



# THESE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

*Discipline : Biologie des Populations et Ecologie*

*Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences, Environnement*

Présentée et soutenue publiquement par

**Cécile JAUZEIN**

**en Février 2009**



**PARAMÉTRISATION DE LA NUTRITION AZOTÉE ET PHOSPHORÉE  
D'*ALEXANDRIUM CATENELLA*, MICROALGUE TOXIQUE  
RESPONSABLE D'EFFLORESCENCES DANS LA LAGUNE DE THAU**

---

## JURY

M <sup>me</sup> ALIAUME Catherine	, Professeur, Université Montpellier II	, Président
M <sup>r</sup> COLLOS Yves	, DR2-CNRS, Université Montpellier II	, Directeur de Thèse
M <sup>r</sup> RAIMBAULT Patrick	, DR2-CNRS, Université de la Méditerranée	, Rapporteur
M <sup>r</sup> SCIANDRA Antoine	, DR2-CNRS, Université Paris VI	, Rapporteur
M <sup>r</sup> GENTIEN Patrick	, Cadre Ifremer Brest	, Examineur
M <sup>me</sup> MAZOUNI Nabila	, Cadre Cepalmar/Région LR	, Examineur





# THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

*Discipline : Biologie des Populations et Ecologie*

*Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences, Environnement*

Présentée et soutenue publiquement par

**Cécile JAUZEIN**

**en Février 2009**



**PARAMÉTRISATION DE LA NUTRITION AZOTÉE ET PHOSPHORÉE  
D'*ALEXANDRIUM CATENELLA*, MICROALGUE TOXIQUE  
RESPONSABLE D'EFFLORESCENCES DANS LA LAGUNE DE THAU**

---

## JURY

M <sup>me</sup> ALIAUME Catherine	, Professeur, Université Montpellier II	, Président
M <sup>r</sup> COLLOS Yves	, DR2-CNRS, Université Montpellier II	, Directeur de Thèse
M <sup>r</sup> RAIMBAULT Patrick	, DR2-CNRS, Université de la Méditerranée	, Rapporteur
M <sup>r</sup> SCIANDRA Antoine	, DR2-CNRS, Université Paris VI	, Rapporteur
M <sup>r</sup> GENTIEN Patrick	, Cadre Ifremer Brest	, Examineur
M <sup>me</sup> MAZOUNI Nabila	, Cadre Cedralmar/Région LR	, Examineur



## REMERCIEMENTS

---

*Je tiens tout d'abord à remercier les deux personnes sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour : mes co-directeurs de thèse Yves Collos et Claire Labry. Merci à Yves Collos pour m'avoir fait confiance, puis m'avoir formée, guidée, et laissé le « ce qu'il faut de liberté » au quotidien pour me permettre de mener ce travail à bien. Merci à Claire Labry pour sa participation « phosphorée », son implication et ses compétences ont permis des apports majeurs à ce travail.*

*Puisqu'un travail de qualité se fait dans un environnement serein, je remercie Ifremer et la Région Languedoc-Roussillon pour avoir financé cette thèse et je suis reconnaissante à Marc Trousselier, Thierry Laugier et Annie Chapelle de m'avoir accueillie dans leur unité respective, le laboratoire Ecosystèmes Lagunaires de l'Université Montpellier II, le laboratoire LER/LR d'Ifremer Sète et le laboratoire DYNECO/Pelagos d'Ifremer Brest. Je remercie également sincèrement Daniel Grzebyk pour son coup de pouce final.*

*Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ce travail, aussi bien au sein d'Ecolag (Estelle Masseret, Mohamed Laabir, Daniel Grzebyk, André Vaquer, Jacques Lautier, Manuel Rouquette), que d'Ifremer Sète (Annie Pastoureaud, Annie Fiandrino), Ifremer Brest (Annie Chapelle, Daniel Delmas, Agnès Youenou, Julien Quéré), ou encore de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelone (Esther Garcés, Sofia Loureiro). Toutes ces collaborations furent fructueuses et pleines d'enrichissements.*

*Je remercie ensuite tous les poteaux du boulot, en particulier Ben, Céline, Emilie, Eve, Manu, Audrey, Corine, Marjorie et bien sûr Patrice avec qui tant de bons souvenirs se sont créés autour de la paillasse ou un café à la main.*

*Pour la spéciale dédicace, tous mes remerciements vont au navigateur devant l'éternel, Yannick, sans qui j'aurais pu couler... Il a su tenir la barre lorsque la situation devenait houleuse, changer les voiles lorsque le bateau n'avancait plus. Bref, sans lui pour me soutenir au quotidien, cette traversée de 3 ans aurait pu devenir un vrai travail de galérien.*

*Enfin, je remercie tous mes amis non-montpelliérains (Magali, Dominique et les autres) et mes proches (parents, frères, cousines...) pour leur soutien et leur compréhension. Sachez que ma période asociale touche à sa fin :*

*Je suis de retour...*



# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>11</b>
<b>I- Les HABs dans le monde</b> .....	<b>12</b>
1- <i>Expansion globale des HABs</i> .....	12
2- <i>Impacts des HABs dans les zones côtières</i> .....	14
a- <i>Impacts écologiques et risques pour la santé humaine</i> .....	14
b- <i>Conséquences économiques des HABs</i> .....	17
3- <i>Gestion des HABs</i> .....	18
a- <i>Prévention</i> .....	18
b- <i>Contrôle</i> .....	18
c- <i>Mitigation</i> .....	20
<b>II- Les efflorescences toxiques récurrentes d'<i>Alexandrium catenella</i> dans l'Etang de Thau</b> .....	<b>20</b>
1- <i>Caractéristiques actuelles de l'Etang de Thau</i> .....	20
a- <i>Caractéristiques hydromorphologiques</i> .....	20
b- <i>L'Etang de Thau, une zone de production conchylicole</i> .....	22
2- <i>Evolution des conditions environnementales de la lagune – Analyse de séries long-terme</i> .....	22
3- <i>Apparition d'<i>Alexandrium catenella</i> dans la lagune de Thau dans les années 90</i> ..	25
a- <i>Cycle de vie d'<i>A. catenella</i></i> .....	25
b- <i><i>A. catenella</i>, une espèce probablement invasive</i> .....	26
4- <i>Facteurs de contrôle des efflorescences et stratégies de croissance</i> .....	27
<b>PARTIE I – Paramétrisation de la nutrition azotée</b> .....	<b>35</b>
<b>CONTEXTE, RESUME ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>37</b>
<b>PRINCIPES METHODOLOGIQUES MAJEURS</b> .....	<b>41</b>
<b>I- Estimation des vitesses d'absorption par marquage au <math>^{15}\text{N}</math> et <math>^{13}\text{C}</math></b> .....	<b>41</b>
1- <i>Les isotopes stables de l'azote et du carbone</i> .....	41
2- <i>Principe du marquage à l'isotope stable et estimation des vitesses d'absorption</i> ..	41
3- <i>Mesures couplées des rapports isotopiques et des masses azotées et carbonées par spectrométrie de masse</i> .....	42
<b>II- Etape de resuspension des cellules d'<i>Alexandrium catenella</i></b> .....	<b>44</b>
<b>CHAP 1 – SHORT TEMPORAL VARIABILITY OF AMMONIUM AND UREA UPTAKE BY ALEXANDRIUM CATENELLA (DYNOPHYTA) IN CULTURES</b> .....	<b>47</b>
<b>I- Introduction</b> .....	<b>48</b>
<b>II- Materials and methods</b> .....	<b>49</b>
1- <i>Culture conditions and kinetics experiments</i> .....	49
2- <i>Cell counts and nutrient analysis</i> .....	50
3- <i>N-uptake measurements and kinetic parameters</i> .....	50

<b>III- Results .....</b>	<b>51</b>
1- <i>Cellular growth, C/N composition ratio, and nutrient conditions.....</i>	<i>51</i>
2- <i>Short-term time series of uptake rates.....</i>	<i>52</i>
3- <i>Ammonium uptake.....</i>	<i>53</i>
4- <i>Urea uptake – Saturable kinetics for ACT03.....</i>	<i>56</i>
5- <i>Urea uptake – Unsaturable kinetics for TL01, ACATA4 and VGO 565.....</i>	<i>57</i>
<b>IV- Discussion .....</b>	<b>59</b>
1- <i>Temporal variations in nutrients kinetics.....</i>	<i>59</i>
2- <i>Variability among strains.....</i>	<i>60</i>
<b>V- Conclusion .....</b>	<b>63</b>
<b>CHAP 2 – INTERACTIONS BETWEEN AMMONIUM AND UREA UPTAKE BY FIVE STRAINS OF ALEXANDRIUM CATENELLA (DYNOPHYCEAE) IN CULTURE .....</b>	<b>69</b>
<b>I- Introduction .....</b>	<b>70</b>
<b>II- Materials and methods .....</b>	<b>71</b>
1- <i>Culture conditions.....</i>	<i>71</i>
2- <i>Interaction experiments.....</i>	<i>71</i>
3- <i>Nutrient analysis.....</i>	<i>72</i>
4- <i>N-uptake measurements.....</i>	<i>72</i>
5- <i>Modeled curves and kinetic parameters.....</i>	<i>73</i>
<b>III- Results .....</b>	<b>74</b>
1- <i>Nutrient conditions.....</i>	<i>74</i>
2- <i>Influence of urea on ammonium uptake rates.....</i>	<i>75</i>
3- <i>Influence of ammonium on N-urea uptake rates.....</i>	<i>77</i>
4- <i>Total N fluxes.....</i>	<i>78</i>
<b>IV- Discussion .....</b>	<b>81</b>
1- <i>Characteristics of the ammonium inhibition of urea uptake.....</i>	<i>82</i>
2- <i>Variability between strains and ecological considerations.....</i>	<i>84</i>
<b>V- Conclusion .....</b>	<b>86</b>
<b>CHAP 3 – CARBON-NITROGEN COUPLING IN THE DINOFLAGELLATE ALEXANDRIUM CATENELLA (DYNOPHYCEAE) .....</b>	<b>91</b>
<b>I- Introduction .....</b>	<b>92</b>
<b>II- Materials and methods .....</b>	<b>93</b>
1- <i>Culture conditions.....</i>	<i>93</i>
2- <i>Experimental procedures.....</i>	<i>93</i>
3- <i>Chemical and biological parameters.....</i>	<i>94</i>
<b>III- Results .....</b>	<b>94</b>
1- <i>Experiment in N-replete conditions.....</i>	<i>94</i>
2- <i>Experiment with N-depletion.....</i>	<i>99</i>
<b>IV- Discussion.....</b>	<b>101</b>
1- <i><sup>15</sup>N-uptake capacities in light and darkness.....</i>	<i>101</i>
2- <i>Variations of <sup>13</sup>C-isotopic ratio during the light:dark cycle .....</i>	<i>103</i>
3- <i>Uncoupling between photosynthesis and nutrient uptake.....</i>	<i>104</i>
<b>V- Conclusion .....</b>	<b>106</b>

<b>PARTIE II – Paramétrisation de la nutrition phosphorée .....</b>	<b>111</b>
<b>CONTEXTE, RESUME ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>113</b>
<b>PRINCIPES METHODOLOGIQUES MAJEURS .....</b>	<b>115</b>
<b>I- Modes de culture employés .....</b>	<b>115</b>
1- <i>Description des différents modes de culture d'algues employés.....</i>	<i>115</i>
2- <i>Choix du mode de culture.....</i>	<i>117</i>
a- <i>Intérêts et contraintes des cultures en batch.....</i>	<i>117</i>
b- <i>Intérêts et contraintes des cultures en continu et semi-continu.....</i>	<i>117</i>
c- <i>Protocole choisi.....</i>	<i>118</i>
<b>II- Estimation des paramètres associés aux stocks et flux de phosphore.....</b>	<b>119</b>
1- <i>Identification et estimation des différentes formes de phosphore.....</i>	<i>119</i>
a- <i>Phosphore inorganique dissous.....</i>	<i>119</i>
b- <i>Phosphore particulaire .....</i>	<i>120</i>
2- <i>Estimation des vitesses d'absorption du phosphate.....</i>	<i>121</i>
3- <i>Activité des phosphatases alcalines (APA).....</i>	<i>122</i>
<b>CHAP 1 – GROWTH AND PHOSPHORUS UPTAKE RESPONSE BY THE TOXIC DINOFLAGELLATE ALEXANDRIUM CATENELLA TO PHOSPHATE LIMITATION ..</b>	<b>123</b>
<b>I- Introduction .....</b>	<b>124</b>
<b>II- Materials and methods .....</b>	<b>125</b>
1- <i>Experimental design.....</i>	<i>125</i>
2- <i>Chemical measurements and cell counts.....</i>	<i>125</i>
3- <i>Phosphate uptake rate.....</i>	<i>126</i>
4- <i>Alkaline phosphatase activity.....</i>	<i>126</i>
5- <i>Modeled curves and kinetic parameters.....</i>	<i>127</i>
<b>III- Results .....</b>	<b>127</b>
1- <i>Phosphate concentrations and cells enumerations.....</i>	<i>127</i>
2- <i>Cellular composition parameters.....</i>	<i>130</i>
3- <i><sup>33</sup>P-uptake rates.....</i>	<i>131</i>
4- <i>APA measurements.....</i>	<i>132</i>
<b>IV- Discussion .....</b>	<b>135</b>
1- <i>P-limitation conditions.....</i>	<i>135</i>
2- <i>P-storage capacities.....</i>	<i>137</i>
3- <i>Alkaline phosphatase activity.....</i>	<i>138</i>
4- <i>Phosphate uptake characteristics.....</i>	<i>143</i>
<b>V- Conclusion.....</b>	<b>144</b>
<b>CHAP 2 – MESURES IN SITU D'ACTIVITE DES PHOSPHATASES ALCALINES AU COURS D'UNE EFFLORESCENCES D'A. CATENELLA DANS L'ÉTANG DE THAU..</b>	<b>151</b>
<b>I- Introduction.....</b>	<b>151</b>
<b>II- Matériel et methods.....</b>	<b>151</b>
<b>III- Résultats et discussion.....</b>	<b>152</b>
<b>IV- Conclusion.....</b>	<b>153</b>

<b>PARTIE III – Phagocytose de cyanobactéries .....</b>	<b>155</b>
<b>CONTEXTE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>157</b>
<b>PRINCIPES METHODOLOGIQUES MAJEURS .....</b>	<b>159</b>
<b>I- Signature pigmentaire .....</b>	<b>159</b>
<b>II- Microscopie confocale .....</b>	<b>160</b>
<b>CHAP – CARACTERISAION DES CAPACITES DE PHAGOCYTOES DE CYANOBACTERIES SYNECHOCOCCUS SP. PAR ALEXANDRIUM CATENELLA.....</b>	<b>163</b>
<b>I- Introduction.....</b>	<b>164</b>
<b>II- Matériel et methods .....</b>	<b>164</b>
1- <i>Expérimentation en culture.....</i>	<i>164</i>
2- <i>Prélèvements in situ.....</i>	<i>167</i>
3- <i>Mesures des paramètres biologiques et physicochimiques.....</i>	<i>167</i>
4- <i>Observation au microscope confocal.....</i>	<i>168</i>
<b>III- Résultats et discussion .....</b>	<b>168</b>
1- <i>Les figures de phagocytose.....</i>	<i>170</i>
2- <i>Observations des figures de phagocytose à l'échelle de la population d'A.         catenella.....</i>	<i>175</i>
<b>IV- Conclusion et perspectives.....</b>	<b>177</b>
<hr/>	
<b>PARTIE IV – Modélisation de la croissance .....</b>	<b>181</b>
<b>CONTEXTE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>183</b>
<b>PRINCIPES THEORIQUES .....</b>	<b>185</b>
<b>I- Facteurs de régulation de la croissance.....</b>	<b>186</b>
<b>II- Mise en place d'un modèle de croissance .....</b>	<b>186</b>
1- <i>Les hypothèses.....</i>	<i>186</i>
2- <i>Le système d'équations.....</i>	<i>187</i>
<b>CHAP 1 – CARACTERISAION DU CONTROLE DE LA CROISSANCE D'ALEXANDRIUM CATENELLA PAR LES ELEMENTS NUTRITIFS .....</b>	<b>189</b>
<b>I- Modélisation de la regulation de la croissance par les éléments nutritifs majeurs,     ammonium, urée, nitrate et phosphate.....</b>	<b>189</b>
1- <i>Simulations des vitesses d'absorption des nutriments – Problème de la         variabilité des paramètres cinétiques du modèle de Michaelis-Menten.....</i>	<i>189</i>
a- <i>Variabilité entre souches d'A. catenella .....</i>	<i>189</i>
b- <i>Variations au cours du cycle diurne.....</i>	<i>190</i>
c- <i>Variabilité due aux interactions entre éléments nutritifs .....</i>	<i>190</i>
d- <i>Variabilité due au niveau de carence.....</i>	<i>192</i>
2- <i>Simulation des vitesses d'assimilation des éléments nutritifs.....</i>	<i>193</i>
a- <i>Pour le phosphore.....</i>	<i>193</i>
b- <i>Pour l'azote .....</i>	<i>195</i>
3- <i>Simulation du cycle Jour/Nuit.....</i>	<i>196</i>
<b>II- Autres sources nutritives organiques à prendre en compte.....</b>	<b>197</b>
1- <i>Le phosphore organique dissous (POD).....</i>	<i>197</i>

2- <i>La matière organique particulaire</i> .....	198
<b>III- Conclusion</b> .....	<b>198</b>
<b>CHAP 2 – CARACTERISAION DU CONTROLE DE LA CROISSANCE D’A. CATENELLA PAR CERTAINS FACTEURS PHYSIQUES</b> .....	<b>201</b>
<b>I- Caractérisation de l’influence de la température et de la salinité</b> .....	<b>202</b>
1- <i>Données à disposition</i> .....	202
2- <i>Caractéristiques de l’influence de la température et de la salinité sur le taux de             croissance d’A. catenella</i> .....	202
a- <i>Influence de la température</i> .....	202
b- <i>Influence de la salinité</i> .....	203
c- <i>Influence couplée température-salinité</i> .....	203
d- <i>Bilan</i> .....	204
3- <i>Mise en place des fonctions de limitation du taux de croissance</i> .....	204
a- <i>Optimisation de la fonction de température</i> .....	206
b- <i>Optimisation de la fonction de salinité</i> .....	208
c- <i>Bilan</i> .....	211
<b>II- Caractérisation de l’influence de l’intensité lumineuse</b> .....	<b>212</b>
1- <i>Données à disposition</i> .....	212
2- <i>Choix de la fonction de limitation par l’irradiance</i> .....	212
<b>III- Conclusion</b> .....	<b>213</b>
<b>SYNTHESE ET CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>217</b>
<b>I- Complexité des processus de contrôle de la croissance d’A. catenella par les         éléments nutritifs</b> .....	<b>218</b>
<b>II- Les stratégies nutritives d’A. catenella dans l’Etang de Thau</b> .....	<b>218</b>
1- <i>Capacités d’absorption de nutriments azotés au noir</i> .....	219
2- <i>Importance des éléments nutritifs régénérés dans la croissance d’A. catenella             dans l’Etang de Thau</i> .....	219
3- <i>Variabilité des souches et stratégies écologiques</i> .....	222
4- <i>Considérations concernant la gestion des HABs dans l’Etang de Thau, inspirés             des stratégies nutritives d’A. catenella</i> .....	223
<b>III- Perspectives</b> .....	<b>223</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (HORS CHAPITRES)</b> .....	<b>225</b>



# INTRODUCTION GENERALE

*« Quant aux infusoires, reprit-il, quant à ces milliards d'animalcules, qui existent par millions dans une gouttelette, et dont il faut huit cent mille pour peser un milligramme, leur rôle n'est pas moins important. Ils absorbent les sels marins, ils assimilent les éléments solides de l'eau, et, véritables faiseurs de continents calcaires, ils fabriquent des coraux et des madrépores ! Et alors la goutte d'eau, privée de son aliment minéral, s'allège, remonte à la surface, y absorbe les sels abandonnés par l'évaporation, s'alourdit, redescend, et rapporte aux animalcules de nouveaux éléments à absorber. »*

Jules Verne, Vingt mille lieues sous les mers, 1869

Dans les milieux aquatiques (eaux douces, eaux marines, estuaires et lagunes), le développement de certaines espèces de micro-algues et de cyanobactéries peut s'avérer néfaste, soit envers les activités socio-économiques de la zone considérée, soit au vu de risques pour la santé humaine : on parle alors d'efflorescences nuisibles, dites « Harmful Algal Blooms » (HABs) (Smayda et al. 1997a). Ces nuisances peuvent provoquer de fortes perturbations de l'écosystème, associées à la production de toxines par les cellules ou à une forte production de biomasse pouvant mener à des phénomènes d'*anoxie* (manque d'oxygène dans le milieu). Dans les eaux côtières et les estuaires, les événements HABs répertoriés sont associés à une grande variété de classes phytoplanctoniques, comprenant des dinoflagellés (dont *Alexandrium catenella*), des diatomées, des raphidophytes et des prymésiophytes, regroupant environ 150 espèces, *i.e.* 3,5% des espèces phytoplanctoniques marines (Landsberg et al. 2005).

## **I- LES HABs DANS LE MONDE**

### **1- *Expansion globale des HABs***

Depuis une trentaine d'années, les efflorescences nuisibles observées dans les zones côtières et d'eaux douces apparaissent en nette augmentation à l'échelle globale, aussi bien du point de vue de leur fréquence, que de leur amplitude et de leur distribution (Anderson et al. 2002 ; Glibert et al. 2005). La zone de répartition d'*Alexandrium catenella* semble suivre cette tendance puisque, depuis l'apparition de cette espèce en Méditerranée en 1994 dans le port de Valence (Espagne), une expansion de sa zone de distribution semble s'être opérée le long des côtes nord-ouest de la Méditerranée (Vila et al. 2001 ; Garcés et al. 2005). Cette expansion globale des HABs a pu être mise en évidence grâce à la compilation et à l'analyse de données à long-terme (*e.g.* Imai et al. 2006 ; Collos et al. *sous presse*). Plusieurs hypothèses, encore débattues actuellement, pourraient l'expliquer.

Une partie de cette augmentation serait due à une amélioration des techniques de détection des espèces nuisibles et de leurs toxines, grâce à une intensification des suivis *in situ* et une augmentation de l'efficacité des techniques de mesures (Hallegraeff 1993 ; Anderson et al. 2002). Le nombre d'espèces de dinoflagellés toxiques répertoriées est ainsi passé d'environ 20 il y a une dizaine d'années à plus de 60 aujourd'hui (Burkholder 1998). Les séries à long-terme intégrant des données historiques (comme celles obtenues avant les années 90) doivent donc être analysées et interprétées avec précaution. La publication des travaux de

Brand & Compton (2007) a fait récemment débat en ce sens en Floride. Ces travaux présentent des données d'abondance et de distribution des blooms de *Karenia brevis* (dinoflagellé toxique) le long de la côte sud-ouest de Floride qui proviennent d'une base de données compilée par le Fish and Wildlife Research Institute (FWRI). En comparant les années 1954-1963 aux années 1994-2002, ces auteurs stipulent que ces données mettent en évidence un changement saisonnier dans l'apparition des blooms et une amplification de leur intensité, en particulier dans les eaux plus au large. Un rapport du FWRI a depuis été publié, précisant que la forte modification des techniques de mesures et des fréquences d'échantillonnages avant et après 1998 ne permettait pas une comparaison directe entre données historiques et données actuelles d'amplitude des blooms. Cette évolution marquée des techniques rendrait de plus inadéquate l'utilisation d'outils statistiques tels que ceux employés par Brand & Compton (2007) pour réduire le biais d'échantillonnage (FWRI 2007a). Les données historiques d'abondance, fournies par le FWRI, pourraient cependant être utilisées pour comparer les zones d'apparition des blooms toxiques et leur évolution spatiale (FWRI 2007b).

Ce biais dû à l'amélioration des techniques de détection ne peut cependant pas expliquer l'ampleur de la tendance observée à l'échelle mondiale : l'expansion globale des HABs dans le monde est une réalité. Elle serait le résultat de l'intensification des activités humaines qui favoriseraient, à la fois, la dispersion des espèces nuisibles et le développement des HABs dans des environnements où les espèces seraient déjà présentes, parfois sous forme d'« espèces cryptiques » (« hidden flora ») *i.e.* encore non-détectées (Smayda 2002 ; Smayda 2008).

Une dispersion des espèces nuisibles due aux activités humaines pourrait s'effectuer par le transport d'eaux de ballast ou le transfert d'animaux vivants, coquillages ou poissons. Ces modes de dispersion auraient entre autres permis aux espèces du genre *Alexandrium* d'être introduites dans des zones côtières méditerranéennes (Penna et al. 2005) (*e.g.* apparition d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau dans le sud de la France, Lilly et al. 2002), du Japon (Furuhata et al. 1996) et d'Australie (Lilly et al. 2005) depuis les années 80.

Les activités humaines pourraient également favoriser le développement d'espèces nuisibles au détriment d'autres espèces en modifiant les conditions environnementales des milieux aquatiques. De nombreux exemples soutiennent l'hypothèse d'un lien entre processus d'*eutrophisation* (terme défini pour les écosystèmes d'eau douce et extrapolé aux milieux côtiers indiquant un enrichissement de l'environnement en éléments nutritifs) et amplification des événements HABs (Anderson et al. 2002 ; Glibert et al. 2005) : dans un contexte

d'intensification de l'urbanisation et des activités industrielles et agricoles, de nombreuses espèces nuisibles se seraient développées plus activement en réponse à une augmentation du déversement de nutriments dans les systèmes aquatiques. Les HABs seraient alors favorisés soit par l'apport massif d'un élément limitant du milieu (azote, phosphore, silicate ou fer) (d'où le terme de « nutrification » défini par Smayda (2008) pour remplacer le terme anglais « eutrophication » lorsque l'on considère les eaux côtières), soit par une modification des rapports élémentaires N:P:Si caractérisant les conditions nutritives du milieu. La nature des éléments nutritifs déversés aurait également un rôle majeur ; l'urée (source d'azote sous forme organique dissoute) favoriserait ainsi le développement de nombreuses espèces nuisibles (Glibert et al. 2006). Cependant, chaque espèce, phytoplanctonique ou cyanobactérie, est caractérisée par des capacités propres de prélèvements des ressources en nutriments. Elles ne répondent donc pas de la même manière à une modification des conditions nutritives. Ainsi, dans la mer intérieure de Seto au Japon, la nette diminution de la pollution des eaux côtières en terme de déversement de nitrate, ammonium et phosphate a permis une nette diminution du nombre global de HABs (en particulier des développements de *Karenia mikimotoi* et *Heterosigma akashiwo*), mais également l'apparition d'espèces du genre *Alexandrium* (*A. catenella* et *A. tamarense*) qui produisent, depuis, des efflorescences toxiques récurrentes (Anderson et al. 2002 ; Imai et al. 2006). De même, d'après Collos et al. (*sous presse*), l'*oligotrophisation* (appauvrissement de l'environnement en éléments nutritifs) des eaux de l'Etang de Thau dans le sud de la France, et en particulier la diminution de la concentration en phosphate, aurait favorisé le développement d'*A. catenella* qui produit, depuis 1995, des efflorescences régulières dans cette lagune.

## **2- Impacts des HABs dans les zones côtières**

### *a- Impacts écologiques et risques pour la santé humaine*

Parmi les HABs, certaines espèces créent des nuisances par la production d'une très forte quantité de matière organique. Les efflorescences récurrentes du prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* en Manche et Mer du Nord en sont un bon exemple : cette micro-algue synthétise de forte quantité de mucus (Seuront et al. 2006) qui, lors d'efflorescences massives, provoque l'accumulation de grandes quantités de mousse sur les plages (Figure 1). Cette accumulation de matière organique sous forme de mousse perturbe l'écologie de la zone

intertidale (Rauch et al. 2008) et a des conséquences particulièrement néfastes sur les activités touristiques de la zone côtière.



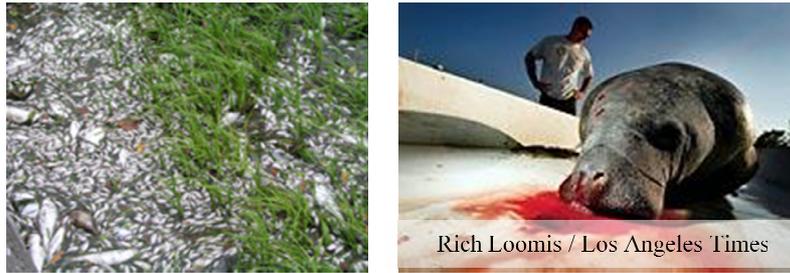
**Figure 1 :** Dépôts de mousse sur les plages de la Côte d'Opale (Manche orientale), conséquence d'un bloom massif de *Phaeocystis globosa*

D'autres espèces (environ 40% d'après Zingone & Enevoldsen (2000)) sont nuisibles par leur faculté à produire des toxines qui peuvent s'accumuler le long de la chaîne trophique et provoquer un risque pour la santé humaine. Dans la majeure partie des cas, les intoxications chez l'homme proviennent de la consommation de coquillages ou de poissons ayant accumulé des toxines dans leur chair. Différents types de syndromes dits « Shellfish Poisoning » ou « Fish Poisoning » ont donc été décrits et associés à des classes spécifiques de toxines (Tableau 1 ; Landsberg et al. (2005)). Parmi ces syndromes, *Alexandrium catenella* est responsable du syndrome PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) par action de saxitoxines (STX) qui perturbent le système nerveux par blocage des canaux sodiques, la dose létale pour l'homme étant de 1-4 mg d'équivalent STX (Levin 1992). Seules les toxines de type brevetoxines peuvent provoquer un risque additionnel pour la santé humaine par inhalation, car une partie des toxines excrétées pendant une efflorescence (de *Karenia brevis* par exemple) passe dans l'atmosphère et crée un « nuage toxique » au dessus de la zone. Les toxines associées aux syndromes PSP, NSP, CFP et ASP (sigles explicités dans le Tableau 1) ont été identifiées comme responsables de la mort de nombreux vertébrés (poissons, oiseaux ou mammifères). Ces mortalités peuvent être le signe de conséquences écologiques désastreuses (Figure 2), comme la mort d'individus appartenant à une espèce protégée ou menacée (e.g. dauphins ou lamantins ; Flewelling et al. 2005).

Syndrome	Toxines	Genre phytoplanktonique	Cas de mortalité		Symptômes en cas d'intoxication grave
			Animaux	Humains	
Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)	Saxitoxines	<i>Alexandrium</i> * <i>Gymnodinium</i> * <i>Pyrodinium</i> *	Oui	Oui	Problèmes de motricité Arrêt de la respiration
Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)	Brevetoxines	<i>Karenia</i> * <i>Chattonella</i> ** <i>Heterosigma</i> **	Oui	Non	Problèmes gastro-intestinaux Problèmes de motricité Gêne respiratoire
Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)	Acide okadaïque Dinophysistoxines Yessotoxines	<i>Dinophysis</i> * <i>Prorocentrum</i> * <i>Protoceratium</i> * <i>Lingulodinium</i> *	Non	Non	Problèmes intestinaux
Ciguatera Fish Poisoning (CFP)	Ciguatoxines	<i>Gambierdiscus</i> *	Oui	Non	Problèmes gastro-intestinaux Problèmes neurologiques Problèmes cardiovasculaires
Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	Acide domoïque	<i>Pseudo-nitzschia</i> ***	Oui	Oui	Vomissements Désorientation
Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP)	Azaspiracide	<i>Protoperidinium</i> *	Non	Non	Problèmes intestinaux

**Tableau 1 :** Syndromes liés à une contamination par des toxines algales, symptômes associés et cas répertoriés de mortalité d'animaux (poissons, mammifères ou oiseaux) et chez l'homme.

Les genres phytoplanktoniques cités appartiennent à la classe des dinoflagellés(\*), des raphidophytes(\*\*) ou des diatomées(\*\*\*). D'après Landsberg et al. (2005)



**Figure 2 :** Mortalités de poissons et de lamantins dues aux brevetoxines produites au cours d'un bloom de *Karenia brevis* sur la côte de Floride.  
*Photos obtenues auprès du Fish and Wildlife Research Institute (FWRI).*

### *b- Conséquences économiques des HABs*

Les HABs peuvent induire des conséquences économiques graves, en particulier dans les zones côtières fortement dépendantes de la conchyliculture, de la pisciculture ou du tourisme. Les pertes financières provoquées sont difficiles à évaluer d'un point de vue global, en particulier concernant le secteur touristique où elles peuvent être significatives à une échelle très locale (comme le front de mer) mais pas à l'échelle de la zone côtière. En effet, en cas de crise HAB, une partie des dépenses prévues par les visiteurs pour des activités touristiques devenues impraticables (pêche, activités nautiques, restaurant en front de mer...) seraient réorientées vers d'autres activités dans des lieux proches.

Une estimation globale des coûts associés aux HABs a été effectuée à l'échelle des Etats-Unis : les efflorescences nuisibles causeraient des pertes financières annuelles d'environ 50 millions de dollars, estimées en moyenne sur la période 1987-1992 (Hoagland et al. 2002) qui se répartiraient de la manière suivante : 45% seraient dus aux frais de santé publiques, 37% aux pertes de production de la filière aquacole, 14% aux pertes dans le secteur touristique et 4% à la gestion et à la mitigation des événements HABs (Anderson et al. 2000). Ces proportions seraient cependant très variables en fonction des zones côtières considérées ; par exemple, les côtes de Floride subiraient plus de pertes liées au tourisme qu'aux filières industrielles. Concernant la filière aquacole, un bloom de *Chattonella antiqua* a déjà provoqué la mort de 14 millions de poissons au Japon en 1972 menant à une perte directe de 76 millions de dollars (Imai et al. 2006). Parmi les espèces du genre *Alexandrium*, un bloom d'*Alexandrium fundyense* dans les eaux de la Nouvelle Angleterre en 2005 a causé des pertes directes pour la filière aquacole estimée à 18 millions de dollars au Massachusetts (Jin et al. 2008). Ces pertes peuvent être renforcées par une baisse des prix sur le marché de la filière aquacole locale, due à une baisse de la consommation résultant de la mauvaise image des

produits diffusée par les médias et à une réorientation des approvisionnements des revendeurs vers d'autres sources comme les exportations (Jin et al. 2008).

### 3- ***Gestion des HABs***

Pour limiter les impacts néfastes des HABs en termes de santé humaine, d'écologie et d'activités socio-économiques de la zone côtière, trois stratégies de gestion peuvent être envisagées : (i) la prévention, qui permet de limiter l'apparition et l'ampleur des HABs et donc leurs conséquences, (ii) le contrôle, qui regroupe des actions visant à limiter ou stopper le développement d'un bloom existant, (iii) la mitigation qui vise à réduire les impacts environnementaux et les risques pour la santé humaine (Boesch et al. 1997 ; Landsberg et al. 2005). Une gestion optimale doit intégrer ces trois stratégies.

#### *a- Prévention*

Parmi les mesures de prévention, on retrouve principalement la limitation du déversement de nutriments (nitrates, phosphates, pollution organique...) dans les eaux douces, les eaux côtières et les lagunes, même si une oligotrophisation du milieu peut parfois favoriser le développement de certaines espèces nuisibles. Des mesures peuvent également être prises pour limiter l'introduction de nouvelles espèces nuisibles par transport d'eaux de ballast ou transfert d'animaux (coquillages ou poissons). Cependant, le traitement et le contrôle des eaux de ballast à l'échelle mondiale restent difficile à envisager.

#### *b- Contrôle*

Pour le contrôle des blooms, des techniques permettant d'éliminer une efflorescence existent ; si elles se révèlent souvent efficaces au laboratoire en milieu confiné, elles sont peu envisageables *in situ*, entre autres à cause de potentiels dommages collatéraux au niveau de l'écosystème. Par exemple, certaines techniques provoquant la destruction des cellules algales toxiques peuvent s'avérer plus néfastes, *in situ*, que de laisser une efflorescence toxique se développer et décliner naturellement : la libération massive de toxines dans le milieu qu'elles provoquent peut être catastrophique pour le reste de l'écosystème et amplifier le risque de contamination des zones aquacoles. Une autre limitation de l'application de ces techniques *in situ* concerne leur coût. En effet, le coût à envisager pour réaliser un traitement à grande échelle peut s'avérer plus important que les pertes associées au développement de

l'efflorescence nuisible. Trois types de traitements visant à contrôler le développement d'une efflorescence ont été testés : des traitements chimiques, physiques et biologiques.

Les traitements physico-chimiques correspondent à des techniques inspirées des procédés utilisés pour la potabilisation de l'eau. On y retrouve l'*ozonation* (injection d'ozone dans l'eau), process qui permet la destruction à la fois des cellules et de leurs toxines (Schneider et al. 2003), mais qui provoque la destruction de tout organisme présent dans l'eau traitée. En plus du risque écologique encouru, son utilisation *in situ* apparaît difficile à mettre en œuvre au vu des risques à envisager pour les opérateurs, dus entre autres aux risques de relargage d'ozone dans l'atmosphère. Un traitement plus prometteur consiste en l'utilisation de flocculants (comme l'argile) qui vise à faire sédimenter les cellules phytoplanctoniques grâce à création d'un maillage entre particules (*e.g.* Archambault et al. 2003). Cependant, ce traitement par floculation n'est pas spécifique : il provoque donc des pertes collatérales sur les communautés bactériennes et zooplanctoniques (Lee et al. 2008). De plus, les précipités obtenus après floculation restent toxiques. Avant de tester cette technique *in situ*, il apparaît donc important d'envisager les conséquences néfastes possibles de ce traitement sur la communauté benthique (Lewis et al. 2003) et de tester si les conditions hydrodynamiques de la zone ne vont pas provoquer leur remise en suspension dans la colonne d'eau (Beaulieu et al. 2005).

Un contrôle biologique des blooms par action de virus et de bactéries algicides a également été envisagé. Concernant l'action virale, des essais effectués en culture sur *Heterosigma akashiwo* et *Heterocapsa circularisquama* ont montré que les virus seraient spécifiques à une souche plutôt qu'à l'espèce : un simple clone de virus algal ne pourrait donc pas permettre d'éliminer totalement une efflorescence (Imai et al. 2006). L'utilisation de bactéries algicides pour réduire des efflorescences nuisibles est également à l'étude. Un projet d'aquaculture de macro-algues favorisant le développement de bactéries algicides est actuellement envisagé dans les zones côtières du Japon : il s'agirait alors d'une méthode de prévention du développement d'HABs grâce à des apports réguliers de bactéries algicides dans les eaux côtières (Imai et al. 2006).

Même si des techniques de contrôle existent, leur application *in situ* reste encore controversée, entre autres à cause des dommages collatéraux potentiels qu'elles peuvent produire. De plus amples recherches sont nécessaires afin de les améliorer.

*c- Mitigation*

Les stratégies de mitigation incluent tout d'abord une amélioration de la compréhension des processus écologiques impliqués dans les HABs, ceci afin de pouvoir détecter, suivre et prédire plus efficacement le développement des efflorescences nuisibles. Elles consistent également en une amélioration de la communication envers le grand public afin d'améliorer sa compréhension des risques encourus pour la santé humaine.

La détection précoce d'un événement HAB est essentielle pour optimiser les stratégies de prévention et de contrôle. Elle nécessite la réalisation d'un suivi régulier et à haute-fréquence des zones à risques, comme celui réalisé par Ifremer au niveau de la Crique de l'Angle où s'initient les efflorescences d'*Alexandrium catenella* dans l'Etang de Thau. L'efficacité de ce genre de suivi est souvent limitée par les techniques employées pour dénombrer les cellules d'algues nuisibles, en particulier par les observations au microscope. Des méthodes de détection en temps réel sont actuellement en développement afin d'améliorer cette efficacité ; elles font appel à des sondes ADN, des sondes anti-corps ou bien des suivis vidéos *in situ* (Scholin et al. 2005).

La mise en place d'un système d'alerte nécessite, de plus, un effort de prédiction. Pour le réaliser, il est nécessaire d'acquérir une bonne connaissance des processus de croissance de l'espèce en cause et de leur contrôle par les conditions environnementales, mais aussi une capacité à modéliser cette croissance. Le travail réalisé au cours de cette thèse s'intègre pleinement dans cet objectif : il vise à caractériser et paramétrer l'influence des éléments nutritifs sur la croissance d'*Alexandrium catenella*, en vue de pouvoir définir les conditions nutritives favorisant l'initiation et le développement d'une efflorescence et mettre en place un modèle de croissance pour cette espèce.

## **II- LES EFFLORESCENCES TOXIQUES RECURRENTES D'*ALEXANDRIUM CATENELLA* DANS L'ÉTANG DE THAU**

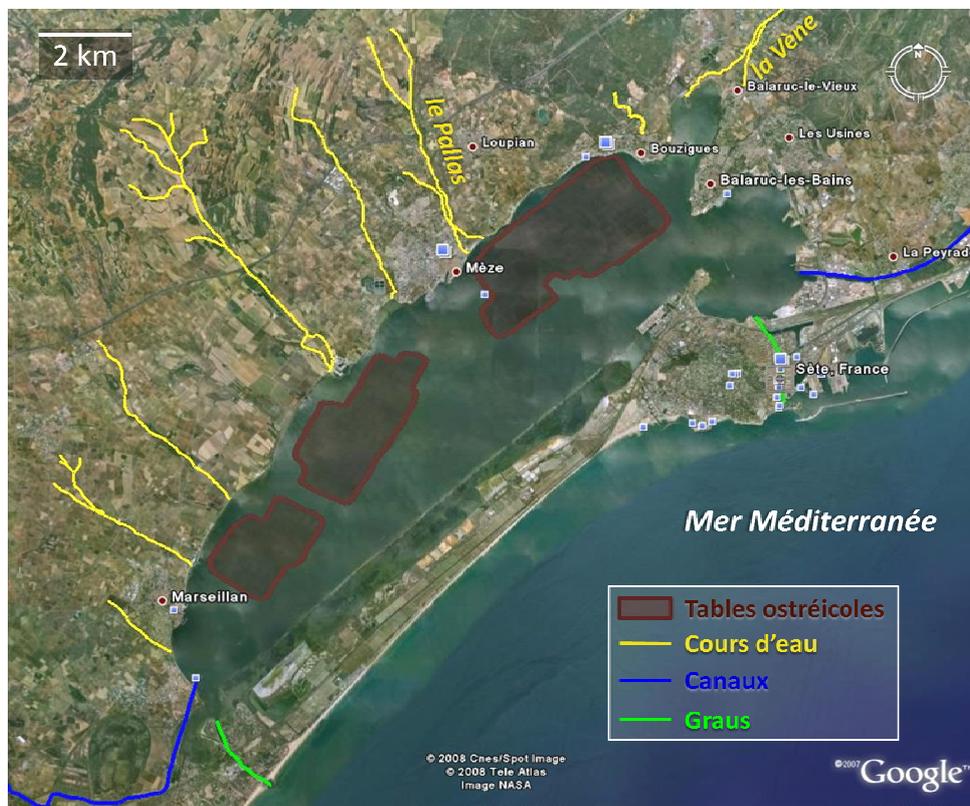
### **1- *Caractéristiques actuelles de l'Etang de Thau***

*a- Caractéristiques hydromorphologiques*

L'Etang de Thau est une lagune caractérisée par une superficie d'environ 75 km<sup>2</sup> et une profondeur moyenne de 5 m qui en font la lagune la plus grande et la plus profonde de la région Languedoc-Roussillon. Ces caractéristiques s'expliquent par sa formation d'origine

tectonique : cet étang est le synclinal d'un plissement dont l'anticlinal est la montagne de la Gardiole au nord-est.

Cet étang est alimenté en eau douce par un réseau hydrographique composé d'une dizaine de petits cours d'eau dont la majorité présente un caractère non-pérenne pendant la saison sèche. Les deux cours d'eau majeurs entrants sont la Vène et le Pallas (Figure 3). Les débits de ces cours d'eau sont régis par le climat méditerranéen littoral, caractérisé par des précipitations irrégulières et souvent automnales ; les débits moyens mesurés sont donc faibles et des crues soudaines et fortes peuvent être générées pendant la saison automnale. Cette lagune reçoit également l'eau de deux canaux de navigation, le canal du Midi (au sud) et le canal du Rhône (à l'est), et reste en communication directe avec la mer par deux graus, le grau de Pisses-Saumes au sud et le canal de Sète à l'est (Figure 3).



**Figure 3** : Réseau hydrographique associé à la lagune de Thau et localisation des zones de tables ostréicoles – Photo satellite obtenue à partir de Google Earth

Ces caractéristiques hydromorphologiques mènent à un faible taux de renouvellement des eaux lagunaires qui sont, de ce fait, particulièrement sensibles aux conditions d'apports, en particulier provenant des cours d'eau. Elles permettent également de maintenir une salinité élevée dans la lagune (proche de celle de la mer Méditerranée) rendant possible la mise en place d'une activité conchylicole.

*b- L'Etang de Thau, une zone de production conchylicole*

La production conchylicole du bassin de Thau atteint environ 13000 tonnes d'huîtres (*Crassostrea gigas*) et 2500 tonnes de moules (*Mytilus galloprovincialis*) chaque année, ce qui en fait le plus gros bassin méditerranéen en terme de production de coquillages et le premier bassin d'Europe en terme de commercialisation (données fournies par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau, SMBT). Elle représente 10% de la production nationale et atteint un chiffre d'affaire direct de 37 millions d'euros. Cette activité, gérée par 750 producteurs, est organisée en trois secteurs (Figure 3), couvrant 1/5 de la surface de la lagune.

La filière conchylicole représente ainsi un secteur majeur d'activité de la zone côtière. Les développements récurrents d'efflorescences toxiques d'*Alexandrium catenella*, observés dans l'Etang de Thau depuis la fin des années 90 (Collos et al. *sous presse*), peuvent donc fortement perturber la production de ce secteur, en plus de provoquer des risques majeurs d'intoxication alimentaire.

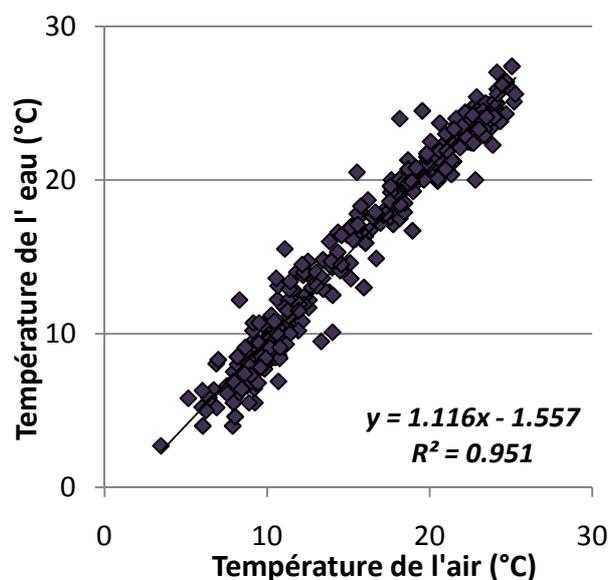
**2- Evolution des conditions environnementales de la lagune – Analyse de séries long-terme**

D'après Collos et al. (*sous presse*), l'analyse de séries long-terme de données de température, salinité et concentrations en éléments nutritifs des eaux de l'Etang de Thau a permis de mettre en évidence deux changements majeurs dans les conditions environnementales de la lagune sur la période 1972 – 2006 : une augmentation globale des températures (0.045°C/an), principalement marquée au printemps, et une diminution marquée des concentrations en phosphate (90% au cours de la période 1970-1995 d'après Souchu et al. (1998)) qui sont maintenues, depuis le début des années 90, à des niveaux bas, inférieurs à 1 µM en été et indétectables en hiver (<0.03 µM). L'Etang de Thau est ainsi devenu l'une des lagunes les moins eutrophes de la côte méditerranéenne.

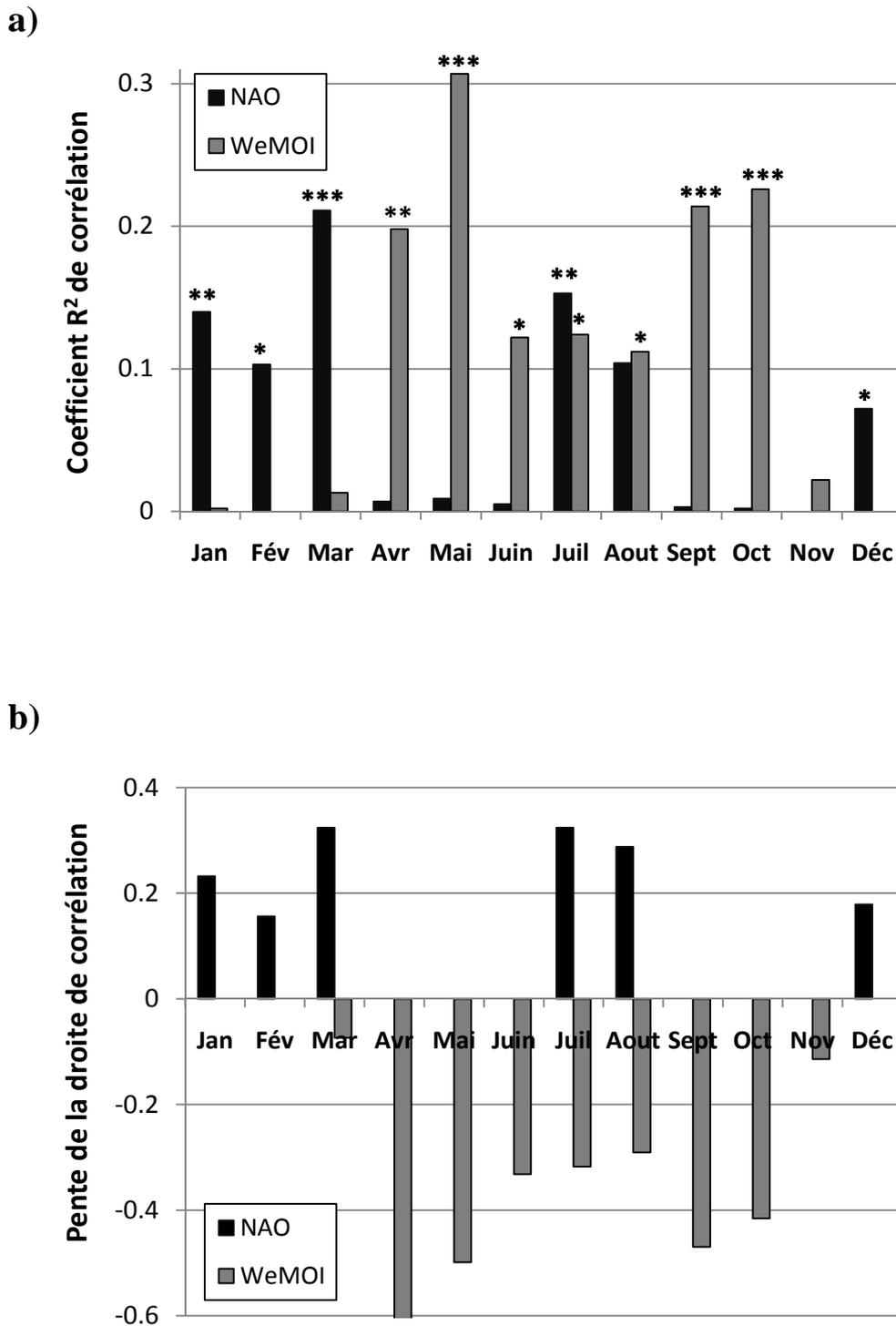
Les variations des conditions chimiques de la lagune sont principalement le résultat des activités humaines. La forte baisse des concentrations en phosphate observée dans les années 70 et 80 peut par exemple s'expliquer par la mise en place de nombreuses infrastructures de traitements des eaux usées au cours de cette période (La Jeunesse & Elliott 2004).

Les variations des paramètres physiques (température, salinité, hydrodynamisme) sont majoritairement le fait du climat (la salinité et l'hydrodynamisme étant fonction des

précipitations et des vents sur la zone), mais également des activités humaines à travers le réchauffement global. Or, à l'échelle du globe, les variations en termes d'amplitude et de localisation des zones anticycloniques et dépressionnaires majeures créent des oscillations naturelles dans les transferts de masses d'air à l'échelle des bassins océaniques qui peuvent influencer les climats de larges zones géographiques. Le bassin de Thau pourrait ainsi subir l'influence de l'Oscillation Nord Atlantique, quantifiée par l'*indice NAO* (calculé à partir de la différence de pression entre l'anticyclone des Açores et la dépression d'Islande) et, également, celle d'une oscillation définie à l'échelle de la zone ouest du bassin méditerranéen, caractérisée par l'indice *WeMO* (Western Mediterranean Oscillation Index, calculé à partir de la différence de pression entre l'anticyclone des Açores et la dépression de Ligurie) défini par Martin-Vide & Lopez-Bustins (2006). L'analyse des corrélations entre données de température ou de précipitations et valeurs de ces indices sur des séries long-terme peut permettre de mettre en évidence un forçage climatique global de la zone considérée. Pour l'Etang de Thau, une série de données d'anomalies de température de l'air sur la période 1971-1998 a pu être comparée aux valeurs des indices NAO ([www.cpc.noaa.gov/index.php](http://www.cpc.noaa.gov/index.php)) et WeMO ([www.ub.es/gc/English/wemo.htm](http://www.ub.es/gc/English/wemo.htm)). L'utilisation des données de température de l'air plutôt que de l'eau a permis d'agrandir la série de données disponibles tout en conservant une bonne représentation de l'influence des forçages climatiques sur les caractéristiques des eaux lagunaires puisque les valeurs de température de l'air sont apparues fortement corrélées à celles de l'eau (Figure 4).



**Figure 4 :** Corrélation entre données de température de l'air et de l'eau au niveau de la lagune de Thau – *Données Météo France et Ifremer*



**Figure 5 :** Caractéristiques des corrélations obtenues entre anomalies de température de l'air au niveau de l'Etang de Thau et valeurs des indices NAO et WeMOI au cours d'un cycle annuel, (a) coefficient de corrélation  $R^2$  (\*  $P < 0.1$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ) et (b) pente.

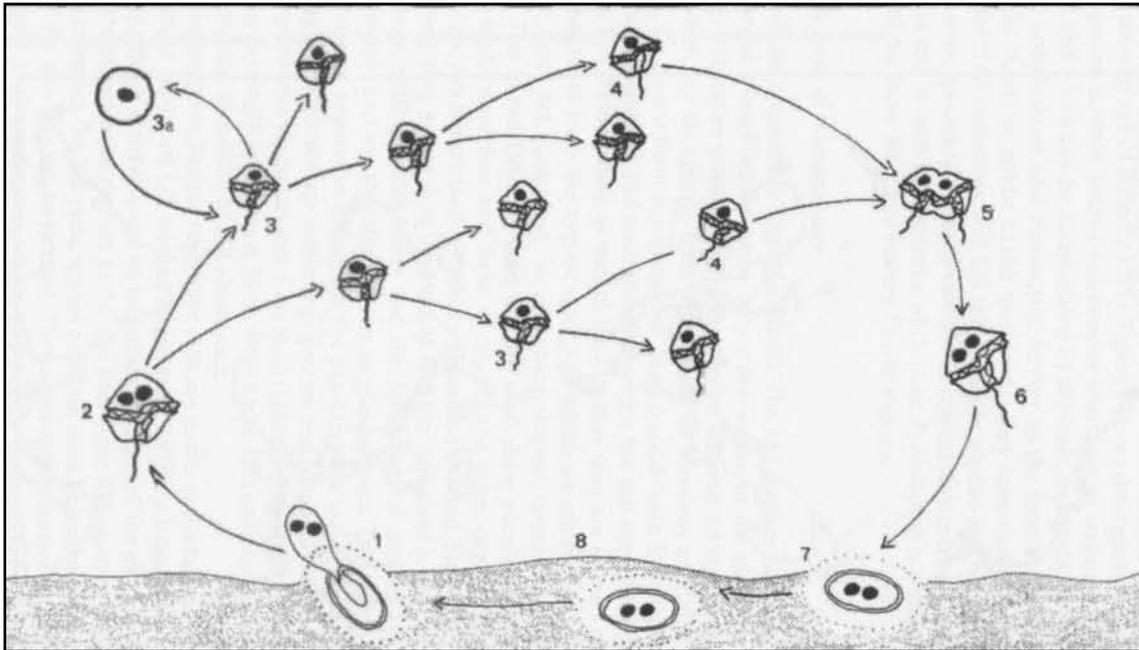
D'après la Figure 5, une succession dans les facteurs de forçage climatiques jouant sur les conditions environnementales de l'Etang de Thau semble s'opérer au cours de l'année : les conditions de température au cours de la période hivernale seraient influencées par l'indice NAO (corrélation positive) ; les températures au cours du printemps et de l'automne subiraient l'influence plus locale des conditions atmosphériques de l'ouest méditerranéen, représentée par une corrélation négative avec l'indice WeMO, qui prendrait alors le relais sur l'influence atlantique ; l'été serait une période où les deux forçages, atlantique et méditerranéen, joueraient simultanément.

De telles corrélations pourraient permettre une prévision des régimes de température, du moins en hiver. En effet, une partie de la variabilité de l'indice NAO d'hiver (tendance vers des indices positifs ou négatifs) pourrait être estimée à partir des anomalies de température sur l'Atlantique en fin d'été (Cassou 2004). D'autre part, chaque espèce phytoplanctonique étant caractérisée par une gamme de tolérance par rapport aux facteurs physiques telles que la température et la lumière, les efflorescences phytoplanctoniques sont des phénomènes saisonniers ; les corrélations mises en évidence révèlent donc que, dans la lagune de Thau, leur contrôle par les facteurs physiques du milieu pourrait être influencé soit par le régime climatique atlantique, soit par celui (plus local) de l'ouest méditerranéen, en fonction de la période privilégiée d'apparition des blooms.

### 3- *Apparition d'**Alexandrium catenella** dans la lagune de Thau dans les années 90*

#### *a- Cycle de vie d'**A. catenella***

*A. catenella* est une espèce pouvant être présente dans le milieu soit au niveau de la colonne d'eau (*stade pélagique*) sous forme de cellules mobiles flagellées nommées *cellules végétatives*, soit au niveau du sédiment (*stade benthique*) sous forme de *kystes dormants* (cellules au métabolisme ralenti permettant à l'espèce de survivre à des conditions environnementales défavorables) appelés également kystes de résistance. Les liens entre les stades benthique et pélagique au cours du cycle de vie de l'espèce sont représentés sur la Figure 6 :



**Figure 6 :** Représentation du cycle de vie d'*Alexandrium* sp.  
– d'après Wyatt & Jenkinson (1997)

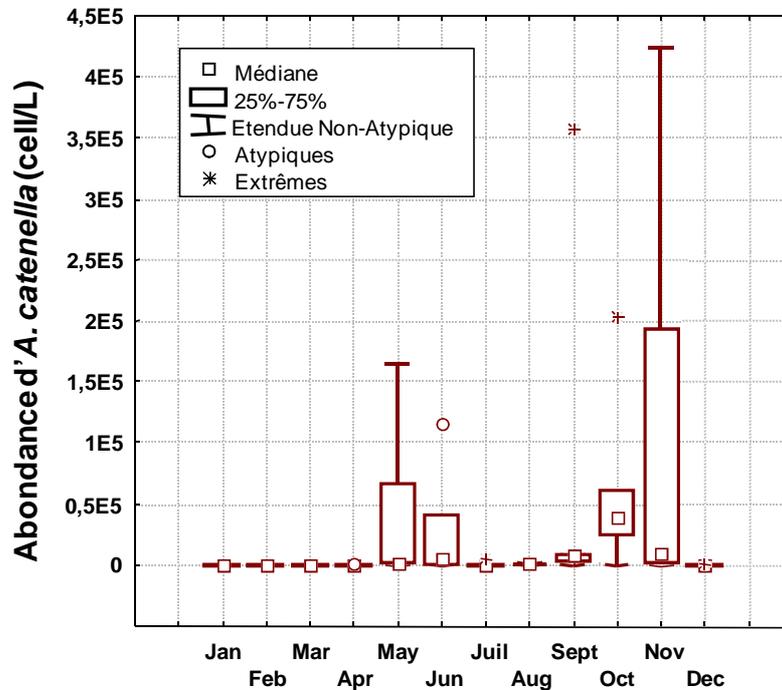
D'après le cycle décrit sur cette figure, la germination d'un kyste dormant (1) permet la libération, dans la colonne d'eau, d'un planoméïocyte diploïde (2) qui, après méiose, donne deux cellules végétatives haploïdes. La division par mitoses successives (3) de ces cellules végétatives va mener au développement d'une efflorescence. Des variations brusques de l'environnement peuvent provoquer la formation de kystes temporaires (3a). Après la phase de croissance exponentielle, les cellules végétatives produisent des gamètes (4) qui fusionnent (5) pour former un planozygote diploïde (6). Cette cellule évolue en se chargeant de réserves et en perdant sa mobilité afin de mener à la formation d'un kyste dormant immature (7). Ce kyste benthique subit, dans le sédiment, une période de dormance obligatoire associée à une phase de maturation (8) avant de pouvoir germer.

Les kystes de résistance restent en état de dormance tant que les conditions environnementales (entre autres de température et de lumière) ne sont pas favorables au développement d'une efflorescence (Anderson 1998).

#### b- *A. catenella*, une espèce probablement invasive

Un suivi régulier de la communauté phytoplanctonique a été mis en place dans l'Etang de Thau à partir de 1987. La première efflorescence d'*Alexandrium catenella* fut observée en 1995 (événement non-toxique) et le premier bloom toxique en 1998 (Lilly et al. 2002).

Depuis, des efflorescences récurrentes saisonnières ont lieu chaque année, au printemps et à l'automne (Figure 7 ; Collos et al. *sous presse*), les deux saisons subissant l'influence du régime climatique ouest méditerranéen. Le bloom le plus dense fut observé en automne 2004, au cours duquel une concentration de  $15 \times 10^6$  cell/L fut atteinte.



**Figure 7 :** Evolution des abondances mensuelles d'*A. catenella* au cours d'un cycle annuel – Données Ifremer obtenues à la station A5 de la Crique de l'Angle, dans l'Etang de Thau.

Le suivi de la concentration en cellules végétatives dans la colonne d'eau n'est pas suffisant pour déterminer une date d'introduction de l'espèce dans l'Etang de Thau : elle pouvait être présente dans la lagune avant 1995, en particulier sous forme de kystes de résistance. Néanmoins, l'estimation de la densité des kystes de résistance au niveau du sédiment a révélé une valeur moyenne faible à l'échelle de l'Etang de Thau (moins de 20 kystes par gramme de sédiment sec) qui suggère une invasion récente de l'espèce (Genovesi-Giunti, 2006).

#### 4- Facteurs de contrôle des efflorescences et stratégies de croissance

Avant 1995, deux raisons peuvent expliquer l'absence de floraisons d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau : soit l'espèce n'était pas encore présente dans le milieu, soit les conditions n'étaient pas favorables à son développement. L'initiation et le développement d'une efflorescence nécessitent que la croissance cellulaire de la population soit supérieure

aux pertes de biomasse dues aux pressions environnementales, comme le broutage, l'advection (Smayda 1997b) ou la lyse parasitaire (Chambouvet et al. 2008). Cette croissance cellulaire est fonction des capacités nutritionnelles, photosynthétiques et d'adaptation des cellules. Ces caractéristiques métaboliques, définies par la génétique, sont aussi régulées par des facteurs environnementaux aussi bien physico-chimiques (tels que la température, l'intensité lumineuse, la turbulence ou la disponibilité en sels nutritifs) que biologiques (comme la compétition interspécifique). L'observation d'une efflorescence dans un milieu donné est donc la preuve que (i) cette population est adaptée aux conditions physico-chimiques du milieu, (ii) qu'elle est compétitrice par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques dans ces conditions environnementales et (iii) qu'elle présente une croissance suffisante pour compenser les pertes de biomasse.

D'après Tilman et al. (1982), l'acquisition de la ressource nutritive limitante a un rôle majeur dans la croissance nette des populations phytoplanctoniques. Cependant, *A. catenella* présenterait de faibles capacités compétitrices en terme d'utilisation des ressources nutritives dites inorganiques, en particulier si les ressources sont limitantes. En effet, les capacités d'absorption d'*A. catenella* seraient caractérisées par de fortes constantes d'affinité ( $K_S$ ) par rapport aux sels inorganiques, aussi bien azotés (nitrate et ammonium ; Collos et al. 2004) que phosphorée (phosphates ; Ou et al. 2008). Or, d'après l'évolution des caractéristiques physico-chimiques des eaux lagunaires décrite précédemment, l'apparition des efflorescences d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau a coïncidé avec une oligotrophisation du milieu : les efflorescences sont observées de manière récurrente depuis 1995, période caractérisée par de faibles concentrations en phosphate. L'espèce doit donc compenser ce désavantage vis-à-vis de l'utilisation des nutriments inorganiques par la mise en place de stratégies de croissance particulières améliorant sa compétitivité. Chez les dinoflagellés toxiques, ces stratégies peuvent concerner le cycle de développement, les caractéristiques morphologiques ou les capacités métaboliques des cellules (Smayda 1997b ; Glibert et al., 2005).

Pour *A. catenella*, les connaissances physiologiques de l'espèce permettent d'envisager quatre types de stratégies apportant des avantages compétitifs : (i) l'existence d'un cycle de vie complexe faisant intervenir une phase de dormance sous forme de kystes benthiques car la régulation associée à la germination de ces kystes permet de libérer un inoculum de cellules dans une fenêtre environnementale favorable à leur développement (Anderson 1998) ; (ii) l'excrétion de molécules toxiques ou allélopathiques (Arzul et al. 1999) qui peuvent permettre de limiter le broutage ou d'inhiber la croissance de certaines espèces algales compétitrices (Smayda 1997b) ; (iii) les capacités de migration des

cellules végétatives qui permettent aux cellules d'optimiser leurs conditions de lumière ou de disponibilité en nutriments en fonction de leurs besoins (Sullivan et al. 2003) ; (iv) des capacités nutritionnelles spécifiques de type *mixotrophes* (utilisation de la matière organique par un organisme photosynthétique ; Caron (2000)) car *A. catenella* serait capable de récupérer des éléments nutritifs pour sa croissance par absorption d'azote organique dissous (Carlsson & Granéli 1998 ; Collos et al. 2004) et phagocytose de cyanobactéries (Jeong et al. 2005).

Les capacités mixotrophes d'*A. catenella*, et en particulier la phagocytose de cyanobactéries, pourraient correspondre à un des avantages compétitifs majeurs permettant d'expliquer l'apparition d'efflorescences récurrentes d'*A. catenella* dans l'Étang de Thau dès les années 90. D'après Collos et al. (*sous presse*), l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de la lagune (hausse des températures et baisse des phosphates) aurait favorisé indirectement le développement d'*A. catenella* en créant une niche écologique favorable au développement de sa proie potentielle, les cyanobactéries. La hausse globale des températures de l'Étang de Thau n'aurait favorisé en aucune manière le développement de cette espèce toxique car l'initiation des blooms d'*A. catenella* nécessiterait une fenêtre de température stable aux alentours de 20°C pendant plusieurs jours (Collos et al. *sous presse*).

L'existence d'une zone préférentielle d'initiation des blooms à l'échelle de l'Étang de Thau confirmerait l'importance majeure des stratégies d'acquisition des nutriments par *A. catenella* dans la compétitivité de cette espèce. En effet, dans la lagune, les efflorescences semblent systématiquement s'initier au niveau de la crique située à l'embouchure de la Vène (Figure 3), nommée Crique de l'Angle. Pourtant, l'étude de la répartition des zones d'accumulation de kystes au niveau des sédiments de la lagune a mis en évidence l'existence d'au moins trois zones privilégiées (Genovesi-Giunti 2006) : la Crique de l'Angle (jusqu'à 440 kystes par gramme de sédiment sec), l'Étang des Eaux blanches (crique située à l'est de la lagune) et une zone située au sud de la lagune, face à Marseillan (Figure 3). Les conditions environnementales spécifiques de la Crique de l'Angle doivent donc être les seules favorables à l'initiation et au développement d'efflorescences d'*A. catenella*. Cette spécificité pourrait résider dans les deux caractéristiques suivantes : (i) la Crique de l'Angle est une zone d'apports importants d'éléments nutritifs à l'échelle de l'Étang de Thau, grâce au débit de la Vène et aux rejets associés à une station de lagunage située en bordure de la Crique et à l'activité thermique de la ville de Balaruc-les-Bains ; (ii) elle présenterait des périodes de confinement (fonction des conditions de vents et de courants associés) (Vincent 2007) qui favoriseraient l'amplification d'une efflorescence en maintenant les cellules dans des

conditions favorables et stables, alors qu'une absence de confinement favoriserait la dispersion des cellules vers le reste de la lagune et augmenterait ainsi le risque de contamination des parcs conchylicoles.

Les conditions nutritives du milieu et les stratégies de croissance associées à l'assimilation des éléments nutritifs semblent donc avoir un rôle clé dans le déclenchement et l'amplification des efflorescences d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau. Afin d'approfondir la compréhension des processus associés à ce facteur de contrôle, ce travail de thèse a été mené avec, comme objectif global, la caractérisation des processus de nutrition d'*A. catenella* et leur rôle dans le développement des efflorescences. Il vise à répondre aux deux questions majeures suivantes :

**⇒ Quelles caractéristiques originales de nutrition apportent à *A. catenella* des avantages compétitifs permettant à cette espèce de réaliser des blooms de grande ampleur dans l'Etang de Thau ?**

**⇒ Comment paramétrer les processus de nutrition des cellules d'*A. catenella* afin de pouvoir comparer l'influence du contrôle des éléments nutritifs sur la croissance par rapport à celle d'autres facteurs environnementaux ?**

***Pour répondre à ces questions...***

***α- Trois approches complémentaires d'analyse***

Trois approches complémentaires d'analyse ont été suivies afin de pouvoir répondre à ces interrogations : la mise en place d'expérimentations en milieu contrôlé en cultures, la réalisation de mesures *in situ* et une approche par modélisation des processus.

L'approche en milieu contrôlé permettra de mettre en évidence l'influence spécifique des conditions nutritives sur la croissance algale en rendant négligeable la limitation des autres facteurs environnementaux sur la croissance. Elle sera centrée sur l'étude des sources majeures d'azote et de phosphore des cellules d'*A. catenella*. Afin de vérifier que certains des processus mis en évidence en conditions de laboratoire ont une réalité environnementale, des observations ont été réalisées à partir d'échantillons *in situ* prélevés au cours des

développements d'*A. catenella*. Cependant, l'approche de terrain réalisée a été fortement limitée par la faible ampleur des blooms qui ont eu lieu pendant le déroulement de cette thèse, empêchant d'effectuer la majeure partie des mesures initialement prévues *in situ*. Une globalisation de ces résultats sera mise en place grâce à une approche par modélisation des processus de nutrition observés. Elle consistera à formaliser sous forme mathématique l'influence des éléments nutritifs sur la croissance à partir des résultats obtenus, mais également celle de la température, de la salinité et de l'intensité lumineuse grâce à un jeu de données mis à disposition par Mohamed Laabir. Cette caractérisation du contrôle de la croissance d'*A. catenella* par différents facteurs environnementaux pourra servir de base à la mise en place d'un futur modèle de croissance qui permettra de hiérarchiser l'influence de ces facteurs au cours du développement des blooms.

### ***β- Différents types de stratégies nutritives testées***

Pour mettre en évidence des caractéristiques dans la nutrition d'*A. catenella* qui lui apporteraient des avantages compétitifs majeurs, différentes stratégies nutritives ont été envisagées concernant la nutrition azotée et phosphorée. Les stratégies originales qui seront abordées concernent principalement l'assimilation potentielle de matière organique (dissoute et particulaire) et l'absorption potentielle d'éléments nutritifs la nuit.

## ***A savoir...***

### ***Expérimentations et modélisation, deux approches interconnectées***

Les protocoles suivis en culture ont été en partie choisis afin de pouvoir faciliter la formalisation mathématique des processus de nutrition des cellules d'*A. catenella*. Une présentation préalable des modèles testés pour simuler ces processus est donc nécessaire afin d'explicitier les paramètres que l'on a cherché à estimer à travers les expérimentations en milieu contrôlé.

Pour les organismes unicellulaires, l'utilisation des éléments nutritifs pour la croissance s'effectue globalement au cours de deux processus : l'*absorption* des éléments, qui correspond au passage physique de la membrane plasmique du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, et l'*assimilation* réelle de cet élément pour la croissance par son

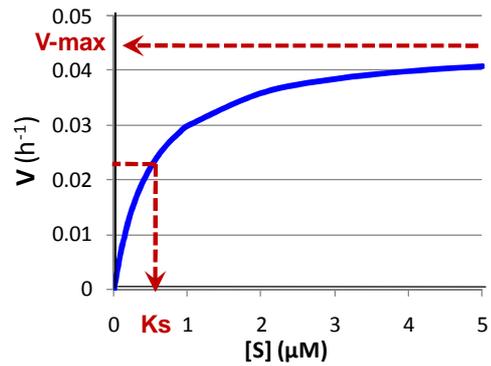
intégration dans les composés organiques vitaux. Certains éléments nutritifs peuvent être accumulés en excès par les cellules ; il existe alors un *découplage* entre le processus d'absorption et de croissance. Une manière de formaliser ce découplage fait appel à une variable que l'on nomme *quota*, représentant la quantité d'élément présent dans la cellule sous forme à la fois organique et inorganique. La valeur du quota intègre donc une valeur de subsistance (le quota minimum,  $Q_0$ ), associée au matériel cellulaire vital, à laquelle s'ajoute la quantité d'élément disponible en surplus pour la croissance, soit sous forme de matériel non-assimilé (inorganique) stocké dans des vacuoles, soit sous forme de molécules organiques pouvant être facilement recyclées (Flynn 2008).

Les capacités de stockage d'éléments nutritifs peuvent correspondre à un avantage compétitif dans un environnement où les apports en nutriments sont irréguliers. En cas de possibilité de découplage important entre absorption et assimilation, il apparaît donc nécessaire de caractériser spécifiquement les capacités de prélèvement de la ressource (absorption), mais aussi d'accumulation (augmentation du quota) et d'utilisation réelle de l'élément pour la croissance (assimilation) afin d'estimer le contrôle potentiel des conditions nutritives sur la croissance. L'acquisition de la ressource reste cependant le processus majeur dans la définition des capacités de compétition interspécifique (Flynn 2002) ; l'estimation des paramètres caractérisant l'absorption est donc la plus cruciale.

L'azote est un élément ne pouvant être stocké sous forme inorganique que dans de faibles quantités. Or, l'utilisation de stocks intracellulaires sous forme organique nécessite plus de dépenses énergétiques que l'utilisation de molécules inorganiques. La prise en compte d'une variable représentant le quota intracellulaire est donc moins essentielle pour l'azote, pour lequel le lien entre concentration extracellulaire et croissance est relativement direct, qu'elle ne l'est pour le phosphore (Flynn 2008) qui peut être stocké en excès, en forte quantité, sous forme inorganique (Watanabe et al., 1987). L'effort de caractérisation des flux d'azote chez *A. catenella* a donc été centré sur le processus d'absorption. Pour le phosphore, une analyse des variations de quota intracellulaire en fonction des conditions nutritives a été effectuée en parallèle à l'étude des flux d'absorption.

L'utilisation de modèles mathématiques permet alors une caractérisation de manière quantifiable des différents processus de nutrition. Le processus d'absorption est généralement modélisé en utilisant une équation inspirée du modèle de Michaelis-Menten (Figure 8), définie par :

$$V = V_{\max} \times [S] / (K_S + [S])$$

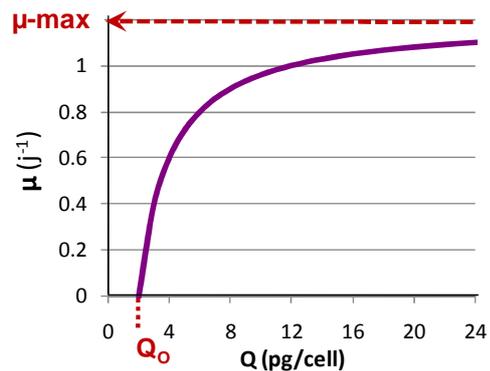


**Figure 8 :** Représentation du modèle de Michaelis-Menten

où  $V$  est la vitesse d'absorption du substrat  $S$  (en  $h^{-1}$ ),  $V_{\max}$  est la vitesse maximale d'absorption (en  $h^{-1}$ ),  $[S]$  est la concentration en substrat (en  $\mu M$ ) et  $K_S$  est la constante de demi-saturation (concentration à laquelle  $V = V_{\max} / 2$ , en  $\mu M$ ).

Le modèle le plus simple permettant de simuler le flux d'assimilation est celui décrit par Droop (1968) (Figure 9) et défini par la relation :

$$\mu = \mu_{\max} \times (1 - Q_0 / Q)$$



**Figure 9 :** Représentation du modèle de Droop

où  $\mu$  est le taux de croissance (en  $j^{-1}$  ou  $div/j$ ),  $Q$  est le quota (exprimé par cellule en  $pg/cell$  ou par unité de  $C$  en  $pg/pgC$ ),  $Q_0$  est le quota minimal (en  $pg/cell$  ou  $pg/pgC$ ) et  $\mu_{\max}$  est le taux maximal de croissance théorique atteint pour une valeur de quota infinie.

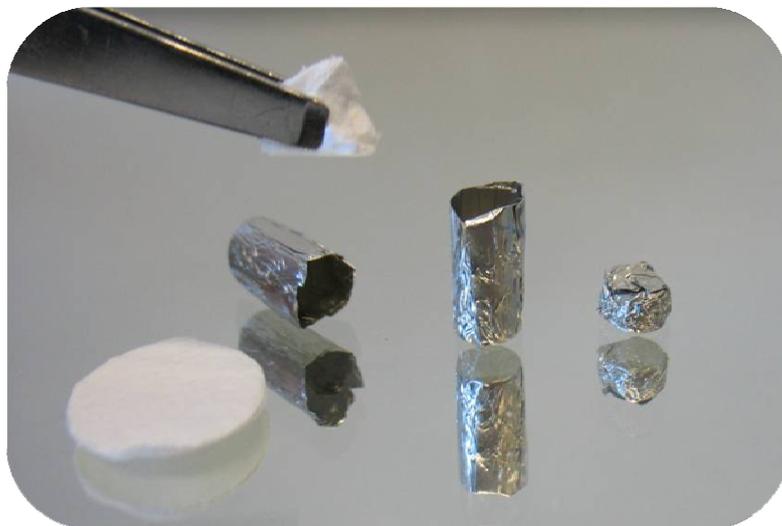
En vue de formaliser les flux de nutrition azotée et phosphorée chez *A. catenella*, des expérimentations ont donc été menées afin d'estimer la variabilité des différents paramètres d'entrée utilisés dans ces modèles,  $V_{\max}$  et  $K_S$  pour caractériser la nutrition azotée et  $V_{\max}$ ,  $K_S$  et  $Q_0$  pour caractériser la nutrition phosphorée.



# Partie 1

---

## PARAMETRISATION DE LA NUTRITION AZOTEE



*Préparation d'échantillons pour passage au spectromètre de masse.*



## Contexte, résumé et perspectives

---

*Alexandrium catenella* est une espèce phytoplanctonique capable d'utiliser divers éléments nutritifs comme source d'azote, dont des sources dissoutes d'azote minéral (telles que l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )) et organique (urée) (Matsuda et al. 1999, Dyhrman & Anderson 2003, Collos et al. 2004). Lors des efflorescences d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau,  $\text{NH}_4^+$  et urée correspondraient aux deux sources majeures d'azote pour ces cellules :  $\text{NH}_4^+$  et urée permettraient de combler respectivement entre 30 % et 100 % et entre 2 % et 59 % des besoins cellulaires pour la croissance *in situ* (Collos et al. 2007). Cependant, Collos et al. (2007) ont rapporté une forte variabilité temporelle dans les capacités d'absorption de ces deux éléments nutritifs par une population naturelle d'*A. catenella*. Une caractérisation détaillée des capacités d'absorption de  $\text{NH}_4^+$  et d'urée par cette espèce et de leur contrôle apparaît donc importante à réaliser afin d'améliorer la compréhension du rôle des éléments nutritifs comme facteur de contrôle des efflorescences toxiques dans l'Etang de Thau.

Des variations de la valeur des paramètres cinétiques  $V_{\max}$  et  $K_s$ , caractérisant les capacités d'absorption d'un nutriment spécifique, ont déjà été observées en fonction du taux de croissance et de la limitation en nutriments des cellules phytoplanctoniques. L'étude de Maguer et al. (2007) montre ainsi l'exemple de variations du  $V_{\max}\text{-NH}_4^+$  en fonction du taux de croissance et de l'état de carence en N des cellules d'*Alexandrium minutum*. La valeur des paramètres cinétiques pourrait également varier au cours de la période de lumière (Eppley et al. 1971 ; Tamminen & Irmisch 1996). Une première série d'expérimentations (décrites dans le **Chapitre 1**) a donc été menée en vue d'analyser les variations des cinétiques d'absorption de  $\text{NH}_4^+$  et de l'urée par *A. catenella* au cours d'un cycle diurne ; les résultats y ont été discutés par rapport au contrôle potentiel de la limitation en azote et/ou d'une périodicité journalière.

## RESUME DU CHAPITRE 1 - Variabilité court-terme des vitesses d'absorption de $\text{NH}_4^+$ et d'urée par *Alexandrium catenella* en cultures

Les capacités d'absorption d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et d'urée de quatre souches méditerranéennes d'*A. catenella* (de France, d'Italie et d'Espagne) ont été estimées par marquage au  $^{15}\text{N}$  et comparées à l'échelle d'un cycle diurne. La réalisation de cinétiques d'absorption sur un gradient de concentration en substrat de 1-10  $\mu\text{atgN/L}$  a permis de caractériser les capacités de prise de  $\text{NH}_4^+$  des quatre souches d'*A. catenella* par des cinétiques de type Michaelis-Menten. Pour l'urée, trois des souches ont présenté des cinétiques linéaires le long du gradient de substrat testé. Dans tous les cas, une augmentation des vitesses d'absorption a été observée au cours de la période diurne. Cette tendance a mené à une augmentation nette des vitesses maximales d'absorption et des pentes initiales  $\alpha$ . Les vitesses maximales d'absorption sont apparues varier d'un facteur 2-10 pour  $\text{NH}_4^+$  (vitesses théoriques,  $V_{\text{max}}$ , pour les cinétiques saturantes) et d'un facteur 2-18 pour l'urée (vitesses mesurées) en fonction des souches testées. Les variations temporelles des constantes de demi-saturation ( $K_s$ ) n'ont pas montré de tendance claire. Les augmentations des vitesses maximales et des pentes initiales ont révélé une optimisation, au cours du temps, des systèmes de prélèvement d'azote en réponse à un apport pulsé, probablement associée à une périodicité journalière. D'autre part, une excrétion intensive de  $\text{NH}_4^+$  a été mise en évidence au cours de l'assimilation de l'urée pour deux souches d'*A. catenella*. Un tel processus d'excrétion d'azote pourrait mener à des surestimations considérables de la contribution de l'urée à la croissance phytoplanctonique lorsque seule la diminution des concentrations dans le milieu est estimée.

Les résultats obtenus dans ce premier chapitre ont mis en exergue deux points importants qui seront étudiés dans les chapitres suivants : (i) l'excrétion de  $\text{NH}_4^+$  pendant le processus d'assimilation de l'urée peut donner cours à des interactions potentielles entre prélèvements de  $\text{NH}_4^+$  et d'urée ; le rôle possible de ces interactions dans le système de régulation du flux d'absorption de N-urée par les cellules d'*A. catenella* a été envisagé dans le **Chapitre 2** ; (ii) L'augmentation, au cours du temps, des capacités d'absorption de  $\text{NH}_4^+$  et urée a été interprétée comme une variation associée au cycle diurne, malgré l'observation conjointe d'une augmentation du rapport C/N ; des expérimentations décrivant la variation des capacités d'absorption de l'azote et du rapport C/N sur un cycle jour/nuit complet, présentées dans le **Chapitre 3**, ont permis de vérifier cette hypothèse.

## RESUME DU CHAPITRE 2 – Interactions entre prélèvements de $\text{NH}_4^+$ et d'urée par cinq souches d'*Alexandrium catenella* en cultures

Des expérimentations à court-terme ont été menées pour étudier si des interactions entre prises d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et d'urée participeraient à la régulation du flux d'assimilation de l'azote chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella*. Afin de prendre en compte la variabilité génétique, cinq souches d'*A. catenella* ont été utilisées : trois souches isolées dans l'Étang de Thau (sud de la France) et deux souches provenant du bassin catalan (en Espagne). Pour chaque souche, les variations du taux d'absorption d'un nutriment ( $\text{NH}_4^+$  ou urée), apporté à une concentration référence de  $10 \mu\text{atgN/L}$ , ont été analysées le long d'un gradient croissant de concentration ( $0\text{-}10 \mu\text{atgN/L}$ ) pour l'autre nutriment. Les taux d'absorption simultanés des deux sources azotées ont été obtenus par mesures de l'incorporation de  $^{15}\text{NH}_4^+$  et de  $^{15}\text{N}$ -urée. Une forte inhibition du taux d'absorption du N-urée par  $\text{NH}_4^+$  (inhibition maximale,  $I_{\text{max}} > 55 \%$ ) a été mise en évidence pour les souches françaises. Aucune influence de l'urée sur le taux d'absorption de  $\text{NH}_4^+$  n'a été observée. L'estimation des taux d'absorption totaux d'azote a révélé que l'inhibition du prélèvement de l'urée ne représenterait pas un inconvénient compétitif pour les cellules d'*A. catenella* : la réduction du taux de prélèvement de N-urée s'est avérée être plus que compensée par le prélèvement de  $\text{NH}_4^+$ . De plus, l'estimation de paramètres cinétiques caractérisant les flux totaux d'azote a suggéré que les souches françaises seraient plus compétitives que les souches espagnoles dans un environnement caractérisé par de faibles concentrations en  $\text{NH}_4^+$  ( $\leq 5 \mu\text{atgN/L}$ ) et de fortes concentrations en N-urée (telles que  $10 \mu\text{atgN/L}$ ). Ces caractéristiques de prélèvements reflèteraient des adaptations métaboliques des différentes souches à leur environnement respectif.

## RESUME DU CHAPITRE 3 – Couplage entre métabolismes de l'azote et du carbone chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella*

Chez les cellules phytoplanctoniques, la dépendance directe de certains processus biologiques envers des produits de la photosynthèse peut induire l'existence d'une périodicité journalière dans l'intensité de ces processus. Le couplage entre métabolismes de l'azote (N) et du carbone (C) chez *Alexandrium catenella* a été étudié lors d'expérimentations en culture, au cours d'un cycle Jour/Nuit. Les taux d'absorption de trois sources potentielles de N (ammonium, nitrate et N-urée) et de deux de C ( $\text{HCO}_3^-$  et C-urée) ont été estimés par ajout de composés marqués au  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ . D'après les variations observées du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  d'*A. catenella*, ces cellules ne seraient pas capable d'utiliser l'urée comme source de C. Des baisses observées du contenu cellulaire en  $^{13}\text{C}$  au cours de la phase sombre ont, de plus, révélé une probable forte contribution du C récemment fixé dans le processus de respiration au noir. L'analyse des taux d'incorporation de  $^{15}\text{N}$  a permis de mettre en évidence de bonnes capacités de prises au noir des trois nutriments azotés testés par *A. catenella*, avec des taux d'absorption au noir représentant entre 27 % et 65 % du taux estimé en phase claire.

De fortes variations journalières du rapport C/N ont révélé une accumulation de composés riches en C le jour qui permettrait, entre autres, de combler les besoins en C et énergie des processus d'absorption au noir. De telles stratégies de prises au noir et de stockage de C représenteraient un intérêt écologique particulier pour les espèces capables de migrations verticales, comme *A. catenella*.

Les études présentées dans les chapitres 1 et 2 ont permis de mettre en évidence une forte variabilité des capacités d'absorption de  $\text{NH}_4^+$  et d'urée entre souches d'*A. catenella*, ainsi que des variations dans le contrôle de ces flux. Une part de cette variabilité a pu être associée à des adaptations environnementales envers différentes zones côtières méditerranéennes. Cependant, la variabilité observée entre souches isolées dans l'Etang de Thau pose la question de l'existence ou non d'une sélection des caractéristiques nutritionnelles au cours du développement des efflorescences dans cette lagune.

## Principes méthodologiques majeurs

---

### I- ESTIMATION DES VITESSES D'ABSORPTION PAR MARQUAGE AU $^{15}\text{N}$ ET $^{13}\text{C}$

#### *1- Les isotopes stables de l'azote et du carbone*

Dans la nature, la plupart des éléments chimiques peuvent exister sous plusieurs formes dites *isotopiques* qui se différencient par les caractéristiques de leur noyau : des isotopes présentent le même nombre d'électrons mais un nombre de *nucléons* (particules constituant le noyau) différent qui caractérise chaque isotope par une masse atomique spécifique. Chaque atome possédant une charge électrique neutre, les différences de masse atomique entre isotopes proviennent de différences dans le nombre de *neutrons* (particules du noyau de charge électrique nulle) et non dans celui de *protons* (particules du noyau de charge électrique positive). Certains isotopes présentent une structure atomique *stable* qui ne se modifie au cours du temps qu'avec un apport d'énergie extérieure. Les autres isotopes sont *radioactifs* et caractérisés par un noyau instable qui évolue spontanément par émission de rayonnements ou de particules. L'écart de masse entre deux isotopes peut entraîner des différences en termes de propriétés physico-chimiques, telles que la température de fusion, la viscosité ou la vitesse de réaction. Ces différences peuvent jouer sur la répartition des isotopes au cours des réactions chimiques ; on parle alors de *fractionnement isotopique*.

Parmi les deux isotopes stables de l'azote et du carbone, l'isotope le plus lourd ( $^{15}\text{N}$  ou  $^{13}\text{C}$ ) est présent en quantité très faible dans la nature. Exprimées par rapport au nombre total d'atomes ( $^{15}\text{N}+^{14}\text{N}$  ou  $^{13}\text{C}+^{12}\text{C}$ ), les abondances naturelles des isotopes de l'azote et du carbone sont globalement de 0,37 % pour le  $^{15}\text{N}$  contre 99,63 % pour le  $^{14}\text{N}$  et de 1,11 % pour le  $^{13}\text{C}$  contre 98,99 % pour le  $^{12}\text{C}$ .

#### *2- Principe du marquage à l'isotope stable et estimation des vitesses d'absorption*

En expérimentation, l'utilisation d'isotopes stables plutôt que d'isotopes radioactifs présente deux avantages majeurs : contrairement aux éléments radioactifs, les isotopes stables

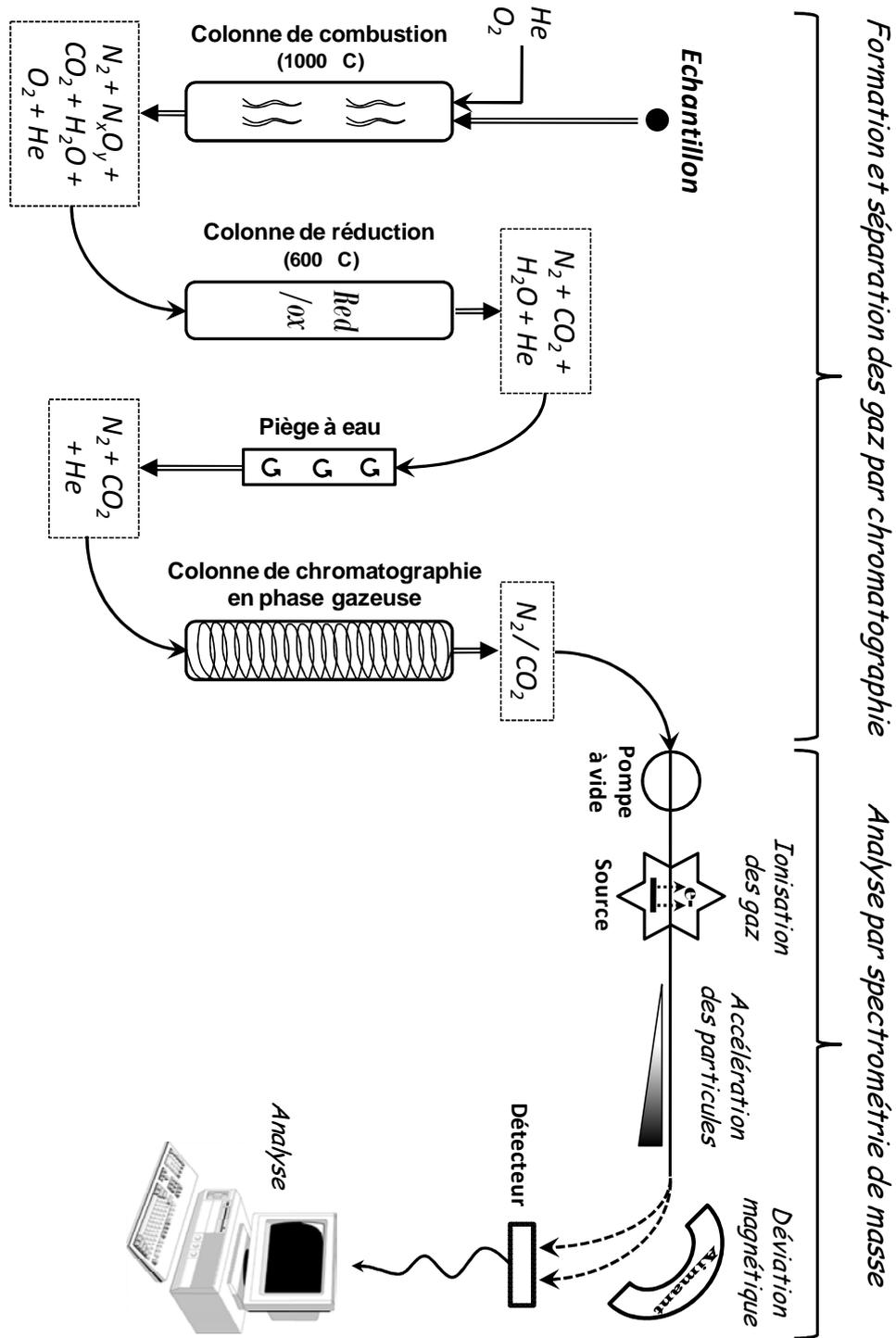
ne sont pas dangereux, et leur stabilité n'impose aucune contrainte quant aux temps d'incubation à réaliser. Par exemple, l'isotope radioactif de l'azote, le  $^{13}\text{N}$ , est hautement radioactif et possède une durée de demi-vie extrêmement brève de 10 minutes, ce qui rend son utilisation particulièrement contraignante. Afin de limiter ces contraintes méthodologiques, les vitesses d'absorption de l'azote et du carbone par les cellules d'*Alexandrium catenella* ont été estimées par marquage des cellules aux isotopes stables lourds,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ .

L'estimation de ces vitesses d'absorption a été effectuée au cours d'incubations débutant par l'ajout d'une quantité connue de  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ . Ces éléments étaient apportés sous forme de sources nutritives et de  $\text{HCO}_3^-$  constitués à 99% d'isotopes lourds. Au cours des incubations, les rapports isotopiques en azote ( $\delta^{15}\text{N} = ^{15}\text{N} / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})$ ) et carbone ( $\delta^{13}\text{C} = ^{13}\text{C} / (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C})$ ) des cellules d'*A. catenella* augmentaient par le biais de l'absorption progressive des éléments marqués. L'augmentation de ces rapports isotopiques relativisée par rapport au temps d'incubation donnait alors une estimation des vitesses d'absorption.

En fin d'incubation, chaque échantillon était filtré afin de concentrer les cellules d'*A. catenella* sur un filtre en accumulant une biomasse supérieure à 5.8  $\mu\text{g}$  d'azote et 35.3  $\mu\text{g}$  de carbone, valeurs nécessaires afin d'assurer des mesures isotopiques fiables sur les appareils utilisés. Les rapports isotopiques, ainsi que les masses azotée et carbonée associées, étaient mesurés pour chaque filtre (*i.e.* chaque échantillon) grâce à un système couplant une méthode séparative par chromatographie en phase gazeuse à une méthode d'identification par spectrométrie de masse.

### ***3- Mesures couplées des rapports isotopiques et des masses azotées et carbonées par spectrométrie de masse***

Le principe de l'appareil utilisé pour ces mesures, couplant un système de séparation des gaz par chromatographie à un spectromètre de masse, est décrit sur la Figure 1 répertoriant les principales étapes du processus d'analyse des échantillons. Au cours d'une première phase de formation et de séparation des gaz, l'échantillon subit tout d'abord une combustion en présence d'oxygène transformant la matière particulaire sous forme de gaz. Les passages successifs de ces gaz dans une colonne de réduction, un piège à eau et une colonne de chromatographie permettent d'obtenir, en sortie, l'azote et le carbone de l'échantillon sous forme de  $\text{N}_2$  et de  $\text{CO}_2$  arrivant séparément au niveau du spectromètre de masse. Le transport des gaz dans le système est ici assuré par un gaz vecteur inerte, l'hélium.



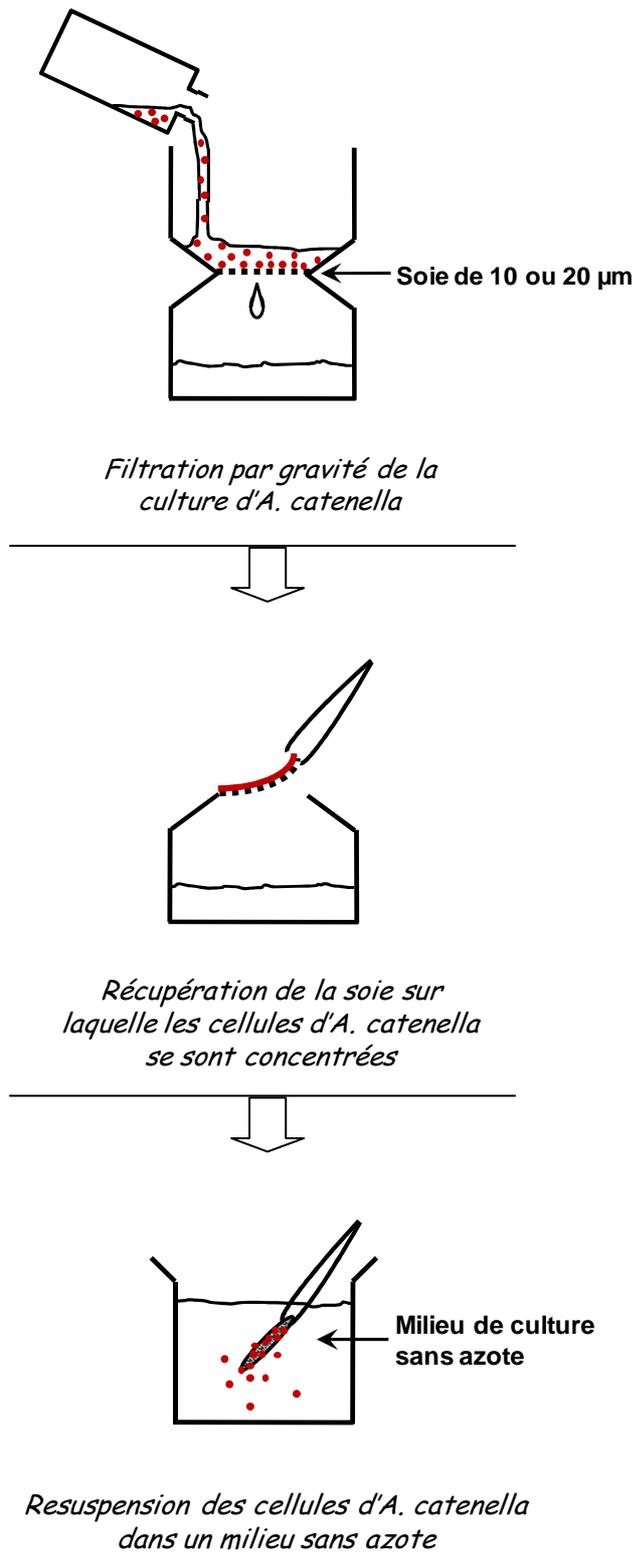
**Figure 1 :** Mesures des rapports isotopiques et des masses azotées et carbonées par utilisation d'un système couplant une phase de chromatographie en phase gazeuse à une analyse par spectrométrie de masse

Après séparation des gaz, les molécules de N<sub>2</sub> puis de CO<sub>2</sub> sont ionisées positivement et accélérées dans un champ électrique. Chaque particule est ensuite déviée par un aimant en fonction de sa masse et de sa charge. Un détecteur mesure alors l'intensité des signaux obtenus pour les différents types de déviation caractéristiques des molécules de N<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, correspondant respectivement aux molécules <sup>14</sup>N<sup>14</sup>N, <sup>14</sup>N<sup>15</sup>N, <sup>15</sup>N<sup>15</sup>N et <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>. En sortie d'analyse, chaque échantillon est caractérisé par sa masse totale d'azote (nommée NOP, azote organique particulaire), sa masse totale de carbone (nommée COP, carbone organique particulaire), et les rapports isotopiques δ<sup>15</sup>N et δ<sup>13</sup>C associés.

## II- ETAPE INITIALE DE RESUSPENSION DES CELLULES D'*ALEXANDRIUM* *CATENELLA*

Les travaux présentés dans cette partie visent principalement à caractériser les processus d'absorption de l'azote par les cellules d'*A. catenella*. Afin de contrôler les ressources en azote disponibles pour les cellules pendant les incubations, chaque expérimentation débutait par une première étape de resuspension des cellules dans un milieu sans azote, schématisée sur la Figure 2. Au cours de cette étape, les cellules sont récupérées sur une soie par *gravitation*, *i.e.* aucun système de pompage n'est utilisé afin d'accélérer le processus de filtration. Cette pratique, quoi que plus lente, permet de minimiser le stress des cellules afin de les garder viables et actives. Bien que les tailles cellulaires répertoriées pour *A. catenella* varient de 23 μm à 36 μm (Rapport Ifremer N° 05/5210506 référencé sous Collos 2006), l'utilisation d'une soie de 20 μm ne s'est pas toujours avérée suffisante pour récupérer la majorité des cellules de la culture : un stress trop intense, par agitation ou autre, peut pousser les cellules à se séparer de leur thèque les rendant déformables et donc aptes à traverser une maille de 20 μm. Afin d'assurer une biomasse suffisante dans les échantillons à incuber, une soie de 10 μm a donc été utilisée dans la suite des expérimentations.

Deux types de milieu de culture ont été utilisés pour la resuspension des cellules : de l'eau de mer vieillie, enrichie en éléments minéraux, vitamines et phosphates puis stérilisée par filtration sur 0.2 μm ou de l'eau de mer artificielle (Enriched Seawater Artificial Water without NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ESAW-N) enrichie suivant les mêmes dosages et filtrée sur 0.2μm. L'utilisation de l'eau de mer artificielle présente comme avantage de pouvoir contrôler au mieux la composition du milieu utilisé, et donc de minimiser la concentration en azote dissous lorsque l'on utilise de l'ESAW-N. Cependant, la composition chimique de l'ESAW reste



**Figure 2 :** Etapes de la resuspension d'une culture d'*A. catenella*

légèrement incomplète par rapport aux besoins des cellules d'*A. catenella* : on observe toujours une meilleure croissance des cellules en milieu d'eau de mer naturelle vieillie qu'en milieu artificiel.

En fonction des souches d'*A. catenella* testées, l'un ou l'autre des milieux de resuspension a été utilisé. Ceci correspond à un compromis entre maintien de conditions similaires d'expérimentation et facilité de mise en œuvre des expériences. En effet, la majorité des travaux présentés dans cette partie ont été réalisés en collaboration avec l'Institut de Ciències del Mar de Barcelone, où les expérimentations faisant intervenir les souches espagnoles (VGO 565, VGO 715), italienne (ACATA4) d'*A. catenella* et la souche française VGO 815 ont été menées. Au cours des expérimentations réalisées dans cet Institut, le milieu de resuspension utilisé correspondait à de l'eau de mer vieillie, alors plus aisément disponible ; les expérimentations réalisées à l'Université Montpellier II sur les souches TL01 et ACT03 ont été effectuées en utilisant de l'eau artificielle. Cette différence de composition de milieu a été considérée comme négligeable par rapport aux processus étudiés et est discutée dans les deux premiers articles présentés.

VARIABILITE A COURT-TERME DES VITESSES D'ABSORPTION D'AMMONIUM  
ET D'UREE PAR *ALEXANDRIUM CATENELLA* EN CULTURES

**SHORT-TERM TEMPORAL VARIABILITY OF AMMONIUM AND UREA UPTAKE  
BY *ALEXANDRIUM CATENELLA* (DYNOPHYTA) IN CULTURES**

Jauzein C.<sup>ab</sup>, Collos Y.<sup>b</sup>, Garcés E.<sup>c</sup>, Vila M.<sup>c</sup>, Maso M.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Laboratoire LER-LR, Sète, France

<sup>b</sup> Université Montpellier 2, UMR 5119 UM2-CNRS-IFREMER,  
Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, Montpellier, France

<sup>c</sup> Institut de Ciències del Mar, Barcelone, Espagne

Article publié dans *Journal of Phycology* (2008, Vol. 44, p. 1136-1145), accessible dans sa version définitive sur [www.blackwell-synergy.com](http://www.blackwell-synergy.com)

**ABSTRACT :**

In batch cultures of four Mediterranean strains (from France, Italy and Spain) of *A. catenella* (Whedon et Kofoid) Balech growing on a daily light cycle, ammonium and urea uptake were estimated by the <sup>15</sup>N tracer technique. Ammonium uptake could be described by Michaelis-Menten kinetics along a substrate gradient of 0.1-10 µgat N.L<sup>-1</sup> for the four strains, while two different patterns were observed for urea uptake with Michaelis-Menten kinetics for one strain and linear kinetics for the others. In all cases, an increase in uptake rates with time was noted over the daylight period. This trend led to a net increase in the maximum uptake rate ( $V_{max}$ ) (for saturable kinetics) and in the initial slope  $\alpha$ . For ammonium,  $V_{max}$  increased by a factor of 2-10 depending on the strain and, for urea, the maximal uptake rates measured increased by a factor of 2-18. Temporal variations of half-saturation constants ( $K_S$ ) for both nutrients did not show a clear trend. Increases in  $V_{max}$  and  $\alpha$  showed an acclimation of cells uptake system over time to a N pulse which may be explained by the light periodicity. For two strains, extensive ammonium release was observed during urea assimilation. This mechanism removes urea from the medium, so it is no longer available to other potential competitors, but supplies N back to the medium in the form of ammonium. From a methodological point of view, the phenomenon leads to considerable underestimates of the contribution of urea to phytoplankton growth.

## I- INTRODUCTION

In coastal areas of the Mediterranean Sea, blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* have been observed since the 1990s (Penna et al. 2005). *A. catenella* is able to use several nitrogen (N) sources for its vegetative growth in laboratory cultures (Matsuda et al. 1999; Dyhrman & Anderson 2003; Collos et al. 2004) or during bloom formation in the field (Collos et al. 2004; 2007). Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and urea appear to be the main N sources for growth during bloom periods, contributing from 30 to 100 % and from 2 to 59 % respectively to N requirements (Collos et al. 2007). However, Collos et al. (2007) reported a high temporal variability in  $\text{NH}_4^+$  and urea uptake kinetics for natural populations of *A. catenella* in Thau lagoon (France). For example, half-saturation constants varied between 0.2 and 20  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  for  $\text{NH}_4^+$  and between 0.1 and 44  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  for urea over four bloom episodes. Corresponding  $V_{\text{max}}$  values on a cell basis ranged ten fold for  $\text{NH}_4^+$  and eight fold for urea over the same period of four years. On a shorter time scale, the half-saturation constants for  $\text{NH}_4^+$  ( $K_S\text{-NH}_4^+$ ) increased from 0.5 to 6.2  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  over a period of three days during a bloom development. This variability in kinetics parameters precludes precise estimates of the  $\text{NH}_4^+$  and urea contributions to growth, and requires additional studies.

Over the same period of three days, the cell-based growth rate of *A. catenella* decreased by a factor of two while the  $K_S\text{-NH}_4^+$  increased. Previous studies have shown that the variability in kinetics parameters could be related to growth rate or N-limitation. For example, a direct relationship between  $V_{\text{max}}$  of  $\text{NH}_4^+$  and growth rate was observed for *Alexandrium minutum* by Maguer et al. (2007) and were related to N-limitation. However, for other phytoplankton species such as the diatom *Thalassiosira pseudonana*, conflicting trends have been reported for specific  $V_{\text{max}}$  for  $\text{NH}_4^+$  as a function of growth rate/N-limitation (Caperon & Meyer 1972; Eppley & Renger 1974; McCarthy & Goldman 1979).  $V_{\text{max}}$  for  $\text{NH}_4^+$  and urea is also known to vary during the light period (Eppley et al. 1971; Caperon & Ziemann 1976; MacIsaac 1978; Tamminen & Irmisch 1996).

Here we examine the short-term variability during the light period of  $\text{NH}_4^+$  and urea uptake kinetics of *A. catenella* in batch cultures growing on a light-dark cycle. Results are discussed with regards to N-limitation and daily periodicity.

## II- MATERIALS AND METHODS

### 1- Culture conditions and kinetics experiments

Four clonal strains of *Alexandrium catenella* originating from three different geographical areas were used: two strains from France (ACT03 and TL01 isolated from the Thau lagoon), one from Spain (VGO 565 from the Tarragona harbor) and one from Italy (ACATA4 from Olbia, Sardinia). Non axenic cultures of each strain were grown at 20°C on enriched seawater with nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) as N-source. The medium used for the maintenance of the cultures and during the experiments was f/2 medium (Guillard & Ryther 1962) prepared in 0.2  $\mu\text{m}$  filtered seawater for the Spanish and the Italian strains and ESAW artificial seawater medium (Andersen et al. 2005) with S = 38 for the French strains. Illumination was provided by fluorescence tubes (Grolux, Sylvania, Germany), providing an irradiance of 100  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  using a light:dark cycle of 12h:12 h.

At the beginning of each experiment (around 10:00), cells were collected on an 11 or 20  $\mu\text{m}$  mesh size net and resuspended in N-free culture medium in less than an hour. This step also allowed the removal of most of the bacteria and limited their contribution in the resuspended culture (Rausch de Traubenberg & Soyer-Gobillard 1990; Doucette & Powell 1998). Three 1 hour incubations were then performed during the light period, respectively just after resuspension and 3 h and 6 h later. Each incubation started with the addition of  $^{13}\text{C}$ -labeled bicarbonate at a constant concentration and of  $^{15}\text{NH}_4^+$  or  $^{15}\text{N}$ -urea at 8 concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5 and 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) in two different series of 50-mL samples. This range of substrate concentrations was chosen because it corresponds to the  $\text{NH}_4^+$  or urea concentrations measured in the field areas where *A. catenella* blooms occur (Garcés et al. 2005; Collos et al. 2007). For the ACATA4 strain, the third incubation was only done with the highest substrate concentration of 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ . For one strain (VGO 565), an additional incubation was also carried out 24 h after resuspension only at 10  $\mu\text{gat N.L}^{-1}$ . Incubations were ended after 1h with filtration through Gelman A/E (equivalent pore size of 1  $\mu\text{m}$ ) 13 mm pre-combusted glass fiber filters (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA). Filters were dried at 60°C for 24 h and then stored at room temperature until analysis. Measurements of particulate nitrogen (PN), particulate carbon (PC),  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotopic ratios were done on the filters with an Integra CN elemental analysis-mass spectrometry system (PDZ Europa, UK).

Separate 50-mL aliquots with 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  addition were filtered every 10-15 min to follow the short-term evolution of uptake over the 1-h incubation.

## **2- Cell counts and nutrient analysis**

To estimate growth rates at the beginning and during each experiment, cells of *A.catenella* were counted the day before, just after resuspension and 24 h later. Growth rates were calculated according to Guillard (1973).

For each experiment, concentrations of urea,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  were determined just after resuspension. Urea concentrations measurements were done using the method of Goeyens et al. (1998).  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations were measured with a continuous flow analyzer following Grasshoff et al. (1983) for the Spanish and the Italian strains and using respectively the method of Koroleff (1976) and Collos et al. (1999) for the French strains. For the Spanish strains, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) concentrations were also measured using the method of Bendschneider & Robinson (1952) and additional measurements of nutrients concentrations were done at the end of each incubation. For the French strains, only  $\text{NH}_4^+$  concentrations were measured at the end of the  $^{15}\text{N}$ -urea incubations to assess  $\text{NH}_4^+$  release during N-urea assimilation.

## **3- N uptake measurements and kinetic parameters**

Uptake is defined as the sum of processes resulting in  $^{15}\text{N}$  incorporation in cells. It includes adsorption and absorption. For urea, assimilation is defined as the transformation of intracellular urea to  $\text{NH}_4^+$  and its incorporation into carbon skeletons.

Net uptake rates of  $\text{NH}_4^+$  and urea ( $V$  in  $\text{h}^{-1}$ ) were calculated from the  $^{15}\text{N}$ -enrichment of the samples according to Collos (1987). If the relationship between net uptake rates and concentrations appeared to conform to saturable kinetics, a nonlinear regression was computed according to the Michaelis-Menten model and allowed to estimate the affinity constant ( $K_S$  in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ), the maximum uptake rate ( $V_{\text{max}}$  in  $\text{h}^{-1}$ ) and the initial slope ( $\alpha$  in  $\text{L.h}^{-1}.\mu\text{gatN}^{-1}$ ). The initial slope  $\alpha$  was calculated from the uptake rate at the concentration of  $0.5 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  estimated by the model equation as recommended by Hurd & Dring (1990) and was used as an indicator of the cells competitive ability at low substrate concentrations. The other data showing unsaturable uptake were fitted to linear regressions.

The estimation of net uptake rates neglects any loss of  $^{15}\text{N}$  during incubation. The losses under the form of  $\text{NH}_4^+$  may be estimated from  $\text{NH}_4^+$  concentrations and allowed to calculate gross uptake rates using the following equation:

$$\rho = V + \Delta [\text{NH}_4] / (\Delta t \cdot \text{PN})$$

Where  $\rho$  is the gross uptake rate (in  $\text{h}^{-1}$ ),  $V$  is the net uptake rate (in  $\text{h}^{-1}$ ),  $\Delta [\text{NH}_4]$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) is the difference in  $\text{NH}_4^+$  concentrations during the incubation time ( $\Delta t$ , in h) and PN is the particulate nitrogen (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ).

### III- RESULTS

#### *1- Cellular growth, C/N composition ratio and nutrient conditions*

At resuspension time, growth rates estimated from cell counts were respectively  $0.23 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.50 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.32 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.25 \text{ d}^{-1}$  for strains ACT03, TL01, VGO 565 and ACATA4. Additional measurements of  $\text{NH}_4^+$  uptake were done with an ACT03 culture growing at  $0.08 \text{ d}^{-1}$ . These complementary data are only discussed with regards to the variability due to growth rates.

Variations of C/N composition ratios are available only for two strains (ACT03 and TL01) due to problems with the C measurements for the other strains. These values show increases over the light period: from  $7.8 \pm 0.16$  (mean  $\pm$  SD) molC/molN immediately after resuspension to  $10.0 \pm 0.20$  three h later and to  $11.6 \pm 0.87$  six h later for ACT03 and from  $6.2 \pm 0.27$ , to  $7.0 \pm 1.33$  and to  $9.8 \pm 0.46$  molC/molN for TL01.

Nutrients conditions during each experiment in terms of N-sources are summarized in Table 1. They showed that cells were N sufficient due to significant  $\text{NO}_3^-$  concentrations. Initial  $\text{NO}_3^-$  concentrations ranged between 3.9 and  $18.5 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  in resuspended cultures and the monitoring of these values along the day of experiment for VGO 565 and ACATA4 indicated that only a low consumption of this N-source occurred, during the first hour after resuspension.

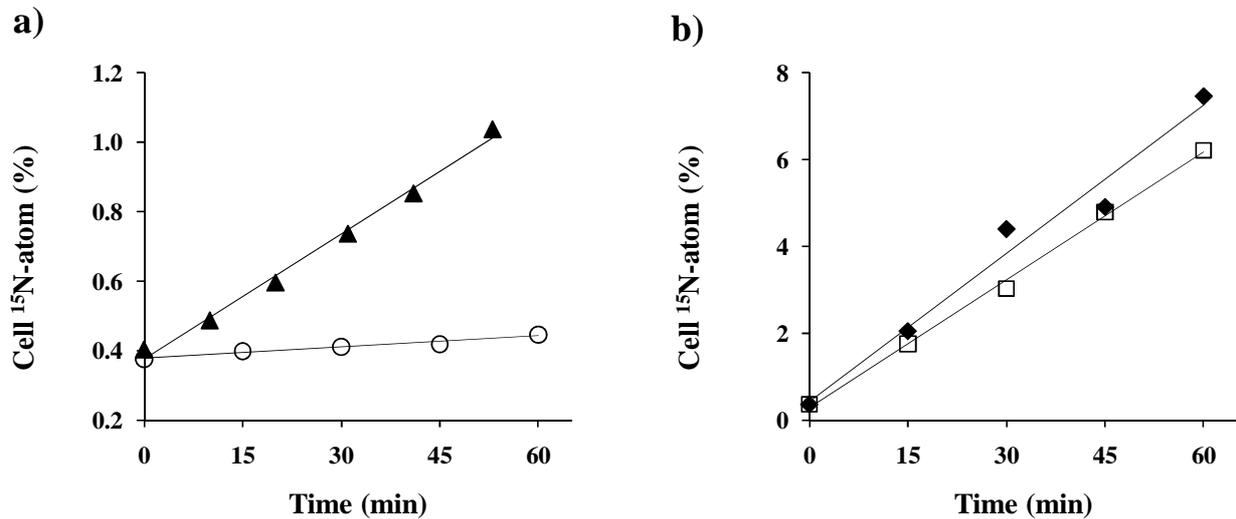
Strain	Medium	Nutrient	Initial concentration	Concentration at the end of incubation			
				To	To + 3h	To + 6h	To + 24h
VGO 565	Filtered seawater	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.6 ± 0.5	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.4 ± 1.1	4.6 ± 0.4
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.8 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.3	4.7 ± 0.0
		Urea	2.9				
ACATA4	Filtered seawater	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.9 ± 0.1	2.8 ± 0.2	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.2	
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.1	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.3	
		Urea	2.5				
ACT03	ESAW	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	17.7				
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.1	2.4 ± 0.3	1.2 - 13.5 *	
		Urea	0.9 ± 0.8				
TL01	ESAW	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	18.5				
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1.4 ± 0.0	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1	
		Urea	1.0 ± 0.9				

**Table 1:** Nutrients concentrations (in µgatN.L<sup>-1</sup>) measured in the culture medium during each experiment. The initial concentration corresponds to the nutrient concentration in the resuspended culture. Concentrations at the end of each incubation (starting just after (To), 3h after (To+3h), 6h after (To+6h) or 24h after (To+24h) the cells resuspension) correspond to the mean value of 16 samples of the two series (with addition of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or <sup>15</sup>N-urea) for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and to the mean value of 8 samples of the <sup>15</sup>N-urea incubations for NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Data presented for the To+6h and To+24h incubations with the VGO 565 strain correspond only to measurements after addition of 10 µgatN.L<sup>-1</sup> of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or urea. \* Range of values for 8 measurements reflecting increasing NH<sub>4</sub><sup>+</sup> release upon increasing urea concentration.

## 2- Short-term time series of uptake rates

The existence of a preconditioning effect due to growth on NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as described by Dortch et al. (1991), or a surge uptake just after substrate addition has been tested through high frequency measurements (Fig. 1). Ammonium and urea uptake rates appeared to be constant over one hour, even for cells maintained several hours in the resuspension culture medium. Results of urea uptake by *A. catenella* cells maintained six hours in the resuspension

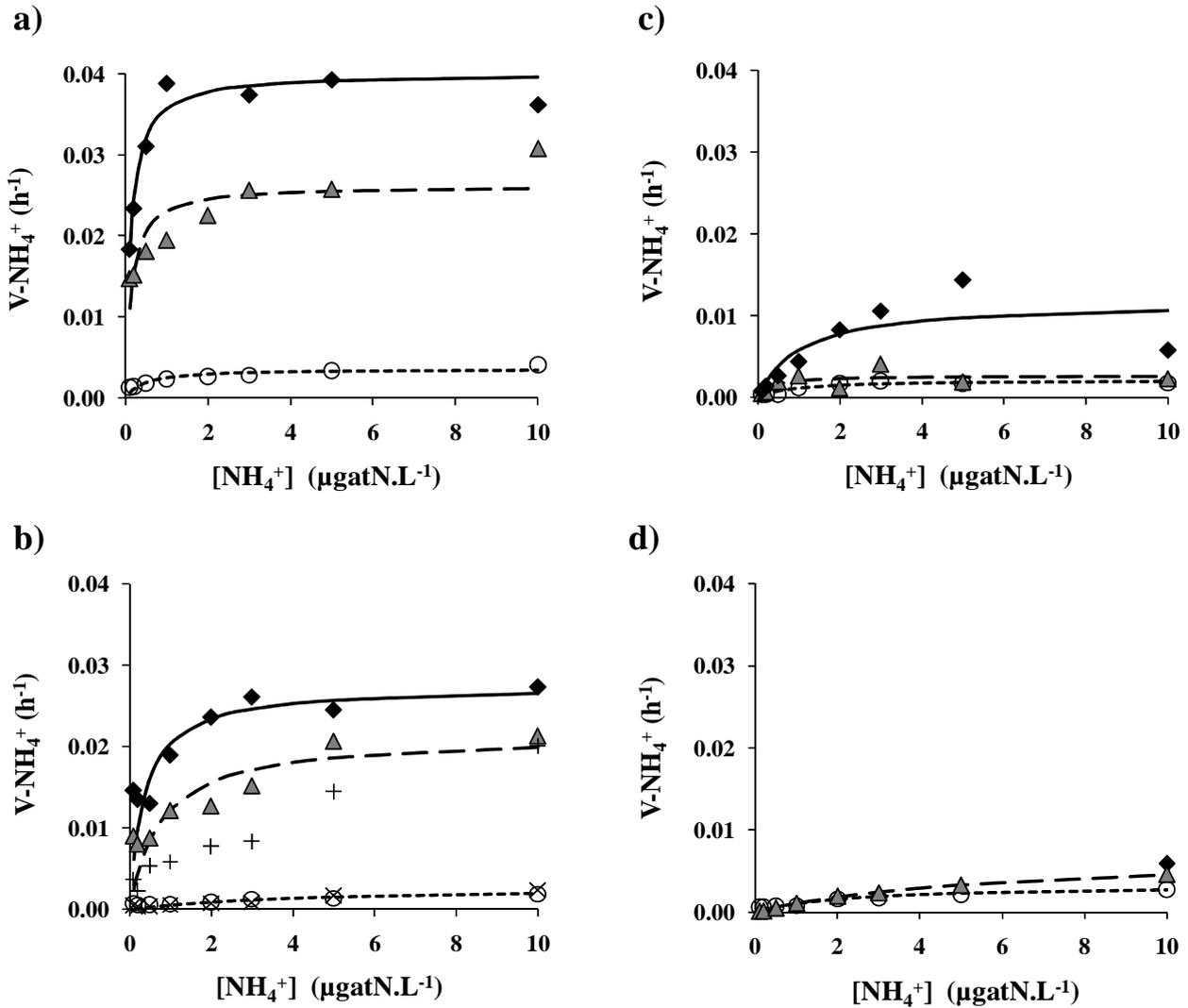
medium are shown in Fig. 1a for one Spanish strain (VGO 565) and one French strain (ACT03). The linearity of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake rates over time just after substrate addition was also verified in field conditions, during the *A. catenella* bloom episode of 2001 in Thau lagoon (Fig. 1b).



**Figure 1:**  $^{15}\text{N}$  incorporation (in % of  $^{15}\text{N}$ -atom in cells contents) over one hour just after substrate addition in cultures (a) and field conditions (*A. catenella* bloom of 2001 in Thau lagoon) (b). Measurements in cultures corresponded to  $^{15}\text{N}$ -urea uptake by cells maintained 6h in the resuspension medium for VGO 565 (○) and ACT03 (▲). Respective  $r^2$  values of linear regressions are 0.96 and 0.99. Linear regressions associated with field measurements of  $^{15}\text{NH}_4^+$  incorporation (◆) and  $^{15}\text{N}$ -urea incorporation (□) were characterized by respective  $r^2$  values of 0.97 and 1.00.

### 3- Ammonium uptake

For the four strains tested, relations between  $\text{NH}_4^+$  uptake rates and added  $\text{NH}_4^+$  concentrations followed Michaelis-Menten kinetics. Uptake data obtained are presented in Fig. 2 and values of kinetics parameters ( $V_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $\alpha$ ) generated by the model are summarized in Table 2. Repeat values obtained a year apart for ACT03 at two different growth rates ( $0.23 \text{ d}^{-1}$  and  $0.08 \text{ d}^{-1}$ ) were similar for the first incubation (at  $T_0$ ) (Fig. 2b). Three h after resuspension, results showed identical uptake rates at  $10 \mu\text{gat N.L}^{-1}$  but small differences at intermediate substrate concentrations.



**Figure 2 :** Kinetic curves of  $\text{NH}_4^+$  uptake for the TL01 strain from France (a), the ACATA4 strain from Italy (b) and the VGO 565 strain from Spain (c). Data from the three experiments, are represented by (○) for the incubation just after the resuspension ( $T_0$ ), (△) for the second incubation ( $T_0+3\text{h}$ ) and (◆) for the third incubation ( $T_0+6\text{h}$ ).

The respective modeled curves by the Michaelis-Menten model correspond to a dot line ( $T_0$ ), a dashed line ( $T_0+3\text{h}$ ) and a solid line ( $T_0+6\text{h}$ ).

The values of  $V_{\max}$  and  $\alpha$  showed an increase over the three successive incubations for the four strains of *A. catenella*. This trend was particularly strong for the ACT03 strain, the TL01 strain and the ACATA4 strain. For those strains,  $V_{\max}$  increased, respectively, by a factor of 9, 10 and 6 over the course of the experiment, and alpha by a factor of 47, 16 and 5 (Table 2). Thus, even if the values of  $V_{\max}$  and  $\alpha$  estimated just after resuspension were very similar, differences between strains for these parameters increased with time. The maximal value of  $V_{\max}$  obtained for each strain was  $0.040 \text{ h}^{-1}$  for TL01,  $0.029 \text{ h}^{-1}$  for ACT03,  $0.012 \text{ h}^{-1}$  for ACATA4 and  $0.007 \text{ h}^{-1}$  for VGO 565.

Incubation time	Linear regressions				Michaelis-Menten model					
	TL01 (France) $\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )	R <sup>2</sup>	ACATA4 (Italia) $\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )	R <sup>2</sup>	VGO 565 (Spain) $\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )	R <sup>2</sup>	V <sub>max</sub>	K <sub>S</sub>	R <sup>2</sup>	$\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )
To	0.1	0.96	0.3	0.99	3.0E-05	0.22	0.0004	2.3	0.90	0.1
To + 3h	0.8	0.98	0.7	0.97	2.0E-05	0.92	0.001	0.6	0.86	0.8
To + 6h	1.8	1.00	0.5	0.98	9.0E-05		0.023	2.2	0.96	0.9

**Table 3:** Parameters ( $V_{max}$  ( $h^{-1}$ ),  $K_S$  ( $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ),  $\alpha$  ( $L.h^{-1}.\mu\text{gatN}^{-1}$ )) obtained for <sup>15</sup>N-urea uptake rates of *A. catenella* cells, just after the cells resuspension (To), 3h after (To+3h) and 6h after (To+6h).

Incubation time	TL01 (France)				ACT03 (France)				ACATA4 (Olbia, Italia)			VGO 565 (Spain)				
	V <sub>max</sub>	K <sub>S</sub>	R <sup>2</sup>	$\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )	V <sub>max</sub>	K <sub>S</sub>	R <sup>2</sup>	$\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )	V <sub>max</sub>	K <sub>S</sub>	R <sup>2</sup>	$\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )	V <sub>max</sub>	K <sub>S</sub>	R <sup>2</sup>	$\alpha$ ( $\times 10^{-3}$ )
To	0.004	0.4	0.85	3.9	0.003	4.1	0.77	0.7	0.002	0.9	0.87	1.5	0.003	2.3	0.93	1.1
To + 3h	0.026	0.1	0.71	40.6	0.021	0.8	0.78	16.8	0.003	0.3	-	3.6	0.007	6.2	1.00	1.1
To + 6h	0.040	0.1	0.92	64.5	0.028	0.4	0.77	32.9	0.012	1.0	0.49	7.7	0.006			

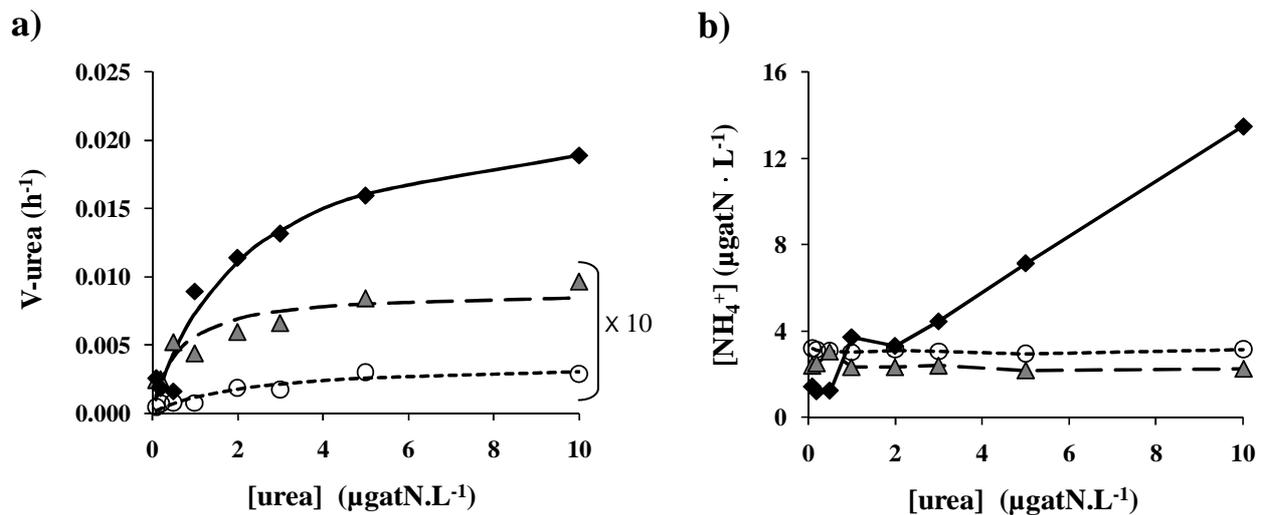
**Table 2:** Kinetics parameters ( $V_{max}$  ( $h^{-1}$ ),  $K_S$  ( $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ),  $\alpha$  ( $L.h^{-1}.\mu\text{gatN}^{-1}$ )) of  $NH_4^+$  uptake by the four strains of *A. catenella*, just after the cells resuspension (To), 3h after (To+3h) and 6h after (To+6h). For VGO 565,  $V_{max}$  at To+6h corresponds to the uptake rate measured after an addition of  $10 \mu\text{atgN.L}^{-1}$  of  $NH_4^+$ .

$K_S$  values decreased over time for TL01 and ACT03 (factor of 4 and 12 respectively) but did not show a clear trend for the other strains.

#### 4- Urea uptake – saturable kinetics for ACT03

Two different patterns were observed in the relation between  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates and added urea concentrations, depending on the strain tested.

For the ACT03 strain, variations of  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates along the urea gradient followed the Michaelis-Menten model (Fig. 3 a). As for  $\text{NH}_4^+$  uptake, an increase in  $V_{\max}$  and  $\alpha$  was measured over the course of the experiment (Table 3) leading to a maximal value of  $V_{\max}$  of  $0.023 \text{ h}^{-1}$ . No trend could be defined in the temporal variations of  $K_s$  which varied around a mean of  $1.7 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ .



**Figure 3:** Kinetic curves of N-urea uptake (a) and ammonium concentration in the medium culture (b) for the ACT03 strain from France. Data from the three experiments, are represented by (○) for the incubation just after the resuspension ( $T_0$ ), (△) for the second incubation ( $T_0+3\text{h}$ ) and (◆) for the third incubation ( $T_0+6\text{h}$ ). The respective modeled curves by the Michaelis-Menten model correspond to a dot line ( $T_0$ ), a dashed line ( $T_0+3\text{h}$ ) and a solid line ( $T_0+6\text{h}$ ).

Measurements of  $\text{NH}_4^+$  concentrations in the culture medium permitted the detection of a large  $\text{NH}_4^+$  release in cultures 6 h after resuspension (Fig. 3 b). This  $\text{NH}_4^+$  production during urea assimilation resulted in a significant discrepancy between net and gross  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates. For example, at the higher urea concentration ( $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ), a gross uptake rate of  $0.749 \text{ h}^{-1}$  was computed from a net uptake rate of  $0.019 \text{ h}^{-1}$ , a PN value of  $13.8 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ , a

difference in  $\text{NH}_4^+$  concentrations of  $12.3 \mu\text{gatN}\cdot\text{L}^{-1}$  and an incubation time of 1.22 h. When comparing the rate of  $\text{NH}_4^+$  release during this third incubation period with the product of gross uptake rate and PN ( $\rho\cdot\text{PN}$ , in  $\mu\text{gatN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ),  $^{15}\text{N}$  losses under the form of  $\text{NH}_4^+$  accounted for 91-97 % of gross  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rate of *A. catenella* cells. Thus, the pattern of gross uptake rate as a function of the urea concentration became similar to the one of  $\text{NH}_4^+$  release and may be modeled by a linear regression with a global slope of  $0.074 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{gatN}^{-1}$ .

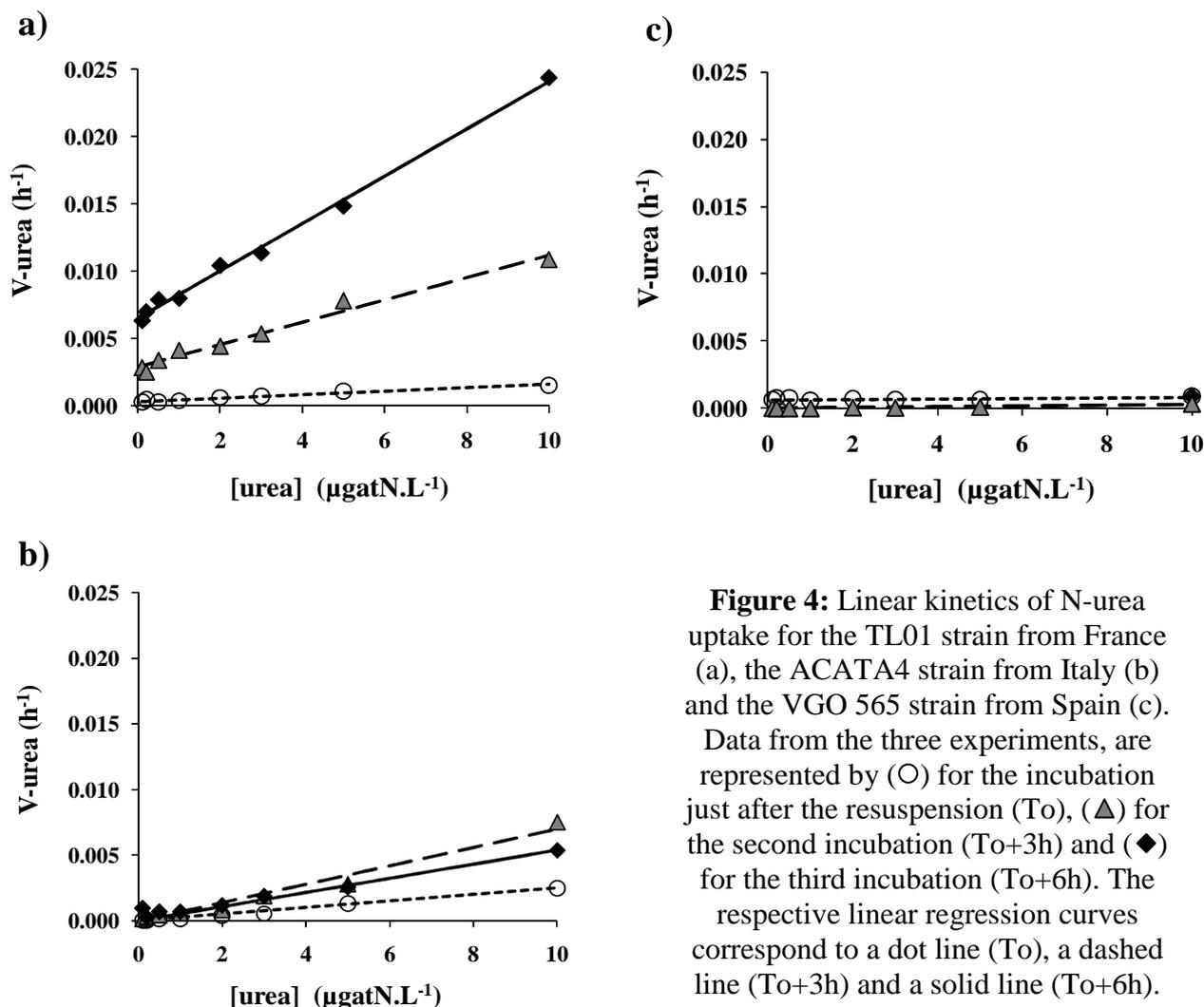
### **5- Urea uptake – unsaturated kinetics for TL01, ACATA4 and VGO 565**

For the three strains TL01, ACATA4 and VGO 565, linear relations were observed between  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates and added urea concentrations along the substrate gradient tested (Fig. 4). Estimations of the slope and  $r^2$  values for each linear regression are summarized in Table 3. For the three data series of the TL01 strain and the first incubation of the VGO 565 strain, parameters values were computed from linear regressions without zero Y intercept.

The range of temporal variations in  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates appeared to be very different between the three strains. A regular increase in  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates all along the urea gradient for the TL01 strain (Fig. 4 a) led to a net increase in the regression slope during the course of the day (Table 3) and to a maximal uptake rate of  $0.024 \text{ h}^{-1}$ . For the ACATA4 strain, this trend was not clear. Even if an increase in urea uptake rates was visible between the first and the second incubation, these rates were not all maintained 3 h after (Fig. 4 b), leading to a maximal urea uptake rate of  $0.008 \text{ h}^{-1}$ . No trend was visible for VGO 565 for which very low  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates (lower than  $0.001 \text{ h}^{-1}$ ) were measured during the three incubations (Fig. 4 c).

For the first incubation of VGO 565, a low  $r^2$  value was obtained ( $r^2 = 0.22$ ) even though the linear regression was not forced through the origin of axes. The Y intercept may only be representative of the standard error of measurements. For the TL01 strain (Fig. 4 a), significant Y intercepts were also necessary to yield high  $r^2$  values for the linear regressions. Considering the significant trends observed with  $r^2 > 0.96$ , these deviations may be representative of a physiological process. They suggest that a complete description of the relation between urea uptake and concentration may involve biphasic kinetics. These mixed kinetics could be described by a Michaelis-Menten relationship under very low urea

concentration (probably less than  $1 \mu\text{gatN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) and by a linear fit at higher concentrations ( $1\text{--}10 \mu\text{gatN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). However, more uptake rate data are required under  $1 \mu\text{gatN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  of urea to test and estimate parameters of these biphasic models.



**Figure 4:** Linear kinetics of N-urea uptake for the TL01 strain from France (a), the ACATA4 strain from Italy (b) and the VGO 565 strain from Spain (c). Data from the three experiments, are represented by (○) for the incubation just after the resuspension ( $T_0$ ), (△) for the second incubation ( $T_0+3\text{h}$ ) and (◆) for the third incubation ( $T_0+6\text{h}$ ). The respective linear regression curves correspond to a dot line ( $T_0$ ), a dashed line ( $T_0+3\text{h}$ ) and a solid line ( $T_0+6\text{h}$ ).

For those experiments, no change in  $\text{NH}_4^+$  concentrations in the medium could be noted for these three strains over the incubation period (Table 1). So, no N losses have to be taken into account during the incubations and the net and gross N-urea uptake rates could be considered as similar for the TL01, ACATA4 and VGO 565 strains. Twenty four hours after resuspension,  $\text{NH}_4^+$  excretion was observed for the Tarragona strain (VGO 565) (Table 1). At this point, about 45 % of the N taken up as urea ( $10 \mu\text{gat N.L}^{-1}$  addition) was recovered in the medium under the form of  $\text{NH}_4^+$ .

## IV- DISCUSSION

### 1- Temporal variations in nutrients kinetics

There is a strain-dependent acclimation over time of the cells uptake system to a N pulse (either  $\text{NH}_4^+$  or urea) along the concentration gradient. Except for N-urea uptake by VGO 565, this acclimation is expressed through an increase in  $V_{\max}$  and  $\alpha$  for saturated uptake kinetics and by an increase in the slope  $\alpha$  for linear kinetics (Fig. 2, 3 and 4, and Tables 2 and 3). According to the results of short time-series experiments (Fig. 1), constant uptake rates were observed over the incubation period. Although in contrast with previous studies showing preconditioning effect (Dortch et al. 1991) or surge uptake (Conway et al. 1976; Glibert & Goldman 1981; Goldman & Glibert 1982; Horrigan & McCarthy 1982), these trends are in accordance with the results of Cochlan & Harrison (1991a) in cultures of *Micromonas pusilla* for both  $\text{NH}_4^+$  and urea, Wheeler et al. (1982) for Chesapeake Bay phytoplankton at high nutrient stations and Tamminen & Irmisch (1996) in the Baltic Sea. Therefore, no such effect has interfered in the trends observed here, even for incubations six hours after resuspension. Stress due to resuspension does not seem to be involved here as inorganic carbon uptake did not differ with time at low N additions. For example, values of 0.030, 0.033 and 0.026  $\text{h}^{-1}$  were observed for inorganic C uptake by TL01 at  $T_0$ , three h and six h respectively following  $\text{NH}_4^+$  addition. For the series with urea additions, corresponding values were 0.036, 0.031 and 0.027  $\text{h}^{-1}$ . Therefore, those trends could be due to two major causes: daily periodicity in uptake due to the light/dark cycle or change in the cells nutrient state following resuspension in low nitrogen medium.

Concerning the first cause, very few studies exist on changes in kinetic parameters over the light-dark cycle. Eppley et al. (1971) noted a peak in  $\text{NH}_4^+$  uptake by *Skeletonema costatum* around noon in continuous cultures on a day-night cycle (factor of 3 increase over 6 h). Ammonium uptake by *Pavlova lutheri* increased by a factor of 4 over 6 hours in the light period (Caperon & Ziemann 1976). In natural populations of marine phytoplankton dominated by *Gonyaulax polyedra*,  $V_{\max}$  for  $\text{NH}_4^+$  increased two fold over 4 to 8 hours depending on stations (McIsaac 1978). For urea uptake, Tamminen & Irmisch (1996) reported a five fold increase in uptake rate over 12 h under natural irradiance, with the maximum uptake taking place in the late afternoon (around 18:00). The only study on changes in both  $K_S$  and  $V_{\max}$  for a major limiting nutrient over a day/night cycle that we are aware of is that of

Chisholm & Stross (1976 a,b) on phosphate uptake by *Euglena gracilis*. For P-sufficient cells, they observed an increase in  $V_{\max}$  (factor of 2.5 272 over 5 h) and an increase in  $K_S$  (2 fold over 5 h, 3.5 fold over 10 h) during the light phase (Chisholm & Stross 1976 a). They related those changes to the daily oscillation in energy source (L-D cycle) or to an endogenous rhythm.

The alternative explanation to temporal variations in  $V_{\max}$  and  $\alpha$  is a change in the nutrient status of cells (Caperon & Meyer 1972; Conway et al. 1976; Collos 1980). Thus, Harrison (1976) managed to separate effects of daily periodicity from those of N deficiency by comparing N sufficient and N starved (24 h without N) cells. Such coupled experiments have revealed that nutrient limitation may modify the daily rhythm of nutrient uptake. Chisholm and Stross (1976 b) have observed a temporal shift in the maximal P-uptake rate from noon for P-sufficient cells to the end of the light period for P-limited cells. A small increase in  $V_{\max}$  for P-limited cells (1.5 fold over 12 h) was also observed, as well as no variation in  $K_S$  which contrasts with the increase noted for P-sufficient cells (Chisholm & Stross 1976 a,b). In the present study, the presence of significant  $\text{NO}_3^-$  concentrations indicate that *A. catenella* cells were N-sufficient during experiments. Therefore, increases in C/N ratios measured for ACT03 and TL01 over 6 h must be due to the daily irradiance (uncoupling between carbon fixation and N assimilation) and not to N deficiency.

Thus, the changes in kinetic parameters with time as observed here are due to the daily irradiance cycle.

## **2- Variability among strains**

Large differences in uptake kinetics are seen between strains. The clearest one concerns urea uptake and contrasts ACT03 to the other strains. This strain is the only one for which a large  $\text{NH}_4^+$  release linked with urea assimilation has been observed during the incubations and for which net N-urea uptake rate can be modeled by Michaelis-Menten kinetics over the concentration range tested. The existence of a release process during urea assimilation may not be limited to this strain. A strong  $\text{NH}_4^+$  release was also noted for the Tarragona strain (VGO 565) but only 24 h after resuspension. This illustrates the need for a better knowledge of the time scale of this process. A number of unicellular algae have been reported to release  $\text{NH}_4^+$  during urea assimilation (Rees & Bekheet 1982; Price & Harrison 1988; Uchida 1976). In particular, *Prorocentrum micans* released large amounts of  $\text{NH}_4^+$

during urea assimilation, with a mean of 60 % of urea uptake, and individual values ranged between 23 and 81 % of urea taken up (Uchida 1976). For *A. catenella* cells, no  $\text{NH}_4^+$  release was observed in a previous work (Collos et al. 2004) using another strain (ACT 2000). The strong  $\text{NH}_4^+$  release measured for the ACT03 strain (more than 90 % of gross N-urea uptake) is accompanied by very high gross N-urea uptake rates, which are nevertheless within physiological bounds (McCarthy & Goldman 1979). Comparing these gross N-urea uptake rates with  $\text{NH}_4^+$  uptake rates, the preferred N source for ACT03 appears to be urea 6 h after resuspension, whereas  $\text{NH}_4^+$  clearly remains the preferred N source for the other strains. The  $\text{NH}_4^+$  release process by ACT03 is consistent with the observed lack of intracellular  $\text{NH}_4^+$  accumulation in that strain in contrast with TL01 (Collos et al. 2006). Such a mechanism removes urea from the medium, thereby making it unavailable to other potential competitors, but it supplies N back to the medium under the form of  $\text{NH}_4^+$ . The net result is a rather limited incorporation of N, so the ecological advantage of such a limiting nutrient acquisition strategy is not obvious. Ammonium release could also be a mechanism for reducing intracellular  $\text{NH}_4^+$  toxicity during uncoupling between urease activity and the maximum rate of  $\text{NH}_4^+$  assimilation following exposure to a urea pulse.

The second characteristic of the urea uptake system of ACT03 was represented by saturable kinetics. Values of  $K_S$  ranged from 0.6 to 2.3  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  (Table 3) in our study and agree with the range of 0.4-1.7  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  generally observed for urea uptake by marine phytoplankton in laboratory cultures (McCarthy 1972; Rees & Syrett 1979; Cochlan & Harrison 1991b). In particular for dinoflagellates, (Fan et al. 2003a) reported values of 0.9-1.8  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  for *Prorocentrum minutum*. No data exist in the literature for other *Alexandrium* species.

Considering gross N-urea uptake rates, kinetics of uptake for the ACT03 strain appeared to be linear, as for the three other strains of *A. catenella* (Fig. 4). Such linear kinetics are surprising because urea assimilation by *A. catenella* cells involves the enzyme urease (Dyhrman & Anderson 2003) whose activity has always been related to Michaelis-Menten kinetics (Mobley et al. 1995; Fan et al. 2003b). This discrepancy can be explained by the existence of separated regulation systems between urease activity and urea uptake or by a saturation kinetics model involving a very high  $K_S$ . Results obtained in previous works supported the second hypothesis. Collos et al. (2004) reported  $K_S$ -urea values of 28 and 44  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  respectively for cultures and natural populations of *A. catenella*. For the strain ACT 2000 (Collos et al. 2004), saturation of urea uptake occurred only above 20  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ . Linear

kinetics are usually interpreted as diffusion of substrate (Glibert et al. 2006) or non-saturable kinetics which maximize the uptake rates at high concentrations (Fan et al. 2003a). In the present study, the linearity between uptake rates and substrate concentration may reflect a different process: very low capacities of *A. catenella* cells to take up urea at low concentrations through saturable kinetics with very high  $K_S$ .

For  $\text{NH}_4^+$  kinetics,  $K_S\text{-NH}_4^+$  values obtained for *A. catenella* cells ranged from 0.1 to 6.2  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  in our study (from 0.1 to 0.4  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  for TL01 and from 2.3 to 6.2  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  for VGO 565). Concerning other *Alexandrium* species, values between 0.25 and 0.38  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  were observed in *A. minutum* by Maguer et al. (2007) and a value of 2  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  was reported by MacIsaac (1978) for *A. tamarense*. So the variability between strains of *A. catenella* observed here is as large as that between species of the same genus.

From a temporal point of view, marked differences between strains were also noted in acclimation capacities of uptake kinetics to N pulses. The range of acclimation potential observed widens the differences in N-uptake between strains with time. Thus, a large range of maximal values of uptake rates (close to the  $V_{\text{max}}$  value for saturable kinetics) were measured 6 h after resuspension: 0.007 to 0.040  $\text{h}^{-1}$  for  $\text{NH}_4^+$ , and 0.001 to 0.024  $\text{h}^{-1}$  for urea (or 0.001 to 0.749  $\text{h}^{-1}$  for gross uptake rates), depending on the strain. These differences in maximal uptake rates could not be explained by differences in growth rates. Additional measurements done with the ACT03 strain (Fig. 2b) showed that  $\text{NH}_4^+$  uptake rates measured at the higher concentration (10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) were similar for two different growth rates (0.08  $\text{d}^{-1}$  and 0.23  $\text{d}^{-1}$ ) just after and three h after resuspension. The small differences in uptake rates observed at lower concentrations suggest that the affinity to  $\text{NH}_4^+$  may be reduced when the growth rate decreased, as observed by Collos et al. (2007) during an *A. catenella* bloom in Thau lagoon. However, the uptake rates at 0.08  $\text{d}^{-1}$  (Fig. 2b) do not change intra- and inter strain trends and ranking of uptake capacities. Moreover, the Spanish strain VGO 565 presented a high growth rate but the lowest uptake rates of  $\text{NH}_4^+$  and urea 6 h after resuspension. Thus, the range of uptake rates achieved during each experiment represents differences in uptake capacities between strains. Values obtained for both French strains (TL01 and ACT03) are in accordance with  $V_{\text{max}}$  estimated in cultures by Collos et al. (2004) with the strain ACT 2000 and confirm previous results on such differences in  $V_{\text{max}}\text{-NH}_4^+$  between TL01 and ACT03 (Collos et al. 2006).

The comparison of kinetics parameters allows the ranking of those strains as a function of their acclimation potential and N acquisition capacities. For  $\text{NH}_4^+$ , the coupled

increases in  $V_{\max}$  and alpha (Table 2) allow to define the following ranking (from lowest to highest acquisition capacities): VGO 565 < ACATA4 < ACT03 < TL01. For urea (Table 3), net uptake capacities may only be compared with the maximal uptake rate measured (after addition of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) because of the difference in kinetics patterns between strains and lead to the same ranking between strains. The comparison of gross N-urea fluxes changes this ranking, giving ACT03 the best N-urea influx capacity 6 h after resuspension. So, for ACT03,  $\text{NH}_4^+$  losses by excretion clearly decrease the competitiveness of this strain when urea is the limiting resource. The fact that similar rankings were observed between strains from net uptake rates and that both French strains remain close in these rankings may indicate specific adaptations of *A. catenella* cells to environmental conditions characterizing the three originating areas, the Tarragona harbor in Spain (for VGO 565), the Olbia Bay in Italy (for ACATA4) and the Thau lagoon in France (for ACT03 and TL01).

## V- CONCLUSION

In conclusion, differences observed in N-uptake characteristics between strains of *A. catenella* point out difficulties to extrapolate results obtained in culture to the field. However, the analysis of several strains has shown a range of daily variations in N-uptake kinetics. This range encompasses the variations in  $V_{\max}$  observed in the field over a few days by Collos et al. (2007), but not those of  $K_s$ . The latter could be due to an interaction between light and N limitation. Studies of N limited *A. catenella* in cultures are presently seriously hampered by methodological problems (Collos et al. 2006). Nevertheless, the relationship between N-uptake kinetics and the daily light cycle highlights the importance of assessing daily uptake rates from successive short-term measurements rather than a sole one during the day. Two of the four strains tested, the ACT03 and the VGO 565 strain, seem to have complex regulation systems of N-urea fluxes, including extensive N losses during N-urea assimilation through  $\text{NH}_4^+$  excretion. Moreover, this excretion process points out potential interactions between  $\text{NH}_4^+$  and urea uptake. Such nutrient interactions may be part of the regulation system of N urea uptake and require further investigations. A wider implication of our results concerns the estimation of urea uptake by the  $^{15}\text{N}$  tracer technique. If N losses due to  $\text{NH}_4^+$  release during urea assimilation are not taken into account, it is likely that the importance of urea in the N nutrition of phytoplankton has been widely underestimated (up to 90 %).

## Acknowledgements

The authors wish to thank R. Ventosa for the nutrient analyses. We thank S. Fraga for the strain ACATA4. This study was financed by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer), as well as the EU funded Research Project SEED (Life cycle transformations among HAB species, and the environmental and physiological factors that regulate them, GOCE-CT-2005-003875). E. G. work was sustained by a Ramon y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Education. This work benefited from correspondence with Dr. T.A.V. Rees.

## References

- Andersen R.A.**, Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In Andersen, R. A. [Ed.] *Algal culturing techniques*. Elsevier, Amsterdam, pp. 429-538.
- Bendschneider K.**, Robinson R.J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *J. Mar. Res.* Vol. 11, p. 87-96.
- Caperon J.**, Meyer J. 1972. Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton. 2. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep-Sea Res.* Vol. 19, p. 619-632.
- Caperon J.**, Ziemann D.A. 1976. Synergistic effects of nitrate and ammonium ion on growth and uptake kinetics of *Monochrysis lutheri* in continuous culture. *Mar. Biol.* Vol. 36, p.73-84.
- Chisholm S.W.**, Stross R.G. 1976a. Phosphate uptake kinetics in *Euglena gracilis* (Z) (Euglenophyceae) grown on light-dark cycles .1. Synchronized batch cultures. *J. Phycol.* Vol. 12, p. 210-217.
- Chisholm S.W.**, Stross R.G. 1976b. Phosphate uptake kinetics in *Euglena 421 gracilis* (Z) (Euglenophyceae) grown in light-dark cycles .2. Phased  $PO_4^-$  limited cultures. *J. Phycol.* Vol. 12, p. 217-222.
- Cochlan W.P.**, Harrison P.J. 1991a. Inhibition of nitrate uptake by ammonium and urea in the eucaryotic picoflagellate *Micromonas pusilla* (Butcher) Manton et Parke. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 153, p. 143-152.
- Cochlan W.P.**, Harrison P.J. 1991b. Kinetics of nitrogen (nitrate, ammonium and urea) uptake by the picoflagellate *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 153, p. 129-141.
- Collos Y.** 1980. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms .1. Changes in uptake parameters during nitrogen starvation. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 25, p. 1075-1081.
- Collos Y.** 1987. Calculations of N-15 uptake rates by phytoplankton assimilating one or several nitrogen sources. *Appl. Radiat. Isot.* Vol. 38, p. 275-282.

- Collos Y.**, Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* Vol. 11, p. 179-184.
- Collos Y.**, Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *J. Phycol.* Vol. 40, p. 96-103.
- Collos Y.**, Lespilette M., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* Vol. 28, p. 313-318.
- Collos Y.**, Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A., Souchu P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae.* Vol. 6, p. 781-789.
- Conway H.L.**, Harrison P.J., Davis C.O. 1976. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation .2. Transient response of *Skeletonema costatum* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.* Vol. 35, p. 187-199.
- Dortch Q.**, Thompson P.A., Harrison P.J. 1991. Variability in nitrate uptake kinetics in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* Vol. 27, p. 35-39.
- Doucette G.J.**, Powell C.L. 1998. Algal-bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates? In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L. & Wyatt, T. [Eds.] *Harmful Algae.* Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, pp. 406-409.
- Dyhrman S.T.**, Anderson D.M. 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 48, p. 647-655.
- Eppley R.W.**, Rogers J.N., McCarthy J.J. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 14, p. 912-920.
- Eppley R.W.**, Rogers J.N., McCarthy J.J., Sournia A. 1971. Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemostat culture. *J. Phycol.* Vol. 7, p. 150-154.
- Eppley R.W.**, Renger E.H. 1974. Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen limited continuous culture. *J. Phycol.* Vol. 10, p. 15-23.
- Fan C.**, Glibert P.M., Burkholder J.M. 2003a. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. *Harmful Algae.* Vol. 2, p. 283-299.
- Fan C.**, Glibert P.M., Alexander J., Lomas M.W. 2003b. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum* and *Thalassiosira weissflogii*. *Mar. Biol.* Vol. 142, p. 949-958.
- Garcés E.**, Vila M., Masó M., Sampedro N., Giacobbe M.G., Penna A. 2005. Taxon specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 301, p. 67-79.
- Glibert P.M.**, Goldman J.C. 1981. Rapid ammonium uptake by marine-phytoplankton. *Mar. Biol. Letters.* Vol. 2 (1), p. 25-31.

- Glibert P.M.**, Burkholder J.M., Parrow M.W., Lewitus A.J., Gustafson D.E. 2006. Direct uptake of nitrogen by *Pfiesteria piscicida* and *Pfiesteria shumwayae*, and nitrogen nutritional preferences. *Harmful Algae*. Vol. 5(4), p. 380-394.
- Goeyens L.**, Kindermans N., Abu Yusuf M., Elskens M. 1998. A room temperature procedure for the manual determination of urea in seawater. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* Vol. 47, p. 415-418.
- Grasshoff K.**, Ehrardt M., Kremling K. 1983. *Methods of sea water analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Guillard R.R.L.** 1973. Division rates. In Stein, J. R. [Ed.] *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289-311.
- Guillard R.R.L.**, Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* Vol. 8, p. 229-239.
- Harrison W.G.** 1976. Nitrate metabolism of the red tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 21, p. 199-209.
- Hurd C.L.**, Dring M.J. 1990. Phosphate uptake by intertidal algae in relation to zonation and season. *Mar. Biol.* Vol. 107, p. 281-289.
- Koroleff F.** 1976. Determination of nutrients. In Grasshoff, K. [Ed.] *Methods of Seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp.117-182.
- Matsuda A.**, Nishijima T., Fukami K. 1999. Effects of nitrogenous and phosphorus nutrients on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* Vol. 65, p. 847-855.
- McCarthy J.J.** 1972. Uptake of urea by marine phytoplankton. *J. Phycol.* Vol. 8, p. 216-222.
- McCarthy J.J.**, Goldman J.C. 1979. Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient depleted waters. *Science*. Vol. 203, p. 670-672.
- McIsaac J.J.** 1978. Diel cycles of inorganic nitrogen uptake in a natural phytoplankton population dominated by *Gonyaulax polyedra*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 23, p. 1-9.
- Mobley H.L.T.**, Island M.D., Hausinger R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Reviews*. Vol. 59, p. 451-480.
- Penna A.**, Garcés E., Vila M., Giacobbe M.G., Fraga S., Lugliè A., Bravo I., Bertozzini E., Vernesi C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* Vol. 148, p. 13-23.
- Price N.M.**, Harrison P.J. 1988. Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 33, p. 528-537.
- Raush de Traubenberg C.**, Soyer-Gobillard M.O. 1990. Bacteria associated with a photosynthetic dinoflagellate in culture. *Symbiosis*. Vol. 8, p. 117-133.
- Rees T.A.V.**, Bekheet I.A. 1982. The role of nickel in urea assimilation by algae. *Planta* Vol. 156, p. 385-387.
- Rees T.A.V.**, Syrett P.J. 1979. Uptake of urea by the diatom, *Phaeodactylum*. *New Phytol.* Vol. 82, p. 169-178.

- Tamminen T.**, Irmisch A. 1996. Urea uptake kinetics of a midsummer planktonic community on the SW coast of Finland. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 130, p. 201-211.
- Uchida T.** 1976. Excretion of ammonia by *Prorocentrum micans* Ehrenberg in urea-grown culture. *Jap. J. Ecol.* Vol. 26, p. 43-44.
- Wheeler P.A.**, Glibert P.M., McCarthy J.J. 1982. Ammonium uptake and incorporation by Chesapeake Bay phytoplankton: Short term uptake kinetics. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 27(6), p. 1113-1128.



INTERACTIONS ENTRE PRISES D'AMMONIUM ET D'UREE  
PAR CINQ SOUCHES D'*ALEXANDRIUM CATENELLA* EN CULTURE

INTERACTIONS BETWEEN AMMONIUM AND UREA UPTAKE BY FIVE  
STRAINS OF *ALEXANDRIUM CATENELLA* (DYNOPHYCEAE) IN CULTURE

Jauzein C.<sup>ab</sup>, Loureiro S.<sup>c</sup>, Garcés E.<sup>c</sup>, Collos Y.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Laboratoire LER-LR, Sète, France

<sup>b</sup> Université Montpellier 2, UMR 5119 UM2-CNRS-IFREMER,  
Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, Montpellier, France

<sup>c</sup> Institut de Ciències del Mar, Barcelone, Espagne

Article publié dans *Aquatic Microbial Ecology* (2008, Vol.53, p. 271-280), accessible dans sa version définitive sur [www.int-res.com](http://www.int-res.com)

**ABSTRACT :**

Short-term experiments were carried out to investigate whether interactions between ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and urea uptake regulate the total nitrogen assimilation of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. To test for strain variability, five strains of *A. catenella* from the NW Mediterranean were used: three strains from the Thau lagoon (South of France) and two strains from the Catalonia basin (Spain). For each strain, the uptake rate of one nutrient (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or urea) at a reference concentration (10 µgatN.L<sup>-1</sup>) has been measured as a function of the increasing concentration of the other nutrient (0-10 µgatN.L<sup>-1</sup>). Simultaneous N-uptake rates of the distinct nitrogen sources were obtained from <sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and <sup>15</sup>N-urea incorporation measurements. A strong inhibition of urea uptake by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (maximum inhibition, I<sub>max</sub> > 55 %) was observed exclusively for the French strains. No influence of urea on the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-uptake rate was noted for any strain. Estimation of total N-uptake rates revealed that the N-urea uptake inhibition was not a competitive disadvantage for *A. catenella* cells considering that the reduced N-urea uptake was more than compensated by NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-uptake. Furthermore, the computation of composite kinetic parameters from total N-uptake data suggested the French strains to be more competitive than the Spanish ones in an environment characterized by low NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations (≤ 5 µgatN.L<sup>-1</sup>) and high urea concentrations (as 10 µgatN.L<sup>-1</sup>). These N-uptake characteristics may reflect particular metabolic adaptations by the strains to their respective environment.

## I- INTRODUCTION

During the last few years, recurrent toxic blooms of *Alexandrium catenella* have been observed in coastal waters of the NW Mediterranean Sea. In particular, this dinoflagellate species was detected for the first time in the Catalan coast of Spain in 1996 (Vila et al. 2001) and in the Thau lagoon, an intensive shellfish farming zone in France, in 1998 (Lilly et al. 2002). Physiological rate measurements on natural populations of *A. catenella* have shown that most of the dissolved nitrogen supply for growth comes from ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and urea (Collos et al. 2007). A large variability in uptake kinetic parameters was noted for both N sources, part of which could be attributed to differences in growth rate (Collos et al. 2007). Nevertheless, the interactions between  $\text{NH}_4^+$  and urea uptake were not taken into account in these investigations. Historically, urea has been relatively ignored as a N source compared to other compounds such as nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) or  $\text{NH}_4^+$ , but recently, urea is suggested as a major factor leading to harmful algal blooms (Glibert et al. 2006).

Studies on interactions between  $\text{NH}_4^+$  and urea uptake by microalgae have been relatively few. In marine phytoplankton, Waser et al. (1998) found a variety of interactions. For example, N sufficient cells of *Chaetoceros debilis* preferred  $\text{NH}_4^+$  to urea, while N starved cells took up urea first and only upon exhaustion of this compound was  $\text{NH}_4^+$  taken up. For *Emiliana huxleyi*, N sufficient cells preferred  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  to urea, while starved cells took up  $\text{NH}_4^+$  first until exhaustion, and then urea, in preference to  $\text{NO}_3^-$ . For *Thalassiosira weissflogii*,  $\text{NH}_4^+$  had no effect of N-urea uptake (Lomas 2004). In natural populations of phytoplankton in the Baltic Sea, Irmish (1991) found that  $\text{NH}_4^+$  additions reduced urea uptake in a significant way. Such studies are complicated by physiological processes such as  $\text{NH}_4^+$  excretion that occurs during urea assimilation (Uchida 1976; Rees & Bekheet 1982; Price & Harrison 1988), and could lead to feedback regulation.

Bioassays have indicated N to be the limiting nutrient in the Thau lagoon for phytoplankton in general (Bec et al. 2005) and for *Alexandrium catenella* in particular (Collos et al. 2007). Here we present results of experiments designed to characterize the interactions between  $\text{NH}_4^+$  and urea uptake as well as to assess whether or not inhibition of one N source by the other leads to an increase in the overall uptake of this limiting resource. As significant differences in the N uptake and assimilation of  $\text{NH}_4^+$  have been noted previously between strains of *A. catenella* (Collos et al. 2006), several strains were used in order to examine this variability regarding the  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction process.

## II- MATERIALS AND METHODS

### 1- Culture conditions

The five strains used in this study were isolated from different Mediterranean coastal areas: VGO 715 (Barcelona, Spain), VGO 565 (Tarragona, Spain), ACT03 (Thau lagoon, France), TL01 (Thau lagoon, France) and VGO 815 (Thau lagoon, France). Except TL01 isolated in 1998, other strains were acclimated in cultures more recently, between 2002 and 2004. Stock cultures were non axenic and maintained on enriched seawater with  $\text{NO}_3^-$  as N-source. Before and during the experiments, the cultures were grown at 20°C and exposed to  $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  with a 12:12h light:dark cycle using fluorescent tubes (Gyrolux, Sylvania, Germany). The culture medium used was ESAW artificial seawater medium (Andersen et al. 2005) for ACT03 and TL01 strains and f/2 medium (Guillard & Ryther 1962) prepared in 0.2  $\mu\text{m}$  filtered seawater for the other strains.

### 2- Interactions experiments

For each strain, the experiment started with the resuspension of *A. catenella* cells from the stock culture into 2.6 l of medium without N-source. This resuspension step was performed by collecting the cells on a 10  $\mu\text{m}$  mesh net by gravity filtration and allowed for the withdrawal of most of the bacteria from the culture medium (Rausch de Traubenberg & Soyer-Gobillard 1990). The cells were kept in these low N conditions during 6h to ensure undetectable  $\text{NH}_4^+$  concentration in the medium at the beginning of the incubations.

Then, two series of incubations were done successively, to test: (1) the influence of urea on the maximal uptake rate of  $\text{NH}_4^+$  ( $V_{\text{max-NH}_4^+}$ ) and (2) the reverse influence of  $\text{NH}_4^+$  on the maximal uptake rate of N-urea ( $V_{\text{max-urea}}$ ). During each part of the experiment, the uptake rate of one nutrient at a reference concentration of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  was measured as a function of the increasing concentration of the other nutrient (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5 and 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ). The reference concentration ( $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) corresponds to the upper range of  $\text{NH}_4^+$  or urea concentrations observed in the field during *A. catenella* blooms in Spain and France (Garcés et al. 2005; Collos et al. 2007). For each part of the experiment ((1) and (2)), two incubations of 1h were performed in parallel, based on the same nutrient regimes but one in which the constant nutrient was labeled with  $^{15}\text{N}$  and the second in which the varying

nutrient was labeled. The coupled incubations allowed measurements of simultaneous uptake of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea for all the nutritive conditions. Incubations started with the addition of  $^{15}\text{NH}_4^+$  or  $^{15}\text{N}$ -urea into 50-ml samples. At the end of the incubation period, all samples were filtered through precombusted (4h at  $450^\circ\text{C}$ ) A/E filters (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA). Filters were dried at  $60^\circ\text{C}$  overnight and analyzed on an Integra CN elemental analysis-mass spectrometry system (PDZ Europa, UK) to obtain measurements of particulate nitrogen (PN), particulate carbon (PC) and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotopic ratio.

### ***3- Nutrient analysis***

Concentrations of different N-sources ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and urea) were determined in the culture medium just after resuspension and at the beginning of each experiment part ((1) and (2)). Ammonium and  $\text{NO}_3^-$  concentrations were measured using a Technicon AutoAnalyzer® as described in Grasshoff et al. (1983) for VGO 715, VGO 565 and VGO 815 and using respectively the methods of Koroleff (1976) and Collos et al. (1999) for TL01 and ACT03. Urea measurements were performed according to Goeyens et al. (1998). For most of the strains, the whole of these measurements was not obtained.

Complementary measurements of  $\text{NH}_4^+$  concentration were done every 15 min during each incubation periods to check for a potential excretion of  $\text{NH}_4^+$  linked with urea assimilation.

### ***4- N-uptake measurements***

Measurements of  $^{15}\text{N}$ -enrichments were converted to net uptake rates of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea according to Collos (1987). For urea uptake, inclusion of an ambient urea concentration higher than  $0.5 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  in the calculation of  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates led to apparent reverse kinetics (decrease in uptake rate with increasing urea concentrations) despite the fact that  $^{15}\text{N}$  isotopic ratio increased along the urea gradient. Such patterns are thought to be due to overestimation of the ambient substrate concentration (Eppley et al. 1977; Kristiansen & Lund 1989; Sahlsten 1987). Therefore, we chose to not include ambient urea concentration in  $^{15}\text{N}$ -urea uptake calculations. Furthermore, a lack of change of  $\text{NH}_4^+$  concentration in the medium during each incubation allowed the consideration that no N excretion losses have to be taken

into account in N-urea uptake estimations. Thus, net  $^{15}\text{N}$ -urea uptake rates measured were equivalent to gross N-urea uptake rates.

From simultaneous incubations, total N uptake rates (from  $\text{NH}_4^+$  and urea fluxes) were computed for each nutrient condition and strain, using the following equation:

$$\rho_{\text{N.tot}} = \rho_{\text{N}}(\text{urea}) + \rho_{\text{N}}(\text{NH}_4^+) \quad (1)$$

Where  $\rho_{\text{N.tot}}$  is the total influx of  $^{15}\text{N}$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) for each nutrient conditions and  $\rho_{\text{N}}(\text{urea})$  and  $\rho_{\text{N}}(\text{NH}_4^+)$  are respectively the influx of  $^{15}\text{N}$ -urea and  $^{15}\text{NH}_4^+$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) obtained from simultaneous incubations.

To compare strains, total N uptake rates were normalized to the particulate nitrogen (PN) according to the following equation:

$$V_{\text{N.tot}} = \rho_{\text{N.tot}} / \text{PN}_{\text{mean}} \quad (2)$$

Where  $V_{\text{N.tot}}$  is the total N uptake rate from  $\text{NH}_4^+$  and urea (in  $\text{h}^{-1}$ ) and  $\text{PN}_{\text{mean}}$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) is the mean of PN values from both coupled incubations.

### 5- Modeled curves and kinetic parameters

When the relation between uptake rates and concentrations exhibited saturation kinetics, the Michaelis-Menten model was used to generate kinetic parameters from the original or modified equations depending on cases.

(i) For a specific nutrient, if saturable kinetics were observed in the relation between uptake rates and concentrations, uptake data were modeled using the original Michaelis-Menten relation:

$$V_{\text{N}} = V_{\text{max-N}} \cdot [\text{N}] / (K_{\text{S}} + [\text{N}]) \quad (3)$$

Where  $V_{\text{N}}$  (in  $\text{h}^{-1}$ ) is the N-uptake rate under a nutrient concentration of  $[\text{N}]$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ),  $V_{\text{max-N}}$  is the maximal uptake rate (in  $\text{h}^{-1}$ ) and  $K_{\text{S}}$  is the half-saturation constant.

(ii) If an exponential decrease was noted in the uptake rate of one nutrient (N1) when increasing the concentration of the other (N2), modeled uptake rates and inhibition parameters were determined using the reverse Michaelis-Menten relation (Varela & Harrison 1999):

$$V_{N1} = V_{\max-N1} \cdot (1 - (I_{\max} \cdot [N2] / (K_I + [N2]))) \quad (4)$$

Where the N-uptake rate of the nutrient N1,  $V_{N1}$  (in  $h^{-1}$ ), is function of the maximum uptake rate without inhibition ( $V_{\max-N1}$ , in  $h^{-1}$ ), the concentration of the inhibitory nutrient  $[N2]$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ), the maximum inhibition  $I_{\max}$  (values from 0 to 1) and of the inhibition constant  $K_I$  (concentration of N2 at which  $I = I_{\max} / 2$ , in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ).

(iii) If the variations of total N-uptake rates along a concentration gradient followed a saturable kinetics, “composite” kinetic parameters associated with the total N flux (from  $\text{NH}_4^+$  and urea) were defined using the following equation which derived from the Michaelis-Menten model:

$$V_{N\text{-tot}} = V_0 + (V_{\max\text{-tot}} - V_0) \cdot [N] / (K_{S\text{-tot}} + [N]) \quad (5)$$

Where  $V_{N\text{-tot}}$  is the total N uptake rate from  $\text{NH}_4^+$  and urea (in  $h^{-1}$ ),  $[N]$  (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) is the variable nutrient concentration (the other nutrient concentration being fixed),  $V_0$  (in  $h^{-1}$ ) is the N-uptake rate when  $[N] = 0$  and  $V_{\max\text{-tot}}$  and  $K_{S\text{-tot}}$  are the two composite parameters equivalent to a maximal total N-uptake rate and a half-saturation constant for the total N flux.

### III- RESULTS

#### 1- Nutrient conditions

Nutrient concentrations during each experiment (just after resuspension and at the beginning of each experiment part, (1) and (2)) in terms of N-sources are summarized in Table 1. An  $\text{NH}_4^+$  concentration lower than  $1.2 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  was ensured at the beginning of each incubation. For  $\text{NO}_3^-$ , significant concentrations were measured during experiments and prevented any changes in N-metabolism due to N-deficient conditions. Such N free conditions may result in population crashes and/or gametogenesis for this species (Collos et al. 2006). According to the available data, a slight  $\text{NO}_3^-$  drawdown may have occurred during the first part (1) of experiments using VGO 565 and VGO 715.

Strain	Origin	Nutrient	After resuspension	Part (1)	Part (2)
VGO 565	Tarragona harbor (Spain)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.80	3.46	3.19
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.41	0.25	0.28
		Urea	1.77	NA	1.32
VGO 715	Barcelona harbor (Spain)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.54	5.65	3.39
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.36	0.10	1.22
VGO 815	Thau lagoon (France)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.63	4.20	4.77
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.32	0.60	0.35
TL01	Thau lagoon (France)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.19	NA	NA
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.40	0.28	0.57
		Urea	NA	0.10	NA
ACT03	Thau lagoon (France)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NA	3.75	NA
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.57	0.17	0.27

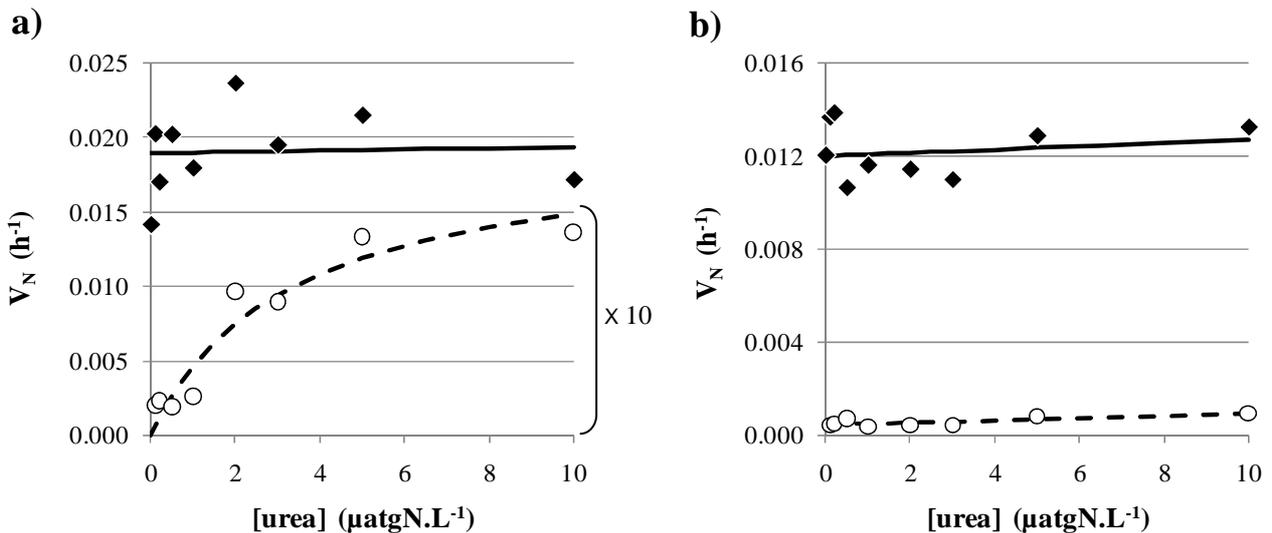
**Table 1:** Nutrient concentrations (in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) measured in the culture medium just after the resuspension step and at the beginning of the two successive parts of each experiment (Parts (1) and (2)). NA: not available.

## 2- Influence of urea on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake rates

The influence of urea on the maximal uptake rate of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( $V_{\text{max-NH}_4^+}$ ) was analyzed through the variations of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and <sup>15</sup>N-urea uptake data after an addition of 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and along a urea gradient of 0-10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  (Table 2, Fig. 1). For both N-sources, variations of uptake rates along the urea gradient were constrained in similar ranges of values for the four strains tested, with high NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake rates ( $V_{\text{NH}_4^+} > 0.011 \text{ h}^{-1}$ ) and very low N-urea uptake rates ( $V_{\text{N-urea}} < 0.002 \text{ h}^{-1}$ ) all along the concentration gradient. Uptake data of two strains (TL01 and ACT03) are shown in Figure 1. In this range of nutrients conditions,  $V_{\text{NH}_4^+}$  remained higher than  $V_{\text{N-urea}}$  by a factor of 10 also when both nutrients were added at the same concentration.

Strain	Origin	$V_{N\text{-urea}}$ (kinetic parameters)			$V_{NH_4^+}$	$V_{N\text{-tot}}$
		$V_{\max\text{-urea}}$	$K_S\text{-urea}$	$r^2$		
VGO 565	Tarragona (Spain)	0.0005	0.53	0.95	$0.015 \pm 0.001$	$0.014 \pm 0.001$
VGO 715	Barcelona (Spain)	0.0012	0.86	0.89	$0.021 \pm 0.002$	$0.022 \pm 0.004$
VGO 815	Thau lagoon (France)	0.0019	0.84	0.99	$0.023 \pm 0.002$	$0.026 \pm 0.005$
TL01	Thau lagoon (France)	0.0020	3.31	0.93	$0.019 \pm 0.003$	$0.019 \pm 0.003$
		$V_{N\text{-urea}}$				
ACT03	Thau lagoon (France)	$0.0006 \pm 0.0002$			$0.012 \pm 0.001$	$0.012 \pm 0.002$

**Table 2:** Kinetic parameters ( $V_{\max}$  in  $h^{-1}$  and  $K_S$  in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) and mean ( $\pm$  SD) uptake rates of N-urea,  $NH_4^+$  and  $V_{N\text{-tot}}$  obtained along a urea gradient of 0 to  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  and after an addition of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $NH_4^+$ .



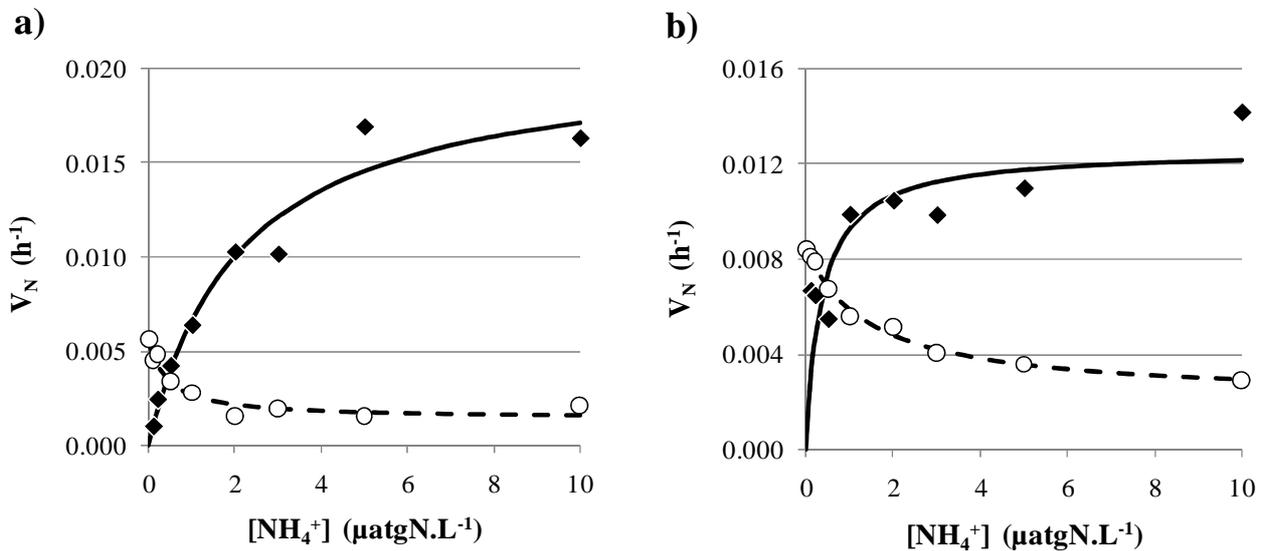
**Figure 1:** Ammonium ( $\blacklozenge$ ) and N-urea uptake rates ( $\circ$ ) obtained for the strains (a) TL01 and (b) ACT03 after an addition of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $NH_4^+$  and along a graded urea concentration ([urea]) of 0- $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ . The modeled curves of  $NH_4^+$  and N-urea uptake data correspond to the solid and dashed lines, respectively. N-urea uptake data for TL01 were multiplied by a factor of 10, as indicated by the bracket.

No trend was observed in variations in  $V_{\text{NH}_4^+}$  along the urea gradient for any strain (Table 2). Thus, the level of urea concentration (between 0 and  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) has no effect on  $\text{NH}_4^+$  uptake by *A. catenella* cells when  $\text{NH}_4^+$  concentration is high, suggesting no influence of urea concentration on the  $V_{\text{max-NH}_4^+}$ .

Regarding  $V_{\text{N-urea}}$  as a function of urea concentration and in the presence of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NH}_4^+$ , particular patterns were displayed for every strain except ACT03 (Fig. 1, dashed lines). These patterns corresponded to Michaelis-Menten kinetics with very low  $V_{\text{max}}$  ( $< 0.002 \text{ h}^{-1}$ ) and  $K_S$  values of  $0.53 - 3.31 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ . All the parameters values obtained for  $V_{\text{N-urea}}$  versus concentration relationships are summarized in Table 2.

### 3- Influence of $\text{NH}_4^+$ on N-urea uptake rates

The complementary analysis of the  $\text{NH}_4^+$  influence on the maximal uptake rate of N-urea ( $V_{\text{max-urea}}$ ) was based on reverse nutrient conditions: a constant urea concentration of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  and a variable  $\text{NH}_4^+$  concentration (0 to  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ). Results revealed that  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction may be an important feature for N-uptake regulation, depending on the strains of *A. catenella*.



**Figure 2:** Ammonium uptake rates (◆) and N-urea uptake rates (○) obtained for the VGO 815 strain (a) and ACT03 strain (b) of *A. catenella* after an addition of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of urea and along a graded  $\text{NH}_4^+$  concentration of 0- $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ . The modeled curves of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake data correspond to a solid line and a dashed line respectively.

An  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction was exclusively observed for the French strains, TL01, ACT03 and VGO815, and was visible through the net decrease of  $V_{\text{N-urea}}$  when  $\text{NH}_4^+$  concentration increased. Figure 2 displayed patterns obtained for two strains taken as examples, TL01 and ACT03. This interaction corresponded to a strong  $\text{NH}_4^+$  inhibition on the  $V_{\text{max-urea}}$  which could be characterized by fitting the data to reverse Michaelis-Menten kinetics. The inhibition parameters obtained (Table 3) corresponded to high maximum inhibition values ( $I_{\text{max}} > 55 \%$ ) and respective  $K_I$  values of 0.44, 1.47 and  $6.81 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  for TL01, ACT03 and VGO815. The maximal N-urea uptake rate achieved without  $\text{NH}_4^+$  varied from  $0.003 \text{ h}^{-1}$  for VGO 815 to  $0.008 \text{ h}^{-1}$  for ACT03.

For the Spanish strains (VGO 715 and VGO 565),  $V_{\text{N-urea}}$  was more or less constant along the  $0\text{-}10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  gradient with mean uptake values lower than  $0.002 \text{ h}^{-1}$  (Table 3). These patterns showed low capacities of these strains to take up N-urea even if urea was the unique N-source and suggested no influence of  $\text{NH}_4^+$  concentration on  $V_{\text{max-urea}}$  for these cells in the range of concentration tested.

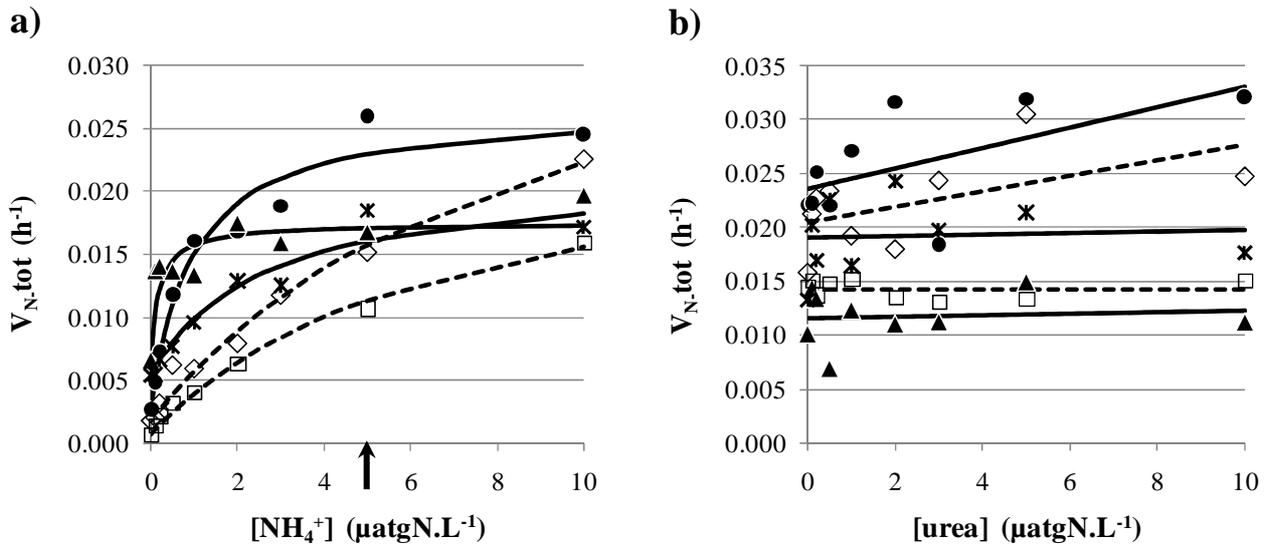
Variations of  $V_{\text{NH}_4^+}$  along the  $\text{NH}_4^+$  gradient and under a constant urea concentration ( $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) showed similar patterns for the five strains tested, corresponding to Michaelis-Menten kinetics. These patterns are presented in Figure 2 for TL01 and ACT03. Kinetics parameters calculated for all strains are computed in Table 3. Considering  $V_{\text{max-NH}_4^+}$  values in the presence of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of N-urea, ACT03 presented a lower value ( $0.013 \text{ h}^{-1}$ ) than other strains of *A. catenella* for which  $V_{\text{max-NH}_4^+}$  ranged from  $0.021$  to  $0.025 \text{ h}^{-1}$ . The comparison of  $K_S\text{-NH}_4^+$  values separated the strains differently, putting in contrast the French strains ( $K_S\text{-NH}_4^+ < 2.2 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) to the Spanish strains ( $K_S\text{-NH}_4^+ > 3.5 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) when a high urea concentration was added.

#### 4- Total N fluxes

Data of the summed uptake rates of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea (total N-uptake rates,  $V_{\text{N,tot}}$ ) represent N-uptake capacities when both nutrients are present in the medium and reflect the competitiveness of each strain in these multi-nutrient conditions. Results obtained along the urea gradient and the  $\text{NH}_4^+$  gradient are presented in Figure 3a and b respectively. Similar patterns were observed for the five strains along the varying nutrients conditions, with two different kinds of variations depending on the nutrient gradient tested.

Strain	Origin	$V_{N\text{-urea}}$			$V_{NH_4^+}$ (kinetic parameters)			$V_{N\text{-tot}}$ (kinetic parameters)		
		$V$ ( $[NH_4^+]=0$ )	$I_{max}$	$K_I$	$V_{max-NH_4^+}$	$K_S-NH_4^+$	$r^2$	$V_{max\text{-tot}}$	$K_S\text{-tot}$	$r^2$
VGO 565	Tarragona (Spain)	0.0009 ± 0.0004			0.023	6.49	0.83	0.026	6.80	0.99
VGO 715	Barcelona (Spain)	0.0016 ± 0.0002			0.021	3.50	0.95	0.041	9.01	0.98
		$V_{N\text{-urea}}$ (inhibition parameters)								
VGO 815	Thau lagoon (France)	0.003	55.6	6.81	0.80	0.31	0.95	0.027	0.96	0.96
TL01	Thau lagoon (France)	0.006	75.6	0.44	0.91	2.15	0.97	0.022	2.60	0.95
ACT03	Thau lagoon (France)	0.008	75.0	1.47	0.96	0.36	0.78	0.018	0.19	0.74

**Table 3:** Kinetic parameters ( $V_{max}$  in  $h^{-1}$  and  $K_S$  in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ), inhibition parameters (N-urea uptake rate without inhibition,  $V$  ( $[NH_4^+] = 0$ ) in  $h^{-1}$ ,  $I_{max}$  in % and  $K_I$  in  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) and mean ( $\pm$  SD) uptake rates of N-urea,  $NH_4^+$  and  $V_{N\text{-tot}}$  obtained along an  $NH_4^+$  gradient of 0 to 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  and after an addition of 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  of urea.



**Figure 3:** Total N-uptake rates (from  $\text{NH}_4^+$  and urea) obtained under (a) a constant urea concentration of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  coupled with a graded  $\text{NH}_4^+$  concentration of 0 to  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  and (b) under the reverse nutrients conditions, a constant  $\text{NH}_4^+$  concentration of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  coupled with a graded urea concentration of 0 to  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ . These data compile the results obtained for the five strains tested, the French strains VGO 815 (●), TL01 (stars) and ACT03 (▲) and the both Spanish strains VGO 715 (◇) and VGO 565 (□). Modeled curves are represented by solid lines for the French strains and dashed lines for the Spanish strains. The black arrow in (a) points to the threshold concentration of  $5 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ .

When urea concentration was high ( $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ),  $V_{\text{N.tot}}$  increased with increasing  $\text{NH}_4^+$  concentration according to Michaelis-Menten kinetics for the five strains (Figure 3a). The composite kinetic parameters values for the total N-fluxes are summarized in Table 3. Contrary to  $V_{\text{max.tot}}$  values, the comparison of  $K_{\text{S.tot}}$  values between strains highlights two contrasting groups: the French strains ( $K_{\text{S.tot}} \leq 2.6 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) and the Spanish strains ( $K_{\text{S.tot}} \geq 6.8 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ). This difference in  $K_{\text{S.tot}}$  suggests higher N-uptake capacities for the French strains at low  $\text{NH}_4^+$  concentration when the urea concentration is high ( $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ). This was confirmed by the fact that  $V_{\text{N.tot}}$  mean values of the French strains were significantly different (two tailed paired t test) from those of the Spanish strains below  $5 \mu\text{M NH}_4^+$  (arrow in Fig. 3a), while they were not for the other concentration values.

No clear trend in  $V_{\text{N.tot}}$  could be defined along the urea gradient ( $0\text{-}10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) with an addition of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 3b). Estimation of  $V_{\text{N.tot}}$  mean values through the urea gradient (Table 2) allows for the assessment of the N-uptake capacities of each strain under a high  $\text{NH}_4^+$  concentration, whatever the urea concentration. The range of mean values obtained is bracketed by two French strains, VGO 815 and ACT03. With a  $V_{\text{N.tot}}$  mean value

of  $0.026 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ , VGO 815 appeared to be the most competitive strain when the  $\text{NH}_4^+$  concentration was high. Conversely, ACT03 showed poor competitive abilities ( $V_{\text{N-tot}}$  mean value of  $0.012 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ ) under the same nutrients conditions.

#### IV- DISCUSSION

Even if  $\text{NO}_3^-$  may be considered as a potential interfering factor for  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake estimations in the present results, its influence is probably negligible. Stock cultures grown on a  $\text{NO}_3^-$  based medium could lead to underestimations of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake rates due to pre-conditioning effects. However, from short time-series experiments using French and Spanish strains of *A. catenella*, Jauzein et al. (2008) obtained linear trends in uptake rates of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea with time over 1h, following the same protocol. Such trends allowed to reject any potential interference associated with pre-conditioning effects as well as with surge uptake processes due to maintenance in low N-conditions before starting incubations. Furthermore, significant  $\text{NO}_3^-$  concentrations measured during experiments require assessing the potential effect of  $\text{NO}_3^-$  on  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake. Concerning  $\text{NH}_4^+$  uptake,  $\text{NO}_3^-$  has sometimes been reported to reduce its uptake, but the effect was only slight (2-15 %) in *Monochrysis lutheri* (Caperon & Zieman 1976) and *Skeletonema costatum* (Dortch & Conway 1984). Larger effects were only observed either in N deficient cells (Dortch & Conway 1984) or at values above  $8 \mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  (Cochlan & Harrison 1991). No effect has been reported by Terry (1982) on *T. weissflogii*, Nakamura (1985) on *Chatonella* and Lund (1987) on *S. costatum*, even at  $10 \mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ . Similar characteristics have been reported for the potential interaction between  $\text{NO}_3^-$  and N-urea. The influence of  $\text{NO}_3^-$  on N-urea uptake has only been reported by Lund (1987) for *S. costatum* and by Molloy & Syrett (1988) for *Chlorella emersonii* and *Phaeodactylum tricorutum*. In these studies, N-urea uptake was reduced by only 10-24 % at respective levels of  $10 \mu\text{M}$  and  $10000 \mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ . No effect of  $\text{NO}_3^-$  ( $40\text{-}50 \mu\text{M}$ ) was evident from data of Grant et al. (1967) and Waser et al. (1998) on four species of marine phytoplankton, justifying that such inhibition is species specific.  $\text{NO}_3^-$  concentrations always being under  $5.7 \mu\text{M}$  during our experiments (Table 1) and cells being N sufficient, we assumed that interaction with  $\text{NO}_3^-$  may be considered as not interfering in the trends observed for  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake.

For all strains, a factor of 10 was measured between  $V_{\text{NH}_4^+}$  and  $V_{\text{N-urea}}$  values after an addition of  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NH}_4^+$ . This discrepancy implies low capacities of *A. catenella*

cells to take up N-urea when  $\text{NH}_4^+$  concentration in the medium is high. Depending on the strains, this N-uptake characteristic may be explained by low intrinsic N-urea uptake capacities or by an  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction.

### ***1- Characteristics of the $\text{NH}_4^+$ inhibition of urea uptake***

Among all potential interactions between N-sources available for phytoplankton growth, the  $\text{NH}_4^+$  effect on  $\text{NO}_3^-$  uptake has been focused by most ecological studies (Dortch 1990 and references therein). The results of the present study point out the importance of another potential nutrient interaction with the strong inhibition of  $\text{NH}_4^+$  on urea uptake noted for Thau lagoon strains of *A. catenella*. Even if only a few studies have been conducted on this interaction, such an  $\text{NH}_4^+$  inhibition of urea uptake has been previously observed for other phytoplankton taxa, such as diatoms (Horrigan & McCarthy 1982; Lund 1987) or freshwater cyanobacteria and chlorophytes (Healey 1977), and for field plankton communities (McCarthy & Eppley 1972; Irmish 1991; Tamminen & Irmish 1996). The inhibition characteristics reported in these previous studies show a high variability, both for the level of inhibition observed (from 15 % to 90 %) as for the threshold of  $\text{NH}_4^+$  concentration needed to depress urea uptake. The only two studies which present inhibition data along an  $\text{NH}_4^+$  gradient reported two distant threshold values,  $2 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  in the study of Healey (1977) and  $50 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  in the work of Tamminen & Irmish (1996). Another difference in the inhibition characteristics may also be noted in the time scale over which the inhibition process is implemented. The  $\text{NH}_4^+$  addition may induce an instantaneous decrease in urea uptake (Lund 1987) or after a time lag as observed in cases reported by Horrigan & McCarthy (1982) and Tamminen & Irmish (1996). Such differences in the reactivity time may suggest differences in the control of the inhibition process. An immediate inhibition effect may indicate a direct repression of the urea transport activity, while a time lag may reflect a more complex regulation system such as a disruption of the synthesis/degradation cycle in transport proteins or a control system by an internal pool.

The  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction observed in the present study was strictly an  $\text{NH}_4^+$  inhibition of urea uptake, and more precisely on the  $V_{\text{max}}$ -urea according to the protocol employed. This “one way” interaction contrasts with the results of the two previous studies where mutual interaction experiments were conducted (Healey 1977; Lund 1987), and for which the  $\text{NH}_4^+$  inhibition of urea uptake was coupled with a reverse inhibition of urea on

$\text{NH}_4^+$  uptake. The use of an inhibitor concentration gradient ranging from 0.1 to 10  $\mu\text{gatN.L}^{-1}$  has led to a visualization of a regular hyperbolic decrease of urea uptake with increasing  $\text{NH}_4^+$  concentration. This detailed pattern of the  $\text{NH}_4^+$  inhibition of urea uptake is the first one reported for phytoplankton species and allows characterization of the  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction using an adequate modeling approach.

So far, studies on  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  interaction have led to the most abundant available data on nutrients interaction, resulting from four decades of experiments (Dortch 1990 and references therein). This well documented  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  interaction has allowed a strong modeling effort, from laboratory experiments to marine ecosystem models (e.g. Sarmiento et al. 1993; Chapelle et al. 2000). Numerous mathematical formulations have been proposed to simulate the co-limitation between these nutrients, making the interaction modeling somehow confusing (Tian 2006) when the choice among them may be critical in the case of ecosystem simulation (Andersen & Heibig 1998; Sharada 2005). The lack of knowledge on the processes involved in the  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction makes the mechanistic models, relying on uptake regulation by feedback mechanisms and internal biochemical pools (e.g. Flynn (2001)), too complex to simulate this inhibition. A modeling approach referring only to external nutrient concentrations appears to be more adequate in the present case. When modeling the  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  interaction, modelers usually set as a postulate that  $V_{\text{max-N1}} / V_{\text{max-N2}} = 1$ , where  $V_{\text{max-N1}}$  and  $V_{\text{max-N2}}$  are the maximal uptake rates of both nutrients without interaction process. However, this relation may not be verified in the case of the  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction. Even if results of Collos et al. (2004) on the nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* cells presented similar values for  $V_{\text{max-NH}_4^+}$  and  $V_{\text{max-urea}}$ , the present investigation demonstrates that it was not the case for all the strains of *A. catenella*.

Following the recommendations of Sharada et al. (2005) and Tian (2006) recommendations, two formulations (Parker (1993) and Varela & Harrison 1999) were tested with our data. The equation proposed by Varela & Harrison (1999) appeared to generate the most efficient simulation of the inhibition process observed for Thau lagoon strains. The accuracy of this formulation is strengthened by the fact that it gathers the three essential properties defined by Sharada et al. (2005), so called similarity, hyperbolicity and incomplete inhibition.

From the model fitting, the inhibition parameters  $I_{\text{max}}$  (maximum inhibition) and  $K_I$  (inhibition constant) were generated and allow for the characterization of the urea uptake inhibition observed for the Thau lagoon strains of *A. catenella*. The TL01 and ACT03 strains

showed an inhibition of urea uptake that was particularly strong ( $I_{\max} \geq 75\%$ ) and sensitive to  $\text{NH}_4^+$  concentration ( $K_I \leq 1.47 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ). The range of values obtained for  $I_{\max}$  and  $K_I$  appears to be similar to the one reported for the  $\text{NH}_4^+$  inhibition on  $\text{NO}_3^-$  uptake of the dinoflagellates *Alexandrium minutum* (Maguer et al. 2007), *Prorocentrum minimum* and *Gyrodinium uncatenum* (Lomas & Glibert 1999). However, this similarity is not sufficient to suppose identical mechanisms of regulation between these distinct interactions.

The influence of  $\text{NH}_4^+$  concentration on N-urea assimilation by *A. catenella* cells may not be restricted to the uptake process. For *A. catenella*, the assimilation of N-urea involves the enzyme urease (Dyhrman & Anderson 2003). An inhibition of the activity of this enzyme by  $\text{NH}_4^+$  concentration has been previously reported for diatoms (Lomas 2004) and freshwater cyanobacteria (Singh 1992), pointing out the interest of studying such a potential influence for *A. catenella*.

## 2- Variability between strains and ecological considerations

From the estimation of total N-uptake rates (from  $\text{NH}_4^+$  and N-urea,  $V_{\text{N,tot}}$ ), it is possible to describe further aspects of the control of N-uptake by *A. catenella* cells and to compare N-uptake capacities of the different strains in a range of nutrient conditions. For all the strains,  $V_{\text{N,tot}}$  was mostly constant along the urea gradient, whereas an increase was observed along the  $\text{NH}_4^+$  gradient. This suggests that the total N-uptake by *A. catenella* cells may be mainly governed by the  $\text{NH}_4^+$  concentration when both nutrients are present. As well, the strong inhibition of  $\text{NH}_4^+$  on N-urea uptake noted for the French strains enhances the importance of this  $\text{NH}_4^+$  control of total N-flux for these strains. In this particular case, the increase in  $V_{\text{N,tot}}$  along the  $\text{NH}_4^+$  gradient arises from the compilation of two inverse trends: a decrease in  $V_{\text{N-urea}}$  together with an increase in  $V_{\text{NH}_4^+}$ . This suggests that N-urea uptake losses induced by  $\text{NH}_4^+$  inhibition were more than compensated by the  $\text{NH}_4^+$ -uptake. Such a compensatory effect may also be noted in the results of Healey (1977) and Lund (1987) on other phytoplankton species and points out that the  $\text{NH}_4^+$  inhibition of N-urea uptake is not a competitive disadvantage for these cells. Moreover, this compensation of the  $\text{NH}_4^+$  inhibition allows an increase in  $V_{\text{N,tot}}$  with the diversification of the potential N-sources. A similar consideration may be made for the Spanish strains but from the lack of  $\text{NH}_4^+$ /urea interaction.

Considering the  $V_{\text{N,tot}}$  values obtained along the  $\text{NH}_4^+$  gradient, French strains appeared to be more competitive than the Spanish ones in an environment characterized by

$\text{NH}_4^+$  concentration below  $5 \mu\text{gatN l}^{-1}$  (see Fig. 3) and high urea (as  $10 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) concentrations. This competitive ability may be explained by better capacities of the French strains to take up  $\text{NH}_4^+$  at low concentrations (lower  $K_S\text{-NH}_4^+$  than the Spanish strains) but also to higher capacities to take up N-urea when the  $\text{NH}_4^+$  concentration is low, in particular for the ACT03 strain. These uptake capacities may be examined relatively to the nutrient conditions reported for each originating area of the strains. Ranges of dissolved inorganic nitrogen concentrations during *A. catenella* blooms are usually higher in Barcelona and Tarragona harbors in Spain ( $0.4 - 36 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NO}_3^-$  ;  $0.1-17.9 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NH}_4^+$ ) than in Thau lagoon in France ( $0.1 - 4.4 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NO}_3^-$  ;  $0.2 - 9.6 \mu\text{gatN.L}^{-1}$  of  $\text{NH}_4^+$ ) (unpublished data collected in 2000-2003 from 2 and 4 blooms, respectively for French and Spanish sites). Furthermore, high dissolved organic nitrogen concentrations (up to  $26 \mu\text{gatN.L}^{-1}$ ) have been measured during these blooms in Thau lagoon. So, the differences noted in  $K_{S,\text{tot}}$  values between Spanish and French strains may reflect particular metabolic adaptations of the strains to their respective environment.

Although French strains appear to be well adapted to an environment with low  $\text{NH}_4^+$  concentration, they present different ranges of optimal nutrient conditions. For example, with a high  $V_{\text{max-NH}_4^+}$  coupled with a low  $K_S\text{-NH}_4^+$ , VGO 815 showed competitive abilities to take up  $\text{NH}_4^+$  under a large range of  $\text{NH}_4^+$  concentrations, whatever the urea concentration. With the lowest  $V_{\text{max-NH}_4^+}$ , ACT03 did not show efficient N-uptake capacities when the  $\text{NH}_4^+$  concentration was high but presented the highest ability to use urea as a major N-source when  $\text{NH}_4^+$  concentration was low. Such diversity between strains of the same originating area allows us to consider two potential ecological strategies for *A. catenella*, which can be called adaptability or efficiency. If the strategy points to adaptability, no selection of N-uptake characteristics occurs from nutrients conditions during the bloom development, keeping the diversity in N-uptake capacities at the population level. In this case, the global N-uptake rate of the population may be maintained even if the environmental conditions vary but an optimal uptake and competitiveness are prevented. The efficiency strategy requires a selection phase of the cells. It leads to a population well adapted to the instantaneous environmental conditions with an optimal N-uptake but very sensitive to changes in nutrients conditions. Only a biomolecular approach of the genetic variability of blooming *A. catenella* cells may give a broad insight on the ecological strategies encountered in the field and on the potential selection of genotypic and phenotypic characteristics.

## V- CONCLUSION

Ammonium concentration appeared to be the main factor controlling N-uptake by *A. catenella* cells when  $\text{NH}_4^+$  and urea are simultaneously present in the medium. For the French strains tested, this control is reinforced by a strong inhibition of  $\text{NH}_4^+$  on N-urea uptake. The potential influence of  $\text{NH}_4^+$  on the urease activity of these cells has to be analyzed to achieve a complete understanding of the control of N-urea assimilation. This understanding is complicated by a high variability noted between strains of *A. catenella*. If part of this variability may be associated with environmental adaptations, this diversity allows a potential selection of the cells during bloom developments with regards to their  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake characteristics.

## *Acknowledgements*

The authors wish to thank R. Ventosa for the nutrient analyses. This study was financed by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer), as well as the EU funded Research Project SEED (Life cycle transformations among HAB species, and the environmental and physiological factors that regulate them, GOCE-CT-2005-003875). S. Loureiro was supported by a FCT (Fundação para a Ciência e para a Tecnologia, Portugal) grant within the III Quadro Comunitário de Apoio by the FSE. E. Garcés work was supported by the Ramon y Cajal contract of the Spanish Ministry of Education and Science.

## *References*

- Andersen V.**, Heibig A. 1998. Modelling nitrate and ammonium uptake by phytoplankton. Influence of the formulation in an ecosystem model. *Bull. Soc. R. Sci. Liège*. Vol. 67(1-2), p. 3-21.
- Andersen R.A.**, Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In R.A. Andersen [Ed], *Algal culturing techniques*. Elsevier, Amsterdam, p. 429-538.
- Bec B.**, Husseini-Ratrema J., Collos Y., Souchu P., Vaquer A. 2005. Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *J. Plankton Res.* Vol. 27(9), p. 881-894.

- Caperon J.**, Ziemann D.A. 1976. Synergistic effects of nitrate and ammonium on growth and uptake kinetics of *Monochrysis-lutheri* in continuous culture. *Mar. Biol.* Vol. 36(1), p. 73-84.
- Chapelle A.**, Menesguen A., Deslous-Paoli J.M., Souchu P., Mazouni N., Vaquer A., Millet B. 2000. Modelling nitrogen, primary production and oxygen in a Mediterranean lagoon. Impact of oysters farming and inputs from the watershed. *Ecol. Model.* Vol. 127(2-3), p. 161-181.
- Collos Y.** 1987. Calculations of N-15 uptake rates by phytoplankton assimilating one or several nitrogen sources. *Appl. Radiat. Isot.* Vol. 38, p. 275-282.
- Collos Y.**, Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* Vol. 11, p. 179-184.
- Collos Y.**, Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *J. Phycol.* Vol. 40, p. 96-103.
- Collos Y.**, Lespilette M., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* Vol. 28, p. 313-318.
- Collos Y.**, Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A., Souch P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae.* Vol. 6, p. 781-789.
- Dortch Q.** 1990. The Interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 61(1-2), p. 183-201.
- Dortch Q.**, Conway H.L. 1984. Interactions between nitrate and ammonium uptake – Variation with growth-rate, nitrogen-source and species. *Mar. Biol.* Vol. 79(2), p. 151-164.
- Dyhrman S.T.**, Anderson D.M. 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 48(2), p. 647-655.
- Eppley R.W.**, Sharp J.H., Renger E.H., Perry M.J., Harrison W.G. 1977. Nitrogen assimilation by phytoplankton and other microorganisms in the surface waters of the central North Pacific Ocean. *Mar. Biol.* Vol. 39, p. 111-120.
- Flynn K.J.** 2001. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton. *J. Plankton Res.* Vol. 23(9), p. 977-997.
- Garcés E.**, Vila M., Masó M., Sampedro N., Giacobbe M.G., Penna A. 2005. Taxon-specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 301, p. 67-79.
- Glibert P.M.**, Harrison J., Heil C., Seitzinger S. 2006. Escalating worldwide use of urea – A global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry.* Vol. 77(3), p. 441-463.

- Goeyens L.**, Kindermans N., Abu Yusuf M., Elskens M. 1998. A room temperature procedure for the manual determination of urea in seawater. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* Vol. 47, p. 415-418.
- Grasshoff K.**, Ehrardt M., Kremling K. 1983. *Methods of sea water analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Guillard R.R.L.**, Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* Vol. 8, p. 229-239.
- Healey F.P.** 1977. Ammonium and urea uptake by some freshwater algae. *Can. J. Bot.* Vol. 55(1), p. 61-69.
- Horrigan S.G.**, McCarthy J.J. 1982. Phytoplankton uptake of ammonium and urea during growth on oxidized forms of nitrogen. *J. Plankton Res.* Vol. 4(2), p. 379-389.
- Irmisch A.** 1991. Investigations on the urea uptake by phytoplankton in the Baltic Sea. *Acta. Hydrochim. Hydrobiol.* Vol. 19(1), p. 39-44.
- Jauzein C.**, Collos Y., Garcès E., Vila M., Maso M. 2008. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *J. Phycol.* Vol. 44(5), p. 1136-1145.
- Koroleff F.** 1976. Determination of nutrients. In K. Grasshoff [Ed] *Methods of Seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, p. 117-182.
- Kristiansen S.**, Lund B.A. 1989. Nitrogen cycling in the Barents Sea – I. Uptake of nitrogen in the water column. *Deep-Sea Res.* Vol. 36(2), p. 255-268.
- Lilly E.L.**, Kulis D.M., Gentien P., Anderson D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* Vol. 24(5), p. 443-452.
- Lomas M.W.** 2004. Nitrate reductase and urease enzyme activity in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae): interactions among nitrogen substrates. *Mar. Biol.* Vol. 144(1), p. 37-44.
- Lomas M.W.**, Glibert P.M. 1999. Interactions between  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures. *Mar. Biol.* Vol. 133(3), p. 541-551.
- Lund B.A.** 1987. Mutual interference of ammonium, nitrate, and urea on uptake of N-15 sources by the marine diatom *Skeletonema-Costatum* (Grev) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 113(2), p. 167-180.
- McCarthy J.J.**, Eppley R.W. 1972. A comparison of chemical, isotopic, and enzymatic methods for measuring nitrogen assimilation of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 17(3), p. 371-382.
- Maguer J.F.**, L'Helguen S., Madec C., Labry C., Le Corre P. 2007. Nitrogen uptake and assimilation kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): Effect of N-limited growth rate on nitrate and ammonium interactions. *J. Phycol.* Vol. 43(2), p. 295-303.
- Parker R.A.** 1993. Dynamic-models for ammonium inhibition of nitrate uptake by phytoplankton. *Ecol. Model.* Vol. 66(1-2), p. 113-120.

- Price N.M.**, Harrison P.J. 1988. Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 33, p. 528-537.
- Rausch de Traubenberg C.**, Soyer-Gobillard M.O. 1990. Bacteria associated with a photosynthetic dinoflagellate in culture. *Symbiosis.* Vol. 8, p. 117-133.
- Rees T.A.V.**, Bekheet I.A. 1982. The role of nickel in urea assimilation by algae. *Planta.* Vol. 156, p. 385-387.
- Sahlsten E.** 1987. Nitrogenous nutrition in the euphotic zone of the Central North Pacific Gyre. *Mar. Biol.* Vol. 96(3), p. 433-439.
- Sarmiento J.L.**, Slater R.D., Fasham M.J.R., Ducklow H.W., Toggweiler J.R., Evans G.T. 1993. A seasonal 3-dimensional ecosystem model of nitrogen cycling in the North-Atlantic euphotic zone. *Global Biogeochem. Cycles.* Vol. 7(2), p. 417-450.
- Sharada M.K.**, Yajnik K.S., Swathi P.S. 2005. Evaluation of six relations of the kinetics of uptake by phytoplankton in multi-nutrient environment using JGOFS experimental results. *Deep-Sea Part II.* Vol. 52(14-15), p. 1892-1909.
- Singh S.** 1992. Regulation of Urease Cellular-Levels in the Cyanobacteria *Anacystis-Nidulans* and *Nostoc-Muscorum*. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen.* Vol. 188(1), p. 33-38.
- Tamminen T.**, Irmisch A. 1996. Urea uptake kinetics of a midsummer planktonic community on the SW coast of Finland. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 130, p. 201-211.
- Tian R.C.C.** 2006. Toward standard parameterizations in marine biological modeling. *Ecol. Model.* Vol. 193(3-4), p. 363-386.
- Uchida T.** 1976. Excretion of ammonia by *Prorocentrum micans* Ehrenberg in urea-grown culture. *Jap. J. Ecol.* Vol. 26, p. 43-44.
- Varela D.E.**, Harrison P.J. 1999. Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliana huxleyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 186, p. 67-74.
- Vila M.**, Garcés E., Masó M., Camp J. 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 222, p. 73-83.
- Waser N.A.**, Yin K., Yu Z., Ada K., Harrison A.J., Turpin D.H., Calvert S.E. 1998. Nitrogen isotope fractionation during nitrate, ammonium and urea uptake by marine diatoms and coccolithophores under various conditions of N availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 169, p. 29-41.



COUPLAGE ENTRE METABOLISMES DE L'AZOTE ET DU CARBONE CHEZ LE  
DINOFLAGELLE TOXIQUE *ALEXANDRIUM CATENELLA*

---

**CARBON-NITROGEN COUPLING IN THE TOXIC DINOFLAGELLATE**  
***ALEXANDRIUM CATENELLA* (DINOPHYCEAE)**

Jauzein C.<sup>ab</sup>, Collos Y.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Laboratoire LER-LR, Sète

<sup>b</sup> Université Montpellier 2, UMR 5119 UM2-CNRS-IFREMER,  
Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, Montpellier

**ABSTRACT :**

For phytoplankton cells, irradiance oscillation throughout the light:dark cycle may induce a diel periodicity in metabolic processes dependent on end-products of photosynthesis, such as nitrogen (N) uptake and assimilation. Variations of N-uptake and carbon (C) fixation by *Alexandrium catenella* cells were analyzed throughout a complete light:dark cycle during culture experiments to investigate the coupling between N and C metabolism for these cells. Uptake rates of three potential N-sources (ammonium, nitrate and N-urea) and two potential C-sources (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and C-urea) were estimated during both light and dark phases, from the incorporation of <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C labeled compounds. According to the variations observed in <sup>13</sup>C-isotopic ratio, *A. catenella* cells were not able to use C-urea. Furthermore, decreases in <sup>13</sup>C cell content during darkness were noted and revealed probably a high involvement of C recently fixed in dark respiration. From the analysis of <sup>15</sup>N-incorporation, relatively efficient dark N-uptake capacities were estimated for *A. catenella* cells: dark/light uptake ratio of 27%, 43% and 65% were measured for NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N-urea respectively. An accumulation of C-rich compounds during the light period was highlighted through strong diel variations in C:N ratio and would provide C and energy for these dark uptake processes. Such dark uptake and C-storage strategies may be of particular interest for migrating species, such as *A. catenella*.

## I- INTRODUCTION

Biological processes of phytoplankton cell metabolism may show a diel periodicity, initiated by extracellular oscillations in environmental growth conditions, internal variability associated with cell division cycle or circadian rhythms driven by a biological clock (*cf.* Sweeney 1987; Edmunds 1988). For phytoplankton cells, irradiance oscillation throughout the light:dark cycle corresponds to the most significant cyclic environmental variable: it can regulate metabolic processes through the influence of day or night length, maximum irradiance or spectral composition, which can act individually or in combination (Prézelin 1992). This regulation may not only affect photosynthesis activity, but also metabolic processes dependent on end-products of photosynthesis. For nutrition metabolism, nitrogen (N) uptake and assimilation may be linked with photosynthesis through different metabolic pathways (Turpin 1991) as it requires production of ATP, reducing power (NAD(P)H) and C-fixation. A strong coupling between N and C metabolism may lead to diel periodicity of N uptake and assimilation, provided that cells are in N-sufficient conditions: N-limitation conditions may induce the storage of C-rich compounds which facilitates dark nutrition processes and the decline of diel periodicity (Turpin 1991).

In the previous study of Jauzein et al. (2008), diurnal patterns (*i.e.* during the light period) were highlighted for *Alexandrium catenella* cells, consisted in an increase in N-uptake rates for ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and N-urea, and an increase in C:N composition ratio interpreted as a consequence of uncoupling between C and N uptake despite N-sufficient conditions. The present work was conducted to carry out complementary analyses of N-uptake and C-fixation by *A. catenella* cells throughout a complete light:dark cycle, in particular to test the potentiality of dark uptake of nitrogen which would be sustained by C accumulation during the day reflected by the diurnal increase in C:N ratio. Three potential nitrogen sources of *A. catenella* cells were tested, ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and N-urea (Collos et al. 2004). Some phytoplankton species being capable of utilizing urea not only as a N-source but also as a C-source (Lomas 2004), this study gave the opportunity to test the potential use of C-urea by *A. catenella* cells.

## II- MATERIAL AND METHODS

### 1- Culture conditions

The *A. catenella* strain (ACT03) used in this study was isolated from the Thau lagoon in 2003. Cultures were maintained at 20°C on ESAW artificial seawater (Andersen et al. 2005) with nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) as N-source. Cells were synchronized on a 12h light:12h dark cycle using a photon flux density of  $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 2- Experimental procedures

To investigate the diel variations of N and C-uptake by *A. catenella* cells, two experiments were conducted in batch cultures, based on the same experimental design but different ranges of N-addition: (1) in the first one, N-additions were performed to ensure N-sufficient conditions all along the experiment duration, (2) in the second one, lower N-additions were done to allow a depletion of N-sources before the end of the experiment. The latest experiment was also performed to test the potential uptake of C-urea. A unique 3L-stock culture in exponential growth phase was used for each experiment to ensure that cells were in similar growth conditions.

Each experiment started at the beginning of the light period with the resuspension of *A. catenella* cells in 3L of ESAW medium without N-source using an 11  $\mu\text{m}$  mesh size net. To avoid modifications of metabolic processes due to agitation during repeated sampling, the resuspended culture was immediately split in 40mL-aliquots and different  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ -additions were performed.

In the first experiment (1) four series of samples were compiled for testing three different N-sources (ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ),  $\text{NO}_3^-$  and urea) in N-sufficient conditions, one series without N-addition being used for control purpose. N-sources were added as  $^{15}\text{N}$ -labeled nutrient at an initial concentration comprised between 66 and 140  $\mu\text{atgN/L}$ .  $^{13}\text{C}$ -labeled bicarbonate ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) was added simultaneously at 78  $\mu\text{molC/L}$  in each sample.

The second experiment (2) tested three N-conditions, applying an initial pulse of urea (15  $\mu\text{gatN/L}$ ) or  $\text{NH}_4^+$  (15  $\mu\text{gatN/L}$ ) or no N-addition. Four series of samples were performed as follow: addition of  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea only, addition of  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea and  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ , addition of

$^{15}\text{NH}_4^+$  and  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ , and neither  $^{15}\text{N}$  nor  $^{13}\text{C}$ -addition. Pulses of  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  corresponded to 78  $\mu\text{molC/L}$  additions.

Incubations started with the addition of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ -sources and samples were immediately replaced in the culture chamber under initial conditions. During each experiment, at least one aliquot was used every hour during light periods and every 2 h (except for one missing incubation time) during dark periods for parameters measurements. Experiment duration of respectively 26 h and 29 h for (1) and (2) secured the survey of a complete diel cycle.

### ***3- Chemical and biological parameters***

Each incubation was ended with sample filtration through precombusted (4h at 450 °C) A/E filters (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA). Measurements of nutrients concentrations were performed from the filtrate using the methods of Collos et al. (1999), Koroleff (1976) and Goeyens et al. (1998) respectively for  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and urea. Filters were dried at 60 °C overnight and kept at room temperature until analysis. Estimations of particulate nitrogen (PN), particulate carbon (PC) and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratios were obtained from filters analysis on an Integra CN elemental analysis-mass spectrometry system (PDZ Europa, UK).

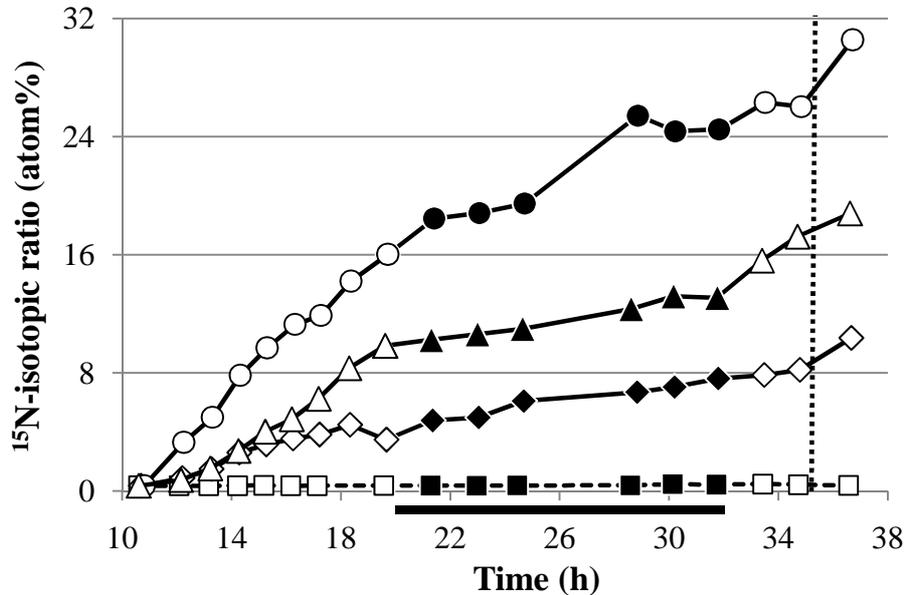
## **III- RESULTS**

Considering variations of  $\text{NH}_4^+$  concentrations in the series of samples were an initial  $^{15}\text{N}$ -urea addition was performed, no extensive  $\text{NH}_4^+$  release, associated with urea assimilation process, was observed during both experiments. Thus, no N-losses have to be taken into account in the analysis of  $^{15}\text{N}$ -isotopic ratios.

### ***1- Experiment in N-replete conditions***

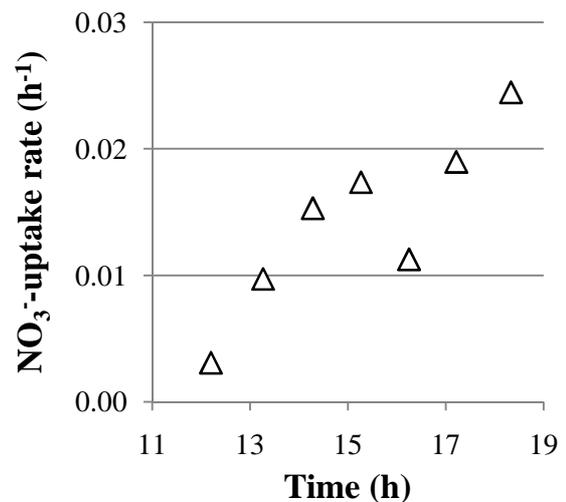
For the first experiment (1), a linear decrease in nutrient concentrations was observed with time for the three series of samples performed with an initial  $^{15}\text{N}$ -addition. Despite this consumption, nutrient concentrations remained over 12  $\mu\text{gN/L}$  until the end of the experiment.

According to the patterns of  $^{15}\text{N}$  isotopic ratios shown in Figure 1, *A. catenella* cells were capable of using the three N-sources,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and urea, during the light and the dark periods. Considering data of each consecutive light/dark period, most appeared to increase linearly with time, indicating a constant uptake rate.



**Figure 1 :** Variations in  $^{15}\text{N}$  isotopic ratio of *A. catenella* cells for the four series of samples, with  $^{15}\text{NH}_4^+$  (circles),  $^{15}\text{NO}_3^-$  (triangles),  $^{15}\text{N}$ -urea (diamonds) and without N-addition (squares). Open and closed symbols correspond to light and dark measurements respectively. The end of the complete light:dark cycle (24h) is indicated by the vertical dotted line.

Only data associated with the  $^{15}\text{NO}_3^-$  series displayed a particular pattern during the first light period corresponding to an exponential rise in  $^{15}\text{N}$  ratio which revealed a linear increase in  $\text{NO}_3^-$ -uptake rate over the first 8 hours (Figure 2). To compare N-uptake capacities of *A. catenella* cells under the different nutrient and light conditions, linear regressions of the  $^{15}\text{N}$ -ratios as a function of time were computed for each light/dark period.



**Figure 2 :** Variations in  $\text{NO}_3^-$ -uptake rate ( $\text{h}^{-1}$ ) during the first light period.

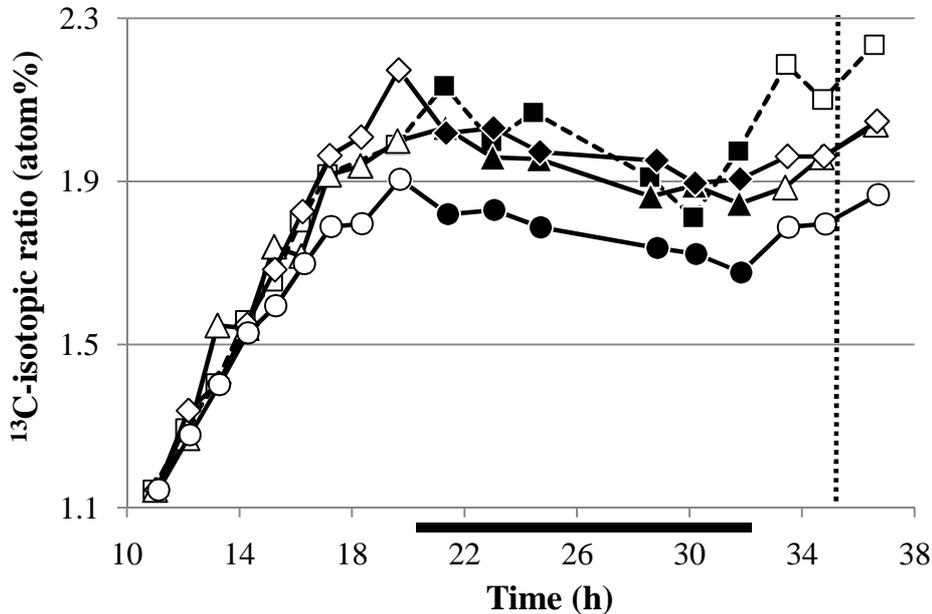
Mean uptake rates estimated from regression slopes are presented in Table 1 with corresponding  $R^2$  values. Comparing data of the dark period with data of the first light period, dark uptake rates corresponded to 43%, 27% and 65% of light uptake rates for  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and urea respectively.

	$^{15}\text{N}$ -uptake		$^{13}\text{C}$ -uptake		C:N composition ratio	
	$V_N$	$R^2$	$V_C$	$R^2$	Slope	$R^2$
<i>First light period</i>						
+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0.018	0.99	0.025	1.00		
+ $^{15}\text{NO}_3^-$	0.012	0.96	0.028	0.94		
+ $^{15}\text{N}$ -urea	0.005	0.85	0.031	0.99		
Without N-addition			0.030	1.00		
<i>Dark period</i>						
+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0.008	0.92			-0.196	0.71
+ $^{15}\text{NO}_3^-$	0.003	0.98			-0.139	0.79
+ $^{15}\text{N}$ -urea	0.003	0.91			-0.071	0.71
Without N-addition					-0.156	0.89

**Table 1:** Estimations of  $^{15}\text{N}$ -uptake rates ( $V_N$  in  $\text{h}^{-1}$ ),  $^{13}\text{C}$ -uptake rates ( $V_C$  in  $\text{h}^{-1}$ ) and slopes from regressions of  $^{15}\text{N}$ -isotopic ratio,  $^{13}\text{C}$ -isotopic ratio and C:N ratio *versus* time during the light and dark periods, for the four series of samples (with an without N-addition).  $R^2$  values corresponding to each data regressions are shown.  $^{13}\text{C}$ -uptake rates ( $V_{\text{max-C}}$ ) were estimated from data obtained in the linear part of variations in  $^{13}\text{C}$ -isotopic ratio.

Variations of the  $^{13}\text{C}$  isotopic ratio showed similar patterns for the four series of samples, with and without initial N-pulses. These patterns were constituted of successive increase and decrease during the light and dark periods respectively (Figure 3). The first linear rise, identified between 11:00 - 17:00, allowed the definition of maximal  $^{13}\text{C}$ -uptake rates ( $V_{\text{max-C}}$ ) from regression slopes (Table 1). Uptake rates obtained were very close ( $0.028 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ ), with a minimal value noted for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series. After 17:00,  $^{13}\text{C}$ -uptake rates appeared to slow down until the beginning of the dark period (20:00). Linear decreases in  $^{13}\text{C}$  isotopic ratios were then observed during darkness, characterized by similar negative slopes for the four series of samples with a mean of  $-0.0037 \pm 0.0004 \text{ h}^{-1}$ . From the minimal  $V_{\text{max-C}}$

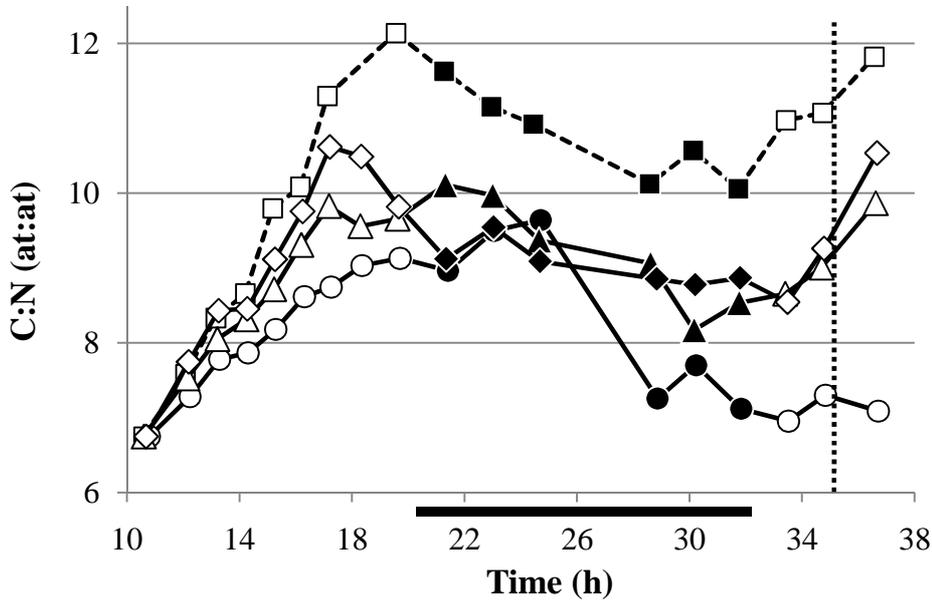
maintained until 17:00 and the similarity observed in subsequent variations of  $^{13}\text{C}$  isotopic ratio, measurements of  $^{13}\text{C}$  ratios performed after 17:00 were significantly ( $P > 0.0001$ ) lower for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series than for the others.



**Figure 3 :** Variations in  $^{13}\text{C}$  isotopic ratio of *A. catenella* cells for the four series of samples, with  $^{15}\text{NH}_4^+$  (circles),  $^{15}\text{NO}_3^-$  (triangles),  $^{15}\text{N}$ -urea (diamonds) and without N-addition (squares). Open and closed symbols correspond to light and dark measurements respectively. The end of the complete light:dark cycle (24h) is indicated by the vertical dotted line.

Under low N-conditions, likewise under N-sufficient conditions, variations in C:N composition ratios revealed a clear diel cycle showing a global increase during the light period followed by a decrease during the dark period (Figure 4). Slight deviations from these general trends were observed: during the first 24h, the maximal C:N value was shifted backward to the end of the light period for the  $^{15}\text{N}$ -urea series and forward to the early night for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series ; no resumption of the increase in C:N was visible at the beginning of the second light period for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series. According to variations observed in isotopic ratios, discrepancies noted for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series could be explained by measurements variability. During the first light period, the highest increase in C:N ratios was noted for the series without initial N-pulse, reaching 12.1 molC/molN. Thereafter, trends observed allowed the maintenance of significantly higher C:N values ( $P > 0.0001$ ) for this series of samples (without N-addition) than for the three others until the end of the experiment. Data obtained between 19:30 and 08:00 were used to estimate regression slopes associated with decreases in

darkness (Table 1): slope values between  $-0.07$  and  $-0.20 \text{ molC.molN}^{-1}.\text{h}^{-1}$  were obtained, with the lowest calculated for the  $^{15}\text{N}$ -urea series and the highest for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series.



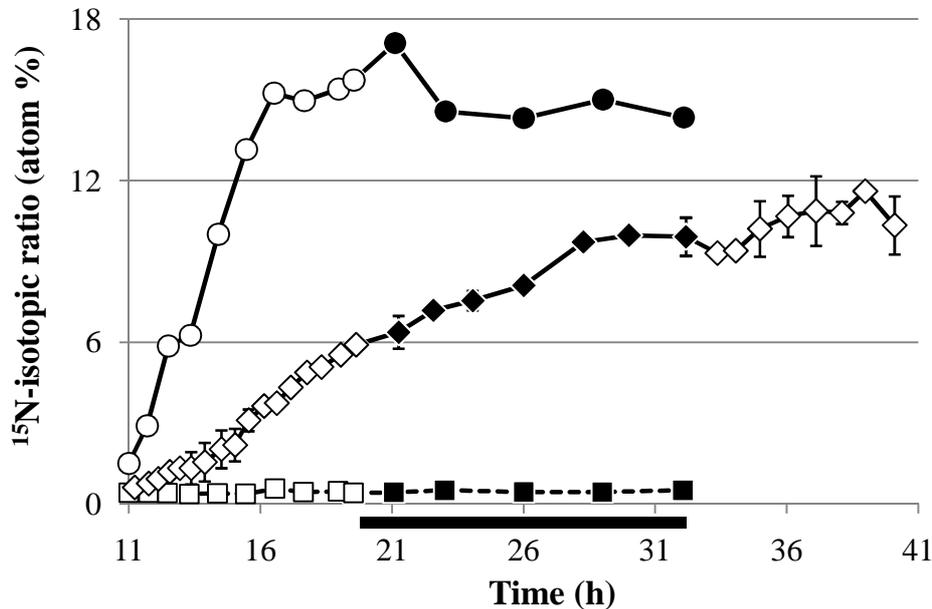
**Figure 4 :** Variations in C:N composition ratio of *A. catenella* cells for the four series of samples, with  $^{15}\text{NH}_4^+$  (circles),  $^{15}\text{NO}_3^-$  (triangles),  $^{15}\text{N}$ -urea (diamonds) and without N-addition (squares). Open and closed symbols correspond to light and dark measurements respectively. The end of the complete light:dark cycle (24h) is indicated by the vertical dotted line.

Cumulating C:N variations along the first 24h (limit indicated by a dashed line on Figure 4), C:N ratios measured at the end of the complete diel cycle ( $\text{C:N}_{24\text{h}}$ ) were 7.3, 9.0, 9.3 and 11.1 for the  $^{15}\text{NH}_4^+$ ,  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{N}$ -urea and without N-addition series respectively. For the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series, the  $\text{C:N}_{24\text{h}}$  value was close to the initial value of 6.8, indicating that the increase during the light period was entirely compensated by the decrease in darkness. Such compensation was only partial for the others series. Similar  $\text{C:N}_{24\text{h}}$  values were obtained for the series based on  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{N}$ -urea and corresponded to initial ratio increased by 33 % and 37 % respectively. The series without N-addition showed the greatest difference between initial C:N and  $\text{C:N}_{24\text{h}}$  matching an increase of 64 %.

Using regressions of C:N values and  $^{15}\text{N}$  isotopic ratios during the dark period, costs of N-assimilation into *A. catenella* cells during darkness (including maintenance metabolism) were estimated from variations in POC relatively to changes in PON ( $\Delta \text{POC} / \Delta \text{PON}$ ). Respective costs of 13.7, 14.2 and 10.3  $\text{gC.gN}^{-1}$  were calculated for  $^{15}\text{NH}_4^+$ ,  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{N}$ -urea series.

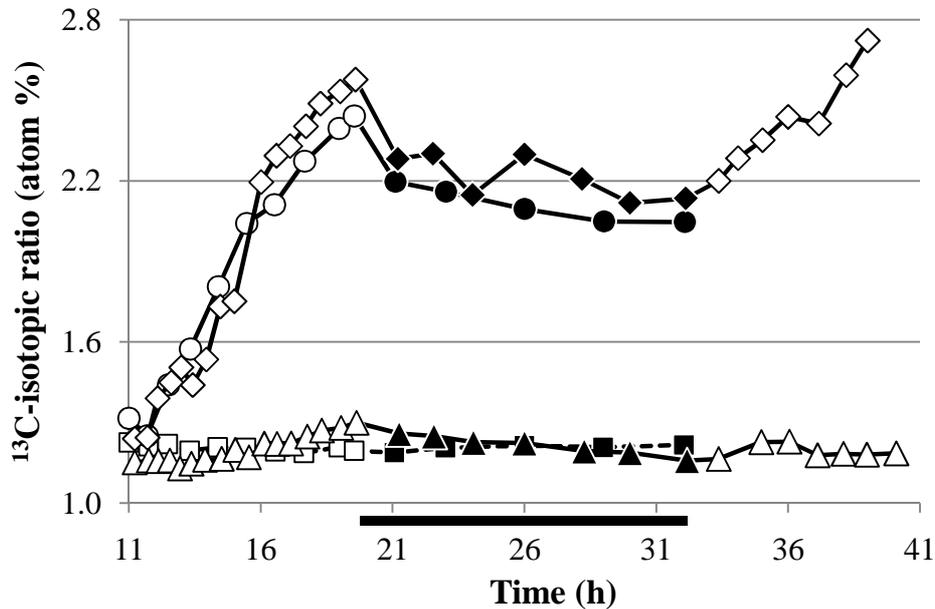
## 2- Experiment with N-depletion

For the second experiment (2), an initial pulse of 15  $\mu\text{gN/L}$  of  $\text{NH}_4^+$  or N-urea was performed for three of the four series of samples. Nutrient depletions occurred during the first light period (~16:30) for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series and at the end of the dark period (~08:00) for the  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea series. This difference came from the maximal N-uptake rate measured during the light period for the  $^{15}\text{NH}_4^+$  series ( $0.026 \text{ h}^{-1}$ ) that was found three times higher than the one measured for  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea series ( $0.007 \text{ h}^{-1}$ ). These uptake rates were estimated from the linear part of the increase in cellular  $^{15}\text{N}$  isotopic ratio with time (Figure 5). Variations in  $^{15}\text{N}$  isotopic ratio were similar for both  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea series, so associated results were considered as replicates and are reported on Figure 5 as mean values. As for the first experiment in N-replete conditions, N-urea uptake rate was measured also during the dark period, with a ratio between dark and light uptake rates of 53 %. Increases observed in  $^{15}\text{N}$  isotopic ratios ended with nutrient depletion and ratios were then globally maintained at a constant level until the end of the experiment,  $15.2 \pm 0.9 \%$  and  $10.3 \pm 0.7 \%$  for the  $^{15}\text{NH}_4^+$ - and the  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea series respectively.



**Figure 5 :** Variations in  $^{15}\text{N}$  isotopic ratio of *A. catenella* cells after an initial pulse of  $^{15}\text{NH}_4^+$  (circles),  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea (diamonds) and without  $^{15}\text{N}$ -addition (squares). The  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea data compiled the results obtained from both series, with and without supplementary addition of  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ . Open and closed symbols correspond to light and dark measurements respectively.

Assimilation of  $^{13}\text{C}$  by *A. catenella* cells was measured only for samples where an initial addition of  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  had been performed (Figure 6). When comparing  $^{13}\text{C}$  isotopic ratios of the series based on  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea addition (without  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) and the series without initial pulses of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ , results were found equivalent, suggesting that *A. catenella* cells were not able to use urea as a C-source. Variations in  $^{13}\text{C}$  ratios observed for the other series with  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  additions ( $^{15}\text{NH}_4^+ + \text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  and  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea +  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) showed trends similar to those highlighted under N-replete conditions: increases during the light periods and decreases during the dark period, however decreases appeared exponential rather than linear in this second experiment. As no  $^{13}\text{C}$ -assimilation was noted after an initial addition of  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea only, variations observed for the series compiling both potential  $^{13}\text{C}$ -sources,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea and  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ , were representative of  $^{13}\text{C}$  assimilation from  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  exclusively and allowed estimations of  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  uptake rates.  $V_{\text{max-C}}$  from  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  estimated during the first light period were  $0.040 \text{ h}^{-1}$  and  $0.046 \text{ h}^{-1}$  for the series based on  $^{15}\text{NH}_4^+$  and  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea respectively.



**Figure 6 :** Variations in  $^{13}\text{C}$  isotopic ratio of *A. catenella* cells for the four series of samples: with initial pulses of  $^{15}\text{NH}_4^+$  and  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  (circles),  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea and  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  (diamonds),  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -urea solely (triangles) and without any  $^{15}\text{N}$  or  $^{13}\text{C}$ -addition (squares). Open and closed symbols correspond to light and dark measurements respectively.

#### IV- DISCUSSION

##### 1- $^{15}\text{N}$ -Uptake capacities in light and darkness

Measurements of  $^{15}\text{N}$ -isotopic ratio during the light:dark cycle showed that *A. catenella* cells were capable of using the three N-sources tested ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and N-urea) either in the light or in the dark periods. Results confirmed that  $\text{NH}_4^+$  is the major N-source for *A. catenella* cells (Collos et al. 2004), as it was taken up at the highest uptake rate during both light and dark phases.

During the light period,  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake appeared to be maintained at a constant rate until the end of the photophase or N-depletion in experiments (1) and (2), suggesting a slight increase in N-uptake capacities with time, enough to compensate the regular decrease in nutrient concentration. Measurements of  $\text{NO}_3^-$  uptake rate under the N-sufficient conditions of experiment (1) showed a clearer trend as a function of time with a linear increase from  $0.003 \text{ h}^{-1}$  to  $0.025 \text{ h}^{-1}$  over 6h. Such increases of N-uptake rate during daytime have previously been reported for the same strain by Jauzein et al. (2008) analyzing evolution of  $\text{NH}_4^+$  and N-urea uptake rate at fixed nutrient concentrations, even though trends reported for both these nutrients were found higher, close to  $\text{NO}_3^-$  uptake rate variations measured in the present results.

During the dark phase, respective uptake rates of *A. catenella* cells in N-sufficient conditions of experiment (1) were  $0.008 \text{ h}^{-1}$  for  $\text{NH}_4^+$  and  $0.003 \text{ h}^{-1}$  for  $\text{NO}_3^-$  and N-urea. These dark uptake rates corresponded to 43%, 27% and 65% of the light uptake rate measured during the previous photophase for  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and N-urea respectively. Part of the variability observed in these percentages may be explained by the energetic cost required for each nutrient to be assimilated. Compared to  $\text{NH}_4^+$ , the reduction of  $\text{NO}_3^-$  successively into nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and  $\text{NH}_4^+$ , which is required for the nitrogen assimilation into amino acids, induces an additional energetic expense (Syrett 1981) associated with the requirement of ATP, reductant (NAD(P)H) and enzyme synthesis ( $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reductases). This may explain the stronger dependence on light observed for  $\text{NO}_3^-$  uptake compared to  $\text{NH}_4^+$ , which was reported for several marine phytoplankton species through a stronger difference between light and dark uptake rates noted for  $\text{NO}_3^-$  (Paasche et al. (1984); Clark & Flynn (2002); present results). For *A. catenella*, the limitation of  $\text{NO}_3^-$  dark uptake by the energetic demand was confirmed from estimations of costs in terms of C unit associated with N-uptake at night: a similar value was

obtained (around 14 gC.gN<sup>-1</sup>) for both NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, while uptake rate of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> corresponded to only half the rate of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. These costs appeared to be much higher than values (< 3 gC.gN<sup>-1</sup>) reported for the diatom *Thalassiosira weissflogii* in N-replete conditions (Clark et al. 2002). However, such a discrepancy may be explained by the higher respiration rate required for the maintenance metabolism of flagellates compared to diatoms, which could be partly explained by the additional energetic expense associated with active swimming. With a dark/light uptake ratio of 65%, N-urea uptake showed the greatest maintenance in darkness, more efficient than NH<sub>4</sub><sup>+</sup> while assimilation of N-urea includes an additional transformation step of urea into NH<sub>4</sub><sup>+</sup> which involves the synthesis of the enzyme urease by *A. catenella* cells (Dyhrman & Anderson 2003). This high dark:light uptake ratio may be explained by the relatively low dark uptake rate measured for N-urea (0.003 h<sup>-1</sup>, half the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake rate) which required a lower energetic cost (10 gC.gN<sup>-1</sup>) compared to other nutrients. This suggests that *A. catenella* cells may not have optimized their N-urea uptake rates during the experiments.

Abilities of marine microalgae to carry out uptake at night under N-replete conditions was observed for various taxonomic groups, including prymnesiophytes and diatoms (Needoba & Harrison 2004). No global classification of phytoplankton taxonomic groups according to their dark uptake abilities in N-replete conditions may be proposed as reported capacities varied strongly between genera of the same class and even between species of the same genus. Between diatom genera, Needoba & Harrison (2004) reported a dark NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake rate corresponded to 50% of light uptake rate for *Thalassiosira pseudonana*, while Granum et al. (2002) observed only low ability of *Skeletonema costatum* to realize NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in darkness. Between dinoflagellate species of the same genus, Paasche et al. (1984) characterized *Prorocentrum micans* by dark:light uptake rate ratios of 15% and 36% for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> respectively, while *Prorocentrum minimum* showed respective values 4 times and 2.5 times higher. Similarly, they measured 75% of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake maintenance at night for *Heterocapsa triquetra* while the proportion reported for *Heterocapsa illdefina* by Clark et al. (2002) was lower than 20%. Compared to other species presenting capacities of nutrient dark uptake, *A. catenella* showed a relatively efficient maintenance of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake at night but low for NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, with reported dark:light uptake rate ratios ranging from 12% to 75% for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and from 36% to 100% for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Paasche et al. 1984; Clark et al. 2002; Granum et al. 2002; Needoba & Harrison 2004). To the best of our knowledge, no comparable dark N-urea uptake estimations were reported from culture experiments in previous works.

Data presented for *A. catenella* may not be representative of the whole potentiality of dark uptake of these cells as the dependence of nutrient uptake on light appeared to vary with nutrients conditions. Several studies reported an improvement of N-uptake and assimilation in darkness when cells were N-limited, as for *Heterosigma carterae* and *Thalassiosira weissflogii* which showed an increase in the ratio between dark and light uptake rates with decreasing N:C ratio (Clark & Flynn 2002; Clark et al. 2002) or for *Gyrodinium aureolum* and *Emiliana huxleyi* which realized dark uptake only when cells were N-starved (Paasche et al. 1984; Riegman et al. 2000).

## 2- Variations of $^{13}\text{C}$ -isotopic ratio during the light:dark cycle

During the light period, estimations of  $^{13}\text{C}$ -uptake rates may be representative of estimations of photosynthetic activity. They revealed that *A. catenella* cells maintained an optimized photosynthetic activity during the main part of the light period, with a drop in C-uptake rate noted during the 3h preceding the dark phase.

During the dark phase, the decrease in  $^{13}\text{C}$ -isotopic ratio could result from an unbalanced loss of carbon (loss of products enriched in  $^{13}\text{C}$  relatively to natural abundance) or from dilution of the POC labeling by uptake of unlabelled C-products. The second hypothesis was previously proposed by Collos et al. (2006) to explain a concomitant decrease in both  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -isotopic ratios of *A. catenella* cells in cultures once the extracellular concentration of inorganic nitrogen was exhausted: they interpreted these trends as dilution of cell labeling due to uptake of unlabelled organic compounds. However, results obtained in the experiment (2) (Figure 5) did not reveal the existence of a decrease in  $^{15}\text{N}$  cell content after exhaustion of  $^{15}\text{NH}_4^+$  (during the first light period) or  $^{15}\text{N}$ -urea (at the end of the dark phase). Thus, if uptake of unlabelled organic compounds has occurred during experiments (1) and (2), this process would not be the only one to contribute to the decrease in  $^{13}\text{C}$ -isotopic ratio noted during the dark phase. Concerning the first hypothesis and according to Burkhardt et al. (1999a), an unbalanced loss of carbon may be the result of a fractionation process associated with carboxylation/decarboxylation reactions, complete decarboxylation of  $^{13}\text{C}$ -rich organic compounds or loss of  $^{13}\text{C}$ -enriched dissolved organic carbon from the cell. Even if complementary measurements are required to estimate the role of these processes in the decrease of  $^{13}\text{C}$  content during the dark phase, the decarboxylation of  $^{13}\text{C}$ -rich organic compounds is likely to have contributed the most to the trends observed. According to Geider

& Osborne (1989), dinoflagellates may be characterized by high ratios between dark respiration and maximum net photosynthesis rates, generally higher than 25% and reaching upto 59%. In the present results,  $^{13}\text{C}$ -decreases during darkness represented 12-15% of the maximal C-uptake estimated during the previous photophase. Comparing these values with dark respiration versus net photosynthesis ratios proposed by Geider & Osborne (1989), a contribution of 20-60% of previously fixed  $^{13}\text{C}$  in the pool of C respired during the dark phase may explain slopes of  $^{13}\text{C}$ -decrease observed for *A. catenella* cells. Thus, the decrease in  $^{13}\text{C}$  cell content in darkness may reflect a high involvement of C recently fixed (*i.e.* during the previous light period) in dark respiration.

### ***3- Uncoupling between photosynthesis and nutrient uptake***

Dark N-uptake capacities highlighted for *A. catenella* cells are dependent on particular metabolic adaptations. Nutrient uptake and assimilation in darkness require an additional expense of previously fixed C to be supplied with energy (ATP), reductant (NAD(P)H) and C-skeletons, creating an uncoupling between photosynthesis and nutrition processes (Cosper 1982). Photosynthetic C fixed in excess during the light period may be stored into C-rich and N-free macromolecules, such as carbohydrates or neutral lipids which can account for 10-50% of the dry weight of the cell (Geider & La Roche 2002). Accumulation of large pools of C-rich storage compounds may modify significantly C:N and C:P ratios (Geider & La Roche 2002), as observed for *A. catenella* cells during the experiment (1).

Diel variations observed in C:N ratio during the light:dark cycle highlighted the uncoupling between photosynthetic and nutrition processes for *A. catenella* cells. C-uptake from urea did not interfere in these trends as *A. catenella* cells were not able to use urea as a C-source according to the results of experiment (2). Therefore, the increase in C:N ratio during the light period revealed that photosynthetic C was stored in excess relatively to requirements for N-uptake and assimilation. The decrease in C:N during the dark period resulted from C losses, through respiration and DOC excretion, and N-uptake at night for cultures with an initial N-addition. The high C:N decrease observed for the control series (without initial N-addition) suggested that C:N variations in darkness were mainly governed by C-losses. From the comparison of initial C:N value and  $\text{C:N}_{24\text{h}}$ , only the series based on  $^{15}\text{NH}_4^+$ -addition may be considered as being under N-replete conditions during experiment (1); N-conditions encountered for  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{N}$ -urea series were sufficient for growth but

not replete as an increase of more than 30% was noted between C:N<sub>24h</sub> and the initial ratio. The compensation of C:N variations over the diel cycle obtained for the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-series may be explained (i) by lower C requirements of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake and assimilation compared to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and N-urea, which explained the lowest <sup>13</sup>C-accumulation and C:N value noted for this series at the end of the light period, and (ii) by the two times higher NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dark uptake relative to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or N-urea, which allowed the highest C:N decrease at night. The minimal C:N value obtained for *A. catenella* cells in N-replete conditions (6.8) is in the range of values reported by Flynn et al. (1996) for other *Alexandrium* species, which were 5-7.5 molC/molN for *A. minutum*, 5.6 for *A. affini* and 9.1 for *A. tamarense*. Diel variations of C:N ratio observed for *A. catenella* cells in N-replete conditions confirmed the assumption proposed by Jauzein et al. (2008a) according to which an increase in C:N values from 7 to 11 during the light period is not evidence for N-deficiency but the result of the irradiance cycle: for such species showing an uncoupling between C and N uptake, variations in C:N values must be interpreted carefully.

Similar detailed patterns of C:N diel variations were obtained for various marine species, such as the chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* (Sciandra et al. 1997), the diatoms *S. costatum* (Burkhardt et al. 1999b) and *T. weissflogii* (Clark et al. 2002), and the prymnesiophyte *E. huxleyi* (Bucciarelli et al. 2007). C-storage compounds contributing to diurnal increase in C:N ratio and support of dark processes may be carbohydrates (Cuhel et al. 1984; Clark & Flynn 2002; Granum et al. 2002) or lipids (Fábregas et al. 2002), depending on species. However, uncoupling between photosynthesis and nutrition process, revealed by diel C:N variations, does not represent necessarily a strategy focused on dark uptake optimization. For example, even if clear diel C:N variations were observed for *S. costatum* cells (Burkhardt et al. 1999b), this algae presented only low dark NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake capacities but a N-storage strategy: during the light period, this species showed NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake rate which exceeded growth rate and allowed N-storage into intracellular pools of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and intermediate N-assimilation products (Granum et al. 2002). For such species, exceeding fixed C is exclusively used for N-assimilation into proteins, respiration or cell division in darkness.

Storage of C-rich compounds may also have other implications on nutrient acquisition strategies, increasing the cell density. The role of carbohydrates as ballast may have an ecological interest in particular for non-flagellate phytoplankton species, such as diatoms: intracellular accumulation of carbohydrates in response to nutritive stress may trigger cell sinking into deeper layers where more nutrient sufficient conditions may be encountered (Richardson & Cullen, 1995). However, this buoyancy regulation process operates over

longer time scales than diel variations. For *A. catenella* cells, migrations are mainly governed by active swimming; accumulation of C-rich compounds over the daylight may just favor the migration to the deep during the night period.

## V- CONCLUSION

Experiments performed have allowed the test of two potential nutritive strategies of *A. catenella* cells: dark N-uptake and C-urea uptake capacities. If *A. catenella* cells showed no ability to use C-urea, they were characterized by relatively efficient dark N-uptake capacities at the expense of previously fixed carbon, in particular from the dissolved organic source N-urea. Complementary experiments have to be performed to test the whole potentiality of dark uptake of *A. catenella*. This includes potential increase in dark N-uptake capacities under N-limited conditions and potential use of phosphorus in darkness. Indeed, dark P-uptake capacities have been reported previously for some phytoplankton species, such as the dinoflagellate *Gymnodinium bogoriense* (Lieberman et al. 1994).

According to Litchman et al. (2004), the impact of the dark N-uptake strategy on species competitiveness depends on the proportion of the light period in the diel cycle (dependent on the day length and the mixing depth *in situ*) and on the energetic cost of the nutrient uptake and assimilation. For *A. catenella* cells, dark uptake was associated with high energetic costs in terms of C. However, the major part of this C-expense was probably more linked with maintenance metabolism than N-uptake in darkness. This was suggested by the fact that decreases observed in  $^{13}\text{C}$  cell content and C:N during the dark phase, mainly governed by C-losses, appeared to be close between the control series (without N-addition) and the N-sufficient series. Furthermore, the ability of *A. catenella* cells to migrate actively in the water column optimizes the efficiency of the dark uptake strategy *in situ* for this species: migration behavior during the diel cycle allows the improvement of dark N-uptake at night optimizing nutrient conditions, as well as C storage capacities during the daylight optimizing irradiance conditions. Even if dark-uptake strategy of *A. catenella* probably corresponds to a competitive advantage favoring bloom development, *in situ* estimations, such as migration behavior, water column stability or repartition of nutrient pools, have to be performed to conclude on the competitiveness gain of this strategy.

## References

- Andersen R.A.**, Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M.. 2005. Recipes for freshwater and seawater media, p: 429-538. In R. A. Andersen [Ed], *Algal culturing techniques*. Elsevier, Amsterdam.
- Bucciarelli E.**, Sunda W.G., Belviso S., Sarthou G. 2007. Effect of the diel cycle on production of dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of *Emiliana huxleyi*. *Aquat. Microb. Ecol.* Vol. 48, p. 73-81.
- Burkhardt S.**, Riebesell U., Zondervan I. 1999a. Stable carbon isotope fractionation by marine phytoplankton in response to daylength, growth rate, and CO<sub>2</sub> availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 184, p. 31-41.
- Burkhardt S.**, Zondervan I., Riebesell U. 1999b. Effect of CO<sub>2</sub> concentration and C:N:P ratio in marine phytoplankton: A species comparison. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 44(3), p.683-690.
- Clark D.R.**, Flynn K.J. 2002. N-assimilation in the noxious flagellate *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae) : dependence on light, N-source, and physiological state. *J. Phycol.* Vol. 38, p. 503-512.
- Clark D.R.**, Flynn K.J., Owens N.J.P. 2002. The large capacity for dark nitrate-assimilation in diatoms may overcome nitrate limitation of growth. *New Phytol.* Vol. 155, p. 101-108.
- Collos Y.**, Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* Vol. 11, p. 179-184.
- Collos Y.**, Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau Lagoon, Southern France. *J. Phycol.* Vol. 40, p. 96-103.
- Collos Y.**, Lespilette M., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* Vol. 28, p. 313-318.
- Cosper E.** 1982. Influence of light intensity on diel variations in rates of growth, respiration and organic release of a marine diatom: comparison of diurnally constant and fluctuating light. *J. Plankton Res.* Vol. 4(3), p. 705-724.
- Cuhel R.L.**, Ortner P.B., Lean D.R.S. 1984. Night synthesis of protein by algae. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 29(4), p. 731-744.
- Dyhrman S.T.**, Anderson D.M. 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 48(2), p. 647-655.
- Edmunds L.N.** 1988. Cellular and molecular bases of biological clocks. Springer-Verlag, New York, pp 497.
- Fábregas J.**, Maseda A., Domínguez A., Ferreira M., Otero A. 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light:dark cycle. *Biotech. Letters.* Vol. 24, p. 1699-1703.

- Flynn K.**, Jones K.J., Flynn K.J. 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting batch culture. *Mar. Biol.* Vol. 126, p. 9-18.
- Geider R.**, Osborne B.A. 1989. Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. *New Phytol.* Vol. 112, p. 327-341.
- Geider R.**, La Roche J. 2002. Redfield revisited : variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* Vol. 37, p. 1-17.
- Goeyens L.**, Kindermans N., Abu Yusuf M., Elskens M. 1998. A room temperature procedure for the manual determination of urea in seawater. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* Vol. 47, p. 415-418.
- Granum E.**, Kirkvold S., Myklestad S.M. 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 242, p. 83-94.
- Jauzein C.**, Collos Y., Garcés E., Vila M., Maso M. 2008. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *J. Phycol.* Vol. 44, p. 1136-1145.
- Koroleff F.** 1976. Determination of nutrients. In K. Grasshoff [Ed] *Methods of Seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, p. 117-182.
- Lieberman O.S.**, Shilo M., van Rijn J. 1994. The physiological ecology of a freshwater dinoflagellate bloom population : vertical migration, nitrogen limitation, and nutrient uptake kinetics. *J. Phycol.* Vol. 30, p. 964-971.
- Litchman E.**, Klausmeier C. A., Bossard P. 2004. Phytoplankton nutrient competition under dynamic light regimes. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 49(4), p. 1457-1462.
- Lomas M.W.** 2004. Does urea-carbon contribute significantly to *Aureococcus anophagefferens* carbon nutrition ? In K.A. Steidinger, J.H. Landsberg, Tomas C.R., Vargo G.A. [Eds], *Hamful algae 2002*. p. 402-4004.
- Needoba J.A.**, Harrison P.J. 2004. Influence of low light and a light:dark cycle on NO<sub>3</sub> uptake, intracellular NO<sub>3</sub>, and nitrogen isotope fractionation by marine phytoplankton. *J. Phycol.* Vol. 40, p. 505-516.
- Paasche E.**, Bryceson I., Tangen K. 1984. Interspecific variation in dark nitrogen uptake by dinoflagellates. *J. Phycol.* Vol. 20, p. 394-401.
- Prézelin B.B.** 1992. Diel periodicity in phytoplankton productivity. *Hydrobiologia.* Vol. 238, p. 1-35.
- Richardson T.L.**, Cullen J.J. 1995. Changing in buoyancy and chemical composition during growth of a coastal marine diatom: ecological and biogeochemical consequences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 129, p. 77-90.
- Riegman R.**, Stolte W., Noordeloos A.A.M., Slezak D. 2000. Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliana huxleyi* (Prymnsiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures. *J. Phycol.* Vol. 36, p. 87-96.

- Sciandra A.**, Gostan J., Collos Y., Descolas-Gros C., Leboulanger C., Martin-Jézéquel V., Denis M., Lefèvre D., Copin-Montégut C., Avril B. 1997. Growth-compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 42(6), p. 1325-1339.
- Sweeney B.M.** 1987. Rhythmic phenomena in plants (2<sup>nd</sup> edn). Academic Press, New York, pp 172.
- Syrett, P.J.** 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. In T. Platt [Ed], *Physiological bases of phytoplankton ecology*. *Can. Bull. Fish Aquat. Sci.* Vol. 210, p. 182-210.
- Turpin D.H.** 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* Vol. 27, p. 14-20.



## Partie 2

---

# PARAMETRISATION DE LA NUTRITION PHOSPHOREE



*Cultures d'Alexandrium catenella maintenues en semi-continu.*



## Contexte, résumé et perspectives

---

L'apparition d'*Alexandrium catenella* dans l'Etang de Thau en 1995 a fait suite à une diminution des concentrations en phosphate de 90 % entre 1970 et 1995 (Souchu et al. 1998), résultant de l'implantation de systèmes de traitements des eaux usées (La Jeunesse & Elliott 2004). Les concentrations en phosphate mesurées sont ainsi passées de 10  $\mu\text{M}$  à 1  $\mu\text{M}$  en été et de 3  $\mu\text{M}$  à des valeurs indétectables ( $< 0,03 \mu\text{M}$ ) en hiver au cours de cette phase d'oligotrophisation des eaux (Collos et al. *sous presse*). La coïncidence observée entre la baisse de concentrations en phosphate et l'émergence d'*A. catenella* suggère qu'une niche écologique favorable au développement de cette espèce toxique est apparue dans les années 90.

Différentes espèces d'*Alexandrium*, dont *A. catenella*, sont capables de diversifier leurs sources potentielles de phosphore grâce à la synthèse d'enzymes particulières appelées phosphatases alcalines (Flynn et al. 1996 ; Ou et al. 2008). Ces enzymes permettent aux cellules les synthétisant de récupérer des phosphates à partir de la fraction de phosphore organique dissous. Elles représentent donc un avantage compétitif en cas de limitation en phosphate du milieu.

Dans ce contexte, des expérimentations, présentées dans le **Chapitre 1**, ont été menées en culture afin de caractériser les capacités d'absorption du phosphore par *A. catenella* en cas de limitation en phosphate. L'utilisation potentielle des fractions inorganique et organique dissoutes y a été étudiée grâce à des mesures de vitesses d'absorption du phosphate et d'activité des phosphatases alcalines.

### **RESUME DU CHAPITRE 1 – Capacité d'assimilation du phosphore par *Alexandrium catenella* en condition de limitation en phosphate**

*Alexandrium catenella* est un dinoflagellé toxique responsable d'efflorescences récurrentes dans l'Etang de Thau (Sud de la France) depuis 1995. L'apparition de cette espèce a fait suite à une forte diminution (90 % entre 1971 et 1994) de la concentration en phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) du milieu. Pour déterminer si *A. catenella* présente un avantage compétitif en cas de

limitation en  $\text{PO}_4^{3-}$ , ses capacités de prélèvement du P inorganique et organique dissous ont été analysées le long d'un gradient de limitation en  $\text{PO}_4^{3-}$ , au cours d'expérimentations en semi-continu. Pour cela, des mesures de taux de prélèvement de  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ , d'activité des phosphatases alcalines (APA) et de quotas intracellulaires en P ( $Q_{p/cell}$ ) ont été réalisées le long d'un gradient de taux de dilution. Les vitesses maximales ( $V_{max}$ ) d'absorption du  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  et d'hydrolyse des phosphatases sont apparues plus élevées aux faibles taux de dilution, indiquant des capacités d'adaptations physiologiques des cellules à un état de limitation en  $\text{PO}_4^{3-}$ . Ces flux de P seraient plus fortement contrôlés par la concentration extracellulaire en  $\text{PO}_4^{3-}$  que par  $Q_{p/cell}$ . Un seuil de déclenchement de la synthèse des PA, compris entre  $0,4 \mu\text{M}$  et  $1,0 \mu\text{M}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ , a pu être mis en évidence. Des concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  inférieures à  $0,4 \mu\text{M}$  étant régulièrement mesurées au cours des efflorescences d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau, une part significative de la croissance de ces cellules serait basée sur l'utilisation des composés organiques phosphorés.

Cette étude a permis de préciser, de manière indirecte, que la nutrition phosphorée d'*A. catenella* lors des efflorescences serait en partie mixotrophe, grâce à l'utilisation de la fraction organique dissoute par action des phosphatases alcalines. En complément, des mesures *in situ* de l'activité de ces enzymes ont donc été tentées au cours d'une efflorescence d'*A. catenella* lors du printemps 2007 ; elles sont présentées dans le **Chapitre 2**. Cependant, les résultats obtenus ont montré les limites des méthodes fluorimétriques dans l'estimation de l'activité des phosphatases alcalines (APA) *in situ*. La réalisation d'une méthode de marquage à l'ELF serait intéressante à tester et employer en complément d'une méthode quantitative de mesure d'APA : elle permettrait d'estimer, dès le début d'une efflorescence, le mode de nutrition phosphorée (mixotrophe ou non) d'*A. catenella*.

Dans tous les cas, des mesures quantitatives d'APA *in situ*, au cours d'efflorescences futures d'*A. catenella*, sont à prévoir afin d'estimer la contribution du phosphore organique dans la nutrition de cette espèce au cours de ses développements dans l'Etang de Thau. Cette quantification du flux entre phosphore organique et population d'*A. catenella* apparaît majeure pour la compréhension des processus de contrôle des efflorescences, entre autres par les éléments nutritifs.

## Principes méthodologiques majeurs

---

Les expérimentations réalisées en vue de paramétrer l'absorption du phosphore par *A. catenella* et d'étudier l'utilisation potentielle du phosphore organique dissous (POD) par cette espèce ont été effectuées au laboratoire DYNECO/Pelagos d'Ifremer Brest. Elles ont fait appel à deux modes de mise en culture différents (culture en batch et en semi-continu) qui ont permis d'obtenir des résultats de réponses cellulaires en fonction d'un gradient de limitation en phosphate.

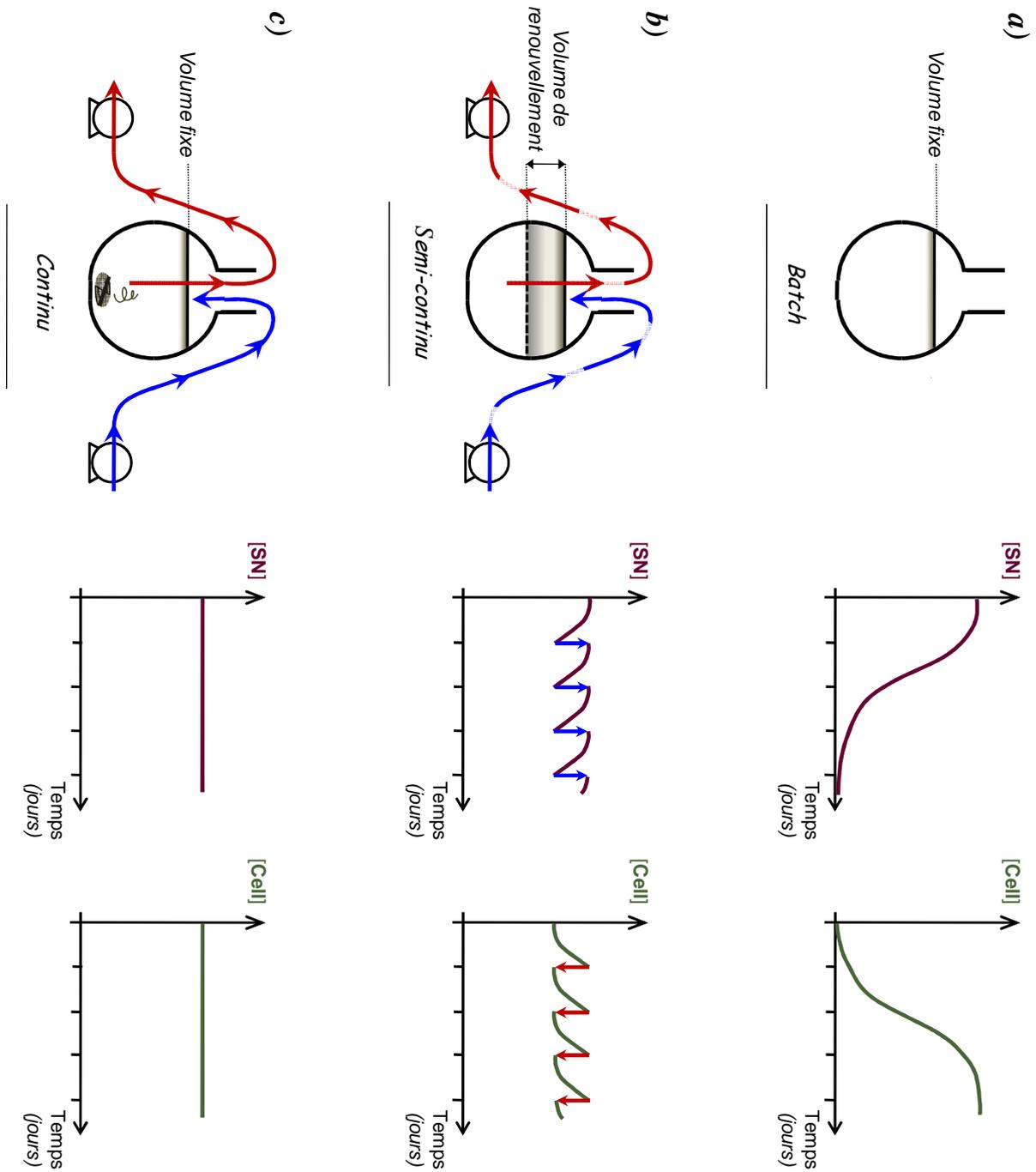
### I- MODE DE CULTURE EMPLOYE

#### *1- Description des différents modes de culture d'algues existants*

Une culture d'algue peut être mise en place suivant trois modes, en batch, en semi-continu et en continu, schématisés sur la Figure 1. Ces modes de culture se différencient exclusivement par la régulation des apports en nutriments réalisée. Pour comparer ces modes, on considérera donc que les autres facteurs de contrôle de la croissance algale (comme la lumière et la température) sont maintenus à un taux optimum pour la croissance grâce à une régulation adéquate en chambre de culture.

Pour une culture en *batch*, un apport unique en éléments nutritifs est effectué au moment de l'inoculation de la culture : les cellules sont alors repiquées dans un milieu enrichi, sans aucun apport ultérieur en nutriments. La population va croître de manière exponentielle en consommant le stock disponible en nutriments, jusqu'à atteindre une phase stationnaire, correspondant au plateau observé dans le suivi temporel de la densité cellulaire (Figure 1 a), lorsque l'un des éléments constitutifs du milieu nutritif arrive à épuisement.

Une culture maintenue en *semi-continu* va recevoir des apports réguliers en nutriments, en général journaliers. Chaque apport se fera par le biais du remplacement d'une partie du volume de la culture par du milieu neuf : cette étape est appelée *renouvellement*. Le rapport entre volume de renouvellement et volume total de la culture définit le taux de



**Figure 1 :** Représentation des trois modes de culture algale, en batch (a), en semi-continu (b) et en continu (c). L'allure théorique des variations de la concentration en sels nutritifs ([SN]) et en cellules ([Cell]) dans le milieu est présentée pour chaque mode.

renouvellement, également nommé *taux de dilution*. Ce renouvellement a deux conséquences : il permet, d'une part, d'augmenter la concentration disponible en nutriments en remplaçant un volume où les éléments nutritifs ont été partiellement consommés par un volume pleinement enrichi, mais provoque, d'autre part, une diminution du nombre de cellules due au retrait d'une partie de la culture. En maintenant une culture à un taux de dilution constant, la population finit par atteindre un état d'équilibre où le taux de croissance compense exactement la perte de densité cellulaire due au renouvellement, comme représenté sur la Figure 1 b.

Une culture maintenue en *continu* subit un renouvellement permanent. Grâce à un appareillage adapté, un flux régulier de milieu nutritif neuf est introduit dans la culture, alors qu'un flux équivalent de milieu riche en cellules en est retiré. Ce système permet d'atteindre un état d'équilibre mieux défini (Figure 1 c), mais nécessite une agitation permanente de la culture afin d'homogénéiser le milieu.

## 2- *Choix du mode de culture*

Le choix entre ces modes de culture dépend des processus que l'on cherche à étudier et des contraintes expérimentales.

### *a- Intérêts et contraintes des cultures en batch*

Des cultures en batch peuvent être représentatives de processus de croissance cellulaire en milieu complet si le temps d'incubation choisi est bien plus court que la période nécessaire à épuiser les ressources nutritives. Ce type de culture peut également servir à obtenir une culture graduellement limitée en nutriments, mais dont les états successifs de limitation sont difficiles à étudier. En effet, tout prélèvement diminue le volume total de la culture, il faut donc s'assurer que le volume prélevé n'ait pas d'influence significative sur le comportement des cellules, ou bien fractionner la culture mère en sous-échantillons afin de les maintenir en conditions similaires, comme réalisé au cours du chapitre précédent.

### *b- Intérêts et contraintes des cultures en continu et semi-continu*

Les cultures en continu et semi-continu permettent d'obtenir un état d'équilibre caractérisé par un taux de croissance fixe, dont les paramètres peuvent être facilement étudiés

à partir du volume retiré au cours du renouvellement. Une modification dans la composition nutritive du milieu de renouvellement permet d'atteindre un état d'équilibre spécifique, fixé par la concentration en l'élément limitant et par le taux de dilution de la culture. Ainsi, un renouvellement des cultures par un milieu de composition équivalente à un milieu complet pour tous les éléments nutritifs sauf le phosphate (introduit en concentration plus faible) peut permettre de mettre en place des cultures à l'équilibre représentant différents états de limitation en phosphate en faisant varier le taux de dilution : plus les cultures auront un taux de dilution faible, plus elles seront limitées en phosphate. A un tel gradient de limitation est alors associé à un gradient de taux de croissance suivant le précepte « plus les cellules sont limitées en nutriments, moins leur croissance est forte ». Une estimation des taux de croissance associés à chaque taux de dilution est alors possible à condition que les cultures soient à l'équilibre et que les seuls facteurs de contrôle du métabolisme des cellules algales soient le taux de dilution et la concentration en l'élément limitant du milieu de renouvellement. Ces principes seront discutés dans le chapitre suivant, aux vues des résultats obtenus pour *A. catenella* le long d'un gradient de limitation en phosphate.

Les cultures maintenues en continu présentent comme avantages par rapport au semi-continu de mettre en place des états d'équilibre mieux définis et de limiter les contaminations bactériennes grâce à une automatisation du circuit de renouvellement. Mais elles présentent comme désavantages de nécessiter un appareillage lourd et un brassage continu des cultures.

### c- *Protocole choisi*

Le but des expérimentations menées était d'étudier la réponse cellulaire d'*A. catenella* en fonction de conditions variables de limitation en phosphate. L'étude de divers paramètres en parallèle nécessitant un volume de prélèvement important, il a donc été choisi d'utiliser des cultures renouvelées. Comme *A. catenella* est une espèce sensible à l'agitation, le gradient de limitation en phosphate a été obtenu par le biais de cultures maintenues en semi-continu, ce qui permettait de limiter le stress des cellules en n'effectuant qu'une seule homogénéisation par jour, au moment du renouvellement. Afin d'obtenir de manière assez rapide des états proches de l'équilibre, une culture en batch en gros volume a été entretenue en début d'expérimentation. Elle a permis d'obtenir, au bout d'une semaine, une biomasse abondante dans un milieu à faible concentration en phosphate. Ainsi, cette culture mère a pu être répartie dans différents ballons afin d'assurer l'ensemencement de toutes les cultures utilisées en

semi-continu, tout en apportant une concentration en phosphate cohérente avec le gradient d'apports qui allait être mis en place en semi-continu.

## II- ESTIMATION DES PARAMETRES ASSOCIES AUX STOCKS ET FLUX DE PHOSPHORE

### 1- *Identification et estimation des différentes formes de phosphore*

Le phosphore existe sous différentes formes dans l'environnement marin, qui peuvent être identifiées par rapport à deux critères majeurs : la composition chimique et la taille des composés phosphorés. La composition chimique permet de définir deux fractions parmi ces composés, la fraction minérale (dite *inorganique*) et la fraction *organique*, qui se distinguent par le fait qu'une molécule organique est constituée d'au moins deux atomes de carbone formant un squelette carboné et de plusieurs liaisons carbone-hydrogène. La taille du composé phosphoré permet de séparer la fraction *dissoute* (molécules traversant un filtre de 0.2 µm au cours d'une filtration d'eau de mer) de la fraction *particulaire* (molécules associées aux particules restant piégées sur un filtre de 0.2 µm).

La combinaison de ces critères définit quatre fractions : le phosphore inorganique dissous (PID, correspondant aux ions *phosphates*), le phosphore organique dissous (POD), le phosphore inorganique particulaire (PIP) et le phosphore organique particulaire (POP). Le POD correspond à la seule fraction qui n'ait pas été estimée au cours des expérimentations réalisées.

#### *a- Phosphore inorganique dissous*

Les ions phosphates formant le PID correspondent aux anions associés à la dissociation de l'acide phosphorique suivant les réactions :



Les abondances relatives de ces ions phosphates sont dépendantes du pH, de la température et de la disponibilité d'autres cations et anions présents dans le milieu. Dans les conditions physico-chimiques de l'eau de mer, la principale forme de DIP est l'ion orthophosphate  $\text{HPO}_4^{2-}$  (~ 87 %) (Cembella et al 1984). La forme  $\text{PO}_4^{3-}$  correspond à la seconde forme

majeure de DIP, libre ou associée à des cations tels que le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sous forme de sels.

La concentration en PID dans les échantillons d'eau de mer est souvent estimée par formation de phosphomolybdate en milieu acide, suivant la méthode développée par Murphy & Riley (1962). Cependant, l'étape d'acidification provoque l'hydrolyse d'une partie du POD (principalement des monoesters de phosphate et des sucres simples) présent dans l'échantillon. Cette hydrolyse non-contrôlée entraîne une surestimation de la concentration en PID (Benitez-Nelson, 2000 et travaux cités dans cette revue bibliographique). La fraction mesurée par cette technique est donc souvent appelée *phosphore réactif soluble* plutôt que PID ou phosphates.

Dans la suite du manuscrit, on utilisera la notation «  $\text{PO}_4^{3-}$  » pour représenter la fraction de phosphore mesurée par la méthode de Treguer & Le Corre (1975) ici employée pour estimer le PID.

#### *b- Phosphore particulaire*

Trois méthodes, Solórzano & Sharp (1980), Raimbault et al (1999) et Tovar-Sanchez et al (2003), ont été utilisées pour estimer le phosphore particulaire au cours des expérimentations.

La méthode de Solórzano & Sharp (1980) est basée sur un processus de calcination couplé à une attaque acide qui permet de libérer le phosphore cellulaire sous forme de  $\text{PO}_4^{3-}$ , y compris le PIP présent dans les cellules sous forme de phosphates de fer, d'aluminium ou de calcium ainsi que de polyphosphates. La concentration de  $\text{PO}_4^{3-}$  obtenue en fin de réaction donne alors une estimation de la quantité de phosphore particulaire total (PPT = PIP + POP) contenue dans l'échantillon.

La méthode de Raimbault et al (1999), s'effectuant à pH légèrement basique, ne permet pas de prendre en compte le PIP intracellulaire et fournit donc une estimation proche du POP de l'échantillon. Cette méthode fait appel à une oxydation au persulfate de potassium et permet d'estimer le phosphore particulaire par mesure de la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  ainsi libéré.

Cependant, une partie du phosphore estimé par ces méthodes n'est pas intégrée au matériel cellulaire, mais adsorbé à la surface des cellules. Afin de vérifier que cette fraction de phosphore adsorbé ne mène pas à une surestimation des mesures de PPT et POP, les protocoles de Solórzano & Sharp (1980) et Raimbault et al (1999) ont été suivis avec ou sans

désorption préalable de ces molécules phosphorées par ajout d'oxalate suivant la méthode décrite par Tovar-Sanchez et al (2003).

L'efficacité et la significativité de ces différentes méthodes seront discutées dans le chapitre suivant par comparaison des résultats obtenus pour des cellules d'*A. catenella* en cultures.

## 2- Estimation des vitesses d'absorption du $PO_4^{3-}$

Parmi les sept formes isotopiques du phosphore (voir l'introduction de la Partie I pour des compléments d'informations sur les isotopes), seul le  $^{31}P$  est stable et représente ainsi l'élément le plus abondant naturellement. Le suivi de l'absorption du phosphore par les cellules ne peut donc pas être réalisé par marquage à l'isotope stable comme pour l'azote ou le carbone : il nécessite l'emploi d'un isotope radioactif. Les formes  $^{28}P$ ,  $^{29}P$ ,  $^{30}P$  et  $^{34}P$  ont une durée de vie extrêmement brève (de moins d'une seconde à quelques minutes) les rendant inadéquats pour une utilisation en expérimentation. Le  $^{32}P$  et le  $^{33}P$  sont les seules formes isotopiques compatibles avec des mesures d'absorption grâce à des durées respectives de demi-vie de 14,3 et 25,3 jours. Au cours des expérimentations menées sur *A. catenella*, la forme isotopique utilisée a été le  $^{33}P$  car sa demi-vie plus longue et son énergie de désintégration moins élevée rendent son utilisation moins dangereuse et contraignante.

Pour estimer les capacités d'absorption du  $PO_4^{3-}$  par *A. catenella*, des incubations courtes ont été mises en place avec ajout initial de  $^{33}PO_4^{3-}$ . Après l'arrêt des incubations par filtration, des mesures d'incorporation du  $^{33}P$  dans le matériel cellulaire étaient réalisées à partir des filtres obtenus, par comptage en scintillation liquide. Pour cela, les filtres étaient placés dans un liquide scintillant dont les substances fluorescentes réagissent aux rayonnements radioactifs par émission de photons. La quantité de photons émise, représentative de la quantité de  $^{33}P$  présent sur chaque filtre, était estimée en coups par minute (cpm) au niveau d'un compteur de radioactivité. Une estimation des vitesses d'absorption du  $PO_4^{3-}$  par *A. catenella* était alors obtenue en divisant les quantités de radioactivité mesurées par le temps d'incubation.

### 3- *Activité des phosphatases alcalines (APA)*

Le POD peut correspondre à une autre source de phosphore pour les cellules phytoplanctoniques, à condition que ces cellules aient synthétisé au niveau de leur membrane des enzymes particulières nommées *phosphatases alcalines* (PA). En milieu marin, ces enzymes permettent de libérer du  $\text{PO}_4^{3-}$  à partir des molécules organiques dissoutes, le rendant ainsi disponible pour les cellules. Ces enzymes agissent par catalyse de l'hydrolyse des liaisons phosphomonoester ( $-\text{C}-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$ ), sans spécificité par rapport au type de substrat organique (Chrost 1991).

Les phosphatases alcalines ne sont pas spécifiques du phytoplancton : elles sont, entre autres, également synthétisées par des bactéries et des protozoaires. L'estimation de l'activité des enzymes associées exclusivement aux cellules phytoplanctoniques nécessite donc la réalisation d'un *fractionnement* pour tout échantillon d'eau *in situ* ou provenant d'une culture *non-axénique* (non-stérile, contenant des bactéries). Un tel fractionnement consiste à réaliser des filtrations en parallèle à différentes porosités, à partir de sous-échantillons ; les porosités sont choisies de manière à pouvoir « encadrer » au mieux la taille des cellules étudiées. Dans le cas des cellules d'*A. catenella* (taille comprise entre 23 et 36  $\mu\text{m}$ ) en cultures non-axéniques, un fractionnement a été réalisé par filtration sur 0.2  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ . L'activité associée aux cellules d'*A. catenella* était alors estimée par différence entre l'activité mesurée dans l'échantillon total et celle mesurée dans le filtrat après filtration sur 10  $\mu\text{m}$ . L'activité estimée dans le filtrat obtenu après filtration sur 0.2  $\mu\text{m}$  a permis d'estimer l'APA dissoute. En effet, la liaison entre l'enzyme et la membrane cellulaire est parfois fragilisée et peut se rompre. Estimer cette activité dans la fraction inférieure à 0.2  $\mu\text{m}$  permet alors de vérifier que l'APA cellulaire calculée est bien représentative de l'activité de l'ensemble des enzymes synthétisées au cours des incubations.

Les mesures d'APA ont ici été réalisées en estimant le taux d'apparition d'un produit fluorescent (le methylumbelliferyl, le MUF) après hydrolyse du substrat ajouté (le methylumbelliferyl-phosphate, MUF-P) au cours d'incubations réalisées au noir afin d'éviter toute dégradation du produit fluorescent.

CAPACITES D'ASSIMILATION DU PHOSPHORE PAR *ALEXANDRIUM*  
*CATENELLA* EN CONDITION DE LIMITATION EN PHOSPHATE

**GROWTH AND PHOSPHORUS UPTAKE RESPONSE BY THE TOXIC  
DINOFLAGELLATE *ALEXANDRIUM CATENELLA* TO PHOSPHATE LIMITATION**

Jauzein C.<sup>ab</sup>, Labry C.<sup>c</sup>, Youenou A.<sup>c</sup>, Quéré J.<sup>c</sup>, Delmas D.<sup>c</sup>, Collos Y.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Laboratoire LER-LR, Sète

<sup>b</sup> Université Montpellier 2, UMR 5119 UM2-CNRS-IFREMER,  
Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, Montpellier

<sup>c</sup> IFREMER/Centre de Brest, Laboratoire DYNECO-Pelagos, Plouzané

**ABSTRACT :**

*Alexandrium catenella* has exhibited seasonal recurrent blooms in the Thau lagoon (South of France) since its first report in 1995. Its appearance succeeded to a strong decrease (90%) in phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) concentrations in this environment during two decades. To determine if this dinoflagellate species presents a competitive advantage in  $\text{PO}_4^{3-}$  limited conditions, semi-continuous cultures were carried out to characterize P-uptake by *A. catenella* cells along a P-limitation gradient using different dilution rates. Both inorganic and organic P-sources were tested measuring respectively  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ -uptake and alkaline phosphatase activity (APA), and cells P-status was estimated from cellular phosphorus contents ( $\text{Q}_{\text{p/cell}}$ ). The maximal uptake rate of  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  increased strongly with the decrease in dilution rate displaying physiological adaptations to  $\text{PO}_4^{3-}$ -limitation. Concerning maximal APA per cell, the observation of an all-or-nothing pattern along the dilution gradient suggests that synthesis of AP was induced and maximized at the cellular scale as soon as  $\text{PO}_4^{3-}$ -limitation set in. However, only weak relations could be defined between P-uptake processes and  $\text{Q}_{\text{p/cell}}$ , indicating that extracellular  $\text{PO}_4^{3-}$  rather than  $\text{Q}_{\text{p/cell}}$  seemed to be the main factor controlling P-uptake by *A. catenella* cells. The synthesis of AP was repressed over a  $\text{PO}_4^{3-}$  threshold comprised between 0.4 and 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Lower  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations being regularly reached during *A. catenella* blooms in Thau lagoon, a significant part of P-uptake by *A. catenella* cells in the field may come from organic compounds.

## I- INTRODUCTION

Phosphorus (P) deficiency in marine systems has been reported for several open-ocean areas and coastal waters (Vidal et al. 2003; Labry et al. 2005; Thingstad et al. 2005) and may lead to growth limitation of both phytoplankton and heterotrophic bacteria communities (Thingstad et al. 1998). In such environments, a significant fraction of the total dissolved phosphorus pool (TDP) often corresponds to dissolved organic phosphorus (DOP) (Karl & Yanagi 1997; Karl & Björkman 2002; Suzumura & Ingall 2004), making the enzymatic remineralization of organic P compounds a key process in species competitiveness.

In the Thau lagoon (South of France), the role of organic P compounds may have become more critical for organisms nutrition as a strong decrease in phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) concentrations has been observed for the last four decades, summer values dropping from  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  to  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and winter values from  $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  to undetectable ( $<0.03 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Collos et al. *in press*). This oligotrophication has principally occurred during the 1970-1995 period, over which annual mean values have decreased by 90 % (Souchu et al. 1998) as a consequence of effective implementation of waste water collection and treatment facilities (La Jeunesse & Elliott 2004). The end of this period coincided with the first report of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Thau lagoon waters, followed by a first PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) toxic event in 1998 (Lilly et al. 2002; Collos et al. *in press*). Ever since 1998, seasonal recurrent blooms of *A. catenella* have been observed, suggesting the oligotrophication has created a niche where *A. catenella* may perform an effective growth.

To determine if this species presents a competitive advantage in  $\text{PO}_4^{3-}$  limited conditions, we investigate P-uptake characteristics of *A. catenella* cells along a P-limitation gradient. *Alexandrium sp.*, and in particular *Alexandrium catenella*, are known to produce alkaline phosphatases (Oh et al. 2002; Ou et al. 2006) in case of  $\text{PO}_4^{3-}$  deficiency. These enzymes hydrolyze ester bonds between  $\text{PO}_4^{3-}$  and dissolved organic compounds, making  $\text{PO}_4^{3-}$  available for cellular assimilation (Perry 1972). In the present study, both inorganic and organic P-sources were examined, carrying out  $\text{PO}_4^{3-}$ -uptake and alkaline phosphatase activity (APA) measurements.

## II- MATERIALS AND METHODS

### 1- *Experimental design*

Two Thau lagoon strains of *A. catenella* were tested: TL01 and ACT03, isolated respectively in 1998 and 2003. Nonaxenic cultures were maintained on ESAW artificial seawater (Andersen et al. 2005) at 20°C and were illuminated with  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  under a 12h light : 12h dark cycle.

For each strain, one stock culture was used to inoculate 14 3L-flasks using ESAW medium with  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration limited to ESAW/4 (N:P = 98). These cultures were run under batch conditions until  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations were reduced to less than  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The cultures were then maintained semi-continuously renewing a part of the medium every 24 h. The fresh medium used for dilutions was based on ESAW composition with modified  $\text{PO}_4^{3-}$  and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentrations, corresponding to  $9.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $882.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively (N:P = 98). Seven dilution rates (DRs) were assayed (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40,  $0.50 \text{ d}^{-1}$ ) with replicated cultures. After each renewal, the withdrawn water samples were used to measure  $\text{PO}_4^{3-}$  and *A. catenella* cells concentrations.

After nine days of semi-continuous conditions, additional measurements of maximal  $\text{PO}_4^{3-}$ -uptake rate, maximal alkaline phosphatase activity (APA) and cellular composition parameters were performed for each DR during three successive days. These measurements were done using withdrawn water samples from both replicated cultures mixed together and the day-by-day results obtained were considered as triplicates. They were followed by additional kinetics measurements testing three different DR conditions ( $0.15 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.2 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.3 \text{ d}^{-1}$  for TL01 and  $0.1 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.15 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.2 \text{ d}^{-1}$  for ACT03), realized over the next three days of experiments. Each kinetic experiment was performed using the whole of a 3L-flask.

### 2- *Chemical measurements and cells counts*

Phosphate concentrations in water samples were measured on an autoanalyzer AACE Bran and Luebbe following Treguer and Le Corre (1975).

For measurements of particulate phosphorus and carbon, water samples were filtered on pre-combusted (12 h at 400°C) 25 mm Whatman GF/D filters which were then maintained at -20°C until analysis. Different fractions of particulate phosphorus were estimated. The total particulate phosphorus (TPP) was measured according to Solórzano & Sharp (1980). The

particulate organic phosphorus (POP) was determined based on the method of Raimbault et al. (1999). As a complement, the contribution of  $\text{PO}_4^{3-}$  adsorbed on cells surface in these estimations was analyzed testing the influence of an initial addition of oxalate reagent following Tovar-Sanchez et al. (2003). Measurements of particulate organic carbon (POC) were performed using a carbon-nitrogen elemental analyzer (VarioEL III Elementar).

Cells concentrations and colonies enumerations were estimated from water samples fixed with formaldehyde addition (final concentration of 5%), counting the cells under microscope using a haemocytometer.

### ***3- $\text{PO}_4^{3-}$ -uptake rate***

Rates of  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake were measured using the  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  incorporation technique. During the first three days of semi-continuous experiments, incubations were performed to estimate maximal uptake rates ( $V_{p_{\max}}$ ) for each DR. After adjusting the  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration of water samples to  $6.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , incubations started with the addition of  $20 \mu\text{Ci } ^{33}\text{PO}_4^{3-}$  and were ended by addition of 4 % formaldehyde final concentration. Different incubation times ranging from 5 min to 6 h were tested and  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates were calculated on the linear part of the  $^{33}\text{P}$  incorporation time series. For kinetics experiments, similar incubations were performed by adding graded  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and  $6.4 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) and  $16 \mu\text{Ci } ^{33}\text{PO}_4^{3-}$  to subsamples. At the end of incubations, samples were filtered on  $8 \mu\text{m}$  25 mm Millipore filters with or without 5 mL oxalate washing as described by Tovar-Sanchez et al. (2003) for surface-adsorbed P determination. Then, filters were rinsed twice with 5 mL of  $0.2 \mu\text{m}$  filtered AW water and stored with 4 mL of scintillation cocktail until they were counted with a liquid scintillation counter (Wallac 1414).

### ***4- Alkaline phosphatase activity***

APA measurements were performed in duplicates after pre-filtration of the water-samples through  $0.2$  or  $10 \mu\text{m}$  polycarbonate filters. From the fractionated APA measurements, APA associated with *A. catenella* cells was determined by subtracting the APA in the  $<10 \mu\text{m}$  fraction from the total APA and APA obtained from the  $0.2 \mu\text{m}$  filtrate was regarded as soluble APA.

Fractionated APA was assayed by using the fluorogenic substrate methyl-umbelliferyl phosphate (MUF-P) (Hoppe 1983; Ammerman 1993). During the three days of semi-

continuous experiments, a MUF-P final concentration of  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  was added to 2mL-water samples to determine maximal hydrolysis rates along the DR gradient. For kinetics experiments, ten MUF-P final concentrations ranging from 0.5 to  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  were used. Incubations were carried out in the dark at  $20^{\circ}\text{C}$  and were ended by formaldehyde addition, with final concentration of 4 %, and by freezing the samples at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Incubations stop was performed when APA variations with time were still linear, avoiding saturation of enzymatic sites and hydrolysis of the main part of available MUF-P. In this way, incubation were performed during 30 - 60 min for the DR gradient analysis (incubation time increased with increasing DR) and during 15 min or 30 min for kinetics experiments (15 min when substrate concentration was lower than  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). The concentrations of the dephosphorylated fluorescent product 4-methyl-umbelliferone (MUF) at the end of incubations were estimated from fluorescence (365 nm excitation and 460 nm emission) measured by flow injection analysis (Delmas et al. 1994; Labry et al. 2005). To convert units of MUF fluorescence into concentration values, a calibration curve ( $R^2 > 0.999$ ) was performed with standard solutions of MUF in the range  $0.02\text{-}20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### ***5- Modeled curves and kinetic parameters***

Data from kinetics experiments were used to compute maximal uptake rates ( $V_{\text{max}}$ ) and half-saturation constants ( $K_S$ ) of  $\text{PO}_4^{3-}$ -uptake rate and APA, fitting the data to the Michaelis-Menten model by nonlinear regressions.

We tested our data against the Droop model (1968) from quota measurements and theoretical growth rates estimated as  $\mu \text{ (d}^{-1}\text{)} = -\ln(1 - \text{DR (d}^{-1}\text{)})$  (Tilman & Kilham 1976).

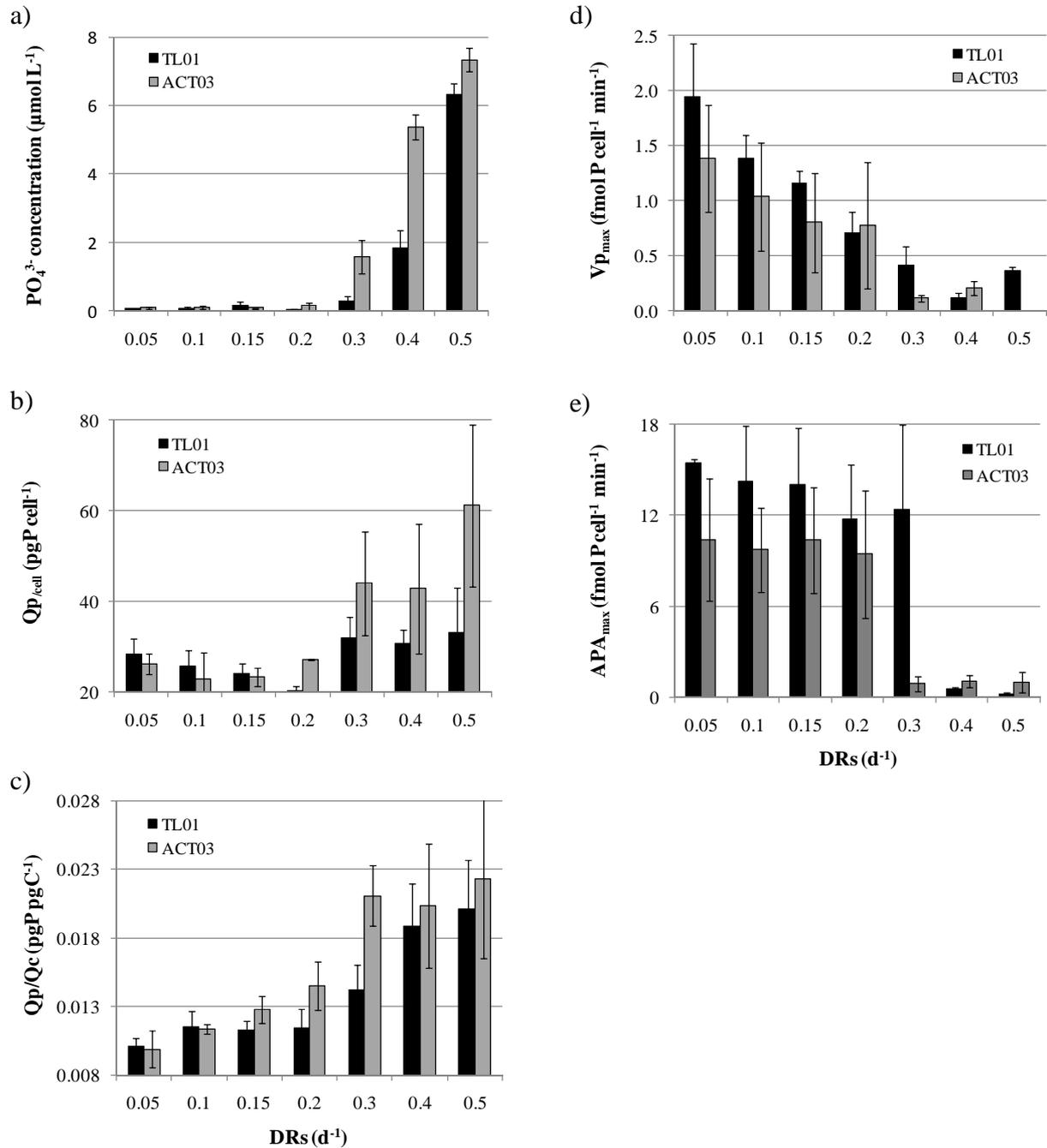
## **III- RESULTS**

Data presented along the DR gradient corresponded to mean values compiled from the three successive days of experiments in semi-continuous conditions.

### ***1- Phosphate concentrations and cells enumerations***

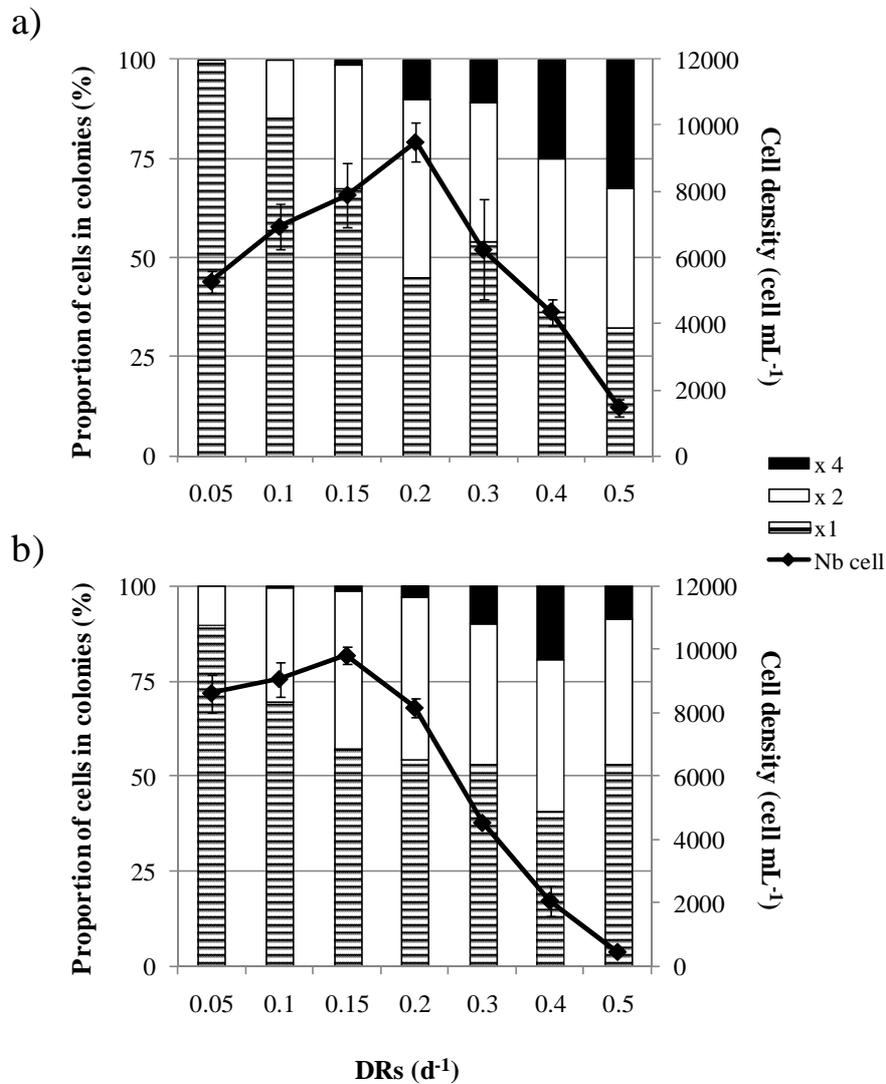
Measurements of  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations in the TL01 and ACT03 cultures are presented as a function of DR in Figure 1a. For both strains, a net decrease in phosphate concentrations with decreasing DR was observed between 0.5 and  $0.3 \text{ d}^{-1}$  and reached values lower than 0.3

$\mu\text{mol L}^{-1}$  for cultures diluted at  $0.2 \text{ d}^{-1}$  and less. Along this decrease, phosphate concentrations were significantly lower (two tailed t-test) in the TL01 cultures compared to the ACT03 cultures at DR of 0.4 and  $0.3 \text{ d}^{-1}$ .



**Figure 1** : Residual phosphate concentrations in the cultures (a), phosphorus content per cell of *Alexandrium catenella* (b), phosphorus content per cell carbon (c), maximal phosphate uptake per cell (d), maximal alkaline phosphatase activity per cell (e) as a function of dilution rates (DR) in semi-continuous cultures.

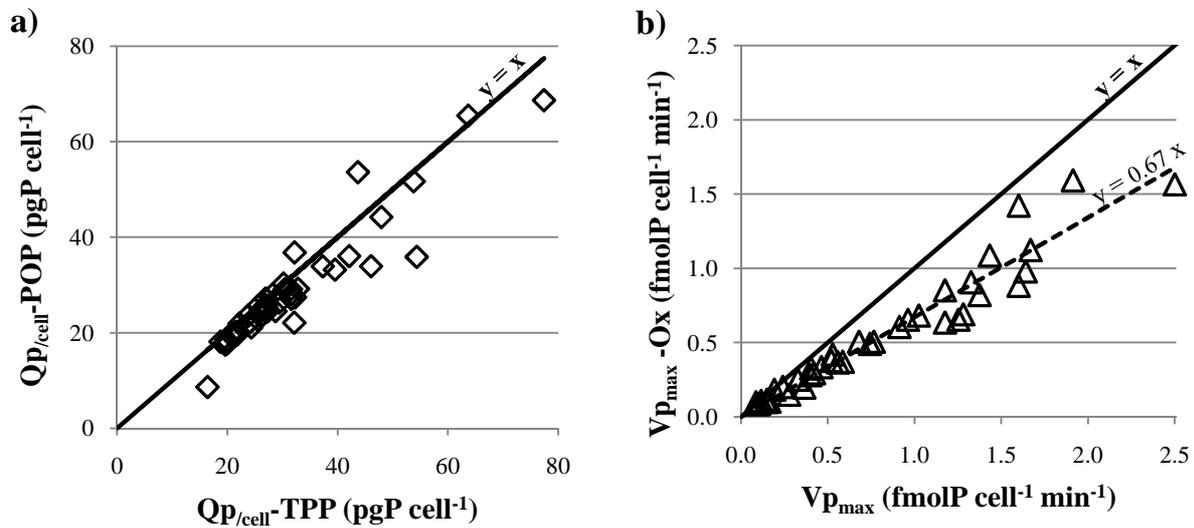
Along the dilution gradient, cell concentration showed a maximum at respective DR of 0.2 and 0.15 d<sup>-1</sup> for TL01 and ACT03 cultures (Figure 2). The maximum was particularly evident for TL01 with a decrease of 47 % between the maximal value and the density measured at the lowest DR (0.05 d<sup>-1</sup>). The DR associated with the maximal cell concentration also defined a threshold in colonies formation, even if the proportion of single cells decreased globally with increasing DR. At lower DRs, no four cell colonies were present and the percentage of two cell colonies increased as the DR increased. At higher DRs, four cell colonies were observed representing up to 32.3 % and 19.1 % of the TL01 and ACT03 populations respectively, and the proportion of cells in colonies of two appeared to be stationary with respective means values of 38.5 ± 4.6 % and 39.9 ± 2.5 % for TL01 and ACT03 (Figure 2).



**Figure 2** : Cell densities and cell distribution in colonies as a function of dilution rates (DR) in semi-continuous cultures of *Alexandrium catenella* strain TL01 (a) and ACT03 (b).

## 2- Cellular composition parameters

The two methods used to estimate particulate phosphorus, Solórzano & Sharp (1980) and Raimbault et al. (1999), showed a good concordance between their results, with a slight over-estimation observed for TPP estimations compared to POP estimations (Figure 3a). The addition of oxalate reagent did not allow to detect a significant  $\text{PO}_4^{3-}$  pool adsorbed on cells membrane as a regression slope of 1.02 ( $R^2 = 0.54$ ) was observed between data obtained with and without addition. In the following, TPP estimations based on the Solórzano & Sharp (1980) method without oxalate addition are used to represent the P-status ( $Q_p$ ) of *A. catenella* cells.



**Figure 3 :** Comparison of phosphorus cell content from (a) total particulate phosphorus (TPP, Solorzano & Sharp 1980) and particulate organic phosphorus (POP, Raimbault et al. 1999) in *Alexandrium catenella* and (b) maximal phosphate uptake rates with and without oxalate addition.

When expressed on a per cell basis,  $Q_p$  variations observed along the DR gradient globally followed the pattern of  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations (Figure 1b). For  $\text{DR} \leq 0.2 \text{ d}^{-1}$ , no trend was visible in the relationship between cellular  $Q_p$  ( $Q_{p/\text{cell}}$ ) and DR, as  $Q_{p/\text{cell}}$  values were constrained at low levels surrounding a mean value of  $24.8 \pm 2.6 \text{ pgP}\cdot\text{cell}^{-1}$  compiled from both strains measurements, with a minimum value ( $Q_{p/\text{cell-min}}$ ) of  $20.3 \text{ pgP}\cdot\text{cell}^{-1}$ . At higher DRs, a significant increase in  $Q_{p/\text{cell}}$  with the DR was apparent only for the ACT03 strain with a mean  $Q_p$  value ( $Q_{p/\text{cell-max}}$ ) of  $61.1 \pm 17.8 \text{ pgP}\cdot\text{cell}^{-1}$  obtained from triplicates at  $\text{DR} = 0.5 \text{ d}^{-1}$ . For TL01,  $Q_{p/\text{cell}}$  values appeared to be higher in the range of  $\text{DR} 0.3 - 0.5 \text{ d}^{-1}$ , however they only reached  $33.1 \pm 9.9 \text{ pgP}\cdot\text{cell}^{-1}$  at the highest DR.

Compiling  $Q_p$  and C concentration per cell ( $Q_C$ ) data, P quota values have also been estimated on a C unit basis ( $Q_p/Q_C$ , Figure 1c). Trends observed were different from the  $Q_{p/cell}$  variations: from a minimal value ( $Q_p/Q_{C-min} = 0.010 \pm 0.001 \text{ pgP.pgC}^{-1}$ ) obtained at the minimal DR,  $Q_p/Q_C$  increased regularly with increasing DR and reached a maximum plateau at an intermediate DR:  $0.4 \text{ d}^{-1}$  for TL01 (two-tailed t test) and  $0.3 \text{ d}^{-1}$  for ACT03 (repeated measures ANOVA). Taking into account results of both strains, this plateau was characterized by a mean value of  $0.021 \pm 0.001 \text{ pgP.pgC}^{-1}$ , slightly lower than the Redfield ratio ( $0.024 \text{ pgP.pgC}^{-1}$ ). This pattern of  $Q_p/Q_C$  variations along the DR was particularly visible for ACT03, for which a linear increase ( $R^2 = 0.95$ ) was observed between  $0.05 \text{ d}^{-1}$  and  $0.3 \text{ d}^{-1}$ .

As discussed below, only data obtained at DRs ranging from  $0.2 \text{ d}^{-1}$  to  $0.5 \text{ d}^{-1}$  for TL01 and  $0.15 \text{ d}^{-1}$  to  $0.5 \text{ d}^{-1}$  for ACT03 may be compatible with Droop's theory. Taking both strains as a whole, these data were fitted to Droop's model to estimate the theoretical minimum quota ( $q_0$ ) associated with a zero growth rate. From  $Q_p$  values expressed on a per cell basis, a value close to the  $Q_{p/cell-min}$  measurement was obtained,  $q_0 = 16.4 \text{ pgP.cell}^{-1}$  ( $r^2 = 0.54$ ). From  $Q_p$  estimations per cellular C unit, a  $q_0$  value ( $0.010 \text{ pgP.pgC}^{-1}$ ) equal to the  $Q_p/Q_{C-min}$  measurement was calculated from a better data fitting ( $r^2 = 0.67$ ).

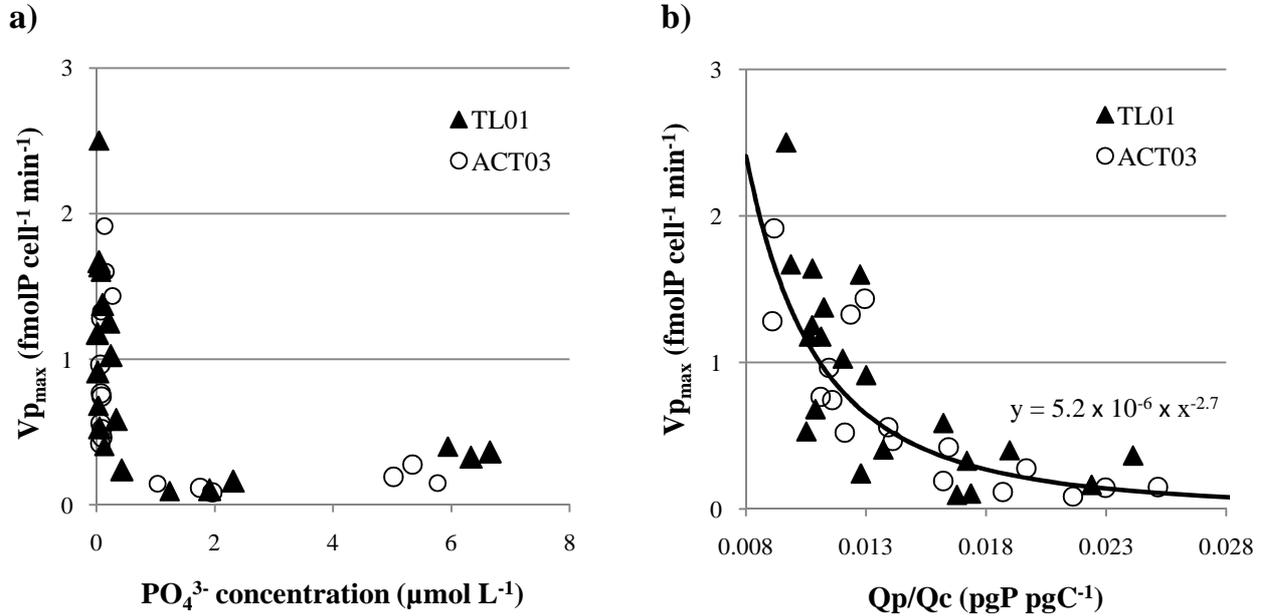
### 3- $^{33}\text{P}$ -uptake rates

For measurements of  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates along the DR gradient, the addition of oxalate reagent induced a drop of about 33 % in maximal  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  uptake estimations ( $V_{p_{max}}$ ) (Figure 3b). Uptake results presented below correspond to  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  uptake measurements without oxalate addition. Estimations corresponding to  $\text{DR} = 0.5 \text{ d}^{-1}$  for ACT03 strain were not taken into account as values obtained were clearly incoherent with the rest of the data.

Along the DR gradient,  $V_{p_{max}}$  showed a maximum at the lowest DR, corresponding to  $1.9 \text{ fmolP cell}^{-1} \text{ min}^{-1}$  and  $1.4 \text{ fmolP cell}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $0.129 \text{ h}^{-1}$  and  $0.097 \text{ h}^{-1}$  after division by  $Q_{p/cell}$ ) for TL01 and ACT03 respectively (Figure 1d). A regular decrease of  $V_{p_{max}}$  with the DR was observed as DR increased from  $0.05 \text{ d}^{-1}$  to  $0.3 \text{ d}^{-1}$  and a mean value of  $V_{p_{max}}$  of  $0.2 \pm 0.1 \text{ fmolP.cell}^{-1}.\text{min}^{-1}$  ( $0.014 \pm 0.009 \text{ h}^{-1}$ ) was obtained for  $\text{DR} \geq 0.3 \text{ d}^{-1}$ , compiling data of both strains.

Considering variations of  $V_{p_{max}}$  as a function of extracellular  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations (Figure 4a),  $V_{p_{max}}$  higher than  $0.42 \text{ fmolP cell}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $0.039 \text{ h}^{-1}$ ) were associated with  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations lower than  $0.34 \mu\text{mol L}^{-1}$ . When  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations were higher than this

threshold,  $V_{p_{\max}}$  was maintained at  $0.21 \pm 0.11 \text{ fmolP}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , corresponding to  $0.011 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ . No relationship was found between  $V_{p_{\max}}$  and  $Q_{p/\text{cell}}$ , but an exponential decrease was observed representing  $V_{p_{\max}}$  as a function of  $Q_p/Q_C$  ( $r^2 = 0.68$ ) (Figure 4b).



**Figure 4 :** Maximal phosphate uptake rates per cell of *A. catenella* as a function of (a) the residual phosphate and (b) the phosphorus content per cell carbon, in semi-continuous culture grown at various dilution rates.

From kinetics experiments testing three DR conditions for each strain, variations of  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates as a function of concentrations followed the Michaelis-Menten model with  $r^2 \geq 0.79$ . Considering the kinetics parameters values obtained, the maximal P-uptake rate  $V_{\max(\text{P})}$  showed a net decrease as the DR increased (Table 1), in accordance with previous trends observed in  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rate data (Figure 1d). Associated  $K_{S(\text{P})}$  values ranged between  $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $1.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for TL01 and between  $0.03$  and  $0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for ACT03 (Table 1).

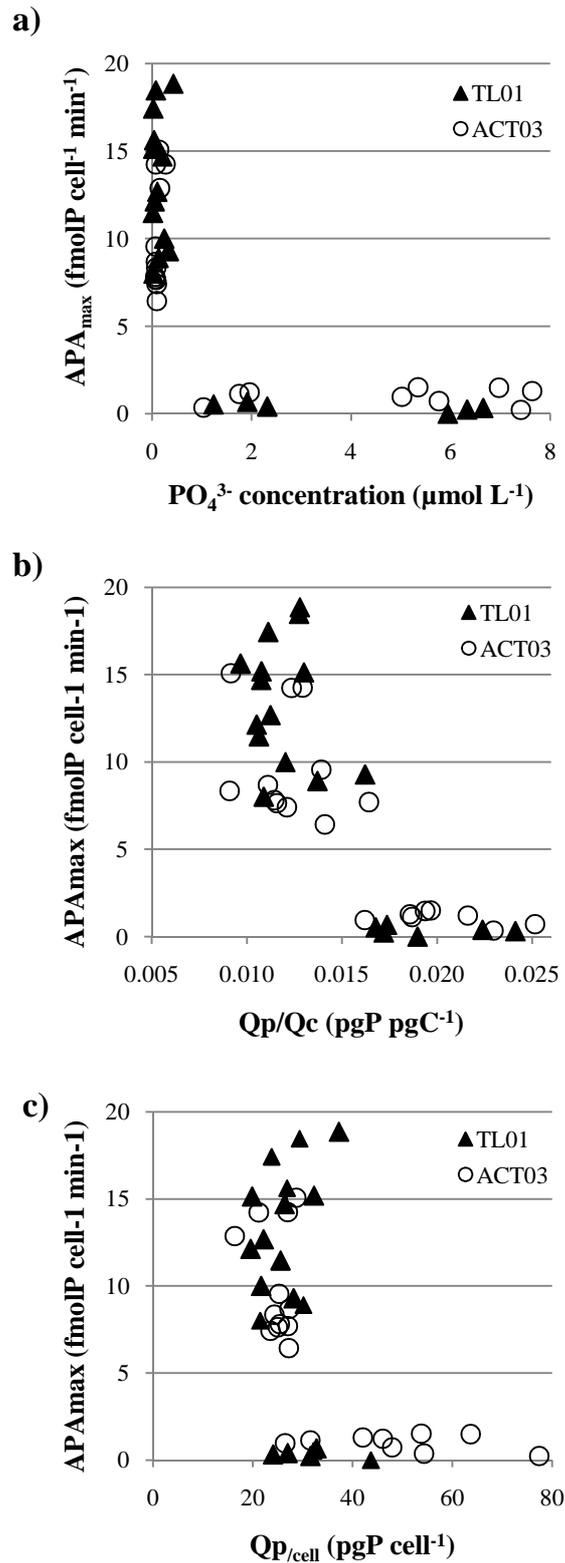
#### 4- APA measurements

The main part of the APA measured in the total fraction was cell-bound. The dissolved APA ( $< 0.2 \mu\text{m}$ ) represented less than 13% of the total APA for all measurements, while for most of the data (77%) it reached less than 5% of the total fraction.

Considering the variations of maximal APA per cell as a function of DR, values showed an all-or-nothing pattern (Figure 1e). Significant APA measurements were obtained

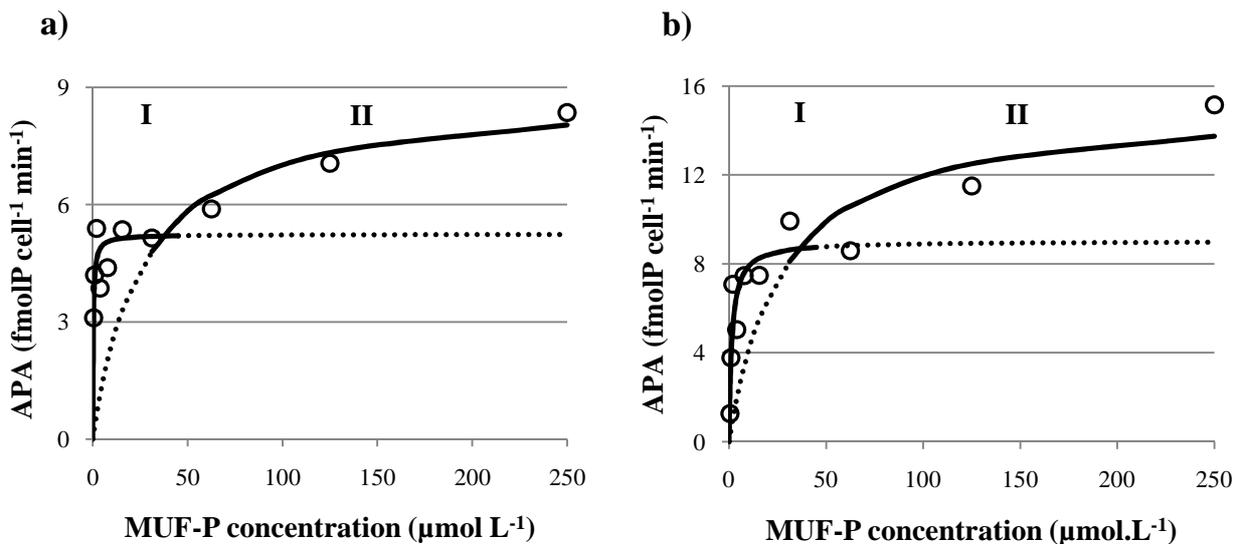
for  $DR \leq 0.3 \text{ d}^{-1}$  for TL01 and  $0.2 \text{ d}^{-1}$  for ACT03, with no particular trend observed as the DR decreased. In this range, maximal normalized APA varied around respective means values of  $13.4 \pm 3.6 \text{ fmolP}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $10.0 \pm 3.2 \text{ fmolP}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  for TL01 and ACT03.

Expressed as a function of  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations (Figure 5a), values of maximal APA per cell showed a pattern clearly defined by a threshold value comprised between  $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{PO}_4^{3-}$ : while significant APA measurements were exclusively associated with  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations lower than this threshold, negligible APA values were obtained for higher concentrations. A similar pattern was observed considering maximal APA per cell as a function of  $Q_p/Q_c$  (Figure 5b) and highlighted a strict threshold at  $Q_p/Q_c = 0.016 \text{ pgP}\cdot\text{pgC}^{-1}$  (C:P ratio of 161) which separated significant APA data from negligible ones. The relation observed between maximal APA estimations and  $Q_{p/\text{cell}}$  values was not so clear-cut, but significant APA measurements were obtained for  $Q_{p/\text{cell}} < 42.1 \text{ pgP}\cdot\text{cell}^{-1}$  (Figure 5c).



**Figure 5 :** Maximal alkaline phosphatase activity as a function of (a) residual phosphate concentrations in the cultures, (b) phosphorus content per cell carbon and (c) phosphorus content per cell of *A. catenella*

Along the MUF-P gradient of  $0.5 - 250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , three series of specific APA measurements were realized for each strain corresponding to three different DRs. The use of a single Michaelis-Menten equation did not allow a convergence of the hyperbolic regression analysis with confidence intervals of 95% in all cases. For three of the six kinetic experiments, the use of a single equation did not led to a random dispersion of normalized residues along the substrate gradient, with a trend suggesting that the model tends to overestimate activities between  $3.9$  and  $62.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of MUF-P and underestimate them at higher substrate concentrations. To avoid distorted estimations of kinetic parameters, biphasic patterns described by two Michaelis-Menten equations were used to model these data, with a transition between both phases in the range  $31.3 - 62.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of MUF-P. Figure 6 presents two biphasic kinetics taken as examples (one for each strain) with the two phases of the modeled curves denoted as I and II. Values of kinetic parameters ( $K_S$ ,  $V_{\max}$ ) obtained for both uniphasic and biphasic models are summarized in Table 1. For biphasic models,  $K_S$  values of Phase I provide estimations of the AP affinity of *A. catenella* cells and  $V_{\max}$  values of Phase II estimations of the enzyme efficiency under high substrate concentrations. Comparing these parameters values with the  $K_S$  and  $V_{\max}$  values of uniphasic models, respective mean values of  $0.78 \pm 0.47 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and  $1.86 \pm 0.43 \mu\text{mol.L}^{-1}$  were estimated for  $K_S$  of TL01 and ACT03 and respective  $V_{\max}$  values obtained were  $10.1 \pm 1.5 \text{ fmolP.cell}^{-1}.\text{min}^{-1}$  and  $14.8 \pm 0.5 \text{ fmolP.cell}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . From the low standard deviations obtained, no trend was observed in variations of kinetic parameters values of APA with the DR.



**Figure 6 :** Alkaline phosphatase activity as a function of methyl-umbelliferyl phosphate (MUF-P) concentration for *A. catenella* TL01 strain (a) and ACT03 strain (b).

Strain	Kinetic parameters	Dilution rate	PO4 uptake	APA		
				Uniphasic model	Biphasic model	
					Phase I	Phase II
TL01	Ks	0.15	0.93	1.22	-	-
		0.2	0.92	-	0.82	11.64
		0.3	0.01	-	0.29	26.58
	Vmax	0.15	1.97	11.80	-	-
		0.2	0.77	-	6.61	9.64
		0.3	0.49	-	5.24	8.89
ACT03	Ks	0.1	0.83	1.79	-	-
		0.15	0.97	-	1.47	27.55
		0.2	0.04	2.33	-	-
	Vmax	0.1	1.75	14.29	-	-
		0.15	0.75	-	9.04	15.26
		0.2	0.48	14.84	-	-

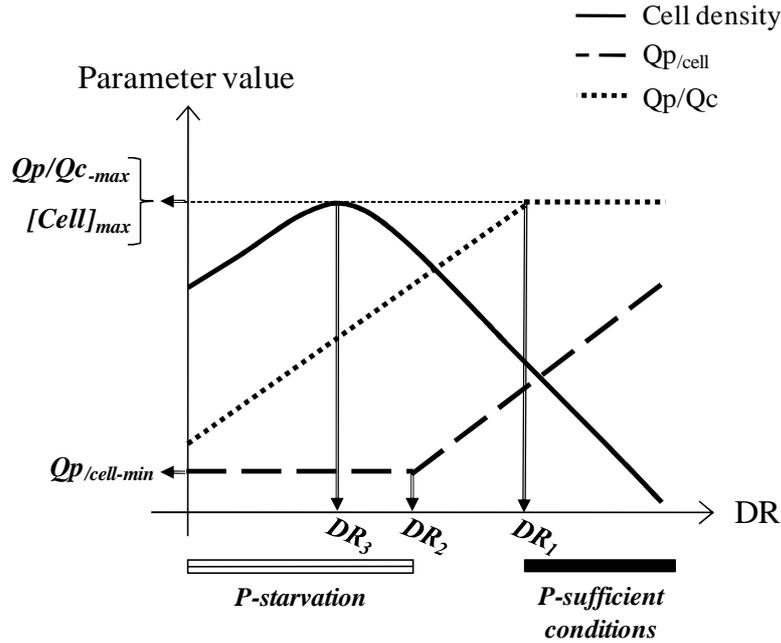
**Table 1 :** Values of kinetic parameters ( $K_S$  in  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and  $V_{\text{max}}$  in  $\text{fmolP cell}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) obtained for  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rate and APA at different dilution rates ( $\text{d}^{-1}$ ). APA results compiled data obtained using uniphasic and biphasic Michaelis-Menten models, with values detailed for each phase in case of biphasic patterns.

#### IV- DISCUSSION

##### 1- P-limitation conditions

Measurements of phosphate concentrations along the dilution gradient indicated that phosphate pulses were almost entirely consumed after 24h in the cultures diluted at  $\text{DR} \leq 0.2 \text{ d}^{-1}$ , suggesting that the DRs gradient used ( $0.05 - 0.5 \text{ d}^{-1}$ ) has imposed a severe P-limitation for *A. catenella* cells maintained at low renewal rates.

At the population scale, the rate of colony formation reflected the graded phosphate conditions. Considering global cell concentrations, a critical dilution rate ( $0.2 \text{ d}^{-1}$  for TL01 and  $0.15 \text{ d}^{-1}$  for ACT03) can be defined for each strain from the maximum observed in cell density (Figure 2 ;  $\text{DR}_3$  on Figure 7).



**Figure 7 :** Schematic representation of the different phases of nutrient state of *A. catenella* assessed from trends in cell density (solid line), phosphorus content per cell (dashed line) and phosphorus content per cell carbon (dotted line) as a function of dilution rate (DR).

Maximal values at intermediate DRs were unexpected as cell concentrations in semi-continuous and continuous cultures at steady states often decrease linearly with the DR, matching Droop's model (1968). Divergences from this theoretical trend may be observed under high DRs (near the maximal growth rate) where cell density may drop rapidly towards zero due to culture washout, and under low DRs where cultures may reach particular steady states well described by Sciandra & Ramani (1994). According to these authors, decreasing cell density as the DR becomes low may be explained by the presence of additional controlling factors, such as competition with bacteria, strengthened by low algal growth rates, or negative retroactive effects due to accumulation of excreted products. Shafik et al. (1997) and Le Floc'h et al. (2002) also reported cellular densities lower than the ones supported by Droop's model for phytoplankton cultures maintained under low DRs ( $DR \leq 0.11 \text{ d}^{-1}$ ). As  $DRs \leq 0.3 \text{ d}^{-1}$  were sufficient to lead to steady states different from Droop's theory in the study of Sciandra & Ramani (1994), results presented here for *A. catenella* are in the range of DR threshold values reported previously for such effects.

At the cellular scale, the graded P-stress conditions encountered by *A. catenella* cells may also be described through variations of intracellular quotas, consisting of a successive decrease in Qp per cell ( $Qp_{/cell}$ ) followed by a decrease in Qp per C unit ( $Qp/Q_C$ ) as the DR

decreased (Figure 1). These trends were particularly visible for ACT03 and are schematized in Figure 7. When P-stress increased, the lag observed at highest DRs between  $Q_{p/cell}$  and  $Q_p/Q_C$  variations revealed that cellular P quota started to decrease proportionally with the cellular C quota, leading to constant  $Q_p/Q_C$ . This lag defined a first P-stress range where conditions are still P-sufficient for cell metabolism but the cell size decreases when the P-stress increases. The start of decrease in  $Q_p/Q_C$  when the DR decreased ( $DR_1$  on Figure 7) indicated the threshold between P-sufficient conditions and P-limitation. As noted for the threshold defined by cells density ( $DR_3$ ), the P-limitation was induced at a higher DR for TL01 than ACT03, with respective P-limitation thresholds reached at  $DR = 0.3 \text{ d}^{-1}$  for TL01 and  $= 0.2 \text{ d}^{-1}$  for ACT03. The trends observed in  $Q_{p/cell}$  variations along the DR gradient indicated an additional P-stress threshold: the shift to P-starvation conditions, encountered when  $Q_{p/cell}$  reached down the minimum plateau ( $DR_2$  on Figure 7). These conditions set in under the same range of DR ( $DR \leq 0.2 \text{ d}^{-1}$ ) for both strains. Below this P-starvation threshold ( $DR_2$ ),  $Q_p$  could not act as a buffer against external  $\text{PO}_4^{3-}$  depletion. Consequently, when  $\text{PO}_4^{3-}$  from the daily pulse was exhausted, cells could not use the internal P pool to maintain their growth. This explains the observed decrease in cell density at lowest DRs by limited growth rates, lower than the ones predicted by Droop's theory.

Contrary to our results, Matsuda et al. (2006) observed a maximal cell density and a minimal  $Q_{p/cell}$  at the lowest DR ( $0.05 \text{ d}^{-1}$ ) from semi-continuous experiments performed with axenic cultures of *A. catenella* along a P-limitation DR gradient of  $0.05 - 0.35 \text{ d}^{-1}$ . Non-axenic cultures being used in the present study, competition with bacteria may have been an additional controlling factor of *A. catenella* growth at low DRs in our experiments, resulting in more severe P-limitation conditions for algal cells. The discrepancies noted along similar DR gradients also suggest that the French strains of *A. catenella* may be more sensitive to P-stress than the Japanese strain TNY7 used by Matsuda et al. (2006). This hypothesis is sustained by previous observations of significant differences in N-uptake capacities between different *A. catenella* strains (Collos et al. 2006; Jauzein et al. 2008).

## **2- P-storage capacities**

The range of  $Q_p$  variations allows the estimation of potential P-storage capacities of algal cells. However, differences noted in variations of  $Q_{p/cell}$  and  $Q_p/Q_C$  along the DR gradient highlight the importance of the reference considered (cell or  $Q_C$ ) for quota

estimations. Compiling data of ACT03 and TL01 compatible with Droop's theory (obtained at  $DR \geq DR_3$ ), values of the theoretical minimum quota  $q_0$  (16.4 pgP.cell<sup>-1</sup> ; 0.010 pgP.pgC<sup>-1</sup>) obtained from Droop's model were close to minimal  $Q_p$  measurements ( $Q_{p/cell-min} = 20.3$  pgP.cell<sup>-1</sup> ;  $Q_p/Q_{C-min} = 0.010$  pgP.pgC<sup>-1</sup>). Thus, neither estimations of ratios between the maximal and minimal  $Q_p$  measurements ( $Q_{p-max} / Q_{p-min}$ ) nor of  $Q_{p-max} / q_0$  revealed a particular P storage capacity of these strains because each ratio value (not detailed) was lower than an amplitude variation of 3.7.

From the studies of Sakshaug et al. (1984) and Ou et al. (2008), a large range of minimal (1.3 – 83.5 pgP.cell<sup>-1</sup>) and maximal (1.9 – 788.7 pgP.cell<sup>-1</sup>)  $Q_{p/cell}$  values have been reported for six different species of marine dinoflagellates, suggesting the existence of different P requirements and P-storage capacities between phytoplankton genera. Focusing on *Alexandrium* species,  $Q_{p/cell-min}$  estimations were obtained for *Alexandrium tamarense* (23.6 pgP cell<sup>-1</sup>) and *A. catenella* (9.0 pgP cell<sup>-1</sup>) by Yamamoto & Tarutani (1999) and Matsuda et al. (2006) respectively, with a high P storage capacity highlighted for *A. tamarense* from  $Q_{p-max} / q_0 = 36$  (cited in Yamamoto & Tarutani 1999). However, cellular  $Q_p$  in these studies were not measured but calculated from the difference of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> concentration between input and output media, which makes difficult a direct comparison with our  $Q_{p/cell}$  data. More comparable results for *Alexandrium* species were obtained by Ou et al. (2008) on *A. catenella* and by Béchemin et al. (1999) on *A. minutum* and present ranges of  $Q_{p/cell}$  values in accordance with our results. For *A. catenella*, Ou et al. (2008) reported similar  $Q_{p/cell-min}$  (24.7 pgP.cell<sup>-1</sup>) but two times higher  $Q_{p/cell-max}$  values, leading to  $Q_{p-max} / Q_{p-min} = 7.68$  which confirms the low P storage capacity of *A. catenella* cells. According to Béchemin et al. (1999), *A. minutum* may present even lower P-storage capacities as they did not observe a trend in  $Q_{p/cell}$  variations along a gradient of P-stress conditions, defined by N:P in the culture medium ranging from 16 to 160, with  $Q_{p/cell}$  values oscillating between 8.7 and 14.3 pgP.cell<sup>-1</sup>.

### **3- Alkaline phosphatase activity**

Alkaline phosphatases being inducible by low extracellular PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> concentrations for many marine phytoplankton species, their activity is often used as another P-limitation indicator (Cembella et al. 1984; Dyhrman & Palenik 2003). However, such influence is not so easy to interpret in terms of metabolic control as additional factors may regulate AP synthesis

(Hoppe 2003) and, in particular for the *Alexandrium* genus, APA appeared to be a poor indicator of  $\text{PO}_4^{3-}$ -stress for *A. minutum*, *A. tamarense* and *A. affini* cells (Flynn et al. 1996). Among the potential controlling factors, a regulation by the intracellular P-pool has often been reported, for example by Xu et al. (2006) who noted a delay of several hours in the induction of genes associated with AP synthesis by *E. huxleyi* after a cells transfer in P-depleted conditions.

In the present study, fractionated APA measurements were realized to estimate specific APA of *A. catenella* cells and dissolved APA. While algal alkaline phosphatases were described as linked with the cell surface for most marine phytoplankton (Cembella et al. 1984), this enzyme may also be released in the aqueous environment by some species, such as *Prorocentrum donghaiense* (Huang et al. 2005) or *E. huxleyi* (Xu et al. 2006). The low levels of dissolved APA measured during our experiments indicate that APA measurements associated with *A. catenella* cells (estimated in the  $> 10 \mu\text{m}$  fraction) represented almost all of the activity of synthesized AP.

The comparison of the specific APA measurements with both cellular quotas and extracellular  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations allow to pinpoint AP control in *A. catenella* cells. Contrary to the observations of Flynn et al. (1996) on other species of *Alexandrium*, the regulation of APA synthesis by extracellular  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations appears to be straightforward in *A. catenella* cells, defined by a threshold value between  $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and  $1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of  $\text{PO}_4^{3-}$  (Figure 5a). AP synthesis was repressed when  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration was higher than the threshold and induced otherwise. Such threshold values have been reported for other marine phytoplankton species (Table 2) revealing that this parameter is species specific, with a high variability noted inside phytoplankton classes. The  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration threshold observed for *A. catenella* is in accordance with the one characterizing *A. tamarense* (Oh et al. 2002), while values reported for other toxic dinoflagellates ranged from  $0.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  for *Karenia mikimotoi* (Yamaguchi et al. 2004) to  $3.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  for *Gymnodinium catenatum* (Oh et al. 2002). Regulation by the intracellular P-pool did not seem to be as direct as by extracellular  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration. Indeed, the relation between APA and  $\text{Qp}_{\text{cell}}$  was not so clear-cut, even though a  $\text{Qp}_{\text{cell}}$  value lower than  $\sim 40 \text{pgP.cell}^{-1}$  (Figure 5c) appears necessary to allow AP synthesis. The control by the intracellular P-pool may take effect principally through the C:N:P stoichiometry because  $\text{Qp}/\text{Q}_C = 0.016 \text{pgP.pgC}^{-1}$  (C:P (at:at) ratio of 161) appeared as a threshold for AP synthesis (Figure 5b). Comparing variations of APA and  $\text{Qp}/\text{Q}_C$  along the DR gradient (Figure 1), normalized APA per cell increased drastical when  $\text{Qp}/\text{Q}_C$  started to

Classes	Species	PO <sub>4</sub> concentration threshold	Reference
Dinophyceae	<i>Alexandrium catenella</i>	0.4 - 1	Present study
	<i>Alexandrium tamarense</i>	0.43	Oh et al. (2002)
	<i>Gymnodinium catenatum</i>	3.3	Oh et al. (2002)
	<i>Karenia mikimotoi</i>	0.2	Yamaguchi et al. (2004)
	<i>Ptychodiscus brevis</i>	< 0.5	Vargo and Shanley (1985)
Bacillariophyceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	50	Garcia-Ruiz et al. (1997)
	<i>Skeletonema costatum</i>	0.25	Yamaguchi et al. (2004)
Prymnesiophyceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	0.25	Dyhrman and Palenik (2003)
	<i>Phaeocystis sp.</i>	0.5	van Boekel and Veldhuis (1990)

**Table 2 :** Values of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> concentration threshold (in μmol L<sup>-1</sup>) reported to induce AP synthesis for marine phytoplankton species.

decrease ( $DR_I$  on Figure 7) but did not vary under more severe P-stress conditions. Thus, synthesis of AP by *A. catenella* cells appeared to be induced and maximized at the cellular scale as soon as P-limitation set in. According to Ou et al. (2006), this maximization of APA synthesis may also be observed at the population scale. From batch cultures of *A. catenella*, these authors noted that a change in bulk APA of 0 to 1.42 nmolP.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> during two consecutive days was associated with a percentage of ELF-labeled cells from 1.4 % to 100 %, where cells were labeled on their active AP sites located on the cell surface by a fluorescent precipitate (the hydrolysis product of the ELF-97 substrate).

To complement the characterization of APA of *A. catenella* cells, kinetics experiments were performed. Biphasic models were used to describe enzyme kinetics results for half of the data series. In previous works, multiphasic kinetics were rarely reported for AP produced by phytoplankton cells. Studying APA associated with the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*, Rivkin & Swift (1980) described three phases in the relationship between APA and substrate concentration, each one following a Michaelis-Menten type kinetics. Biphasic kinetics in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* were reported by Riegman et al. (2000) and Dyhrman & Palenik (2003) and may result from the combined activity of two different enzymes, one characterized by a high-affinity/low-capacity and the other by a low-affinity/high-capacity.

In the present results of APA kinetics, data series associated with biphasic patterns did not show a clear intermediate saturation plateau, but a single Michaelis-Menten model did not

correctly represent the data, with a net underestimation of enzyme activity noted at high substrate concentrations. This reveals an inadequacy between the Michaelis-Menten model and the data series rather than a potential multi-enzymatic system. A similar consideration has been made by García-Ruiz et al. (1997) describing APA kinetics in *Phaeodactylum tricornutum* and may be explained by the high dependence of the kinetic parameters values upon the range of substrate concentration considered (McComb et al. 1979). Using the model proposed by Li (1983), Sebastián et al. (2004) observed similar underestimation of APA at high substrate concentrations for *in situ* samples, but chose to keep a single equation to calculate kinetics parameters. According to these authors, concentration of bioavailable DOP in marine systems being often maintained at very low levels, the model efficiency has to be especially focused on the low substrate concentrations. However, this point of view does not take into account the potential patchiness of nutrients concentrations at the cellular scale as described by Shanks & Trent (1979). According to these authors, aggregates in the water column may be characterized by nutrient concentrations several hundred times higher than the surrounding water. Considering this potential heterogeneity of the environment, we choose to take into account biphasic patterns, using one equation to obtain an estimation of the enzyme affinity ( $K_S$  of Phase I) in the range of low substrate concentrations and the other equation to estimate the enzyme capacity ( $V_{max}$  of Phase II) using data at high substrate concentrations. This approach is endorsed by the consistency noted between parameters values obtained from uniphasic and biphasic models.

From the three DR tested, no trend in kinetic parameters values of APA with the DR was observed and values obtained for TL01 and ACT03 appeared to be very close. Compiling the data obtained for both strains, APA of *A. catenella* cells were characterized by an affinity constant ( $K_S$ ) of  $1.3 \pm 0.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and a potential maximal activity value ( $V_{max}$ ) of  $12.5 \pm 2.8 \text{ fmolP.cell}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Ou et al. (2008) determined lower kinetics parameters values for *A. catenella* cells ( $K_S = 0.55 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $V_{max} = 2.88 \text{ fmolP.cell}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) using another fluorogenic substrate, MFP (methylfluorescein-phosphate). The comparison of values obtained for *A. catenella* with results of previous studies on marine phytoplankton where MUF-P or MFP were used (Table 3) reveals that *A. catenella* cells showed a major competitive advantage for utilizing the DOP resource at low concentrations.

Classes	Species	Substrate	$K_s$	$V_{max}$	Reference	
Dinophyceae	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	MUF-P		3.44	Yamaguchi et al. (2005)	
	<i>Prorocentrum donghaiense</i>	MFP	0.25	0.09	Ou et al. (2008)	
	<i>Alexandrium catenella</i>	MFP	0.55	2.88	Ou et al. (2008)	
	<i>Alexandrium catenella</i>	MUF-P	1.32	12.45	Present study	
	Bacillariophyceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	MUF-P	3.1	186	Garcia-Ruiz et al. (1997)
		<i>Chaetoceros ceratosporum</i>	MUF-P		1.04	Yamaguchi et al. (2005)
<i>Skeltonema costatum</i>		MFP	1.38	0.03	Ou et al. (2008)	
Prymnesiophyceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	MFP	1.9	3.17	Riegman et al. (2000)	
	<i>Emiliana huxleyi</i>	MUF-P	2.2	5100	Dyhrman and Palenik (2003)	

**Table 3 :** Comparison of kinetic parameter values ( $K_s$  in  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and  $V_{max}$  in  $\text{fmolP cell}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) reported for APA between *A. catenella* and other marine phytoplankton species. Compilation limited to previous works where the fluorogenic substrates MUF-P or MFP were used.

#### 4- Phosphate uptake characteristics

Experiments realized also allowed to analyze metabolic adaptations of *A. catenella* cells to graded P-limitation conditions in terms of  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake. For estimations of  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates using the  $^{33}\text{P}$  technique, the additional use of oxalate reagent according to the method of Tovar-Sanchez et al. (2003) appeared to be conclusive. Results obtained revealed that one third of the  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  associated with *A. catenella* cells at the end of incubations was adsorbed on the cell membranes, whatever the cell P-deficiency. As previously highlighted by Sañudo-Wilhelmy et al. (2004) and Fu et al. (2006), these results confirm the importance of taking into account the surface-adsorbed  $\text{PO}_4^{3-}$  pool in  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  uptake rate estimations. These authors reported  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates after removal of the P-adsorbed fraction corresponding to 42 - 51 % and 25 - 78 % of the total uptake rate, depending on P-limitation conditions, for respective cyanobacteria cultures of *Trichodesmium* (Sañudo-Wilhelmy et al. 2004) and *Synechococcus* (Fu et al. 2006). While these authors measured also an influence of the adsorbed fraction on  $Q_p$  estimations, oxalate addition did not induce a significant difference in  $Q_p$  measurements for *A. catenella* cells, probably because the chemical technique employed to measure  $Q_p$  is less sensitive than the radioactive method used for  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates.

The control of  $V_{p_{\max}}$  was clearly linked with the extracellular  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations and  $Q_p/Q_C$ , but no characteristic influence of  $Q_p/\text{cell}$  on  $V_{p_{\max}}$  could be identified. Thus, as for AP regulation,  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake rates appeared to be regulated by the intracellular P quota only through an indirect pathway, the P:C stoichiometry of the cell. The exponential decrease observed considering  $V_{p_{\max}}$  as a function of  $Q_p/Q_C$  revealed that *A. catenella* cells were able to optimize their  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake capacities as the P-deficiency increased. Even if, under P-limitation conditions, the specific APA per cell did not rise with the P-stress, this potential optimization of  $\text{PO}_4^{3-}$  uptake may also benefit to the DOP utilization as  $\text{PO}_4^{3-}$  released from APA may be more rapidly taken up in case of highly P-deficient conditions. However, the maximal value of  $V_{p_{\max}}$  reached was  $1.9 \text{ fmolP cell}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (for TL01) corresponding to  $0.13 \text{ h}^{-1}$ . This value is low compared to the one reported for *A. catenella* ( $2.5 \text{ h}^{-1}$ ) by Ou et al. (2008) and for the other dinoflagellates *A. tamarense* ( $1.8 \text{ h}^{-1}$ , Yamamoto & Tarutani (1999)) and *G. catenatum* ( $0.31 \text{ h}^{-1}$ , Yamamoto et al. (2004)) or the diatom *S. costatum* ( $2.6 \text{ h}^{-1}$ , Ou et al. (2008)). Thus, Thau lagoon strains of *A. catenella* showed poor competitive abilities under high  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations. Concerning abilities under low concentrations,  $K_S$  measured during

kinetics experiments ( $0.01 - 1.17 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) are in accordance with the range  $0.4 - 1.68 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reported for *Alexandrium* species by Cembella et al. (1984), Yamamoto and Tarutani (1999) and Frangópulos et al. (2004). However, Ou et al. (2008) characterized a Chinese strain of *A. catenella* by a higher  $K_S$  of  $2.28 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Based on the summary of reported  $K_S$  values ( $0.01 - 2.8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) for marine phytoplankton species proposed by Yamamoto and Tarutani (1999),  $K_S$  obtained for Thau lagoon strains present *A. catenella* as a more efficient competitor for  $\text{PO}_4^{3-}$  at low concentrations.

## V- CONCLUSION

To conclude, shifts in trends of  $Q_p/Q_c$ ,  $Q_p/\text{cell}$  and cell density variations along the DR gradient have allowed the definition of three successive P-stress thresholds for *A. catenella* cells, from the setting up of P-limitation to severe P-deficiency (Figure 7). Regarding the DR values associated with these shifts, the TL01 strain presented slightly higher P-requirements than ACT03. For each strain, a slight change in DR values, from  $0.3 \text{ d}^{-1}$  to  $0.2 \text{ d}^{-1}$  for ACT03 and from  $0.4 \text{ d}^{-1}$  to  $0.2 \text{ d}^{-1}$  for TL01, was sufficient to induce a shift from P-sufficient conditions to P-starvation. Thus, *A. catenella* cells showed a very high sensitivity to P-stress. For ACT03 taken as an example, this shift corresponded to a difference of only  $0.9 \mu\text{mol PO}_4^{3-}$  per culture liter in the daily pulse.

Since the first threshold ( $DR_l$  on Figure 7) defining P-limitation initiation was overstepped, APA synthesis has been induced, presenting APA as a robust indicator of  $\text{PO}_4^{3-}$ -limitation for *A. catenella* cells. This also suggests that this threshold is the only one which can be used to analyze *in situ* conditions. Indeed, while AP are synthesized during a bloom development, the cellular P-demand of *A. catenella* cells may be modified from culture observations if a significant DOP concentration exists, delaying other metabolic responses to  $\text{PO}_4^{3-}$ -stress.

Comparing the characteristics highlighted in culture for *A. catenella* cells with *in situ* conditions, DOP may play a significant role in bloom formation of *A. catenella* in the Thau lagoon (France), similar to that proposed by Ou et al. (2008) for *A. catenella* developments in Chinese coastal waters. Considering the P-sources concentrations encountered in Thau lagoon waters during blooms of *A. catenella* in spring 2002 and autumn 2003 (unpublished data),  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations lower than  $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , which stimulate AP synthesis of *A. catenella* cells, were often measured (80 % and 33 % of the respective duration of blooms) and DOP

estimations ranged between 0.6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  and 1.4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Under such environmental conditions, *A. catenella* presents a competitive advantage to use the DOP pool when APA is induced, as DOP concentrations *in situ* were close to the  $K_S$  of APA (1.3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Thus, *A. catenella* bloom developments in 2002 and 2003 may have been sustained by the DOP resource, with a significant part of P-uptake based on APA. Additional *in situ* measurements have to be performed to assess to what extent the DOP utilization may be considered as a key competitive advantage for *A. catenella* cells in Thau lagoon waters with regards to other environmental controlling factors.

## References

- Ammerman J.W.** 1993. Microbial cycling of inorganic and organic phosphorus in the water column, p 649-660. In P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr and J. J. Cole [Eds.], *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis, Boca Raton.
- Andersen R.A.**, Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M.. 2005. Recipes for freshwater and seawater media, p. 429-538. In R. A. Andersen [Ed], *Algal culturing techniques*. Elsevier, Amsterdam.
- Béchemin C.**, Grzebyk D., Hachame F., Hummert C., Maestrini S.Y. 1999. Effect of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the toxin content in *Alexandrium minutum*. *Aquat. Microb. Ecol.* Vol. 20, p. 157-165.
- 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. II. *Crit. Rev. Microbiol.* Vol. 11, p. 13-81.
- Collos Y.**, Lespilette M., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* Vol. 28(2), p. 313-318.
- Collos Y.**, Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P., Vaquer A. 2008. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea. Res.* *In press.* (doi: 10.1016/j.seares.2008.05.008)
- Delmas D.**, Legrand C., Bechemin C., Collinot C.. 1994. Exoproteolytic activity determined by flow injection analysis: its potential importance for bacterial growth in coastal marine ponds. *Aquat. Living Resour.* Vol. 7, p. 17-24.
- Droop M.R.** 1968. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* Vol. 48, p. 689-733.

- Dyhrman S.T.**, Palenik B. 2003. Characterization of ectoenzyme activity and phosphate-regulated proteins in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *J. Plankton Res.* Vol. 25(10), p. 1215-1225.
- Flynn K.**, Jones K.J., Flynn K.J. 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting batch culture. *Mar. Biol.* Vol. 126, p. 9-18.
- Frangópulos M.**, Guisande C., deBlas E., Maneiro I. 2004. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. *Harmful Algae.* Vol. 3(2), p. 131-139.
- Fu F.**, Zhang Y., Feng Y., Hutchins D.A. 2006. Phosphate and ATP uptake and growth kinetics in axenic cultures of the cyanobacterium *Synechococcus* CCMP 1334. *Eur. J. Phycol.* Vol. 41, p. 15-28.
- García-Ruiz R.**, Hernandez I., Lucena J., Niell F.X. 1997. Preliminary studies on the significance of alkaline phosphatase activity in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Scientia Marina.* Vol. 61(4), p. 517-525.
- Hoppe H.G.** 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 11, p. 299-308.
- Hoppe H. G.** 2003. Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia.* Vol. 493, p. 187-200.
- Huang B.Q.**, Ou L.J., Hong H.S., Luo H.W., Wang D.Z.. 2005. Bioavailability of dissolved organic phosphorus compounds to typical harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Mar. Pol. Bul.* Vol. 51, p. 838-844.
- Jauzein C.**, Collos Y., Garcés E., Vila M., Masó M. 2008. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *J. Phycol.* Vol. 44, p. 1136-1145.
- Karl D.M.**, Björkman K.M. 2002. Dynamics of DOP. In D. A. Hansell and C. A. Carlson [Eds.], *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press, San Diego, CA.
- Karl D.M.**, Yanag K.. 1997. Partial characterization of the dissolved organic phosphorus pool in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 42(6), p. 1398-1405.
- Labry C.**, Delmas D., Herbland A. 2005. Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 318(2), p. 213-225.
- La Jeunesse I.**, Elliott M. 2004. Anthropogenic regulation of the phosphorus balance in the Thau catchment-coastal lagoon system (Mediterranean Sea, France) over 24 years. *Mar. Pol. Bull.* Vol. 48, p. 679-687.
- Le Floc'h E.**, Malara G., Sciandra A. 2002. An automatic device for *in vivo* absorption spectra acquisition and chlorophyll estimation in phytoplankton cultures. *J. App. Phycol.* Vol. 14, p. 435-444.

- Li W.K.W.** 1983. Consideration of errors in estimating kinetic parameters based on Michaelis-Menten formalism in microbial ecology. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 28, p. 185-190.
- Lilly E.L., Kulis D.M., Gentien P., Anderson D.M.** 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* Vol. 24(5), p. 443-452.
- Matsuda A., Nishijima T., Fukami K., Adachi M.** 2006. Growth kinetics and paralytic shellfish poisoning toxin production in phosphorus-limited cultures of *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* Vol. 72, p. 193-200.
- McComb R.B., Bowers Jr G.N., Posen S.** 1979. Alkaline Phosphatase. Plenum Publishing Corp., New York.
- Oh S.J., Yamamoto T., Kataoka Y., Matsuda O., Matsuyama Y., Kotani Y.** 2002. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fisheries Science.* Vol. 68, p. 416-424.
- Ou L.J., Huang B.Q., Lin L.Z., Hong H.S., Zhang F., Chen Z.Z.** 2006. Phosphorus stress of phytoplankton in the Taiwan Strait determined by bulk and single-cell alkaline phosphatase activity assays. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 327, p. 95-106.
- Ou L., Wang D., Huang B., Hong H., Qi Y., Lu S.** 2008. Comparative study of phosphorus strategies of three typical harmful algae in Chinese coastal waters. *J. Plankton Res.* Vol. 30(9), p. 1007-1017.
- Perry M. J.** 1972. Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Mar. Biol.* Vol. 15, p. 113-119.
- Raimbault P., Diaz F., Pouvesle W., Boudjellal B.** 1999. Simultaneous determination of particulate organic carbon, nitrogen and phosphorus collected on filters, using a semi-automatic wet-oxidation method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 180, p. 289-295.
- Riegman R., Stolte W., Noordeloos A.A.M., Slezak D.** 2000. Nutrient uptake, and alkaline phosphate (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures. *J. Phycol.* Vol. 36(1), p. 87-96.
- Rivkin R.B., Swift E.** 1980. Characterization of alkaline-phosphatase and organic phosphorus utilization in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis-Noctiluca*. *Mar. Biol.* Vol. 61(1), p. 1-8.
- Sakshaug E., Granéli E., Elbrächter M., Kayser H.** 1984. Chemical composition and alkaline phosphatase activity of nutrient-saturated and P-deficient cells of four marine dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 77, p. 241-254.
- Sañudo-Wilhelmy S.A., Tovar-Sanchez A., Fu F., Capone D.G., Carpenter E.J., Hutchin A.** 2004. The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Redfield stoichiometry. *Nature.* Vol. 432, p. 897-901.
- Sciandra A., Ramani P.** 1994. The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 178, p. 1-15.

- Sebastián M.**, Arístegui J., Montero M.F., Niell F.X. 2004. Kinetics of alkaline phosphatase activity, and effect of phosphate enrichment: a case study in the NW African upwelling region. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 270, p. 1-13.
- Shafik H.M.**, Herodek S., Voros L., Presing M., Kiss K.T. 1997. Growth of *Cyclotella meneghiniana* Kutz. I. Effects of temperature, light and low rate of nutrient supply. *International J. Limnol.* Vol. 33(3), p. 139-147.
- Shanks A.L.**, Trent J.D. 1979. Marine snow - Microscale nutrient patches. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 24(5), p. 850-854.
- Solórzano L.**, Sharp J.H. 1980. Determination of total dissolved phosphorus and particulate phosphorus in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 25, p. 754-758.
- Suchu P.**, Gasc A., Collos Y., Vaquer A., Tournier H., Bibent B., Deslous-Paoli J.M. 1998. Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 164, p. 135-146.
- Suzumura M.**, Ingall E.D. 2004. Distribution and dynamics of various forms of phosphorus in seawater: insights from field observations in the Pacific Ocean and a laboratory experiment. *Deep-Sea Research I.* Vol. 51, p. 1113-1130.
- Thingstad T.F.**, Zweifel U.L., Rassoulzadegan F. 1998. P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 43(1), p. 88-94.
- Thingstad T. F.**, Krom M.D., Mantoura R.F.C., Flaten G.A.F., Groom S., Herut B., Kress N., Law C.S., Pasternak A., Pitta P., Psarra S., Rassoulzadegan F., Tanaka T., Tselepidis A., Wassmann P., Woodward E.M.S., Riser C.W., Zodiatis G., Zohary T. 2005. Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science.* Vol. 309, p. 1068-1071.
- Tilman D.**, Kilham S. S. 1976. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* Vol. 12, p. 375-383.
- Tovar-Sanchez A.**, Sañudo-Wilhelmy S.A., Garcia-Vargas M., Weaver R.S., Popels L.C., Hutchins D.A. 2003. A trace metal clean reagent to remove surface-bound iron from marine phytoplankton. *Mar. Chem.* Vol. 82, p. 91-99.
- Treguer P.**, Le Corre P. 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (Utilisation de l'Autoanalyseur II Technicon), 2<sup>ème</sup> édition. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- van Boekel W.H.M.**, Veldhuis M.J.W. 1990. Regulation of alkaline phosphatase synthesis in *Phaeocystis* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 61, p. 281-289.
- Vargo G.A.**, Shanley E. 1985. Alkaline-phosphatase activity in the red-tide dinoflagellate, *Ptychodiscus-brevis*. *Mar. Ecol.* Vol. 6(3), p. 251-264.
- Vidal M.**, Duarte C.M., Agustí S., Gasol J.M., Vaquer D. 2003. Alkaline phosphatase activities in the central Atlantic Ocean indicate large areas with phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 262, p. 43-53.

- Xu Y.**, Wahlund T.M., Feng L., Shaked Y., Morel F..M. 2006. A novel alkaline phosphatase in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) and its regulation by phosphorus. *J. Phycol.* Vol. 42(4), p. 835-844.
- Yamaguchi H.**, Nishijima T., Nishitani H., Fukami K., Adachi M.. 2004. Organic phosphorus utilization and alkaline phosphatase production of 3 red tide phytoplankton. *Nippon Suisan Gakkaishi.* Vol. 70(2), p. 123-130.
- Yamaguchi H.**, Sakou H., Fukami K., Adachi M., Yamaguchi M., Nishijima T. 2005. Utilization of organic phosphorus and production of alkaline phosphatase by the marine phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*, *Fibrocapsa japonica* and *Chaetoceros ceratosporum*. *Plankton Biol. Ecol.* Vol. 52(2), p. 67-75.
- Yamamoto T.**, Tarutani K. 1999. Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Phycol. Res.* Vol. 47, p. 27-32.
- Yamamoto T.**, Oh S.J., Kataoka Y. 2004. Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science.* Vol. 70(1), p. 108-115.



**MESURES *IN SITU* D'ACTIVITES DES PHOSPHATASES ALCALINES  
AU COURS D'UNE EFFLORESCENCE D'*ALEXANDRIUM CATENELLA*  
DANS L'ÉTANG DE THAU**

---

**I- INTRODUCTION**

Des estimations de l'activité des phosphatases alcalines (APA) ont été réalisées à partir d'échantillons d'eau prélevés dans l'Etang de Thau, au cours de l'efflorescence d'*A. catenella* du printemps 2007. Ces estimations visaient à obtenir une quantification de la part potentielle du phosphore organique dissous dans la nutrition d'*A. catenella in situ*.

**II- MATERIEL ET METHODES**

Des échantillons d'eau ont été prélevés le 24/05/07 au niveau de la station C3 de la Crique de l'Angle lors du suivi hebdomadaire Ifremer et ont été immédiatement ramenés au laboratoire pour analyses. A partir de ces échantillons, des estimations de l'activité des phosphatases alcalines ont été effectuées et complétées par des mesures d'abondance d'*A. catenella* par comptage au microscope. Des estimations des concentrations en phosphate dans la Crique de l'Angle lors de cette journée d'échantillonnage ont été fournies en complément par Ifremer.

Le protocole suivi pour estimer l'APA a été similaire à celui présenté dans le chapitre précédent. Afin d'optimiser les mesures, un fractionnement de classe de taille a été réalisé au préalable sur les échantillons d'eau par filtration sur une soie de 10  $\mu\text{m}$ . La réalisation de mesures d'activités enzymatiques à la fois dans l'eau filtrée et non-filtrée a permis d'estimer l'APA associée spécifiquement aux cellules planctoniques de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  (dont *A. catenella*), par différence entre l'activité totale (mesurée dans l'échantillon non-filtré) et l'activité de la fraction < 10  $\mu\text{m}$ . Un tel fractionnement permet entre autres de limiter la contribution des bactéries dans les estimations d'APA.

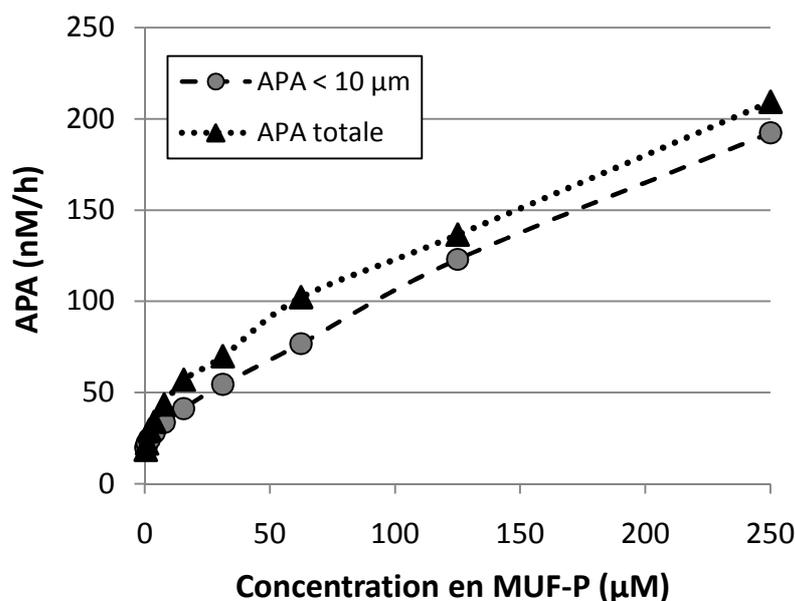
Les mesures d'APA ont été obtenues par quantification de la concentration en produit formé par la réaction enzymatique au cours d'incubations au laboratoire. Le substrat employé, le MUF-P (substrat des phosphatases dont le produit, après action enzymatique, est

fluorescent), a été ajouté suivant un gradient de concentration (0,5 – 250  $\mu\text{M}$ ) afin d'obtenir des cinétiques de l'activité enzymatique fractionnée. Les incubations étaient réalisées au noir, à 20 °C, pendant environ 2h30. Elles furent stopper par ajout de formaldéhyde (concentration finale de 4 %) et passage des échantillons à - 20°C. Les échantillons furent stockés dans ces conditions jusqu'à analyse, correspondant à des mesures de fluorescence effectuées suivant le même protocole que celui présenté dans le chapitre précédent.

### III-RESULTATS ET DISCUSSION

L'eau prélevée contenait une concentration d'*A. catenella* de 419 300 cell/L. Des valeurs de concentrations en phosphate variant de 0,03  $\mu\text{M}$  à 0,09  $\mu\text{M}$  ont été mesurées sur quatre stations de la Crique de l'Angle le jour de l'échantillonnage. Le seuil de déclenchement de la synthèse des phosphatases alcalines par les cellules d'*A. catenella* (compris entre 0,4  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  de phosphate d'après le chapitre précédent) a donc largement été dépassé sous ces conditions environnementales.

Cependant, d'après les résultats de mesures d'APA obtenues le long du gradient de MUF-P testé, l'activité associée à la fraction  $> 10 \mu\text{m}$  s'est avérée très faible par rapport à l'activité de la fraction  $< 10 \mu\text{m}$  (Figure 1). De tels écarts rendent inadéquates des mesures d'APA par fractionnement de classe de taille : le calcul, par différence entre activité totale et activité de la fraction  $< 10 \mu\text{m}$ , impose alors une erreur trop grande.



**Figure 1** : Mesures de l'activité des phosphatases alcalines associées aux fractions totale et  $< 10 \mu\text{m}$  des échantillons *in situ*.

La concentration en cellules d'*A. catenella* n'a probablement pas été assez élevée pour permettre une estimation correcte de leur activité enzymatique. De telles mesures, réalisées à l'échelle des populations, sont fortement dépendantes de l'abondance de l'espèce étudiée : cette abondance doit être suffisamment importante pour permettre de mesurer un signal, mais doit également représenter une part majeure de la population planctonique (de même classe de taille lorsqu'un fractionnement est réalisé) afin que le signal mesuré puisse être interprété comme représentatif de l'espèce considérée.

Concernant les mesures d'APA, une méthode existe permettant de pallier à ces contraintes : l'utilisation du substrat ELF-97 (Enzyme Labeled Fluorescence) dont le produit, fluorescent, précipite au niveau des sites enzymatiques membranaires (e.g. González-Gil et al. 1998 ; Lomas et al. 2004). L'observation d'échantillons *in situ* incubés avec ce substrat permet alors de visualiser, sous un microscope à épifluorescence, les cellules pour lesquelles des phosphatases alcalines sont actives. Ces observations s'effectuant à l'échelle cellulaire, il est possible, même en cas d'abondance faible et de forte mixité planctonique, de définir pour chaque espèce présente si les cellules ont synthétisé ou non des phosphatases alcalines. Cette méthode de marquage au ELF a cependant le défaut de ne pas être quantitative alors que les méthodes dites fluorimétriques, telle que l'utilisation de MUF-P, le sont.

Cette méthode ELF serait intéressante à tester pour compléter la compréhension des processus de contrôle des efflorescences d'*A. catenella* dans la lagune de Thau. En effet, d'après le chapitre précédent, le déclenchement de la synthèse des phosphatases chez *A. catenella* s'est avéré être un bon indicateur d'un état de limitation en phosphate chez cette espèce. L'utilisation de cette méthode dès l'initiation des efflorescences permettrait d'estimer le mode de nutrition phosphorée d'*A. catenella* : par absorption de phosphate (tant que sa concentration dans le milieu n'est pas limitante pour la croissance) ou par mixotrophie (grâce à la synthèse de phosphatase alcalines permettant d'utiliser le pool de phosphore organique dissous).

#### IV- CONCLUSION

L'utilisation de la méthode fluorimétrique par ajout de MUF-P s'est révélée non-adaptée à des mesures *in situ* pour une concentration d'*A. catenella* d'environ 400 000 cell/L, malgré la mise en place d'un fractionnement de classe de taille. L'emploi d'une méthode par marquage à l'ELF apparaît être pleinement complémentaire face à ce genre de contrainte méthodologique. Son utilisation (encore non-testée) pourrait permettre de suivre le mode de

nutrition phosphorée (par utilisation ou non de la matière organique dissoute) d'*A. catenella in situ*, dès l'initiation des efflorescences, fournissant ainsi des informations majeures concernant le contrôle de la croissance de cette espèce par les éléments nutritifs.

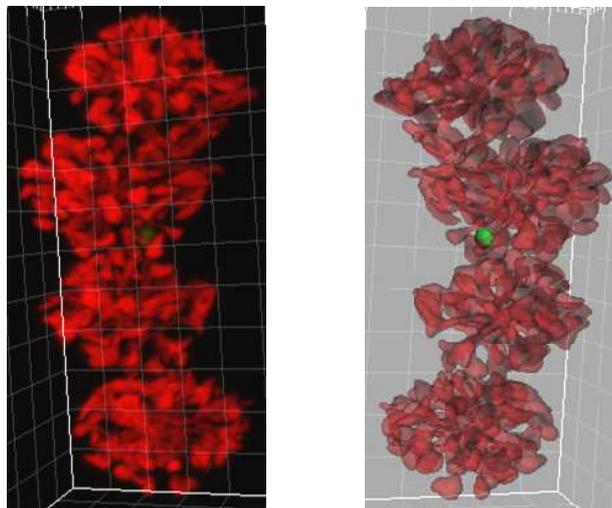
### ***Références***

- González-Gil S.**, Keafer B.A., Jovine R.V.M., Aguilera A., Lu, S., Anderson D.M. 1998. Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 164, p. 21-35.
- Lomas M.W.**, Swain A., Shelton R., Ammerman J.W. 2004. Taxonomic variability of phosphorus stress in Sargasso Sea phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 49(6), p. 2303-2310.

## Partie 3

---

# PHAGOCYTOSE DE CYANOBACTERIES



*Observation d'une colonie d'Alexandrium catenella au microscope confocal.  
(Images 3D reconstituées avant (à gauche) et après (à droite) traitement du signal)*



## Contexte et perspectives

---

Lors des efflorescences d'*Alexandrium catenella* dans l'Etang de Thau, la nutrition azotée de cette espèce consisterait principalement en absorption d'ammonium et d'urée, mais une source d'azote organique encore non-identifiée pourrait contribuer à 0-67 % de la croissance de cette espèce (Collos et al. 2007). Ces capacités mixotrophes correspondraient à un avantage compétitif dans le contexte d'oligotrophisation des eaux de l'Etang de Thau, observé sur une échelle de 40 ans (Collos et al. 2009). Une analyse détaillée des capacités d'*A. catenella* à utiliser des sources nutritives originales (autres que les nutriments inorganiques dissous) apparaît donc essentielle à la compréhension des conditions favorisant le développement et le maintien des efflorescences dans cette lagune.

Les capacités d'utilisation de la matière organique dissoute (MOD) de haut poids moléculaire (supérieur à 1000 dalton), obtenue par ultrafiltration, a été testé au cours de bioessais effectués par Christian Béchemin et Philippe Souchu. Les résultats de cette étude n'ont révélé aucune capacité d'utilisation de ces composés organiques dissous par *A. catenella* (Rapport Ifremer N° 05/5210506 référencé sous Collos 2006). La publication récente d'une étude révélant des capacités de phagocytose de cyanobactéries du genre *Synechococcus* par *A. catenella* (Jeong et al. 2005) a permis d'envisager une autre voie d'étude, d'autant plus prometteuse qu'une émergence conjointe de *Synechococcus* sp. et d'*A. catenella* a été observée dans l'Etang de Thau (Collos et al. 2009).

L'étude présentée dans ce chapitre porte sur les capacités phagotrophes d'*A. catenella* sur des proies du genre *Synechococcus*. Elle a été basée sur des expérimentations en culture et des observations *in situ*, réalisées en vue d'estimer si la nutrition phagotrophe de cette algue toxique pouvait correspondre à un avantage compétitif dans les eaux de l'Etang de Thau. Les résultats concluants obtenus suggèrent l'importance de prendre en compte ce mode de nutrition dans l'étude des facteurs de contrôle régissant le développement des efflorescences toxiques dans cette lagune. Ces capacités phagotrophes pourraient également inclure la phagocytose de bactéries (Seong et al. 2006), processus qu'il apparaît donc important d'étudier par la suite.



## Principes méthodologiques majeurs

---

### I- SIGNATURE PIGMENTAIRE

Chez les algues et les cyanobactéries, les *pigments photosynthétiques* (molécules présentes au sein des chloroplastes permettant aux organismes d'être autotrophe par rapport au carbone en réalisant la photosynthèse) peuvent être de trois types, définis par rapport à leur composition chimique : (i) les *chlorophylles*, caractérisées par l'existence d'un noyau tétrapyrrolique avec un atome de magnésium en son centre ; (ii) les *caroténoïdes*, constitués d'une longue chaîne carbonée avec deux extrémités cyclisées ; (iii) les *phycobilines*, composées d'un noyau tétrapyrrolique ouvert, associé à une protéine. Chaque pigment est capable d'absorbé la lumière sous certaines radiations dites actives pour la photosynthèse. Les chlorophylles absorbent la lumière dans les rouges ( $\lambda > 625$  nm) et dans les bleus (entre 400 et 500 nm), d'où leur couleur apparente verte due à une mauvaise efficacité d'absorption entre 500 et 600 nm. Le spectre d'absorption des caroténoïdes est restreint dans les bleus (entre 400 et 500 nm). Les phycobilines sont les seuls pigments présentant une absorption efficace dans les verts : les deux composants majeurs de cette classe pigmentaire sont la phycoérythrine et la phycocyanine qui absorbent respectivement les radiations comprises entre 500 et 570 nm et entre 550 et 650 nm.

L'absorption de radiations par les pigments photosynthétiques provoque leur passage dans un état excité. Le retour à leur état fondamental, plus stable thermodynamiquement, peut se faire de différentes manières : par émission de lumière (*fluorescence*), par transfert d'énergie à une molécule proche (*résonance*), par perte d'un électron (*photochimie*). La résonance et la photochimie vont permettre aux cellules de réaliser la photosynthèse par transfert d'énergie et transfert d'électrons. La fluorescence va permettre de caractériser la *signature pigmentaire* des cellules.

Chaque espèce d'algues ou de cyanobactéries peut être caractérisée par sa composition pigmentaire. Sous une excitation donnée, un spectre d'émission caractéristique peut ainsi être mesuré, cumulant les capacités de fluorescence des différents pigments présents. Les

cyanobactéries, dont les espèces du genre *Synechococcus*, possèdent des pigments appartenant aux trois classes, chlorophylles, caroténoïdes et phycobilines. Les dinoflagellés, dont *Alexandrium catenella*, ne possèdent que des pigments chlorophylliens et des caroténoïdes. Une excitation à 543 nm d'une cellule de *Synechococcus* a révélé un spectre d'émission à deux pics nettement définis : l'un aux alentours de 570 nm et l'autre à 680 nm, probablement associés à la fluorescence respective de la phycoérythrine et de la chlorophylle a. Sous cette même excitation, le spectre d'*A. catenella* ne révèle qu'un pic à 680 nm. Le signal mesuré à 570 nm, sous une excitation de 543 nm, permet donc de distinguer la signature pigmentaire spécifique de *Synechococcus* de celle d'*A. catenella*.

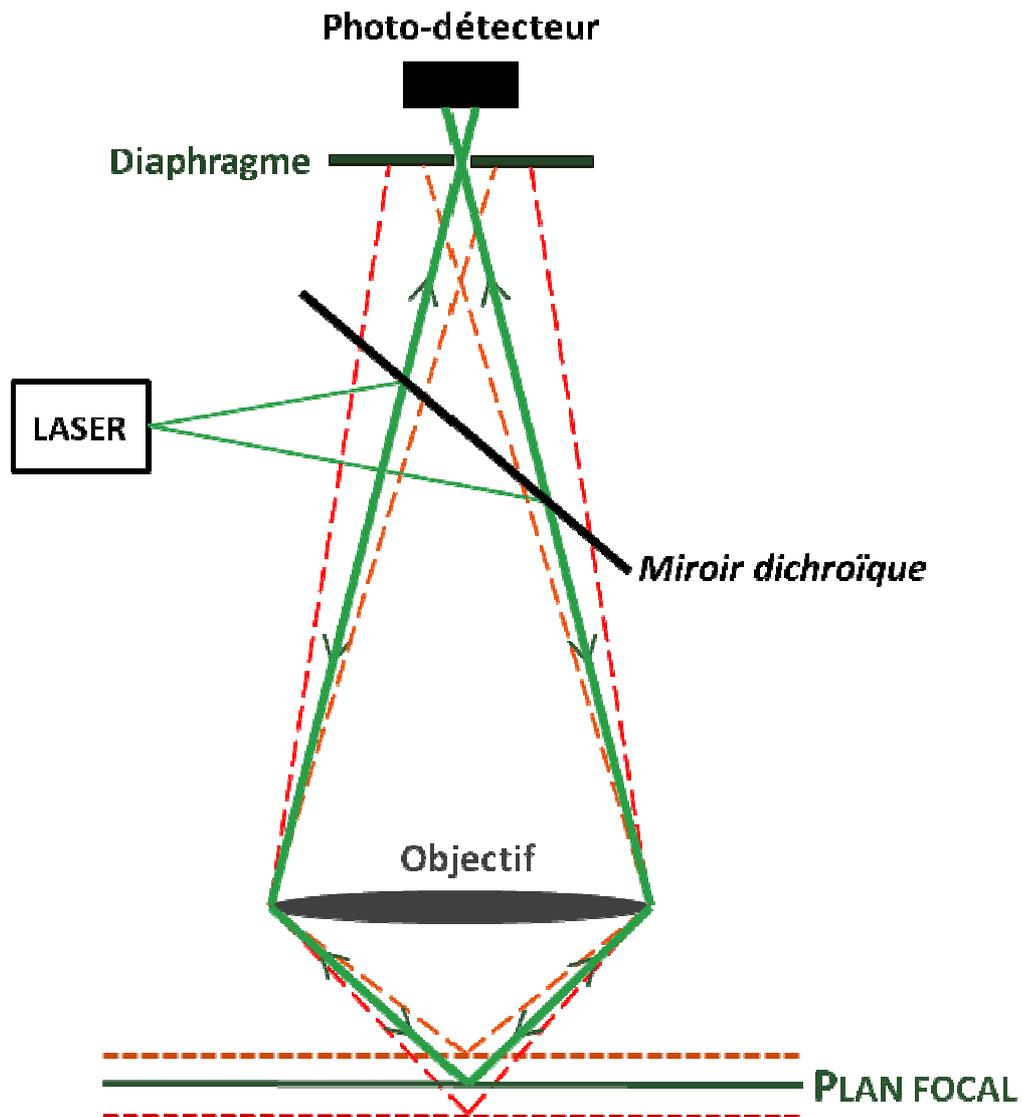
Les mesures de fluorescence à l'échelle cellulaire peuvent être effectuées à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Lors de l'étude du processus de phagocytose de *Synechococcus* par *A. catenella*, une technologie plus complexe a été employée : la microscopie confocale.

## II- MICROSCOPIE CONFOCALE

La microscopie confocale est une technologie permettant d'analyser l'intérieur des objets microscopiques en réalisant des coupes optiques virtuelles. Son principe, décrit sur la figure 1, permet d'enregistrer la fluorescence émise en un plan unique, nommé plan focal, en limitant les pertes de résolution dues aux informations parasites issus des plans voisins (Pawley, 1990 ; Matsumoto, 1993 ; Stevens et al. 1994). Le chemin optique réalisé est le suivant : le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon, provoquant l'émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation ; ces rayons émis atteindront le photo-détecteur après passage par le diaphragme variable, nommé *pinhole* en anglais (« trou d'aiguille »). C'est le réglage de ce diaphragme qui va permettre de sélectionner le signal provenant d'un plan unique : les rayons issus des plans hors-focal (représentés en rouge et orange sur la figure 1) ne seront pas enregistrés au niveau du photo-détecteur. En réalisant une succession de coupes sous un pas d'échantillonnage suffisamment faible, il est possible de réaliser une reconstitution 3D de l'objet étudié.

Le choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission est fonction des composés fluorescents étudiés. Dans le cadre de l'étude du processus de phagocytose de *Synechococcus* par *A. catenella*, la signature pigmentaire caractéristique de *Synechococcus* a pu être révélée par analyse du signal d'émission à 570 nm sous une excitation de 543 nm. Aucun marquage à

l'aide de fluorochromes n'a été effectué pour cette étude : les analyses au microscope confocal ont été réalisées sous fluorescence naturelle.



**Figure 1** : Principe de la microscopie confocale



**CARACTERISATION DES CAPACITES DE PHAGOCYTOSE DES  
CYANOBACTERIES *SYNECHOCOCCUS* SP. PAR *ALEXANDRIUM CATENELLA***

---

Jauzein C.<sup>ab</sup>, Rouquette M.<sup>b</sup>, Masseret E.<sup>b</sup>, Collos Y.<sup>b</sup>, Lautier J.<sup>b</sup>, Vaquer A.<sup>b</sup>, Grzebyk D.<sup>b</sup>,  
Pastoureaud A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Laboratoire LER-LR, Sète

<sup>b</sup> Université Montpellier 2, UMR 5119 UM2-CNRS-IFREMER,  
Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, Montpellier

**RESUME :**

L'espèce phytoplanctonique toxique *Alexandrium catenella*, principalement photo-autotrophe, est capable de compléter sa nutrition par mixotrophie, en phagocytant des cyanobactéries du genre *Synechococcus*. Les genres *Alexandrium* et *Synechococcus* sont apparus simultanément dans la communauté planctonique de l'Etang de Thau (Sud de la France) dans les années 90, au cours d'une phase d'oligotrophisation du milieu. Les capacités mixotrophes d'*Alexandrium catenella* pourraient donc représenter un avantage compétitif majeur. Afin d'étudier l'importance de cette nutrition organique au cours des efflorescences d'*A. catenella*, des expérimentations en culture ont été réalisées et complétées par des observations *in situ*. En laboratoire, des cellules d'*A. catenella* ont été mises en commun avec des cellules de *Synechococcus* marquées au <sup>15</sup>N sous différentes concentrations en ammonium et N-urée. Le processus de phagocytose a été analysé à partir des variations observées du rapport isotopique <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N et de la signature pigmentaire des cellules d'*A. catenella*. L'observation de l'ingestion progressive de *Synechococcus* et de vacuoles digestives a pu être effectuée par microscopie confocale. Le processus de phagotrophie semble être un mode de nutrition additionnel des cellules d'*A. catenella*, quelque soient les conditions nutritives. Les observations effectuées à partir d'échantillons *in situ* au cours des efflorescences de juin 2008 ont confirmé l'importance écologique de cette nutrition organique, avec un pourcentage de cellules d'*A. catenella* ayant ingéré des *Synechococcus* atteignant 41%.

## I- INTRODUCTION

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses espèces de dinoflagellés, connues pour être exclusivement autotrophes, se sont révélées être mixotrophes, capables d'utiliser la matière particulaire comme source de nutrition par des processus tels que la phagocytose (Stoecker 1999 ; Jeong et al. 2005a). Cette stratégie mixotrophe assurerait aux cellules phytoplanctoniques des gains en termes de carbone, d'azote ou de phosphore indépendamment de la photosynthèse, pouvant représenter des avantages compétitifs entre autres en cas de limitation en nutriments dissous (Nygaard & Tobiesen 1993). Parmi le genre *Alexandrium*, *Alexandrium tamarense* s'est avéré capable de phagocyter des proies de taille variée, allant des bactéries (Nygaard & Tobiesen 1993) jusqu'à des cellules phytoplanctoniques de diamètre supérieur à 11  $\mu\text{m}$  dont *Heterosigma akashiwo* et *Prorocentrum minimum* (Jeong et al. 2005a). Les capacités mixotrophes d'*Alexandrium catenella* ont été découvertes plus récemment : parmi les proies potentielles de cette espèce se trouveraient des bactéries (Seong et al. 2006) et des cyanobactéries du genre *Synechococcus* (Jeong et al. 2005b).

Dans l'Etang de Thau, l'émergence conjointe de développements d'*A. catenella* et de *Synechococcus* sp. dans les années 90, dans un contexte d'oligotrophisation des eaux, a conduit à poser l'hypothèse d'un lien trophique entre ces espèces (Collos et al. *sous presse*) : les capacités phagotrophes d'*A. catenella* pourraient correspondre à un avantage compétitif pour cette espèce favorisant le développement et le maintien de blooms toxiques dans cette lagune. Afin de tester cette hypothèse et de tenter de caractériser ce processus de nutrition mixotrophe chez *A. catenella*, des expérimentations en culture et des observations *in situ* dans les eaux de l'Etang de Thau ont été menées.

## II- MATERIEL ET METHODES

### 1- *Expérimentation en culture*

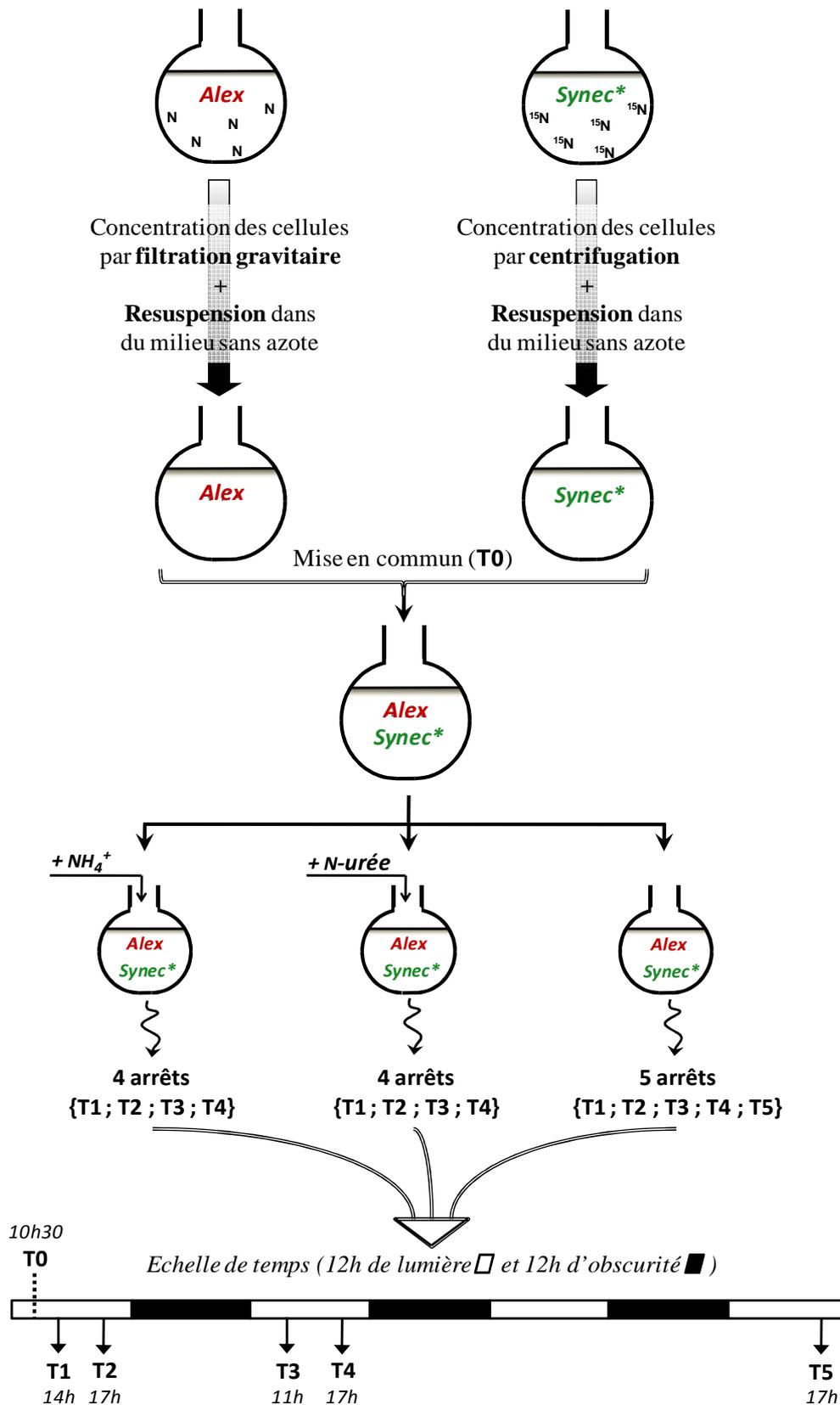
L'isolation de souches d'*A. catenella* et de *Synechococcus* sp. dans l'Etang de Thau a permis de mettre en place une expérimentation en culture pour quantifier les capacités phagotrophes spécifiques d'*A. catenella* sur ces cyanobactéries. Les souches utilisées au cours de cette expérimentation furent la souche ACT03 d'*A. catenella* et la souche TES 206 H6 de *Synechococcus*, isolées respectivement en 2003 et 2006. Ces souches ont été maintenues à

20°C sous un éclairage de  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  variant sur un cycle jour/nuit de 12h/12h. Le milieu de culture employé était similaire pour les deux espèces (eau artificielle ESAW, Andersen et al. (2005)), à la différence près que la seule source d'azote pour *A. catenella* correspondait à du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) alors que l'azote était disponible sous deux formes,  $\text{NO}_3^-$  et ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), pour *Synechococcus*.

Deux semaines avant le début de l'expérimentation, la culture de *Synechococcus* a été repiquée dans un milieu de composition similaire mais comprenant des sources azotées marquées au  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NO}_3^-$  et  $^{15}\text{NH}_4^+$ ). L'expérimentation menée a consisté en la mise en commun de ces cellules de *Synechococcus* fortement marquées au  $^{15}\text{N}$  avec des cellules d'*A. catenella* non-marquées sous différentes conditions nutritives, afin d'estimer si le taux de phagocytose par *A. catenella* était fonction de la disponibilité en nutriments azotés dissous.

Afin de contrôler les conditions en azote dissous du milieu, l'expérimentation a débuté par une resuspension des cellules d'*A. catenella* et de *Synechococcus* dans un milieu ESAW sans azote (Figure 1). *A. catenella* étant une espèce sensible à l'agitation lorsqu'elle est maintenue en culture (Collos et al. 2006), cette étape a été effectuée après concentration des cellules sur une soie de  $10 \mu\text{m}$  par filtration gravitaire (voir les Principes méthodologiques de la Partie I) pour cette espèce alors qu'elle a consisté en une centrifugation (10 000 tr/min pendant 5min à 20°C) avant resuspension pour les cellules de *Synechococcus*. Après une mise en commun des deux cultures resuspendues, trois conditions nutritives ont été mises en place et maintenues sur plusieurs jours : des conditions de croissance sur  $\text{NH}_4^+$ , sur N-urée ou sans apport d'azote (Figure 1). Les conditions nutritives non-déficientes ont été maintenues grâce à la réalisation d'apports pulsés (de  $\text{NH}_4^+$  ou de N-urée) augmentant la concentration en azote dissous du milieu d'environ  $10 \mu\text{atgN/L}$  toutes les 3h pendant la période diurne et de  $45 \mu\text{atgN/L}$  avant le commencement de la phase obscure.

Des temps d'incubation variant de 3.5 h à 78.5 h ont été effectués (Figure 1). A chaque arrêt d'incubation, des prélèvements d'eau étaient réalisés pour permettre l'estimation des abondances d'*A. catenella* et de *Synechococcus*. La concentration en éléments nutritifs ( $\text{NH}_4^+$ , N-urée et  $\text{NO}_3^-$ ) était mesurée à partir d'échantillons d'eau préalablement filtrés sur  $0,2 \mu\text{m}$ . 200 mL de culture étaient de plus récupérés et filtrés sur une soie de  $10 \mu\text{m}$  par gravitation afin d'isoler une grande quantité de cellules d'*A. catenella*, qui étaient immédiatement resuspendues dans 200 mL d'ESAW stérilisée (par filtration sur  $0,2 \mu\text{m}$ ). Des filtrations étaient alors réalisées à partir du milieu de resuspension afin d'analyser la signature pigmentaire et le rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  des cellules d'*A. catenella*.



**Figure 1 :** Schéma du protocole suivi au cours de l'expérimentation.

Deux types de filtres ont été employés lors des arrêts d'incubation : des filtres noirs en polycarbonate (porosité de 0.2  $\mu\text{m}$ , diamètre de 25 mm), utilisés pour des observations au microscope confocal, et des filtres en fibre de verre précalcinés (A/E, de porosité 1  $\mu\text{m}$  et de diamètre 13 mm), employés pour réaliser des mesures de rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  et de matière particulaire azotée et carbonée au spectromètre de masse. Après filtration, les filtres noirs étaient montés entre lame et lamelle dans de l'huile à immersion et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant observation ; les filtres en fibre de verre étaient séchés à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 24h puis maintenus à température ambiante avant analyse.

## 2- *Prélèvements in situ*

Des prélèvements *in situ* ont été effectués au cours du bloom d'*A. catenella* qui s'est développé dans l'Etang de Thau au printemps 2008. Trois stations de la Crique de l'Angle ont servi aux échantillonnages : les stations A3 et B3 (prélèvements le 05/06/08) et à la station C5 (prélèvements le 19/06/08). En plus de l'estimation des abondances d'*A. catenella* et de *Synechococcus*, ces prélèvements ont permis de réaliser des observations au microscope confocal de cellules d'*A. catenella* lors d'une efflorescence afin de pouvoir tester l'existence *in situ* de processus de phagocytose. Pour faciliter l'observation des cellules d'*A. catenella* au sein de la communauté planctonique, un fractionnement de classe de taille a été réalisé au niveau des échantillons. Pour cela, les cellules de diamètre supérieur à 10  $\mu\text{m}$  (dont *A. catenella*) ont été isolées par filtration/resuspension à l'aide d'une soie de 10  $\mu\text{m}$  (comme lors des expérimentations en culture) ; la resuspension s'effectuait dans de l'eau de mer naturelle stérilisée par filtration préalable sur 0,2  $\mu\text{m}$ . Des échantillons d'eau furent ensuite prélevés à partir du milieu de resuspension afin de réaliser des montages pour observation au microscope confocal, comme décrit précédemment.

## 3- *Mesures des paramètres biologiques et physico-chimiques*

L'abondance des cellules d'*A. catenella* était estimée par comptage au microscope, celle de *Synechococcus* par cytométrie en flux. Les concentrations en  $\text{NH}_4^+$ , N-urée et  $\text{NO}_3^-$  étaient respectivement mesurées suivant les méthodes de Koroleff (1976), Goeyens et al. (1998) et Collos et al. (1999).

#### 4- Observations au microscope confocal

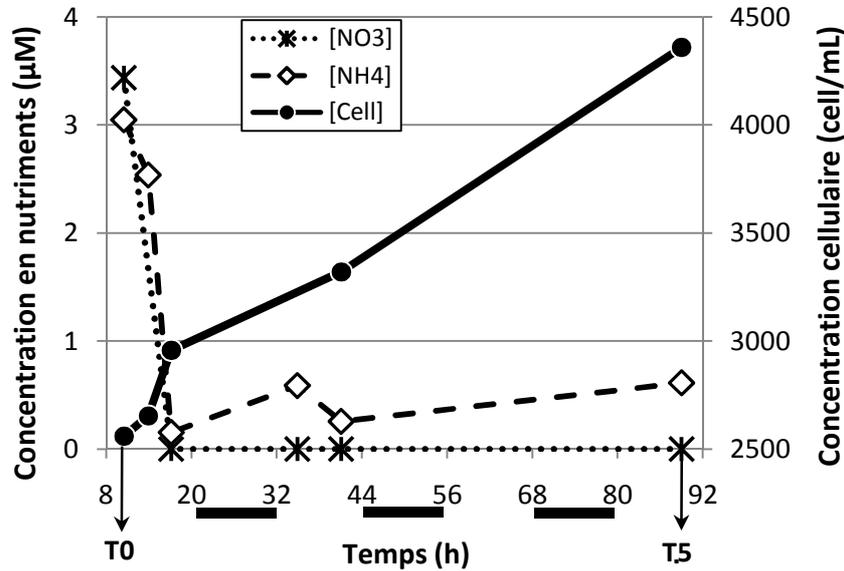
Pour l'expérimentation en culture, 50 cellules ont été scannées pour chaque temps d'incubation et chaque condition de culture. Le nombre de scans a été augmenté pour les observations d'échantillons *in situ*, à raison de 55 à 100 cellules scannées par station.

Les observations au microscope confocal ont été réalisées sous une excitation laser unique de 545 nm. L'émission associée aux pigments spécifiques des cyanobactéries (principalement la phycoérythrine) était mesurée à 570 nm et celle des pigments chlorophylliens (présents à la fois chez *A. catenella* et *Synechococcus*) à 680 nm. En réalisant des scans de cellules sous un pas de 0,2 µm entre les coupes, des représentations 3D ont pu être obtenues grâce à l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image (Imaris). Ce logiciel a également permis d'estimer les volumes vacuolaires après filtration des signaux de fluorescence.

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

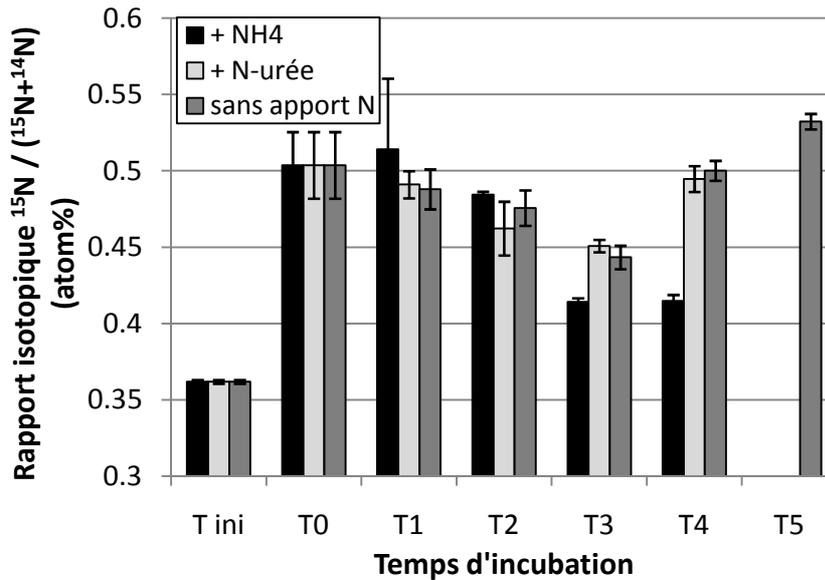
D'après les résultats obtenus en culture, la souche ACT03 d'*A. catenella* s'est avérée capable de continuer à croître pendant plusieurs jours en conditions de carence en azote lorsque des proies potentielles du genre *Synechococcus* étaient présentes dans le milieu. Ces conditions de carence se sont mises en place dans la culture mixte d'*A. catenella* et de *Synechococcus* où aucun apport d'azote n'a été effectué pendant l'expérimentation, une fois que les contaminations en  $\text{NO}_3^-$  (3,4 µM) et  $\text{NH}_4^+$  (3,1 µM) du milieu de resuspension sans azote aient été épuisées. D'après la Figure 2, un état de carence, caractérisé par des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  indétectables et des concentrations en  $\text{NH}_4^+$  inférieures à 0,6 µM, s'est instauré dès le deuxième temps d'incubation (6,7 h après la mise en commun des cellules d'*A. catenella* et de *Synechococcus*). Malgré cette carence en azote, la population d'*A. catenella* a montré un taux de croissance de  $0,13 \text{ j}^{-1}$  au cours des trois jours suivants (Figure 2). Cependant, ces résultats de variations de densité cellulaire ne suffisent pas à conclure quant à l'existence d'une nutrition mixotrophe d'*A. catenella* par phagocytose de cyanobactéries car *A. catenella* serait capable d'assurer plus d'une division cellulaire en état de carence. Les variations des diamètres cellulaires (obtenus sur les cellules scannées au microscope confocal) suggèrent tout de même qu'une croissance effective a eu lieu pendant ces jours de carence : aucune diminution des diamètres cellulaires n'a été observée dans la culture où aucun apport d'azote n'a été réalisé ; les diamètres moyens des cellules scannées

ont été de  $17 \pm 3 \mu\text{m}$ ,  $17 \pm 3 \mu\text{m}$ ,  $17 \pm 1 \mu\text{m}$  et  $22 \pm 5 \mu\text{m}$  aux temps T1, T2, T3 et T5 (définis sur la Figure 1), suggérant qu'un processus de nutrition mixotrophe a pu permettre de combler les besoins en azote nécessaires pour soutenir la croissance des cellules d'*A. catenella*.



**Figure 2 :** Variations des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  ( $[\text{NO}_3^-]$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $[\text{NH}_4^+]$ ) et cellules d'*A. catenella*, entre T0 (heure de mise en commun des cellules avec *Synechococcus*) et le dernier temps d'incubation (T5), dans la culture mixte où aucun ajout d'azote n'a été effectué. Les barres noires représentent les périodes d'obscurité.

Deux types de marquage de la matière particulaire des cellules de *Synechococcus* ont été envisagés en vue de caractériser la nutrition mixotrophe d'*A. catenella* par phagocytose : la signature pigmentaire spécifique des cyanobactéries et le marquage au  $^{15}\text{N}$ . Seule l'analyse, à l'échelle cellulaire, du marquage pigmentaire a donné des résultats concluants ; le suivi du rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  des cellules d'*A. catenella* n'a pas montré d'accumulation de matériel marqué au cours de l'expérimentation, qui aurait pu permettre de quantifier un flux d'azote entre populations de *Synechococcus* et d'*A. catenella*. Les variations observées du rapport isotopique des cellules d'*A. catenella*, oscillant entre 0,41 et 0,53 atom% (Figure 3), seraient probablement dues à des phénomènes d'adsorption et désorption physique du matériel marqué sur les thèques des cellules. En effet, une valeur de 0,50 atom% (supérieure à l'abondance naturelle de 0,37 atom% estimée dans la culture initiale d'*A. catenella*) a été mesurée immédiatement après la mise en commun des cellules d'*A. catenella* et de *Synechococcus* (Figure 3).

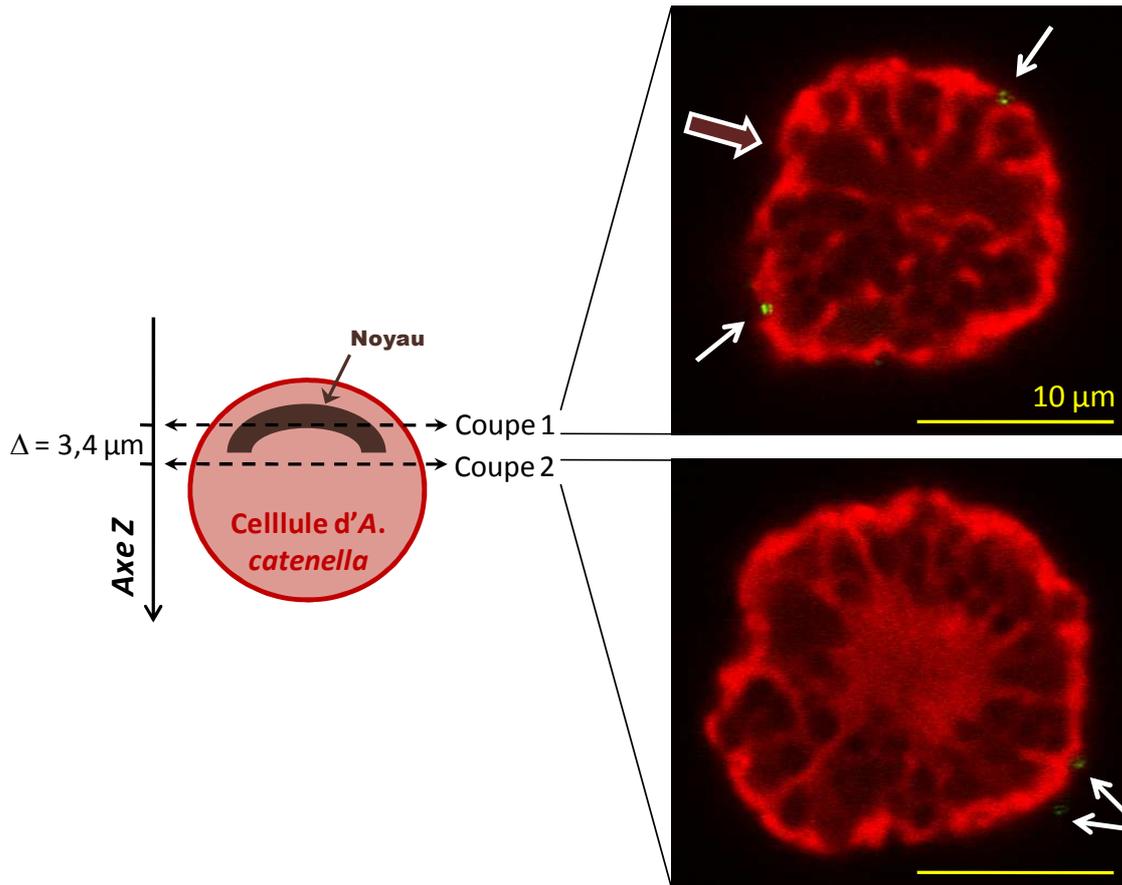


**Figure 3 :** Variation du rapport isotopique  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  des cellules d'*A. catenella* au cours de l'expérimentation sous les trois conditions de croissance (sur  $\text{NH}_4^+$ , N-urée ou sans apport d'azote). T ini et T0 représentent respectivement les temps précédant et succédant immédiatement la mise en commun des cellules d'*A. catenella* et de *Synechococcus*.

Si les mesures de marquage isotopique au spectromètre de masse ne se sont pas avérées suffisamment précises pour mettre en évidence le processus de phagocytose de cyanobactéries, l'analyse de la fluorescence des pigments photosynthétiques présents au sein des cellules d'*A. catenella* a permis de caractériser en partie ce processus de nutrition mixotrophe.

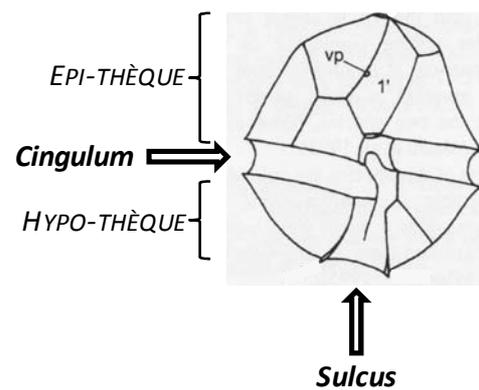
### 1- Les figures de phagocytose

L'analyse des signaux de fluorescence de cellules d'*A. catenella* observées en coupe, à l'aide d'un microscope confocal, a permis de visualiser trois étapes dans le processus de phagocytose : l'internalisation de cellules de *Synechococcus* au niveau de divers sites membranaires, la formation de vacuoles digestives et la migration de pigments non pleinement dégradés dans l'ensemble du protoplasme (Figure 4, 6 et 8). Ces trois types de figure de phagocytose ont été observés aussi bien lors de l'analyse des échantillons *in situ* qu'au cours des expérimentations en culture, et ceci dès le premier arrêt d'incubation (3,5 h après la mise en commun prédateurs/proies).



**Figure 4 :** Deux coupes d'une même cellule d'*A. catenella* observées au microscope confocal. La chlorophylle a apparaît en rouge et la phycoérythrine en vert. Les petites flèches blanches indiquent des cellules de *Synechococcus* tout juste ingérées ; la grosse flèche brune indique l'encoche créée par le noyau entre les chloroplastes.

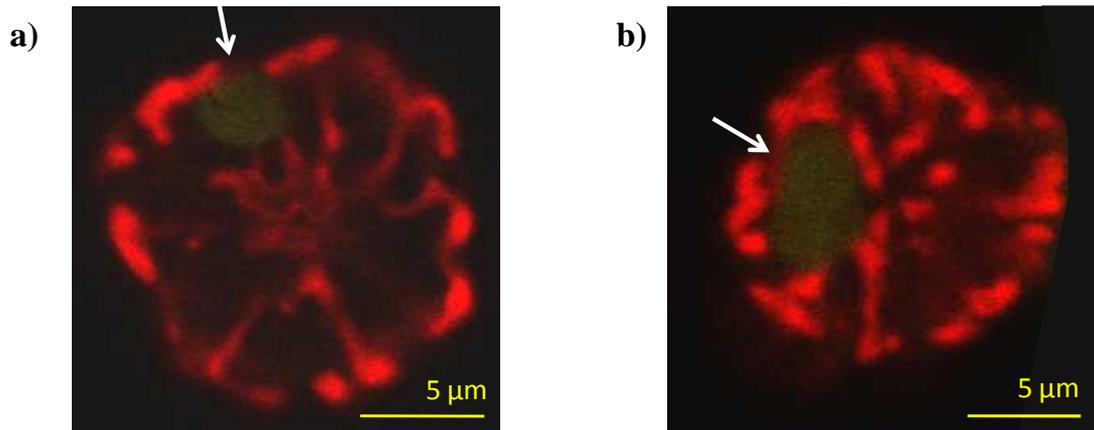
D'après la Figure 4 présentant deux coupes d'une même cellule d'*A. catenella* prises à 3,4 μm d'écart sur l'axe Z, différents sites membranaires semblent propices à l'internalisation de cellules de *Synechococcus*. La localisation du noyau (elliptique et équatoriale chez *A. catenella* (Whedon & Kofoid 1936 ; Balech 1995), situé le long du sillon central nommé cingulum, voir Figure 5) permet de préciser que ces sites de phagocytose seraient répartis de part et d'autre du cingulum, *i.e.* aussi bien au niveau de l'hypo-thèque que de l'épi-thèque.



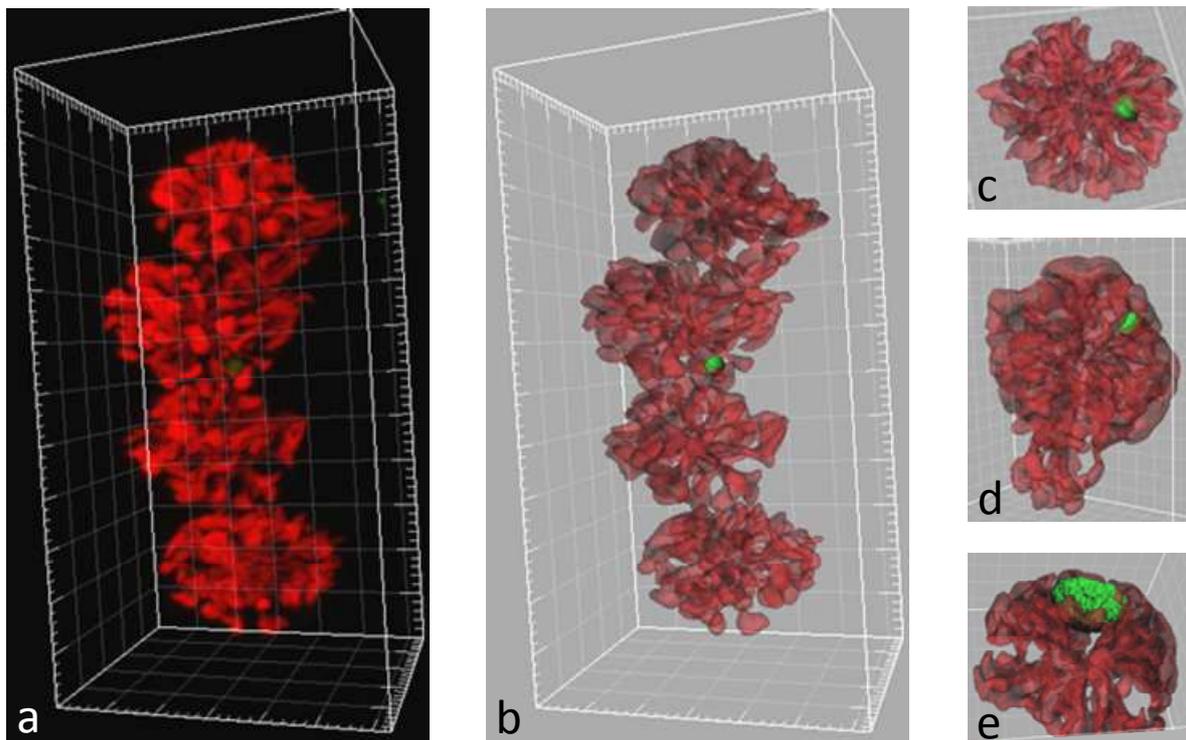
**Figure 5 :** Représentation d'une thèque d'*A. catenella* en face ventrale avec localisation du pore ventrale (Vp) caractéristique de cette espèce. Schéma complété à partir des représentations de Balech (1995) et Faust & Gualledge (2002).

L'analyse des sites potentiels de phagocytose chez *Alexandrium tamarense* réalisée par Jeong et al. (2005a) à l'aide d'un microscope classique n'a pas révélé une telle diversité de sites. En observant le comportement prédateur d'*A. tamarense* face à six proies potentielles, correspondant à six espèces phytoplanctoniques de diamètre variant de 5,2  $\mu\text{m}$  (*Isochrysis galbana*) à 12,1  $\mu\text{m}$  (*Prorocentrum micans*), un seul site préférentiel d'ingestion des proies a été mis en évidence pour cette espèce : le sillon longitudinal nommé sulcus, situé au niveau de l'hypo-thèque (Figure 5). Trois hypothèses pourraient expliquer l'observation de cellules de *Synechococcus* tout juste piégées en divers sites membranaires d'une même cellule d'*A. catenella* : (i) *A. catenella* serait capable d'internaliser des proies dans son protoplasme à partir de sites plus diversifiés qu'*A. tamarense* ; les proies pourraient alors être capturées au niveau de différentes sutures entre les plaques de la thèque, comme observé par Jeong et al. (2005a) au cours de la phagocytose d'un cryptophyte par *P. micans* ; (ii) *A. catenella* serait capable de capturer des proies au niveau des sutures de la thèque à condition qu'elles soient de très petite taille, comme *Synechococcus* (cellules en bâtonnet de longueur moyenne 1  $\mu\text{m}$ ) ; les capacités de phagocytose d'*A. catenella* envers des proies plus grosses (supérieures à 5  $\mu\text{m}$ ) seraient alors limitées aux sites du sulcus comme chez *A. tamarense* ; (iii) lors de la phagocytose par des cellules du genre *Alexandrium*, les proies traverseraient la thèque au niveau du sulcus, puis migreraient dans l'espace situé entre thèque et membrane plasmique avant d'être internalisées dans le protoplasme au niveau de divers sites membranaires, répartis largement sur la périphérie de la cellule. Des observations supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir trancher entre ces trois hypothèses. La réalisation d'un marquage fluorescent de la thèque (tel qu'au calcofluor) avant observation des cellules au microscope confocal pourrait permettre des avancées dans la compréhension du processus de capture se déroulant chez *A. catenella*.

Une fois le processus de digestion initié, la rupture des membranes plasmiques des cellules de *Synechococcus* a permis la visualisation de vacuoles digestives par diffusion de leurs pigments spécifiques dans le volume vacuolaire. Une à cinq vacuoles par cellule d'*A. catenella* ont été observées ; des grosses vacuoles périphériques sont visibles sur la Figure 6. L'estimation des volumes vacuolaires, après compilation en 3D des coupes réalisées (Figure 7), a révélé une grande variété de tailles de vacuoles digestives (de 0,3 à 49,0  $\mu\text{m}^3$  correspondant à un pourcentage de 0.01 % à 2.5 % du volume cellulaire total). Cette variété s'expliquerait par des phénomènes de fusion de vacuoles au cours du processus de digestion, pouvant mener à la formation de vacuoles de très grande taille (Figure 6 et 7e).



**Figure 6 :** Observation de vacuoles de grosse taille (flèche blanche) sur des coupes de cellules d'*A. catenella*. La chlorophylle a apparait en rouge et la phycoérythrine en vert.

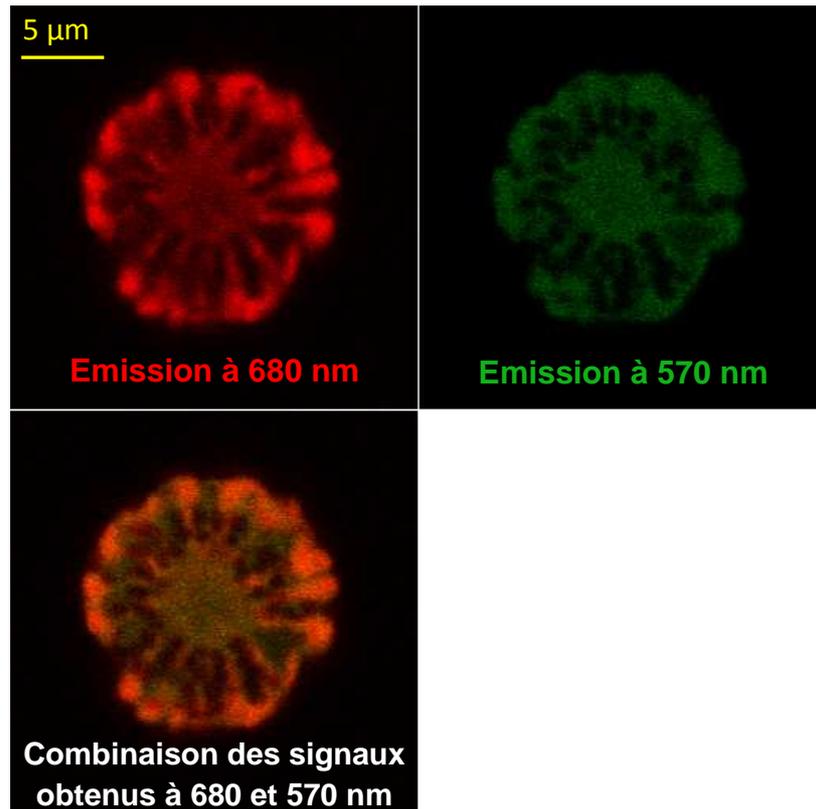


**Figure 7 :** Réalisation de représentations 3D de cellules d'*A. catenella* où les vacuoles digestives apparaissent en vert. Observation d'une vacuole digestive au sein d'une colonie de 4 cellules avant (a) et après (b) filtration du signal de fluorescence compilé en 3D ; (c) Cellule avec vacuole digestive où le sillon créé par le noyau entre les chloroplastes est visible ; (d) Vacuole digestive dans une cellule en état de bourgeonnement ; (e) Grosse vacuole digestive en périphérie d'une cellule (représentée en coupe sur la Figure 6b).

Skovgaard et al. (2000) ont envisagé le fait que les vacuoles digestives pourraient provoquer une baisse de l'efficacité de la photosynthèse en masquant les chloroplastes environnants. Chez l'espèce mixotrophe étudiée dans ces travaux (*Fragilidium subglobosum*), l'influence de ce phénomène serait limitée grâce à l'accumulation des vacuoles au centre de la cellule (Skovgaard 1996). Pour *A. catenella*, un tel phénomène d'ombrage pourrait être envisagé au vu de la taille et de la répartition de certaines vacuoles, telles que celles visibles sur les Figure 6 et 7e.

La variabilité observée dans les tailles des vacuoles et l'existence de processus de fusion vacuolaire sont également à prendre en compte dans l'estimation du taux d'ingestion chez *A. catenella*. Les taux d'ingestion sont habituellement estimés à partir du contenu instantané en vacuoles digestives, *i.e.* le nombre moyen de vacuoles par cellule prédatrice. Au cours de l'expérimentation *in vitro*, des vacuoles de grosses tailles (dont celle présentée sur la Figure 6 et 7e) ont été observées dès le premier arrêt d'incubation. Le plus court temps d'incubation réalisé (3,5 h) s'est donc avéré trop long pour estimer un taux d'ingestion suivant cette méthode : l'existence de vacuoles fusionnées risquait de provoquer une sous-estimation du processus de phagocytose. Dans cette étude préliminaire où des temps d'incubations variant de 3,5 h à 78,5 h ont été réalisés, le taux de phagocytose sera donc analysé à travers la proportion de cellules d'*A. catenella* présentant des figures de phagocytose plutôt qu'à partir de l'estimation du nombre moyen de vacuoles par cellules.

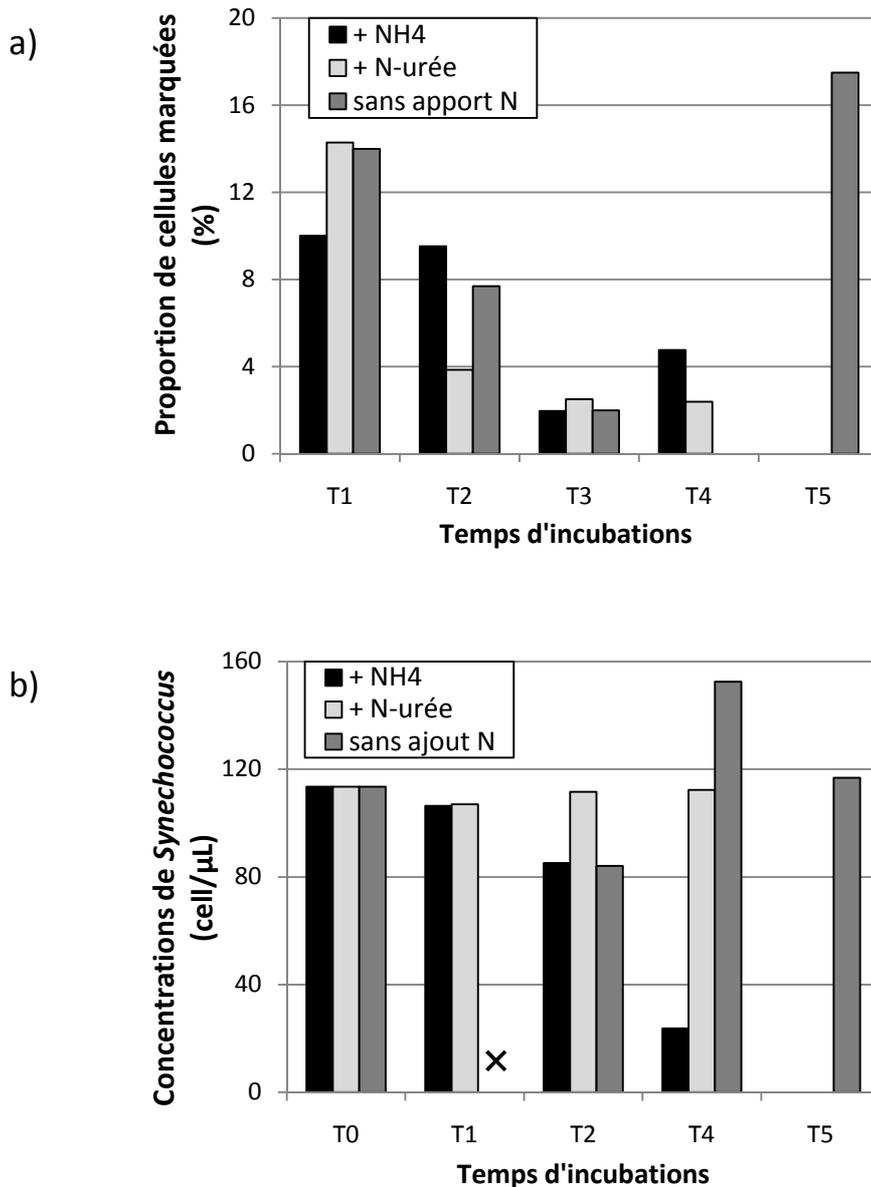
Une autre étape du processus de digestion des proies a pu être visualisée à partir de l'observation de coupes cellulaires, et ceci dès le premier temps d'incubation (3,5 h) des expérimentations en culture : la diffusion, dans tout le protoplasme des cellules d'*A. catenella*, de la fluorescence caractéristique des cyanobactéries (Figure 8). Ces figures de diffusion sont la marque d'une digestion antérieure d'au moins une cellule de *Synechococcus* et suggèrent que les pigments des proies restent non pleinement dégradés au moment de la disparition de la vacuole digestive. L'observation de telles figures suggère que le taux de digestion (taux de disparition de vacuoles par unité de temps) pourrait atteindre  $0,29 \text{ h}^{-1}$  ( $= 1 / 3,5 \text{ h}^{-1}$ ) valeur nettement supérieure à celles estimées par Li et al. (2001) (entre  $0,004$  et  $0,088 \text{ h}^{-1}$ ) pour caractériser le taux de digestion de cryptophytes par le dinoflagellé *Gyrodinium galatheanum*.



**Figure 8 :** Visualisation, au niveau d'une coupe cellulaire d'*A. catenella*, des signaux obtenus aux deux longueurs d'onde mesurées (680 nm et 570 nm), le signal à 570 nm représentant la signature pigmentaire de *Synechococcus*.

## 2- Observation des figures de phagocytose à l'échelle de la population d'*A. catenella*

Au cours de l'expérimentation en culture, le pourcentage de cellules d'*A. catenella* présentant des figures de phagocytose a varié entre 0 % et 17,5 % (Figure 9a), sans aucune tendance nette différenciant les trois conditions nutritives testées (croissance sur  $\text{NH}_4^+$ , sur N-urée et sans apport d'azote). La phagocytose de cyanobactéries semble donc correspondre à un mode de nutrition additionnel par rapport à l'absorption de nutriments azotés dissous. Son intensité n'est pas apparue fonction de la disponibilité en azote dissous ou de la concentration en *Synechococcus* (Figure 9) ; on aurait pu s'attendre à une intensification du mode de nutrition mixotrophe en cas de carence en azote dissous et à une corrélation positive entre pourcentage de cellules d'*A. catenella* marquées et nombre de proies. La comparaison des valeurs obtenues en milieu (temps d'incubations T1 et T3) ou en fin de phase claire (temps d'incubation T2, T4 et T5) n'a pas non plus révélé de variation diurne dans l'intensité du processus de phagocytose (Figure 9a).



**Figure 9 :** Variations de la proportion de cellules d'*A. catenella* présentant des figures de phagocytose (a) et de la concentration en proies (b) au cours de l'expérimentation. La croix indique une perte d'échantillons.

Les échantillons prélevés *in situ* sur trois stations au cours du printemps 2008 ont montré des concentrations en *Synechococcus* nettement plus faibles que celles testées en culture. Les pourcentages atteints de cellules d'*A. catenella* présentant des figures de phagocytose sont cependant apparus du même ordre de grandeur, voire nettement supérieurs aux résultats *in vitro* : des proportions de 5 %, 18 % et 41 % de cellules marquées de la signature pigmentaire de *Synechococcus* ont été estimées pour des concentrations en proies de 0,5 cell/μL, 3,7 cell/μL et 3,1 cell/μL respectivement. Ces valeurs prouvent

l'importance du processus de nutrition mixotrophe par phagocytose de cyanobactéries dans le développement des efflorescences d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau et suggèrent qu'*A. catenella* serait capable d'exploiter de faibles densités cellulaires de proies.

En culture, les taux de phagocytose observés (< 17,5 % de cellules d'*A. catenella* marquées) ont pu être limités par une faible appétence des proies. En effet, les conditions de culture employées étaient adaptées à la croissance d'*A. catenella* mais n'ont pas été optimisées pour celle de *Synechococcus* ; les cellules de *Synechococcus* ont donc pu subir un stress important en culture diminuant leur appétence par rapport à des conditions de croissance *in situ*.

#### IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La nutrition mixotrophe d'*A. catenella* par phagocytose de cyanobactéries du genre *Synechococcus* apparaît donc être essentielle à prendre en compte dans la compréhension des développements et maintien d'efflorescences toxiques dans la lagune de Thau. L'importance de la bactériovorie dans ces efflorescences reste à définir. Le processus de phagocytose des cyanobactéries a pu être en partie caractérisé grâce à l'utilisation de la microscopie confocale, mais ce mode de nutrition semble être difficile à quantifier en terme de flux de matière, de manière expérimentale. L'estimation réelle des gains métaboliques associés à cette stratégie mixotrophe par rapport à l'absorption de nutriments dissous risque donc d'être complexe à réaliser.

Ce processus de phagocytose est apparu indépendant des conditions nutritives en terme d'azote dissous. Il serait cependant intéressant d'envisager et de tester également l'influence de la disponibilité en phosphate car une augmentation du taux de phagocytose de bactéries par *A. tamarensis* en cas de limitation en phosphate a déjà été observée (Nygaard & Tobiesen 1993). L'interaction potentielle entre processus de phagocytose et photosynthèse représente une autre voie à étudier en vue de caractériser de manière plus complète le processus de phagocytose chez *A. catenella*. En effet, des influences de l'irradiance sur le taux de phagocytose par stimulation (Caron et al. 1993) ou inhibition (Jones et al. 1993) et, à l'inverse, de la phagocytose sur le taux de photosynthèse (Skovgaard et al. 2000) ont déjà été mises en évidence. La phagocytose pourrait limiter les capacités photosynthétiques par diminution du contenu en chlorophylle a des cellules (Skovgaard et al. 2000), mais peut-être également par un phénomène d'ombrage des chloroplastes par les vacuoles digestives chez *A. catenella*.

## Références

- Andersen R.A.**, Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In: R.A. Andersen [Ed] *Algal culturing techniques*. Elsevier, Amsterdam, p. 429-538.
- Balech E.** 1995. The Genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata), Sherkin Island Marine Station, Ireland. 151 pp.
- Caron D.A.**, Sanders R.W., Lim E.L., Marrasé C., Amaral L.A., Whitney S., Aoki R.B., Porter K.G. 1993. Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic chrysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microb. Ecol.* Vol. 25, p. 93-111.
- Collos Y.**, Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* Vol. 11, p. 179-184.
- Collos Y.**, Lespilette M., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* Vol. 28, p. 313-318.
- Collos Y.**, Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P., Vaquer A. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea. Res. Sous presse.* (doi: 10.1016/j.seares.2008.05.008)
- Faust M.A.**, Gullledge R.A. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. *Contr. U. S. Nat. Herb.* Vol. 42, p. 1-14.
- Goeyens L.**, Kindermans N., Abu Yusuf M., Elskens M. 1998. A room temperature procedure for the manual determination of urea in seawater. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* Vol. 47, p. 415-418.
- Jeong H.J.**, Yoo Y. D., Park J. Y., Song J. Y., Kim S. T., Lee S. H., Kim K. Y., Yih W. H. 2005a. Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquat. Microb. Ecol.* Vol. 40, p: 133-150.
- Jeong H.J.**, Park J. Y., Nho J.H., Park M.O., Ha J.H., Seong K.A., Jeng C., Seong C.N., Lee K.Y., Yih W.H. 2005b. Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.* Vol. 41, p : 131-143.
- Jones H.L.J.**, Leadbeater B.S.C., Green J.C. 1993. Mixotrophy in marine species of *Chrysochromulina* (Prymnesiophyceae): ingestion and digestion of a small green flagellate. *J. Mar. Biol. Assoc U.K.* Vol. 73, p. 283-296.
- Koroleff F.** 1976. Determination of nutrients. In K. Grasshoff [Ed] *Methods of Seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, p. 117-182.
- Li A.**, Stoeker D.K., Coats D.W. 2001. Use of the “food vacuole content” method to estimate grazing by the mixotrophic dinoflagellate *Gyrodinium galatheanum* on cryptophytes. *J. Plankton Res.* Vol. 23(3), p. 303-318.
- Nygaard K.**, Tobiesen A. 1993. Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 38(2), p : 273-279.

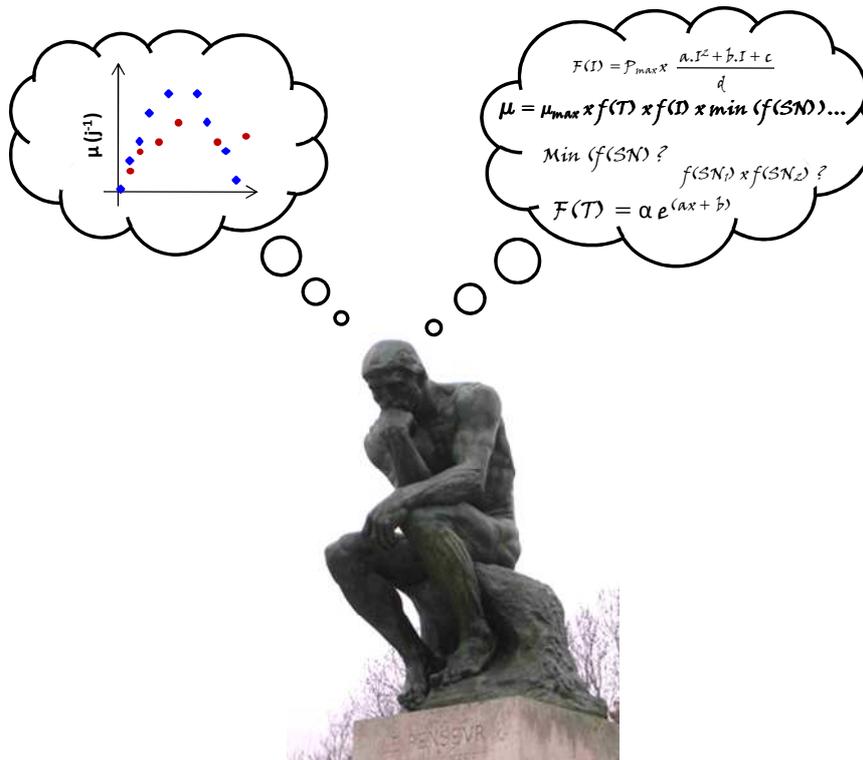
- Seong K.A.**, Jeong H.J., Kim S., Kim G.H., Kang J.H. 2006. Bacterivory by co-occurring red-tide algae, heterotrophic nanoflagellates, and ciliates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 322, p : 85-97.
- Skovgaard A.** 1996. Engulfment of *Ceratium* spp. (Dinophyceae) by the thecate photosynthetic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. *Phycologia*. Vol. 35, p. 490-499.
- Skovgaard A.**, Hansen P.J., Stoecker D.K. 2000. Physiology of the mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. I. Effects of phagotrophy and irradiance on photosynthesis and carbon content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 201, p. 129-136.
- Stoecker D.K.** 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* Vol. 46 (4), p : 397-401.
- Whedon W.F.**, Kofoid C.A.. 1936. Dinoflagellata of the San Diego region. I. On the skeletal morphology of two new species, *Gonyaulax catenella* and *G. acatenella*. *Univ. Calif. Publ. Zool.* Vol. 41, p : 25-31.



# Partie 4

---

## MODELISATION DE LA CROISSANCE



*Penseur de Rodin*



## Contexte, résumé et perspectives

---

Les expérimentations réalisées en chambre de culture au laboratoire ont permis de mettre en évidence les effets spécifiques de la disponibilité en éléments nutritifs sur la croissance d'*A. catenella* en maintenant les autres facteurs majeurs de contrôle (température, salinité, lumière...) à des conditions proches des conditions optimales. Chacune des expériences réalisées, décrites précédemment, a permis d'apporter des informations quant à la formalisation à envisager pour simuler ce contrôle par les éléments nutritifs.

Cependant, la description des processus de nutrition d'*A. catenella* s'est avérée particulièrement complexe de par : (i) la mise en évidence d'une grande variété de sources nutritives potentielles pouvant intervenir significativement dans la croissance, suggérant un nombre important de fonctions de limitations à intégrer dans un modèle explicatif, (ii) la forte variabilité observée dans la valeur des paramètres utilisés pour modéliser les processus d'absorption, poussant à complexifier l'expression mathématique des fonctions de limitations. Le **Chapitre 1** de cette partie dresse un bilan des avancées et contraintes, effectuées au cours du travail expérimental, concernant la paramétrisation des flux d'absorption et d'assimilation par *A. catenella*. La complexité observée dans l'analyse des processus de nutrition rend incompatible ces résultats de modélisation avec un modèle de type prédictif à court terme, comme celui prévu pour compléter le système d'alerte précoce au niveau de l'Etang de Thau.

Le **Chapitre 2** présente des formalisations de l'influence de la température, de la salinité et de l'éclairement sur la croissance d'*A. catenella* sous forme de fonctions de limitation. Ces travaux de modélisation ont été effectués à partir d'un jeu de données fourni par Mohamed Laabir. Les fonctions de limitation proposées pourront être intégrées à un futur modèle de croissance d'*A. catenella*.



## Principes théoriques majeurs

---

Les systèmes biologiques se caractérisent par une grande *complexité*, engendrée par une forte hétérogénéité structurelle que l'on retrouve à toutes les échelles (de l'écosystème à l'échelle moléculaire), couplée à une complexité dans les comportements des organismes. Pour représenter de tels systèmes, le modélisateur a alors le choix entre favoriser une représentation la plus proche possible du réel ou préférer simplifier la réalité afin de se focaliser sur les mécanismes les plus élémentaires ou fondamentaux. Ce choix se fera en fonction de l'objectif recherché : désire-t-on un modèle plutôt *explicatif* ou *prédictif*? Une représentation proche du réel vise à décrire plus finement les mécanismes biologiques, mais impose une plus forte complexité mathématique. Cette dernière se traduit par l'introduction d'un grand nombre de paramètres dans le modèle dont les incertitudes cumulées augmentent le risque global d'erreur dans les simulations. Plus un modèle sera complexe, moins il aura de chance de pouvoir être utilisé dans un but prédictif. Un modèle explicatif doit, lui, intégrer un certain niveau de complexité dans la représentation des processus. Cependant, pour chaque type de modèle, il est important de limiter le nombre de paramètres intégrés et d'utiliser, en grande majorité, des paramètres mesurables afin de permettre une validation du modèle.

La démarche de modélisation suivie dans cette thèse a été centrée sur la représentation de processus (comme l'absorption des éléments nutritifs) qui sont apparus rapidement complexes. Elle s'intègre donc, tout d'abord, dans une approche explicative des mécanismes biologiques associés à la croissance d'*A. catenella*. L'utilisation de ces résultats de modélisation dans un but prédictif, tel que celui de modéliser le développement d'un bloom dans l'Etang de Thau en vue d'améliorer le système d'alerte pour la protection de la production ostréicole, dépendra du potentiel de simplification de ces résultats.

## I- FACTEURS DE REGULATION DE LA CROISSANCE

L'influence des facteurs environnementaux sur la croissance du phytoplancton (voir Introduction générale) peut être qualifiée de *limitante* ou *régulante*. Les facteurs dits *limitants* sont strictement nécessaires à la croissance algale et une modification de leurs caractéristiques peut être induite par cette croissance. On y retrouve, par exemple, les éléments nutritifs (facteur chimique) dont la concentration dans le milieu diminue lorsque les algues les consomment en vue de combler leurs besoins nutritifs pour la croissance. Les facteurs dits *régulants* ont une influence sur la croissance algale mais ne subissent pas, de manière significative, l'influence des organismes. Ces facteurs peuvent être de type physique, comme la température, l'intensité lumineuse ou la turbulence, ou bien chimique, comme le pH. *In situ*, dans certains cas extrêmes, des facteurs considérés comme régulants peuvent tout de même être modifiés par le développement de micro-algues : une efflorescence massive peut, par exemple, provoquer un phénomène d'ombrage ou bien une modification du pH du milieu.

## II- MISE EN PLACE D'UN MODELE DE CROISSANCE

La mise en place d'un modèle de croissance vise à formaliser l'influence de ces facteurs de régulation sur le taux de croissance ( $\mu$ ) à travers un schéma conceptuel composé d'*hypothèses* et d'un *système d'équations mathématiques*.

### 1- *Les hypothèses*

Pour clarifier ce concept d'hypothèses, on peut se baser sur l'exemple d'expérimentations réalisées en semi-continu, telles que celles mises en place pour étudier le prélèvement du phosphore par *A. catenella*. Pour pouvoir modéliser ces systèmes et les comparer à la théorie de Droop (1968), trois hypothèses doivent être posées : la première postule que les cultures sont à l'équilibre ; la deuxième est basée sur les bilans de matière, définis par les flux d'entrée et de sortie ; la troisième concerne l'homogénéité du milieu de culture et postule que les concentrations mesurées dans le volume prélevé au cours du renouvellement sont égales à celle de la culture complète.

A partir de ces postulats, les variations de la concentration en éléments nutritifs dans le milieu de culture, prises en exemple, peuvent alors être formalisées de la manière suivante :

$$d ([SN]) / d (t) = DR \times [SN]_0 - DR \times [SN] - V_{SN} \times [cell] \quad (1)$$

où la concentration en élément nutritif SN est notée [SN] ( $\mu\text{M}$ ) dans la culture au temps t et  $[SN]_0$  ( $\mu\text{M}$ ) dans le milieu de renouvellement, DR est le taux de dilution ( $j^{-1}$ ), [cell] est la concentration cellulaire (nombre de cellules par litre,  $\text{cell.L}^{-1}$ ) et  $V_{SN}$  ( $\mu\text{atg.cell}^{-1}.j^{-1}$ ) est la vitesse d'absorption de cet élément par les cellules.

## 2- Le système d'équations

Le système d'équations fait appel à trois types de variables. Les *variables d'état* regroupent des indicateurs de biomasse, comme le nombre de cellules ou la quantité de matière particulaire, et des paramètres associés aux facteurs environnementaux limitants (voir définition ci-dessus) comme la concentration en éléments nutritifs. Les *facteurs de forçages* correspondent aux facteurs régulant la croissance (voir définition ci-dessus). Les *constantes* sont des paramètres d'entrée dont la valeur est fixée au cours de chaque simulation. On y retrouve par exemple les constantes  $K_S$  et  $V_{\max}$  du modèle de Michaelis-Menten ou bien le quota cellulaire minimal  $Q_0$  du modèle de Droop.

Le système d'équations est construit autour d'une équation centrale exprimant le taux de croissance ( $\mu$ ) en fonction de facteurs potentiels de régulation suivant la relation générale :

$$\mu = \mu_{\max} \times \{\text{fonctions de limitation}\} \quad (2)$$

où le taux de croissance  $\mu$  (en  $j^{-1}$  ou  $\text{div}/j$ ) est exprimé en fonction du taux maximal de croissance  $\mu_{\max}$  (constante correspondant au taux de croissance atteint quand les conditions environnementales sont optimales, exprimée en  $j^{-1}$  ou  $\text{div}/j$ ) auquel est appliqué un ensemble de fonctions de limitation dont la valeur est comprise entre 0 et 1.

Etablir cette équation générale va donc consister à faire des choix concernant le *nombre de fonctions de limitations* à intégrer (*i.e.* le nombre de paramètres environnementaux dont l'influence sur la croissance apparaît significative et importante à prendre en compte), les *liens* reliant ces fonctions (de type multiplicatif, additif, par seuil ou bien une combinaison de plusieurs types) et la *formalisation mathématique* de chaque fonction de limitation.

Par exemple, l'influence des éléments nutritifs sur la croissance est souvent représentée soit par un modèle de type multiplicatif (3), soit par un modèle de type seuil (4) :

$$\mu = \mu_{\max} \times f(\text{SN}_1) \times f(\text{SN}_2) \times f(\text{SN}_3) \dots \quad (3)$$

$$\mu = \mu_{\max} \times \min \{ f(\text{SN}_1) ; f(\text{SN}_2) ; f(\text{SN}_3) \dots \} \quad (4)$$

où, pour tout entier  $i$ ,  $f(\text{SN}_i)$  représente la fonction de limitation associée au sel nutritif  $\text{SN}_i$ .

La formalisation mathématique la plus simple et couramment employée pour représenter ces fonctions  $f(\text{SN}_i)$  suit le modèle de Michaelis-Menten :

$$f(\text{SN}_i) = [\text{SN}_i] / ([\text{SN}_i] + K_s) \quad (5)$$

où la concentration de l'élément nutritif  $\text{SN}_i$  est notée  $[\text{SN}_i]$  ( $\mu\text{M}$ ) et  $K_s$  est la constante de demi-saturation ( $\mu\text{M}$ ).

La prise en compte de facteurs limitants dont les caractéristiques sont influencés par la croissance phytoplanctonique, tels que les sels nutritifs, va nécessiter la mise place d'équations couplées simulant la variation simultanée des différents indicateurs. Ceci peut être visualisé dans l'équation (1) formalisant les variations de la concentration en sels nutritifs dans un système maintenu en semi-continu : cette équation est dépendante de la concentration en cellules qui, elle-même, varie en fonction du temps. Il en découlera la mise en place d'un système d'équations multiples, représentant les variations simultanées des différentes variables d'état.

Au cours de cette thèse, l'objectif de modélisation était de caractériser l'influence de certains paramètres environnementaux majeurs sur la croissance d'*A. catenella*. Les efforts de simulation ont été centrés sur l'influence des éléments nutritifs (ammonium, urée, nitrate, phosphate), de la température, de la salinité et de l'intensité lumineuse sur la croissance d'*A. catenella*. Ce travail a permis de proposer des formalisations mathématiques pour chacune des fonctions de limitation associées, en estimant les valeurs des paramètres d'entrée (constantes telles que  $K_s$ ,  $V_{\max}$ ...) par programmation sous Matlab. Ces valeurs de paramètres ont été obtenues en minimisant la somme des carrés des écarts entre valeurs modélisées et valeurs mesurées. La caractérisation de l'influence des éléments nutritifs sur la croissance a été basée sur les résultats obtenus lors des expérimentations en culture effectuées au cours de cette thèse. Celle de l'influence des paramètres physiques a été réalisée à partir d'un jeu de données obtenu par Mohamed Laabir.

## CARACTERISATION DU CONTROLE DE LA CROISSANCE

### D'*A. CATENELLA* PAR LES ELEMENTS NUTRITIFS

---

#### I- MODELISATION DE LA REGULATION DE LA CROISSANCE PAR LES ELEMENTS NUTRITIFS MAJEURS, AMMONIUM, UREE, NITRATE ET PHOSPHATE

##### *1- Simulation des vitesses d'absorption des nutriments – Problème de la variabilité des paramètres cinétiques du modèle de Michaelis-Menten*

Afin de caractériser l'absorption des nutriments par *A. catenella*, des *cinétiques d'absorption* (suivi de la vitesse d'absorption en fonction d'un gradient de concentration en nutriment) ont été réalisées pour les deux sources principales d'azote de ces cellules, l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et l'urée (Partie I, Chap 1), ainsi que pour le phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Partie II, Chap 1). Elles ont permis de vérifier que le modèle de Michaelis-Menten, faisant intervenir comme paramètres d'entrée la vitesse maximale d'absorption  $V_{\text{max}}$  et la constante de demi-saturation  $K_S$  (voir Introduction Générale), permettait d'obtenir une bonne représentation des données pour chacun de ces éléments nutritifs ; ceci en considérant que les cinétiques linéaires mises en évidence le long d'un gradient de 0 – 10  $\mu\text{gN/L}$  d'urée peuvent être représentatives de courbes michaéliennes caractérisées par un très fort  $K_S$ . Cependant, une grande plasticité a été observée dans la valeur de ces paramètres cinétiques, rendant délicat le choix des valeurs à intégrer comme paramètres d'entrée dans un modèle de croissance.

##### *a- Variabilité entre souches d'*A. catenella**

Les caractéristiques d'absorption des nutriments azotés et phosphorés sont apparues nettement variables entre souches d'*A. catenella* (Partie I, Chap 1 et Partie II, Chap 1), et ceci même entre souches provenant de la même origine géographique (comme entre TL01 et ACT03 toutes deux isolées dans l'Etang de Thau). Ces différences ont été plus

particulièrement marquées pour les sources azotées  $\text{NH}_4^+$  et N-urée. Concernant la vitesse maximale d'absorption, les variations du  $V_{\text{max-NH}_4^+}$  entre souches ont, par exemple, atteint un facteur 6. Le coefficient  $K_S$  a également montré de fortes variations, visibles pour l'urée à travers les différences d'allures de cinétiques (avec ou sans plateau de saturation) obtenues sur le gradient testé. Une manière de prendre en compte cette variabilité dans un modèle de croissance serait d'effectuer des simulations testant les deux souches présentant les valeurs les plus extrêmes.

*b- Variations au cours du cycle diurne*

D'après les résultats exposés dans le Chapitre 1 de la Partie I, la valeur des paramètres cinétiques caractérisant l'absorption de  $\text{NH}_4^+$  et N-urée a également montré de fortes variations à l'échelle d'un cycle diurne, atteignant un facteur 10 pour  $V_{\text{max-NH}_4^+}$ . Une manière d'intégrer ces variations consisterait à exprimer les paramètres cinétiques ( $V_{\text{max}}$  et  $K_S$ ) en fonction du temps ; ce qui nécessiterait de simuler le cycle Jour/Nuit. Cependant, des expérimentations supplémentaires seraient à envisager pour formaliser ces relations car les variations observées à l'échelle d'une période diurne n'ont pas toujours montré la même ampleur d'après les résultats présentés pour la souche ACT03 dans les chapitres 1 et 3 de la Partie I.

*c- Variabilité due aux interactions entre éléments nutritifs*

D'autres types de variations des paramètres cinétiques ont pu être formalisés sous forme mathématique. Concernant l'absorption de l'azote, des variations du paramètre  $V_{\text{max}}$  dues aux interactions entre éléments nutritifs ont été mises en évidence (Partie I, Chap 2) entre  $\text{NH}_4^+$  et urée : il s'agit exclusivement d'une inhibition de la concentration en  $\text{NH}_4^+$  sur la vitesse maximale d'absorption de l'urée ( $V_{\text{max-urée}}$ ). L'influence de cette interaction sur  $V_{\text{max-urée}}$  a pu être caractérisée à l'aide du modèle proposé par Varela et Harrison (1999) :

$$V_{\text{max-urée}} = V_{\text{max-inhib}} \times \left( 1 - \frac{I_{\text{max}} \times [\text{NH}_4^+]}{K_I + [\text{NH}_4^+]} \right) \quad (1)$$

Où la vitesse maximale d'absorption de l'urée ( $V_{\text{max-urée}}$ , en  $\text{h}^{-1}$ ) est fonction de la vitesse maximale sans inhibition ( $V_{\text{max-inhib}}$ , en  $\text{h}^{-1}$ ), de la concentration de l'inhibiteur  $\text{NH}_4^+$  ( $[\text{NH}_4^+]$ , en  $\mu\text{gatN/L}$ ), du coefficient d'inhibition maximale  $I_{\text{max}}$  (valeurs entre 0 et 1) et de la constante d'inhibition  $K_I$  (concentration de  $\text{NH}_4^+$  à laquelle  $I = I_{\text{max}} / 2$ , en  $\mu\text{gatN/L}$ ).

Référence	Vitesse d'absorption du N-urée	Vitesse d'absorption du NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Paramètres d'inhibition
Walsh et Dugdale (1971)	$\frac{V1 N1}{k1 + N1} * (1 - \alpha N2)$ , si $N2 \leq 1/\alpha$ 0, sinon	$\frac{V2 N2}{k2 + N2}$	$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )
Jamart et al. (1977)	$\frac{s1 V1 N}{0.2 k + 0.16 N}$ , si $0 \leq N \leq 5$ $\frac{s1 V1 N}{k + N}$ , sinon	$\frac{s2 V2 N}{0.2 k + 0.16 N}$ , si $0 \leq N \leq 5$ $\frac{s2 V2 N}{(k + N)}$ , sinon	Si $N2 > Ncr$ , $s1=0$ et $s2=1$ Si $N2 < Ncr \leq N1$ , $s1=1$ et $s2=0$ Sinon, $s1=N1/N$ et $s2=N2/N$ $Ncr$ (µmolN kg <sup>-1</sup> )
Wroblewski (1977)	$\frac{V1 N1}{k1 + N1} * e^{-\psi N2}$	$\frac{V2 N2}{k2 + N2}$	$\psi$ (Kg µmolN <sup>-1</sup> )
O'Neill et al. (1989)	$\frac{k2 V1 N1}{k1 k2 + k2 N1 + k1 N2}$	$\frac{k1 V2 N2}{k1 k2 + k2 N1 + k1 N2}$	
Parker (1993)	$\frac{V1 N1}{k1 + N1} * \frac{k2}{(k2 + N2)}$	$\frac{V2 N2}{k2 + N2}$	
Varela et Harrison (1999)	$\frac{V1 N1}{k1 + N1} * (1 - \frac{Imax * N2}{k1 + N2})$	$\frac{V2 N2}{k2 + N2}$	Imax kl
Spitz et al. (2001)	$\frac{k2 V1 N1}{k1 k2 + k2 N1 + k1 N2} * e^{-\psi N2}$	$\frac{k1 V2 N2}{k1 k2 + k2 N1 + k1 N2}$	$\psi$ (Kg µmolN <sup>-1</sup> )
Yajnik et Sharada	$\frac{V1 N1}{k1 + N1} * \frac{1 + a N2}{1 + b N2}$	$\frac{V2 N2}{k2 + N2}$	a b

**Tableau 1 :** Formalisations mathématiques proposées dans divers travaux pour représenter les interactions entre éléments nutritifs.  $V_i$  représente la vitesse maximale d'absorption,  $k_i$  la constante de demi-saturation et  $N_i$  la concentration en élément nutritif, avec  $i=1$  pour N-urée et  $i=2$  pour NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Différentes formulations mathématiques ont été proposées dans la littérature pour simuler ce genre d'interaction entre éléments nutritifs : huit d'entre elles sont présentées dans le Tableau 1. Le choix de l'équation de Varela & Harrison (1999) a tout d'abord été orienté par les travaux de Sharada et al. (2005) et Tian (2006) où sont détaillées des comparaisons entre différents modèles. D'après Sharada et al. (2005), un modèle efficace et réaliste d'inhibition doit répondre à trois propriétés essentielles : *la similarité* qui suggère que l'allure de la fonction d'inhibition n'est pas fonction de la concentration de l'élément subissant cette inhibition, *l'hyperbolicité* qui définit l'allure décroissante de la courbe d'inhibition suivant deux asymptotes parallèles aux axes et *l'inhibition incomplète* qui impose une asymptote horizontale de la courbe non-confondue avec l'axe des abscisses. Les fonctions proposées par Jamart et al. (1997) et O'Neill et al. (1989) ne suivent pas la propriété de similarité. Celle décrite par Walsh & Dugdale (1971) ne répond pas à la propriété d'hyperbolicité. Les cinq formulations restantes sont comparées dans les travaux de Tian (2006) à travers les variations observées dans les flux totaux obtenus le long du gradient d'inhibition. Pour l'interaction observée entre  $\text{NH}_4^+$  et urée pour *A. catenella*, l'allure observée des flux totaux d'azote le long du gradient de  $\text{NH}_4^+$  (Partie I, Chap 2) a été de type michaélien, avec plateau de saturation ; or, les équations proposées par Wroblewski (1977) et Spitz et al. (2001) ne génèrent pas ce genre d'allure. D'autre part, d'après Tian (2006), la fonction décrite par Yajnik & Sharada (2003) peut générer un facteur de limitation en nutriment supérieur à 1, créant alors une croissance phytoplanctonique non-réaliste dont le taux de croissance dépasse le taux maximal  $\mu_{\text{max}}$ . Ainsi, seules les formulations proposées par Parker (1993) et Varela & Harrison (1999) ont été testées sur nos données et les meilleures simulations ( $r^2$  supérieurs) ont été obtenues en employant le modèle de Varela et Harrison (1999).

#### d- Variabilité due au niveau de carence

Concernant l'absorption du  $\text{PO}_4^{3-}$ , une variation significative du  $V_{\text{max}}$  en fonction du niveau de carence en P des cellules a été observée et caractérisée par la relation suivante (Partie II, Chap 1) :

$$V_{\text{max-p}} = 5,2 \times 10^{-6} \times (\text{Qp/Qc})^{-2,7} \quad (2)$$

où  $V_{\text{max-p}}$  est la vitesse maximale d'absorption du  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{fmolP.cell}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) et  $\text{Qp/Qc}$  correspond au ratio entre quotas intracellulaires en P et C (en  $\text{pgP/pgC}$ ).

Le ratio  $Q_p/Q_c$  est employé comme un indicateur du niveau de carence en P des cellules. En effet, à condition que le C ne soit pas limitant pour la croissance, ce rapport atteint une valeur maximale ( $Q_p/Q_{c_{max}}$ ) lorsque les cellules ne sont pas déficientes en P, qui est proche de 0,024 (valeur du rapport de Redfield) et caractéristique de l'espèce considérée. Une valeur inférieure à  $Q_p/Q_{c_{max}}$  indique alors une carence en P, d'autant plus importante que cette valeur est faible. Pour *A. catenella*,  $Q_p/Q_{c_{max}} = 0,021$  pgP/pgC a été estimée à partir de prélèvements effectués à heure fixe au cours du cycle Jour/Nuit (en fin de matinée ; Partie II, Chap 1). Ce rapport  $Q_p/Q_c$  est plus souvent exprimé en écologie sous la forme du ratio C:P (ratio entre le nombre d'atomes de C et de P par cellule), pour lequel une valeur minimale (proche de la valeur 106 définie par le rapport de Redfield) est atteinte lorsque P n'est pas limitant pour la croissance.

Cependant, les valeurs des paramètres obtenues dans la relation (2) entre  $V_{max-p}$  et  $Q_p/Q_c$  doivent pour l'instant être prises avec précaution et demandent à être généralisées. En effet, les variations observées à l'échelle d'un cycle diurne des vitesses d'absorption des sources azotées (Partie I, Chap 1) ainsi que du ratio C:N (Partie I, Chap 3) poussent à concevoir qu'une variabilité cyclique similaire serait à prévoir pour  $V_{max-p}$  et  $Q_p/Q_c$ , suggérant une possible variation temporelle à l'échelle de la journée de la valeur des constantes de l'équation (2).

## 2- Simulation des vitesses d'assimilation des éléments nutritifs

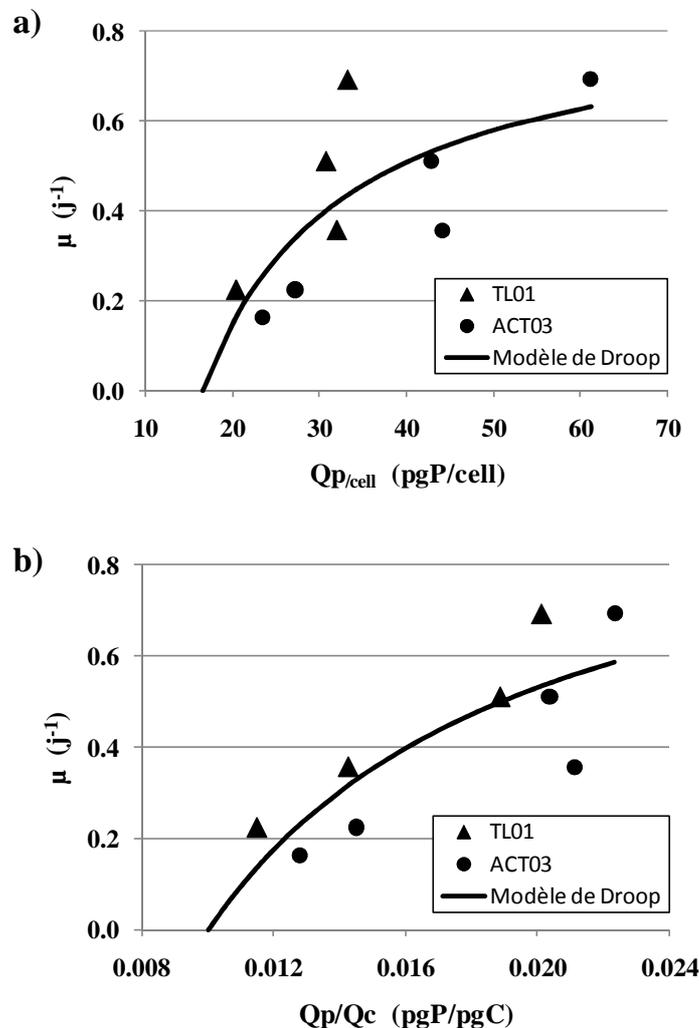
### a- Pour le phosphore

Des expérimentations réalisées en semi-continu (Partie II, Chap 1) ont permis d'analyser les variations du quota intracellulaire en phosphore ( $Q_p$ ) des cellules d'*A. catenella* en fonction d'un gradient de limitation en  $PO_4^{3-}$ , régi par un gradient de taux de dilution (voir Introduction Partie II). En semi-continu, si l'on considère que les cultures ont atteint leur état d'équilibre, il est possible d'estimer les taux de croissance de chaque culture par la relation (Tilman & Kilham 1976) :

$$\mu = - \ln (1 - TD) \quad (2)$$

où le taux de croissance  $\mu$  ( $j^{-1}$ ) est exprimé en fonction du taux de dilution TD ( $j^{-1}$ ).

Les capacités d'assimilation du phosphore par *A. catenella* ont ainsi pu être caractérisées à partir des variations théoriques de  $\mu$ , exprimées en fonction des valeurs de  $Q_p$  mesurées. Le modèle de Droop (voir Introduction Générale), faisant intervenir comme paramètres d'entrée le taux maximal de croissance ( $\mu_{\max}$ ) et le quota minimum ( $Q_0$ ) obtenu pour une croissance nulle, a pu être testé malgré le fait qu'un tiers des données n'ait pas pu être utilisé en ce sens (Partie II, Chap 1). La figure 1 montre les résultats des simulations obtenues en exprimant le quota intracellulaire de P par cellule ( $Q_{p/\text{cell}}$ ) ou par unité de carbone ( $Q_p/Q_c$ ). Les faibles  $r^2$  obtenus sont en partie dus au faible nombre de données disponibles. Une partie de la dispersion observée provient, entre autres, du cumul des résultats obtenus pour deux souches différentes (TL01 et ACT03), effectué en vue d'augmenter le nombre de points de la série à modéliser.



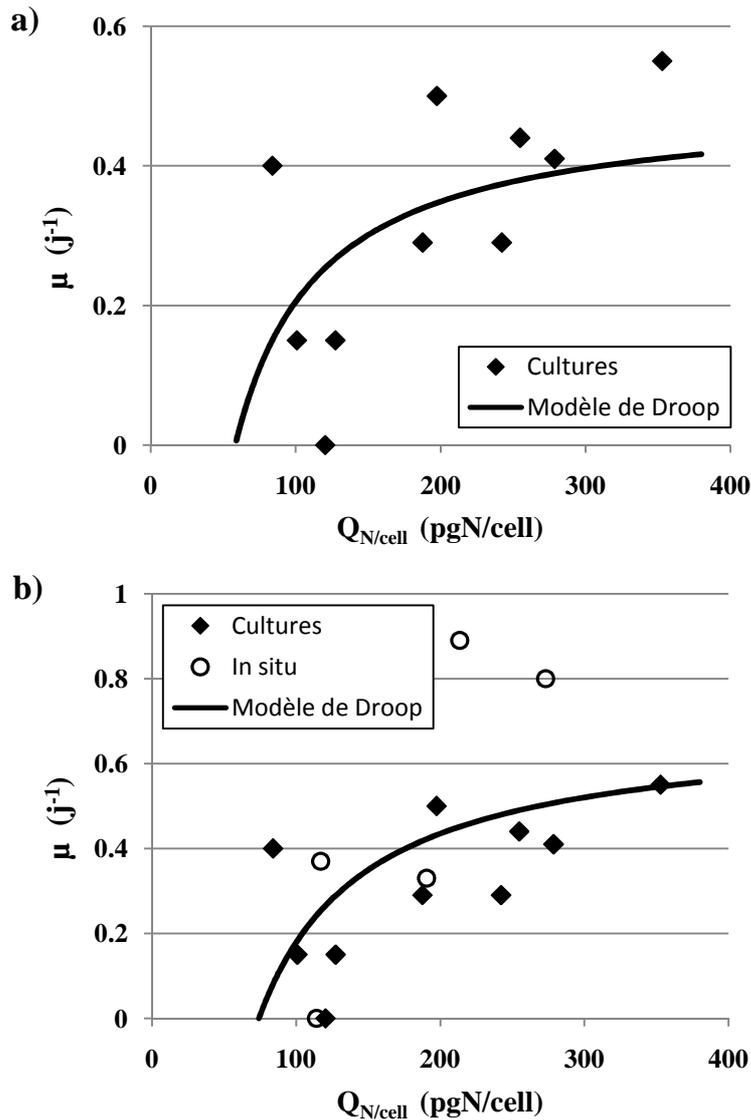
**Figure 1 :** Simulation des variations de taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) en fonction du quota intracellulaire en P, exprimé par cellule ( $Q_{p/\text{cell}}$ ) (a) ou par unité de C ( $Q_p/Q_c$ ) (b). Valeurs obtenues pour les paramètres d'entrée du modèle de Droop : (a)  $\mu_{\max} = 0,87 \text{ j}^{-1}$ ,  $Q_0 = 16,4 \text{ pgP/cell}$  ( $r^2 = 0,54$ ) ; (b)  $\mu_{\max} = 1,06 \text{ j}^{-1}$ ,  $Q_0 = 0,010 \text{ pgP/pgC}$  ( $r^2 = 0,67$ ).

Ces deux paramètres,  $Q_{p/cell}$  et  $Q_p/Q_c$ , ont montré des variations nettement différentes le long du gradient de limitation en  $PO_4^{3-}$  (Partie II, Chap 1), soulignant l'importance du choix de l'unité employée pour représenter le quota intracellulaire (par cellule ou par unité de C). Dans le modèle originel de Droop (1968), la cellule était proposée comme référence dans l'estimation du quota. Cependant, Droop (1979) précisa que ce modèle était adapté à une représentation en unité de masse et que son emploi pour des données exprimées par cellule n'était envisageable que si la masse par cellule ne variait pas (*i.e.* que la taille cellulaire ne variait pas). Cet argument est encore employé aujourd'hui par les modélisateurs pour justifier l'intérêt d'utiliser des valeurs de quota en unité de masse par unité de C (Flynn 2008) puisque la taille cellulaire est un paramètre variant suivant de nombreux facteurs, comme au cours du cycle cellulaire. De nombreux écologistes continuent, cependant, à utiliser le modèle de Droop à partir de données par cellule (ex. Matsuda et al 2006). Dans le cas d'*A. catenella*, le choix de l'unité ne tombe pas sous l'évidence puisque cette espèce présente une régulation particulière de sa masse carbonée, avec stockage de C en excès le jour afin d'assurer le prélèvement des nutriments la nuit (Partie I, Chap 3). Utiliser le carbone particulaire comme unité de référence risque donc d'apporter également un biais.

Un choix de l'unité à utiliser pour représenter les quotas intracellulaires n'est pas toujours envisageable. En effet, dans le cas de modèles de type écosystémique, représentant des flux de matière associés à des liens trophiques, l'unité de base est obligatoirement la masse et non le nombre d'organismes.

#### *b- Pour l'azote*

Concernant l'assimilation de l'azote, aucune expérimentation n'a été menée pour estimer le lien existant entre quota en azote (N) et taux de croissance. Un premier essai de paramétrisation de cette relation a pu être réalisé à partir de données de taux de croissance et de quotas en N par cellule, obtenues en cultures par Yves Collos (Collos et al. 2004). Malgré une tendance cohérente avec le modèle de Droop, le nombre de données à disposition n'a pas permis une bonne convergence du modèle, avec un coefficient de corrélation très faible ( $r^2 < 0,3$ ) et une sous-estimation du  $\mu_{max}$  (Figure 2a). Une amélioration des coefficients du modèle a été obtenue en intégrant au jeu de données des mesures réalisées par Yves Collos en *in situ* (entre 2001 et 2004), au cours d'efflorescences d'*A. catenella* où l'abondance des cellules était supérieure à un million de cellules par litre (Collos et al. 2007) (Figure 2b).



**Figure 2 :** Mesures de taux de croissance ( $\mu$  en  $\text{j}^{-1}$ ) exprimées en fonction du quota en N par cellule obtenues en cultures (a) et en *in situ* (b) et données modélisées associées estimées à partir du modèle de Droop. Valeurs obtenues pour les paramètres d'entrée : (a)  $\mu_{\text{max}} = 0,49 \text{ j}^{-1}$ ,  $Q_0 = 59.3 \text{ pgN}/\text{cell}$  ( $r^2 = 0,28$ ) ; (b)  $\mu_{\text{max}} = 0,69 \text{ j}^{-1}$ ,  $Q_0 = 74.0 \text{ pgN}/\text{cell}$  ( $r^2 = 0,37$ )

Cependant, il serait tout de même intéressant d'acquérir des données supplémentaires afin de formaliser de manière plus précise la relation entre taux de croissance et quota en N qui apparaît être significative.

### 3- Simulation du cycle Jour/Nuit

D'après les résultats présentés dans le Chapitre 3 de la Partie I, *A. catenella* possède de fortes capacités d'absorption des éléments nutritifs azotés ( $\text{NH}_4^+$ , urée et nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )) la nuit. Ces capacités de prélèvement nocturne nécessitent des adaptations métaboliques

particulières permettant un stockage en excès de carbone (C) et d'énergie au cours de la phase diurne afin d'assurer un maintien des processus d'absorption la nuit. Toutes les espèces phytoplanctoniques ne réalisant pas de prélèvements nutritifs la nuit, ces capacités ont un rôle majeur dans la compétition interspécifique. D'après Flynn & Fasham (2003), un modèle ne décrivant le comportement que d'une seule espèce effectuant des prélèvements de nutriments la nuit sans compétiteur ne nécessite pas la prise en compte d'un cycle Jour/Nuit ; par contre, pour un modèle faisant intervenir plusieurs groupes phytoplanctoniques où une des espèces est capable d'absorption au noir, il apparaît important de simuler le cycle Jour/Nuit en intégrant des caractéristiques d'absorption et d'assimilation des éléments nutritifs spécifiques à chaque espèce considérée (ou groupe phytoplanctonique) et à chaque période (jour ou nuit). Pour simuler le cycle Jour/Nuit, un pas de temps de  $0,01 \text{ j}^{-1}$  (environ 15 min) serait alors suffisant, même pour des simulations d'écosystèmes sur un an (Flynn & Fasham 2003).

Pour un modèle décrivant la croissance d'une population d'*A. catenella*, l'intégration d'un cycle Jour/Nuit permettrait également de faire varier, sous forme de fonction temporelle, les valeurs des paramètres cinétiques ( $V_{\max}$  et  $K_S$ ) au cours de la période diurne afin de simuler les variations observées (Partie I, Chap 1).

## II- AUTRES SOURCES NUTRITIVES ORGANIQUES A PRENDRE EN COMPTE

D'après les expérimentations réalisées, *A. catenella* présente des capacités originales d'utilisation de la matière organique disponible dans le milieu, qui lui confèreraient des avantages compétitifs. Il apparaît donc important de prendre en compte ces sources nutritives potentielles organiques dans un modèle de croissance d'*A. catenella*.

### 1- Le phosphore organique dissous (POD)

L'estimation des capacités de synthèse de phosphatases alcalines par *A. catenella* (Partie II, Chap 1) a montré que les composés organiques dissous pouvaient correspondre à une source significative de phosphore (P) pour la croissance de cette espèce, en particulier en période d'efflorescence dans l'Etang de Thau. Le POD est donc un stock de P qu'il apparaît important d'intégrer dans un modèle de croissance d'*A. catenella*.

Cependant, les mesures d'activité enzymatique ont été effectuées par méthode fluorimétrique ; elles donnent donc des estimations de quantités de P libéré et rendu disponible pour la croissance, mais ne permettent pas d'estimer le flux réel de P entre POD et

stock intracellulaire (Qp). Pour paramétrer ce flux d'absorption provenant du POD, des expérimentations supplémentaires devront être réalisées en utilisant une méthode de mesure par marquage radioisotopique, utilisant des substrats naturels comme l'ATP ou le glucose-6-phosphate. Ce genre de méthode présente comme désavantage de ne pas pouvoir rendre compte de l'activité de l'ensemble des phosphatases présentes sur les cellules à cause de la haute spécificité des substrats employés. Comme le MUF-P (substrat utilisé dans les mesures fluorimétriques présentées) est un substrat artificiel justement peu spécifique, les capacités globales d'activité enzymatique des cellules d'*A. catenella* ont déjà été caractérisées. Effectuer des mesures par marquage radioisotopique serait donc pleinement complémentaire.

## 2- La matière organique particulaire

Les cellules d'*A. catenella* sont capables de récupérer des éléments provenant du stock de matière organique particulaire, grâce à un processus original pour une espèce phytoplanctonique autotrophe : la phagocytose de cyanobactéries du genre *Synechococcus*. D'après les résultats présentés dans le Chapitre de la Partie III, ce processus de nutrition par phagocytose serait utilisé de manière additionnelle par rapport à l'absorption des éléments nutritifs dissous, quelque soient les conditions nutritives. De plus, il pourrait jouer un rôle majeur dans le développement des blooms d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau puisque des prélèvements réalisés en *in situ* ont révélé que la proportion de cellules ayant phagocyté des *Synechococcus* pouvait atteindre 41 % de la population. Lors de la mise en place d'un modèle de type écosystémique simulant la croissance d'*A. catenella* en *in situ*, il apparaît donc important de considérer et d'intégrer la population de cyanobactéries (en unité de masse) comme une source nutritive potentielle des cellules d'*A. catenella*.

Cependant, quantifier le flux de matière associé à ce processus de phagocytose, et ainsi estimer sa part par rapport aux flux d'absorption, apparaît très complexe. Un premier essai a été effectué en utilisant le  $^{15}\text{N}$  comme traceur, mais s'est révélé non-concluant. De plus amples recherches et expérimentations seront à réaliser en vue de paramétrer ce processus original de nutrition par phagocytose.

## III- CONCLUSION

L'influence des éléments nutritifs sur la croissance d'*A. catenella* a ici été estimée de manière indépendante des autres facteurs de contrôle, permettant une simplification de

l'interprétation des résultats et une caractérisation plus aisée des processus impliqués. Malgré cela, la caractérisation de l'influence des éléments nutritifs est apparue très complexe, de par le nombre de sources nutritives à prendre en compte ainsi que la variabilité à envisager pour certains paramètres d'entrée du modèle. Une partie de ce contrôle de la croissance par les éléments nutritifs a pu être formalisée sous forme mathématique, fonctions qui pourront être directement intégrées aux fonctions de limitation. Cependant, des expérimentations supplémentaires permettraient de compléter cette caractérisation, afin d'aboutir à un modèle de type explicatif plus complet (*e.g.* quantification des flux provenant de la matière organique).

La complexité observée dans l'analyse des processus de nutrition rend incompatible ces résultats de modélisation avec un modèle de type prédictif à court terme, comme celui prévu pour compléter le système d'alerte de risques de contamination des parcs à huîtres. En effet, trop de paramètres seraient à suivre en continu pour pouvoir alimenter le modèle (*e.g.* grand nombre de sources nutritives potentielles) et un niveau équivalent de précision dans la représentation des flux serait à obtenir pour les autres communautés phytoplanctoniques compétitrices (*e.g.* capacités de stockage ou de prélèvement de nutriments la nuit).

## Références

- Collos Y.**, Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *J. Phycol.* Vol. 40, p. 96-103.
- Collos Y.**, Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A., Souchu, P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae.* Vol. 6, p. 781-89.
- Droop M.R.** 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* Vol. 48, p. 689-733.
- Droop M.R.** 1979. Definition of X and of Q in the cell quota model. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 39, p. 203 1979.
- Flynn K.J.** 2008. Use, abuse, misconceptions and insights from quota models - the Droop cell quota model 40 years on. *Oceanogr. Mar. Biol.* Vol. 46, p. 1-23.
- Flynn K.J.**, Fasham M.J.R. 2003. Operation of light–dark cycles within simple ecosystem models of primary production and the consequences of using phytoplankton models with different abilities to assimilate N in darkness. *J. Plankton Res.* Vol 25 (1), p. 83-92.

- Jamart B.M.**, Winter D.F., Banse K., Anderson G.C., Lam R.K. 1977. A theoretical study of phytoplankton growth and nutrient distribution in the Pacific Ocean off the northwestern US coast. *Deep-Sea Res.* Vol. 31, p. 21-37.
- Matsuda A.**, Nishijima T., Fukami K., Adachi M. 2006. Growth kinetics and paralytic shellfish poisoning toxin production in phosphorus-limited cultures of *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. Vol. 72, p. 193-200.
- O'Neill R.V.**, DeAngelis D.L., Pastor J.J., Jackson B.J., Post W.M. 1989. Multiple nutrient limitations in ecological models. *Ecological Modelling*. Vol. 46, p. 147-163.
- Parker R.A.** 1993. Dynamic models for ammonium inhibition of nitrate uptake by phytoplankton. *Ecological Modelling*. Vol. 66, p. 113-120.
- Sharada M.K.**, Yajnik K.S., Swathi P.S. 2005. Evaluation of six relations of the kinetics of uptake by phytoplankton in multi-nutrient environment using JGOFS experimental results. *Deep-Sea Res. II*. Vol. 52, p. 1892-1909.
- Spitz Y.H.**, Moisan J.R., Abbott M.R. 2001. Configuring an ecosystem model using data from the Bermuda Atlantic Time Series (BATS). *Deep-Sea Res. II*. Vol. 48, p. 1733-1768.
- Tian R.C.** 2006. Toward standard parametrizations in marine biological modeling. *Ecological modeling*, Vol. 193, p. 363-386.
- Tilman D.**, Kilham S.S. 1976. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* Vol. 12, p. 375-383.
- Varela D.E.**, Harrison P.J. 1999. Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliania huxleyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 186, p. 67-74.
- Walsh J.J.**, Dugdale R.C. 1971. A simulation model of the nitrogen flow in the Peruvian upwelling system. *Deep-Sea Res.* Vol. 22, p. 201-236.
- Wroblewski J.S.** 1977. A model of phytoplankton plume formation during variable Oregon upwelling. *J. Mar. Res.* Vol. 35, p. 357-394.
- Yajnik K.S.**, Sharada M.K. 2003. Ammonium inhibition of nitrate uptake by phytoplankton: a new relation based on similarity and hyperbolicity. *Current Science*. Vol. 85 (8), p. 1180-1189.

## CARACTERISATION DU CONTROLE DE LA CROISSANCE D'*A. CATENELLA* PAR CERTAINS FACTEURS PHYSIQUES

---

Les principaux facteurs physiques contrôlant la croissance phytoplanctonique sont la température, la salinité, l'intensité lumineuse (ou irradiance) et la turbulence. Ces paramètres sont généralement considérés comme des facteurs de forçage dans les modèles (voir Introduction Partie IV). L'influence de trois de ces facteurs (température, salinité et irradiance) sur la croissance d'*A. catenella* a pu être paramétrée sous forme de fonctions de limitation grâce à un jeu de données fourni par Mohamed Laabir.

De nombreuses formulations ont été proposées dans des travaux antérieurs pour représenter l'influence de la température et de l'irradiance sur la croissance phytoplanctonique. Un bon aperçu de la variété de ces fonctions de limitation est présenté dans les travaux de Tian (2006) et Baklouti et al (2006). Moins d'efforts, en termes d'expérimentations et de modélisation, ont été fournis pour étudier le contrôle de la salinité sur la croissance phytoplanctonique. Son influence est donc, en général, simulée par une fonction polynomiale d'ordre 1 à 3, soit sous forme d'une fonction de limitation à un seul paramètre, comme dans les travaux de McGillicuddy et al (2005) et Stock et al (2005), soit sous forme d'une fonction polynomiale unique couplant Température-Salinité, comme dans les modèles décrits par Nagasoe et al (2006) et Matsubara et al (2007), ou encore Température-Salinité-Irradiance (*e.g.* Paz et al 2006).

Pour caractériser l'influence de la température, de la salinité et de l'irradiance sur la croissance d'*A. catenella*, l'utilisation de fonctions faisant intervenir des paramètres ayant une réalité biologique (pouvant donc être estimés expérimentalement) a été privilégiée par rapport à l'emploi de fonctions polynomiales.

## I- CARACTERISATION DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA SALINITE

### 1- *Données à disposition*

La souche d'*A. catenella* ACT03 (isolée dans l'Etang de Thau en 2003) a été utilisée pour réaliser des expérimentations en culture en vue de caractériser l'influence couplée de la température et de la salinité sur la croissance algale de cette espèce. Pour cela, des mesures de taux de croissance et d'abondance cellulaire ont été effectuées sur 48 combinaisons Température-Salinité, comprenant 8 valeurs de température (9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 et 30 °C) et 6 de salinité (10, 15, 20, 30, 35 et 40 psu). Une pré-acclimatation des cellules aux différentes conditions expérimentales a été assurée avant chaque mesure. De plus amples détails sur le protocole employé sont présentés dans les travaux de Laabir et al. (*Soumis*).

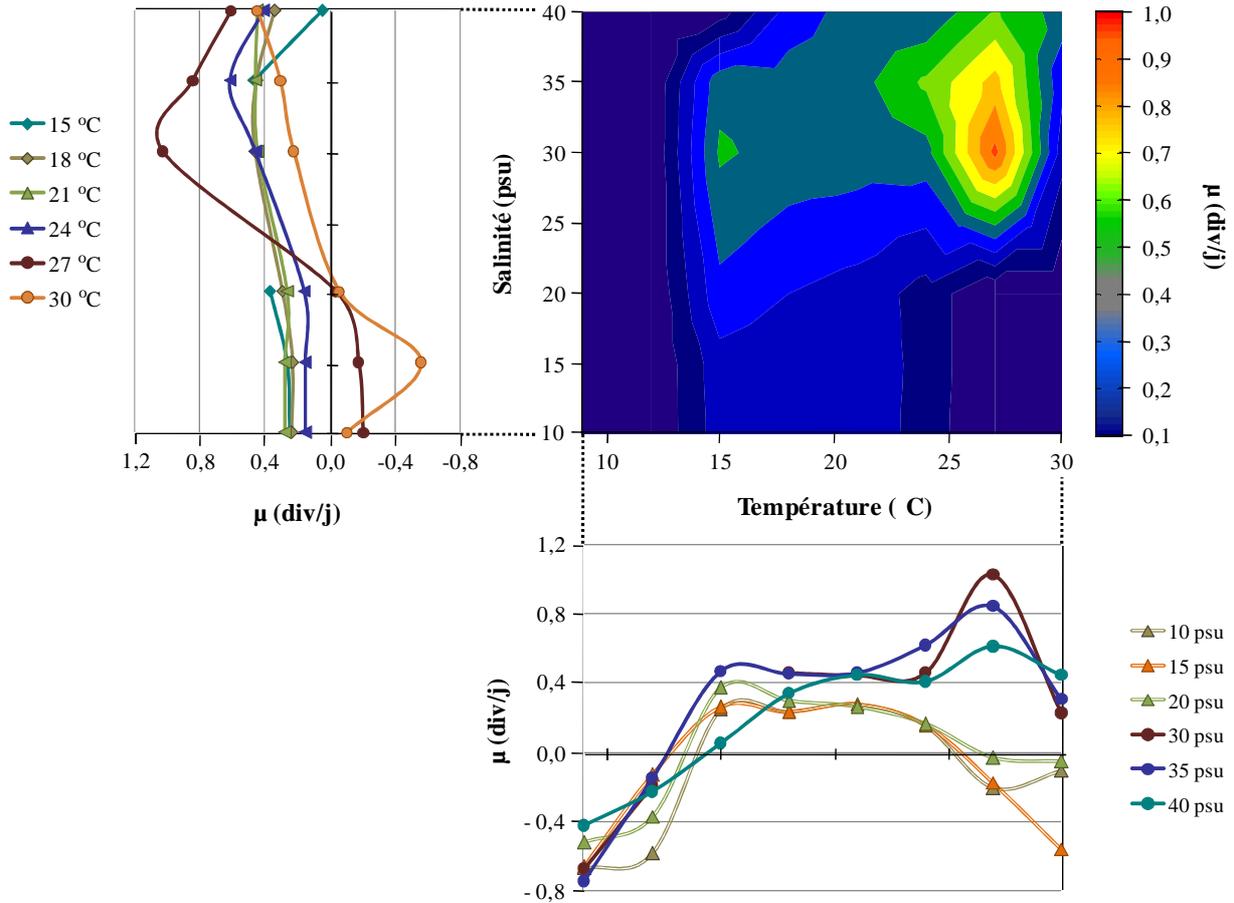
Une modélisation des données sous forme de fonctions de limitation a été mise en place pour les deux paramètres, taux de croissance et abondance, et valorisée dans l'étude de Laabir et al. (*Soumis*). Seule la mise en place des fonctions de limitation associées au taux de croissance sera ici détaillée car ce paramètre est le plus essentiel dans la mise en place d'un modèle de croissance.

Un aperçu des données de taux de croissance disponibles (exprimées en termes de taux de division par jour) est présenté dans la Figure 1, sous forme d'un diagramme 2D et de deux graphiques détaillant les variations observées le long de chaque gradient, température et salinité.

### 2- *Caractéristiques de l'influence de la température et de la salinité sur le taux de croissance d'A. catenella*

#### a- *Influence de la température*

A chaque salinité testée, les variations observées de taux de division en fonction de la température (Figure 1) suivent globalement une courbe en cloche, caractérisée par deux critères : (i) un taux de division maximal est atteint à une température optimale  $T_{opt}$  ; (ii) la croissance est inhibée (valeurs de taux de division négatives) sous une température critique  $T_{crit}$ , comprise entre 12 et 15°C.



**Figure 1 :** Variations du taux de croissance ( $\mu$  (div/j)) en fonction de la température (9 – 30 °C) et de la salinité (10 – 40 psu). *Données de Mohamed Laabir.*

*b- Influence de la salinité*

Les variations de taux de division le long du gradient de salinité sont moins nettes (Figure 1). Il semble cependant que : (i) il existe une salinité optimale ( $S_{opt}$ ) aux alentours de 30-40 psu ; (ii) des variations de salinité entre 10 et 20 psu n'influencent pas le taux de division.

*c- Influence couplée Température-Salinité*

La mise en place de gradients de variations combinés Température-Salinité a également permis de mettre en évidence les caractéristiques suivantes : (i) la température optimale semble varier en fonction de la salinité, elle est mesurée à 27°C pour des salinités comprises entre 30 et 40 psu et semble comprise entre 15 et 22°C pour les salinités comprises entre 10 et 20 psu ; (ii) la combinaison d'une température supérieure à 27°C et d'une salinité inférieure à 20 psu semble inhiber la croissance.

*d- Bilan*

L'influence couplée de la température (T) et de la salinité (S) sur la croissance d'*A. catenella* semble principalement régie par l'existence d'une combinaison optimale  $\{T_{opt}; S_{opt}\}$  caractérisant le taux de division maximal ( $\mu_{max}$ ) et par celle de gammes où la croissance est inhibée (quand  $T \leq T_{crit}$  et quand  $\{S \leq 20 \text{ psu}; T \geq 27^\circ\text{C}\}$ ). Les données disponibles limitent l'estimation de ces bornes caractéristiques aux combinaisons  $\{T; S\}$  testées. Une simulation des données à l'aide de formulations mathématiques adéquates peut permettre d'améliorer cette estimation, en testant les valeurs présentes au sein des intervalles entre données réelles et en diminuant l'impact des erreurs de mesure par lissage du jeu de données.

Afin de pouvoir aisément visualiser l'efficacité de différentes simulations effectuées, certaines combinaisons Température-Salinité du jeu de données seront codifiées sur les graphiques présentant les résultats de modélisation : la combinaison  $\{T_{opt}; S_{opt}\}$  sera représentée par un point rouge et les gammes  $T \leq T_{crit}$  et  $\{S \leq 20 \text{ psu}; T \geq 27^\circ\text{C}\}$  par des croix violettes.

**3- Mise en place des fonctions de limitation du taux de croissance**

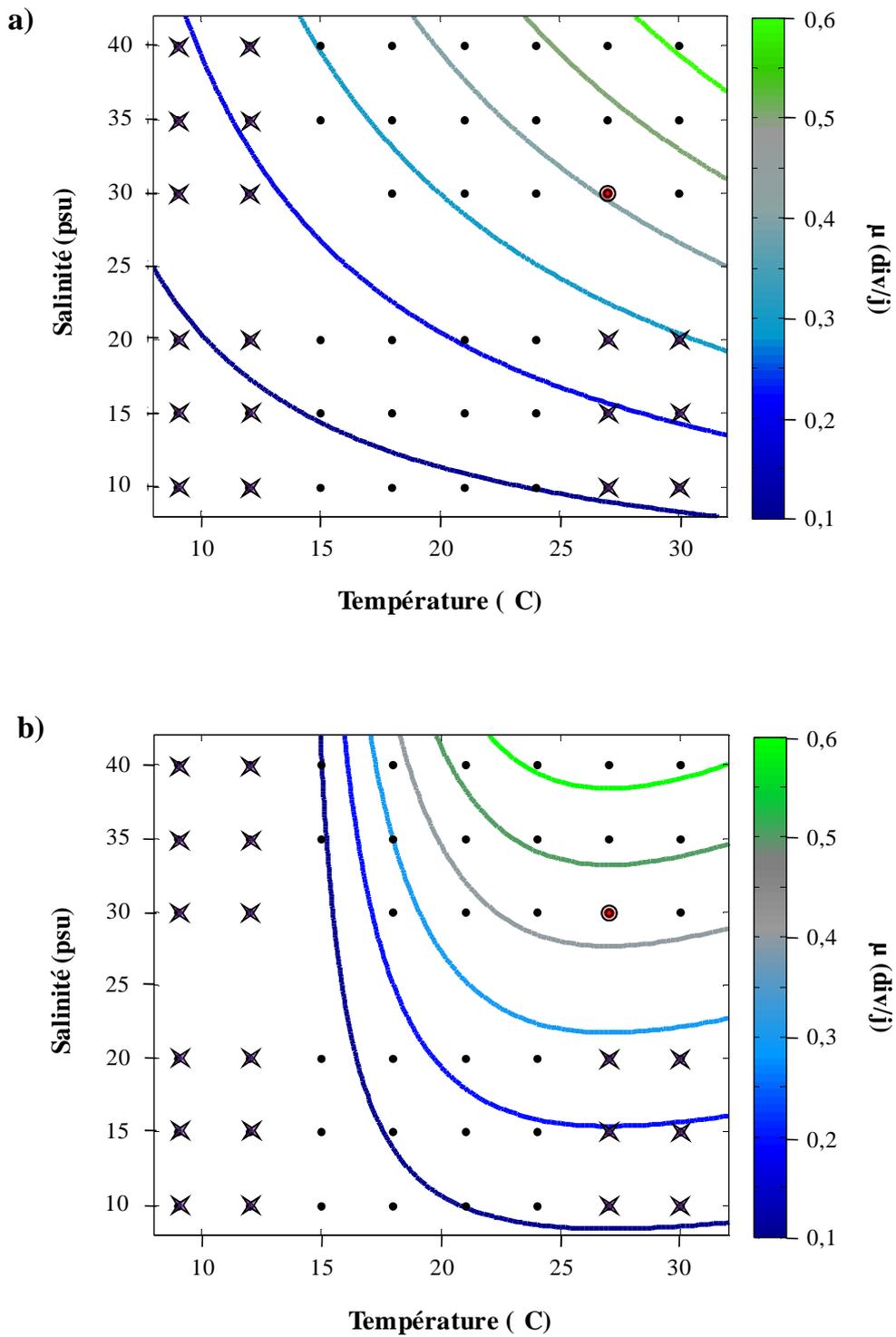
En première approche, deux fonctions de limitation indépendantes ( $f(T)$  et  $f(S)$ ) ont été mises en place et reliées par un modèle de type multiplicatif suivant l'équation globale :

$$\mu = \mu_{max} \times f(T) \times f(S) \quad (1)$$

où le taux de croissance  $\mu$  (en div/j) est exprimé en fonction du taux maximal de croissance  $\mu_{max}$  (en div/j) auquel est appliqué deux fonctions de limitations variant entre 0 et 1, celle de la température  $f(T)$  et celle de la salinité  $f(S)$ .

La valeur du paramètre d'entrée  $\mu_{max}$  est fixée à 1,03 div/j, valeur maximale mesurée à une température de  $27^\circ\text{C}$  et une salinité de 30 psu.

L'utilisation de fonctions de limitation de type polynomiale d'ordre 2 (Figure 2a) ou 3 ne permet pas de représenter l'allure complexe observée : ni l'optimum, ni les zones d'inhibition de croissance ne sont bien retranscrits. Pour obtenir une simulation plus efficace des données, il apparaît donc important de se baser sur les critères mis en évidence ci-dessus caractérisant l'influence de la température et de la salinité sur la croissance, afin de choisir les équations adéquates à employer. Chaque critère sera progressivement intégré au modèle



**Figure 2 :** Modèles utilisant deux fonctions de limitation ( $f(S)$  et  $f(T)$ ) de type polynomiale d'ordre 2 (a) ou une fonction  $f(S)$  polynomiale et une fonction de type Thebault pour représenter  $f(T)$  (b).

jusqu'à obtenir une représentation satisfaisante des données. Ceci permettra de limiter la complexité des équations et le nombre de paramètres d'entrées et de définir les caractéristiques essentielles du contrôle de la température et de la salinité sur la croissance d'*A. catenella*.

*a- Optimisation de la fonction de température*

Les patrons de variations les mieux définis et les plus homogènes sont ceux observés le long du gradient de température. L'effort de modélisation a donc tout d'abord consisté à améliorer la représentation de l'influence de la température sur le taux de croissance. Deux caractéristiques fortes sont ressorties des variations de taux de division observées en fonction de ce paramètre : l'existence d'une température optimale ( $T_{opt}$ ) et d'une température critique ( $T_{crit}$ ) sous laquelle la croissance est inhibée. Parmi les fonctions de température rapportées dans la littérature (voir Tian (2006)), une apparaît être particulièrement bien adaptée aux données, celle décrite par Thebault (1985) qui ne fait intervenir que trois paramètres d'entrée dont  $T_{opt}$  et  $T_{crit}$  :

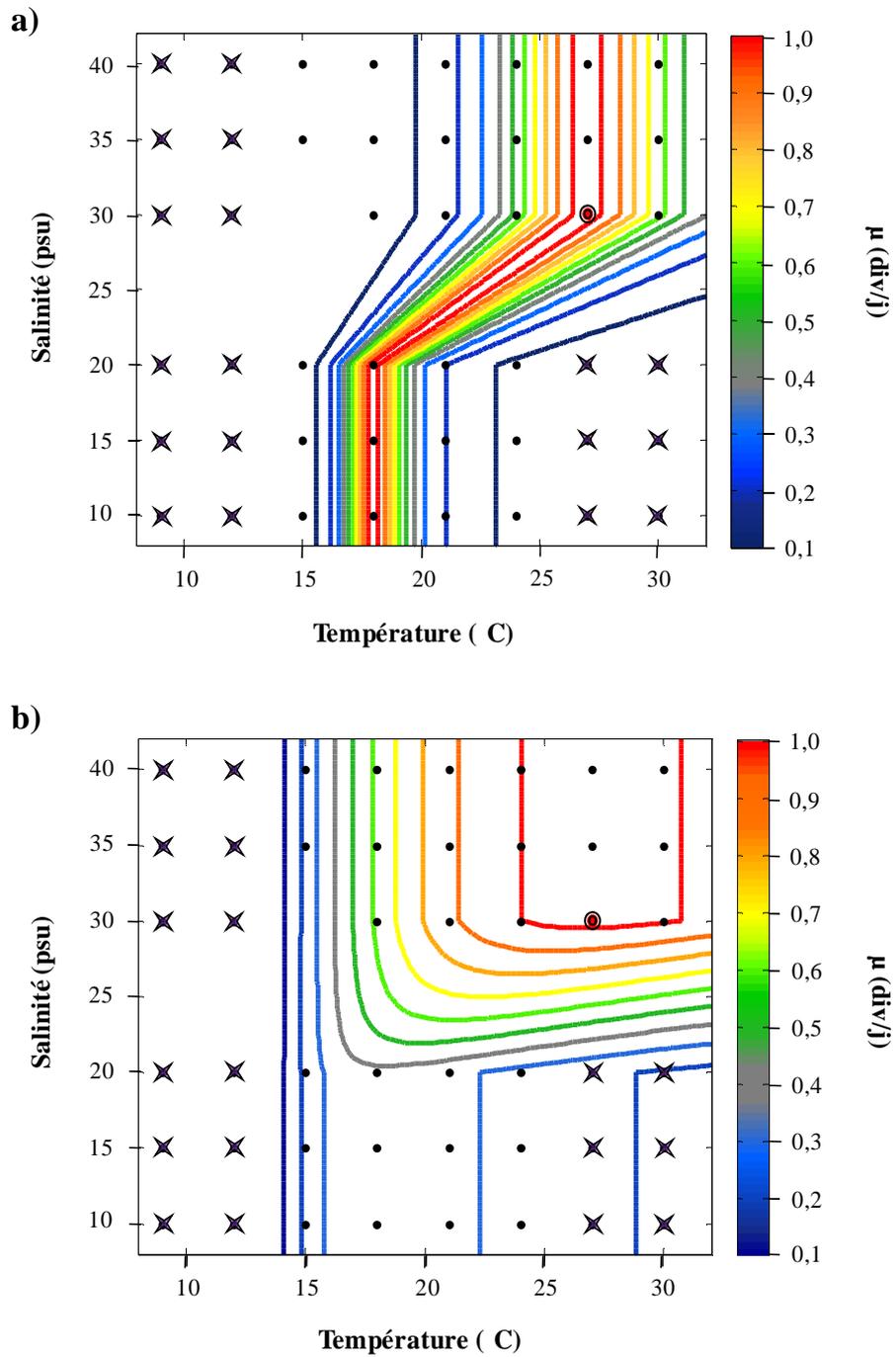
$$f(T) = 2 \times (1 + \alpha) \times p / (p^2 + 2 \times \alpha \times p + 1) \quad (2)$$

avec  $p = (T - T_{crit}) / (T_{opt} - T_{crit})$

où  $T$  est la température (en °C),  $T_{crit}$  la température critique (en °C) sous laquelle le taux de croissance est nul,  $T_{opt}$  la température optimale (en °C) et  $\alpha$  une constante.

Comme les variations du taux de division en fonction de la salinité semblait présenter un maximum, une première simulation a été réalisée en cumulant une fonction de température de type fonction de Thebault (2) à une fonction de salinité de type polynôme d'ordre 2 suivant l'équation (1). Le résultat de cette simulation (Figure 2b) montre que l'intégration des paramètres  $T_{crit}$ ,  $T_{opt}$  et  $\alpha$  permet de représenter la zone d'inhibition de croissance  $T \leq T_{crit}$ , mais ne suffit pas à simuler correctement la zone d'inhibition  $\{S \leq 20 \text{ psu} ; T \geq 27^\circ\text{C}\}$  et l'optimum de croissance.

Une première amélioration du modèle a été obtenue en intégrant le critère suivant lequel la température optimale semblait varier en fonction de la salinité. Une manière de globaliser les variations observées a consisté en la construction d'une fonction à deux plateaux simulant les valeurs de  $T_{opt}$  le long du gradient de salinité et fixant une valeur constante minimale quand  $S \leq 20 \text{ psu}$  et une valeur constante maximale quand  $S \geq 30 \text{ psu}$ .



**Figure 3 :** Modèles intégrant une variation de la température optimale en fonction de la salinité avec  $f(S) = 1$  (a) ou  $f(S)$  sous forme d'une fonction à deux plateaux (b).  $f(T)$  est représentée par une fonction de Thebault.

En extrapolant les valeurs de manière linéaire entre 20 et 30 psu afin d'obtenir une fonction continue le long du gradient de salinité, on obtient les équations mathématiques suivantes :

$$\begin{cases} T_{\text{opt}} = T_{\text{opt-min}} & \text{quand } S \leq 20 \text{ psu} \\ T_{\text{opt}} = a \times T + b & \text{quand } S \in ] 20 ; 30 \text{ psu [} \\ T_{\text{opt}} = T_{\text{opt-max}} & \text{quand } S \geq 30 \text{ psu} \end{cases} \quad (3)$$

$$\text{avec } \begin{cases} a = (T_{\text{opt-max}} - T_{\text{opt-min}}) / (30 - 20) = (T_{\text{opt-max}} - T_{\text{opt-min}}) / 10 \\ b = T_{\text{opt-min}} - 20 \times a \end{cases}$$

où T est la température (en°C).

La Figure 3a donne une représentation des données modélisées obtenues en combinant, dans l'équation (1),  $f(S) = 1$  et  $f(T)$  sous forme d'une fonction de Thebault (2) où  $T_{\text{crit}} = 12^\circ\text{C}$  et  $T_{\text{opt}}$  varie suivant (3) avec  $T_{\text{opt-min}} = 17^\circ\text{C}$  et  $T_{\text{opt-max}} = 27^\circ\text{C}$ . En fixant  $f(S) = 1$ , seule l'influence de la température a été prise en compte dans ce modèle, ce qui permet d'estimer plus précisément l'influence des paramètres associés à  $f(T)$ . D'après l'allure des données modélisées obtenues, faire varier  $T_{\text{opt}}$  en fonction de la salinité améliore significativement le modèle en permettant de simuler la zone d'inhibition de croissance  $\{S \leq 20 \text{ psu} ; T \geq 27^\circ\text{C}\}$ .

#### b- Optimisation de la fonction de salinité

Dans le modèle combinant les équations (1), (2) et (3), exprimer  $f(S)$  sous forme d'une fonction polynomiale ne permet pas de bien représenter la réalité : la majorité des données est alors sous-estimée et le modèle converge pour un optimum de croissance à  $S \geq 40 \text{ psu}$ , hors de la gamme de données. Il est donc nécessaire d'améliorer la représentation de  $f(S)$  en se basant sur les critères mis en évidence précédemment, suivant lesquels le taux de division ne varierait pas sous  $S \in [10 ; 20 \text{ psu}]$  et atteindrait un maximum sous  $S \in [30 ; 40 \text{ psu}]$ .

Une première manière d'intégrer ces critères consiste à construire une fonction  $f(S)$  avec deux plateaux, l'un définissant une valeur minimum sous  $S \leq 20 \text{ psu}$  et l'autre un maximum sous  $S \geq 30 \text{ psu}$ . Le taux de division maximum atteint sous  $S \leq 20 \text{ psu}$  a été de  $0,37 \text{ div/j}$  ; cette valeur a donc été prise comme référence pour définir le taux de limitation à appliquer au  $\mu_{\text{max}}$  sous  $S \leq 20 \text{ psu}$ . En extrapolant les données de manière linéaire entre les deux plateaux, on obtient une fonction de limitation du taux de croissance telle que :

$$\begin{cases} f(S) = 0,37 / \mu_{\max} = 0,36 & \text{quand } S \leq 20 \text{ psu} \\ f(S) = 0,064 \times S - 0,92 & \text{quand } S \in ] 20 ; 30 \text{ psu [} \\ f(S) = 1 & \text{quand } S \geq 30 \text{ psu} \end{cases} \quad (4)$$

où  $S$  est la salinité (en psu) et  $\mu_{\max}$  le taux maximal de croissance (en div/j).

Cette approche améliore le modèle mais ne retranscrit pas la diminution de taux de division globalement observée entre 35 et 40 psu et présente l'optimum de croissance comme un plateau plutôt qu'un point unique (Figure 3b, où  $T_{\text{opt-min}} = 17^\circ\text{C}$  et  $T_{\text{opt-max}} = 27^\circ\text{C}$ ).

Pour obtenir une allure en dôme telle que celle observée et conserver un plateau minimum sous  $S \leq 20$  psu, une autre fonction  $f(S)$  a été testée, correspondant à une fonction de Thebault modifiée de telle sorte que  $S_{\text{crit}}$  (salinité critique) définisse une gamme de salinité où le taux de division soit maintenu à un niveau minimum (et non pas nul comme dans la fonction originelle). Comme pour la fonction définie dans (4), cette nouvelle fonction a été construite de façon que  $f(S)$  soit fixée à  $0,37 / \mu_{\max}$  tant que  $S \leq 20$  psu et varie entre  $0,37 / \mu_{\max}$  et 1 pour  $S > 20$  psu. Retranscrit sous forme mathématique, ceci donne :

$$f(S) = 0,37 / \mu_{\max} + (1 - 0,37 / \mu_{\max}) \times \{f_{\text{Thebault}}\}$$

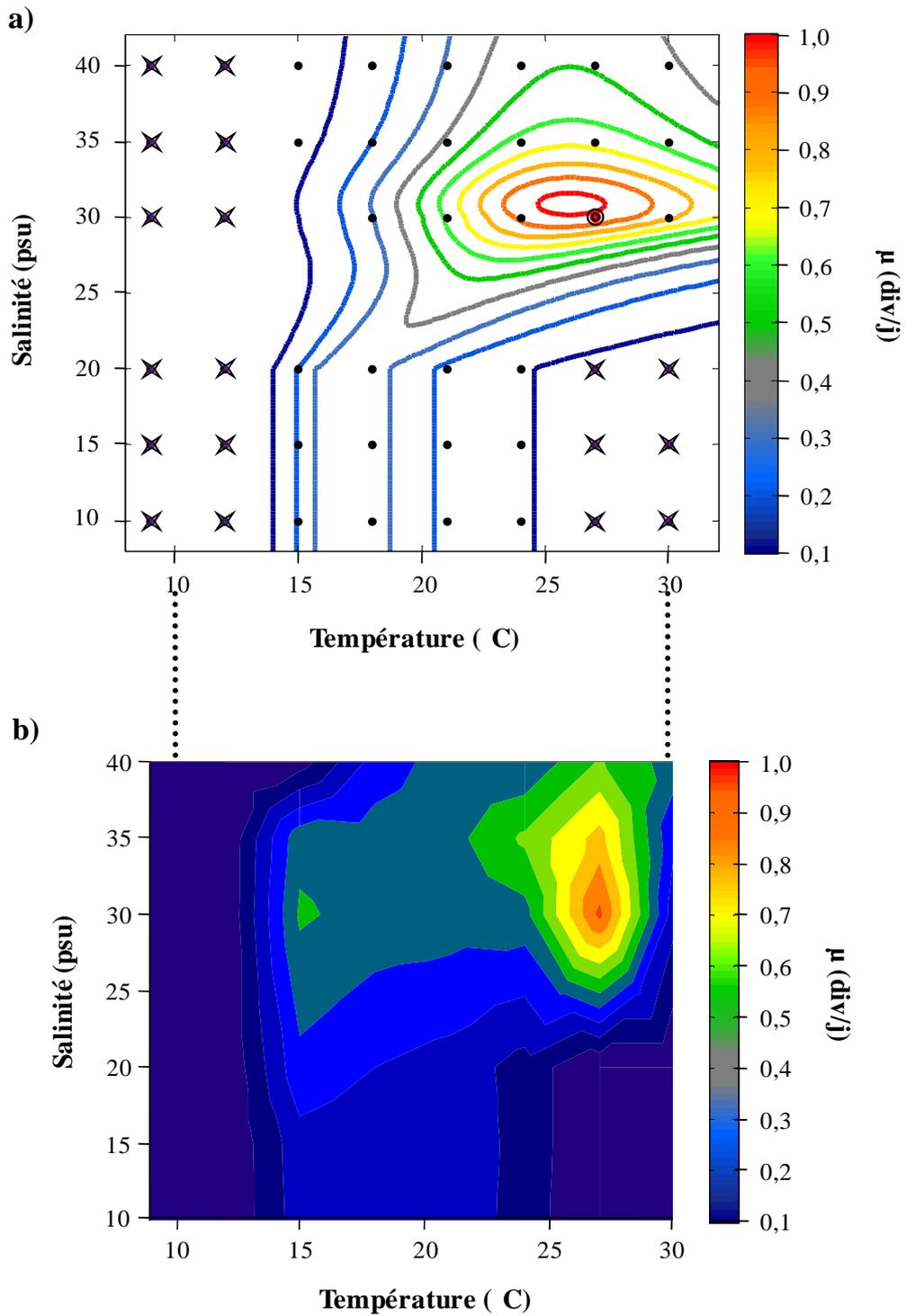
où  $\mu_{\max}$  est le taux maximal de croissance (en div/j) et  $\{f_{\text{Thebault}}\}$  une fonction de type Thebault.

$$\begin{aligned} \text{d'où :} \quad f(S) &= 0,36 + 1,28 \times (1 + \beta) \times q / (q^2 + 2 \times \beta \times q + 1) & (5) \\ \text{avec} \quad q &= (S - S_{\text{crit}}) / (S_{\text{opt}} - S_{\text{crit}}) \end{aligned}$$

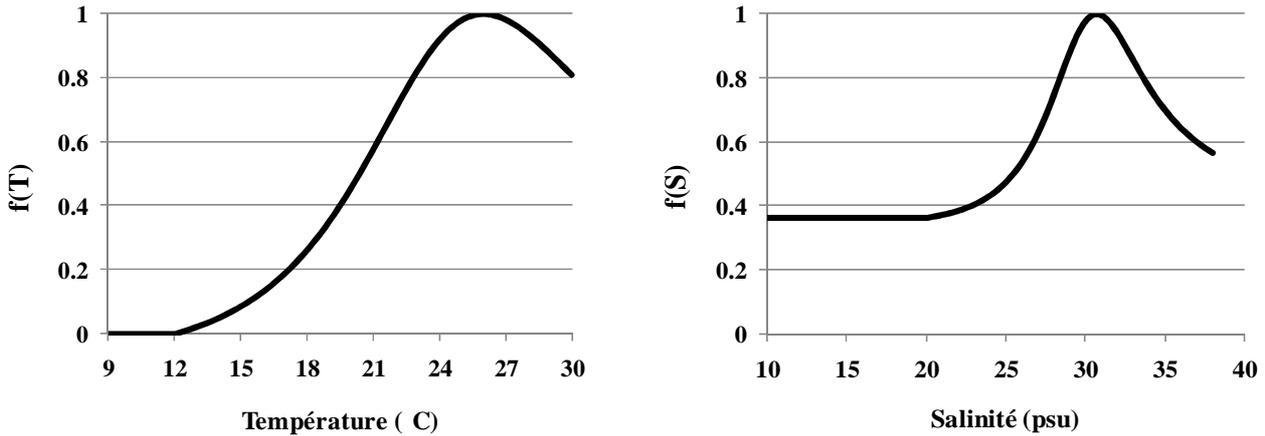
où  $S$  est la salinité (en psu),  $S_{\text{crit}}$  la salinité critique (en psu) sous laquelle le taux de croissance est fixé à  $0,37$  div/j,  $S_{\text{opt}}$  la salinité optimale (en psu) et  $\beta$  une constante.

Une combinaison des équations (1), (2), (3) et (5) donne un modèle à 7 paramètres d'entrée dont 5 sont mesurables ( $\mu_{\max}$ ,  $T_{\text{opt}}$ ,  $T_{\text{crit}}$ ,  $S_{\text{opt}}$ ,  $S_{\text{crit}}$ ). Ce modèle a été optimisé en imposant comme contrainte une erreur inférieure à 5% sur la valeur  $\mu$  ( $T = 27^\circ\text{C}$  ;  $S = 30$  psu), considérée comme donnée de référence. Les valeurs des paramètres d'entrée utilisées après optimisation du modèle sont données dans la Tableau 2.

Les résultats de simulation sont apparus satisfaisants (Figure 4) : les critères principaux (optimum de croissance et zones d'inhibition de croissance) caractérisant l'influence de la température et de la salinité sur la croissance  $y$  sont bien retranscrits et le coefficient de corrélation entre données réelles et modélisées obtenu est  $r^2 = 0,59$ . La Figure 5 donne un aperçu des fonctions de limitation  $f(T)$  et  $f(S)$  utilisées.



**Figure 4 :** Résultats de modélisation obtenus en combinant les équations (1), (2), (3) et (5) (a) et données réelles associées (b).



**Figure 5 :** Représentation des fonctions de limitation de la température ( $f(T)$ ) (a) et de la salinité ( $f(S)$ ) (b) le long des gradients respectifs de température et de salinité testés.

La fonction  $f(T)$  est ici représentée pour une salinité fixée à 30 psu.

### c- Bilan

Cette approche par modélisation des données a permis de faire ressortir les caractéristiques majeures de l'influence couplée de la température et de la salinité sur la croissance d'*A. catenella* grâce à l'intégration successive de différents critères au sein des fonctions de limitation  $f(T)$  et  $f(S)$ . Une simulation correcte des données a nécessité la prise en compte (i) d'une combinaison optimale  $\{T ; S\}$  maximisant le taux de croissance, (ii) de valeurs critiques définissant des seuils d'inhibition complète ( $T_{crit}$ ) ou partielle ( $S_{crit}$ ) de la croissance et (iii) d'une dépendance de  $f(T)$  à la salinité. D'après le Tableau 2, l'utilisation d'un modèle pour simuler le jeu de données a également permis de proposer une estimation plus précise de la valeur des paramètres définissant ces caractéristiques,  $T_{crit}$ ,  $T_{opt}$ ,  $S_{crit}$  et  $S_{opt}$ .

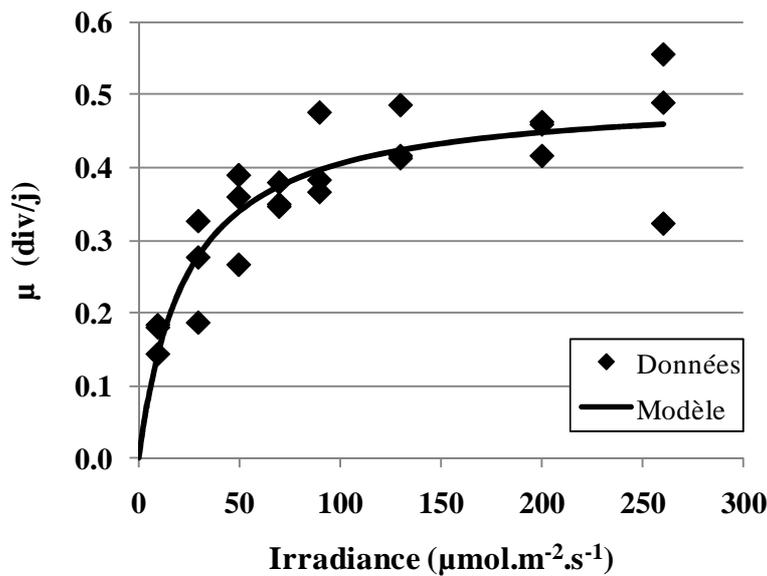
Dans l'Etang de Thau, d'après des données cumulées entre 2000 et 2004 (voir Introduction générale), la température oscille entre 5°C et 30 °C au cours du cycle annuel et la salinité entre 30 et 40 psu. Malgré de possibles déversements massifs d'eau douce dans l'Etang de Thau, et en particulier dans la Crique de l'Angle où les efflorescences d'*A. catenella* s'initient, seule la gamme de la salinité 30-40 psu apparaît intéressante à considérer pour analyser les conditions *in situ* de cette lagune. L'ensemble du gradient de température testé présente, lui, une réalité *in situ*. Dans ces gammes *in situ*, la modélisation des données a permis de définir comme valeurs caractéristiques définissant l'influence de la température et de la salinité sur la croissance d'*A. catenella* :  $T_{crit} = 12^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{opt} = 26^{\circ}\text{C}$  et  $S_{opt} = 31$  psu.

## II- CARACTERISATION DE L'INFLUENCE DE L'INTENSITE LUMINEUSE

### 1- Données à disposition

Des expérimentations ont été menées par Mohamed Laabir à partir de cultures de la souche ACT03, en vue d'estimer l'influence de l'intensité lumineuse sur le taux de croissance d'*A. catenella*. Huit niveaux d'intensité lumineuse ont été testés, variant de 10 à 260  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Les cultures étaient maintenues sous une température de 20 °C et une salinité de 30 psu. Un descriptif détaillé du protocole suivi est présenté dans les travaux de Laabir et al. (soumis).

Les variations de taux de croissance obtenues le long du gradient d'irradiance suivent une courbe croissante avec plateau de saturation (Figure 6). Aucune tendance de diminution n'est apparue aux fortes intensités lumineuses, suggérant qu'aucun processus de photoinhibition n'a pu être mis en évidence sur le gradient testé.



**Figure 6 :** Valeurs de taux de croissance mesurées le long d'un gradient d'intensité lumineuse et données modélisées associées, obtenues à partir de l'équation de Kim et al. (1984). Valeurs estimées pour les paramètres d'entrée :  $\mu_{\text{max}} = 0,5 \text{ div/j}$ ,  $K_I = 23,7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $I_0 = 0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ( $r^2 = 0,77$ ).

### 2- Choix de la fonction de limitation par l'irradiance

Une grande variété de formulations mathématiques a été proposée dans des travaux antérieurs pour représenter l'influence de l'intensité lumineuse sur le taux de croissance du

phytoplancton (Tian 2006 ; Baklouti et al. 2006). La majorité d'entre elles font intervenir un terme de photoinhibition (*e.g.* modèle de Peeters et Eilers (1978)), qu'il n'apparaît pas important de prendre en compte pour simuler les données à disposition. D'après l'allure observée, un simple modèle inspiré du modèle de Michaelis-Menten a été testé sur les données, celui décrit par Kim et al. (2004) où une valeur critique d'intensité lumineuse est intégrée suivant :

$$\mu = \mu_{\max} \times f(I) \quad (6)$$

où le taux de croissance  $\mu$  (en div/j) est exprimé en fonction du taux maximal de croissance  $\mu_{\max}$  (en div/j) auquel est appliqué une fonction de limitation par l'intensité lumineuse  $f(I)$  variant entre 0 et 1.

$$\text{avec } f(I) = (I - I_0) / (I + (K_I - 2 \times I_0)) \quad (7)$$

où  $I$  est l'irradiance (en  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $I_0$  l'intensité critique sous laquelle la croissance est nulle et  $K_I$  la constante de demi-saturation (en  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Avec un coefficient de corrélation entre données réelles et données modélisées  $r^2 = 0.77$ , ce modèle donne une bonne représentation des données (Figure 6). Cependant, il converge pour un coefficient  $I_0 = 0$ , signifiant qu'un simple modèle de Michaelis-Menten suffit à simuler efficacement cette série de données.

### III- CONCLUSION

L'influence des facteurs physiques, température, salinité et intensité lumineuse, sur la croissance d'*A. catenella* a pu être caractérisée et formalisée sous forme de fonctions de limitation s'appliquant au taux maximal de croissance  $\mu_{\max}$  par un modèle multiplicatif. Les trois fonctions de limitation décrites ne sont pas indépendantes : une simulation correcte des données à nécessiter l'intégration d'une dépendance de  $f(T)$  à la salinité sur le gradient 10-40 psu testé. Cependant, dans l'optique d'étudier les facteurs de contrôle environnementaux régulant le développement d'*A. catenella* dans l'Étang de Thau, seule une gamme de variation entre 30 et 40 psu est nécessaire à envisager, gamme pour laquelle les trois fonctions  $f(T)$ ,  $f(S)$  et  $f(I)$  décrites sont indépendantes.

Concernant l'influence de la température, cette caractérisation a été mise en place à partir de données de croissance obtenues sous des conditions stables de température. Or, *A.*

*catenella* est une espèce qui semble être sensible aux variations de température. D'après Collos et al. (2008), les efflorescences d'*A. catenella* dans l'Étang de Thau se développeraient à condition que la température soit stable (aux alentours de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) et qu'il y ait peu d'agitation (une vitesse des vents inférieure à 2-3 m/s) pendant une quinzaine de jours. Une hausse ou une baisse brutale des températures pendant une période favorable de croissance n'a jamais permis le développement d'une efflorescence. Pour simuler la croissance d'*A. catenella* dans l'Étang de Thau, il pourrait donc être intéressant d'intégrer au modèle, en complément de la fonction  $f(T)$  ici présentée, un coefficient dit « de choc thermique » qui simulerait un arrêt de croissance en cas de forte amplitude de variations de la température.

Enfin, *A. catenella* est une espèce phytoplanctonique capable de migrer dans la colonne d'eau vers des conditions physico-chimiques plus favorables à sa croissance. Pour appliquer correctement les fonctions de limitations ici décrites dans un modèle de croissance, il pourrait être nécessaire de caractériser les migrations verticales journalières de cette espèce *in situ* afin de connaître plus précisément à quelles conditions de Température-Salinité-Irradiance les cellules sont confrontées.

## Références

- Baklouti M.**, Diaz F., Pinazo C., Faure V., Quéquiner B. 2006. Investigation of mechanistic formulations depicting phytoplankton dynamics for models of marine pelagic ecosystems and description of a new model. *Prog. Oceanogr.* Vol. 71, p. 1-33.
- Collos Y.**, Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P., Vaquer A. 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea. Res.* Vol. 61, p.68-75.
- Kim D.**, Matsuyama Y., Nagasoe S., Yamaguchi M., Yoon Y., Oshima Y., Imada N., Honjo T. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *J. Plankton Res.* Vol. 26 (1), p. 61-66.
- Matsubara T.**, Nagasoe S., Yamasaki Y., Shikata T., Shimasaki Y., Oshima Y., Honjo T. 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 342, p. 226-230.
- Laabir M.**, Jauzein C., Genovesi B., Collos Y., Masseret E., Grzebyk D., Pastoureaud A., Cecchi P., Vaquer A. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Soumis*.

- McGillicuddy D.J.**, Anderson D.M., Lynch D.R., Townsend D.W. 2005. Mechanisms regulating large-scale seasonal fluctuations in *Alexandrium fundyense* populations in the Gulf of Maine: Results from a physical-biological model. *Deep-Sea Res. II*. Vol 52, p. 2698-2714.
- Nagaso S.**, Kim D., Shimasaki Y., Oshima Y., Yamaguchi M., Honjo T. 2006. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Harmful Algae*. Vol. 5, p. 20-25.
- Paz B.**, Vázquez J.A., Riobó P., Franco J.M. 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Mar. Env. Res.* Vol. 62, p. 286-300.
- Peeters J.C.H.**, Eilers P. 1978. The relationship between light intensity and photosynthesis, a simple mathematical model. *Hydrobiol. Bull.* Vol. 12, p. 134-136.
- Stock C.A.**, McGillicuddy D.J., Solow A.R., Anderson D.M. 2005. Evaluating hypotheses for the initiation and development of *Alexandrium fundyense* blooms in the western Gulf of Maine using a coupled physical-biological model. *Deep-Sea Res. II*. Vol 52, p. 19-21.
- Tian R.C.** 2006. Toward standard parametrizations in marine biological modeling. *Ecological modeling*, Vol. 193, p. 363-386.



# SYNTHESE ET CONCLUSION GENERALE



## **I- COMPLEXITE DES PROCESSUS DE CONTROLE DE LA CROISSANCE D’A. CATENELLA PAR LES ELEMENTS NUTRITIFS**

Ces travaux de thèse ont permis de nettes avancées quant à la compréhension de la régulation de la croissance d’*A. catenella* par les éléments nutritifs grâce à une caractérisation détaillée de nombreux processus de nutrition, dont l’absorption de divers nutriments dissous (ammonium, urée, nitrate et phosphate), l’utilisation potentielle du phosphore organique dissous et l’internalisation de matière particulaire par phagocytose. Une partie des processus de régulation impliqués dans ces modes de nutrition a pu être formalisée sous forme mathématique, définissant ainsi des relations qui pourront être intégrées à un futur modèle de croissance. Une paramétrisation de l’influence des facteurs physiques, température, salinité et intensité lumineuse, sur la croissance d’*A. catenella* a été réalisée en complément au cours de ce travail, dans le but de définir d’autres fonctions de limitation pouvant être utilisées pour ce modèle.

L’analyse des processus de nutrition chez *A. catenella* a également révélé leur forte complexité, par la mise en évidence d’une grande diversité de sources nutritives potentielles, de variations temporelles dans les capacités d’absorption, de phénomènes d’excrétion/réabsorption et d’interactions entre processus d’assimilation. Cette complexité limite l’utilisation de ces résultats, pris dans leur ensemble, dans la mise en place d’un modèle de croissance de type prédictif à court terme, comme celui prévu pour compléter le système d’alerte associé aux risques de contamination des parcs à huitres de l’Etang de Thau. Elle pourra cependant être intégrée à un futur modèle de croissance d’*A. catenella* de type explicatif qui pourrait servir d’aide à la décision quant à la gestion des problèmes associés aux efflorescences toxiques dans l’Etang de Thau ; ce genre de modèle permettrait, entre autres, de hiérarchiser l’influence des différents facteurs environnementaux dans le développement des efflorescences toxiques.

## **II- LES STRATEGIES NUTRITIVES D’A. CATENELLA DANS L’ETANG DE THAU**

Les expérimentations et observations réalisées au cours de ce travail de thèse ont permis de mettre en évidence deux types de stratégies nutritives pouvant représenter un avantage compétitif pour *A. catenella* : l’absorption de nutriments azotés au noir et les capacités d’utilisation de la matière organique dissoute et particulaire comme source nutritive. L’existence de ces stratégies permet de justifier la possibilité, pour cette espèce, de réaliser

des efflorescences de grande ampleur dans la lagune de Thau malgré qu'elle apparaisse peu compétitive, par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques, pour l'acquisition de ses ressources azotées majeures que sont l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et l'urée (Collos et al. 2004 ; Collos et al. 2007).

### 1- *Capacités d'absorption de nutriments azotés au noir*

D'après les résultats obtenus au cours d'expérimentations en culture, *A. catenella* présenterait de bonnes capacités d'absorption au noir des nutriments azotés dissous, ammonium, nitrate et urée. Il serait intéressant de compléter la caractérisation de ces capacités d'absorption nocturne en analysant, par exemple, la variation des taux d'absorption de ces sources azotées au noir en fonction du niveau de carence en azote des cellules ou bien les capacités d'*A. catenella* à prélever du phosphate la nuit. Cette stratégie de prise de nutriments la nuit, combinée aux capacités migratrices de cette espèce, lui apporterait un avantage compétitif majeur *in situ* : elle ne semble pas imposer de coûts métaboliques supplémentaires trop importants et permet aux cellules d'optimiser la prise cumulée de nutriments sur un cycle de 24h.

L'efficacité de cette stratégie *in situ* reste cependant à définir. Des analyses, lors d'une efflorescence dans la Crique de l'Angle, des comportements migratoires de cette espèce en fonction de la répartition des nutriments dans la colonne d'eau et des conditions de lumière sont nécessaires afin de définir le réel gain de cette stratégie pour *A. catenella*.

### 2- *Importance des éléments nutritifs régénérés dans la croissance d'A. catenella dans l'Etang de Thau*

Un bilan des conditions nutritives observées pendant les efflorescences d'*A. catenella* qui ont eu lieu dans l'Etang de Thau entre le printemps 2002 et le printemps 2007 est présenté dans le Tableau 1. D'après Collos et al. (2007), les sources majeures d'azote pour *A. catenella* dans cet environnement seraient  $\text{NH}_4^+$  et l'urée. Les résultats obtenus en culture lors de cette thèse, comparés aux conditions nutritives présentées dans le Tableau 1, permettent d'obtenir des informations supplémentaires quant aux éléments nutritifs contribuant significativement à la croissance d'*A. catenella* lors des efflorescences.

Source nutritive	Année	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2002	0,01	0,41	0,16	0,16
	2003	0,12	6,48	1,82	1,91
	2005	0,07	2,44	0,62	0,84
	2007	0,11	0,38	0,23	0,13
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2002	0,02	0,25	0,06	0,07
	2003	0,05	0,39	0,20	0,11
	2005	0,06	0,31	0,12	0,09
	2007	0,03	0,07	0,05	0,02
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2002	0,26	1,08	0,49	0,29
	2003	0,42	9,60	2,84	2,69
	2005	0,00	0,04	0,02	0,03
	2007	0,36	0,83	0,48	0,20
Urée	2002	-	-	-	-
	2003	0,73	2,55	1,46	0,66
	2005	0,14	1,23	0,52	0,37
	2007	0,28	2,50	0,96	0,91
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	2002	0,21	0,80	0,43	0,19
	2003	0,24	1,10	0,59	0,31
	2005	0,28	0,51	0,36	0,10
	2007	0,03	1,40	0,37	0,58
POD (calculé)	2002	-	-	-	-
	2003	1,14	3,03	1,85	1,03
	2005	0,47	1,00	0,75	0,22
	2007	0,85	1,09	0,94	0,09

**Tableau 1 :** Récapitulatif des concentrations en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), urée, phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) et phosphore organique dissous (POD) estimées lors des efflorescences d'*A. catenella* ayant eu lieu au printemps 2002, automne 2003, automne 2005 et printemps 2007 dans la Crique de l'Angle. Données Ifremer obtenues en station A5.

Malgré le fait que NH<sub>4</sub><sup>+</sup> soit un inhibiteur potentiel de la prise d'urée par *A. catenella*, les niveaux de concentrations en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> observés au cours des efflorescences (Tableau 1) confirment le fait que l'urée puisse être une source significative d'azote pour ces cellules *in situ* : les efflorescences de 2002, 2005 et 2007 ont été caractérisées par des concentrations moyennes en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (entre 0,02 ± 0,03 μM et 0,49 ± 0,29 μM) inférieures à la valeur moyenne des constantes d'inhibition K<sub>I</sub> estimées en culture (K<sub>I</sub> = 0,44 μM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pour la souche TL01 et 1,47 μM pour la souche ACT03) ; l'inhibition de la prise d'urée par *A. catenella* est donc probablement restée faible au cours de ces efflorescences. Par contre, la concentration

moyenne de  $2,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$  estimée au cours de l'efflorescence de 2003 a pu limiter la contribution de l'urée dans la croissance d'*A. catenella* lors de cette période.

Concernant la nutrition phosphorée, les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  mesurées au cours des efflorescences révèlent que le seuil de concentration sous lequel la synthèse de phosphatases alcalines serait activée chez *A. catenella* (situé entre  $0,4 \mu\text{M}$  et  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ ) a régulièrement été dépassé. Des niveaux de  $\text{PO}_4^{3-}$  inférieurs à  $0,4 \mu\text{M}$  ont en particulier été mesurés pendant des périodes représentant 80 %, 33 % et 68 % de la durée des blooms de 2002, 2003 et 2005 respectivement. La fraction de phosphore organique dissous (POD) a donc probablement alimenté significativement la croissance d'*A. catenella* au cours de ces efflorescences grâce à l'action des phosphatases alcalines. Ceci aurait permis aux cellules d'*A. catenella* de doubler la concentration de phosphore disponible pour sa croissance au vu des concentrations estimées de POD (valeurs calculées par différence entre concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  et concentration en phosphore organique total).

De plus, de nombreuses figures de phagocytose de cyanobactéries ont été observées au niveau de cellules prélevées lors de la floraison du printemps 2007 ; la proportion de cellules d'*A. catenella* présentant de telles figures a alors atteint 41 % de la population. Ce processus de phagotrophie étant apparu peu fonction des conditions de disponibilité en nutriments dissous et efficace pour de faibles concentrations en cyanobactéries, l'utilisation de la matière organique particulaire par *A. catenella* doit correspondre à un mode de nutrition régulièrement actif lors du développement des efflorescences toxiques dans la lagune de Thau.

Dans l'Etang de Thau, la croissance d'*A. catenella* serait donc très liée à la disponibilité en sources nutritives régénérées au niveau de la colonne d'eau. En effet,  $\text{NH}_4^+$  et urée sont des éléments pouvant être produit par la dégradation bactérienne de la matière organique, l'excrétion du zooplancton ou la lyse cellulaire ; POD peut être libéré par lyse cellulaire ou à partir des débris de broutage par le zooplancton ; les cyanobactéries constituent une source de matière particulaire que l'on pourrait qualifier de « régénérée » de par la croissance propre de la population. Si l'utilisation de  $\text{NH}_4^+$  comme source d'azote est un processus commun chez de nombreuses espèces phytoplanctoniques, l'utilisation de composés organiques dissous ou particulaire est une stratégie peu courante chez les organismes photosynthétiques : les capacités mixotrophes mises en évidence chez *A. catenella* doivent donc fournir à cette espèce un avantage compétitif, en particulier dans l'Etang de Thau, lagune caractérisée par une oligotrophisation du milieu.

### 3- Variabilité entre souches et stratégies écologiques

Si la mixotrophie apparaît être une stratégie écologique majeure pour le développement d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau, elle pourrait résulter d'une adaptation spécifique de l'espèce à cet environnement. En effet, l'analyse comparée des capacités d'absorption de  $\text{NH}_4^+$  et d'urée par différentes souches d'*A. catenella*, provenant de la lagune de Thau et d'autres zones côtières méditerranéennes, a révélé que les souches françaises présenteraient des capacités plus efficaces de prise d'urée. Les souches isolées de l'Etang de Thau seraient ainsi plus compétitives que les souches espagnoles testées (isolées dans les ports de Barcelone et de Tarragone en Espagne) dans un environnement caractérisé par de fortes concentrations d'urée et des concentrations en  $\text{NH}_4^+$  inférieures à  $5 \mu\text{M}$ .

Les conditions nutritives rapportées par Bravo et al. (2008) au cours d'efflorescences d'*A. catenella* qui ont eu lieu dans les ports de Barcelone et Tarragone entre 2000 et 2003 confirment cette idée. Ces sites espagnols présentaient des concentrations en azote minéral dissous plus élevées que celles mesurées dans l'Etang de Thau au cours des floraisons d'*A. catenella*, avec des concentrations respectives de  $\text{NO}_3^-$  de  $6,9 \pm 5,4 \mu\text{M}$  et  $9,4 \pm 8,9 \mu\text{M}$  mesurées à Barcelone et Tarragone et des concentrations respectives de  $\text{NH}_4^+$  de  $5,3 \pm 4,3 \mu\text{M}$  et  $4,4 \pm 3,1 \mu\text{M}$ . Dans ces eaux côtières espagnoles, la disponibilité en azote minéral a pu se révéler suffisante pour ne pas favoriser le développement d'une stratégie de mixotrophie chez les populations d'*A. catenella* s'y développant, comme par optimisation de l'utilisation des ressources organiques azotées telles que l'urée.

D'importantes différences de capacités d'absorption des nutriments dissous ont également été mises en évidence entre souches d'*A. catenella* isolées dans l'Etang de Thau. Cette diversité entre souches de la même origine géographique rend envisageable la mise en place d'une sélection, à l'échelle de la population, de capacités d'absorption spécifiques, adaptées aux conditions environnementales, lors du développement d'une efflorescence. Deux stratégies écologiques peuvent alors être envisagées : (i) une stratégie « d'efficacité » pour laquelle une forte sélection s'opérerait, rendant la population bien adaptée aux conditions environnementales instantanées mais sensibles aux changements environnementaux ; (ii) une stratégie « d'adaptabilité », caractérisée par des critères inverses et mise en place en cas d'absence de sélection. Une sélection, fonction des conditions nutritives, ne semble pas s'opérer lors de la germination des kystes (Genovesi-Guinti 2006). Cependant, des relations entre viabilité des cellules germées et concentrations en nutriments ont déjà été observées chez *Scrippsiella lachrymose* par Olli & Anderson (2002), suggérant qu'une sélection

potentielle par les conditions nutritives pourrait se réaliser dès les premiers stades de développement d'une efflorescence. Seule une étude de la variabilité génétique des cellules d'*A. catenella* au cours du développement d'une efflorescence dans l'Etang de Thau, par analyses de biologie moléculaire, permettrait d'acquérir des informations concernant le type de stratégie écologique suivie par cette espèce, efficacité ou adaptabilité. De telles connaissances permettraient entre autres de connaître la sensibilité d'une population à un changement brutal des conditions nutritives.

#### **4- *Considérations concernant la gestion des HAB's dans l'Etang de Thau, inspirées des stratégies nutritives d'A. catenella***

La forte implication des sources nutritives régénérées dans la croissance d'*A. catenella* dans les eaux de l'Etang de Thau impose des contraintes quant aux possibilités de contrôle de ces efflorescences. Tout d'abord, la disponibilité réelle de ces sources nutritives pour la croissance d'*A. catenella* peut s'avérer difficile à évaluer : étant produites et consommées au niveau de la colonne d'eau, ces sources nutritives peuvent être en « flux tendu », signifiant que leur présence instantané dans le milieu est faible alors qu'il existe un flux réel important entre production et consommation. Le simple suivi des concentrations ou abondances de ces sources nutritives régénérées n'est donc pas suffisant pour conclure quant à l'aspect favorable ou non, pour la croissance d'*A. catenella*, des conditions nutritives du milieu à un instant donné. D'autre part, cette forte contribution de sources régénérées dans la croissance de cette espèce toxique rend inefficace toute tentative de limitation du développement des efflorescences par modification des conditions d'apports en nutriments par les rivières.

### **III- PERSPECTIVES**

Des voies de recherche restent à explorer pour pouvoir conclure sur l'importance des éléments nutritifs comme facteur de contrôle des efflorescences d'*A. catenella* dans l'Etang de Thau. Une globalisation de l'influence des divers facteurs potentiels de contrôle de ces efflorescences doit être réalisée pour cela. Elle nécessite entre autres de caractériser plus en détails le rôle de facteurs physiques tels que la turbulence dans le développement de ces floraisons.

Les résultats obtenus à partir d'expérimentations en culture au cours de cette thèse devront être prolongées par des observations *in situ*. Les méthodes de suivi *in situ* prévues initialement dans ce travail se sont avérées trop dépendantes des conditions d'abondance des

cellules d'*A. catenella* : les faibles abondances observées entre 2005 et 2008 n'ont pas permis leur utilisation efficace. D'autres méthodes d'analyse, à l'échelle cellulaire plutôt qu'à celle de la population, seraient à prévoir et tester afin d'améliorer la qualité du suivi *in situ*.

Un des modes de nutrition mis en évidence au cours de ce travail mais encore peu caractérisé reste le processus de phagocytose chez *A. catenella*. Des expérimentations et observations supplémentaires seraient nécessaires pour estimer la contribution réelle de la phagotrophie à la croissance d'*A. catenella* afin d'estimer le rôle potentiel des populations de cyanobactéries et bactéries dans le développement et le maintien des efflorescences toxiques dans la lagune de Thau.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Hors chapitres – 76 références

(231 références au total)

---

- Anderson D.M.** 1998. Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions. *Dans* Anderson D.M., Cembella A.D. et Hallegraeff G.M. [Eds], *Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Series. Vol. G41*. Springer, New York, p. 29-48.
- Anderson D.M.**, Hoagland P., Kaoru Y., White A.W. 2000. Estimated Annual Economic Impacts of Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States. Woods Hole, MA: Woods Hole Oceanographic Institution. *Rapport technique WHO I 2000-11*. 97 p. ([http://www.whoi.edu/redtide/pertinentinfo/Economics\\_report.pdf](http://www.whoi.edu/redtide/pertinentinfo/Economics_report.pdf)).
- Anderson D.M.**, Glibert P.M., Burkholder J.M. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries*. Vol. 25, p. 704-726.
- Archambault M.**, Grant J., Bricelj V.M. 2003. Removal efficiency of the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* by phosphatic clay, and implications for the mitigation of harmful algal blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 253, p. 97-109.
- Arzul G.**, Seguel M., Guzman L., Erard-LeDenn E. 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 232, p. 285-295.
- Beaulieu S.E.**, Sengco M.R., Anderson D.M. 2005. Using clay to control harmful algal blooms : deposition and resuspension of clay/algal flocs. *Harmful Algae*. Vol. 4, p. 123-138.
- Benitez-Nelson, C.R.** 2000. The Biogeochemical Cycling of Phosphorus in Marine Systems. *Earth Sci. Rev.* Vol. 51, p. 109-135.
- Boesch D.F.**, Anderson D.M., Horner R.A., Shumway S.E., Tester P.A., Whitledge T.E. 1997. Harmful algal blooms in coastal waters: Options for prevention, control and mitigation. *NOAA Coastal Ocean Program Analysis Series No. 10*. NOAA Coastal Ocean Office, Silver Spring, Maryland, 46 pp.
- Brand L.E.**, Compton A. 2007. Long-term increase in *Karenia brevis* abundance along the Southwest Florida Coast. *Harmful Algae*. Vol. 6, .: 232-252.
- Bravo I.**, Vila M., Masó M., Figueroa R.I., Ramilo I. 2008. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: Toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae*. Vol. 7, p. 515-522.

- Burkholder J.M.** 1998. Implications of harmful microalgae and heterotrophic dinoflagellates in management of sustainable marine fisheries. *Ecol. Appl.* Vol. 8, p. 537-562.
- Carlsson P., Granéli E.** 1998. Utilization of dissolved organic matter (DOM) by phytoplankton, including harmful species. Dans D.A. Andreson, A.D. Cembella, G.M. Hallegraeff [Eds], *The physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Bermuda Biological Station, Springer-Verlag, Germany, p. 509-524.
- Caron D.A.** 2000. Symbiosis and mixotrophy among pelagic microorganisms. Dans D.L. Kirchman [Ed], *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, Inc., New York, p.495-523.
- Cassou C.** 2004. Du changement climatique aux régimes de temps : l'oscillation nord-atlantique. *La Météorologie*. Vol. 45, p. 21-32.
- Cembella A.D., Antia N.J., Harrison P.J.** 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* Vol. 10, p. 317-391.
- Chambouvet A., Morin P., Marie D., Guillou L.** 2008. Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science*. Vol. 322, p. 1254-1257.
- Collos Y.** 2006. Rôle du mode de nutrition mixotrophe sur la dynamique d'*Alexandrium catenella* dans l'Etang de Thau. *Rapport Ifremer*, contrat n° 05/5210506, 51 pp.
- Collos Y., Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P.** 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau Lagoon, Southern France. *J. Phycol.* Vol. 40, p. 96-103.
- Collos Y., Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A., Souch P.** 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae*. Vol. 6, p. 781-789.
- Collos Y., Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P., Vaquer A.** 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea. Res.* Vol. 61, p. 68-75.
- Droop M.R.** 1968 Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology.IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* Vol. 48, p. 689-733.
- Dyhrman S.T., Anderson D. M.** 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 48, p. 647-55.
- Eppley R.W., Rogers J.N., McCarthy, J.J., Sournia A.** 1971. Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemostat culture. *J. Phycol.* Vol. 7, p. 150-54.
- Flewelling L.J., Naar J.P., Abbott J.P., Baden D.G., Barros N.B., Bossart G.D., Bottein M.D., Hammond D.G., Haubold E.M., Heil C.A., Henry M.S., Jacoks H.M., Leighfield T.A., Pierce R.H., Pitchford T.D., Rommel S.A., Scott P.S., Steidinger K.A., Truby E.W., Van Dolah F.M., Landsberg J.H.** 2005. Red tides and marine mammal mortalities. *Science*. Vol. 435, p. 755-756.
- Florida Fish and Wildlife Research Institute (FWRI).** 2007a. An Evaluation of FWRI's historical Red Tide Database. *Rapport technique*. ([http://research.myfwc.com/features/view\\_article.asp?id=27095](http://research.myfwc.com/features/view_article.asp?id=27095)).

- Florida Fish and Wildlife Research Institute (FWRI).** 2007b. Looking at the Florida Red Tide historical Database. *Rapport technique*.  
([http://www.floridamarine.org/features/print\\_article.asp?id=25871](http://www.floridamarine.org/features/print_article.asp?id=25871)).
- Flynn K.J.** 2002. How critical is the critical N:P ratio? *J. Phycol.* Vol. 38, p. 961–970.
- Flynn K.J.** 2008. Use, abuse, misconceptions and insights from quotas models – The Droop cell quota model 40 years on. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Vol. 46, p. 1-23.
- Flynn K., Jones K.J., Flynn K.J.** 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting batch culture. *Mar. Biol.* Vol. 126, p. 9-18.
- Furuhata K., Kakino J., Miyama Y., Fukuyo Y.** 1996. Elimination of cysts of the toxic dinoflagellates *Alexandrium* spp. contaminated in hard clam. *Nippon Suisan Gakkaishi*. Vol. 62, p. 813-814.
- Garcés E., Vila M., Masó, Sampedro N., Giacobbe M.G., Penna A.** 2005. Taxon-specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 301, p. 67-79.
- Genovesi-Giunti B.** 2006. Initiation, maintien et recurrence des efflorescences toxiques d'*Alexandrium catenella* (Dinophyceae) dans une lagune méditerranéenne (Thau, France) : rôle du kyste dormant. *Thèse - Université Montpellier II*. 186 pp.
- Glibert P.M., Seitzinger S., Heil C. A., Burkholder J.M., Parrow MW., Codispoti L.A., Kelly V.** 2005. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms. *Oceanography*. Vol. 18 (2), p. 198-209.
- Glibert P.M., Harrison J., Heil C., Seitzinger S.** 2006. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry*. Vol. 77, p. 441-463.
- Hallegraeff G.M.** 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*. Vol. 32, p. 79-99.
- Hoagland P., Anderson D.M., Kaoru E., White A.W.** 2002. The economic effects of harmful algal blooms in the United States: Estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries*. Vol. 25, p. 819-837.
- Imai I., Yamaguchi M., Hori Y.** 2006. Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.* Vol. 1 (2), p. 71-84.
- Jeong H.J., Park J.Y., Nho J.H., Park M.O., Ha J.H., Seong K.A., Jeng C., Seong C.N., Lee K.Y., Yih W.H.** 2005. Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.* Vol. 41, p. 131-143.
- Jin D., Thunberg E., Hoagland P.** 2008. Economic impact of the 2005 red tide event on commercial shellfish fisheries in New England. *Ocean & Coastal Management*. Vol. 51, p. 420-429.
- La Jeunesse I., Elliott M.** 2004. Anthropogenic regulation of the phosphorus balance in the Thau catchment-coastal lagoon system (Mediterranean Sea, France) over 24 years. *Mar. Pol. Bull.* Vol 48, p. 679-687.

- Landsberg J.**, Dolah F.V., Doucette G. 2005. Marine and estuarine harmful algal blooms: Impacts on human and animal health. *Dans* Belkin et Colwell [Eds], *Oceans and health: Pathogens in the marine environment*. Springer, New York, p. 165-215.
- Lee Y.J.**, Choi J.K., Kim E.K., Youn S.H., Yang E.J. 2008. Field experiments on mitigation of harmful algal blooms using a Sphorolipid-Yellow clay mixture and effects on marine plankton. *Harmful Algae*. Vol. 7, p. 154-162.
- Levin R.E.** 1992. Paralytic shellfish toxins: Their origins, characteristics, and methods of detection: A review. *J. Food Biochem*. Vol. 15, p. 405-417.
- Lewis M.A.**, Dantin D.D., Walker C.C., Kurtz J.C., Greene R.M. 2003. Toxicity of clay flocculation of the toxic dinoflagellate, *Karenia brevis*, to estuarine invertebrates and fish. *Harmful Algae*. Vol. 2, p. 235-246.
- Lilly E.L.**, Kulis D.M., Gentien P., Anderson D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res*. Vol. 24 (5), p. 443-452.
- Lilly E.L.**, Halanych K.M., Anderson D.M. 2005. Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful Algae*. Vol. 4, p. 1004-1020.
- Maguer J.F.**, L'Helguen S., Madec C., Labry C., Le Corre P. 2007. Nitrogen uptake and assimilation kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): Effect of N-limited growth rate on nitrate and ammonium interactions. *J. Phycol.* Vol. 43(2), p. 295-303
- Martin-Vide J.**, Lopez-Bustins J. 2006. The Western Mediterranean Oscillation and rainfall in the Iberian peninsula. *Int. J. Climatol*. Vol. 26, p. 1455-1475.
- Matsuda A.**, Nishijima T., Fukami, K. 1999. Effects of nitrogenous and phosphorus nutrients on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* Vol. 65, p. 847-55.
- Murphy J.**, Riley J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*. Vol. 27, p. 31-36.
- Olli K.**, Anderson D.M. 2002. High encystment success of the dinoflagellate *Scrippsiella* cf. *lachrymose* in culture experiments. *J. Phycol.* Vol. 38, p. 145-156.
- Ou L.**, Wang D., Huang B., Hong H., Qi Y., Lu S. 2008. Comparative study of phosphorus strategies of three typical harmful algae in Chinese coastal waters. *J. Plankton Res*. Vol. 30(9), p. 1007-1017.
- Penna A.**, Garcés E., Vila M., Giacobbe M.G., Fraga S., Lugliè A., Bravo I., Bretozzini E., Vernesi C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Biol*. Vol. 148, p. 13-23.
- Raimbault P.**, Diaz F., Pouvesle W., Boudjellal B. 1999. Simultaneous determination of particulate organic carbon, nitrogen and phosphorus collected on filters, using a semi-automatic wet-oxidation method. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. Vol. 180, p. 289-295.

- Rauch M.**, Denis L., Dauvin J. 2008. The effects of *Phaeocystis globosa* bloom on the dynamics of the mineralization processes in intertidal permeable sediment in the Eastern English Channel (Wimereux, France). *Mar. Pol. Bull.* Vol. 56 (7), p. 1284-1293.
- Schneider K.R.**, Pierce R.H., Rodrick G.E. 2003. The degradation of *Karenia brevis* toxins utilizing ozonated seawater. *Harmful Algae*. Vol. 2, p. 101-107.
- Scholín C.A.**, Doucette G.J., Cembella A.D. 2005. Prospects for developing automated systems for in situ detection of harmful algae and their toxins. Dans M. Babin, C. Roesler, J. Cullen [Eds], *Monographs on oceanographic methodologies Vol. 10*. Intergovernmental oceanographic commission of UNESCO, Paris.
- Seong K.A.**, Jeong H.J., Kim S., Kim G.H., Kang J.H. 2006. Bacterivory by co-occurring red-tide algae, heterotrophic nanoflagellates, and ciliates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 322, p : 85-97.
- Seuront L**, Vincent D., Mitchell J.G. 2006. Biologically induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring bloom. *J. Mar. Sys.* Vol. 61 (3-4), p. 118-133.
- Smayda T.J.** 1997a. What is a bloom? A commentary. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 42 (5), p. 1132-1136.
- Smayda T.J.** 1997b. Harmful algal blooms : Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 45 (5), p. 1137-1153.
- Smayda T.J.** 2002. Adaptative ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *J. Oceanogr.* Vol. 58, p. 281-294.
- Smayda T.J.** 2008. Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae*. Vol. 8, p. 140-151.
- Solórzano L.**, Sharp J.H. 1980. Determination of total dissolved phosphorus and particulate phosphorus in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 25, p. 754-758.
- Souchu P.**, Gasc A., Collos Y., Vaquer A., Tournier H., Bibent B., Deslous-Paoli J.M. 1998. Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 164, p. 135-146.
- Sullivan J.M.**, Swift E., Donaghay P.L., Rines J.E.B. 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae*. Vol. 2, p. 183-199.
- Tamminen T.**, Irmisch A. 1996. Urea uptake kinetics of a midsummer planktonic community on the SW coast of Finland. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 130, p. 201-211.
- Tilman D.**, Kilham S.S., Kilham P. 1982. Phytoplankton community ecology: The role of limiting nutrients. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 13, p. 349-372.
- Tovar-Sanchez A.**, Sañudo-Wilhelmy S.A., Garcia-Vargas M., Weaver R.S., Popels L.C., Hutchins D.A. 2003. A trace metal clean reagent to remove surface-bound iron from marine phytoplankton. *Mar. Chem.* Vol. 82, p. 91-99.
- Treguer P.**, Le Corre P.. 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (Utilisation de l'Autoanalyseur II Technicon), 2<sup>ème</sup> édition. Université de Bretagne Occidentale, Brest.

- Ou L.**, Wang D., Huang B., Hong H., Qi Y., Lu S. 2008. Comparative study of phosphorus strategies of three typical harmful algae in Chinese coastal waters. *J. Plankton Res.* Vol 30 (9), p. 1007-1017.
- Vila M.**, Garcés E., Masó M., Camp J. 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 222, p. 73-83.
- Vincent C.** 2007. Détection de structures tourbillonnaires par analyse de données directionnelles. *Thèse – Université Montpellier II.*
- Watanabe M.**, Kohata K., Kunugi M. 1987. <sup>31</sup>P nuclear-magnetic-resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae). *J. Phycol.* Vol. 23, p. 54–62.
- Wyatt T.**, Jenkinson I.A. 1997. Notes on *Alexandrium* population dynamics. *J. Plankton Res.* Vol. 19 (5), p. 551-575.
- Zingone A.**, Enevoldsen H.O. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management.* Vol. 43, p. 725-748.



## RESUME

L'activité ostréicole de l'Etang de Thau subit, depuis une dizaine d'années, des pertes de production régulières dues à des contaminations des parcs conchylicoles par des microalgues toxiques de l'espèce *Alexandrium catenella*. Cette thèse a été menée dans le but d'améliorer la compréhension des processus de contrôle environnementaux régulant ces efflorescences toxiques, en étudiant plus particulièrement l'influence des éléments nutritifs azotés et phosphorés sur la croissance d'*A. catenella*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une grande variété de sources potentielles nutritives pour cette espèce, dont la majorité peut être régénérée au niveau de la colonne d'eau. Différentes sources organiques contribueraient à la croissance d'*A. catenella* grâce à divers processus de nutrition : absorption directe à travers la membrane plasmique (pour l'urée), dégradation enzymatique dans le milieu extracellulaire (pour le phosphore organique dissous) ou phagocytose (pour internaliser des cyanobactéries). Ces capacités mixotrophes représenteraient un des avantages compétitif permettant à cette espèce de réaliser des efflorescences de grande ampleur ; un autre correspondrait à l'utilisation potentielle de nutriments azotés la nuit. Les expérimentations réalisées ont de plus révélé une grande complexité dans les processus de nutrition de cette espèce, par la mise en évidence de variations temporelles dans les capacités d'absorption, de phénomènes d'excrétion/réabsorption et d'interactions entre processus d'assimilation. Cette complexité a pu être en partie paramétrée afin de définir des relations mathématiques pouvant être intégrées à un futur modèle de croissance.

**Mots clés :** *Alexandrium catenella*, cinétiques d'absorption, ammonium, urée, phosphate, mixotrophie, phosphatases alcalines.

---

**TITLE:** PARAMETERIZATION OF THE NITROGEN AND PHOSPHORUS NUTRITION OF *ALEXANDRIUM CATENELLA*, A TOXIC MICROALGAE BLOOMING IN THAU LAGOON WATERS

---

## ABSTRACT

In the Thau lagoon, blooms of the toxic microalgae *Alexandrium catenella* have induced regular losses of shellfish production since 1998 due to bioaccumulation of toxins in oysters and mussels. This thesis was conducted to enhance knowledge of toxic bloom development regulation by environmental factors, focusing on nitrogen and phosphorus nutrients influence on *A. catenella* growth. These works highlighted a large variety of potential nutritive sources for this species and a major part of these nutrients appeared to be potentially regenerated in the water column. Different organic sources may contribute to the growth of *A. catenella* from diverse nutrition processes: direct absorption through the cell membrane (for urea), enzymatic degradation in the extracellular medium (for dissolved organic phosphorus) or phagocytosis (for ingestion of cyanobacteria). These mixotrophic capacities may represent competitive advantages for this species allowing the development of huge blooms; another competitive advantage may correspond to the potential use of nitrogen nutrients at night. A high complexity in nutrition processes of this species was revealed through observation of temporal variations in uptake capacities, excretion/absorption phenomena and interactions between nutrient uptake processes. The parametrization of a part of this complexity allowed the definition of mathematical formulations which can be integrated in a future growth model.

**Key words:** *Alexandrium catenella*, uptake kinetics, ammonium, urea, phosphate, mixotrophy, alkaline phosphatases.