

71314

E121-MAG - M

CONVENTION IFREMER N° 2004 2 24 31 405

**MESURES DES CONSTANTES CINÉTIQUES D'ABSORPTION
DES DIFFÉRENTES FORMES DE L'AZOTE CHEZ *ALEXANDRIUM MINUTUM*
PAR L'UTILISATION DES ISOTOPES ¹⁵N**

J-F MAGUER, C. MADEC, J. CARADEC, C. MAGE

**Laboratoire de Chimie Marine
UMR CNRS 7144 Roscoff
Institut Universitaire Européen de la Mer
Technopôle Brest Iroise
29280 PLOUZANE**

JUIN 2005

Responsable scientifique : P. Le Corre

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10662

INTRODUCTION

Différentes espèces phytoplanctoniques ont été impliquées dans des efflorescences toxiques sur l'ensemble du littoral français ces dernières années. Parmi celles recensées, les efflorescences du dinoflagellé *Alexandrium minutum* s'avèrent comme particulièrement dangereuses en raison des toxines qu'elles produisent et qui sont responsables chez l'homme du syndrome PSP (Paralytic Shellfish Poisoning). *A. minutum* a été signalé pour la première fois en France il y a une vingtaine d'années dans les abers bretons puis dans la baie de Morlaix (Erard Le Denn, 1999). Depuis, des efflorescences récurrentes y sont observées, occasionnant régulièrement des interdictions préfectorales de commercialisation de mollusques bivalves.

Les études menées dans l'estuaire de Penzé (Baie de Morlaix) ont permis de cerner les conditions physiques de développement d'*A. minutum* en milieu naturel. Il a été montré en particulier que son développement est tributaire de la présence de kystes dans le sédiment dont la remise en suspension est favorisée par des débits élevés dans la rivière (Probert, 1999). Une température supérieure à 16°C apparaît aussi favorable à la germination de ces kystes (Erard-Le Denn, 1997) et à la prolifération des cellules végétatives dans la colonne d'eau (Morin *et al.*, 2000). Des travaux récents (Maguer *et al.*, 2004) ont mis également en évidence la nécessité d'un synchronisme sur une période prolongée entre une séquence de forte stabilité de la colonne d'eau et une période continue de fort ensoleillement dans le déclenchement du bloom et le maintien de l'espèce jusqu'au stade d'eau colorée. Ces mêmes travaux ont montré que le déclin d'*A. minutum* pouvait être provoqué par une diminution importante de la lumière disponible *in situ* sous l'effet d'auto ombrage. L'importance des facteurs nutritionnels sur le développement d'*A. minutum* n'a par contre été que très peu abordée et on ne connaît pas bien en particulier la capacité d'*A. minutum* à utiliser les nutriments en réponse à des modifications de l'état nutritionnel des cellules. Les travaux réalisés jusqu'à présent ont porté exclusivement sur le phosphore (Labry *et al.*, 2004). Les lacunes actuelles tiennent au fait que le développement de l'espèce est restreint à la partie de l'estuaire fortement enrichie en nutriments.

Dans cette étude, nous examinons en milieu de culture les capacités d'absorption de l'azote par *A. minutum* en fonction de la nature du substrat, de sa disponibilité, et du degré de déficience cellulaire en azote. Les résultats obtenus doivent permettre, via l'obtention des paramètres cinétiques, d'établir les conditions de limitation et de maintien de l'espèce en milieu naturel ; ils sont nécessaires à une modélisation ultérieure des conditions de développement d'*A. minutum*.

I. MATERIEL ET METHODES

1. I. Les Cultures

Les travaux ont été menés sur des souches d'*Alexandrium minutum* (AM89BM) issues de l'estuaire de la rivière de Morlaix et clonées en laboratoire dans un milieu non axénique. Toutes les cultures ont été maintenues à 18°C dans une eau naturelle de salinité 27 filtrée à 0.2 µm ; elles ont été soumises à une irradiance de 200 µE m⁻² s⁻¹ avec une photopériode lumière / obscurité de 14 : 10.

Pour les expérimentations ¹⁵N, des inoculums ont été cultivés en ballon de 3 L en mode batch en milieu f/2/6-N et f/2-P, puis en mode semi-continu avec un renouvellement du milieu nutritif toutes les 24 heures. Six taux de renouvellement différents du milieu (ou taux de dilution $D = 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.40$ et 0.50) ont été effectués afin de couvrir l'ensemble de la gamme des taux de croissance connus pour *A. minutum*. L'apport quotidien en azote a varié de 7.3 à 73.3 µmol L⁻¹ selon le taux de renouvellement. Une homogénéisation douce, privilégiée à l'agitation automatique susceptible d'altérer l'état physiologique de la cellule a été réalisée une seule fois par jour avant l'échange. Un suivi des concentrations cellulaires et des teneurs en éléments nutritifs a été réalisé tous les deux jours durant toute la durée de l'expérience sur le volume échangé. L'échantillonnage pour les expérimentations azote 15 a été réalisé sur le volume échangé lorsque l'équilibre a été atteint. Les cultures ont été considérées à l'équilibre pour les taux de dilution de 0.05 à 0.40 dès lors que les variations des concentrations en cellules et en éléments nutritifs ont été respectivement inférieures à 20 et 10%. Pour le taux de dilution le plus élevé ($D = 0.5 \text{ j}^{-1}$), l'atteinte de l'équilibre aurait conduit à une disparition complète des cellules du milieu (état de lessivage de la culture). Les prélèvements pour les expérimentations azote 15 ont dans ce cas été effectués alors que les concentrations cellulaires étaient faibles ($< 300 \text{ cell mL}^{-1}$), ce qui peut expliquer la plus grande variabilité cellulaire observée ($\pm 30\%$). A partir de l'état d'équilibre, ont également été déterminés sur les volumes extraits les teneurs en azote et carbone organique.

2. I. les analyses

Les teneurs en nitrate et en phosphate ont été déterminées par analyse automatique (Analyseur Technicon type II) selon les procédures décrites par Tréguer et Le Corre (1975). Le dosage en ammonium a été réalisé manuellement et en triplicata par la méthode colorimétrique de Koroleff (1970). Les teneurs en azote et carbone organique particulaire ont été obtenues par analyseur élémentaire (Flash EA, Thermoélectron) et converties en quotas cellulaires (Q_N) en divisant par le nombre de cellules correspondant. Les comptages cellulaires d'*A. minutum* ont été réalisés sur cellule de Nageotte au microscope optique après fixation au lugol.

3. I. L'expérimentation azote 15

Les taux d'absorption du nitrate et de l'ammonium ont été déterminés en suivant l'incorporation du traceur azote 15 dans la matière particulaire (Dugdale et Goering, 1967) sur des cultures à l'état d'équilibre. Pour chacune des expérimentations, un aliquot du volume de culture extrait a été introduit dans un flacon d'incubation de 1 L en polycarbonate et complété avec de l'eau de mer naturelle filtrée à 0.2 μm et pauvre en éléments nutritifs. Un ajout en PO_4^{3-} à une concentration équivalente à un milieu f/2-P a été effectué sur chacun des flacons. Les taux d'absorption de l'azote ont été déterminés pour des concentrations finales en azote sous la forme de nitrate ou d'ammonium de 0.1, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0 et 30.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pour les taux de dilution 0.05, 0.10, 0.15 et 0.25 pour lesquels les concentrations initiales en substrat azoté à l'équilibre sont en dessous de la limite de détection. Pour les taux de dilution 0.40 et 0.50, seuls les taux d'absorption à concentration saturante en azote ont été déterminés. Des expériences d'inhibition de l'absorption du nitrate par addition croissantes d'ammonium (entre 0 et 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) ont également été réalisées pour l'ensemble des taux de dilution prédéfinis. L'addition du traceur sous la forme de nitrate ($^{15}\text{NaNO}_3$, 99,0 %) ou d'ammonium ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 99,0%) a représenté 10% de la concentration finale en azote. Les échantillons ont été incubés à une température de 18°C, sous une irradiance de 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durant 60 minutes. Ce temps d'incubation a été choisi après des expériences d'incubation en fonction du temps qui ont montré qu'il n'y a pas de variations significatives des taux mesurés dans l'intervalle de temps 15mn – 4 heures. A la fin des incubations, les échantillons ont été fixés avec une solution de Hg_2Cl_2 60 g L^{-1} (35 μl pour 100 mL), puis filtrés sous une dépression < 100 mmHg sur filtre GF/D préalablement traité au four (450°C, 4h). Les filtres ont été ensuite rincés avec de l'eau de mer filtrée à 0.2 μm et séchés à 60°C pendant 24 heures jusqu'aux analyses isotopiques. Les enrichissements en azote 15 dans la matière particulaire collectée sur les filtres ont été obtenus par spectrométrie de masse (Delta Plus – Thermoelectron) couplée via une interface type III à un analyseur élémentaire carbone azote (Flash EA – Thermoelectron). Les taux d'absorption (ρ en $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) ont été déterminés à partir de l'équation de Dugdale (1967) et n'ont pas été corrigés de la dilution isotopique. Les taux d'absorption spécifiques (V en h^{-1}) ont été obtenus en divisant les taux d'absorption absolus par la teneur en NOP.

4. I. Détermination des paramètres cinétiques.

L'équation de Droop (1973) ($\mu = \mu_{\text{max}} (1 - Q_{\text{Nmin}} / Q_{\text{N}})$) été utilisée pour décrire les variations des taux de croissance en fonction des différents états nutritionnels expérimentés. Dans cette équation, les μ_{max} et Q_{Nmin} représentent respectivement le taux de croissance maximum atteint lorsque le quota cellulaire Q_{N} tend vers l'infini et le quota minimum en dessous duquel la croissance cellulaire devient impossible.

Les variations de l'absorption du nitrate ou de l'ammonium en fonction de la concentration en substrat ont été décrites en utilisant le modèle cinétique de Michaelis Menten proposé par Dugdale (1967) pour l'azote et qui utilise une fonction hyperbolique décrite par l'équation $V = (V_{\max} \cdot [S]) / (K_s + [S])$ dans laquelle V_{\max} est la vitesse d'absorption maximale et K_s (constante de demi-saturation) la concentration en substrat S pour laquelle la vitesse d'absorption correspond à la vitesse d'absorption maximale divisée par 2. L'affinité pour le substrat aux faibles concentrations (i.e $[S] < K_s$) a été déterminée à partir de la pente initiale de la courbe ($\alpha = V_{\max} / K_s$; Healey, 1980; Goldman et Glibert, 1982). L'équation $V = V_{\max} [1 - (I_{\max} [NH_4]) / (K_i + [NH_4])]$ proposée par Varela *et Harrison* (1999) a été utilisée pour décrire l'effet inhibiteur de la concentration en ammonium sur l'absorption du nitrate. Dans cette équation, V_{\max} représente la vitesse d'absorption maximum du nitrate en absence d'ammonium, I_{\max} est la valeur d'inhibition maximum et K_i (constante de demi-inhibition) la concentration en ammonium pour laquelle la valeur de I_{\max} est divisée par 2.

La méthode de calcul par régression non linéaire du logiciel Sigma plot (Jandel Scientific) a été utilisée pour obtenir les valeurs de μ_{\max} et $Q_{N\min}$ ainsi que les paramètres cinétiques d'absorption K_s et V_{\max} et d'inhibition I_{\max} et K_i

II RESULTATS

1. II. Etat physiologique des cellules en culture semi-continue

La dynamique de croissance des cultures en mode semi-continu a permis d'obtenir un gradient décroissant des concentrations cellulaires (de 29000 à 200 cellules ml^{-1}) et croissant de quota en azote (de 4.2 à 24.0 pmol N cell^{-1}) en fonction du taux de dilution. (Figure 1).

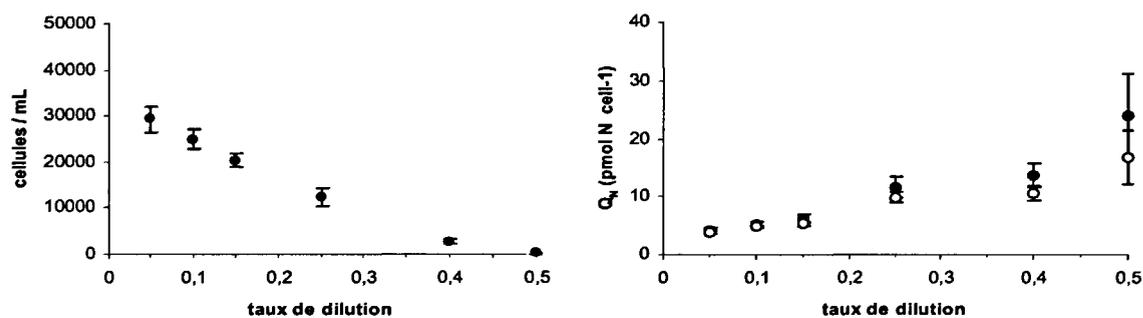


Figure 1 : Concentrations cellulaires et quotas en azote en fonction du taux de dilution (j^{-1}) imposé aux cultures à l'équilibre. Les barres d'erreurs correspondent à 9 mesures pour chaque culture.

Les rapports C/N cellulaire varient en fonction du taux de dilution (Figure 2) entre 6.4 et 12.9. Ils diminuent entre les taux de dilution 0.05 et 0.25 traduisant un gradient de limitation en azote (Dortch *et al.*, 1984). Aux taux de dilution 0.25 et 0.40, les rapports sont peu différents ; ils sont comparables au rapport C/N cellulaire reporté par Probert (1999) comme étant caractéristique de cellules d'*A. minutum* dans un état transitoire entre cellules déficientes et non déficientes en azote. L'augmentation du rapport C/N à partir du taux de dilution 0.40 caractérise le changement d'état nutritionnel.

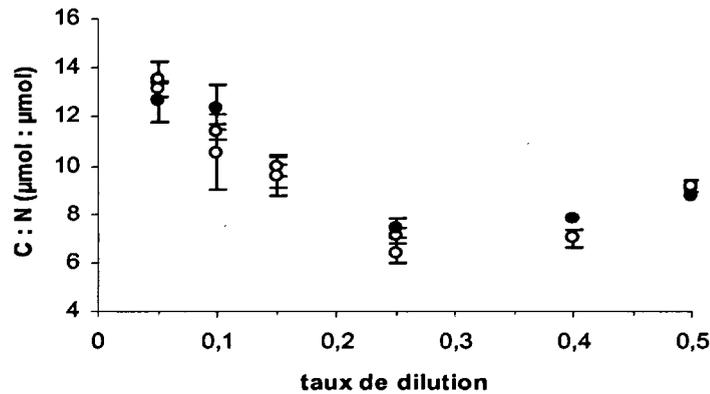


Figure 2 : Rapport C : N des cellules d'*A. minutum* en culture semi-continue à l'équilibre en fonction du taux de dilution (j^{-1}). Trois cultures ont été réalisées pour chaque taux de dilution. Les barres d'erreurs correspondent à 9 mesures pour chaque culture.

Pour ce type de culture, une valeur du taux de dilution D impose une valeur du taux de croissance théorique. Les taux de croissance mesurés des cellules à l'équilibre ont varié entre 0.04 et 0.59 j^{-1} (Tableau 1) et ne sont pas significativement différents des taux de croissance théoriques obtenus à partir de l'équation de Tilman et Kilham (1976) ($\mu_{\text{théo}} = \text{LN}(1-D)$)

Tableau 1 : Taux de dilution (j^{-1}), taux de croissance théorique et mesuré (j^{-1}) des cellules d'*A. minutum* en culture semi-continue

Tx dilution	0.05	0.10	0.15	0.25	0.40	0.50
μ théorique	0.05	0.11	0.16	0.29	0.51	0.69
μ mesuré	0.04	0.14	0.20	0.29	0.51	0.59

La variation hyperbolique des taux de croissance en fonction du quota cellulaire (Figure 3) peut être décrite par le modèle de Droop. Les paramètres μ_{\max} et $Q_{N\min}$ sont respectivement de 0.64 j^{-1} et $4.08 \text{ pmol N cell}^{-1}$. Le quota maximal théorique ($Q_{N\max}$), calculé à partir de la relation de Morel (1987), est de $27 \text{ pmol N cell}^{-1}$. Le rapport $Q_{N\max}/Q_{N\min}$ qui représente la capacité de stockage maximale en azote d'*A. minutum* atteint 6.6.

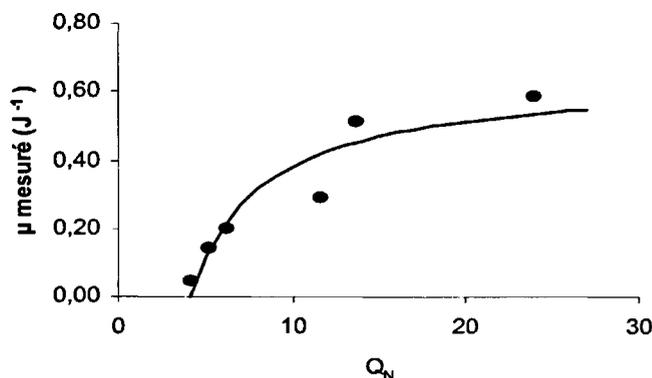


Figure 3 : Evolution du taux de croissance (j^{-1}) atteint par les cellules en culture semi-continue à l'équilibre et le quota cellulaire en azote (pmol N cell^{-1}) – Application du modèle de Droop.

2. II. Cinétiques d'absorption – relation avec l'état physiologique des cellules

L'influence de la concentration en nitrate et en ammonium sur la capacité d'*A. minutum* à utiliser ces deux formes de l'azote a été étudiée pour 4 états nutritionnels différents des cellules ou taux de croissance relatif (μ/μ_{\max}). Les variations des vitesses d'absorption en fonction de la concentration en substrat suivent le modèle classique de Michaelis Menten (Figure 4). Les constantes de demi saturation K_s (Tableau 2) sont comprises respectivement pour le nitrate et pour l'ammonium entre 0.22 et $0.27 \mu\text{mol L}^{-1}$ et entre 0.25 et $0.37 \mu\text{mol L}^{-1}$. Elles ne présentent pas de variations significatives en fonction du quota en azote. Les vitesses d'absorption maximales varient entre 0.028 et 0.071 h^{-1} pour le nitrate et entre 0.051 et 0.156 h^{-1} pour l'ammonium (Tableau 2). Ces vitesses décroissent linéairement ($r^2_{\text{NO}_3} = 0.90$ et $r^2_{\text{NH}_4} = 0.83$, $n=6$) avec l'augmentation du quota en azote quelle que soit la forme azotée considérée (Figure 5). Les rapports $V_{\max \text{ NH}_4} / V_{\max \text{ NO}_3}$ sont très supérieurs à 1 quel que soit l'état nutritionnel de la cellule et ne varient pas significativement en fonction du quota en azote (2.38 ± 0.18). Le coefficient $\alpha = V_{\max}/K_s$ varie respectivement pour le nitrate et l'ammonium entre 0.17 et 0.30 et entre 0.31 et 0.62 . L'efficacité d'*A. minutum* à utiliser ces deux formes d'azote tend à augmenter avec le degré de déficience en azote de la cellule (Tableau 2).

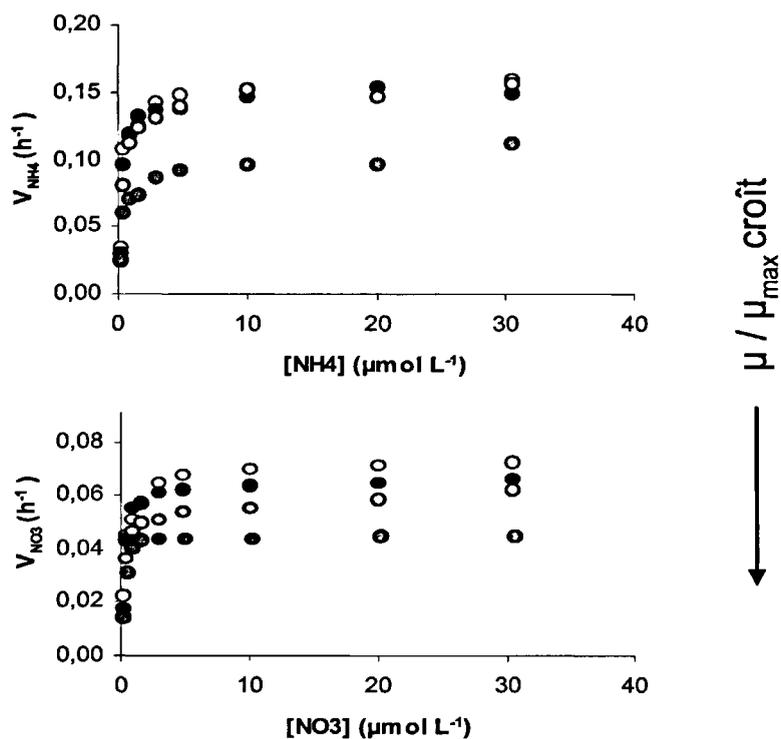


Figure 4 : Relation entre la vitesse d'absorption (h^{-1}) de a) l'ammonium et b) du nitrate et la concentration en substrat ($\mu\text{mol L}^{-1}$) à l'équilibre pour 4 états physiologiques des cellules ou taux de croissance relatif (μ/μ_{max}).

Tableau 2 : Paramètres cinétiques d'absorption (K_s , V_{max} et α) en fonction de l'état physiologique des cellules. Les écarts types sont présentés entre parenthèses.

Tx dilution	0.05	0.10	0.15	0.25	0.40	0.50
Q_N (pmol Cell $^{-1}$)	4.2	5.2	6.2	11.6	13.6	24.0
μ / μ_{max}	0.07	0.22	0.31	0.45	0.80	0.92
$K_s_{\text{NH}_4}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.25 (0.03)	0.27 (0.03)	0.37 (0.04)	0.32 (0.06)	nd	nd
$V_{\text{max NH}_4}$ (h^{-1})	0.156 (0.003)	0.152 (0.003)	0.154 (0.003)	0.101 (0.003)	0.075	0.051
α_{NH_4}	0.62	0.56	0.41	0.31	nd	nd
$K_s_{\text{NO}_3}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.26 (0.02)	0.22 (0.02)	0.26 (0.03)	0.27 (0.06)	nd	nd
$V_{\text{max NO}_3}$ (h^{-1})	0.071 (0.001)	0.066 (0.001)	0.058 (0.001)	0.046 (0.002)	0.032	0.028
α_{NO_3}	0.27	0.30	0.22	0.17	nd	nd

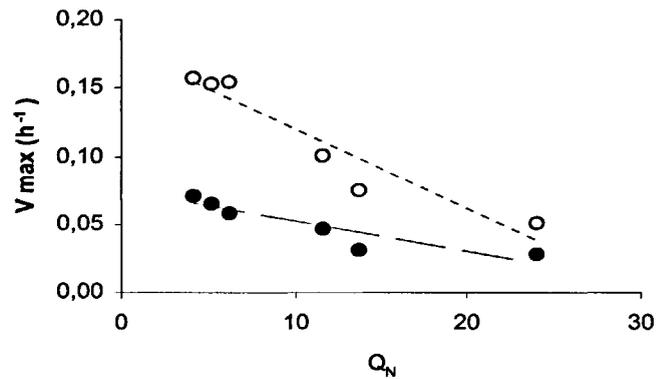


Figure 5 : Variations des vitesses d'absorption maximale de l'ammonium (rond vide) et du nitrate (rond plein) (h⁻¹) en fonction du quota cellulaire (pmol N cell⁻¹) pour des cultures en semi-continue d'*A. minutum* à l'équilibre.

3. II. Cinétiques d'inhibition de l'absorption du nitrate par la concentration en ammonium – relation avec l'état physiologique des cellules.

L'effet inhibiteur de l'ammonium sur l'utilisation du nitrate a été examiné pour six états nutritionnels différents des cellules, entre Q_{Nmin} et Q_{Nmax} . Les résultats montrent clairement que la vitesse d'absorption du nitrate décroît, quelle que soit l'expérimentation avec l'augmentation de la concentration en ammonium (Figure 6). Dans tous les cas, la décroissance observée peut être décrite par une relation de type Michaelis Menten inversée. La réduction maximale aux plus fortes concentrations en ammonium (I_{max}) varie de 0.62 à 0.90 (Tableau 3). Dans aucun cas, l'inhibition n'est totale. Les constantes de demi inhibition (K_i), comprises entre 0.26 et 4.16 $\mu\text{mol L}^{-1}$, décroissent de manière hyperbolique en réponse à une augmentation du Q_N (Figure 7).

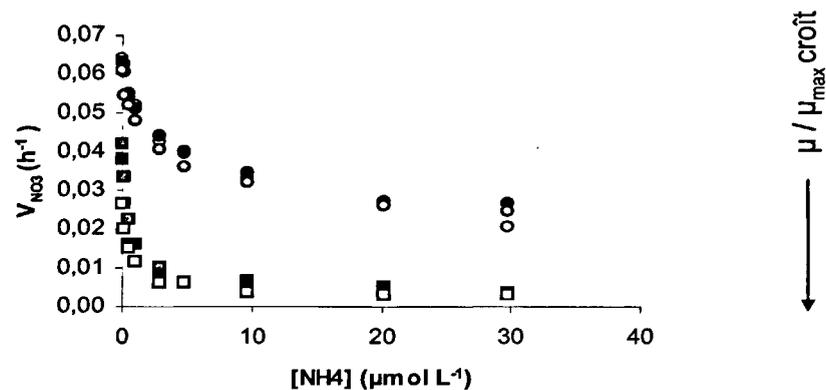


Figure 6 : Evolution de la vitesse d'absorption du nitrate (h⁻¹) et la concentration en ammonium ($\mu\text{mol L}^{-1}$) pour des cultures semi-continues d'*A. minutum* pour 6 états physiologiques ou taux de croissance relatif (μ / μ_{max}).

Tableau 3 : Paramètres cinétiques d'inhibition (K_i , I_{max} et V_{max}) en fonction de l'état physiologique des cellules. Les écarts types sont présentés entre parenthèses.

Tx dilution	0.05	0.10	0.15	0.25	0.40	0.50
Q_N (pmol Cell ⁻¹)	4.2	5.2	6.2	11.6	13.6	24.0
μ / μ_{max}	0.07	0.22	0.31	0.45	0.80	0.92
K_i ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4.16 (1.08)	3.46 (0.62)	2.69 (0.51)	0.55 (0.07)	0.31 (0.04)	0.26 (0.02)
I_{max}	0.72 (0.05)	0.63 (0.03)	0.62 (0.02)	0.94 (0.02)	0.89 (0.02)	0.90 (0.01)
$V_{max \text{ NO}_3}$ (h ⁻¹)	0.062 (0.002)	0.062 (0.001)	0.059 (0.001)	0.043 (0.001)	0.038 (0.001)	0.030 (0.001)

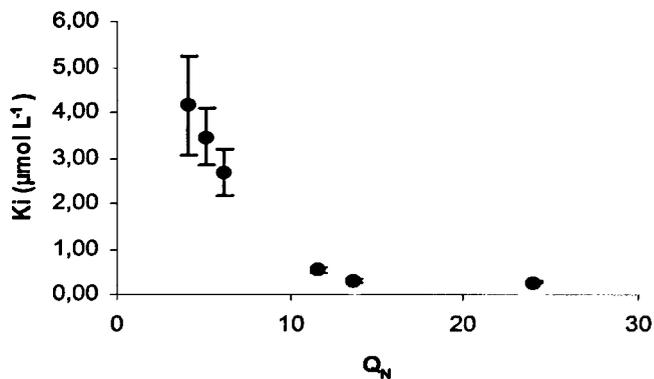


Figure 7 : Variations de la constante d'inhibition K_i ($\mu\text{mol L}^{-1}$) en fonction du quota cellulaire en azote pour des cultures en semi-continue d'*A. minutum* à l'équilibre.

III. DISCUSSION

De nombreux travaux ont montré que l'intensité et la fréquence accrue des efflorescences d'*Alexandrium* ont pour origine un enrichissement des eaux côtières en azote (Hallegraeff *et al.*, 1988 ; Cannon, 1990 ; Glibert *et al.*, 2001, Anderson *et al.*, 2002, Vila *et al.*, 2005). La compréhension de la dynamique de croissance en réponse à l'accroissement des concentrations en azote implique de cerner les capacités physiologiques de la cellule à utiliser le substrat ; elle nécessite aussi de disposer des informations sur les interactions (préférence, inhibition) entre les différentes formes d'azote utilisées par l'espèce.

Le mode de culture en semi-continu nous a permis d'examiner la réponse physiologique d'*A. minutum* à des fluctuations contrôlées en azote pour une large gamme de quotas cellulaires en azote (4.1–25.0 pmol N cell⁻¹) et pour des taux de croissance relatifs μ/μ_{\max} compris entre 0.07 et 0.92. La plus faible valeur de quota expérimentée est comparable à celle obtenue sur la même souche par Probert (1999) en mode semi-continu (4.1–5.3 pmol N cell⁻¹). Elle est inférieure à celle mesurée pour d'autres espèces du même genre, telles que *Alexandrium affini* (18 pmol N cell⁻¹, Flynn *et al.*, 1996) ou *Alexandrium catanella* (7.0 pmol N cell⁻¹; Matsuda *et al.*, 2001), indiquant que *A. minutum* peut proliférer, pour des conditions environnementales identiques, à des densités cellulaires supérieures de 2 à 5 fois à ces deux espèces. Des plus forts quotas en azote sont généralement reportés pour les dinoflagellés que pour les diatomées (Yamamoto et Hatta 2004).

1. III. Influence du degré de limitation en azote des cellules d'*A. minutum* sur les cinétiques d'absorption du nitrate et de l'ammonium.

Une comparaison avec la littérature des valeurs des constantes de demi saturation K_s du nitrate (<0.30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) et de l'ammonium (<0.37 $\mu\text{mol L}^{-1}$) montrent que les valeurs de K_s déterminées pour *A. minutum* sont proches de celles obtenues pour *Gonyaulax polyedra* (Harrison, 1976) ou *Lingulodinium polyedrum* (Kudela et Cochlan, 2000), mais faibles au regard des valeurs habituellement reportées en milieu de culture pour l'ensemble des dinoflagellés (voir pour une revue des K_s en milieu de culture, Smayda, 1997). Elles sont par contre comparables aux constantes K_s généralement faibles des diatomées.

L'utilisation de la seule constante de demi saturation K_s pour conclure quant à l'affinité d'une espèce vis-à-vis d'une forme d'azote ou sur la compétitivité entre espèces dans des milieux pauvres en azote est controversée en raison des co-variations possibles entre les paramètres cinétiques K_s et V_{\max} (Healey, 1980; Asknes et Egge 1991), la taille des cellules (Malone, 1980), leur état nutritionnel (Dortch *et al.*, 1982; Syrett *et al.*, 1986; Dortch *et al.*, 1991a, b) ou leur taux de croissance (McCarthy et Goldman 1979, Dortch *et al.*, 1991, Fan *et al.*, 2003). Dans ce contexte, le coefficient $\alpha = V_{\max}/K_s$ est considéré comme le meilleur indicateur d'affinité d'une espèce vis à vis d'un substrat (Healey, 1980, Harrison *et al.*, 1989). Les valeurs des coefficients α_{NO_3} et α_{NH_4} sont d'un ordre de grandeur supérieur à celles calculées pour d'autres dinoflagellés (Tableau 4). Elles sont dans la gamme des valeurs déterminées pour les diatomées qui sont considérées comme des espèces à affinité adaptée à des milieux épuisés en azote (Sommer, 1986). Ces résultats montrent que *A. minutum* s'avère être, quel que soit l'état physiologique des cellules, compétitif vis-à-vis d'autres communautés phytoplanctoniques en condition de déplétion du milieu en azote. Cette forte affinité d'*A. minutum* pour l'azote correspond davantage à des valeurs de K_s faibles qu'à une forte capacité d'absorption (i.e V_{\max} élevé) (Tableau 4).

Les constantes K_s du nitrate et de l'ammonium ne varient pas significativement avec le degré de carence cellulaire en azote. Les variations de α en fonction de Q_N correspondent par conséquent à celles de V_{max} . Les variations de V_{max}

Tableau 4 : paramètres cinétiques K_s ($\mu\text{mol L}^{-1}$), V_{max} (h^{-1}) et α ($\text{L h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) du nitrate et de l'ammonium pour différentes espèces phytoplanctoniques en milieu de culture. Le paramètre α a été calculé à partir des données disponibles dans la littérature. Entre parenthèses, sont donnés les écarts type.

Espèce	$K_s \text{ NO}_3$	$V_{max} \text{ NO}_3$	α	$K_s \text{ NH}_4$	$V_{max} \text{ NH}_4$	α	Réf.
Dinoflagellés							
<i>Alexandrium. minutum</i>	0.22-0.37	0.028-0.071	0.17-0.30	0.25-0.37	0.051-0.156	0.31-0.62	(1)
<i>Alexandrium catanella</i>	0.60-28.1	0.003-0.047	-	2.0	0.026	0.013	(2)
<i>Prorocentrum minimum</i>	5,0 (0,6)	0.05 (0.01)	0.01	-	-	-	(3)
<i>Gonyaulax excavata</i>	1.49-2.84	0.020-0.029	0.019	1.95	0.041	0.021	(4)
Chlorophytes							
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	11.1 (3.6)	0.03 (0.01)	0.003	0.48-1.48	0.07-0.10	0.05-0.21	(3) (5)
Diatomées							
<i>Chaetoceros simplex</i>	-	-	-	1.24-2.22	0.17-0.45	0.08-0.36	(5)
<i>Skeletonema costatum</i>	0.4 (0.1)	0.10 (0.01)	0.25	-	-	-	(2)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	2.8 (0.3)	0.17 (0.01)	0.06	-	-	-	(2)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.8-1.2	0.18-0.23	0.19-0.22	-	-	-	(6)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	-	0.22-0.66	0.09-0.58	0.41-1.45	(7)

Réf : (1) cette étude ; (2) Collos *et al.*, 2004 ; (3) Lomas et Glibert (2000) ; (4) MacIsaac *et al.*, (1979) ; (5) Goldman et Glibert (1982) ; (6) Collos *et al.* (1982) ; (7) Eppley et Renger (1974)

versus Q_N montrent que l'affinité d'*A. minutum* à utiliser les différentes formes de l'azote est d'autant plus marquée que le degré de déficience des cellules en azote est important. Les relations entre la disponibilité du substrat, la capacité d'absorption et la division cellulaire (croissance) d'une cellule déficiente en azote sont complexes. Collos (1986) a proposé deux stratégies d'adaptation pour des espèces phytoplanctoniques carencées puis soumises à des pulses en nutriments : une stratégie de croissance caractérisée par une absorption du nutriment et une division cellulaire rapides et en phase, et une stratégie de stockage du nutriment, conséquence d'une absorption modérée et d'une division cellulaire retardée (jusqu'à 24 heures). La stratégie adoptée par *A. minutum* peut être examinée en comparant la vitesse d'absorption maximum de l'ammonium ou du nitrate (h^{-1}) au taux de croissance (h^{-1}). Le taux de croissance horaire a été calculé comme le taux de croissance journalier divisé par 24. Les rapports V_{max}/μ de l'ammonium et du nitrate sont d'autant plus élevés que le quota cellulaire est faible (Figure 8). Ces résultats montrent que plus la déficience en azote de la cellule est prononcée et plus *A. minutum* accumule des quantités importantes de NID pour une croissance ultérieure, confirmant ainsi la stratégie de stockage déjà observée chez cette espèce vis-à-vis du phosphore (Labry *et al.*, 2004). Une réponse similaire à des apports d'azote a été reportée pour des cultures d'*Alexandrium catanella*, (Collos *et al.*,

2004). Cette stratégie de stockage confère un avantage écologique aux dinoflagellés sur les diatomées lorsque la fréquence des apports est inférieure au taux de division cellulaire (Collos, 1986). Dortch *et al.* (1982) ont montré que dans certains cas, jusqu'à 50% de l'azote absorbé n'est pas incorporé sous forme de protéines 10 heures après l'apport d'azote, et est stocké principalement sous la forme de nitrate, d'ammonium ou d'acides aminés. Ce décalage dans le temps entre processus d'absorption et de croissance a été proposé pour expliquer la migration verticale nyctémérale des cellules de dinoflagellés et le maintien de fortes concentrations cellulaires dans la couche de surface épuisée en azote (Labib et Halim, 1995). Les cellules migreraient la nuit vers les eaux de fond pour y puiser l'azote. Cet azote serait ensuite incorporé le jour dans la couche éclairée de surface. La capacité des dinoflagellés à absorber les nutriments à l'obscurité (Eppley et Harrison, 1975) appuie fortement cette hypothèse. Les études expérimentales menées par Zhou et Elbrachter (1994) sur une espèce voisine, *Alexandrium lusitanicum*, montrent une migration synchrone avec le cycle jour-nuit.

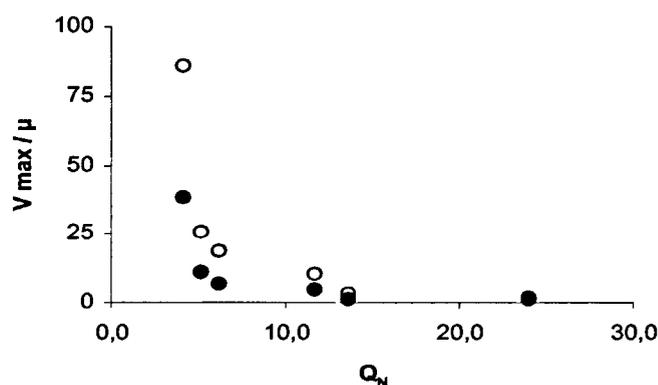


Figure 8 : variations du rapport V_{max} / μ du nitrate (rond vide) et de l'ammonium (rond plein) en fonction du quota cellulaire en azote pour des cultures en semi-continue d'*A. minutum* à l'équilibre.

2. III. Interactions entre le nitrate et l'ammonium – Relations avec l'état physiologique des cellules d'*A. minutum*.

Les interactions entre les substrats azotés, et plus particulièrement entre le nitrate et l'ammonium, ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont révélé une grande variété de réponses dépendant des espèces et de l'état nutritionnel des cellules (voir pour une revue, McCarthy, 1981 ; Syrett, 1981, Dortch 1990). Ces interactions incluent l'utilisation préférentielle d'un composé par rapport à un autre et l'inhibition de l'absorption d'une forme azotée par une autre forme.

L'utilisation préférentielle d'un composé azoté par le phytoplancton est indépendante de la concentration des autres formes d'azote et est généralement étudiée en comparant les vitesses d'absorption maximales. Les $V_{max\ NH_4}$

toujours très supérieures à $V_{\max \text{ NO}_3}$ montrent une préférence d'*A. minutum* pour l'ammonium quel que soit l'état physiologique des cellules (Figure 5). Cette utilisation préférentielle de l'ammonium est très généralement observée chez le phytoplancton (Dortch, 1990). Elle correspond lors de l'assimilation à une dépense énergétique moindre que celles des formes oxydées, tel que le nitrate. Il a été montré pour certaines espèces que la préférence pour l'ammonium est favorisée aux faibles intensités lumineuses (Dortch, 1990) ; elle peut aussi être accentuée par une déficience en azote (Collos, 1983, Goldman et Glibert, 1983, Dortch, 1990). Dans le cas d'*A. minutum*, les faibles variations du rapport $V_{\max \text{ NH}_4} / V_{\max \text{ NO}_3}$ (<0.20) avec le quota cellulaire montre que, le degré de préférence pour l'ammonium est indépendant de l'état nutritionnel des cellules.

L'effet inhibiteur de l'ammonium sur l'absorption du nitrate a été observé pour de nombreuses espèces phytoplanctoniques (Voir pour une revue Dortch, 1990). Le degré avec lequel l'ammonium exerce cet effet est par contre très variable selon les espèces étudiées. Varela et Harrison (1999) et Dortch *et al.*, (1991) ont montré par exemple que des teneurs en ammonium de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ étaient suffisantes pour entraîner une suppression totale de l'absorption du nitrate respectivement chez *Emiliana huxleyi* et *Thalassiosira pseudonana*, alors que des concentrations 10 fois plus élevées réduisent l'utilisation du nitrate de uniquement 6% chez *Skeletonema costatum* (Dortch et Conway, 1984). Dans le cas d'*A. minutum*, l'inhibition n'est jamais totale ; elle peut être réduite au maximum de 90% pour des concentrations en ammonium de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nos résultats montrent que le degré d'inhibition dépend de l'état nutritionnel des cellules (de 62 à 90%) et tend à diminuer, plus les cellules sont déficientes en azote. Une diminution de l'effet inhibiteur avec l'accroissement d'une carence cellulaire en azote, comparable à celle mise en évidence dans notre étude, a déjà été signalée en milieu de culture pour d'autres espèces phytoplanctoniques telles que *Chorella sorokiniana* (Tischner, 1981), *Monochrysis lutherii* (Caperon et Meyer, 1972) ou *Skeletonema costatum* (Conway, 1977). D'autres travaux ont montré qu'une déficience cellulaire en azote était par contre sans effet (Dortch, 1990) ou pouvait au contraire accentuer (Harrison *et al.*, 1996) le degré avec lequel l'ammonium exerce un effet inhibiteur sur l'utilisation du nitrate. Du préconditionnement des cultures (Dortch, 1990), des conditions d'éclairement (Bates, 1976, Yin *et al.*, 1998) et de température (Lomas et Glibert, 1999) imposées aux cellules, peut aussi dépendre le degré inhibiteur de l'ammonium sur l'absorption du nitrate.

Les valeurs des constantes de demie inhibition K_i (Tableau 3) sont comparables aux valeurs reportées en milieu de culture par Lomas et Glibert (1999) lors d'une étude sur différentes espèces de dinoflagellés et de diatomées. Elles sont par contre très différentes selon l'état nutritionnel des cellules indiquant que la sensibilité d'*A. minutum* vis-à-vis de l'effet inhibiteur dépend de l'état physiologique des cellules. La diminution hyperbolique des valeurs de K_i en réponse à une augmentation de la concentration cellulaire en azote (Figure 7) montrent, qu'à des faibles concentrations en ammonium, les cellules non déficientes en azote ($C/N > 7$, Figure 2) sont plus sensibles à l'effet inhibiteur de l'ammonium ($K_i < 0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) que les cellules déficientes en azote (C/N

< 7 ; $K_i > 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$). L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de l'effet inhibiteur de l'ammonium comme facteur important de contrôle de l'absorption du nitrate chez *A. minutum*. Dans le domaine côtier, où l'ammonium est présent en forte concentration, ce processus peut alors être un frein à l'utilisation massive du nitrate apporté par les fleuves.

CONCLUSION

Ces travaux ont permis, et ce pour la première fois, de fournir les paramètres cinétiques d'absorption du nitrate et de l'ammonium pour le dinoflagellé *A. minutum* en réponse à l'état physiologique des cellules. Les résultats obtenus montrent clairement qu'*A. minutum* présente une forte affinité à la fois pour le nitrate et l'ammonium ; cette espèce s'avère donc être un bon compétiteur vis-à-vis d'autres communautés phytoplanctoniques lorsque l'azote est en faible concentration dans le milieu. La capacité d'*A. minutum* à absorber l'azote est d'autant plus importante que le degré de carence cellulaire en azote est marqué. L'augmentation des rapports V_{max}/μ de l'ammonium et du nitrate avec la diminution du quota montre, que plus la déficience en azote de la cellule est prononcée et plus *A. minutum* accumule des quantités importantes de NID pour une croissance ultérieure, confirmant ainsi la stratégie de stockage déjà observée chez cette espèce vis-à-vis du phosphore (Labry *et al.*, 2004).

L'ammonium s'avère être la source d'azote préférentiellement utilisée par *A. minutum*. Le degré de préférence pour cette forme de l'azote est indépendant de l'état physiologique des cellules. De fortes concentrations en ammonium peuvent inhiber l'absorption du nitrate. L'inhibition n'est cependant jamais totale. Elle atteint aux fortes concentrations en ammonium et selon le degré de déficience des cellules en azote entre 62 et 90%. Aux faibles concentrations en ammonium, les cellules non déficientes en azote sont plus sensibles à l'effet inhibiteur de l'ammonium ($K_i < 0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) que les cellules déficientes ($K_i > 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Remerciements :

*Nous tenons à remercier l'équipe du laboratoire Proliférations phytoplanctoniques (DEL/EC/PP) de l'Ifremer Brest et plus particulièrement Claire Labry, Marie Pierre Crassous et Agnes Youenou, pour nous avoir mis à disposition leur souche d'*A. minutum*, et assurer le conditionnement ainsi que le suivi des cultures pour les expérimentations azote-15.*

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, D.M., P.M. Glibert & J.M. Burkholder, 2002. Harmful algal blooms and eutrophication : nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25 (4b) : 704-726.
- Aksnes, D.L. & J.K. Egge, 1991. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 70 : 65-72
- Bates, S.S. 1976. Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 21 : 212-218.
- Cannon, J.A. 1990. Development and dispersal of red tides in the Port River, South Australia. *In* : Toxic marine phytoplankton (Graneli, E. Sundstrom, B., Edler, L. & Anderson D.M eds.), 110-115.
- Caperon, J. & J. Meyer, 1972. Nitrogen limited growth of phytoplankton : II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep Sea Res.*, 19 : 619-632.
- Collos, Y., 1983. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 4. Non linear phenomena and the estimation of the maximum uptake rate. *J. Plankton Res.*, 5 : 677-671.
- Collos, Y., 1986. Time lag algal growth dynamics : biological constraints on primary production in aquatic environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 33 : 193-206.
- Collos, Y., C. Gagne, M. Laabir, A. Vaquer, P. Cecchi & P. Souchu. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium Catenella* (Dinophyceae) in Thau Lagoon, Southern France. *J. Phycol.* 40 : 96-103.
- Conway, H.L. 1977. Interactions of inorganic nitrogen in the uptake and assimilation by marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 39 : 221-232.
- Dortch, Q. 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61: 183-201.
- Dortch, Q. & H.L. Conway, 1984. Interactions between nitrate and ammonium uptake : variations with growth rate, nitrogen source and species. *Mar. Biol.* 79 : 151-164.
- Dortch, Q., J.R. jr. Clayton, S.S. Thoresen & S.I. Ahmed, 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.* 81 : 237-250.

- Dortch, Q., J.R. jr. Clayton, S.S. Thoresen, S.L. Bressler & S.I. Ahmed, 1982. Response of marine phytoplankton to nitrogen deficiency : decrease nitrate uptake vs enhanced ammonium uptake. *Mar. Biol.* 70 : 13-19.
- Dortch, Q. P.A. Thompson & P.J. Harrison, 1991. Variability in nitrate uptake kinetics in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 27 : 35-39.
- Dortch, Q. P.A. Thompson & P.J. Harrison, 1991. Short term interactions between nitrate and ammonium uptake by *Thalassiosira pseudonana* : effect of preconditioning nitrogen source and growth rate. *Mar. Biol.* 110 : 183-193.
- Droop, M.R. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.* 9: 264-272
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.* 12: 685-695.
- Dugdale, R.C. & J.J. Goering. 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12: 196-206
- Eppley, R.W. & W.G. Harrison, 1975. Physiological ecology of *Gonyaulax polyedra*, a red water dinoflagellate of southern California. In : *Toxic dinoflagellate blooms* (LoCicero, V.R., eds), Mass. Sci. Technological Found, 11-22.
- Eppley, R.W. & E.H. Renger, 1974. N assimilation of an oceanic diatom in N limited continuous culture. *J. Phycol.*, 10 : 15-23.
- Erard Le Denn, E. 1999. Dragage et environnement marin. Etat des connaissances. In : *Phytoplancton toxique et sédiments*, Ifremer.
- Erard Le Denn, E., M.L. Cochard & J. Le Grand, 1997. Etude sur l'utilisation des kystes d'*Alexandrium minutum* à la prévision des efflorescences. Rapport PNEAT, Ifremer, France convention No 97 5 440912.
- Fan, C., P.M. Glibert & J.M. Burkholder, 2003. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. *Harmful algae*, 2 : 283-299.

- Flynn, J., K.J. Jones & K.J. Flynn, 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (dinophyceae) grown in nitrogen or phosphorus limiting batch culture. *Mar. Biol.* 126 : 9-18.
- Flynn, K.J., 1991. Algal carbon nitrogen metabolism : a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake. *J. Plankton Res.*, 13 : 373-387.
- Flynn, K.J., M.J.R.Fasham & C.R.Hipkin, 1997. Modelling the interactions between ammonium and nitrate uptake in marine phytoplankton. *Phil Trans. R. Soc. London (B)*, 352 : 1625-1645.
- Goldman, J.C. & P.M. Glibert, 1982. Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 27 (5) 814-827.
- Goldman, J.C. & P.M. Glibert, 1983. Kinetics of inorganic nitrogen uptake by phytoplankton. *In* : Nitrogen in marine environment (Carpenter E.J., Capone, D.G., eds) Accademic press, New York, 233-274.
- Hallegraeff, G.M., D.A. Steffensen & R. Wetherbee, 1988. Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shelfish toxins. *J. Plankton. Res.* 10 : 533-541.
- Harrison, P.J., J.S. Parslow & H.L. Conway, 1989. Determination of nutrient uptake kinetic parameters : a comparison of methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 52 : 301-312.
- Harrison, W. G., 1976. Nitrate metabolism of the red tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 21 : 199-209.
- Harrison, W.G., L.R. Harris & B.D. Irwin, 1996. The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer : nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 41 : 16-32.
- Healey, F.P., 1980. Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. *Microb. Ecol.* 5: 281-286
- Kudela, R.M. & W.P. Cochlan, 2000. Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom of southern California. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21 : 31-47.

- Labib, W. & Y. Halim, 1995. Diel vertical migration and toxicity of *Alexandrium minutum* Halim red tide in Alexandria. *Egypt. Mar. Life*, 5 (1) : 11-17.
- Labry, C., E. Erard-Le-Denn, A. Chapelle, A. Youenou, M.P. Crassous & V. Martin-Jézequel, J. Le Grand, 2004. Etude écophysiological et paramétrisation du rôle du phosphore sur la croissance d'*Alexandrium minutum*, espèce responsable d'eaux colorées toxiques en estuaire de Penzé, et de son principal compétiteur *Heterocapsa triquetra*. Rapport PNEAT-ART3, Ifremer
- Lomas, M.W. & P.M. Glibert, 1999. Temperature regulation of nitrate uptake : a novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, 44 : 556-572.
- Lomas, M.W. & P.M. Glibert, 2000. Comparisons of nitrate uptake, storage and reduction in marine diatoms and flagellates. *J. Phycol.*, 36 : 903-913.
- MacCarthy, J.J., 1981. The kinetics of nutrient utilization : *In* : *Physiological basis of phytoplankton ecology* (Platt, T. Eds), *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, 210 : 211-233.
- MacCarthy, J.J. & J.C. Goldman, 1979. Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient depleted waters. *Science*, 203 : 670-672.
- MacIsaac, J.J., G.S. Grunseich, H.E. Glover, & C.M. Yentch, 1979. Light and nutrient limitation in *Gonyaulax Excavata* : nitrogen and carbon trace results. *In* : *Toxic dinoflagellate blooms*. (Taylor D.L., Seliger, H.H. eds) Elsevier North Holland, New York, 107-110.
- Malone, T.C., 1980. Algal size : *In* : *The ecophysiological Ecology of phytoplankton* (Morris, I., eds) Blackwell, London, 43-463.
- Morel, F.M.M., 1987. Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *J. Phycol.* 23: 137-150.
- Morin, P., E. Erard Le Denn, J.F. Maguer, C. Madec, C. Videau, J. Le Grand, & E. Macé, 2000. Etude des causes de prolifération de microalgues toxiques en mer : cas d'*Alexandrium*. Etude scientifique Agence de l'Eau Loire-Bretagne. 135 p.
- Maguer, J.F. M. Wafar, C. Madec, P. Morin & E. Erard-Le Denn, 2004. Nitrogen and phosphorus requirements of an *Alexandrium minutum* bloom in the Penze Estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 49 (4): 1108-1114.

- Probert, I., 1999. Sexual reproduction and ecophysiology of the marine dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim. PhD, university of Westminster, London
- Smayda, T.J., 1997. Harmful algal blooms : their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42 (5/2) : 1137-1153.
- Sommer, U., 1986. The role of competition for resources in phytoplankton succession. *In* : Sommer, U eds, *Plankton Ecology, Successions in Plankton Communities*. Springer-Verlag, Berlin, 57-106.
- Syrett, P.J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210 (346) : 182-210.
- Syrett, P.J., K.J. Flynn, C.J. Molloy, G.K. Dixon, A.M. Peplinska & R.C. Cresswell, 1986. Effects of nitrogen deprivation on rates uptake of nitrogenous compounds by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bolhin, *New Phytol.*, 102 : 39-44.
- Tichner, R., 1981. The regulation of the nitrate metabolism in *Chlorella sorokiniana*, *Ber. Dt. Bot. Ges.* 94S / 635-645.
- Tilman, D. & S.S. Kilham, 1976. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semi-continuous culture. *J. Phycol.* 12: 375-383.
- Treguer, P. & P. Le Corre, 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (Utilisation de l'Autoanalyseur II Technicon), 2^{ème} édition. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Varela, D.E. & P.J. Harrison, 1999. Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliana Huxeyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 186 : 67-74.
- Vila, M. and al., 2005. A comparative study on recurrent blooms of *Alexandrium minutum* in two Mediterranean coastal areas. *Harmful Algae*, 4 : 673-695.
- Yamamoto, T. & G. Hatta, 2004. Pulsed nutrient supply as a factor inducing phytoplankton diversity. *Ecol. Model.* 171: 247-270.
- Yin, K., P.J. Harrison & Q. Dortch, 1998. Lack of ammonium inhibition of nitrate for a diatom grown under low light conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 228 : 151-165.

- Zhou M. & M. Elbrachter, 1994. Diurnal vertical migrations of two dinoflagellates. *Oceanol. Limnol. Sin. Haiyang-Yu-Huzhao*. 25(2) : 173-178.

*Impression : Service IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53*