

Univ. Paris VII
D.E.A de BIOMATHEMATIQUES
Contrat 84/7579

Année 1983-84

**Etude expérimentale et modélisation
des effets de la lumière et des sels
nutritifs azotés sur la croissance d'une
algue unicellulaire servant de fourrage
en aquaculture intensive**

Pierre Frecon

Sous la direction de :

**Alain Menesguen
(Département Environnement Littoral)**

23128

6529
VAL
E

Univ. Paris VII
D.E.A de BIOMATHEMATIQUES
Contrat 84/7579

ANNEE 1983-84

FRECON Pierre

ETUDE EXPERIMENTALE ET MODELISATION
DES EFFETS DE LA LUMIERE
ET DES SELS NUTRITIFS AZOTES
SUR LA CROISSANCE D'UNE ALGUE UNICELLULAIRE
SERVANT DE FOURRAGE EN AQUACULTURE INTENSIVE

FRECON Pierre

Sous la Direction de :
Alain MENEGUEN (Département Environnement Littoral)

1984

IFREMER - SDP
Centre de BREST
Bibliothèque
B.P. 337 - 29273 BREST CEDEX

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p 1
1) <u>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CROISSANCE ET LA CULTURE D'ALGUES PHYTO- PLANCTONIQUES</u>	
1.1 Les principaux types de culture d'algues en laboratoire	p 2
1.2 Les principales caractéristiques de la culture en 'batch	p 2,5
1.3 La croissance du phytoplancton	p 5,12
2) <u>L'EXPERIENCE REALISEE</u>	
2.1 Materiels et methodes	p 13,16
2.2 Résultats	
2.2.1 Remarques préliminaires	p 17,19
2.2.2 Analyse qualitative des phénomènes observés	p 19,21
3) <u>LA MODELISATION</u>	
3.1 Structure et formulation mathématique du modèle	
3.1.1 Organigramme	p 22
3.1.2 Formulation du système différentiel	p 23
3.1.3 Signification des douze paramètres du modèle	p 24,25
3.2 Simulation des deux cultures expérimentales	p 25,26
3.3 Etude comparée par simulation de diverses techniques de cul- ture	
3.3.1 Etude de l'effet combiné de l'auto-ombrage et de la richesse initiale du milieu en azote	p 26,28
3.3.2 Etude de l'effet d'une alternance jour-nuit	p 28,29
CONCLUSION	p 30
Résultats:= Figures	p 31,45
BIBLIOGRAPHIE	p 47,50
ANNEXES	p 51,52

INTRODUCTION.

Depuis plusieurs années, l'aquaculture intensive vise à construire expérimentalement des chaînes alimentaires raccourcies permettant l'élevage d'une espèce de mollusque ou de poisson commercialisable. Ainsi, le CNEOX (IFREMER) a développé dans ses laboratoires des filières démarrant toutes par l'élevage d'une ou de plusieurs algues unicellulaires dont la production primaire est utilisée pour alimenter, soit un crustacé herbivore intermédiaire, soit directement les larves ou les juvéniles de mollusques (ormeaux, coquilles St Jacques, ...).

Une première étape a consisté à mettre au point puis à banaliser la production algale *in vitro*. Bénéficiant à l'heure actuelle d'élevages en routine, il est apparu intéressant de passer à une seconde étape, plus analytique, en vue d'optimiser éventuellement ce type de production.

L'objet de ce stage de DEA est donc de tester la capacité d'adaptation et la croissance d'une algue unicellulaire (en l'occurrence l'Haptophycée *Isochrysis affinis galbana*) à différents scénarios d'éclairement et d'alimentation en sels azotés. On cherchera à établir un modèle numérique simple simulant les principaux processus de la croissance phytoplanctonique.

De plus, à partir de ces cultures en laboratoire, il est possible d'effectuer un suivi rapproché de phénomènes physiologiques à évolution assez rapide (de l'ordre de quelques heures) et fins (modifications de paramètres significatifs du métabolisme cellulaire). De tels travaux doivent permettre de mieux appréhender certaines réactions caractérisant la croissance du premier maillon de la chaîne alimentaire. En fait, ils constituent des bases de données mesurées à haute fréquence à partir desquelles il devient possible de calibrer la modélisation d'effets à court terme (apports ponctuels importants en sels nutritifs, ...), de lancer les bases d'un sous-modèle pouvant venir s'intégrer à un modèle plus général simulant par exemple la production planctonique (phyto et zooplancton) en milieu naturel.

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CROISSANCE ET LA CULTURE D'ALGUES PHYTO-PLANCTONNIQUES.

1.1. Les principaux types de culture d'algues en laboratoire.

1.1.1. La culture en batch.

Selon EPPLEY (1974) le terme de "batch culture" fait référence à la technique de culture dite en "bloom" c'est-à-dire par croissance en enceinte close d'un inoculat à quantité totale d'azote fixée au départ.

Le milieu de culture estensemencé avec la souche à tester et aménagé pour l'aération et la collecte d'échantillons destinés à être analysés.

1.1.2. Le processus en continu.

THE GROWTH AND CULTURE OF DIATOMS 43

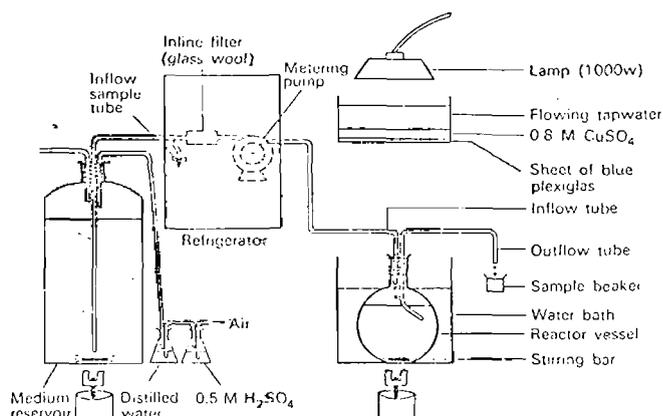


Fig. 4 Diagram of a chemostat culture device used for the study of growth of *Skeletonema costatum* under silicic acid limitation. The reactor vessel (culture vessel) is a 3 litre flat-bottomed boiling flask. From Davis, Harrison & Dugdale (1973).

Il s'agit de cultures à volumes constants caractérisées par l'existence d'un débit entrant continu de milieu nutritif contrebalancé par un débit sortant équivalent de milieu de culture (fig. 1).

1.1.3. La culture par dialyse.

Ce système repose sur le phénomène d'échange par dialyse de sels nutritifs et de métabolites diffusibles au travers d'une membrane semi-perméable. Le processus peut fonctionner en discontinu ou en continu par pompage dans l'un des compartiments d'un débit connu de milieu de culture.

1.2. Les principales caractéristiques de la culture en batch.

La croissance algale dans des milieux de culture non renouvelés et limités en volume suit la courbe typique de croissance de populations micro-

biennes décrite par Monod en 1949 avec ses phases de latence, de croissance exponentielle, ralentie et stationnaire (fig. 2). Chacune se reconnaît non seulement par l'évolution du taux de croissance (μ) * mais aussi par des modifications du métabolisme cellulaire qui accompagnent la croissance, d'où une certaine hétérogénéité cellulaire en termes de caractéristiques physiques, de composantes chimiques et métaboliques. On peut citer l'exemple du Péridinien *Gonyaulax tamarensis*, dont la croissance, assez lente, a été étudiée par PRAKASH (1973) :

fig. 2

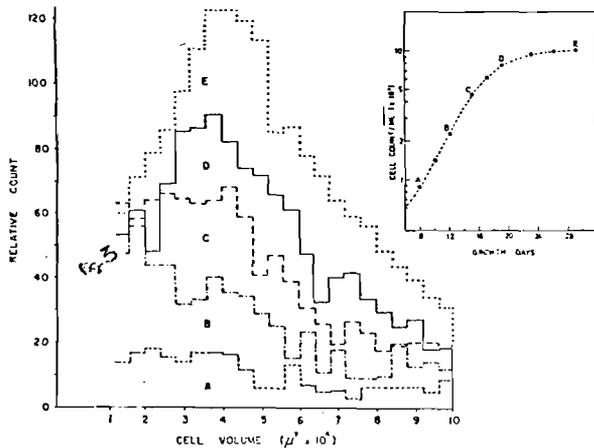


Fig. 2. Cell-size distribution of *Gonyaulax tamarensis* during the various stages of its 29 days growth in a batch culture recorded with an automatic particle size distribution analyzer.

0 - 8 jours = latence

* croissance exponentielle
(A - C ; $dN / dt = N \cdot \mu$)

* croissance ralentie
(C - D ; $dN / dt = a = c^{te}$)

* phase stationnaire
(D - E ; $dN / dt = 0$)

* déclin ($t > 30$ jours ?)

* La croissance durant la phase exponentielle peut être décrite mathématiquement par :

$$dN / dt = \mu N \text{ ou } \mu = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{N}{N_0} \right) \quad (1)$$

$$\text{ou } N = N_0 \cdot 2^{\mu' t} \Rightarrow \mu' = \frac{1}{t} \log_2 \left(\frac{N}{N_0} \right) \quad (2)$$

où

N : concentration cellulaire au temps "t"

N_0 : concentration initiale de cellules

μ : taux spécifique de croissance

t : temps

(1) μ est exprimé dans la base des log naturels / jour

(2) μ' est exprimé en nombre de divisions cellulaires / jour

1.2.1. Evolution des caractéristiques physiques.

Une population algale en phase de croissance peut non seulement se caractériser par une augmentation en nombre des cellules mais aussi par les variations du volume des cellules ainsi que par les changements de la distribution de leur taille.

1.2.1.1. Densité cellulaire.

La rupture de croissance dans une culture en batch s'explique largement sur la base d'un épuisement en sels nutritifs, d'une illumination insuffisante due à l'auto-ombrage et d'une accumulation de métabolites inhibiteurs de croissance.

Ces limitations sont réduites dans des proportions importantes dans les cultures en continu par suite du maintien des algues en phase active de division grâce à une possible régulation du flux entrant de sels nutritifs et corrélativement du débit de soutirage de la culture.

1.2.1.2. Diamètre et volume cellulaire.

Le production de nouvelles cellules plutôt uniformes en tailles et en composition domine durant la phase exponentielle de croissance.

Pendant les phases ralentie et stationnaire, le taux de formation de nouvelles cellules chute sensiblement en relation avec le rythme de production de certains composants cellulaires, entraînant du même coup une augmentation de la taille des cellules (fig. 3).

1.2.2. Les composantes métaboliques.

Durant la phase exponentielle, les réactions aboutissant à la synthèse de biomasse sont synchrones et destinées à produire des cellules filles de taille et de composition chimique voisines. Le changement de taille durant la période post-exponentielle de croissance indique non seulement une rupture de cette synchronicité mais aussi reflète une dérive notable du métabolisme cellulaire.

Bien que la nature des produits de synthèse puisse dépendre des conditions prévalant durant la photosynthèse, les protéines sont habituellement le produit de synthèse dominant durant la phase exponentielle alors que la formation de produits de stockage, principalement des hydrates de carbone, dominerait la croissance post-exponentielle (FOGG, 1965).

Si l'on considère que l'augmentation de taille des cellules devient plus importante durant les phases de ralentissement et d'arrêt de croissance,

l'accumulation de produits de stockage d'une certaine manière, apparaît être reliée à l'agrandissement des cellules algales.

Enfin, la phase finale d'autolyse cellulaire peut être retardée par suite d'un relargage important de produits de stockage étalé en période post-exponentielle de croissance.

1.3. La croissance du phytoplancton.

Les trois facteurs environnementaux principaux régulant la croissance d'algues unicellulaires autotrophes sont respectivement, les sels nutritifs, la lumière et la température.

1.3.1. Action de ces paramètres pris isolément sur la croissance.

1.3.1.1. Les sels nutritifs azotés.

1.3.1.1.1. La croissance en milieu limité en azote.

Des travaux de CAPERON et MEYER (1972) portant sur la croissance à taux stabilisé de quatre espèces algales cultivées en continu dans des milieux limités en nitrates (NO_3^-) et en azote ammoniacal (NH_4^+) on peut retenir :

- que le taux de croissance (μ) ne peut pas être relié directement à la concentration en azote dans le milieu de culture.
- que par contre il existe une relation entre μ et le sel nutritif limitant par l'intermédiaire d'une variable caractérisant l'état nutritionnel de la cellule : on citera en exemple les rapports N/C, chlorophylle a / carbone, voire le contenu cellulaire en azote dans le cas de la croissance en milieu limité en NO_3^- . L'hypothèse émise par de nombreux auteurs dont DROOP (1968) et WILLIAMS (1971) sur l'existence d'un réservoir interne de sels nutritifs dans lequel la cellule puise pour sa croissance se trouve ainsi confirmée.
- enfin, que cette relation peut être approximée par une fonction hyperbolique dérivée de l'équation de Michaelis-Menten d'expression $\mu = \mu_m (q - q_0) / (K + q - q_0)$ (fig. 4)

μ = taux de croissance (temps⁻¹)

q = rapport azote/ carbone dans les cellules

K, q_0, μ_m = constantes :

μ_m = taux de croissance maximum (temps⁻¹)

K = constante de demi saturation ($q - q_0 = K$ pour $\mu = \mu_m / 2$)

$q_0 = q$ pour $\mu = 0$

Fig. 4
(for *Dunaliella tertiolecta*)

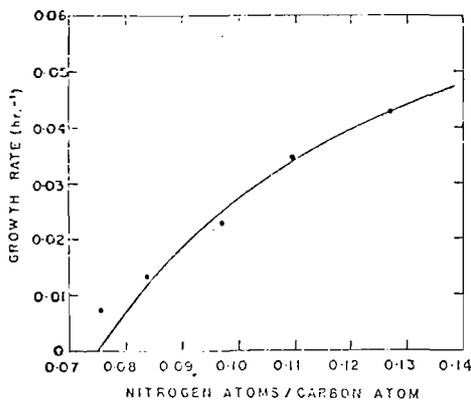
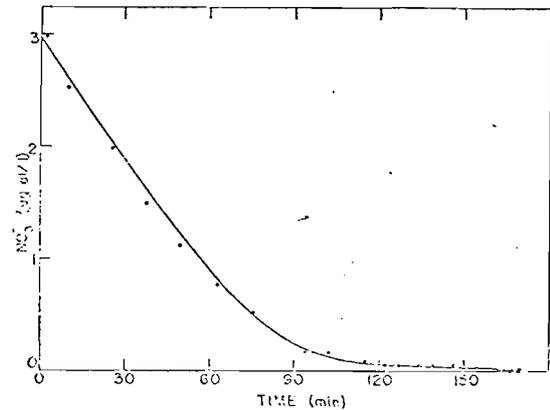


Fig. 5
(for *Monochrysis lutheri*)



1.3.1.1.2. Cinétiques d'absorption.

Les expériences conduites à la fois en batch (DROOP, 1968 ; EPPLEY, ROGERS et Mc CARTHY, 1969) et en continu (CAPERON & MEYER, 1972) indiquent qu'une cinétique d'absorption de type michaelienne relie de manière satisfaisante le taux de "pompage" aux concentrations en NO_3^- ou NH_4^+ dans le milieu de culture. L'expression analytique de cette dépendance obtenue à partir du système d'équations suivant (d'après CAPERON & MEYER) :

$$(1) V = V_{\max} \frac{S - S_0}{K_s + (S - S_0)} \quad \text{ou}$$

V = taux d'absorption de sels nutritifs
($\mu\text{at.g/ l.mir}^{-1}$)

$$(2) V = dS / dt$$

V_{\max} = taux d'absorption maximal ($\mu\text{at.g/ l.mir}^{-1}$)

S = concentration en sels dans le milieu extérieur ($\mu\text{at.g/ l}$)

$S = S_0$ pour $V = 0$

$S - S_0 = K_s$ pour $V = V_{\max}/2$

peut être représenté par : $(S_0 - S) + K_s \ln (S_0/S) = V_m \cdot t$ (fig. 5).

Après épuisement des NO_3^- dans le milieu extérieur, le contenu cellulaire en azote et l'activité de la nitrate réductase peuvent être corrélés de manière positive et significative (COLLOS & SLAWYK, 1976).

Pendant la durée du phénomène de "pompage", le contenu en azote peut être multiplié par un facteur 5 par rapport à sa valeur de référence à l'état stable. Ainsi les cellules ont une large capacité de stockage à la fois pour les ions NO_3^- et NH_4^+ . Ce réservoir de sels nutritifs, lors d'une croissance en régime permanent, est vide d'azote ammoniacal et rempli seulement en partie de nitrates (CAPERON & MEYER, 1972).

Le modèle de transport actif et d'accumulation d'ions proposé par MITCHELL (1967) semble être bien adapté aux phénomènes d'absorption de sels nutritifs par des organismes unicellulaires (SYRETT, 1982).

On the left of Fig 6 is an ATP-ase whose function is to pump out protons with a stoichiometry of $m \text{ H}^+$ per ATP hydrolyzed and on the right a cotransport mechanism in which the transport of one substrate molecule, S, is linked to the cotransport of n protons. In the glucose uptake system $n = 1$.

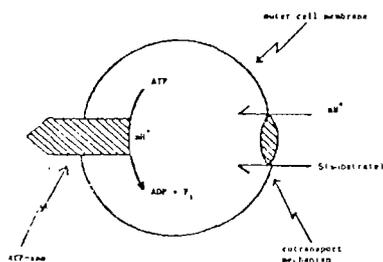


FIG. 6 Model for substrate (S) uptake by proton-linked cotransport (Eddy 1978). See text for explanation.

Dans ce modèle, le déclenchement du processus d'accumulation repose sur l'existence d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane cellulaire, maintenu par le métabolisme. EDDY (1978) propose une représentation schématique du mécanisme relatif à ce processus (fig. 6).

Il est maintenant bien connu que durant la croissance d'une culture en batch avec présence simultanée d'azote ammoniacal et de nitrates comme sources d'azote, l' NH_4^+ est assimilé en premier et c'est seulement lorsqu'il a disparu que le NO_3^- est utilisé (LUDWIG, 1938 ; HARVEY, 1953).

1.3.1.2. La lumière.

La relation fonctionnelle entre l'intensité lumineuse et la photosynthèse, "the light-saturation curve", est à la base de nombreux modèles de production phytoplanktonique (voir PLATT *et al.*, 1976, 80, 83), le palier de croissance pouvant s'expliquer sur la base d'une limitation par la cellule du nombre et (ou) de la taille de ses unités photosynthétiques (Photosystème II).

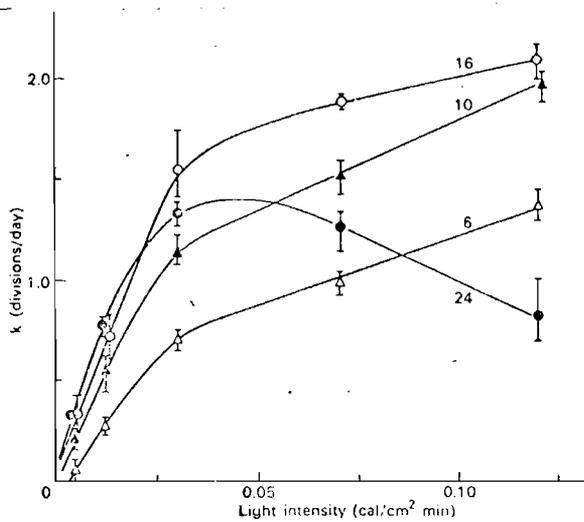
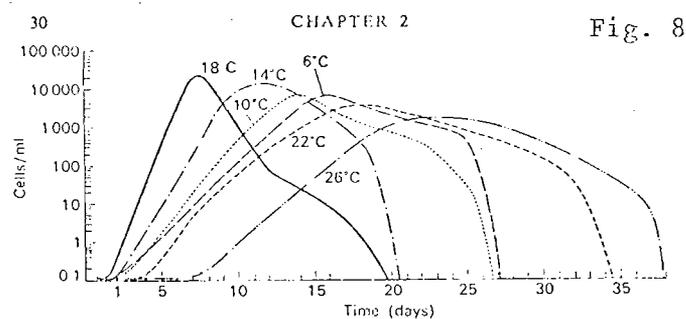


Fig. 7 The specific growth rate (k) of *Ditylum brightwellii* as a function of light intensity with different day lengths or hours of light per 24-hour cycle. Vertical bars indicate the range of observations. Temperature is 20°C. Growth rate is given as divisions/day. From Paasche (1958).

1.3.1.3. La température.

Les cultures en batch ont été utilisées pendant de nombreuses années pour étudier les relations pouvant exister entre le taux de croissance spécifique et la température pour les diatomées. Les limites inférieures et supérieures de température ainsi que la température optimale de croissance (ϑ° pour μ_{max}) sont des paramètres reproductibles pouvant être utilisés pour caractériser une espèce ou un clone (EPPLEY, 1977).

La figure 8 montre pour l'espèce *Chaetoceros socialis*, l'influence que ce paramètre peut avoir sur le taux de croissance et la longueur relative des différentes phases généralement observables sur ce type de culture.



La réponse de la croissance à la longueur de la période d'éclairement ainsi qu'à son intensité est maintenant connue pour de nombreuses espèces algales cultivées en laboratoire (fig. 7).

De forts éclaircements en continu peuvent être à l'origine de processus dits de photo-inhibition au sein desquels la photo-respiration peut jouer un rôle non négligeable.

CHAPTER 2

Fig. 8

1.3.2. Effets combinés sur la croissance de deux de ces facteurs limitants parmi les trois.

1.3.2.1. Relations entre le taux de croissance, les cinétiques d'absorption et les concentrations intra et extra cellulaires de deux éléments nutritifs.

La croissance de *Monochrysis lutheri* dans un milieu de culture contenant à la fois la vitamine B₁₂ et du phosphore a été analysée par DROOP (1974). Il en a tiré un modèle dont les principaux faits marquants sont les suivants :

- pour une culture continue en régime permanent, il est possible d'exprimer le taux de croissance en terme de concentration interne à la fois d'un aliment limitant et d'un aliment non limitant et que le rapport de ces concentrations est, lui, indépendant du taux de croissance.
- le quota cellulaire de subsistance d'un aliment limitant est invariant et indépendant du statut de la cellule vis-à-vis d'autres aliments et constitue une mesure utile du niveau des besoins.
- Vu que le quota de subsistance d'une cellule vis-à-vis d'un aliment non limitant est variable, rapporté à la valeur de subsistance réelle (lorsqu'il est limitant), il constitue une mesure du degré d'excédent de ce nutriment : quotient qualifié par DROOP de "luxury coefficient".
- le modèle dit "multiplicatif" (stipulant essentiellement que tous les nutriments exercent de manière continue un contrôle plus ou moins important) doit être abandonné au profit du modèle à seuil qui lui considère que le contrôle est toujours exercé par un aliment unique, le seul présent en quantité la plus faible comparativement aux besoins de la cellule (loi du minimum de LIEBIG).
- le modèle d'absorption d'aliment basé sur une équation de Michaelis-Menten doit être remodelé par une approche prenant en compte un certain contrôle du produit de la réaction : autrement dit, partant de la constatation selon laquelle il est généralement diffi-

cile à un organisme de débarrasser son environnement de la totalité d'un facteur limitant sa croissance, on doit admettre l'existence dans le milieu de culture d'une concentration résiduelle en ce nutriment certainement faible et même sans doute à la limite de la détectabilité. DROOP dans son article met l'accent notamment pour la vitamine B₁₂ sur l'existence d'un processus qualifié de "binding phenomenon" que l'on peut interpréter comme la possibilité de relargage par les cellules de métabolites venant se combiner à l'aliment disponible et le rendant inutilisable par la cellule. L'auteur propose d'utiliser à cet effet un coefficient $\beta = \frac{\text{quantité totale}}{\text{quantité disponible}}$ de l'aliment, fonction du stade de développement de la population cellulaire.

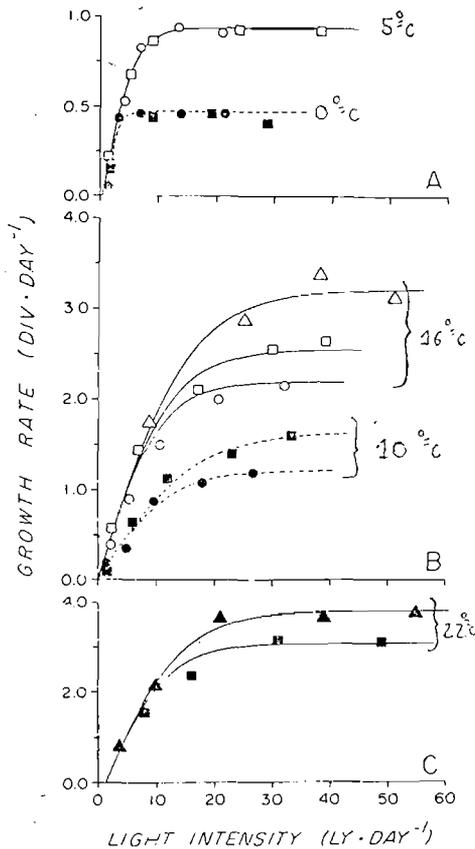
$\beta_{\text{min}} = 1$

$\beta > 1$ proportionnel au taux de croissance

 proportionnel à la densité cellulaire.

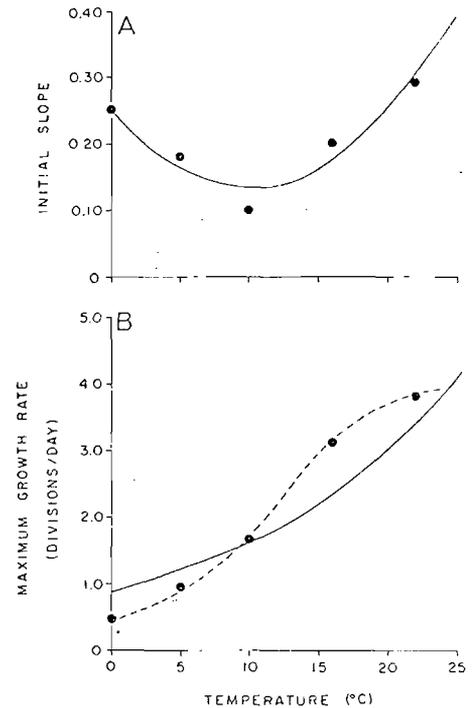
1.3.2.2. Effets combinés de la température et de la lumière.

Fig. 9



○ = 9^h Lumière / 15^h obscurité := 9:15
 □ = 12:12
 △ = 15:9

Fig. 10



La réponse de la croissance phytoplanctonique aux éclairagements usuels pouvant être représentée par une simple hyperbole, certains auteurs ont étudié l'effet de la température sur la forme de cette hyperbole. La figure 9, issue de YODER (1976), donne une représentation des résultats de croissance de la Diatomée *Skeletonema costatum* à diverses températures et sous divers régimes d'alternance jour / nuit. On constate que le taux de croissance maximal atteint augmente avec la température, et YODER (1976), après EPPLEY (1972) et GOLDMAN & CARPENTER (1974), admet une influence exponentielle de la température sur μ_{max} (fig. 10). La pente de l'hyperbole à l'origine varierait par contre de façon parabolique (fig. 10).

1.3.2.3. Effets combinés de la lumière et des sels nutritifs.

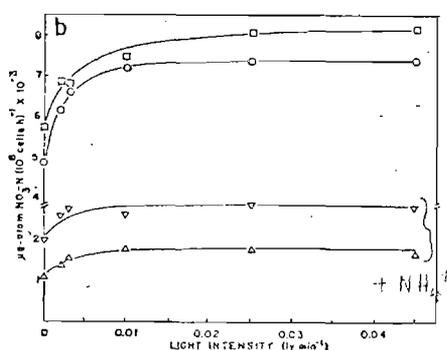


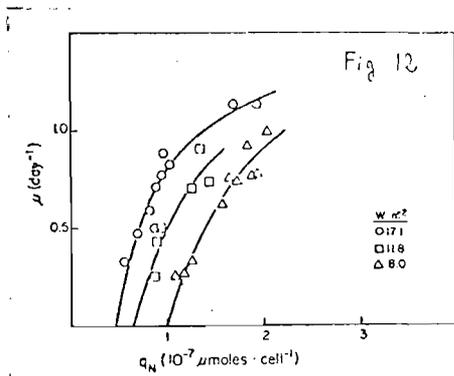
Fig. 4.3. Influence of light intensity on the velocity of nitrate uptake, expressed on a cell number basis, by sun-adapted and shade-adapted cells in the presence and absence of ammonium.

La réponse de l'assimilation de nitrates à l'intensité lumineuse en l'absence d'azote ammoniacal peut être décrite par une relation hyperbolique (BATES, 1976) (fig. 11).

Le transit de sels au travers de la membrane cellulaire se fait par transport actif ; il nécessite donc de l'énergie. Cette énergie est stockée dans la cellule sous forme d'énergie chimique (ATP). La production d'ATP, découlant de la photosynthèse, est en conséquence sous la dépendance de l'énergie lumineuse et de la teneur en CO_2 du milieu (THACKER & SYRETT, 1972b).

La limitation provient cette fois du nombre de sites de transit des NO_3^- du milieu extérieur vers le milieu intérieur.

RHEE et GOTHAM (1981) ont étudié les effets d'une double limitation en lumière et en nutriments sur la croissance de *Scenedesmus* sp. et *Fragilaria crotonensis* cultivées en continu et suggèrent que les effets combinés sont supérieurs à la somme des effets individuels mais ne sont pas multiplicatifs.



Sous des conditions de limitation en nitrates, le quota cellulaire relatif à l'aliment limitant (q_N) pour un taux de croissance constant ainsi que le quota de subsistance (q_0) augmentent lorsque l'éclairement diminue (fig. 12).

Dans une certaine "fourchette" de taux de croissance, la lumière et le quota cellulaire en azote peuvent mutuellement compenser leurs effets et maintenir le taux de croissance à une valeur constante. Sur la base d'équations de croissance et de cinétiques d'absorption de sels nutritifs conformes à celles de DROOP (1974) et CAPERON (1972), ces deux auteurs nous proposent un diagramme conceptuel établissant les différents types d'interactions envisageables (fig. 13).

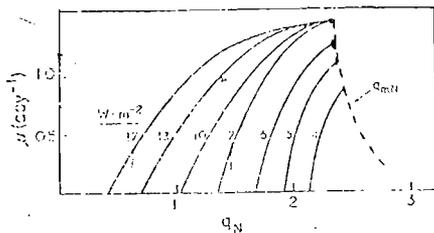


Fig. 13 : La courbe à l'extrême gauche représente la limite où la croissance est indépendante de l'éclairement (saturation) et où l'azote est le facteur limitant. La limite à droite (ligne pointillée) représente la croissance sous influence de la lumière où $\mu = \mu_m L$, $q = q_{mN}$ et où le taux de croissance est indépendant du quota cellulaire en azote. Entre ces deux limites, est figurée la zone d'interaction lumière - sels.

II. L'EXPERIENCE REALISEE.

2.1. Matériels et méthodes.

L'expérience porte sur la culture en batch d'une algue fourrage nano-planctonique (de diamètre moyen = 4 μ), l'Haptophycée *Isochrysis affinis galbana*, élevée en routine dans l'unité de production phytoplanktonique du Centre Océanologique de Bretagne.

Le choix s'est porté sur cette espèce plutôt qu'une autre essentiellement à cause de la relative robustesse de cette souche aux fluctuations de conditions de milieu (Δ pH, $\Delta\theta^\circ$, ...) et en raison de sa réponse correcte à certaines pratiques expérimentales (centrifugation, conservation dans différents cas de figures, ...).

La croissance de la culture est assurée dans des bacs cylindriques, verticaux, en résine polyester armée de tissu de verre de quarante centimètres de diamètre, d'une contenance de 200 litres environ que l'on désignera sous le terme de "scobalite".

L'ensemencement est réalisé à partir d'un inoculum :

- de 10 litres
- contenant de l'ordre de $20 \cdot 10^6$ cellules au millilitre
- où les cellules sont maintenues en phase active de division.

Ces caractéristiques découlent d'une série d'inoculations dans des récipients de volumes croissants (2 l, 20 l) ; l'état d'avancement des cultures étant contrôlé approximativement grâce à un comptage journalier sur cellule de MALASSEZ. Le but de ces différentes opérations est de pouvoir démarrer l'expérience en grand volume avec une densité cellulaire voisine de 10^6 cellules au ml.

La salle d'élevage est thermostatée à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Les scobalites sont éclairés en continu sur une face par une rampe de néons et l'aération des cultures est assurée par un bullage d'air comprimé enrichi en CO_2 . Le milieu nutritif utilisé est un milieu dit de CONWAY dont on trouvera la composition en annexe.

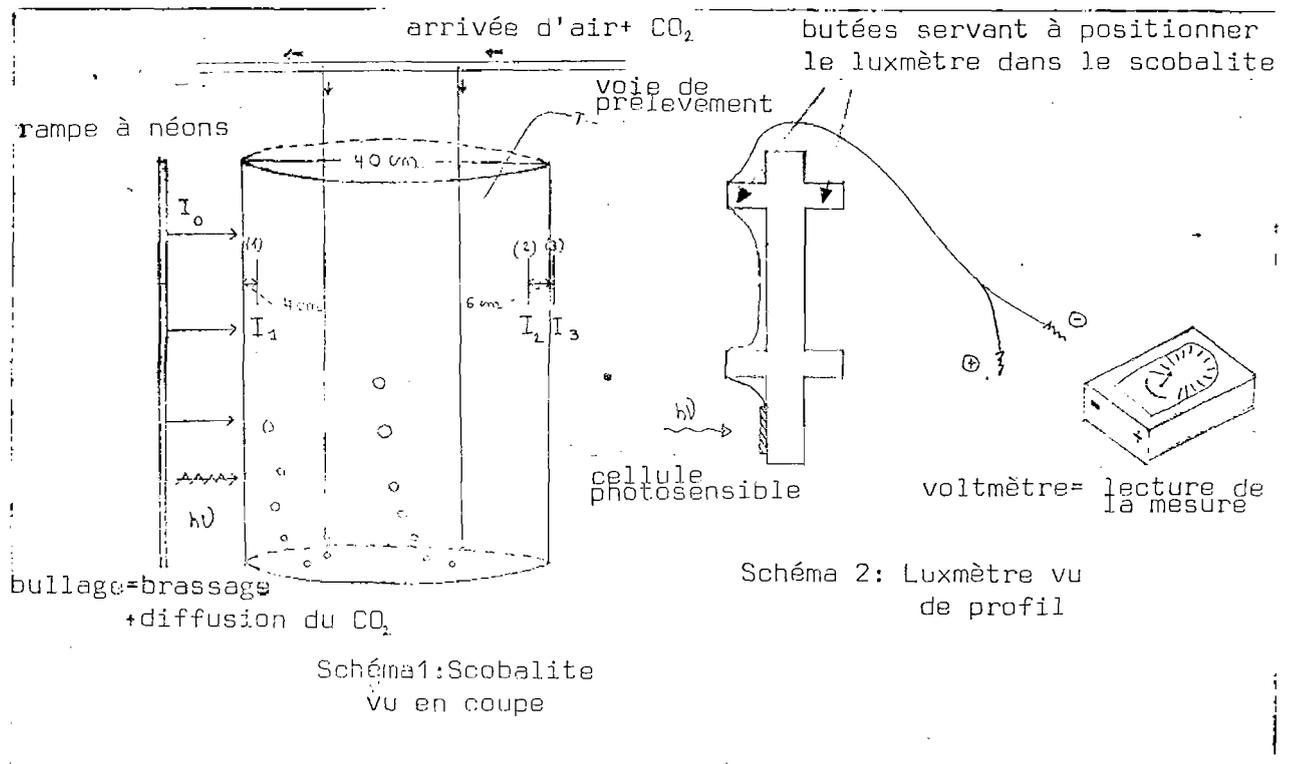
Deux cultures à concentration initiale en nitrates (NO_3^-) respectivement voisines de 500 $\mu\text{atg N-NO}_3/1$ (Scobalite 1) et 1000 $\mu\text{atg N-NO}_3/1$ (Scobalite 2) ont été suivies sur une période de 10 jours.

Les quatre premiers jours, la fréquence d'échantillonnage a été fixée à un prélèvement toutes les trois heures (suivi rapproché de la cinétique d'absorption de l'azote minéral). Au delà, le nombre de prélèvements journaliers a été ramené à deux ou trois pour se limiter en fin de culture à un échantillon / jour.

Les mesures effectuées sur chacun des deux scobalites peuvent se répartir en deux groupes :

- d'une part, les paramètres du milieu à savoir :

* l'intensité lumineuse qui a été mesurée au moyen d'un luxmètre (sensibilité min = 10 lux) ; l'appareil placé dans une double poche plastic (schéma 2) transparente, étanche, étant immergé dans chacun des scobalites en 3 points (de façon à estimer l'auto-ombrage créé par les cellules) précis que l'on peut figurer sur un schéma de l'installation de la manière suivante :



La loi de décroissance exponentielle de l'intensité lumineuse disponible dans un milieu de concentration donnée permet d'obtenir le système d'équations suivant :

$$I_1 = \alpha * I_0 * e^{-k * 0.04} \quad (1) \quad \text{où } \alpha = \text{absorption due au scobalite, sup-}$$

$$I_2 = I_1 * e^{-k * 0.30} \quad (2) \quad \text{posée égale à une constante.}$$

$$I_3 = \alpha * I_2 * e^{-k * 0.06} \quad (3) \quad k = \text{coefficient d'extinction (m}^{-1}\text{).}$$

$I_1, I_2, I_3 = \text{intensités lumineuses aux}$
 $3 \text{ points de mesures (lux).}$
 $I_0 = \text{intensité incidente (lux).}$

L'estimation de "k" à chaque série de mesure s'obtiendra :

- en début de culture, par la moyenne des trois estimations associées à chacune des équations du système (où I_0 et α sont connues *a priori*).
- en milieu et fin de culture, par le résultat tiré de l'équation 2 (extinction due uniquement au milieu de culture) ; la mesure de I_3 avoisinant rapidement la limite de détection de l'appareil utilisé.

* la température par simple immersion d'un thermomètre NOVO-QUICK (précision $\pm 0.1^\circ\text{C}$) dans le milieu de culture.

* le pH, à l'aide d'une sonde à pH de laboratoire (précision ± 0.1 unité pH pour $15 \leq \theta^\circ \leq 25^\circ\text{C}$).

* l'azote minéral dans l'eau a été dosé à l'aide d'un auto-analyseur Technicon selon la méthode adaptée aux mesures d'azote en milieu marin par TREGUER et LE CORRE (1975).

La mesure (en double exemplaire) des concentrations des 3 formes d'azote minéral présentes (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) nécessite à chaque fois un volume de 30 ml de milieu de culture préfiltrés puis filtrés sur filtre en acétate de cellulose (pores à $0.8 \mu \emptyset$).

- d'autre part, les paramètres de la culture :

* le dénombrement cellulaire a été effectué à l'aide d'un compteur de particules Coulter (comptage à $\pm 1 \%$).

Les volumes d'échantillons utilisés pour le comptage s'échelonnaient de 5 ml (en début de culture) à 0.5 ml (en fin de culture) correspondant à des taux de dilution allant respectivement de 1/40 à 1/400 (solutions complétées à 200 ml avec eau de mer filtrée à 1μ).

Parallèlement au dénombrement cellulaire, l'appareil utilisé fournit un histogramme de distribution de taille des cellules ; histogramme destiné à être digitalisé de manière à préciser l'évolution temporelle en volume et en taille des cellules de chacune des deux cultures.

* les mesures de composition en azote et carbone totaux des cellules ont été effectuées sur analyseur CHN Carlo Erba.

Un volume connu de culture (90 ml puis 60 ml les trois derniers jours) est centrifugé à 4000 tours / min. (accélération de l'ordre de 2000 x g) pendant 10 à 15' (●). Après élimination du surnageant, le culot est lyophilisé (de 6 à 12 heures).

L'estimation de la biomasse planctonique se fait alors par différence entre le tube à vide (destiné à recevoir l'échantillon) et le tube plus le culot une fois la lyophilisation achevée.

La mesure en elle-même se fait sur un aliquot pesé avec précision, correspondant à 2 ± 1 mg de produit lyophilisé, déposé dans une nacelle

Pour minimiser les risques d'erreur sur la mesure, chaque nacelle aura été préalablement lavée au chloroforme, puis à l'acétone et déposée dans une étuve thermostatée à 100°C.

Un cycle complet de 24 mesures (nacelles vides, étalons (Acetanilide), échantillons) prend environ trois heures.

* la chlorophylle : après filtration d'un volume connu de culture (filtre en fibre de verre type GF/C Whatman, $\emptyset = 42$ mm), le filtre est immergé dans de l'acétone à 90 % qui assure l'extraction des pigments ; la mesure de l'absorbance de l'extrait est effectuée à 650 nm (maximum d'absorption de la chlorophylle a) et à 750 nm (blanc de cuve et de turbidité) avant et après acidification (Hcl 10 %) dans le cas où l'on recherche également les formes dégradées (phéopigments). (Méthode monochromatique de LORENZEN, 1967).

(●) Des observations au microscope ont permis de s'assurer du non éclatement des cellules après centrifugation.

2.2. Résultats.

L'ensemble des résultats est présenté dans les tableaux 1 et 2 (page 32, 33). A chaque tableau correspond la création d'un fichier (1 x c). Ce fichier est utilisé via un utilitaire de représentation graphique pour figurer l'évolution d'une ou plusieurs variables les unes par rapport aux autres. Pour ce faire, on a attribué la valeur 999999 aux données manquantes ou douteuses (et ainsi ne pas les confondre avec 0 par exemple) de manière à ne pas les prendre en compte lors du tracé des différentes courbes.

2.2.1. Remarques préliminaires.

Avant de s'intéresser à l'analyse des données, il apparaît important de préciser quelques points concernant la validité des résultats obtenus.

2.2.1.1. Paramètres du milieu.

* pH.

Les mesures de T_4 à T_{12} pour les deux cultures sont à éliminer suite à un défaut de fonctionnement de l'appareil (dérive en fait supprimée grâce à un second étalonnage).

* N minéral dans l'eau.

On notera la très bonne reproductibilité des mesures de NO_2^- et NO_3^- . Les mesures de NH_4^+ présentent par contre une disparité non négligeable. La méthode de dosage par colorimétrie au bleu d'indophénol reste la mieux adaptée aux faibles teneurs rencontrées. Cependant dans de tels cas de figure, toute contamination de l'échantillon prend des proportions relatives importantes et ce d'autant plus que le volume utilisé pour analyse dépasse à peine les 2 ml. Les contaminations peuvent se produire au prélèvement et lors de toute manipulation ultérieure ; elles peuvent provenir du contact avec les mains ou avec l'air atmosphérique et il est excessivement difficile de les contrôler.

* Coefficient d'extinction.

Les mesures à T_8 , T_{10} , T_{11} et T_{12} n'ont pas été faites car correspondant à un pas de temps d'échantillonnage trop serré compte-tenu :

- de l'évolution de la mesure (déterminations précédentes).
- et de la précision de l'appareil utilisé.

idem pour Sco 1 : T₁₈ (Sco 2)

T₂₀, 21, 22.

2.2.1.2. Paramètres de la culture.

* Densité cellulaire.

En moyenne 5 à 6 mesures ont été effectuées pour chaque échantillon. Les valeurs présentées dans les tableaux ne sont en fait que les moyennes de ces estimations. Les écarts-types mesurés restent faibles en comparaison des dénombrements effectués.

* Pigments.

Les critères de précision (appareillage, valeurs relatives du triplet : volume de culture filtrée, volume de solvant, longueur du trajet optique) et d'applicabilité (gamme de concentration) de la méthode utilisée (d'après STRICKLAND et PARSONS, 1972) ont été respectés dans leur ensemble.

Cependant la dynamique d'évolution du pourcentage de phéopigments notamment dans le Scobalite 1, beaucoup moins dans le Scobalite 2, semble douteuse. MOED et HALLEGRAEF (1978) signalent en outre que la quantité d'acide à utiliser doit être suffisante pour transformer la chlorophylle en phéopigments mais qu'un trop grand excès peut parfois être la source d'erreurs importantes :

- déplacement du maximum d'absorption des phéopigments.
- transformation des epoxycaroténoïdes en composés absorbant dans le rouge, zone d'absorption de la chlorophylle.
- réactions secondaires lentes engendrant une dérive continue de la mesure.

* Azote algal.

Le dosage de cet élément dans les cellules s'est heurté à deux difficultés principales.

La première fait référence à l'estimation du pourcentage d'azote contenu dans les différents aliquots utilisés pour la mesure au CHN. L'erreur relative sur le dosage d'un élément présent à l'état de trace (qqes %) n'est

pas négligeable en début de culture où la densité cellulaire est la plus faible et où en conséquence la quantité de matière organique déposée dans la nacelle est limitée.

La seconde concerne le passage d'un pourcentage à une biomasse (gN/l, gN/quota de cellules).

Suite à des problèmes sporadiques de précision de pesée (T₆ à T₈ pour Sco 1, T₁₂ pour Sco 2) les estimations de biomasse "azotée" ont été biaisées ; il s'est alors avéré impossible de conserver les mesures d'azote total qui en découlaient.

De plus, les échantillons T₁₆ et T₁₇ (Sco 2), T₁₆ (Sco 1) ont été égarés.

Enfin, les analyses des échantillons T₃₄ et T₃₅ n'ont pas été faites.

* Rapport N/C .

S'agissant d'un rapport et non plus d'une biomasse, on se référera plus à l'évolution dans le temps de ce paramètre qu'à celle correspondant au paramètre précédent.

En début de culture cependant, ce rapport a eu tendance à être sous-estimé (limite de détection de l'azote dans l'échantillon).

2.2.2. Analyse qualitative des phénomènes observés.

Après une période de latence d'environ 15 heures, les deux cultures entament une phase de croissance exponentielle (fig. 1 et 2 p 34). Le début de cette phase de croissance se caractérise par une augmentation de volume cellulaire représenté ici par le mode de l'histogramme des volumes cellulaires déterminé au compteur de particules (fig. 3 et 4 p 35). Ce phénomène, pour lequel il est difficile de proposer une explication satisfaisante, n'est que temporaire puisqu'en fin de croissance exponentielle, le mode de la distribution des volumes cellulaires est retombé à sa valeur initiale ou même moins.

Au-delà de la 60^{ème} heure de culture environ, la croissance devient linéaire et se ralentit jusqu'à s'annuler (fig. 5 et 6 p 36). Cette chute du taux de croissance peut s'expliquer à la fois par l'épuisement des nitrates dans le milieu et par la baisse de l'énergie lumineuse moyenne disponible dans la culture, liée à l'obscurcissement par les pigments cellulaires: ce dernier phénomène est bien représenté par la croissance du coefficient d'extinction de la culture (fig. 9 p 38).

La phase stationnaire de la culture s'étale environ entre la 80^{ème} et la 150^{ème} heure pour le Scobalite 1 et entre la 120^{ème} et la 230^{ème} heure dans le Scobalite 2. Corrélativement, le volume cellulaire recommence à augmenter. Cette période de stabilité de la densité cellulaire de la culture se termine assez brutalement dans le Scobalite 1 par une autolyse des cellules, accompagnée d'une apparition de nitrites et d'ammonium dans le milieu (fig. 7 p 37, fig. 10 p 38), du fait de la reminéralisation commençante de la matière organique détritique ainsi créée. La durée de l'expérience n'a pas permis d'atteindre cette phase dans le Scobalite 2.

Au cours de l'évolution de ces cultures, trois paramètres montrent un comportement particulièrement intéressant:

- la concentration de nitrites dans le milieu augmente régulièrement dans les deux cultures au cours de la phase de croissance exponentielle des cellules, pour chuter brutalement quand les nitrates du milieu viennent à épuisement (fig. 7, 8 p 37): ceci s'explique par le fait que, tant qu'il y a des nitrates dans le milieu, les cellules ont tendance à réduire de la forme NO_3^- à la forme NO_2^- plus d'atomes d'azote qu'elles ne peuvent utiliser dans les étapes ultérieures de la synthèse d'acides aminés; l'excédent des nitrites est donc relargué dans le milieu. Par contre, dès que les nitrates du milieu ont disparu, les cellules repompent la seule forme d'azote minéral encore disponible: les nitrites qu'elles ont précédemment secrétés.

- le contenu cellulaire en chlorophylle chute linéairement au cours du temps (fig. 11 et 12 p 39), ainsi que l'avait déjà observé SHARP (1980) sur une culture en batch de *Thalassiosira pseudonana*, sans toutefois donner d'explication au phénomène. Cette tendance est d'autant plus curieuse que de nombreux travaux (FALKOWSKY, 1980) ont montré que le phytoplancton s'adaptait en quelques heures à une diminution de la lumière incidente par une synthèse de chlorophylle. Aucune explication ne peut être avancée dans cette étude.

-le rapport N/C (fig. 13 et 14 p 40) des cellules passe rapidement d'une valeur faible en début de culture à une valeur élevée en fin de croissance exponentielle, pour rediminuer ensuite lentement. Etant donné que l'azote cellulaire dosé à l'analyseur C-H-N représente le total (azote organique cellulaire + azote minéral dissous contenu éventuellement dans les cellules), on peut supposer que la rapide augmentation du rapport N/C correspond à un pompage rapide de NO_3^- du milieu, qui s'accumule donc dans le compartiment intracellulaire. Celui-ci était partiellement vide dans les cellules de l'inoculum, et il se videra à nouveau à partir du moment où l'azote minéral du milieu sera épuisé. Le fait que l'inoculum vienne d'une culture elle-même déjà très dense explique donc que l'on puisse trouver au départ des valeurs de N/C semblables à celles de la fin de l'expérience.

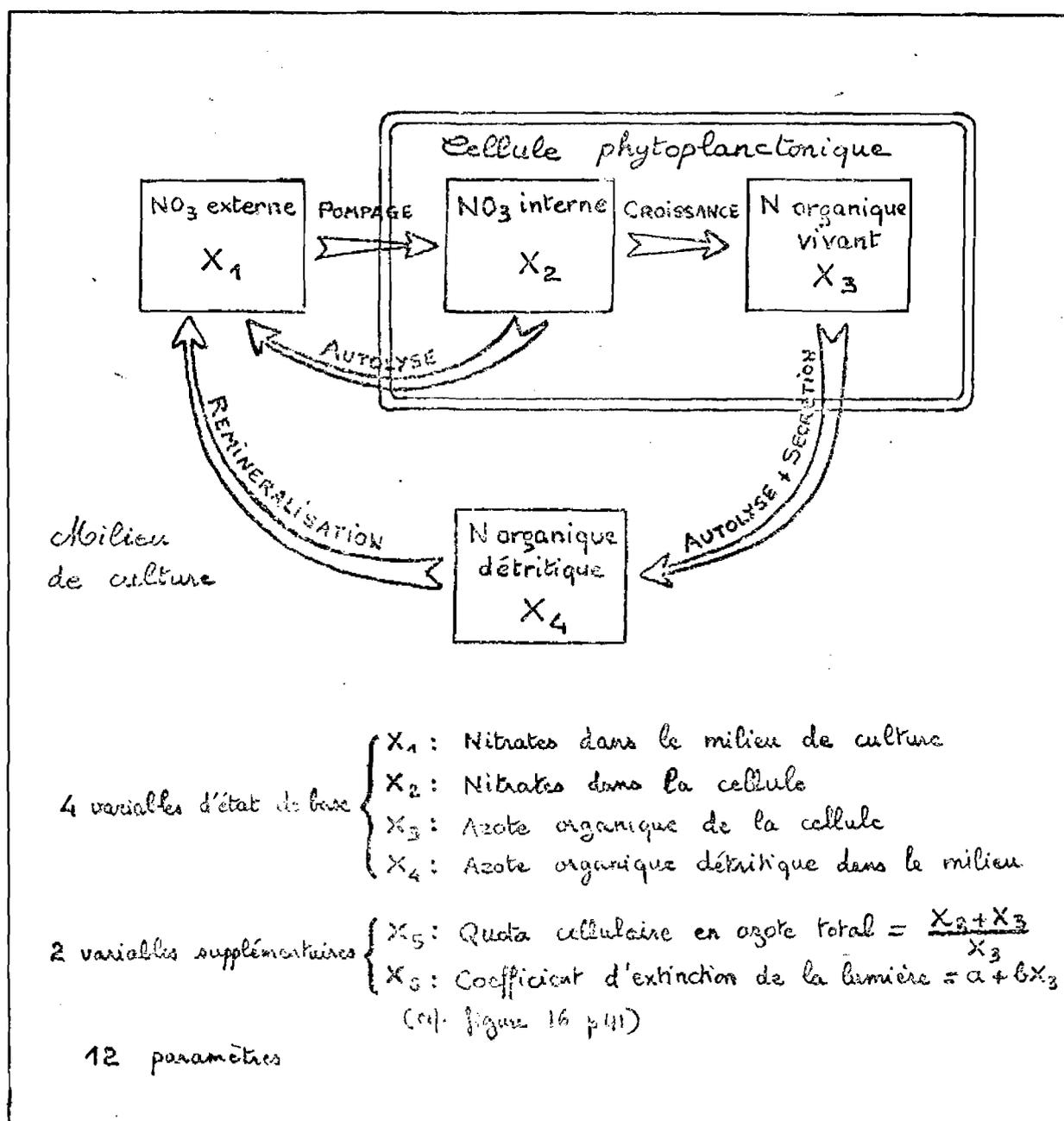
Ceci correspond bien aux résultats de MOAL et al. (1977) d'abord, qui montrent que le carbone cellulaire peut être considéré comme une bonne référence cellulaire, indépendante du taux de croissance, et au nombreux travaux qui, par ailleurs, montrent qu'une population jeune, en pleine croissance, présente toujours des rapports N/C plus élevés que des populations sénescents ou en milieu limitant: MYKLESTAD (1972), SKOGLUND (1976), LE MASSON (1977), ANTIA et al. (1963).

III. MODELISATION.

3.1. Structure et formulation mathématique du modèle.

3.1.1. Organigramme.

Il s'agit d'un modèle à 2 "super-compartiments" : les milieux extra et intra cellulaires où la variable que l'on mesure se trouve elle-même sous deux états fondamentaux : l'azote minéral et l'azote organique. Ceci conduit donc à constituer un modèle à $2 \times 2 = 4$ compartiments, dont les interactions sont schématisées par l'organigramme ci-dessous.



3.1.2. Formulation du système différentiel.

L'ensemble des équations établissant les relations entre ces différentes variables s'établit comme suit :

$$\frac{dX_1}{dt} = \underbrace{-\mu \cdot \text{Param}(4) \cdot \frac{X_1 - \text{Param}(6)}{\text{Param}(5) + X_1 - \text{Param}(6)} \cdot X_3}_{\text{Pompage}} + \underbrace{\text{Param}(9) \cdot X_2}_{\text{Autolyse}} + \underbrace{\text{Param}(10) \cdot X_4}_{\text{Reminéralisation}}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \underbrace{\mu \cdot \text{Param}(4) \cdot \frac{X_1 - \text{Param}(6)}{\text{Param}(5) + X_1 - \text{Param}(6)} \cdot X_3}_{\text{Pompage}} - \underbrace{\text{Param}(9) \cdot X_2}_{\text{Autolyse}} - \underbrace{\mu \cdot X_3}_{\text{Croissance}}$$

$$\frac{dX_3}{dt} = \underbrace{\mu \cdot X_3}_{\text{Croissance}} - \underbrace{\text{Param}(8) \cdot \frac{\text{Param}(1) - \mu}{\text{Param}(1)} \cdot X_3}_{\text{Scission}} - \underbrace{\text{Param}(9) \cdot X_3}_{\text{Autolyse}}$$

$$\frac{dX_4}{dt} = \underbrace{\text{Param}(8) \cdot \frac{\text{Param}(1) - \mu}{\text{Param}(1)} \cdot X_3}_{\text{Scission}} + \underbrace{\text{Param}(9) \cdot X_2}_{\text{Autolyse}} - \underbrace{\text{Param}(10) \cdot X_4}_{\text{Reminéralisation}}$$

$$\frac{dX_5}{dt} = \frac{1}{X_3} \frac{dX_2}{dt} - \frac{X_2}{(X_3)^2} \frac{dX_3}{dt}$$

$$\frac{dX_6}{dt} = \beta \cdot \frac{dX_3}{dt}$$

avec taux de croissance $\mu = \text{Param}(1) \cdot \frac{X_5 - \text{Param}(3)}{\text{Param}(2) + X_5 - \text{Param}(3)} \cdot \frac{\bar{I}}{\text{Param}(7)} \cdot e^{\left[1 - \frac{\bar{I}}{\text{Param}(12)}\right]}$

et intensité lumineuse moyenne $\bar{I} = \frac{I_0}{d X_6 + \beta}$ (ref. fig 15 p 41)

3.1.3. Signification des douze paramètres du modèle. (cf. figure 45)

- le paramètre (1) représente le taux de croissance maximum (heure^{-1}).
- " (2) " la constante de Michaelis pour la croissance (s.d).
- " (3) " le quota cellulaire N total / N organique minimum pour la croissance (s.d).
- " (4) " le facteur de proportionnalité entre la croissance et le pompage des NO_3^- (s.d).
- " (5) " la constante de Michaelis pour le pompage ($\mu\text{at.g/l}$).
- " (6) " la concentration minimum de NO_3^- dans le milieu extérieur nécessaire à l'amorce du pompage ($\mu\text{at.g/l}$).

Chacun correspond respectivement aux paramètres μ_{max} , K_q , q_0 , b , K_s et S_0 du modèle de CAPERON et MEYER (1972).

- le paramètre (7) représente l'intensité lumineuse optimale de croissance pour l'algue étudiée, mesurée en W/m^2 . Ce paramètre sera utilisé dans l'équation de STEELE (1962), qui exprime une des formes possibles de réponse de la photosynthèse aux variations de l'énergie lumineuse, par la formule :

$$\mu / \mu_{\text{max}} = I / I_{\text{opt}} e^{(1 - I / I_{\text{opt}})}$$

avec μ = taux de croissance et I = intensité lumineuse

Cette relation a été intégrée au modèle sous une forme légèrement modifiée en sens qu' est prise en compte, non plus l'intensité lumineuse incidente, mais l'intensité lumineuse moyenne (\bar{I}) disponible dans un cylindre vertical éclairé unilatéralement (on trouvera d'ailleurs, en annexe 2, le détail du calcul de cette intensité).

- le paramètre (8) représente le taux maximum de sécrétion d'azote organique (heure^{-1}).
- " (9) " le taux de mortalité des algues (heure^{-1}).
- " (10) " le taux de reminéralisation de l'azote détritique (h^{-1}).

Les deux paramètres restant **sont** destinés, via les deux variables d'état complémentaires, à faire le lien entre variables mesurées et variables estimées.

- le paramètre (11) : une relation linéaire a été établie entre la variable mesurée "k" (coefficient d'extinction de la lumière) et le nombre de cellules par millilitre de culture (fig. 15, p.41). Or on ne simule pas le nombre de cellules. Donc pour se rapporter à la variable simulée (N organique vivant = X_3), on assimilera le contenu azoté organique par cellule à une constante de valeur égale à celle du paramètre 11.
- le paramètre (12) : le quota cellulaire en azote (variable simulée) peut se relier au rapport N / C mesuré au C.H.N., via le rapport carbone / azote organique des cellules par l'expression $X_5 = \text{param. (12)} \times N / C$.

3.2. Simulation des deux cultures expérimentales.

Les résultats sont présentés dans les figures (17, 18, p.42, 43). L'évolution effectivement mesurée des variables est figurée par des traits pleins, l'évolution simulée par des traits pointillés.

Il est important de signaler que :

- les graphiques 3 présentent l'évolution de l'azote algal total mesuré (N phyto) et de l'azote cellulaire simulé (à savoir $X_2 + X_3$).
- les graphiques 5 présentent l'évolution du rapport N / C mesuré et du N / C simulé à savoir ($X_5 / \text{paramètre (12)}$).

de manière à pouvoir comparer ce qui peut l'être.

La simulation des deux cultures avec rigoureusement le même lot de paramètres, donne de bons résultats pour l'ensemble des variables prises en compte. On notera en particulier le ralentissement de la chute du NO_3^- dans le milieu observé dans le Scobalite 2, pour lequel la teneur double en NO_3^- a engendré une forte densité algale, donc un auto ombrage plus important que dans le Sco 1.

Par contre, si durant la phase qui aboutit à la disparition de NO_3^- du milieu exprimé, le modèle reproduit fidèlement (pour le Sco 1, moins pour le Sco 2) la cinétique d'évolution de la quantité totale d'azote présente dans les cellules, à l'inverse, le modèle est pris en défaut lorsqu'il s'agit de rendre compte de la décroissance marquée enregistrée partiellement par cette variable dans les 50 h qui suivent la phase d'augmentation.

En fin de simulation (aux environs de la 150e heure), modèle et données s'accordent de nouveau, pour les deux cultures.

En fait, le modèle rend compte d'une chute "régulière" de la quantité totale d'azote présente, au fur et à mesure que la phase d'incorporation des NO_3^- , préalablement stockés dans les composés organiques se développe.

Les données observées montrent par contre une redescente rapide et presque totale de ce quota. On est d'autant plus surpris par ce résultat que de nombreux auteurs signalent un décalage important entre taux de croissance et de pompage toujours au profit de ce dernier....

De même, pour le rapport N/C, il existe une divergence entre modèle et mesures qui se retrouve pour les deux cultures : durant la phase initiale, de pompage du NO_3 extérieur, le rapport N/C simulé augmente selon une courbe à concavité dirigée vers le bas alors que les mesures montrent une croissance à concavité vers le haut. Ceci pourrait suggérer qu'en réalité, le NO_3 intracellulaire ne subit pas une accumulation aussi simple que celle décrite par le système différentiel utilisé.

Enfin, le coefficient d'extinction simulé se montre systématiquement trop faible pour le Scobalite 2, ce qui permet une croissance algale un peu trop rapide, donc un épuisement du NO_3 extra-cellulaire trop précoce par rapport à la réalité. Etant donné que l'éclairage du Scobalite 2 était plus faible que celui du Scobalite 1 (47 W/m^2 contre 60 W/m^2), on peut penser que les cellules se sont adaptées en augmentant leur contenu chlorophyllien dans le Scobalite 2, ce qui expliquerait qu'à nombres de cellules comparables, le coefficient d'extinction ait été plus fort dans le Scobalite 2 que dans le 1.

3.3. Etude comparée par simulations de diverses techniques de culture.

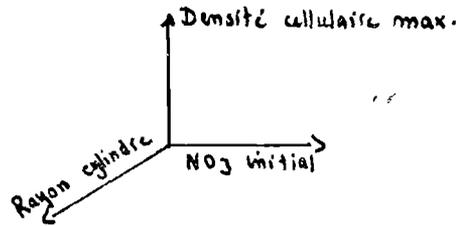
3.3.1. Etude de l'effet combiné de l'auto ombrage et de la richesse initiale du milieu.

Le rendement d'un tel type de culture se juge à la fois sur :

- la vitesse avec laquelle la culture atteint son maximum de densité cellulaire (nombre de cellules/ml).
- la valeur de cette densité cellulaire maximale.

3.3.1.1. Etude de l'effet combiné de ces deux paramètres sur le maximum de densité cellulaire.

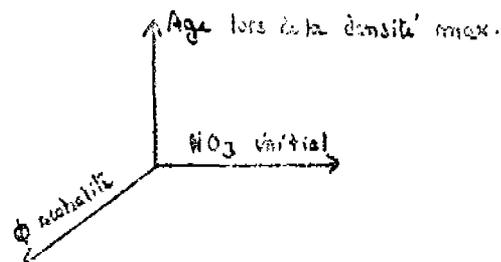
Les résultats des simulations correspondantes, schématisées sur un bloc diagramme en trois dimensions, sont présentés p. 44 fig 19



- à rayon identique, le maximum de densité cellulaire augmente avec la concentration initiale en nitrates dans le milieu.
- à quantité totale d'azote identique, le maximum de densité cellulaire augmente quand le rayon du cylindre de culture diminue.
- enfin, à faible quantité de NO_3^- au départ (250, 500 $\mu\text{atg/l}$) l'effet du diamètre du scobalite sur le rendement (en terme de densité de cellules) est peu marqué. L'effet pénalisant des grands diamètres (conséquence de l'auto ombrage) est cependant d'autant plus important que le milieu est plus chargé initialement en NO_3 (> 500 $\mu\text{atg/l}$).

3.3.1.2. Etude de l'effet combiné de ces deux paramètres sur le délai nécessaire pour atteindre le maximum de densité cellulaire.

(44 fig 20)
Du bloc diagramme présenté p on retiendra que :



On peut conserver un délai fixé en augmentant la biomasse produite (donc la concentration initiale en NO_3) à condition de diminuer le rayon du cylindre de culture.

Ainsi pour un optimum de nombre de cellules au ml atteint après 80 heures de culture, on peut monter à :

- 950 $\mu\text{atg/l}$ NO_3^- au départ pour un Scobalite de rayon $R = 0.1$ m
- 400 " " " " " $R = 0.3$ m
- 240 " " " " " $R = 0.5$ m

A quantité initiale de NO_3^- identique, le maximum de densité cellulaire est atteint d'autant plus rapidement que le rayon du Scobalite est plus faible, en raison du faible auto-ombrage qui advient alors.

Ainsi pour 500 $\mu\text{atg/l}$ NO_3

- l'optimum cellulaire est atteint en 66 heures avec un Scobalite de rayon = 0.1 m
- " " " 87 " " 0.3 m
- " " " 105 " " 0.5 m

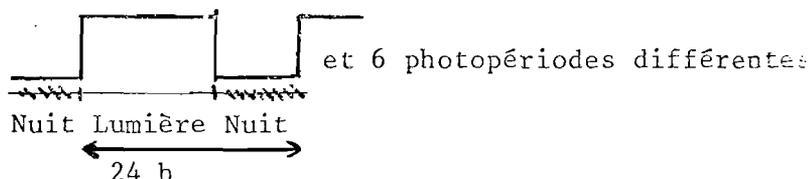
L'effet de l'auto-ombrage sur la vitesse à laquelle le plateau de densité cellulaire est atteint se manifeste suivant des modalités comparables à celles décrites dans le paragraphe précédent mais encore plus accentuées ; les forts diamètres sont d'autant plus pénalisants sur le délai à attendre que la charge du milieu en nitrates est forte.

3.3.2. Etude de l'effet d'une alternance jour - nuit.

L'effet sur l'âge auquel une culture, lancée avec une concentration initiale en NO_3^- de 250 $\mu\text{at.g/l}$, atteint son maximum de densité cellulaire a été étudié en jouant à la fois sur :

- la longueur (par jour) de la période d'éclairement (en heures) ou photopériode.

avec un signal de type



- le rayon du Scobalite.

Des résultats de cette série de simulations présentes sur la figure 22 p.45, on retiendra que :

- la relation liant l'âge auquel la culture atteint son maximum de densité cellulaire à la longueur de la photopériode est en première approximation de type hyperbolique : (indépendamment du rayon du Scobalite) pour des photopériodes très faibles (≤ 5 heures), le temps que met la culture à atteindre son maximum tend vers l'infini ; entre 5 et 10 heures, cette variable "âge" décroît de manière significative. A partir de 15 h d'éclairement la courbe relative à

IsochrYSIS atteint un minimum ; un tel gain de près de 10 heures sur un éclairage en continu devrait permettre une substantielle économie sans pour autant détériorer significativement le rendement de la culture.

- à délai identique pour atteindre le maximum de densité cellulaire, l'éclairage doit se prolonger d'autant plus longtemps que le diamètre du Scobalite est élevé. Ainsi pour un délai de 100 heures il suffira de :

*		une photopériode de 9 heures pour un Scobalite de 0.1 m de rayon
*	"	13 " " 0.3 m "
*	"	17 " " 0.5 m "

CONCLUSION.

Depuis déjà plusieurs dizaines d'années, la physiologie du plancton végétal a été largement étudiée. Ces recherches ont permis notamment de mieux conceptualiser la croissance phytoplanctonique en relation avec les principaux facteurs environnementaux limitants.

Le but de ce stage était en fait d'utiliser cette masse d'informations pour, si possible, dans un premier temps bâtir un modèle simple de croissance et dans un second temps utiliser ce modèle pour simuler la croissance d'une algue fourrage dans des conditions différentes de celles utilisées habituellement, par exemple en terme d'éclairement et d'alimentation en sels nutritifs.

Le modèle proposé dans ce rapport permet de dégager les points importants suivants :

- aux faibles concentrations en NO_3 ($< 500 \mu\text{atg./l}$) l'effet du diamètre du cylindre dans lequel se développe la culture sur le rendement de la croissance (densité cellulaire maximum, âge correspondant) est peu marqué.
- à des concentrations plus élevées cependant, la limitation, par le rayon, du rendement de la culture, en conséquence de l'auto-ombrage est nettement plus effective.
- plutôt que d'utiliser systématiquement un éclairage continu, le recours à un éclairage "jour-nuit" (artificiel ou en milieu naturel si conditions de θ° satisfaisantes) peut s'envisager ainsi qu'en témoigne l'évolution de type hyperbolique de l'âge du maximum de densité cellulaire en fonction de la longueur de la photopériode.

Ces premiers résultats ouvrent la perspective de recherches plus approfondies en terme de biotechnologie, d'ingénierie de méthodes de production adaptées à la culture d'algues unicellulaires ; l'optimisation du rendement de la culture faisant appel à des contraintes d'ordre "physique" (forme de récipient, hydraulique, temps de renouvellement) et "économique" (coûts d'engrais d'azotes, de consommation électrique, ...).

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'IFREMER dans son ensemble (personnels administratif et scientifique) pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de D.E.A au Centre Océanologique de Brest et plus particulièrement A.MENESGUEN pour la qualité du travail qu'il m'a proposé ainsi que pour l'aide efficace et soutenue qu'il m'a apportée tout au long de ce stage.

En son nom et au mien, je tiens tout particulièrement à remercier pour leur active collaboration et leurs conseils Marie-Madeleine BODENES et Hervé CHARTOIS du département " Biologie, Aquaculture et Pêche, (B.A.P) " qui ont pris en charge respectivement:

- la réalisation des cultures et la préparation d'échantillons destinés à l'analyseur C.H.N
- le dosage de la totalité des formes azotées dans les milieux de culture.

Sont également associés à ces remerciements:

- A.AMINOT, P.GENTIEN, R.KEROUEL, G.YOUEUNOU du département "Environnement Littoral, Gestion du Milieu Marin "
- J.ROBIN du B.A.P.

TABLEAU 1

RCE	TEMP	PH	K(M-L)	NH4	NO2	NO3	CEL/ml	CHL	KPHRED	N/C	Nitro
	°C			µg/l	µg/l	µg/l		µg/l			µg/l
T1	3	19.7	7.1	1.9	.8	.45	567.25	1019360	999999	999999	999999
T2	6	21	6.9	1.8	1.9	.51	559	1090990	129	4.5	105
T3	9	21.8	7.1	2	1.3	.53	525.95	1208160	117	15	.093
T4	12	22.4	999999	2	.4	.56	511.45	1136750	138.5	4	999999
T5	15	22.8	999999	2.2	.3	.5	505.25	1292320	136	7	.684
T6	18	23	999999	2.2	.4	.62	481.9	1388450	131	13	.085
T7	21	22.7	999999	2.4	.8	.95	474.75	1853600	154	8.5	132.1
T8	24	23.4	999999	999999	.3	1.54	453.2	2133170.1	179.1	11	103
T9	27	23.6	999999	3.1	1.6	2.65	416.5	2274110	209	14.5	104
T10	31	23.6	999999	999999	.4	4.81	380.8	2893680	287	10.5	115
T11	34	23.8	999999	999999	.3	6.82	311.1	3959490	269	21	133
T12	37	23.8	999999	999999	.4	8.66	255.3	4448440	285	31	139
T13	48	23.9	7.7	7.7	.3	11.2	42.05	6489280	399	46	161
T14	51	24	7.5	9	.4	.23	.1	7684560	403.5	48	166
T15	55	23.9	7.6	9.6	.6	.24	1.6	10800200	564	41	143
T16	59	24	7.6	11	.4	.28	.1	11698660	463	47	999999
T17	61	24	7.4	10.8	.3	.25	.1	11425100	631	35.5	113
T18	71	23.9	7.5	999999	.5	.2	.1	16521400	722	27	.085
T19	72	23.9	7.2	11.6	1.2	.24	.1	17194800	804	19	.089
T20	75	23.9	7.2	999999	1.2	.22	.1	17913600	915.5	22	.09
T21	78	23.9	7.4	999999	1.1	.22	.1	18200400	829	33	.085
T22	82	23.9	7.5	999999	1.1	.22	.1	19111600	838	30	.085
T23	84	23.9	7.4	13.1	1.1	.22	.2	20057100	794	27.5	.064
T24	96	23.7	7.4	15.8	1.7	.26	.5	17403000	927.5	16	.087
T25	102	23.7	7.3	15.7	1.8	.19	1.5	17648900	906	17.5	.077
T26	107	23.7	7.5	14.9	1.3	.24	1.8	17000000	547	12	.06
T27	118	23.6	7.4	15.3	1.4	.25	.55	16200400	879.5	22	.082
T28	126	23.6	7.4	15.4	999999	.27	.45	10284500	909	18	.066
T29	131	23.6	7.4	15	1	.41	.1	18380800	885	16.5	.068
T30	143	23.7	7.3	14.7	2.3	.33	.35	17176500	897.5	14.5	.067
T31	150	23.9	7.3	14.8	1.6	.5	.3	20413400	914.5	15.5	.06
T32	167	23.7	7.4	14.2	1.6	.28	.25	18544800	898	19	.067
T33	192	23.7	7.3	12.6	1.2	1.35	.16	9316320	558.5	999999	999999
T34	216	23.8	7.2	6.6	6.4	2.52	.1	1112400	107	60	999999

TAB. LEAU 2

AGE	TEHP (°C)	pH	K(m-1)	NH4	NO2	NO3	CEL/MI	CHL	ZPHRO	N/C	NOVTO
* T0 *	01	18.2	6.8	1.8	1.5	1.081	99394	122.5	61	.061	17.9
* T1 *	31	19.6	6.9	1.8	1.1	1.111	105020	112	16	99999	99999
* T2 *	61	20.7	6.8	2.2	.9	1.104	110270	130	41	99999	99999
* T3 *	91	21.4	6.7	2.1	1.6	1.073	99999	111.5	8.5	.089	26.4
* T4 *	121	22.1	6.9	2.2	.4	1.024	114350	137	12	.079	73.6
* T5 *	151	22.2	6.9	2.4	.4	1.021	115000	132	15	.084	57.9
* T6 *	181	22.5	6.9	2.5	.3	1.020	135830	133	12.5	99999	99999
* T7 *	221	23.2	6.9	2.6	.2	1.012	192740	151	8	99999	99999
* T8 *	241	22.8	6.9	3.0	.4	1.057	197420	179	5	99999	99999
* T9 *	271	22.9	6.9	3.3	.4	2.059	197780	199	15	.098	147.1
* T10 *	311	23.1	6.9	3.3	.4	4.17	299930	271	7	.1	228.6
* T11 *	341	23.1	6.9	3.3	.8	5.72	376480	245.5	22.5	.127	284.3
* T12 *	361	23.1	6.9	3.3	.4	7.39	438600	319	21.5	.142	392.9
* T13 *	481	23.1	7.2	7.1	.3	11.14	651.5	402	43	.147	99999
* T14 *	511	23.1	7.2	9.6	.3	12.17	697960	374.5	50.5	.16	635
* T15 *	551	23.2	7.4	10.5	.3	12.63	921980	597	33	.17	605.7
* T16 *	591	23.3	7.3	11.3	.3	12.73	102600	451	52.5	99999	99999
* T17 *	601	23.3	7.2	12.3	.5	12.79	99999	669.5	34.5	99999	99999
* T18 *	711	23.1	7.3	12.75	.3	12.75	145290	700.5	31	.123	322.1
* T19 *	721	23.2	7.1	18.3	1.4	12.7	149610	721.5	40.5	.154	589.3
* T20 *	751	23.1	7.2	18.6	1.3	12.62	162980	1221.5	24.5	.123	366.1
* T21 *	781	23.1	7.3	19.9	1.2	13.63	165650	1200	32	.145	577.9
* T22 *	821	23.1	7.5	20.5	1	13.18	185040	1232	31	.128	466.2
* T23 *	841	23.1	7.4	20.7	1.5	12.85	189700	1173.5	33	.135	590.7
* T24 *	961	23.1	7.3	23.2	1.4	12.7	180950	1149	43.5	.135	675.7
* T25 *	1021	23	7.3	22.2	1.3	12.7	199580	1189.5	45.5	.124	637.1
* T26 *	1081	23.1	7.4	23.2	1.1	12.7	215040	1165.5	48	.134	934.3
* T27 *	1181	22.9	7.3	24	.7	12.7	221260	1053	56.5	.117	767.1
* T28 *	1261	23	7.4	23.8	.33	12.7	234730	1186.5	46.5	.101	562.9
* T29 *	1311	23	7.4	23.3	.32	12.7	243170	1155	49.5	.098	587.1
* T30 *	1431	23.1	7.3	23	1.6	12.7	229620	1123	52	.102	677.5
* T31 *	1501	23.3	7.3	24.5	2.5	12.7	242330	1010	56.5	.087	511.1
* T32 *	1671	23	7.4	24.7	1.6	12.7	251880	863.5	64	.098	621.8
* T33 *	1921	23	7.4	22.8	1.4	12.7	248940	877	62.5	.086	585.7
* T34 *	2161	23.5	7.3	21.3	.6	12.7	254620	876.5	64.5	.099	99999
* T35 *	2401	23.9	7.5	20.7	.5	12.7	238070	99999	99999	99999	99999

FIGURE 1-

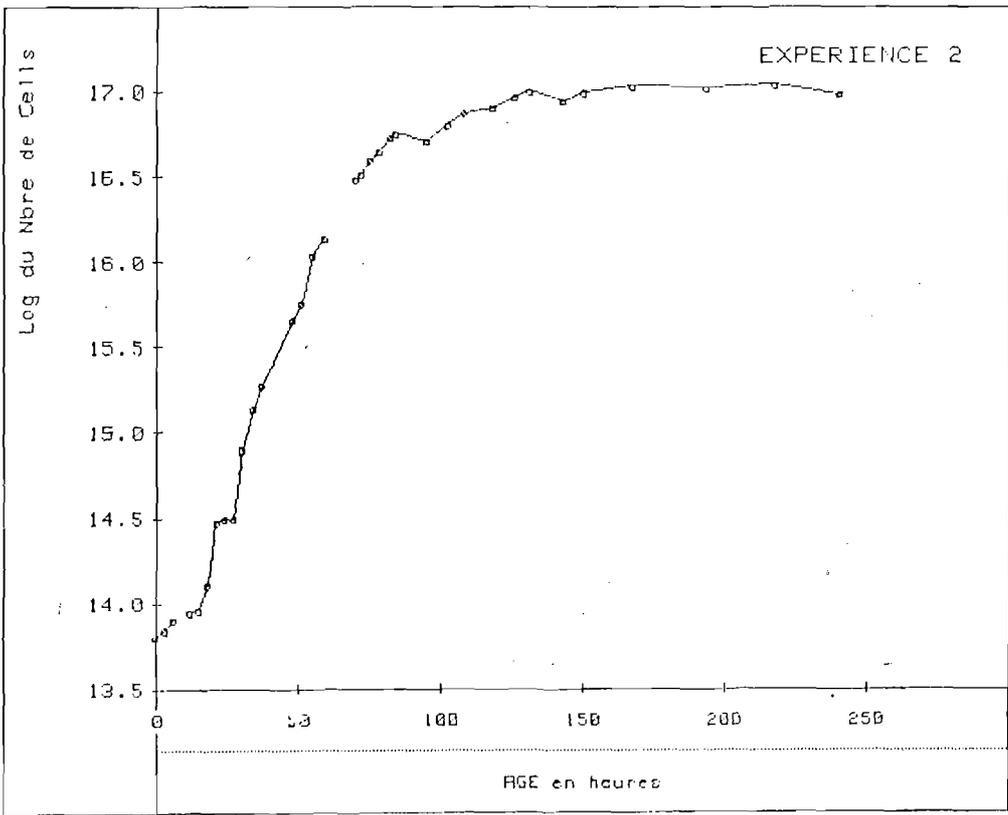
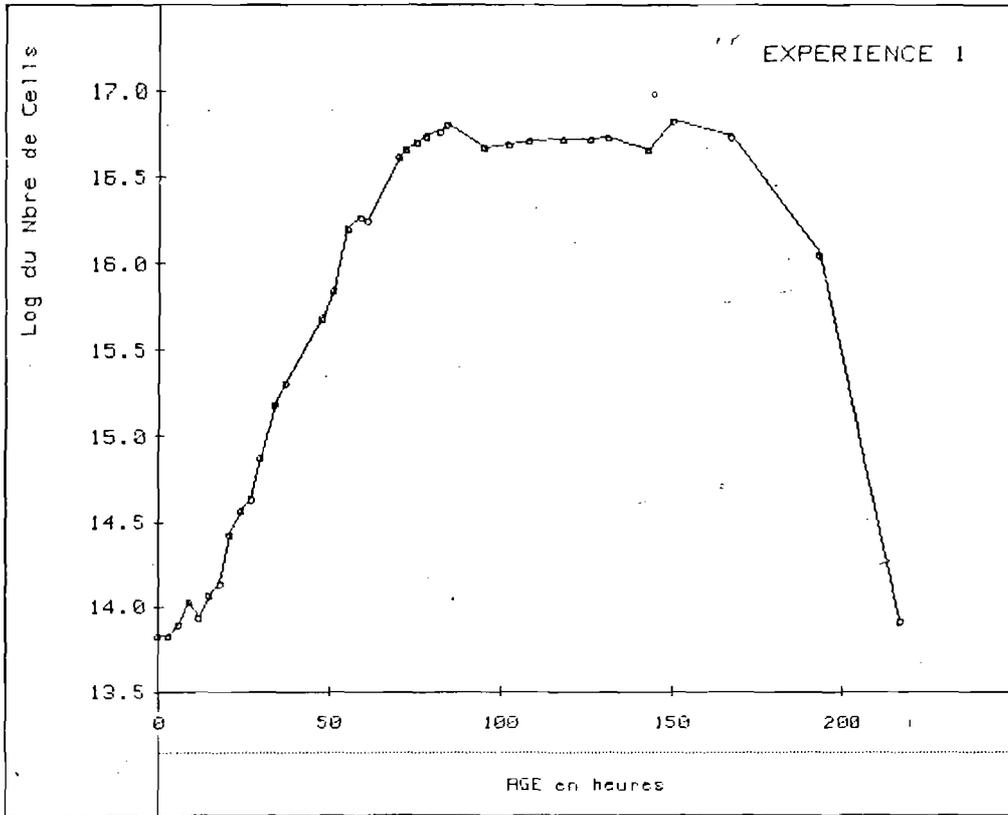


FIGURE 2

FIGURE 3

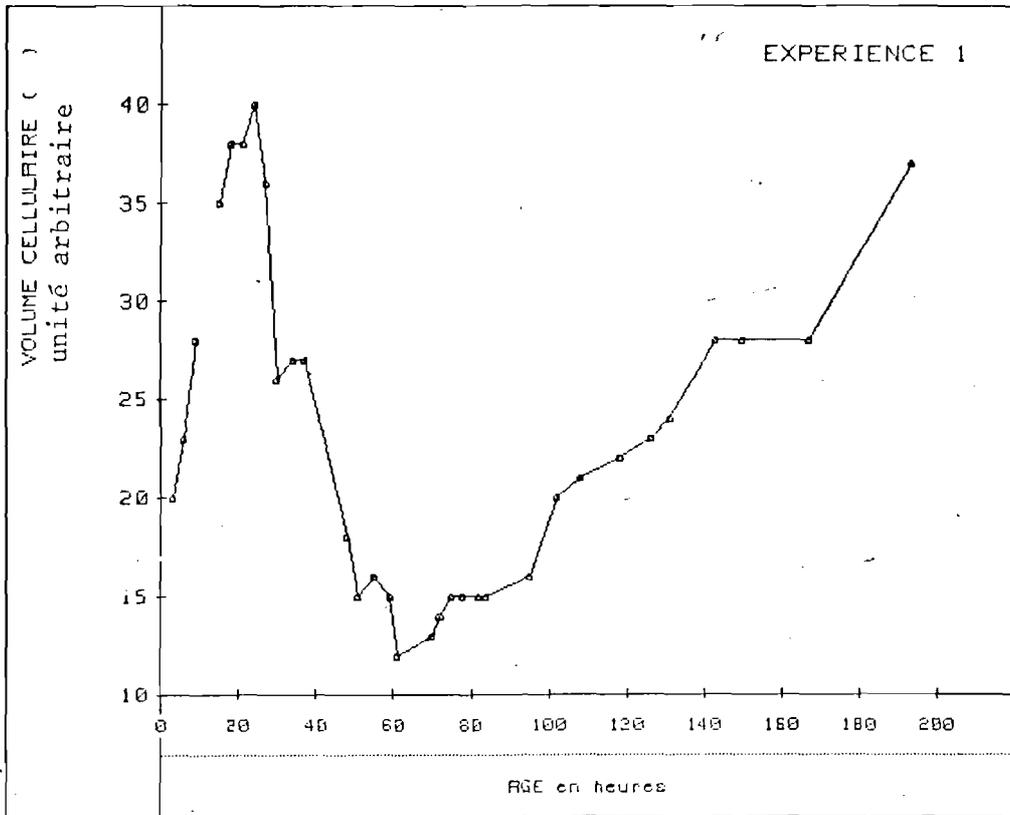
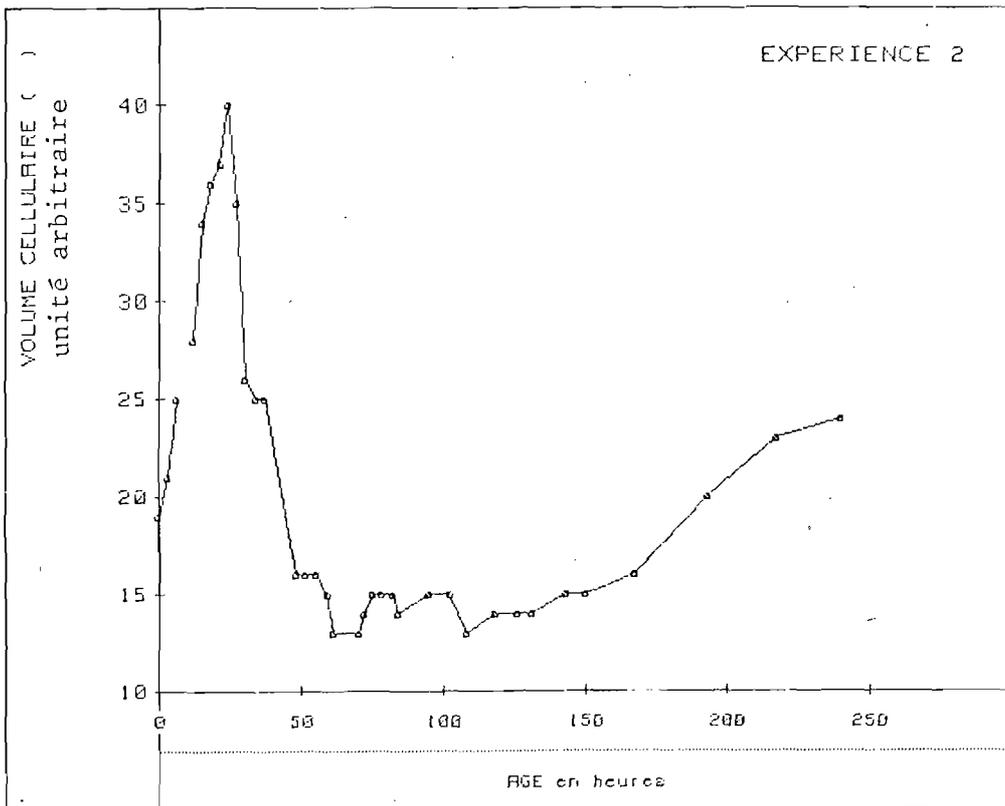


FIGURE 4



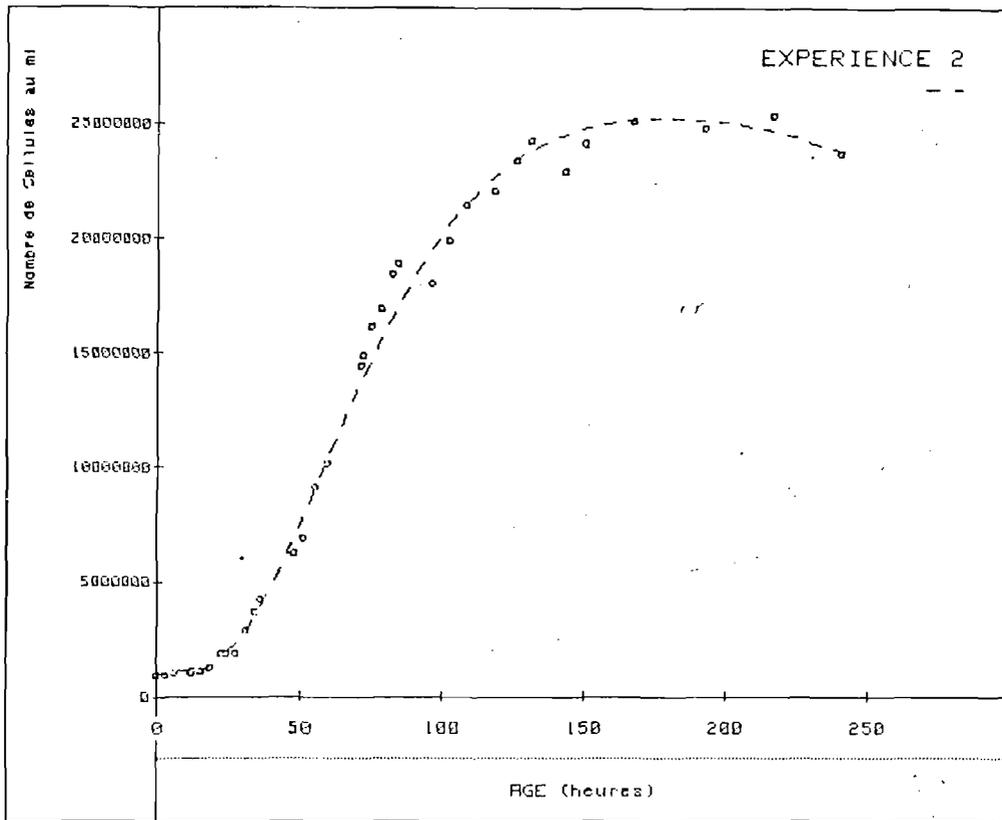


FIGURE 5

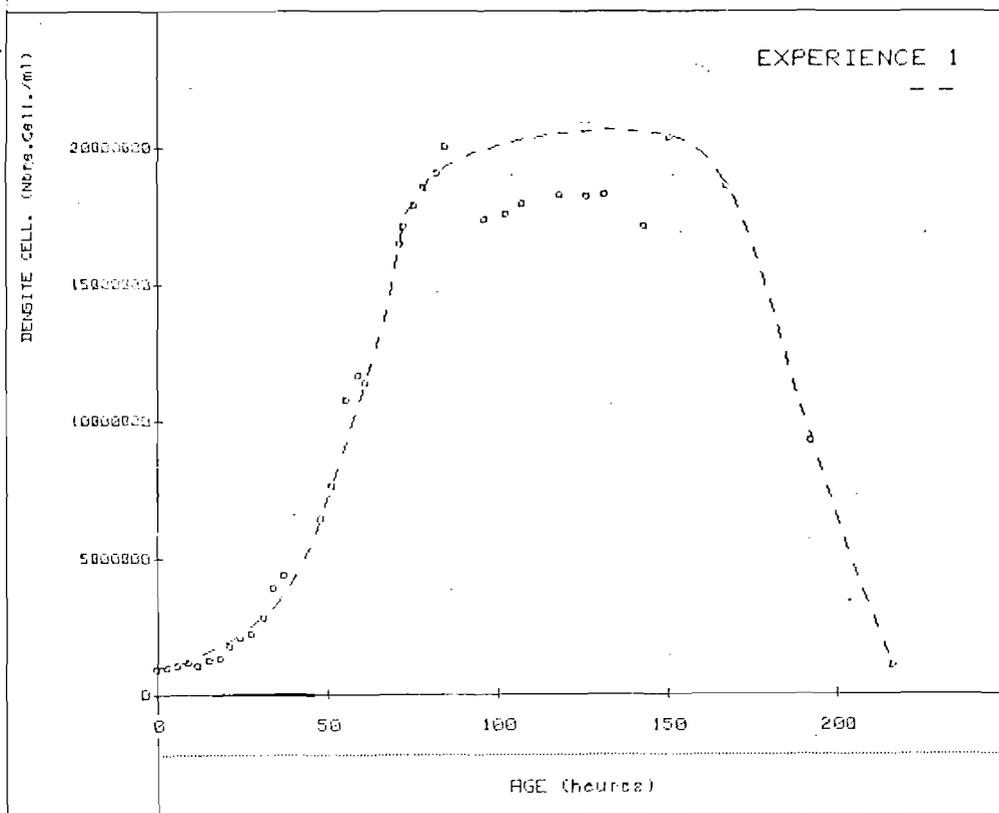


FIGURE 6

FIGURE 7

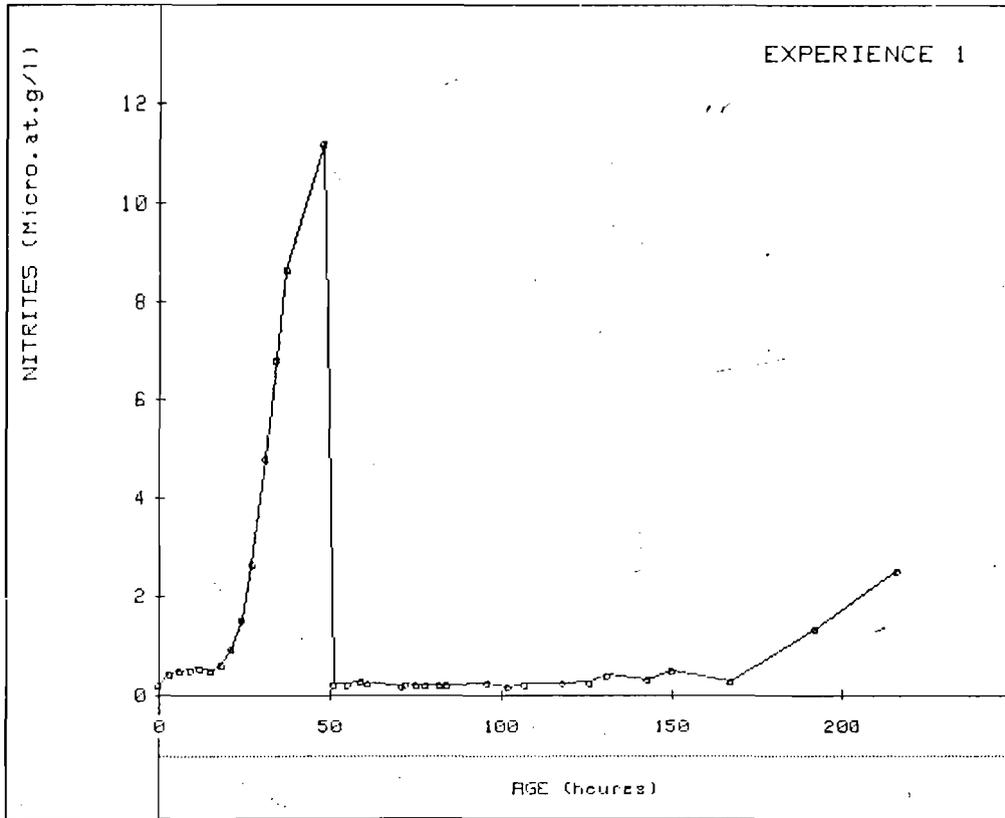


FIGURE 8

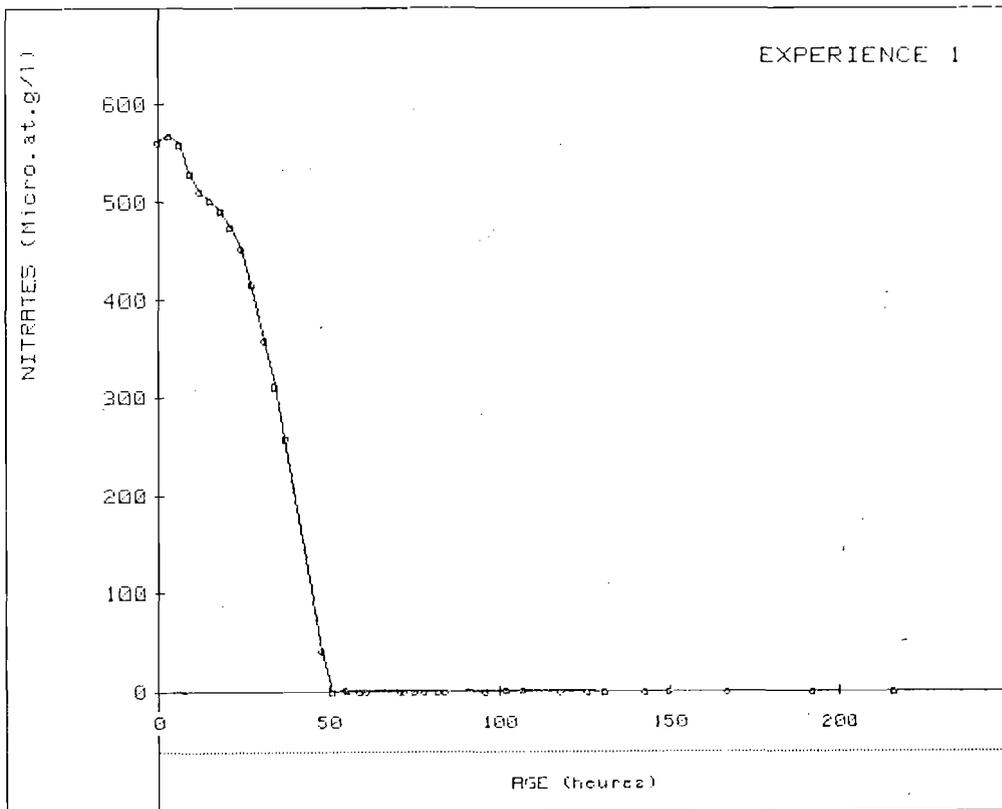


FIGURE 9

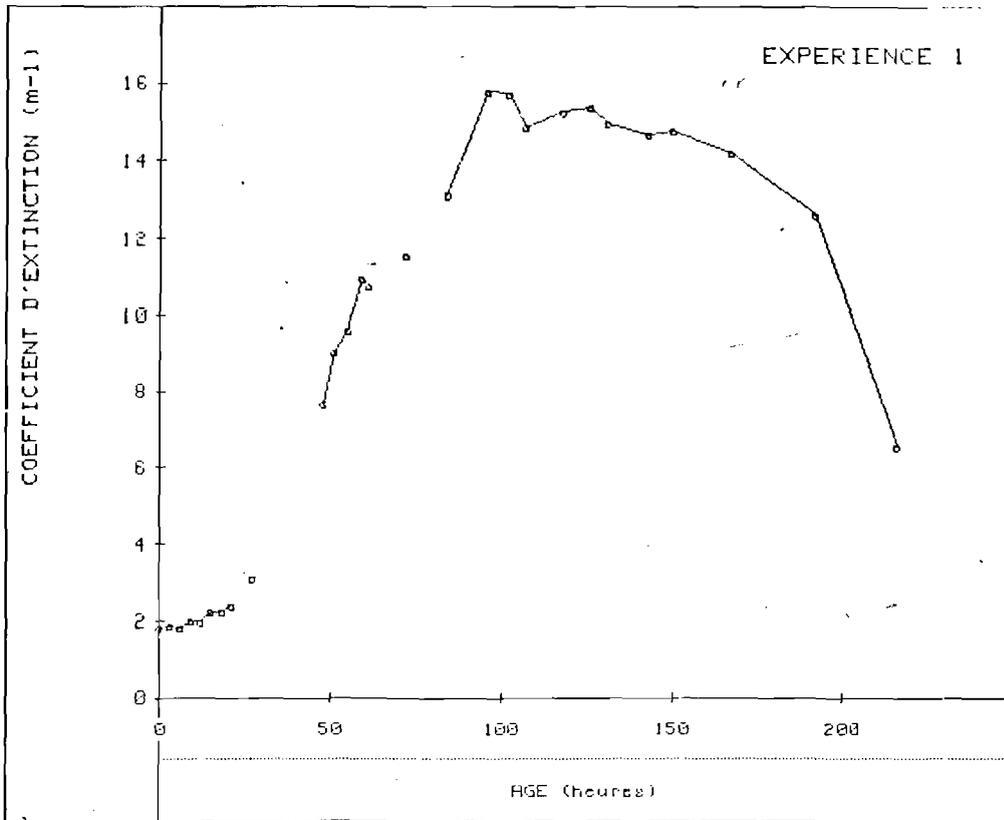


FIGURE 10

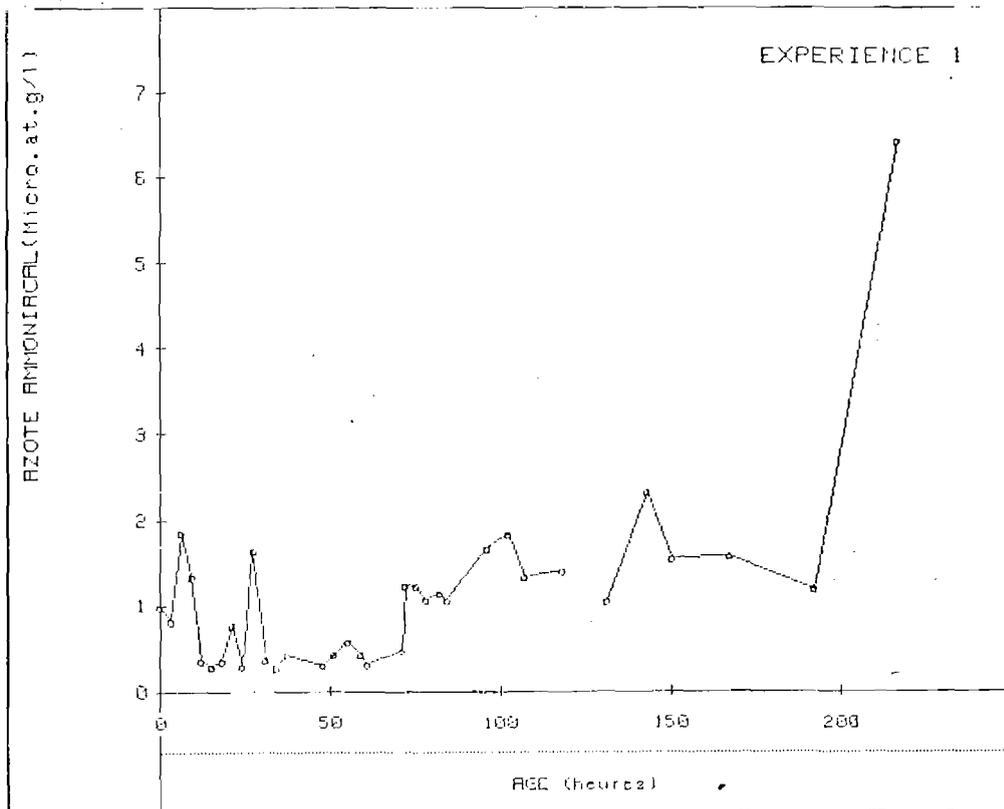


Fig 13

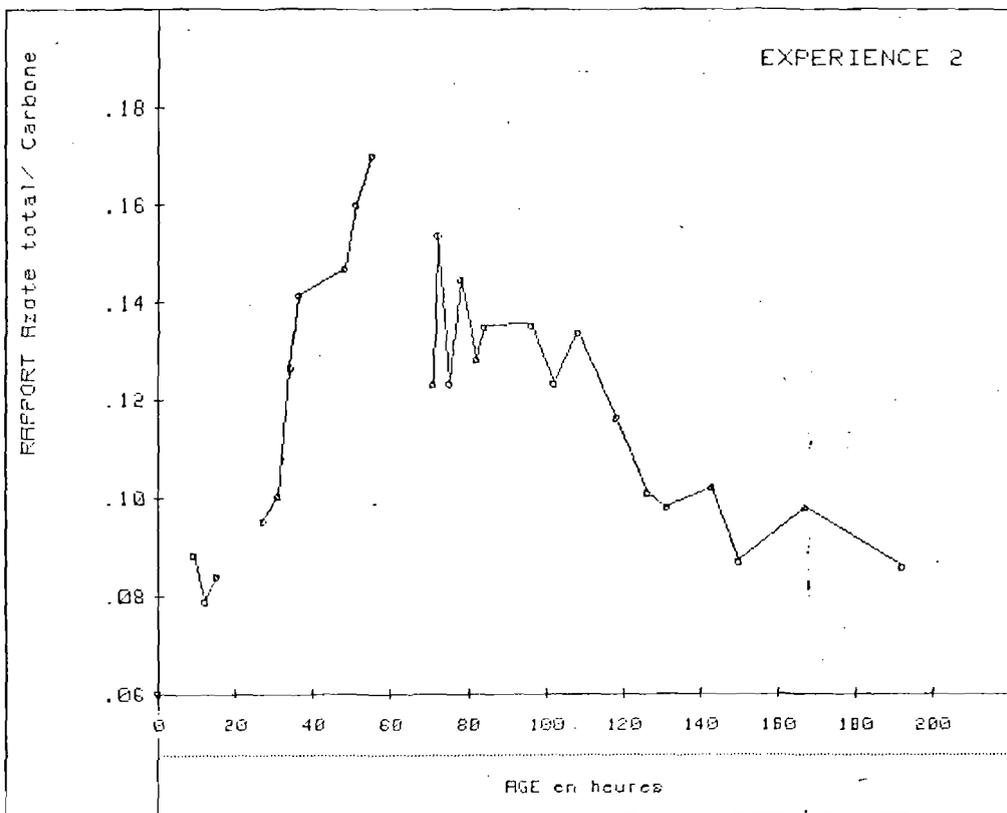
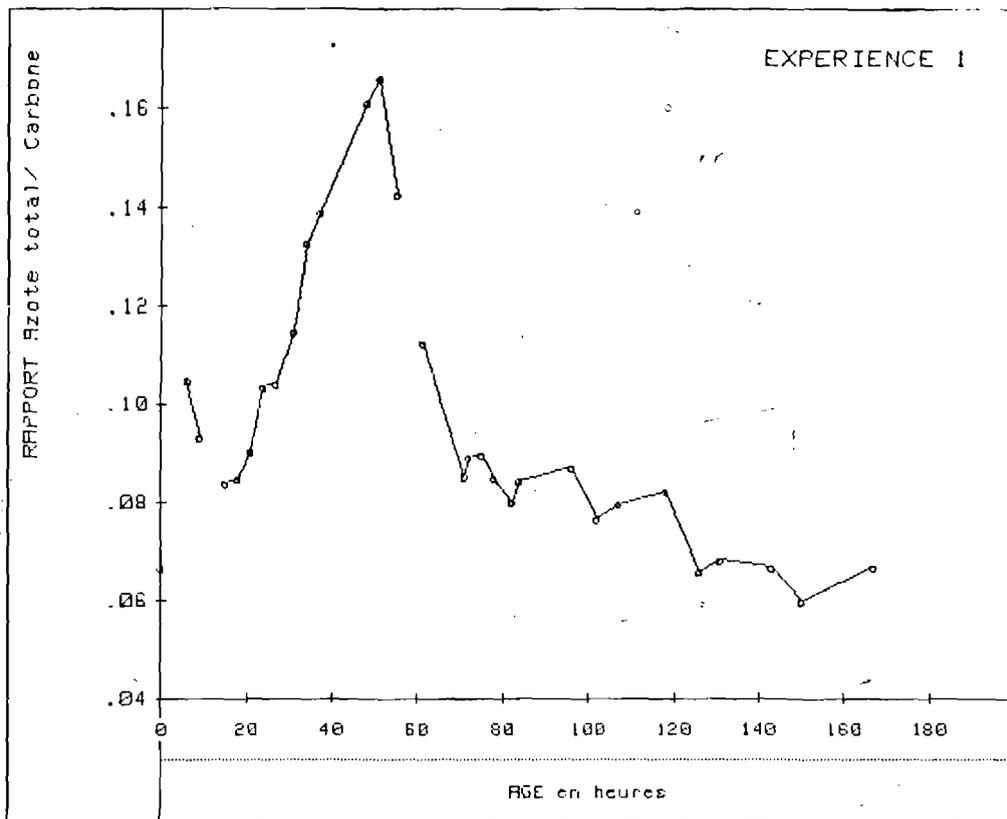


Fig 14

Fig 15

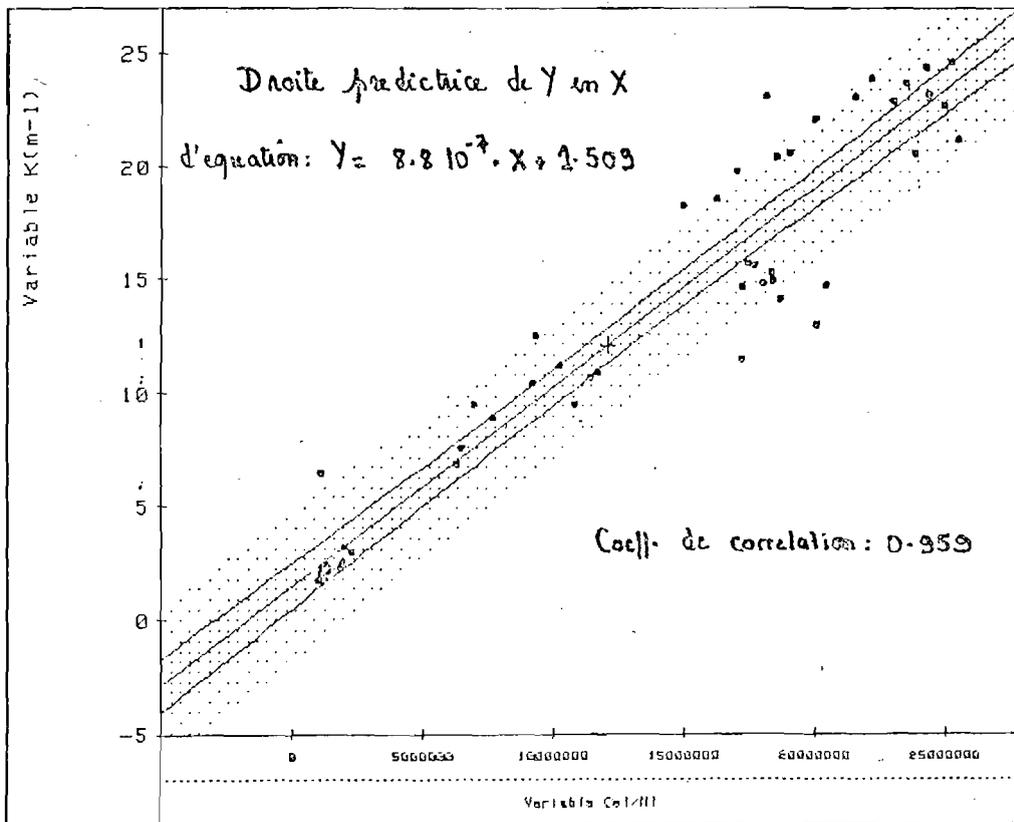
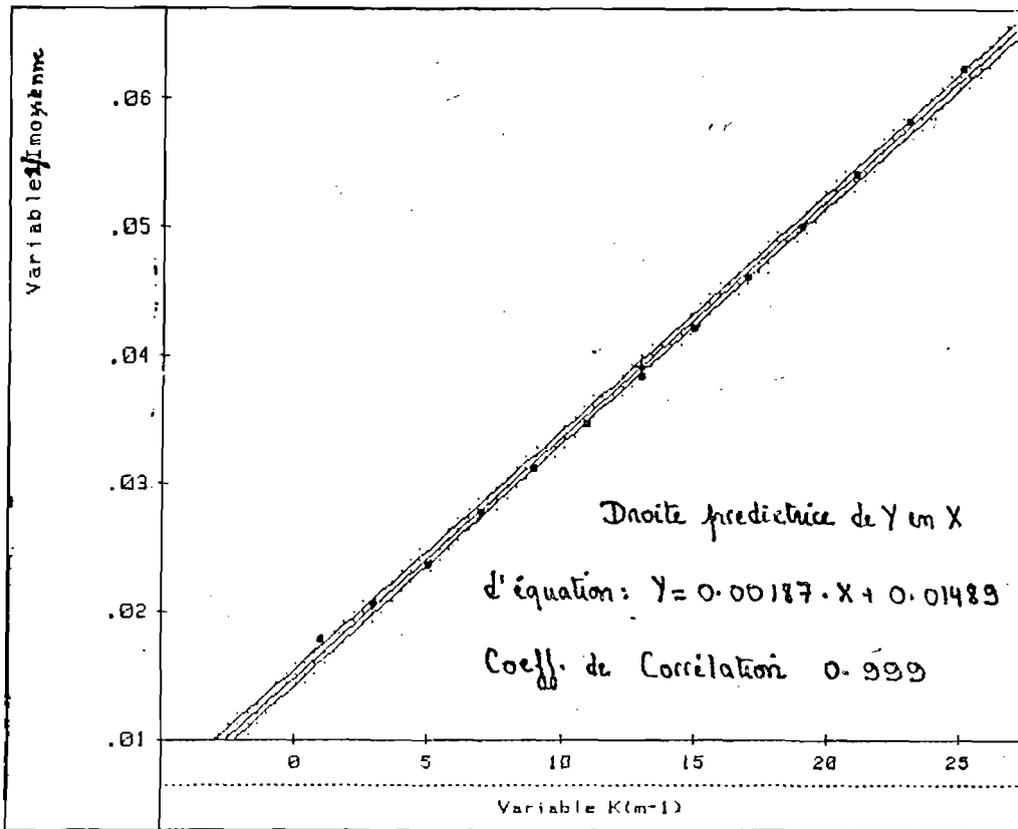


Fig 16

Fig 17

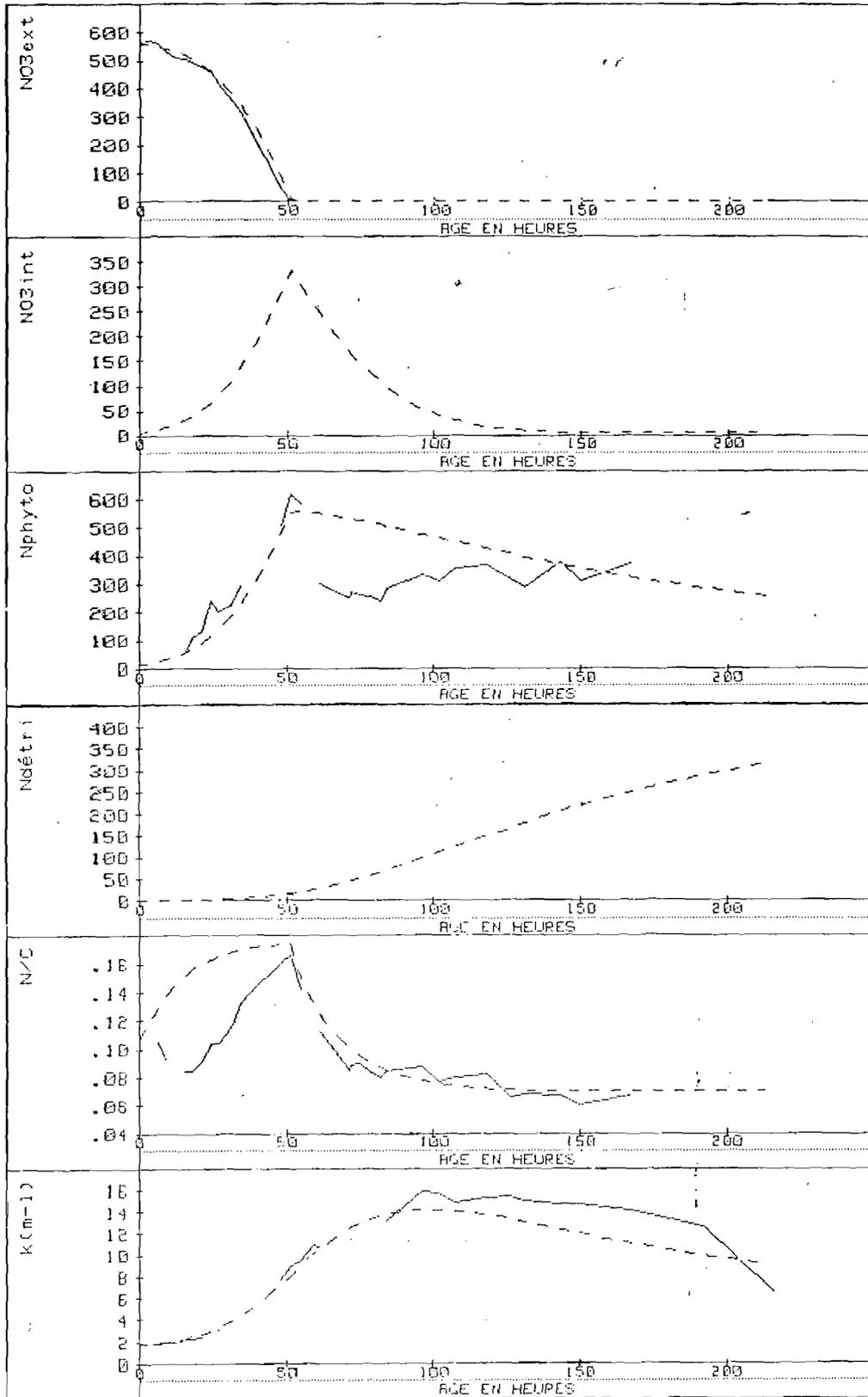
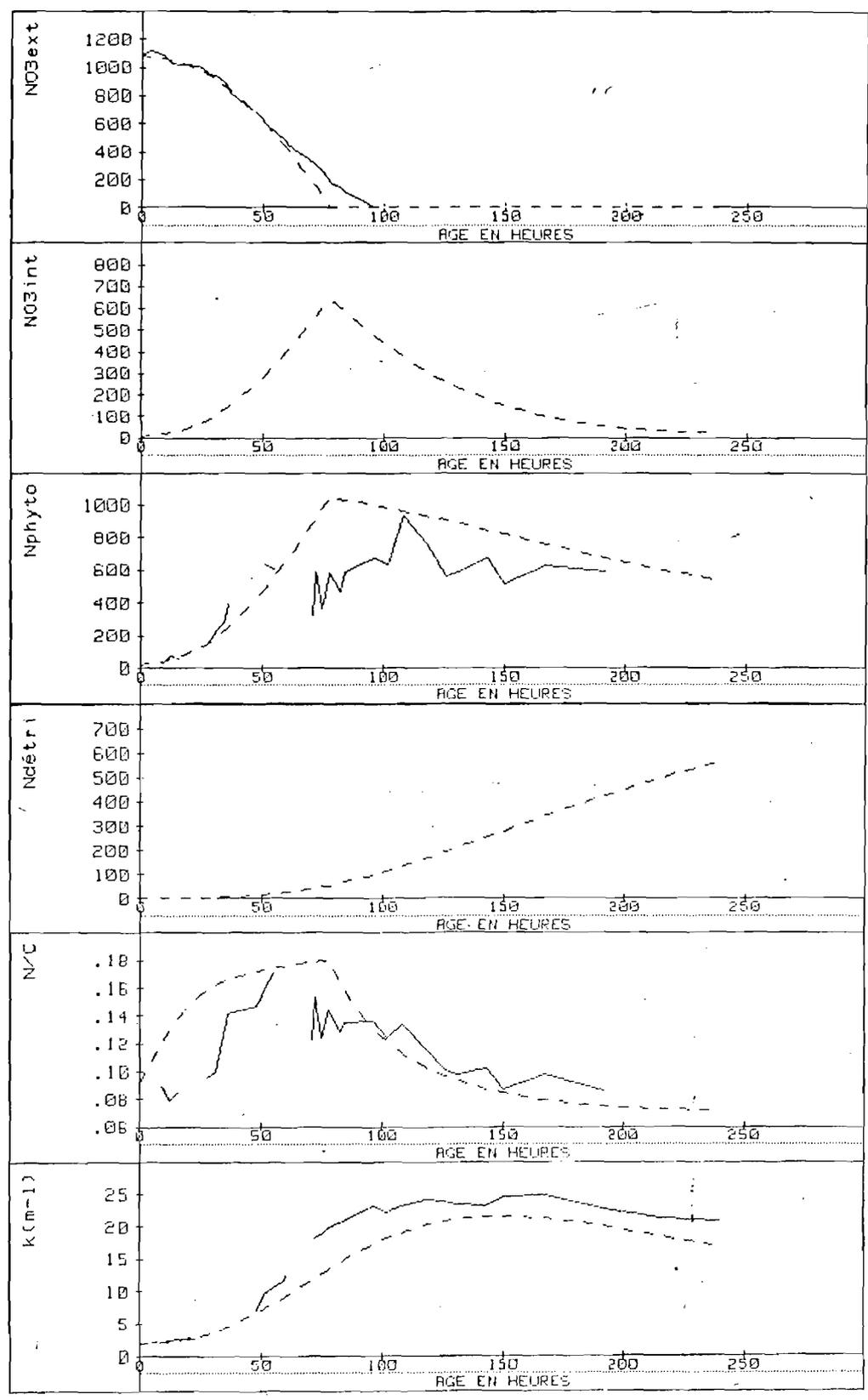


Fig. 18



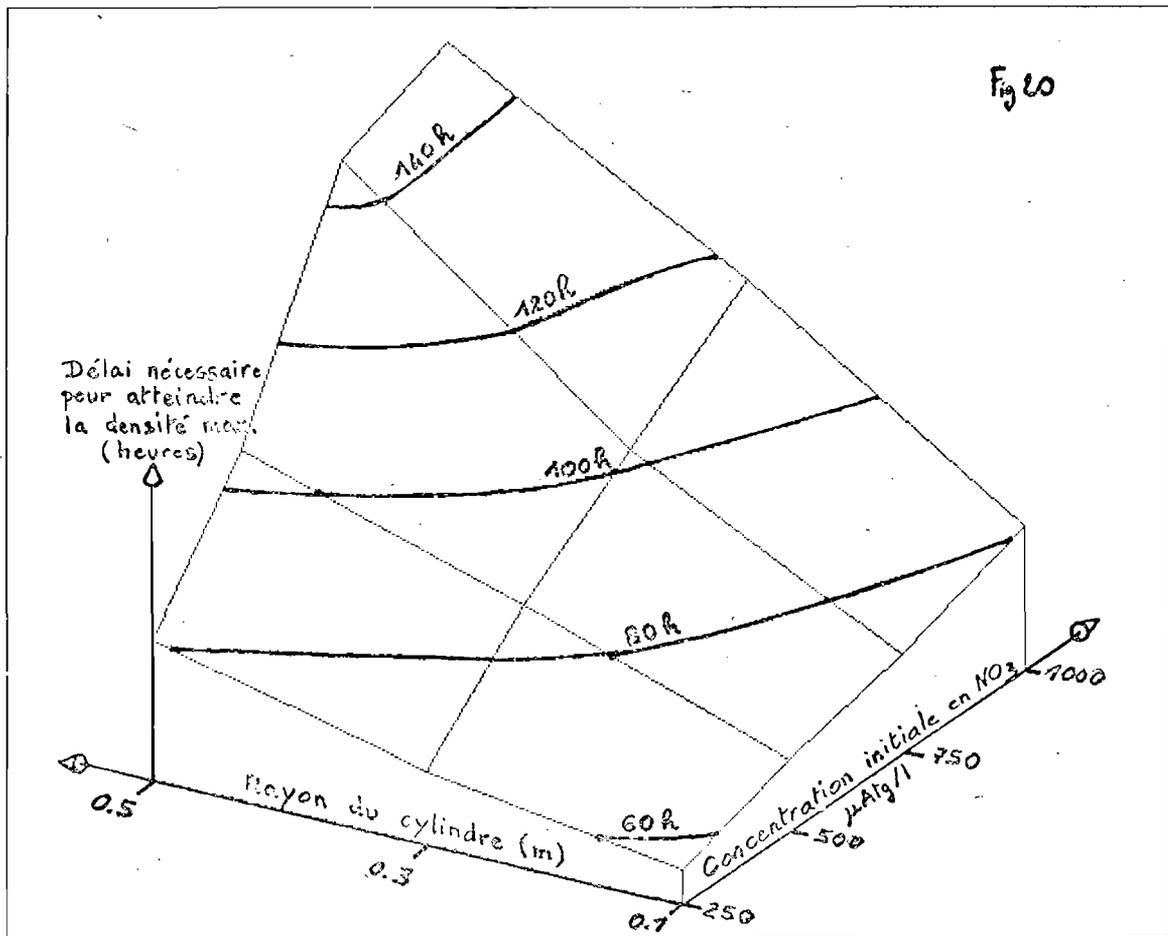
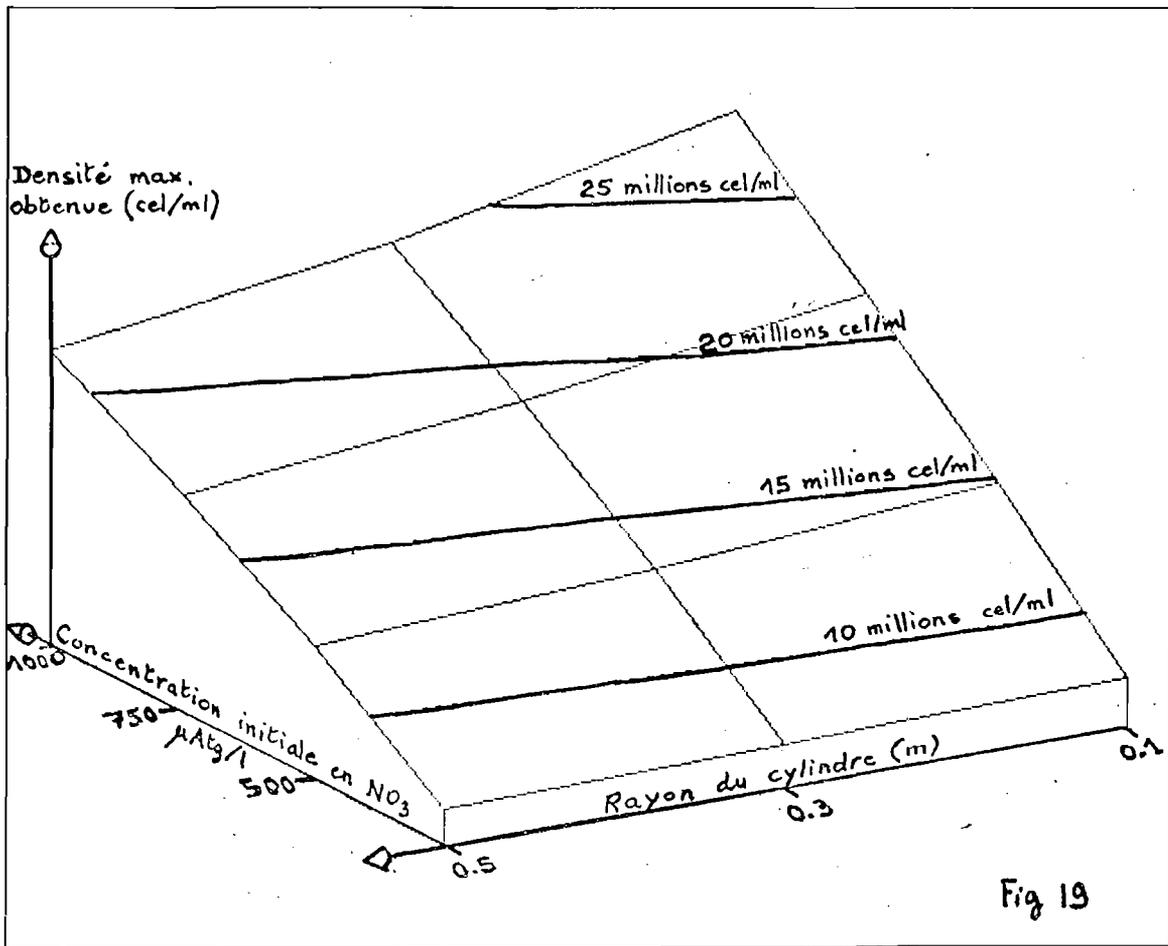


Fig. 21

Valeurs initiales choisies pour les variables :

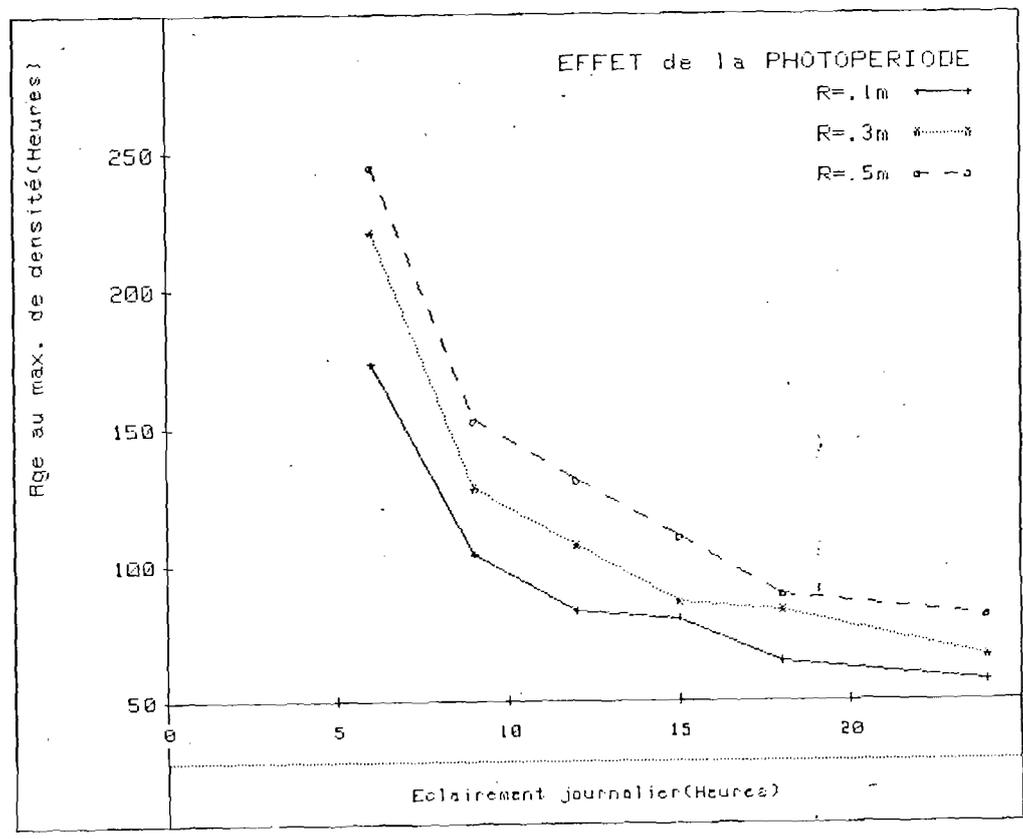
N03ext: 560
 N03int: 5
 Nphyto: 9
 Ndétri: 0
 N/C: 1.55556
 k(m-1): 1.8

N03 initial: 560 => Densité cellulaire max: 14071333 cell/ml après 102 Heures

PARAMETRES DE CETTE SIMULATION:

- | | |
|--|--------|
| 1. Taux de croissance maximum (Heure ⁻¹): | .14 |
| 2. Constante de Michaelis pour la croissance: | .7 |
| 3. Quota cellulaire Ntotal/Norganique minimum: | 1 |
| 4. Facteur de proportionnalité entre croissance et pompage de N03: | 2.5 |
| 5. Constante de Michaelis pour le pompage (MuAtg/l): | .4 |
| 6. N03 externe minimum pour le pompage (MuAtg/l): | .1 |
| 7. Intensité lumineuse optimale (W/m ²): | 60 |
| 8. Taux maximum de sécrétion d'azote organique (Heure ⁻¹): | .005 |
| 9. Taux de mortalité des algues (Heure ⁻¹): | .001 |
| 10. Taux de reminéralisation de Ndétritique (Heure ⁻¹): | .001 |
| 11. Contenu azoté organique par cellule (MuAtg/cellule): | .00003 |
| 12. Rapport Carbone/Azote organique des cellules: | 14.5 |

Fig. 22



BIBLIOGRAPHIE

N.J.ANTIA,C.D.McALLISTER,T.R.PARSONS;K.STEPHENS and J.D.H.STRICKLAND(1963)
Further measurements of primary production using a large volume plastic sphere.
Limnology and Oceanography,8(3):166-183

S.S.BATES (1976)

Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplankton.

Limnol. Oceanogr.,21(2):212-218

J.CAPERON and J.MEYER (1972)

Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton

(1) Changes in population characteristics with steady-state growth rate

(2) Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton.

→ Deep Sea Research ,vol 19, 619-632

COLLOS,Y.and G.SLAWYK, (1976)

→ Significance of cellular nitrate content in naturel populations of marine phytoplankton growing in shipboard cultures.

Mar. Biology 34 , 27-32.

DAVIS,C.O.,HARRISON P.J.and DUGDALE R.C. (1973)

Continuous culture of marine diatoms under silicate limitation.

J. Phycol. 9 , 175-80.

DROOP,M.R.

Vitamin B-12 and marine ecology. The kinetics of uptake,growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*.

J. Mar. Biol.Ass.U.K.,48,689-733. (1968)

The nutrient status of algal cells in continuous culture.

J. Mar. Biol.Ass.U.K.,54, 825-855 (1974).

47

EDDY, A.A. (1978)

Proton dependent solute transport in microorganisms, p 280-360. In F. Bronner and A. Kleinzeller (ed). Current topics in membranes and transport. Vol 10. Academic Press, New York and London.

EPPLEY, R.W. (1972)

Temperature and phytoplankton growth in the sea.
Fish. Bull. 70:1063-85.

EPPLEY, R.W. (1977)

The growth and culture of diatoms., P 24-64. In Biology of diatoms, D. WERNER (ed). Botanical Monographs, vol 13. Univ. California Press, 498p .

EPPLEY, R.W., J.N. ROGERS and J.J. Mc CARTHY (1969)

Half saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton.
Limnol. Oceanogr., 14, 912-920.

FASHAM, M.J.R. and T. PLATT (1983)

Photosynthetic response of phytoplankton to light, a physiological model.
Proc. R. Soc. Lond. B 219, 355-70.

FOGG, G.E. (1965)

Algal cultures and phytoplankton ecology.
The Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wis. 126p.

GOLDMAN, J.C. and E.J. CARPENTER (1974)

A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth.
Limnol. Oceanogr. 19: 756-66.

HARVEY, H.N. (1953)

Synthesis of organic nitrogen and chlorophyll by *Nitzschia closterium*.
J.Mar.Biol.Ass.U.K. 31: 477-87.

JASSBY, A.D. and T. PLATT (1976)

Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton.
Limnol. Oceanogr. 21: 540-47.

KAYSER, H. (1971)

Produktivitätsmessungen an phytoplanktonorganismen aus kustengewässern als standardmethode für einen abwassertest.
Thalassia Jugoslav. 7: 139-50.

LORENZEN, C.J. (1967)

Determination of chlorophyll and pheopigments : spectrophotometric equations.
Limnol. Oceanogr. 12: 343-46.

LUDWIG, C.A. (1938)

The availability of different forms of nitrogen to a green alga (Chlorella).
Am.J.Bot. 25: 448-58.

MITCHELL, P. (1967)

Active transport and ion accumulation, chap.4, p167-98.
In M. Florkin and E.H. Stotz (ed). Comprehensive biochemistry, Vol.22. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.

MOAL, J., SAMAIN, J.F. et J.R. LE COZ (1977)

C/N et contrôle de la physiologie des cultures de phytoplancton.
Centre Océanologique de Bretagne. Publication interne 8p.

MOED, J.R. and G.M. HALLEGRAEFF (1978)

Some problems in the estimation of percentage degradation of chlorophylls to pheopigments in extracts of algae.
Limnol. Oceanogr. 12: 335-340.

PAASCHE, E. (1968).

Marine plankton algae with light-dark cycles, *Ditylum brightwellii* and *Nitzschia turgidula*.

Physiologia Pl. 21: 66-77.

PLATT, T. and C.L. GALLEGOS (1980)

Modelling primary production.

In "Primary productivity in the sea". Falkowski P.G., ed., 339-362.

PRAKASH, A. (1973)

Growth and cell-size distribution of marine planktonic algae in batch and dialysis cultures.

J. Fish. Research Board Canada, vol 30, No 2: 143-155.

RHEE, G.Y. and I.J. GOTHAM (1981)

The effect of environmental factors on phytoplankton growth: light and the interaction of light with nitrate limitation.

Limnol. Oceanogr. 26(4): 649-659.

SHARP, J.H., UNDERHILL, P.A. and A.C. FRAKE (1980)

Carbon budgets in batch and continuous cultures: how can we understand physiology of marine phytoplankton?

J. Plankton Research, vol 2, No 3: 213-222.

STRICKLAND, J.D.H. and T.R. PARSONS (1972)

A practical handbook of seawater analysis.

Bull. Fish. Res. Board Can., 167, 311p.

THACKER, A. and P.J. SYRETT (1972)

a) The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardi*.

New Phytol. 71: 423-433.

b) Disappearance of nitrate reductase activity from *Chlamydomonas reinhardi*.

New Phytol. 71: 435-441.

TREGUER, P. et P. LE CORRE (1975)

Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'autoanalyseur Technicon.

Laboratoire d'Océanologie Chimique. Université Bretagne Occidentale.

ULLRICH, W.R. (1979)

Die nitritaufnahme bei grüenalgen und ihre regulation durch äussere faktoren.
Ber. Dtsch. Bot. Ges., 92: 273-284.

WILLIAMS, F.M. (1971)

Dynamics of microbial populations.

In Systems analysis and simulation in ecology, B.C. Pattn, editor, Academic Press,
New York, 1, 197-267.

YODER, J.A. (1979)

Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Skeletonema costatum*.

J. Phycol. 15: 362-70.

MONOD, J. 1949. The growth of bacterial cultures.

Ann. Rev. Microbiol. 3: 391-394

LE MASSON, L., CREMOUX, J.L., MONTEL, Y. (1977).

Analyse des rapports C/N/P du seston dans la partie orientale de l'Atlantique
équatorial.

Marine Chemistry, 5, 171-181.

MYKLESTAD, S., HAUG, A. (1972).

Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var.
Willei (gram) Hustedt.

Journal of experimental marine biology and ecology, 9, 125-136.

SKOGLUND, L., JENSEN, A. (1976).

Studies of N limited growth of diatoms, in dialysis culture.

Journal of experimental marine biology and ecology, 21, 169-178.

SYRETT, P.J. (1982).

Nitrogen Metabolism of microalgae.

Can. Bull. Fish. Aquatic Sci., 210, 180-210.

FALKOWSKY, P.G., OWENS, T.G. (1980)

Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton.

Plant. Physiol. 66, 592-95.

STEELE, J.H. (1962)

Environmental control of photosynthesis in the sea. Limnol. Oceanogr. 7, 137-150

SOLUTION PRINCIPALE.

Na_2EDTA	45 g	
NaNO_3	100 g	Nitrate de Na
H_3BO_3	33,6 g	acide borique
NaH_2PO_4	20 g	dihydrogenophosphate de Na
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,36 g	chlorure de manganèse
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,3 g	chlorure ferrique
Trace de métaux 1 ml.		
Dose: 1 ml par litre d'eau de mer		

SOLUTION traces de métaux

ZnCl_2	2,1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mg}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,9 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
eau distillée	: 100 ml

- Hcl pour dissoudre les sels et avoir 1 solution limpide

SOLUTION Vitaminique

Thiamine anserine Hydrochloride (B_1)	200 mg
Cyanocobalamine (Vit B_{12})	10 mg
eau distillée	: 100 ml

Dose: 0,1 ml / litre d'eau de mer

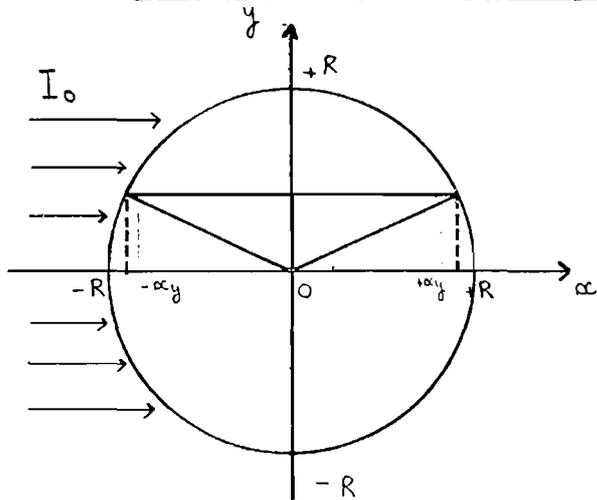
Solution silicatée pour diatomées (Skatomena. Chaetocera)

40mg $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pour 100 ml e. distillée

dose: 2,5 ml / litre d'eau de mer

Annexe 2

CALCUL DE L'INTENSITE LUMINEUSE MOYENNE
DISPONIBLE DANS UN CYLINDRE VERTICAL
ECLAIRE UNILATERALEMENT



$$\bar{I} = \frac{1}{2R} \int_{-R}^R \frac{1}{2\alpha y} \int_{-\alpha y}^{\alpha y} I_0 e^{-k(\alpha+\alpha y)} d\alpha \cdot dy$$

$$\text{or } \alpha y = \sqrt{R^2 - y^2}$$

$$\Rightarrow \bar{I} = \frac{I_0}{4R} \int_{-R}^R \frac{e^{-k\sqrt{R^2-y^2}}}{\sqrt{R^2-y^2}} \left[\int_{-\sqrt{R^2-y^2}}^{\sqrt{R^2-y^2}} e^{-k\alpha} \cdot d\alpha \right] \cdot dy$$

$$= \frac{I_0}{4kR} \int_{-R}^R \frac{e^{-k\sqrt{R^2-y^2}}}{\sqrt{R^2-y^2}} \left[\frac{k\sqrt{R^2-y^2}}{e^{-k\sqrt{R^2-y^2}}} - e^{-k\sqrt{R^2-y^2}} \right] \cdot dy$$

$$= \frac{I_0}{4kR} \left[\int_{-R}^R \frac{dy}{\sqrt{R^2-y^2}} - \int_{-R}^{+R} \frac{e^{-2k\sqrt{R^2-y^2}}}{\sqrt{R^2-y^2}} \cdot dy \right]$$

$$= \frac{I_0}{4kR} \left(\left[\text{Arc sin } \alpha \right]_{-1}^{+1} - \int_{-\pi/2}^{\pi/2} e^{-2kR \cdot \cos \theta} \cdot d\theta \right)$$

d'où on en tire

$$\bar{I} = \frac{I_0}{4kR} \cdot \left[\pi - \int_{-\pi/2}^{\pi/2} e^{-2kR \cos \theta} \cdot d\theta \right]$$

Comme $\bar{I} = I_0 \cdot f(k, R)$, on peut rechercher une relation empirique liant \bar{I} à k pour I_0 et R fixés. On trouve que :

$$\bar{I} \approx \frac{I_0}{\alpha \cdot k + \beta} \quad , \quad \text{où } \alpha \text{ et } \beta \text{ sont des constantes dépendant du rayon } R.$$

Exemples :

$R = 0,1 \text{ m}$	\Rightarrow	$\alpha = 0,11$	$\beta = 0,80$
$R = 0,3 \text{ m}$	\Rightarrow	$\alpha = 0,38$	$\beta = 0,69$
$R = 0,4 \text{ m}$	\Rightarrow	$\alpha = 0,51$	$\beta = 0,60$
$R = 0,5 \text{ m}$	\Rightarrow	$\alpha = 0,64$	$\beta = 0,58$