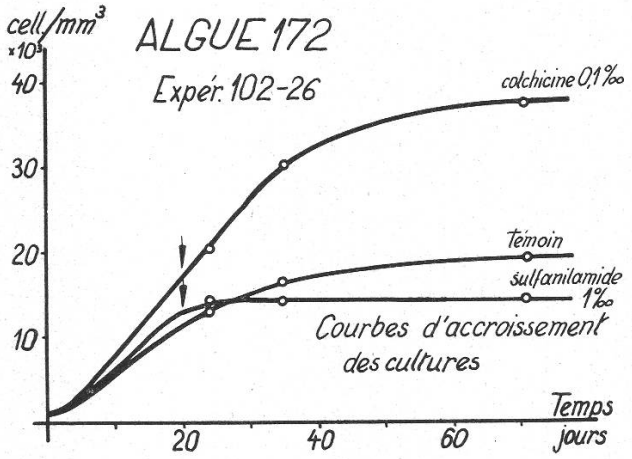


Figure 18

Nous n'avons pas d'explication concernant le comportement paradoxal de cette algue vis-à-vis de la colchicine; nous tenions à signaler ici ce remarquable résultat.

V. Conclusions

1re partie

Lorsque les deux systèmes de biosynthèse carboautotrophique et carbohétérotrophique fonctionnent simultanément dans une culture d'algues, le rendement de chacun d'eux est moins bon que s'il fonctionnait seul dans une culture soit purement autotrophique, soit purement hétérotrophique.

En d'autres termes: Il se produit dans les cellules en régime mixte des interférences dans l'utilisation des deux sources d'énergie, conduisant à une mauvaise utilisation de l'énergie totale mise à disposition de la cellule.

Ou encore: Le rendement global de l'utilisation des énergies carboautotrophe et carbohétérotrophe en régime mixte est moins bon que la somme des rendements d'utilisation de ces deux formes d'énergie en régime *A* et en régime *H* purs, respectivement.

Cette conclusion est l'inverse de celle que nous avions obtenue par l'analyse arithmétique des dénombrements de cellules en Erlenmeyers.

L'hétérétrophie modifie assez profondément les processus physiologiques des algues normalement autotrophes.

2e partie

Les résultats des expériences effectuées ont été discutées au fur et à mesure. Nous n'y reviendrons pas, si ce n'est pour résumer les observations essentielles faites:

1. La sulfanilamide n'a aucun effet direct sur le pouvoir photosynthétique des algues, aussi bien sensibles que résistantes.
2. L'adjonction au milieu de culture d'acides aminés isolés ou groupés ou celle de bases puriques et pyrimidiques isolées ou groupées n'empêche pas l'action cytostasique de la sulfanilamide sur les algues sensibles.
3. L'effet protecteur de la sulfanilamide sur la chlorophylle ne se marque que dans le genre *Oocystis* (algues qui compensent).
4. La présence de sulfanilamide stoppe l'assimilation par les algues, sensibles ou résistantes, de l'azote minéral (ion nitrique): la concentration des nitrates dans la solution nutritive demeure pratiquement inchangée après adjonction tardive de sulfanilamide. Il n'est pas possible de dire encore si cet arrêt est une conséquence d'une modification de la perméabilité ou un effet de blocage sur quelque autre système enzymatique concernant la réduction des nitrates; on peut encore invoquer le caractère nutritif compétitif de la sulfanilamide à l'égard de l'offre nitrique. Rappelons à cet égard que la fonction amide du toxique semble utilisable par l'algue. La poursuite des synthèses de protides, postérieure à l'intoxication, en serait une nouvelle démonstration.
5. Chez les algues sensibles, la sulfanilamide stoppe le «développement» (divisions) mais pas la «croissance» (nutrition ou augmentation des réserves énergétiques de ces algues).
6. L'hétérotrophie modifie indirectement, par rapport à l'autotrophie, les réactions des algues vis-à-vis de la sulfanilamide.
7. L'oxydation de la sulfanilamide qui est essentiellement une photooxydation ne lui enlève pas ses propriétés cytostasiques.

Notre travail ne serait pas complet s'il ne comprenait pas en conclusion certaines critiques ou autocritiques utiles à une éventuelle poursuite de ces travaux.

Les algues vertes ont un taux de croissance relativement lent: selon Myers (49), pour *Chlorella pyrenoïdosa*, ce taux de croissance est sept fois plus faible (à la lumière, avec CO_2 et NO_3) que celui des levures *(Willia anomala)*, quarante fois plus faible que celui d'*Escherichia coli* et vingt fois plus que celui de *Pseudomonas fluorescens*.

Le nombre des cellules ne croît donc qu'assez lentement, surtout si l'on ne se situe pas dans les conditions de croissance maximum, et les discussions portant sur le nombre des cellules dénombrées par millimètre cube doivent être faites avec beaucoup de prudence. Malgré tout le soin apporté à l'inoculation d'un nombre bien déterminé et identique de cellules dans les flacons d'expérience, une erreur de 10% sur ce point de départ, ou une légère différence de pH des deux milieux, ou encore tout autre cause de déséquilibre, même très petite, peut se répercuter assez fortement sur les densités cellulaires en fin de culture: supposons, par exemple, que les cellules dans le 1er flacon de culture se divisent avec un taux (un facteur K dans l'équation de Blackman) de 10% supérieur à celle du 2e flacon. Lorsque la culture du 1er flacon a accompli 10 divisions, celle du second n'en a effectué que 9; le nombre de cellules dans le premier est cependant alors le double (par exemple 30000 par millimètre cube) de celui du second (15000 par millimètre cube).

Une incertitude gênante peut souvent régner sur les résultats de telles expériences qui exigent une propreté, une minutie et une rigueur extrêmes.

D'autre part, l'allure logarithmique d'une partie du développement de ces cultures peut être la cause, surtout lors du début de celles-ci, d'erreurs d'appréciation considérables. Ainsi la période de lag ou de latence que l'on peut observer sous le microscope est parfois confondue avec la première partie d'une courbe logarithmique. Supposons qu'un certain inoculum introduise dans un milieu de culture stérile 5 cellules par millimètre cube. Après 5 divisions, il y aura environ 160 cellules par millimètre cube. Après 10 divisions, soit après un temps double, il y en aura 5200 et après 12 divisons 21000, soit 120 fois plus qu'après 5 divisions. L'augmentation très lente du nombre des cellules dans les premiers temps peut faire croire à une période de lag, alors que l'on est déjà en pleine période logarithmique. Le risque d'erreur est encore augmenté par l'imprécision des méthodes de mesure appliquées au matériel biologique qui sont généralement d'autant moins précises que le nombre des cellules dans un échantillon est faible.

Le système de la culture non renouvelée consistant à introduire dans un milieu stérile frais un faible inoculum ne semble pas non plus favorable à une étude physiologique telle que celle que nous avons entreprise. En effet, en même temps que la culture se développe, les réserves nutritives s'épuisent (d'où la loi de Robertson), ce qui modifie les conditions de la culture au fur et à mesure de sa croissance. D'autre part, les cellules elles-mêmes vieillissent et présentent une évolution dans le temps dont les méthodes d'analyse ne nous permettent pas de tenir compte, mais qui ressort souvent assez nettement de l'allure des courbes de croissance. En d'autres termes, les causes se déforment en même temps que les effets; il est extrêmement difficile d'établir la relation dynamique qui les unit.

Bibliographie

Bialosuknia W. 1909. Sur un nouveau genre de Pleurococcacées. Bull. Soc. Bot. Gen. 2. sér. **1**, 101.

Blackman V.H. 1905. Optima and limiting factors. Ann. Bot. **19**, 281–295.

— 1919. The compound interest law and plant growth. Ann. Bot. **33**, 353–360.

Blondel B. 1952. Résistance et sensibilité aux sulfamidés d'algues unicellulaires. Thèse (Genève).

Bouillenne R. 1960. La lumière artificielle en horticulture. Arch. Inst. Bot. Liège **27**.

Bristol-Roach M.B. 1928. On the influence of light and glucose on the growth of a soil alga. Ann. Bot. **42**, 317–345.

Burlew J.S. (éd.) 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Inst. Publ. 600, 357 p.

Cano H. 1939. Peut-on appliquer la méthode de dénombrement des germes de Krueger dans les recherches de bactériophagie? Arch. Sc. phys. nat. **21**, 319–326.

Chodat F. 1942. Cytologie des chlorophycées caroténifères. C.R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève **59**, 127–130.

— 1949. Expression allométrique de la précocité d'un légume-racine (*Daucus*). Experientia **5**, 287–289.

— et coll. 1960. Cahiers de travaux pratiques de physiologie végétale. Ed. Univ. Genève.

— et G. Bocquet. 1955. Dispositif pour la culture massive des algues en milieu aéré et agité. Arch. Sc. phys. nat. **8**, 214–220.

— et R. Olivet. 1940. Action antisporulante de la sulfanilamide chez les algues. C. R. Soc. phys. Hist. nat. Genève **57**, 143–145.

— — 1941. Action des sulfamidés sur la gélification des matières peptiques des algues vertes. C. R. Soc. phys. Hist. nat. Genève **58**, 71–74.

— et J.-F. Schopfer. 1960. Effet de synergie des conditions simultanées de carboautotrophie et de carbohétérotrophie observées dans la croissance de quelques algues. Rev. Suisse Hydrol. **22**, 103–110.

— et S. Soloweitchik. 1942. Action protectrice de la vitamine H contre l'intoxication par la sulfanilamide de dix espèces d'algues vertes. C. R. Soc. phys. Hist. nat. Genève **52**, 167–168.

— — 1943. Contribution à l'étude de la sulfamidose chez les algues vertes. Schw. Z. Path. Bakt. **6**, 345–347.

— et V. Uehlinger. 1955. Concentration en gaz carbonique de l'atmosphère utile à la croissance d'une algue unicellulaire. Arch. Sc. phys. nat. **8**, 221–225.

Comar C.L. et F. B. Zscheile. 1942. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **14**, 877; Plant Physiol. **17**, 198–209 (d'après K. Paech et M. V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Vol. **4**, Berlin 1955).

Davis B.B. 1951. Aromatic biosynthesis 3. Role of p-aminobenzoic acid in the formation of vitamin B_{12}. J. Bact. **62**, 221–230.

Davidson J.-N. 1960. La biochimie des acides nucléiques. Dunod, Paris.

Emerson R. et C. M. Lewis. 1939. Factors influencing the efficiency of photosynthesis. Amer. J. Bot. **26**, 808–822.

Haag E. 1942. Sur le rougissement d'une algue verte. Thèse (Genève).

— et Ch. Dalphin. 1943. Note sur le microdosage des nitrates d'après Lemoigne, Moguillon, Desveaux. C. R. Soc. phys. Hist. nat. Genève **60**, 145–150.

Iwamura T., E. Hase, Y. Morimura et H. Tamiya. 1955. Life cycle of the green alga *Chlorella* with special reference to the protein and nucleic acids contents of cells in successive formative stages. Biochemistry of Nitrogen (Helsinki).

Johnston R. 1959. Preliminary studies on the responses of marine algae to antimetabolites. Int. Oceanogr. Congress.

Kieselbach R. 1944. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **16**, 764.

Kol E. et F. Chodat. 1934. Quelques algues nouvelles des sols et de la neige du Parc national suisse. Bull. Soc. Bot. Gen. **25**, 1–14.

Krauss R.W. 1953. Inorganic nutrition of algae. Dans Burlew (1953), 85–102.

Lemoigne M., P. Monguillon et R. Desveaux. 1937. C. R. Acad. Sc. **204**, 683–686.

Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Microbiol. **3**, 371–393.

Moyse A. et A. Yvon. 1956. Etude de la croissance d'algues monocellulaires en cultures accélérées. J. rech. C. N. R. S. **35**, 169–175.

Myers J. 1951. Physiology of the algae. Ann. Rev. Microbiol. **5**, 157–180.

Myers J., J. N. Phillips et J.-R. Graham. 1951. On the mass culture of algae. Plant Physiol. **26**, 538–548.

Nihei T., T. Sasa, S. Miyachi, K. Suzuki et M. Tamiya. 1954. Change of photosynthetic activity of chlorella cells during the course of their normal life cycle. Arch. Mikrob. **21**, 155–164.

Pratt R., J. F. Oneto et J. Pratt. 1945. Studies on *Chlorella vulgaris X*. Amer. J. Bot. **32**, 405–408.

Pringsheim E. G. 1951. Methods of cultivation of algae. Manual of Phycology (Waltham, Mass.), 347–357.

Robertson T. B. 1908. On the normal rate of growth of an individual and its biochemical significance. Arch. Entw. mech. Organ. **25**, 580–614.

— 1923. The chemical basis of growth and senescence. Philadelphia.

Siva Sankar D. V. 1958. Paraminobenzoic acid and sulphanilamide in the inhibition of *Neurospora crassa*. Nature **181**, 629–630.

Sophoulis E. 1959. Analyse qualitative de quelques sulfamidés par la chromatographie sur papier. Ann. Pharm. Fr. **17**, 446–453.

Stroun M. 1956. Contribution à l'étude du développement des céréales. Thèse (Genève).

Tamiya H. 1950. Some theoretical notes on the kinetics of algal growth. Bot. Mag. Tokyo **64**, 167–173, 216–218.

— et al. 1953. Correlation between photosynthesis and light independent metabolism in the growth of *Chlorella*. Bioch. Biophys. Acta **12**, 23–40.

Uehlinger V. et F. Chodat. 1955. Influence d'intensités lumineuses variées sur la croissance, le titre en chlorophylle et le pouvoir photosynthétique d'une algue unicellulaire. Arch. Sc. phys. nat. **8**, 187–198.

— et A. Linder. 1955. L'efficacité du dénombrement dans l'hémacytomètre. Arch. Sc. phys. nat. **8**, 429–441.

Umbreit W. W., R. H. Burris et J. F. Stauffer. 1949. Manometric techniques and tissue metabolism. Minneapolis, 227 p.

Wiedling S. 1941. The inhibitory action of p-aminobenzoic acid on sulfanilamides in experiments with Diatoms. Bot. Notiser 1941, 375–392.

Woods D. D. 1940. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide. Brit. J. exp. Path. **21**, 74–90.