



INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE EN INFORMATIQUE ET EN AUTOMATIQUE

Les Cahiers d'EDORA II

Alain PAVE - Jean-Luc GOUZE

N° 2530

Avril 1995

PROGRAMME 5

A large, stylized, light-colored 'R' graphic that overlaps the black bar.

*R*apport
de recherche

ETUDE DE LA CROISSANCE ET DE L'ABSORPTION DE NITRATE CHEZ UNE ALGUE
PHYTOPLANCTONIQUE (*PROROCENTRUM MINIMUM* : DINOPHYCEAE) SOUMISE À DES
APPORTS IMPULSIONNELS ET PÉRIODIQUES DE NITRATE

ANTOINE SCIANDRA

Station Zoologique - UA 716

Villefranche-sur-mer

B.P. 28 - 06230

ABSTRACT

The growth and nitrate uptake rates of the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum* were measured in a chemostat culture system in which nitrate was added in the same proportions every 1, 2 or 3 days. In comparison with continuous nitrate supply, the rate of cell division was not affected by the 1 or 2 day pulse treatments, whereas it fell drastically when a nitrogen source was added only every 3 days. Delayed steady uptake rates were reached during the 1 or 2 day pulse phases, which reflected a mid-term adaptation of the cell uptake process under discontinuous nutrient supply. This adaptation permitted *P. minimum* to maintain a steady growth rate under these regimes. During the one pulse per 3 day treatment, the maximal uptake rate measured during each pulse experiment increased importantly, which reflected a long term adaptation, but it was not sufficient to maintain the initial growth rate. For low frequencies of nitrate supply, uptake and growth rate became largely uncoupled. It is concluded that *P. minimum* is a species able to form a large internal pool of nitrogen which constitutes a competitive advantage discussed in the light of *in situ* observations.

RESUME

Les processus de croissance et d'absorption de nitrate ont été mesurés chez une algue phytoplanctonique *Prorocentrum minimum* (Dinophycée) au sein d'un système de culture en continu. Après une période d'alimentation continue en nitrates, ces derniers sont injectés par impulsions successives avec des périodicités de 1, 2 et 3 jours, et des concentrations telles que la culture reçoive en moyenne au cours du temps la même quantité de nitrate. En comparaison avec un mode d'alimentation continu, le taux de division cellulaire n'est pas affecté pour les périodes impulsionnelles de 1 et 2 jours. Par contre, il chute brutalement pour des impulsions effectuées une fois tous les trois jours. Pour les périodicités de 1 et 2 jours, un taux d'absorption stable n'est observé à la suite de l'impulsion qu'après un temps de latence qui reflète une adaptation à moyen terme permettant aux cellules alimentées de façon discontinue de maintenir un taux de croissance stable. Pour des apports de nitrate effectués seulement une fois tous les trois jours, les cellules atteignent un taux maximum d'absorption beaucoup plus important qui traduit une adaptation à long terme qui reste néanmoins insuffisante pour maintenir un taux de croissance constant. Pour les basses fréquences impulsionnelles, croissance et absorption deviennent des processus très découplés. En définitive, *P. minimum* est une espèce capable de former des réserves intracellulaires de nitrate importantes qui lui confèrent par rapport à d'autres espèces un avantage compétitif qui est discuté au vu d'observations faites *in situ*.

INTRODUCTION

Cette étude traite des rapports entre le processus d'absorption de sels nutritifs d'une espèce du phytoplancton, *Prorocentrum minimum*, et sa croissance, celle-ci étant représentée par le taux de division cellulaire de la population. L'absorption désigne le mécanisme par lequel des ions nutritifs inorganiques en solution dans l'eau de mer, en l'occurrence les nitrates dans notre étude, traversent la membrane de la cellule. L'assimilation désigne la chaîne de réactions enzymatiques que subissent les ions devenus intracellulaires avant d'être incorporés sous forme de protéines associées soit à l'activité enzymatique de la cellule, soit à la synthèse d'ADN, soit au stockage d'énergie. Cette étude s'inscrit dans la problématique de l'adaptation des espèces phytoplanctoniques au sein du milieu océanique où le facteur qui limite la croissance (dans notre cas, les nitrates) peut avoir une fluctuation temporelle complexe. La prise en considération que la couche superficielle de mélange de l'océan (environ les 100 premiers mètres) n'est pas un environnement stable, et la démonstration expérimentale que les processus physiologiques du phytoplancton sont adaptés à un environnement fluctuant (Harris, 1986), ont suscité durant la dernière décade un engouement important pour l'étude des processus de croissance et d'absorption dans des conditions instationnaires de sels nutritifs.

Les premières tentatives menées pour quantifier l'influence de la concentration de sels nutritifs sur l'activité des cellules phytoplanctoniques ont été faites dans des conditions dites stables, où les algues sont acclimatées au niveau nutritif externe avant que les mesures de croissance ou d'absorption ne soient faites. Les cinétiques ainsi obtenues mettent en évidence des relations hyperboliques entre d'une part la concentration externe de sels nutritifs (x , $\mu\text{g-atN.l}^{-1}$) et d'autre part la croissance $\mu(x)$ en jour^{-1} (modèle de Monod), et la vitesse d'absorption $\rho(x)$ en $\mu\text{g-at N.jour}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ (relation de Michaëlis-Menten).

$$\mu(x) = \mu_m \frac{x}{k_\mu + x}$$

$$\rho(x) = \rho_m \frac{x}{k_\rho + x}$$

A l'état stable, tel qu'il peut être obtenu dans un chémostat, ces deux expressions représentent les mêmes flux de matière: tout l'azote absorbé est investi sous forme de biomasse azotée, donc de croissance algale (si les processus d'excrétion sont négligeables).

L'expression de Monod, qui a été utilisée pour décrire la croissance du phytoplancton en milieu océanique par Dugdale (1967), met en relation la croissance μ qui est un indice endogène, avec une variable exogène, la concentration de sel nutritif externe. Droop (1968) a établi une relation également de type

hyperbolique, mais plus réaliste puisqu'elle prend en considération la concentration interne de l'élément qui limite la croissance (q , en $\mu\text{g-atN}\cdot\text{cellule}^{-1}$), que l'on appelle également le quota interne:

$$\mu(q) = \mu'_m \left(1 - \frac{k_q}{q}\right)$$

où μ'_m est le taux de croissance maximal théorique obtenu pour une valeur infinie de q , et k_q le quota interne minimum en dessous duquel la croissance n'est plus possible. Morel (1987) a montré l'équivalence de ces trois relations à l'équilibre lorsque les flux sont stationnaires. Cela signifie que dans des conditions de stabilité, la croissance algale peut être connue d'après la simple détermination du taux d'absorption de sels nutritifs.

Quand la croissance est loin de la stationnarité, les modèles classiques de Monod, de Droop, et de Michaëlis-Menten ne sont plus aptes à représenter en détail ni la croissance, ni l'absorption de sels nutritifs. Nombreux sont les cas cités dans la littérature où ces modèles ne peuvent être adaptés aux cinétiques observées (Murphy, 1980; Goldman et McCarthy, 1978; McCarthy, 1981; Cunningham et Maas, 1978; Burmaster, 1979; Cunningham, 1984; DeManche *et al.*, 1979). Cette inaptitude a initialement été démontrée en soumettant des cellules carencées à une impulsion unique du facteur limitant Conway *et al.*, 1976). Ce type de perturbation quasi instantanée constitue bien entendu un cas extrême de variation. Même si de telles impulsions sont improbables dans le milieu naturel, en raison des mécanismes de diffusion spatiale qui lissent toutes variations importantes, ces expérimentations se sont néanmoins révélées utiles pour révéler l'existence des processus d'adaptation potentiels chez différentes espèces du phytoplancton. En régime instationnaire, les cinétiques d'absorption et de stockage de la plupart des nutriments deviennent autrement complexes, en raison du nombre important d'inter-relations physiologiques au sein de la cellule, et des priorités données à la synthèse des différents constituants cellulaires (Harris, 1986). Les constantes (coefficients de demi-saturation k , taux maximum, ρ_m , μ_m) deviennent en réalité des variables qui peuvent évoluer dans le temps en fonction des conditions intra et extracellulaires. La diversité des types d'adaptation enregistrés reflète également la complexité des processus d'adaptation qui diffèrent d'une espèce à l'autre (Collos, 1986).

L'étude des processus d'adaptation dans l'environnement marin est chose ardue, non seulement parce que ces processus, étant non linéaires, sont difficiles à analyser, mais aussi parce que les modes de variation lagrangienne des facteurs limitants *in situ* sont complexes et mal connus (Marra, 1990; McCarthy et Altabet, 1984). Quelques modèles mathématiques ont néanmoins permis de prédire l'existence durable de certaines fréquences caractéristiques, comme les bouffées de

nitrate à travers la nitracline (Klein, 1984; Woods et Wiley, 1972). En dépit du fait que des modes plus complexes existent probablement en raison de la simultanéité et de la diversité des processus physiques qui entretiennent l'instabilité dynamique de l'environnement marin (Denmann et Gargett, 1983), on peut néanmoins utiliser comme descripteur de la variabilité d'un facteur limitant sa période de variation (Harris, 1984).

Etant donné que la gamme des fréquences de variabilité des nutriments est assez large, il apparaît judicieux de mesurer les taux de croissance et d'absorption de cellules soumises à des impulsions de différentes fréquences et amplitudes. Les travaux de Suttle *et al.*, (1987), Olsen *et al.* (1989), Sommer (1985), ainsi que d'autres, ont clairement démontré qu'il n'est plus possible d'aborder la problématique de la compétition entre espèces sans considérer les modes de variation temporelle des facteurs limitants. Quarmby *et al.* (1982) ont par exemple montré que des nitrates ajoutés périodiquement à des cultures de diatomées modifient leur cinétique de croissance par rapport à une alimentation continue. Malheureusement, toutes ces études sont généralement limitées à l'influence d'une seule fréquence impulsionnelle, et par conséquent sont inaptes à illustrer la diversité des comportements cellulaires face à différentes fréquences de variation.

En outre, les études des effets d'impulsions sur la croissance et sur le taux d'absorption sont le plus souvent accomplies à la suite d'un pré-conditionnement des cellules réalisé dans un système de culture en continu, de sorte que les pools internes sont stabilisés à un niveau fixé par le taux de renouvellement de la culture. L'apport impulsionnel est donc effectué sur des cellules qui sont supposées être à l'état stable, situation improbable en mer. En procédant à l'étude de trains d'impulsions de différentes fréquences, il devient par contre possible d'analyser les processus de croissance et d'absorption de cellules plus ou moins éloignées d'un état d'équilibre, condition nécessaire pour optimiser l'étude de processus non linéaires. Il est clair que l'intervalle de temps entre deux impulsions consécutives ainsi que leur amplitude, sont des facteurs cruciaux, puisqu'ils déterminent l'état physiologique des cellules au moment de l'impulsion (Collos, 1980).

Une telle approche est ardue, parce qu'une importante quantité de données est nécessaire pour analyser la non-linéarité des cinétiques observées (Collos, 1983; Goldman *et al.*, 1981; Harrison *et al.*, 1989). Des modèles mathématiques comme ceux de Turpin *et al.* (1981) ont tenté de fournir des résultats théoriques sur l'effet d'apports intermittents sur la croissance phytoplanctonique. Cependant, étant donné la complexité des modes d'absorption et d'utilisation des nutriments par les cellules (Dortch, 1982), de tels modèles sont peu crédibles, surtout s'ils formalisent la croissance et l'absorption à partir de relations établies pour l'état stable.

Sont par conséquent présentés dans ce paragraphe les résultats d'une étude expérimentale dont le but a été d'évaluer l'adaptation de *Prorocentrum minimum* à divers régimes de fluctuation d'azote inorganique, en l'occurrence des nitrates. *P. minimum* est une espèce dont la distribution et la dynamique de croissance ont été très largement étudiées en relation avec les facteurs physiques de l'environnement (Tyler et Seliger, 1978; 1981). Les implications écologiques de nos résultats sur le développement d'eaux colorées dues à cette espèce sont discutées dans la conclusion.

MATERIELS ET METHODES

Le détail de la mise en culture de *Prorocentrum minimum* est exposé dans Sciandra, 1991). Rappelons simplement que sa prolifération s'effectue dans un chémostat de 3,3 litres. A l'aide de ce dispositif, le taux de croissance de l'algue, sa concentration ainsi que celle des nitrates se stabilisent après un certain temps à des niveaux fixés par le taux de renouvellement de la culture ($0,16 \text{ jour}^{-1}$) par un milieu neuf, ainsi que par la concentration de nitrate (le facteur limitant) dans ce dernier. Lorsque la stabilité est atteinte, la culture est toujours alimentée avec un milieu neuf et dépourvu de nitrate. Ceux-ci sont injectés séparément de façon discontinue. Suivant la fréquence des impulsions, la concentration de la solution injectée est ajustée de sorte que l'apport moyen de nitrate dans la culture reste identique à l'apport effectué en mode d'alimentation continu. Sur toute la durée de l'expérience, la culture reçoit en moyenne la même quantité de nitrate. Seule la fréquence d'approvisionnement change. L'ensemble du système (acquisition sels nutritifs, température, pH, basculement du mode continu vers le mode impulsional) est piloté par un automate élaboré à la Station Zoologique de Villefranche-sur-mer (Malara et Sciandra, 1991). Durant cette expérience, l'azote inorganique total a été dosé sans distinction entre nitrate et nitrite. Le taux de dilution a été maintenu constant durant toute l'expérience, de sorte que le taux de variation instantanée des nitrates dans le chémostat s'écrit:

$$\frac{dx}{dt} = -\rho(x) y + D (C-x)$$

x ($\mu\text{g-at N} \cdot \text{l}^{-1}$) et y ($\text{cell} \cdot \text{l}^{-1}$) étant respectivement la concentration d'azote inorganique et la densité cellulaire dans le chémostat, $\rho(x)$ ($\mu\text{g-at N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) le taux d'absorption d'azote inorganique, D (h^{-1}) le taux de dilution, et C ($\mu\text{g-at N} \cdot \text{l}^{-1}$) la concentration de nitrate dans le milieu de renouvellement. Pour les impulsions où un taux d'absorption stable a été observé durant un certain temps avant la limitation due à l'épuisement du sel, on a supposé que la cinétique de variation suivait la loi de Michaëlis-Menten:

$$\rho(x) = \rho_m \frac{x}{k_N + x}$$

ρ_m ($\mu\text{g-at N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) étant le taux d'absorption maximum, et k_N ($\mu\text{g-at N.l}^{-1}$) la constante de demi-saturation. Les estimations de k_N et ρ_m sont obtenues par régression non-linéaire grâce à l'algorithme de Gauss-Marquard. La fonction estimée est la taux de variation de la concentration en azote inorganique:

$$\frac{dx}{dt} = -\rho_m \frac{\bar{x}}{k_N + \bar{x}} y + D (c - \bar{x})$$

qui est ajustée aux valeurs calculées à partir de la variation entre deux mesures consécutives de x:

$$\frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{x_{t+\Delta t} - x_t}{\Delta t}$$

La concentration moyenne de x au cours de cette variation est calculée d'après:

$$\bar{x} = \frac{x_t + x_{t+\Delta t}}{2}$$

Le taux de croissance μ est estimé à partir de la pente d'une fonction polynomiale ajustée aux concentrations cellulaires, qui représente l'évolution moyenne de la culture au cours du temps (Fig. 1).

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln\left(\frac{y_{t+\Delta t}}{y_t}\right) + D$$

RESULTATS

La Fig. 1 illustre la concentration en azote inorganique et la population de *Prorocentrum minimum* durant les 70 jours d'expérimentation. Les nitrates ne sont plus décelables (moins de $0,02 \mu\text{g-at N.l}^{-1}$) à partir du 8^{ème} jour, bien que la concentration cellulaire continue d'augmenter jusqu'au 12^{ème} jour. A ce moment, la culture se stabilise suite à une limitation de la croissance par les nitrates qui sont très faibles, et est considérée à l'état stable. Le tableau I donne les différents modes d'introduction de nitrate dans le chémostat.

Périodes (jours)	Nitrate présent dans le milieu de renouvellement	Impulsion de NO ₃		
		Nombre (par période)	Quantité (µgat N par litre de culture)	Fréquence (Jour ⁻¹)
0 - 4	-	0	-	-
4 - 17	+	0	-	-
14	+	1	6.4	1.00
17 - 24	-	7	6.4	1.00
24 - 32	-	5	12.5	0.50
32 - 38	-	2	19	0.33
39	-	1	19	1.00
40 - 70	+	0	-	-

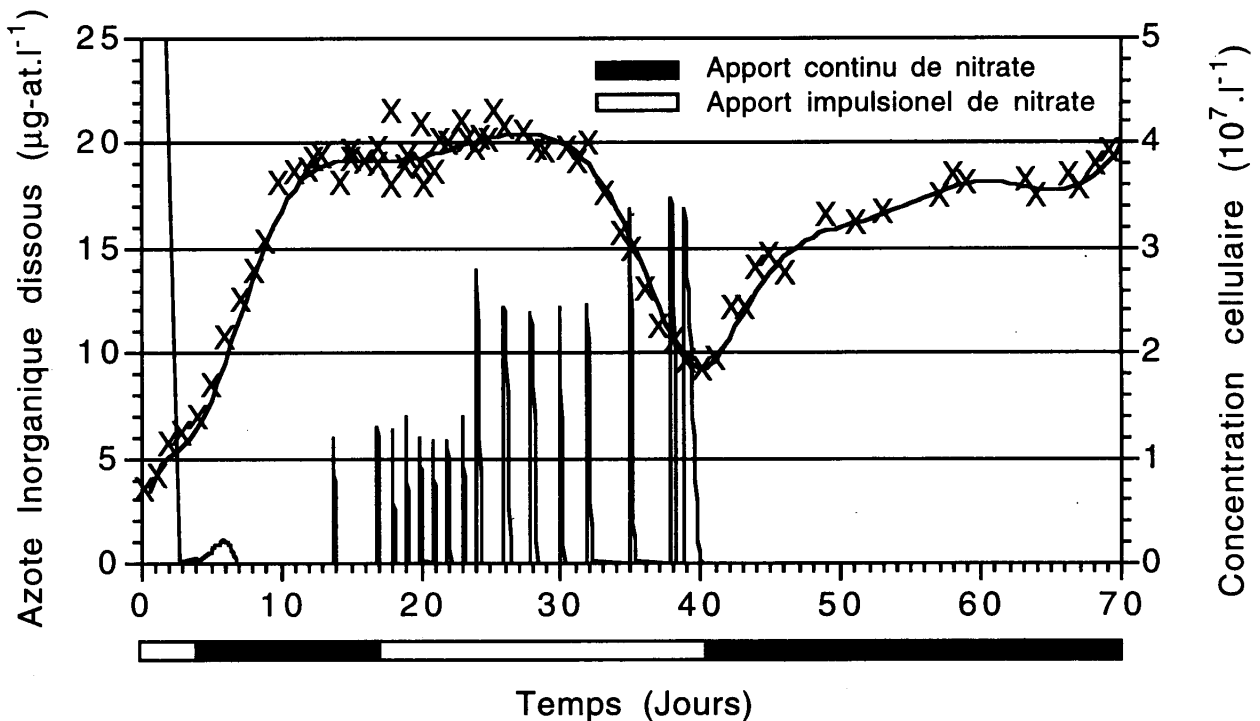


Figure 1. Evolution de *Procentrum minimum* (points et courbe ajustée) et de l'azote inorganique (ligne) dans le chémostat. Pendant la période d'apport impulsionnel de nitrate, le milieu de renouvellement continu est dépourvu de nitrate (sauf pour la première impulsion)

L'apport impulsionnel de nitrate n'affecte pas significativement le taux de croissance de *Procentrum minimum* jusqu'au 30^{ème} jour par rapport au taux de croissance stationnaire obtenu en régime d'apport continu. (Fig. 2). Pendant les 12 premiers jours du régime impulsionnel, la concentration cellulaire augmente légèrement, probablement parce que l'état stable n'était pas complètement atteint le

17^{ème} jour, ou suite à une légère baisse de débit de la pompe qui assure le renouvellement du milieu de culture.

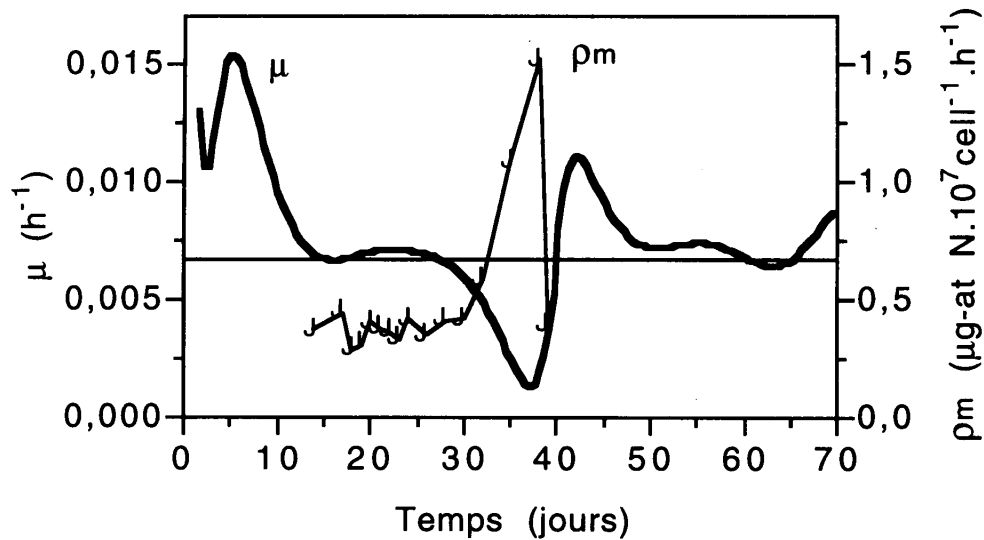


Figure 2. Taux de croissance (ligne continue) et taux maximum d'absorption (points) de *Prorocentrum minimum* mesurés au cours de chaque impulsion.

Inversement, le taux de croissance décroît rapidement jusqu'à de très faibles valeurs ($0,03 \text{ jour}^{-1}$) quand l'addition de nitrate est faite une fois tous les trois jours (du 23^{ème} au 38^{ème} jour). On remarque également que le taux de croissance retrouve rapidement des valeurs supérieures au taux de dilution lorsque la dernière impulsion avant le retour à un régime d'apport continu est effectuée seulement 1 jour après la précédente, au lieu de trois. On voit également sur la Fig. 1 que, lorsque le régime d'apport en continu est rétabli, la culture tend à retrouver son niveau initial, mais plus lentement.

On peut calculer que, durant la phase impulsionnelle, les cellules de *Prorocentrum minimum* ont absorbé la même masse d'azote qu'en régime continu, moins 4 %. Une différence si faible ne permet vraisemblablement pas d'expliquer en soit la chute du taux de croissance. Au cours de cette expérience, la réactivité de *P. minimum* à la limitation par l'azote dépend étroitement de la fréquence des impulsions. Dans les conditions expérimentales présentes, des périodes d'apport de 1 et 2 jours n'affectent pas la croissance de *P. minimum*, alors que les périodes de 3 jours sont limitantes.

La Fig. 3 illustre les variations temporelles de la concentration en azote inorganique et du taux d'absorption pour quelques impulsions. Il apparaît clairement sur l'ensemble des séries recueillies une augmentation de la non linéarité du processus d'absorption durant la période impulsionnelle. Le taux mesuré chez les

cellules à l'état stable le 17^{ème} jour atteint son maximum ($\rho=4.0 \cdot 10^{-8} \mu\text{gatN}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) immédiatement après l'impulsion.

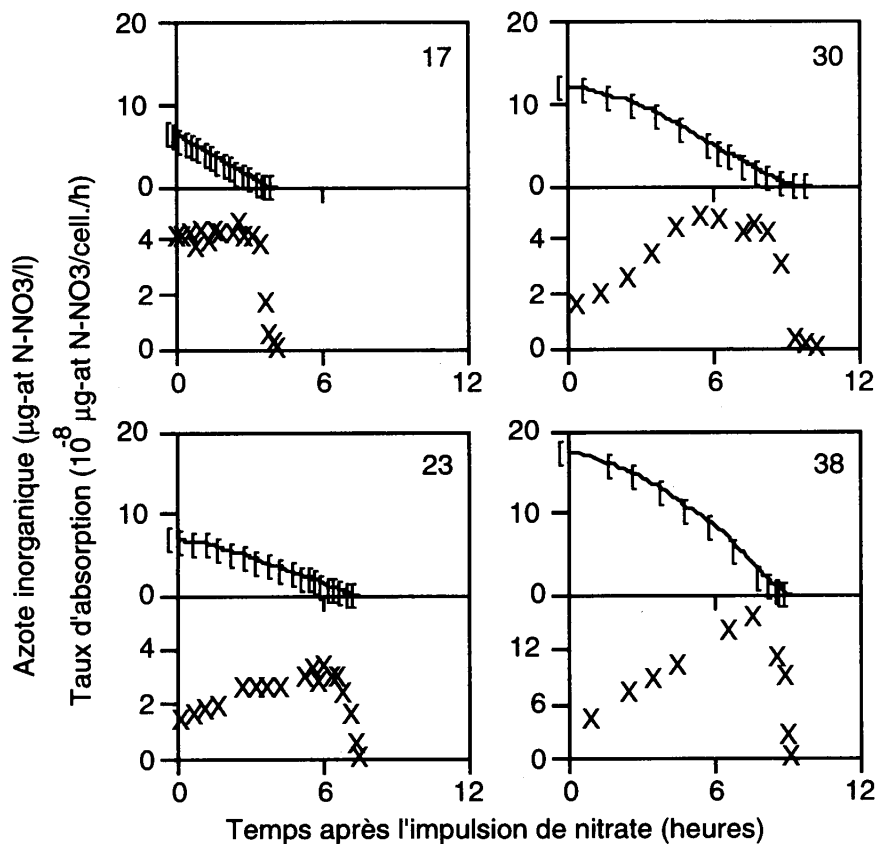


Figure 3. Evolution de l'azote inorganique dissous (B: nitrate et nitrite confondus), et de son taux d'absorption par les cellules (J) suite aux apports impulsions effectués les jours 17, 23, 30 et 28. Noter que les échelles diffèrent.

Les taux initiaux mesurés pour les impulsions suivantes sont plus faibles et décroissent au fil des impulsions. Quelques heures sont nécessaires pour qu'un taux relativement stabilisé soit atteint avant le contrôle externe dû à l'épuisement des nitrates. Ce mode est caractéristique des cellules limitées en azote (Eppley *et al.*, 1969; Caperon et Meyer, 1972; Collos, 1980; Romeo et Fisher, 1982). Les taux maximum atteints au cours de chaque impulsion sont représentés sur la Fig. 2. Par opposition avec la période précédant le 32^{ème} jour durant laquelle on n'observe pas de variation significative du taux d'absorption maximum, une augmentation marquée se produit ensuite, qui est concomitante avec la réduction du taux de croissance. On remarquera également que la première valeur du taux d'absorption qui excède significativement $5.0 \cdot 10^{-8} \mu\text{gat N}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ est obtenue à la fin de la période où les impulsions sont distribuées 1 fois tous les deux jours.

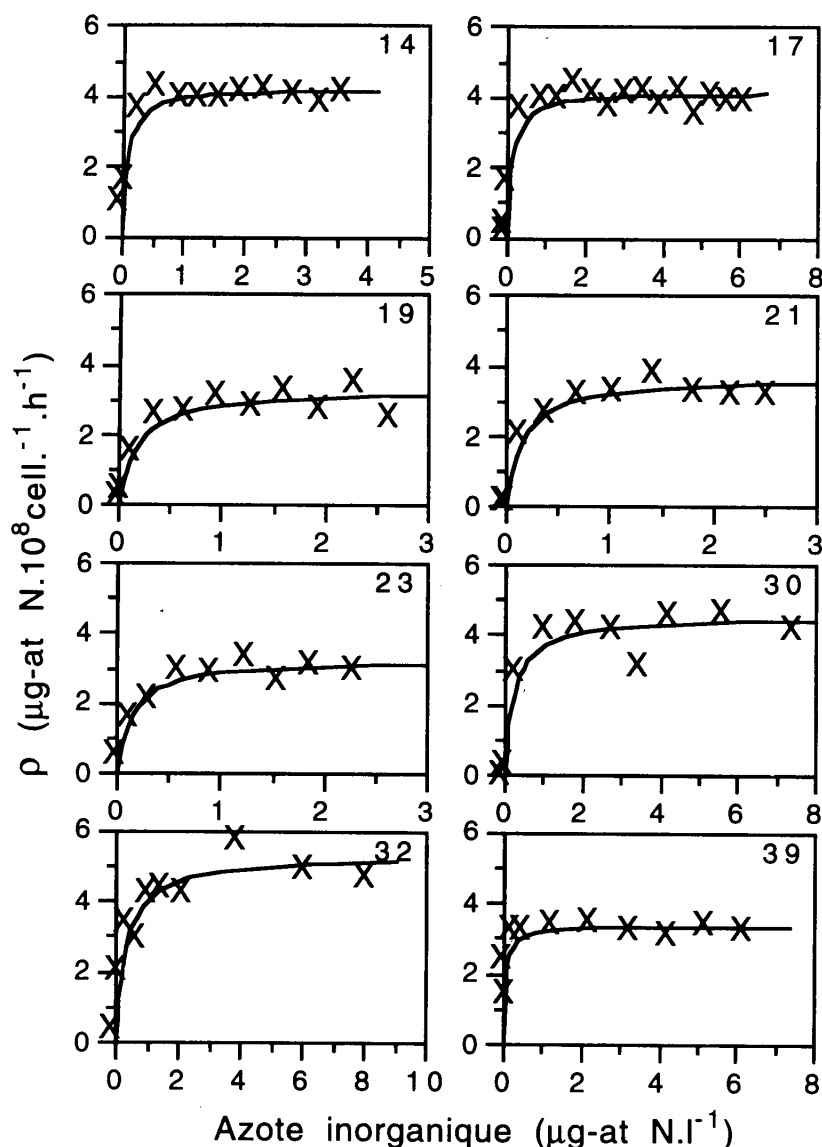


Figure 4. Cinétiques du taux d'absorption obtenues pour les impulsions où un taux maximum stabilisé a été mesuré avant le contrôle externe du à l'épuisement des nitrates par les cellules. Les nombres se réfèrent aux jours des impulsions.

La Fig. 4 montre les cinétiques d'absorption estimées qui ont été obtenues au cours des impulsions pour lesquelles un taux stationnaire a été atteint avant le contrôle externe du à l'épuisement des nitrates. En comparaison avec les valeurs de k_N communément obtenues pour les dinoflagellés, celles que nous mesurons pour *P. minimum* sont étonnamment basses. Ceci est expliqué par le fait que nos mesures d'azote inorganique concernent les nitrates et les nitrites sans distinction. La Fig. 5 montre l'excrétion de nitrite consécutive à une addition de $8 \mu\text{g-at N-NO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$ dans une culture de *P. minimum* limitée par les nitrates dans un chémostat identique et avec le même taux de dilution. Plus de 5 % de l'azote apporté est excrété à un taux moyen de $1.7 \cdot 10^{-9} \mu\text{g-at N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Pour les concentrations de nitrate

inférieures à $2 \mu\text{g-at N.l}^{-1}$, les nitrites sont à leur tour consommés. Il s'en suit que, si les nitrates ne sont pas mesurés séparément des nitrites, et si ces derniers sont présents en quantités non négligeables, le taux d'absorption mesuré pour les nitrates peut être sous-estimé quand les cellules excrètent des nitrites, et sur-estimé quand les cellules réabsorbent les nitrites en fin d'incubation. Cet artefact conduit à une sous-estimation du k_N (Collos, 1982).

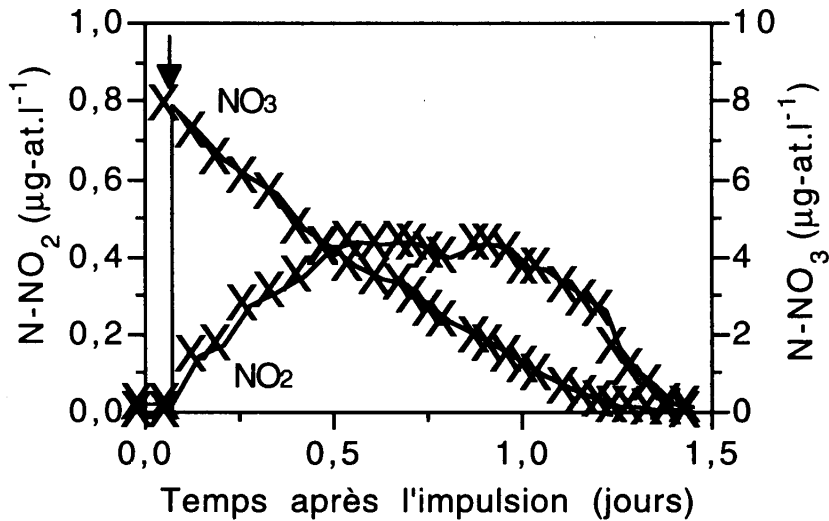


Figure 5. Variation des teneurs en nitrate et nitrite dans une culture en continu de *Prorocentrum minimum*, consécutive à une addition impulsionnelle de nitrate (↓)

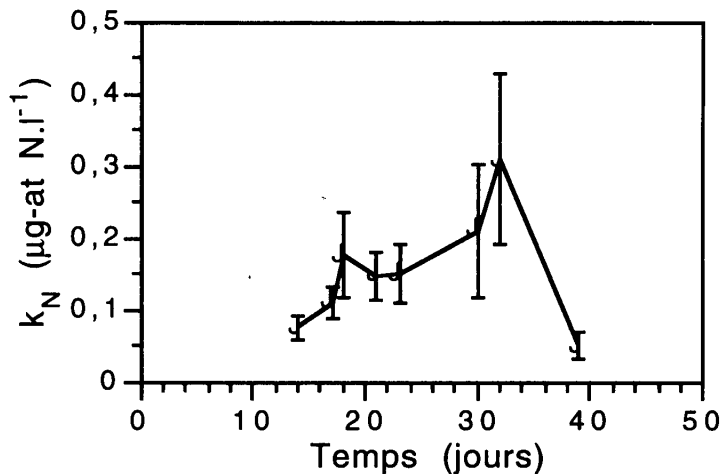


Figure 6. Variation du coefficient de demi-saturation des cinétiques présentées Figure 4. L'intervalle de confiance représente un écart-type.

Nous avons néanmoins reporté les valeurs de k_N sur la Fig. 6, ce qui permet d'avoir un indice de l'évolution de l'"affinité globale" des cellules pour l'azote

inorganique. Une augmentation notable du coefficient de demi-saturation se produit à partir du 32^{ème} jour, comme c'est également le cas pour le ρ_m . Cependant, il est impossible de stipuler si cette variation reflète une réelle modification de l'affinité des cellules, où une diminution de l'excrétion de nitrite avec le temps. Quoiqu'il en soit, cette variation pourrait traduire une modification du métabolisme azoté.

DISCUSSION

La discordance des résultats trouvés dans la littérature qui concernent les effets d'impulsions de nutriments sur la croissance et la consommation (Collos, 1986) trouve probablement son origine dans la diversité des états physiologiques des cellules au moment de l'impulsion (Raimbault et Mingazzini, 1987; Elrifi et Turpin, 1987). La plupart du temps, un stimulus unique est porté sur des cellules dont le degré de limitation n'est pas forcément bien défini (Collos, 1983; Dortch *et al.*, 1984). La distinction entre "limité" et "carencé" est un peu arbitraire, si l'on doit comprendre que, dans le premier cas, le quota interne n'est pas à son maximum théorique, et que dans le second, il est proche de son minimum. Mais le "quota interne" (au sens de Droop) est en réalité un index global qui représente la totalité de l'azote cellulaire, sans précision sur sa composition. En fait, suivant les conditions de limitation, de carence ou de réplétion, les divers éléments de structure, de synthèse et génétiques sont différemment affectés (Dortch, 1982), suivant des voies complexes et hiérarchiques (Falkowski *et al.*, 1989; Wheeler, 1983).

Au cours de cette étude, différentes adaptations physiologiques apparaissent chez *Prorocentrum minimum* suivant la fréquence des impulsions. Pour toutes les perturbations, exceptée la première, il apparaît une non-linéarité qui reflète une adaptation à moyen terme des cellules, qui suit l'impulsion. Durant la phase d'une addition par jour, et une partie de la période d'une addition tous les deux jours, un taux d'absorption maximum relativement stabilisé a été obtenu au cours de chaque impulsion, et qui était sensiblement le même que celui obtenu à l'état stable en régime continu. On peut donc supposer qu'à chacune de ces impulsions, les cellules ont eu le temps de retrouver leur équilibre initial.

Par opposition à cette période où il n'apparaît aucune variation significative ni du taux de croissance, ni du taux d'absorption, une adaptation à plus long terme apparaît lorsque les cellules reçoivent des nitrates seulement 1 fois tous les trois jours. Cette adaptation est caractérisée par une augmentation du taux maximum d'absorption au fil des impulsions. Durant le régime de périodicité impulsionnelle de 2 jours, le taux d'absorption maximum ne commence à augmenter significativement qu'au bout de la 5^{ème} impulsion, ce qui suggère que l'effet de ce régime sur la consommation de sel est retardé. Par la suite, le taux maximum d'absorption mesuré

dépasse le taux obtenu à l'état stationnaire d'un facteur 3 à 4. Il apparaît d'après la Fig. 2 que la croissance commence à être sérieusement ralentie lorsque l'adaptation à long-terme devient plus visible.

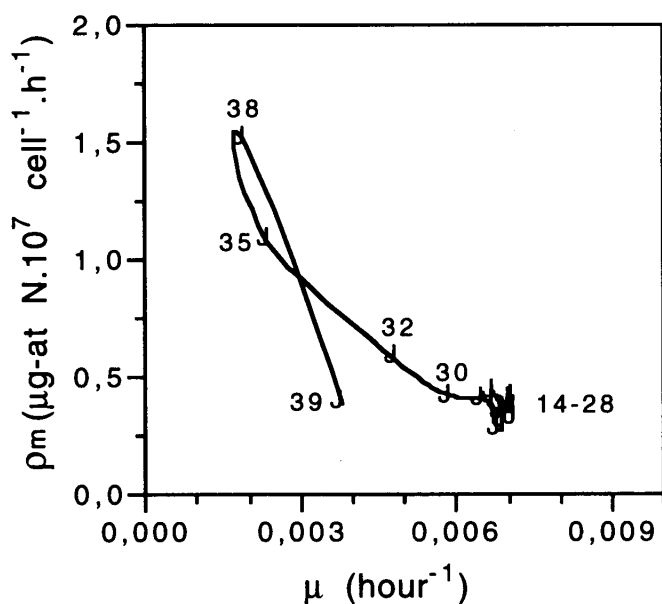


Figure 7. Plan de phase de la croissance et du taux d'absorption maximum. Les deux processus deviennent largement découplés pour la période où les nitrates sont ajoutés seulement 1 fois tous les trois jours. Les nombres indiquent les jours d'impulsions.

Croissance et absorption sont très fortement découplées chez *Prorocentrum minimum* (Fig. 7). Bien que les cellules aient quasiment consommé la même quantité d'azote durant toute l'expérience, sa conversion en croissance dépend de la fréquence des apports de nitrate. La fréquence de 1 jour⁻¹ induit une non-linéarité dans le processus d'absorption qui traduit une adaptation à moyen terme suffisante pour permettre aux cellules de garder un taux de croissance stable. Pour des fréquences plus faibles et des amplitudes plus importantes, la non linéarité, qui est accrue, reflète une adaptation plus importante, mais cependant insuffisante pour préserver le taux de croissance. En se référant aux travaux de Dortch (1982), on peut suspecter que, durant la période d'apport journalier, seules les formes les plus labiles de l'azote intracellulaire comme les nitrates et les acides aminés sont mobilisées, alors que pour des intervalles d'addition plus importants, des éléments plus structuraux ou fonctionnels comme les protéines sont utilisés pour satisfaire la demande énergétique des cellules. Pour compenser cette perte de matériel, les cellules augmentent leur consommation de nitrate quand celui-ci est à nouveau disponible, suivant une cinétique qui dépend du degré de limitation. Comme l'assimilation de l'azote nouvellement incorporé nécessite une dépense énergétique et enzymatique, un temps d'induction est nécessaire avant que la consommation atteigne

un régime maximum.

La division cellulaire commence à s'accélérer environ un jour après la fin de la période impulsionnelle (39^{ème} jour) qui s'arrête lorsque l'apport de nitrate en continu est réinstallé. Un tel laps de temps et le fait que des périodicités d'apports impulsionnels de 1 et 2 jours n'affectent pas le taux de croissance de *Prorocentrum minimum*, suggèrent que cette espèce est apte à accumuler d'importantes réserves nutritives. Ce type de réponse présente un avantage écologique dans les situations où la fréquence de disponibilité en nitrate est inférieure au taux de division cellulaire (Collos, 1986).

Parallèlement aux multiples modes d'adaptation que *Prorocentrum minimum* peut développer face à différentes formes et intensités du spectre de la lumière (Vogel et Sager, 1985; Harding, 1988; Coats, 1988), Paasche *et al.* (1984) ont démontré l'aptitude chez cette espèce de maintenir des taux d'absorption quasiment inchangés d'ammoniaque ou de nitrate pendant la phase nocturne d'un cycle lumineux diurne de 12h:12h. Cette faculté peut permettre de découpler dans le temps la photosynthèse (proche de la surface durant le jour) et la consommation de nitrate (en profondeur, durant la nuit), et pourrait rendre cette espèce compétitive par rapport à d'autres espèces comme les diatomées (Eppley et Harrison, 1975; Harrison, 1976). Tyler et Seliger (1981) rapportent que, au moment où les nitrilites deviennent rares dans les eaux stratifiées de la baie de Chesapeake à la fin de l'été, des efflorescences de *P. minimum* persistent néanmoins avec une consommation de carbone élevée. Des observations préliminaires dans la même zone ont par ailleurs démontré que cette espèce est capable d'effectuer une migration nocturne vers les couches plus riches en nitrilites. Cette aptitude peut effectivement constituer un avantage, seulement si *P. minimum* est à même de supporter plusieurs heures de privation par jour dans les couches supérieures. Notre déduction expérimentale selon laquelle *P. minimum* peut maintenir un taux de croissance constant dans un milieu où l'élément qui limite sa croissance fluctue avec une périodicité de 1 jour, conforte l'hypothèse selon laquelle cette espèce peut effectivement développer un comportement migratoire qui contribue significativement à réduire les effets de la limitation par les nitrilites.

CONCLUSION

Cette étude expérimentale illustre comment certains processus considérés *a priori* comme pouvant être représentés par des cinétiques simples s'avèrent en réalité complexes lorsqu'ils sont étudiés au sein d'un environnement variable. La diversité des conditions expérimentales a permis de révéler la diversité des cinétiques d'absorption chez *Prorocentrum minimum*, traduisant divers modes

d'adaptation face aux variations externes de nitrate. Au delà de l'aspect purement expérimental, se pose le problème de la formalisation des lois observées. Il apparaît clairement que la non-linéarité des processus, ainsi que le découplage entre absorption, assimilation et croissance ne pourraient être correctement restitués par un modèle qu'à la condition que ce dernier intègre les processus de stockage, les phénomènes d'induction enzymatiques, autrement-dit les mécanismes internes de la cellule qui sont régis par des réactions biochimiques. Il va de soi que la réalisation d'un tel modèle est chose ardue à cause de l'effort expérimental nécessaire pour la calibration, et qu'elle n'est donc pas souhaitable pour qui veut se contenter d'une formalisation qui restituerait globalement les phénomènes sans les représenter explicitement. On peut en effet oublier un instant la physiologie de l'espèce que l'on considère alors comme une boîte noire dont les mécanismes et la structure interne se manifestent uniquement par les relations que l'on peut expérimentalement établir entre une fonction d'entrée (fréquence et amplitude des impulsions de nitrate par exemple) et une ou plusieurs sorties (taux de croissance et d'absorption des cellules). En multipliant les expériences avec différents mode d'entrée, on peut obtenir différentes sorties cohérentes les unes par rapport aux autres parce que résultant de lois physiologiques qui restent néanmoins transparentes pour l'expérimentateur. L'idée est donc d'exercer un contrôle sur les cellules avec des forçages qui prennent des valeurs discontinues dans la gamme de ce que peut tolérer l'espèce. En connaissance des entrées et des sorties, on doit chercher à établir une représentation du processus étudié pour une fonction d'entrée continue, à l'aide d'un formalisme qu'il reste à définir en cherchant à le simplifier au maximum.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Burmester, D.E. (1979). The continuous culture of phytoplankton: mathematical equivalence among three steady-state models. *Am. Nat.* 113: 123-134.
- Caperon, J., Meyer, J. (1972). Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton. I. Changes in population characteristics with steady-state growth rate. *Deep-Sea Res.* 19: 601-618.
- Coats, D.W., Harding, L.W. (1988). Effect of light history on the ultrastructure and physiology of *Prorocentrum mariae-lebouriae* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 24: 67-77.
- Collos, Y. (1980). Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. I. Changes in uptake parameters during nitrogen starvation. *Limnol. Oceanogr.* 25: 1075-1081.
- Collos, Y. (1982). Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. II. Changes in nitrate and nitrite following a nitrate perturbation. *Limnol. Oceanogr.* 27: 528-535.
- Collos, Y. (1983). Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 4. Non-linear phenomena and the estimation of the maximum uptake rate. *J. plankton Res.* 5: 677-691.
- Collos, Y. (1986). Time-lag algal growth dynamics: biological constraints on primary production in aquatic environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33: 193-206.
- Conway, H.L., Harrison, P.J., Davis, O. (1976). Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. II. Transient response of *Skeletonema costatum* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.* 35: 187-199.
- Cunningham, A. (1984). The impulse response of *Chlamydomonas reinhardtii* in nitrite-

- limited chemostat culture. *Biotechnol. Bioengin.* 26: 1430-1435.
- Cunningham, A., Maas, P. (1978). Time lag and nutrient storage effects in the transient growth response of *Chlamydomonas reinhardtii* in nitrogen-limited batch and continuous culture. *J. General Microbiol.* 104: 227-231.
- DeManche, J.M., Curl, H.C., Lundy, D.W., Donaghay, P.L. (1979). The rapid response of the marine diatom *Skeletonema costatum* to changes in external and internal nutrient concentration. *Mar. Biol.* 53: 323-333.
- Denmann, K.L., Gargett, A.E. (1983). Time and space scales of vertical mixing and advection of phytoplankton in the upper ocean. *Limnol. Oceanogr.* 28: 801-815.
- Dortch, Q. (1982). Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 243-264.
- Dortch, Q., Clayton, J.R., Thoresen, S.S., Ahmed, S.I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.* 81: 237-250.
- 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.* 48: 689-733.
- Dugdale, R.C. (1967). Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance. *Limnol. Oceanogr.* 12: 685-695.
- Elrifi, I.R., Turpin, D.H. (1987). Short-term physiological indicators of N deficiency in phytoplankton: a unifying model. *Mar. Biol.* 96: 425-432.
- Eppley, R.W., Harrison, W.G. (1975). Physiological ecology of *Gonyaulax polyedra*, a red water dinoflagellate of southern California. In: LoCicero, V.R. (ed.) *Toxic dinoflagellate blooms*, Vol. Proc. Intl. Conf. (1st) Mass. Sci. Technol. Fndn., Wakefield, 12-22
- Eppley, R.W., Rogers, J.N., McCarthy, J.J. (1969). Half-saturation 'constants' for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 14: 912-920.
- Falkowski, P.G., Sukenik, A., Herzig, R. (1989). Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *J. Phycol.* 25: 471-478.
- Goldman, J.C., McCarthy, J.J. (1978). Steady state growth and ammonium uptake of a fast-growing marine diatom. *Limnol. Oceanogr.* 23: 695-703.
- Goldman, J.C., Taylor, C.D., Glibert, P. (1981). Nonlinear time-course uptake of carbon and ammonium by marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 137-148.
- Harding, W.H. (1988). The time course of photoadaptation to low-light in *Prorocentrum mariae-lebouriae* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 24: 274-281.
- Harris, G.P. (1984). Phytoplankton productivity and growth measurements: past, present and future. *J. Plankton Res.* 6: 219-237.
- Harris, G.P. (1986). *Phytoplankton ecology. Structure, function and fluctuation.* London, New York,
- Harrison, P.J., Parslow, J.S., Conway, H.L. (1989). Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 52: 301-312.
- Harrison, W.G. (1976). Nitrate metabolism of the red tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 21: 199-209.
- Klein, P., Coste, B. (1984). Effects of wind-stress variability on nutrient transport into the mixed layer. *Deep-Sea Res.* 31: 21-37.
- Malara, G., Sciandra, A. (1991). A multiparameter phytoplanktonic culture system driven by microcomputer. *J. Applied Phycol.* in press:
- Marra, J., Bidigare, R.R., Dickey, T.D. (1990). Nutrients and mixing, chlorophyll and phytoplankton growth. *Deep-Sea Res.* 1: 127-143.
- McCarthy, J.J. (1981). The kinetics of nutrient utilization. In: Platt, T. (ed.) *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, Vol. 210. 211-233
- McCarthy, J.J., Altabet, M.A. (1984). Patchiness in nutrient supply: implication for phytoplankton ecology. In: Meyers, D.G., Strickler, J.R. (ed.) *Trophic interactions within aquatic ecosystems*, Vol. 85. AAAS Selected Symposium, 29-45
- Morel, F.M.M. (1987). Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *J. Phycol.* 23: 137-150.
- Murphy, T.P. (1980). Ammonia and nitrate uptake in the lower Great Lakes. *Can. J. Fish. Aq. Sci.* 37: 1365-1372.

- Olsen, Y., Vadstein, O., Andersen, T., Arne, J. (1989). Competition between *Staurastrum luetkemuellerei* (Chlorophyceae) and *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) under varying modes of phosphate supply. *J. Phycol.* 25: 499-508.
- Paasche, E., Bryceson, I., Tangen, K. (1984). Interspecific variation in dark nitrogen uptake by Dinoflagellates. *J. Phycol.* 20: 394-401.
- Quarmby, L.M., Turpin, D.H., Harrison, P.J. (1982). Physiological responses of two marine diatoms to pulsed additions of ammonium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 63: 173-181.
- Raimbault, P., Mingazzini, M. (1987). Diurnal variations of intracellular nitrate storage by marine diatoms: effects of nutritional state. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 112: 217-232.
- Romeo, A.J., Fisher, N.S. (1982). Intraspecific comparisons of nitrate uptake in three marine diatoms. *J. Phycol.* 18: 220-225.
- Sciandra, A. (1991). Coupling and uncoupling between nitrate uptake and growth rate in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) under different frequencies of pulsed nitrate supply. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72: 261-269.
- Sommer, U. (1985). Comparison between steady and non-steady state competition: experiments with natural phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 30: 335-346.
- Suttle, C.A., Stockner, J.G., Harrison, P.J. (1987). Effects of nutrient pulses on community structure and cell size of a freshwater phytoplankton assemblage in culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1768-1774.
- Turpin, D.H., Parslow, J.S., Harrison, P.J. (1981). On the limiting nutrient patchiness and phytoplankton growth: a conceptual approach. *J. plankton Res.* 3: 421-431.
- Tyler, M.A., Seliger, H.H. (1978). Annual subsurface transport of a red tide dinoflagellate to its bloom area: water circulation patterns and organism distributions in the Chesapeake Bay. *Limnol. Oceanogr.* 23: 227-237.
- Tyler, M.A., Seliger, H.H. (1981). Selection for a red tide organism: physiological responses to the physical environment. *Limnol. Oceanogr.* 26: 310-324.
- Vogel, H., Sager, J.C. (1985). Photosynthetic response of *Prorocentrum mariae-lebouriae* (Dinophyceae) to different spectral qualities, irradiances, and temperatures. *Hydrobiologia.* 128: 143-153.
- Wheeler, P.A. (1983). Phytoplankton nitrogen metabolism. In: Carpenter, E.J., Capone, D.G. (ed.) *Nitrogen in the marine environment*, Vol. 9. Academic Press, Inc., New York, 309-346.
- Woods, J.D., Wiley, R.L. (1972). Billow turbulence and ocean microstructure. *Deep-Sea Res.* 19: 87-121.