

L'existence de kystes chez les Dinophysales

Michèle BARDOUIL, Brigitte BERLAND, Daniel GRZEBYK et Patrick LASSUS

Résumé – A partir d'échantillons prélevés à Antifer (côtes normandes, France) nous avons observé un grand nombre de cellules de *Dinophysis* cf. *acuminata* présentant un cytoplasme rétracté en un disque circulaire plat et la libération de kystes. Ce type de kyste plat et déformable s'apparente au kyste temporaire de nombreux dinoflagellés. Plusieurs cellules montraient, à l'évidence, la formation, à partir de *D. sacculus*, de petites formes s'apparentant à *D. skagii*. Ces petites formes seraient des morphotypes du cycle biologique de *Dinophysis*, éventuellement des gamètes.

First report on cyst production among Dinophysales

Abstract – In samples collected from the harbour at Antifer (Normandy, France), a great number of *Dinophysis* cf. *acuminata* cells had retracted cytoplasm within a circular disc. We observed the release of a temporary cyst similar to other temporary dinoflagellate cysts. Several daughter cells still attached to the empty theca of the mother cell *D. Sacculus* showed apparently the shape and morphology of *D. skagii*. This suggests that these small size cells are not different species but only morphotypes of *Dinophysis*' biological cycle.

Abridged English Version – There has been increasing interest in *Dinophysis* blooms in recent years because of their role in diarrhetic shellfish poisoning (DSP) ([1], [2]). However, few data are available on the physiology and biological cycle of this genus, despite numerous reports on swimming-stage biology, morphology and ultrastructure ([3] to [7]) in the literature. These organisms are rather rare in plankton and several attempts to grow them *in vitro* have proved unsuccessful.

Winter production of *Dinophysis* resting cysts or dormant stages has never been demonstrated. In France, several experiments intended to produce excystment in muddy bottom samples from Vilaine Bay failed to produce swimming stages [8]. However, there have been recent reports of *D. acuta* cyst occurrences in the Pontevedra and Vigo rias (Galicia, Spain) and of "small size" division stages originally attributed to *D. dens* [10].

During an experimental survey of the vertical migration of *Dinophysis* cf. *acuminata* in the harbour of Antifer (Normandy, France) in August 1990, preserved or living samples were obtained for laboratory sorting, examination and culture growth. Taxonomic composition was obtained with Utermöhl method [13]. Optic and scanning electron microscopy studies were carried out.

The dinoflagellate species list (Table) shows the dominance of *Gymnodinium* sp. and *Prorocentrum triestimum* in these samples. Three *Dinophysis* species were found: *D. cf. acuminata*, *D. sacculus* and *D. skagii*. The maximum of *Dinophysis* during vertical migration was observed between 3 and 5 m depth, with the presence of *D. skagii* (small size cells). In one preserved sample, one-third of *D. cf. acuminata* cells had retracted cytoplasm (Pl. I, Fig. 1) within a perfectly circular disc. Micromanipulation of these cells caused immediate opening of the hypotheca at the dorsal and ventral sutures, with release of a temporary cyst (Pl. I, Fig. 2) similar to other temporary (or pellicle) dinoflagellate cysts ([14], [15], [16]). This type of cyst appears to be flat and deformable.

Several culture assays were run in parallel. *Dinophysis* cells were inoculated in filtered coastal seawater without any enrichment. After 4 days, cells in some batches formed an internal cyst (Pl. II, Fig. 7) with more or less granular protoplasma.

Note présentée par Jean-Marie PÉRÈS.

Cysts were generally round, sometimes oblong, measuring 25 to 30 μm in diameter, and seemed to be enveloped with a triple-layered wall (Pl. I, Figs. 3, 4, Pl. II Figs. 9, 10). The smooth connective dorsal band can be seen in a microphotograph of a cyst surrounded by the opened theca after ecdysis (Pl. II, Fig. 8). It was not possible to perform germination experiments to determine cyst ability to produce a new vegetative stage.

We also observed in preserved samples, after division, several daughter cells still attached to half of the empty theca of the mother cell *D. sacculus* showing the apparent shape and general morphology of *D. skagii* (Pl. I, Figs. 5, 6). This suggests that the "small size" cells, *i.e.* *D. dens*, *D. skagii* and *D. lapidistrigiliformis*, described by various authors [17] during *D. acuta*, *D. sacculus*, *D. acuminata* or *D. fortii* blooms, are not different species but morphotypes of the biological cycle of these species and perhaps gametes participating in zygote fusion through a sexual cycle.

In conclusion, although these observations of temporary cysts do not provide a definite indirect demonstration of potential winter resting stages, they indicate that safe shellfish farming areas might be recontaminated by bivalves previously exposed to *Dinophysis*. Temporary cysts could remain viable in shellfish inter-valve seawater.

INTRODUCTION. — Très peu de données sont disponibles en ce qui concerne la physiologie et le cycle biologique du genre *Dinophysis* (Dinophycées) décrit cependant depuis longtemps [1]. A part quelques descriptions morphologiques, les caractéristiques écophysiologiques de ces organismes plutôt rares dans le plancton n'ont donné lieu qu'à peu de recherches. Il est vrai que les différentes espèces se sont montrées jusqu'ici rebelles à toute croissance *in vitro*.

Un regain d'intérêt s'est manifesté ces dernières années après la mise en évidence de leur rôle dans la contamination DSP (« diarrhetic shellfish poisoning ») des coquillages [2].

Des observations faites au microscope par épifluorescence ont montré l'existence chez *Dinophysis* Ehrenberg d'espèces autotrophes (parmi lesquelles se trouvent plusieurs espèces toxiques) et d'espèces sans chloroplastes ([3], [4], [5]). Ces mêmes auteurs ont observé une fluorescence primaire orange indiquant la présence de phycobilines qu'ils ont attribuée, pour certains [3], à la présence possible de cyanobactéries endosymbiontes. Mais la structure fine de plusieurs espèces de *Dinophysis* (*D. acuta*, *D. acuminata* et

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE I

Fig. 1. — *Dinophysis cf. acuminata* (longueur 51 μm) formant un kyste de stress.

Fig. 1. — *Dinophysis cf. acuminata* (51 μm length) forming a temporary cyst.

Fig. 2. — *Dinophysis cf. acuminata* (longueur 54 μm) en déhiscence avec kyste temporaire rétracté.

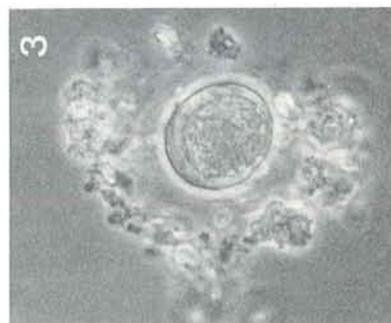
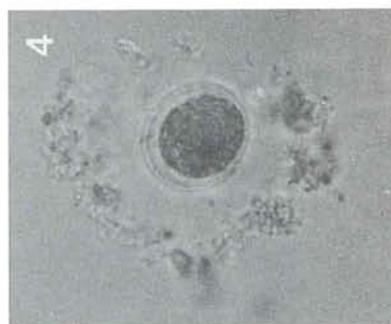
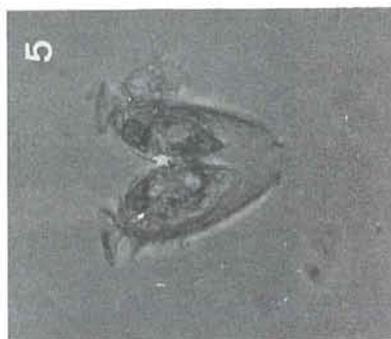
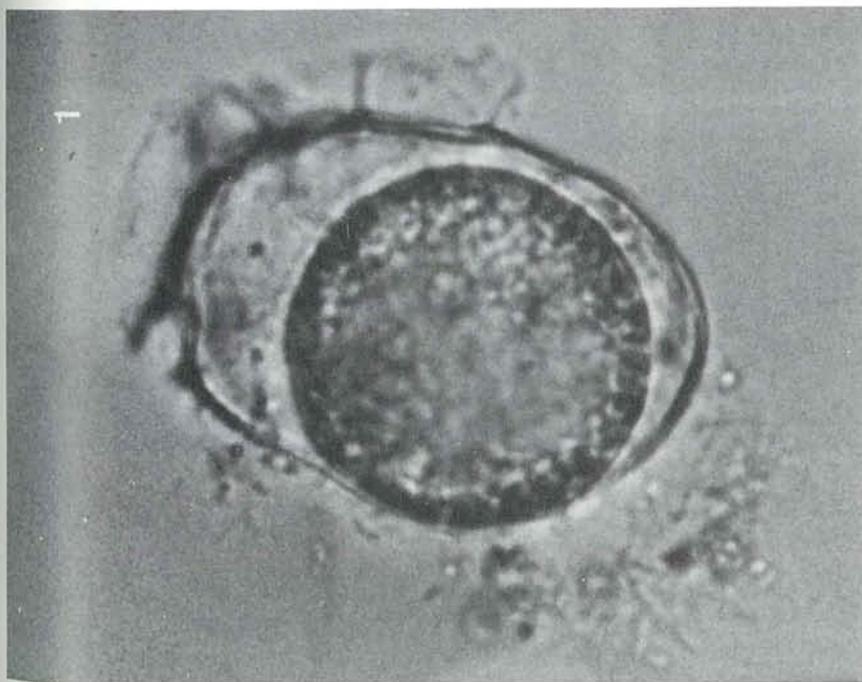
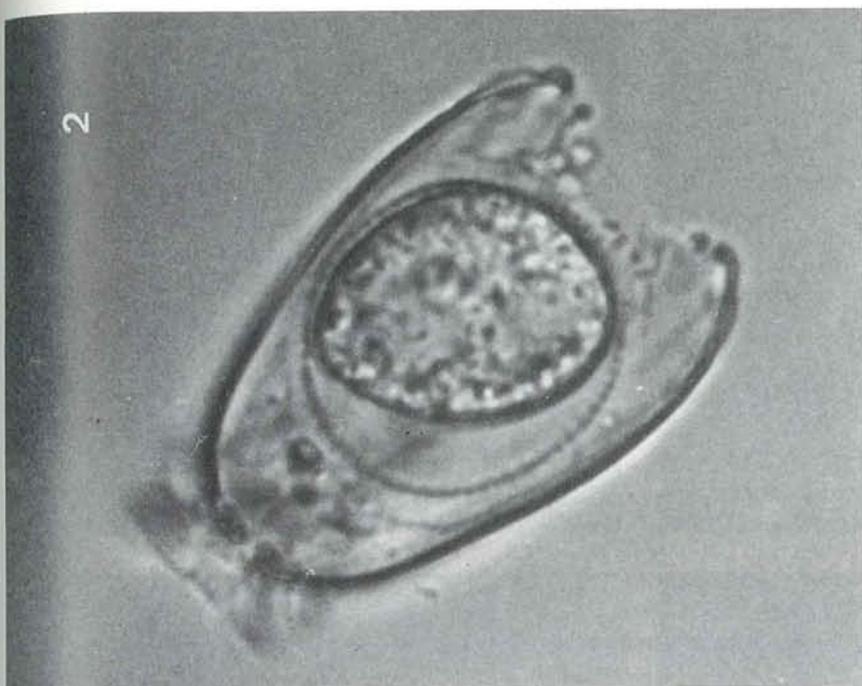
Fig. 2. — *Dinophysis cf. acuminata* (54 μm length) dehiscent cell with temporary cyst.

Fig. 3-4. — Kyste isolé (diamètre 30 μm), vu avec (3) et sans (4) contraste de phase. Il semble entouré d'une triple enveloppe.

Figs. 3-4. — Cyst (diameter 30 μm) seen in (3) and without phase-contrast. Cyst seems enveloped with a triple layered-wall.

Fig. 5-6. — Cellule en fin de division avec deux cellules filles de tailles inférieures, identiques à *D. skagii*. Vues sans (5) puis avec (6) contraste de phase (longueur 51 μm).

Figs. 5-6. — Cell (51 μm length) at the end of division with two daughter cells of reduced size similar to *D. skagii*. Views without (5) and in (6) phase-contrast.



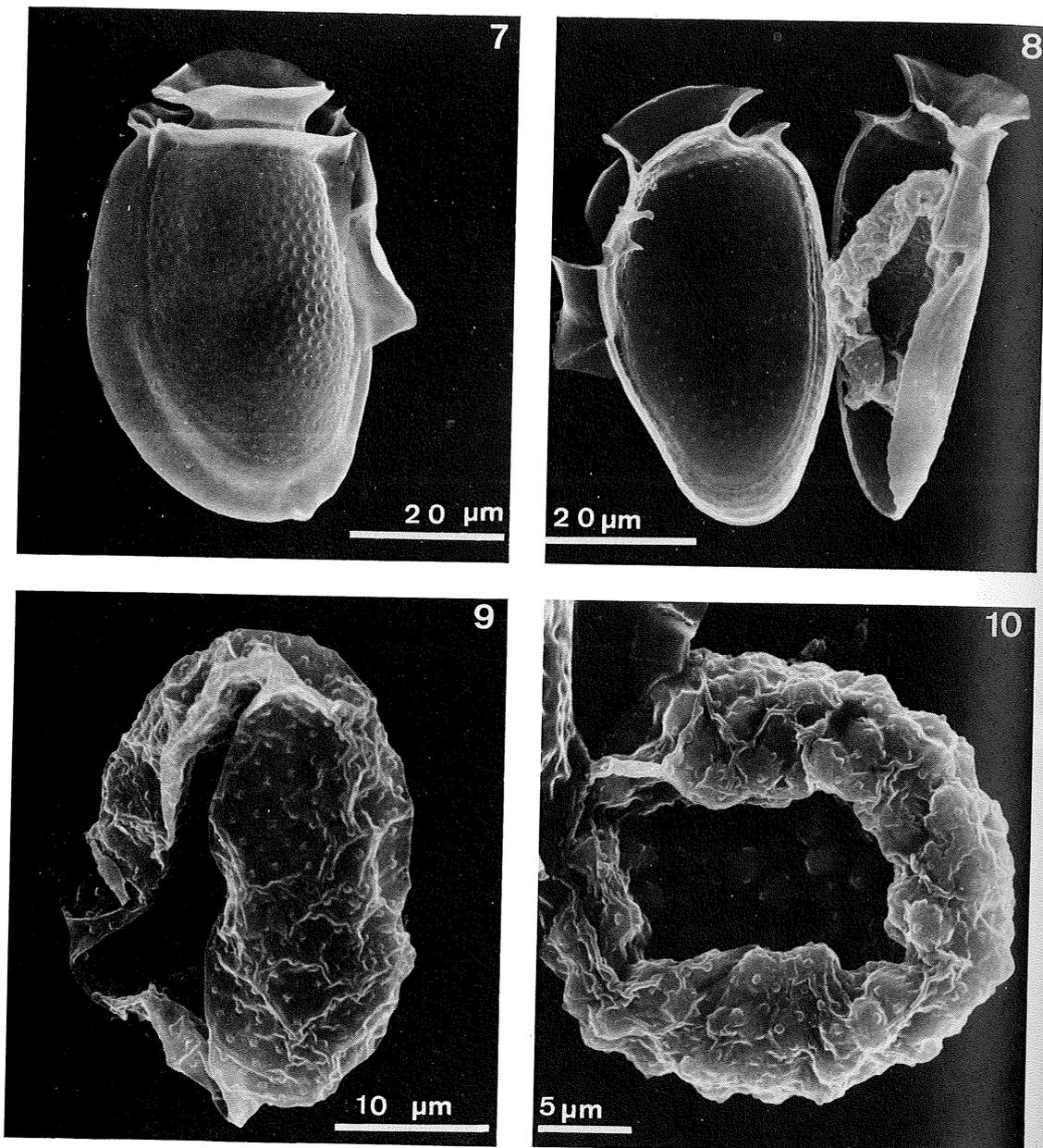


Fig. 7. — *Dinophysis* cf. *acuminata* avec un kyste intérieur et présentant une bande connective (suture dorsale) lisse élargie avant la déhiscence.

Fig. 7. — *Dinophysis* cf. *acuminata* with a cyst inside and showing a widened smooth connecting strip (dorsal suture) before dehiscence.

Fig. 8. — *Dinophysis* cf. *acuminata* déhiscent montrant un kyste à l'intérieur d'une demi-thèque.

Fig. 8. — Dehiscent *Dinophysis* cf. *acuminata* showing a cyst in one half-theca.

Fig. 9-10. — Microstructures de kystes isolés.

Figs. 9-10. — Cyst microstructures.

TABLEAU

Composition spécifique des dinoflagellés
présents dans les prélèvements du 30 août 1990 dans l'avant-port d'Antifer.

*Taxonomic composition of the Dinoflagellates
in the samples (August 1990) from the harbour at Antifer.*

Espèces	Nombre de cellules.l ⁻¹
DINOFLAGELLÉS	
<i>Prorocentrum triestinum</i>	142 000
<i>P. micans</i>	5 600
<i>Dinophysis sacculus</i>	6 400
<i>D. cf. acuminata</i>	2 000
<i>D. skagii</i>	360
<i>Dinophysis</i> (kystes).	80
<i>Protoperdinium steinii</i>	4 000
<i>P. leonis</i>	100
<i>Gymnodinium</i> sp.	1 536 000
<i>Gyrodinium</i> sp.	16 000
<i>Polykrikos schwartzii</i>	40
DIATOMÉES	28 000
PHYTOFLAGELLÉS	
<i>Pyramimonas disomata</i>	4 000

D. fortii) a révélé la présence de chloroplastes à double membrane avec des thylakoïdes appariés identiques à ceux des Cryptophycées ([6], [7]).

Hallegraeff et Lucas [4] ont montré chez les Dinophysales une fréquence élevée de phagohétérotrophie. Mais Lucas et Vesk [7], chez les formes photosynthétiques toxiques *D. acuminata* et *D. fortii* n'ont pas observé de vacuoles digestives. Par contre, ces derniers auteurs ont montré la présence d'un système pusulaire important qui pourrait être impliqué dans l'absorption de macromolécules.

La production d'un kyste ou de formes de résistance hivernales n'a jamais pu être démontrée à ce jour. Des expériences de germination expérimentale à partir de kystes provenant de sédiments vaseux prélevés l'hiver en baie de Vilaine [8] n'ont pas permis l'obtention de formes mobiles de *Dinophysis*. Cependant, dans ce site critique en matière de contamination DSP des coquillages, on peut penser que les faibles développements estivaux (maximum : 20 000 cell. l⁻¹) ne pourraient donner qu'un très petit nombre de kystes par gramme de sédiment. Dans la littérature, une seule mention est faite d'un kyste fossile attribuable à une Dinophysale [9] et qui appartient au genre *Ternia*, mais aucun élément ne permet de confirmer cette hypothèse.

Cependant, des travaux récents [10] font état non seulement de kystes de *D. acuta* dans les rias de Pontevedra et Vigo (Galice, Espagne) mais également de « petites formes » de division, décrites initialement sous l'appellation *D. dens*. De même, des petites formes résultant de stades de division de *D. acuta* ont été observées en Nouvelle-Zélande [11].

Jusqu'à présent, il n'a pas été décrit de reproduction sexuée chez les Dinophysales. Mais l'on peut s'interroger sur le rôle des petites formes attribuées à *D. skagii* rencontrées lors des développements de *D. acuminata*, s'il s'avère qu'elles représentent un morphotype de cette espèce [12].

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Dans le cadre d'un suivi de la migration verticale de *Dinophysis* cf. *acuminata* dans le port d'Antifer (côtes normandes, France), des échantillons fixés ou vivants ont été rapportés au laboratoire pour tri (au micromanipulateur Alcatel), examen et essais de culture, à la fin d'août 1990. La composition floristique des échantillons a été évaluée par la méthode d'Utermöhl [13]. Des cellules avec kystes ont été fixées avec 2 % de glutaraldéhyde puis triées, rincées à l'eau distillée sous microscope inversé et placées sur lamelle de verre. Celle-ci subit enfin une métallisation à l'or-palladium avant l'observation au microscope à balayage.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La composition floristique des échantillons est donnée dans le tableau. Elle présente une forte dominance de dinoflagellés : des *Gymnodinium* sp. et *Prorocentrum triestinum*. Trois espèces de *Dinophysis* ont été observées : *Dinophysis* cf. *acuminata*, *D. sacculus* et *D. skagii*.

Dans l'un des échantillons fixés, environ le tiers de l'effectif en *Dinophysis* cf. *acuminata* présentait des cellules au cytoplasme rétracté (pl. I, fig. 1) en un disque parfaitement circulaire. La manipulation de ces cellules provoquait immédiatement la déhiscence des valves au niveau des sutures dorsale et ventrale et la libération d'un kyste (pl. I, fig. 2) semblant plat et déformable. Ce type de kyste s'apparente ici comme pour de nombreux dinoflagellés à un kyste temporaire ([14], [15], [16]).

Dans les essais de mise en culture de *Dinophysis*, seules des cellules végétatives normales ont été prélevées car les prélèvements non fixés initialement ne contenaient aucune cellule enkystée. Plusieurs cultures ont été effectuées en parallèle (10 cell. ml⁻¹ ont été introduites dans de l'eau de mer côtière filtrée stérilement, sans enrichissement). Au bout de 4 jours, 3 des cultures ont présenté des cellules avec kystes (pl. II, fig. 7). La photo 8 de la planche II montre un kyste à l'intérieur de la thèque après déhiscence; on voit nettement la bande connective lisse. Les kystes sont ronds, parfois oblongs et d'un diamètre d'environ 25 à 30 µm, avec un contenu plus ou moins granuleux (pl. II, fig. 9 et 10); ils semblent présenter une triple enveloppe (pl. I, fig. 3, 4). Il n'a pas été possible de procéder à des expériences de germination afin de vérifier la potentialité du kyste à redonner une forme végétative.

Par ailleurs, en accord avec les observations de Reguera et coll. [10], le maximum de *Dinophysis* observé au cours de la migration verticale se situait généralement entre 3 et 5 m sous la surface avec présence de quelques *D. skagii* (petites formes). Plusieurs cellules en division ou en fin de division avec une demi-thèque relique (pl. I, fig. 5, 6) montraient à l'évidence la formation de *D. skagii* à partir des cellules de *D. sacculus*.

CONCLUSION. — Il ressort de ces dernières observations que les « petites formes », c'est-à-dire *D. dens*, *D. skagii* et *D. lapidistrigiliformis* [17], décrites dans la littérature lors des développements de *D. acuta*, *D. sacculus*, *D. acuminata* ou *D. fortii*, seraient en fait non des espèces différentes mais des morphotypes du cycle biologique de ces dernières espèces, éventuellement des gamètes participant à un cycle sexué avec formation de zygote.

Les observations de kystes temporaires ne sont pas une indication formelle d'une potentialité à produire des stades de résistance hivernaux. Par contre, elles permettent de craindre des recontaminations éventuelles de zones conchylicoles salubres lors de transfert de coquillages contaminés par *Dinophysis*. Les kystes pourraient, en effet, rester viables dans l'eau intravalvaire des bivalves.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. EHRENBERG, *Verh. preuss. Akad. Wiss. (Berl.)*, 1840, p. 152-159.
- [2] T. YASUMOTO, Y. OSHIMA, W. SUGAWARA, Y. FUKUYO, H. OGURI, T. IGARASHI et T. FUJITA, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1980, p. 1405-1411.
- [3] E. LESSARD et E. SWIFT, *J. Plankton Res.*, 8, 1986, p. 1209-1215.
- [4] G. HALLEGRAEFF et M. LUCAS, *Phycologia*, 27, 1988, p. 25-42.
- [5] R. GEIDER et P. GUNTER, *Br. Phycol. J.*, 24, 1989, p. 195-198.
- [6] E. SCHNEPF et M. ELBRÄCHTER, *Botanica Acta*, 101, 1988, p. 196-203.
- [7] I. LUCAS et M. VESK, *J. Phycol.*, 26, 1990, p. 345-357.
- [8] M. LARRAZABAL, P. LASSUS, P. MAGGI et M. BARDOUIL, *Cryptog. Algol.*, 11, (3), 1990, p. 171-185.
- [9] D. GOODMAN, In *The biology of Dinoflagellates*, chap. 15, F. J. R. TAYLOR éd., Blackwell, *Scient. Publ. Bot. Mon.*, 21, 1987, p. 649-722.
- [10] B. REGUERA, I. BRAVO et S. FRAGA, I.C.E.S. CM 1990/L, 1990, p. 14.
- [11] L. MACKENZIE, In *Toxic marine phytoplankton*, Symp. Lünd, Suède, 26-30 juin 1989, 1990, abstracts.
- [12] J. DODGE, *Her Majesty's Stationery Office London*, 1982, p. 303.
- [13] H. UTERMÖHL, *Mitt. Int. Verein. theor. angew. Limnol.*, 9, 1958, p. 1-38.
- [14] B. DALE, *Sarsia*, 63, 1977, p. 29-34.
- [15] D. M. ANDERSON et D. WALL, *J. Phycol.*, 14, 1978, p. 224-234.
- [16] B. DALE, In *Survival Strategies of the Algae*, Fryxell éd., 1983, p. 69-136.
- [17] T. ABE, *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 15, 1967, p. 37-78.

M. B. et P. L. : IFREMER, rue de l'Île-d'Yeu,
B.P. n° 1049, 44037 Nantes Cedex 01;

B. B. et D. G. : Centre océanologique de Marseille,
rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille.