

30248
Laboratoire de Biologie Cellulaire Végétale
Université Paris VII
2 place Jussieu
75005 PARIS

E110-PUI-E

CELO1136

Contrat CNEXO (IFREMER)

n° 84/3179

Essais de mise en culture et étude de la
toxicité du Dinoflagellé *Dinophysis acuminata*

Responsable scientifique : Pr S. PUISEUX - DAO

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENT
LITTORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

Monique DURAND

9 août 1985

F21

Laboratoire de Biologie Cellulaire Végétale
Université Paris VII
2 place Jussieu
75005 PARIS

Contrat CNEXO (IFREMER)

n° 84/3179

Essais de mise en culture et étude de la
toxicité du Dinoflagellé *Dinophysis acuminata*

Responsable scientifique : Pr S. PUISEUX - DAO

Monique DURAND

9 août 1985

PLAN

INTRODUCTION	1
I - MODALITES DE RECOLTE	2
A - Mode de prélèvement des échantillons d'eau in situ	2
B - Contrôle de la présence de <i>Dinophysis acuminata</i> lors des prélèvements	3
C - Transport des échantillons	3
II - MODALITES DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS D'EAU DE MER	3
III - ISOLEMENT DES CELLULES DE <i>DINOPHYSIS ACUMINATA</i> SOUS LA LOUPE	4
IV - TRAITEMENT DES DONNEES HYDROLOGIQUES 1983	5
V - ESSAIS DE MISE EN CULTURE DE <i>DINOPHYSIS ACUMINATA</i>	6
A - Effets de divers facteurs externes de l'environnement	7
A.1 - Température	7
A.2 - Eclairage	7
A.3 - Agitation	8
A.4 - Forme des récipients de culture	8
B - Essais de divers milieux de culture	8
B.1 - Milieux liquides	8
B.2 - Milieux solides	9
C - Résultats	9
D - Notes concernant la physiologie de <i>Dinophysis acuminata</i>	11
VI - MISE EN CULTURE D'AUTRES ESPECES PHYTOPLANCTONIQUES	11
VII - CONTROLE DE LA NON-TOXICITE DE <i>PROROCENTRUM</i>	12
VIII - ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DE L'ULTRASTRUCTURE DE <i>DINOPHYSIS ACUMINATA</i>	13

A - Aspects en microscopie électronique	13
A.1 - Microscopie à balayage	13
A.2 - Microscopie à transmission	14
B - Aspects en microscopie optique	15

CONCLUSION

INTRODUCTION

Dans la mesure où les efflorescences de *Dinophysis acuminata* dans les eaux ont été de faible ampleur pendant l'été 1984* nous n'avons pu disposer de grande quantité de matériel vivant pour les essais de mise en culture de ce Dinoflagellé, responsable présumé des problèmes de D.S.P. (Diarrhetic-Shellfish-Poisoning) en France.

Ce rapport présente :

- des résultats obtenus au cours des essais de mise en culture au laboratoire
- un ensemble de recommandations visant à résoudre certains problèmes pratiques concernant la récolte et la conservation des échantillons
- un ensemble de documents photographiques réalisés à partir de matériel fixé afin d'illustrer certaines préoccupations taxonomiques
- quelques images de *Dinophysis acuminata* en microscopie électronique à transmission et à balayage.

Les travaux présentés reposent parfois sur un assez faible nombre d'observations, les résultats qui en sont issus gardent donc un caractère indicatif.

* I. TRUQUET, P. LASSUS, P. TRUQUET, P. MAGGI : influence de la température et de la salinité sur les perturbations phytoplanctoniques observées dans le Mor Bras en 1983 et 1984. Rapport IFREMER DERO 85.

I - MODALITES DE RECOLTE

A - Mode de prélèvement des échantillons in situ

Plusieurs techniques ont été utilisées :

- prélèvement d'eau de mer de surface dans des gros bidons (20 l)
- concentration du phytoplancton sur le bateau
 - par filtration sur filtre ou maille (diamètre de environ 10-15 cm) de 30 μ
 - par utilisation d'un filet à phytoplancton (maille de environ 20 μ).

Remarques

- . Bien équilibrer le filet à phytoplancton.
- . Ne pas prélever de matériel trop concentré ou sinon le diluer assez rapidement
 - avec de l'eau de mer "locale",
 - et/ou - avec de l'eau de mer préalablement stérilisée au laboratoire et additionnée de chloramphénicol à 10 mg/l. Cet antibiotique est sensible à la lumière ; stocker la solution-mère à l'obscurité et à 4°C. Dilution 1V/1V environ.
- . Essayer de conserver les fioles à la température de l'eau de mer, éviter de les stocker dans la glace (entraîne la mort des *Dinophysis acuminata*).
- . Ne pas trop remplir les fioles (au 3/4 maximum, nécessité d'air).
- . Faire des prélèvements, pour un site donné, à différentes profondeurs et heures de la journée afin d'essayer de déterminer les migrations nycthémérales du Dinoflagellé.

B - Contrôle de la présence de *Dinophysis acuminata* lors des prélèvements

Si on peut disposer d'une loupe, près de la zone de récolte, il est intéressant de vérifier la présence de *Dinophysis acuminata* dans les divers prélèvements. Pour cela, il suffit de filtrer 5 à 20 ml de prélèvement environ sur un Swinnex (diamètre : 5 cm par exemple). Les filtres (pores : 8 - 10 μ peuvent être placés dans un petit tube avec quelques gouttes d'eau de mer. Leur surface peut être observée à la loupe rapidement. On peut ajouter une goutte de lugol sur ces filtres. Ceci peut permettre une meilleure visualisation des espèces phytoplanktoniques. Nous avons obtenu une bonne corrélation entre ces observations rapides et des observations plus précises réalisées en laboratoire par la suite. Ce procédé permet de ne garder et diluer que les échantillons contenant du *Dinophysis*.

C - Transport des échantillons

Dinophysis acuminata semble être un Dinoflagellé assez fragile, il faut donc prendre des précautions quant à son transport : ne pas trop échauffer ou secouer les échantillons transportés. Nous avons pu observer un bon maintien des *Dinophysis* vivants transportés dans des bidons plastique de 20 l lors d'un voyage Paris-Le Havre (environ 3 h). Ceci malgré un manque de régulation thermique. Ce fait doit être moins évident pour des volumes plus petits et dans ce cas il doit être nécessaire d'essayer de maintenir la température aux alentours de 20°C.

II - MODALITES DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS D'EAU DE MER

Les meilleurs résultats de maintien des populations phytoplanktoniques, en particulier celles de *D. acuminata* ont été observées dans les cas suivants :

- échantillons maintenus dans des bidons de 20 l (bouchés à l'aide d'un bouchon en coton)

- échantillons maintenus dans des Erlenmeyers de 2 l avec dilution avec de l'eau de mer provenant du lieu de récolte et autoclavée après filtration. Une agitation très douce du milieu semble être un facteur favorable au maintien en vie de *D. acuminata* (oxygénation du milieu, limitation du développement des bactéries et des espèces phytoplanctoniques benthiques).
- dans des petites fioles en plastique opaque.

De toutes façons les échantillons doivent avoir été filtrés 50 μ (élimination du zooplancton de taille supérieure), additionnés de chloramphénicol (concentration finale 5 mg/l) et doivent être maintenus sous un éclairage assez faible.

III - ISOLEMENT DES CELLULES DE *DINOPHYSIS ACUMINATA* SOUS LA LOUPE

Nous avons vérifié que les *Dinophysis acuminata* résistaient à une centrifugation douce (environ 1 000 g) mais cette technique de concentration des cellules n'a pas pu être utilisée car les échantillons contenaient trop de phytoplancton.

Une centrifugation sera utile pour concentrer initialement des prélèvements d'eau de mer à l'occasion d'un bloom.

Les cellules ont été isolées sous loupe, à la micropipette et par aspiration (pipettes étirées à la flamme d'un bec Bunsen, l'orifice ne doit pas être trop étroit car les *Dinophysis acuminata* sont assez fragiles - diamètre de 100 μ environ).

A partir d'un échantillon d'eau de mer assez dilué, il faut compter environ 1 h pour isoler une à une 20 à 30 cellules. Les *Dinophysis* sont ensuite transférés dans un ou plusieurs bains successifs d'eau de mer stérile pour élimination progressive des autres organismes prélevés. On observe une perte de 20 à 40 % de la quantité de cellules vivantes du Dinoflagellé à chaque transfert.

Il convient de faire attention à l'échauffement du milieu d'isolement sous l'effet du rayonnement de la lampe et pour cela on peut intercaler sous la boîte de Pétri un filtre anticalorique ou une couche d'eau. Le grossissement de la loupe doit être suffisant (objectifs 50 - oculaires 20 par exemple) car il est facile de confondre *Dinophysis acuminata* avec d'autres organismes de taille et forme voisines (*Prorocentrum* et divers ciliés, ...).

IV - TRAITEMENT DE DONNEES HYDROLOGIQUES 1983 : RELATIONS ENTRE PARAMETRES HYDROLOGIQUES ET EFFLORESCENCE DE *DINOPHYSIS ACUMINATA*

Dans le cadre des essais de mise en culture de *D. acuminata* il nous a paru intéressant de constater l'existence ou l'absence de liaisons entre l'apparition ou le maintien des populations de ce Dinoflagellé et certains paramètres hydrologiques du milieu (température, salinité, sels nutritifs...).

La baie de Vilaine nous a semblé représenter un site adéquat pour ce type d'approche, dans la mesure où de nombreuses données ont été recueillies sur le terrain par l'IFREMER depuis 1983.

Le traitement de ces données a été réalisé en partie par le chargé d'étude de la Commission Baie de Vilaine* avec les moyens informatiques de l'IFREMER (Centre de Nantes).

Il nous a été possible de collaborer à l'analyse des résultats concernant *D. acuminata*. Ce travail, qui représente un chapitre du rapport "qualité des eaux du Mor Bras" est présenté en annexe.

Les principales conclusions tirées de cette analyse sont les suivantes :

- les conditions d'apparition et celles du maintien des populations de *D. acuminata* dans le milieu apparaissent très différentes

* J.C. CLEMENT (1985) : "Qualité des eaux du Mor-bras : résultats complémentaires issus des campagnes 1983". Cahiers du Mor-Bras n° 7. Avril 1985. Commission Baie de Vilaine.

- on peut définir un ensemble de conditions apparaissant favorables à l'apparition de *D. acuminata*, et caractérisées par des chocs thermiques et salins (voir détails dans pièce annexe)
- par contre il n'a pas été possible, compte tenu des méthodes d'échantillonnage utilisées, de définir des conditions de milieu favorables au maintien des populations ou susceptibles de favoriser la croissance du Dinoflagellé. Cette analyse n'a donc pas pu, malheureusement, déboucher sur des indications pratiques quant aux conditions de mise en culture.

V - ESSAI DE MISE EN CULTURE DE *DINOPHYSIS ACUMINATA*

Avec les échantillons dont nous disposions, contenant peu de *Dinophysis* et beaucoup d'autres éléments du phyto- et zoo-plancton, nous avons essayé de faire varier divers facteurs physico-chimiques de l'environnement. Ces expériences n'ont pas permis d'obtenir des cultures de *Dinophysis acuminata* (étude commencée trop tardivement par rapport à l'apparition de ce Dinoflagellé dans le milieu naturel ; problème d'installation d'une serre thermostatée à 16°C ; complexité des besoins nutritifs de l'algue ; faible quantité de matériel dont nous disposions).

Néanmoins l'ensemble des essais et observations réalisés ont abouti à une meilleure connaissance de ce matériel. Cet acquis facilitera largement des recherches futures dès que le Dinoflagellé sera à nouveau présent dans le milieu naturel.

Les différents facteurs testés ont essentiellement agi sur les conditions de conservation du *Dinophysis*, notamment son temps de survie et son état physiologique (mobilité, pigmentation). Leurs optimums correspondront certainement à des conditions favorables de développement de cette algue ainsi qu'à sa division (mitoses que nous avons pu obtenir au laboratoire dans quelques cas).

Les essais ont été réalisés de deux façons :

- par isolement à la micropipette de cellules de *Dinophysis* (voire page précédente) et transfert dans les différents milieux testés
- par adjonction, dans les milieux à tester, de quantités aliquotes du prélèvement de base contenant des *Dinophysis* puis observation et comparaison de l'évolution des populations.

A - Effets de divers facteurs externes de l'environnement

A.1 - Température

La serre dont nous disposions en juillet-août était thermostatée à 20°-22°C. L'analyse de la bibliographie nous avait conduit à penser que la température optimale pour la mise en culture du *Dinophysis* devait être de 16°-18°C. L'aménagement d'une serre ainsi régulée a été commandé dès l'obtention des crédits du contrat, mais les délais de livraison, compte tenu des vacances ont été de plus de deux mois. L'installation est donc intervenue trop tard.

Les *Dinophysis* ne résistent ni à 4°C (chambre froide), ni à 25°C. Des échantillons d'eau de mer placés à 18°-20°C ont permis un maintien des cellules du Dinoflagellé pendant un temps plus long que d'autres placées à 20°-22°C.

Il nous semble donc que le facteur limitant dans notre étude a été la température. *Dinophysis acuminata* doit certainement, pour son adaptation à des conditions de culture unalgale en laboratoire, être maintenu à moins de 20°C.

A.2 - Eclairement

L'ensemble des observations a montré que les exigences en énergie lumineuse de *Dinophysis* étaient très faibles. Il convient donc de ne pas fournir un éclairement supérieur à 8-10 W.m⁻². Il serait bon de placer les fioles de culture sur un support opaque à la lumière.

A.3 - Agitation

Une légère amélioration de l'aspect des algues, ainsi que de leur temps de survie a pu être observée par agitation du milieu qui les contient. Cette agitation doit être très faible et peut être obtenue par l'action d'un barreau (agitateur magnétique) ayant un mouvement de rotation lent.

A.4 - Forme des récipients de culture

Des cellules de *Dinophysis* placées dans des tubes ont très vite dégénéré. L'algue semble exiger un volume de culture assez important et peut être, une interface milieu de culture/air assez grande. Nous avons utilisé des erlenmeyers (100, 250, 500, 1 000, 2 000 ml), des fioles Fourneau, des ballons de culture ainsi que divers flacons en plastique.

B - Essais de divers milieux de culture

B.1 - Milieux liquides

Ils concernent tant des milieux à base d'eau de mer enrichie ou non, que des milieux synthétiques. Nous avons également essayé divers enrichissements

- Eau de mer provenant . de Banyuls/mer (utilisée couramment au laboratoire)
- . du Havre (telle quelle ou filtrée puis autoclavée 20 mn, 120°C).

Nous avons, ou non, rajouté des vitamines (1 % à 4 % de la solution-mère dont la composition est donnée dans la figure 1 en annexe)

- Eau de mer enrichie par le complément de Provasoli, modifié (ES) : apport de divers sels minéraux et de vitamines (Biotine, Thiamine, B₁₂) (voir sa composition figure 1 = milieu MPP en annexe)
- Eau de mer enrichie par un extrait de terre et diverses vitamines selon ERDSCHREIBER, milieu Lateur
- Nous avons essayé diverses associations entre ces milieux et modifié les quantités d'enrichissement (ES de 0,5 % à 4 %)
- Milieu synthétique d'après SHEPARD, milieu MS (voir sa composition fig. 2 en annexe)

- Nous avons supplémenté soit le MS, soit l'eau de mer avec divers éléments :

- + extrait de terre 0,5 %
- + acides aminés (0,1 mM) : glycolle - Acide glutamique - Lysine
- + acide folique (0,1 mM)
- + glucose (1 mM)
- + urée (0,5 mM)
- + "nutrient growth" (1 g/L)

Afin de limiter le développement de la flore bactérienne, nous avons ajouté dans certains essais du chloramphénicol au milieu de culture.

B.2 - Milieus solides

Nous avons essayé d'isoler *Dinophysis acuminata* sur milieu solide (en boîte de Pétri) :

- milieu MPP additionné de gélose à 15 g/l
- milieu Zobell modifié ainsi préparé : à 750 ml d'eau de mer et 250 ml d'eau distillée, ajouter :
 - + Protéose peptone 3 g
 - + "Yeast extract" 1 g
 - + Casitone 1 g
 - + Phosphate ferrique 0,1 g
 - + Gélose agar 15 g

Dissoudre les divers composants à chaud, puis autoclaver le mélange (10 mn à 120°C). A la sortie de l'autoclave, le couler dans les boîtes de Pétri.

C - Résultats

Aucun des essais d'isolement sur milieu solide n'a donné de résultat positif : ils ont rapidement abouti à une prolifération des populations de bactéries et à une dégérescence des cellules de *Dinophysis acuminata*.

Les divers essais de culture du *Dinophysis* en milieu liquide sont globalement difficiles à interpréter du fait de l'action de multiples facteurs : interaction algues/bactéries/zooplancton, compétitions entre les différentes espèces phytoplanctoniques, intervention de facteurs externes défavorables, faible inoculum du Dinoflagellé, ... Quelques données peuvent être dégagées de l'ensemble des expériences :

- *Dinophysis acuminata* résiste bien au chloramphénicol pour une dose de 5 mg/l. L'addition de cet antibiotique, en limitant le développement de la flore bactérienne favorise le maintien des populations de phytoplancton et en particulier du *Dinophysis acuminata*.

- Dans nos conditions expérimentales, les phénomènes de compétition sont toujours apparus comme défavorables au *Dinophysis acuminata*. En particulier, lors des isollements de ce Dinoflagellé, après quelques jours, nous n'avons obtenu que le développement de *Prorocentrum* (certains ont en effet la même taille et une nage très voisine de celle du *Dinophysis*, il est donc facile de les confondre lors du tri).

Il sera donc judicieux dans l'avenir d'essayer d'obtenir, dès le début des expériences, des tris unialgaux, en évitant néanmoins de trop diluer les cellules de *Dinophysis* car dans ce cas nous avons constaté qu'il dégénérait rapidement.

- Nous n'avons jamais observé la présence de kyste typique de Dinoflagellé. Les thèques de *Dinophysis acuminata* dégénérés (par exemple lors d'un tri de 200 cellules placées dans 50 ml de milieu) sont en général détruites par les microorganismes. Des thèques vides intactes ont pu être obtenues dans des cultures ayant subi plusieurs traitements antibiotiques successifs.

- Les milieux de culture ayant permis un maintien pendant un temps assez long de cellules vivantes de *Dinophysis* ne correspondent pas à ceux où quelques divisions cellulaires ont pu être notées.

. Un doublement (et même un peu plus) de la population du Dinoflagellé a été observé dans des conditions de milieux assez riches :

- milieu MPP + 2 % ES, 3,5 % Vitamines
- milieu Erdschreiber + 1 % ES, 3 % Vitamines.

Ceci est contraire aux observations réalisées sur *D. fortii* au Japon (IGARASHI communication personnelle).

. Au contraire, les cellules de Dinoflagellé se sont maintenues plus longtemps dans les milieux peu enrichis :

- Eau de mer seule
- Eau de mer + Vitamines
- MS + 0,5 %, 2 % Vitamines

La pression osmotique du milieu de culture semble être un facteur important, en particulier une dilution (par la solution de vitamines par exemple) favorise le développement du *Dinophysis*. Des milieux trop riches semblent toxiques et favorisent largement la croissance des Diatomées.

D - Notes concernant la physiologie de *Dinophysis acuminata*

Il s'agit d'une espèce assez mobile, qui semble pouvoir réaliser des déplacements assez importants. En particulier les cellules, en fin d'après-midi, ont souvent été localisées à la surface du milieu de culture. Ces migrations pourraient être utilisées pour "pré-trier" les échantillons.

L'observation des cellules en microscopie optique permet de distinguer dans le cytoplasme deux masses très claires (pusules ou organes d'osmorégulation), de nombreux globules sombres éparpillés dans le cytoplasme, un gros noyau de localisation assez dorsale et des amas colorés en brun-orange qui pourraient être des chloroplastes (chez les Dinoflagellés les pigments caroténoïdiens sont en effet localisés dans les plastes). Aucun stigma (ocelle) n'a été observé. Il semble que ce Dinoflagellé contiennent donc quelques plastes ; il pourrait être capable d'autotrophie. Les études en microscopie électronique permettront de confirmer ou non ce fait (voir schéma en annexe).

IV - MISE EN CULTURE D'AUTRES ESPECES PHYTOPLANCTONIQUES

Selon des méthodes proches de celles utilisées pour *D. acuminata* nous avons mis en culture quatre espèces de Diatomées et deux souches de *Prorocentrum* sp (*micans* ?) qui étaient associées au *D. acuminata* lors des blooms dans la région de Antifer en août 1984. Ces souches sont actuellement maintenues en milieu MPP.

Elles permettront de contrôler si des milieux dans lesquels ces algues ont séjourné sont susceptibles de favoriser le développement de *Dinophysis acuminata* (interactions trophiques).

VII - CONTROLE DE LA NON-TOXICITE DE PROROCENTRUM

La toxicité des deux cultures de *Prorocentrum sp (micans)* isolées des échantillons d'eau de mer contenant les *D. acuminata* a été testée par le test souris. L'extrait à tester a été obtenu selon le protocole suivant :

culture
 ↓
 centrifugation
 ↓
 culot d'algues (0,2 g)
 ↓
 sonication dans le méthanol
 ↓
 extraction du culot par 30 ml de méthanol
 (x 3 fois)
 ↓
 évaporation de l'extrait méthanolique

L'extrait a ensuite été repris dans le TWEEN 60 à 1 %.

La moitié de la solution obtenue (soit l'équivalent de 0,1 g de *Prorocentrum* en poids humide) est injectée à une souris blanche femelle (SWISS) de 20 g. L'autre moitié est testée de la même façon.

Aucun trouble n'a été observé chez les deux souris. Etant donné la forte dose injectée nous pouvons considérer qu'aucune toxine de type dinophysistoxine n'a pu être extraite des cultures. *Prorocentrum* ne serait donc pas toxique.

VIII - ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DE L'ULTRASTRUCTURE DE *DINOPHYSIS*

ACUMINATA

Cette étude a été réalisée à partir d'échantillons de phyto-plancton qui nous ont été fournis par J.P. JOLY. Il s'agit de matériel ayant été conservé au congélateur pendant plusieurs mois et provenant d'Antifer (1984).

A - Aspects en microscopie électronique

A.1 - Microscopie à balayage (scanning)

Le matériel, après congélation a été traité de la façon suivante : l'échantillon est fixé par le tétr oxyde d'osmium ajouté à raison de 1 % dans le milieu, à température ambiante pendant une heure. Après centrifugation (1 500 g), le culot cellulaire est abondamment rincé à l'eau.

Les cellules sont déshydratées par passages successifs dans des bains d'acétone de concentration croissante (25 % - 50 % - 75 % - 90 % - 100 %). L'échantillon est desséché par la technique du point critique puis métallisé à l'or.

Les observations et photographies ont été réalisées en collaboration avec A. COUTE (laboratoire de cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris) sur un microscope électronique à balayage (GAMBRIDGE 600).

L'aspect général de *Dinophysis acuminata* originaire de Antifer en scanning est montré par les figures A et B de la planche I qui présentent, en vue latérale les deux valves de l'hypothèque. On peut noter qu'une des valves ne possède pas de pore trichocystaire à son extrémité antéapicale.

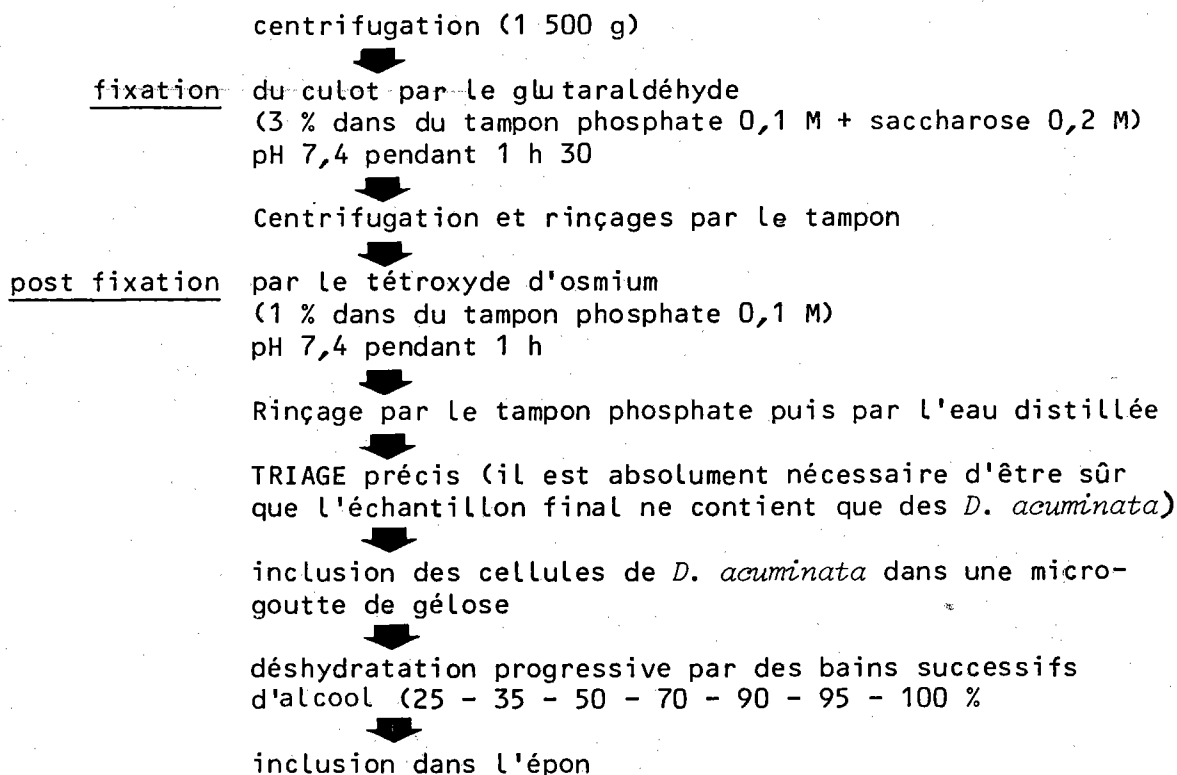
Les deux premières photographies (A et B) de la planche II concrétisent un problème de mauvaise conservation des cellules. En

effet, sous l'impact du faisceau d'électrons, l'hypothèque à tendance à s'ouvrir au niveau de la suture entre les deux grandes plaques thécales, donnant alors aux cellules un aspect disymétrique. Ce phénomène se produit peut être lors de la fixation des échantillons d'eau de mer pour le lugol et le formol (risques de déformations de la thèque sous l'effet de chocs osmotiques).

Les autres photographies de cette planche, ainsi que celles de la planche III présentent des détails de la structure de *Dinophysis acuminata* (vues latérales et apicales, détails de la région cingulaire, de l'organisation des pores trichocystaires...).

A.2 - Microscopie à transmission

L'échantillon après décongélation a été traité selon le protocole suivant :



Toutes les manipulations ont été faites à température ambiante.

Coupes et colorations

Les coupes ultrafines ont été réalisées par A. MOREAU à l'aide d'un ultra-microtome (LKB modèle nova) équipé d'un couteau de

diamant. Elles ont été ensuite contrastées par l'acétate d'uranyl en solution alcoolique, puis par le citrate de plomb.

Les observations et photographies ont été faites sur un microscope électronique JEOL 100 C.

L'ensemble des manipulations nous a fait perdre beaucoup de matériel néanmoins nous avons réussi à obtenir quelques coupes ultrafines de *D. acuminata*. Malheureusement la conservation des échantillons au congélateur a complètement abimé le cytoplasme ne permettant pas une conservation correcte des organites ; en particulier, on ne peut pas reconnaître de structure plastidiale.

Les photographies des planches IV, V et VI présentent quelques aspects de l'ultrastructure de *D. acuminata*. Elles montrent l'organisation de la thèque percée de pores trichocystaires, à différents niveaux. Une coupe transversale (fig. A planche VI) d'une cellule contient de nombreuses sections de petites structures à aspect circulaire dont un grossissement est donné figure B. Ce pourrait être des "cables" du cytosquelette visibles dans certaines cellules en microscopie optique (fig. B et C planche XI).

B - Aspect en microscopie optique

Les cellules de *D. acuminata* ont été triées sous la loupe à la micropipette et déposées sur des lames de verre.

Les observations et photographies ont été réalisées sur un microscope NIKON.

Les planches VII à XI donnent des aspects à divers grossissements de la morphologie de *D. acuminata* d'Antifer. On peut noter les variations de forme et de taille entre les cellules ainsi que l'aspect de la thèque ou du cytoplasme du Dinoflagellé.

CONCLUSION

Cette étude a précisé certaines précautions à prendre en ce qui concerne les prélèvements et la conservation des échantillons d'eau de mer susceptibles de contenir des cellules de *Dinophysis acuminata*.

L'analyse de données hydrologiques en baie de Vilaine n'a pas abouti à l'obtention de corrélations nettes entre facteurs physico-chimiques de l'eau de mer et concentration cellulaire du Dinoflagellé dans le milieu naturel. Ce fait pourrait, en partie être lié à un problème d'échantillonnage ; on peut, en effet, se demander si le prélèvement d'échantillons en surface est suffisant pour refléter l'état et l'évolution des populations de *D. acuminata* sur toute la colonne d'eau. Il serait intéressant, dans l'avenir, d'essayer d'évaluer ce paramètre.

Les essais de mise en culture, qui n'ont pas abouti à un résultat positif et l'observation de cellules vivantes permettent d'avancer quelques hypothèses quant à la physiologie de *D. acuminata* : il semble contenir quelques plastes, visualisés dans son cytoplasme par des zones pigmentées. *D. acuminata* pourrait donc être capable d'autotrophie. Néanmoins quelques divisions cellulaires ont pu être observées en milieu additionné d'extrait de terre ou de "nutrient growth" par exemple suggérant la possibilité pour l'algue d'utiliser des sources organiques de carbone : il pourrait donc également être capable l'hétérotrophie. L'hypothèse de phagotrophie ne peut être écartée, bien que sa croissance n'ait pas été améliorée par l'adjonction, dans son milieu de culture de petites espèces de phytoplancton (*Exuviella* sp. ou *Dunaliella bioculata*).

La réalisation de coupes en microscopie électronique à transmission n'a malheureusement pas permis d'infirmer ou de confirmer la présence de structures plastidiales chez *D. acuminata*, du fait de la mauvaise préservation du matériel (congélation). Cette étude devra donc être à nouveau réalisée à partir de matériel vivant.

La culture du genre *Dinophysis* s'avère donc très difficile, ce qui correspond aux résultats obtenus depuis de nombreuses années dans d'autres pays (Japon, Angleterre, Pays-Bas). Le problème n'est cependant pas insoluble et pour le résoudre plus facilement il sera souhaitable, dans l'avenir de disposer d'échantillons provenant d'un bloom. L'étape culture de *Dinophysis acuminata* reste très intéressante quant à la compréhension du problème "Diarrhetic-shellfish" poisoning sur nos côtes ; elle donnera des indications tant sur les besoins nutritifs du Dinoflagellé que sur sa toxicité.

PIECES ANNEXES

- Missions
- Figure 1 : composition du milieu de culture MPP
- Figure 2 : composition du milieu de culture MS
- Extrait du rapport de J.C. CLEMENT (1985), cahiers du Mor-Bras n° 7 (avril 1985). Commission baie de Vilaine : "Le cas particulier de *Dinophysis acuminata* : examen des données 1983".
- Schéma de deux cellules vivantes de *Dinophysis acuminata*
- Planches photographiques
 - I - III microscopie électronique à balayage
 - IV - VI microscopie électronique à transmission
 - VII - XI microscopie optique

MISSIONS : 1984

* 19/6 au 23/6 - Nantes :

- Préparation du matériel nécessaire pour la récolte de phytoplancton en mer.
- Sortie en mer pour réaliser des prélèvements à l'occasion d'une sortie de routine (avec P. Maggi).
- Observation des échantillons prélevés : présence de très peu de *Dinophysis* dans une biomasse phytoplanctonique importante.
- Sortie en mer avec un pêcheur en Baie de Vilaine. Observation sur place de matériel à l'aide d'une loupe.
- Observation au laboratoire des échantillons où des *Dinophysis acuminata* avaient été décelés : en fait présence de très peu de *Dinophysis acuminata*.

* 5/7 au 6/7 - Nantes :

- Sortie en Baie de Vilaine avec un pêcheur (bouchaux de C. Pelletan, Cromenach, Pen-Bé, Maresclé, ...) et une vedette des affaires maritimes. Observation des échantillons sur place, puis tri au laboratoire de Nantes de ceux où des *Dinophysis acuminata* avaient été décelés (obtention de 300 cellules environ).

* 17/7 - Le Havre :

- Récupération d'échantillons d'eau de mer prélevés à Antifer et dans le port du Havre (fournis par F. Proniewski).

* 14/8 - Le Havre :

- Récupération d'échantillons d'eau de mer prélevés à Antifer (fournis par P. Delalande).

* 28/8 - Nantes :

- A l'arrivée, il n'y avait plus de *Dinophysis acuminata* à Ouistreham. Discussion avec P. Lassus et C. Le Baut.

* Août et partiellement Septembre et Octobre - Paris :

- Tri des échantillons, préparation de divers milieux de culture, contrôle des essais,

FIG. 1 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE
A BASE D'EAU DE MER ENRICHIÉ DU
COMPLEMENT DE PROVASOLI MODIFIÉ (MPP)

- Solution-stock de fer : A 500 ml d'eau distillée, rajouter :

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 351 mg
EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : 330 mg

- Solution-stock PII : A 100 ml d'eau distillée, rajouter :

EDTA (Na_2) : 100 mg
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 4,90 mg
 H_3BO_3 : 114 mg
 MnSO_4 : 12,30 mg
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,20 mg
 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,48 mg

- Solution-stock de vitamines : A 200 ml d'eau distillée stérile, ajouter :

- 6 ml d'une solution de biotine à 2 mg/100 ml d'eau
- 10 ml d'une solution de vitamine B_{12} à 2 mg/100 ml d'eau
- 10 mg de thiamine

- Préparation de la solution ES : A 50 ml d'eau distillée, rajouter :

NaNO_3 : 350 mg
Tris : 500 mg
Glycérophosphate de sodium : 50 mg
Solution-stock de fer : 25 ml
Solution-stock PII : 25 ml

- Préparation du milieu final MPP :

A un litre d'eau de mer filtrée, vieillie, rajouter 20 ml de solution ES et 20 ml de solution de vitamines filtrée sur Millipore (0,2 μ).

FIG. 2 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE SYNTHÉTIQUE (MS)
(d'après SHEPHARD)

- Solution de base : Pour un litre d'eau distillée, rajouter les composants suivants, un à un, dans l'ordre donné :

NaCl	:	24	g
MgSO ₄ (7H ₂ O)	:	12	g
CaCl ₂ (2H ₂ O)	:	1	g
Tris	:	1	g
KCl	:	0,75	g
NaNO ₃	:	40	mg
K ₂ HPO ₄	:	1	mg

- Solution de microéléments : Pour 100 ml d'eau distillée, ajouter :

EDTA tétrasodique (Na ₄ 2H ₂ O)	:	1,2	g
ZnSO ₄ (7H ₂ O)	:	0,2	g
Na ₂ MoSO ₄ (2H ₂ O)	:	0,1	g
FeCl ₃ (6H ₂ O)	:	50	mg
MnCl ₂ (4H ₂ O)	:	20	mg
CoCl ₂ (6H ₂ O)	:	0,2	mg
CuSO ₄ (5H ₂ O)	:	0,2	mg

- Solution-mère de vitamines : Pour 100 ml d'eau distillée

Thiamine (HCl)	:	30	mg
p-Aminobenzoate	:	2	mg
Pantothénate (Ca)	:	1	mg
Vitamine B ₁₂	:	0,4	mg

- Solution de bicarbonate de soude :

NaHCO₃ → 1 g dans 20 ml d'eau stérile

- Solution finale :

Solution de base (1 l) + 1% de solution de microéléments (1 ml).

Ajuster le pH à 7,8 avec du HCl pur. Autoclaver à 120° C pendant 20 mn.

Au moment de l'emploi, rajouter stérilement (filtration sur sweenex stérile) les vitamines à 1% (1 ml) et le bicarbonate de soude à 2% (2 ml).

3.2.- Le cas particulier de Dinophysis acuminata ; examen des données 1983 *

3.2.1.- Examen sur l'ensemble des campagnes 1983

Les données de l'année 1983 présentent un intérêt particulier pour plusieurs raisons :

- 1983 fut la première année où le phénomène Dinophysis est apparu avec une ampleur telle qu'il entraîna l'interdiction de pêche et commercialisation des coquillages filtreurs, non seulement en Baie de VILAINE, mais en BRETAGNE-SUD et en NORMANDIE ;
- En raison de l'apparition de ce phénomène, un grand nombre de campagnes a été réalisé en JUIN - JUILLET - AOUT par l'IFREMER, permettant l'acquisition de nombreuses informations selon un maillage temporel assez serré ;
- Les concentrations observées en 1983 ont parfois été importantes (maximum : 35.000 cellules/litre) ; le phénomène a été plus fugace, et de moindre ampleur en 1982 et 1984 ; les conditions de milieu ayant régné en 1983 sont donc théoriquement favorables à l'apparition de D. acuminata.

Il est donc apparu nécessaire de procéder à une analyse fine de ces résultats, dans la mesure où des conclusions précises sur les exigences écologiques de Dinophysis peuvent permettre la prévision de ses efflorescences, et donner des indications précieuses pour la culture in vitro, préalable à toute étude sérieuse sur cette espèce particulière.

Les premiers résultats réunis dans les tableaux 13 et 14 autorisent les remarques suivantes :

- 1) Facteurs climatiques : des corrélations significatives existent de façon positive entre l'insolation des jours précédant le prélèvement, de façon négative avec la force moyenne du vent de la décade précédente.

Dinophysis marque donc les mêmes préférences climatiques que l'ensemble des Dinoflagellés, mais de manière plus discrète (les corrélations sont plus faibles).

Par contre, il ne semble pas sensible à l'amplitude des marées (effectivement, comme nous le verrons par la suite, son apparition s'est produite en période de vive-eau moyenne).

- 2) Facteurs hydrologiques : il ne semble pas exister de liaison très nette avec la température in situ. Ceci n'implique pas une indifférence totale vis à vis des variations de température précédant le prélèvement.

.../...

La figure 56 montre la dispersion des densités de *Dinophysis* en fonction de la température de l'eau, et permet de constater que :

- en 1983, *Dinophysis* est apparu alors que les températures de l'eau étaient supérieures à 14°C ;
- en dehors de cette borne apparente, la plage de tolérance est très vaste (14-22°C) : *Dinophysis acuminata* n'apparaît pas inféodé à un intervalle de température réduit.

Pour la salinité, la liaison semble plus marquée ($r = + 0,46$). La figure 57 indique cette relation :

- pour des salinités inférieures à 27 ‰, les concentrations sont nulles, dans la majorité des cas ;
- Les plus fortes concentrations sont observées pour des salinités égales à 32 - 33 ‰.

Là encore, la dispersion des points interdit toute conclusion définitive.

Cette analyse permet de confirmer les observations japonaises (LASSUS, 1985) ayant montré que *D. acuminata* est une espèce relativement tolérante vis à vis de la température et de la salinité (alors que d'autres espèces comme *D. fortii*, présentent des préférences thermiques et halines assez strictes).

- 3) Nutriments : *D. acuminata* ne se singularise pas à ce propos des autres genres de Dinoflagellés ; il apparaît préférentiellement dans les milieux appauvris en sels nutritifs ; cependant, cette affirmation doit être nuancée, des différences importantes pourront apparaître entre stations de prélèvement, et selon la période d'échantillonnage.

Aussi, avons-nous procédé à une étude plus fine sur les données de chaque station, pour l'ensemble des campagnes, pour les résultats de JUIN puis de JUILLET.

3.2.2.- Evolution des liaisons avec certains paramètres du milieu, par station, et par période

Nous nous intéresserons essentiellement aux stations 1 et 2, celles-ci ayant été échantillonnées de FEVRIER à SEPTEMBRE 1983 (les stations 4, 5 et 10, seulement de JUIN à SEPTEMBRE).

Les résultats de nos calculs sont réunis dans les tableaux 15-A, 15-B, 15-C. On peut noter les faits suivants :

- pour les stations 1 et 2, on peut noter les corrélations significatives enregistrées entre concentrations et :
 - . de façon négative, l'agitation de l'eau, les teneurs en nutriments ;
 - . de façon positive, la température (effet très discret), la salinité (effet plus marqué).

.../...

Fig 56 RELATION TEMPERATURES-DENSITES DINOPHYTIS - 1983

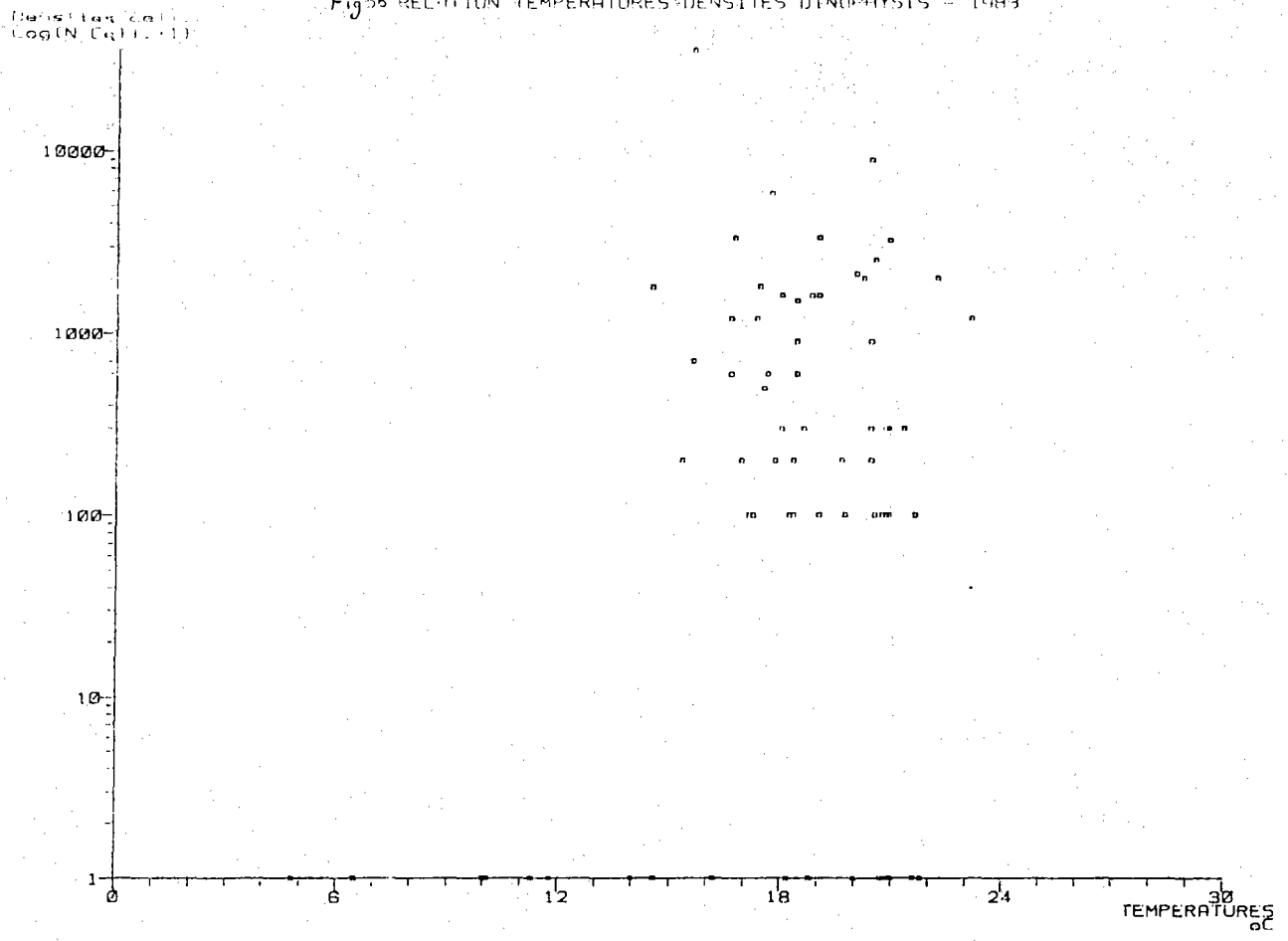


Fig 57 RELATION SALINITES-DENSITES DINOPHYTIS - 1983

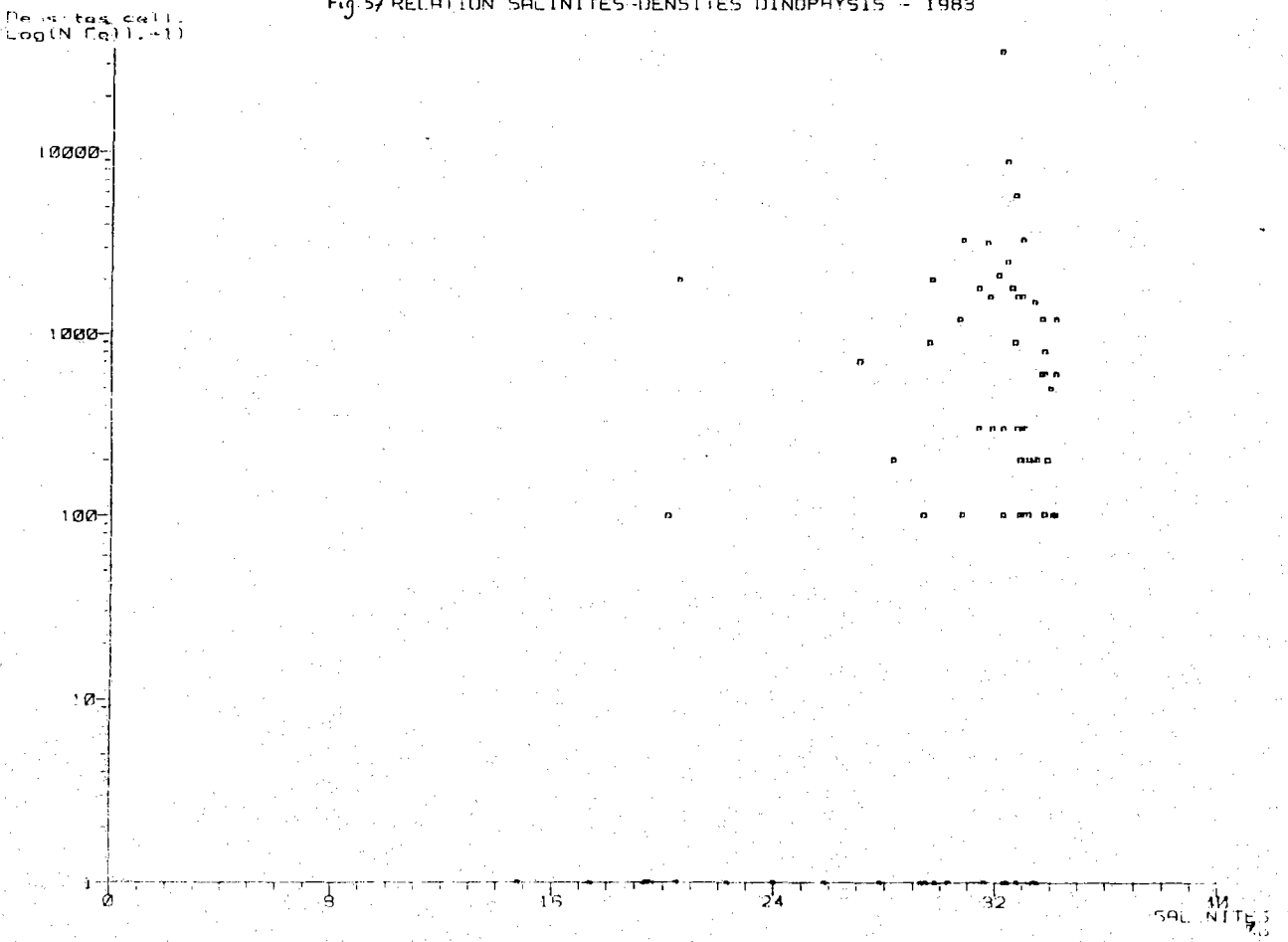


TABLEAU 15 : Coefficients de corrélation partielle (r) calculés entre certains paramètres du milieu et densités cellulaires de Dinophysis sp. en 1983

(1) N = Nombre d'observations
(2) r (0,05) = valeur de r significative à un seuil de 5 %.

Tableau 15 -A : Valeurs de r (coefficient de corrélation) calculés pour chaque station, entre certains paramètres du milieu, et densités cellulaires de Dinophysis sp. exprimées en LOG (N + 1)

VARIABLES TESTEES	S T A T I O N S				
	1	2	4	5	10
V FOR 10	- 0,40	- 0,41	0,18	- 0,16	- 0,16
TEAU	0,33	0,29	- 0,41	0,16	- 0,33
SAL	0,40	0,61	0,56	- 0,07	- 0,52
NO2	- 0,28	- 0,61	- 0,35	0,14	- 0,26
NO3	- 0,31	- 0,60	- 0,43	0,19	0,19
PO4	- 0,63	- 0,27	0,21	0,01	- 0,77
SIL	- 0,65	- 0,54	0,23	0,10	- 0,68
N (1)	20	20	14	12	12
r (0,05) (2)	± 0,433	± 0,433	± 0,514	± 0,553	± 0,553

Tableau 15 -B : Valeurs de r calculées entre certaines variables et les densités cellulaires de Dinophysis sp. (exprimés en LOG (N + 1) pour les campagnes de JUIN 1983

VARIABLES TESTEES	ENSEMBLES des STATIONS	STATION 1	STATION 2
TEAU	- 0,54	- 0,47	- 0,61
SAL	0,68	0,54	0,93
NO3	- 0,67	- 0,43	- 0,84
PO4	0,46	0,36	0,84
N (1)	13	5	5
r (0,05) (2)	± 0,532	± 0,814	± 0,814

Tableau 15 -C : Valeurs de r calculées entre certaines variables et les densités cellulaires de Dinophysis sp. (exprimées en LOG (N + 1) pour les campagnes de JUILLET 1983

VARIABLES TESTEES	ENSEMBLE DES STATIONS	STATION 1	STATION 2	STATION 4	STATION 5	STATION 10
TEAU	- 0,26	- 0,25	- 0,57	- 0,09	0,02	- 0,12
SAL	0,03	0,48	0,06	- 0,20	0,24	- 0,67
NO3	- 0,10	0,43	- 0,66	- 0,62	0,04	0,30
PO4	- 0,62	- 0,90	- 0,77	0,59	- 0,84	- 0,61
N (1)	30	6	6	6	6	6
r (0,05)(2)	± 0,349	± 0,754	± 0,754	± 0,754	± 0,754	± 0,754

- pour les autres stations, échantillonnées en été, les relations sont extrêmement fluctuantes ; il semblerait que les conditions de maintien des populations échappent au cadre global décrit précédemment.

Les tableaux 15-B et 15-C confirme cette hypothèse d'exigences écologiques différentes suivant la période :

- . en JUIN (période d'apparition des populations), la température joue un rôle négatif, la salinité un rôle positif marqué ; on peut relever d'autre part, une corrélation positive avec les teneurs en phosphates.
- . en JUILLET (période de croissance, de décroissance des populations) on ne peut plus guère définir de relations précises entre tel paramètre et les densités observées, les liaisons variant considérablement selon les stations.

3.2.3.- Etude de l'évolution des principaux paramètres du milieu pendant la période d'apparition de *Dinophysis*

On trouvera dans les figures 58 à 73 une description des principales conditions du milieu (climatiques, hydrochimiques) en rapport avec l'apparition et le maintien des populations de *D. acuminata*, en particulier pour les stations 1 et 2.

3.2.3.1.- Apparition de *Dinophysis* en Baie de VILAINE

Nous décrivons le contexte dans lequel sont apparues les populations de *D. acuminata* aux stations 1 et 2, en JUIN 1983.

(On devra par la suite réaliser une étude comparative des années 1982-83-84 afin de vérifier la permanence de certains traits de ce contexte lors des apparitions de *D. acuminata*).

La première efflorescence s'est produite :

- pour la station 1 : entre le 7 et le 10 JUIN,
- pour la station 2 : entre le 10 et le 17 JUIN.

L'apparition de *D. acuminata* a été précédée :

- d'un bloom à Diatomées spectaculaire : pour la station 1, il est net que l'apparition du premier pic de *Dinophysis* s'est produit alors que ce bloom n'était pas achevé (densités supérieures à 1 million de cellules/L) ; pour la station 2, *D. acuminata* survient alors que le bloom est largement à son déclin (cf. fig. 71 et 73). Ce bloom à Diatomées (*Nitzschia* et *Rhizosolenia* essentiellement) semble s'être déroulé dans la première semaine de JUIN, suite à des conditions de milieu exceptionnellement favorables (décrites ci-dessous). Par ailleurs, les pics de *D. acuminata* coïncident avec ceux de l'ensemble des Dinoflagellés ; ceci est particulièrement net pour la station 1 (figure 70). L'apparition de *D. acuminata* n'est donc pas liée à des conditions spécifiques par rapport aux autres genres de Dinoflagellés.

.../...

- d'une augmentation de la température de l'eau considérable (celle-ci passant de 14°C à 21°C) (cf. figure 66 et 67) consécutive à un réchauffement de l'atmosphère aussi important (cf. figure 61), entraînant d'ailleurs des écarts de températures quotidiens très élevés (11-12°C en moyenne pendant la première semaine de JUIN (cf. figure 62).
- d'une longue période de calme du 20 MAI à la mi-JUIN (cf. figure 57) (vitesse moyenne du vent inférieure à 3,5 m/s) ; à cela s'ajoute l'intervention d'une période de mortes-eaux début JUIN (cf. figure 58).
- de l'augmentation des durées moyennes d'insolation, de 4 heures/jour début MAI à 12-13 heures/jour (cf. figure 59) ; l'insolation cumulée dépasse 700 heures lors du premier pic de *D. acuminata* alors que celle-ci était inférieure à 500 heures début MAI.
- d'une crue particulièrement violente de la VILAINE dans la 2ème quinzaine de MAI. Le débit passe de 63 m³/s le 11 MAI à 334 m³/s le 22 MAI ; cette crue est suivie d'une décrue tout aussi rapide ; les débits restent cependant importants (entre 50 et 130 m³/s) jusqu'au 7 JUIN (cf. fig. 64). Les flux d'éléments nutritifs transitant par la VILAINE s'avèrent ainsi considérables (en moyenne 130 T/jour de matières organiques, 60 T/jour d'azote nitrique, 2 T/jour de phosphoresoluble). La salinité est faible (inférieure à 20 ‰ en surface) ; elle fléchit encore du 27 MAI au 7 JUIN à la station 1, du 7 au 10 JUIN à la station 2.

Compte tenu de ce contexte l'apparition de *D. acuminata* s'est opérée

- alors que les vents étaient encore faibles ;
- pendant une moyenne vive-eau ;
- lors d'une chute de la température de l'eau parallèle à un refroidissement de l'atmosphère .
- en période de remontée de la salinité après la période de forte dessalure.

Par ailleurs, on peut noter que ces premiers pics s'affirment alors que :

- les nitrates sont encore à un niveau assez élevés (30-40 µatg/l en surface) ;
- les phosphates sont en phase d'augmentation, suite sans doute à la reminéralisation d'une partie du matériel détritique fourni par le bloom à Diatomées (qui avait auparavant épuisé pendant un certain temps les stocks de phosphore immédiatement disponible d'origine fluviale). Les concentrations restent faibles cependant.

Ainsi, on peut avancer l'hypothèse que l'apparition de *Dinophysis* est essentiellement liée à des chocs de salinité, pouvant entraîner une levée de dormance de formes de résistance, ou de kystes ; une période de dessalure suivie d'une forte augmentation de la salinité semble donc nécessaire pour le " démarrage " de la croissance. Un choc thermique (forte augmentation puis diminution de la température) peut également concourir à favoriser le phénomène.

3.2.3.2.- Maintien des populations

Le problème apparait nettement plus complexe, comme nous l'avons entrevu au chapitre 3.1. Les seules constantes qui se révèlent à l'examen sont :

- la nécessité de périodes de calme (vents faibles) pour l'apparition de nouveaux pics de *D. acuminata* ; ceci n'implique d'ailleurs pas forcément une préférence de l'espèce pour les mortes-eaux ;
- une répétition des mêmes exigences vis à vis de la température, par rapport à l'apparition de nouveaux pics (augmentation puis diminution de la température de l'air et de l'eau).

Tous les autres facteurs ont une action parfois fort différente que lors du premier bloom : ceci est particulièrement vrai pour la salinité, les phosphates.

D'autres facteurs interviennent certainement à ce niveau : substances inhibitrices (comme les métaux) ou stimulants (substances humiques), carences nutritionnelles, position du prélèvement par rapport à l'heure-marée, ou aux cycles nycthéméraux.

La stratégie d'échantillonnage se révèle indiscutablement insuffisante pour rendre compte de l'évolution des populations.

Il serait intéressant de développer par la suite un suivi :

- d'une station témoin, afin de contrôler le déroulement des successions phytoplanctoniques, et de détecter l'apparition de *Dinophysis* dans le milieu ;
- de plusieurs stations sur 2 cycles de marées, à plusieurs profondeurs, en cas d'apparition de *Dinophysis*, afin de déterminer l'étendue des proliférations de ce genre, et son comportement nyctéméral.

Les résultats de ces campagnes apporteraient de précieuses indications quant à la stratégie d'échantillonnage correcte à adopter.

N.B. : Sur les figures 58 à 73 décrivant les relations entre densités de *Dinophysis* sp. et facteurs du milieu, les traits pointillés correspondent à l'apparition de pics de densités sur les stations échantillonnées.

Figure 58 : CRCE MOYENNE DU VENT - MAI/SEPTEMBRE 1983

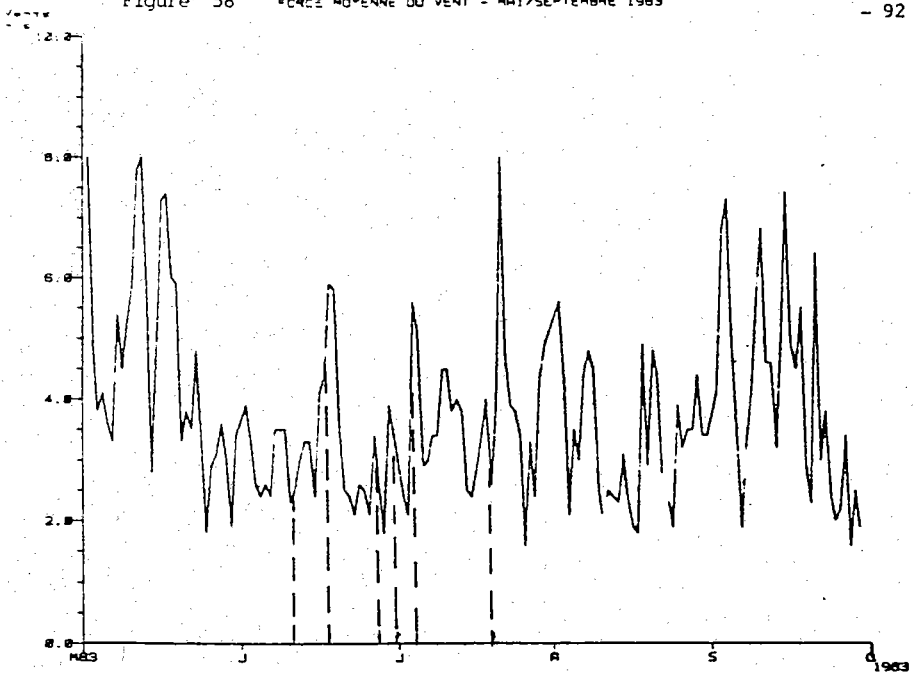


Figure 60 : INSOLATION MAI/SEPTEMBRE 1983

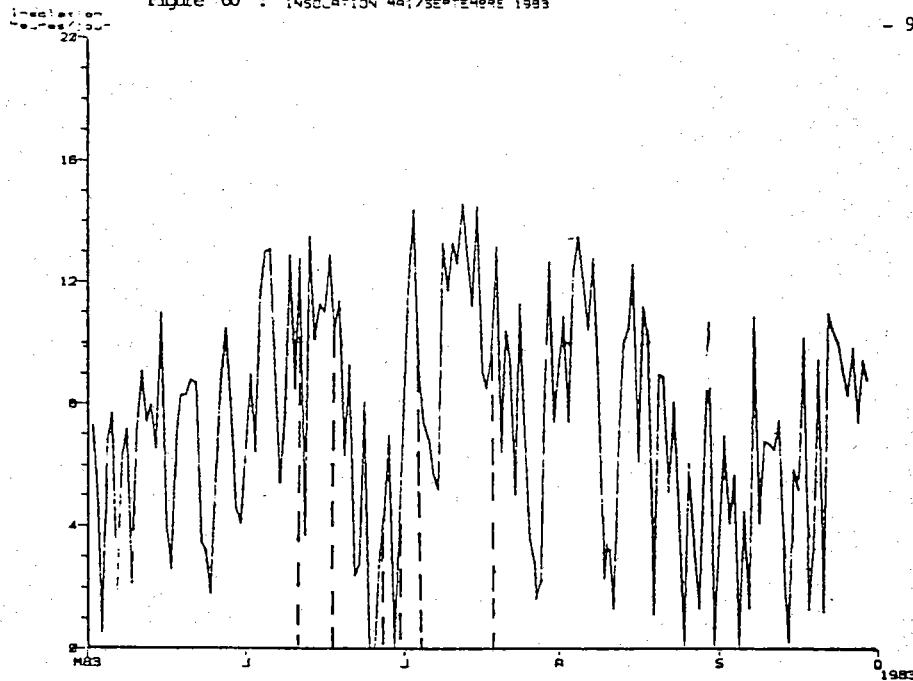


Figure 59 : COEFFICIENTS DE MAREE - MAI/SEPTEMBRE 1983

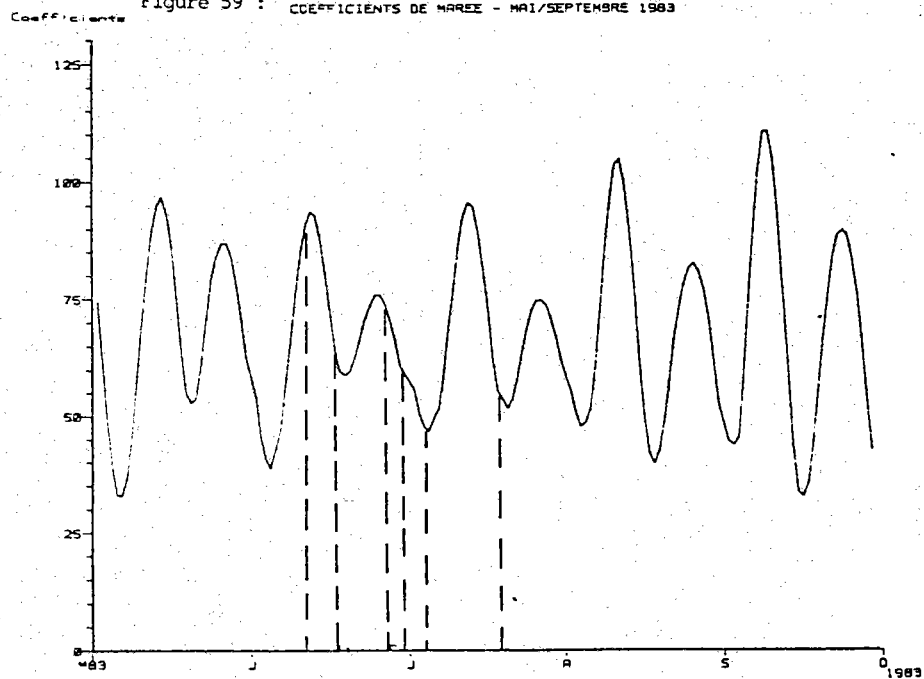


Figure 61 : INSOLATION CUMULEE - MAI-SEPTEMBRE 1983

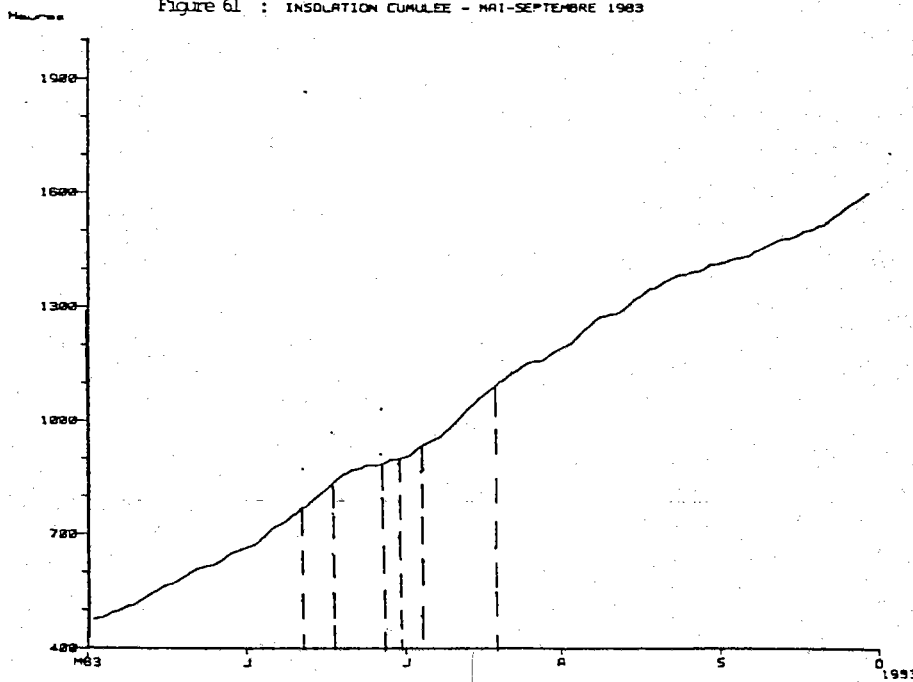


Figure 62 : TEMPERATURES MOYENNES DE L'AIR - MAI/SEPTEMBRE 89

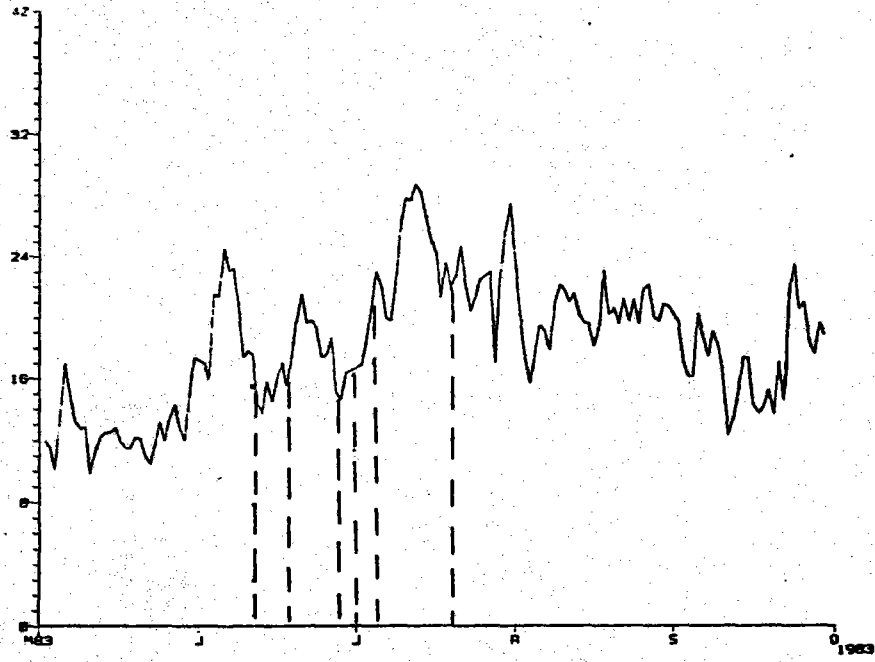


Figure 64 : DEBITS LOIRE - MAI/SEPTEMBRE 1989

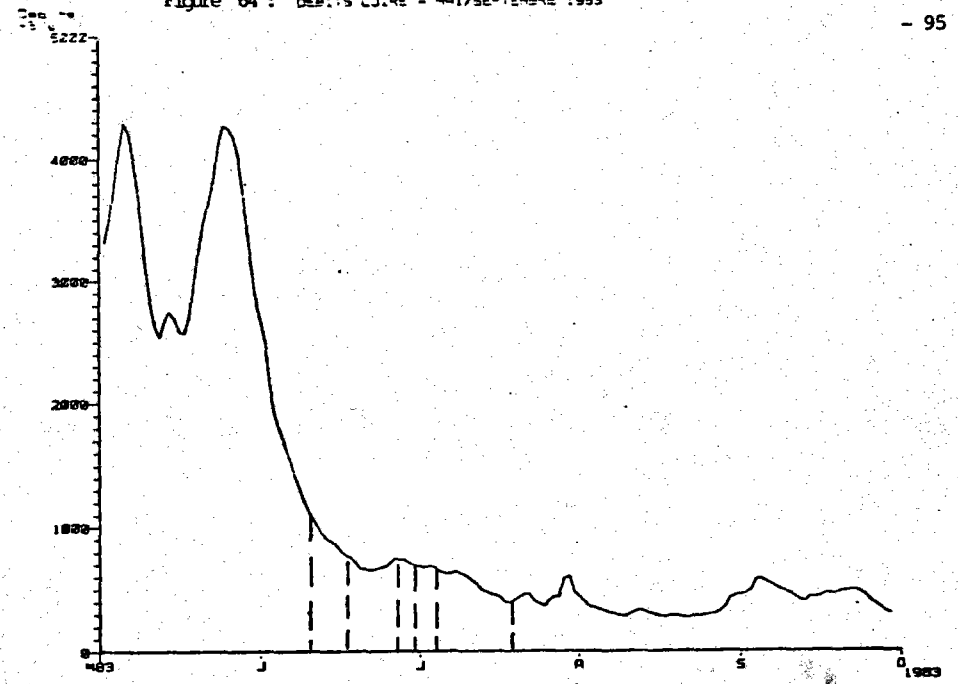


Figure 63 : ECARTS DE TEMPERATURES DE L'AIR - MAI-SEPTEMBRE 89

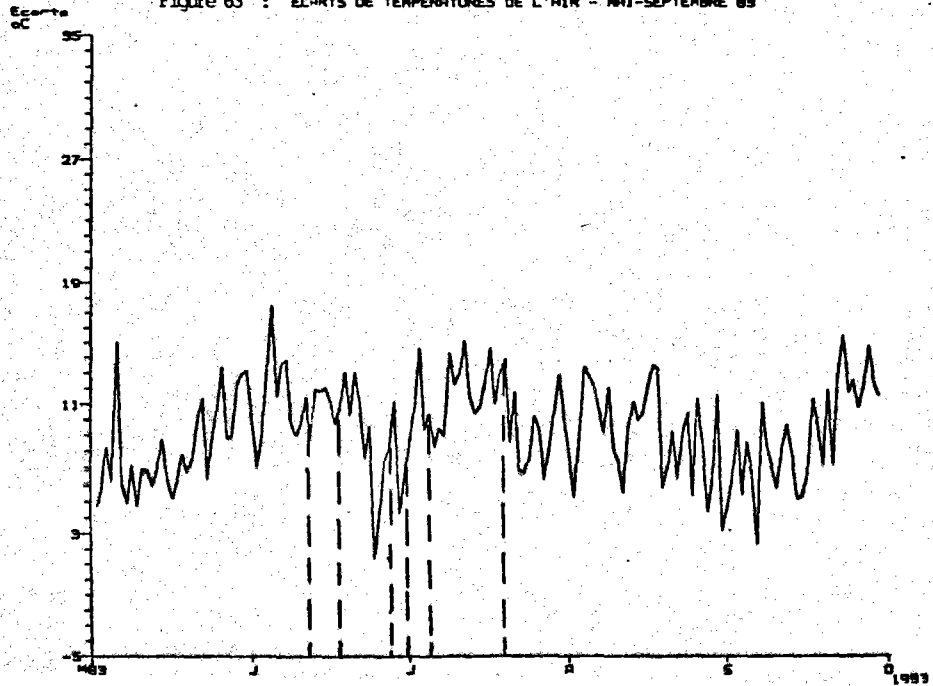


Figure 65 : DEBITS VILAINNE - MAI/SEPTEMBRE 1989

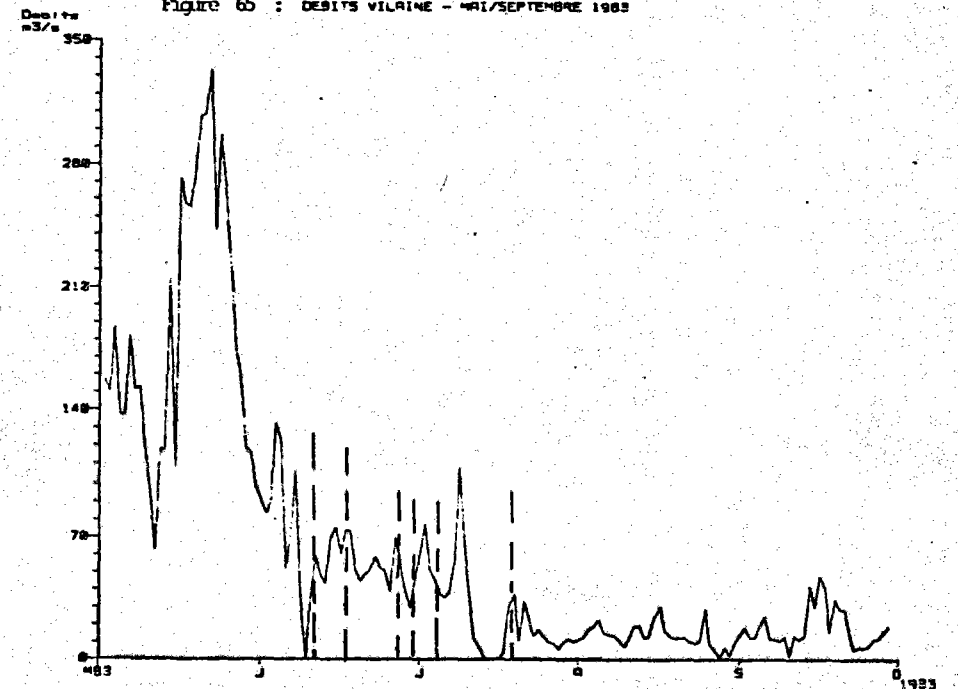
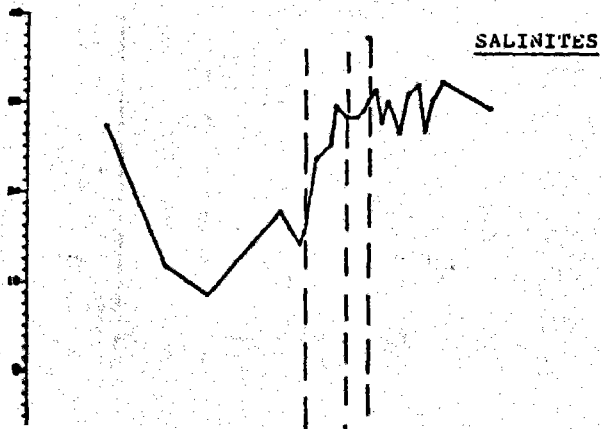
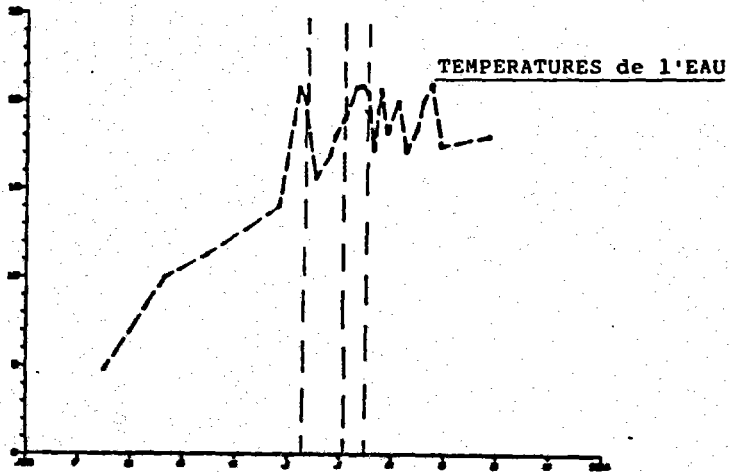
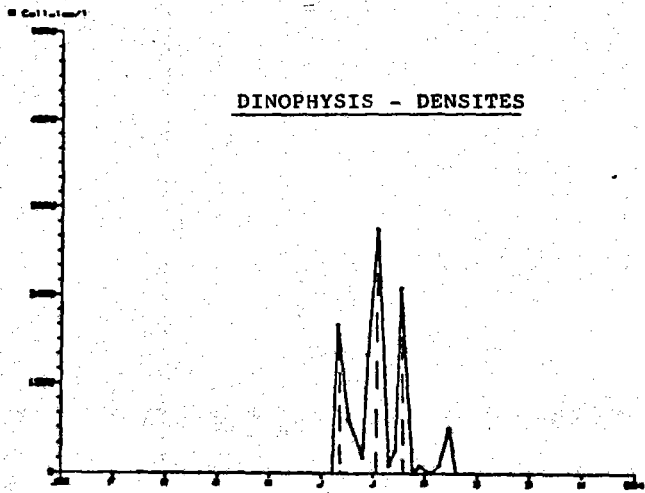


Figure 66 :

- Densités de Dinophysis
 - Températures de l'eau
 - Salinités
- STATION 1 (1983)

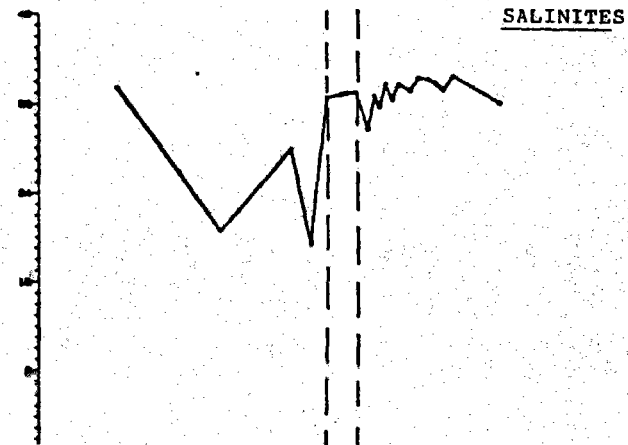
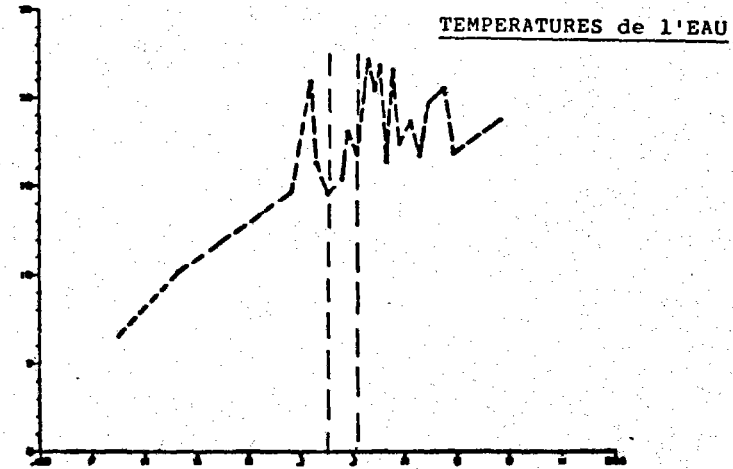
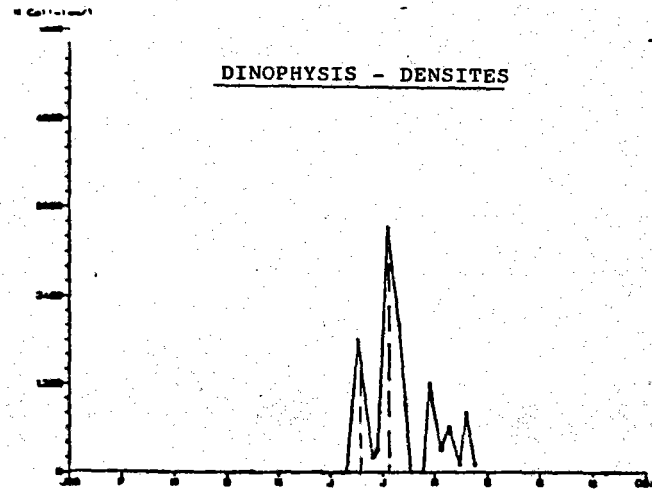


DINOPHYSIS - DENSITES

Figure 67

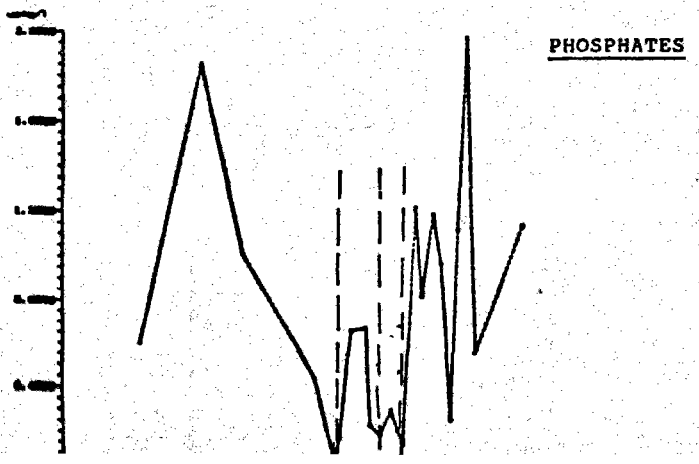
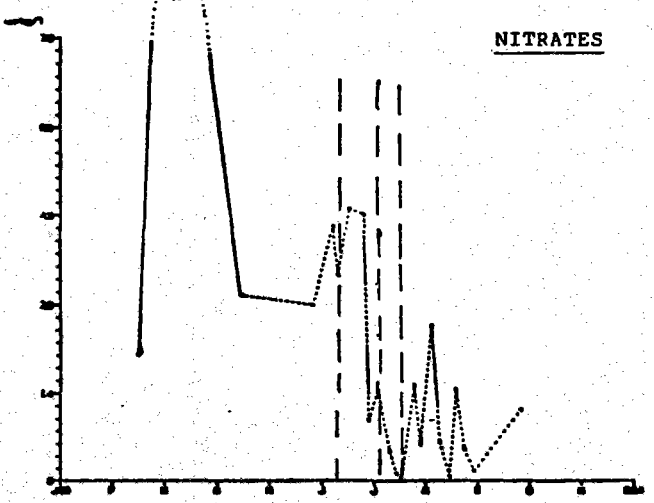
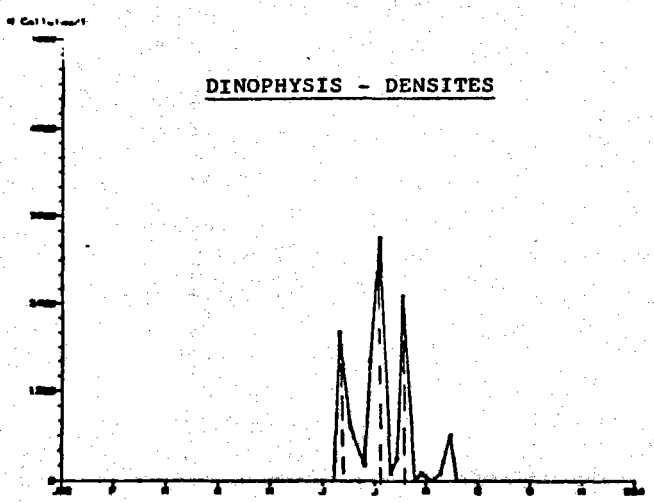
- Densités de Dinophysis acuminata
- Températures de l'eau
- Salinités

STATION 2 (1983)



DINOPHYSIS - DENSITES

Figure 68
- Densités de Dinophysis
- Nitrates
- Phosphates
STATION 1 (1983)



DINOPHYSIS - DENSITES

Figure 69 :
- Densités de Dinophysis
- Nitrates
- Phosphates
STATION 2 (1983)

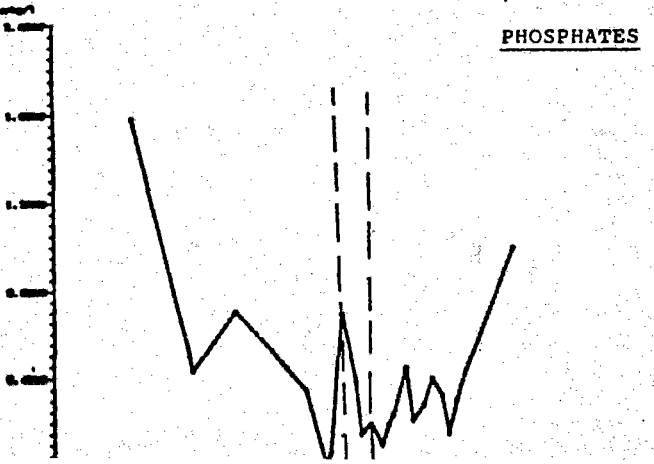
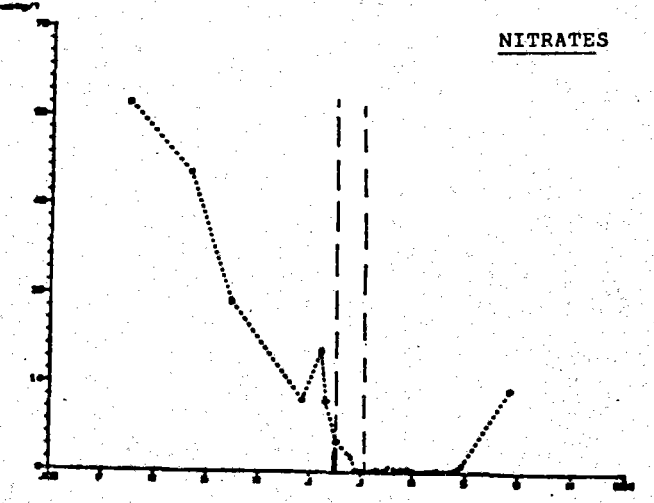
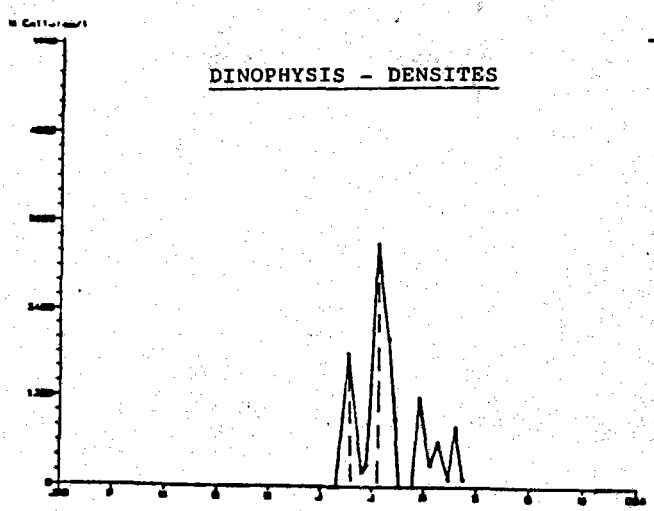


Figure 70 : Ensemble des Dinoflagellés - Station 1 - 1983

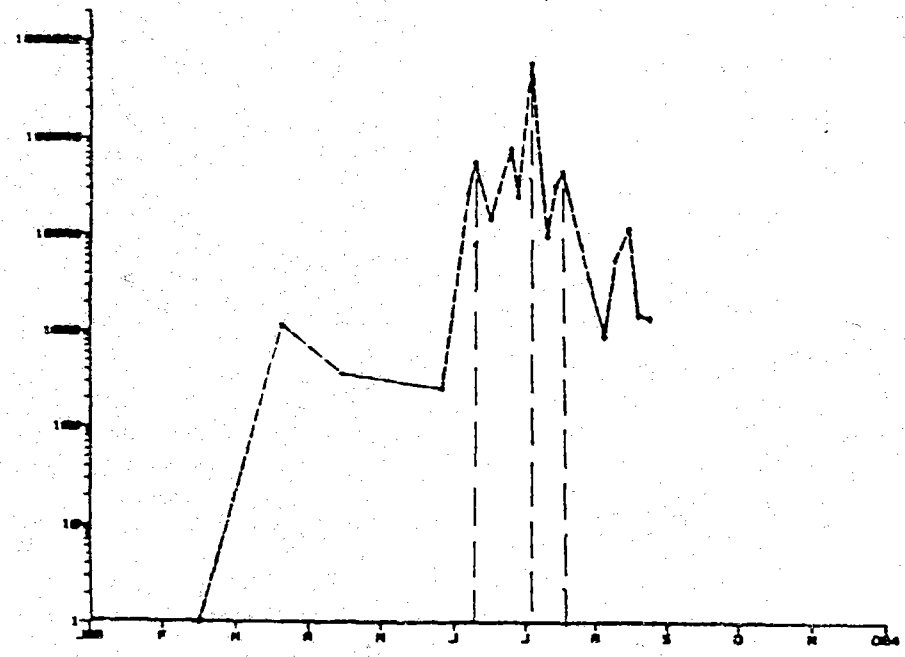


Figure 72 : Ensemble des Dinoflagellés - Evolution des densités cellulaires - Station 2 - 1983 -

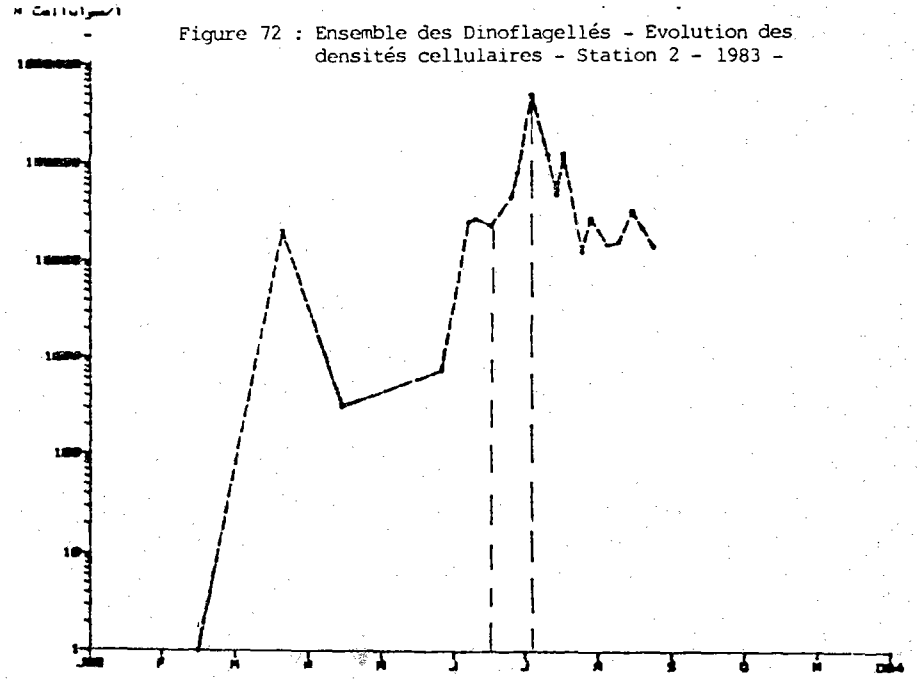


Figure 71 : Ensemble des Diatomées - Station 1 - 1983

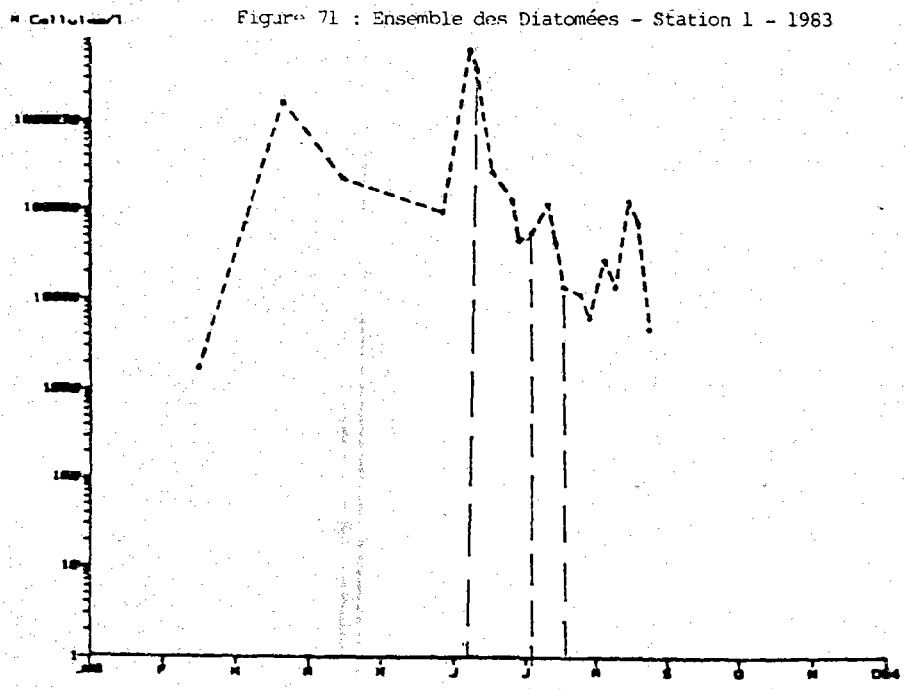
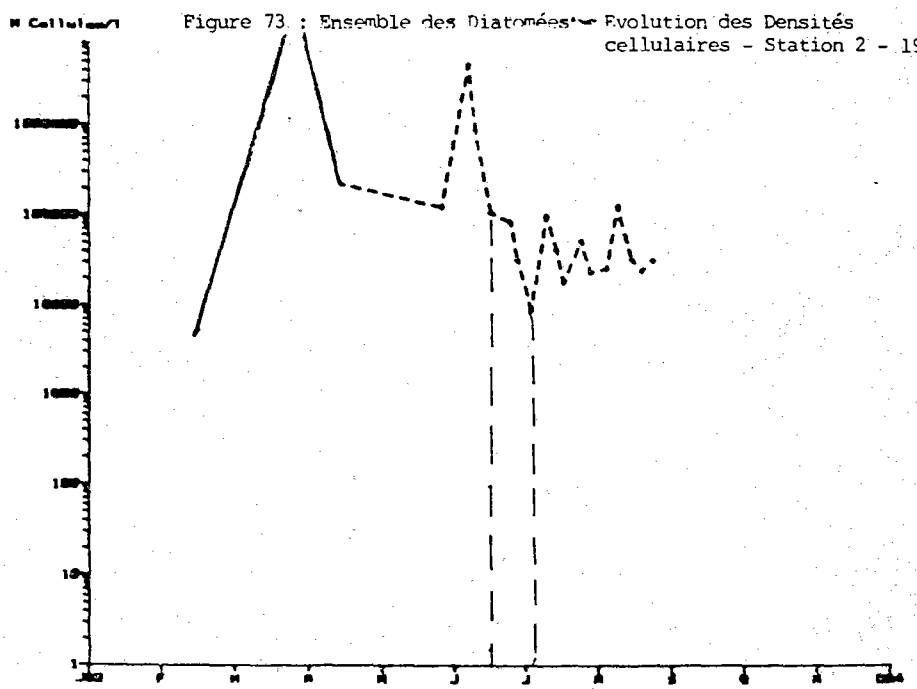


Figure 73 : Ensemble des Diatomées - Evolution des Densités cellulaires - Station 2 - 1983 -



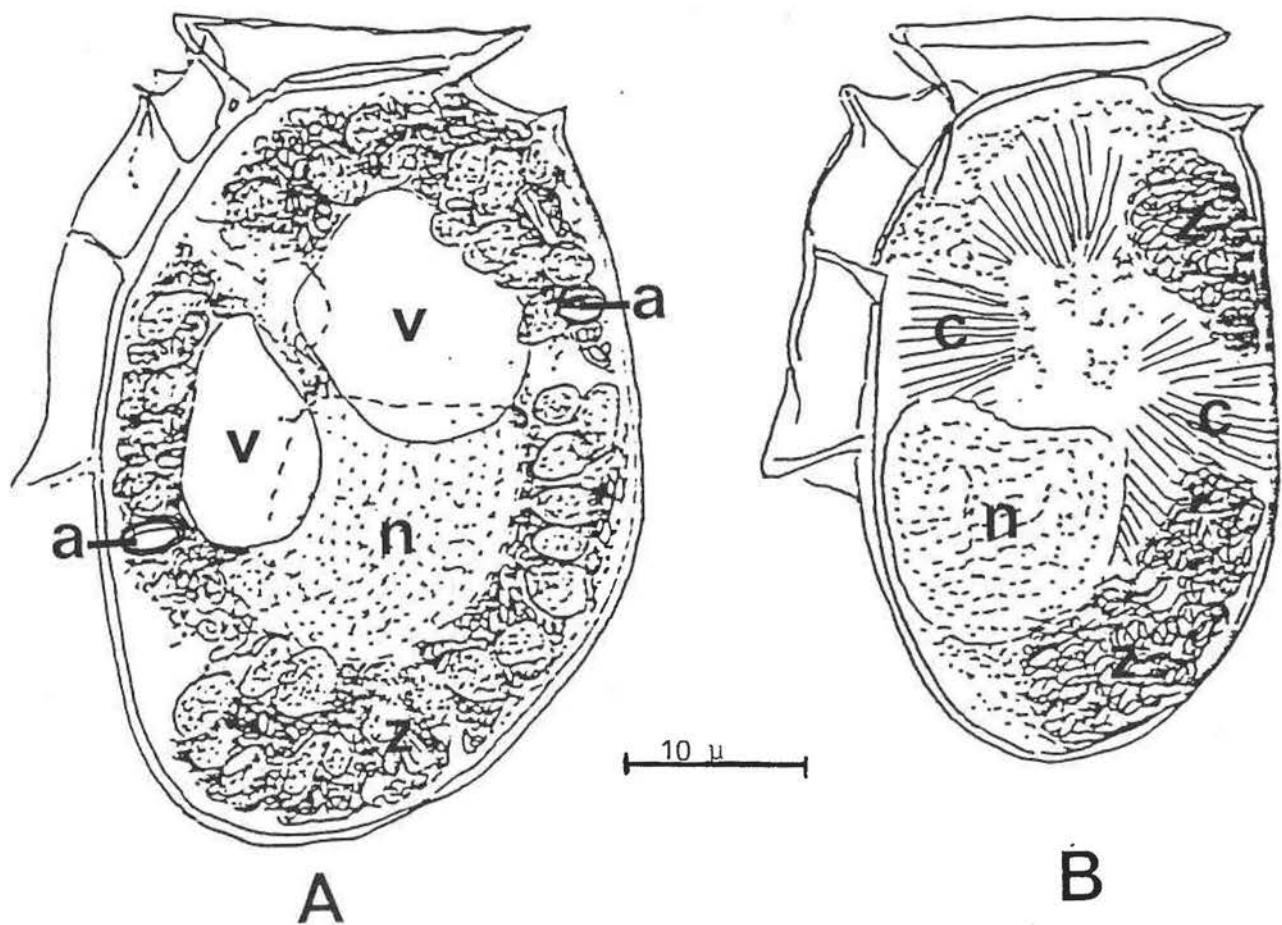


Schéma de deux cellules vivantes de *Dinophysis acuminata* provenant d'Antifer (vues latérales)

A : cellule très mobile

B : cellule peu mobile (observée après quelques jours de maintien de l'échantillon au laboratoire)

n : noyau

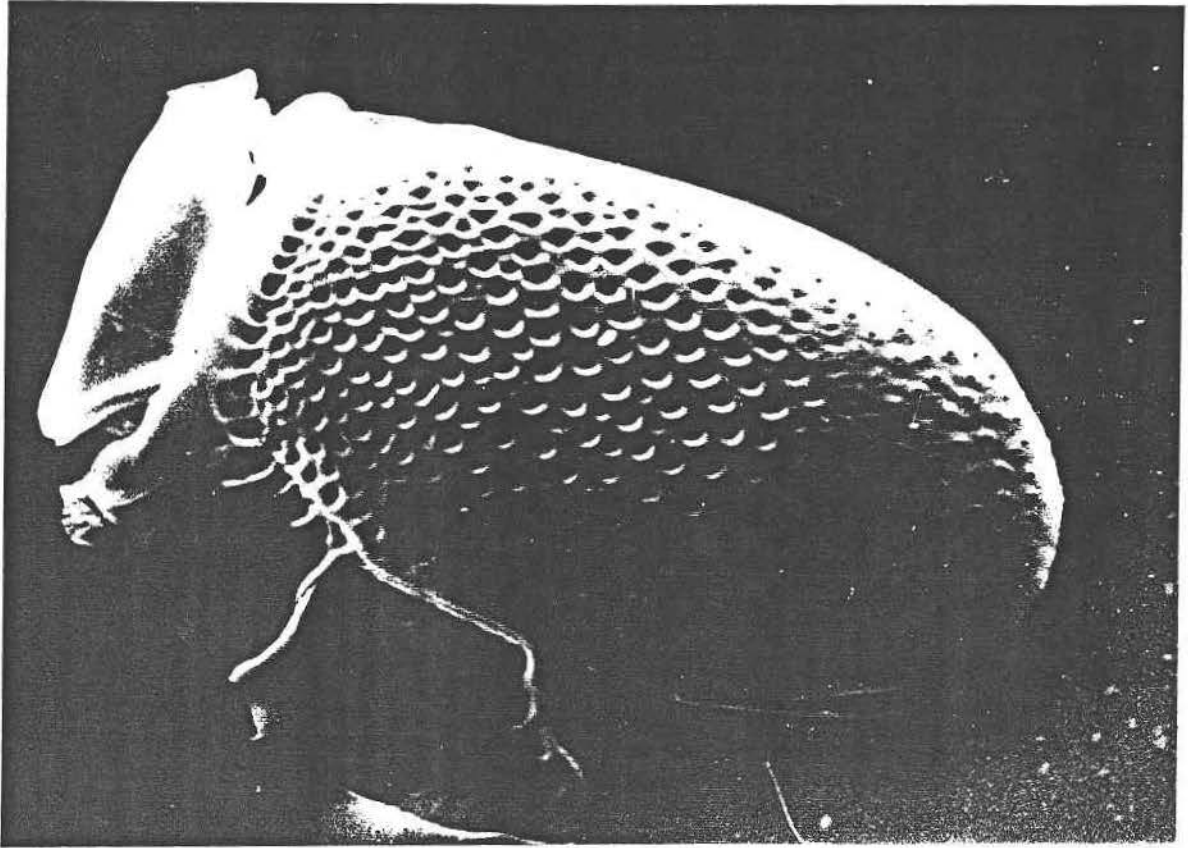
v : grosse vacuole (organe d'osmorégulation ?)

a : grain d'amidon

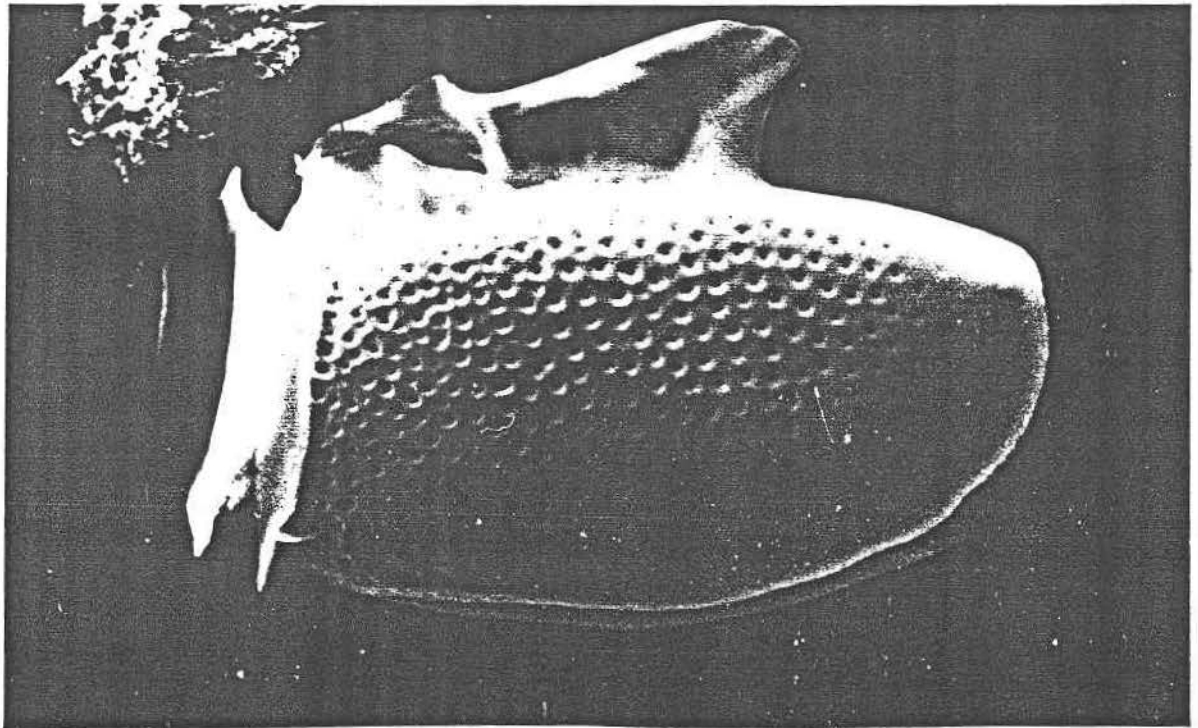
z : zone pigmentée (zone plastidiale ?)

c : "cables" cytoplasmiques (qui pourraient correspondre à certaines structures observées en microscopie électronique à transmission planche VI, photographie B)

Planche I : Aspect de *Dinophysis acuminata* en microscopie électronique à balayage : vues latérales précisant l'aspect des deux valves de l'hypothèque x 3 000 (photographies M. DURAND et A. COUTE).



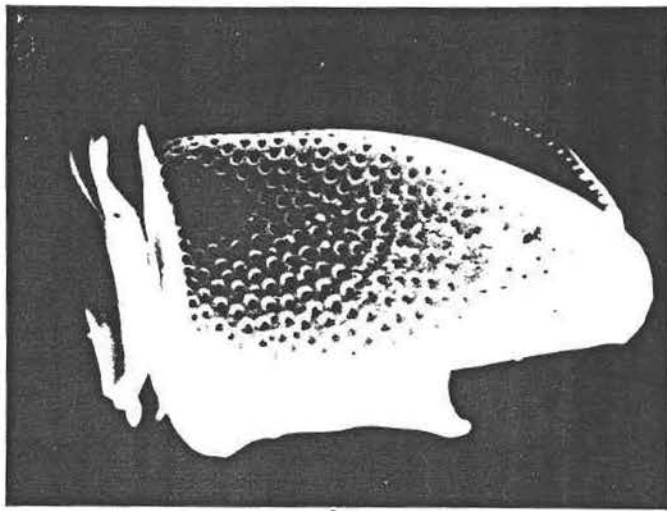
A



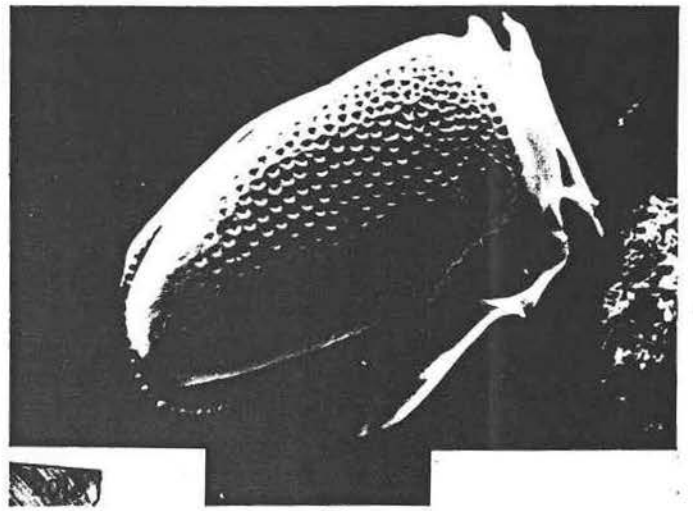
B

Planche II : Aspect de *Dinophysis acuminata* en microscopie électronique à balayage

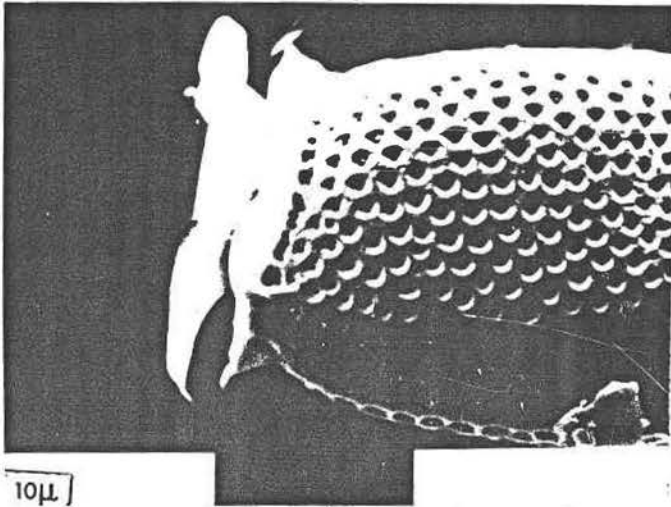
- . photographies A et B : aspect de deux cellules dont les plaques de l'hypothèque se sont ouvertes sous l'impact du faisceau d'électrons. Ceci donne aux cellules un aspect dissymétrique x 1 500
 - . photographies C, D, E, F : détails de la thèque au niveau du cingulum
 - C et E : x 2 600
 - D : x 3 800
 - F : x 3 400
-



A

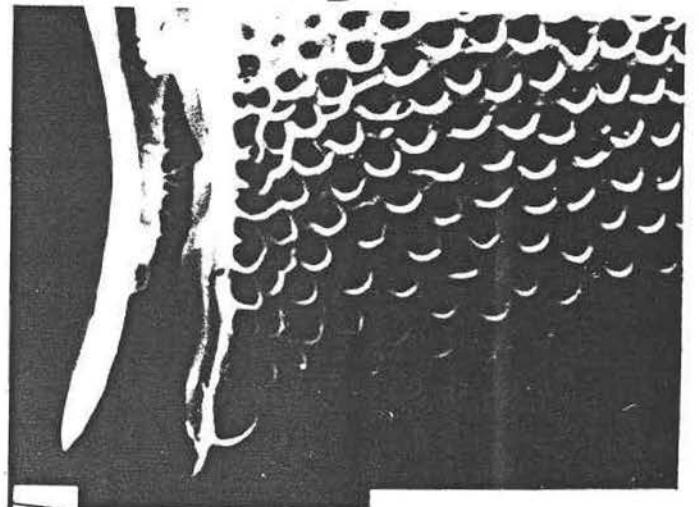


B

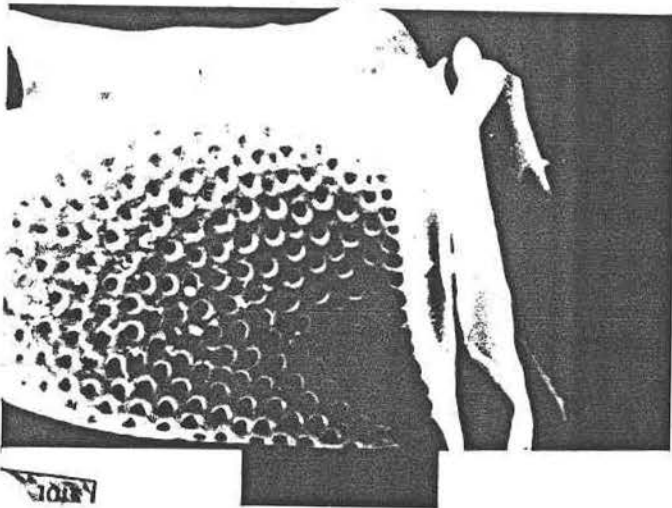


[10μ]

C

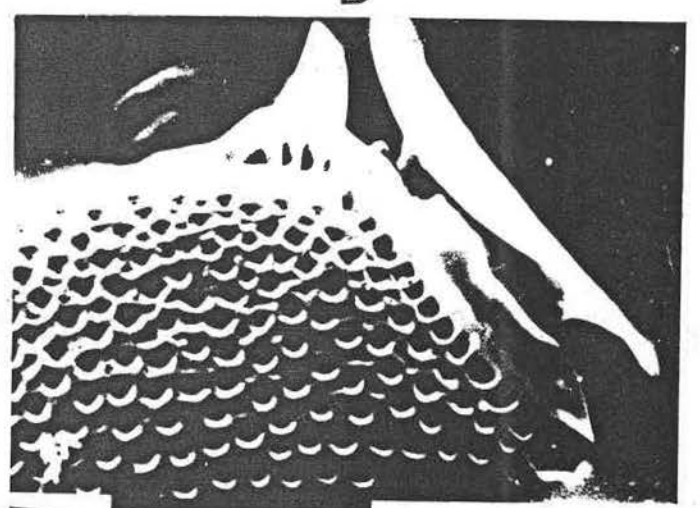


D



[10μ]

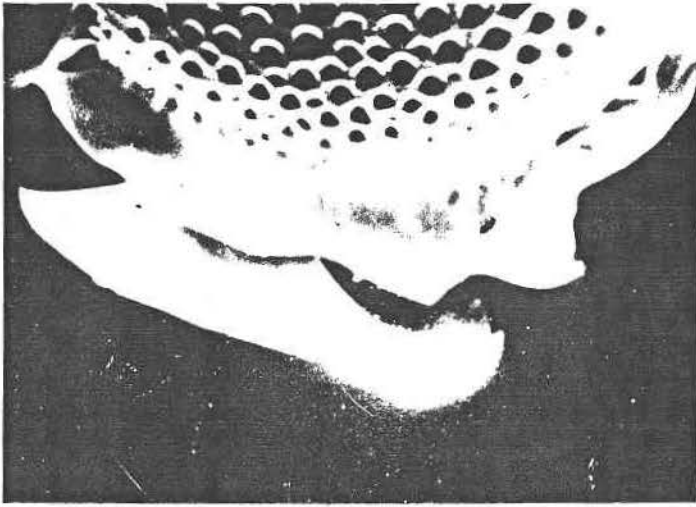
E



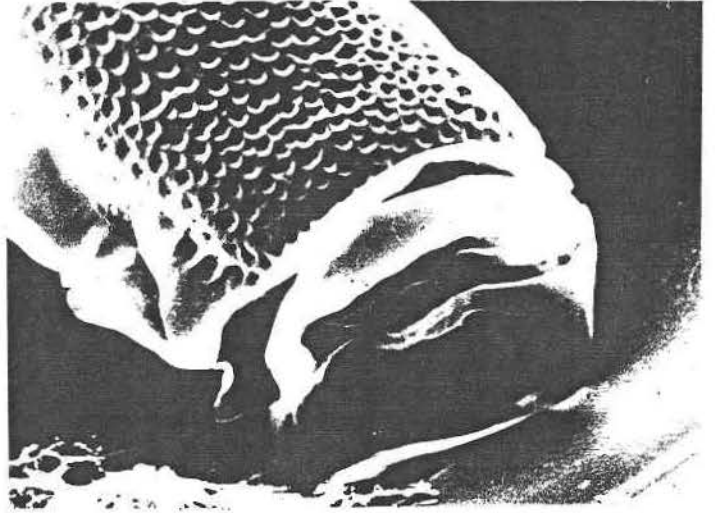
F

Planche III : Aspect de *Dinophysis acuminata* en microscopie électronique
à balayage : détails de la thèque

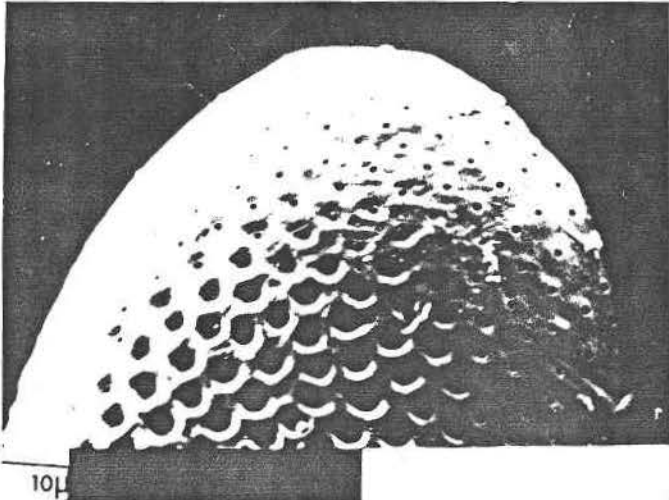
- . photographies A, C et D : x 3 800
- . photographie B : x 2 600
- . photographie E : x 4 800
- . photographie F : x 2 000



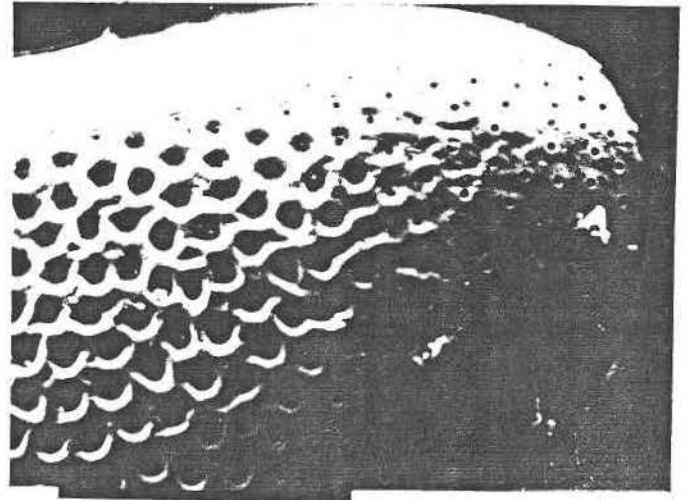
A



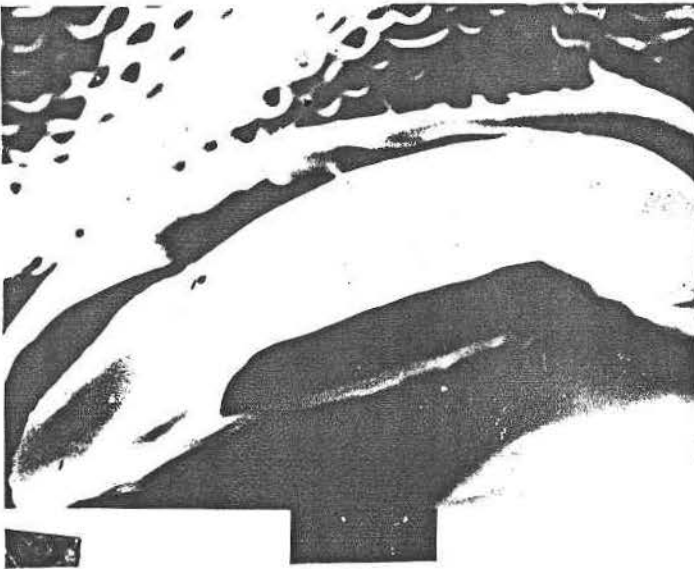
B



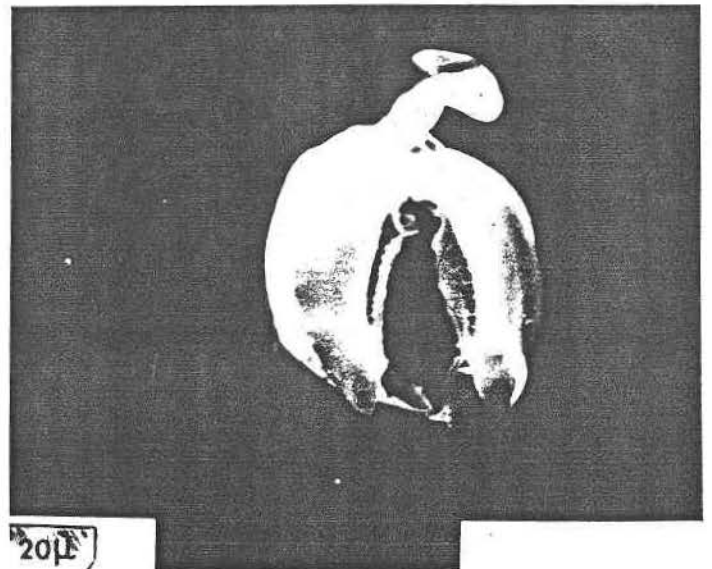
C



D



E



F

Planche IV : Aspect de coupes ultrafines de *Dinophysis acuminata*
(NB : le matériel ayant été conservé au congélateur
présente un cytoplasme très dégradé).

Microscopie électronique à transmission x 6 500.



A



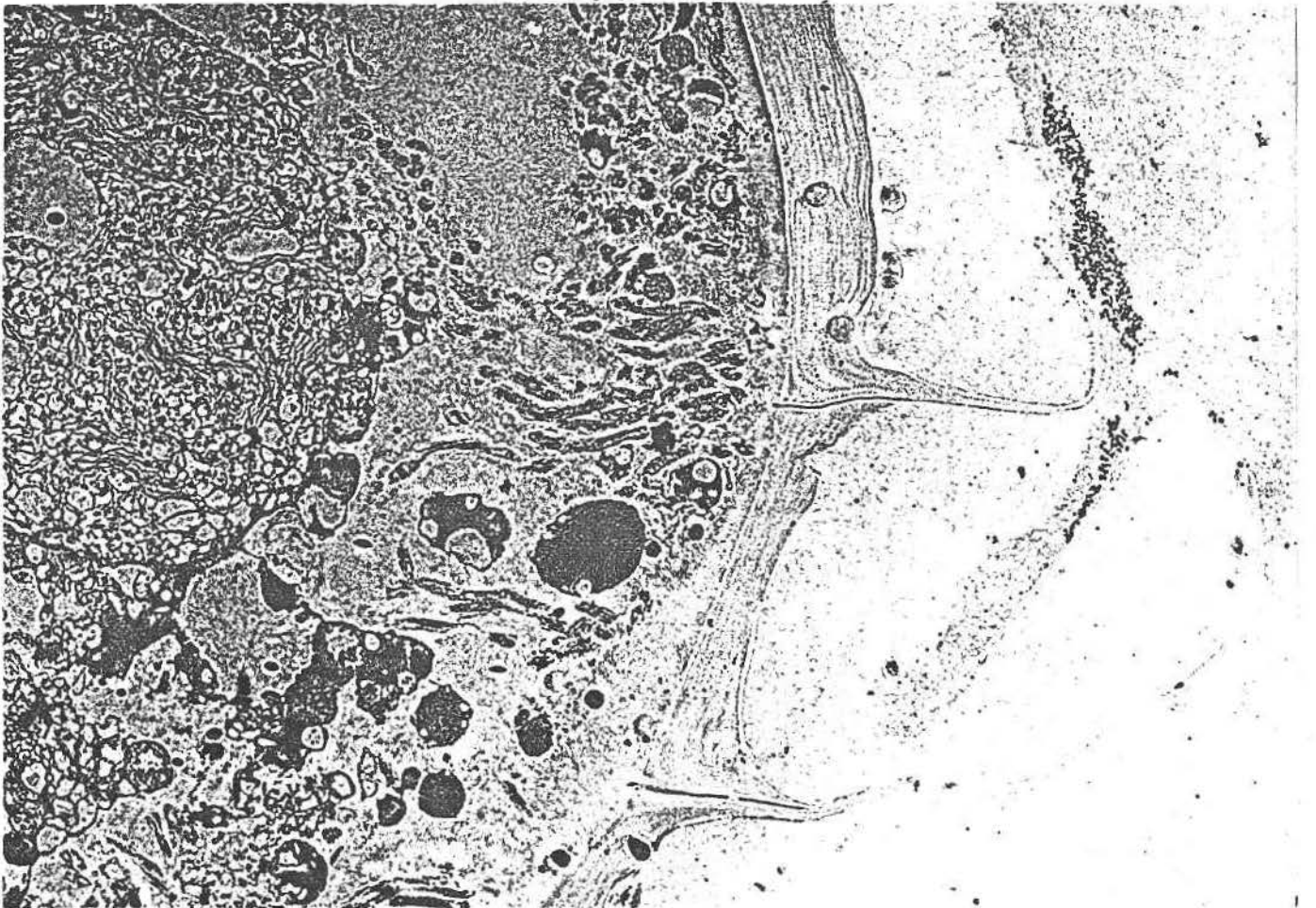
B

Planche V : Détails de l'ultrastructure de *Dinophysis acuminata*

- . photographie A : x 13 000
- . photographie B : x 15 000



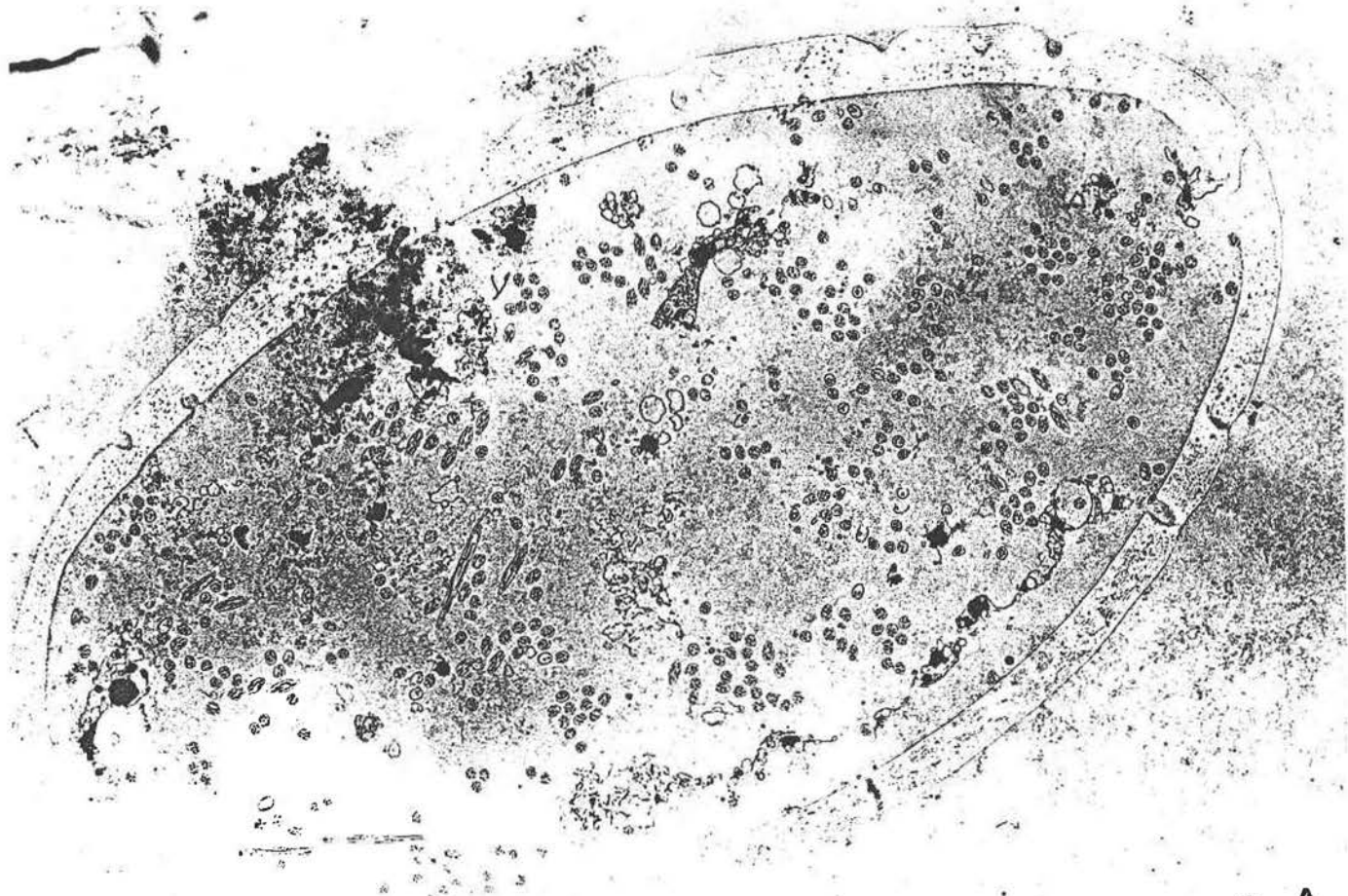
A



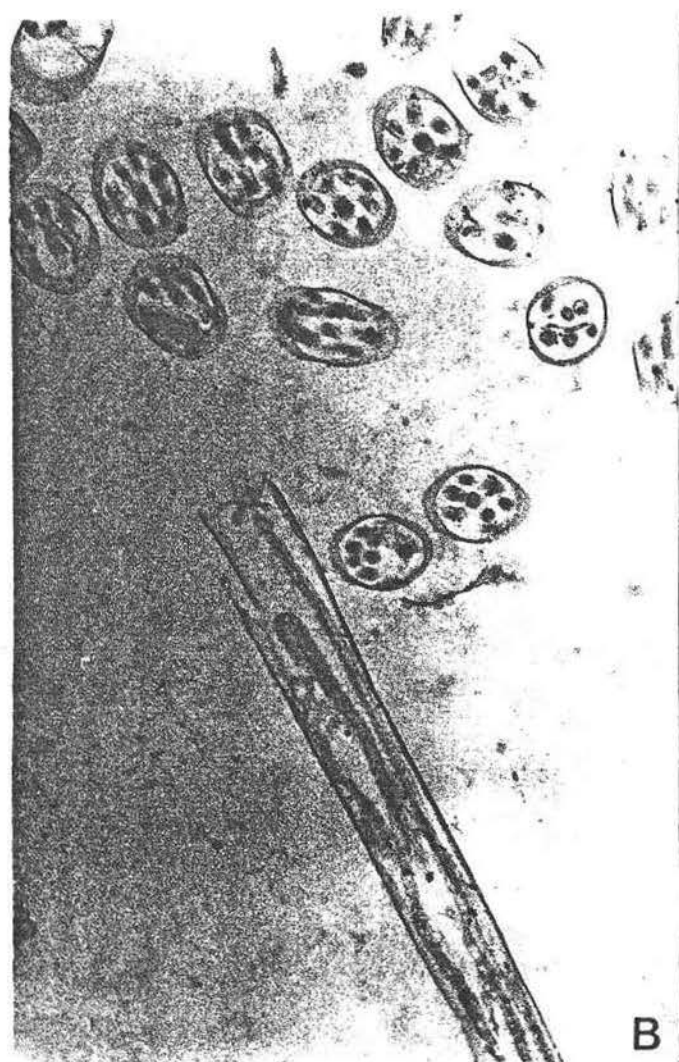
B

Planche VI : Ultrastructure de *Dinophysis acuminata*

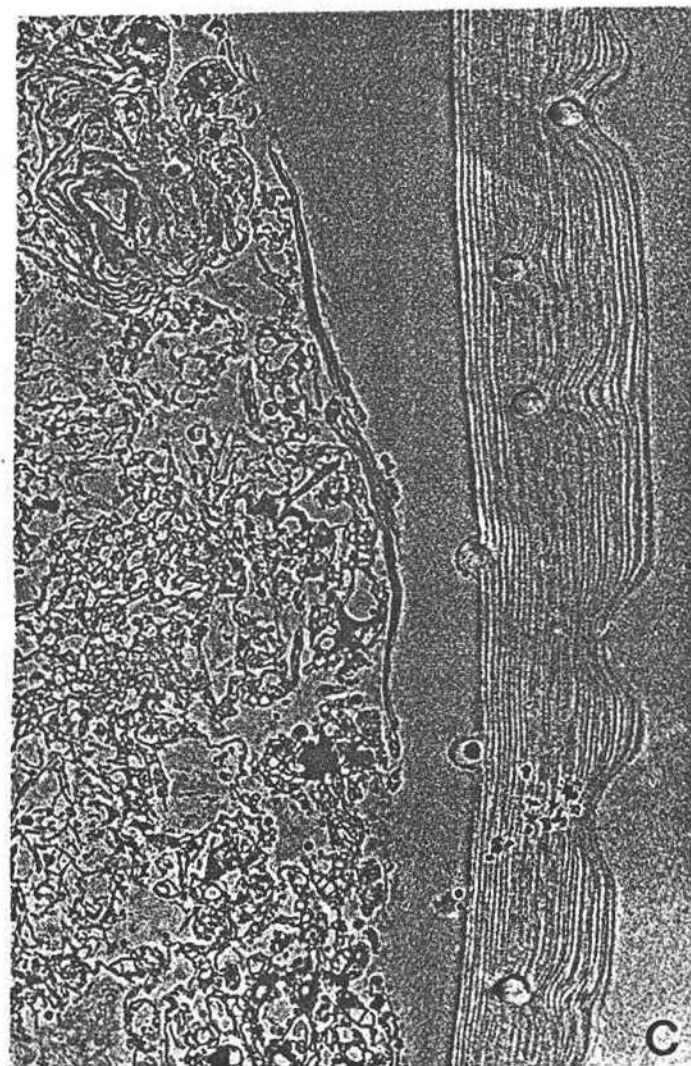
- . photographie A : coupe transversale de l'hypothèque
x 9 500
- . photographie B : détail des structures observées dans
le cytoplasme ("cables du cytosquelette") en coupes
transversales et obliques : x 100 000
- . photographie C : détail de la thèque : x 23 000



A



B



C

Planche VII : Aspects en microscopie optique (fond clair) de
D. acuminata isolés de prélèvements provenant
d'Antifer et ayant été conservés au congélateur
x 500.

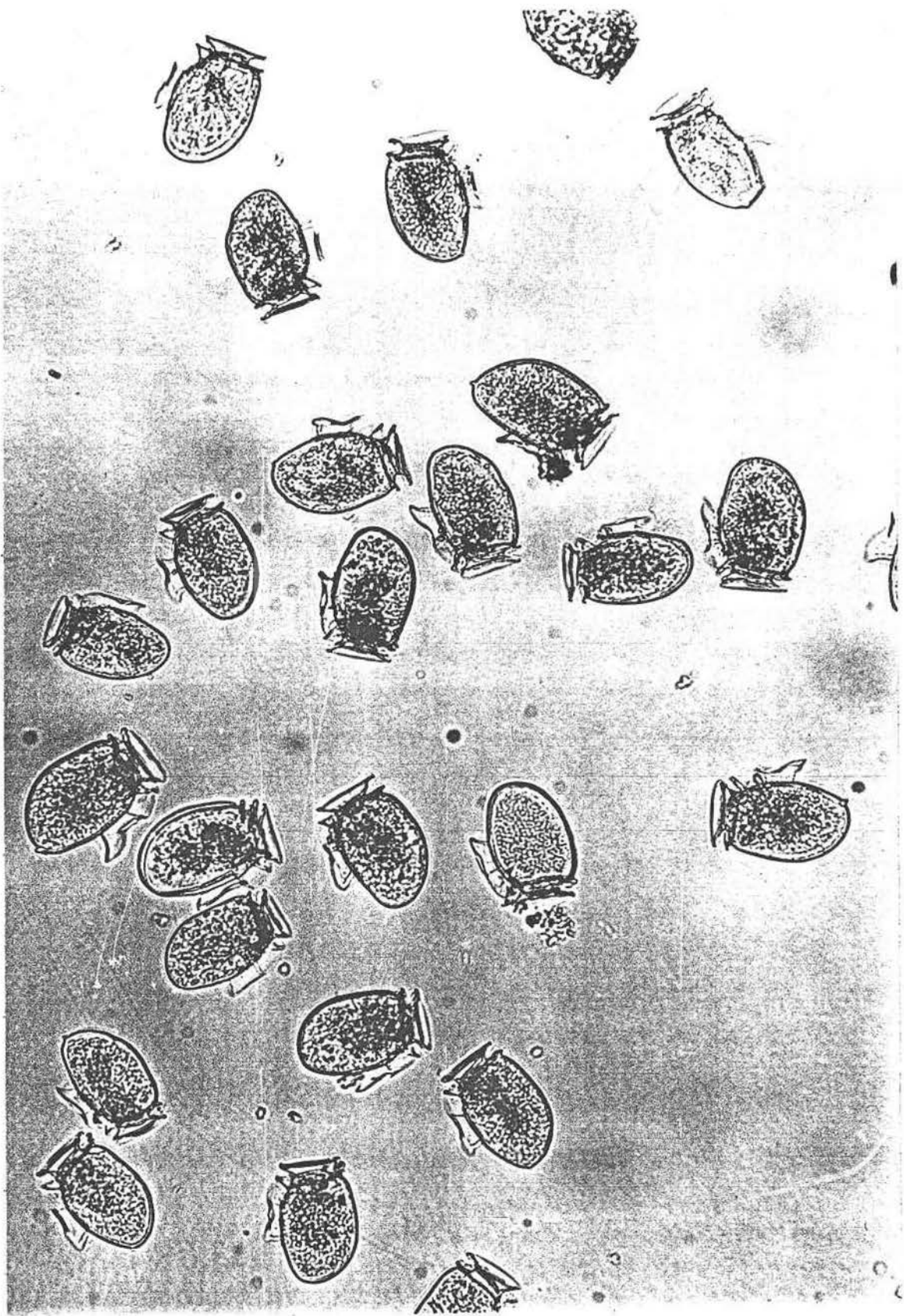


Planche VIII : Aspects en microscopie optique (contraste interférentiel de Nomarski) de *D. acuminata* d'Antifer (x 400).

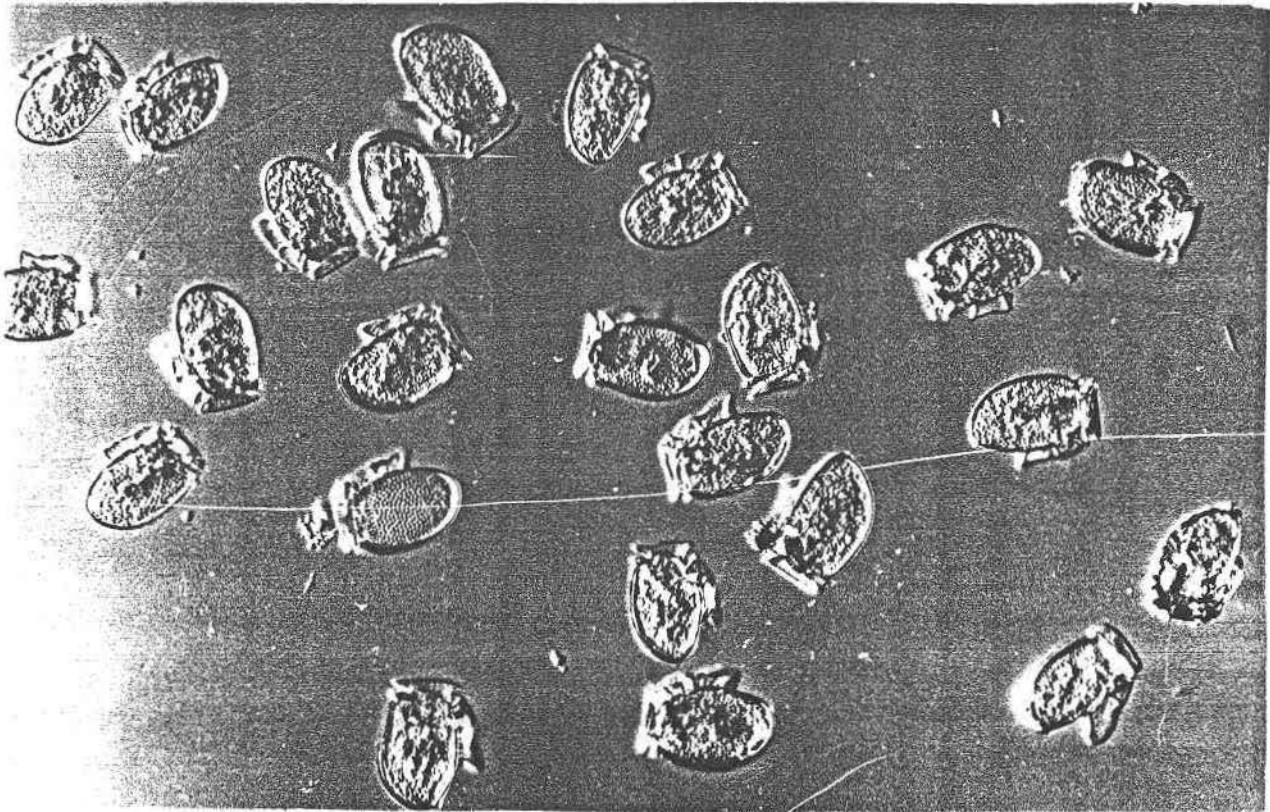
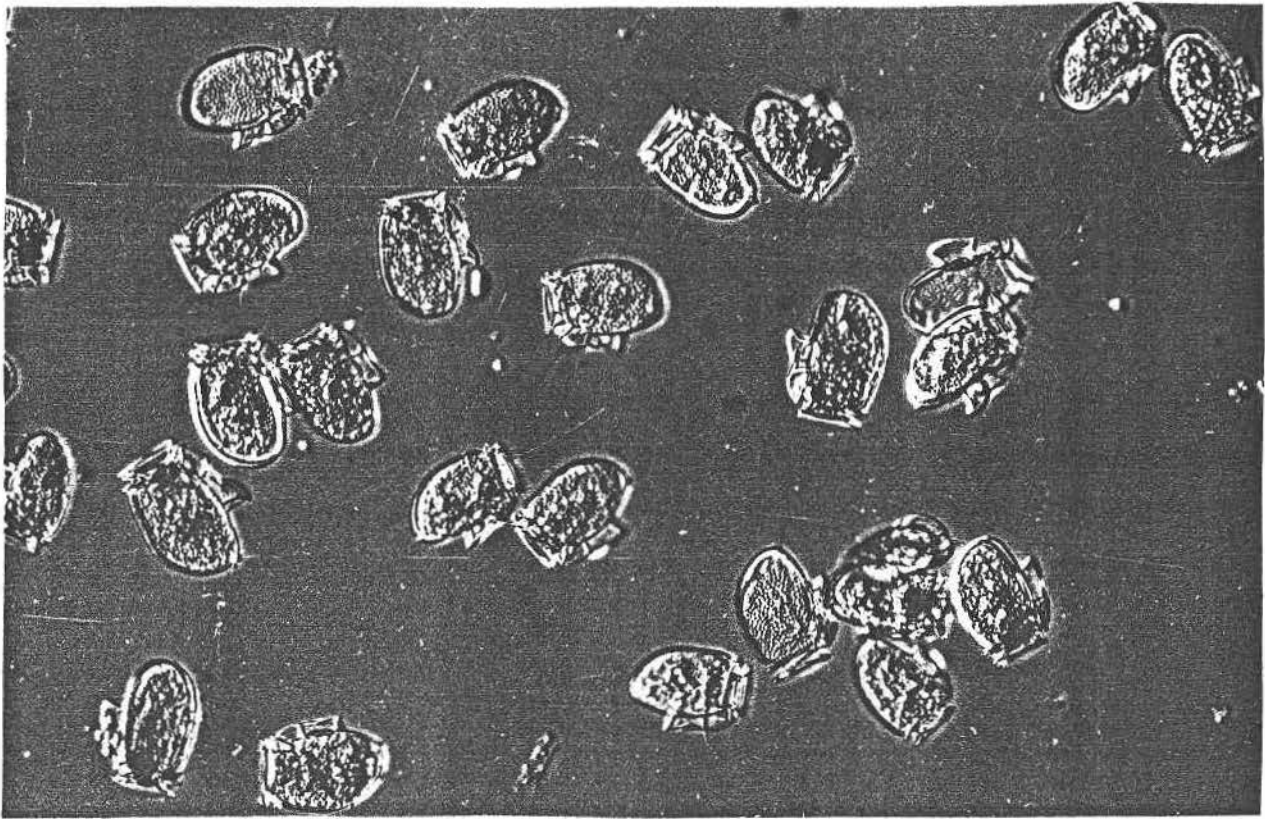


Planche IX : Quelques aspects de *D. acuminata* d'Antifer (toutes les photographies présentent le même grossissement) x 850.

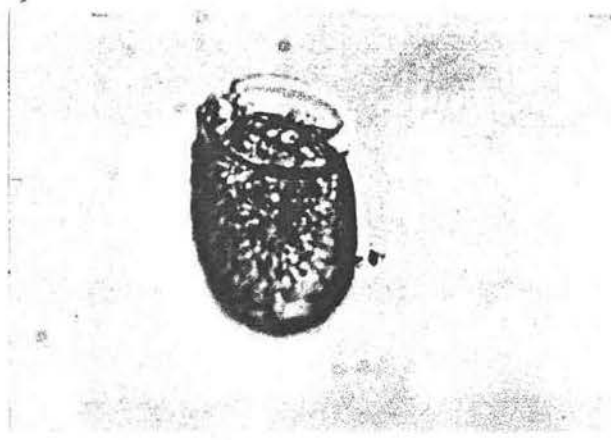
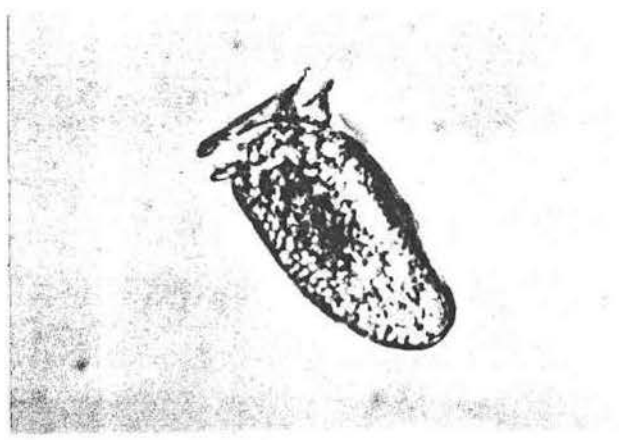
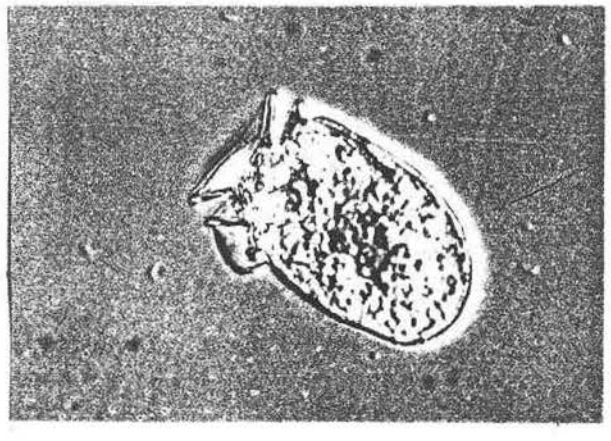
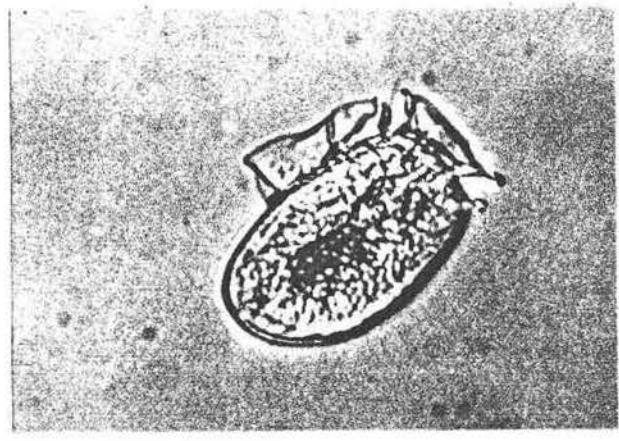
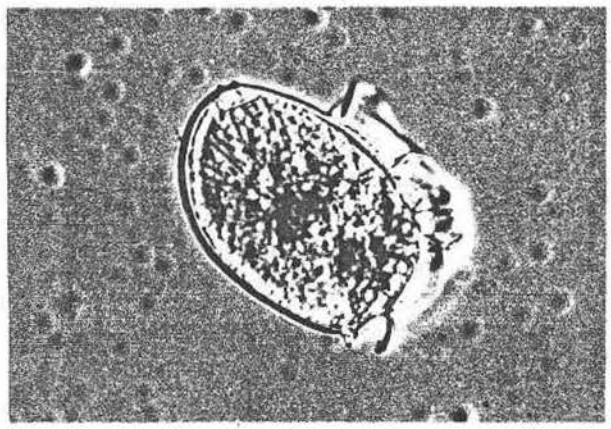
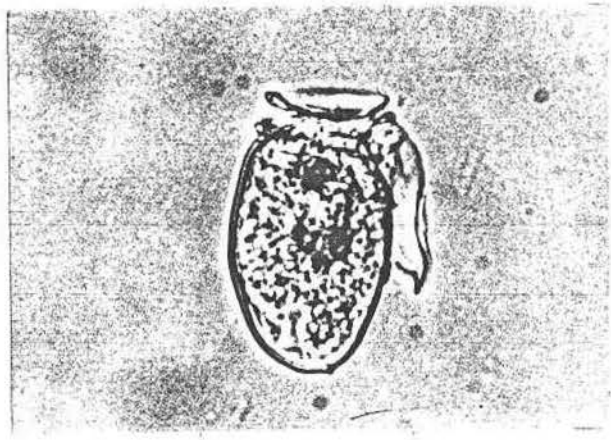
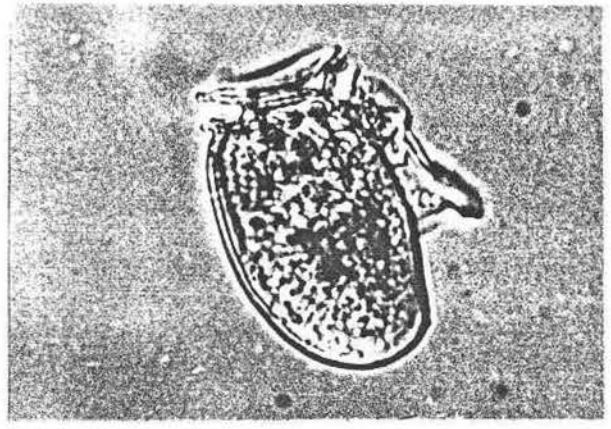
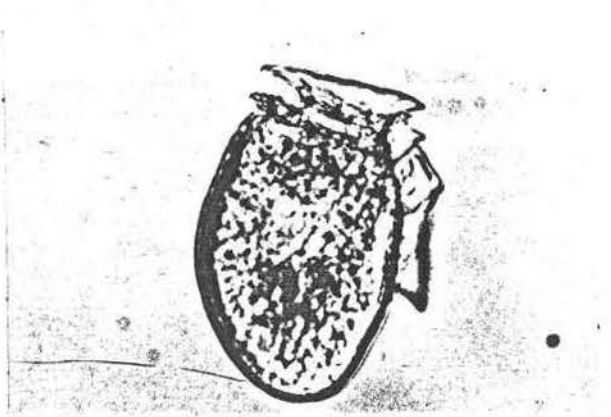


Planche X : Aspects de *D. acuminata* en microscopie optique

- photographie A : x 1 000
- photographie B et C : x 950

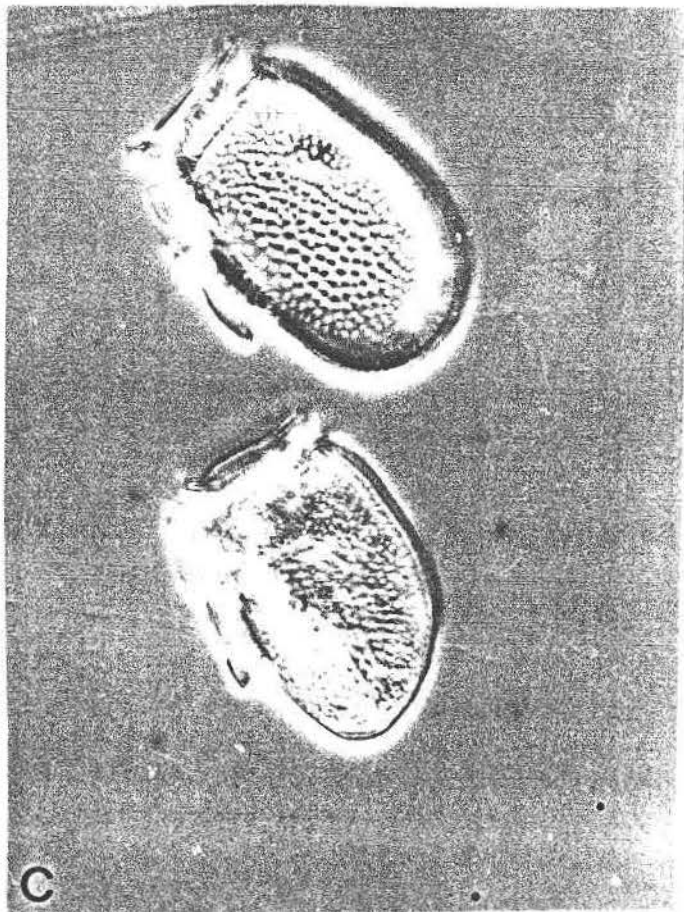
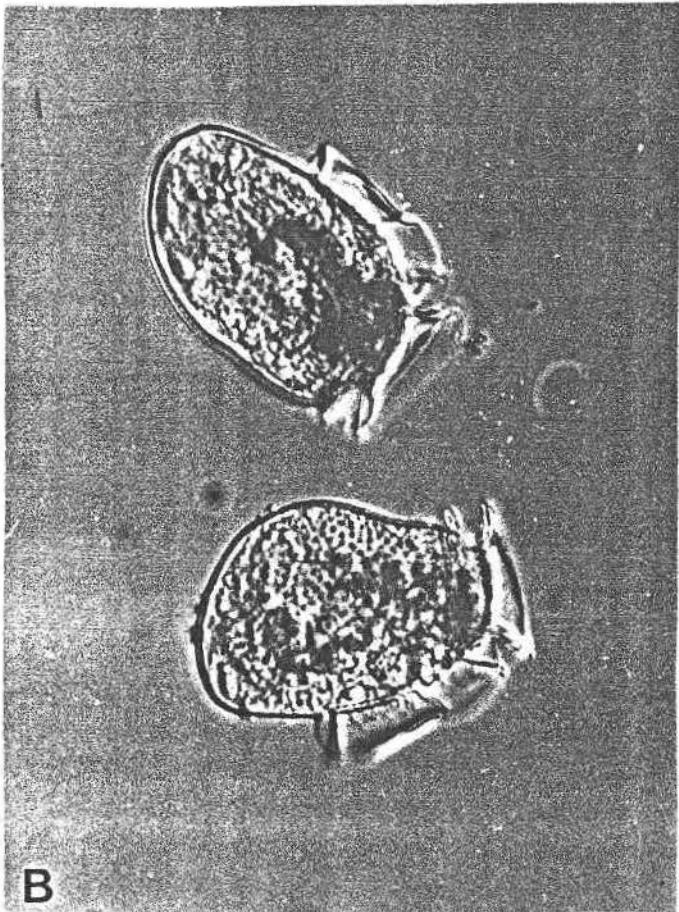
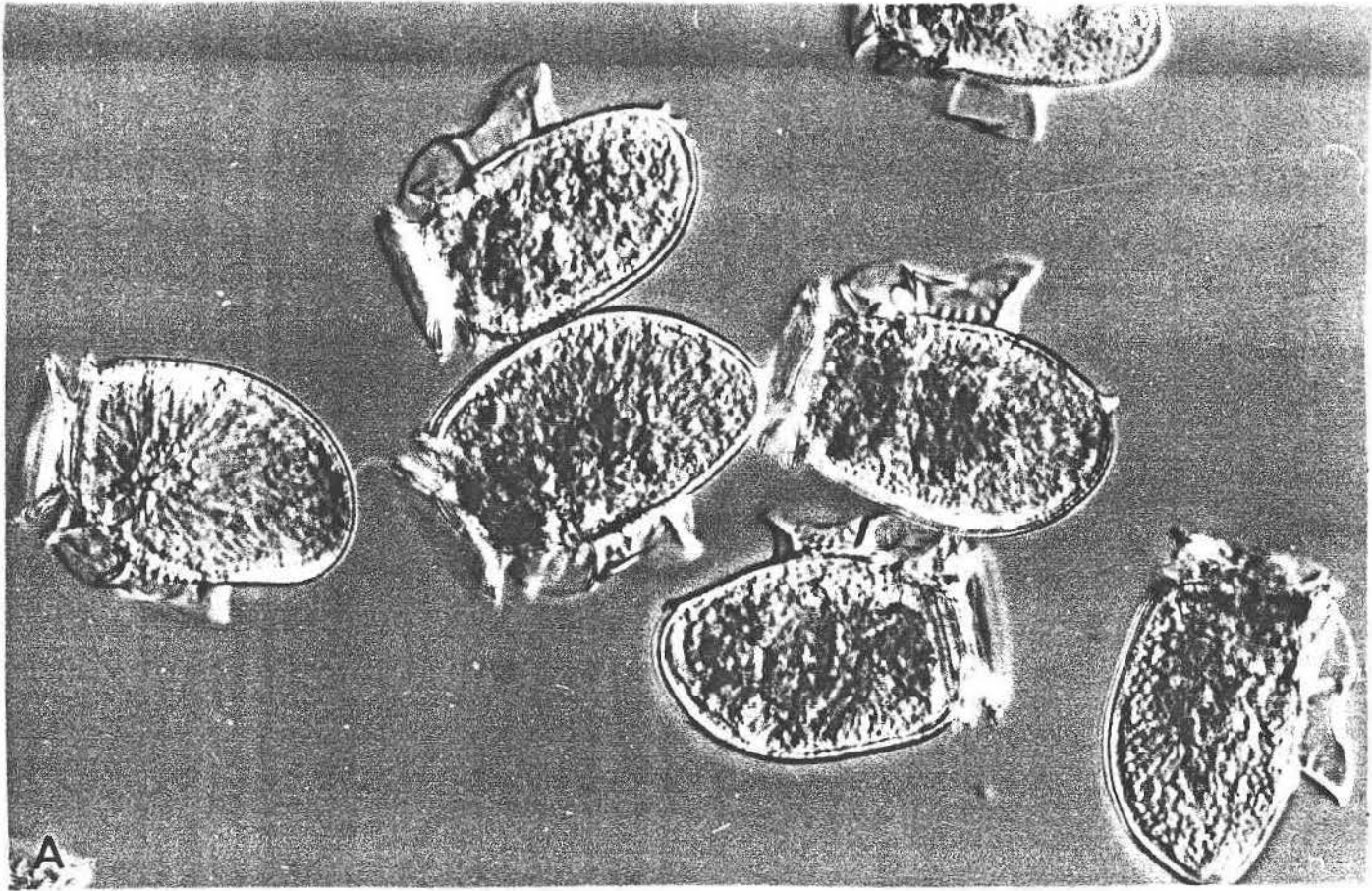


Planche XI : Détails de cellules de *D. acuminata* en microscopie optique :
x 1 600

Photographies A et B : même cellule observée selon deux
coupes optiques différentes. A = cytoplasme, B = thèque.
Même chose pour C et D.

Noter la présence de "cables" cytoplasmiques bien développés.
Ces cables peuvent parfois être observés sur du matériel
vivant.

