

E121-AR2-c

Direction de l'Environnement et aménagement Littoral
Département Ecologie côtière

Geneviève Arzul, Christiane Videau, Guy Bodennec,
Marie-Pierre Crassous, Agnès Youenou

....
Décembre 2002 - R.INT.DEL/EC/02.02/Brest

72049
Ifremer

Comparaison de l'hétérotrophie phytoplanctonique en laboratoire et *in situ* :

Efflorescence estivale en eau côtière et populations printanières en mer stratifiée

Projet « Formation d'efflorescences en mer stratifiée ».

Contribution de l'hétérotrophie phytoplanctonique

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL11019

<p>Numéro d'identification du rapport : DEL/EC /02.02/Brest</p> <p>Diffusion : libre x restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/></p>	<p>date de publication décembre 2002</p> <p>nombre de pages 37</p> <p>bibliographie 74 réf.</p> <p>illustration(s) 19 fig., 8 tabl.</p> <p>langue du rapport : français</p>
<p>Titre et sous-titre du rapport : Comparaison de l'hétérotrophie phytoplanctonique en laboratoire et <i>in situ</i> : efflorescence estivale en eau côtière et populations printanières en eau de mer stratifiée</p> <p>Titre traduit : Comparison of phytoplankton heterotrophy in laboratory and <i>in situ</i> : coastal summer bloom and spring populations in stratified areas.</p>	
<p>Auteur(s) : Geneviève Arzul, Christiane Videau Guy Bodennec Marie-Pierre Crassous Agnès Youenou</p>	<p>Organisme / Direction / Service, laboratoire DEL-EC, Ifremer, Plouzané PAE, Plouzané DEL-EC, Ifremer, Plouzané DEL-EC, Ifremer, Plouzané DEL-EC, Ifremer, Plouzané</p>
<p>Collaborateur(s) : nom, prénom Monique Pomépuy, Dominique Hervio, Michèle Gourmelon, Marie-Paule Caprais Alain Aminot, Roger Kerouel, Dorothée Vincent, Michel Lunven Geneviève Mével Patrick Camus, Raoul Gabellec Catherine Legrand</p>	<p>DEL-MP, Ifremer, Plouzané DEL-EC, Ifremer, Plouzané Station Biologique de Roscoff DEL-MPL, Ifremer, La Trinité Univ. Kalmar, Suède</p>

Résumé :

Pour mieux connaître les facteurs qui agissent sur les interactions trophiques entre le phytoplancton et le milieu nutritif, nous avons étudié la capacité hétérotrophe du phytoplancton en conditions contrôlées, non axéniques, au laboratoire. Les expériences réalisées avec la [U-¹⁴C] glutamine, étaient basées sur l'étude des vitesses d'assimilation. Les résultats obtenus avec deux espèces du genre *Gymnodinium* et une diatomée ont été vérifiés lors d'efflorescences en eau côtière et estuarienne, montrant l'adaptation des algues au milieu riche en substances organiques et leur capacité hétérotrophe en fonction de l'éclairement. L'effet de l'éclairement sur la capacité phagotrophe de *Gymnodinium* a été observé au laboratoire. L'étude réalisée sur les particules phytoplanctoniques en mer stratifiée (Golfe de Gascogne) en période printanière, a confirmé l'effet de la lumière sur la vitesse d'assimilation dans certains cas. Les faibles concentrations à mi-saturation (Ks) correspondraient à l'activité hétérotrophe de diatomées, classe prédominante dans les prélèvements étudiés. L'incorporation des substances organiques par les ciliés et les bactéries est également évoquée.

Abstract :

To have a better knowledge of the factors which act on the trophic interactions between the phytoplankton and the nutritive medium, we studied the heterotrophy in phytoplankton in controlled, non-axenic conditions, at the laboratory. The experiments carried out with [U-¹⁴C] glutamine, were based on the kinetic study of uptake. The results obtained with two *Gymnodinium* species and a diatom were validated during a summer bloom in coastal and estuarine waters, showing the adaptation of the algae to the medium rich in organic substances, and their heterotrophy according to light irradiance. The effect of light on the phagotrophy (pinocytosis) of *Gymnodinium* was observed at the laboratory. The study carried out on the phytoplankton particles in stratified seawater (Bay of Biscay) in spring period, confirmed the effect of the light on the kinetic of uptake, in some cases. The low half-saturation (Ks) values would correspond to the heterotrophy in diatoms, which constituted the dominant class in the studied samples. The uptake of the organic substances by ciliates and the bacteria are also evoked.

Mots-clés :

hétérotrophie, phytoplancton, lumière, glutamine

Keywords :

Heterotrophy, phytoplankton, light, glutamine

Commentaire :

Ce travail est soumis pour publications :

«Experimental adaptation of phytoplankton to heterotrophy" (Arzul, Videau)

"Evidence of *in situ* heterotrophy in phytoplankton" (Arzul, Bodennec)

«Heterotrophy in phytoplankton : a review » (Arzul, Legrand)

Comparaison de l'hétérotrophie phytoplanctonique en laboratoire et *in situ* : efflorescence estivale en eau côtière et populations printanières en mer stratifiée

Geneviève Arzul, Christiane Videau*, Guy Bodennec,
Marie-Pierre Crassous, Agnès Youenou.

Ifremer-DEL-EC, *PAE rue De Rochon, 29280 Plouzané

Pour mieux connaître les facteurs qui agissent sur les interactions trophiques entre le phytoplancton et le milieu nutritif, nous avons étudié la capacité hétérotrophe du phytoplancton en conditions contrôlées, non axéniques, au laboratoire. Les expériences réalisées avec la [U-¹⁴C] glutamine, étaient basées sur l'étude des vitesses d'assimilation. Les résultats obtenus avec deux espèces du genre *Gymnodinium* et une diatomée ont été vérifiés lors d'efflorescences en eau côtière et estuarienne, montrant l'adaptation des algues au milieu riche en substances organiques et leur capacité hétérotrophe en fonction de l'éclairement. L'effet de l'éclairement sur la capacité phagotrophe de *Gymnodinium* a été observé au laboratoire. L'étude réalisée sur les particules phytoplanctoniques en mer stratifiée (Golfe de Gascogne) en période printanière, a confirmé l'effet de la lumière sur la vitesse d'assimilation dans certains cas. Les faibles concentrations à mi-saturation (K_s) correspondraient à l'activité hétérotrophe de diatomées, classe prédominante dans les prélèvements étudiés. L'incorporation des substances organiques par les ciliés et les bactéries est également évoquée.

Mots clés : hétérotrophie, phytoplancton, lumière, glutamine

Introduction

L'étude des relations trophiques entre les populations phytoplanctoniques et leur environnement se limite le plus souvent à des corrélations entre le substrat nutritif inorganique et l'éclairement. Cependant de nombreux travaux soulignent également la capacité de survie du phytoplancton dans les zones oligo- et euphotiques (Murphy & Cowles, 1997 ; Rines *et al.*, 2002), en particulier dans les zones frontales stratifiées. Les pycnoclines sont décrites comme des zones d'accumulation de la matière détritique organique et minérale, et d'organismes vivants de nature bactérienne et planctonique (Pingree *et al.*, 1980 ; Arzul *et al.*, 1993 ; Lunven *et al.*, soumis). Les conditions rencontrées (lumière très atténuée, abondance de matériel détritique particulaire et dissous) apparaissent peu compatibles avec le développement d'organismes strictement autotrophes. Elles doivent impliquer pour certaines espèces un mode de nutrition à caractère, au moins partiellement, hétérotrophe associé au prélèvement de substances organiques dissoutes (hétéro-osmotrophie) ou particulaire (hétéro-phagotrophie). Dans cette étude nous avons recherché les conditions environnementales qui favorisent le caractère hétérotrophe dans deux dinoflagellés : *Karenia mikimotoi* et *Gymnodinium chlorophorum*, et dans une diatomée : *Nitzschia* sp. (cultures mono spécifiques non axéniques), à partir des vitesses d'incorporation de la L-[U-¹⁴C] glutamine utilisée comme traceur de substances organiques azotées. Les mesures ont été effectuées pour différents niveaux de lumière et de concentration en entraîneur glutamine, en tenant compte de la participation de la fraction bactérienne. Les constantes physiologiques obtenues en laboratoire ont été comparées à celles d'une population phytoplanctonique naturelle présente en période printanière à proximité de la pycnocline. Les prélèvements *in situ* ont été effectués à différents niveaux de la colonne d'eau suivant une radiale côte-large à partir de l'estuaire de la Loire, au cours d'une campagne océanographique dans le Golfe de Gascogne (Gasprod).

Cette mission s'inscrivait dans un projet (Chantier Golfe de Gascogne, financement Ifremer) dont l'objectif général est de comprendre l'interaction entre les ressources halieutiques, l'environnement et la pression anthropique. Notre contribution visait à rechercher l'activité hétérotrophe des populations phytoplanctoniques à différents niveaux de la colonne d'eau, et relier cette activité aux facteurs environnementaux : lumière, nutriments inorganiques, substances organiques possédant un groupement amine primaire.

Matériel et méthodes

Expériences sur cultures

Les espèces phytoplanctoniques étudiées en cultures mono spécifiques correspondaient à celles rencontrées dans les eaux côtières. La diatomée *Nitzschia* sp. était comparée aux dinoflagellés produisant des eaux colorées en période estivale : *Karenia mikimotoi* connu pour son activité ichtyotoxique et ses proliférations en zones frontales et côtières (Pingree *et al.*, 1980), et *Gymnodinium chlorophorum* non toxique, collecté dans un bloom monospécifique à 99 % en août 2001 puis cultivé au laboratoire.

Ces algues non axéniques étaient cultivées en milieux stérilisés par autoclavage, à 18°C, en éclairage de 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une photopériode L/O = 12h-12h, ou à l'obscurité. Elles étaient préalablement acclimatées au milieu f/2 (Guillard & Ryther, 1962) dilué 20 fois et désigné f/40. Pour l'expérience elles ont été repiquées à 10^5 cellules L^{-1} (dinoflagellés) et 10^7 cellules L^{-1} (diatomée) dans trois milieux nutritifs f/40 modifiés :

- azote inorganique (Ni) composé de 37 μM N- NO_3 , 7 μM N- NH_4 (désigné milieu témoin)
- sans apport azoté (désigné N-)
- azote organique composé de 44 μM N-glutamine (désigné N-gln)

Les cultures étaient suivies par comptages cellulaires au microscope. Les expériences ont été répliquées et ont donné des résultats identiques.

Les tests d'incorporation de la gln ont été réalisés d'après le protocole de Flynn & Syrett (1985, 1986a). Pour comparer l'influence de la lumière et des stades de croissance sur la vitesse d'incorporation, 2,5 μM de L- [^{14}C]glutamine (Amersham) marqué à 20 nCi mL^{-1} (0,74 kBq mL^{-1}) ont été ajoutés à 10 mL de culture de dinoflagellé (0,2 μM pour la diatomée). Les constantes physiologiques caractéristiques des espèces ont été déterminées à partir des teneurs en gln-entraîneur présentées dans le tableau 1.

Le comptage de la radioactivité ajoutée a été effectué sur 2 x 100 μL prélevés immédiatement après addition du radioélément et introduits dans les flacons à scintillation contenant le liquide scintillant. Le volume restant a été fractionné en 2 x 5 mL et incubé pendant 10 minutes à 20°C. L'éclairage mesuré par un quanta mètre muni d'une sonde 2π (QLS 100, Biosperical Instrument Inc.) était de la même intensité que celui de la culture algale (100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). L'incorporation était stoppée par filtration manuelle douce des cellules, afin d'éviter la rupture des membranes cellulaires, sur un filtre Nuclepore de porosité 3 μm . Un rinçage du filtre par 2 x 5 mL d'eau de mer stérile avait pour but d'éliminer la radioactivité non incorporée et les bactéries. Les filtres étaient ensuite introduits dans des flacons à scintillation contenant le liquide scintillant. Les mesures de désintégration étaient faites sur 10 min. Il était tenu compte du bruit de fond dû aux cellules non marquées, au filtre et au liquide scintillant.

Pour déterminer la vitesse d'incorporation maximale (V_{max}) et la constante de demi-saturation K_s , des concentrations croissantes de gln froide (entraîneur), variant de 0,05 à 5

μM de N-gln pour les diatomées, et de 0,8 à 200 μM de N-gln pour les dinoflagellés ont été ajoutées au milieu de culture au moment de l'inoculation de la gln marquée. Les concentrations de celle-ci variaient de 10 à 20 nCi pour les diatomées et de 20 à 160 nCi pour les dinoflagellés.

Tableau 1. Concentrations d'entraîneur (N-gln) et marquage correspondant utilisés pour déterminer V_{max} et K_s .

	Concentration entraîneur	Marquage/mL
↑ diatomées ↓ Dinoflagellés ↓	0.05 μM (N)	10nCi
	0.1 μM	10nCi
	0.2 μM	10nCi
	0.4 μM	10nCi
	0.8 μM	10nCi
	1 μM	20nCi
	5 μM	20nCi
	10 μM	40nCi
	20 μM	40nCi
	50 μM	60nCi
100 μM	80nCi	
200 μM	160nCi	

La fraction particulaire 3- 0,2 μm était recueillie de la même façon sur filtre Nuclepore 0,2 μm , rincée par 2 x 5 mL d'eau de mer stérile, et considérée comme la fraction bactérienne.

Les mesures d'incorporation des bactéries par *K. mikimotoi* (pinocytose) en milieu f/40 à l'obscurité, ont été réalisées à partir de la fraction bactérienne retenue sur chaque filtre 0,2 μm , marquée au cours du test d'incorporation de gln par les algues. Cette fraction a été introduite dans 5 mL de la culture algale et décrochée du filtre par légère agitation. 100 μL de chaque suspension ont été immédiatement prélevés pour étalonnage, la teneur en N particulaire dans la fraction 0,2-3 μm ayant été déterminée sur une fraction aliquote (analyseur CHN). Après 20 min d'incubation (Nygaard & Tobiesen, 1993), les filtres ont été traités comme précédemment. Chaque essai était répliqué (n=2)..

Les bactéries libres dans les cultures algales (fraction 0,2- 3 μm) étaient dénombrées par comptage des colonies après étalement sur milieu « marine agar », après sept jours. Les bactéries fixées sur les cellules algales ont été comptées au microscope à épifluorescence après marquage au fluorochrome DAPI (Porter & Feig, 1980) et leur viabilité vérifiée par marquage au CTC (Rodriguez *et al.*, 1992).

Expériences sur une efflorescence naturelle

L'analyse floristique d'un prélèvement de l'eau colorée à *Gymnodinium chlorophorum* provenant de sud-Bretagne (France) en juillet-août 2001 a été réalisée avant les tests d'incubation.

Le prélèvement étudié a été dilué au 1/10 avec de l'eau de mer filtrée puis partagé en deux parties, l'une placée à la lumière et l'autre à l'obscurité. Trois jours après le prélèvement, les vitesses d'incorporation de la gln ont été mesurées en fonction des concentrations en gln-entraîneur ajoutées. Ces expériences ont été menées selon le protocole appliqué aux cultures monospécifiques avec des filtrations supplémentaires (30 – 5 – 0,2 μm) afin de mesurer séparément les fractions retenues.

Expérience sur une population naturelle en eau stratifiée

L'incorporation de gln par les populations naturelles printanières en eau de mer stratifiée a été étudiée au cours d'une campagne océanographique en avril 2002, le long d'une radiale côte-large à partir de l'estuaire de la Loire (Côte Atlantique-France). Quatre stations ont été retenues pour la présente étude, chacune échantillonnée successivement à trois niveaux (sub-surface, au maximum de fluorescence chlorophyllienne autour de la pycnocline, et zone sous-jacente), puis à différents niveaux photiques lors d'un deuxième passage. L'incorporation de la gln a été mesurée sur la fraction particulaire $> 1\mu\text{m}$, ce qui donne une valeur approchée de la flore eucaryotique, et n'entraîne qu'une perte d'environ 7 % du nanoplancton (Malinsky-Rushansky & Legrand, 1996).

Les observations microscopiques ont permis de connaître la composition floristique des populations phytoplanctoniques, et de sélectionner la gamme des concentrations de l'entraîneur ^{14}C -gln à utiliser (tableau 1).

La teneur en amines primaires (R-NH_2) dans l'eau a été estimée par spectrofluorimétrie en présence du réactif fluorescamine directement sur les prélèvements tamponnés à pH 9 (Underfriend et al., 1972 ; Packard & Dortch, 1975 ; North, 1975). Les mesures étaient effectuées sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B réglé aux longueurs d'onde 390 nm en excitation et 486 nm en émission. Les valeurs sont exprimées en équivalents N-gln L^{-1} par référence à la courbe d'étalonnage de la gln sans correction des teneurs en azote ammoniacal et urée (composés ne réagissant pas avec la fluorescamine aux teneurs rencontrées dans l'eau de mer).

Les sels nutritifs correspondant aux prélèvements expérimentaux ont été mesurés au laboratoire DEL/EC-EB (Ifremer-Brest).

Résultats et discussion

Cultures

D) Effet de la glutamine sur la croissance des dinoflagellés : *Karenia mikimotoi*, *Gymnodinium chlorophorum* et d'une diatomée : *Nitzschia* sp.

On observe une différence de comportement entre les deux espèces de dinoflagellés. Dans les cultures en lumière, le taux de croissance spécifique ($\mu \text{ j}^{-1}$) de *Karenia mikimotoi* en milieu témoin et avec gln : 0,41 et 0,39 j^{-1} , respectivement, est plus élevé qu'en milieu sans apport azoté : 0,33 j^{-1} ; cette dernière valeur cependant élevée pour un milieu sans azote, s'expliquerait par la réserve intracellulaire (quota). Chez *Gymnodinium chlorophorum*, le taux de croissance est également plus faible en absence d'azote minéral : 0,16 j^{-1} , mais les taux de croissance sont identiques chez le témoin et en milieu enrichi en gln : 0,39 j^{-1} . En outre, les densités cellulaires obtenues en présence de gln sont nettement supérieures à celles du témoin (figures 1a et 2a). A l'obscurité, la multiplication cellulaire est observable dans tous les cas sur un court laps de temps, et les taux de croissance les plus élevés sont obtenus chez *K. mikimotoi* en présence de gln (figures 1b et 2b).

La même expérience réalisée uniquement à la lumière sur la diatomée *Nitzschia* sp. a montré des résultats analogues mais avec une croissance moins élevée en présence de gln que chez le témoin (Figure 3). Les résultats des taux de croissance sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Taux de croissance calculés pour les différentes cultures.

	Taux de croissance en μ d ⁻¹					
	témoin		N-		N-gln	
	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité
<i>K. mikimotoi</i>	0.41	0.22	0.33	0.19	0.39	0.27
<i>G. chlorophorum</i>	0.39	0.02	0.16	0.13	0.39	0.23
<i>Nitzschia</i> sp.	0.91	nt	0.56	nt	0.68	nt

Nt : non testé

Ces résultats montrent que les cellules algales peuvent utiliser la gln comme source azotée pour leur croissance (Flynn & Syrett, 1986a,b). Cependant la dégradation de l'acide aminé par les bactéries présentes dans les cultures constitue une source potentielle d'azote inorganique (formule : $C_5H_{10}N_2O_3$). Les faibles taux de croissance obtenus dans les cultures de dinoflagellés à l'obscurité ne suffisent pas pour vérifier l'utilisation de N-gln en hétérotrophie, car l'incorporation de NO_3 par *G. mikimotoi* (alias *K. mikimotoi*) est possible à l'obscurité (Dixon & Holligan, 1989).

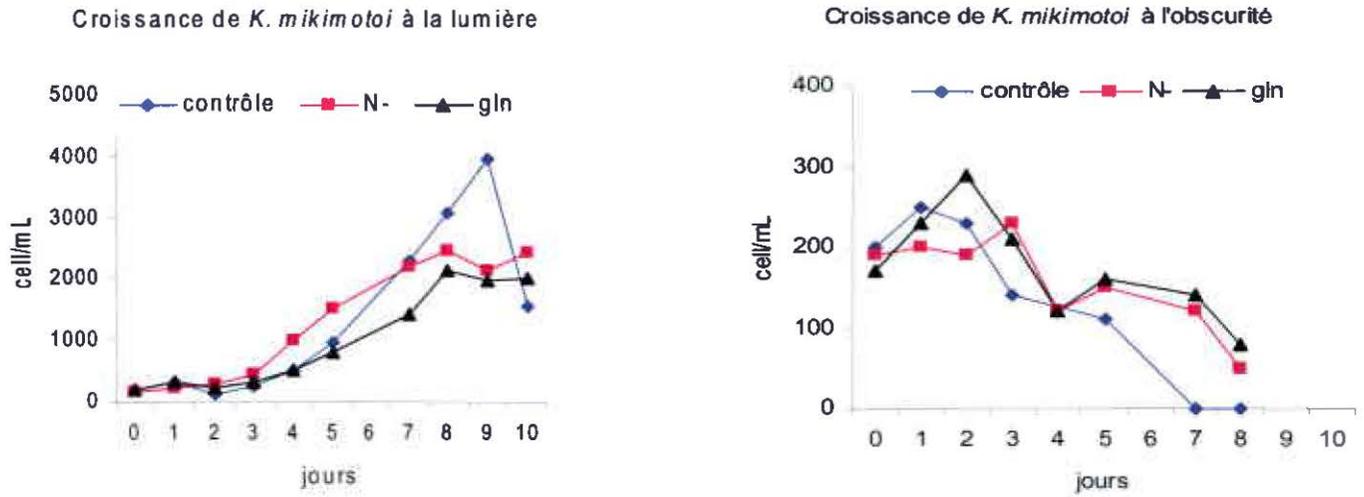
Afin de vérifier si le transport de gln dans les cellules a bien lieu sous forme d'acide aminé, et non d'azote inorganique, l'incorporation a été suivie en utilisant la L- [U-¹⁴C]gln comme source d'azote.

2) Incorporation de la glutamine au cours de la croissance

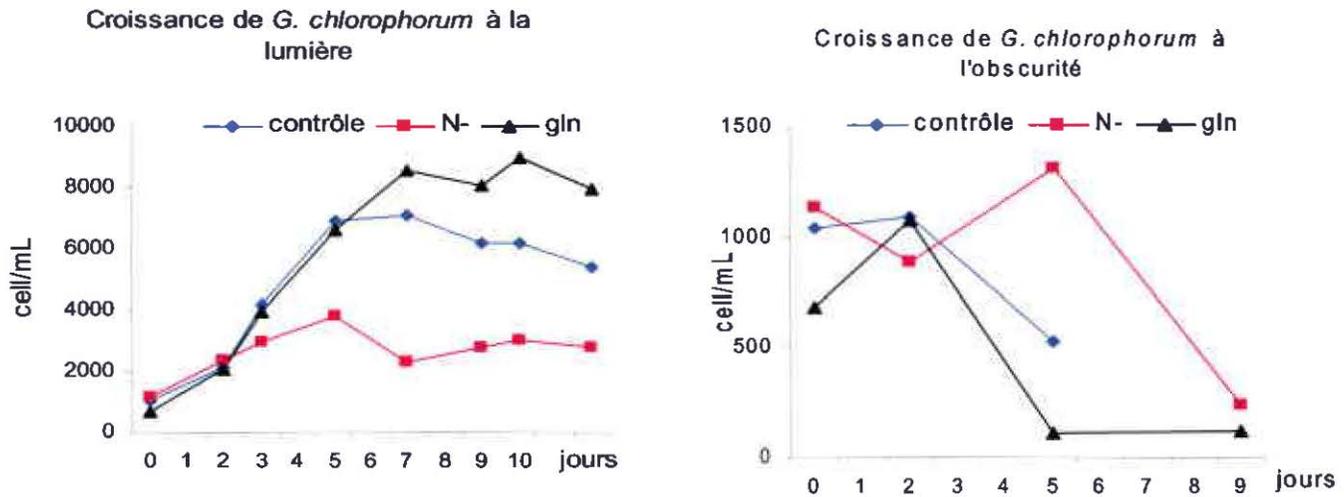
Les mesures répliquées (n=6) sur les trois séries d'expérience pour déterminer l'écart-type des vitesses d'incorporation ont donné des résultats avec un coefficient de variation de 8 à 15 %.

Les figures 4 à 6 présentent la vitesse d'incorporation de la gln par les cellules algales de *K. mikimotoi*, *G. chlorophorum* et *Nitzschia* sp. à différents stades de leur croissance en milieu contrôle f/40 soumis à la lumière. Dans tous les cas, la vitesse d'incorporation est plus élevée dans la phase pré-exponentielle. Lorsque la phase exponentielle est amorcée, la vitesse d'incorporation diminue.

Le suivi de l'assimilation de plusieurs acides aminés marqués par *Gymnodinium breve* a permis à Baden & Mende (1979) de mettre en évidence l'utilisation immédiate des acides aminés pour la synthèse protéique, même si les cellules disposent de l'azote sous forme inorganique (NO_3 , NH_4). Les vitesses d'incorporation élevées observées dans nos expériences correspondraient à une situation identique : forte activité métabolique en milieu riche en phase pré-exponentielle, mais aussi espace intercellulaire plus grand. Ces résultats rappellent également la phase de « dé-stressage » observée chez les bactéries en phase pré-exponentielle, lorsque la perméabilité membranaire plus importante est propice à l'incorporation de petites molécules organiques.



Figures 1a, 1b. Croissance de *Karenia mikimotoi* en différentes conditions de culture : 1a, lumière. 1b, obscurité.



Figures 2a, 2b. Croissance de *Gymnodinium chlorophorum* en différentes conditions de culture : 2a, lumière. 2b, obscurité.

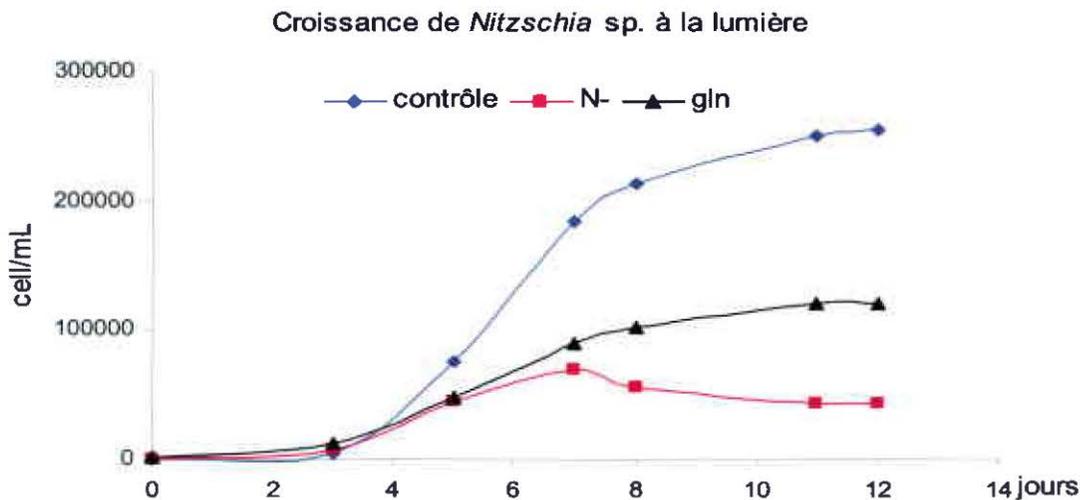


Figure 3. Croissance de *Nitzschia* sp. en différentes conditions de culture en lumière.

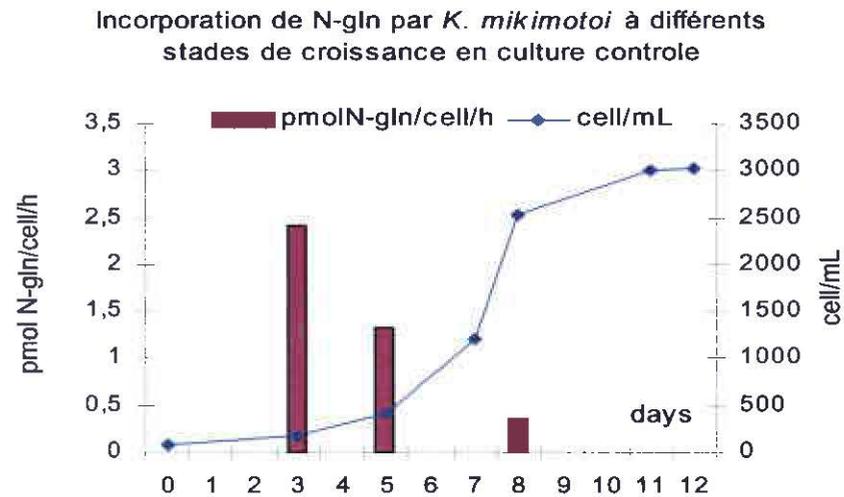


Figure 4 : Vitesses d'incorporation de la gln par *K. mikimotoi* en culture témoin à différents stades de croissance.

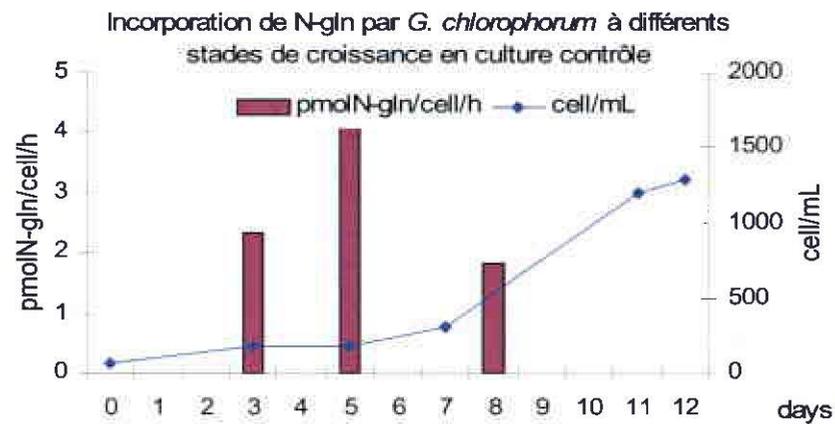


Figure 5 : Vitesses d'incorporation de la gln par *G. chlorophorum* en culture témoin à différents stades de croissance.

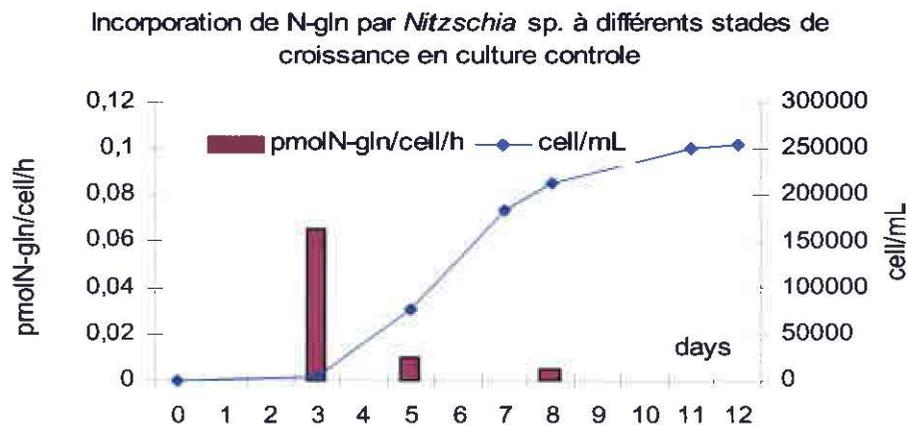


Figure 6 : Vitesses d'incorporation de la gln par *Nitzschia* sp. en culture témoin à différents stades de croissance.

3) Estimation des constantes V_{max} et K_s sur les différentes cultures

L'influence de la concentration en gln sur la vitesse d'incorporation par les algues a été testée sur les cultures témoins précédentes au stade pré-exponentiel. Les courbes obtenues sont de type hyperbolique conformes aux courbes de Michaelis-Menten, et la transformation des données selon la formule de Hanes et Woolf :

$$1/V = K_s/V_{\max}(1/C) + 1/V_{\max}$$

permet de déterminer les vitesses maximales V_{max} et les concentrations de mi-saturation K_s en gln. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Constantes calculées pour trois espèces cultivées en milieu témoin (100 μmol quanta m⁻² s⁻¹).

	V _{max} pmol N-gln cell ⁻¹ h ⁻¹	K _s μM N-gln
<i>Karenia mikimotoi</i>	9,7	14,7
<i>Gymnodinium chlorophorum</i>	8,4	13,2
<i>Nitzschia</i> sp.	0,08	0,78

On notera les valeurs de V_{max} et de K_s proches pour les deux espèces de dinoflagellés. Dans la littérature on note également que la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* a une affinité plus élevée pour la lysine : K_s = 2 μM (Flynn & Syrett, 1986a,b), que le dinoflagellé *Gymnodinium breve* pour les acides aminés comme la glycine : K_s = 110 μM, la valine : K_s = 150 μM, ou la méthionine : K_s = 125 μM (Baden & Mende, 1979).

Les K_s élevés sont caractéristiques de cellules adaptées pour utiliser de fortes concentrations en acides aminés, tandis que les K_s faibles caractérisent des cellules nécessitant seulement de faibles concentrations pour atteindre les vitesses d'incorporation maximum. V_{max} chez *Nitzschia* sp est 100 fois plus faible que celle de *K. mikimotoi* et *G. chlorophorum*, et le faible K_s pour gln montre l'adaptation de la diatomée aux milieux contenant peu de substances organiques dissoutes.

La vitesse d'incorporation des acides aminés est également limitée par la surface des cellules, déterminante dans le nombre de sites actifs au niveau de la membrane, les petites cellules présentant une vitesse moins élevée que les grandes. Nos résultats concernant la relation entre le volume cellulaire (proportionnel à la surface membranaire) et la vitesse d'incorporation, confirment ceux de Lomas & Glibert (1999) (Tableau 4).

Tableau 4. Comparaison entre les vitesses d'incorporation d'acides aminés (AA) et les volumes cellulaires.

Notre étude	<i>Nitzschia</i> sp.	<i>G. chlorophorum</i>	<i>K. mikimotoi</i>	
Volume μm ³	180	4200	4 200	
fmol gln cell ⁻¹ h ⁻¹	80	8 400	9 700	
Lomas & Glibert (1999)	<i>Chaetoceros</i> sp	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	<i>Prorocentrum minimum</i>	<i>Gyrodinium uncatenatum</i>
Volume μm ³	71	1 385	1 109	14 470
fmol N-AA cell ⁻¹ h ⁻¹	2,5	25	70	650

4) Effet de la concentration en azote dans le milieu de culture sur la vitesse d'incorporation de glutamine

Les vitesses d'incorporation de la gln par des cellules cultivées dans les trois conditions : sans apport azoté, avec 44 μM N minéral (témoin : f/40) et avec 44 μM N-gln, ont été mesurées dans les cultures en phase pré-exponentielle de croissance.

Chez les dinoflagellés, la plus faible vitesse d'incorporation est observée dans les cultures sans apport azoté. Pour une concentration de 5 μM N-gln ajoutée dans le milieu, l'acide aminé est incorporé à raison de 1 - 1,5 pmol N-gln cell⁻¹ h⁻¹. Dans la culture témoin cette vitesse atteint 2,3 pmol N-gln cell⁻¹ h⁻¹ (figure 7). Les mêmes cultures soumises à un apport de 50 μM N-gln ont des vitesses plus élevées : 7,2 et 6,4 pmol N-gln cell⁻¹ h⁻¹ pour *K. mikimotoi* et *G. chlorophorum*, respectivement. Ces dinoflagellés cultivés en présence de 44 μM N-gln ont les vitesses d'incorporation (sans ajout d'entraîneur) les plus élevées : 110 et 87 pmol N-gln cell⁻¹ h⁻¹ (figure 8), près de 100 fois la valeur mesurée dans le milieu sans apport azoté.

Il semble donc qu'indépendamment de la concentration en gln ajoutée au moment de l'expérimentation, les conditions de culture ont une importance primordiale puisque les algues acclimatées à de fortes concentrations de gln présentent une vitesse d'incorporation supérieures d'un ordre de grandeur.

Ainsi la composition chimique azotée du milieu de culture modifie la capacité de réponse du phytoplancton pour une utilisation optimale de son environnement nutritif. Pour tester cette hypothèse nous avons enrichi une partie aliquote de culture sur f/40 en phase pré-exponentielle, avec de l'eau provenant d'une station d'épuration filtrée sur 3 μm , à raison de 2 %. Après 24 h de culture, la vitesse d'incorporation atteignait 0,23 pmol N-gln cell⁻¹ h⁻¹, soit trois fois plus que dans la partie non-enrichie (0,08 pmol N-gln cell⁻¹ h⁻¹). Cette adaptation apparaît donc rapide.

Chez la diatomée *Nitzschia* sp., les vitesses d'incorporation de la gln mesurées avec entraîneur 0.4 μM N-gln sont dix fois plus faibles que celles obtenues avec les dinoflagellés en présence de 5 μM N-gln, en raison des faibles constantes d'incorporation V_{max} et K_s (Tableau 3). Mais la vitesse d'incorporation de la gln est plus élevée en milieu carencé qu'en milieu témoin et cette différence est encore plus marquée lorsque l'expérience est réalisée avec un entraîneur 5 μM N-gln (figure 9). Ces résultats, inversés par rapport à ceux obtenus avec *K. mikimotoi* et *G. chlorophorum*, sont en accord avec ceux obtenus par Flynn et Syrett (1986b) avec la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* en présence de lysine.

La réponse physiologique des dinoflagellés carencés en azote inorganique est donc différente de celle observée chez les diatomées.

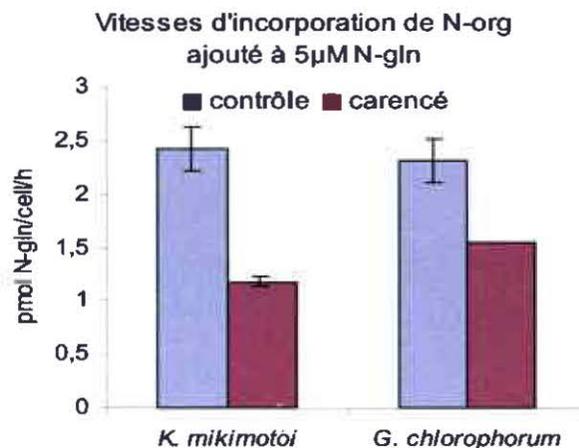


Figure 7. Vitesse d'incorporation de la gln par les dinoflagellés en milieux témoin (contrôle) et carencé en azote.

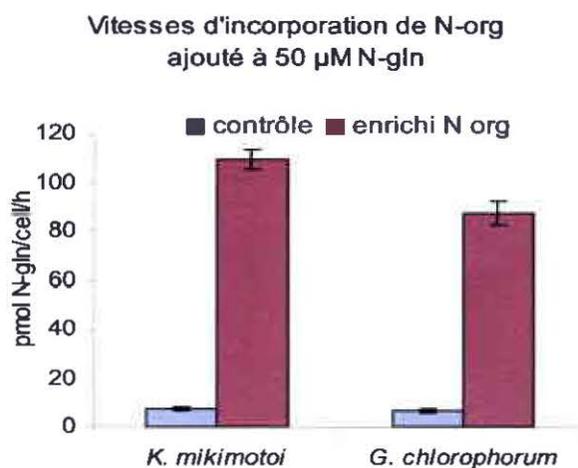


Figure 8. Vitesse d'incorporation de la gln par les dinoflagellés en milieux témoin (contrôle) et enrichi en N-gln

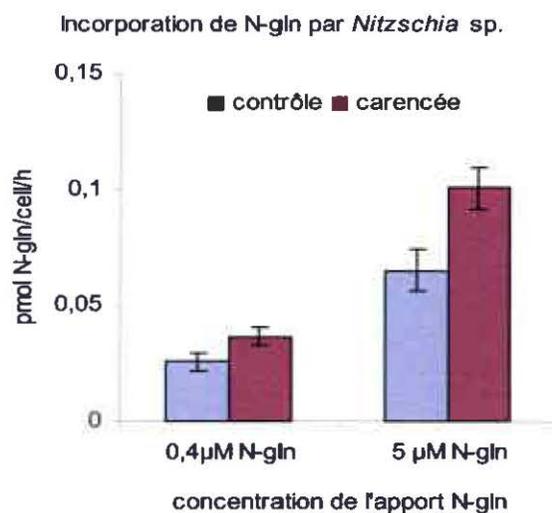


Figure 9. Vitesse d'incorporation de la gln par la diatomée *Nitzschia* sp. cultivée en milieu témoin (contrôle) et carencé en azote.

6) Effet de l'intensité lumineuse sur l'incorporation de substance organique

La vitesse d'incorporation de N-gln (N-dissous) à différentes intensités lumineuses, par *K. mikimotoi* cultivé à la lumière (J5, $100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{h}^{-1}$) en milieu f/40 a montré que la vitesse d'incorporation n'est pas très influencée par l'intensité d'éclairage (Figure 10).

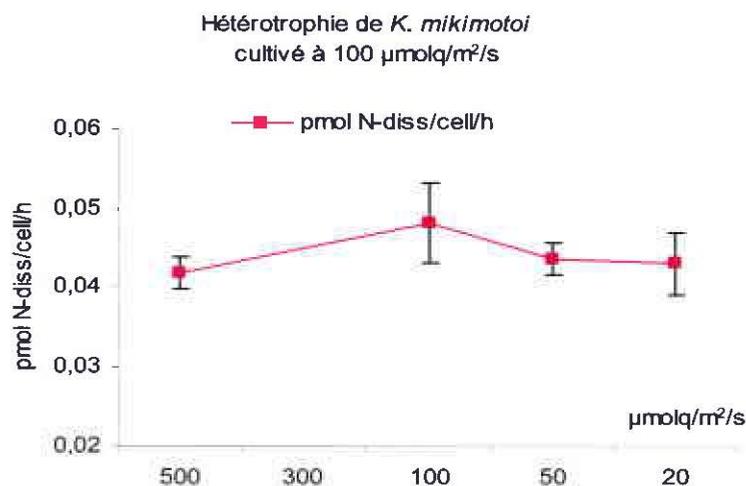


Figure 10 : Hétérotrophie (osmotrophie) chez *K. mikimotoi* cultivé à $100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en fonction de l'intensité lumineuse appliquée durant l'incorporation de ^{14}C -gln sous forme dissoute.

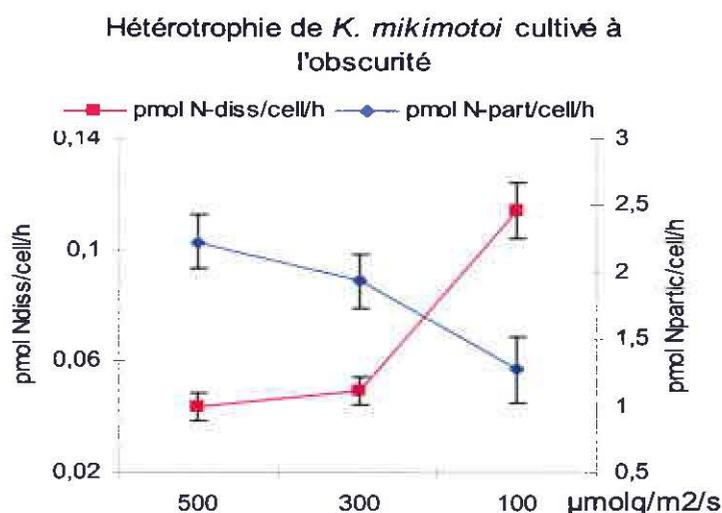


Figure 11 : Hétérotrophie (pinocytose et osmotrophie) chez *K. mikimotoi* cultivé à l'obscurité, en fonction de l'intensité lumineuse appliquée durant l'incorporation de ^{14}C -gln.

La même expérience d'incorporation avec les plus fortes intensités lumineuses, a été réalisée sur *K. mikimotoi* cultivé à l'obscurité (J5). La vitesse d'incorporation de la gln dissoute

diminue avec l'augmentation d'intensité lumineuse. Les vitesses d'incorporation mesurées à forte intensité lumineuse (300 et 500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sont semblables à celles obtenues sur la culture faite à la lumière, mais triplent lorsque l'incorporation est réalisée à plus faible intensité (100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

L'expérience a été complétée par des tests d'incorporation de particules retenues sur le filtre 0,2 μm , elles-même marquées par l'incorporation de la ^{14}C -gln au cours des tests d'incorporation de gln par *K. mikimotoi*. La charge en C et N particulaire d'un aliquot de la solution préalablement filtrée sur 3 μm étant déterminée (732 et 49 μM , respectivement), les calculs montrent que la vitesse d'incorporation des particules (0,2-3 μm) marquées par la ^{14}C -gln varie dans le même sens que l'intensité lumineuse (figure 11).

Plusieurs mécanismes distincts sont donc impliqués dans l'incorporation des substances organiques dissoutes ou particulières par *K. mikimotoi*, selon le conditionnement préalable de l'algue. L'incorporation de N-dissous par *K. mikimotoi* cultivé à la lumière apparaît indépendante de l'énergie lumineuse appliquée durant le test. Ce fait a également été observé par Flynn & Syrett (1985, 1986a) dans le cas de la diatomée *P. tricornutum* cultivée à la lumière en milieu non carencé en azote. Inversement, le mécanisme d'incorporation utilisé par *K. mikimotoi* conditionné à l'obscurité semble inactivé en présence de lumière.

Des observations similaires ont été faites par Nygaard & Tobiesen (1993) au cours d'une efflorescence : le brotage des bactéries (pinocytose) par *Prymnesium parvum* et *Chrysochromulina ericina* était élevé dans la zone superficielle éclairée mais nul à 4 m. Cependant Legrand *et al.* (1998a) ont montré que la carence en substances nutritives inorganiques semble plus efficace sur la pinocytose chez *Alexandrium catenella*, que la lumière.

7) Contribution de l'activité bactérienne

L'incorporation de la gln par la fraction 0,2-3 μm est attribuée à la fraction bactérienne non fixée sur les cellules algales. Des expériences ont été réalisées sur des cultures de *K. mikimotoi* soit en cultures témoins, soit en culture N-gln. Les mesures d'incorporation ont été effectuées aux 3 stades de la croissance de *K. mikimotoi*. Les résultats montrent une incorporation maximale au début de la phase exponentielle de croissance de l'algue (Figure 12). Ce maximum est décalé par rapport au maximum d'incorporation de gln par les cellules algales (Figure 4). L'incorporation par les bactéries libres en culture N-gln est 10 fois plus élevé qu'en culture témoin. En culture N- ces résultats sont peu différents de ceux obtenus chez la culture témoin.

Le nombre de bactéries libres dans les cultures de *K. mikimotoi* et *G. chlorophorum* (résultats non présentés pour cette dernière espèce) sont similaires à J5 et J8, avec des valeurs 10^2 à 10^3 fois plus élevées que dans les cultures de *Nitzschia* sp.. Les cultures avec gln sont plus riches en bactéries ce qui explique les vitesses plus élevées mesurées dans ces milieux (Figure 12). Ces densités bactériennes sont plus élevées que celles mentionnées par Baden & Mende (1979) en culture de *Gymnodinium breve* mais proches de celles de Sukoso & Sakata (1996) en culture de *Chattonella marina*. Cependant, la méthode employée ne permet que le dénombrement de cellules cultivables sur un milieu « marine agar », et ne tient pas compte des bactéries de l'environnement non cultivables, ou stressées (vibrioses par exemple). La densité bactérienne peut donc être sous-estimée, ce qui n'est pas mentionné par les auteurs précédents. Il est vraisemblable que les bactéries en culture algale se développent

principalement fixées sur les débris cellulaires, et les flocculats résultant des excréments phytoplanctoniques. Certaines colonies apparaissent tardivement et ne sont dénombrables qu'au 7^{ème} jour après étalement. Elles correspondraient à des espèces bactériennes, soit inhibées par les excréments algales, soit difficilement adaptées aux conditions de culture. L'incorporation moyenne par bactérie dans les cultures témoin et celles enrichies avec 44 μM N-gln est de 80 amol N-gln bact⁻¹ h⁻¹. Ces valeurs 10² fois plus élevées que celles trouvées par Ayo *et al* (2001) dans les eaux oligotrophes de Méditerranée, sont probablement sur-estimées, et se rapprocheraient de l'incorporation par les bactéries fixées.

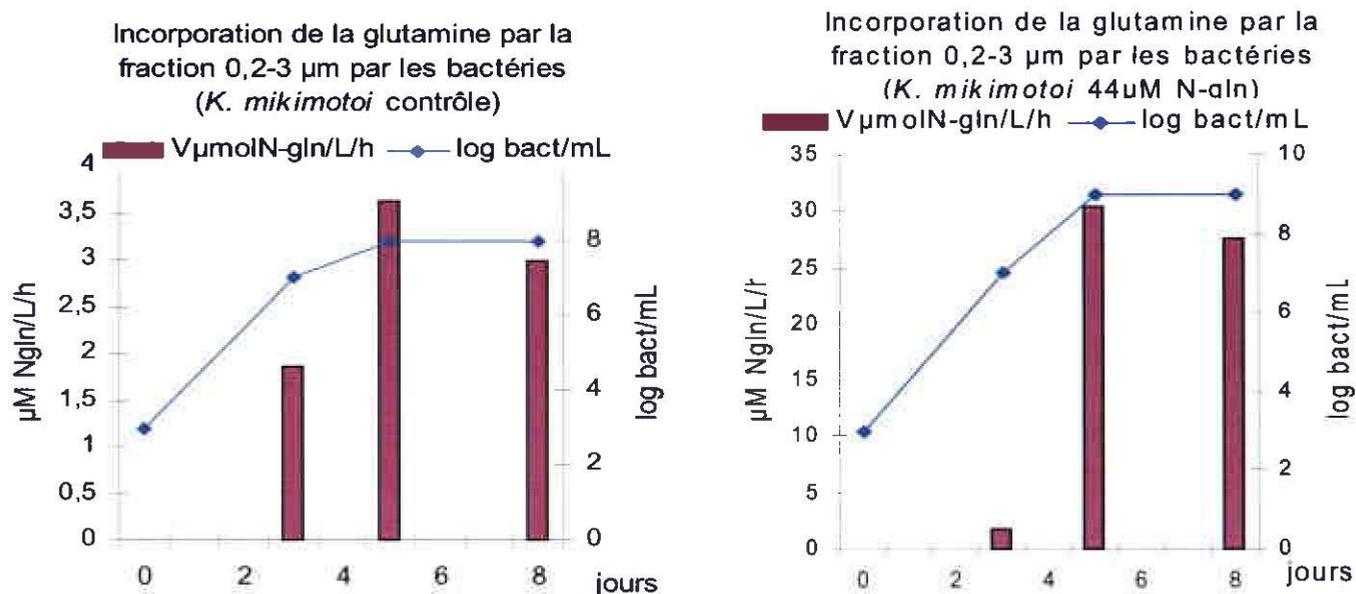


Figure 12 : Vitesse d'incorporation de la glutamine par les bactéries lors des tests d'incorporation par *K. mikimotoi* en culture témoin et avec apport de 44 μM N-gln.

Une approche de caractérisation faite sur les colonies bactériennes a révélé le caractère gram-, et oxydase + dans la plupart des cas, et ces résultats sont en accord avec ceux de Sukoso & Sakata (1996) obtenus sur les bactéries des cultures de *Chattonella marina*. L'identification des souches bactériennes isolées sur galeries API20E a donné des résultats négatifs, montrant l'absence de métabolisation des sucres par ces bactéries.

Les bactéries attachées aux cellules phytoplanctoniques ont été observées et dénombrées dans les cultures témoin au 8^{ème} jour de la culture, au microscope à épifluorescence après coloration au DAPI et réduction du CTC. La diatomée a peu de bactéries associées (2 à 4 bactéries par cellule algale), probablement en raison de la faible production de mucus et de la présence de substances antimicrobiennes (Rogerson *et al.*, 1993 ; Naviner *et al.*, 1999 ; Clarkson & Evans, 1993). En revanche les dinoflagellés exsudent des polysaccharides ce qui favorise la fixation et le développement des bactéries (6 à 8 bactéries par cellule algale pour les deux espèces). En considérant les vitesses d'assimilation moyennes, la contribution des bactéries attachées à l'incorporation de la gln mesurée dans la fraction $> 3 \mu\text{m}$ serait au maximum de 1 fmol cell phyto⁻¹ h⁻¹, ce qui est inférieur aux variations expérimentales calculées pour les vitesses d'incorporation algales (8-15 %).

Bien que l'incorporation de gln par les bactéries hétérotrophes soit importante principalement dans les cultures algales en phase exponentielle de croissance, la méthode employée pour éliminer les bactéries liées aux cellules algales permet d'en limiter l'interférence lors des

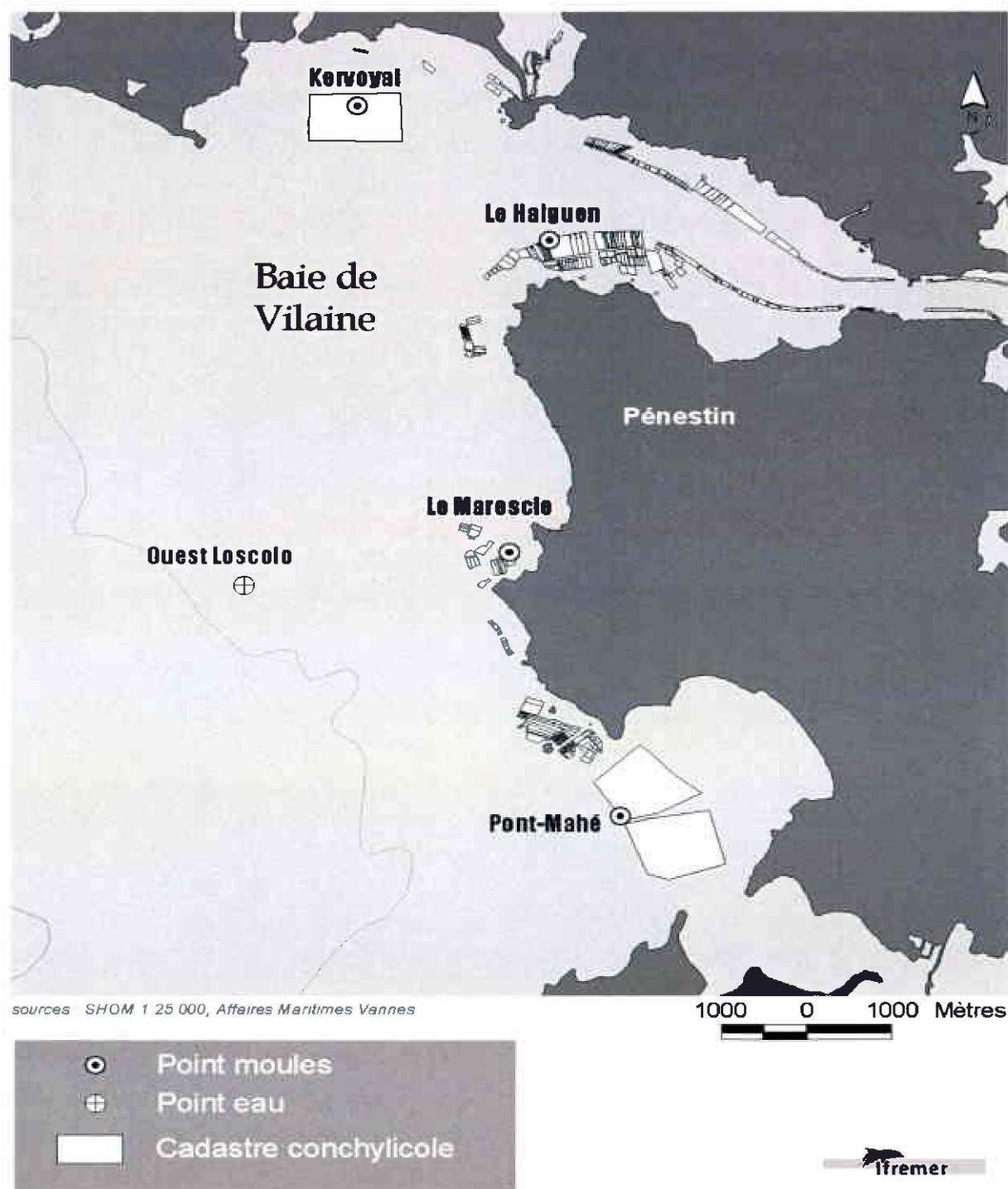
mesures d'incorporation. D'autre part la présence de bactéries permet de reproduire la condition naturelle en respectant l'aspect compétitif entre bactéries et phytoplancton, pour l'utilisation des substances organiques.

In situ

Expérience sur bloom estival en zone côtière:

Des efflorescence à *Karenia mikimotoi* et /ou *Gymnodinium chlorophorum* sont observées de façon récurrente dans les eaux côtières de France sur la façade atlantique, de juin à septembre (Gentien, 1998). Leur présence simultanée, jamais observée jusqu'à présent, laisse penser à des exigences environnementales différentes. La première espèce est détectée dans presque toutes les zones côtières du globe en régions tempérées, ainsi que dans les zones frontales (Pingree *et al.*, 1980 ; Arzul *et al.*, 1983). Elle forme des eaux brunes, associées à des mortalités d'organismes marins, et parfois des pertes économiques importantes (Erard-Le Denn *et al.*, 1981 ; Honjo, 1994). Elle se caractérise par la production de glycolipides formés d'acides gras poly-insaturés (Yasumoto *et al.*, 1990), qui lui confèrent sa toxicité, ses propriétés cytolytique, et allélopathique vis-à-vis des autres espèces compétitrices (Bodennec *et al.*, 2000 ; Parrish *et al.*, 1998 ; Gentien & Arzul, 1990). *G. chlorophorum* forme des eaux vertes en zones côtières et estuariennes, et n'est pas reconnu toxique. C'est au cours d'une efflorescence de cette espèce le long des côtes Sud-Bretagne (France), que l'expérience a été réalisée en juillet-août 2001 (carte 1).

Localisation des points de prélèvements REPHY au 01/01/2002 en Baie de Vilaine



Carte 1. Zone d'extension de l'efflorescence à *Gymnodinium chlorophorum* en juillet-août 2001 et points de surveillance du Réseau Phytoplancton (REPHY)

1) composition spécifique de la population

La population naturelle était composée en partie de gymnodinés dominés par *Gymnodinium chlorophorum* et en partie par les diatomées, dont l'espèce dominante était *Leptocylindrus minimus* (Tableau 4).

Tableau 4 : Composition floristique du prélèvement d'eau colorée avant dilution.

Familles	Espèces	Cell L ⁻¹
Gymnodinés	<i>Gymnodinium chlorophorum</i> (18-20µm)	854 000
	Gymnodinés ≤ 30 µm	30 800
	Gymnodinés < 15µm	114 450
	<i>Torodinium robustum</i> (>30 µm)	26 400
Diatomées	<i>Leptocylindrus minimus</i> (chaînes < 6µm de large)	1 030 000
	<i>Skeletonema costatum</i> (chaîne < 6 µm de large)	30 800
	<i>Nitzschia</i> spp (< 6µm de large)	13 200
Ciliés	> 30 µm	13 200

2) Incorporation de la glutamine

Les tests d'incorporation de la gln dans la classe de taille > 30 µm ne présentent pas de saturation même pour des concentrations aussi élevées que 40 µM N-gln (Figure 13). Dans cette classe de taille se trouve la diatomée *L. minimus* dont la longueur de chaîne dépasse 30 µm, et les ciliés à forte activité hétérotrophe. Ceci expliquerait la vitesse d'incorporation beaucoup plus élevée à la lumière qu'à l'obscurité (0,24 et 0,15 µmol L⁻¹ h⁻¹ respectivement pour 40 µM N-gln entraîneur) (Strom, 2001).

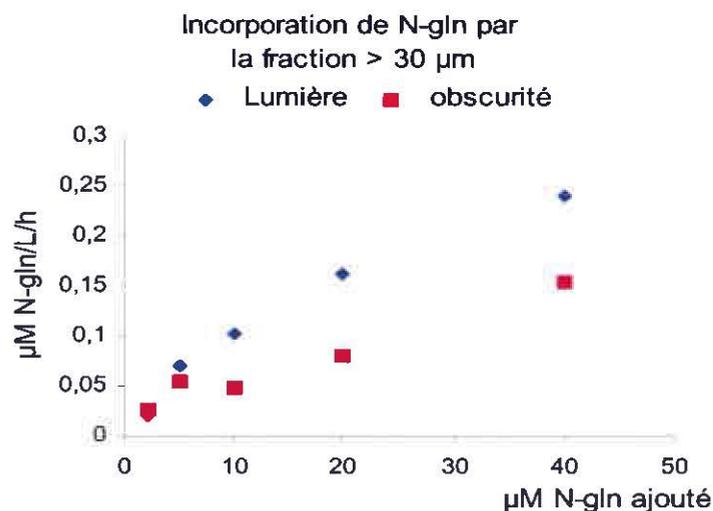


Figure 13. Incorporation de gln par la fraction > 30 µm.

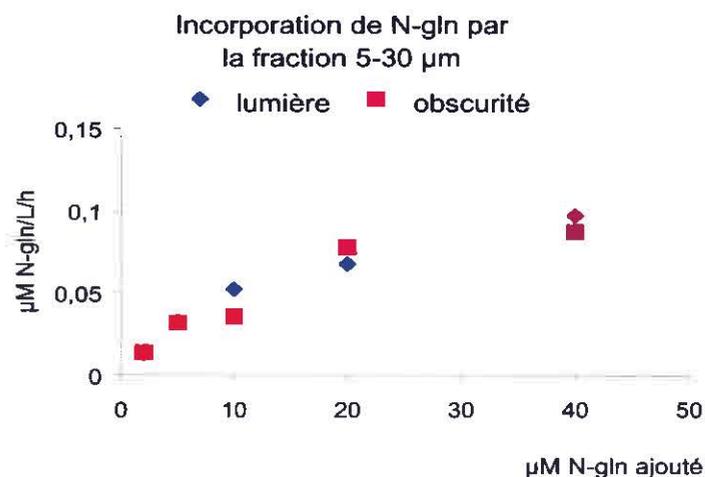


Figure 14 . Incorporation de gln par la fraction 5-30 μm

La classe de taille 5-30 μm correspond à la présence de *G. chlorophorum* et de différents gymnodinés. Les courbes d'incorporation de la gln en fonction de la concentration de ce substrat, sont de type hyperbolique (Figure 14). Le calcul des constantes d'assimilation de gln donne une vitesse maximale d'incorporation 0,13 $\mu\text{M N-gln L}^{-1} \text{h}^{-1}$ et Ks de 17 $\mu\text{M N-gln}$ ($p > 0,01$). La constante de demi-saturation est proche de celle obtenue ci-dessus avec *G. chlorophorum* en culture (13,2 $\mu\text{M N-gln}$).

La classe de taille 0,2-5 μm correspond à la présence de nanoflagellés et de bactéries (bactérioplancton). Seule la courbe d'incorporation à la lumière décrit une hyperbole (Figure 15) avec une vitesse maximale de 2,3 $\mu\text{M N-gln L}^{-1} \text{h}^{-1}$ et un Ks de 29 $\mu\text{M de N-gln}$ ($p > 0,01$). L'incorporation à l'obscurité est plus faible et présente un plateau pour les concentrations $> 20 \mu\text{M N-gln}$ avec une vitesse maximale de 1,25 $\mu\text{mol N-gln L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Il est à noter que l'absorption de la gln par les nanoorganismes (nanoflagellés auto et hétérotrophes, bactéries) est au moins 100 fois supérieure à celle des microorganismes (microalgues, ciliés) (Dennett et al., 2001).

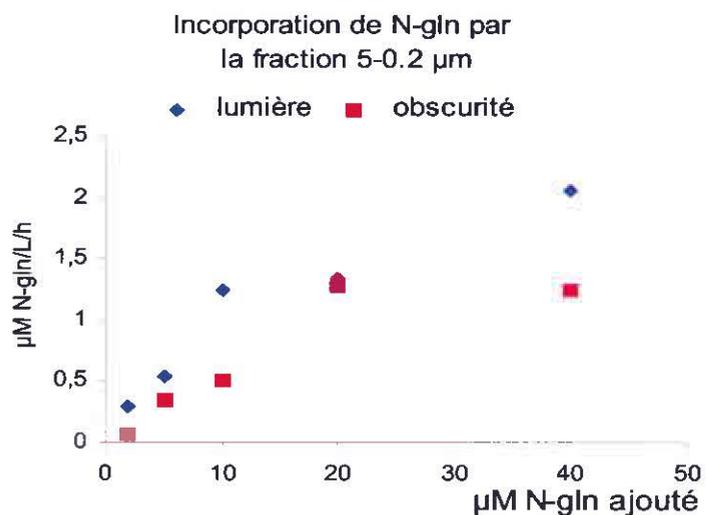


Figure 15. Incorporation de gln par la fraction 0,2-5 μm .

L'incorporation de gln par les différentes classes de taille de la population mixte naturelle montre un ensemble de caractéristiques décrites au préalable avec les cultures mono spécifiques : insensibilité de l'incorporation de N-gln dissous à la lumière, Ks proche de celui mesuré pour *G. chlorophorum* dans la fraction 5-30 μm , forte activité hétérotrophe dans la fraction contenant le bactérioplancton, voisine de celle mesurée sur les bactéries.

Expérience sur populations printanières en eau de mer stratifiée

Au cours de la campagne les stations étaient déterminées en fonction du gradient de salinité côte-large (Carte 2). Les niveaux de prélèvement étaient sélectionnés en fonction des densités particulières détectées au moyen d'un équipement spécifique, muni d'un détecteur multi-sondes et d'un système de prélèvement (Lunven *et al.*, 2002 ; Lunven *et al.*, soumis). Des sous-échantillons ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques et biologiques complémentaires.

1) Populations phytoplanctoniques et ciliés

Les populations phytoplanctoniques, principalement formées de nanoplancton, présentaient un gradient de concentration croissant depuis l'estuaire de la Loire vers le large. Les diatomées présentaient une tendance inverse avec des concentrations plus élevées vers la côte (stations 1 et 2) constituant jusqu'à 42 % de la population (station 2). Les cellules se développent surtout dans la zone 0-16 m, il apparaît un gradient vertical aux stations les plus profondes et éloignées (3 et 4), où les couches profondes sont plus pauvres en microorganismes (tableau 5).

L'activité hétérotrophe des ciliés accompagnateurs des fortes densités de diatomées et de cryptophycées dont ils se nourrissent, est comprise dans l'activité mesurée dans la fraction $> 1 \mu\text{m}$. Peu abondants : 1 % des cellules dénombrées, les ciliés peuvent cependant contribuer à augmenter les vitesses d'incorporation de N-gln tant par osmotrophie que par broutage.



Carte 2. Zone étudiée au cours de la mission Gasprod (avril 2002) et stations de prélèvement.

Tableau 5. Pourcentages des groupes floristiques et des ciliés observés sur l'ensemble de la colonne d'eau. Le nanoplancton ne constitue pas un groupe au sens systématique du terme, mais regroupe les cellules de taille 2-20 μm .

Stations	% diatom.	% dinoflag.	% ciliés	% nanoplanct	Total cellules L^{-1}
1	28	1	1	69	$1,1 \times 10^6$
2	42	2	1	55	$2,6 \times 10^6$
3	8	3	1	88	$3,5 \times 10^6$
4	1	5	1	93	$6,6 \times 10^6$

2) Composition chimique en sels nutritifs et amines primaires

Les substances azotées inorganiques présentent des concentrations plus élevées à la côte et en surface (Figure 16). Les amines primaires sont plus concentrées en surface et en station 3 à 30 m, et en station 4. Les concentrations en phosphate sont basses, particulièrement en surface (excepté en station 1) et en station 4. Il s'agit d'une situation océanique typiquement printanière avec le phosphate limitant.

3) Mise en évidence de la capacité hétérotrophe

L'incorporation de gln par les organismes planctoniques prélevés aux 4 stations et à différents niveaux, et mis en présence d'ajouts croissants de l'acide aminé est présentée sur les figures 17.

La plupart des courbes obtenues sont de type Michaelis-Menten (tableau 6). Les stations 1 et 2 présentent des K_s faibles, correspondant aux populations de diatomées relativement abondantes (tableau 5).

A la station 3 en surface on ne note pas de saturation dans l'incorporation de la gln. Dans cet échantillon la flore planctonique était surtout composée de nanoplancton, accompagnée de ciliés dont l'activité hétérotrophe est élevée. A 14 m la courbe de vitesse d'incorporation permet de distinguer deux types de populations : les diatomées à faibles K_s : $3,2 \mu\text{M N-gln}$ (8 % de la population à ce niveau), les ciliés et nanoplancton à K_s élevés : $10 \mu\text{M N-gln}$ (80 %).

La station 4 se caractérise par des valeurs de K_s nettement plus élevées, en raison de la prédominance des ciliés, des nanoflagellés et des dinoflagellés par rapport aux diatomées.

Les valeurs de K_s varient de 0,3 (surface en station 2) à $31 \mu\text{M N-gln}$ (surface en station 4), et montrent une adaptation des cellules à prélever des teneurs relativement élevées en azote organique. Les concentrations en acides aminés totaux (AA) mesurées par Williams & Poulet (1986) en avril en Mer Celtique étaient de 10 à $700 \text{ nmoles L}^{-1}$ (dissous) et 24 à $800 \text{ nmoles L}^{-1}$ (particulaire). Leur utilisation par les cellules phytoplanctoniques est donc possible.

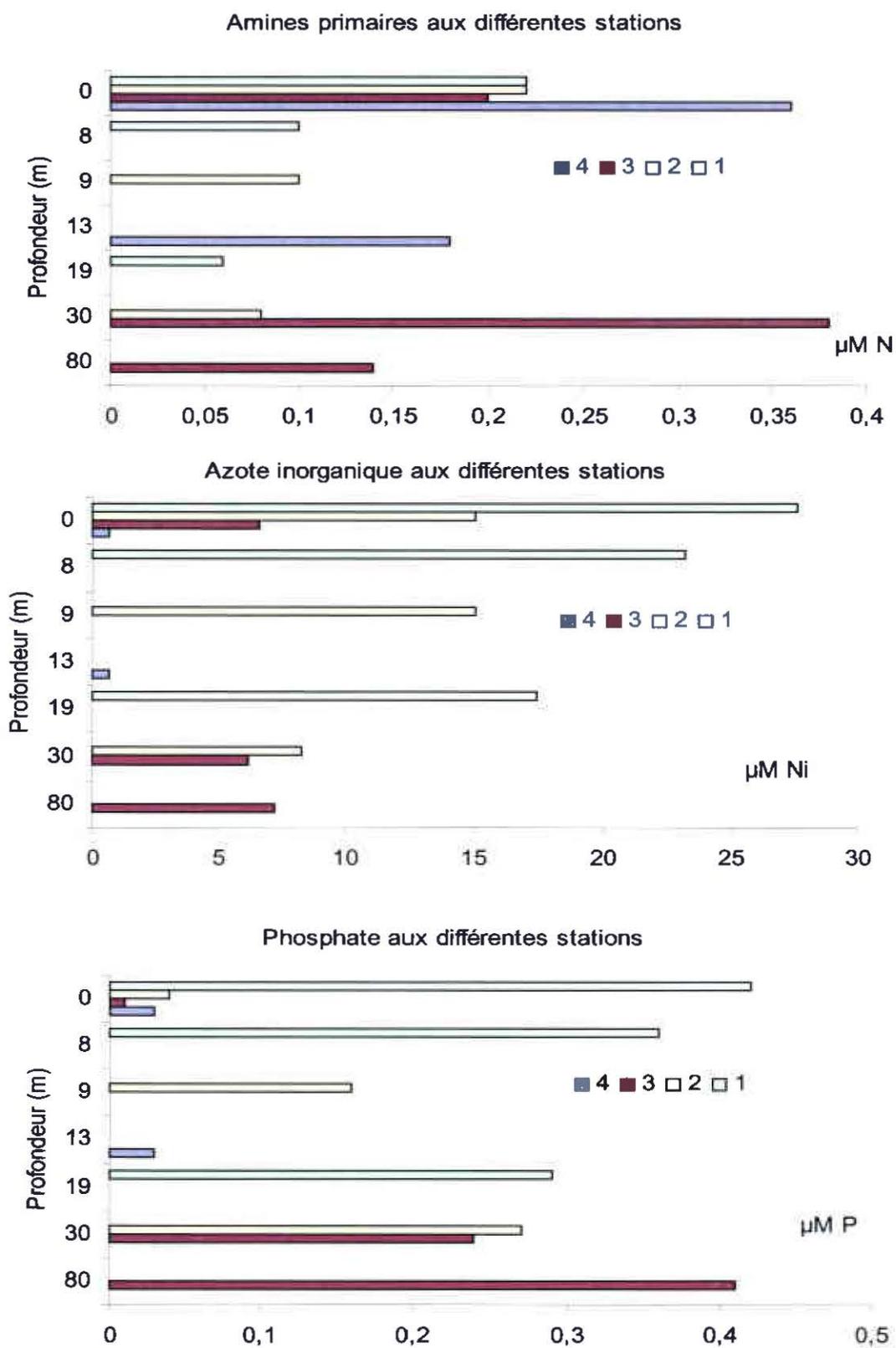


Figure 16. Composition chimique des échantillons étudiés aux stations 1, 2, 3 et 4.

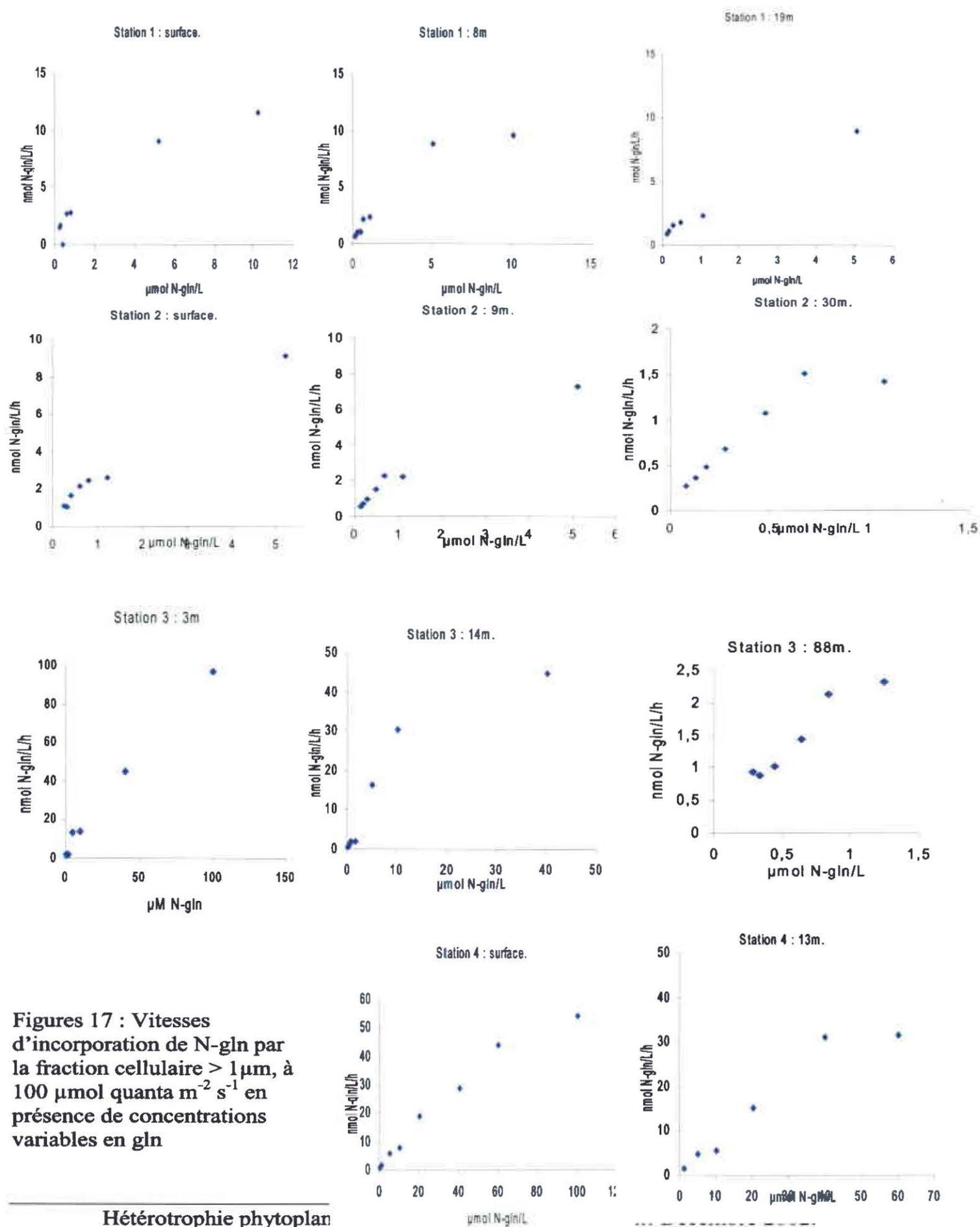
Tableau 6 : Vmax en nmol N-gln L⁻¹ h⁻¹, et Ks en µM N-gln

Stations	Niveaux		
1	Surface	8 m	19 m
	Vm 9,9	Vm 7,4	Vm 4,1
	Ks 1,6	Ks 1,7	Ks 0,4
2	Surface	9 m	30 m
	Vm 2,8	Vm 2,5	Vm 1,5
	Ks 0,3	Ks 0,4	Ks 0,4
3	Non calculables	14 m	88 m
		Vm ₁ 8,5	Vm ₂ 45,0
		Ks ₁ 3,2	Ks ₂ 10,0
4	Surface	13m	
	Vm 42,2	Vm 24,2	
	Ks 30,9	Ks 18,8	

L'assimilation de l'azote organique par des bactéries fixées aux cellules algales a été étudiée par ailleurs (G. Mevel, Institut de Biologie Marine de Roscoff, en prép.). Les mesures d'assimilation de la leucine par les bactéries ont montré que les bactéries fixées contribuaient à 50 % de l'assimilation bactérienne bien que ne constituant que 15 % de la population totale (10⁹ L⁻¹). L'assimilation moyenne azotée calculée pour les bactéries fixées (0,06 amol N bactérie⁻¹ h⁻¹), est légèrement plus faible que celles de Ayo *et al.* (2001). Ces résultats nous ont permis de ne pas considérer l'interférence des bactéries fixées dans les mesures d'incorporation de gln par les cellules algales, les variations expérimentales calculées pour les vitesses d'incorporation algales étant de 8-15 %.

4) Mesures de la consommation réelle

Les analyses d'amines primaires équivalents N-gln dans les prélèvements étudiés, ont permis de connaître la consommation hétérotrophe réelle Vr et comparer ces vitesses avec les Vmax (tableau 6). Les résultats (Figure 18) montrent que les Vr mesurées sur tous les échantillons au même éclaircissement (100 µmol quanta m⁻² s⁻¹) sont plus élevées dans les échantillons de surface, et proches des Vmax (déterminées à 100 µmol quanta m⁻² s⁻¹) aux stations 1 et 2 (Vr/Vmax = 0,32 et 0,31, respectivement). Hormis dans les prélèvements de fond en stations 1 et 3 (Vr/Vmax = 0,20 et 0,40, respectivement), les Vr restent inférieures à 10% de Vmax. Ceci montre que les conditions en surface sont proches des conditions optimales pour l'activité hétérotrophe, de même que la composition en sels nutritifs et l'éclaircissement favorisent également l'autotrophie.



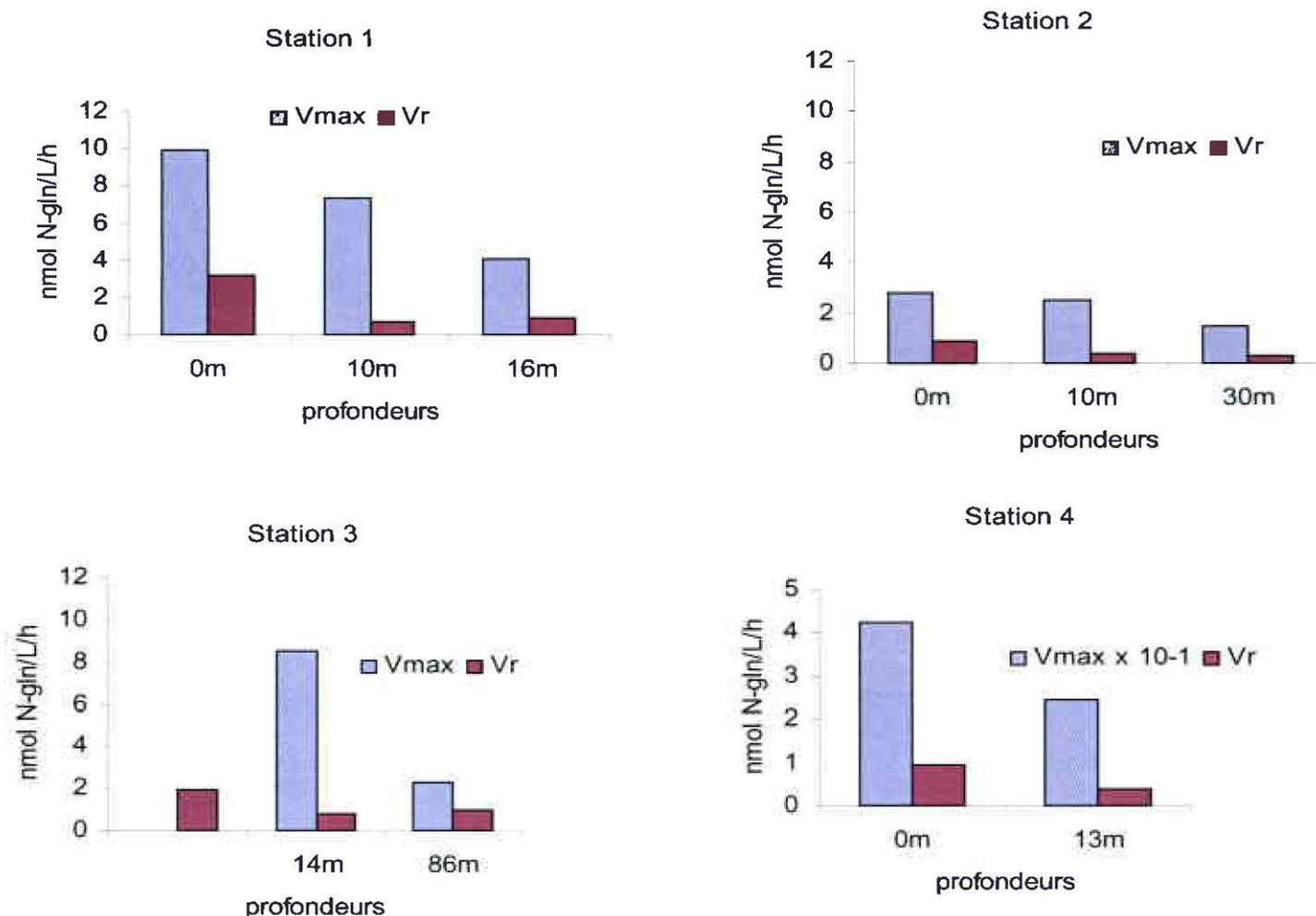


Figure 18 : Comparaison des Vmax et vitesses réelles (Vr) calculées dans les échantillons de différentes profondeurs aux quatre stations.

5) Effet de l'intensité lumineuse sur l'incorporation de la glutamine par les cellules $>1\mu\text{m}$

Les prélèvements sont faits en sub-surface (éclairage maximum $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), et à différents niveaux, d'intensité lumineuse décroissante avec la profondeur. Les tests d'incorporation de la gln étaient réalisés sur les échantillons en condition d'éclairage maximal ($300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), et en condition d'éclairage naturel simulé.

L'effet de l'intensité lumineuse utilisée durant les expériences d'incorporation de gln est différent selon les échantillons (Figure 19).

L'effet de l'intensité lumineuse est peu marqué sur l'activité hétérotrophe des populations peu ou pas carencées en substances nutritives. C'est le cas de la station 1 où les teneurs en azote et phosphore inorganiques dissous sont relativement élevées, ainsi qu'en surface, celles des amines primaires (Figure 16). A cette station l'incorporation est élevée en surface : $2,5 \text{ nmol}$

N-gln $\mu\text{g Chla}^{-1} \text{h}^{-1}$ (ce qui souligne l'adaptation des cellules pour une utilisation optimale de leur environnement). Elle est de 0,7 à 1 nmol N-gln $\mu\text{g Chla}^{-1} \text{h}^{-1}$ aux profondeurs 5 - 16 m. Les populations algales sont constituées principalement de diatomées : 28% sur l'ensemble des niveaux, tandis que le nanoplancton (69 %) est abondant aux profondeurs supérieures à 10 m (distribution verticale non présentée).

L'effet inhibiteur de l'éclairement maximum sur l'incorporation de la gln a été observé jusqu'à 8 m en station 2, jusqu'à 35 m en station 3, et 11 m en station 4. Il est également signalé par Flynn & Syrett (1986a) sur *P. tricornutum* ; ces auteurs ont montré que la diatomée carencée en lumière prélève l'azote organique dissous, mais cette activité est atténuée en présence d'éclairement. La station 3, pauvre en substances nutritives, présente ce phénomène de façon très accentuée : l'incorporation de la gln est diminuée de plus de la moitié à 10 et 17 m. Ceci confirme l'effet inhibiteur de la lumière sur l'incorporation de l'acide aminé, chez les cellules carencées en sels nutritifs (Flynn & Syrett, 1985, 1986a).

L'effet stimulateur de l'éclairement maximum sur l'incorporation de gln apparaît à des degrés variables sur les échantillons prélevés aux profondeurs supérieures à 15 m, aux stations 2 et 4. Bien que les dinoflagellés ne soient pas majoritaires dans les populations algales, ces résultats rappellent la stimulation de la pinocytose en présence d'intensités lumineuses croissantes mesurée au cours des expériences en laboratoire avec *K. mikimotoi* préalablement carencé en lumière (Figure 11), et ceux de Nygaard & Tobiesen (1993) avec *Prymnesium parvum* et *Chrysochromulina ericina*. En station 4 les populations algales sont formées à 93 % de nanoplancton, très hétérotrophe, et sont accompagnées de ciliés dont le broutage est stimulé par l'intensité lumineuse (Strom, 2001). Dans ces deux cas l'éclairement est donc le facteur limitant l'hétérotrophie aux niveaux peu éclairés. Ce mode nutritionnel compense les carences nutritives en azote et phosphore (Legrand, 2001) chez les dinoflagellés et le nanoplancton.

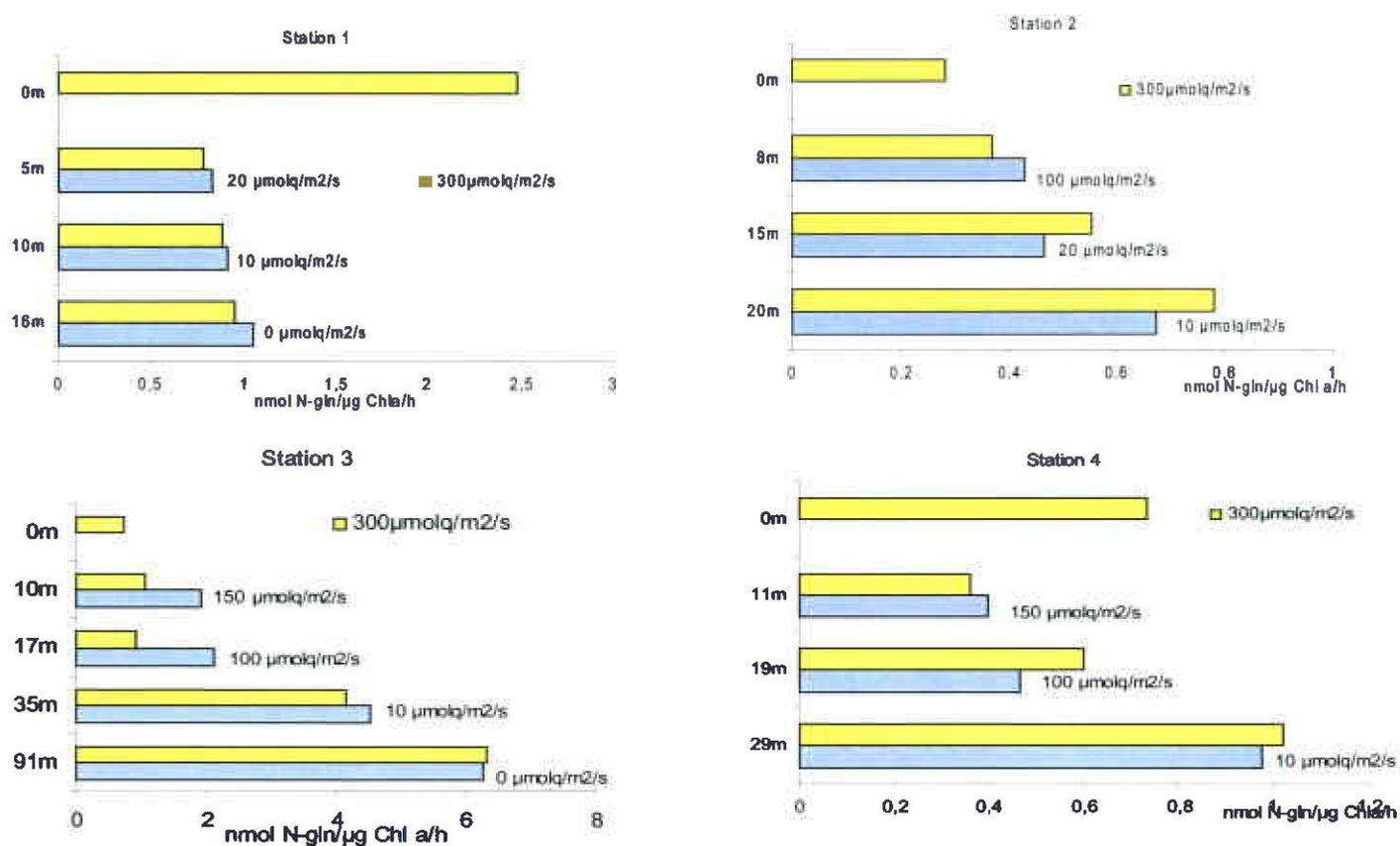


Figure 19. Vitesses d'incorporation de gln mesurées en lumière réelle simulée et lumière maximum ($300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sur les prélèvements de différentes profondeurs.

Conclusion

Les expériences menées en laboratoire et *in situ* ont montré les points suivants :

Les dinoflagellés *Karenia mikimotoi* et *Gymnodinium chlorophorum*, ainsi que la diatomée *Nitzschia* sp., peuvent pousser avec la gln comme substrat azoté. Les taux de croissance peuvent atteindre ceux obtenus en milieu constitué de sels nutritifs (*G. chlorophorum*), cependant la diatomée paraît moins apte que les dinoflagellés à tirer profit de ce substrat nutritif organique.

Bien que les concentrations en sels nutritifs n'aient pas été mesurées pour vérifier l'importance de la minéralisation bactérienne (production de NO_3 , NH_4), les contrôles d'incorporation de l'acide aminé gln ont permis de vérifier que les cellules phytoplanctoniques incorporent la molécule organique.

L'incorporation de la gln est maximale en phase pré-exponentielle.

Les constantes V_{max} sont 100 fois plus élevées chez les dinoflagellés que chez la diatomée, l'une des raisons peut être la surface d'enveloppe cellulaire plus grande chez les premiers. Les concentrations à K_s sont 20 fois plus élevées chez les dinoflagellés que chez la diatomée, ce qui montre une meilleure adaptation des dinoflagellés pour utiliser les milieux contenant des substances organiques.

Les conditions de culture jouent un rôle primordial dans la vitesse d'incorporation de la gln, puisque les algues carencées en azote inorganique et habituées à des concentrations élevées en gln, présentent une vitesse d'incorporation dix fois plus élevée qu'en culture avec sels nutritifs.

L'intensité lumineuse n'a pas d'effet sur la vitesse d'incorporation de la gln par *K. mikimotoi* cultivé à la lumière. En revanche, l'algue carencée en lumière présente une vitesse d'incorporation plus faible lorsqu'elle est soumise à une intensité lumineuse élevée, tandis qu'en présence de particules bactériennes, elle les incorpore par pinocytose et celle-ci est stimulée par la lumière.

Plusieurs mécanismes distincts sont donc impliqués dans l'incorporation des substances organiques dissoutes ou particulaires par *K. mikimotoi*, selon le conditionnement préalable de l'algue.

L'interférence de l'hétérotrophie bactérienne sur la mesure de l'incorporation de la gln par les algues est négligeable ($1 \text{ fmol cell-phytoplancton}^{-1} \text{ h}^{-1}$), inférieure aux variations expérimentales calculées pour les vitesses d'incorporation algales. Elle peut donc être négligée. De plus, la présence de bactéries permet de reproduire les conditions naturelles en respectant la compétition entre les bactéries et le phytoplancton pour l'utilisation des substances organiques.

L'incorporation de la gln par les différentes classes de taille des populations naturelles présente les mêmes caractéristiques que celles obtenues chez les cultures en laboratoire : effet de l'éclairement négligeable chez *G. chlorophorum* quand non carencé en lumière, valeurs de K_s identiques chez *G. chlorophorum*, valeurs élevées chez la fraction bactérienne.

L'incorporation de la gln par les populations naturelles en mer stratifiée dépend des conditions de développement des cellules :

L'éclairement freine l'hétérotrophie sur les substances dissoutes (osmo-hétérotrophie), et inversement semble favoriser l'hétérotrophie sur la phase particulaire (phago-hétérotrophie) chez certains organismes (dinoflagellés, ciliés), lorsque les cellules sont carencées en substances nutritives.

Les teneurs élevées en substances organiques dissoutes dans le milieu favorisent l'incorporation de la gln par les cellules algales, ce qui montre leur adaptation physiologique pour une utilisation optimale de leur environnement.

Les conditions en surface sont proches des conditions optimales d'activité hétérotrophe.

Importance de l'hétérotrophie

L'hétérotrophie du phytoplancton est étudiée depuis de nombreuses années en laboratoire et *in situ*, et les travaux publiés (Wheeler *et al.*, 1974 ; Hellebust & Lewin, 1977 ; Bonin & Maestrini, 1981 ; Graneli *et al.*, 1997, 1999 ; Dennet *et al.*, 2001) montrent que ce mode de nutrition est répandu chez de nombreuses espèces (Tableaux 7 - 8). Des adaptations technologiques ont permis de mieux comprendre et étudier ce mode nutritionnel, et laissent penser qu'il est potentiellement actif chez la plupart des cellules phytoplanctoniques (Jochem, 1999 ; Summons & Osmond, 1981) Néanmoins les conditions environnementales sont déterminantes pour que son utilisation par les cellules soit détectable, et il est parfois difficile de distinguer les deux modes de nutrition : autotrophie et hétérotrophie comme l'ont souligné Jakobsen *et al.* (2000), lorsque les brouteurs hétérotrophes incorporent les chloroplastes de leurs proies pour bénéficier de leur capacité autotrophe.

L'hétérotrophie constitue un mode de nutrition complémentaire chez les organismes phytoplanctoniques, pour suppléer à une carence : lumière, substrat nutritif. Ainsi, le glucose et le glycérol peuvent être utilisés comme source de carbone par les dinoflagellés et les diatomées (Tamminen, 1984 ; Ceron *et al.*, 2000), le glycérophosphate comme source de phosphore (Sohet *et al.*, 1995), tandis que l'urée et certains acides aminés sont utilisables par l'ensemble des groupes floristiques pour suppléer à la carence en azote inorganique (Chang & Page, 1995 ; Antia *et al.*, 1991).

Si le transport intracellulaire des acides aminés semble couplé à la présence d'azote inorganique (Baden & Mende, 1979) leur utilisation par la cellule pour la synthèse protéique nécessite l'énergie lumineuse. Cependant il n'y a pas de couplage avec la photosynthèse comme l'ont montré Flynn & Syrett (1985): le DCMU inhibe la photosynthèse mais pas l'incorporation d'acide aminé. L'assimilation hétérotrophe (incorporation et utilisation) est réalisable non seulement en conditions de déficience mais également en conditions favorisant l'autotrophie.

La phagotrophie constitue une stratégie nutritionnelle connue chez les ciliés, mais également chez les dinoflagellés, comme source de carbone selon Skovgaard (2000) et Li *et al.*, 1993, ou pour compenser une carence en phosphore (Nygaard & Tobiesen, 1993 ; Legrand, 2001). Dans notre expérience d'incorporation des particules bactériennes en présence de 500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cette source nutritive produit un apport en azote particulaire de 2,2 pmole N $\text{cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ chez *K. mikimotoi* cultivé à l'obscurité. Comparé à l'incorporation de N-dissous dans

les mêmes conditions : $0.04 \text{ pmol N cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (figure 11) il apparaît que l'osmotrophie est masquée par la phagotrophie (pinocytose dans notre étude). Il est vraisemblable que ce phénomène soit toujours potentiellement présent dans l'environnement chez certains organismes phytoplanctoniques (dinoflagellés), et l'incorporation mesurée correspondrait partiellement à la phagotrophie.

Les constantes physiologiques (V_{\max} , K_s) permettent de comparer les caractéristiques spécifiques et la capacité adaptative des espèces dans différentes conditions. Le prélèvement des substances organiques par le phytoplancton répondrait plus à un complément énergétique (N, P) qu'à une source de carbone (Bonin & Maestrini, 1981).

L'activité hétérotrophe phytoplanctonique dans l'écosystème des producteurs primaires (qui peuvent ainsi devenir producteurs secondaires) est donc à prendre en compte même si, comme l'ont démontré Flynn & Syrett (1986b) et Nakamura *et al.* (1995) l'assimilation des acides aminés constitue rarement un apport azoté suffisant, comparé à l'ammonium par exemple, pour permettre à elle seule la multiplication cellulaire. Cependant, nos résultats de laboratoire ont montré que *Gymnodinium chlorophorum* cultivé en présence de gln et sans apport d'azote inorganique présente un taux de croissance égal à celui obtenu en culture témoin (milieu enrichi en sels nutritifs), et la densité cellulaire finale est de 25 % supérieure à celle de la culture témoin.

Les valeurs de K_s obtenues chez les populations naturelles sont compatibles avec une utilisation des acides aminés du milieu. Les concentrations en AA en milieux similaires publiées par ailleurs (Williams & Poulet, 1986), se montrent limitantes dans la plupart des cas, ce qui pourrait également résulter d'une incorporation active de ces substances.

Conséquence de l'hétérotrophie sur l'environnement

La chaîne trophique :

Selon Vrede *et al.* (1999) l'hétérotrophie entraîne une interdépendance entre phyto et bactérioplancton (cellules $0,2\text{-}3 \mu\text{m}$) : ce dernier utilisant les excréments de l'autre, ou les deux entrant en compétition pour l'incorporation des substances organiques.

La physiologie des algues :

Ces adaptations à la présence de substances disponibles et aux conditions physiques environnementales révèlent des modifications métaboliques telles que nouvel équipement enzymatique et modifications pigmentaires (Skovgaard, 2000 ; Nygaard & Tobiensen, 1993 ; John & Flynn, 1999 ; Lewitus *et al.*, 1991 ; Serrano *et al.*, 1991 ; Descolas-Gros & Oriol, 1992). Les cellules phytoplanctoniques peuvent ainsi maintenir une activité métabolique suffisante, pour démarer la division cellulaire dès que les conditions environnementales deviennent favorables : transport vers les zones photiques, présence de substances assimilables abondantes. Cette situation rencontrée dans les zones frontales et les zones d'accumulations expliquerait la formation d'efflorescences telles que celles rencontrées en mer d'Iroise (Pingree *et al.*, 198 ; Arzul *et al.*, 1993), ou dans les zones très eutrophisées à forte productivité (Cogné & Barillé, 1999 ; Maestrini *et al.*, 1999) ou à faible turn-over (Townsend & Thomas, 2002).

L'incorporation de l'azote inorganique par les cellules algales varie selon les espèces, leur condition physiologique et le milieu. Les vitesses calculées par Dixon et Holligan (1989) avec des populations naturelles : $0,07 \text{ pmol N-NO}_3$ et $0,1 \text{ pmol N-NH}_4 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ peuvent atteindre

jusqu'à $0,5 \text{ pmoleN cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en cas d'apport élevé en azote inorganique. Ces valeurs sont peu différentes de la vitesse d'incorporation de la gln que nous avons obtenues chez la diatomée *Nitzschia* sp., mais 100 fois plus faibles que celles obtenues chez les dinoflagellés (tableau 3).

L'hétérotrophie semble limitée tant par les concentrations et la nature des substances organiques disponibles que par l'aptitude physiologique des cellules à s'adapter aux ressources nutritives disponibles (Flynn & Butler, 1986). En effet, les travaux de Yamaguchi & Itakura (1999) ont montré que l'utilisation de la glutamine est plus profitable à la production chlorophyllienne de *Gymnodinium mikimotoi*, que l'ensemble des autres AA, tandis que Baden & Mende (1979) ont montré l'incorporation plus active de la glycine par *Gymnodinium breve*. Cependant, l'ensemble des travaux publiés montrent que l'ornithine, provenant de la décomposition de la proline, est le mieux représenté (Williams & Poulet, 1986 ; Flynn & Butler, 1986)

L'impact de certaines substances organiques sur la physiologie des cellules algales

L'ajout aux cultures algales, d'antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique pour éliminer les bactéries associées, empêche la division cellulaire chez algues. Ceci montre une similitude des sites récepteurs au niveau des membranes chez les bactéries hétérotrophes et les cellules algales (Iturriaga & Zsolnay, 1981).

L'activité métabolique particulièrement active au moment des premières divisions cellulaires coïncide avec l'incorporation maximale de gln : ce phénomène est observé également sur certaines molécules connues pour leur rôle de précurseurs de division cellulaire telles les polyamines, provenant de la décarboxylation de l'arginine et de l'ornithine (Hourmant *et al.*, 1994 ; Gentien, 1998 ; Legrand *et al.*, 2001). L'action des biocides apportés dans le milieu par les activités anthropiques, sur les populations phytoplanctoniques est accrue en phase initiale d'efflorescence (Arzul *et al.*, en préparation), et ceci pourrait être aussi la conséquence d'une incorporation plus active par les algues.

Tableau 7. Liste non exhaustive des espèces hétérotrophes étudiées.

Espèces	Auteurs
<i>Alexandrium fundyense</i> (dinophyceae)	John & Flynn, 1999
<i>Amphora coffeaformis</i> (diatomeae)	Clarkson & Evans, 1993
<i>Chlamidomonas humicola</i> (chlorophyceae)	Laliberté & de la Noüe, 1993
<i>Chlorella fusca</i> (Chlorococcale)	Richards & Thurston, 1980*
<i>C. autotrophica</i> , <i>C. saccharophila</i>	Laliberté & Hellebust, 1990
<i>C. vulgaris</i>	Cho <i>et al.</i> , 1981*
<i>Chrysochromulina polylepis</i> (Nygaard & Tobiesen, 1993
<i>Cyclotella cryptica</i>	Liu & Hellebust, 1974a*
<i>Dinophysis</i> spp (dinophyceae)	Granéli <i>et al.</i> , 1997
<i>Fragilidium subglobosum</i> (dinophyceae)	Hansen & Nielsen, 1997
<i>Gyrodinium aureolum</i> (dinophyceae)	Dixon & Holligan, 1989
<i>G. dominans</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
<i>G. fissum</i>	Tamminen <i>et al.</i> , 1984
<i>G. galatheanum</i>	Li <i>et al.</i> , 2000
<i>G. resplendens</i>	Skovgaard, 2000
<i>Gymnodinium breve</i> (dinophyceae)	Baden & Mende, 1979
<i>G. mikimotoi</i>	Yamagushi & Itakura, 1999
<i>Heterocapsa trichetra</i>	Legrand <i>et al.</i> , 1998b
<i>Heterosigma carterae</i> (raphidophyceae)	Chang & Page, 1995
<i>Melosira nummumoides</i> (diatomeae)	Hellebust & Guillard, 1967*, McLean <i>et al.</i> , 1981*
<i>Navicula pavillardii</i> (diatomeae)	Lewin & Hellebust, 1975*
<i>Nitzschia angularis</i> (diatomeae)	Lewin & Hellebust, 1976*
<i>N. laevis</i>	Lewin & Hellebust, 1978*
<i>N. ovalis</i>	North & Stephens, 1972*
<i>Ochromonas</i> sp. (chrysophycée)	Rothhaupt, 1996
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (diatomeae)	Flynn & Syrett, 1986a*
<i>Platimonas subcordiformis</i>	North & Stephens, 1967*
<i>Prorocentrum micans</i>	Tamminen <i>et al.</i> , 1984
<i>Prymnesium parvum</i>	Nygaard & Tobiesen, 1993
<i>Pyremonas salina</i> (chrytophycée)	Lewitus <i>et al.</i> , 1991

*dans Flynn & Butler, 1986.

Tableau 8. Mesures complémentaires réalisées dans le cadre de ce projet. Conditions : 100 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 18 °C.

<i>Alexandrium minutum</i>				
	μM N-gln entraîneur		Vmax pmol N-gln/cell/h	Ks μM N-gln
	5	44		
	pmol N-gln/cell/h			
Carencé N	0.02			
F/40	0.07	0.17	0.20	10.45
44 μM N-gln		4.42		
<i>Alexandrium catenella</i>				
	μM N-gln entraîneur		Vmax pmol N-gln/cell/h	Ks μM N-gln
	5	44		
	pmol N-gln/cell/h			
Carencé N	0.23			
F/40	0.43	0.88	0.84	3.10
44 μM N-gln		48.32		
<i>Heterosigma akashiwo</i>				
	μM N-gln entraîneur		Vmax pmol N-gln/cell/h	Ks μM N-gln
	5	44		
	pmol N-gln/cell/h			
Carencé N	0.37			
F/40	2.22	3.18	3.35	1.72
44 μM N-gln		21.30		
<i>Heterocapsa triquetra</i>				
	μM N-gln entraîneur		Vmax pmol N-gln/cell/h	Ks μM N-gln
	5	44		
	pmol N-gln/cell/h			
Carencé N	0.26	0.60	0.22	8.54
F/40	0.07	0.13	0.59	2.61
44 μM N-gln		38.47		
<i>Scripsiella sp.</i>				
	μM N-gln entraîneur		Vmax pmol N-gln/cell/h	Ks μM N-gln
	5	44		
	pmol N-gln/cell/h			
Carencé N	0.10	0.23	0.34	12.13
F/40	0.05	0.14	0.17	12.43
44 μM N-gln		3.16		

Remerciements

Les auteurs remercient les personnes ayant contribué à ce travail par leur soutien technique, leurs conseils, ou la fourniture de données :

C. Legrand (Dept. of Biology and Environmental Science, Université, Kalmar, Suède)
 P. Camus et R. Gabellec (DEL/MPL-La Trinité)
 M. Pommepuy, D. Herviot, M. Gourmelon, M.P. Caprais (DEL-MP, Plouzané)
 R. Kerouel, A. Aminot, D. Vincent et M. Lunven (DEL-EC, Plouzané)
 G. Mével (Station Biologique de Roscoff)

Références

- Antia N. J., Harrison P.J., Oliveira L., 1991. Phycological reviews 2 : The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia*, 30 (1), 1-89.
- Arzul G., Erard-Le Denn E., Videau C., Jegou A.M., Gentien P., 1993. Diatom growth repressing factors during an offshore bloom of *Gyrodinium cf. aureolum*. in " Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea" , Smayda T.J. & Y. Shimizu , Eds, Elsevier, pp 719-724
- Ayo B., Unanue M., Azua I., Gorsky G., Turley C., Iriberry J., 2001. Kinetics of glucose and amino acid uptake by attached and free-living marine bacteria in oligotrophic waters. *Marine Biology*, 138, 1071-1076.
- Baden D. G., Mende T.J., 1979. Amino acid utilization by *Gymnodinium breve*. *Phytochemistry*, 18, 247-251.
- Bodennec G., Gentien P., Parrish C.C., Arzul G., Crassous M.-P., 2000. Lipid class and fatty acid compositions of toxic *Gymnodinium* and *Heterosigma* strains: haemolytic and signature compounds. In: *Marine Lipids*. Baudimant G. *et al.* (eds), Ed. Ifremer, Actes colloq., 27, 66-74.
- Bonin D.J., Maestrini S.Y., 1981. Importance of organic nutrients for phytoplankton growth in natural environments : Implications for algal species succession. *Canadian Bulletin of Fisheries* 210, 279-291.
- Ceron Garcia M.C., Fernandez Sevilla J.M., Acien Frenandez F.G., Molina Grima E., Garcia Camacho F., 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol : growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology* 12, 239-248.
- Chang F.H., Page M., 1995. Influence of light and three nitrogen sources on growth of *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 29, 299-304.
- Clarkson N., Evans L.V., 1993. Evaluation of a potential non-leaching biocide using the marine antifouling diatom *Amphora coffeaformis*. *Biofouling*, 7 (3), 187-195.

- Cognie B., Barillé L., 1999. Does bivalve mucus favor the growth of their main food source, microalgae ? *Oceanol. Acta*, 22(4), 441-450.1999
- Dennett M.R., Mathot S., Caron D.A., Smith W.O.Jr, Lonsdale D.J., 2001. Abundance and distribution of phototrophic and heterotrophic nano- and microplankton in the southern Ross Sea. *Deep Sea Research*, special issue Part II, 48 (19-20), 4019-4037.
- Descolas-Gros C., Auriol L., 1992. Variation in carboxylase activity in marine phytoplankton cultures. Beta carboxylation in carbon flux studies. *Marine Ecology Progress series*. 85 (1-2), 163-169.
- Dixon G.K., Holligan P.M., 1989. Studies on the growth and nitrogen assimilation of the bloom dinoflagellate *Gymnodinium aureolum* Hulburt. *Journal of plankton research* 11 (1), 105-118.
- Erard-Le Denn E., Morlaix M., Dao J.-C., 1990. Effects of *Gyrodinium cf. aureolum* on *Pecten maximus*. In: *Toxic Marine Phytoplankton*. Granéli E. *et al.* (eds), Elsevier, New York, 132-136.
- Flynn K.J., Syrett P.J., 1985. Development of the ability to take up L-lysine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.* 89, 317-325.
- Flynn K.J., Syrett P.J., 1986a. Characteristics of the uptake system for L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biology* 90, 151-158.
- Flynn K.J., Syrett P.J., 1986b. Utilization of L-lysine and L-arginine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biology* 90, 159-163.
- Flynn K.J., Butler I., 1986. Nitrogen sources for the growth of microalgae : role of dissolved free aminoacids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 34, 281-304.
- Gentien P., 1998. Bloom Dynamics and Ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* Species Complex. In : Anderson D., Cembella A. and Hallegraeff G. (eds). *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO Series, 41, 155-173.
- Gentien P., Arzul G., 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium cf. aureolum* (Dinophyceae). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*70, 571-581.
- Granéli E., Anderson D.M., Carlsson P., Maestrini S.Y., 1997. Light and dark carbon uptake by *Dinophysis* in comparison with other photosynthetic and heterotrophic dinoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology*, 13 (2), 177-186.
- Granéli E., Carlsson P., Legrand C., 1999. The role of C, N and P in dissolved and particulate organic matter as a nutrient source for phytoplankton growth, including toxic species. *Aquatic ecology*, 33(1), 17-27.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Clev). *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Hansen P.J., Nielsen T.G., 1997. Mixotrophic feeding of *Fragilidium subglobosum* (dinophyceae) on three species of *Ceratium* : effects of prey concentration, prey species and light intensity. *Marine Ecology Progress Series*, 147 (1-3), 187-196.

Hellebust J.A., Lewin J., 1977. Heterotrophic nutrition. In : The biology of diatoms. Werner (ed). Blackwell Publ., Oxford, 13, 169-197.

Honjo T., 1994. The biology and prediction of representative red tides associated with fish kills in Japan. *Revue of Fisheries Sciences*, 2(3), 225-253.

Hourmant A., Mereau N., Penot M., Cann C., Caroff J., 1994. Influence of polyamines on growth and metabolism of *Dunaliella primolecta* *Acta Botanica Neerl.*, 43, 129-136.

Iturriaga R., Zsolnay A., 1981. Differentiation between auto- and heterotrophy activity : problems in the use of size fractionation and antibiotics. *Botanica Marina*, 24, 399-401.

Jakobsen H.H., Hansen P.J., Larsen J., 2000. Growth and grazing response of two chloroplast retaining dinoflagellates : effect of irradiance and prey species. *Marine Ecology Progress series*, 201, 121-128.

John E.H., Flynn K.J., 1999. Aminoacid uptake by the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Mar. Biol.* 133 (1), 11-19.

Jochem F.J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed with cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Marine biology*, 135, 721-728.

Laliberté G. & Hellebust J.A., 1990. Arginine utilization by *Chlorella autotrophica* and *Chlorella saccharophila*. *Physiologia plantarum* 79, 57-64.

Laliberté G., de la Noüe J., 1993. Auto-, hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamidomonas humicola* (chlorophyceae) on acetate. *Journal of phycology*, 29, 612-620

Legrand C., 2001. Phagotrophy and toxicity variation in the mixotrophic *Prymnesium patelliferum* (Haptophyceae). *Limnology and Oceanography*, 46 (5), 1208-1214.

Legrand C., Johnsen G., Granéli E., Sakshaug E., 2001. Effect of polyamines on growth and toxicity of *Chrysochromulina leadbeateri* (haptophyte). *Harmful Algal Blooms 2000*. Hallegraeff G.M., Blackburn S., Bolch C.J., Lewis R. (eds). IOC of UNESCO, 332-335.

Legrand C., Carlsson P., 1998a. Uptake of high molecular weight dextran by the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquatic Microbial Ecology*, 16 (1), 81-86.

Legrand C., Granéli E., Carlsson P., 1998b. Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Aquatic Microbial Ecology*, 15 (1), 65-75.

Lewitus A.J., Caron D.A., Miller K.R., 1991. Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyremonas salina* (chrytophyceae). *Journal of Phycology*, 27 (5), 578-587.

Li A., Stoecker D.K., Coats D.W., 2000. Mixotrophy in *Gymnodinium galatheanum* (Dinophyceae) : grazing responses to light intensity and inorganic nutrients. *Journal of Phycology* 36, 33-45.

- Lomas M.W., Glibert P.M., 1999. Interactions between NH_4^+ and NO_3^- uptake and assimilation : comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures. *Marine Biology* 133, 541-551.
- Lunven M., Gentien P., Clément A., Arzul G., 2002. Particle populations around fishfarms. In : *Aquaculture, environment and marine phytoplankton*. Brest, 21-23 May 2001. Ed. Ifremer, Actes Colloq, 34, 41-56.
- Lunven M., Gentien P., Kononen K., Le Gall E., Danielou M.M., . In situ video and diffraction analysis of marine particles. *Estuarine coastal shelf. Research* (submitted).
- Maestrini S.Y., Balode M., Bechemin C., Purina I., 1999. Nitrogenous organic substances as potential nitrogen sources , for summer phytoplankton in the Gulf of Riga, eastern Baltic Sea. *Plankton Biology and Ecology*, 46 (1), 8-17.
- Malinsky-Rushanski N.Z., Legrand C., 1996. Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Marine Ecology Progress series*, 132, 249-255.
- Murphy A.M., Cowles T.J., 1997. Effects of darkness on multi-excitation *in vivo* fluorescence and survival in a marine diatom. *Limnology and Oceanography*, 42 (6), 1444-1453.
- Nakamura Y., Suzuki S.-Y., Hiromi I., 1995. Growth and grazing of a naked heterotrophic dinoflagellate, *Gyrodinium dominans*. *Aquatic Microbial Ecology*, 9 (2), 157-164.
- Naviner M., Berge J.P., Durand P., Le Bris H., 1999. Antibacterial activity of the marine diatom against aquacultural pathogen. *Aquaculture*, 174 (1-2), 15-24.
- North B.B., 1975. Primary amines in California costal waters: Utilization by phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 20, 20-27.
- Nygaard K., Tobiensen A., 1993. Bacterivory in algae : a survival strategy during nutrient limitation. *Limnology and Oceanography*, 38 (2), 273-279.
- Packard T.T., Dortch Q., 1975. Particulate protein-Nitrogen in North Atlantic Surface Waters *Marine Biology* 33, 347-354 .
- Parrish C.C., Bodennec G., Gentien P., 1998. Haemolytic glycolipids from *Gymnodinium* species. *Phytochemistry*, 47, 783-787.
- Pingree R.D., Pugh P.R., Holligan P.M., Forster G.R., 1980. Summer phytoplankton blooms and red tides along tidal fronts in the approaches of the English Channel. *Nature*, 258, 672-677.
- Porter K.G., Feig Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25, 943-948.
- Rines J.E., Donaghay P.L., Deksheniaks M.M., Sullivan J.M., Twardowski M.S., 2002. Thin layers and camouflage : hidden *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) populations in a

fjord in the San Juan Islands, Washington, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 225, 123-137.

Rodriguez G.G., Phipps D., Ishiguro K., 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 1801-1808.

Rogerson A., Hannah J.F., Wilson P.C., 1993. *Nitzschia albicostalis* : an apochloritic diatom worthy of ecological consideration. *Cah. Biol. Mar.*, 34 (4), 513-522.

Rothhaupt K.O., 1996. Utilization of substitutable carbon and phosphorus sources by the mixotrophic chrysophyte + sp.. *Ecology*, 77 (3), 706-715)

Serrano A., Mateos M.I., Losada M., 1991. Differential regulation by trophic conditions of phosphorylating and non-phosphorylating NADPH+-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in *Chlorella fusca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181 (3), 1077-1083.

Skovgaard A., 2000. A phagotrophically derivable growth factor in the plastidic dinoflagellate *Gymnodinium resplendens* (dinophyceae). *J. Phycol.*, 36, 1069-1078.

Sohet K., Pereira A., Braekman J.C., Houvenagel G., 1995. Growth and toxicity of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge in different culture media: Effect of humic acids and organic phosphorus. In : Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (eds.). *International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Nantes (France), Oct Lavoisier Paris (France)*, 669-674.

Strom S.L., 2001. Light-aided digestion, grazing and growth in herbivorous protists. *Aquatic Microbial Ecology*, 23 (3), 253-261

Sukuto, T. Sakata, 1996. Effect of Co-existent bacteria on the growth of *Chattonella marina* in non-axenic culture. *Fisheries Science* 62 (2), 210-214.

Serrano et al., 1991

Summons R.E., Osmond C.B., 1981. Nitrogen assimilation in the symbiotic marine alga *Gymnodinium microadriaticum* : direct analysis of ¹⁵N incorporation by GC-MS methods. *Phytochemistry*, 20 (4), 575-578.

Tamminen T., Kaitala S., Iliash L.V., 1984. The heterotrophic glucose uptake potential of three marine dinoflagellates. *Publications of the Water Research Institute, National Board of Waters, Finland*, 56, 21-25.

Townsend D.W., Thomas M., 2002. Springtime nutrient and phytoplankton dynamics on Geoges Bank. *Marine Ecology Progress series*, 226, 57-74.

Underfriend S., S. Stein, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigle. A reagent for assay of aminoacids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science*, 178, 871-872 (1972).

Vrede K., Vrede T., Isaksson A., Karlsson A., 1999. Effects of nutrients (phosphorus, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton- a seasonal study. *Limnology and Oceanography*, 44 (7), 1616-1624.

Wheeler P.A., North B.B., Stephens G.C., 1974. Amino acid uptake by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 19 (2), 249-259.

Williams R., Poulet S.A., 1986. Relationship between the zooplankton, phytoplankton, particulate matter and dissolved free amino acids in the Celtic Sea. *Marine Biology*, 90, 279-284.

Yamagushi M., Itakura S., 1999. Nutrition and growth kinetics in nitrogen or phosphorus-limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fisheries Sci.*, 65, 367-373.

Yasumoto T., Underdal B., Aune T., Hormazabal V., Skulberg O.M., Oshima Y., 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. In: *Toxic Marine Phytoplankton*, (Ed. by E. Graneli *et al.*) pp.436-440 Elsevier Science Publishing, New York.

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