

E121-LAB-E

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral
Département Ecologie Côtière
Laboratoire Proliférations Phytoplanctoniques

Claire Labry
(coordination)

Evelyne Erard-Le Denn^a, Annie Chapelle^a, Agnes Youenou^a, Marie Pierre Crassous^a,

Véronique Martin-Jézequel^b, Jacqueline Le Grand^a

^a Ifremer DEL/EC/PP

^b ISOMer, UPRES EA 2663

71290
Ifremer

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 final PNEC-ART3, 2003-2004

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10659

Brest, septembre 2004

Sommaire

1. Introduction	
2. Matériel et méthodes	6
2.1. Les cultures	6
2.2. La stratégie	6
2.3. Les analyses	7
3. Résultats et discussion	9
3.1. Influence du degré de carence en phosphore des cellules d' <i>Alexandrium minutum</i> et d' <i>Heterocapsa triquetra</i> avant un pulse de PO ₄ sur leur croissance respective en batch (culture monospécifique et culture mixte)	9
3.1.1. Evolution des concentrations cellulaires et des taux de croissance ...	9
3.1.2. Evolution des concentrations en phosphates	11
3.1.3. Evolution des quotas de P, des diamètres et des viabilités cellulaires	13
3.1.4. Conclusion	15
3.2. Influence du degré de limitation en phosphate des cellules d' <i>Alexandrium minutum</i> et d' <i>Heterocapsa triquetra</i> sur leur physiologie en situation d'équilibre (cultures semi-continues).....	16
3.2.1. Caractéristiques physiologiques des cellules en culture semicontinue	16
3.2.2. Influence de Qp sur le taux de croissance.....	20
3.2.3. Influence des concentrations en PO ₄ et de Qp sur la vitesse d'assimilation des PO ₄	21
3.2.4. Influence de Qp sur la vitesse maximale d'assimilation des PO ₄	24
3.2.5. Influence des conditions de culture sur la viabilité cellulaire et conséquences pour le calcul de l'assimilation des phosphates	26
4. Conclusion	28
5. Bibliographie	29

Résumé

Suite à un premier criblage des facteurs environnementaux favorables à la croissance d'*Alexandrium minutum* comparativement à celle d'une espèce compétitrice en rivière de Penzé, *Heterocapsa triquetra* (rapport ART3 2002-2003) cette étude vise à préciser et quantifier les réponses physiologiques respectives des deux espèces à différentes conditions d'apports en phosphate (taux de croissance, vitesse d'assimilation des phosphates, capacité à stocker le phosphore intracellulaire). Elle montre qu'*Alexandrium minutum* a plutôt une stratégie de « stockage », capable d'assimiler rapidement le phosphate après un apport mais le stockant pour une meilleure croissance ultérieure quand la ressource sera à nouveau épuisée. Comparativement, *Heterocapsa triquetra* aurait, une stratégie de « vitesse adaptée », assimilant rapidement le phosphate et l'utilisant aussitôt pour augmenter son taux de croissance. Ainsi *Am* serait plus compétitive par rapport à *Ht* dans des situations de relatives fortes carences en phosphate. Mais les deux espèces ont une faible affinité pour le phosphate et dans de telles conditions elles ne seraient pas compétitives par rapport à des espèces pico ou nanophytoplanctoniques. Plus généralement cette étude permettra de paramétrer l'influence du quota intracellulaire en phosphore sur les processus de croissance et d'assimilation, participant ainsi à une meilleure calibration du modèle de croissance d'*Alexandrium minutum*.

1. Introduction

Parmi les espèces toxiques émergentes, *Alexandrium minutum* tient une grande place de par la dangerosité des toxines qu'elle produit (toxines paralysantes responsables chez l'homme du syndrome PSP, "Paralytic Shellfish Poisoning") et de par la récurrence des eaux colorées qu'elle provoque dans le secteur Nord Bretagne. Observée en 1988 dans les abers bretons Benoit et Wrac'h, elle est présente régulièrement en rivière de Penzé depuis cette même date (Erard-Le-Denn, 1999). Sa présence a aussi été relevée ces dernières années en Baie de Lannion, dans la Rance, en Baie de Vilaine, dans le bassin de Marennes-Oléron et en Rade de Toulon (données REPHY). Ces efflorescences lorsqu'elles atteignent quelques millions de cellules occasionnent régulièrement des interdictions préfectorales de commercialisation des mollusques filtreurs pouvant entraîner des pertes financières non négligeables pour les professionnels.

Les études entreprises depuis 1997 en rivière de Penzé ont permis de cerner les conditions physiques (insolation, température, courant de marée, débit) favorables au déclenchement du bloom (Morin *et al.*, 2000). L'interaction des facteurs nutritionnels n'est quant à elle pas élucidée si ce n'est que le développement d'*Alexandrium minutum* semble restreint à des systèmes nettement perturbés par les apports anthropiques, comme c'est le cas en rivière de Penzé. Ces apports sont caractérisés par un fort déséquilibre entre les nutriments azotés et les phosphates (rapports $N_{\min}:P > 50$) et des teneurs en phosphates généralement élevées mais qui peuvent aussi parfois atteindre des valeurs faibles ($< 0.1 \mu\text{M}$) après une efflorescence (Morin *et al.*, 2000) ou au moment où une efflorescence pourrait avoir lieu (données de juin 2004). Si ces teneurs ne témoignent pas à première vue d'une limitation par le phosphate mais plutôt un fort déséquilibre par rapport aux formes azotées (c'est le cas aussi du silicium), on peut suspecter le contrôle qu'exercent les apports en phosphates sur la dynamique de croissance du phytoplancton présent dans l'estuaire, *Alexandrium minutum* mais aussi les espèces non toxiques qui coexistent. En effet, *Alexandrium minutum* domine rarement la communauté phytoplanctonique. En 1997 elle a exceptionnellement atteint une contribution en nombre de cellules de plus de 90 % (Morin *et al.*, 2000) mais généralement et même au stade d'eaux colorées, elle est associée à d'autres espèces dont l'abondance est également importante. Il s'agit de dinoflagellés comme *Heterocapsa triquetra*, l'espèce la plus fréquemment associée et abondante, ou *Scrippsiella trochoidea* et de diatomées du genre *Nitzschia* et *Chaetoceros*.

La compréhension de la dynamique de croissance d'*Alexandrium minutum* doit passer à la fois par la connaissance des modalités physiologiques de nutrition de cette espèce, comparativement à ses compétitrices et du régime des apports en éléments nutritifs du milieu. Ces aspects écophysiologiques ont été

relativement peu abordés jusqu'à présent. La modélisation, outil intégrateur, ne pourra pas non plus faire l'impasse sur la connaissance des caractéristiques physiologiques de cette microalgue et de l'influence du milieu sur ces caractéristiques pour pouvoir simuler la dynamique de ces espèces *in situ*.

Des études *in vitro* réalisées dans le cadre d'une précédente proposition du laboratoire au PNEC ART 3 ont montré que le seul cas recensé où *Alexandrium minutum* a un taux de croissance (0.24 j^{-1}) supérieur à celui d'*Heterocapsa triquetra* (0.14 j^{-1}) en culture mixte correspond à une situation de carence en phosphate des cellules pendant une dizaine de jours suivi d'un pulse de PO_4 (Erard-Le Denn *et al.*, 2003). Cela tendrait à montrer que la croissance d'*Alexandrium minutum* serait favorisée en condition d'alternance de limitation et de pulse de PO_4 . Ces résultats préliminaires associés aux déséquilibres $\text{N}_{\text{min}}:\text{P}$ observés *in situ* mettent en évidence la nécessité de préciser le rôle du phosphore sur la dynamique de croissance d'*Alexandrium minutum* et de pouvoir traduire sous forme de fonction mathématique les processus de contrôle du phosphore sur la prise de phosphate et sur la croissance pour chacune des espèces, c'est ce en quoi cette proposition veut contribuer.

Ce projet fait suite à des études montrant l'importance de cet élément dans la régulation du métabolisme toxinique d'*Alexandrium minutum* (Flynn *et al.*, 1994), la production de toxines pouvant être favorisée en condition de limitation en phosphore (résultats de Bechemin *et al.*, 1999 sur notre souche ; Guisande *et al.*, 2002). Les quelques études sur la détermination des caractéristiques d'assimilation des phosphates du genre *Alexandrium* ont été réalisées sur *Alexandrium tamarense* présent dans deux baies du Japon (Yamamoto & Tarutani, 1996; Yamamoto & Tarutani, 1999). Elles ont montré la faible affinité de leur système membranaire de transport des phosphates vis à vis de cette molécule (constante de demi-saturation K_s élevée : $1.85\text{-}2.6 \mu\text{M}$) et sa faible vitesse maximale d'assimilation (V_{max} de $1.4\text{-}1.64 \text{ pmol P cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Cela en ferait un piètre compétiteur par rapport à d'autres espèces et aux bactéries et leur survie à de brèves périodes de limitation pourrait s'expliquer par leur grande capacité de stockage du phosphore ($Q_{\text{pmax}}/Q_{\text{pmin}} = 36$), leur capacité « d'assimilation impulsionnelle » et leur faible taux de croissance. Notre souche *Alexandrium minutum* n'aurait pas une si grande capacité de stockage du phosphore d'après Probert, 1999 avec $Q_{\text{pmax}}/Q_{\text{pmin}} \sim 3$. On ne connaît ni son affinité (K_s) ni ses potentialités d'assimilation du phosphate (activité maximale V_{max}) et encore moins l'évolution de ces caractéristiques avec le degré de déficience en phosphate. Enfin on ne connaît pas l'influence du quota cellulaire en phosphore sur le taux de croissance de cette espèce.

Ce rôle a été appréhendé par quatre interrogations principales :

(1) Quelle est l'influence du degré de carence en phosphore des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* avant un pulse de PO_4 sur leur croissance respective en culture monospécifique et en culture mixte ? Directement liée à l'observation de la dominance d'*Alexandrium* lors des cultures mixtes en condition limitante soumise à un pulse de PO_4 , cette question expérimentée en batch, doit permettre de connaître quelle est la réaction de chaque espèce en terme de croissance et de vitesse d'assimilation de PO_4 en fonction de son quota en phosphore.

(2) Quelle est l'influence du degré de limitation en phosphate des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* sur leur taux de croissance en situation d'équilibre (cultures semi-continues)? La formulation de Droop [$\mu = \mu_{\max} (1 - Q_{p\min}/Q_p)$] faisant intervenir le taux de croissance maximal des cellules (μ_{\max}) et le quota minimal ($Q_{p\min}$) est-elle applicable et suffisante ou d'autres formulations plus complexes sont-elles nécessaires (paramétrisation du quota maximum, $Q_{p\max}$ et formulation de son contrôle)?

(3) Quelle est l'influence des concentrations en PO_4 sur leur vitesses d'assimilation respectives ? Le modèle simple de Michaelis & Menten peut-il s'appliquer et auquel cas comment évoluent les paramètres michaeliens K_{pO_4} , $V_{p\max}$ d'assimilation des PO_4 avec le degré de déficience en phosphore des cellules (effet répletion/carence du quota, Loquet, 2002) ?

(4) L'état physiologique des cellules prises individuellement est-il hétérogène au sein des populations d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* : présence de sous-populations de cellules actives/inactives ?

Chaque expérimentation devait être accompagnée d'un modèle simple OD mis au point sur des cultures d'*Alexandrium minutum* (Loquet 2002 sur des bioessais de Probert, 1999 réalisés au laboratoire dans le cadre de sa thèse), ce modèle, devant être ajusté avec l'information nouvelle acquise par ces expérimentations. Ce travail n'est pas terminé pour raison de congé maladie de deux mois puis de non remplacement d'un congé maternité de six mois. Il se prolongera en fin 2004 et 2005 et n'apparaît pas dans ce rapport.

Dans la suite du rapport, les espèces *Alexandrium minutum* et *Heterocapsa triquetra* seront généralement citées par leurs abréviations respectives « *Am* » et « *Ht* ».

2. Matériel et méthodes

2.1. Les cultures

Les études ont été réalisées sur les souches *Alexandrium minutum* (AM89BM) et *Heterocapsa triquetra* (HT99PZ), souches autochtones (respectivement Baie de Morlaix et rivière de Penzé) clonales non axéniques isolées au laboratoire. Elles sont maintenues dans une eau de mer naturelle (collectée à la station marine d'Argenton) filtrée sur 0.2 μm et enrichie en éléments nécessaires à la croissance des algues selon les concentrations du milieu f/2 (Guillard & Ryther, 1962). Pour chaque expérimentation, les cellules ont été préconditionnées dans le milieu nutritif correspondant par deux repiquages. Les bioessais ont été réalisés dans des conditions de température de 18 °C, de salinité 27 et de lumière de 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une photopériode de L:D 14:10.

2.2. La stratégie

L'expérience de compétition a été réalisée en mode batch sur des cultures bispécifiques (ou mixtes) et des témoins monospécifiques. Les caractéristiques d'assimilation des phosphates par les deux algues et l'influence du quota en phosphore sur leur taux de croissance ont été étudiées sur des cultures monospécifiques en mode semi continu.

L'expérience de compétition a consisté à inoculer les deux espèces soit seule (culture monospécifique) soit ensemble (cultures mixtes en trois replicats) dans un milieu (4.5 litres) dépourvu de phosphate et une teneur en NO_3 correspondant au milieu f/2/4 ($\sim 220 \mu\text{M}$), à raison de 500 cellules ml^{-1} chacune. A partir du jour d'inoculation (to), les caractéristiques de la culture ont été suivies régulièrement ($[\text{PO}_4]$, $[\text{NO}_3]$, $[\text{NH}_4]$, concentration cellulaire) et à chaque temps de suivi (1, 2, 3, 5, 7, 10 jours), un souséchantillon de chaque culture (400 ml) a été prélevé et a subi un pulse de phosphate (4 μM). Sur chacun de ces souséchantillons, la concentration cellulaire et les teneurs en sels nutritifs ont été mesurées quotidiennement.

Cette expérience de mise en carence a été reproduite (sans souséchantillonner à des fins d'ajout de pulse) sur les cultures monospécifiques afin de réaliser des mesures complémentaires tels que le quota intracellulaire en phosphore, le diamètre cellulaire et la viabilité cellulaire.

En mode semicontinu (renouvellement du milieu nutritif toutes les 24h), les cellules ont été cultivées (3 litres) en milieu f/2/4-P (9 $\mu\text{M PO}_4$) et f/2-N (880 $\mu\text{M NO}_3$) après avoir été préconditionnées en batch. Dans ce type de culture,

une valeur de taux de renouvellement du milieu (ou taux de dilution D) impose à l'équilibre une valeur de taux de croissance (μ) et de quota intracellulaire en l'élément limitant. A l'équilibre, le taux de croissance atteint une valeur théorique déterminée ainsi : $\mu = -\ln(1-D)$. Les taux de dilution choisis (réalisés en duplicats) ont couvert la gamme de taux de croissance connus pour les deux espèces entre 0.05 et 0.5 j^{-1} pour *Alexandrium minutum* et jusqu'à 0.6 j^{-1} pour *Heterocapsa triquetra*. Les concentrations en phosphate ajoutées chaque jour se sont échelonnées de 0.4 à $4 \text{ }\mu\text{M}$ pour *Am* et jusqu'à $4.8 \text{ }\mu\text{M}$ pour *Ht*. Pratiquement, les cultures sont homogénéisées une seule fois par jour juste avant de réaliser l'échange. L'agitation manuelle douce a été privilégiée à l'agitation automatique (barreau magnétique) dont il a été montré qu'elle altérait l'état physiologique des cellules d'*Alexandrium* (Le Floch, 1998, Probert 1999) et probablement d'*Heterocapsa triquetra*, dinoflagellés sensibles à la turbulence. Le volume correspondant à chaque taux de dilution est d'abord soustrait des ballons à l'aide d'une pompe péristaltique puis le milieu « neuf » stérile est ajouté manuellement. Un suivi des concentrations cellulaires et des concentrations en sels nutritifs a été réalisé tous les deux à trois jours. Les cultures ont été considérées à l'équilibre à partir du moment où ces concentrations n'ont plus varié de plus de, respectivement 20% et 10%. Les paramètres suivants ont alors été mesurés durant trois jours (triplicats) sur les volumes extraits de tous les ballons : C, N, et P particulières, vitesse maximale (V_{\max}) d'assimilation des PO_4 , viabilité cellulaire, volume cellulaire. Les mesures d'assimilation des phosphates sur le taux de dilution le plus élevé ont été réalisées avant l'atteinte de l'équilibre pour lequel la concentration cellulaire aurait été trop faible (état de lessivage de la culture). Sur les ballons dépourvus de PO_4 à l'équilibre, une mesure de la constante de demi-saturation (K_s) de l'assimilation des PO_4 a été réalisée.

2.3. Les analyses

Le nombre de cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* en culture monospécifique a été déterminé par comptage sur cellule de Nageotte au microscope optique après fixation au lugol. Le volume cellulaire a été mesuré sur ces mêmes échantillons grâce à un analyseur d'image (logiciel développé à l'Ifremer). Concernant les cultures mixtes, l'utilisation d'un anesthésiant non colorant (3-aminobenzoïque acide éthyl ester) pour fixer les échantillons a permis de mieux distinguer les deux espèces très proches morphologiquement et plus difficilement distinguables une fois lugolées. Les cellules étant plus facilement dégradées dans l'anesthésiant au delà de quelques jours, elles ont été comptées dans les 24h.

Les sels nutritifs $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ et PO_4 ont été dosés à l'aide de l'Autoanalyseur AACE Bran & Luebbe et NO_2 à l'aide de l'Autoanalyseur Technicon AAI selon les méthodes correspondantes de Treguer & Le Corre (1975). NH_4 a été

déterminé selon la méthode fluorimétrique de Kerouel & Aminot (1997). Les analyses de C, N, et P particulaires ont été réalisées sur des filtres Whatman GF/D. C et N particulaires ont été mesurés à l'analyseur CN VarioEL III Elementar après décarbonatation des filtres. Le P particulaire a été analysé par la méthode de mesure du phosphore particulaire total de Solorzano & Sharp (1980). Les quotas de phosphore ont été calculés en divisant le POP par le nombre de cellules algales correspondantes.

La vitesse maximale (V_{\max}) d'assimilation des phosphates ainsi que le K_s ont été estimées par l'utilisation du $^{33}\text{PO}_4^{3-}$. La détermination de la V_{\max} a été réalisée à $10 \mu\text{M PO}_4$ (quand la $[\text{PO}_4]$ à l'équilibre n'était pas nulle, le complément a été ajouté à l'aide d'une solution de KH_2PO_4). Différents volumes de culture ont été incubés et filtrés selon la concentration en cellules algales avec un équivalent de quantité introduite de $30 \mu\text{Ci}$ pour environ 500 000 cellules. La détermination des K_s a été réalisée en ajoutant 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 et $6.4 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ et une quantité introduite équivalente sur le filtre de 2.5 à $12 \mu\text{Ci}$. Différents temps d'incubation ont été réalisés allant de 5 min à 6h. L'assimilation a été arrêtée par l'addition de formaldéhyde et de KH_2PO_4 pour atteindre respectivement 4 % et 0.1 mM de concentration finale.

La viabilité cellulaire a été déterminée avec un marqueur généralement utilisé chez les levures (Molecular probe F-7030, Haugland, 1996, Millard *et al.*, 1997), selon la méthode mise au point chez les microalgues par Mezière (2002), Olivier (2003) et Martin-Jézéquel (données non publiées, Erard *et al.*, 2003). Le FUN-1 cell Train est un marqueur métabolique de cellules à membrane perméante qui se lie aux acides nucléiques. Il a été choisi dans le cadre de cette étude car il marque les cellules viables, ce qui permet ensuite de fixer et de conserver les échantillons prélevés en cours d'expérimentation et de réaliser ultérieurement les analyses au laboratoire. Ce marqueur fluorescent est constitué par du 2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-méthyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylidène)-1-phénylquinolinium iodide (Millard *et al.*, 1997). Sa diffusion passive à travers la membrane entraîne la formation de CIVS, structures cylindriques intra-vacuolaires (Haugland, 1996). L'incorporation de ce marqueur impliquerait la formation de conjugués du glutathione à médiation enzymatique chez les levures (Millard *et al.*, 1997). Dans un premier temps, le FUN-1 marque le cytoplasme des cellules viables avec une fluorescence verte diffuse dont la détection est possible en cytométrie et en microscopie à fluorescence. La formation de CIVS apparaît secondairement et entraîne une diminution de la fluorescence verte cytoplasmique, ainsi qu'une augmentation de la fluorescence rouge ; elle requiert l'intégrité de la membrane plasmique mais également du métabolisme. Le transport de FUN-1 du cytosol aux vacuoles n'est pas réalisé chez les cellules mortes. Celles-ci ont une fluorescence brillante de couleur vert jaune et ne présentent pas de CIVS (Haugland, 1996).

La solution stock de FUN-1 utilisée (Molecular Probes) est une solution à 10 mM dans du DMSO anhydre. Ce dernier rend les cellules plus perméables. La solution finale de FUN-1 est une solution diluée à 1%. La concentration finale dans les échantillons est de 1 μ M, avec un temps d'incubation de 10 minutes à l'obscurité. Le fixateur utilisé ici est le paraformaldéhyde à 1%, qui permet une meilleure conservation de la morphologie des cellules que le glutaraldéhyde (Vrieling *et al.*, 1993). Le temps d'incubation pour la fixation est de 10 min. Les échantillons sont conservés au congélateur à -80°C avant l'observation et le dénombrement des cellules mortes ou vivantes. Ce dénombrement est fait au microscope à épifluorescence OLYMPUS, en utilisant un filtre d'excitation à 450/480 et d'émission à 515 nm. Le microscope est équipé d'une caméra et d'un logiciel de visualisation LUCIA.

3. Résultats et discussion

3.1. Influence du degré de carence en phosphore des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* avant un pulse de PO_4 sur leur croissance respective en batch (culture monospécifique et culture mixte)

3.1.1. Evolution des concentrations cellulaires et des taux de croissance

L'examen de la cinétique de croissance d'*Am* et d'*Ht* en population mixte après différentes durées d'exposition à un milieu dépourvu de PO_4 suivi d'un pulse de 4 μ M met en évidence trois périodes bien marquées (Figure 1, 2) :

- (1) Après 1 à 2 jours d'exposition, la croissance d'*Ht* après le pulse est supérieure à celle d'*Am* en terme de taux de croissance et de concentration cellulaire maximale atteinte.
- (2) Après 3 à 5 jours, les taux de croissance d'*Ht* et d'*Am* ne sont pas significativement différents mais la concentration cellulaire en fin de croissance est supérieure pour *Am*
- (3) Après 7 à 10 jours, le taux de croissance d'*Am* et sa concentration cellulaire en phase de saturation sont nettement supérieurs à ceux d'*Ht*.

En cultures monospécifiques, le taux de croissance et la densité cellulaire sont toujours supérieures pour *Ht*.

Dans toutes les configurations, le taux de croissance des deux algues chute du 1^{er} au 3^{ème} jour puis, excepté pour *Ht* en culture mixte, les taux de croissance réaugmentent jusqu'au 7^{ème} jour. Ainsi, il semblerait dans cette expérience qu'il y ait une adaptation des deux algues à partir de 3 jours de conditionnement dans un milieu dépourvu de phosphate entraînant une meilleure croissance après ajout de phosphate.

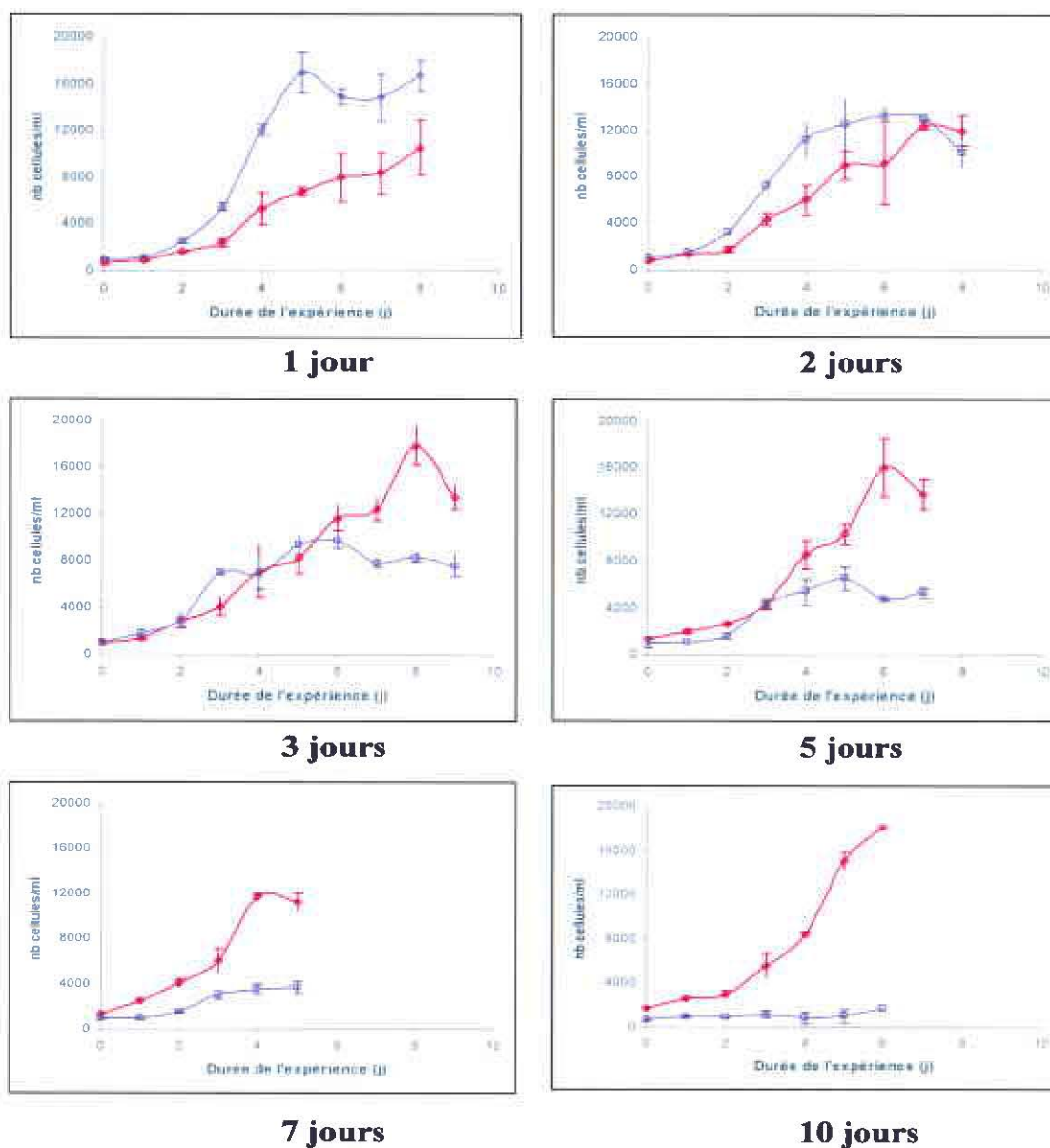


Figure 1 : Evolution de la concentration cellulaire (nombre de cellules/ml) d'*Alexandrium minutum* (points et courbe rose) et d'*Heterocapsa triquetra* (points et courbe mauve) dans les cultures mixtes après 1, 2, 3, 5, 7 ou 10 jours d'exposition à un milieu dépourvu de PO_4 suivi d'un pulse de $4 \mu\text{M}$

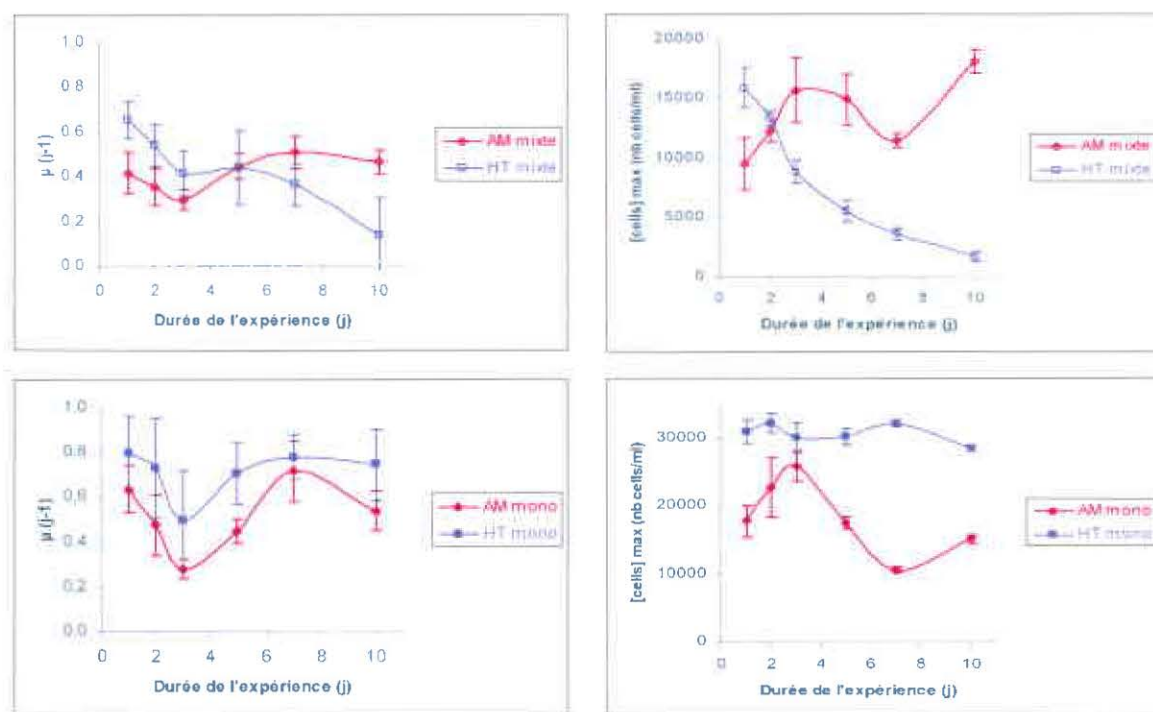


Figure 2 : Evolution du taux de croissance μ (j⁻¹) et de la concentration cellulaire maximale atteinte (nombre de cellules/ml) d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* dans les cultures mixtes et monospécifiques après l'ajout de 4 μ M PO₄ en fonction de la durée antérieure d'exposition à un milieu dépourvu de PO₄

Ces résultats confirment ceux de la première expérience de compétition réalisée dans les mêmes conditions mais dont le pulse de phosphate avait été ajouté seulement après 10 jours de carence (Erard *et al.*, 2003).

3.1.2. Evolution des concentrations en phosphates

L'examen de l'évolution des teneurs en phosphates dans les cultures venant de subir le pulse de phosphate (Figure 3) montre que, dès le 3^{ème} jour de conditionnement :

- (1) les phosphates sont consommés jusqu'à épuisement en moins d'un jour dans les cultures mixtes et dans la culture monospécifique d'*Am* alors que plusieurs jours étaient nécessaires antérieurement
- (2) la consommation du pulse est moins rapide dans la culture monospécifique d'*Ht* par rapport à la culture monospécifique d'*Am*, contrairement aux jours précédents.

Il est à noter que le pulse était identique dans la culture après 10 jours de conditionnement (4 μ M) mais la vitesse de consommation devait être si rapide

que, le temps de prélever et filtrer l'échantillon, une partie du pulse a probablement déjà été consommée. Ainsi à partir de trois jours de carence, *Am* aurait acquis une vitesse d'assimilation des phosphates supérieure à celle d'*Ht*, ce qui n'était pas le cas au début de l'expérience, se traduisant par une croissance supérieure à celle d'*Ht* en culture mixte ensuite.

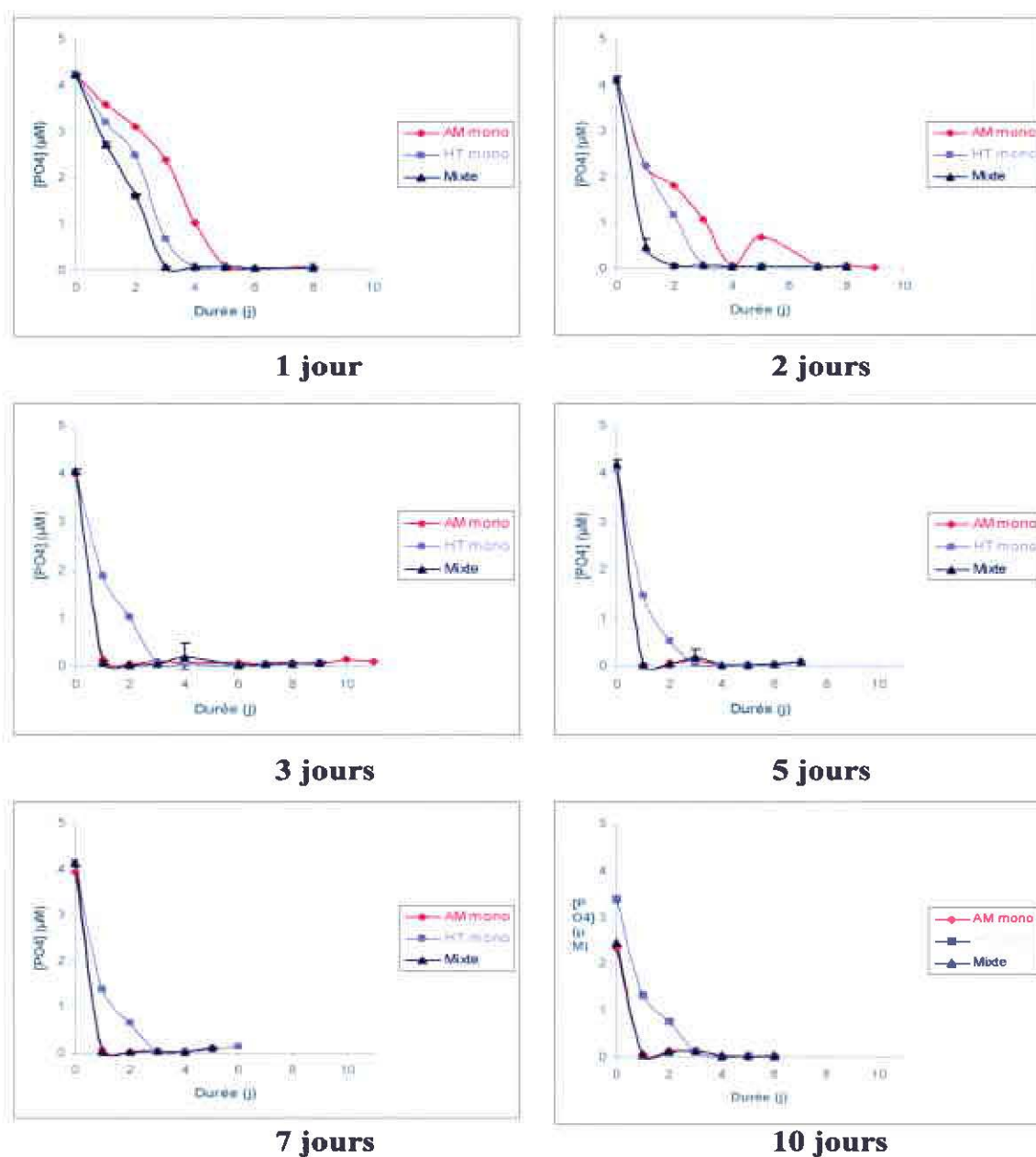


Figure 3 : Evolution de la concentration en PO_4 dans les cultures mixtes et monospécifiques après 1, 2, 3, 5, 7 ou 10 jours d'exposition à un milieu dépourvu de PO_4 suivi d'un pulse de $4 \mu M$.

Le calcul de la consommation journalière du pulse de PO_4 par unité de phosphore intracellulaire ou quota (vitesse spécifique) dans les cultures monospécifiques montre effectivement qu'*Ht* est plus compétitif les premiers jours mais l'est probablement moins ensuite (Figure 4a). Au delà du 3^{ème} jour, la vitesse est sousestimée pour *Am* car l'intervalle d'échantillonnage des PO_4 (24 h) était trop grand dans ces conditions, le pulse de 4 μM ayant probablement été consommé en quelques heures. En tous les cas les vitesses spécifiques des deux espèces augmentent, traduisant une adaptation physiologique des cellules à la carence en phosphate. La consommation de PO_4 par cellule est très vite plus importante pour *Am* (Figure 4b), ce qui est à rapprocher de l'examen des quota en phosphore (cf ci-après).

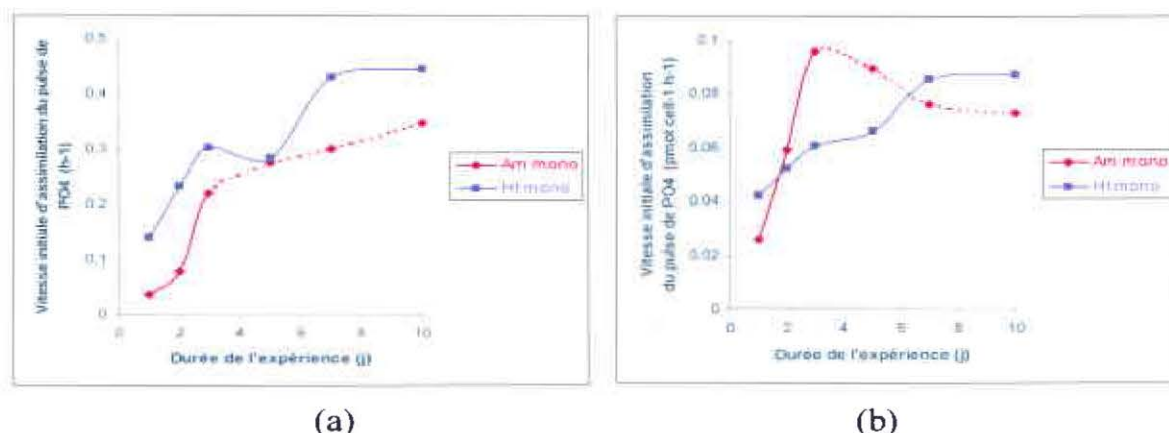


Figure 4 : Evolution de la vitesse initiale de consommation du pulse de PO_4 (a : vitesse spécifique en h^{-1} et b : consommation par cellule en $\text{pmolP cell}^{-1} \text{h}^{-1}$) mesurée par différence des concentrations en PO_4 sur 24h dans les cultures monospécifiques et rapportée à l'heure. A partir de 3 jours, cette vitesse correspond à sa valeur minimale pour *Am*, le pulse ayant été consommé en moins de 24h.

3.1.3. Evolution des quota de P, des diamètres et des viabilités cellulaires

Le changement de vitesse d'assimilation des phosphates est conséquent à un stress intracellulaire en phosphore. L'examen de l'évolution des quota de phosphore d'*Am* et d'*Ht* montre, après une augmentation du quota d'*Am* jusqu'au 2^{ème} jour, une chute brutale de celui-ci entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour puis une diminution plus progressive jusqu'au 10^{ème} jour (Figure 5a). Le quota d'*Ht* diminue du 1^{er} au 3^{ème} jour puis est relativement constant ensuite. La valeur minimale de quota atteinte est similaire pour *Am* ($6.5 \pm 0.6 \text{ pgP cell}^{-1}$) et *Ht* ($6.1 \pm 0.4 \text{ pgP cell}^{-1}$).

Alors que le quota cellulaire diminue, le diamètre cellulaire moyen et par conséquent le volume cellulaire moyen (calculé en considérant que les cellules sont sphériques) tendent à augmenter (Figure 5b). Cette augmentation entraîne une chute plus importante encore du quota exprimée par unité de volume cellulaire (Figure 5c). Pour *Am*, on peut suspecter la formation de planozygotes suite à une induction probable de la sexualité de l'espèce dans ces conditions de limitation en phosphate (Probert 1999). Toutefois des planozygotes, identifiables par leur taille $> 28 \mu\text{m}$, ne sont détectables que le dixième jour (12% de la population totale). Pour les deux espèces cette augmentation de la taille cellulaire alors que leur taux de croissance est faible ($< 0.15 \text{ j}^{-1}$) serait plutôt associée à une répllication de l'ADN sans division mitotique (phase S puis G2 du cycle cellulaire), division rendue impossible par la carence en phosphore.

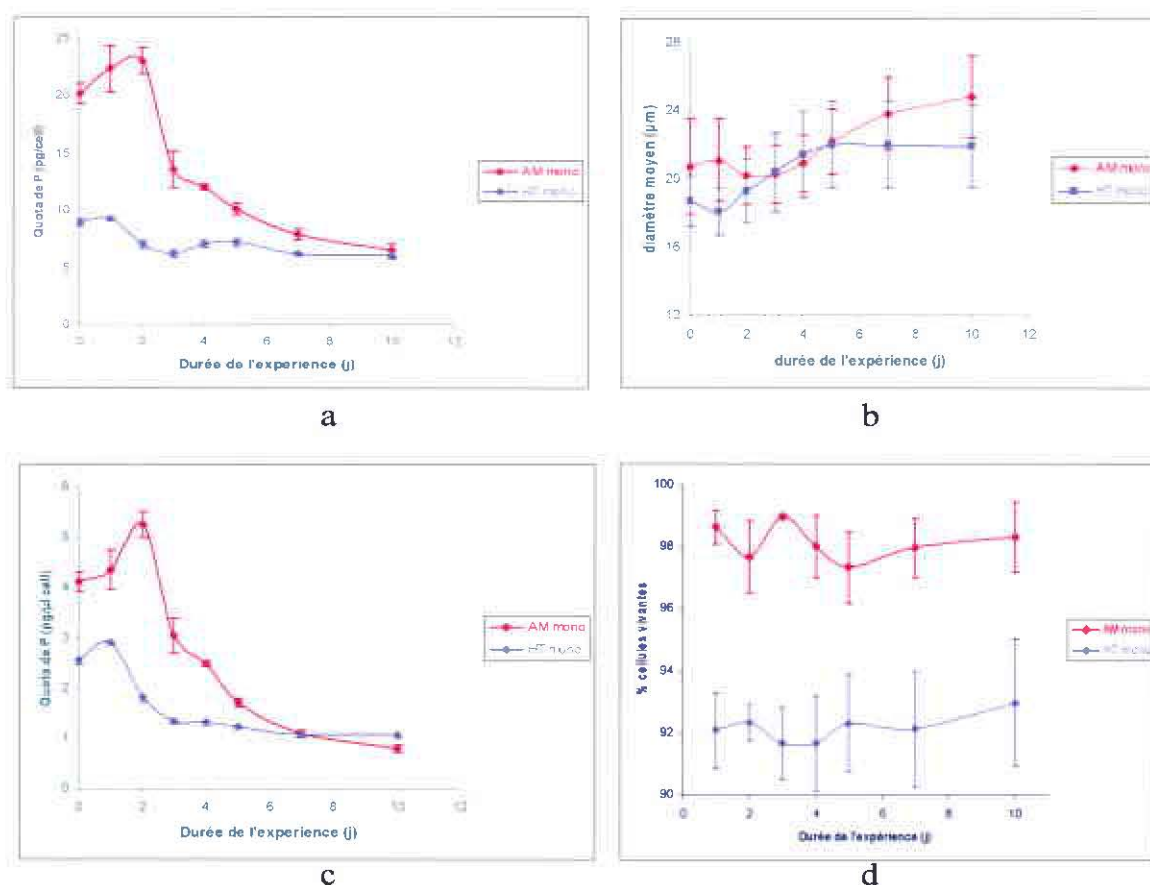


Figure 5 : Evolution du quota de P par cellule (a, pgP cell^{-1}), du diamètre cellulaire (b, μm), du quota de P par unité de volume cellulaire (c, $\text{pgP } \mu\text{cell}^{-1}$) et de la proportion (d, %) de cellules vivantes par rapport à la population totale dans les cultures monospécifiques en fonction de la durée d'exposition à un milieu dépourvu de PO_4 .

Malgré ces changements physiologiques, le taux de viabilité des cellules n'est pas significativement différent en fonction de la durée de cette carence (Figure 5d) : les deux espèces présentent de fortes proportions de cellules vivantes, légèrement supérieures pour *Am* (environ 98%) que pour *Ht* (environ 92%). Il semble donc que les cellules ne sont pas plus affectées, en terme de viabilité, par des carences longues en comparaison des carences courtes.

Cette expérience montre la large gamme de quota expérimentée par *Am* (6.5-23 pgP cell⁻¹) alors que son quota maximum ($Q_{p_{max}}$) n'est pas atteint (48 pgP cell⁻¹ d'après les essais de Probert 1999 pour cette souche). La valeur minimum du quota observée ici pour *Am* (6.5 pgP cell⁻¹) est plus faible que ce que Probert (1999) avait obtenu dans ses essais (17 pgP cell⁻¹) mais est similaire à la valeur la plus basse obtenue par Béchemin *et al.* (1999) sur la même souche (0.19 pmol cell⁻¹ soit 5.9 pgP cell⁻¹). Quant aux valeurs de quota d'*Ht*, la gamme mesurée est beaucoup moins étendue (6.1-9.2 pgP cell⁻¹). Ceci peut être dû à des cellules plus carencées dès le début de l'expérience et/ou à une capacité de stockage du phosphore moindre par rapport à *Am*. A notre connaissance, il n'existe pas de données de quota de phosphore d'*Ht* dans la littérature. Le quota minimum mesuré pour *Heterocapsa triquetra* dans cette expérience (6.1 pgP cell⁻¹) est supérieur à celui d'*Heterocapsa circularisquama* (2.77 pgP cell⁻¹, Yamaguchi *et al.*, 2001).

3.1.4. Conclusion

Du point de vue de la compétition entre les deux espèces, il apparaît que *Heterocapsa triquetra* dans des conditions « modérées » de limitation soit plus compétitive avec une vitesse spécifique d'assimilation supérieure à celle d'*Alexandrium minutum* et qui se traduit par une croissance plus importante après un apport en phosphate. Parmi les trois stratégies de compétition possibles vis à vis de la ressource en phosphore (Sommer, 1984), *Heterocapsa triquetra* serait, dans ces conditions, proche des espèces à « stratégie de vitesse adaptée », caractérisées par une grande V_{max} et un grand μ_{max} , capables d'assimiler le nutriment limitant immédiatement après un pulse et de se diviser.

Alexandrium minutum a, dans ces conditions, une vitesse spécifique moindre que celle d'*Ht*. Toutefois sa consommation de phosphate par cellule augmente les tous premiers jours, se traduisant par une augmentation du quota cellulaire en phosphore mais une diminution du taux de division cellulaire. Lorsque les conditions de limitation en phosphore deviennent plus « sévères », elle devient capable d'augmenter encore sa vitesse d'assimilation et de le traduire cette fois-ci en une augmentation de son taux de division cellulaire. *Ht* ne serait alors plus compétitif. Comparativement, *Alexandrium minutum* serait une espèce à « stratégie de stockage » ayant une grande V_{max} mais un μ_{max} plus faible,

assimilant le nutriment limitant immédiatement après un pulse mais le stockant pour pouvoir survivre dans les périodes de déplétion. Cette hypothèse serait renforcée par la gamme de quota en phosphore observée dans cette expérience qui est plus large pour *Am* (6.5 à 23 pgP cell⁻¹) que celle d'*Ht* (6.1 à 9.2 pgP cell⁻¹) alors que $Q_{p_{max}}$ n'est pas atteint.

Dans cette expérience, *Am* et *Ht* montrent une capacité d'adaptation physiologique à une carence en phosphore qui se traduit par une augmentation de leur vitesse spécifique d'assimilation. Cette adaptation reste à être caractérisée (détermination et évolution des paramètres V_{max} et K_s) ainsi que leur capacité de stockage du phosphore. C'est ce qui a été réalisé dans les expériences de cultures en semicontinu.

3.2. Influence du degré de limitation en phosphate des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* sur leur physiologie en situation d'équilibre (cultures semi-continues)

3.2.1. Caractéristiques physiologiques des cellules en culture semicontinue

Le mode de culture semi continu (renouvellement du milieu nutritif toutes les 24h) a été utilisé car il permet d'atteindre pour les cellules algales des états physiologiques graduels de limitation en un nutriment. Dans ce type de culture, une valeur de taux de renouvellement du milieu impose à l'équilibre une valeur de taux de croissance et de quota intracellulaire en l'élément limitant. Il a été préféré au mode continu, qui permet un contrôle de tous les paramètres de la culture et qui est souvent utilisé (Ducobu *et al.*, 1998, Ahn *et al.*, 2002), pour les raisons suivantes : (1) il permet de limiter l'agitation des ballons (une seule fois par jour) très défavorable aux deux espèces étudiées (Le Floc'h 1998, Probert 1999) ; (2) il permet d'atteindre différents équilibres dans la même expérimentation, ce que permet moins la culture continue beaucoup plus lourde en terme d'appareillage associé et de suivi (Malara & Sciandra, 1991) ; (3) ce mode est utilisé en culture monospécifique (Yamaguchi & Itakura, 1999, Yamamoto and Tarutani, 1999) et est aussi généralement préféré pour des études de compétition entre espèces en culture (Nicklisch, 1999) ou sur des assemblages naturels (Ghosh *et al.*, 1999, Suttle & Harrison, 1986) ; (4) il est probablement plus représentatif des conditions d'apports pulsés de nutriments dans le milieu (Suttle & Harrison 1986).

Après quinze jours à trois semaines de renouvellement, les taux de croissance des cellules étaient similaires aux taux de croissance théoriques attendus pour ce type de culture à l'équilibre (Tableau 1). Ces dynamiques aboutissent comme dans les cultures continues à un gradient décroissant de concentration

cellulaire avec le taux de dilution et croissant de quota en l'élément limitant (Figure 6). Pour *Ht*, seul le taux de dilution de 0.05 j^{-1} conduit à une culture moins concentrée que le suivant (0.1 j^{-1}). Pour les taux de dilution maximum (0.5 j^{-1} pour *Am* et 0.6 j^{-1} pour *Ht*) l'atteinte de l'équilibre aurait conduit à la disparition complète des cellules du milieu (état de lessivage de la culture). L'échantillonnage a été réalisé alors que les concentrations cellulaires étaient faibles ce qui explique la plus forte variabilité du quota (Figure 6). Toutefois malgré cela, $Q_{p_{\max}}$ moyen atteint pour *Alexandrium* est le même que celui précédemment obtenu par Probert (1999) sur des cultures en batch (48 pgP cell^{-1}), appuyant l'hypothèse d'une proximité de μ_{\max} même si celui-ci atteint alors une valeur supérieure (0.63 j^{-1} , Tableau 1) au taux de croissance maximum observé en batch (0.46 j^{-1} Erard *et al.*, 2003). Pour *Ht* il n'existe pas, à notre connaissance, de données de $Q_{p_{\max}}$ dans la littérature afin de comparer avec celle obtenue ici ($23.3 \pm 2.6 \text{ pgP cell}^{-1}$). Le taux de croissance maximum alors atteint (0.89 j^{-1}) est supérieur au taux de croissance maximum atteint en culture batch (0.66 j^{-1} Erard *et al.* 2003).

Tx dilution	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.6
μ théorique	0.05	0.11	0.16	0.22	0.29	0.36	0.43	0.51	0.60	0.69	0.92
μ mesuré <i>Am</i>	0.05	0.14	0.17	0.20	0.28	0.35	0.39	0.46	0.54	0.63	-
μ mesuré <i>Ht</i>	0.04	0.11	0.15	0.22	-	0.37	-	0.52	-	0.71	0.89

Tableau 1 : Taux de dilution (j^{-1}), taux de croissance théoriques et mesurés (j^{-1}) des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* en cultures semicontinues

Les diamètres cellulaires augmentent légèrement avec le taux de dilution (Figure 6). Le mode semi-continu dans les conditions les plus limitantes en phosphate (faible taux de dilution) n'est pas favorable à une reproduction sexuée d'*Am* (aucun planozygote de taille supérieure à $28 \mu\text{m}$ n'a été détecté), comme l'avait déjà constaté Probert (1999) en condition limitante en P et N. Cela a également été observé pour *A. tamarense* en culture continue limitante en nitrate (Marsot, 1997). Les cellules calent leurs activités métaboliques sur le régime d'apport en nutriments afin de les utiliser de manière optimale, les voies métaboliques de la reproduction sexuée ne seraient donc pas activées.

Par ailleurs, les rapports atomiques N:P et C:P des cellules d'*Am* et d'*Ht* décroissent, entre les taux de dilution 0.05 j^{-1} et 0.3 j^{-1} , respectivement de 27 à 11 et de 24 à 9 pour N:P et, de 221 à 71 et de 205 à 80 pour C:P (Figure 7). Ces rapports ne sont pas très différents entre les deux espèces et leur décroissance traduit bien un gradient de limitation en phosphate entre ces taux de dilution. La diminution du rapport C:N observé également pour *Am* (de 8.4 à 6.3) suggère une possible limitation de l'assimilation d'N induite par la limitation en phosphate. Cela n'est pas observé pour *Ht*.

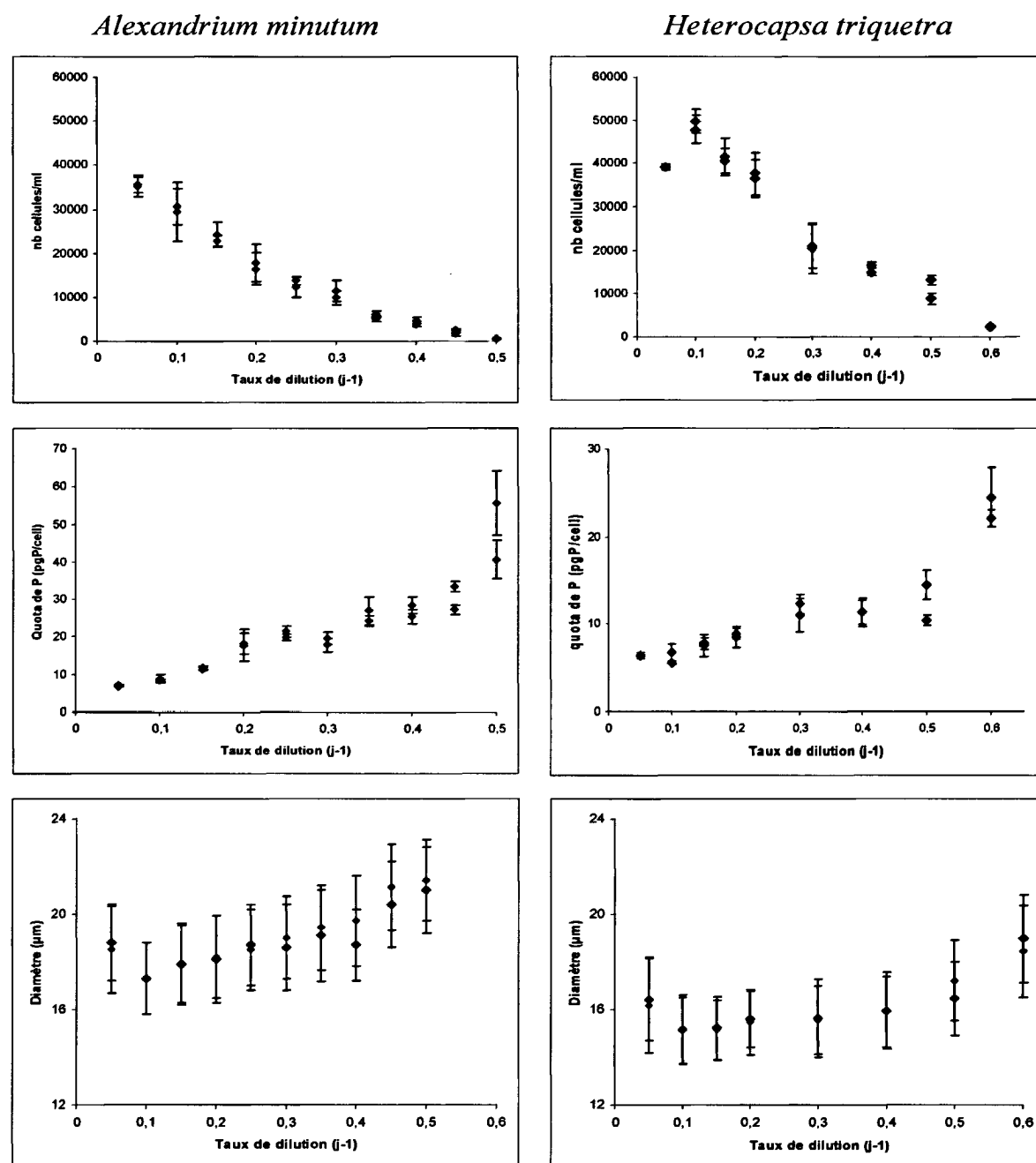


Figure 6 : Concentration cellulaire ($\text{nb cellules ml}^{-1}$), quota de phosphore (pgP cell^{-1}) et diamètre cellulaire (μm) en fonction du taux de dilution imposé aux cultures d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* à l'équilibre. Deux cultures ont été réalisées pour chaque taux de dilution. Les barres d'erreur correspondent à trois mesures pour chaque culture.

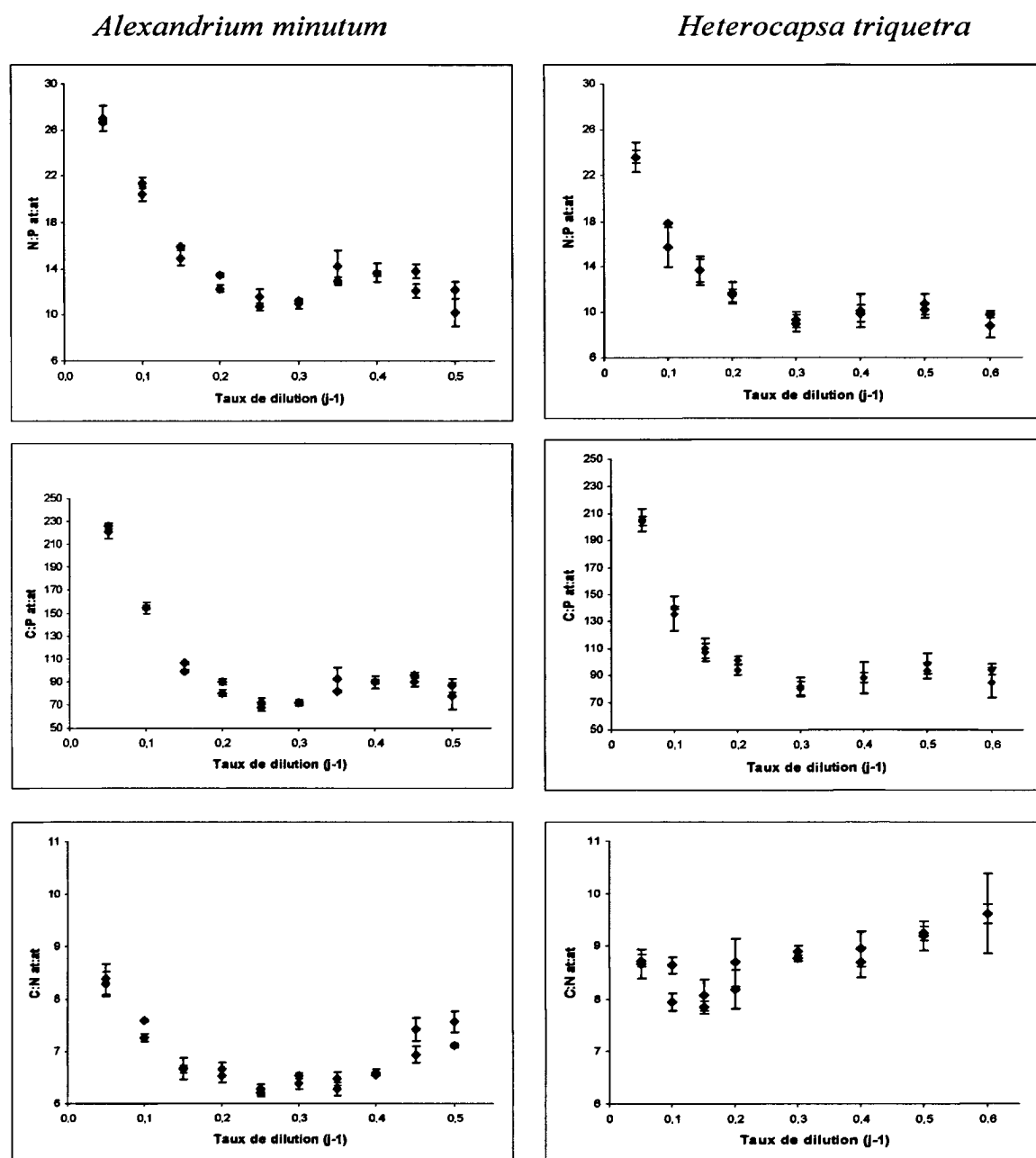
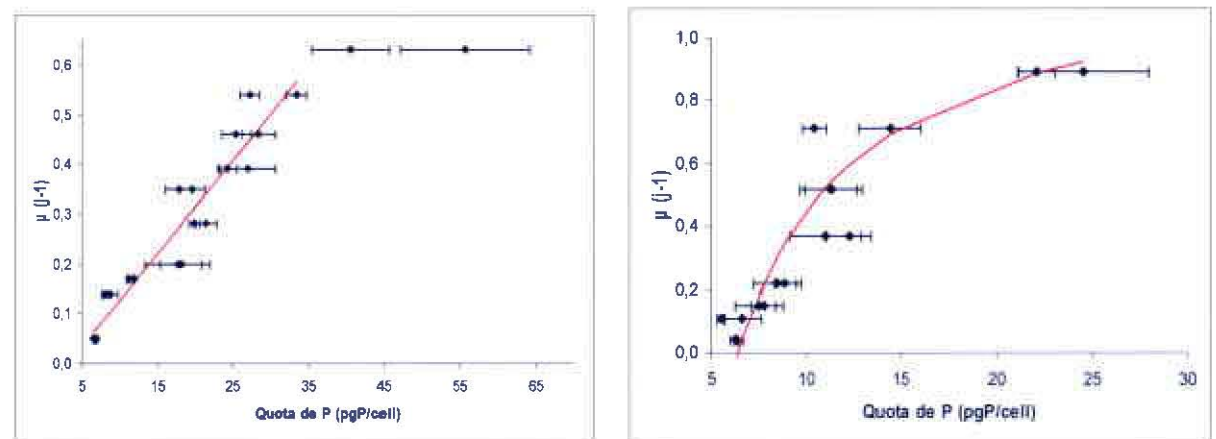


Figure 7 : Rapport atomique N:P, C:P, C:N des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* en culture semicontinue à l'équilibre. Deux cultures ont été réalisées pour chaque taux de dilution. Les barres d'erreur correspondent à trois mesures pour chaque culture.

3.2.2. Influence de Qp sur le taux de croissance

La relation observée entre les deux paramètres μ et Qp est proche de la relation de Droop [$\mu = \mu_{\max} (1 - Q_{p\min}/Q_p)$] pour *Ht* avec une valeur de $Q_{p\min}$ et de μ_{\max} de $6.4 \text{ pgP cell}^{-1}$ et 1.25 j^{-1} respectivement (Figure 8). μ_{\max} est alors la valeur limite atteinte par μ lorsque Qp tend vers l'infini. Cette valeur de μ_{\max} est un peu plus élevée que celui mesuré pour *Heterocapsa circularisquama* (1.1 j^{-1} , Yamaguchi et al. 2001). Pour *Am*, cette relation est linéaire sur une gamme de taux de croissance beaucoup plus étendue (jusqu'à un taux de croissance de 0.54 j^{-1}) que ce que prédirait le modèle de Droop puis un fort infléchissement permet d'atteindre le taux de croissance de 0.63 j^{-1} à $Q_{p\max}$. Pour *Am* et *Ht*, $Q_{p\min}$ mesuré dans cette expérience, respectivement $6.8 \pm 0.2 \text{ pgP cell}^{-1}$ et $6.2 \pm 0.9 \text{ pgP cell}^{-1}$ est similaire à celui mesuré dans l'expérience précédente en batch (cf 3.1.3.). Le rapport $Q_{p\max}/Q_{p\min}$ atteint dans cette expérience est de 7 pour *Am* et de 3.8 pour *Ht*, ce qui montre une capacité de stockage du phosphore plus importante pour *Alexandrium minutum*, même si elle est bien inférieure à la valeur de 36 annoncée par Yamamoto & Tarutani (1999) concernant *Alexandrium tamarense*.



Alexandrium minutum

Heterocapsa triquetra

Figure 8 : Relation entre le taux de croissance (j^{-1}) atteint par les cellules en culture semicontinue à l'équilibre et leur quota de P (pgP cell^{-1}). La ligne rose représente une relation linéaire pour *Am* (pour $Q_p < 35 \text{ pgP cell}^{-1}$, $r = 0.95$) et la relation hyperbolique de Droop pour *Ht* ($r = 0.89$). Deux cultures ont été réalisées pour chaque taux de dilution. Les barres d'erreur correspondent à trois mesures pour chaque culture.

3.2.3. Influence des concentrations en PO_4 et de Q_p sur la vitesse d'assimilation des PO_4

L'influence des $[\text{PO}_4]$ sur la vitesse d'assimilation de ceux-ci a été expérimentée sur les taux de dilution 0.05, 0.1 et 0.2 j^{-1} pour lesquels la concentration en PO_4 à l'équilibre était nulle. Les relations V_p fonction de $[\text{PO}_4]$ obtenues sont représentées Figure 9 et les estimations des K_s et $V_{p_{\max}}$ sont reportées dans le Tableau 2.

Les allures de ces cinétiques sont conformes au modèle de Michaelis & Menten. L'examen précis de la cinétique d'incorporation de $^{33}\text{PO}_4$ en fonction du temps met en évidence l'existence de plusieurs pentes aux concentrations en phosphate les plus élevées (Figure 10) conduisant à des vitesses différentes reportées sur la Figure 9 et indiquées par les flèches. Le changement de pente intervient alors que le quota Q_p des cellules a varié de moins de 1.3 % pour *Am* et 4.7 % pour *Ht* (données non figurées). Par conséquent cette transition ne correspond pas à un changement significatif de l'état physiologique des cellules vis à vis du phosphore intracellulaire total. Dans ce type de cinétique multiphasique on invoque généralement l'existence de deux systèmes enzymatiques (I et II) (ou d'un seul mais ayant deux modalités), l'un ayant de faibles K_s et V_{\max} et fonctionnant aux faibles concentrations et l'autre ayant de forts K_s et V_{\max} et fonctionnant aux fortes concentrations. Il permet d'optimiser l'utilisation de nutriments apportés sous forme de pulses. Il a été décrit chez les végétaux supérieurs et observé chez les macroalgues avec un système II saturant (Gordillo *et al.*, 2002) ou non (Martínez & Rico, 2004). Concernant les espèces phytoplanctoniques il a été décrit pour l'azote (Collos *et al.*, 1997) mais assez peu pour le phosphore. Videau (1999) l'a observé sur des populations phytoplanctoniques naturelles en baie de Seine. Ce manque d'observations pour le phosphore peut être due à l'utilisation de concentrations en phosphate non suffisamment élevées pour le détecter ou bien à des intervalles de temps d'échantillonnage non adaptés. Dans notre cas, la détermination précise de la cinétique en fonction du temps montre que le système II est effectif après le fonctionnement du système I et non simultanément.

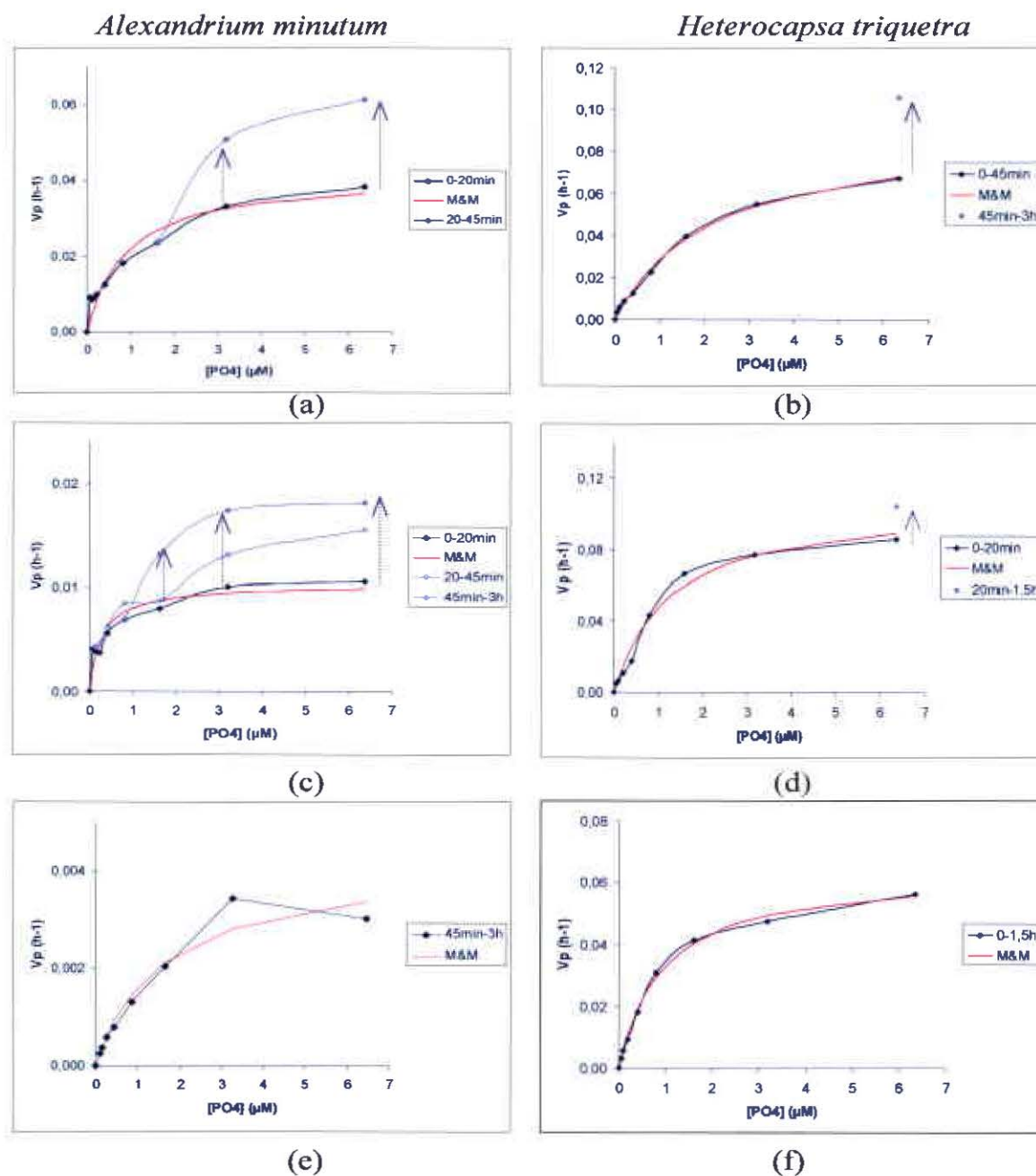


Figure 9 : Relation entre la vitesse d'assimilation de PO₄ (h⁻¹) et la concentration en PO₄ (μM) à l'équilibre des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* aux taux de dilution 0.05 j⁻¹ (a, b), 0.1 j⁻¹ (c, d) et 0.2 j⁻¹ (e, f). Les points et les courbes bleues correspondent aux données, la courbe rose correspond au modèle de Michaelis & Menten. Dans la légende sont indiqués les temps maximum pendant lesquels la vitesse a été estimée. Aux faibles teneurs en PO₄, la première vitesse a pu être estimée sur des temps plus faibles.

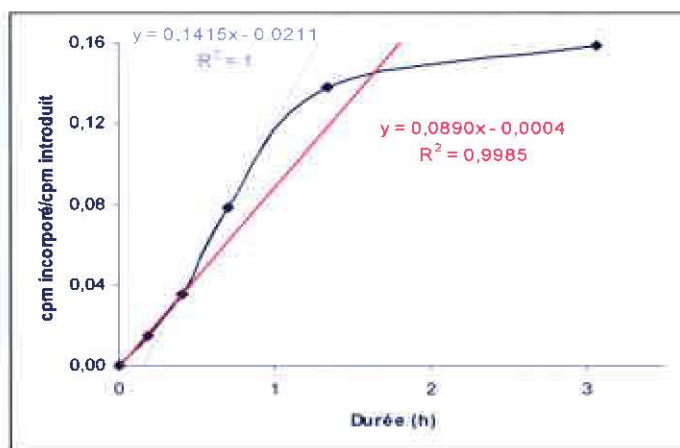


Figure 10 : Exemple de cinétique d'incorporation de $^{33}\text{PO}_4$ par *Am* (cpm incorporé/cpm introduit) en fonction du temps pour une $[\text{PO}_4]$ de $3.2 \mu\text{M}$ et pour $D = 0.05 \text{ j}^{-1}$

Les constantes de demi-saturation K_s d'*Ht* ($0.97\text{-}2.23 \mu\text{M}$) et d'*Am* ($0.28\text{-}1.62 \mu\text{M}$) sont élevées, montrant ainsi que les deux espèces sont adaptées à un milieu riche en phosphate (Tableau 2). Les deux espèces n'ont donc pas une stratégie de compétition à « affinité adaptée », c'est à dire ayant un faible K_s les rendant compétitives en condition de déplétion (Sommer 1984). Toutefois leurs K_s sont proches des concentrations en PO_4 rencontrées dans le milieu de la Penzé ; le phosphore pourrait ainsi exercer un contrôle de leur biomasse dans le milieu. On ne peut pas conclure à une évolution des K_s avec Q_p .

$D \text{ (j}^{-1}\text{)}$	0.05		0.1		0.2	
	<i>Am</i>	<i>Ht</i>	<i>Am</i>	<i>Ht</i>	<i>Am</i>	<i>Ht</i>
$Q_p \text{ (pgPcell}^{-1}\text{)}$	6.8	6.3	8.5	6.2	17.7	8.7
$K_s \text{ (}\mu\text{M, st.d.)}$	0.90 (29%)	2.23 (9%)	0.28 (30%)	1.29 (19%)	1.62 (30%)	0.97 (8%)
$V_{p_{\max}} \text{ (st.d.)}$ ($\text{pmol cell}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0.0090 (10%)	0.0187 (4%)	0.0028 (8%)	0.0215 (7%)	0.0024 (12%)	0.0180 (3%)
(h^{-1})	0.0419 (10%)	0.0919 (4%)	0.0103 (8%)	0.1073 (7%)	0.0042 (12%)	0.0643 (3%)

Tableau 2 : Paramètres cinétiques (K_s , $V_{p_{\max}}$) en fonction des taux de dilution (D) imposés et des conditions de Q_p mesurés pour *Am* et *Ht*. Les coefficients de variation sont exprimés en % entre parenthèses.

3.2.4. Influence de Qp sur la vitesse maximale d'assimilation des PO₄

L'examen des vitesses maximales d'assimilation des PO₄ sur les cultures semicontinues à l'équilibre met en évidence trois types d'observation (Figure 11) :

(1) évolution des vitesses avec le temps : à une concentration en phosphate saturante de 10 μM les cinétiques d'incorporation de ³³PO₄ en fonction du temps ont également montré l'existence de plusieurs pentes à tous les taux de dilution (Figure 10, 11). Le décalage avant l'apparition des vitesses maximales est plus long (3h) que celui obtenu pour des concentrations saturantes inférieures (20 à 45 min dans les cinétiques michaeliennes à 6 μM de PO₄, cf 3.2.3).

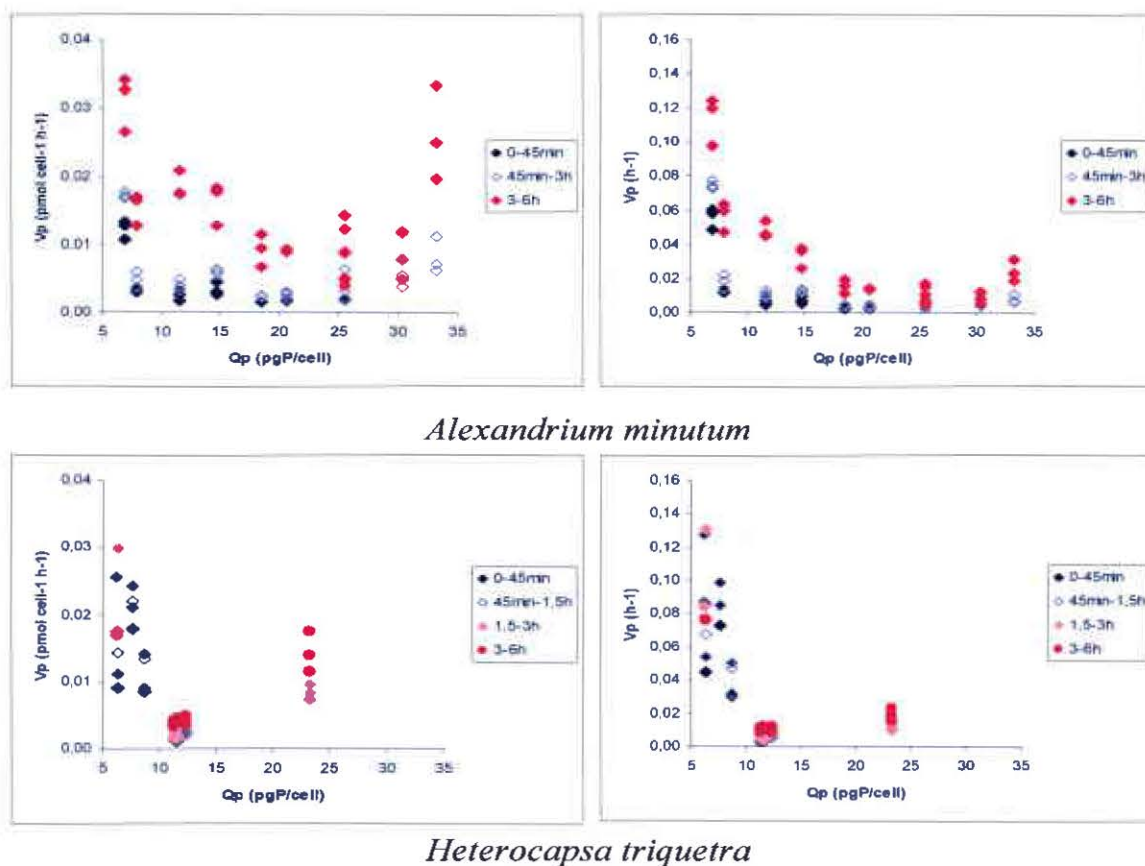


Figure 11 : Evolution de la vitesse maximale d'assimilation des PO₄ (pmol cell⁻¹ h⁻¹ et en h⁻¹) en fonction de Qp des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* à l'équilibre. Les deux séries de cultures de même taux de dilution ont été rassemblées et les trois mesures qui ont alors été réalisées sont représentées sur la figure.

Ces différences de vitesse sont très bien marquées pour *Am* et reproductibles alors qu'une plus grande disparité dans les réplicats apparaît pour *Ht* aux valeurs de quota les plus faibles ($< 10 \text{ pgP cell}^{-1}$). Dans tous les cas, le changement de pente intervient alors que le quota Q_p des cellules a varié généralement de moins de 5 %. Ce type d'évolution a été observé en culture semicontinue (apport pulsé de phosphate) de communautés microbiennes d'eau douce (Suttle & Harrison 1986) avec des vitesses qui se maintenaient ensuite ou diminuaient suivant les espèces dominant la communauté. L'utilisation de la méthode radioisotopique ne permet pas de connaître l'évolution de la vitesse si elle diminue après avoir atteint un maximum.

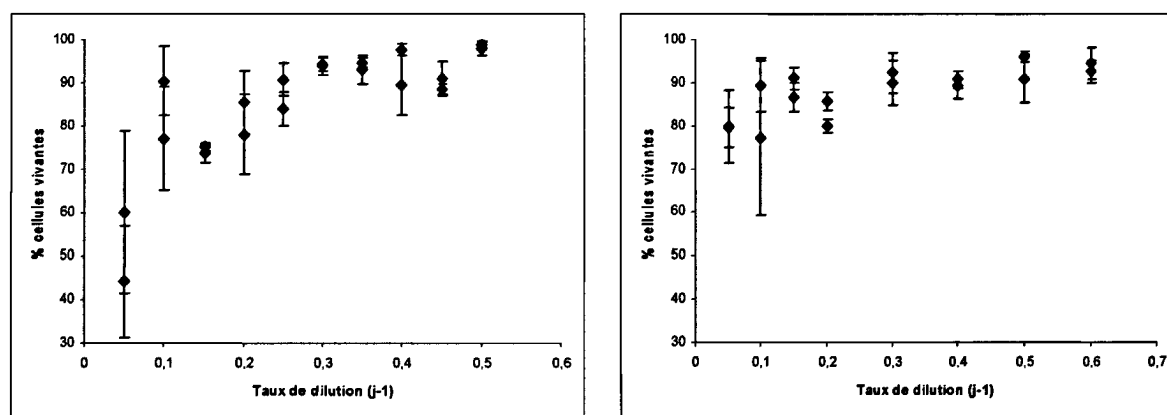
(2) évolution des vitesses avec le quota : les vitesses spécifiques maximales obtenues (h^{-1}) sont les plus élevées aux valeurs de quota minimum pour les deux espèces. Puis leur évolution montre une diminution nette jusqu'à un quota de 20 pgP cell^{-1} pour *Am* et de $11\text{-}12.5 \text{ pgP cell}^{-1}$ pour *Ht*. Cette vitesse se stabilise ensuite puis tend à réaugmenter lorsque l'on se rapproche de la valeur maximale de Q_p obtenue dans nos expériences. Ainsi à partir d'un certain seuil (20 pgP cell^{-1} pour *Am* et de $11\text{-}12.5 \text{ pgP cell}^{-1}$ pour *Ht*), les cellules compensent la diminution de Q_p par une augmentation de leur V_{max} spécifique, c'est ce que nous avons observé dans les cultures monospécifiques en batch dépourvus de phosphate (cf. 3.1.2. et 3.1.3.). Toutefois les vitesses spécifiques atteintes ici sont inférieures aux vitesses mesurées en batch (de 0.04 à 0.35 h^{-1} au moins pour *Am* et de 0.14 à 0.45 h^{-1} pour *Ht*), ce qui peut s'expliquer par des dynamiques de croissance différentes dans les deux cas (cellules adaptées à des apports journaliers constants en semicontinue et cellules adaptées à une situation de carence plus difficile de jour en jour en mode batch). Peu d'étude de l'évolution de V_{max} avec Q_p n'a été entreprise. Nos résultats vont dans le même sens de ce qui est généralement observé c'est à dire une relation inverse entre V_{max} et Q_p , soit linéaire (Ducobu *et al.*, 1998) soit hyperbolique (Brown & Harris, 1978) alors que plus rarement une vitesse maximum à des taux de dilution intermédiaires a pu être mesuré (Suttle & Harrison, 1986) ou aucune relation significative entre les deux paramètres (Bursmaster & Chisholm, 1979).

(3) comparaison entre *Am* et *Ht* : elles possèdent des capacités à assimiler les phosphates similaires dans ces conditions pour un quota compris entre 6 et 10 pgP cell^{-1} . Entre 10 et 15 pgP cell^{-1} , *Am* possède des vitesses d'assimilation spécifiques quatre fois supérieures à celle d'*Ht*. Au delà, la vitesse d'*Ht* augmente et pour un quota de 23 pgP cell^{-1} , elles sont similaires.

3.2.5. Influence des conditions de culture sur la viabilité cellulaire et conséquences pour le calcul de l'assimilation des phosphates

Les deux espèces voient leur viabilité cellulaire augmenter avec le taux de dilution de la culture de 74 à 98 % pour *Am* (excepté 0.05 j^{-1}) et de 80 à 94 % pour *Ht* (Figure 12). Au taux de dilution le plus faible où la carence est la plus élevée, *Heterocapsa triquetra* est moins affectée (80% de cellules vivantes) qu'*Alexandrium minutum* (52%).

Les cellules mortes évaluées par cette technique ont gardé leur intégrité (cellules entières apparaissant avec une fluorescence brillante de couleur vert jaune) et par conséquent le quota des cellules tel qu'il a été déterminé n'est pas affecté par ces mesures de viabilité. Les vitesses d'assimilation des phosphates, elles, peuvent être corrigées puisque seules les cellules vivantes seront actives dans le processus d'assimilation. Ces corrections affectent peu les vitesses pour un taux de dilution supérieur ou égal à 0.1 j^{-1} , en revanche les vitesses d'*Am* sont augmentées d'un facteur deux pour le taux de dilution le plus faible (Figure 13, Tableau 3).



Alexandrium minutum

Heterocapsa triquetra

Figure 12 : Proportion de cellules vivantes (%) par rapport à la population totale dans les cultures limitées en phosphates, en fonction des taux de dilution imposés. Deux cultures ont été réalisées pour chaque taux de dilution. Les barres d'erreur correspondent à trois mesures pour chaque culture.

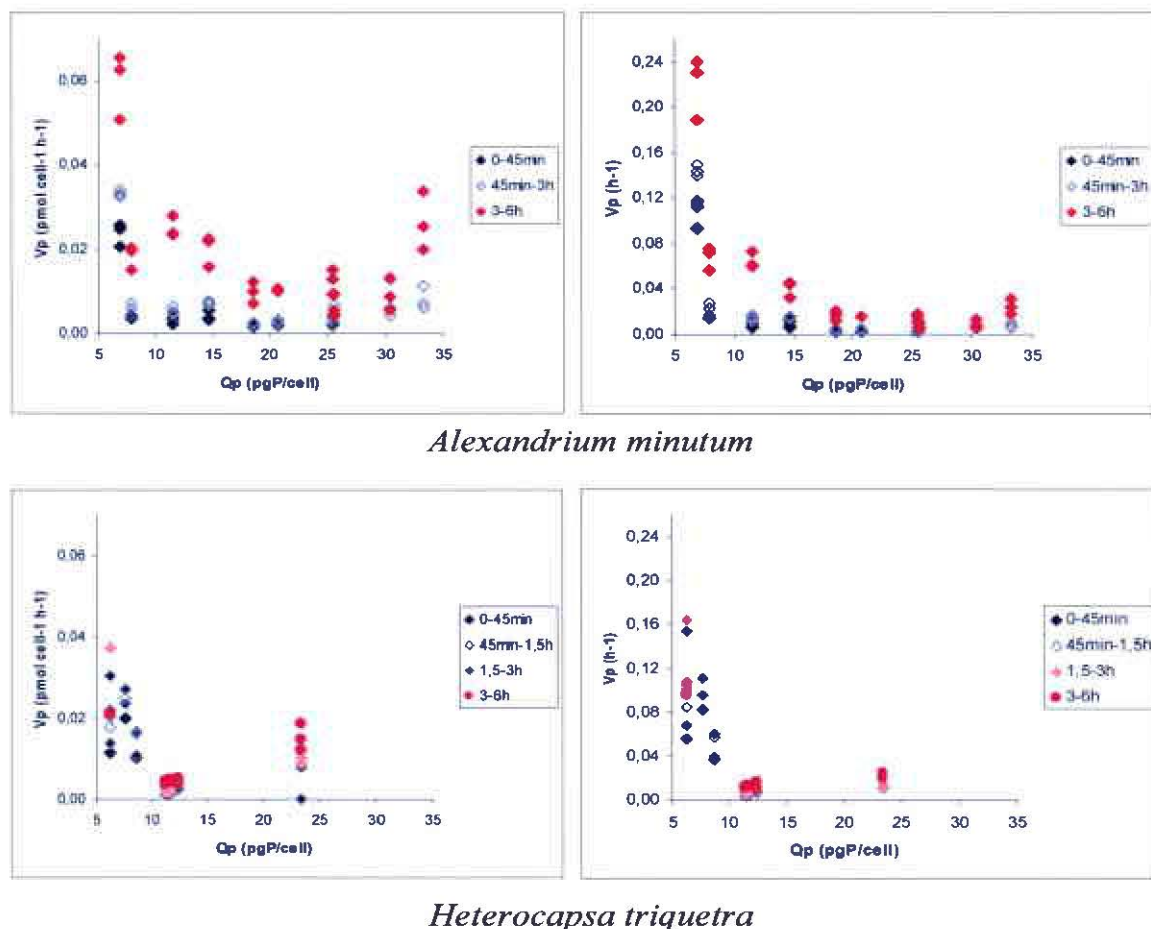


Figure 13 : Evolution de la vitesse maximale d'assimilation des PO_4 corrigée en tenant compte des taux de viabilité ($\text{pmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ et en h^{-1}) en fonction de Q_p des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* à l'équilibre.

D (j^{-1})	0.05		0.1		0.2	
	<i>Am</i>	<i>Ht</i>	<i>Am</i>	<i>Ht</i>	<i>Am</i>	<i>Ht</i>
Q_p (pgPcell^{-1})	6.8	6.3	8.5	6.2	17.7	8.7
K_s (μM , st.d.)	0.90 (29%)	2.23 (9%)	0.28 (30%)	1.29 (19%)	1.62 (30%)	0.97 (8%)
$V_{p_{\max}}$ (st.d.)						
($\text{pmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0.0172 (10%)	0.0234 (4%)	0.0034 (8%)	0.0258 (7%)	0.0029 (12%)	0.0217 (3%)
(h^{-1})	0.0804 (10%)	0.1153 (4%)	0.0123 (8%)	0.1288 (7%)	0.0052 (12%)	0.0775 (3%)

Tableau 3 : Paramètres cinétiques (K_s , $V_{p_{\max}}$) corrigés en tenant compte des taux de viabilité en fonction des taux de dilution (D) imposés et des conditions de Q_p mesurés pour *Am* et *Ht*. Les coefficients de variation sont exprimés en % entre parenthèses.

4. Conclusion

D'une façon générale, cette étude aura permis de paramétrer le rôle du phosphore sur la croissance d'*Am* et d'un de ses compétiteurs en Penzé, sur leur vitesse d'assimilation des phosphates, et sur leur capacité de stockage du phosphore intracellulaire, participant ainsi à une meilleure calibration du modèle de croissance d'*Alexandrium minutum*.

Plus précisément, l'examen des caractéristiques physiologiques des cellules d'*Alexandrium minutum* et d'*Heterocapsa triquetra* en culture semicontinu à l'équilibre a mis en évidence : (1) ni *Am* ni *Ht* ne présente une forte affinité pour le phosphate, ce ne sont pas des espèces à « stratégie d'affinité » ; elles ne seraient pas compétitives dans des milieux fortement limités en phosphate par rapport à des espèces pico ou nanophytoplanctoniques ; (2) *Am* possède une capacité de stockage du phosphore deux fois supérieure à celle d'*Ht* ; (3) *Am* présente des capacités d'assimilation environ 5 fois supérieures dans une gamme de quota comprise entre 10 et 15 pgP cell⁻¹ et 1.5 fois supérieures en deçà de 10 pgP cell⁻¹ ; (4) Toutefois, malgré des vitesses d'assimilation de PO₄ inférieures ou égales à celles d'*Am*, pour un quota compris entre 10 et 23 pgP cell⁻¹ (Qp_{max} d'*Ht*), *Ht* présente des taux de croissance supérieurs (entre 0.37 et 0.89 j⁻¹) à ceux d'*Am* (0.17 et 0.46 j⁻¹).

Ces résultats confirment les observations des expériences en batch montrant que *Heterocapsa triquetra* aurait, comparativement à *Alexandrium minutum*, une stratégie de « vitesse adaptée », capable d'assimiler le nutriment limitant après un apport et de l'utiliser aussitôt pour augmenter son taux de croissance. *Alexandrium minutum* a plutôt une stratégie de « stockage », assimilant rapidement le nutriment limitant mais le stockant pour une meilleure croissance ultérieure quand la ressource sera à nouveau épuisée. Ainsi *Am* serait plus compétitive par rapport à *Ht* dans des situations de fortes limitations en phosphate.

Dans la rivière de Penzé, on peut supposer que les algues expérimentent des conditions nutritives très contrastées soient sous forme d'apport par le relargage du sédiment soit par passage des cellules dans des eaux de concentrations différentes (quelques µM de PO₄ pour des eaux de salinité < 23 à moins de 0.1 µM dans des eaux de salinité > 26 comme cela a été mesuré en juin 2004 au moment du démarrage potentiel d'un bloom d'*Am*). La fréquence avec laquelle les nutriments sont disponibles pour les algues est déterminante sur la compétition entre les espèces. Il a été montré que la structure de communautés naturelles dépendait de la fréquence d'apports en nutriments

(Ghosh *et al.*, 1999) et un apport sous forme de pulse est un facteur de diversité des communautés (nombreux travaux de Sommer). Pour l'étude de l'influence du phosphate sur la dynamique de croissance d'*Alexandrium minutum* en Penzé, il reste à élucider dans quelle condition de fréquence d'apport en phosphate (tous les 1, 2, 4, 6 jours) sa croissance l'emporterait sur ses espèces compétitrices en Penzé. Et ainsi confirmer ou infirmer les stratégies de compétition entre *Am* et *Ht* suggérées à partir des expériences de cette étude. Par ailleurs, observant depuis quelques années la prédominance de diatomées (*Chaetoceros sp.*, ...) au moment de l'émergence potentielle d'*Am* en rivière de Penzé, ce type d'influence devrait être étudié également sur la compétition avec une diatomée.

5. Bibliographie

- Ahn, C. Y., A. S. Chung and H. M. Oh (2002). Diel rhythm of algal phosphate uptake rates in P-limited cyclostats and simulation of its effect on growth and competition. *J. Phycol.* **38** 695-704.
- Bechemin, C., D. Grzebyk, F. Hachame, C. Hummert and S. Y. Maestrini (1999). Effect of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the toxin content in *Alexandrium minutum*. *Aquatic Microb. Ecol.* **20** 157-165.
- Brown, E. J. and R. F. Harris (1978). Kinetics of algal transient phosphate uptake and the cell quota concept. *Limnol. Oceanogr.* **23** (1): 35-40.
- Bursmaster, D. E. and S. W. Chisholm (1979). A comparison of two methods for measuring phosphate uptake by *Monochrysis lutheri* Droop grown in continuous culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **39** 187-202.
- Collos, Y., A. Vaquer, B. Bibent, G. Slawyk, N. Garcia and P. Souchu (1997). Variability in nitrate uptake kinetics of phytoplankton communities in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **44** 369-375.
- Ducobu, H., J. Huisman, R. R. Jonker and L. R. Mur (1998). Competition between a prochlorophyte and a cyanobacterium under various phosphorus regimes: Comparison with the Droop model. *J. Phycol.* **34** (3): 467-476.
- Erard-Le Denn, E., M. P. Crassous, A. Youenou, V. Martin-Jézequel, B. Harang and V. Mézière (2003). Etude de la compétition entre espèces lors du développement d'une efflorescence toxique à *Alexandrium minutum*. Brest, Rapport PNEC ART3 2002-2003.
- Erard-Le-Denn, E., Ed. (1999). Dragage et environnement marin. Etat des connaissances. Dans *Phytoplancton toxique et sédiments*, Ifremer.

Flynn, K., J. M. Franco, P. Fernandez, B. Reguera, M. Zapata, G. Wood and K. J. Flynn (1994). Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111** 99-109.

Ghosh, M., K. V. R. Prasad, S. K. Mehta and J. P. Gaur (1999). Response of a natural phytoplankton assemblage to pulsed supply of phosphorus in semicontinuous cultures. *Annales Limnol. Inter. J. Limnol.* **35** (1): 23-29.

Gordillo, F. J. L., M. J. Dring and G. Savidge (2002). Nitrate and phosphate uptake characteristics of three species of brown algae cultured at low salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **234** 111-116.

Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther (1962). Studies on marine plankton diatoms. I *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8** 229-239.

Guisande, C., M. Frangopulos, I. Maneiro, A. R. Vergara and I. Riveiro (2002). Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **225** 169-176.

Haugland, R. (1996). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Sixth Edition. Molecular probes. Inc., OR, U.S.A.

Kerouel, R. and A. Aminot (1997). Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Mar. Chem.* **57** (3-4): 265-275.

Le Floc'h, E. (1998). Détermination des constantes écophysologiques d'*Alexandrium minutum* Halim. Rapport de DEA d'Aix-Marseille II, Ifremer. 35 p.

Loquet, N. (2002). Modélisation de la croissance du dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* Halim et couplage avec le modèle hydrosédimentaire de la Bretagne Nord., Rapport interne Ifremer 85p.

Malara, G. and A. Sciandra (1991). A multiparameter phytoplankton culture system driven by microcomputer. *J. Appl. Phycol.* **3** 235-241.

Marsot, P. (1997). Variations du volume et des quotas en N et P d'*Alexandrium tamarense* (dinoflagellata) en culture continue limitante en nitrate. *Oceanol. Acta.* **20** (4): 639-643.

Martínez, B. and J. M. Rico (2004). Inorganic nitrogen and phosphorus uptake kinetics in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **40** 642-650.

Mezière, V. (2002). Etude de la variabilité physiologique au sein d'une population de microalgues : Mise au point d'outils de mesure à l'échelle cellulaire chez des espèces représentatives des écosystèmes côtiers, Rapport de DEA, Université La Rochelle, 53p.

Millard, P. J., B. L. Roth, H. P. Truong Thi, S. T. Yue and R. P. Haugland (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** 2897-2905.

Morin, P., E. Erard-Le Denn, J. F. Maguer, C. Madec, C. Videau, J. Le Grand and E. Macé (2000). Etude des causes de proliférations de microalgues toxiques en mer : cas d' Alexandrium. Rapport scientifique Agence de l'eau Loire-Bretagne. 135 pp.

Nicklisch, A. (1999). Competition between the cyanobacterium *Limnithrix redekei* and some spring species of diatoms under P-limitation. *Inter. Rev. Hydrobiol.* **84** (3): 233-241.

Olivier, N. (2003). Variabilité physiologique au sein d'une population phytoplanctonique chez des espèces représentatives des écosystèmes côtiers., Rapport de DEA, Université Paris 6.

Probert, I. (1999). Sexual reproduction and ecophysiology of the marine dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim. PhD, University of Westminster, London

Solorzano, L. and J. H. Sharp (1980). Determination of total dissolved phosphorus and particulate phosphorus in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **25** (4): 754-758.

Sommer, U. (1984). The paradox of the plankton: fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnol. Oceanogr.* **29** 633-636.

Suttle, C. A. and P. J. Harrison (1986). Phosphate uptake rates of phytoplankton assemblages grown at different dilution rates in semicontinuous culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43** (8): 1474-1481.

Treguer, P. and P. Le Corre (1975). Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (Utilisation de l'Autoanalyseur II Technicon), 2ème édition. Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Videau, C. (1999). Flux de phosphore dans le phytoplancton du panache de la Seine en situation printanière. Compagne Bloomseine (Mai 1998), Rapport PNOG.

Vrieling, E. G., A. Draaijer, W. J. M. Van Zeijl, L. Peperzak, W. W. C. Gieskes and M. Veenhuis (1993). The effect of labeling intensity, estimated by real-time confocal laser scanning microscopy, on flow cytometric appearance and identification of immunochemically labeled marine dinoflagellates. *J. Phycol.* **29** 180-188.

Yamaguchi, M. and S. Itakura (1999). Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fish. Sci.* **65** (3): 367-373.

Yamaguchi, M., S. Itakura and T. Uchida (2001). Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the "novel red tide" dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycol.* **40** (3): 313-318.

Yamamoto, T. and K. Tarutani (1996). Growth and phosphate uptake kinetics of *Alexandrium tamarense* from Mikawa Bay, Japan. In T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo (eds) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 293-296.

Yamamoto, T. and K. Tarutani (1999). Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Phycol. Res.* **47** 27-32.

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