

INFLUENCE DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE SUR LA CROISSANCE ET LA TOXICITÉ DE *PROROCENTRUM LIMA* (EHRENBERG) DODGE

Martine MORLAIX et Patrick LASSUS

IFREMER, Centre de Nantes, DEL/PN, B.P. n° 1049,
44037 Nantes Cedex 01, France.

RÉSUMÉ - Peu d'études ont été réalisées sur l'influence des nutriments sur la croissance et la toxicité de dinoflagellés producteurs de poisons diarrhéiques (Diarrhetic Shellfish Poison = DSP). Des résultats préliminaires sont présentés ici en ce qui concerne l'effet de concentrations croissantes d'azote inorganique et de phosphore organique sur le taux de division et la production toxinique de *Prorocentrum lima* (souche espagnole PL2V). L'azote a une influence positive sur la croissance de cette microalgue jusqu'à une valeur seuil de $880\mu\text{M.l}^{-1}$. Au-delà de ce seuil, le taux de division diminue. Par contre, l'effet sur la toxicité n'est pas significatif, les concentrations en acide okadaïque et DTX1 restant relativement faibles ($4.8 \pm 0.5 \text{ pg.cell.}^{-1}$) et stables. Le phosphore agit intégralement sur le taux de division et il y a une relation inverse entre ce dernier et le contenu toxinique cellulaire.

ABSTRACT - Very few attempts have been made in order to investigate the role of nutrients on cellular growth and toxin production in dinoflagellates associated with DSP (Diarrhetic Shellfish Poison). Some preliminary results are presented here, aiming at a better knowledge of inorganic nitrogen and organic phosphorus effects upon division rate and toxin content of *Prorocentrum lima* (PL2V spanish strain). Nitrogen have a positive effect on growth rate, up to a threshold value of $880\mu\text{M.l}^{-1}$. Above this threshold the growth rate decreases. There is no effect on toxin content since okadaic acid and DTX1 cell contents remain low ($4.8 \pm 0.5 \text{ pg.cell.}^{-1}$) and steady. Phosphorus effect upon division rate follows a non-linear relationship, whereas cellular toxic content is inversely proportional to growth rate.

MOTS CLÉS : *Prorocentrum lima*, acide okadaïque, DTX1, taux de croissance, toxicité, nutriments.

INTRODUCTION

Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge est un dinoflagellé benthique faisant partie des biotopes coralligènes associés à la ciguatera (Yasumoto *et al.*, 1980). Bien qu'il ne soit pas connu pour produire des phénomènes d'eaux colorées, il est associé - avec *Dinophysis spp.* - depuis 1982 à des épisodes de contamination diarrhéique des coquillages (DSP: diarrhetic shellfish poison) sur les côtes espagnoles (Lee *et al.*, 1989; Bravo, 1991) et probablement à des phénomènes de bioaccumulation dans la chair de poissons tropicaux (Gamboa *et al.*, 1990; Frémy *et al.*, in press).

En effet, *P. lima* est observé principalement dans les régions subtropicales pacifiques (Yasumoto *et al.*, 1980; Bomber *et al.*, 1985; Carlson *et*

al., 1984) et les toxines qu'il produit, d'abord identifiées sous la dénomination PLT I, II et III seraient en fait essentiellement de l'acide okadaïque (fraction PLTII, Murakami *et al.*, 1982) de la DTXI et une autre toxine appelée Prorocentrolide (Yasumoto, 1990).

En ce qui concerne les côtes françaises, c'est une espèce qui a été recensée dans le plancton en 1986 à Ouessant (Lassus, 1988) avec une concentration de 6400 cell.l^{-1} , et en coïncidence avec une contamination DSP de moules sur le secteur étudié. Une bioaccumulation directe d'acide okadaïque chez les bivalves filtreurs peut être induite par voie alimentaire (Houvenaghel *et al.*, 1991).

Afin de prévenir la contamination des mollusques, il importe donc de mieux connaître les conditions de milieu pouvant modifier le rythme de croissance et la production de toxine chez cette espèce. En effet, chez plusieurs dinoflagellés toxiques, ces paramètres sont influencés par des facteurs environnementaux ou physiologiques (Hall, 1982; Boyer *et al.*, 1985). Pour ce qui est de *P. Lima*, Morton & Norris (1989) ont étudié l'influence des conditions de cultures (salinité, température, lumière) sur le taux de division, et, en 1991 Schoemann *et al.*, ont travaillé sur le rôle de la matière organique sur la croissance de cette espèce. Cependant, jusqu'à présent, très peu d'auteurs traitent de l'influence des facteurs physiques, chimiques ou biologiques sur la toxicité de *P. lima*, excepté Tomas & Baden (1991) qui ont observé l'impact de diverses sources et concentrations en phosphate sur la production toxinique et le développement d'une souche tropicale de ce dinoflagellé.

Compte tenu de la spécificité propre au développement des espèces tempérées de *Prorocentrum*, nous avons étudié l'effet de concentration croissantes d'azote minéral et de phosphore organique sur le taux de division et la toxicité d'une souche de *P. lima* d'origine espagnole.

MÉTHODES

La souche de *P. lima* utilisée (PL2V) a été isolée au large de Vigo (Espagne) en 1987 (fig. 1); depuis, la culture est maintenue au laboratoire à 20°C , avec un cycle jour/nuit 12/12 et un éclairage de $24 \mu\text{mole photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en ballons de 2 ou 0.5 litres remplis pour moitié de milieu "K" (Keller & Guillard, 1985), réalisé à partir d'eau de mer naturelle filtrée sur $0.22 \mu\text{m}$.

Pour chaque expérience, deux réplicats par test ont été réalisés et les cultures n'ont pas été remises en suspension jusqu'à récolte des cellules. Des tubes à essai ont été inoculés avec une culture de 48 jours, à raison de 500 cell.ml^{-1} : ils contiennent 15 ml d'eau de mer filtrée et autoclavée de salinité $35.5 \pm 0.5\%$ et enrichie en milieu "K" modifié. Pour réaliser les expériences, les sources initiales d'azote et de phosphore du milieu "K" normal (NaNO_3 , NH_4Cl et Na_2 Glycérophosphate) ont été éliminées respectivement pour chaque composé testé. Par la suite, les nitrates ont été ajoutés sous forme de NaNO_3 aux concentrations de $0 \mu\text{M.l}^{-1}$, $88 \mu\text{M.l}^{-1}$, $880 \mu\text{M.l}^{-1}$, $1760 \mu\text{M.l}^{-1}$ et $2640 \mu\text{M.l}^{-1}$, qui représentent respectivement 0%, 10%, 100%, 200% et 300% de la concentration normale de nitrates dans le milieu "K". De même, et selon les tests, nous avons ajouté $0 \mu\text{M.l}^{-1}$, $5 \mu\text{M.l}^{-1}$, $10 \mu\text{M.l}^{-1}$, $15 \mu\text{M.l}^{-1}$ et $20 \mu\text{M.l}^{-1}$ de Na_2 Glycérophosphate qui représentent respectivement 0%, 50%, 100%, 150% et 200% de la concentration en phosphates du milieu "K". Les tubes contenant 100% de phosphates font office de témoins; en effet, leur composition en azote et phosphore correspond à celle d'un milieu "K" normal. Pour ces

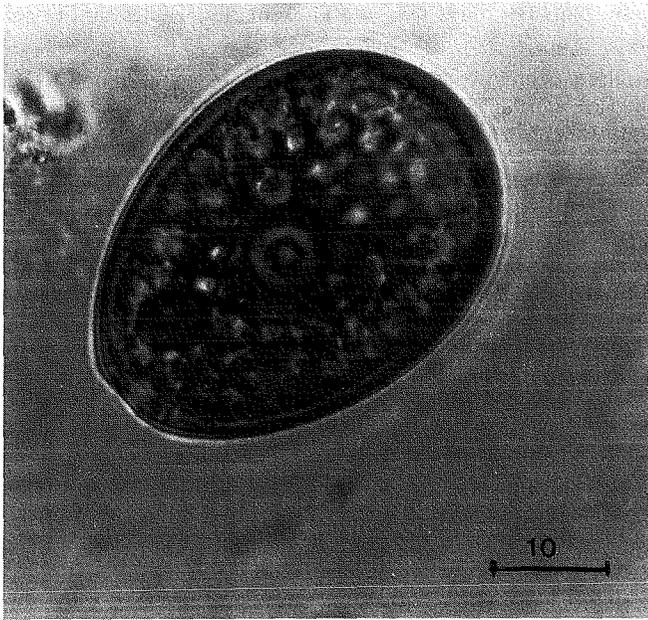


Figure 1. - Microphotographie photonique d'une cellule vivante de *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge en culture. Echelle: 15mm = 10 μ m - Photo M. Bardouil, IFREMER Nantes.

expérimentations - une avec nitrates, une avec phosphates et une normale pour les témoins - la croissance s'est déroulée à 20°C, selon les mêmes modalités que celles précédemment décrites.

Après 15 jours de développement, les cellules sont réinoculées dans le même milieu expérimental et dans des conditions similaires. Cette procédure a été répétée trois fois afin d'éviter toute influence du contenu initial en azote et phosphore des cellules sur les vitesses d'assimilation des nutriments. Les différentes réinoculations correspondent donc à t_0 , $t_0 + 15$, $t_0 + 30$, $t_0 + 45$ = temps de début d'expérimentation. Un prélèvement a alors été fait afin de vérifier le nombre de cellules présentes dans chaque tube.

Les expérimentations ont été arrêtées à 30 jours, ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle chez cette espèce à taux de croissance faible. Le taux de croissance en 30 jours a été calculé par la formule de Fukasawa *et al.* (1980):

$$\mu = \frac{\ln C_1 - \ln C_0}{(T_1 - T_0) \ln 2}$$

Après comptage sous microscope, à la cellule de Nageotte, le contenu des différents tubes a alors été récolté par filtration sous vide sur un filtre nucléopore de 5 μ m. Le filtre avec les cellules est conservé dans du méthanol et le tout congelé à -80°C. Par la suite, les cellules sont éclatées par action des

ultrasons (Sonix Vibracell); la solution ainsi obtenue est alors soumise à une extraction liquide/liquide: après lavage à l'hexane, les cellules sont extraites par le chloroforme.

L'analyse chimique de la toxicité a été effectuée par CLHP selon la méthode de Lee *et al.* (1987), c'est-à-dire par couplage des toxines avec un réactif fluorescent, le 9-anthryldiazométhane (ADAM) et détection en fluorescence.

RÉSULTATS

Les cultures sans source d'azote rajoutée dans le milieu présentent un taux de division relativement bas (0.032 div.j^{-1}) environ 2.5 à 3 fois plus faible que celui des essais avec source d'azote (fig. 2a). En revanche, le taux de division des cultures enrichies en azote minéral augmente jusqu'à une valeur maximale de 0.092 div.j^{-1} pour 100% de NaNO_3 . Si les quantités de nitrates sont doublées ou triplées, cette valeur chute à 0.07 div.j^{-1} dans les deux cas. On constate donc une influence directe de la concentration en azote minéral sur la croissance, jusqu'à une valeur seuil de $880 \mu\text{M.l}^{-1}$.

En ce qui concerne la toxicité, exprimée en picogrammes d'acide okadaïque par cellule, les valeurs varient peu autour d'une moyenne égale à: $4.8 \pm 0.5 \text{ pg.cell}^{-1}$, les différences observées entre les concentrations d'azote testées n'étant pas significatives (fig. 2a).

Les cultures enrichies à $5 \mu\text{M.l}^{-1}$ et $10 \mu\text{M.l}^{-1}$ de Na_2 Glycérophosphate présentent les taux de division les plus faibles soit environ 0.07 div.j^{-1} . Ce sont les algues cultivées à $0 \mu\text{M.l}^{-1}$, $15 \mu\text{M.l}^{-1}$ et $20 \mu\text{M.l}^{-1}$ de phosphates qui ont les taux les plus élevés soit 0.09 div.j^{-1} ; nous obtenons donc une courbe de type "V" avec un minimum (fig. 2b). Ces résultats montrent une action moins marquée qu'avec l'azote du phosphore organique sur la division cellulaire. Néanmoins, la toxicité la plus forte est détectée dans les cultures ayant le taux de croissance le plus bas: 0.066 div.j^{-1} ce qui correspond à la composition en phosphate d'un milieu "K" "normal", dans ce cas, la courbe est de type "V" inversé avec un maximum (fig. 2b).

Pour chacune de ces expériences, nous avons pu observer lors de l'analyse en CLHP la présence d'une seconde toxine diarrhéique: la DTX1 (fig. 3), dérivé méthylé de l'acide okadaïque normalement présente dans cette souche (Lee *et al.*, 1989). Toutefois, la DTX1 ne représente que 10 à 15% du total des toxines (fig. 4a et 4b), et ce, quelles que soient les concentrations en azote et phosphore testées. Il semble donc, dans ce cas précis, que la production d'acide okadaïque et de DTX1 suivent les mêmes variations quantitatives, et ce, indépendamment des nutriments testés.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Quelques espèces de dinoflagellés peuvent stoker l'azote et le phosphore sous forme de réserves intracellulaires afin de l'utiliser lors d'une carence dans le milieu (Cembella *et al.*, 1984. Dortch *et al.*, 1984). D'après nos résultats, *P. lima* agirait de la même façon avec l'azote puisque même après trois inoculations successives dans un milieu sans nitrate, nous observons un taux de division faible mais significatif dans les cultures (0.03 div.j^{-1}). Par ailleurs, il semblerait que des concentrations croissantes de nitrates aient un effet sur les taux de division avec une valeur seuil de $880 \mu\text{M.l}^{-1}$ au-delà de laquelle la croissance

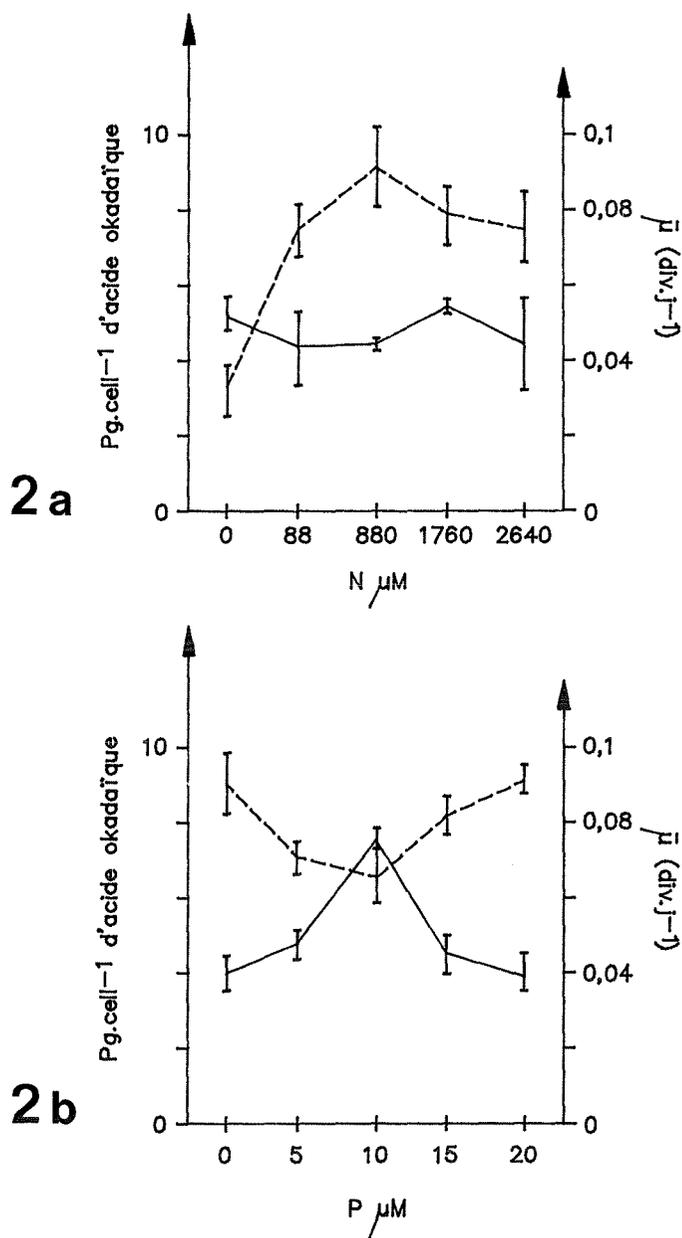


Figure 2. - Influence de diverses concentrations en azote (2a) et phosphore (2b) sur le taux de division (---) et la toxicité (—) de *P. lima*.

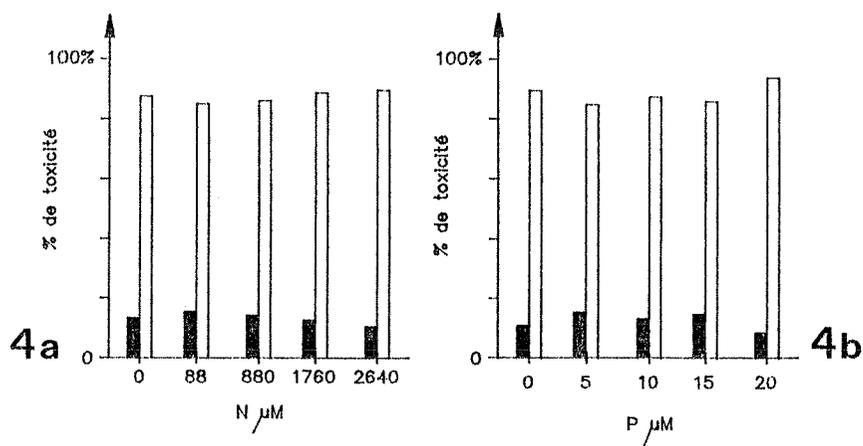
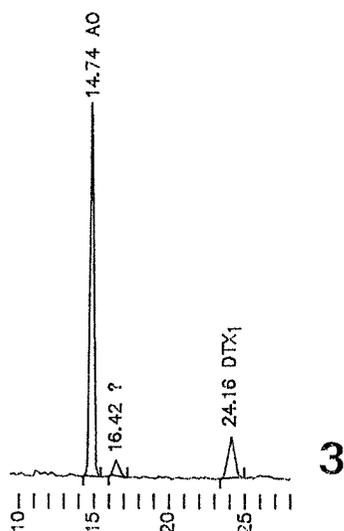


Figure 3. - Chromatogramme de l'analyse en CLHP de *P. lima*. t = temps d'élués en minutes.

Figure 4. - Pourcentages relatifs d'acide okadaïque (\square) et de DTX1 (\blacksquare) dans les cultures de *P. lima* en fonction des concentrations en azote (4a) et phosphore (4b).

diminue; l'influence de ces mêmes concentrations sur la toxicité globale des cultures semble moindre, les valeurs analysées s'échelonnent entre 4.35 et 5.47 $\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$.

Nous observons ici une relation inversement proportionnelle entre la toxicité détectée et le taux de division des cellules: plus la culture se développe rapidement et plus la quantité d'acide okadaïque présente est faible. De plus, il est intéressant de noter que lorsque les concentrations en phosphates sont égales à celles du milieu "K" "normal" (100%), il faut atteindre $880\mu\text{M.l}^{-1}$ de nitrates - soit la teneur du milieu "normal" - pour obtenir une toxicité de 4.42 pg.cell^{-1} . Dans ce cas, et bien que la teneur totale en azote soit plus faible que celle du milieu "K" (pas de NH_4Cl), la toxicité est plus faible que celle obtenue avec une teneur en azote total identique à celle du milieu "K" "normal" (100%) mais avec une teneur en $\text{Na}_2\text{Glycérophosphate}$ de $10\mu\text{M.l}^{-1}$, soit 7.67 pg.cell^{-1} . Inversement, le taux de division est plus faible: 0.092 div.j^{-1} comparé à 0.066 div.j^{-1} respectivement. Les conditions expérimentales font que la différence entre ces deux milieux tient uniquement à la présence de chlorure d'ammonium dans l'expérience sur le phosphore.

Le ratio N/P du milieu "K" est de 93/1 soit un excès d'azote par rapport aux phosphates; en le ramenant à 88/1 par suppression du chlorure d'ammonium, nous observons une augmentation du taux de croissance de la souche, mais, dans le même temps, une diminution de la toxicité. Les nitrates ont donc un rôle primordial sur le taux de division de *P. lima*. Cependant, cette influence positive de l'azote inorganique n'est valable que dans une gamme de concentrations comprises entre 0 et $880\mu\text{M.l}^{-1}$.

Quelle que soit l'expérience, nous observons une toxicité faible ou moyenne de la souche. Le seul facteur testé entraînant une augmentation significative de la toxicité est la diminution du taux de croissance en présence de phosphore organique. Ce phénomène serait sans doute davantage à relier avec la source d'azote supplémentaire présente dans le milieu sous forme de chlorure d'ammonium.

Ces observations vont à l'encontre des résultats donnés par certains auteurs (Anderson *et al.*, 1990; Boyer *et al.*, 1985, 1987) sur l'effet d'une carence en phosphore sur la toxicité des dinoflagellés: une carence en azote entraînerait une baisse très sensible de la toxicité et une carence en phosphore une augmentation dramatique de cette même toxicité. Toutefois, nous pouvons mettre en évidence une relation: taux de croissance faible - toxicité élevée particulièrement nette dans l'expérimentation sur le phosphore, mais non significative dans le test sur l'azote.

Bien que Tomas & Baden (1991) aient travaillé à 26°C sur une souche tropicale clonale de *P. lima* cultivée en jarres de verre, il est intéressant de comparer leurs résultats aux nôtres dans la mesure où leur milieu de culture est identique. Ces auteurs trouvent des contenus toxiques cellulaires comparables (7 pg.cell^{-1} contre 5 pg.cell^{-1} pour la souche espagnole) en présence de phosphore inorganique, avec des variations non significatives en cours de croissance. En revanche, les teneurs sont nettement plus importantes (11 à 13 pg.cell^{-1}) avec du glycérophosphate et pour des taux de croissance moins élevés.

Il semblerait donc que d'une part l'origine de la culture ait une incidence non négligeable sur le contenu toxinique, et d'autre part l'effet positif d'une réduction du taux de division sur la production de toxine ne soit vérifiable qu'en réponse à une carence en phosphate inorganique.

REMERCIEMENTS: Nous remercions le Dr Fraga (Instituto español de Oceanografía - Vigo - Espagne) pour nous avoir aimablement donné un échantillon de la souche PL2V.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON D.M., KULLIS D.M., SULLIVAN J.J., HALL S. & LEE C., 1990 - Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates. *Alexandrium spp.* *Mar Biol.* 104: 511-524.
- BOMBER J.W., NORRIS D.R. & MITCHELL L.E., 1985 - Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida keys. II Temporal, spatial and substrate heterogeneity of *Prorocentrum lima*. In ANDERSON D.M., WHITE A.W., BADEN D.G. (Eds), *Toxic dinoflagellates*. Elsevier Science, Publ., Co., pp. 281-286.
- BOYER G.L., SULLIVAN J.J., ANDERSEN R.J., HARRISON P.J. & TAYLOR F.J.R., 1987 - Effects of nutrients limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 96: 123-128.
- BRAVO I., 1991 - Results of preliminary studies in the field and in culture of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. In RIOM Tomes 101 à 104, AUBERT M. & AUBERT J. (Eds.), pp. 189-196.
- CARLSON R.D., MOREY-GAINES G., TINDALL D.R. & RICKEY R.W., 1984 - Ecology of Toxic Dinoflagellates from the Caribbean Sea. Effects of Macroalgal Extracts on Growth in Culture. In RAGELIS E.P. (Ed.), *Seafood Toxins*. American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 271-287.
- CEMBELLA A.D., ANTIA N.J. & HARRISON P.J., 1984 - The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part 1. *Crit. Rev. Microbiol.* 10: 317-391.
- DORTCH Q., CLAYTON J.R., THORESEN S.S. & AHMED S.I., 1984 - Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.* 81: 237-250.
- FREMY J.M., GLEIZES E. & PARK D., in press - Applications récentes du dosage de l'acide okadaïque aux produits de la pêche. *Toxicorama*.
- FUKASAWA 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. Prog. Ser.* 3: 217-222.
- GAMBOA P., PARK D. & FREMY J.M., 1990 - Extraction and purification of toxic fractions from Barracuda implicated in ciguatera poisoning. *Proceeding of Symposium on Food Contamination*, Nov. 4-15 1990, CAIRO, Egypt.
- HALL S., 1982 - *Toxins and toxicity of Protogonyaulax from the northeast Pacific*. Ph. D. thesis, University of Alaska. 196p.
- HOUVENAGHEL G.T., SENECHAL L., SOHET K. & SZALIES J.-M., 1991 - Preliminary results of the experimental DSP intoxication and detoxication in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to *Prorocentrum lima* cells. Fifth international conference of toxic marine phytoplankton, Newport, R.I., 60. (Abstract)
- KELLER M.D. & GUILLARD R.R.L., 1985 - Factors significant to marine dinoflagellate culture. In ANDERSON D.M., WHITE A.W. & BADEN D.G. (Eds), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, New York, pp. 113-116.
- LASSUS P., 1988 - Plancton toxique et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes. *S.D.P. IFREMER, centre de Brest*. 111 p.
- LEE J.S., YANAGI T., KENMA R. & YASUMOTO T., 1987 - Fluorometric Determination of Diarrhetic Shellfish Toxins by High-Performance Liquid Chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3): 877-881.

- LEE J.S., IGARASHI T., DAHL E., HOVGAARD P. & YASUMOTO T., 1989 - Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1: 147-152.
- MORTON S.L. & NORRIS D.R., 1990 - Role of temperature, salinity, and light on the seasonality of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. In GRANELI E., SUNDSTROM B., EDLER L., & ANDERSON D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 205-221.
- MURAKAMI Y., OSHIMA Y. & YASUMOTO T., 1982 - Identification of Okadaic Acid as a Toxic Component of a Marine Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48(1): 69-72.
- SCHOEMANN V., SOHET K. & HOUVENAGHEL G., in press - Influence of organic matter on the growth of a toxic dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. *Fifth international conference on toxic marine phytoplankton*, Newport, R.I.
- TOMAS C.R. & BADEN D.G., in press - The influence of phosphorus source on the growth and cellular toxin content of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Fifth international conference on toxic marine phytoplankton*, Newport, R.I.
- YASUMOTO T., OSHIMA Y., MURAKAMI Y., NAKAJIMA I., BAGNIS R. & FUKUYO Y., 1980 - Toxicity of Benthic Dinoflagellates Found in Coral Reef. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46 (3): 327-331.
- YASUMOTO T., 1990 - Marine microorganisms toxins - an overview. In GRANELI E., SUNDSTROM B., EDLER L. & ANDERSON D.M. (Eds), *Toxic Marine Phytoplankton*. Newport, R.I.
- YASUMOTO T., OSHIMA Y., MURAKAMI Y., NAKAJIMA I., BAGNIS R. & FUKUYO Y., 1980 - Toxicity of Benthic Dinoflagellates Found in Coral Reef. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46 (3): 327-331.
- YASUMOTO T., 1990 - Marine microorganisms toxins - an overview. In GRANELI E., SUNDSTROM B., EDLER L. & ANDERSON D.M. (Eds), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 3-8.