

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'une méthode de mesure de l'assimilation du phosphore par le plancton de la Meuse

Ducobu, Hélène

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 50000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Télex 59222 facnam-b - telefax 081/23.03.91

Mise au point d'une méthode de mesure de l'assimilation du phosphore par le plancton de la Meuse

DUCOBU Hélène

Abstract

Our aim is to elaborate a method allowing the measurement of the assimilation of P, in eutrophic conditions, by the phyto- and the bacterio-planktons. The amount of P assimilated is determined by means of ^{32}P as a tracer. A post-fractionation gives three classes of phytoplankton : $> 10 \mu\text{m}$, 2-10 μm and 0.2-2 μm and their relative contribution to the total P. assimilation was estimated.

The first result corresponding to the period lasting from may to july 1989, give mean values of assimilation of 2 $\mu\text{g P/L/hours}$. Higher speedes (17 $\mu\text{g P/L/hours}$) have been observed in the case of more important biomasses. The mean K_m values measured are 30 $\mu\text{g P/L}$.

The relative contribution of the diffrents fractions referring to 3 collections of samples, whatever the biomasse (31, 36 and 104 $\mu\text{g Chl a/L}$) are of 20% for the 10 μm class, 30% for the 2-10 μm class and 50% for the 0.2-2 μm class.

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques

Septembre 1989

Promoteur : J.-C. MICHA

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTES DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Mise au point d'une méthode de mesure de l'assimilation de phosphore par le plancton de la Meuse

DUCOBU Hélène

Résumé

L'objectif de ce travail est la mise au point d'une méthode de mesure de l'assimilation du phosphore (P), par le phytoplancton et le bactérioplancton en milieu eutrophe. La technique appliquée consiste à mesurer l'assimilation, via l'incorporation d'un traceur radioactif (le ^{32}P). Un post-fractionnement permet de séparer le plancton par classes de taille ($> 10 \mu\text{m}$; 2-10 μm et 0.2-2 μm) et d'estimer la contribution de chacune à l'assimilation totale du P. Les premiers résultats obtenus durant la période d'étude (mai-juillet 89) indiquent des valeurs de vitesse d'assimilation généralement situées aux environs de 2 $\mu\text{g P/L/heure}$. Des vitesses plus élevées (17 $\mu\text{g P/L/heure}$) ont été observées pour de fortes biomasses. Les valeurs de Km déterminées sont de l'ordre de 30 $\mu\text{g P/L}$. La contribution relative des différentes fractions observées par post-fractionnement (durant trois campagnes) est, quelle que soit la biomasse (31, 36 et 104 $\mu\text{g Chl a/L}$) égale à 20% pour la fraction $> 10 \mu\text{m}$; 30% pour la fraction 2-10 μm et 50% pour la fraction 0.2-2 μm .

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques
Septembre 1989
Promoteur : J.-C. Micha.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Jean-Pierre Descy qui m'a proposé ce sujet, m'a aidée et judicieusement conseillée durant cette année de travail ainsi que le Professeur Jean-Claude Micha qui a mis à ma disposition le laboratoire d'Ecologie.

Je remercie le Professeur Alain Dauta pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir initiée à la technique du 32P.

Je tiens également à remercier le Professeur Pierre Devos pour m'avoir donné la possibilité de terminer mes expériences dans son laboratoire, les Professeurs Claude Gillet et Pierre Van Cutsem pour m'avoir conseillé dans l'interprétation de certains résultats.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Madeleine Meurice qui m'a enseigné les techniques de cultures d'algues unispécifiques et m'a fourni les cultures dont je me suis servie.

Mes remerciements s'adressent aussi aux nombreuses personnes des différents laboratoires au sein des Facultés qui m'ont accueillie et fait profiter de leur expérience : les laboratoires de Biologie Quantitative, de Physiologie Végétale, de Biologie Animale, de Biochimie Cellulaire et de Chimie.

La finition de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide sympathique et très efficace de Mademoiselle Suzanne Loret à qui j'exprime toute mon amitié.

Enfin, j'adresse une profonde reconnaissance à mon père, mon frère, mes grands-parents et mes amis, Olivier, Philippe, Franck, Véronique et Carine pour m'avoir soutenue et aidée durant cette année de travail.

SOMMAIRE

RESUME - ABSTRACT	1
REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	3
INTRODUCTION	8
Première partie :	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. ROLE DU PHOSPHORE DANS LA CROISSANCE DU PHYTOPLANCTON	9
I.1. GENERALITES	9
I.2. MODELISATION DE LA RELATION ENTRE LA CROISSANCE ET LES CONCENTRATIONS EN SUBSTANCES NUTRITIVES	11
I.2.1. Modèle de Monod	11
I.2.2. Modèle de Droop	12
II. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE	13
II.1. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES	13
II.1.1. Caractérisation de la diffusion simple et du transport médiat (diffusion facilitée et transport actif)	14
1. Diffusion simple	14
2. Transport médiat	15
a) Diffusion facilitée	15
b) Transport actif	15
II.1.2. Critères physiologiques utilisés pour déterminer le caractère actif d'un transport d'ion	16
II.1.3. Présentation d'un processus permettant d'énergiser le transport des ions phosphates : force motrice du proton	19
1. Définition de la force motrice du proton	20
2. Exemples de cotransport $H_2PO_4^-/H^+$	20
II.1.4. Compétition entre photosynthèse et assimila- tion : répression photosynthétique	21

II.2. ASPECTS BIOCHIMIQUES	22
II.2.1. Influence de la concentration en substrat : équation de Michaelis-Menten	22
II.2.2. Influence du nombre de sites transporteurs	25
II.2.3. Influence des stocks intracellulaires	26
II.2.4. Contrôle de l'assimilation : mécanismes d'inhibition	27
1. Inhibition compétitive	27
2. Inhibition non compétitive	28
II.2.5. Déviations à l'équation de Michaelis- Menten	29
II.3. FACTEURS ABIOTIQUES ET BIOTIQUES INFLUENCANT LES PARAMETRES CINETIQUES	30
II.3.1. Facteurs abiotiques	30
1. Température	30
2. Composition ionique du milieu	31
3. Lumière	32
4. pH	32
II.3.2. Facteurs biotiques	33
1. Stocks intracellulaires	33
2. Taille cellulaire	33
3. Variations interspécifiques	35
4. Variations clonales	35
5. Variations au cours du cycle cellulaire	35
6. Variations enzymatiques	36
II.4. COMPETITION POUR LES RESSOURCES	37
II.4.1. Espèce à stratégie r	37
II.4.2. Espèce à stratégie K	37
II.4.3. Modélisation de la compétition	38
II.4.4. Compétition algues-bactéries	39

Deuxième partie :

MATERIEL ET METHODES

I. AVANT-PROPOS	40
II. ETUDE DE L'ASSIMILATION EN CULTURE ET EN MILIEU NATUREL : APERCU GENERAL	40
III. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P SUR DES CULTURES DE <u>CHLORELLA</u>	42
III.1. TECHNIQUES DE CULTURES D'ALGUES MONOSPECIFIQUES	42
III.2. PRECONDITIONNEMENT DES ALGUES	43
III.3. SUIVI QUOTIDIEN DE LA CULTURE	43
III.3.1. Mesure de la biomasse	43
1. Comptages cellulaires	43
2. Densité optique	44
3. Chlorophylle a	44
a) Principe	44
b) Procédure et expression des résultats	45
III.3.2. Dosage du P soluble	46
III.4. MESURES CINETIQUES	46
III.4.1. Méthode chimique	46
III.4.2. Méthode radiologique	47
III.4.3. Utilisation de la méthode radiologique pour la détermination de K_m et V_m de <u>Chlorella</u>	49
1. Préparation des réactifs	49
a) ^{32}P	49
b) solutions de ^{31}P	49
2. Mesures cinétiques	50
a) Matériel	50
b) Assimilation en fonction du temps	50
c) Assimilation en fonction de la concentration	52

IV. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P EN MILIEU NATUREL	53
IV.1. AVANT-PROPOS	53
IV.2. MESURE DE L'ABSORPTION NON SPECIFIQUE	53
IV.2.1. Utilisation du formol	54
IV.2.2. Utilisation du cyanure (KCN)	54
IV.3. MESURE DE L'ASSIMILATION	55
IV.3.1. Cadre d'étude	55
IV.3.2. Travail sur le terrain	55
1. Prélèvement des échantillons	55
2. Mesure de la température	55
3. Mesure du pH	55
4. Mesure de la conductivité	55
IV.3.3. Travail en laboratoire	56
1. Mesure de la chlorophylle a	56
2. Comptages cellulaires	56
3. Fractionnement	56
a. Pré-fractionnement	56
b. Post-fractionnement	57
4. Mise en culture du plancton	57
IV.4. MESURES CINETIQUES	58
IV.4.1. Choix des concentrations	58
IV.4.2. Matériel	58
IV.4.3. Cinétique en fonction du temps	59
IV.4.4. Cinétique en fonction de la concentration	60
1. Expérience réalisée sur une seule fraction	60
2. Expérience réalisée sur plusieurs fractions	60

Troisième partie :

RESULTATS ET DISCUSSION

I. MESURE DE L'ABSORPTION NON SPECIFIQUE	62
I.1. BLANCS SANS LA FRACTION PARTICULAIRE	62
I.2. BLANCS AVEC LA FRACTION PARTICULAIRE	63
I.2.1. Echantillon tué au formol	63
I.2.2. Echantillon tué à la chaleur	65
I.2.3. Echantillon tué au KCN	65
I.3. CONCLUSION	66
II. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P SUR DES CULTURES DE <u>CHLORELLA</u>	67
II.1. ASSIMILATION PAR UNE CULTURE DE <u>CHLORELLA</u> CARENCEE-RESULTATS OBTENUS LORS DU STAGE	67
II.2. ESSAIS DE MESURE SUR DES CULTURES REALISES AU LABORATOIRE D'ÉCOLOGIE F.N.D.P.	68
III. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P EN MILIEU NATUREL	70
III.1. VITESSE D'ASSIMILATION DU P PAR LE PLANCTON DE LA MEUSE AUX CONCENTRATIONS IN SITU	70
III.1.1. Mesures sur le plancton total	70
III.1.2. Mesures sur un échantillon pré-fractionné	70
III.1.3. Contribution de différentes fractions du plancton à l'assimilation (post-fractionnement)	71
III.2. ETUDE DE LA RELATION VITESSE-SUBSTRAT	72
III.2.1. Assimilation par le plancton total	72
III.2.2. Assimilation par une fraction isolée par pré-fractionnement et mise en culture	73
III.2.3. Assimilation par la fraction 10 m isolée par post-fractionnement	73
III.2.4. Assimilation par les fractions 10 m et 2-10 m isolées par post-fractionnement	74
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	75
BIBLIOGRAPHIE	80

INTRODUCTION

L'assimilation du phosphore par les algues a déjà fait l'objet de nombreuses études sur des cultures généralement monospécifiques, dans des conditions expérimentales bien définies et contrôlables (lumière et température constantes et milieu synthétique dans lequel les autres nutriments sont apportés en excès).

Peu de données sont disponibles sur l'assimilation du phosphore par des échantillons en milieu naturel et plus particulièrement en milieu eutrophe. La difficulté essentielle rencontrée dans ce genre d'étude réside dans le caractère hétérogène des échantillons et dans le manque d'informations relatives à l'état nutritionnel du plancton. En milieu eutrophe, le problème se complique davantage. Les algues ne sont vraisemblablement pas carencées au moment de l'expérience; elles assimilent par conséquent peu de phosphore, ce qui risque de compromettre la précision des mesures. De plus, la vitesse d'assimilation est peut-être déjà saturée aux concentrations in situ et une détermination précise de la vitesse dans la gamme des faibles concentrations impliquera un appauvrissement préalable du milieu par la mise en culture de l'échantillon.

L'objectif de notre travail est la mise au point d'une technique permettant d'étudier l'assimilation du phosphore en milieu eutrophe ce qui permettrait, dans une phase ultérieure, de combler le manque de données relatives à ce sujet. Pratiquement, nous tenterons de déterminer des paramètres cinétiques (K_m et V_m) du plancton de la Meuse en utilisant le ^{32}P comme traceur de l'assimilation selon la méthode employée par Alain Dauta (Laboratoire d'Hydrobiologie Université Toulouse) pour les cultures. Afin de limiter la complexité des échantillons et de mieux caractériser ainsi les paramètres K_m et V_m , nous séparerons le plancton en classes de taille par pré-fractionnement ou post-fractionnement.

Enfin, nous essaierons de voir quelle est, dans un milieu lotique eutrophe, la contribution bactérienne à l'assimilation totale du phosphore afin de mieux comprendre la dynamique du phosphore au sein de la fraction particulaire. Des observations recueillies par plusieurs auteurs en milieu lacustre oligo-mésotrophe et eutrophe (CURRIE et KALFF, 1984; VADSTEIN et al., 1988) semblent indiquer que les bactéries consomment des quantités importantes de phosphore inorganique et entrent par conséquent en compétition avec les algues pour cette ressource.

PREMIERE PARTIE :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

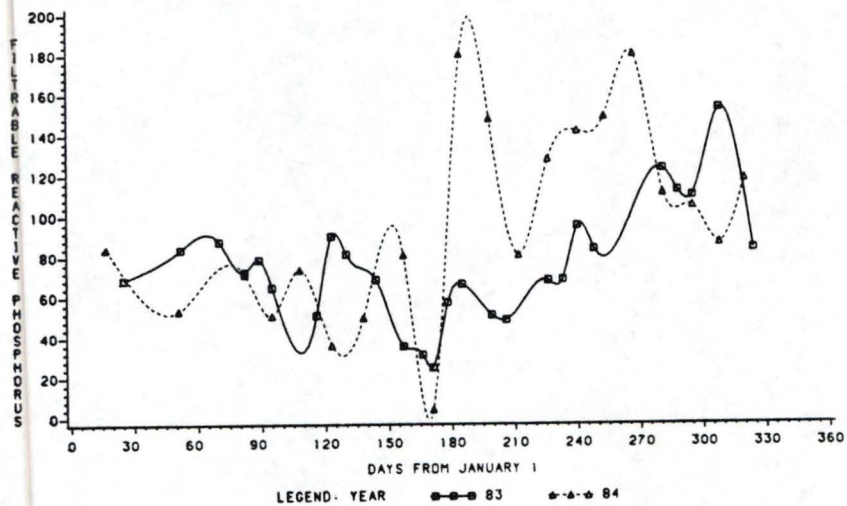


Fig.1.1. Variation de la concentration en P soluble (mg.m-3) en Meuse durant les années 1983 et 1984 (DESCY, 1987)

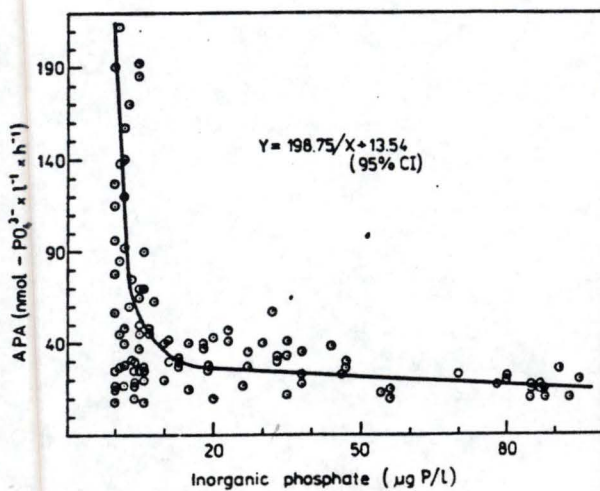


Fig.1.2. Relation entre l'activité totale de la phosphatase alcaline (APA) et de la concentration en P inorganique dans la zone photique du lac eutrophe Mikolajskie (SIUDA et CHROST, 1987).

I. ROLE DU PHOSPHORE DANS LA CROISSANCE DU PHYTOPLANCTON

(D'après NALEWAJKO et LEAN,1980; POURRIOT et al.,1982;
DAUTA,1983; WETZEL,1983)

I.1. Généralités

Comme la température, la lumière, la sédimentation, le grazing (1), les nutriments (on regroupe sous ce terme générique l'azote, la silice et le phosphore) influencent la croissance du phytoplancton.

Selon la "Loi du minimum" énoncée par LIEBIG (1840), la croissance des végétaux est limitée par l'élément dont la concentration est inférieure à une valeur minimale en dessous de laquelle les synthèses ne peuvent plus se faire.

En eau douce, la croissance du phytoplancton est souvent limitée par le phosphore(P). Parmi les différentes formes de P rencontrées en milieu aquatique (divers esters, P colloïdal, complexes métalliques), seuls les ions phosphates sont directement assimilables par le phytoplancton. Comme ceux-ci représentent un faible pourcentage du P total, ils peuvent, lors de développements phytoplanctoniques importants atteindre des concentrations critiques (Fig.1.1.).

Lorsqu'ils deviennent limitants, les algues produisent une enzyme aux propriétés hydrolytiques, la phosphatase alcaline (Fig. 1.2.), leur permettant d'exploiter d'autres sources de P (principalement les esters). Si la demande en P est forte (biomasse importante), ces autres sources s'épuisent rapidement et les algues ne peuvent plus trouver dans leur environnement suffisamment de P pour se multiplier.

La croissance du phytoplancton n'est pas uniquement dépendante du P disponible dans le milieu. Ainsi, les algues sont capables de se multiplier bien qu'il n'y ait plus de trace de P dans leur environnement. Cette observation, apparemment en contradiction avec la loi du minimum développée ci-dessus est liée à la consommation de luxe.

(1) Grazing : prédation, broutage par le zooplancton.

Ce phénomène connu depuis longtemps s'observe également pour les autres nutriments (KETCHUM et REDFIELD, 1939). Après une carence en P, les algues comme les plantes supérieures, prélèvent dans le milieu un excès de P par rapport aux besoins de leur croissance. Ces excédents sont stockés dans un compartiment intracellulaire sous forme de polyphosphates. Dès que le P devient limitant, les algues consomment leurs stocks pour engendrer de nouvelles cellules (DROOP, 1973).

Cette consommation de luxe constitue une entrave dans le contrôle de l'eutrophisation (1) car les effets d'un rejet massif de phosphore peuvent être différés dans le temps et dans l'espace (production d'un bloom phytoplanctonique loin en aval du point de rejet).

Les stocks intracellulaires ne sont cependant pas inépuisables et ne permettent une croissance soutenue que pendant un temps limité. Au fur et à mesure que les algues se multiplient, il y a une dilution des réserves de P et donc une réduction du taux de croissance. Dès que les réserves atteignent une valeur minimale notée Q_0 (niveau de subsistance ou quantité de P nécessaire au maintien du métabolisme de base), le taux de croissance s'annule.

- (1) Eutrophisation : enrichissement des eaux de surface en substances nutritives, permettant une augmentation de la production primaire, entraînant ainsi un développement excessif de la biomasse végétale (DESCY, 1988).

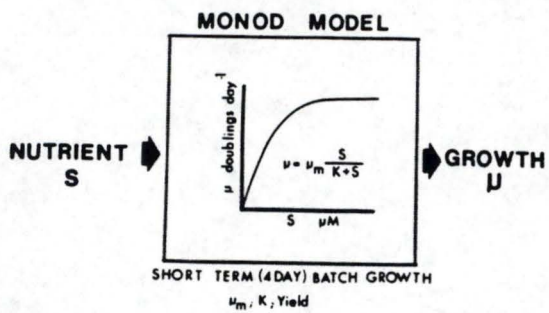


Fig 1.3. Représentation graphique du modèle de Monod décrivant la relation entre le taux de croissance (μ) et la concentration externe en substrat (S) (KILHAM, 1978).

I.2. Modélisation de la relation entre la croissance et les concentrations en substances nutritives : modèle de MONOD - modèle de DROOP.

I.2.1. Modèle de MONOD.

Le modèle de Monod (1949) est basé sur la Loi du minimum. Il relie le taux de croissance (μ) et la concentration externe de l'élément limitant.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K + S} \quad \mu_{\max} = f(t^*, I)$$

$\mu_m(t^*, I)$: taux de croissance spécifique maximum pour une température et une intensité données.

μ : taux de croissance pour une concentration en substrat donnée.

S : concentration externe en substrat.

K : constante de demi-saturation c'est-à-dire concentration en substrat pour laquelle

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$$

Graphiquement, l'équation se représente par une hyperbole (Fig.1.3.). Aux faibles concentrations, la croissance est limitée par le substrat et la relation entre μ et S est linéaire.

Dès que la concentration en substrat devient saturante, croissance et concentration sont indépendantes.

Ce modèle décrit de façon adéquate la croissance dans un milieu constant (conditions 'steady-state'), c'est-à-dire lorsque les concentrations en substances nutritives n'évoluent pas au cours du temps.

De telles conditions sont réalisables en laboratoire (cultures en chemostats).

En conditions 'steady-state', le taux d'assimilation (μ) est égal au taux de disparition des stocks intracellulaires lors de la division cellulaire ($\mu = Q$). En d'autres termes, tout le P assimilé est utilisé pour la croissance.

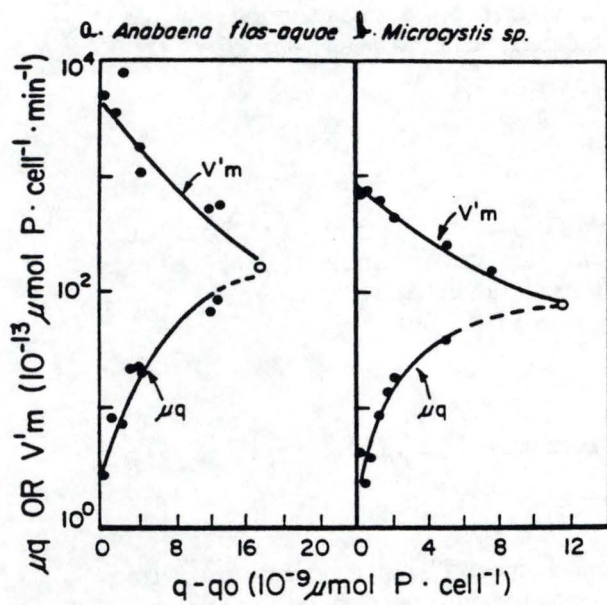


Fig.1.4. Comparaison, à différents taux de croissance (μ), entre la vitesse d'assimilation maximale mesurée $V'm$ et celle calculée μQ par la formule $v = \mu Q$. La vitesse est décrite en fonction de la quantité de P disponible pour la croissance ($Q - Q_0$)

- a. *Anabaena flos-aquae*
- b. *Microcystis* sp. (GOTHAM et RHEE, 1981)

Si les concentrations en P fluctuent au cours du temps (situation habituelle en milieu naturel) et si les algues sont carencées en P (stocks intracellulaires inférieures à une valeur maximale notée Q_m), l'assimilation devient supérieure à la croissance et donc le P peut s'accumuler dans la cellule. Ce découplage entre l'assimilation et la croissance est lié à la consommation de luxe.

La Fig. 1.4. illustre nos propos. Le découplage entre le taux maximal d'assimilation (V_m) et le taux de disparition des stocks intracellulaires (μQ) est d'autant plus accusé que les algues sont carencées ($Q - Q_0 \rightarrow 0$). L'équilibre dynamique $V_m = \mu Q$ n'apparaît que lorsque les stocks sont maxima ($Q = Q_m$).

I.2.2. Modèle de DROOP.

Le modèle physiologique plus complexe proposé par DROOP (1973) tient compte de la consommation de luxe et permet donc de découpler l'assimilation et la croissance.

Il décrit le taux de croissance non plus comme une fonction simple des concentrations externes en substances nutritives mais comme une grandeur dépendante des stocks intracellulaires.

$$\mu = \frac{\mu_m (Q - Q_0)}{K + Q - Q_0} \quad \mu_m = f(t^*, I)$$

Q : quota cellulaire en substances nutritives au temps t

Q_0 : quota minimal en substances nutritives.

Cette équation est celle d'une hyperbole (Fig.1.5.).

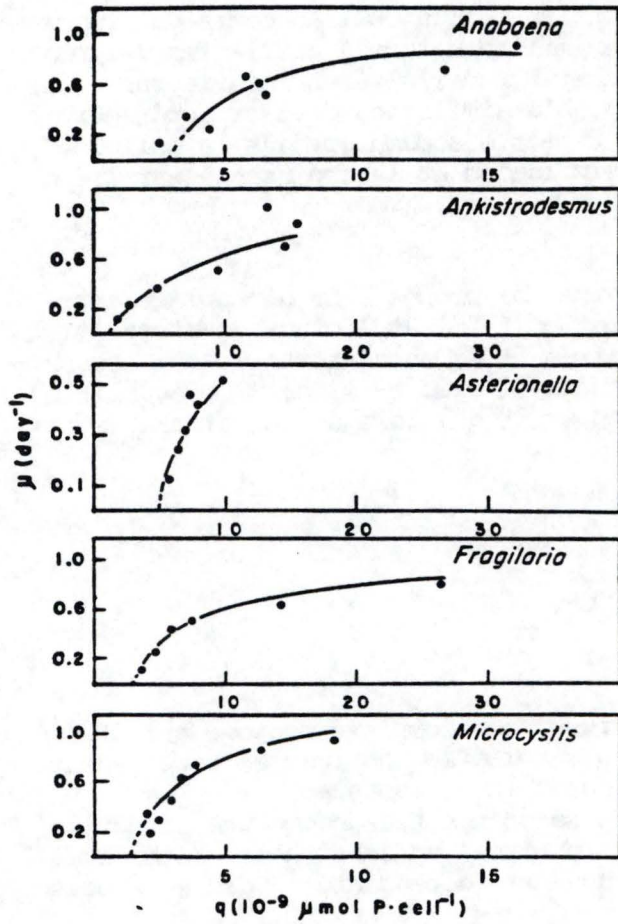


Fig. 1.5. Modèle de Droop. Relation entre les stocks intracellulaires (Q) et le taux de croissance (μ) chez cinq espèces (GOTHAM et RHEE, 1981)

II. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE.

Nous avons montré dans le chapitre précédent comment le modèle de DROOP (1973) permet de découpler l'assimilation et la croissance. Le P est d'abord prélevé dans le milieu extérieur (phase d'assimilation). Ensuite, il est converti en nouvelles cellules (phase de croissance). Ces deux processus peuvent être synchronisés ou différés.

Nous ouvrirons ce chapitre par l'étude des aspects physiologiques et biochimiques de l'assimilation. La connaissance fine de ces mécanismes nous permettra, dans une certaine mesure, de comprendre l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques sur le processus d'assimilation.

II.1. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES.

Le phosphore est un élément indispensable à la cellule. Il intervient dans de nombreuses réactions : métabolisme énergétique (ATP), synthèse des acides nucléiques, des phospholipides... Son transport doit être suffisamment rapide et finement régulé par la cellule. Seul un transport actif permet d'assurer un tel contrôle.

Dans ce paragraphe, nous aborderons quatre points :

- caractérisation de la diffusion simple et du transport médiat (diffusion facilitée - transport actif)
- critères physiologiques utilisés pour déterminer le caractère actif d'un transport d'ions
- présentation d'un processus permettant d'énergiser le transport des ions phosphates : force motrice du proton.
- compétition entre assimilation du P et photosynthèse pour une même source d'énergie (ATP) ou répression photosynthétique.

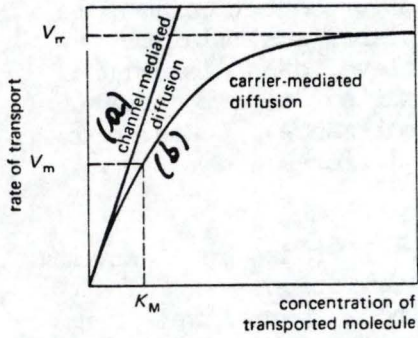


Fig.1.6. Cinétiques d'un transport par diffusion simple (a) et par diffusion facilitée par un carrier (b). Le transport par diffusion facilitée par un carrier possède une vitesse maximale (V_m) et une constante de demi-saturation K_m . Le transport par diffusion simple est proportionnel à la concentration de soluté (LEHNINGER, 1979).

II.1.1. Caractérisation de la diffusion simple et du transport médiat (diffusion facilitée et transport actif)

(D'après LEHNINGER, 1979)

1. Diffusion simple

On parle de diffusion simple lorsque le déplacement d'une molécule se réalise spontanément suivant un gradient énergétique décroissant (phénomène passif) et sans l'intervention d'un médiateur. Il s'agit d'un simple processus physique. Le caractère passif d'un transport, qu'il soit facilité ou non par un transporteur, peut être déterminé en suivant au cours du temps l'entrée du soluté dans la cellule : la concentration interne en soluté augmente linéairement jusqu'à atteindre une valeur maximale. A ce moment les concentrations s'équilibrent de part et d'autre de la membrane et on ne mesure plus aucun flux net.

Un transport passif non facilité s'identifie en mesurant la vitesse d'entrée du soluté en fonction de la concentration. Ce transport est habituellement proportionnel à la concentration de soluté et ne donne pas lieu à un phénomène de saturation (Fig.1.6a).

La diffusion physique est un phénomène lent.

La vitesse de diffusion (v) est liée au gradient de concentration ($S_1 - S_2$) de part et d'autre de la membrane et à la perméabilité de la membrane au soluté (KD)

$$v = KD (S_1 - S_2).$$

2. Transport médiat :
diffusion facilitée - transport actif.

Un transport médiat présente trois caractéristiques :

- Il est saturable car le nombre de sites transporteurs est limité. La représentation graphique de la vitesse initiale du processus de transport en fonction de la concentration du substrat fournit habituellement une courbe hyperbolique qui tend vers un maximum (voir III.3.1.)
- Il est spécifique : un médiateur donné ne transporte pas n'importe quel type de molécule.
- Il peut être inhibé spécifiquement (voir II.2.4.).

Le transport médiat peut être passif ou actif.

a) diffusion facilitée.

Il s'agit de diffusion; le transport est donc passif et sature au cours du temps. La diffusion est facilitée. Elle est donc plus rapide que la diffusion physique

b) Transport actif.

Un transport est actif dès le moment où il se réalise suivant un gradient énergétique croissant; il coûte donc de l'énergie à la cellule.

II.1.2. Critères physiologiques utilisés pour déterminer le caractère actif d'un transport d'ion.

(D'après VAN CUTSEM, 1988).

Une molécule non chargée se déplace en réponse à une différence de concentration. Un ion porteur d'une charge électrique peut se mouvoir non seulement en réponse à un gradient de concentration (d'une phase concentrée vers une phase diluée), mais aussi en réponse à un champ électrique. La plupart des cellules sont chargées négativement par rapport à leur environnement et les cations positifs auront donc tendance à migrer vers la cellule. Si le gradient de potentiel électrique est suffisamment intense, un ion peut diffuser d'une solution externe diluée vers la cellule où sa concentration (plus précisément son activité (1)) est plus élevée.

Cette situation est en fait très courante.

Le potentiel électrochimique d'un ion dans un système donné est la somme de deux termes chimiques et électrique :

$$\mu_j = \mu_j^0 + RT \ln a_j + Z_j F \Psi \quad (\text{J.Mole}^{-1}) \quad (1)$$

μ_j^0 est le potentiel électrochimique de l'ion j à l'état standard,

R la constante des gaz

T la température en ° Kelvin

$\ln a_j$ est le logarithme népérien de l'activité de l'ion j.

Z_j est la valence algébrique de l'ion j (+1 pour Na^+ ,
-2 pour SO_4^{2-}),

F est le Faraday,

Ψ est le potentiel électrique du système qui contient l'ion (ce n'est pas une propriété du seul ion j)

(1) activité : concentration en ions libres.

Si un ion est présent dans deux compartiments qui ne sont pas en équilibre, la force motrice agissant sur l'ion à travers la barrière séparant les deux compartiments est le gradient de potentiel électrochimique, $d\mu_j$, obtenu en différenciant l'équation précédente.

$$-\frac{d\mu_j}{dx} = -\frac{RT}{a_j} \frac{da_j}{dx} - z_j F \frac{d\psi}{dx} \quad (2)$$

Lorsqu'un ion se déplace en descendant le long d'un gradient de potentiel électrochimique, il perd une partie de son énergie potentielle. Cette quantité perdue correspond à la différence de potentiel électrochimique entre les deux compartiments : $\Delta\mu_j$ définit la perte d'énergie potentielle ou d'énergie libre d'une môle d'ion j qui diffuse dans la cellule. Si cet ion j pénètre contre un gradient de potentiel ($\mu_{j\text{ ext}} < \mu_{j\text{ int}}$) la différence de potentiel électrochimique correspond à la quantité minimale d'énergie à fournir pour "pomper" une môle de cet ion j dans la cellule.

L'équation décrivant le potentiel électrochimique d'un ion permet de décider si le transport de cet ion dans la cellule va se faire spontanément (thermodynamiquement parlant) ou non. Pour ce faire un minimum d'information est nécessaire. On doit connaître :

- l'activité de l'ion j dans la cellule et dans le milieu externe de référence.
- la différence de potentiel électrique in-out, généralement notée $\Delta\psi$ et appelée potentiel de membrane.

La différence de potentiel électrique à travers le plasmalemma se mesure en insérant une microélectrode de verre dans le cytoplasme et une deuxième dans la solution externe. Les deux microélectrodes sont connectées via un pont salin (agar - KCL saturé) à un électromètre qui enregistre la différence de potentiel en millivolts.

Considérons un ion j à l'équilibre entre la cellule et la solution externe : le potentiel électrochimique de l'ion sera identique de part et d'autre du plasmalemma et il n'y aura aucun flux net de l'ion dans l'une ou l'autre direction (les flux en sens inverses s'annulent)

On peut réécrire cette dernière équation de plusieurs façons :

$$RT \ln a_j^{\text{in}} + Z_j F \psi^{\text{in}} = RT \ln a_j^{\text{out}} + Z_j F \psi^{\text{out}} \quad (3)$$

$$\log \frac{C_i}{C_o} = \frac{- Z_j F \Delta\psi}{2,3 RT} \quad (4)$$

$\frac{C_i}{C_o}$ est le rapport de concentrations de part et d'autre de la membrane calculé à l'équilibre ($\Delta\mu = 0$) pour un potentiel de membrane ($\Delta\psi$) donné.

Ion Concentrations in Tissues (μ equiv./g water content)

Ion	Pea Roots		Oat Roots	
	Predicted conc.	Measured conc.	Predicted conc.	Measured conc.
K ⁺	74	75	27	66
Na ⁺	74	8	27	3
Mg ⁺⁺	2,700	3	350	17
Ca ⁺⁺	10,800	2	1,400	3
NO ₃ ⁻	0.0272	28	0.0756	56
Cl ⁻	0.0136	7	0.0378	3
H ₂ PO ₄ ⁻	0.0136	21	0.0378	17
SO ₄ ⁻	0.000094	19	0.00071	4

Tabl.1.1. Comparaison entre les concentrations de différents ions mesurées et calculées par l'équation :

$$\log \frac{C_i}{C_o} = \frac{-ZF \Delta \Psi}{2,3 RT}$$

dans les tissus de racines de foin et d'avoine (HIGINBOTHAM et al. 1967).

Si le rapport de concentrations mesuré expérimentalement est supérieur au rapport déterminé par calcul, le transport de l'ion est actif. Par contre, s'il est égal ou inférieur, le transport est passif.

Le Tabl. 1.1. montre que dans les racines de pois et d'avoine, le rapport mesuré est supérieur au rapport calculé à partir de l'équation (4) pour les anions

NO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- , SO_4^{--} . Leur transport est donc actif

II.1.3. Présentation d'un processus permettant d'énergiser le transport des ions phosphates : force motrice du proton

Afin de comprendre toutes les interactions entre le milieu et le processus d'assimilation du P, il faudrait connaître la physiologie de chaque espèce représentée dans l'échantillon naturel étudié. Ceci est loin d'être le cas à l'heure actuelle. Néanmoins, les mécanismes d'assimilation du P sont bien décrits chez plusieurs espèces végétales (plantes supérieures, algues, champignons) et leur connaissance pourrait nous aider à mieux comprendre l'écologie de l'assimilation.

Plusieurs systèmes permettent d'apporter l'énergie nécessaire à l'assimilation du P contre son gradient électrochimique. Parmi ceux-ci, le cotransport d'un ion phosphate avec un ou plusieurs protons semble largement répandu. C'est pourquoi nous le présentons.

1. Définition de la force motrice du proton

(D'après VAN CUTSEM, 1988).

L'extrusion d'un proton nécessite un coût énergétique important sous forme d'ATP.

En effet, le gradient de potentiel électrochimique s'opposant à la sortie d'un proton est très élevé (le potentiel de membrane est négatif et donc les cations sont fortement retenus) et la concentration en H^+ est généralement plus élevée à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule.

Cet ion, une fois sorti de la cellule, possède une énergie potentielle élevée. En diffusant vers le cytoplasme, il libère cette énergie qui pourra servir à pomper d'autres ions.

Un tel processus s'appelle cotransport et désigne globalement la formation d'un complexe ternaire entre un ou plusieurs protons, la molécule ou l'ion cotransporté et un transporteur dans la membrane. La protonation du transporteur favorise l'association de la molécule co-transportée.

Le complexe se réoriente ou migre dans la membrane, exposant ainsi son site de liaison au cytoplasme et la dissociation se réalise.

2. Exemples de cotransport $H_2PO_4^- / H^+$

Différents exemples de cotransport $H_2PO_4^- / H^+$ peuvent être trouvés dans la littérature.

Chez Lemma gibba G1, un ion $H_2PO_4^-$ est cotransporté avec un ion H^+ (ULLRICH-EBERIUS et al., 1984).

L'existence de ce mécanisme est suggérée par différentes observations :

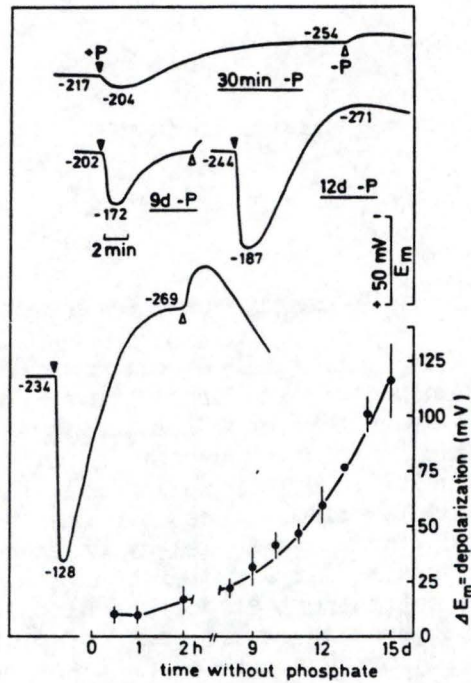


Fig.1.7. Effet d'une carence en P sur la dépolarisation de la membrane (ΔE_m) lors de l'assimilation des ions $H_2PO_4^-$ chez *Lemma gibba* G1 (ULLRICH-EBERIUS, 1984).

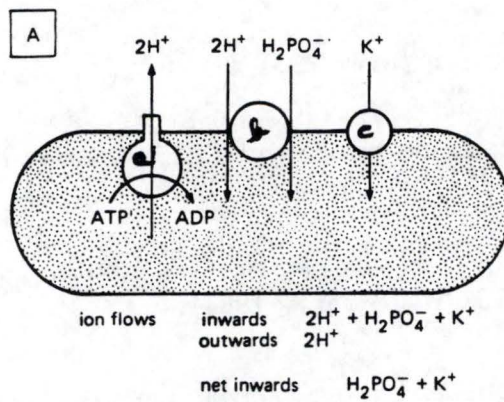


Fig.1.8. Cotransport $H^+/H_2PO_4^-$ dans un hyphes de champignon. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP par une ATPase (a) fournit l'énergie nécessaire pour l'extrusion de deux ions H^+ . Un ion $H_2PO_4^-$ est cotransporté avec $2H^+$ par un même carrier (b). Un ions K^+ pénètre simultanément par un autre carrier (c). (Compilé d'après BEEVER et BURNS, 1980 et COCKBURN et al. 1975)

- la pénétration d'ions H_2PO_4^- provoque une dépolarisation de la membrane. Le potentiel membranaire devient moins négatif à cause de l'entrée d'ions positifs. Cette dépolarisation est d'autant plus sensible que l'espèce est carencée en P (Fig.1.7.).

- plus le gradient en proton de part et d'autre de la membrane est élevé, plus le transport des ions H_2PO_4^- est rapide.

- la fusicoccine (substance stimulant la pompe à protons) accélère la pénétration des ions H_2PO_4^-

Chez les champignons l'assimilation d'un ion phosphate est accompagnée de l'entrée de deux protons (BEEVER et BURNS, 1980). Les flux d'ions au niveau d'un hyphé sont illustrés à la Fig.1.8. Deux ions H^+ sont transportés hors de la cellule via une ATPase.

Ces ions, une fois sortis de la cellule, possèdent une énergie potentielle élevée. En diffusant vers le cytoplasme, ils libèrent une quantité d'énergie suffisante pour 'remonter' un ion H_2PO_4^- .

Un ion K^+ entre également dans la cellule pour assurer l'équilibre de charge.

Le pH de la paroi cellulaire de beaucoup d'espèces phytoplanctoniques est légèrement acide (pH = 5). En conditions normales, le pH du cytoplasme est généralement égal à 7. Ce gradient de pH égal à 2 pourrait énergiser le transport des ions H_2PO_4^- (VAN CUTSEM, comm.pers.)

II.1.4. Compétition entre photosynthèse et assimilation : Répression photosynthétique

De l'ATP est consommé pour l'assimilation du P et pour la réduction du CO_2 lors de la phase sombre de la photosynthèse. Ces deux processus pourraient donc, dans certaines conditions, entrer en compétition.

LEAN et PICK (1981) mesurent le taux d'assimilation du carbone par du phytoplancton originaire d'un milieu lacustre pauvre en P, à différentes profondeurs (2m et 8m) et après des ajouts croissants de P.

Deux observations ressortent de leurs travaux :

- si on enrichit le milieu en P, la photosynthèse est momentanément réduite (répression photosynthétique) tandis que s'active l'assimilation du P. Les algues profitent au maximum de ces apports pour réduire leur dette en P.

- la répression photosynthétique est nettement plus marquée en surface. La photosynthèse y étant plus intense qu'en profondeur, peu d'ATP reste disponible pour assimiler le P.

La Fig. 1.9. schématise ces résultats.

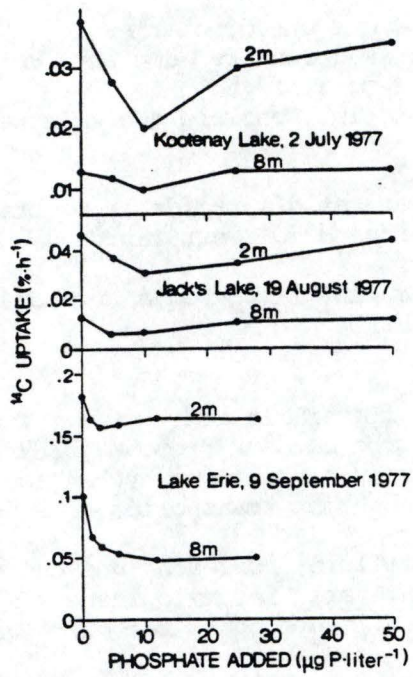


Fig. 1.9. Vitesse d'assimilation du ^{14}C par le phytoplancton de différents lacs (exprimée en % du ^{14}C total assimilé) en fonction de la quantité de P ajoutée. (LEAN et PICK, 1981).

II.2. ASPECTS BIOCHIMIQUES

(D'après LEHNINGER, 1979)

La vitesse avec laquelle le P pénètre dans la cellule dépend du nombre de transporteurs, de la concentration en substrat et de l'état des stocks intracellulaires.

II.2.1. Influence de la concentration en substrat :
équation de Michaelis-Menten.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le transport du P est facilité par un transporteur ('porteur'). La relation entre ce 'porteur' et la molécule transportée est analogue à celle liant un enzyme à son substrat. La dépendance de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration externe en substrat est décrite par l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{V_m S}{K_m + S} \quad (1)$$

V_m : vitesse d'assimilation maximale spécifique

K_m : constante de demi-saturation, c'est-à-dire concentration en substrat telle que $v = \frac{V_{max}}{2}$

v : vitesse d'assimilation pour une concentration en substrat donnée

S : concentration en substrat

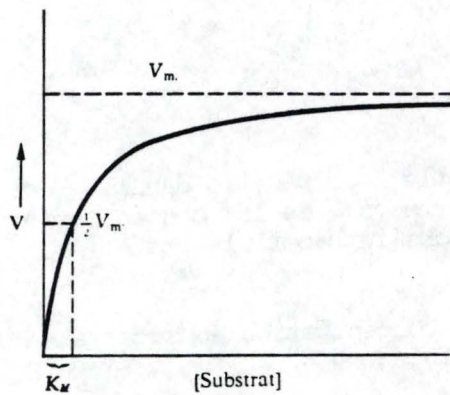


Fig 1.10. Evolution de la vitesse en fonction de la concentration externe en substrat-cinétique de Michaelis-Menten.

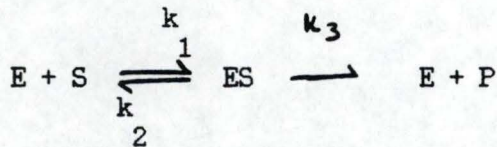
Symboles : S, concentration externe en substrat. v, vitesse d'assimilation. V_m , vitesse maximale d'assimilation. K_m , constante de demi-saturation. (LEHNINGER, 1979).

Cette équation se représente graphiquement par une hyperbole (Fig. 1.10.). Aux faibles concentrations, la vitesse est d'ordre 1 : elle dépend de la concentration d'un seul substrat. Aux fortes concentrations, il y a saturation des sites transporteurs; la vitesse est d'ordre 0 : elle est indépendante de la concentration en substrat.

Les paramètres V_m et K_m mesurent l'efficacité du système transporteur aux fortes et faibles concentrations respectivement :

- V_m est une mesure de la capacité maximale du système transporteur.
- K_m est une mesure de l'affinité du système transporteur pour le substrat.

La formation du complexe carrier-substrat et sa dissociation dans le cytoplasme peut se formuler comme une réaction catalytique.



E : Enzyme

S : Substrat

ES : complexe Enzyme - substrat

E+P : dissociation du complexe ES avec régénération de l'enzyme et libération des produits de la réaction (P)

k_1 , k_2 , k_3 sont des constantes de vitesse

k_2 et k_3 déterminent le taux de dissociation du complexe ES

k_1 détermine son taux de formation.

K_m est la résultante de ces constantes :

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

si $k_1 \gg k_2 + k_3$, K_m sera petit et l'affinité du transporteur élevée.

L'équation de Michaelis-Menten (équation (1)) peut être transformée algébriquement en d'autres relations d'une utilisation plus aisée pour l'exploitation des résultats expérimentaux. L'une des transformations les plus utilisées consiste simplement à prendre l'inverse de l'équation de Michaelis-Menten (équation (1)) :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + S}{V_m S}$$

en effectuant la division :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m S} + \frac{S}{V_m S}$$

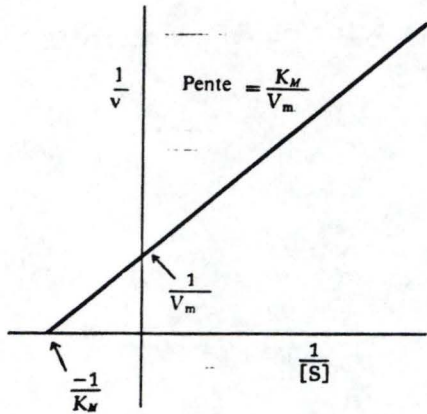


Fig.1.11. Représentation de Lineweaver-Burk.

Symboles : S, concentration externe en substrat. v, vitesse d'assimilation. Km, constante de demi-saturation. Vm, vitesse maximale d'assimilation (LEHNINGER, 1979).

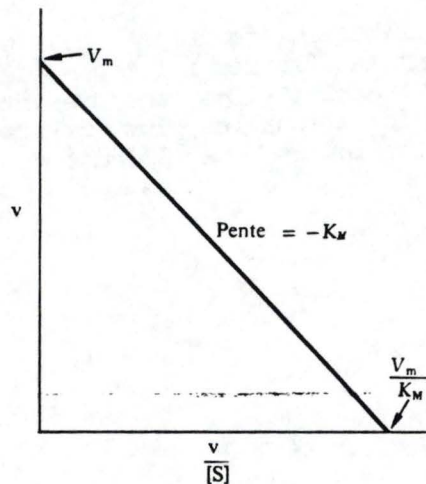


Fig.1.12 : Représentation d'Eadie-Hofstee.

Symboles : S, concentration externe en substrat. v, vitesse d'assimilation. Vm, vitesse maximale d'assimilation. Km, constante de demi-saturation (LEHNINGER, 1979).

qui se simplifie en :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

L'équation (2) est la relation de Lineweaver-Burk qui est représentée par une ligne droite de pente K_m / V_m et d'ordonnée à l'origine $1/V_m$ (Fig.1.11.). Cette représentation en "double inverse" est intéressante dans la mesure où elle permet d'établir la valeur de la vitesse maximale avec une meilleure précision que la représentation directe de v en fonction de (S) . La droite de Lineweaver-Burk peut aussi, comme nous le verrons plus loin (II.2.4.) donner d'intéressants renseignements sur les différents types d'inhibition enzymatique.

Une autre transformation pratique de l'équation de Michaelis-Menten s'obtient en multipliant les deux termes de l'équation (2) par V_m , ce qui donne après réarrangement :

$$v = -K_m (v/S) + V_m$$

En portant v en fonction de $v/(S)$, on obtient la représentation de la Fig 1.12. Cette représentation d'Eadie-Hofstee a le double avantage de donner directement V_m et K_m et d'amplifier les défauts de linéarité qui peuvent être minimisés par la représentation de Lineweaver-Burk.

Une autre transformation souvent utilisée est celle de Dixon dont l'équation est la suivante :

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{S}{V_m}$$

II.2.2. Influence du nombre de sites transporteurs.

Comme dans le cas d'une réaction catalytique, la vitesse de transport dépend de la concentration du "porteur". Pour une concentration en substrat donnée, la vitesse de transport augmente proportionnellement au nombre de sites transporteurs jusqu'à atteindre une valeur constante aux fortes concentrations en porteur (Fig. 1.13).

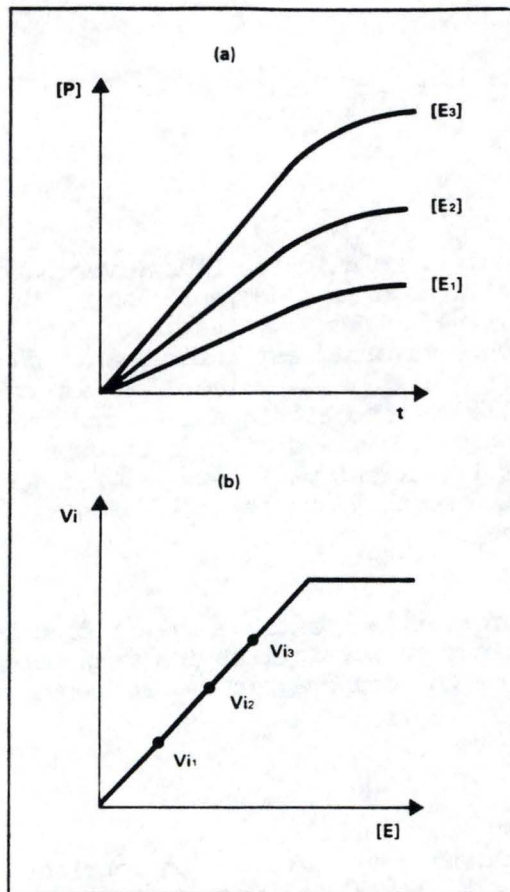


Fig.1.13 Influence de concentrations croissantes d'enzyme ($E_3 > E_2 > E_1$), pour une même concentration de substrat S sur

- a) la concentration du produit (P) formé.
 - b) la vitesse initiale de la réaction v_i
- (LEHNINGER, 1979)

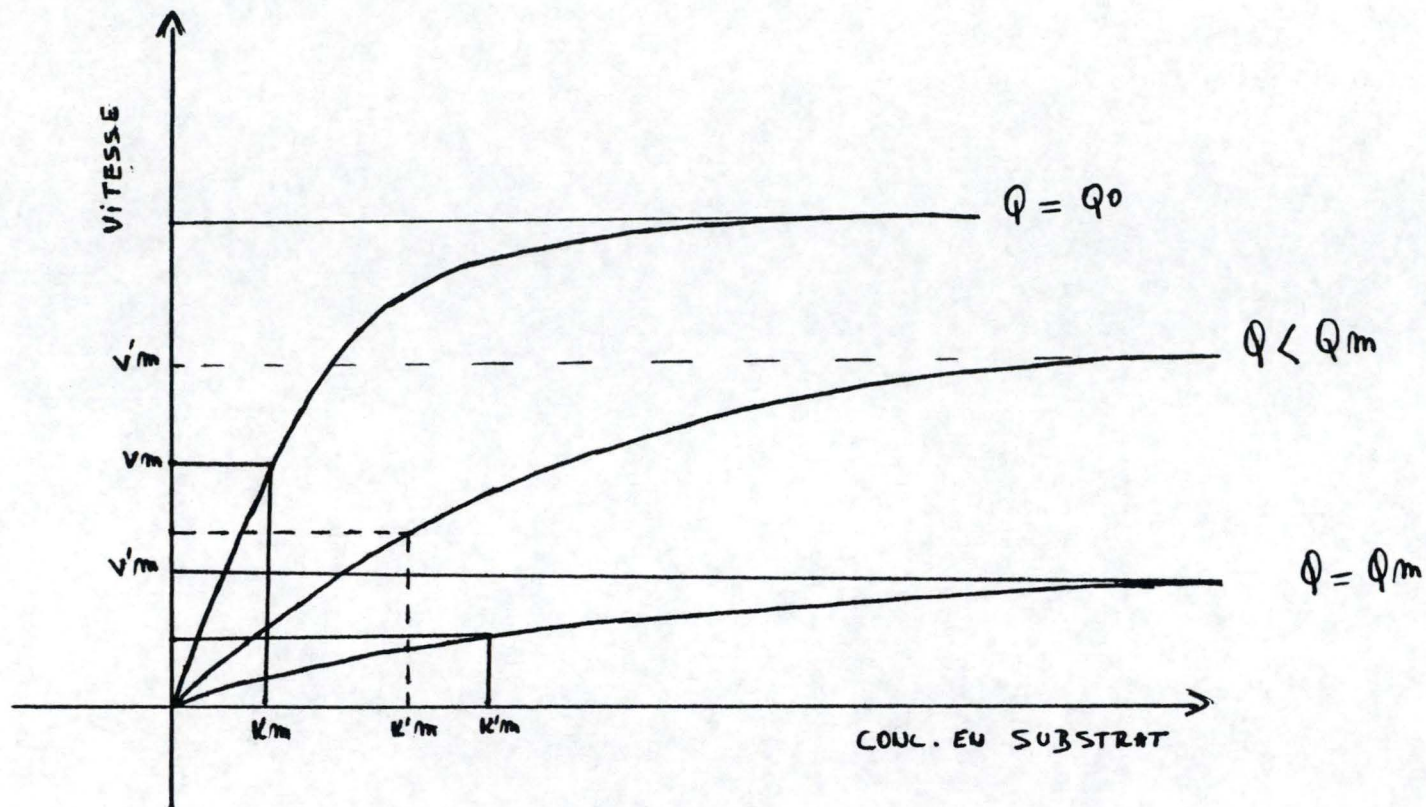


Fig.1.14. Relation entre la vitesse d'assimilation et la concentration externe en substrat en fonction de l'état des stocks intracellulaires.

Symboles : V_m , vitesse d'assimilation maximale. K_m , constante de demi-saturation. Q , quotas cellulaires au temps t . Q_m , quotas cellulaires maxima. Q_0 , quotas cellulaires minima.

II.2.3. Influence des stocks intracellulaires

La vitesse d'assimilation ne dépend pas uniquement des concentrations en P. Elle est, comme la croissance, influencée par l'état des stocks intracellulaires. Ainsi une algue carencée en P (Q proche de Q₀) assimilera-t-elle le P beaucoup plus vite qu'une algue vivant dans un milieu riche (Q proche de Q_m).

Cette relation existant entre le taux d'assimilation et les stocks intracellulaires peut s'exprimer par l'équation suivante (DAUTA, 1983)

$$v = \frac{V_m S (Q_m - Q)}{S + K_m (Q_m - Q)}$$

Si on regarde cette équation de plus près, on se rend compte que, pour déterminer les paramètres V_m et K_m 'absolus' c'est-à-dire les plus performants pour une espèce donnée, il faut que Q soit égal à Q₀.

Cette conclusion rejoint celle de GOTHAM et RHEE (1981). Selon ces auteurs, si les algues ne sont pas carencées avant de réaliser l'étude cinétique, l'expérimentateur mesure un V_{max} et un K_m apparents notés V'_{max} et K'_m. Ce ne sont pas de vraies constantes car elles varient avec l'état nutritionnel. V'_m est inférieur au V_m absolu mesuré pour Q = Q₀ et K'_m est supérieur au K_m absolu.

On voit donc toute l'importance de connaître l'état physiologique des algues avant de réaliser une étude cinétique. Sans cette condition, aucune comparaison entre les paramètres cinétiques d'espèces différentes n'est possible. En réalisant une étude cinétique sur une culture d'algues progressivement carencée, on peut établir la famille de courbes schématisée à la Fig. 1.14

II.2.4. Contrôle de l'assimilation : mécanismes d'inhibition

(D'après LENHINGER, 1979)

Cette diminution de la vitesse d'assimilation observée au fur et à mesure du remplissage des stocks intracellulaires rappelle les mécanismes d'inhibition enzymatique.

Il existe trois types d'inhibition enzymatique :

- 1) inhibition compétitive
- 2) inhibition non compétitive
- 3) inhibition incompétitive

Dans le cas du phosphore, seuls les deux premiers types sont à prendre en considération.

1. inhibition compétitive

Comme nous l'avons signalé plus haut (II.2.1.), la représentation de Lineweaver et Burk en double inverse permet d'identifier le type d'inhibition.

Dans le cas d'une inhibition compétitive, l'inhibiteur présente une structure stérique proche de celle du substrat. Il entre donc en compétition avec ce dernier pour le site de fixation et réduit l'affinité (K_m) de l'enzyme pour son substrat. Ceci se traduit au niveau de l'équation de Lineweaver-Burk de la façon suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

où I : concentration en inhibiteur

K_i : concentration en inhibiteur pour laquelle

$$V_m = \frac{V_m}{2}$$

L'abscisse à l'origine est modifiée ($-\frac{1}{K_m} = -\frac{1}{K_m(1+I/K_i)}$)

tandis que l'ordonnée à l'origine ($\frac{1}{V_m}$) reste inchangée.

Un ion comme l'arsenate peut entrer en compétition avec les ions phosphates vu la similitude de leurs structures stériques.

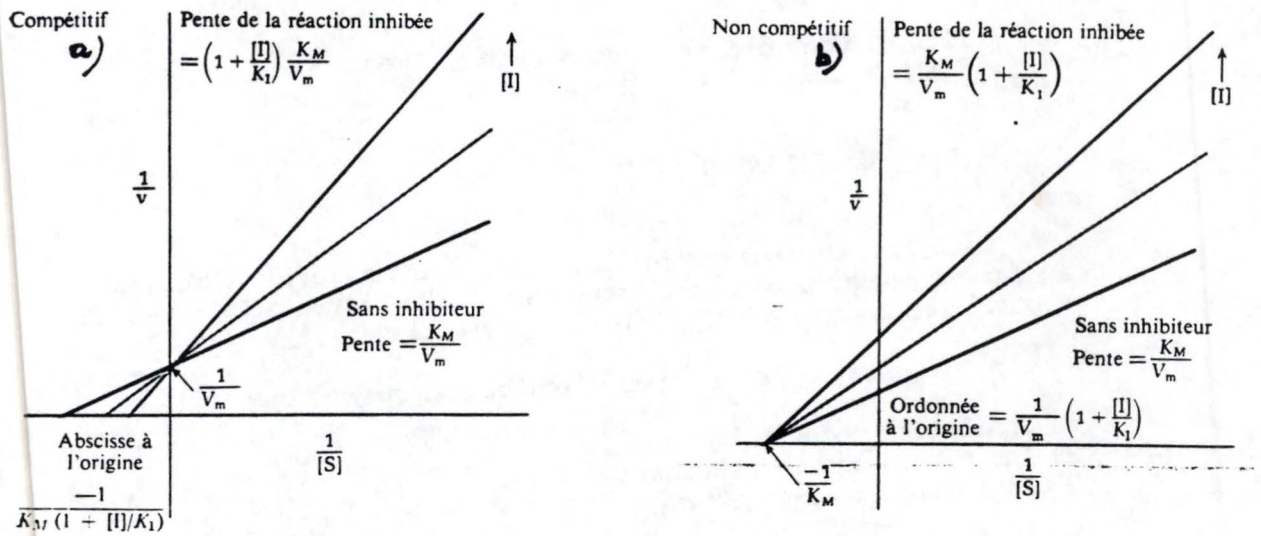


Fig.1.15. Représentation de Lineweaver-Burk de cinétiques en présence d'inhibiteur compétitif (a) et non compétitif (b).

Symboles : I, concentration en inhibiteur. K_i , constante d'inhibition. K_m , constante de demi-saturation. S, concentration en substrat. V_m , vitesse d'assimilation maximale (LENHINGER, 1979).

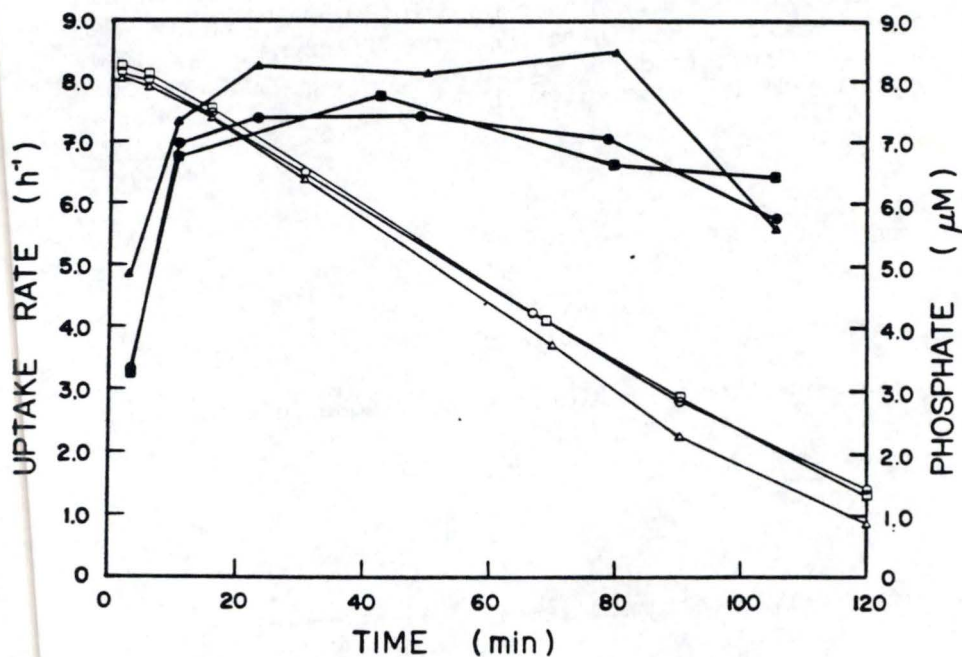


Fig.1.16 Vitesse d'assimilation en fonction du temps par une culture dominée par *Synechococcus* (culture en semi-continu, taux de dilution ou taux de croissance égal à 1,5 d⁻¹).

Evolution des concentrations en phosphate. Replicats A(○), B(△), C(□).

Vitesse d'assimilation. Replicats A(●), B(▲), C(■) (SUTTLE et HARRISON, 1986).

2. Inhibition non compétitive

Dans l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur se fixe sur un site différent de celui du substrat. Son action se traduit non par changement de l'affinité de l'enzyme pour son substrat mais par une réduction de la vitesse de réaction.

L'équation de Lineweaver-Burk devient dans ce cas :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)$$

L'abscisse à l'origine n'est pas modifiée tandis que l'ordonnée à l'origine est augmentée

$$\frac{1}{V_m} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)$$

La Fig. 1.15. schématise les deux types d'inhibition.

Chez la plupart des espèces, les mécanismes contrôlant l'assimilation (mécanismes de feedback) entrent dans cette dernière catégorie. Ils se mettent en place rapidement et ne sont donc pas liés à la synthèse de novo d'une protéine inhibitrice mais à l'intervention de molécules riches en phosphore (polysphosphates, RNA, phospholipide).

Les polyphosphates, constituants essentiels des stocks intracellulaires, semblent être plus particulièrement impliqués dans les mécanismes de régulation (RHEE, 1973).

Cependant, chez certaines espèces, les mécanismes de feedback ne s'établissent pas directement. Ainsi chez *Monochrysis lutheri* (BURMASTER et CHISHOLM, 1979) et *Synechococcus* (SUTTLE et HARRISSON, 1986) V_m reste constant alors que Q augmente (Fig. 1.16). Le fait que le contrôle ne soit pas immédiat peut constituer un avantage écologique dans un milieu où les apports en P sont irréguliers et éphémères (apports par pulses). En effet, en maintenant une vitesse soutenue, les espèces profitent davantage de ces apports passagers (SUTTLE et HARRISSON, 1986).

Brown et al.

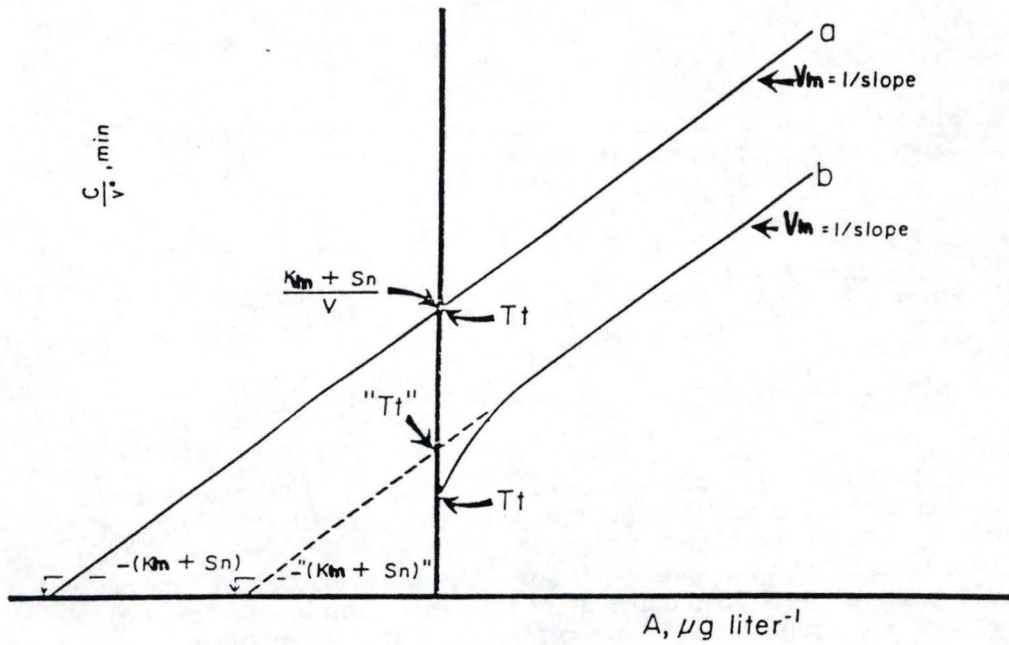


Fig.1.17. Déviation à l'équation de Michaelis-Menten dans la gamme des faibles concentrations. Relations entre C/v^* et les concentrations en P31 ajoutées (A) pour un système obéissant à l'équation de Michaelis-Menten (a) et pour un système présentant une déviation curviligne (b).

Symboles : V_m , vitesse d'assimilation maximale. K_m , constante de demi-saturation. S_n , concentration in situ. T_t , temps de turnover réel. $"T_t"$, temps de turnover obtenu après extrapolation. (BROWN et HARRIS, 1978).

II.2.5. Déviations à l'équation de Michaelis-Menten.

Les cinétiques observées ne suivent pas toujours exactement l'équation de Michaelis-Menten. Là se situe toute la différence entre un système enzymatique isolé et un organisme complet ou une population hétérogène.

Déviations de Michaelis-Menten observées dans la gamme des faibles concentrations

Quand on porte en graphique C/v^* en fonction de A (voir Matériel et Méthodes), on observe, dans certains cas, une déviation curviligne pour des concentrations en P de l'ordre de grandeur du K_m (Fig. 1.17.).

De telles déviations ont été mises en évidence lors d'études cinétiques réalisées sur des échantillons naturels plurispécifiques (WILLIAMS, 1973; LEAN et WHITE, 1983) et dans le cas de culture monospécifiques axéniques de Selenastrum capricornutum (BROWN et HARRIS, 1978).

WILLIAMS (op.cit.) explique cette déviation par le caractère hétérogène de l'échantillon c'est-à-dire la présence d'un ensemble d'espèces caractérisées par des K_m distincts.

La courbe décrivant la cinétique d'assimilation de l'échantillon complet apparaît donc comme la résultante de plusieurs cinétiques et la déviation sera d'autant plus accusée que le nombre d'espèces est élevé. (Cet auteur propose même d'utiliser cette déviation pour mesurer la diversité spécifique du phytoplancton).

BROWN et HARRIS (op.cit.) explique cette réponse curviligne par la présence, chez un même organisme de plusieurs systèmes de transport caractérisés par des affinités différentes.

Comme l'illustre la Fig. 1.17. cette non-linéarité marquée aux faibles concentrations pose un problème pour la détermination précise des paramètres K_m et T_t (temps de turnover au temps nécessaire pour que tout le P du milieu soit assimilé).

V_m peut être déduit avec précision à partir des mesures de vitesse déterminées aux fortes concentrations là où la relation est bien linéaire (V_m est égal à l'inverse de la pente).

Par contre, pour obtenir une estimation valable des deux autres paramètres (K_m et T_t), il faut travailler à faible concentration dans la zone de non-linéarité. De toute façon, un K_m déterminé à partir d'une population hétérogène n'a pas exactement la même signification qu'un K_m mesuré sur un système enzymatique purifié.

Il s'agit d'un paramètre écologique qui doit avant tout nous instruire sur l'adaptation des organismes à leur environnement.

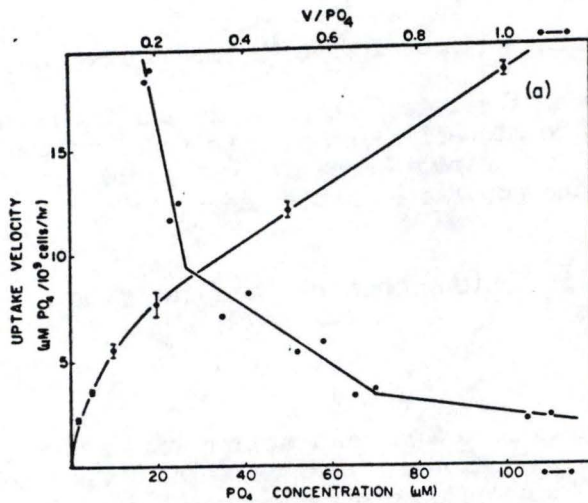


Fig.1.18. Cinétique multiphasique chez *Euglena gracilis* (Z). Vitesse d'assimilation du P en fonction de la concentration externe en P suivant la représentation d'Eadie Hofstee (o). Les barres verticales $\bar{\pm}$ représentent l'intervalle de confiance (CHISHOLM et STROSS, 1976 a)

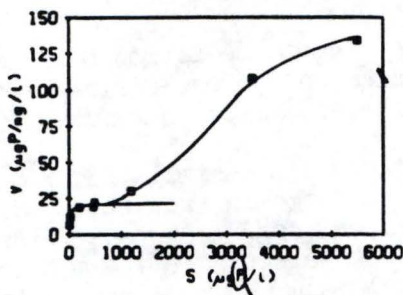


Fig.1.19. Vitesse d'assimilation du P en fonction de la concentration externe en substrat chez l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*. (NYHOLM, 1977).

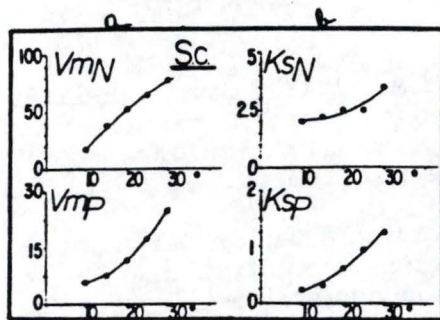


Fig.1.20. Evolution des paramètres V_m et K_m en fonction de la température.

- a) Relation entre la température et le paramètre V_m
- b) Relation entre la température et le paramètre K_m.

Symboles : V_m, vitesse d'assimilation maximale. K_s, constante de demi-saturation. (DAUTA, 1983).

Cinétique multiphasique

Chez *Euglena gracilis* (Z), l'assimilation du P dans une gamme de concentrations comprise entre 0 à 100 μ -mole de P présente un caractère multiphasique. Sur la droite d'Éadie-Hofstee présentée à la Fig. 1.18., trois phases caractérisées par des K_m et des V_m distincts apparaissent nettement. Une telle cinétique composite reflète probablement la multiplicité des systèmes de transport opérant dans des gammes de concentrations bien précises (CHISHOLM et STROSS, 1976a)

Chez l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*, NYHOLM (1977) met en évidence l'existence de deux systèmes de transport : l'un saturant à des concentrations en P de l'ordre de 500 μ g P/L, l'autre saturant à des concentrations supérieure de l'ordre de 1g/L. La Fig. 1.19. montre la superposition des deux courbes de Michaelis-Menten.

Ce phénomène semble largement répandu parmi les microorganismes et les plantes supérieures pour le P et pour d'autres ions (sulfate, potassium).

II.3. FACTEURS ABIOTIQUES ET BIOTIQUES INFLUENCANT LES PARAMETRES CINETIQUES

II.3.1. Facteurs abiotiques.

1. Température

L'assimilation dépend du métabolisme et est donc influencée par la température. Celle-ci peut agir directement en activant le système transporteur ou indirectement en accroissant la demande en P de la cellule. DAUTA (1983) étudie l'assimilation du P à des températures croissantes (de 10°C à 30°C). L'auteur observe une augmentation des paramètres V_m et K_m . L'évolution de ces paramètres en fonction de la température est montrée à la Fig. 1.20.

CRESS et al. (1979) mesurent le Q_{10} (coefficient de température d'une réaction défini par le rapport

$$Q_{10} = \frac{\text{taux de réaction à } T + 10^\circ\text{C}}{\text{taux de réaction à } T})$$

de la vitesse d'absorption du P par des racines de tomates. Ils obtiennent des valeurs proches de 2; l'assimilation du P est donc bien liée au métabolisme.

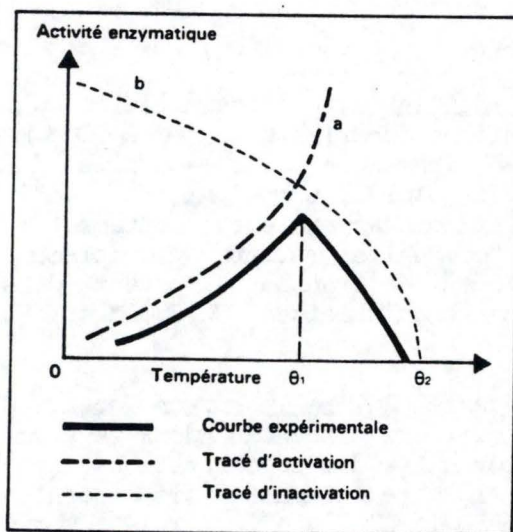


Fig.1.21. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la température.

Symboles : (—), courbe expérimentale (---), tracé d'activation. (-----), tracé d'inactivation. θ_1 température optimale pour laquelle l'activité enzymatique est maximale (LEHNINGER, 1979)

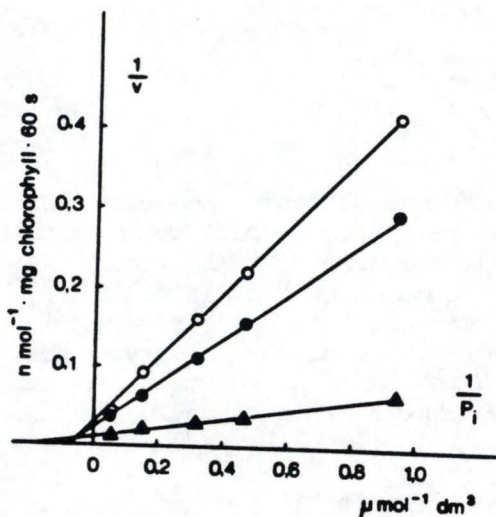


Fig.1.22. Représentation en double inverse de la dépendance de l'assimilation du P32 avec ou sans ajout de EDTA +/- Mg⁺⁺

Symboles : ▲, contrôle ○, contrôle + 400 μ mole/l de EDTA

●, contrôle + 400 μ mole/l de EDTA et 400 μ mole/l de Mg⁺⁺. (PORTIS et al., 1980)

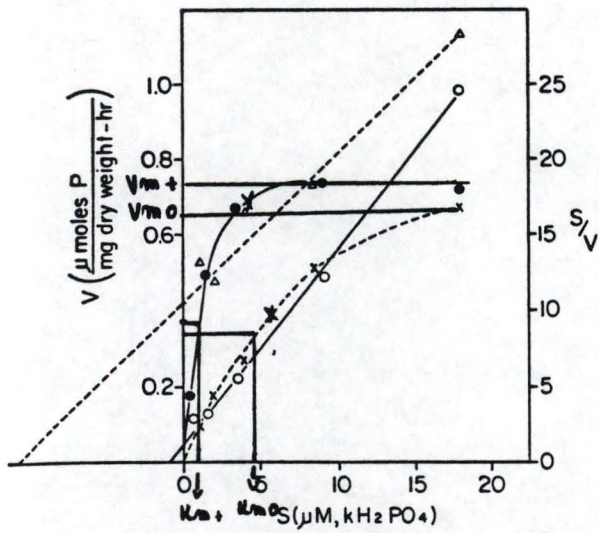


Fig.1.23.a Effet de la concentration en Mg^{++} sur la relation entre la vitesse d'assimilation et la concentration externe en substrat chez *Anabaena*.

Symboles : V_{m+} , vitesse d'assimilation maximale en présence d'ions Mg^{++} , K_{m+} , constante de demi-saturation en présence de Mg^{++} . V_{m0} , vitesse d'assimilation maximale sans ajout d'ions Mg^{++} . K_{m0} , constante de demi-saturation sans ajout d'ions Mg^{++} . (HEALEY, 1973, modifiée).

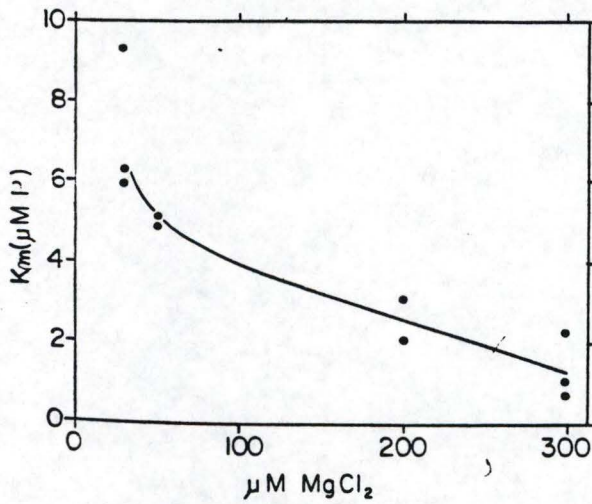


Fig.1.23.b Effet de la concentration en MgCl_2 sur la constante de demi-saturation dans différents milieux chez *Anabaena* (HEALEY, 1973).

L'augmentation de la vitesse avec la température peut s'expliquer par la loi d'Arrhenius.

$$\log K = A - \frac{Q}{RT}$$

k : constante de vitesse de la réaction (temps⁻¹)

A : constante

Q : énergie d'activation de la réaction c'est-à-dire quantité minimum d'énergie nécessaire pour franchir la barrière énergétique qui empêche la réaction de se produire

R : constante des gaz

La vitesse de réaction (dans notre cas de transport) augmente avec la température jusqu'à atteindre une valeur maximale pour une température optimale (cette température est une caractéristique de l'enzyme A). Pour des températures supérieures, l'activité enzymatique (la vitesse de réaction) diminue progressivement car il y a dénaturation de l'enzyme. Le tracé de ces deux phases d'activation et d'inactivation est illustré à la Fig. 1.21.

2. Composition ionique du milieu

FA/KNER et al. (1980) mettent en évidence, chez l'algue bleue Anacystis nidulans, le rôle activateur joué par les cations bivalents (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) dans le transport du P (Fig. 1.22). Ils concluent de leurs expériences que le calcium et le magnésium doivent être présents dans le milieu pour que le P pénètre dans la cellule.

Chez Anabaena (HEALEY, 1973), l'ion magnésium affecte à la fois Km et Vm (Fig. 1.23). La vitesse d'assimilation augmente avec la concentration en Mg⁺⁺ présente dans le milieu, tandis que les apports croissants en Mg⁺⁺ augmentent, l'affinité du système transporteur. Si le milieu s'appauvrit en P, les besoins en Mg⁺⁺ s'accroissent. L'interaction de deux molécules (Mg⁺⁺ et PO₄^{- -}) sur le taux d'assimilation constitue un exemple de réaction limitée par deux substrats à la fois.

D'autres ions influencent l'assimilation du P. Ainsi, chez différents genres de Chlorococcales (Chlorella, Scenedesmus, Ankistrodesmus et Hydrodictyon); l'assimilation est stimulée par les ions sodium et lithium (RAVEN, 1974).

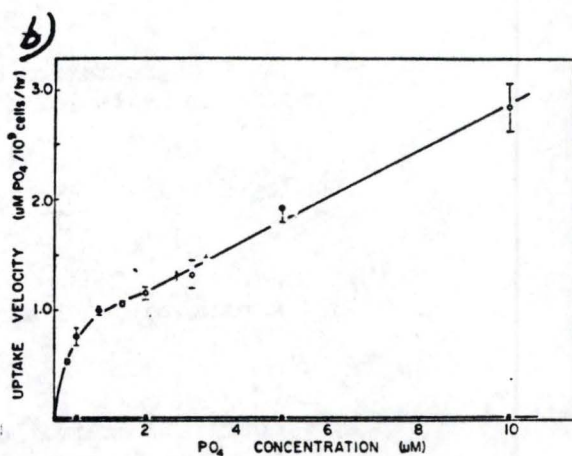
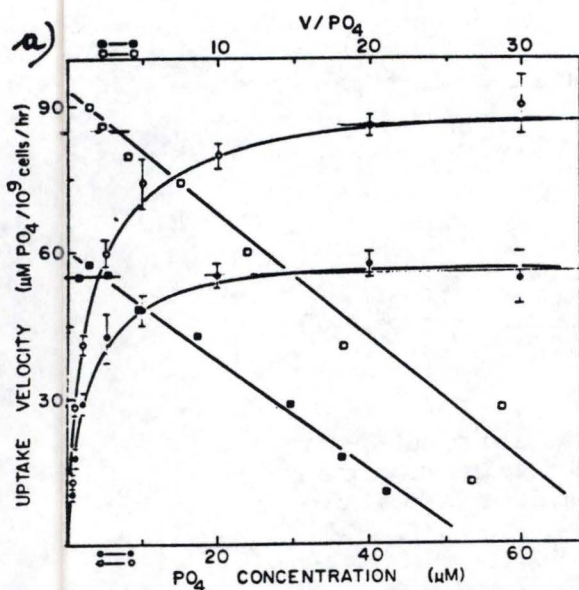


Fig. 1.24.a. Cinétique d'assimilation du P à la lumière (o) et à l'obscurité (●) chez *Euglena gracilis* (Z) cultivée en milieu riche en P. Représentation de Eadie-Hoast de la vitesse à l'obscurité (■) et à la lumière (□)
 V_m à la lumière : $93 \pm 7 \mu\text{M PO}_4^{3-}/10^9$ cellules/h/l
 V_m à l'obscurité : $60 \pm 2 \mu\text{M PO}_4^{3-}/10^9$ cellules/h/l
 Les valeurs de K_m obtenues dans les deux conditions ne sont pas significativement différentes.
 K_m à la lumière : $2,6 \pm 0,6 \mu\text{M PO}_4/1$
 K_m à l'obscurité : $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M PO}_4/1$ (CHISHOLM et STROSS, 1976a).

Fig. 1.24.b Cinétique d'assimilation du P à la lumière (○) et à l'obscurité (●) chez *Euglena gracilis* (Z) cultivée en milieu pauvre en P. (CHISHOLM et STROSS, 1976b).

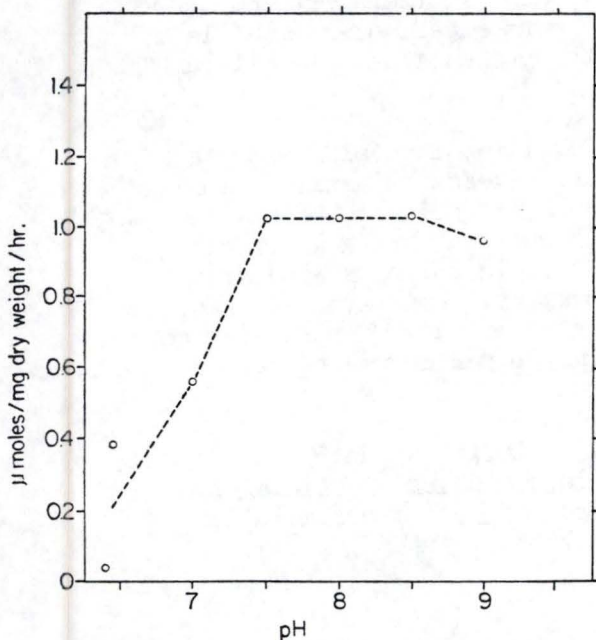


Fig. 1.25. Effet du pH sur l'assimilation du P chez *Anabaena* (HEALEY, 1973).

3. Lumière

L'influence de la lumière sur l'assimilation n'est pas très claire et semble varier largement d'une espèce à l'autre. Dans l'état actuel des connaissances, aucune conclusion générale ne peut être tirée. Nous nous limiterons donc à une approche ou "cas par cas" de la question.

CHISHOLM et STROSS (1976 a) observent que l'assimilation du P chez Euglena gracilis (Z) cultivée dans un milieu pauvre en P est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité comme le montre la Fig.1.24.a., la vitesse est réduite de 30 % à l'obscurité. Des observations similaires ont été faites chez les algues Anabaena (HEALEY, 1973), et Anacystis nidulans (FALKNER et al., 1980) et chez la plante supérieure Lemna gibba G1 (ULLRICH-EBERIUS et al., 1984). L'assimilation du P semble donc être stimulée par la lumière mais n'est pas dépendante de celle-ci.

Ce caractère non dépendant ne peut cependant être généralisé. CHISHOLM et STROSS (1976 b) réalisent une étude cinétique sur une culture d'Euglena gracilis (Z) transférée d'un milieu riche dans un milieu pauvre au moment de la mesure. Dans ce nouvel environnement, l'espèce n'assimile plus du tout le P (Fig. 1.24.b.).

FALKNER et al. (1980) expliquent l'activation de l'assimilation par la lumière chez l'algue bleue Anacystis nidulans par la composition ionique particulière du cytoplasme lors de la photosynthèse et donc en présence de lumière.

Chez l'algue bleue, comme dans un chloroplaste, lors de la photosynthèse, des protons pénètrent dans l'espace thylacoïdien (le gradient en proton ainsi établi est couplé à la formation d'ATP). Cet influx, pour éviter un déséquilibre de charge, est compensé par un efflux d'ions Mg^{+} ; ions dont le rôle stimulateur chez cette espèce a été explicite au paragraphe précédent.

4. pH

Chez beaucoup d'espèces, il existe une gamme de pH pour laquelle le taux d'assimilation est optimal. Par exemple la diatomnée Asterionella assimile le P plus vite à des pH situés entre 6 et 7 (MACKERETH, 1953). D'après HEALEY (1973), l'assimilation chez Anabaena est optimale à des pH situés entre 7,5 et 8,5 (Fig. 1.25.).

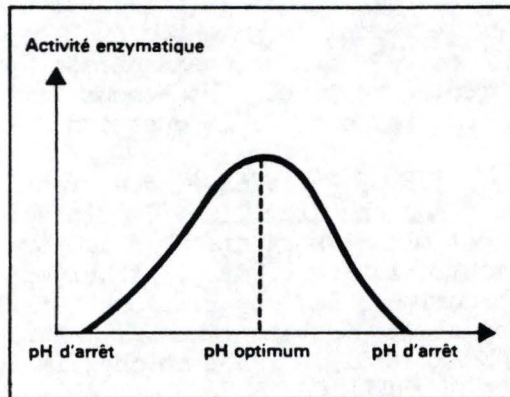


Fig.1.26. Influence du pH sur la vitesse d'une réaction enzymatique (LEHNINGER, 1979).

L'action du pH peut se manifester à différents niveaux :

- 1) activité enzymatique : chaque enzyme présente un pH optimal auquel son activité est maximale (Fig. 1.26.)
- 2) degré d'ionisation des ions phosphates : plus la molécule sera chargée, plus elle pénétrera difficilement dans un compartiment chargé négativement.
- 3) stimulation de la pompe à protons : si le transport du P est énergisé par un cotransport avec H⁺, une variation du pH externe modifie le gradient en pH et donc la vitesse d'assimilation (voir II.1.3.).

II.3.2. Facteurs biotiques

1. Stocks intracellulaires

Comme nous l'avons expliqué précédemment (II.2.3.) l'état des stocks intracellulaires détermine les valeurs de Km et Vm :

Rappelons que $K'm = Km$ quand $Q = Q_0$
et $V'm = Vm$ quand $Q = Q_0$

2. Taille cellulaire

(D'après MALONE, 1980; SMITH et KALFF, 1982)

Un ensemble de processus métaboliques (la respiration, la photosynthèse, la croissance, l'assimilation des nutriments) varient étroitement avec la taille de la cellule.

L'équation allométrique proposée par BANSE (1976) décrit ces relations :

$$Y = aX^b$$

Y : taux de croissance, d'assimilation ...

où a : constante

X : taille de la cellule

b : exposant allométrique

Si b est significativement inférieur à l'unité, le paramètre étudié diminue avec la taille de la cellule.

Le taux de croissance (μ max) diminue avec la taille : les petites cellules se multiplient plus vite que les grandes (voir stratégie r - stratégie K II.4.1. - II.4.2.).

Le taux d'assimilation (μ -max) augmente avec la surface de la cellule. La vitesse d'absorption mesurée par cellule est la somme de la capacité d'assimilation de chaque 'porteur' impliqué dans le transport. Ces 'porteurs' se répartissant à la surface de la cellule, plus celle-ci est grande, plus le nombre de sites de transport élevé et plus le P sera assimilé rapidement (voir II.2.2.).

Si une grande cellule assimile le P plus vite qu'une petite cellule, celui-ci se distribue, se répartit, dans un biovolume plus important. Puisque le rapport surface-volume (S/V) diminue avec la taille, la quantité de P arrivant, par unité de temps, en chaque point de la cellule diminue également avec la taille. Ceci signifie qu'une espèce 'bénéficiera' d'autant mieux du P qu'elle présentera un rapport S/V favorable (élevé).

Les espèces isolées assimilent le P plus rapidement que celles groupées en colonies car elles présentent une surface de contact avec les nutriments plus importante.

L'affinité pour le P (K_m) ne semble pas varier significativement avec la taille.

Le quota de subsistance (Q_0) diminue avec la taille. Les espèces de petite taille ont un métabolisme plus élevé que celles de grande taille (voir μ max plus élevé). Pour entretenir ce métabolisme très actif, celles-ci ont besoins de quantités de P plus importantes.

Le quota maximum (Q_m), quant à lui, augmente avec la taille de la cellule. Les grandes cellules présentent un biovolume important et par conséquent, une capacité de stockage des nutriments élevées (voir stratégie K-stratégie r).

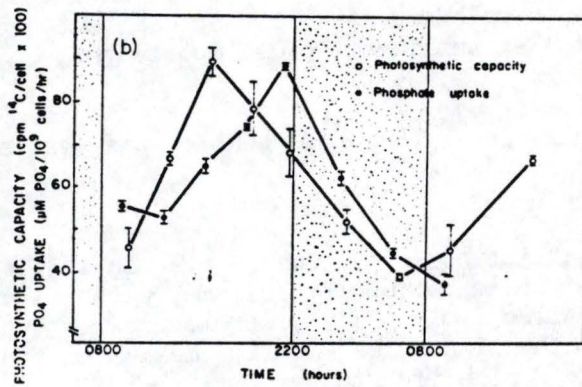


Fig.1.27. Evolution de la capacité photosynthétique (o) et de la vitesse d'assimilation du P (●) pendant un cycle de 24 heures chez *Euglena gracilis* (Z). (CHISHOLM et STROSS, 1976 b)

3. Variation interspécifiques

Les paramètres cinétiques sont propres à chaque espèce. La nature, l'efficacité et le nombre de molécules transporteur sont autant de caractères déterminés génétiquement. Cependant, selon SMITH et KALFF (1982), l'appartenance taxonomique explique un faible pourcentage de la variabilité au niveau de V_m et de K_m .

4. Variations clonales

Au sein d'une même espèce, des populations (clones) adaptées à divers milieux aquatiques présentent parfois des différences au niveau des paramètres cinétiques. Ainsi une souche vivant en milieu oligotrophe peut avoir une affinité plus grande (K_m plus faible) pour le P qu'une souche originaire d'un milieu eutrophe.

TILMAN et KILHAM (1976) ont identifié trois clones d'Asterionella formosa caractérisés par des K_m pour la silice différents.

Avant toute comparaison de paramètres cinétique il faut donc connaître l'origine exacte des souches utilisées (KILHAM, 1971; KILHAM, 1975; TILMAN et KILHAM 1976).

5. Variations au cours du cycle cellulaire

CHISHOLM et STROSS (1976) étudient à partir de cultures synchrones d'Euglena gracilis (Z) l'évolution de l'assimilation au cours du cycle cellulaire. Ils constatent que les algues consomment plus de P en début de division, ce qui s'explique par les phosphorylations précédant la synthèse du DNA.

CHISHOLM et STROSS (1976) observent chez Euglena gracilis (Z) des oscillations de V_m durant la journée. Comme l'illustre la Fig. 1.27., V_m atteint une valeur maximale juste avant la période sombre.

Cette rythmicité est endogène, c'est-à-dire inhérente à la cellule, donc indépendante du cycle de division, car elle se maintient chez les algues qui ne se divisent pas. Ces oscillations sont déterminées génétiquement par l'horloge biologique et pourraient dans certains cas constituer un avantage écologique. En effet, dans un milieu où les apports en phosphates sont irréguliers (pulses), une espèce dont le rythme d'assimilation se superpose à celui des apports est mieux adaptée (CHISHOLM et STROSS, *op. cit.*) Une telle synchronisation pourrait peut-être se réaliser en laboratoire mais est peu vraisemblable dans la nature car les apports en P sont vraisemblablement répartis irrégulièrement dans le temps.

6. Variations enzymatiques

Comme il a été vu précédemment (II.2.5.), chez une même espèce, il peut exister différents systèmes de transport caractérisés par des paramètres cinétiques différents et fonctionnant dans des conditions précises.

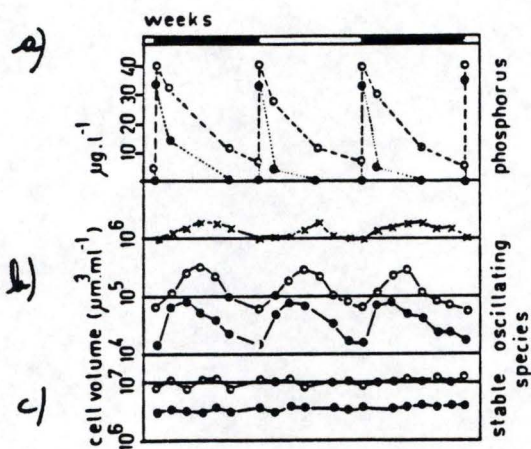


Fig.1.28. Evolution de la biomasse de cultures dans lesquelles le P est apporté sous forme de pulses (Si : P = 200 : 1)

- a) concentration en P total (o) - concentration en SRP (●)
- b) évolution de la biomasse chez des espèces oscillantes (stratégie r) x : *Mougeotia thylespora*; o : *Scenedesmus quadricauda*; ● : *Chlorella* sp.
- c) évolution de la biomasse chez deux espèces stables (stratégie K) o : *Synedra acus*; ● : *Diatoma elongatum* (SOMMER, 1984).

II.4. COMPETITION POUR LES RESSOURCES

(D'après KILHAM et KILHAM, 1980;
DAJOZ, 1985)

Un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques contrôlent la dynamique du phytoplancton : la lumière, la température, le grazing, la sédimentation, les nutriments. Parmi ceux-ci, la compétition interspécifique pour les ressources joue un rôle déterminant.

L'utilisation des ressources nutritives varie selon les espèces. Les unes investissent une grande partie de la nourriture absorbée dans la reproduction, les autres l'utilisent pour des activités autres que la reproduction : dispersion, compétition... Selon le type de stratégie adopté, on parlera d'espèce r et d'espèce K (MAC ARTHUR et WILSON, 1967).

II.4.1. Espèce à stratégie r.

Les espèces à stratégie r vivent dans un milieu instable, temporaire. Dans le cas du phosphore, il s'agirait d'un milieu où les apports se font par pulses. Ce milieu est non saturé, c'est-à-dire qu'il n'a pas atteint sa charge biotique maximale; la compétition pour les ressources y est donc faible. Un tel milieu favorise la productivité plutôt que l'efficacité.

Dès qu'il y a un apport en P, les espèces r se multiplient; le P assimilé n'est pas stocké. Si le milieu s'appauvrit, elles disparaissent au profit d'espèces capables de stocker le P. Sur la Fig. 1.28 **b** nous remarquons que les effectifs d'une espèce à stratégie r évoluent de la même façon que les ressources (espèce oscillante).

II.4.2. Espèce à stratégie K.

Les espèces à stratégie K vivent dans un milieu stable et saturé où la compétition pour les ressources joue un rôle important. Elles présentent un taux de croissance faible mais sont efficaces dans l'utilisation des nutriments. Au lieu d'investir tout le P assimilé dans la reproduction, elles le stockent. Lorsque celui-ci devient limitant, elles peuvent se multiplier aux dépens de leurs réserves intracellulaires et maintenir leurs effectifs stables (Fig. 1.28 **c**).

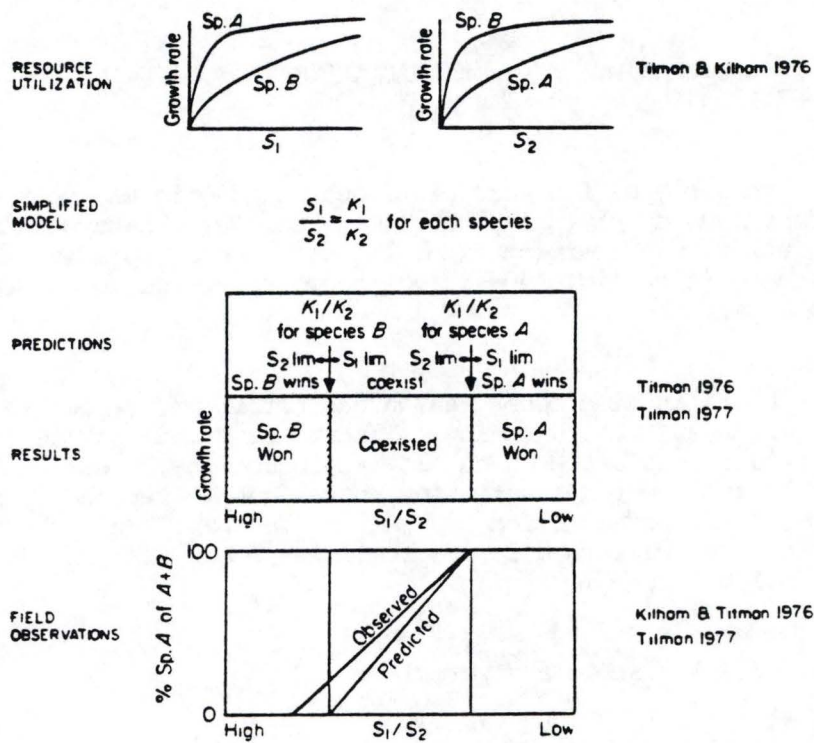


Fig. 1.29. Description des différentes étapes de l'étude de la compétition pour les ressources.

- caractérisation de la capacité d'utilisation de deux ressources (1 et 2) de deux espèces A et B.
S : concentration en substrat.
- Modèle de Monod simplifié.
Une espèce présente un taux de croissance maximal dans un milieu donné lorsque le rapport entre les concentrations externes des deux ressources S_1/S_2 est optimal, c'est-à-dire égal au rapport de sa capacité d'utilisation (K) de chaque substrat. K = constante de demi-saturation c'est-à-dire concentration en substrat pour laquelle $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$
- Prédictions, à partir du modèle, de la répartition des deux espèces le long d'un gradient S_1/S_2 .
Lorsque le gradient est faible, l'espèce A est dominante. Lorsqu'il est élevé, l'espèce B devient dominante. Les deux espèces coexistent pour des valeurs du gradient intermédiaires.
- Vérification du modèle in situ (lac Michigan).
Abondance relative des deux espèces le long d'un gradient S_1/S_2 . Comparaison des valeurs prédites par le modèle et des valeurs effectivement mesurées.
(KILHAM et KILHAM, 1980).

II.4.3. Modélisation de la compétition.

Les modèles utilisés dans l'étude de la compétition pour les ressources sont basés sur la relation de Monod. Un exemple de ce type de modèle et de sa vérification in situ est donné à la Fig.1.29. Soit deux espèces A et B, entrant en compétition pour deux substrats S1 et S2; pour le substrat S1, A a une meilleure efficacité d'utilisation que B ($KS_{1A} < KS_{1B}$); c'est l'inverse pour le substrat S2 ($KS_{2B} < KS_{2A}$), c'est-à-dire que B, utilisant mieux S2, atteint rapidement son taux maximal de croissance μ_{max} . On suppose enfin que $\mu_{max A} \approx \mu_{max B}$. Si l'on fait varier S1 et S2, ou le rapport S1/S2, le modèle montre que l'espèce B se développe seule quand S1/S2 est élevé; par contre, lorsque le rapport S1/S2 est faible, c'est l'espèce A qui est seule présente.

La coexistence des deux espèces n'est possible que pour des valeurs de S1/S2 intermédiaires. En d'autres termes, deux espèces ne coexistent que si elles sont limitées par des nutriments différents. C'est le principe de l'exclusion compétitive.

Ce modèle a été vérifié pour deux diatomées au lac Michigan : *Cyclotella meneghiniana* et *Asterionella formosa*, dont la croissance en fonction de la silice et du phosphore a été étudiée en culture. *Cyclotella* se développe mieux à des concentrations externes en Si faibles; par contre, *Asterionella* se multiplie mieux à des concentrations externes en P faibles. Un modèle comme celui décrit ci-dessus ne permet pas d'expliquer le maintien, malgré la compétition de la diversité spécifique du phytoplancton naturel ou ce que HUTCHINSON (1967) appelle le paradoxe du phytoplancton, c'est-à-dire la coexistence de plusieurs espèces limitées par le même nutriment.

La théorie sur laquelle se basent la plupart des modèles de compétition présuppose que les habitats sont homogènes dans l'espace et dans le temps, autrement dit que les apports en nutriments ne fluctuent pas, restent constants (conditions 'steady-state'). Les biotopes naturels sont typiquement structurés, hétérogènes : les apports en nutriments fluctuent dans l'espace et dans le temps. Ainsi par exemple, la présence de zooplancton peut créer localement un apport, un 'patchiness' de nutriments par excrétion et engendre une microhétérogénéité locale.

En ajoutant aux modèles cette variabilité spatiale et temporelle, on peut rendre compte de la diversité des communautés naturelles.

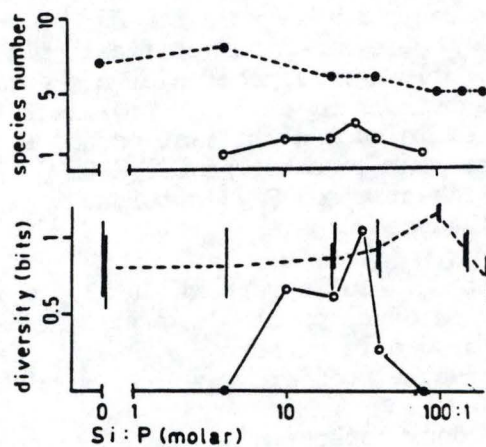


Fig.1.30. Comparaison du nombre d'espèces et de la diversité spécifique de cultures où les apports en P sont constants et d'autres où ils sont effectués sous forme de pulses.

a) nombre d'espèces dans une culture aux apports constants (o) et aux apports pulsés (●)

b) indice de diversité (indice de Shannon).
Culture en continu (o)-culture aux apports pulsés (---)
(SOMMER, 1984)

Des expériences réalisées par SOMMER (1984) illustrent ces propos. L'auteur compare la diversité spécifique (elle est exprimée par l'indice de Shannon) dans une culture en chemostat (apports en nutriments constants) et dans une culture où les apports en nutriments se font par 'pulses'. La Fig. 1.30, fait apparaître que pour un même gradient Si : P, la culture où les apports sont pulsés présente une plus grande diversité spécifique.

II.4.4. Compétition algues-bactéries.

Dans les modèles classiques du cycle de la matière, les bactéries sont considérées comme responsables de la minéralisation de la matière organique et par conséquent du recyclage des substances minérales comme le phosphore, l'azote. Contrairement au phytoplancton, elles trouvent les éléments indispensables à leur croissance en décomposant les molécules organiques du milieu.

Certaines études réalisées en milieu lacustre (CURRIE et KALFF, 1984; VADSTEIN et al., 1988) tendent à modifier cette conception classique.

Selon les auteurs, les bactéries sont des consommateurs nets de P inorganique et entrent en compétition avec le phytoplancton pour les ressources. CURRIE et KALFF (op.cit.) rapportent une contribution bactérienne à l'assimilation totale du P proche de 95 % en milieu oligo à mésotrophe. Cette contribution relative élevée reste constante, même lors de la production de blooms phytoplanctoniques.

Les algues utiliseraient pour leur croissance une autre source de P que les orthophosphates : une molécule organique riche en P excrétée par le bacterioplancton.

VADSTEIN et al.(op.cit.) observent des valeurs similaires dans un lac eutrophe.

Ils expliquent l'importance de la contribution bactérienne dans l'assimilation des orthophosphates par leur rapport P : C élevé (celui-ci varie entre 2,5 et 55 μ gP/mgC pour le phytoplancton et entre 34 et 360 μ gP/mgC dans le cas du bacterioplancton. Selon FUHRMAN et AZAM (1982), ces différences sont liées au fait que les bactéries contiennent plus d'ADN que les algues.

Quant à la valeur des paramètres cinétiques V_m et K_m , les résultats semblent différer selon que l'on étudie l'assimilation à partir de cultures monospécifiques en milieu synthétique ou d'échantillons naturels.

FUHS et al. (1972) rapportent des valeurs de K_m et de V_m plus élevées pour les bactéries que pour les algues (Tabl. 1.2.). Des mesures cinétiques réalisées par SIUDA et CHROST (1987) sur des échantillons naturels provenant d'un lac eutrophe indiquent que les bactéries présentent une plus forte affinité pour le P (K_m cinq fois plus faible que celui des algues et un V_m plus faible (Fig.1.31.).

ALGAE AND BACTERIA	MEAN CELL VOLUME (μm^3)	MEAN CELL SURFACE (μm^2)	a_0 (10^{-20} g-atom P)	μ_m (doublings per day)	K_m (10^{-4} g-atom P liter $^{-1}$)	V_m (10^{-20} g-atom P μm^{-2} day $^{-1}$)
Diatoms						
<i>Cyclotella nana</i>	77.5	103	0.95	1.6	0.6	2.0
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	1570	826	12.5	1.6	1.7	7.3
Bacteria						
<i>Corynebacterium bovis</i>	0.71	6	0.19	4.8	6.7	7.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.41	4.2	0.10	48	12.2	17.9
<i>Bacillus subtilis</i>	0.39	3.9	0.15	12	11.3	12.5

Tabl. 1.2. Mesure des paramètres de croissance et d'assimilation du P pour deux espèces de diatomées et trois espèces bactériennes.

a_0 = quota de subsistance de la cellule

μ_m : taux de croissance maximum à la t° de 22°C (les autres conditions sont optimales)

K_m : constante de demi-saturation de l'assimilation

V_m : vitesse d'assimilation maximum par unité de surface.
(FU HS et al., 1972).

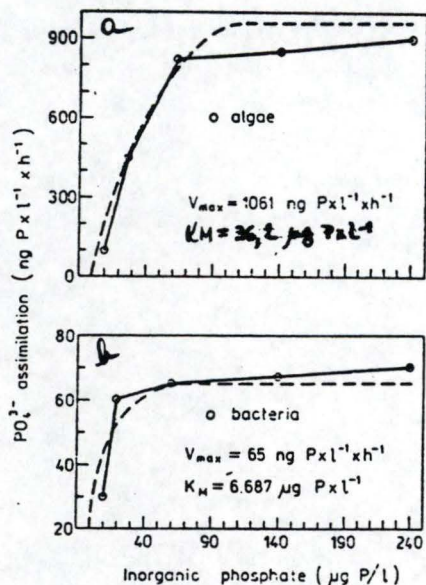


Fig. 1.31. Relation vitesse-substrat pour la fraction algale (a) et la fraction bactérienne (b).

V_m : vitesse d'assimilation maximale

K_m : constante de demi-saturation.

Les lignes en pointillé représentent l'ajustement des points obtenu par ordinateur.

DEUXIEME PARTIE :

MATERIEL ET METHODES

I. AVANT-PROPOS

Ce chapitre a été rédigé en fin d'expérimentation; il constitue une synthèse de l'ensemble des problèmes pratiques rencontrés au cours des expériences. Nous considérons que chacun de ceux-ci a de l'importance car une étape mal soignée ou mal conçue peut compromettre ou du moins compliquer l'interprétation finale des résultats. La méthodologie que nous retiendrons pour l'étude de l'assimilation du P par des échantillons naturels n'est en aucun cas la recette miracle! Nous sommes conscients des améliorations qu'il faudrait encore y apporter pour rendre son usage plus aisé et mieux l'adapter aux conditions naturelles.

Durant ces quatre mois d'expérimentation, nous avons, dans un premier temps, travaillé avec des cultures de *Chlorelles* afin de mettre au point la méthode. Dans une seconde phase, nous avons tenté d'adapter cette technique à l'étude de l'assimilation du P par des échantillons naturels.

II. ETUDE DE L'ASSIMILATION EN CULTURE ET EN MILIEU NATUREL : APERÇU GENERAL

Les conditions diffèrent selon que l'on étudie l'assimilation du P par des cultures ou par des échantillons naturels. Le schéma expérimental devra être adapté en conséquence.

Les cultures sont monospécifiques et axéniques (il n'est cependant pas toujours possible d'obtenir des cultures non contaminées car des bactéries s'absorbent sur la paroi de certaines algues, notamment les diatomées).

Le plancton naturel se compose d'un ensemble hétérogène d'espèces algales et bactériennes et la composition spécifique n'est pas constante : elle présente des variations spatiales et temporelles.

Les densités de cellules rencontrées en culture sont beaucoup plus élevées que celles qui existent en milieu naturel.

L'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer le taux d'assimilation d'une culture est connu et contrôlable. En milieu lotique, le temps de séjour du potamoplancton en un endroit donné est très court. Dès lors, la réponse cinétique observée ne dépend pas uniquement des conditions prévalant en ce lieu; l'état physiologique des algues dépend des conditions de croissance qu'elles ont connu dans le secteur amont. Ces événements antérieurs ne sont pas connus de l'expérimentateur.

En travaillant sur une espèce isolée, l'expérimentateur peut suivre l'état des stocks intracellulaires et distinguer un taux d'assimilation maximal apparent d'un taux d'assimilation absolu. Ce suivi n'est pas possible en présence d'un ensemble d'espèces différentes, dans un échantillon d'eau naturel, non conditionné au départ.

Il est assez aisé de carencer en P une culture monospécifique. La composition spécifique reste constante et un ajout en excès des autres nutriments permet d'étudier les effets liés à l'appauvrissement du milieu en une seule substance. Carencer des échantillons naturels en les mettant en culture pendant un certain temps sans renouveler le milieu pose le triple problème du changement de la composition spécifique, de la prolifération des bactéries et de la carence possible en une autre substance que celle dont on étudie l'assimilation.

	COMPOSES CHIMIQUES	CONCENTRATIONS mg / litre
Milieu de base	MgSO ₄ , 7H ₂ O	25
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	1
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	25
	Na ₂ EDTA	1
	NaHCO ₃	50
	Na ₂ CO ₃	5
Oligo- Eléments	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,020
	CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,020
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,400
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,010
	Bo ₃ H ₃	0,001
	Na ₂ MoO ₄	0,035
	Nutriments	KNO ₃
K ₂ HPO ₄		25
SiO ₂ Na ₂ O , 5H ₂ O		212

Tabl.2.1. Composition du milieu de culture de Dauta (DAUTA, 1983).

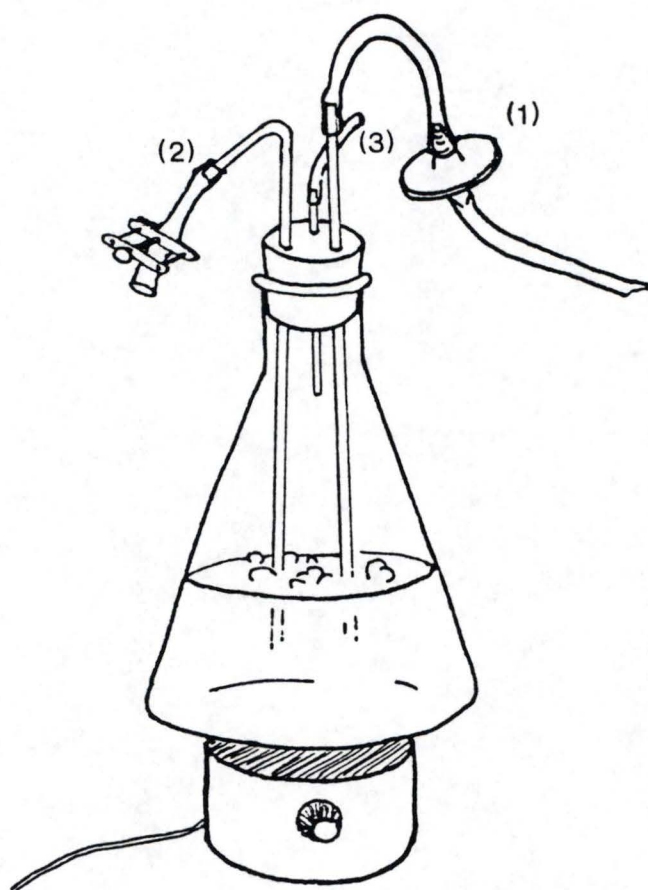


Fig.2.1. Fioule cônica utilizada para as culturas líquidas de algas.

- (1) apport d'air comprimé via un filtre 0,2 μm
- (2) tube de prélèvement
- (3) tube de sortie des gaz

(GOSELAIN, 1988)

III. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P SUR DES CULTURES DE CHLORELLA.

Afin de mettre au point le procédé expérimental, un stage de trois jours a été effectué à l'Université Paul Sabatier de Toulouse dans le laboratoire du Docteur Alain Dauta.

III.1. TECHNIQUES DE CULTURES D'ALGUES MONOSPECIFIQUES

(D'après GOSSELAIN, 1988)

Les souches de collection proviennent du laboratoire d'Algologie de l'Université de Liège (Département de Botanique), où elles sont maintenues sur milieu de culture solide coulé dans des éprouvettes et conservées pendant 2 à 3 mois en chambre froide à 12°-13°C. La première semaine, les tubes sont placés à la lumière, aux intensités suivantes :

DIATOMEES : 50 - 100 μ E.m-2.S-1

ALGUES VERTES : 100 - 150 μ E.m-2.S-1

Ensuite, ils sont gardés sous intensité lumineuse plus faible (mais pas à l'obscurité). Pour nos expériences, le milieu utilisé est le milieu Dauta (DAUTA, 1983) dont la composition est détaillée au Tabl. 2.1. L'absence de composés organiques réduit la prolifération des bactéries et la forte teneur en bicarbonates permet de la tamponner et de mettre à la disposition des algues un stock important de CO₂.

Le milieu est stérilisé par autoclavage et est solidifié en ajoutant de l'agar. Avant de remettre en culture les algues en milieu liquide, elles sont repiquées sur boîte de Pétri, sur le même milieu solide. Ces nouvelles souches peuvent être conservées une dizaine de jours; il faut les repiquer ensuite sur une nouvelle boîte. La mise en culture se fait généralement dans un litre de milieu liquide contenu dans de grandes fioles cônes (Fig. 2.1.), fermées par un bouchon de caoutchouc muni de trois tubes en verre :

- un long tube de prélèvement
- un long tube d'apport d'air comprimé sur lequel est fixé un filtre de porosité égale à 0,2 μ m.
- un tube court pour la sortie des gaz.

L'extrémité de chacun des tubes est prolongée par un petit caoutchouc. Une pince de Mohr ferme le tube de prélèvement. Celui-ci se fait en ouvrant la pince et en pinçant le tube de la sortie des gaz. La surpression qui en résulte provoque une montée de liquide dans le tube de prélèvement.

Les cultures sont mises à incuber avec bullage d'air comprimé. L'intensité lumineuse est de $125 \mu\text{E.m}^{-2}\text{S}^{-1}$ et la photopériode est de 16:9 L:D. La température optimale pour les algues vertes est de 20 à 25° C et pour les diatomées de 13°C. Les cultures liquides sont conservées une semaine puis elles seront diluées avec du milieu neuf pour éviter une prolifération trop importante des algues et un appauvrissement du milieu en substances nutritives.

III.2. PRECONDITIONNEMENT DES ALGUES

(D'après DAUTA, 1983).

Rappelons (II.2.3.) que pour déterminer un taux d'assimilation maximal absolu, il faut que les algues soient carencées ($Q = Q_0$). Des cultures en phase exponentielle de croissance sont placées dans un milieu riche en nutriments (1 mmole NO_3 , 1 mmole SiO_2 , 70 μmoles de $\text{PO}_4/1$) durant 6 à 8 heures, dans des conditions optimales de température et de lumière. Durant cette période, on suppose que les algues constituent des réserves intracellulaires proches de la limite supérieure (Q_m). Ensuite, celles-ci sont récupérées par filtration douce et lavées plusieurs fois avec un milieu de culture dépourvu en P. Les cultures sont remises dans un milieu neuf où les autres nutriments sont fournis en excès (la culture ne risque donc pas d'être limitée par deux nutriments à la fois). Le suivi de la densité optique (DO) de la culture permet de déterminer l'arrêt de la croissance (si la DO se stabilise, le taux de croissance est nul). On admet que cet arrêt est dû au fait que les stocks intracellulaires sont minima ($Q = Q_0$).

III.3. SUIVI QUOTIDIEN DE LA CULTURE

III.3.1. Mesure de la biomasse

1. Comptages cellulaires

Les comptages de cellules se réalisent au microscope avec la cellule de Burker

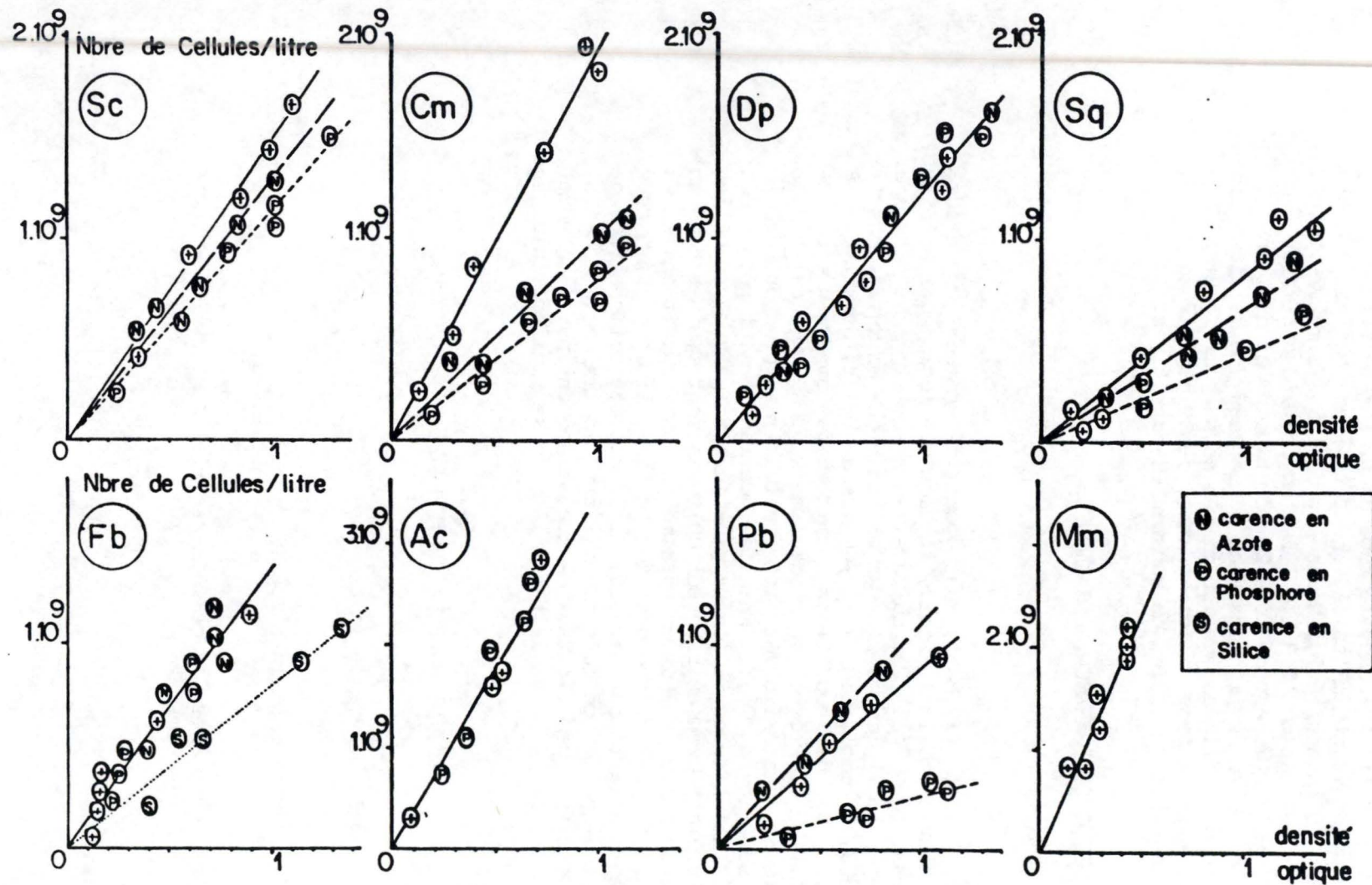


Fig.2.2. Relations entre le nombre de cellules et la densité optique en fonction de l'état nutritionnel.
(DAUTA,1983)

Cette cellule est constituée de plusieurs carrés ayant chacun un volume de 0.004 mm³. En connaissant le nombre moyen de cellules par carré et le volume de l'échantillon d'où elles ont été prélevées, on détermine le nombre total N de cellules contenu dans l'échantillon par la formule :

$$N = \bar{x} \cdot 2,5 \cdot 10^5 \cdot V$$

\bar{x} : nombre moyen de cellules par carré
V : volume total de l'échantillon en ml.

Le nombre de carrés compté est choisi de manière à ce que le facteur de conversion entre le volume de la cellule et le volume de l'échantillon soit inférieur à 10. Le comptage sera répété trois fois à partir de trois prélèvements différents du même échantillon.

2. Densité optique

(D'après DAUTA, 1983)

La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre avec des cellules de 2 cm. La DO mesure l'absorbance de la chlorophylle a à une longueur d'onde de 680 nm. Elle dépend de la taille des cellules et de la concentration en chlorophylle a de l'échantillon; elle est donc proportionnelle au nombre de cellules. La relation entre la DO et le nombre de cellules est linéaire. La pente de la droite est propre à chaque espèce et peut varier avec l'état nutritionnel de l'espèce (Fig. 2.2.).

Ce dernier phénomène s'explique par le fait que la taille des cellules et le nombre de celles constituant les cénobes ou les agrégats varient selon que l'espèce est carencée ou non.

3. Chlorophylle a

(D'après GOSSELAIN, 1988)

a) Principe.

Un volume d'eau est prélevé et filtré sous vide sur un filtre en fibre de verre retenant les algues. L'extraction des pigments chlorophylliens est obtenue à l'aide d'un solvant : un mélange dans les proportions 5/1 (vol/vol) d'acétone 90 % et de méthanol proposé par PECHAR (1987). L'extraction se pratiquera à 65° C pendant 2 minutes. L'absorbance est mesurée à 665 nm.

La lecture de l'absorbance après acidification permet de supprimer l'erreur due à la présence éventuelle de pigments chlorophylliens dégradés (LORENZEN, 1967). En effet, elle transforme la chl a en phéopigments, alors que cette transformation ne se produit pas pour les pigments déjà dégradés, et produit une diminution de l'absorbance. Par la différence des deux lectures au spectrophotomètre, on peut déterminer la teneur en chl a "active".

L'emploi comme solvant d'un mélange acétone-méthanol 5/1 combine les avantages d'une extraction quasi totale (méthanol) avec une bonne stabilité de l'extrait et une mesure fiable des phéopigments, grâce à une acidification sans problème de déplacement de spectre (acétone).

b) Procédure et expression des résultats.

On filtre un prélèvement d'eau sous vide, sur filtre whatman GF/C de 25 mm de diamètre, de manière à avoir une concentration en chl a dans l'extrait située plus ou moins entre 0,01 μg et 0,003 μg . Les filtres sont placés dans des tubes de centrifugation dans lesquels il sera ajouté 10 ml de solvant. L'extraction s'effectue dans un bain à 65°C pendant deux minutes. Ensuite les filtres sont repoussés au fond du tube et les tubes centrifugés à la centrifugeuse de table. Cette dernière opération demandera cinq minutes. On prélève ensuite 3 ml d'extrait et l'on mesure l'absorbance à 665 nm dans des cellules de 1 cm de trajet optique. Le même extrait est acidifié avec 0,1 ml de HCl 0,1 N. Une à deux minutes après mélange, l'absorbance est à nouveau mesurée à 665 nm. La mise à zéro de l'appareil est réalisée avec un blanc solvant.

La concentration en chl a se calcule par la formule suivante : (MARKER et al., 1980)

$$C = (D_b - D_a) \frac{R}{R - 1} \cdot k \cdot \frac{v}{V \cdot l}$$

où C : concentration en chl a exprimée en $\mu\text{g/L}$

D_b : densité optique avant acidification

D_a : densité optique après acidification

R : "acid ratio" maximum

$$k = \frac{1000}{\text{SAC}}$$

v : volume de solvant en ml

V : volume total d'eau filtrée en ml

l : longueur du trajet optique de la cellule en cm

L'"acid ratio" est le rapport entre l'absorbance de la chl a pure à 665 nm avant et après acidification. Selon la méthode de PECHAR (op cit.), ce rapport maximum est de 1,695.

Le SAC (Specific Absorption Coefficient) de la chl a dans ce mélange acétone-méthanol 5/1 est de 84,1 $\mu\text{g/ml/cm}$.

Par conséquent, on peut écrire la relation exprimant la teneur en chl a pour le mélange acétone-méthanol 5/1 comme suit :

$$\text{chl a } (\mu\text{g/l}) = (\text{Db}-\text{Da}) 2,439 - 11,89 \frac{v}{V.l}$$

III.3.2. Dosage du P soluble

La concentration des orthophosphates dans l'eau est mesurée à partir d'eau filtrée sur whatman GF/C par la formation, en présence d'un complexe de molybdate d'ammonium en milieu acide, d'un complexe phosphomolybdique, lequel, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue. Celle-ci permet un dosage colorimétrique par lecture à 882 nm, de préférence dans des cellules de grande épaisseur (2,5 cm) afin d'augmenter la précision de la mesure aux faibles concentrations. La précision est de 0,01 mg/l PO₄ - P (GOLTERMAN, 1969).

III.4. MESURES CINÉTIQUES

III.4.1. Méthode chimique.

La méthode chimique consiste à doser par la réaction décrite ci-dessus le P soluble en début et en fin d'incubation. La quantité de P disparue divisée par le temps d'incubation donne la vitesse d'assimilation.

Cette technique sous-estime le taux d'assimilation lorsque du phosphore organique dissous (DOP) est excrété par les algues ou les bactéries durant la période d'incubation. En effet, le dosage chimique des orthophosphates se réalisant en milieu acide, certaines molécules organiques, non directement assimilables peuvent s'hydrolyser (JORDAN et DINSMORE, 1985)

III.4.2. Méthode radiologique

(D'après BROWN et HARRIS, 1978)

On ajoute dans le milieu de faibles quantités de ^{32}P utilisé comme traceur; le suivi du marquage des cellules, recueillies sur un filtre adéquat, permet de mesurer la vitesse avec laquelle le ^{32}P est incorporé par les algues. Celles-ci suppose-t-on, assimilent indifféremment le P marqué et le P non marqué.

En connaissant le taux d'assimilation du ^{32}P (v^*), les concentrations initiales en ^{31}P (S) et en ^{32}P (C), il sera possible de calculer le taux d'assimilation du ^{31}P (v) par l'équation suivante :

$$v = v^* \frac{S}{C} \quad (1)$$

Détermination de v^* .

A une concentration en ^{31}P donnée, on suit, au cours du temps, la quantité de ^{32}P (exprimée en nombre de coups par minute : CPM) apparaissant dans les algues. Le processus d'assimilation est stoppé au temps voulu par filtration rapide et dilution du substrat par de l'eau distillée ou du milieu sans P. Si l'entrée du P dans les cellules est constante, la relation entre le temps et le ^{32}P assimilé est linéaire. La pente de la droite exprimée en CPM/temps mesure la vitesse (v^*).

Lorsque les algues sont très carencées, elles assimilent le P rapidement durant les premières minutes. Ensuite, le taux d'assimilation diminue car les stocks se remplissent et les mécanismes de feedback se mettent en place. En portant graphiquement le ^{32}P assimilé en fonction du temps on obtient deux droites de pentes différentes et deux mesures de vitesse pour une même concentration en ^{31}P .

Le but étant de déterminer une vitesse maximale la plus proche possible de la vitesse absolue (pour obtenir la vitesse absolue, il faudrait mesurer l'assimilation à des temps extrêmement courts; ce qui techniquement n'est pas faisable), on ne considère donc que la vitesse initiale. La droite reliant le 32P assimilé en fonction du temps ne passe pas par l'origine. En effet, l'activité détectée au temps 0 de l'expérience mesure la quantité de 32P absorbée non spécifiquement au niveau des algues et du filtre.

Courbe de Michaelis-Menten - Détermination des paramètres V_m , K_m , T_t .

La vitesse d'assimilation est déterminée aux concentrations in situ (S_n) et après des ajouts (A) croissants en 31P. En portant la vitesse en fonction de la concentration, on obtient une courbe de Michaelis-Menten dont l'équation est la suivante :

$$v = \frac{V_m (S_n + A)}{K_m + (S_n + A)} \quad (2)$$

Cette équation peut se linéariser sous la forme de Dixon (MOORE, 1972)

$$\frac{S_n + A}{v} = \frac{A}{V_m} + \frac{K_m + S_n}{V_m} \quad (3)$$

comme $v^* = v \frac{(S_n + A)}{C}$

L'équation (3) peut encore s'écrire sous la forme :

$$\frac{C}{v^*} = \frac{A}{V_m} + \frac{K_m + S_n}{V_m} \quad (4)$$

L'équation (4) se représente graphiquement par une droite montrée à la Fig. 2.3

L'ordonnée à l'origine est une mesure du temps de turnover (T_t), c'est-à-dire du temps nécessaire pour que tout le P du milieu soit assimilé. Il s'exprime en unité de temps. La vitesse maximale (V_m) est donnée par l'inverse de la pente de la droite.

L'abscisse à l'origine mesure la somme de la constante de demi-saturation (K_m) et de la concentration en P in situ (S_n).

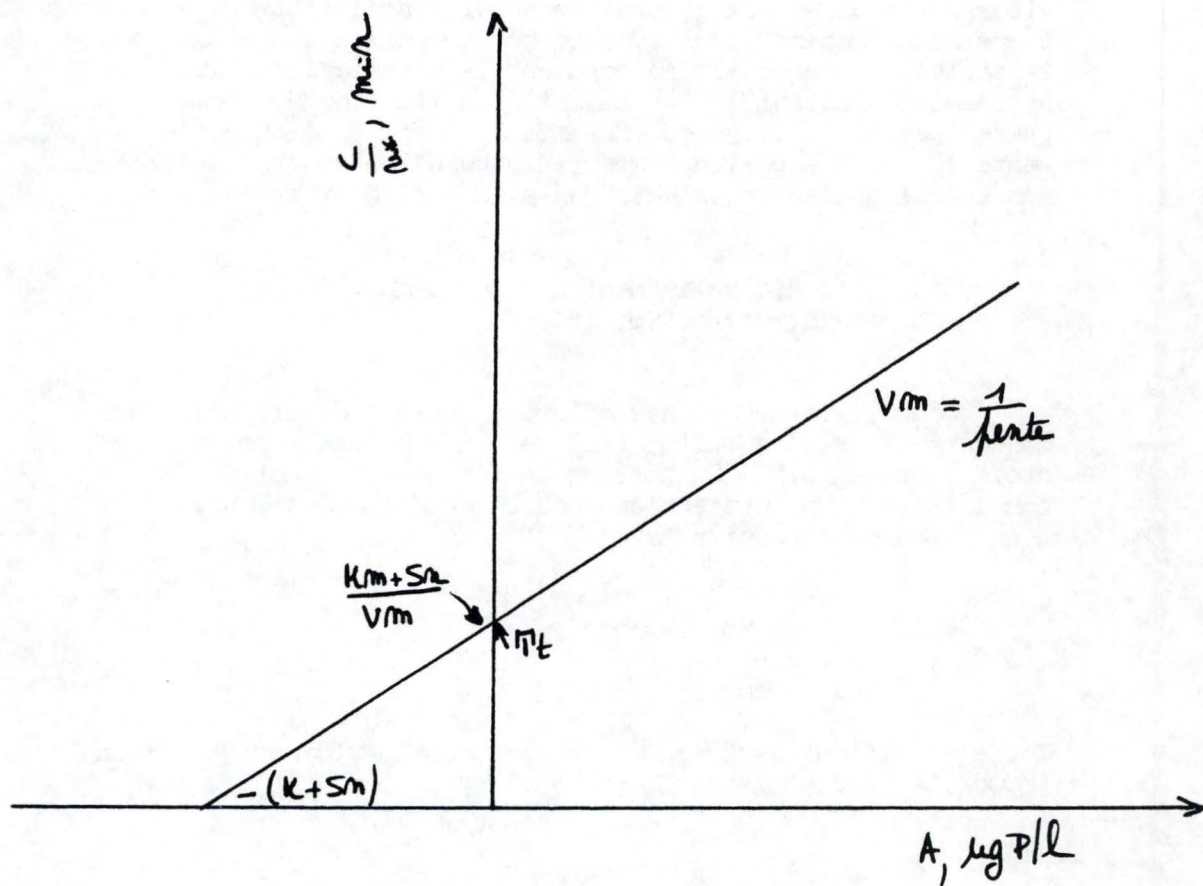


Fig.2.3. Relation théorique entre C/v^* et la concentration en P31 ajoutée (A)

V_m : vitesse maximale d'assimilation du ^{31}P ($\mu\text{gP/l/h}$)

S_n : concentration en ^{31}P in situ ($\mu\text{gP/l}$)

T_t : temps de turnover

K_m : constante de demi-saturation

(BROWN et HARRIS, 1978)

III.4.3. Utilisation de la méthode radiologique pour la détermination de K_m et V_m de Chlorella

1. Préparation des réactifs

a) ^{32}P

Nous utilisons du ^{32}P carrier-free (Amersham PBS11) sous forme orthophosphate et délivré à des activités de 1mCi/ml dans de l' HCl dilué ($pH 2-3$). La solution mère de ^{32}P est préalablement diluée cinq cents fois avec de l'eau distillée de manière à obtenir une activité finale de $2\mu\text{Ci/ml}$. Afin d'éliminer les bactéries ou toute autre particule en suspension, la solution diluée de ^{32}P est filtrée avant chaque manipulation avec un filtre stérile de porosité $0,2\mu\text{m}$ (Millipore Millex -GV) adapté à une seringue. Cette précaution nous permettra d'obtenir de meilleurs blancs techniques. Lorsqu'il n'est pas utilisé, le ^{32}P est conservé en chambre froide et non au congélateur afin d'éviter d'éventuelles précipitations.

Le temps de demi-vie du ^{32}P est d'environ quinze jours, il faut contrôler par conséquent l'activité de la solution avant de commencer une expérience. Le ^{32}P émet des rayonnements d'énergie relativement élevée, (énergie max : $1,709\text{ MeV}$). Il est donc nécessaire de travailler avec des gants, sous une hotte prévue à cet effet et de maintenir les fioles contenant les solutions dans des containers en plomb.

b) Solutions de ^{31}P

Nous étudions l'assimilation du P dans la gamme de concentrations finales (concentrations au moment de l'expérience) : $5 - 10 - 25 - 50 - 75 - 100 - 200 - 400 - 800\mu\text{gP/l}$. Ces concentrations sont celles que Alain Dauta nous a proposées après avoir procédé à des essais préliminaires sur cette espèce. Lorsque l'on ne connaît pas, à priori, les besoins en P de l'espèce étudiée, il faut tester une gamme de concentrations plus large afin de repérer la présence éventuelle de plusieurs systèmes de transport (II.2.5.).

Nous préparons, à partir de KH_2PO_4 (l'ion dihydrogénophosphate est la forme la plus facilement assimilable par le phytoplancton) neuf solutions étalons de concentrations : $25 - 50 - 100 - 250 - 350 - 500 - 1000 - 2000 - 4000\mu\text{gP/l}$. Comme ce sel retient un pourcentage important d'eau, il sera séché à l'étuve avant de peser les quantités nécessaires.

La concentration en P dans les solutions préparées pour l'étude de l'assimilation est vérifiée par dosage chimique au molybdate.

2. Mesures cinétiques

a) Matériel

- vaisselle propre lavée avec du détergent sans phosphate
- matériel de filtration sous vide
- une fine pince pour positionner les filtres
- une fine pince pour récupérer les filtres après la filtration
- chronomètre
- plaque à agitation multiple
- une micropipette de 5 ml
- une micropipette de 1 ml
- filtres Millipore hydrophiles (HA, $0,45\mu\text{m}$) humidifiés à l'avance dans de l'eau distillée
- pissette remplie d'eau distillée ou de milieu de culture sans P
- milieu de culture sans P
- culture carencée ($Q = Q_0$)

b) Assimilation en fonction du temps.

Une cinétique en fonction du temps, pour une concentration en 31P donnée, nous permettra de voir comment évolue la vitesse.

Si celle-ci diminue, nous sélectionnerons un intervalle de temps (Δt) durant lequel elle est constante et maximale. Ce dernier sera le même pour chaque concentration.

Pratiquement, nous procédons comme décrit ci-dessous. La concentration en 31P choisie pour la cinétique est de $75\mu\text{gP/l}$. (ce choix est arbitraire) et les mesures sont effectuées aux temps suivants : 2, 5, 7, 10, 15, 30, 60 minutes. L'assimilation aux temps très courts (30 sec, 1 min) n'a pu être déterminée car la filtration, rinçages compris, dure environ une minute. Avant de commencer l'expérience, nous procédons à quelques essais de filtrations : 10 ml de la culture sont filtrés et la burette rincée deux fois avec de l'eau distillée. Si le temps de filtration est supérieur à une minute, la culture sera diluée avec du milieu sans P. Une filtration trop lente augmente le temps de contact entre les algues et le P; la vitesse risque dès lors d'être surestimée.

Dans un erlenmeyer de 250 ml, on ajoute 20 ml de la solution étalon sélectionnée ($350 \mu\text{gP/l}$) et $250 \mu\text{l}$ de ^{32}P (activité finale d'environ 30.000 CPM).

Après avoir bien homogénéisé la solution $^{31}\text{P} - ^{32}\text{P}$ (la distribution du ^{32}P doit être aléatoire afin de respecter

P31 ass. P32 ass.
l'égalité $\frac{\text{P31 ass.}}{\text{P31 total}} = \frac{\text{P32 ass.}}{\text{P32 total}}$), on ajoute

rapidement et en évitant de verser sur les bords, 80 ml de la culture. Cette opération correspond au temps 0 de l'expérience. L'emploi de volumes importants permet de limiter les risques d'erreur. Le milieu réactionnel est agité doucement avec barreau magnétique en veillant à ce que les algues ne forment pas d'aggrégats (situation courante lorsque les cultures sont carencées). Aux temps sélectionnés, on filtre deux fois 5 ml (total 10 ml) de la culture marquée. Le filtre est rincé deux fois avec de l'eau distillée ou du milieu de culture sans P.

Le filtre est ensuite récupéré avec une pince, plié en deux (les algues se trouvent dans la face interne du pli) et plongé dans le liquide scintillant.

Afin de connaître la quantité totale de ^{32}P ajoutée, on prélève 1 ml du milieu réactionnel que l'on dissout sans filtration dans 5 ml de scintillant (témoin λ)

Un certain pourcentage du ^{32}P total ajouté est absorbé de façon non spécifique au niveau des filtres hydrophiles et de la paroi des algues.

Un blanc réalisé à partir d'algues mortes (80 ml d'algues tuées + 20 ml de ^{31}P + $250 \mu\text{l}$ de ^{32}P) ou de la solution de ^{31}P (80 ml d'eau distillée + 20 ml de ^{31}P + $250 \mu\text{l}$ de ^{32}P)

permet de mesurer l'absorption non spécifique. Sans cette correction, la vitesse est surestimée. De plus, la valeur du blanc nous informe sur les mécanismes mis en oeuvre aux temps courts.

Si le blanc mesuré est significativement inférieur au blanc déterminé en extrapolant la droite, les algues assimilent rapidement le P durant les deux premières minutes.

L'activité des filtres est comptée au compteur à scintillation liquide. Les rayonnements émis par le ^{32}P excitent les molécules du liquide scintillant (le Fluor). Celles-ci libèrent l'énergie accumulée sous forme de photons dont l'intensité est mesurée par l'appareil. L'activité s'exprime en CPM (coups par minute).

La vitesse d'assimilation du ^{31}P sera déterminée suivant le principe décrit au paragraphe III.4.2.

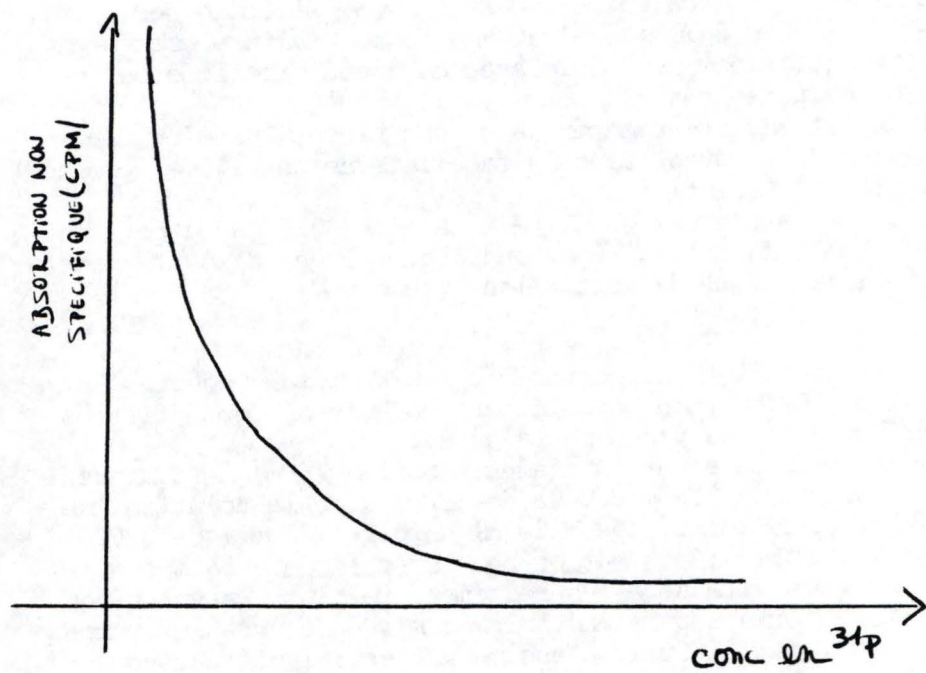


Fig.2.4 Evolution de l'absorbtion non spécifique (CPM) en fonction de la concentration en ^{31}P (DAUTA, comm.pers.).

c) Assimilation en fonction de la concentration

Dans 9 erlenmeyers de 50 ml, on ajoute 20 ml de la concentration en P31 adéquate et 250 μ l de 32P.

Au temps 0, on verse 40 ml d'algues dans l'erlenmeyer n° 1. Une minute plus tard, il est procédé à la même opération dans l'erlenmeyer n° 2 et ainsi de suite jusqu'à l'erlenmeyer n° 9. Après 10 minutes (Δt sélectionné lors de l'expérience précédente), on filtre 10 ml de l'erlenmeyer n° 1; les suivants le seront avec une minute de décalage. Un témoin est fait pour chaque concentration.

Mesure de l'absorption non spécifique

La quantité de 32P ajoutée est constante tandis que les concentrations en 31P augmentent. Comme la radioactivité spécifique (RS = $\frac{\text{32P total}}{\text{31P total}}$) diminue, l'absorption non spécifique décroît de façon exponentielle (Fig. 2.4.). Elle est dès lors surtout significative aux faibles concentrations. Ce schéma est constant et étroitement corrélé à la valeur de l'étalon. Toute correction à posteriori est donc possible.

Calcul de la vitesse

Pour chaque concentration, la vitesse (μ gP/l/h) se calcule par la formule :

$$v = \frac{(31P \text{ ass. au temps } t - 31P \text{ adsorbé}) \times 60 \text{ min}}{\Delta t \text{ (min)}}$$

Cette méthode permet de ne pas faire une cinétique en fonction du temps pour chaque concentration et donc de simplifier l'expérience.

Détermination de Km et Vm

Les paramètres Km et Vm sont déterminés par la linéarisation de Lineweaver-Burk.

IV. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P EN MILIEU NATUREL

IV.1. AVANT-PROPOS

Le protocole expérimental utilisé pour les cultures monospécifiques ne peut s'appliquer tel quel à l'étude de l'assimilation du P par des échantillons naturels car le contexte est différent :

- les échantillons étudiés dans le cadre de ce mémoire proviennent d'un milieu eutrophe (Meuse); les algues ne sont dès lors vraisemblablement pas carencées en P (Q proche de Q_m) et risquent d'assimiler peu de P.
- la vitesse d'assimilation aux concentrations in situ est peut-être déjà à sa valeur maximale, ce qui pose le problème de la détermination du paramètre K_m .
- les échantillons naturels constituent enfin un ensemble hétérogène d'espèces algales et bactériennes.

Lorsque les algues assimilent de faibles quantités de P, l'absorption non spécifique devient significative et sans des mesures de blancs fiables, nous pourrions surestimer la vitesse.

Si la vitesse d'assimilation aux concentrations in situ a effectivement déjà atteint sa valeur maximale, nous procéderons à des essais de carencage en laboratoire afin d'appauvrir le milieu en P.

Enfin, nous essaierons de réduire les difficultés d'interprétation dues au caractère hétérogène de l'échantillon en séparant, par filtration, les espèces suivant différentes classes de taille.

IV.2. MESURE DE L'ABSORPTION NON SPECIFIQUE

Le P s'adsorbe facilement sur les parois des algues et des bactéries ainsi que sur les particules en suspension. Par conséquent, l'absorption non spécifique totale sera estimée à partir d'un échantillon complet préalablement filtré sur un filtre $63\mu m$ (afin d'éliminer le zooplancton non pris en compte dans nos expériences) et traité avec une substance tuant l'ensemble de la communauté.

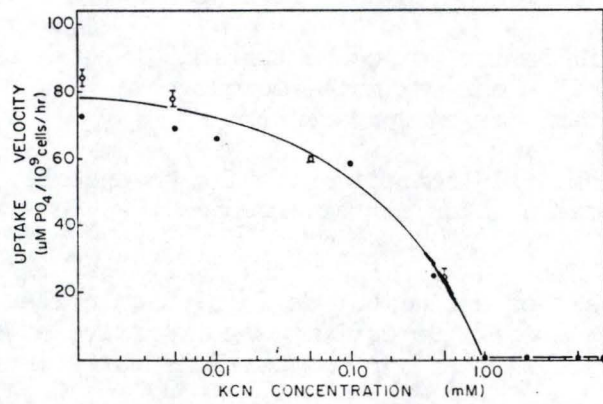


Fig. 2.5. Evolution de la vitesse d'assimilation en fonction de la concentration en KCN

• • Replicats (CHISHOLM et STROSS, 1976b.)

IV.2.1. Utilisation du formol

Le formol est la substance la plus généralement utilisée pour tuer les cellules. Il s'agit d'un agent alkylant, capable de se lier de façon covalente à deux groupements nucléophiles (NH₂, OH, COOH, SH) dont il remplace les H labiles de façon à former un pont

Procédure

A 50 ml de suspension, on ajoute 1 ml de formol 3,5%. (concentration finale 0,07 %) et 250 μ l de ³²P (temps 0) et on suit l'incorporation du ³²P au cours du temps comme pour un échantillon non tué. La même expérience est réalisée sur un échantillon témoin non tué. Nous utilisons des filtres hydrophobes Nucléopore 0,2 μ m de manière à mesurer l'absorption non spécifique au niveau de l'ensemble de la communauté (algues + bactéries + particules). L'expérience est répétée avec des concentrations en formol plus élevées (concentration finale égale à 4 %) afin de tester l'efficacité de la première.

IV.2.2. Utilisation de cyanure (KCN)

CHISHOLM et STROSS (1976^b) observent chez Euglena gracilis (Z) que des concentrations croissantes en KCN diminuent le taux d'assimilation du P (Fig. 2.5.). A partir d'une concentration maximale (1mM/l), l'assimilation du P est totalement inhibée. Les auteurs expliquent ces observations par le fait, qu'à ces concentrations, la respiration est inhibée à 90 % et donc que l'énergie nécessaire au transport du P n'est plus apportée.

Procédure

Nous préparons une solution stock de KCN 50mM/l. L'efficacité du KCN est testée dans une gamme de concentrations finales comprises entre 0,01mM/l et 2mM/l (0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 mM/l). On laisse agir le KCN pendant une minute avant d'ajouter le ³²P et de suivre son assimilation. Une cinétique est également réalisée sur un échantillon non traité au cyanure.

IV.3. MESURES DE L'ASSIMILATION

IV.3.1. Cadre d'étude

Les échantillons sont prélevés en Moyenne-Meuse, au site de La Plante. Ce site a été choisi en raison de sa proximité et de sa situation dans un secteur déjà bien étudié antérieurement, notamment dans le cadre d'études de l'Unité d'Ecologie des Eaux Douces (HENRIETTE, 1987; GOSELAIN, 1988).

IV.3.2. Travail sur le terrain

1. Prélèvement des échantillons

L'échantillon d'eau à analyser est prélevé au moyen d'un jerrycan de 10 litres que l'on enfonce progressivement dans l'eau en évitant les films d'hydrocarbures, de détergents et les diverses impuretés flottant à la surface.

2. Mesure de la température

La température est mesurée à l'aide d'une sonde de t°WTW LF 91, avec une précision de plus ou moins 0,2°C.

3. Mesure du pH

Les mesures de pH sont effectuées au moyen d'un pH-mètre WTW 90 dont la précision atteint 0,01 unité pH.

4. Mesure de la conductivité

La conductivité est mesurée au moyen d'un conductimètre WTW LF 91; elle est donnée pour une t° de référence de 25°C.

IV.3.3. Travail en laboratoire

1. Mesure de la chlorophylle a

(pour le principe, revoir III.3.1.3.)

Six litres sont destinés aux mesures de chl a.

La chl a totale est obtenue en filtrant sur un filtre GF/C de diamètre 9 cm deux fois un litre d'eau de Meuse brute.

Les quatre autres sont utilisés pour déterminer la chl a de la fraction supérieure à $10\mu\text{m}$.

On filtre deux fois deux litres sur du $63\mu\text{m} - 28\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}$ (voir IV.3.3.3.a.). Les algues retenues par le filtre $10\mu\text{m}$ sont récupérées et remises en suspension dans de l'eau de Meuse filtrée sur du $0,2\mu\text{m}$ (voir IV.3.3.3.).

Nous utilisons deux litres par mesure de chl a de manière à avoir suffisamment de matériel et par conséquent une mesure plus précise. Il est nécessaire de faire des répliquats car du matériel est perdu lors de la remise en suspension des algues. En connaissant la chl a totale et la chl a supérieure à $10\mu\text{m}$, on déduit la concentration en chl a dans la fraction inférieure à $10\mu\text{m}$.

2. Comptages cellulaires

(voir III.3.1.1.)

3. Fractionnement

La séparation du plancton par classes de taille peut se faire soit par pré-fractionnement (fractionnement avant l'expérience) soit par post-fractionnement (fractionnement au moment de l'expérience).

a) Pré-fractionnement

Ce fractionnement permet de sélectionner, dans notre cas, quatre classes de tailles :

$63\mu\text{m}$
 $28 - 63\mu\text{m}$
 $10 - 28\mu\text{m}$
 $10\mu\text{m}$

L'appareil de filtration se constitue d'un cylindre de PVC au fond duquel est fixé, au moyen d'un anneau, un filet à plancton de diamètre égal au diamètre externe du cylindre.

La première filtration se fait sur un filtre $63\mu\text{m}$; elle élimine essentiellement le zooplancton et la fraction détritique.

La fraction de diamètre inférieur à $63\mu\text{m}$ est refiltrée sur un filtre de porosité $28\mu\text{m}$. La fraction inférieure à $28\mu\text{m}$ est filtrée sur un filtre $10\mu\text{m}$. Cette dernière filtration est plus lente que les autres car le filtre se colmate. Afin d'éviter que de petites cellules de diamètre inférieur à $10\mu\text{m}$ ne soient retenues sur le filtre suite à son colmatage, les algues sont régulièrement remises en suspension à l'aide d'une tige à bout rond que l'on agite en l'appuyant légèrement sur le filtre.

Grace à cette technique, il est possible de concentrer les échantillons. L'eau est filtrée suivant la méthode décrite ci-dessus. Après la filtration, le filtre est récupéré à l'aide d'une pince et plongé dans un récipient contenant un petit volume d'eau de Meuse préfiltré sur GF/C et ensuite filtrée sur $0,2\mu\text{m}$ (Stérivex GS). Celui-ci est agité afin de remettre en suspension les algues. Après avoir récupéré le filtre, les algues sont transvasées dans un plus grand récipient et le volume ajusté selon la concentration désirée (pour doubler la biomasse, on resuspend dans un volume de 500 ml les algues filtrées à partir d'1 litre d'eau).

b) Post-fractionnement

En fonction des classes de taille les plus fréquemment rencontrées en Meuse, nous avons sélectionnés les porosités suivantes :

- filtres Nucléopore $10\mu\text{m}$ - $2\mu\text{m}$ et $0,2\mu\text{m}$
- filtres GF/C (2,5 cm de diamètre) $1\mu\text{m}$

Les filtres $2\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$ sont utilisés pour séparer la fraction algale et la fraction bactérienne.

Fraction $> 1\mu\text{m}$ constituée essentiellement d'algues

Fraction $< 1\mu\text{m}$ composée essentiellement de bactéries.

4. Mise en culture du plancton

Nous procédons à des essais de mise en culture en batch (sans renouvellement du milieu) d'échantillons complets préfiltrés sur du $63\mu\text{m}$ et de fractions isolées par pré-fractionnement et remises en suspension dans un litre d'eau de Meuse filtrée sur du $0,2\mu\text{m}$.

Les conditions de culture, ne sont pas "naturelles" : t° constante de 20°C et lumière continue au photopériode 15:9 L:D. Le matériel utilisé est semblable à celui décrit pour les cultures monospécifiques (III.1.). Quotidiennement nous dosons le P et procédons à un examen microscopique de la culture afin de voir si la composition spécifique reste constante.

Concentration finale (gP/l)	ml de la solution 10 mgP/l à ajouter dans 50 ml de culture	ml de la solution 40 mgP/l à ajouter dans 50 ml de culture
5	0,025	
10	0,05	
25	0,125	
50	0,250	
75	0,375	
100	0,5	
150	0,75	
175	0,875	
200	1	
250		0,312
300		0,375
400		0,5
500		0,625
600		0,75
800		1

Tabl.2.2. : volumes des solutions étalons 10 mgP/l et 40 mgP/l à ajouter à 50 ml de culture pour obtenir les concentrations finales en P de l'expérience.

IV.4. MESURES CINÉTIQUES

IV.4.1. Choix des concentrations

La concentration moyenne de P en Meuse se situe entre 100 et 200 $\mu\text{gP/l}$. Comme nous travaillons avec un ensemble d'espèces dont les exigences en P sont probablement différentes et que nous ne connaissons pas l'état de leurs stocks intracellulaires, nous testons, dans un premier temps, une gamme large de concentrations comprises entre S_n (mesurée au début de l'expérience) et 800 $\mu\text{gP/l}$. Après ces expériences de "repérage", nous limitons et affinons la gamme de concentrations afin de mieux caractériser les paramètres K_m et V_m .

Les différentes concentrations sélectionnées (A) sont préparées à partir d'ajouts à l'échantillon de petits volumes de deux solutions concentrées de KH_2PO_4^- (10mg/l et 40mg/l). Ceci permet de ne pas diluer l'échantillon au moment de l'expérience (les volumes maxima ajoutés s'élèvent à 1ml contre 10ml dans le cas des cultures). Cette précaution se justifie par le fait que les biomasses observées en milieu naturel sont nettement moins importantes que celles rencontrées en culture. Le Tabl. 2.2. indique les volumes des solutions étalons ajoutés à un échantillon de 50ml pour l'obtention de la gamme de concentrations finales sélectionnée.

IV.4.2. Matériel

Le matériel utilisé est le même que celui utilisé pour les cultures. Il faut cependant y inclure quelques éléments supplémentaires :

- filtres Nucléopore 10 μm - 2 μm - 0,2 μm
- filtres GF/C (2,5 de diamètre)
- 1 litre d'eau de Meuse préfiltrée sur GF/C et filtrée sur 0,2 μm
- 1 litre d'eau de Meuse filtré sur 63 μm ou 1 litre de l'échantillon mis en culture.

IV.4.3. Cinétique en fonction du temps

Cette expérience préliminaire nous permettra de voir :

1. si la vitesse est constante
2. si le phytoplancton assimile suffisamment de P.

1. Les temps sélectionnés sont compris entre 2 et 60 minutes :

2 - 5 - 10 - 15 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60 minutes.

Nous n'étudions pas la vitesse aux temps très courts (entre 0 et 2 minutes) car la filtration, rinçages compris, dure en moyenne une minute.

2. Lorsque les algues assimilent peu de P, il est possible d'augmenter la sensibilité de la mesure :

- en ajoutant plus de 32P
- en concentrant les algues par pré-fractionnement (IV.3.3.3.a.)
- en mesurant la vitesse sur des temps plus longs.

La manipulation se réalise suivant le même schéma que pour les cultures. Seuls les filtres hydrophiles (HA; 0,45 μ m) doivent être hydratés avant l'expérience. Les filtres Nucléopore et GF/C se placent directement sur le plateau de l'appareil de filtration. Les filtres GF/C sont relativement épais et hydrophiles et risquent par conséquent de retenir un certain pourcentage de 32P. Plusieurs rinçages permettent de réduire les artéfacts de filtration.

Problèmes de quenching

LEAN et WHITE (1983) conseillent de dissoudre les filtres Nucléopore dans 100 μ l d'une solution d'éthylène-éthanolamine 10 : 1 avant d'ajouter les 5 ml de liquide scintillant.

Les auteurs ne précisent pas si l'ajout d'une substance étrangère diminue l'efficacité du comptage (r). Celui-ci correspond au rapport de l'activité émise par le traceur (exprimée en DPM : désintégrations par minute) sur le rayonnement mesuré (exprimé en CPM : coups par minute). Les phénomènes d'affaiblissement lumineux ou **quenching** dus à la présence de composés autres que le système scintillateur diminuent cette efficacité.

Une comparaison entre deux mesures n'est possible que si celles-ci présentent le même quenching.

L'efficacité du comptage est proportionnelle au 'H number' (H#) : plus celui-ci est élevé, moins bonne est l'efficacité de la mesure. Par une comparaison des "H numbers" obtenus avec et sans ajout du mélange éthylène-éthanolamine, nous vérifions si une dissolution préalable des filtres se justifie.

IV.4.4. Cinétique en fonction de la concentration

1. Expérience réalisée sur une seule fraction

Nous suivons le même protocole que celui utilisé pour les cultures. L'intervalle de temps sélectionné (Δt) dépend de l'évolution de la vitesse au cours du temps et de l'importance de l'assimilation. Si les algues assimilent peu de P, la vitesse sera mesurée aux temps longs (par exemple après 30 ou 60 minutes).

2. Expérience réalisée sur plusieurs fractions

Un fractionnement complet demande cinq minutes (avant de commencer l'expérience, nous avons procédé à plusieurs essais avec uniquement les algues). Afin de réduire les risques d'erreur liés au temps de filtration (la dernière fraction est filtrée plus ou moins 4 min. après la première) et d'avoir un temps de 'battement' suffisant permettant le rinçage complet de l'appareil et le positionnement des filtres pour le fractionnement suivant, nous mesurons la vitesse après 60 minutes et avec un décalage de 15 minutes entre chaque échantillon. La cinétique en fonction du temps réalisé préalablement permet de s'assurer que la vitesse reste constante au cours du temps.

Le schéma expérimental est le suivant :

Soit les concentrations suivantes :

Sn : $100 \mu\text{gP/l}$ - Sn + A : 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500 $\mu\text{gP/l}$.

Dans l'erlen n° 1, on ajoute $250 \mu\text{l}$ de ^{32}P (activité finale de 30.000 CPM/ml. Au temps 0 de l'expérience, on verse 50 ml de la culture et on enclenche l'agitation. Après 10 minutes (les réactifs sont préparés le plus tard possible afin d'éviter les contaminations par les bactéries), on ajoute dans l'erlenmeyer suivant (n° 2) $250 \mu\text{l}$ de ^{32}P et $125 \mu\text{l}$ de la solution étalon (10mgP/l). Les réactifs sont mélangés avant d'ajouter, au temps 15, 50 ml de la culture. Cette opération est répétée pour les erlenmeyers 3 et 4.

Après la préparation du quatrième échantillon, il nous reste 15 minutes avant la filtration du premier.

Pendant ce temps, nous disposons un filtre Nucléopore $10\mu\text{m}$ sur le plateau de la première fiole à vide et un de $2\mu\text{m}$ sur celui de la seconde. Au temps 60, on filtre 10 ml de l'échantillon n° 1 sur le filtre $10\mu\text{m}$ et la burette est rincée une fois avec de l'eau distillée. Ensuite, le filtre est placé dans une fiole à scintillation et le filtrat ($< 10\mu\text{m}$) passé sur le filtre $2\mu\text{m}$. Nous versons le contenu de la fiole directement (on ne transvase pas le liquide dans un récipient intermédiaire) dans la burette de la seconde afin de ne pas perdre de temps et de matériel. La burette est également rincée une fois à l'eau distillée et le filtre placé dans une fiole. Après avoir rincé plusieurs fois la burette de la première fiole, on dispose un filtre $0,2\mu\text{m}$ sur lequel on passe le filtrat de la seconde fiole. La burette est rincée une fois après la filtration.

L'ensemble de ces opérations demande cinq minutes; il nous reste dix minutes pour préparer la seconde filtration.

Chaque système de filtration (burette, plateau, fiole) est abondamment rincé avec de l'eau distillée et les filtres $10\mu\text{m}$ et $2\mu\text{m}$ disposés sur les plateaux.

Au temps 75, on fractionne l'échantillon n° 2. L'ensemble des opérations est répété pour les erlenmeyers n° 3 et 4.

Pour la seconde série de concentrations, on utilise la solution 40 mg/l. Le protocole expérimental est identique et les volumes ajoutés sont ceux indiqués au Tabl. 2.2.

Mesure de l'absorption non spécifique

Un blanc est réalisé pour chaque type de filtre (leur porosité étant différente, ils ne retiennent pas la même quantité de particules) à partir d'eau de Meuse préfiltrée sur GF/C et filtrée sur $0,2\mu\text{m}$. A une prise de 50 ml, on ajoute $250\mu\text{l}$ de 32P et après deux minutes (on travaille aux temps courts de manière à éviter les contaminations : voir RESULTATS ET DISCUSSIONS), 10 ml sont filtrés. Cette opération est répétée pour chaque filtre. Nous n'avons pas fait de blanc à partir d'algues tuées pour les raisons évoquées dans la discussion des résultats.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

Millipore 0.45 μm	Nucléopore			GF/C
	0.2 μm	2 μm	10 μm	
0.61 0.58 0.12	0.86 0.07 0.06 0.46 0.12 0.25 0.07 0.06 0.09	0.1	0.02 0.03	0.36 0.45

Tableau 3.1 : échantillonnage de quelques valeurs de blancs obtenues après ajout de ^{32}P à de l'eau de Meuse filtrée sur du 0.2 μm , pour différents types de filtres. Ces valeurs sont exprimées en pourcentage de rétention par rapport à l'activité totale de l'échantillon.

I. MESURE DE L'ABSORPTION NON SPECIFIQUE

Au cours de nos premières expériences d'assimilation du ^{32}P par des algues en culture ou en milieu naturel, nous avons rencontré de nombreux problèmes d'obtention de bons témoins. Ces témoins sont réalisés soit avec du milieu de culture ou de l'eau de Meuse filtrée sur $0,2\mu\text{m}$ (donc dépourvue d'algues et de bactéries), soit par des algues et des bactéries tuées préalablement par différents procédés. Le premier type de témoin rend compte de la rétention de la solution de ^{32}P par le filtre; le second comprend également cette rétention, mais aussi, en principe, le ^{32}P retenu sur la fraction particulaire (matières en suspension, algues, bactéries, etc...) sans incorporation due à l'assimilation.

I.1. BLANCS SANS LA FRACTION PARTICULAIRE

Nous utilisons des filtres à caractère hydrophile (Millipore, GF/C) et hydrophobe (Nucléopore) dont les porosités varient entre $0,2$ et $10\mu\text{m}$. Des blancs réalisés sur chaque type de filtre avec de l'eau de Meuse filtrée sur du $0,2\mu\text{m}$ permettent d'estimer leur pouvoir de rétention du ^{32}P .

Le Tabl. 3.1. indique les valeurs de blancs obtenues pour chaque type de filtre. Elles sont exprimées en % de la quantité totale de ^{32}P ajoutée retenue sur le filtre afin de supprimer la variabilité liée à la valeur du témoin.

Nous pouvons constater que les filtres hydrophiles donnent généralement des valeurs de blanc plus élevées que celles des filtres hydrophobes.

La variabilité occasionnellement observée avec la filtration sur Nucléopore $0,2\mu\text{m}$ tient à l'efficacité plus ou moins bonne de la stérilisation du ^{32}P et/ou à celle du rinçage à l'eau distillée (le nombre de rinçages a en effet varié suivant la vitesse de la filtration).

Dans tous les cas, la prétériorisation, de préférence sur filtre stérile $0,2\mu\text{m}$ de la solution ^{32}P est indispensable. En effet, dans les premières expériences où cette filtration n'était pas effectuée, le pourcentage de rétention sur Millipore $0,45\mu\text{m}$ et Nucléopore $0,2\mu\text{m}$ était compris en 1,3 et 4,6 %. L'augmentation de cette valeur était probablement liée à l'âge de la solution radioactive.

Toutes les valeurs de rétention précitées correspondent à une mesure du blanc après 2 minutes. Cependant si on contrôle l'évolution de ce blanc au cours du temps, on peut constater une augmentation régulière : celle-ci serait imputable à une contamination du ^{32}P par des bactéries.

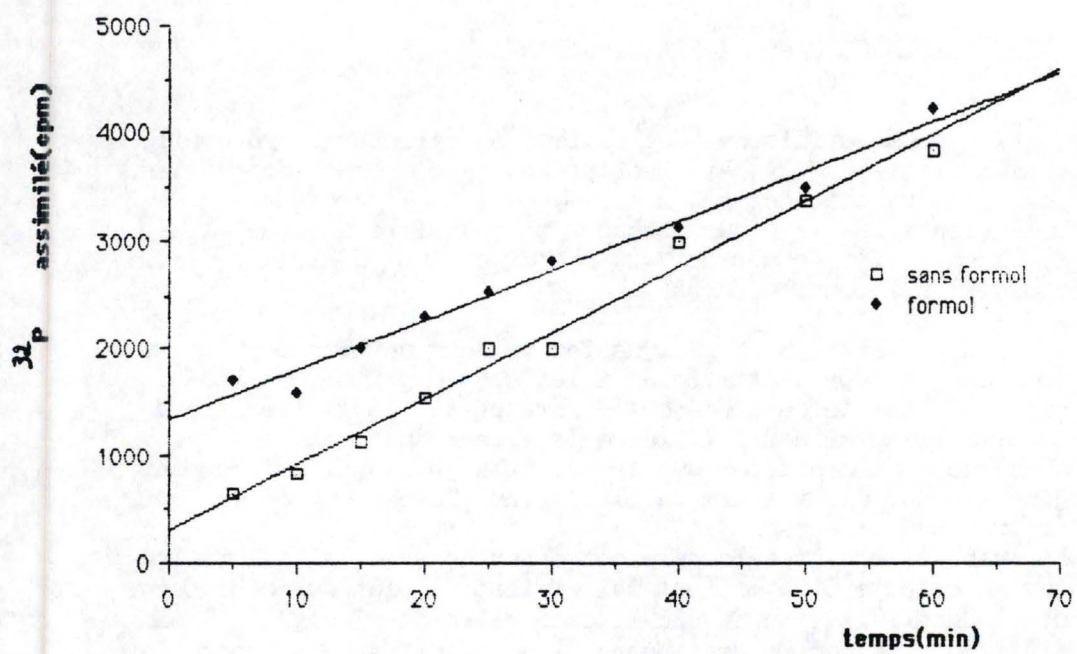


Fig. 3.1 : ^{32}P assimilé (CPM) en fonction du temps (min.), par un échantillon non traité et par un échantillon traité au temps 0 avec du formol 0.07 %.

D'après A. Dauta (comm.pers.), la valeur du blanc devrait diminuer de façon exponentielle en fonction de la concentration en ^{31}P de la suspension. Ceci serait dû à la dilution isotopique du ^{32}P , dont la concentration est constante, en présence de concentrations en ^{31}P croissantes.

Nous avons voulu vérifier ce phénomène dans une gamme de concentrations en substrat, pour deux types de filtres. Pour les filtres GF/C, le pourcentage de rétention varie de façon irrégulière dans la gamme de 100 à 500 μg $^{31}\text{P}/\text{l}$, entre 0,13 et 0,24 %; cette variation est imputable à l'efficacité du rinçage.

Quant aux filtres Nucléopore, un test a été réalisé pour 12 concentrations en ^{31}P réparties entre 50 et 800 μg $^{31}\text{P}/\text{l}$; le pourcentage de rétention variait de façon moins significative entre 0,04 et 0,07 %.

Cette vérification n'a cependant été réalisée qu'avec les filtres de porosité 10 μm . Les observations de Dauta sont relatives aux filtres Millipore 0,45 μm pour lesquels nous n'avons pas fait de test, étant notre utilisation plus fréquente des autres types de filtres. De plus, la décroissance exponentielle du blanc évoquée par Dauta se situe principalement dans la gamme des faibles concentrations que nous n'avons pas testée.

I.2. BLANCS AVEC LA FRACTION PARTICULAIRE

I.2.1. Echantillon tué au formol

Nous utilisons des concentrations finales égales à 0,07-4 %. Lors d'essais pour 'stopper' l'assimilation, le formol est ajouté en temps 0 de l'incubation avec le ^{32}P afin de tester son temps d'action.

Dans d'autres expériences, les échantillons sont incubés avec le formol pendant quelques minutes avant d'ajouter le ^{32}P .

Formol 0,07 %

Le formol est ajouté au temps 0 de l'expérience. La Fig.3.1. montre que l'assimilation du P n'est pas stoppée instantanément : la quantité de ^{32}P mesurée dans la fraction particulaire augmente linéairement au cours du temps.

La pente de la droite, exprimée en CPM/min est égale à 40 tandis que celle observée dans le cas d'un échantillon non traité est égale à 60. Nous n'exprimons pas la vitesse d'assimilation du ^{31}P (v) car nous ne disposons pas de mesure de la concentration en P in situ.

Cette augmentation du ^{32}P assimilé au cours du temps observée pour des échantillons traités au formol pourrait s'expliquer de trois façons :

- le formol ne tue pas instantanément l'ensemble de la communauté (algues + bactéries)
- la concentration utilisée n'est pas suffisante pour tuer l'ensemble de la communauté. VADSTEIN et al. (1988) utilisent une concentration finale en formol de 2 % pour fixer les bactéries
- tous les organismes sont morts et le P diffuse passivement dans les cellules suite à l'altération des membranes.

Nous optons pour la seconde hypothèse car dans les autres cas, on devrait observer une saturation rapide de la quantité de ^{32}P assimilée.

Dans une seconde expérience, l'échantillon (biomasse phytoplanctonique de $15,2 \mu\text{g/l}$) est incubé pendant cinq minutes avant d'ajouter le ^{32}P . La rétention du filtre seul (sans la fraction particulaire) exprimée en % du ^{32}P total est égale à 1,2 %. Celle du filtre et de la fraction particulaire mesurée après 15 minutes est de 2,2 %. 45,5 % de l'absorption non spécifique totale serait donc imputable à la fraction particulaire. Le % du ^{32}P total assimilé par un échantillon non traité, après le même intervalle de temps est égal à 3,6 %.

La valeur de l'absorption non spécifique déterminée de cette façon est peut-être faussée. En effet, nous n'avons aucune information sur l'évolution du blanc entre 0 et 15 minutes. Si le blanc mesure uniquement la rétention du ^{32}P sur la fraction particulaire, la valeur obtenue après 15 minutes doit être semblable à celle mesurée aux temps courts (la surface des cellules est rapidement saturée en ^{32}P). Si certains organismes résistent aux concentrations utilisées (par exemple les bactéries) et/ou si le P pénètre par diffusion dans les cellules mortes, la valeur du blanc n'est pas constante, elle augmente au cours du temps (dans le cas d'une diffusion, elle augmente jusqu'à atteindre, plus ou moins rapidement, une saturation lorsque les concentrations en P s'équilibrent de part et d'autre de la membrane).

Formol 4 %

Pour obtenir cette concentration finale, nous ajoutons 10 ml de formol 40 % à 100 ml de culture. Il faut dès lors tenir compte de la dilution de la biomasse pour l'estimation de la vitesse.

La biomasse phytoplanctonique de l'échantillon est de $52 \mu\text{g chl a/l}$.

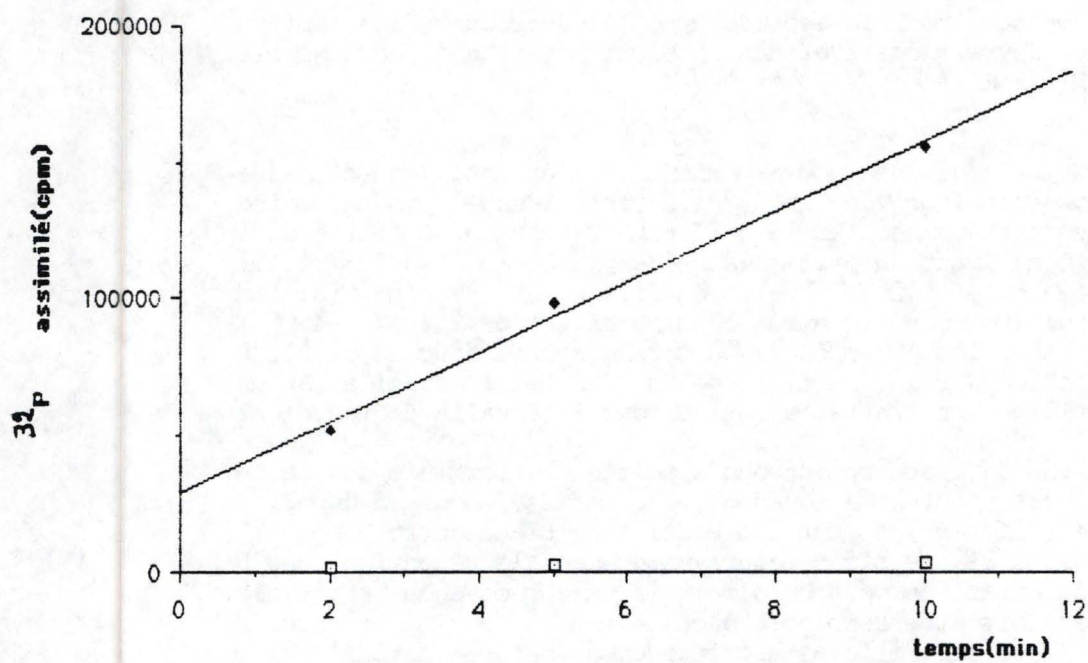


Fig. 3.2 : ^{32}P assimilé (CPM) en fonction du temps (min), par du plancton non traité et du plancton traité au temps 0 avec du formol 4%. Biomasse phytoplantonique : 52 μg Chl a/L.

Dans une première expérience, le formol est ajouté au temps 0 de l'incubation avec le ^{32}P et 10 ml de l'échantillon sont filtrés après 2-5 et 10 minutes. La même cinétique est réalisée sur du plancton non traité. La Fig.3.2. montre clairement que lorsque l'assimilation du P par les algues est importante (biomasse élevée et forte demande en P, l'absorption non spécifique devient non significative.

Dans une seconde expérience, l'eau de Meuse est incubée pendant 5 minutes avec le formol avant d'ajouter le ^{32}P . Le % du ^{32}P total assimilé par le témoin après 15 minutes est égal à 35 %. Celui retenu par le filtre seul est de 0,07 % tandis que celui retenu par la fraction particulaire et le filtre est de 0,99 %. La contribution de la fraction particulaire à l'absorption non spécifique totale serait par conséquent de 93 %. Ce pourcentage plus élevé que celui observé dans le cas du formol 0,07 % pourrait s'expliquer par l'importance de la biomasse et/ou par la diffusion du P suite à une altération plus profonde des membranes.

I.2.2. Echantillon tué à la chaleur

Une culture a été portée à ébullition pendant quinze minutes. A une prise de 50 ml, nous ajoutons du ^{32}P et mesurons l'absorption non spécifique après 15 minutes. La chl a de l'échantillon est de $104 \mu\text{g/l}$. Le % du ^{32}P total assimilé par les algues non traitées est de 100 %. Le % du ^{32}P total retenu par le filtre seul est de 0,07 %, celui retenu par l'ensemble de la fraction particulaire et le filtre est de 0,77 %. La contribution de la fraction particulaire serait donc égale à 91 %. Cette valeur élevée pourrait être due à l'importance de la biomasse (nous n'avons pas d'indication sur la biomasse bactérienne) ou à la diffusion du ^{32}P à l'intérieur des cellules suite à l'altération des membranes.

I.2.3. Echantillon tué au KCN

Une première expérience a été réalisée dans la gamme de concentrations suivantes : 0 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 1 mM/l de KCN (suspension 1, Fig.3.3.).

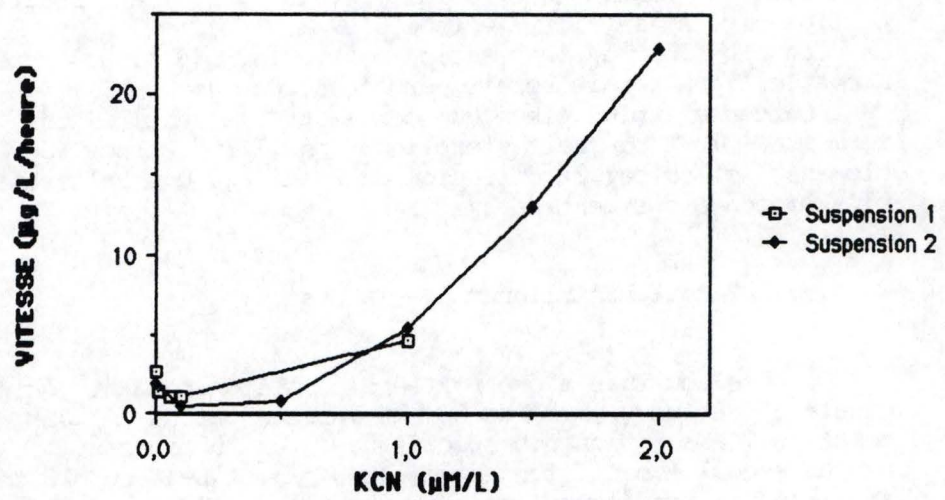


Fig. 3.3 : Vitesse d'assimilation du P ($\mu\text{g P/L/heure}$) en présence de concentrations croissantes en KCN ($\mu\text{M/L}$), pour deux suspensions phytoplanktoniques.

Nous remarquons que la vitesse (exprimée en $\mu\text{gP/l/h}$) diminue entre 0 et 0,1 mM/l, concentration à laquelle elle atteint une valeur minimale (38 % de la vitesse sans KCN). Au delà de ce minimum, la vitesse augmente brusquement (pente proche de l'unité). Afin de mieux visualiser ce qu'il se passe aux concentrations en KCN supérieures à 0,1 mM/l (nous avons trop peu de points entre 0,1 et 1 mM/l de KCN), nous refaisons la même expérience avec la gamme de concentrations : 0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 mM/l de KCN (suspension 2, Fig.3.3.).

Nous observons la même évolution de la vitesse que lors de la première expérience.

La vitesse minimale (26 % de la vitesse sans ajout de KCN) est observée pour une concentration en KCN égale à 0,1 mM/l. Au-delà de cette concentration, la vitesse augmente brusquement.

Nous ne mettons pas en évidence, comme CHISHOLM et STROSS (1976) une inhibition totale de la vitesse d'assimilation du P à une concentration de 1 mM/l. Par contre, nous remarquons une réduction de celle-ci ($\approx 30\%$) en présence de 0,1 mM/l de KCN.

Si nous avons testé l'efficacité du KCN dans une gamme plus fine de concentrations entre 0,1 et 0,5 mM/l, nous aurions peut-être observé une réduction plus importante de l'assimilation.

L'augmentation brutale de la vitesse aux fortes concentrations en KCN confirme l'hypothèse d'une entrée rapide du P par diffusion suite à la mort des cellules (GILLET, comm.pers.).

I.3. CONCLUSION

Afin d'obtenir de bons blancs techniques, il faut stériliser par filtration le ^{32}P avant l'expérience et mesurer la rétention du ^{32}P sur le filtre et la fraction particulaire.

Nous ne possédons pas encore la bonne technique qui inhibe complètement l'assimilation et qui, en même temps, ne risque pas de modifier les propriétés de surface des particules de la suspension. Nous préconiserons une fixation au formol douce (0,07 % ou 2 %) suffisamment longtemps avant la manipulation d'assimilation (le temps est à tester) couplée avec des tests d'activité ou de viabilité : mesure de l'activité photosynthétique au ^{14}C , absorption de colorants vitaux, test qualitatif de l'activité respiratoire (technique au TTC, INT).

Rappelons enfin que le problème de ces témoins est critique quand le taux d'assimilation du P est faible. Lorsque la demande en P est forte, l'absorption non spécifique devient non significative (Fig.3.2.).

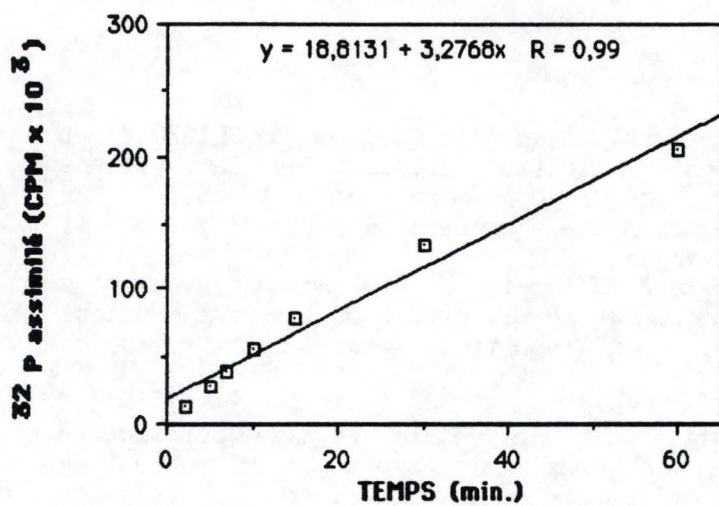


Fig. 3.4: ^{32}P assimilé (CPM x 10^3) en fonction du temps (min.) par une culture de *Chlorella* sp. carencée. A=75 μg P/L.

II. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P SUR DES CULTURES DE CHLORELLA

II.1. ASSIMILATION PAR UNE CULTURE DE CHLORELLA CARENCEE-RESULTATS OBTENUS LORS DU STAGE

L'expérience suivante a été réalisée sous la direction de A. Dauta, au laboratoire d'Hydrobiologie de Toulouse.

Les algues ont été mises en culture et carencées suivant la procédure décrite dans le chapitre MATERIEL ET METHODES (III.2.).

Au début de l'expérience, la culture est diluée dans du milieu sans P pour obtenir une densité de l'ordre de 10.000 cellules par ml.

La manipulation a été réalisée en deux phases : la première est un suivi de l'assimilation en fonction du temps dans une solution comprenant un ajout de 32P (39.500 cpm/ml) et un ajout de 31P donnant une concentration en substrat de 75 μ gP/l; dans une deuxième phase, on utilise un temps choisi au cours de la première phase pour mesurer la vitesse à différentes concentrations en substrat.

Assimilation du P en fonction du temps

Les résultats sont présentés à la Fig. 3.4.. La vitesse d'assimilation du 32P, exprimée en CPM/min est égale à 3,3. Le calcul de la vitesse d'assimilation du 31P donne une valeur de 4,5 μ gP/l/h.

La vitesse évolue de façon linéaire dans le temps entre 2 et 60 min. Le fait que la droite ne passe pas par l'origine peut s'expliquer par :

- la rétention du 32P sur le filtre, égale 0,18 % de l'activité totale
- une assimilation très rapide du P aux temps courts, entre 0 et 10', correspondant à la consommation de luxe

Après cette phase rapide, on se trouve plus ou moins dans des conditions d'équilibre, où la vitesse d'assimilation dépend de l'utilisation du P intracellulaire pour le métabolisme ($v = \mu Q$). Il est à noter que la concentration externe en P varie significativement au cours de l'expérience, puisque 1/3 du 31P fourni est assimilé par les algues parès une heure.

On a dès lors choisi un temps de 10 min pour la mesure de la variation de la vitesse en fonction de la concentration en substrat (S). Ce temps est suffisant pour une bonne estimation de la vitesse d'assimilation, tout en permettant de maintenir (S) à une valeur proche de la concentration initiale.

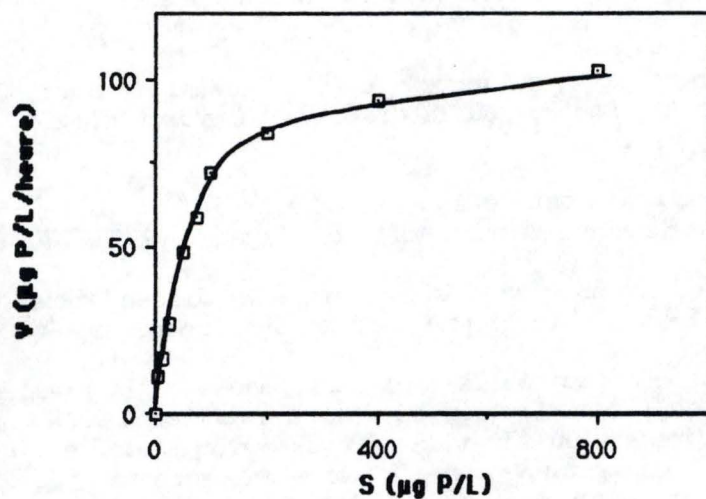


Fig. 3.5 a : évolution de la vitesse ($\mu\text{g P/L/heure}$) d'assimilation du P en fonction de la concentration en substrat pour une culture de *Chlorella* sp. carencée.

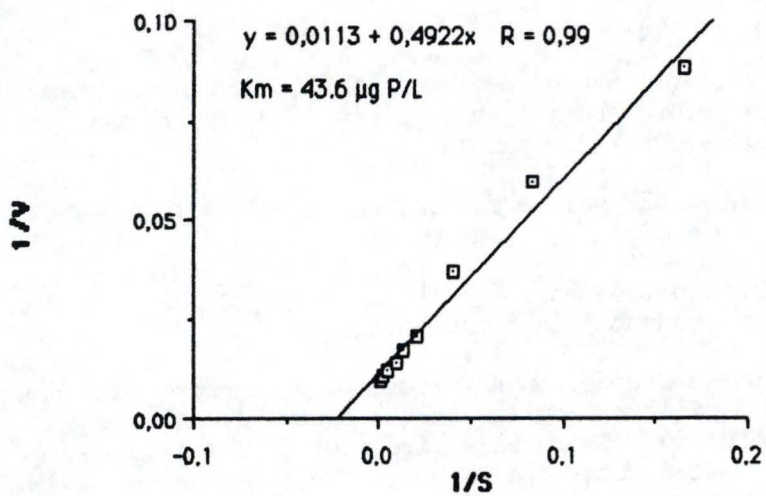


Fig. 3.5 b : représentation de Lineweaver-Burk de la relation vitesse-substrat pour une culture de *Chlorella* sp. carencée. $A=75 \mu\text{g P/L}$.

Etude de la relation vitesse-substrat

La gamme de concentrations en substrat est comprise entre 6 et 800 $\mu\text{gP/l}$. La relation vitesse-substrat est montrée à la Fig. 3.5.a. Elle correspond à une relation Michaelis-Menten typique. La représentation de Lineweaver-Burk des résultats est montrée à la Fig.3.5.b. Les K_m et V_m déterminés par cette méthode sont respectivement de 43,6 $\mu\text{gP/l}$ et 88,5 $\mu\text{gP/l/h}$.

Idéalement, un blanc aurait dû être réalisé à chaque concentration, pour corriger l'effet de la dilution isotopique sur la rétention du ^{32}P sur le filtre. De plus, une application tout-à-fait rigoureuse de la technique demanderait la réalisation d'une cinétique en fonction du temps pour chaque concentration en substrat, en particulier dans la gamme des faibles valeurs, comme le soulignent Brown et Harris (1978). Néanmoins, l'excellent ajustement à la relation théorique de Michaelis-Menten témoigne du bon choix des conditions expérimentales pour la mesure de la vitesse.

II.2. ESSAIS DE MESURE SUR DES CULTURES REALISEES AU LABORATOIRE D'ECOLOGIE FNDF

Pour la mise au point de la technique de mesure du ^{32}P dans notre laboratoire, nous avons tenté de reproduire le schéma expérimental appliqué à Toulouse sur des cultures de *Chlorella vulgaris* effectuées dans des conditions identiques à celles de Dauta (1983) (même milieu, cultures batch en fioles cônes, photopériodes similaire, etc...).

Différents problèmes ont été rencontrés :

- imprécisions (les comptages ne se faisaient pas sur un nombre suffisamment élevé de cellules et la détermination de la DO avec des cellules de 2cm est imprécise pour les faibles densités) dans le suivi de la croissance de la culture, entraînant une incertitude sur l'estimation de l'état nutritionnel des algues;
- contamination des cultures par des bactéries (conditions de stérilité imparfaites)
- contamination de la solution du ^{32}P , non stérilisée par filtration avant les expériences d'assimilation, entraînant des blancs techniques très élevés.

A titre d'exemple, on trouvera aux Figs.3.6.a. et 3.6.b. des cinétiques en fonction du temps, illustrant bien la valeur anormalement élevée des blancs. Quant aux mesures de vitesse en fonction de la concentration, aucune saturation nette n'a été observée (Fig. 3.7.). Ceci est probablement dû à la mauvaise précision des mesures de vitesse aux concentrations en ^{31}P élevées, à cause des fortes valeurs des blancs techniques et des contaminations bactériennes.

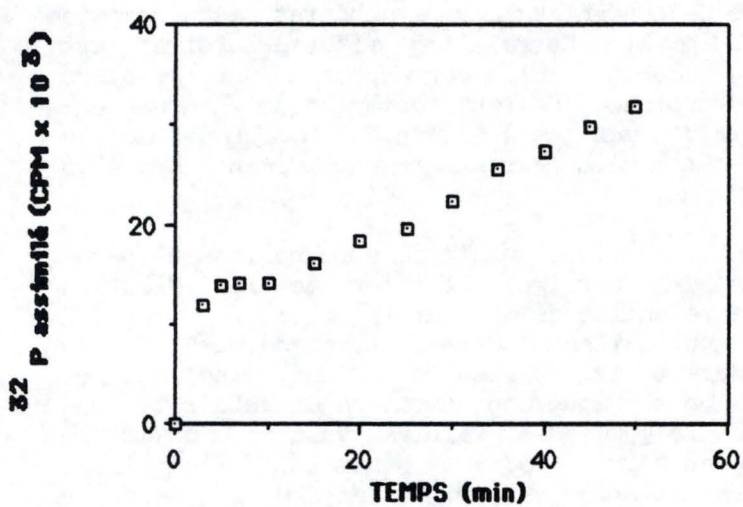


Fig. 3.6 a : ^{32}P assimilé (CPM x 10^3) en fonction du temps (min.) par une culture de *Chlorella vulgaris* carencée. A=75 μg P/L.

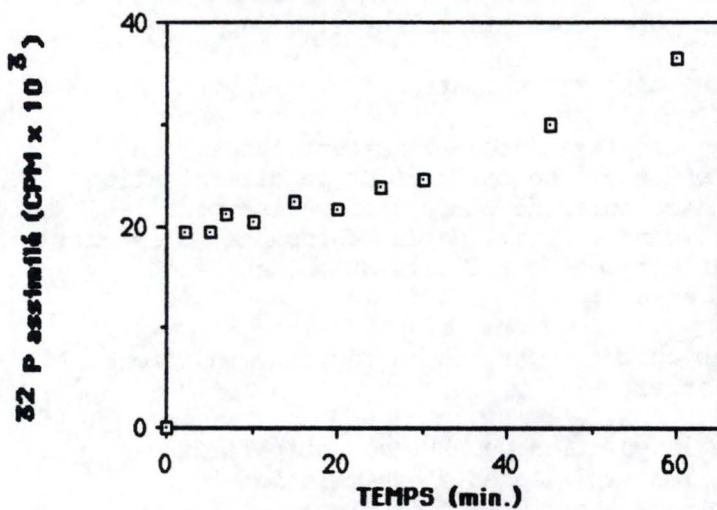


Fig. 3.6 b : ^{32}P assimilé (CPM x 10^3) en fonction du temps (min.) par une culture de *Chlorella vulgaris* carencée. A=50 μg .

Le but de notre travail étant l'étude de l'assimilation du P en milieu naturel, nous n'avons pas poursuivi les essais sur des cultures. Ceux-ci ont néanmoins permis d'apporter les corrections nécessaires à l'amélioration des conditions expérimentales utilisées par la suite. En particulier la nécessité de stérilisation de la solution de ^{32}P a bien été mise en évidence.

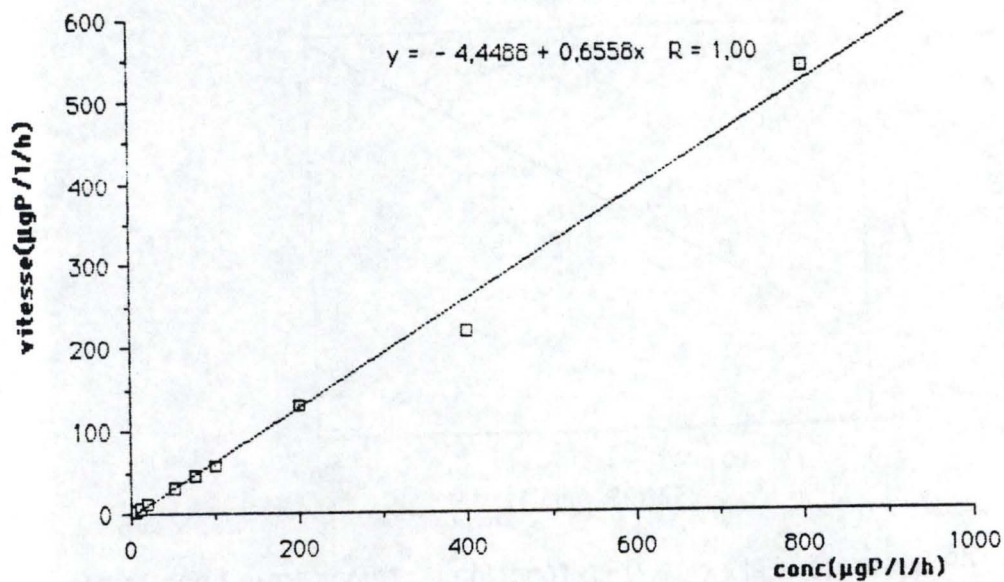


Fig. 3.4 : Relation vitesse-substrat pour une culture de Chlorella vulgaris carencée.

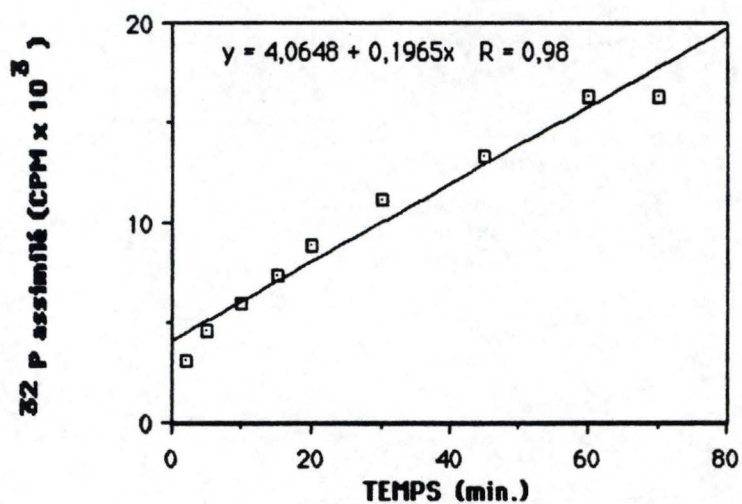


Fig. 3.8 : ^{32}P assimilé (CPM x 10^3) en fonction du temps (min.) par le plancton total de la Meuse aux conditions *in situ* : (P) : 31 $\mu\text{g P/L}$; Chl a : 15,2 $\mu\text{g/L}$; t^* : 22.4 $^{\circ}\text{C}$.

III. ETUDE DE L'ASSIMILATION DU P EN MILIEU NATUREL

(pour la réalisation des prélèvements, leur traitement et les techniques utilisées voir MATERIEL et METHODES IV)

III.1. VITESSE D'ASSIMILATION DU P PAR LE PLANCTON DE LA MEUSE AUX CONCENTRATIONS IN SITU

III.1.1. Mesures sur le plancton total

Une cinétique d'assimilation en fonction du temps a été réalisée conditions in situ suivantes : température : 22,6°C; chl a : 15,2 $\mu\text{g/l}$; (P) = 31 $\mu\text{gP/l}$. Les résultats sont présentés à la Fig.3.8. Comme dans les cultures, l'évolution de l'activité en fonction du temps est linéaire entre 2 et 70 minutes. La vitesse d'assimilation du 31P calculée à partir de la pente de la droite (v^*) est égale à 2,15 $\mu\text{gP/l/h}$.

Afin d'obtenir une estimation de la contribution de différentes classes de taille du plancton à l'assimilation totale du P, une post-filtration est réalisée après 70 minutes sur filtres Nucléopore 10 μm - 2 μm - 0,2 μm . Les pourcentages de 31P assimilés sont :

fractions (μm)	31P assimilé après 70 min ($\mu\text{g/l}$)	% du 31P total assimilé
10	0,63	20
2 - 10	0,76	25
0,2 - 2	1,70	55

La somme de ces trois fractions (2,65 $\mu\text{g P/l/h}$) est très proche de la valeur obtenue sans fractionnement (2,15 $\mu\text{gP/l/h}$). La dernière fraction ne contient vraisemblablement que des bactéries, dont la contribution à l'assimilation totale est importante.

III.1.2. Mesures sur un échantillon pré-fractionné

Un pré-fractionnement a été réalisé sur un échantillon recueilli dans les conditions initiales suivantes : température de 15,4°C; chl a : 42,7 $\mu\text{g/l}$; (P) : 108 $\mu\text{gP/l}$. La fraction retenue par le filtre de porosité 63 μm est essentiellement détritique. Deux fractions ont été retenues pour les mesures d'assimilation : d'une part, celle passant à travers le filtre 28 μm et retenue sur le filtre 10 μm dominée par Stephanodiscus hantzschii avec Cyclotella meneghiniana (diatomées centriques), d'autre part, l'entiereté du plancton passant à travers le filtre 28 μm , composée en plus des espèces précitées, de diatomées de plus petites tailles (petites Cyclotella et Nitzschia acicularis).

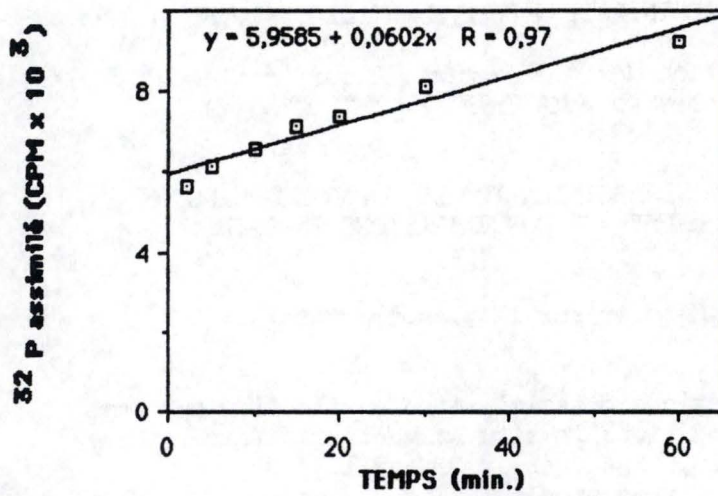


Fig. 3.9 : ^{32}P assimilé (CPM $\times 10^3$) en fonction du temps (min.) par la fraction 10-28 μm aux conditions *in situ* : t : 15.4 °C; Chl aT: 42.7 $\mu\text{g/L}$; (P) : 108 P/L.

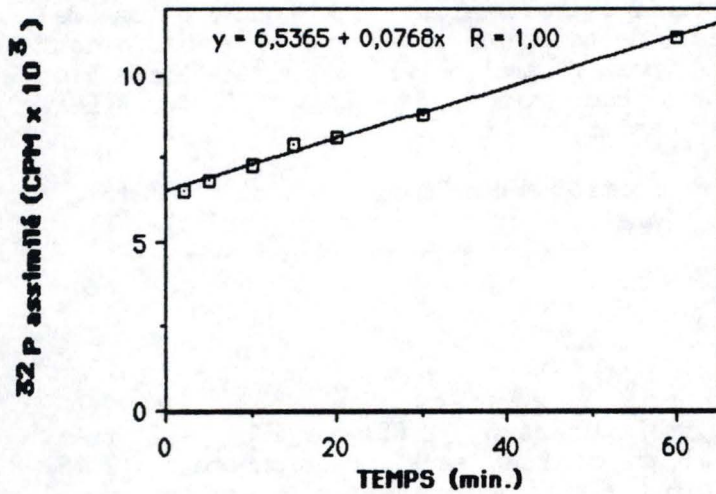


Fig. 3.10 : ^{32}P assimilé (CPM $\times 10^3$) en fonction du temps (min.) par la fraction < 28 μm aux conditions *in situ* : t : 15.4 °C; Chl a T : 42.7 $\mu\text{g/L}$; (P) : 108 $\mu\text{g P/L}$.

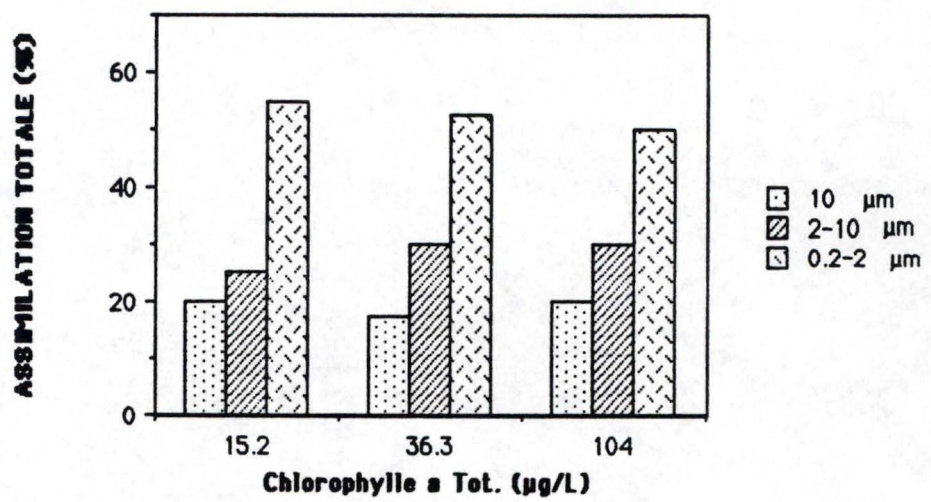


Fig. 3.11: Contribution relative (%) des différentes fractions du plancton (obtenues par post-fractionnement sur filtres Nucléopore) à l'assimilation totale du P, pour 3 suspensions planctoniques caractérisées par une concentration en Chl a de 15.2, 36.3 et 104 µg/L respectivement.

Les cinétiques d'assimilation du ^{32}P sont présentées aux Figs. 3.9. et 3.10. Les vitesses sont constantes dans les deux cas et sont égales à $2,46 \mu\text{gP/l/h}$ pour la 1ère fraction ($10-28 \mu\text{m}$) et à $3,17 \mu\text{gP/l/h}$ pour la 2ème ($< 28 \mu\text{m}$). L'assimilation est donc un peu plus rapide dans l'échantillon comprenant des petites cellules algales et des bactéries.

Des données additionnelles obtenues dans le cadre d'autres expériences (voir ci-après) fournissent des estimations de la vitesse d'assimilation in situ du même ordre de grandeur, c'est-à-dire environ $2 \mu\text{gP/l/h}$. Elle semble rester assez constante au cours du temps, du moins dans notre période d'étude.

Des observations plus systématiques, sur de plus longues périodes, permettraient sans doute de mettre en évidence les relations entre la vitesse et les biomasses algales et bactériennes. Le problème se complique cependant par le fait que l'assimilation dépend de l'état nutritionnel du plancton au moment de son prélèvement, qui reste jusqu'à présent une inconnue.

III.1.3. Contribution de différentes fractions du plancton à l'assimilation (post-fractionnement)

Les résultats évoqués au paragraphe précédent montraient l'importance de la contribution probable des bactéries (fraction $.2 - 2 \mu\text{m}$). Deux autres mesures ont été effectuées pour des biomasses phytoplanctoniques in situ différentes : la comparaison des résultats est présentée à la Fig. 3.11

Ces résultats confirment l'importance de l'assimilation du P par la fraction $.2 - 2 \mu\text{m}$ que nous considérons comme composée de bactéries uniquement. La fraction "algale" $2 - 10 \mu\text{m}$ présente une assimilation relative légèrement plus élevée que celle de la fraction de taille supérieure ($> 10 \mu\text{m}$). Ceci peut être en rapport avec une biomasse algale plus importante dans cette classe de taille.

Il faudrait cependant caractériser physiologiquement ces différentes catégories d'organismes planctoniques, par des tests spécifiques des algues et des bactéries. Par exemple, l'assimilation du bicarbonate $-^{14}\text{C}$ à la lumière pourrait constituer un bon test de l'importance des organismes photosynthétiques dans les différentes fractions; pour les bactéries planctoniques, l'assimilation du glucose marqué pourrait être utilisé comme marqueur spécifique.

Enfin, le fractionnement lui-même pourrait être amélioré en subdivisant mieux dans la gamme inférieure à $10 \mu\text{m}$, par exemple en employant une porosité de $5 \mu\text{m}$ pour obtenir une nouvelle classe algale, et une porosité de $1 \mu\text{m}$ pour la distinction bactéries-algues. Cependant les bactéries fixées sur du matériel particulaire (algues, matières organiques mortes, ...) ne peuvent être isolées par cette technique : il serait utile d'estimer l'importance de cette biomasse en microscopie à épifluorescence.

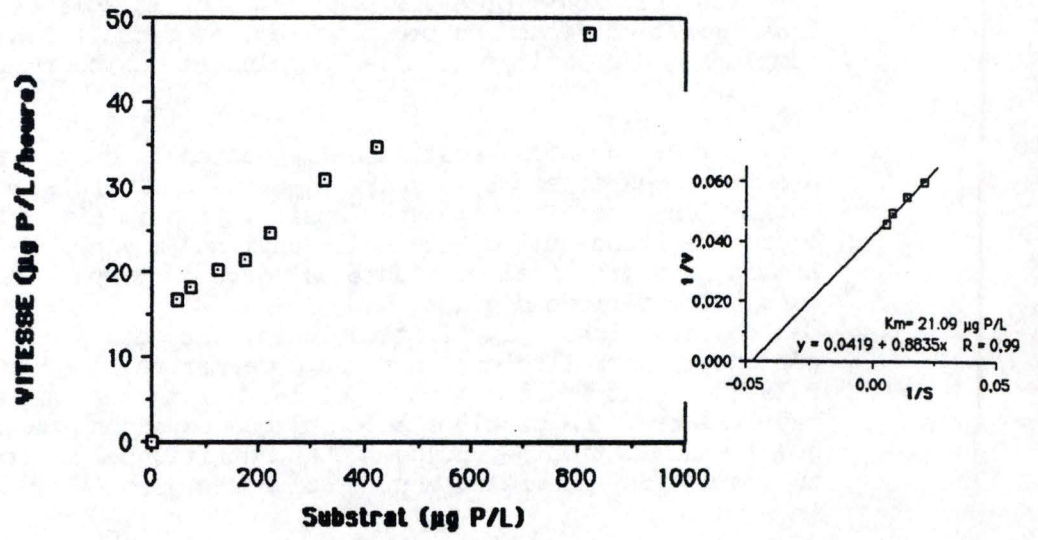


Fig. 3.12 a : relation vitesse-substrat pour le plancton total.

b) représentation de Lineweaver-Burk de la relation vitesse-substrat, pour des concentrations de P de 0 à 200 $\mu\text{g/L}$.

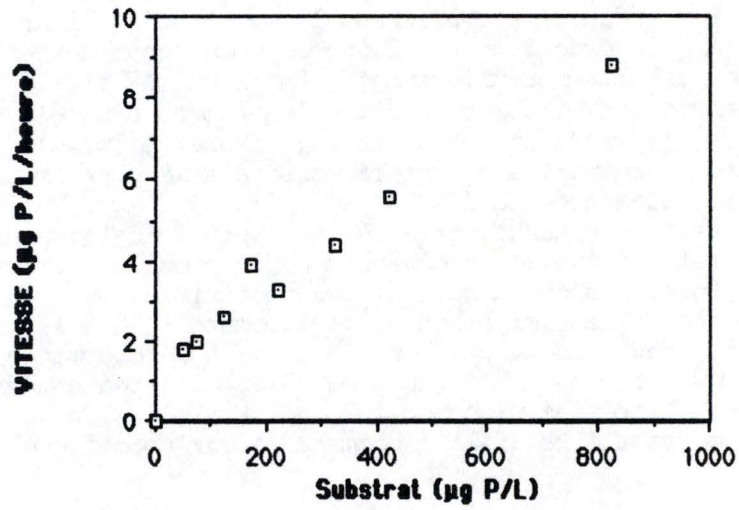


Fig. 3.13 a : relation vitesse-substrat pour la fraction 10-28 μm .

III.2. ETUDE DE LA RELATION VITESSE-SUBSTRAT

III.2.1. Assimilation par le plancton total

Nous étudions l'assimilation en fonction de la concentration sur un échantillon complet et sur la fraction 10-28 μm . Au moment du prélèvement des échantillons, la t° est de 16,6°C; le pH de 8,26 et de la conductivité de 355 $\mu\text{S/cm}$ à 25°C.

La concentration en 31P est faible : 23 $\mu\text{gP/l}$ et la biomasse phytoplanctonique élevée : 63,6 $\mu\text{g/L}$. La chl a dans la fraction inférieure à 10 μm est égale à 30 $\mu\text{g/L}$: on a donc une répartition équivalente de la biomasse dans les deux classes de taille.

La composition spécifique de l'échantillon total est la suivante : Stephanodiscus hantzschii (espèce dominante)

Cyclotella meneghiniana

Cyclotella div.sp.

et Nit. schia acicularis

La fraction 10-28 μm est essentiellement constituée de Stephanodiscus hantzschii. La filtration se fait sur Millipore 0,45 μm .

Les vitesses mesurées aux concentrations in situ pour l'échantillon total et la fraction 10-28 μm sont respectivement de 17,6 $\mu\text{gP/L/h}$ et 1,7 $\mu\text{gP/L/h}$. La faible contribution des cellules de grande taille (10 %) à l'assimilation totale n'est pas en accord avec les résultats obtenus précédemment (20 %). Cette discordance pourrait s'expliquer par une perte de matériel au moment du pré-fractionnement ou par le fait que nous ne tenons pas compte de la fraction 28 μm constituée de Stephanodiscus (cellules groupées sous forme de filaments).

Comme l'illustrent les Figs.3.12.a. et 3.13.a., la vitesse d'assimilation ne sature pas en fonction de la concentration en substrat.

Un examen plus détaillé de la Fig.3.12.a. semble indiquer une saturation de la vitesse vers 200 $\mu\text{gP/l}$.

Une linéarisation de la partie hyperbolique (Fig.3.12. b) donne une valeur de K_m égale à 27,9 $\mu\text{gP/l}$.

Cette valeur est imprécise étant donné le peu de points dont nous disposons mais elle est du même ordre de grandeur des K_m mentionnés dans la littérature pour les milieux eutrophes (aux environs de 35 $\mu\text{gP/l}$). L'augmentation de la vitesse aux concentrations supérieures est vraisemblablement liée aux mauvaises valeurs de blanc (3,4 % du 32P total retenu sur le filtre seul).

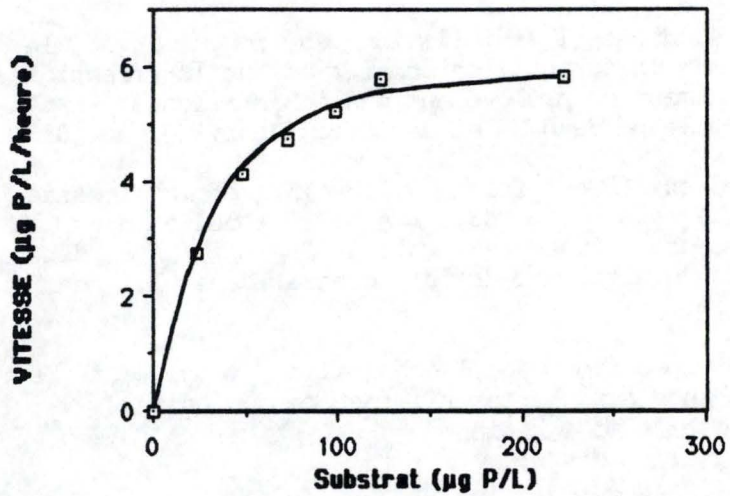


Fig. 3.15 a : relation vitesse-substrat pour la fraction 10-28 µm.

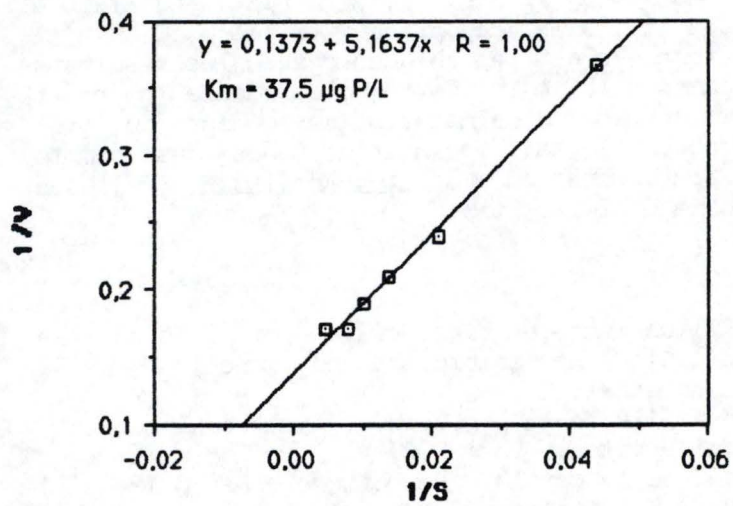


Fig. 3.15 b : représentation de Lineweaver-Burk de la relation vitesse-substrat, pour la fraction 10-28 µm.

Nous avons dès lors, par la suite, veillé à l'obtention de blancs techniques plus bas, par filtration de la solution de 32P sur des filtres stériles 0,2 m.

III.2.2. Assimilation par une fraction isolée par préfractionnement et mise en culture

Nous mettons en culture, afin d'appauvrir le milieu en P, des algues passant à travers un filtre 28 μ m et retenues sur un filtre 10 μ m (fraction 10-28 μ m) dans de l'eau de Meuse stérile, pendant 24 heures, en lumière continue. L'échantillon est concentré dix fois par rapport aux densités naturelles.

La concentration en 31P au début de l'incubation est de 107 μ gP/L et de 22,8 μ gP/L au moment de l'expérience. La fraction isolée est principalement constituée de Stephanodiscus hantzschii. Dans un premier temps, nous vérifions que la vitesse est bien linéaire (Fig.3.14.). La vitesse d'assimilation du 31P calculée à partir du coefficient angulaire de la pente (v^*) est égale à 2,73 μ gP/L/h.

Dans un second temps, nous mesurons la vitesse après 10 minutes aux concentrations en P suivantes : 22,8 - 47,8 - 72,8 - 97,8 - 122,8 - 222,8 μ gP/L.

L'évolution de la vitesse en fonction de la concentration en substrat est illustrée à la Fig.3.15.a.

La vitesse montre une saturation pour des concentrations en P égales à 200 μ gP/L, avec un bon ajustement au modèle théorique. Les paramètres $K'm$ et $V'm$ sont déterminés par la méthode de Lineweaver-Burk dont la représentation est illustrée à la Fig.3.15.b.

$$V'm : 7,3 \mu\text{gP/L/h}$$

$$K'm : 37,5 \mu\text{gP/L}$$

La valeur de $K'm$ est du même ordre de grandeur de celles rapportées dans la littérature pour les milieux eutrophes : SIUDA et CHROST (1988) mesurent un K_m de 36,2 μ gP/L pour le phytoplancton du lac eutrophe Mikolajskie.

D'autre part, le temps de turnover du P calculé à l'aide de la méthode de Dixon est de 4,4 heures.

III.2.3. Assimilation par la fraction 10 μ m isolée par post-fractionnement

Nous mettons en culture, pendant 24 heures, à la photopériode 15:9 L:D, à 20°C, un échantillon total dont la concentration en 31P au début de l'incubation est égale à 100 μ gP/L.

Au moment de l'expérience, la concentration est égale à 46,8 μ gP/L. La mesure de l'assimilation est réalisée sur filtre Nucléopore de porosité 10 μ m.

Nous faisons, pour chaque concentration en 31P, un blanc avec de l'eau de Meuse dépourvue de la fraction particulière. La valeur de celui-ci est faible et évolue peu significativement entre 0,04 % et 0,06 %.

FRACTION	CONCENTRATION en SUBSTRAT ($\mu\text{g P/L}$)						
	53.5	78.5	103.5	153.5	177.5	203.5	253.5
> 10	1.61	1.70	2.00	2.10	2.20	1.80	2.70
2-10	0.22	0.27	0.22	0.23	0.39	0.42	0.40
0.2-2	1.02						

Tableau 3.2 : mesure de la vitesse d'assimilation du P ($\mu\text{g P/L/heure}$) en fonction de la concentration, par les fractions $> 10 \mu\text{m}$, $2-10 \mu\text{m}$, et $0.2-2 \mu\text{m}$.

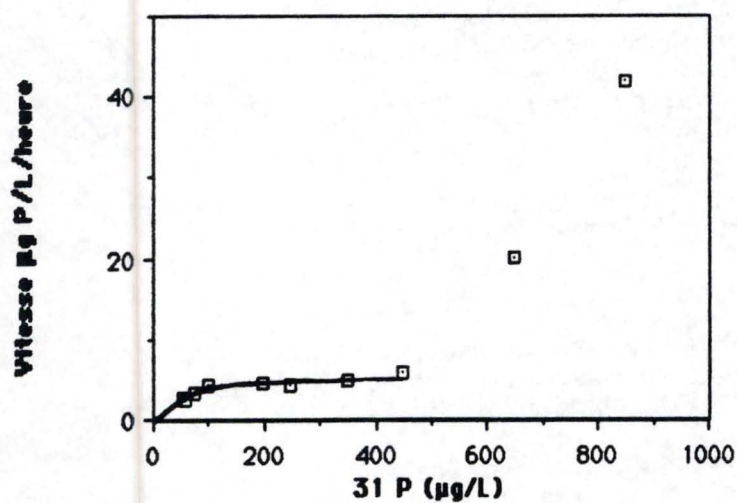


Fig. 3.16 : relation vitesse-substrat, pour un échantillon total mis en culture pendant 24 heures et filtré sur Nucléopore $10 \mu\text{m}$.

La Fig.3.16. schématise l'évolution de la vitesse dans la gamme de concentration sélectionnée.

Nous remarquons que celle-ci sature vers $100 \mu\text{gP/L}$, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans l'expérience précédente.

Une linéarisation suivant la méthode de Lineweaver-Burk des résultats obtenus entre 50 et $400 \mu\text{gP/L}$ donne une valeur de K_m égale à $70 \mu\text{gP/L}$ et $1 V_m$ de $6,4 \mu\text{gP/L/h}$. La valeur de K_m n'est pas précise étant donné le manque de données pour les faibles concentrations.

L'augmentation importante de la vitesse observée au-delà de $400 \mu\text{gP/L}$ n'a pas trouvé d'explication satisfaisante en dehors d'un problème technique non détecté.

III.2.4. Assimilation par les fractions $10 \mu\text{m}$ et $2 - 10 \mu\text{m}$ isolées par post-fractionnement

Nous mettons en culture, pendant trois jours, à la t° de 20°C et sous la photopériode $15:9 \text{ L:D}$, 10 litres d'eau de Meuse filtrée sur du $63 \mu\text{m}$.

Chaque jour, nous mesurons la concentration en P restant dans le milieu et procédons à un examen microscopique de l'échantillon pour voir comment évolue la composition spécifique.

Au début de l'incubation, la concentration en P était de $120 \mu\text{gP/l}$. Après 24 heures, elle était de $80 \mu\text{gP/l}$. La cinétique est réalisée le troisième jour lorsqu'il ne reste plus que $53,5 \mu\text{gP/l}$. Nous n'avons pas prolongé l'incubation afin d'éviter une prolifération trop importante des bactéries.

Les mesures de vitesse aux concentrations de la culture et après des ajouts croissants de 31P sont exprimées au Tabl.3.2.

Nous n'avons, pour des raisons du temps, pas procédé à un fractionnement complet pour chaque concentration.

Aux concentrations de la culture, la contribution relative (exprimée en %) de chaque fraction à l'assimilation totale est la suivante :

Fraction (μm)	contribution à l'assimilation totale (%)
10	57
2 - 10	7,9
0,2 - 2	36

Nous ne retrouvons pas la distribution observée ($20 - 30 - 50$ %) lors des expériences antérieures. Cette répartition différente pourrait s'expliquer par la prolifération des bactéries.

En effet, durant les trois jours de culture, nous avons observé une augmentation importante de la biomasse bactérienne et de la fraction détritique (cellules mortes). Comme beaucoup de bactéries sont attachées à la fraction détritique, la participation de la fraction supérieure à $10 \mu\text{m}$ est vraisemblablement surestimée.

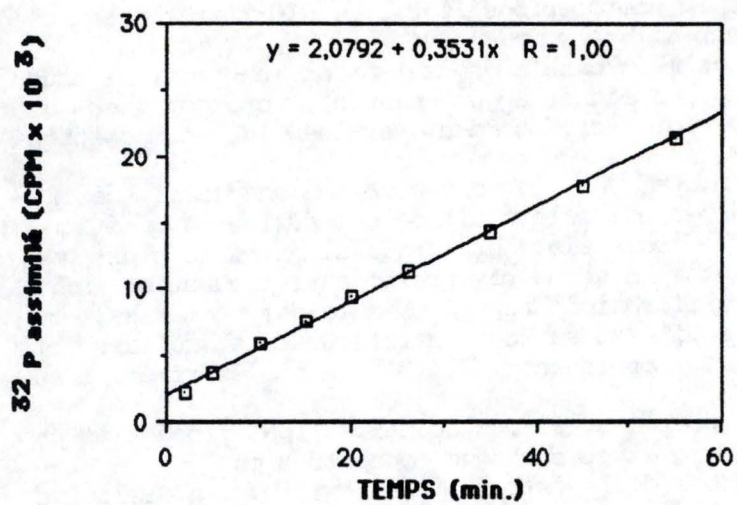


Fig. 3.14: ^{32}P assimilé (CPM x 10^3) en fonction du temps (min.) par la fraction 10-28 μm . (P) = 22.8 $\mu\text{g P/L}$.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

L'objectif de notre travail était l'étude de l'assimilation du P par le plancton de la Meuse, en conditions naturelles.

La technique choisie a été celle de l'assimilation du ^{32}P , dont l'apprentissage a été réalisé sur des cultures algales monospécifiques, suivant la technique utilisée par Alain Dauta.

Dans ces expériences, les conditions sont bien standardisées : l'état nutritionnel des algues au départ de l'expérience est bien connu, puisqu'il s'agit d'algues carencées, en suspension dans un milieu synthétique sans P, contenant les autres nutriments essentiels en excès. Dans ces conditions, la détermination des paramètres de l'assimilation du P ne pose pas de problème et l'ajustement à une cinétique de Michaelis-Menten classique est parfait.

Comme l'ont démontrée différents auteurs (WILLIAMS, 1973; BROWN et HARRIS, 1978), une technique similaire est utilisable en milieu naturel, du moins en milieu lacustre oligo à mésotrophe où la limitation de la croissance algale par le P est fréquente. Des problèmes se posent déjà cependant à ce niveau du fait de la coexistence dans les mêmes échantillons d'espèces présentant des K_m et des V_m différents : des déviations s'observent par rapport au modèle théorique simple (WILLIAMS, op.cit.).

L'application de cette technique est plus délicate en milieu eutrophe.

Comme les apports en P sont importants, le plancton n'est vraisemblablement pas carencé (nous ne disposons, à ce stade, d'aucune technique permettant de connaître l'état des stocks intracellulaires) et absorbe dès lors peu de P. La vitesse est probablement proche de sa valeur maximale (V_m) ce qui pose le problème de la détermination précise du paramètre K_m .

Les résultats obtenus durant ces quelques mois d'expérimentation nous permettent de nuancer notre hypothèse de départ et d'apporter certaines solutions qui pourraient contribuer, dans une phase ultérieure, à une meilleure application de la technique.

Les vitesses d'assimilation mesurées aux concentrations in situ sont généralement faibles (environ $3 \mu\text{gP/l/h}$) sauf lorsque la biomasse -et la demande en P- est élevée (jusqu'à 100 % du ^{32}P total ajouté assimilé après 10 minutes). Lorsque le taux d'assimilation est faible, l'absorption non spécifique devient significative et compromet la précision de la mesure.

Afin de pouvoir réaliser des cinétiques, quelle que soit la demande en P, nous avons tenté d'évaluer l'importance de l'absorption non spécifique et de corriger les mesures de vitesse obtenues en mesurant la quantité de ^{32}P retenue sur le filtre et sur la fraction particulaire.

Différents types de filtres ont été testés; les meilleurs blancs ont été obtenus en utilisant des filtres Nucléopore de porosité variable, dont le caractère hydrophobe réduit fortement la rétention du ^{32}P . Cependant, l'utilisation des filtres GF/C peut être conseillée car la filtration est très rapide, ce qui offre la possibilité d'étudier l'assimilation aux temps très courts et de mesurer la vitesse initiale.

Un problème non encore résolu de façon satisfaisante est celui de l'estimation de la quantité de ^{32}P effectivement retenue sur la fraction particulaire. Il faudrait pouvoir recourir à une technique permettant d'inhiber l'assimilation du P par l'ensemble (algues + bactéries) de la communauté, sans altérer pour autant les propriétés d'adsorption des cellules. Des essais ultérieurs devront s'orienter vers la fixation préalable des algues avec du formol 0,07 % ou 2 %.

Les tests sur les blancs ont également mis en évidence la nécessité de travailler dans des conditions stériles; plusieurs cinétiques en fonction de la concentration ont échoué à cause de la contamination bactérienne de la solution radioactive.

Il est donc indispensable de stériliser, avant chaque expérience, le ^{32}P par filtration sur $0,2\ \mu\text{m}$.

La vitesse d'assimilation du P aux concentrations in situ était le plus souvent, en ce point de prélèvement et durant la période des mesures, proche de sa valeur maximale. Pour déterminer avec précision le paramètre K_m , quelles que soient les conditions in situ, il s'avère donc nécessaire de mettre en culture le plancton afin d'appauvrir le milieu en P (nous ne pouvons pas vraiment parler de carence car nous n'avons aucune indication sur l'état des stocks intracellulaires).

Nous avons procédé à des essais de culture batch des échantillons complets (dépourvus de zooplancton) et avec une fraction pratiquement monospécifique isolée et concentrée par pré-fractionnement et remise en suspension dans de l'eau de Meuse stérile.

Dans le premier cas, nous avons observé sur un intervalle de temps de trois jours une faible diminution de la concentration en P et un changement net de la composition de l'échantillon : la biomasse bactérienne et la fraction détritique avaient par ailleurs fortement augmenté.

Dans le second, l'appauvrissement du milieu en P est plus rapide et la prolifération bactérienne est évitée (fraction algale pratiquement pure, biomasse phytoplanctonique importante et temps d'incubation court).

Ces dernières conditions nous ont permis de déterminer avec précision les paramètres cinétiques K_m et V_m d'une fraction à dominance de Stephanodiscus hantzschii. La valeur obtenue soit $36\ \mu\text{gP/l}$ est proche de celle rapportée dans la littérature pour des milieux eutrophes.

De telles conditions de mise en culture posent un double problème : elles s'éloignent de celles rencontrées dans la Meuse et n'excluent pas la possibilité d'une limitation de la croissance du plancton par les autres nutriments (N et Si.). La mise en culture pourrait être améliorée selon la méthode utilisée par MORGAN et KALFF (1979). Ces auteurs conservent pendant une à trois semaines du plancton naturel dans un récipient alimenté en continu par de l'eau de lac stérile diluée dans un milieu synthétique sans P, dont la composition ionique est proche de celle du milieu originaire. Les cultures sont maintenues à la température in situ et à une intensité lumineuse égale à 200-300 μ E/m²/s PAR et sous un cycle lumière obscurité égal à 12:12. Tout l'intérêt de cette technique résidera dans le choix d'un milieu synthétique ad hoc (par exemple de l'eau Vittel à laquelle on ajoute les microéléments manquants).

Enfin les quelques essais de détermination par post-fractionnement, de la contribution relative des différentes fractions (0,2 - 2 μ m, 2 - 10 μ m, > 10 μ m) à l'assimilation totale du P semblent indiquer une contribution importante (50 %) de la fraction bactérienne (0,2 - 2 μ m). Celle-ci se maintient pour des biomasses variables (31 - 104 μ g chl a/l). Afin de mieux caractériser la participation du phytoplancton et du bactérioplancton, il serait nécessaire d'avoir de bonnes mesures de la répartition de la biomasse algale et bactérienne dans chaque fraction (détermination de la biomasse algale par des mesures de la Chl a et de l'assimilation du ¹⁴C bicarbonate -détermination de la biomasse bactérienne par épifluorescence ou par assimilation du ¹⁴C glucose). Nous pourrions aussi tester d'autres porosités (Nucléopore 5 μ m et 1 μ m) en vue d'affiner le fractionnement.

Perspectives de travaux ultérieurs

L'assimilation du P en milieu eutrophe est un problème à la fois très complexe et très intéressant qui mériterait de plus longues investigations.

La technique de mise en culture par pré-fractionnement semble être, moyennant quelques améliorations citées ci-dessus, la voie à suivre pour la détermination des paramètres $K'm$ et $V'm$ du plancton en milieu eutrophe.

La taille n'explique cependant pas l'entièreté de la variabilité observée au niveau des paramètres cinétiques. Il serait dès lors intéressant de confronter les mesures de vitesse obtenues par cette technique avec celles déterminées pour chaque espèce. La caractérisation des paramètres cinétiques spécifiques est délicate et constitue une recherche en soi. SMITH et KALFF (1982) recourent à la technique d'autoradiographie pour distinguer la vitesse d'assimilation de chaque espèce d'une communauté : ils marquent une suspension avec un excès de ^{32}P et déterminent au microscope de phase, le nombre de désintégrations associées à chaque cellule [pour plus de détails sur la technique, voir KNOECHEL et KALFF (1976)]

Une autre technique, le tri en cytofluorimétrie de flux, pourrait permettre en principe l'isolement de cellules présentant des caractéristiques bien distinctes de fluorescence et de morphologie. Elle a encore très peu été utilisée pour le phytoplancton (des essais réalisés au laboratoire d'Ecologie des Eaux Douces, F.N.D.P., par le Docteur J.P. DESCY, ont permis une bonne séparation de certaines espèces, notamment *Cyclotella* sp.). De nombreux essais de mise au point restent encore à faire.

Cependant, si l'étude de l'assimilation du phosphore par les algues est intéressante en soi, pour déterminer la contribution de l'assimilation biologique au bilan un phosphore de rivières comme la Meuse, le problème essentiel pour le contrôle de l'eutrophisation est de voir dans quelle mesure la croissance des algues peut être limitée par une diminution des concentrations en phosphore.

Il est probable, d'après ce que l'on connaît du fonctionnement de l'écosystème Haute Meuse (BILLEN et al. 1985) que le phytoplancton soit pratiquement toujours à son taux de croissance maximal μ_{max} .

Cependant, il n'en va peut-être pas de même dans tous les secteurs de la Meuse (partie française en amont des apports importants, canal Albert). Dès lors, l'étude de la limitation par le phosphore conserve tout son intérêt, mais vu les difficultés rencontrées dans notre étude en milieu naturel, en particulier l'ignorance de l'état nutritionnel des algues au moment du prélèvement, une autre approche pourrait être envisagée, en vue de déterminer à la fois les paramètres cinétiques et les stocks intracellulaires des algues.

La méthode à suivre est probablement de perfectionner l'isolement des espèces d'algues par fractionnement (en couplant à la filtration des techniques plus fines comme le tri en cytofluorimétrie de flux) et en les cultivant en conditions contrôlées, soit dans l'eau naturelle stérilisée, soit dans un milieu synthétique où les concentrations en nutriments sont aisément contrôlables.

Ensuite, à l'aide de méthodes comme celle utilisée par Sommer (), le suivi de la croissance à différentes concentrations en substrat, avec analyse du contenu intracellulaire en nutriments, permet de déterminer les "valeurs naturelles" des paramètres cinétiques, ainsi que les valeurs minimales et maximales des stocks intracellulaires.

Parallèlement, une problématique qui conserve tout son intérêt et qui nous tient plus particulièrement à coeur est celle de la contribution respective des algues et des bactéries à l'assimilation du P.

Il serait intéressant de vérifier si la contribution bactérienne observée durant nos trois campagnes reste constante au cours d'un cycle saisonnier. Ceci implique un suivi régulier de la biomasse algale et bactérienne et du taux d'assimilation du P aux concentrations in situ.

Des cinétiques à long terme (plusieurs heures) permettraient d'étudier les échanges de P entre la fraction algale et la fraction bactérienne. Si l'activité du ^{32}P diminue après un certain temps dans la fraction bactérienne ($0,2 - 2\mu\text{m}$) et augmente proportionnellement dans la fraction algale ($> 2\mu\text{m}$), du P excrété par les bactéries est assimilé par les algues. Un taux d'assimilation moins élevé que celui observé lors de cinétiques à court terme indiquerait que le P est excrété sous forme organique (CURRIE et KALFF, 1984).

Pour mieux comprendre les mécanismes de la compétition entre les algues et les bactéries, il faudrait déterminer leurs paramètres cinétiques. Les bactéries présentent-elles, en milieu eutrophe, comme le rapportent SIUDA et CHROST (1987), une meilleure affinité pour le P que les algues ?

A ce stade, nous ne pourrions pas le faire à partir d'échantillons naturels car, comme nous l'avons observé dans nos expériences, la mise en culture d'un échantillon total, qui appauvrira le milieu en P (concentrations proche de Km) pose le problème du changement rapide de la composition spécifique. Des recherches restent donc à réaliser pour mieux caractériser les paramètres cinétiques des bactéries en milieu naturel.

- BANSE, K. (1976). Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size. *J. Phycol.*, 12, 135-140.
- BEEVER, R.E. and BURNS, D.J.W. (1980). Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. *Adv. Bot. Res.*, 9, 127-219.
- BILLEN, G., DESCY, J.-P., SERVAIS, P. et SMITZ, J.S. (1985). Etude écologique de la Haute Meuse et modélisation du fonctionnement de l'écosystème aquatique. Rapport final. Ministère de la Région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 250 p.
- BROWN, E.J. and HARRIS, R.F. (1978). Kinetics of phosphate uptake by aquatic microorganisms : deviations from a simple Michaelis-Menten equation. *Limnol. Oceanogr.*, 23(1), 26-34.
- BURMASTER, D.E. and CHISHOLM, S.W. (1979). A comparison of two methods for measuring phosphate uptake by Monochrysis lutheri grown in continuous culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 39, 187-202.
- CHISHOLM, S.W. and STROSS, R.G. (1976a). Phosphate uptake kinetics in Euglena gracilis (Z (Euglenophyceae) grown on light/dark cycles. I. Synchronized batch cultures. *J. Phycol.*, 12, 210-217.
- CHISHOLM, S.W. and STROSS, R.G. (1976b). Phosphate uptake kinetics in Euglena gracilis (Z (Euglenophyceae) grown in light/dark cycles. II. Phased PO₄-limited cultures. *J. Phycol.*, 12, 217-222.
- COCKBURN, M., EARNSHAW, P. and EDDY, A.A. (1975). The stoichiometry of the absorption of protons of the genus Saccharomyces. *Biochem. J.*, 146, 705-712.
- CRESS, W.A., THRONEBERRY, G.O. and LINDSEY, D.L. (1979). Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol.*, 64, 484-487.
- CURRIE, D.J. and KALFF, J. (1984). The relative importance of bacterioplankton and phytoplankton in phosphorus uptake in freshwater. *Limnol. Oceanogr.*, 29(2), 311-321.
- DAJOS, R. (1985). Précis d'écologie, Bordas, Paris, 505 p.

- DAUTA, A. (1983). Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. Cinétiques d'assimilation et de croissance : étude expérimentale. Modélisation appliquée aux cultures et à un milieu naturel : le Lot. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences, Université Paul Sabatier, Toulouse, 166 p.
- DESCY, J.-P. (1987). Phytoplankton composition and dynamics in the river Meuse (Belgium). Arch. Hydrobiol. Suppl., 78(2), Algal Stud., 47, 225-245.
- DROOP, M.R. (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae. J. Phycol., 9(3), 264-272.
- FALKNER, G., HORNER, F. and SIMONIS, W. (1980). The regulation of the energy-dependent phosphate uptake by the blue-green alga Anacystis nidulans. Planta, 149, 138-143.
- FUHRMAN, J.A. and AZAM, F. (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton in marine surface waters : evaluation and field results. Mar. Biol., 66, 109-120.
- FUHS, G.W., DEMMERLE, S.D., CANELLI, E. and CHEN, M. (1972). Characterization of phosphorus-limited plankton algae (with reflections on the limiting-nutrient concept). In G.E. Likens, ed. Nutrients and Eutrophication : the limiting-nutrient controversy. Special Symposium, Amer. Soc. Limnol. Oceanogr., 1, 113-133.
- GOLTERMAN, H.C. (1969). Methods for chemical analysis of freshwaters. IBP Handbook, Blackwell Sc. Publ., Oxford and Edinburgh, 8, 166p.
- GOSSELAIN, V. (1988). Compléments à l'étude de la production primaire en Meuse. Mise au point d'une méthode de mesure de l'activité respiratoire du phytoplancton. Mémoire de licence en Sc. ZOOL., FNDP, Namur, 122p.
- GOTHAM, I.J. and RHEE, G.Y. (1981). Comparative kinetics studies of phosphate-limited growth and phosphate uptake in phytoplankton in continuous culture. J. Phycol., 17, 257-265.
- HEALEY, F.P. (1973). Characteristics of phosphorus deficiency in Anabaena. J. Phycol., 9, 383-394.

- HENRIETTE, M.-F. (1987). Etude de la Production Primaire de la Haute Meuse (secteur ANSEREMME-NAMUR) et dans la Sambre. Mémoire de licence en Sc. ZOOL., FNDP, Namur, 54p. + tableaux et annexes.
- HIGINBOTHAM, N. (1973). Electropotentials of plant cells. Annual Review of Plant Physiology, 24, 25-46.
- HUTCHINSON, G.E. (1961). The paradox of the plankton. Am. Nat., 95, 137-147.
- JORDAN, C. and DINSMORE, P. (1985). Determination of biologically available phosphorus using a radiobioassay technique. Freshwater Biology, 15, 597-603.
- KETCHUM, B.H. and REDFIELD, A.C. (1939). Some physical and chemical characteristics of algae growth in mass culture. J. Cell. Comp. Physiol., 33, 281-299.
- KILHAM, P. (1971). A hypothesis concerning silica and the freshwater planktonic diatoms. Limnol. Oceanogr., 16, 10-18.
- KILHAM, P. (1975). Mechanisms controlling world water chemistry based on data for African lakes and rivers. Proc. Int. Symp. Geochemistry of Natural waters. Burlington, Ontario Sp.
- KILHAM, P. and KILHAM, S. S. (1980). In "Studies in Ecology", Vol 7, ed. by Morris I., Blackwell Scientific Publ., pp 571-597.
- KILHAM, P. and TITMAN, D. (1976). Some biological effects of atmospheric inputs to lakes : nutrient ratios and competition interactions between phytoplankton. J. Great. Lakes Res, 2, Suppl. 1, 187-191.
- KILHAM, S.S. (1978). Nutrient kinetics of freshwater planktonic algae using batch and semicontinuous methods. Mitt. Internat. Verein. Limnol., Stuttgart, 21, 147-157.
- KNOECHEL, R. and KALFF, J. (1976). Track autoradiography : a method for the determination of phytoplankton species productivity. Limnol. Oceanograph., 21, 590-595.

- LEAN, D.R.S. and PICK, F.R. (1981). Photosynthetic response of lake plankton to nutrient enrichment : a test for nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 26(6), 1001-1019.
- LEAN, D.R.S. and WHITE, E. (1983). Chemical and radiotracer measurements of phosphorus uptake by lake plankton., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40(2), 147-155.
- LEHNINGER, A.L. (1979). *Biochimie*. Flammarion, France, 1088 p.
- LIEBIG, J. (1840). *Die Chemie in ihrer Advendungen in Agricultur and Physiologie*. 4th ed., 1847. London, Taylor and Walton.
- LORENZEN, C.J. (1967). Determination of chlorophyll a and phaeopigments : spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 343-346.
- MAC ARTHUR, R.H. and WILSON, E.O. (1967). *The theory of island biogeography*. Princeton University Press.
- MACKERETH, F.J.H. (1953). Phosphorus utilization by Asterionella formosa. Hass. *J. Exp. Bot.*, 4, 296-313.
- MALONE, T.C. (1980). In "Studies in Ecology", Vol 7, ed. by Morris I., Blackwell Scientific Publ., pp 433-463.
- MARKER, A.F.H., NUSCH, E.A., RAI, H. and RIEMANN, B. (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardisation of methods : conclusions and recommandations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 14, 91-106.
- MONOD, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, 3, 371-394.
- MOORE, W. J. (1972). *Physical Chemistry*, 4th edition, Prentice-Hall.
- MORGAN, K.C. and KALFF, J. (1979). Effect of light and temperature interactions on growth of Cryptomonas erosa (Cryptophyceae). *J. Phycol.*, 15, 127-134.
- NALEWAJKO, C. and LEAN, D.R.S. (1980). In "Studies in Ecology", Vol 7, ed. by Morris I., Blackwell Scientific Publ., pp 433-463.

- NYHOLM, N. (1977). Kinetics of phosphate limited algal growth. *Biotechnol. Bioengineer.*, 19, 467-492.
- PECHAR, L. (1987). Use of acetone : methanol mixture for extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll a in phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 78(1), *Algol. Stud.*, 46, 99-117.
- POURRIOT, R., CAPBLANCQ, J., CHAMP, P. et MEYER, J.A. (1982). *Ecologie du plancton des eaux continentales*. Masson, Paris, 198 p.
- RAVEN, J.A. (1984). Phosphate transport in *Hydrodictyon africanum*. *New Phytologist.*, 73, 421-432.
- RHEE, G.Y. (1973). A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.*, 9, 495-506.
- SIUDA, W. and CHROST, R.J. (1987). The relationship between alkaline phosphatase (APA) activity and phosphate availability for phytoplankton and bacteria in eutrophic lakes. *Acta Microbiologica Polonia*, 36, (3), 247-257.
- SMITH, R.E.H. and KALFF, J. (1982). Size-dependent phosphorus uptake kinetics and cell quota in phytoplankton. *J. Phycol.*, 18, 275-284.
- SOMMER, U. (1984). The paradox of the plankton : fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 29(3), 633-636.
- SUTTLE, C.A. and HARRISON, P.S. (1986). Phosphate uptake rates of phytoplankton assemblages grown at different dilution rates in semicontinuous culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 1474-1481.
- TILMAN, D. (1976). Ecological condition between algae : experimental confirmation of resource based competition theory. *Science*, 192, 463-465.
- TILMAN, D. (1977). Resource competition between algae : an experimental and theoretical study. *Ecology*, 58, 338-348.
- TILMAN, D. and 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.*, 12, 375-383.

- TILMAN, D., KILHAM, S.S. and KILHAM, P. (1982). Phytoplankton community ecology : the role of limiting nutrients. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13, 349-372.
- ULLRICH-EBERIUS, C.I., NOVACKY, A., VAN BEL, A.J.E. (1984). Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1 : energetics and kinetics. *Planta*, 161, 46-52.
- VADSTEIN, O., JENSEN, A., OLSEN, Y., REINERTSEN, H. (1988). Growth and phosphorus status of limnetic phytoplankton and bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 489-503.
- VAN CUTSEM, P. (1988). *Physiologie végétale, cours de 1ère licence, FNDP, Namur*, 180 p.
- WETZEL, R.G. (1983). *Limnology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 767 p.
- WILLIAMS, P.S. (1973). The validity of the application of simple kinetics analysis to heterogeneous microbial populations. *Limnol. Oceanogr.*, 18(1), 159-165.