

61201

E450-1100-E

**Programme National Efflorescences Algales Toxiques
Volet Efflorescences**

**EFFETS DES POLYAMINES SUR LA CROISSANCE DU
PHYTOPLANCTON**

Complément de l'étude

Annick Hourmant*, Geneviève Arzul**

* UBO, Laboratoire de physiologie des Systèmes Intégrés, 29285 Brest cédex

** IFREMER-DEL-EC, BP 70, 29280 Plouzané

DEL-EC/99-03/Brest

IFREMER Bibliothèque de BREST



0EL07944

Résumé

Les résultats ont montré la production de polyamines:

-au cours du développement *in vitro* d'une population de diatomées, et ceci quels que soient les milieux d'enrichissement et l'espèce algale (*Chaetoceros gracile* ou *Thalassiosira weissflogii*).

-au cours de la dégradation à l'obscurité, d'un concentrat de cellules phytoplanctoniques, prélevé lors du bloom printanier en rade de Brest.

La production de polyamines est corrélée à la biomasse algale. Parmi les molécules détectées on observe des traces de spermidine et de spermine; la putrescine étant dans tous les cas très largement prédominante. Des molécules acétylées (acétyl-spermidine et acétyl-spermine) sont également détectées, et plus particulièrement en fin de culture.

Dans le milieu de dégradation, la disparition rapide de la putrescine en moins d'une semaine, pourrait résulter d'une activité bactérienne intense, comme semble le démontrer l'apparition du nitrate au détriment de l'ammonium. On ne peut toutefois exclure une participation d'enzymes hydrolytiques libérées par les cellules algales sénescences.

Des expériences faites avec la putrescine-¹⁴C montrent que l'absorption de cette diamine par le dinoflagellé *G. mikimotoi* présente à la fois une composante passive et une composante dépendante du métabolisme qui est largement majoritaire. Cette absorption active, suivie en fonction de la concentration en substrat, révèle la participation d'un système saturable de transport, de nature protéique, avec un Km de 43 µmoles et une Vmax de 27 nmole/h/10⁶ cellules.

Les résultats obtenus montrent que la putrescine est donc consommée de façon active par *G. mikimotoi*. Cette observation constituerait une étape importante dans la compréhension du mode d'action de cette substance.

Programme National Efflorescences Algales Toxiques Volet Efflorescences

EFFETS DES POLYAMINES SUR LA CROISSANCE DU PHYTOPLANCTON

Complément de l'étude

Annick Hourmant*, Geneviève Arzul**

* UBO, Laboratoire de physiologie des Systèmes Intégrés, 29285 Brest cédex

** IFREMER-DEL-EC, BP 70, 29280 Plouzané

1 Introduction

Parmi les substances azotées de la matière organique dissoute, les polyamines semblent jouer un rôle particulier. Ces molécules sont des produits de décarboxylation de l'arginine et de l'ornithine, acides aminés basiques dont le dernier est le 2^{ème} en abondance (après la leucine) dans les populations vieillissantes de la diatomée *Chaetoceros gracile* (Poulet & Martin-Jezequel, 1983). Les polyamines comprennent différentes molécules : la putrescine, la cadavérine, la spermine, la spermidine...; et résultent d'une façon générale, de toute dégradation de matière organique. Or ces molécules se rencontrent aussi dans les cellules algales en cours de division (Hourmant *et al.*, 1994), principalement au début de la phase S (Maiss *et al.*, 1982) et avant l'augmentation des concentrations en ARN, ADN et protéines (Evans & Malmberg, 1989).

Il paraît intéressant de rapprocher de ce contexte les observations effectuées *in situ* lors de campagnes océanographiques, sur les sites où l'algue *Gymnodinium mikimotoi* a été détectée (Birrien *et al.*, 1985 ; Arzul *et al.*, 1993). Ce dinoflagellé susceptible de produire des efflorescences responsables de mortalités dans la faune marine, se développe en effet dans des masses d'eaux correspondant à une zone d'accumulation de substances organiques provenant en particulier de diatomées sénescences. Les concentrations maximales en putrescine mesurées *in situ* dans de telles masses d'eaux (zone frontale de mer d'Iroise) étaient de l'ordre de 0.1 $\mu\text{mole.l}^{-1}$. Or, des milieux de culture enrichis en putrescine à faible concentration (< 1 μM) tendent à stimuler la croissance du dinoflagellé *G. mikimotoi* (C. Videau).

Si les dinoflagellés sont sensibles aux concentrations en polyamines produites par les populations printanières de diatomées en phase de sénescence et si les fenêtres d'activité sont notablement différentes, la succession des espèces algales pourrait être basée non plus seulement sur les équilibres en éléments nutritifs minéraux, mais également sur la qualité des substances organiques dissoutes. Ainsi, *G. mikimotoi* non seulement bénéficie de la reminéralisation de la matière organique produisant un flux d'ammonium (Le Corre *et al.*, 1993), mais pourrait également profiter de certains facteurs de croissance comme la putrescine.

L'objectif de cette étude est de préciser les conditions de production de la putrescine (et autres polyamines) au cours de la croissance de deux diatomées: *Chaetoceros gracile* et *Thalassiosira weissflogii*, poussées dans deux milieux enrichis différemment. Parallèlement, nous avons effectué un suivi de l'apparition des polyamines et d'autres formes azotées minérales dans un concentrat de cellules planctoniques provenant d'un bloom printanier, placé en conditions de dégradation. Cette étude a été complétée par une analyse de l'absorption de la putrescine marquée au ¹⁴C par le dinoflagellé *G. mikimotoi*.

2 Matériel et méthodes

2.1: matériels utilisés

2.1.1 Cultures de diatomées

Les diatomées utilisées pour le suivi de la production de polyamines, sont *Chaetoceros gracile* et *Thalassiosira weissflogii*. Elles peuvent être considérées comme représentatives des diatomées qui prédominent dans le bloom printanier. Leur culture est réalisée en routine en laboratoire, en eau de mer océanique de salinité 34, autoclavée. Pour l'expérience, deux enrichissements en éléments nutritifs ont été testés sur chaque espèce parallèlement: le milieu optimum f/2 (Guillard & Ryther, 1962), et un milieu plus proche des conditions naturelles observées en fin d'hiver en rade de Brest: milieu post-hivernal (Le Pape *et al.*, 1995.). L'enrichissement initial apporté aux cultures est résumé dans le tableau 1. Les cultures sont maintenues à 18°C, en éclairage alterné jour/nuit (12h/12h) d'intensité 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Le suivi des cultures en densité cellulaire et en caractéristiques chimiques, est réalisé régulièrement. Pour cela, 200 ml d'eau sont prélevés dans chacun des quatre ballons après homogénéisation, les cellules sont comptées au microscope à la cellule de Malassez, et les échantillons pour analyses sont préparés selon le protocole défini ultérieurement.

Tableau 1. Concentrations en éléments nutritifs introduits dans les cultures avant ensemencement, en fonction des milieux testés.

	Milieu f/2	Milieu post-hivernal
N-NO ₃	880 μM	23 μM
P-PO ₄	36 μM	0.4 μM
Vitamines	0.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de B12 et biotine, 0.1 mg.l^{-1} de thiamine	
Métaux en μM	11.7 Fe, 0.08 Zn, 0.9 Mn, 0.03 Mo, 0.05 Co, 0.04 Cu.	

2.1.2 Dégradation du concentrat de cellules

La cinétique de dégradation des substances organiques provenant du bloom printanier est réalisée à partir d'un concentrat de cellules phytoplanctoniques. Celui-ci, collecté le 17 avril sur un filtre à l'entrée des bacs d'élevage de l'écloserie de coquilles Saint-Jacques du Tinduff (rade de Brest), concentre les diatomées du bloom printanier. L'échantillon est maintenu 24h à l'obscurité à 4°C en attendant son transfert au laboratoire. Une observation des espèces présentes est effectuée avant la répartition des quatre litres dans deux flacons de verre brun. Les deux sous-échantillons sont maintenus à 18°C en salle de culture, chacun avec léger bullage d'air, et protégés de la lumière. Après homogénéisation, 200 ml d'eau sont prélevés dans chaque flacon toutes les semaines, et les échantillons pour analyses sont préparés selon le protocole défini ultérieurement.

2.1.3 Culture du dinoflagellé

Le dinoflagellé utilisé comme modèle pour l'absorption des polyamines est *Gymnodinium mikimotoi*, souche isolée durant un bloom en rade de Brest en 1995 (E. Erard). Sa culture est maintenue en laboratoire en conditions contrôlées d'enrichissement: f/2, température: 18°C, et lumière: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avec une alternance jour/nuit (12h/12h). La croissance de la culture est suivie par comptage cellulaire à la cellule de Malassez.

2.2 méthodes d'analyses utilisées

2.2.1 Sels nutritifs

L'eau prélevée dans les ballons de culture et dans les flacons de verre brun est passée sur filtres Whatman GF/F préalablement brûlés deux heures à 450°C et maintenus à l'abri des contaminations. Une partie des filtrats est conservée dans des flacons de polyéthylène puis congelés à -20°C pour analyse des sels nutritifs par les méthodes standards, à l'auto-analyseur Technicon (Tréguer & Le Corre, 1975). Les sels ainsi mesurés sont: P (PO_4), N($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) dans les cultures de diatomées (l'analyseur de NH_4 s'était montré défectueux au moment de ces analyses), N($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) et N- NH_4 dans les flacons de dégradation.

2.2.2 Matériel particulaire

L'analyse chimique en C et N du matériel particulaire retenu sur les filtres GF/F est réalisée par oxydation et chromatographie en phase gazeuse, à l'auto-analyseur Leco. Les filtres sont conservés à -20°C en attendant l'analyse, puis séchés 12h à 50°C.

2.2.3 Polyamines

Les polyamines sont analysées dans les filtrats (25 ou 50 ml) conservés en flacons de verre (préalablement passés au four deux heures à 450°C pour éliminer les contaminations organiques) puis congelés et conservés lyophilisés.

2.2.3.1 Extraction de NaCl

L'extraction des PAs a nécessité l'élimination préalable du maximum de NaCl, gêne pour le dosage des PAs.

Le lyophilisat est repris par 6 ml de méthanol et centrifugé pour éliminer une première fraction de NaCl ; le surnageant est ensuite concentré au Speed-Vac jusqu'à obtention d'un volume final de 1 ml qui est alors soumis à une nouvelle centrifugation pour éliminer à nouveau du NaCl ; le surnageant est ensuite totalement éliminé au Speed-Vac et le résidu est repris par 400 μl de HClO_4 (5%).

2.2.3.2 Dansylation

La dansylation est réalisée selon la méthode de Florès et Galston (1982). A cet effet l'extrait perchlorique est additionné de 400 μl de Na_2CO_3 (à saturation) et de 400 μL de chlorure de dansyl (5 mg/ml d'acétone). Après une nuit à température ambiante, 200 μl de proline (200 mg/ml) sont ajoutés pour éliminer l'excès de chlorure de dansyl. Les PAs dansylées sont alors extraites par du benzène et la séparation des 2 phases est améliorée par centrifugation.

2.2.3.3 Dosage des PAs

Le dosage des PAs est réalisé après évaporation du benzène et reprise par du méthanol selon la méthode décrite par Féray *et al* (1992). Un exemple de chromatogramme comportant les différents standards est montré dans la figure 1 et les temps de rétention des différentes PAs sont consignés dans le tableau 2 ; un chromatogramme représentatif des dosages effectués dans l'eau de mer est rapporté dans la figure 2.

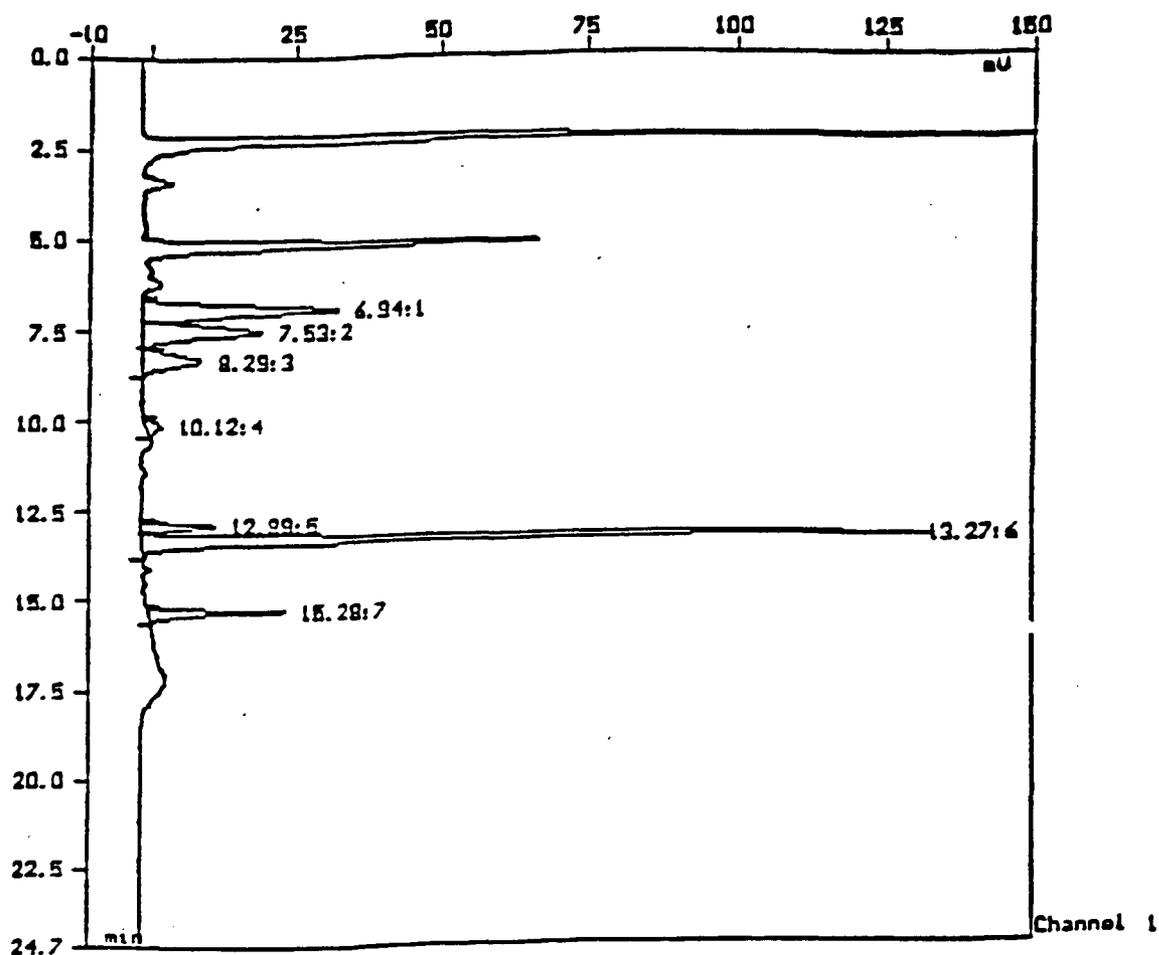


Figure 1 : Chromatogramme des polyamines contenues dans le mélange standard.

Tableau 2 : Concentrations des polyamines du mélange standard, exprimées en nmol/ml de méthanol (AcSpd = Acétylspermidine, Put = Putrescine, Cad = Cadavérine, Hist = Histamine, AcSpm = Acétylspermine, Spd = Spermidine, Spm = Spermine).

Polyamine	AcSpd	Put	Cad	Hist	AcSpm	Spd	Spm
Concentration	0,5	0,3525	0,204	2,0	0,5	0,81	0,083
Temps de rétention (min.)	6,94	7,53	8,29	10,12	12,89	13,27	15,28

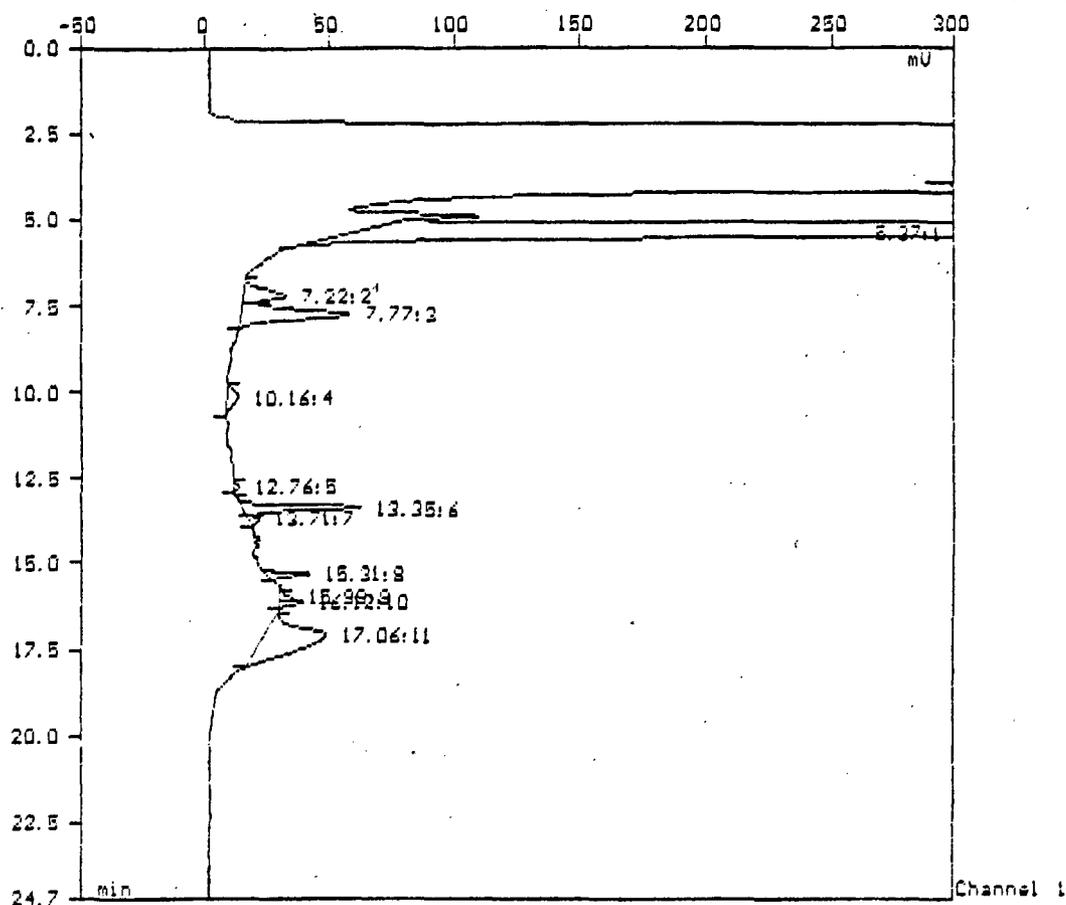


Figure 2 :Exemple de chromatogramme de polyamines obtenu à partir d'un échantillon d'eau de mer (ici filtrat de culture de diatomées, après une semaine de dégradation).

2.3 : absorption de la putrescine

Les cultures de *Gymnodinium mikimotoi* sont utilisées 8 jours après ensemencement en milieu f/2.

La suspension algale est additionnée de putrescine à la concentration appropriée et 5 minutes plus tard de la putrescine ^{14}C (Amersham) est ajoutée, à raison de 0,5 à 1 KBq/ml. Pour chaque point expérimental, 10 ml de suspension sont filtrés sur des filtres Whatman GF/F et il est procédé à 3 lavages successifs par 5 ml de putrescine (1 mM) dans l'eau de mer. La radioactivité est mesurée après addition aux filtres de 5 ml de liquide scintillant (ACS, Amersham).

La quantité de putrescine absorbée est calculée à partir de la radioactivité spécifique du milieu d'absorption mesurée par prélèvement de 100 μl de suspension marquée à t_0 .

Pour apprécier la part métabolique de l'absorption, du NaCN (0,5 mM) est ajouté à la suspension algale.

3 Résultats

L'évolution des différents paramètres étudiés est présentée sur les figures 3 à 8.

3.1 Evolution des densités cellulaires

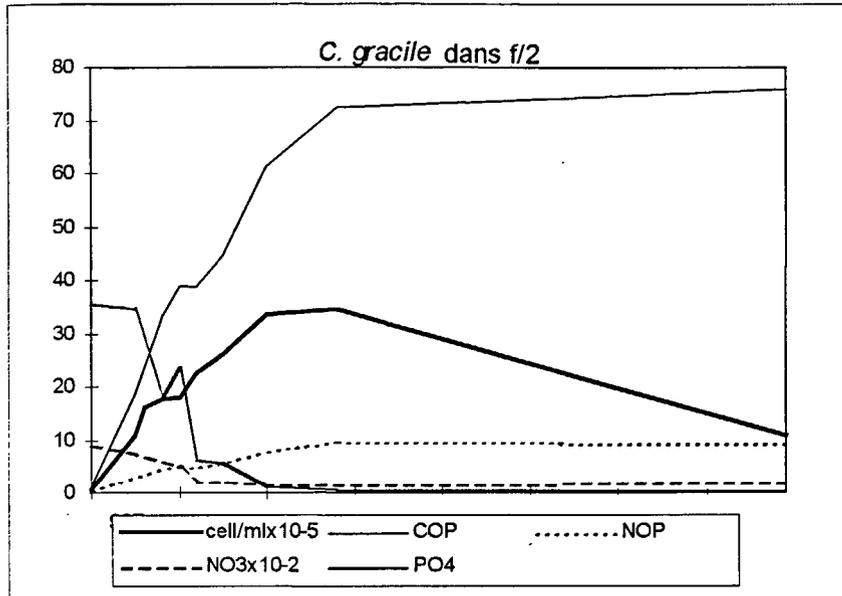


Figure 3. Evolution des différents paramètres étudiés dans la culture de *Chaetoceros gracile* dans le milieu f/2. COP et NOP en mg.l^{-1} , NO_3 et PO_4 en μM de N et P.

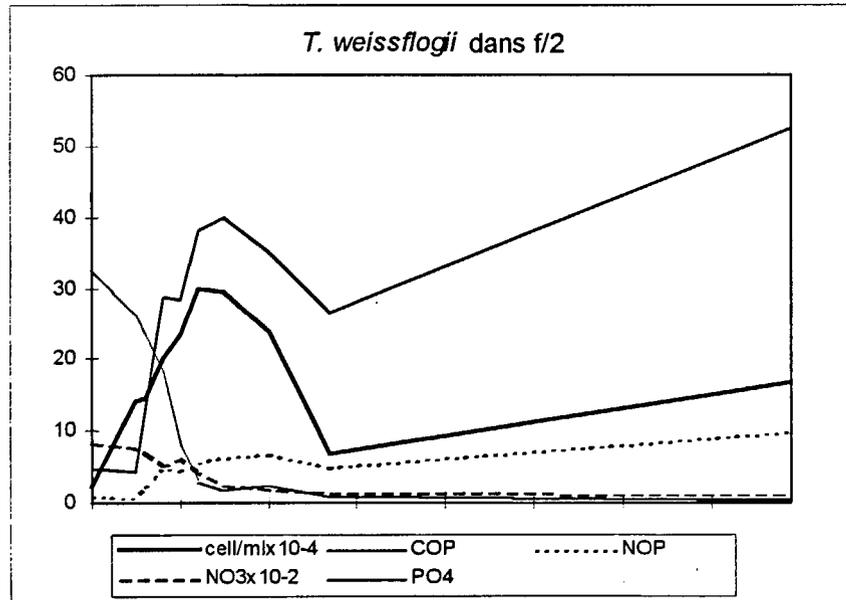


Figure 4. Evolution des différents paramètres étudiés dans la culture de *Skeletonema weissflogii* dans le milieu f/2. COP et NOP en mg.l^{-1} , NO_3 et PO_4 en μM de N et P.

En milieu f/2 la densité des cellules s'élève immédiatement (Figures 3 et 4) et les taux de croissance μ_2 calculés (Fukazawa *et al.*, 1980 ; Guillard, 1979) sont résumés dans le tableau 3. Les maxima de densité cellulaire en *Chaetoceros gracile*: $3.3 \text{ millions.ml}^{-1}$, et en *Thalassiosira weissflogii*: $0.3 \text{ million.ml}^{-1}$, sont atteints respectivement au bout de 20 et 12 jours de culture. Tandis que *C. gracile* se maintient élevé au delà du 27^{ème} jour, la décroissance de densité

cellulaire est observée pour *T. weissflogii* à partir du 20^{ème} jour. Le dénombrement effectué le 79^{ème} jour avant arrêt de l'expérience révèle une reprise de la croissance dans la culture de *T. weissflogii*, tandis que *C. gracile* présente une décroissance, correspondant à la population sénescente. Etant donné l'intervalle de temps de 50 jours entre les deux derniers dénombrements, il est difficile d'apprécier l'évolution des densités à partir de ces données seules: croissance, stagnation ou décroissance.

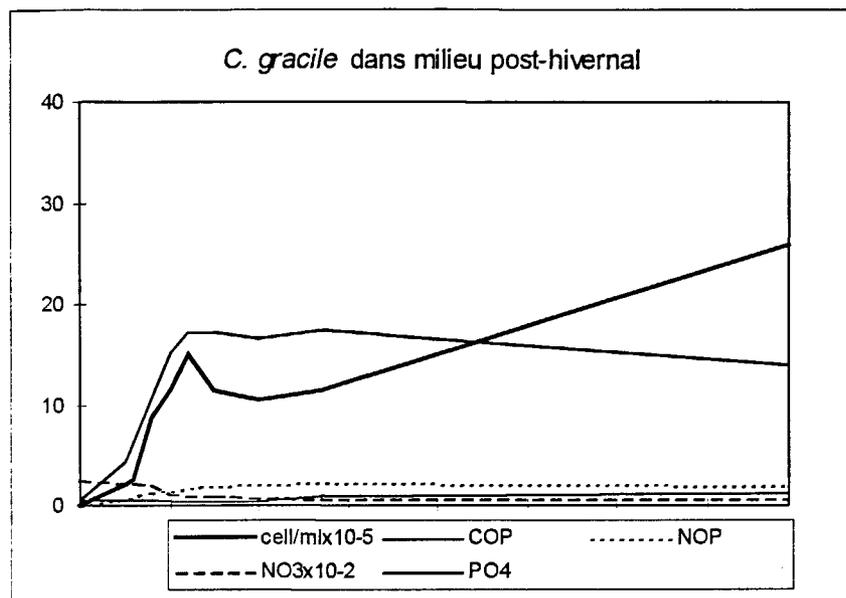


Figure 5 . Evolution des différents paramètres étudiés dans la culture de *Chaetoceros gracile* dans le milieu post-hivernal. COP et NOP en mg.l⁻¹, NO₃ et PO₄ en µM de N et P.

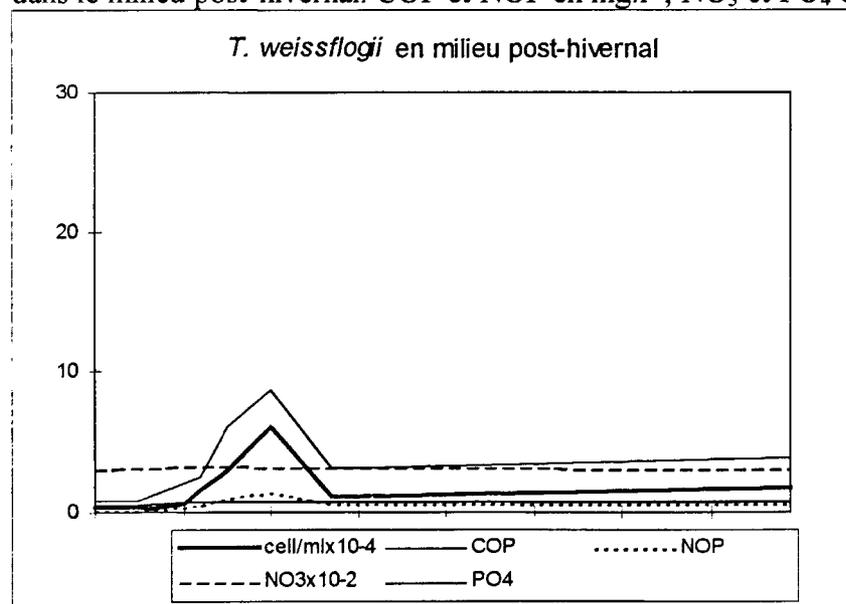


Figure 6 . Evolution des différents paramètres étudiés dans la culture de *Skeletonema weissflogii* dans le milieu post hivernal. COP et NOP en mg.l⁻¹, NO₃ et PO₄ en µM de N et P.

En milieu post-hivernal, l'accroissement des populations est plus lent (Figures 5 et 6). La densité de *C. gracile* ne s'élève de façon significative qu'à partir du 8^{ème} jour. Cette évolution est lente et durant la période la plus suivie (0 - 28 jours) le maximum: 1.5 million.ml⁻¹ est observé le 12^{ème} jour. Cependant lors du dénombrement final du 79^{ème} jour, la concentration cellulaire atteint 2.8 millions.ml⁻¹. Le développement de la culture *T. weissflogii* n'est sensible

qu'au 12^{ème} jour, et le maximum: 0.06 millions.ml⁻¹ est atteint sous forme de pic le 21^{ème} jour de culture. Le dernier dénombrement montre également une légère élévation de la concentration par rapport au 27^{ème} jour, mais comme ci-dessus pour le milieu f/2, il n'est pas possible de définir la tendance de l'évolution.

Tableau 3. Taux de croissance μ_2 calculés selon la formule: $\text{Ln}(N_2/N_1)/(t_2-t_1)\text{Ln}2$, N_1 et N_2 étant les densités cellulaires aux temps t_1 et t_2 , encadrant la plus forte variation de densités.

	<i>Chaetoceros gracile</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>
Milieu f/2	0.90	0.52
Milieu post-hivernal	0.20	0.33

3.2 Evolution des sels nutritifs et matériel particulaire dans les cultures de diatomées

Dans les cas étudiés en milieu f/2, P-PO₄ et N-(NO₂+NO₃) diminuent pendant la croissance des populations et atteignent le minimum au moment du maximum de densité des populations (Figures 3 et 4). On n'observe pas de reminéralisation cours de la dégradation de matière détritique qui normalement accompagne la décroissance de la population algale.

En milieu post-hivernal il n'apparaît pas d'évolution détectable en P-PO₄, sauf une tendance à l'élévation en fin d'expérience. La culture de *T. weissflogii* (Figure 6) ne présente pas de variations dans les concentrations de N-(NO₂+NO₃), tandis que dans la culture de *C. gracile* on observe une décroissance nette jusqu'au pic de densité cellulaire, puis une tendance à une diminution plus lente (Figure 5).

Il est à noter que dans le milieu post-hivernal les concentrations analysées en sels minéraux sont élevées: l'ensemencement des cellules à partir des cultures-mères (en f/2) est probablement responsable de l'enrichissement plus élevé que celui introduit initialement (Tableau 1).

Les composés particuliers: NOP et COP ont le même profil d'évolution. Ils s'élèvent fortement dans les deux cas durant la période de croissance des cultures, puis régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience. Ces variations suivent celles des densités cellulaires au cours du développement des cultures, puis restent élevées puisqu'elles correspondent à la totalité de la matière organique particulaire présente: vivante et détritique. Cependant les teneurs en C et N de la matière organique dans la culture de *T. weissflogii* en milieu post-hivernal, présentent la particularité de diminuer de façon significative après le pic de densité cellulaire, ce qui pourrait résulter d'une activité bactérienne élevée.

Cependant les teneurs en COP sont très nettement plus élevées que N tout au long de l'expérience. Le tableau 4 présente l'évolution des rapports N/C dans la fraction organique particulaire. Les valeurs obtenues montrent que *T. weissflogii* présente des teneurs relatives en azote plus élevées que *C. gracile*, et ces teneurs sont aussi élevées dans les deux milieux testés. En revanche, chez *C. gracile* les faibles teneurs relatives en azote sont plus élevées en milieu optimum f/2.

Lorsque la fraction organique particulaire est surtout composée de matière vivante ou récente les teneurs azotées sont plus élevées (Romankevich, 1982) que lorsqu'elle est constituée de substances détritiques déjà dégradées (réfractaires).

Ces résultats informent donc sur la signification des concentrations cellulaires élevées en fin d'expériences. En milieu post-hivernal, *C. gracile* est en phase de croissance (N/C a une valeur relativement élevée), de même que *T. weissflogii* en milieu f/2.

Tableau 4. Variations de N/C calculées dans les quatre cultures, dans les fractions organiques particulières en fonction de l'âge des cultures. Valeurs moyennes calculées dans les quatre milieux.

age (jours)	<i>C. gracile</i> , f/2	<i>C. gracile</i> , post-hivernal	<i>T. weissflogii</i> , f/2	<i>T. weissflogii</i> , post-hivernal
0	0.15	0.11	0.18	0.21
5	0.17	0.14	0.14	0.19
8	0.13	0.11	0.16	
10	0.13	0.10	0.16	
12	0.12	0.10	0.15	0.17
15	0.12	0.11	0.16	0.16
20	0.12	0.12	0.19	0.16
27	0.13	0.13	0.19	0.18
79	0.12	0.14	0.19	0.14
Moy.	0.13±0.02	0.12±0.02	0.17±0.02	0.17±0.02

3.3 Evolution de la putrescine dans les cultures de diatomées

Que *Thalassiosira weissflogii* soit cultivé en milieu f/2 ou en conditions post-hivernales, l'évolution de la teneur en putrescine est calquée sur celle de la densité cellulaire (Figures 7 et 8) à l'exception toutefois du dernier point expérimental où, en milieu f/2, malgré la reprise des divisions cellulaires, on observe un abaissement de la teneur en putrescine (Figure 7).

Lorsque *Chaetoceros gracile* est cultivé dans les deux conditions, globalement là encore, la teneur en putrescine est corrélée à la densité cellulaire (Figures 9 et 10); toutefois deux observations peuvent être faites, à savoir qu'il existe, en conditions post-hivernales, un retard de 5 jours entre l'apparition du pic de densité cellulaire (15j) et du pic de putrescine (20j) (Figure 10) et qu'en milieu f/2, une diminution temporaire de la putrescine se produit en début de phase exponentielle de croissance cellulaire (Figure 9); ce dernier fait n'est pas sans rappeler les observations faites par C Videau chez *Gymnodinium mikimotoi* (rapport PNEAT 1992)

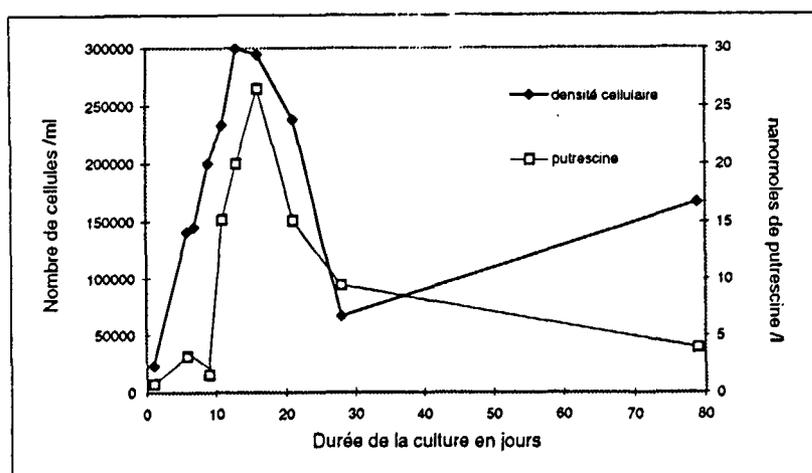


Figure 7 : Evolution en fonction du temps de la densité cellulaire et de la teneur en putrescine dans le milieu de culture (f/2) de *Thalassiosira weissflogii*.

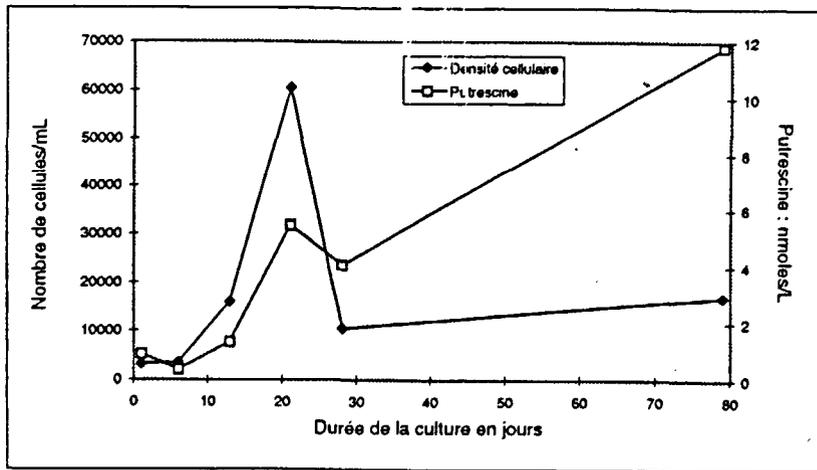


Figure 8 : Evolution en fonction du temps de la densité cellulaire et de la teneur en putrescine dans le milieu de culture (conditions post-hivernales) de *Thalassiosira weissflogii*

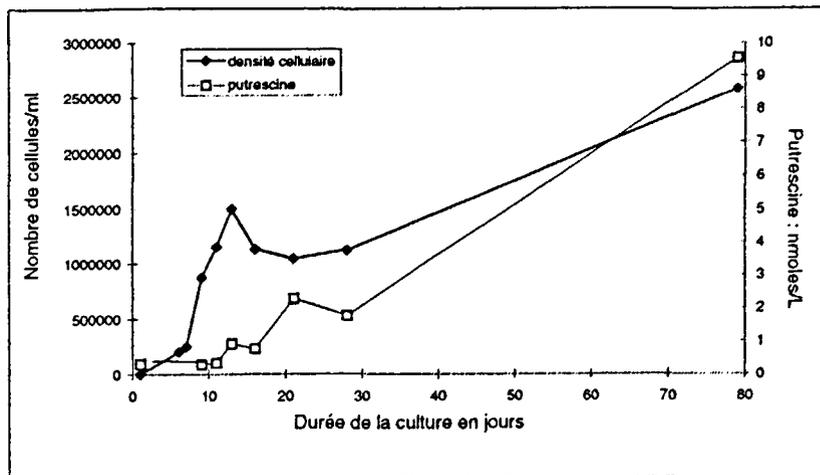


Figure 9 : Evolution en fonction du temps de la densité cellulaire et de la teneur en putrescine dans le milieu de culture (conditions post-hivernales) de *Chaetoceros gracile*.

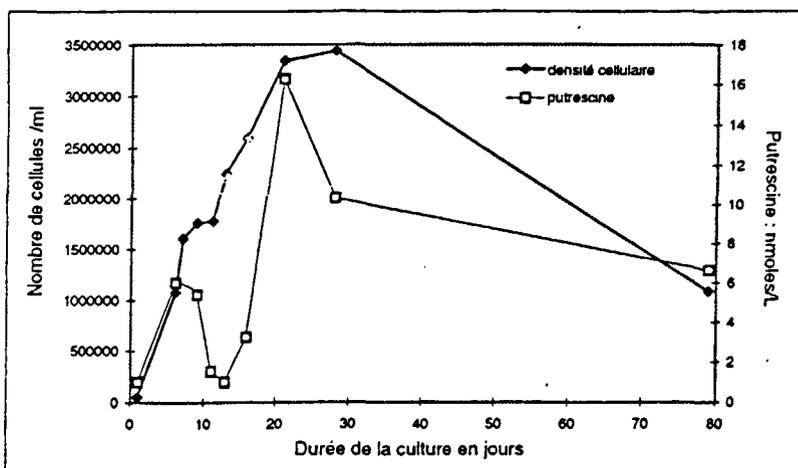


Figure 10 : Evolution en fonction du temps de la densité cellulaire et de la teneur en putrescine dans le milieu de culture (f/2) de *Chaetoceros gracile*.

Il est à noter que, en plus de la putrescine, de très faibles quantités de spermidine et de spermine sont retrouvées à tout moment dans les deux milieux de culture pour les deux diatomées considérées. En outre, en fin de culture, et plus particulièrement à 79 j, de l'acétylspermine est présente à hauteur de 1,6 - 2,9 nmoles/l dans le milieu f/2 et de 4,2-8,6 nmoles en conditions post-hivernales.

3.4 Evolution des sels nutritifs et matériel particulaire au cours de la dégradation du concentrat de cellules.

L'observation de l'échantillon au microscope montre la présence majoritaire de diatomées: *Skeletonema costatum* (bloom), *Thalassiosira* sp., *Nitzschia longissima* ou *N. closterium*, *Licmophora* sp., *Coscinodiscus* sp., *Ditylum* sp., quelques *Rhizosolenia delicatula*, *Pleurosygma* sp., *Amphiphora* sp.. De plus, quelques *Prorocentrum micans* et des tintinnides sont observés, et de nombreux déchets.

Présentes en faible quantité: $6.5\mu\text{M N}-(\text{NO}_2+\text{NO}_3)$, les formes minérales azotées oxydées diminuent durant les 2 premières semaines puis augmentent brutalement dès la 4^{ème} semaine (Figures 11 et 12). Elles se maintiennent à cette concentration très élevée: $800\mu\text{M}$ durant toute la suite de l'expérience (12 semaines).

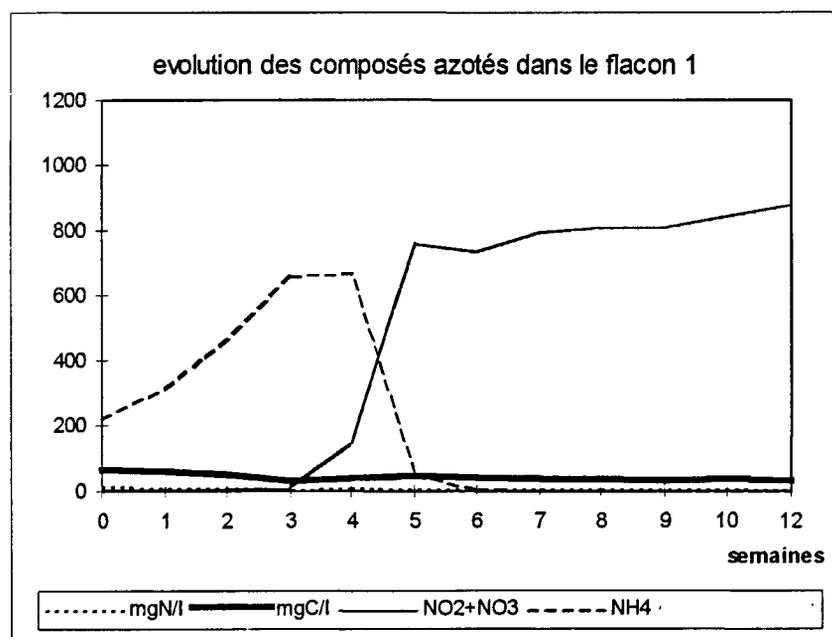


Figure 11. Evolution des composés azotés au cours de la dégradation de matière organique suivie dans le flacon 1. NO_2+NO_3 et NH_4 en $\mu\text{M N}$.

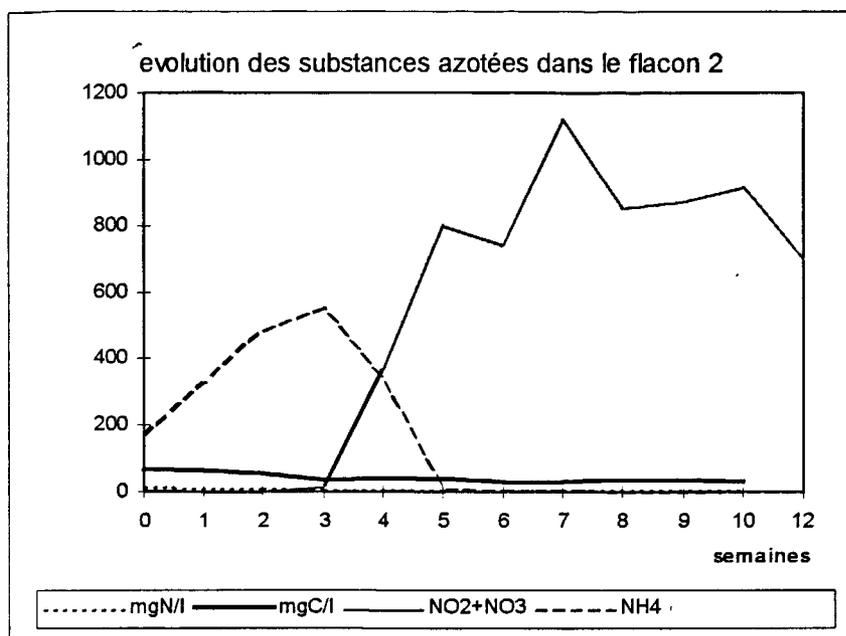


Figure 12. Evolution des composés azotés au cours de la dégradation de matière organique suivie dans le flacon 2. NO_2+NO_3 et NH_4 en $\mu\text{M N}$.

La concentration initiale en NH_4 est 30 fois plus élevée dans les deux flacons: $193 \pm 24 \mu\text{M}$ que le $\text{N}-(\text{NO}_2+\text{NO}_3)$. On observe une augmentation immédiate jusqu'à la 4^{ème} semaine: 334 et 671 μM (différence due probablement à des irrégularités dans le bullage d'air), pour chuter brutalement à partir de la 5^{ème} semaine et avoisiner une concentration 1 μM en fin d'expérience dans les deux flacons.

Il est à noter que la disparition brutale d'ammonium se produit au même moment que la brusque apparition de $\text{N}-(\text{NO}_2+\text{NO}_3)$.

Tableau 5. Variations de N/C dans la fraction organique particulaire, et de N (μM) dans la fraction minérale dissoute au cours des 12 semaines de l'expérience.

semaines	Flacon 1			Flacon 2		
	N/C	N-NH4	N-(NO2+NO3)	N/C	N-NH4	N-(NO2+NO3)
0	0.20	218	6.9	0.19	169	6.5
1	0.19	314	3.2	0.19	325	1.5
2	0.19	458	2.9	0.19	485	2.3
3	0.19	657	11.2	0.18	550	16
4		671	141	0.17	334	364
5	0.17	49	760	0.18	8.0	800
6	0.17	3.8	735	0.16	2.9	740
7	0.16	2.1	796	0.15	2.9	
8	0.16	1.5	812	0.16	1.8	852
9	0.15	1.9	811	0.15	1.5	872
10	0.15	1.6	845	0.15	1.0	914
12	0.15	0.6	878		1.8	700

Les formes particulières organiques C et N, respectivement 64.5 ± 2.1 et 12.4 mg.l^{-1} en début d'expérience, diminuent de moitié durant les 3 premières semaines de dégradation et varient peu jusqu'à la fin des 12 semaines. N poursuit une légère diminution. Le tableau 5 présente l'évolution du rapport N/C de la fraction organique particulaire, comparée à celle des

concentrations en azote minéral. Il apparaît que les rapports N/C les plus faibles (0.15) correspondent aux concentrations les plus élevées (>800 μM) en azote minéral NO_2+NO_3 . Les concentrations élevées de l'ammonium accompagnent les valeurs élevées de N/C, et précèdent l'apparition du nitrate. L'ensemble de ces résultats suggère la présence d'une activité bactérienne nitrifiante efficace, puisque le rapport N/C, caractéristique de substances fraîches d'origine phytoplanctonique (Romankevich, 1982) s'abaisse rapidement.

3.5 Evolution des polyamines au cours de la dégradation du concentrat de cellules.

Des teneurs élevées en putrescine, cadavérine et histamine sont trouvées dans le filtrat au temps initial de mise en dégradation (Tableau 6). Si, après une semaine de culture, la teneur en histamine s'avère inchangée, en revanche, la cadavérine n'est plus guère décelable et la teneur en putrescine a considérablement diminué, chutant de 121,6 à 9,7 nmoles/l, teneur qui se maintient ensuite constante jusqu'à la fin de l'expérience (Tableau 6 et Figure 13).

Tableau 6 Evolution au cours du temps de la teneur en polyamines dans le milieu de dégradation du concentrat cellulaire. Résultats exprimés en nmoles/l d'eau de mer. Ac Spd = Acétyl-spermidine ; Put = Putrescine ; Cad = Cadavérine ; Hist = Histamine ; Ac Spm = Acétyl-spermine; Spd = Spermidine ; Spm = Spermine

Semaine	Ac Spd	Put	Cad	Hist	Ac Spm	Spd	Spm
0	-	121,6	75,2	46,9	1,2	0,4	2,6
1	2,8	9,7	0	44,2	0,3	2,0	0,9
5 à 10	1,4	8,2	0	0	0,2	2,6	1,0

D'autres polyamines : spermidine, spermine et acétyl-spermine, sont également présentes en très faibles quantités tout au long de l'expérience avec une tendance à l'augmentation de la spermidine et à la diminution de la spermine (Tableau 6).

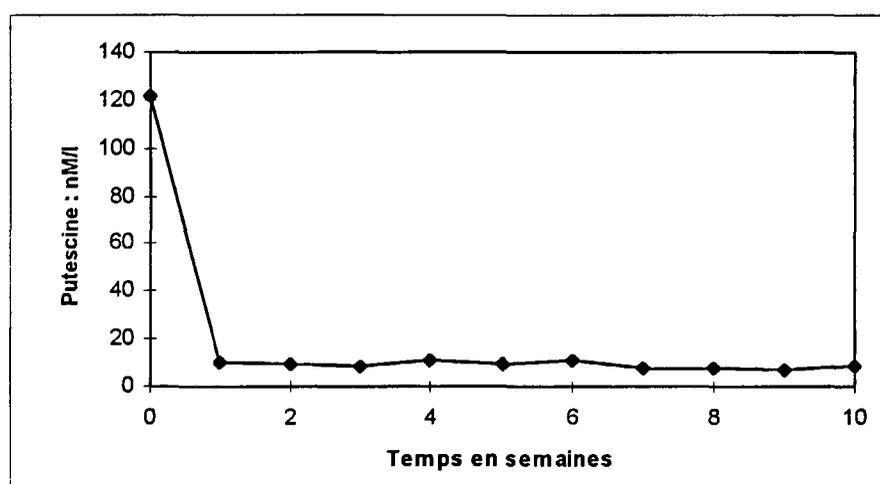


Figure 13. Evolution au cours du temps de la teneur en putrescine dans le milieu de dégradation du concentrat cellulaire

Il est à noter, dès la première semaine, une apparition de traces d'acétyl-spermidine. Les polyamines conjuguées dont la présence a récemment été rapportée chez les végétaux, constitueraient, à l'exemple de ce qui est connu chez les mammifères, des intermédiaires dans la voie d'interconversion de la spermidine et de la spermine vers la putrescine (Tiburcio et *al.*, 1997).

3.6 Absorption de la putrescine par *Gymnodinium mikimotoi*

Compte tenu de la large prédominance de la putrescine parmi les polyamines dosées dans le milieu naturel, seule l'absorption de celle-ci a été étudiée. Les figures 14 et 15, qui retracent respectivement l'absorption de la putrescine à 1 et 10 μM , montrent toutes 2 un caractère biphasique. En effet, on observe une première phase qui correspond classiquement à l'adsorption sur les parois et une deuxième phase plus lente qui correspond véritablement à l'absorption par la cellule ; cette absorption est largement dépendante du métabolisme comme en atteste la très forte inhibition par le cyanure (Figure 14 et 15).

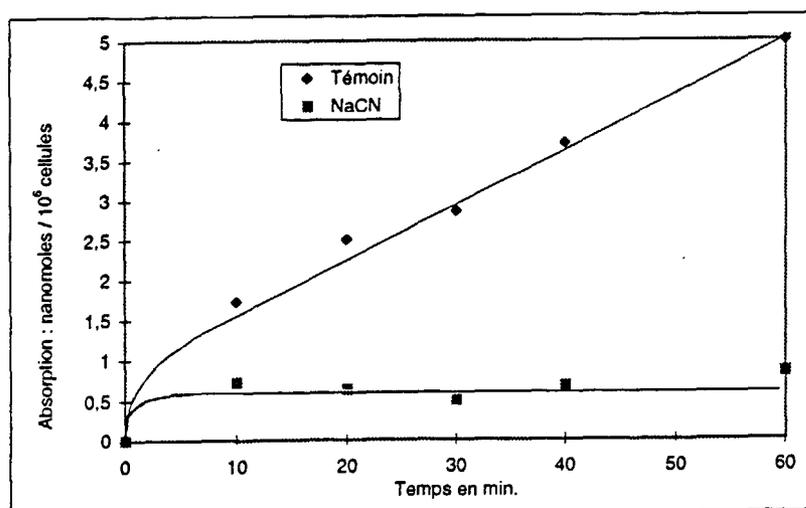


Figure 14 : Cinétique d'absorption de la putrescine (1 μM) par *Gymnodinium mikimotoi*.

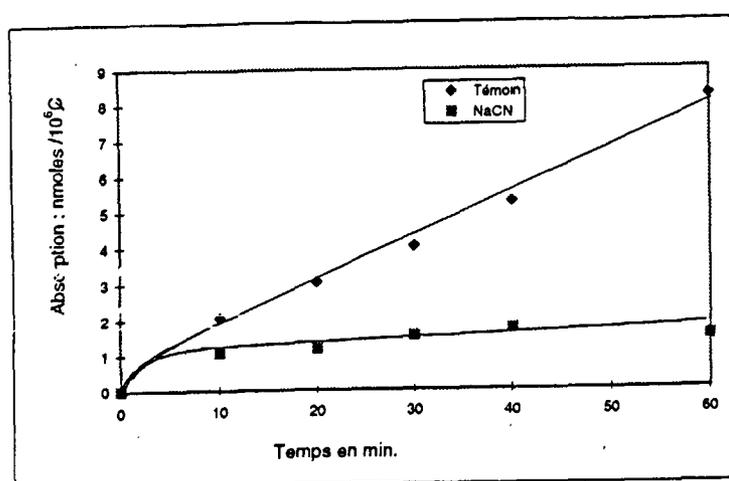


Figure 15 : Cinétique d'absorption de la putrescine (10 μM) par *Gymnodinium mikimotoi*.

L'étude de l'absorption de la putrescine a été réalisée pour une gamme de concentrations en putrescine comprise entre 50 nM et 500 μ M et la vitesse déterminée entre 30 et 60 min d'absorption c'est-à-dire dans la phase métabolique de l'absorption.

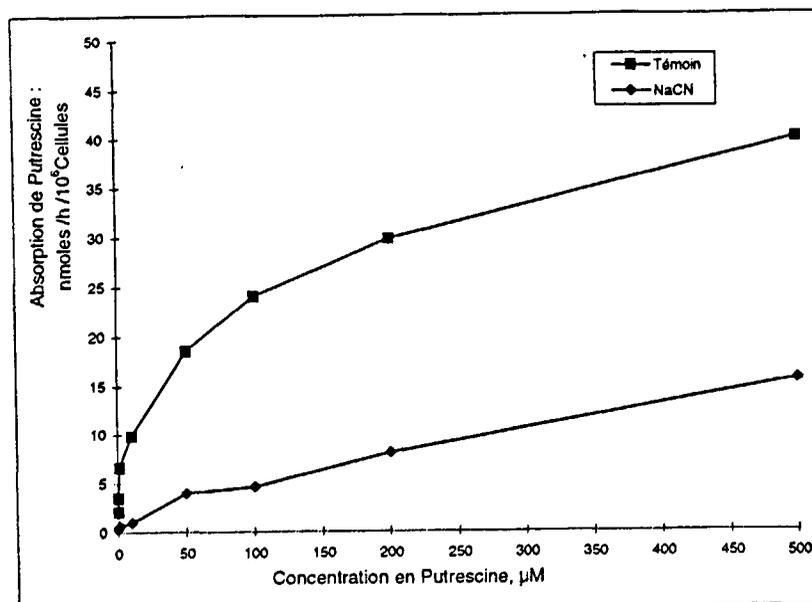


Figure 16 : Vitesse d'absorption de la putrescine en présence ou non de NaCN 0,5 mM) en fonction de la concentration en putrescine.

La figure 16 montre que l'absorption de la putrescine en fonction de la concentration en cette diamine est non saturable et peut être résolue en une composante linéaire appréciée par l'addition de cyanure (Figure 16) et une composante saturable (obtenue par soustraction de la composante linéaire, Figure 17).

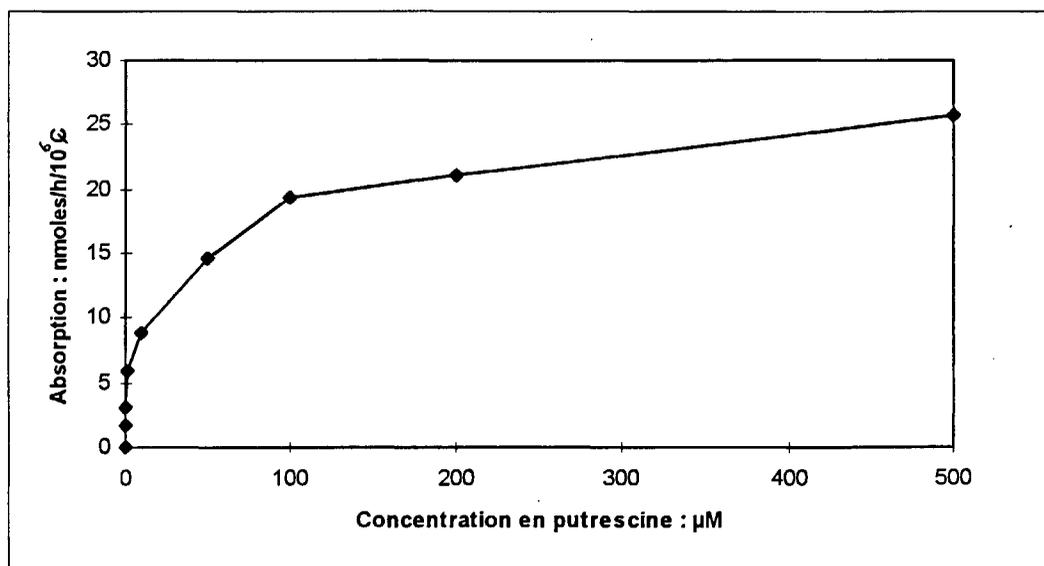


Figure 17 : Composante saturable de l'absorption en fonction de la concentration en putrescine (courbe obtenue à partir des données de la figure 16, par différence entre l'absorption totale et la composante linéaire).

La composante linéaire correspond vraisemblablement à de la putrescine adsorbée sur la paroi et peut-être aussi sur la surface membranaire, non éliminée par les 3 lavages successifs;

l'absorption de la putrescine est largement dominée par une simple composante saturable avec un K_m de $43\mu\text{M}$ et une V_m de $27\text{ nmoles/h}/10^6$ cellules (Figure 17). Ceci suggère que l'absorption de la putrescine est contrôlée par un système de transport de nature protéique.

Ces résultats s'accordent avec les cinétiques de pénétration décrites chez un champignon filamenteux *Neurospora crassa* (Davis et Ristow, 1988), chez les racines de germinations de maïs (DiTomaso et al., 1991) et aussi avec ce qui est observé pour des systèmes animaux (Seiler et Dezeure, 1990). En revanche, ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour la putrescine par Scoccianti et al. (1989) chez *Porphyridium sp.* mais s'apparentent à ce qui est rapporté par ces auteurs pour la spermidine et la spermine, qui montrent également un système saturable d'absorption.

Au cours de cette étude, il est apparu que l'absorption dépendante du métabolisme ne se produisait qu'en début de journée, c'est-à-dire en début de phase éclairée. Ceci écarte l'hypothèse de la seule participation des bactéries au processus d'absorption, sans toutefois exclure totalement leur contribution.

4 Conclusions

Les résultats montrent très clairement la production de polyamines, majoritairement de la putrescine, au cours du développement *in vitro* d'une population de diatomées. Cette production est proportionnelle à la biomasse algale et est observée quels que soient l'espèce algale, et le milieu utilisé. Cependant, la production de putrescine rapportée à l'unité cellulaire au moment du pic de densité s'avère nettement plus importante chez *Thalassiosira weissflogii*, que chez *Chaetoceros gracile* (Tableau 7).

Tableau 7. Quantité de putrescine en picomoles/10⁶ cellules au moment du maximum de densités cellulaires

	milieu f/2	milieu post-hivernal
<i>C. gracile</i>	4.86	3.70
<i>T. weissflogii</i>	90.0	89.9

Sachant que la taille cellulaire est largement plus élevée chez *T. weissflogii*, et que son rapport N/C, considéré comme un indice de l'abondance de matière vivante, est également plus important, (Tableau 4), ceci confirme la corrélation entre la biomasse et l'apparition de polyamines dans le milieu.

Les résultats montrent également que la putrescine, très abondante dans le milieu au moment de la mise en route de la dégradation du concentrat cellulaire, disparaît en moins d'une semaine. La présence vraisemblable de bactéries, comme semble le démontrer l'apparition du nitrate au détriment de l'ammonium, pourrait contribuer à cette brutale disparition, sans qu'on puisse toutefois exclure la libération d'enzymes hydrolytiques par les cellules algales sénescents.

Les expériences faites avec la putrescine-¹⁴C montrent que l'absorption de cette diamine par *G. mikimotoi* présente à la fois une composante passive et une composante dépendante du métabolisme qui est largement majoritaire. Cette absorption active, suivie en fonction de la concentration en substrat, révèle la participation d'un système saturable de transport, de nature protéique, avec un Km de 43 µmoles et une Vmax de 27 nmole/h/10⁶ cellules.

Les résultats obtenus démontrent la présence dans les milieux de culture, de teneurs quantifiables en putrescine, corrélées à la biomasse algale, et que par ailleurs, cette diamine est consommée de façon active par *G. mikimotoi*. Cette observation constituerait une étape importante dans la compréhension du mode d'action de cette substance. Des tests préliminaires indiquent en effet une stimulation par la putrescine, de l'absorption du phosphate par les cellules de ce dinoflagellé (*C. Videau*).

5 - Références

Arzul G., Gentien P., Erard-Le Denn E., Videau C. and Jégou A. M., 1993. Diatom growth repressing factors during an offshore bloom of *Gyrodinium cf. aureolum*. in : Smayda and Shimizu eds., Toxic phytoplankton blooms in the sea, Elsevier Sc. Publ. 719-724.

Birrien J. L., Le Corre P. et Videau C., 1985. Développement de *Gyrodinium aureolum* en Baie de Douarnenez et en Mer d'Iroise pendant l'été 1983. In : Actes du 4eme colloque franco-japonais d'Océanographie, Marseille, 2 : 51-64.

Davis R.H. et Ristow J.L., 1988. Polyamine transport in *Neurospora crassa*. Arch Biochem. Biophys., 267 : 479-489.

Di Tomaso J. , Hart J.J. and Kochian V.L., 1991. Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings. Plant Physiol., 98 : 611-620.

Evans P.T.& Malmberg R.L., 1989. Do polyamines have roles in plant development ? Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40 : 235-269.

Féray A., Hourmant A., Béraud J., Brun A., Cann-Moisson C., Caroff J. and Penot M., 1992. Influence of polyamines on the long-distance transport of K (⁸⁶ Rb) in potato cuttings (*Solanum tuberosum*). Comparative study with some phytohormones. J. Exp. Bot., 43 : 403-408.

Florès H. and Galston A.W., 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. Plant Physiol., 60 : 701-706.

Fukazawa N., Ishimaru T., Takahashi M., Fujita Y., 1980. A mechanism of « red-tide » formation. I - Growth rate estimate by DCMU induced fluorescence increase. Mar. Ecol. Progr. Ser., 3 : 217-222.

Guillard R.R.L. 1979. Cultures methods and growth measurements. In: Stein J.R. (ed), Handbook of phycological methods. Cambridge Univ. Press, pp. 289-311.

Guillard R.R.L. & Ryther J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. 1: *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gram. Can. J. Microbiol. 8 : 229-239.

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

Le Corre P., l'Helguen S., 1993. Nitrogen source for uptake by *Gyrodinium cf. aureolum* in a tidal front. Limnol. Oceanogr. 38(2) : 446-451.

Le Pape O., Del Amo Y., Cann P., Ménesguen A., Aminot A., Quéguiner B. et Tréguer P., 1995. Résistance à l'eutrophisation d'un écosystème côtier enrichi: la rade de Brest. 3èmes rencontres scientifiques internationales, mars 1995. Actes du colloque, pp. 59-79.

Maiss B., Kordy E., Kneifel H., and Soeder C. J., 1982. Amines in algae. 7. Concentration changes of polyamines in synchronous *Chlorella emersonii* : kinetic relationship to DNA and RNA content. Z. pflanzenphysiol. Bd., 106 : 213-221.

Poulet S. A. and Martin-Jezequel V., 1983. Relationships between dissolved free amino acids, chemical composition and growth of the marine diatom *Chaetoceros debile*., Mar. Biol., 77 : 93-100.

Romankevich E.A., 1982. Geochemistry of organic matter in the marine ocean Springer Verlag, Berlin. Heidelberg, 334p.

Scoccianti V., Bagni N., Dubinsky O. and Arad S., 1989. Interaction between polyamines and cells of the marine unicellular red alga *Porphyridium sp.* Plant Physiol. Biochem., 27 : 899-904.

Seiler N. et Deleuze F., 1990. Polyamine transport in mammalian cells. Int. J. Biochem., 22 : 211-218.

Tiburcio A.F., Altabella T., Borrell A. and Masgrau C., 1997. Polyamine metabolism and its regulation. Physiologia Plant., 100 : 664-674.