

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

La co-limitation par l'azote et le phosphore :  
étude des mécanismes chez la microalgue *Tisochrysis lutea*

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

Spécialité : Phycologie

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Gaël BOUGARAN**

*Le 22 Octobre 2014, devant le jury ci-dessous*

Président	Joël FLEURENCE,	Professeur,	Université de Nantes
Rapporteurs	Claude AFLALO,	Senior lecturer,	Blaustein Institutes for Desert Research
	Patrick RAIMBAULT,	Directeur de recherche,	Université de Marseille
Examineurs	Olivier BERNARD,	Directeur de recherche,	INRIA Sophia Antipolis
	Damien EVEILLARD,	Maître de conférence,	Université de Nantes
	Benoît SCHOEFS,	Professeur,	Université du Maine

*Directeurs de thèse:*  
Antoine SCIANDRA et Jean-Paul CADORET



---

*Gant pasianted hag amzer, a-benn eus pep tra e teuer*

*Avec patience et temps, on vient à bout de tout*

---

---

Ce travail a été initié dans le cadre de l'ANR *Shamash*, piloté par Olivier Bernard, et a bénéficié de financements de ce projet.



# Table des matières

Table des matières . . . . .	vii
Liste des figures . . . . .	xiii
Liste des tableaux . . . . .	xvii
Liste des symboles . . . . .	xix
Liste des publications . . . . .	xxi
Remerciements . . . . .	xxiii
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
1 De l'environnement aux biotechnologies . . . . .	1
1.1 Un rôle primordial à l'échelle de la planète . . . . .	2
1.2 La valorisation biotechnologique des microalgues . . . . .	4
2 Des ressources clés . . . . .	7
3 Présentation de l'étude . . . . .	12
4 Organisation du manuscrit . . . . .	14
<b>1 Nutrition minérale</b>	<b>17</b>
1 Introduction . . . . .	18
2 La nutrition minérale . . . . .	18
2.1 Des besoins essentiels en macro-éléments . . . . .	19
2.2 L'acquisition des nutriments . . . . .	20
3 La limitation nutritive . . . . .	27
3.1 Le cas de la mono-limitation . . . . .	27
3.2 Le concept de co-limitation . . . . .	29

---

3.3	Les limitations et les réserves en lipides . . . . .	44
4	Conclusion . . . . .	46
<b>2</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>49</b>
1	Dispositif expérimental . . . . .	50
2	Modes de culture . . . . .	53
3	Matériel biologique . . . . .	56
4	Entretien des souches . . . . .	57
5	Cultures expérimentales . . . . .	59
5.1	Cultures en mono-limitations . . . . .	59
5.2	Cultures en chémostat et co-limitation . . . . .	60
6	Analyses biologiques . . . . .	62
6.1	Éléments résiduels . . . . .	63
6.2	Quotas C, N, P cellulaires . . . . .	65
6.3	ATP cellulaire . . . . .	67
6.4	Analyses lipidiques . . . . .	71
7	Expression des résultats . . . . .	72
8	Modélisation . . . . .	72
8.1	Logiciels . . . . .	72
8.2	Estimation de la qualité des simulations . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Développement du modèle de co-limitation</b>	<b>75</b>
1	Introduction . . . . .	76
2	Modifications du modèle de Droop . . . . .	77
2.1	Modélisation du taux de croissance . . . . .	78
2.2	Modélisation de l'absorption . . . . .	79
3	Comparaison à des données expérimentales . . . . .	82
3.1	Comparaison qualitative . . . . .	82
3.2	Calibration du modèle . . . . .	84

3.3	Comparaison quantitative . . . . .	85
4	Discussion . . . . .	86
4.1	Asymétrie entre les absorptions de N et P . . . . .	86
4.2	Prédictions du modèle aux limites physiologiques des quotas . . . . .	87
4.3	Prédictions du modèle dans l'intervalle des limites physiologiques . . . . .	88
5	Conclusion . . . . .	92
<b>4</b>	<b>Paramétrisation du modèle de co-limitation</b>	<b>95</b>
1	Introduction . . . . .	96
2	Résultats . . . . .	96
2.1	Cultures . . . . .	96
2.2	Absorption du $\text{NO}_3$ et du $\text{PO}_4$ . . . . .	101
2.3	ATP . . . . .	102
2.4	Bilan de fractionnement par oxydation humide . . . . .	104
2.5	Calibration du modèle . . . . .	105
3	Discussion . . . . .	106
3.1	Comportement biologique des cultures . . . . .	106
3.2	Prédictions du modèle . . . . .	111
3.3	Enseignements sur la co-limitation N-P . . . . .	112
4	Conclusion . . . . .	113
<b>5</b>	<b>Modifications du modèle de co-limitation</b>	<b>115</b>
1	Introduction . . . . .	115
2	Les modifications proposées . . . . .	116
3	Résultats . . . . .	119
3.1	Simulation d'une population bactérienne . . . . .	119
3.2	Simulation de l'excrétion d'azote organique . . . . .	119
4	Discussion . . . . .	123
5	Conclusion . . . . .	127

---

<b>6</b>	<b>Étude expérimentale de la co-limitation</b>	<b>129</b>
1	Introduction . . . . .	130
2	Résultats . . . . .	130
2.1	Cultures . . . . .	130
2.2	Énergie cellulaire . . . . .	136
2.3	Lipides neutres . . . . .	137
2.4	Prédictions du modèle . . . . .	139
3	Discussion . . . . .	141
3.1	Qualité des prédictions du modèle . . . . .	141
3.2	Interactions N-P . . . . .	144
3.3	Lipides neutres . . . . .	151
4	Conclusion . . . . .	152
<b>7</b>	<b>Discussion générale</b>	<b>155</b>
1	Les interactions au cœur du débat . . . . .	156
2	Des hypothèses concurrentes . . . . .	157
2.1	Quel médiateur pour l'interaction N-P? . . . . .	159
2.2	Quels mécanismes pour la co-limitation N-P? . . . . .	162
2.3	Influence de la co-limitation N-P sur le taux de croissance . . . . .	165
3	Les implications de la co-limitation N-P . . . . .	166
4	Perspectives . . . . .	168
4.1	Vers des expériences complémentaires . . . . .	168
4.2	Quelles améliorations pour le modèle? . . . . .	169
<b>8</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>171</b>
	<b>Annexes</b>	<b>199</b>
	<b>Annexe A</b>	<b>201</b>
	<b>Annexe B</b>	<b>203</b>

<b>Annexe C</b>	<b>205</b>
<b>Annexe D</b>	<b>207</b>
<b>Annexe E</b>	<b>209</b>
<b>Annexe F</b>	<b>211</b>
<b>Annexe G</b>	<b>213</b>
<b>Annexe H</b>	<b>215</b>
<b>Annexe I</b>	<b>217</b>



# Liste des figures

1	Arbre du vivant selon Keeling et al. (2005). . . . .	3
2	Évolution du prix des engrais en monnaie constante. . . . .	9
3	Principe de fabrication des différents engrais azotés. . . . .	10
1.1	Relevé des concentrations océaniques en $\text{NO}_3$ et $\text{PO}_4$ effectué lors de l'étude GEOSECS. . . . .	20
1.2	Topologie membranaire prédite pour le transporteur d'azote HvNRT2.1 de <i>H. vulgare</i> . . . . .	25
2.1	Plateau expérimental pour la culture de microalgues en photobioréacteurs au laboratoire Physiologie et Biotechnologies des Algues de l'IFREMER. . . . .	52
2.2	Photobioréacteurs plans de 12 L et de chemin optique 200 mm (type 1). . . . .	52
2.3	Photobioréacteurs plans de 10 L et de chemin optique 40 mm (type 2). . . . .	52
2.4	Principe de la culture en batch. . . . .	54
2.5	Principe de la culture en chémostat. . . . .	56
2.6	Micrographie électronique à transmission de <i>Tisochrysis lutea</i> . . . . .	58
2.7	Micrographie optique de deux cellules mobiles de <i>Tisochrysis lutea</i> . . . . .	58
2.8	Relation entre l'absorbance ( $\lambda_{680}$ ) et la concentration cellulaire d'une culture de <i>Tisochrysis lutea</i> (a). Atténuation de l'éclairement en fonction de la profondeur de culture (b). . . . .	61

---

2.9	Variation de la teneur en ATP dosée dans les cellules en fonction de la concentration cellulaire de l'échantillon de culture (a). Effet de la température et de la durée de conservation des échantillons sur la teneur en ATP (b).	69
2.10	Exemple de courbe d'étalonnage obtenue pour la mesure d'ATP par luminescence.	70
2.11	Molécule du fluorochrome Nile Red.	71
3.1	Comparaison des prédictions de notre modèle de co-limitation aux données expérimentales de Marchetti et al. (2012) pour <i>Tisochrysis lutea</i> à l'équilibre en chémostat.	83
3.2	Comparaison des prédictions de notre modèle de co-limitation au modèle de Klausmeier et al. (2004b) modifié.	84
3.3	Simulations du modèle de co-limitation pour la capacité de consommation de luxe du $\text{NO}_3$ et du $\text{PO}_4$ en fonction du taux de croissance.	88
3.4	Prédictions de notre modèle pour les quotas $q_N$ et $q_P$ à l'équilibre, en fonction du taux de croissance pour des rapports d'enrichissement N :P variant de 1 à 100.	89
3.5	Prédictions de notre modèle de co-limitation pour le rapport $q_N :q_P$ en fonction du taux de croissance et pour des rapports d'enrichissement variant de 1 à 100.	92
4.1	Évolution du quota cellulaire en carbone $Q_C$ dans les cultures limitées par le N et par le P au cours de l'expérience 1.	97
4.2	Évolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le N des expériences 1 et 2	99
4.3	Évolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le P des expériences 1 et 2	100
4.4	Variations relatives de $q_N$ et $q_P$ au cours des cultures limitées par le N et par le P de l'expérience 1.	102

4.5	Taux d'absorption de l'élément limitant ( $\text{NO}_3$ ou $\text{PO}_4$ ) mesurés chez <i>Tisochrysis lutea</i> au cours des cultures de l'expérience 1, limitées par le N et le P . . . . .	103
4.6	Variation de $q_{ATP}$ et de $A_{ATP}$ en fonction du taux de croissance dans les cultures en batch de l'expérience 2, limitées par le N et par le P. . . . .	104
4.7	Variation du rapport ATP :P en fonction du taux de croissance dans les cultures en batch de l'expérience 2, limitées par le N et par le P. . . . .	105
4.8	Relation entre l'accumulation du N particulaire et la disparition du N dissous dans les cultures limitées par le N et le P au cours de l'expérience 1. . . . .	106
5.1	Simulation de la cinétique de disparition de $\text{NO}_3$ au cours de la culture limitée par le P de l'expérience 1, en présence du développement d'une population bactérienne. . . . .	120
5.2	Simulations de la modification du modèle de co-limitation pour l'excréation, selon la formulation de Baklouti et al. (2006). . . . .	121
5.3	Simulations de la modification REE du modèle de co-limitation. . . . .	122
5.4	Évolution de la fraction NOD au cours de la culture limitée par le P dans l'expérience 1. . . . .	123
6.1	Évolution des variables mesurées dans les cultures en chémostat. . . . .	132
6.2	Détails de l'évolution de $X$ , $q_N$ , $q_P$ , $\text{NO}_3$ , $\text{PO}_4$ et $q_{ATP}$ dans les cultures en chémostat, lors de la seconde transition N-P. . . . .	134
6.3	Évolutions de $q_{ATP}$ en fonction du temps dans les chémostats. . . . .	136
6.4	Variations des taux spécifiques de fixation du carbone, de l'azote et du phosphore particulaires et de production d'ATP, au cours de la seconde transition N-P . . . . .	138
6.5	Variation de $q_{ATP}$ en fonction de $q_P$ dans les chémostats. . . . .	138
6.6	Variations de la fluorescence Nile red rapportée au carbone particulaire dans les cultures en chémostat . . . . .	139

---

6.7	Prédictions du modèle REE pour l'excrétion du NOD au cours des cultures en chémostat. . . . .	140
6.8	Représentation schématique de l'hypothèse de compétition entre les fonctions d'absorption et de fixation de carbone pour l'ATP disponible lors des deux transitions N-P. . . . .	146
7.1	Évolution des rapports ARN :C et ATP :C en fonction du taux de croissance chez <i>Thalassiosira pseudonana</i> , sur des cultures limitées par le NO <sub>3</sub> et le PO <sub>4</sub> , d'après Laws et al. (1983a). . . . .	161
7.2	Représentation schématique des consommations en ATP liées à l'assimilation du NO <sub>3</sub> , au transport du PO <sub>4</sub> et à la fixation du carbone. . .	164
B.1	Bilan de compartimentation obtenu par la méthode d'oxydation humide au cours de l'expérience 1, pour l'azote et le phosphore dans les cultures limitées par le N et par le P. . . . .	204
C.1	Évolution des fractions particulaires N et P dans les chémostats. . . .	206
D.1	Évolution des taux de croissance dans les chémostats et simulation du modèle de co-limitation au cours de la première transition N-P. . .	208
E.1	Évolution de la somme de l'azote particulaire et du NO <sub>3</sub> au cours des chémostats. . . . .	210
F.1	Représentation schématique du modèle d'interaction N-P proposé par Agren et al. (2012). . . . .	212
G.1	Représentation schématique du modèle en chaîne proposé par Pahlow et Oschlies (2009). . . . .	214
H.1	Représentation schématique du modèle d'interaction N-P proposé par Bonachela et al. (2013). . . . .	216

# Liste des tableaux

1.1	Paramètres cinétiques de l'absorption de $\text{NO}_3$ et de $\text{PO}_4$ chez différentes espèces de microalgues. . . . .	23
1.2	Caractéristiques des transporteurs NRT2 chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	26
3.1	Paramètres et variables du modèle de co-limitation. . . . .	77
3.2	Valeurs des paramètres utilisés pour le modèle de co-limitation N-P, pour <i>Selenastrum minutum</i> et <i>Tisochrysis lutea</i> . . . . .	85
4.1	Valeurs minimales et maximales des quotas N et P mesurées au cours des expériences 1 et 2. . . . .	101
4.2	Paramètres cinétiques de l'absorption du $\text{NO}_3$ et du $\text{PO}_4$ obtenus chez <i>Tisochrysis lutea</i> . . . . .	103
4.3	Jeu de paramètres issu de la calibration du modèle sur la base de l'expérience 1. . . . .	107
6.1	Valeurs mesurées au cours des équilibres successifs dans les chémostats, pour le carbone particulaire $X$ , les quotas $Q_C$ , $q_N$ et $q_P$ , les éléments résiduels $\text{NO}_3$ et $\text{PO}_4$ et $q_{ATP}$ . . . . .	135
6.2	Écart des prédictions du modèle aux valeurs expérimentales d'équilibre. . . . .	142



# Liste des symboles

$\varepsilon$	taux d'excrétion
$D$	taux de dilution d'une culture en continu
$K_m$	constante de demi-saturation pour l'absorption
$q_0$	quota minimum d'un élément
$Q_S$	quota de l'élément $S$ , rapporté à la cellule
$q_S$	quota de l'élément $S$ , rapporté au carbone
$q_{exp}$	quota d'un élément en phase exponentielle, rapporté au carbone
$q_{NL}$	quota maximum théorique d'azote, rapporté au carbone
$q_{PL}$	quota maximum de phosphore, rapporté au carbone
$S$	concentration d'un substrat minéral dans une culture
$S_{in}$	concentration d'un substrat minéral injectée dans un chémostat
$X$	concentration de biomasse dans une culture
$\bar{\mu}$	taux de croissance maximum hypothétique du modèle de Droop
$\mu$	taux de croissance
$\mu_{max}$	taux de croissance maximum
$\bar{\rho}$	taux maximum d'absorption théorique d'un nutriment
$\rho$	taux d'absorption d'un nutriment

$\rho_{max}$	taux maximum d'absorption d'un nutriment
$V_{max}$	vitesse maximum d'absorption d'un nutriment
$C$	carbone
$N$	azote
$P$	phosphore
$NID$	azote inorganique dissous
$NOD$	azote organique dissous
$PID$	phosphore inorganique dissous
$POD$	phosphore organique dissous
$PART$	fraction minérale et organique particulaire dans une culture
$R_C$	rapport critique entre deux nutriments
$RES$	fraction minérale dissoute dans une culture
$ROX$	fraction minérale et organique dissoute dans une culture
$TOX$	somme des formes minérales et organiques, particulières et dissoutes dans une culture
REE	variante du modèle de co-limitation, incluant une Régulation Énergétique de l'Excrétion
ADN	acide desoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
DHA	acide docosahexaénoïque
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EPA	acide eicosapentaénoïque
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

# Liste des publications

- Muñoz-Tamayo, R., Martinon, P., **Bougaran, G.**, Mairet, F., Bernard, O. (2014). Getting the most out of it : optimal experiments for parameter estimation of microalgae growth models. *Journal of Process Control*, 24(6), 991-1001.
- Garnier, M., Carrier, G., Rogniaux, H., Nicolau, E., **Bougaran, G.**, Saint-Jean, B., Cadoret, J.P. (2014). Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *Journal of proteomics*, 105, 107-120.
- Carrier, G., Garnier, M., Le Cunff, L., **Bougaran, G.**, Probert, I., De Vargas, C., Corre, E., Cadoret, J.P., Saint-Jean, B. (2014). Comparative transcriptome of wild type and selected strains of the microalgae *Tisochrysis lutea* provides insights into the genetic basis, lipid metabolism and the life cycle. *PLoS One*, 9(1).
- Marchetti, J., **Bougaran, G.**, Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R., Cadoret, J.P. (2013). Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *Journal Of Applied Phycology*, 25(1), 109-119.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., **Bougaran, G.**, Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.B., Fouilland, E., Bernard, O., Cadoret J.P., (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2(3), 212-222.
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., **Bougaran, G.**, Cadoret, J.P., Morant-Manceau, A., Schoefs, B., (2012). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(15), 2733-2750.
- Vasseur, Ch., **Bougaran, G.**, Garnier, M., Hamelin, J., Leboulanger, Ch., Le Chevanton, M., Mostajir, B., Sialve, B., Steyer, J.Ph., Fouilland, E. (2012). Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae-bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate : first step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. *Bioresource*

- technology 119, 79-87.
- **Bougaran, G.**, Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., Lukomska, E., Le Coz, J.R., Cadoret, J.P. (2012). Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2737-45.
  - Marchetti, J., **Bougaran, G.**, Le Dean, L., Mégard, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R., Robert, R., Cadoret, J.P. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, 326-329, 106-115.
  - **Bougaran, G.**, Bernard, O., Sciandra, A. (2010). Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*, 265, 443-454.
  - Loubière, K., Olivo, E., **Bougaran, G.**, Pruvost, J., Robert, R., Legrand, J. (2009). A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop airlift and swirling flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 132-147.

# Remerciements

*A mes grands-parents, à tout jamais merci.*

*A mes parents.*

*A ma femme et à mes enfants, merci pour votre soutien et votre patience, sans lesquels rien n'aurait été possible.*

*Merci à Antoine Sciandra et Olivier Bernard, pour votre vision scientifique, votre disponibilité et votre optimisme inébranlable. Vos qualités humaines ont enrichi cette belle aventure scientifique d'une réelle amitié.*

*Merci à Jean-Paul Cadoret, de m'avoir activement soutenu dans la décision de m'investir dans cette thèse.*

*Merci à Jean-Baptiste Bérard et Ewa Lukomska, pour votre assistance de tous les instants et les innombrables analyses associées à ce travail. Merci pour tous les week-ends et nuits sacrifiés pour les expériences. Je n'en oublierai rien.*

*Merci au laboratoire, dans son ensemble, qui conserve une ambiance tellement favorable au travail en équipe.*

Je tiens également à remercier Claude Aflalo et à Patrick Raimbault, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Benoît Schoefs, Damien Eveillard et Joël Fleurence pour leur participation au jury.

Je remercie enfin Anis Limami pour sa participation au comité de suivi de cette thèse.



# Introduction générale

## Sommaire

---

<b>1</b>	<b>De l'environnement aux biotechnologies . . . . .</b>	<b>1</b>
1.1	Un rôle primordial à l'échelle de la planète . . . . .	2
1.2	La valorisation biotechnologique des microalgues . . . . .	4
	Alimentation animale . . . . .	4
	Bioremédiation . . . . .	5
	Biocarburants . . . . .	5
	Santé humaine . . . . .	6
	Alimentaire . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Des ressources clés . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Présentation de l'étude . . . . .</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Organisation du manuscrit . . . . .</b>	<b>14</b>

---

## 1 Les microalgues : de l'environnement aux biotechnologies

Les algues recouvrent un ensemble d'organismes photosynthétiques très divers, planctoniques ou benthiques, à l'habitat diversifié. Elles ne forment pas un groupe simple et cohésif et sont, à ce titre, considérées comme un assemblage polyphylétique (Andersen, 1992). Il existe au moins sept lignées phylogénétiques distinctes d'algues, dont les majeures sont les algues rouges, les algues vertes et les Chromophytes et les mineures sont les Dinoflagellés,

les Euglénophytes, les Cryptophytes et les Glaucophytes. Le nombre d'espèces d'algues est probablement très élevé et il est difficile de l'évaluer. Diverses tentatives ont conduit à des estimations variant de 30.000 à 10 millions d'espèces (Andersen, 1992). Plus récemment, Guiry (2012) a proposé un nombre d'espèces d'algues de l'ordre de 72500, bien que Mora et al. (2011) soulignent que 91 % des espèces marines demeurent encore à décrire.

L'origine de la diversité des algues est aujourd'hui associée à la théorie de l'endosymbiose, qui décrit l'origine des plastes à partir de procaryotes de type cyanobactérien vivant à l'intérieur de cellules eucaryotiques (McFadden, 2001). Inventée par Mereschkowsky dès 1910, cette théorie est définitivement adoptée à partir des années 70 (Woese, 1977). Les divers niveaux d'endosymbiose, et notamment les endosymbioses secondaires seraient ainsi à l'origine de l'évolution des eucaryotes et de la diversité de la vie moderne.

Les algues rouges et les algues vertes, ces dernières étant à l'origine des plantes terrestres, sont classées parmi les Plantae (figure 1). Les Chromalvéolates, qui comprennent les Straménopiles (Diatomées, Eustigmatophyte, Phaeophytes, Chrysophytes, Haptophytes, Cryptomonads) et les Alvéolates (Dinoflagellés), rassemblent une grande part de la diversité des algues (Keeling et al., 2005). Cette diversité a permis aux algues de coloniser une large variété d'habitats. Généralement aquatiques, les algues se retrouvent dans les océans, les lacs, les rivières et la croûte supérieure du sol. Mais des milieux aussi extrêmes tels que la neige, la glace, les sources chaudes, ont également été conquis par elles.

Créé en 1897, le terme de phytoplancton (du Grec *phytos* : plante et de l'Allemand *plankton* : errant) décrit un groupe lui aussi divers et polyphylétique réunissant principalement des organismes photosynthétiques unicellulaires, qui vivent dans les masses d'eaux marines ou douces (Falkowski, 2004). Ces organismes microscopiques comprennent des bactéries et des protistes. Parmi les types communs, on retrouve les cyanobactéries et les microalgues. Celles-ci se distinguent des cyanobactéries, souvent qualifiées d'algues bleu-vertes, par leur structure eucaryotique, contrairement aux bactéries procaryotiques (Stanier et al., 1971).

### 1.1 Un rôle primordial à l'échelle de la planète

Les algues jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes marins. La production primaire des océans représente 50 % de la production primaire globale sur

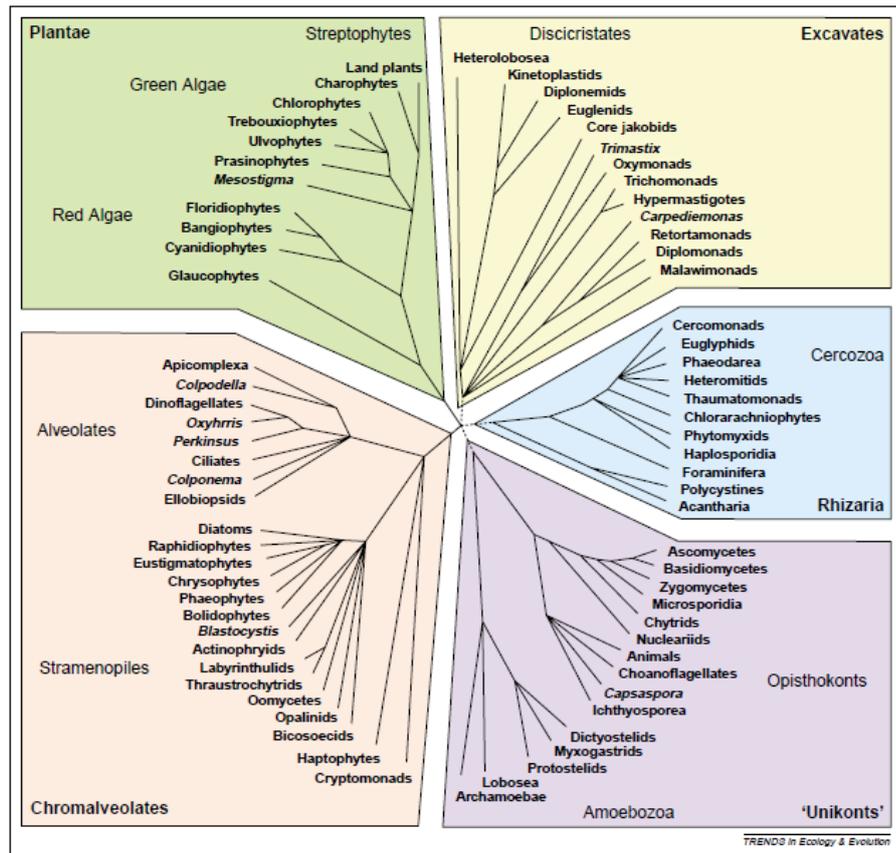


FIGURE 1 – Arbre du vivant selon Keeling et al. (2005).

la planète (Geider et al., 2001) et contribue substantiellement au cycle du carbone. Il est estimé qu'à travers son activité photosynthétique, le phytoplancton fixe entre 45 et 50 GT de carbone organique par an et qu'en moyenne, le renouvellement de la biomasse phytoplanctonique dans les océans est de l'ordre de la semaine (Falkowski, 1998; Geider et al., 2001).

Au-delà, de son rôle considérable en tant que source d'oxygène et puits de carbone, la production primaire des océans est également à la base des chaînes trophiques marines. Les organismes phytoplanctoniques sont capables de synthétiser une variété de molécules essentielles, telles que des acides aminés, des acides gras poly-insaturés à chaînes longues ou des vitamines (Cobalamine, Biotine ou Thiamine). Au bout du compte, la majorité des organismes supérieurs marins est liée de manière directe ou indirecte à cette production primaire.

## 1.2 La valorisation biotechnologique des microalgues

Pour nos sociétés modernes, en constante quête de nouveaux procédés et molécules actives, les microalgues représentent un formidable potentiel. De par leur nombre élevé d'espèces et leur forte biodiversité, elles constituent un réservoir de métabolismes et de propriétés biochimiques (Metting Jr, 1996) encore peu visité, pour le développement de nouvelles applications biotechnologiques. Depuis le milieu du vingtième siècle, le nombre d'applications liées aux microalgues ne cesse de croître dans des domaines variés (Spolaore et al., 2006).

**Alimentation animale** L'un des premiers secteurs à faire appel aux microalgues est l'aquaculture, celles-ci constituant la nourriture naturelle de beaucoup d'animaux d'élevage. Elles sont ainsi utilisées pour la production de larves de crevettes et de certains poissons, de larves et juvéniles de mollusques et pour l'élevage de zooplancton de la chaîne trophique en aquaculture (Benemann, 1992). En ce qui concerne l'élevage des mollusques, activité aquacole la plus développée en France, l'utilisation de microalgues demeure incontournable. Les nombreux essais de régimes de substitution (Coutteau et Sorgeloos, 1992) n'ont pas permis d'égaliser les performances d'élevage atteintes à l'aide de microalgues vi-

vantes. Les microalgues permettent un apport en acides aminés essentiels, en vitamines et acides gras poly-insaturés à longue chaîne (Brown et al., 1997). Avec l'expansion soutenue de l'aquaculture, les besoins quantitatifs et qualitatifs en microalgues à vocation aquacole devraient continuer à s'accroître dans l'avenir (Borowitzka, 1997).

**Bioremédiation** En raison de leur surface spécifique élevée, les microalgues ont des capacités d'absorption particulièrement intéressantes pour la décontamination de milieux pollués et la lutte contre l'eutrophisation. Ces applications de bioremédiation à l'aide de microalgues sont largement documentées dans la littérature. Leur capacité d'absorption de l'azote et du phosphore peut ainsi être mise à profit pour l'épuration des eaux urbaines ou industrielles (Lim et al., 2010; Martinez et al., 2000) ou des effluents d'élevage (Godos et al., 2009). L'utilisation de microalgues pour la dépollution des métaux lourds a également été envisagée et posséderait un potentiel de performance supérieur, à un coût moindre, que les technologies de traitement plus conventionnelles (Wilde et Benemann, 1993). Le développement de ces technologies à l'échelle industrielle se heurte néanmoins à la disponibilité de systèmes de culture d'ampleur, véritablement performants et fiables.

**Biocarburants** Suite aux virulentes polémiques à l'adresse des biocarburants de première et deuxième générations, les microalgues sont aujourd'hui considérées comme une source prometteuse de biocarburants, dits de troisième génération. Selon les espèces de microalgues, il est possible d'envisager la production de biodiesel ou de bioéthanol. Les microalgues sont également méthanisables pour obtenir du biogaz.

Dès 1979, le Laboratoire du NREL, aux États-Unis (Sheehan et al., 1998), avait entrepris des travaux pionniers pour la production de biodiesel à partir de microalgues, mais fut contraint de clore ces recherches trop tôt, en 1996. Depuis les années 2000, cette thématique connaît un net regain d'intérêt à travers le monde où de nombreux groupes de recherche se sont mobilisés (États-Unis, Nouvelle-Zélande, Italie, Israël, Espagne, Allemagne, France ...). Cet engouement se retrouve également au niveau industriel, avec, selon le Rapport Oilgae (2013), environ trois cents sociétés commerciales qui réalisent aujourd'hui un effort significatif dans le domaine des biocarburants à base de microalgues : Greenfuel Technologies Corp., Aurora Algae, Aquaflow Bionomic (New Zealand), Kwikpower, Algae Biofuels,

Energy Farms, Solix Biofuels, Solazyme ...

Comparativement aux espèces oléagineuses terrestres, la production de biodiesel à partir de microalgues résout de nombreux problèmes environnementaux, avec des rendements de croissance et d'huile à l'hectare supérieurs (Cadoret et Bernard, 2008). Outre ces avantages, l'utilisation de microalgues présente de nombreux intérêts, dont les plus importants sont sans doute l'absence de compétition pour les terres arables, la possibilité de biore-médiation de CO<sub>2</sub> et le traitement combiné d'eaux usées (Mata et al., 2010). Néanmoins, l'activité autour de la production de biodiesel à partir des microalgues est encore jeune. Elle demeure essentiellement cantonnée à l'échelle pilote et beaucoup reste à faire pour la rendre économiquement viable. Les principales voies de recherche devront concerner le développement du concept de bioraffinerie, l'amélioration des connaissances sur la biologie des algues et la conception de systèmes de culture performants (Chisti, 2007), en rupture avec les systèmes actuels.

**Santé humaine** S'il est un secteur où la grande diversité des microalgues est particulièrement convoitée, c'est certainement celui de la santé humaine. L'existence de lignées différentes, non représentées parmi les espèces végétales terrestres et des habitats variés — parfois extrêmes — laissent pressentir un potentiel de molécules bioactives nouvelles particulièrement élevé. Ainsi, depuis les années 80, des programmes de criblage ont été entrepris pour la recherche de composés à valeur médicinale (Metting et Pyne, 1986). Un grand nombre d'articles scientifiques traitent du sujet et une revue de cette littérature dépasserait largement le cadre de cette introduction. Néanmoins, parmi les activités biologiques fréquemment recensées, on retrouve des effets antioxydant, anti-inflammatoire et antimutagène des pigments (Mimouni et al., 2012; Schwartz et al., 1990), des activités antimicrobienne et antivirale (Borowitzka, 1995), des effets hypocholestérolémiantes des acides gras poly-insaturés (Mimouni et al., 2012) ou encore des activités antitumorales et contre le diabète ... Depuis quelques années, un intérêt supplémentaire a été porté aux microalgues, avec l'expression d'anticorps monoclonaux humains chez *Chlamydomonas reinhardtii*, comme preuve de concept : la production de ces anticorps dans des systèmes microalgues apparaît comme une alternative particulièrement intéressante aux systèmes mammifères, notamment grâce à une transformation facile et rapide des génomes nucléaire

et plastidial et à des coûts de production inférieurs (Franklin et Mayfield, 2005).

**Alimentaire** Assez anecdotique en occident, l'utilisation de microalgues pour l'alimentation humaine offre des moyens de lutte contre la faim et la malnutrition dans les pays en voie de développement. Bien que n'étant pas à proprement parler une microalgue, la spiruline a fait l'objet de nombreux travaux qui en font un exemple en la matière (Habib et al., 2008). Au-delà, les microalgues sont également une source de compléments alimentaires, de protéines et de lipides. Leur capacité à synthétiser des acides gras poly-insaturés comme le DHA et l'EPA est particulièrement prisée (Mendes et al., 2009). La société Martek produit ainsi par hétérotrophie, à l'aide de *Cryptocodinium cohnii*, des quantités de DHA (Barclay et al., 1994) qui rentre dans la composition du lait infantile. Plus près de nous, en France, la société Innovalg produit la microalgue *Odontella aurita* pour sa richesse en EPA (Haimeur et al., 2012). Cependant, en France, le développement des microalgues pour l'alimentaire est entravé par la difficulté d'obtention des autorisations nécessaires auprès de l'Anses : en dehors de la spiruline, seules *Odontella aurita* et *Chlorella sp.* bénéficient actuellement de ces autorisations.

## 2 L'azote et le phosphore : des ressources clés

Après le carbone, l'azote et le phosphore sont quantitativement les éléments les plus importants de la biomasse phytoplanctonique naturelle. Ces trois éléments entrent dans sa composition selon un rapport moyen de 106:16:1, identifié par Redfield (1934) dans les océans. L'azote et le phosphore sont des ressources indispensables à tous les organismes ; ils interviennent dans la composition de molécules essentielles dans le vivant.

Geider et La Roche (2002) ont réalisé une synthèse des données disponibles sur la contribution de l'azote et du phosphore dans les grands types moléculaires chez le phytoplancton : l'azote cellulaire est majoritairement impliqué, à part égale et à hauteur de 30 %, dans la composition de chacun des acides nucléiques (ADN et ARN) et des protéines (environ 30 %). Les chlorophylles représentent une part moindre, mais significative d'environ 10 % de l'azote cellulaire. De la même manière, une large part du phosphore cellulaire (environ 40 %) rentre dans la composition des deux types d'acides nucléiques, et les phospholipides

membranaires représentent jusqu'à 20 % du phosphore cellulaire. Enfin, bien que ne mobilisant qu'une faible part du phosphore cellulaire, les pools adénosine phosphate (ATP, ADP, AMP) et NADPH jouent cependant un rôle crucial dans le métabolisme énergétique cellulaire.

Selon que l'on considère le phytoplancton dans un contexte écologique ou dans le cadre des productions dites industrielles, les questions relatives à la disponibilité en azote et en phosphore sont d'ordres très différents. Les ressources en azote et phosphore disponibles pour les populations phytoplanctoniques dans le milieu marin, particulièrement dans les eaux côtières, proviennent des charges nutritives drainées par les fleuves sur les bassins versants. Ces bassins supportent plus de 75 % de la population humaine (Vitousek, 1997) et sont le lieu de développements urbains et d'activités industrielles et agricoles, concourant aux fortes charges nutritives. Howarth et al. (1996) estiment que les apports fluviaux vers l'océan Atlantique nord atteignent  $13,1 \text{ GT an}^{-1}$  pour l'azote et  $2,2 \text{ GT an}^{-1}$  pour le phosphore. Dans de nombreuses régions tempérées, les flux d'azote auraient augmenté de 2 à 20 fois depuis l'ère préindustrielle.

Ces rejets anthropogéniques sont responsables d'efflorescences phytoplanctoniques dans les milieux côtiers et estuariens où ils conduisent à des situations d'eutrophisation. Il est reconnu que les populations phytoplanctoniques y sont majoritairement limitées par la disponibilité en azote (Howarth et al., 1996), parfois en phosphore et que le type de limitation est susceptible d'évoluer selon les saisons (Howarth, 1988). Ainsi, Smith (2006) insiste sur la nécessité de cerner le lien quantitatif entre la concentration en nutriments et la qualité du milieu, afin d'évaluer les risques d'eutrophisation et de déterminer le niveau auquel la charge nutritive doit être maintenue ou réduite pour obtenir la qualité d'eau visée. Dans l'état actuel des connaissances, Howarth et al. (1996) recommandent, quant à eux, la limitation des apports d'azote et dans une moindre mesure, de phosphore vers les estuaires et les zones côtières pour contrôler l'eutrophisation de ces eaux.

Dans le cadre des productions phytoplanctoniques industrielles, l'azote et le phosphore représentent des intrants cruciaux pour la productivité des cultures. L'utilisation intensive d'engrais induit des coûts et des impacts sur l'environnement qui remettent en question l'équilibre de l'analyse du cycle de vie des productions phytoplanctoniques (Lardon et al.,

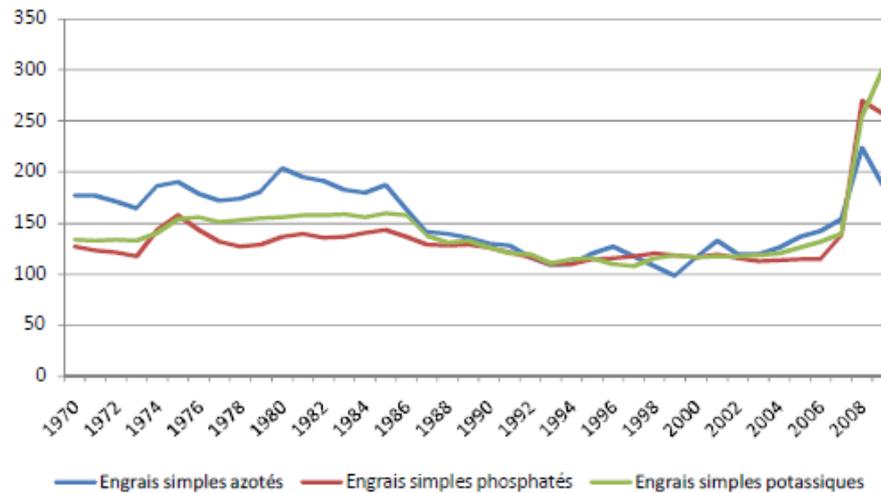


FIGURE 2 – Evolution du prix des engrais en monnaie constante. Source : Rapport GCL Développement Durable (2010).

2009).

La France importe la majorité des matières premières nécessaires à la production d'engrais azotés et phosphorés, ce qui crée une situation de dépendance vis à vis du marché international. Suite à la croissance des pays émergents et à l'absence d'investissement dans l'industrie des engrais pendant les années 90, le cours des engrais a connu des variations particulièrement importantes, avoisinant les 100 % entre les années 2006 et 2007 (figure 2). D'autres sources (Cordell et White, 2011) font état d'une hausse vertigineuse du prix du phosphore en 2008, celui-ci étant multiplié par 5 par rapport à 2007. A l'instar des productions agricoles, les productions phytoplanctoniques à l'échelle industrielle sont soumises aux fluctuations du prix des engrais azotés et phosphorés. L'examen des causes révèle des problèmes spécifiques à chacun de ces deux éléments indispensables.

L'azote est un élément présent dans l'atmosphère à hauteur de 80% ; à ce titre, cette ressource est disponible à volonté pour l'industrie des engrais. Les différentes formes d'azote,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  ou urée, assimilables par les végétaux terrestres et les microalgues, sont synthétisées par réaction entre l'azote atmosphérique et l'hydrogène, ce dernier provenant essentiellement de gaz naturels et, dans une moindre mesure, du charbon (figure 3). Le coût de la production d'engrais azotés est donc intimement lié au coût de l'énergie. L'essentiel des besoins énergétiques de l'industrie des engrais est globalement relié à la production d'engrais azotés, représentant 94 % de l'énergie totale consommée, contre seulement 3 %

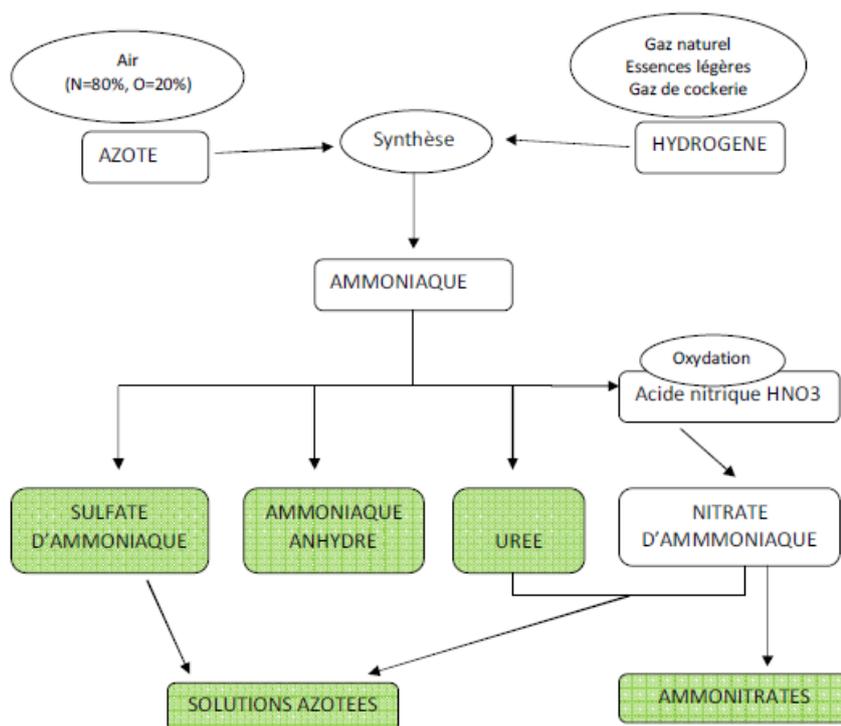


FIGURE 3 – Principe de fabrication des différents engrais azotés. Source : Rapport GCL Développement Durable (2010).

pour la transformation du pentoxyde de phosphore (Jenssen et Kongshaug, 2003). Le coût du gaz naturel nécessaire à la synthèse représente environ 80 % du coût de production de l'ammoniaque ; ce qui explique l'indexation du prix de l'ammoniaque sur celui du gaz naturel. Bien que la consommation d'énergie par l'industrie des engrais soit approximativement inférieure de 15 % en Europe de l'Ouest par rapport au reste du monde, celle-ci représente néanmoins 0.9 % de la consommation totale d'énergie et contribue à hauteur de 1.8 % aux émissions de  $N_2O$  et de  $CO_2$  (Rapport GCL Développement Durable, 2010). Actuellement, les principales zones productrices de gaz naturel sont le Moyen-Orient, la Russie, l'Afrique du Nord et l'Amérique du Nord. Ces régions possèdent une influence déterminante sur l'évolution du prix des engrais azotés.

Le phosphore est au dixième rang des éléments les plus représentés dans la croûte terrestre (Taylor, 1964). La production d'engrais phosphorés repose sur l'exploitation minière de gisements de pentoxyde de phosphore ( $P_2O_5$ ), d'origine sédimentaire marine (80 %) ou magmatique (17 %) auxquels s'ajoute le guano, issu des excréments d'oiseaux marins (3 %). La répartition géographique mondiale des gisements naturels de phosphore est hétérogène ; le Maroc (43 %) et la Chine (23 %), associés aux Etats-unis (7 %) et à l'Afrique

du sud (6%), regroupent à eux seuls 80 % des ressources mondiales (Gilbert, 2009). Du fait de sa faible consommation interne, le Maroc représente l'acteur principal des flux de phosphore dans le monde (Rapport GCL Développement Durable, 2010).

Les dynamiques extrêmement lentes d'accumulation dans les gisements font du minerai de phosphore une ressource épuisable, contrairement à l'azote. Il est estimé que les ressources connues de phosphore pourraient se tarir d'ici 30 à 300 ans (Cordell et al., 2009; Cordell et White, 2011). Les difficultés d'approvisionnement pourraient cependant se manifester plus tôt encore, comme l'expliquent Cordell et White (2011), en raison de l'occurrence d'un "pic phosphore" : cette notion recouvre l'idée que l'augmentation de la demande pour une ressource critique dépasse à un moment ou un autre les possibilités d'approvisionnement économiquement réalisables, malgré les avancées technologiques. Dans le cas du phosphore, les causes évoquées pour ce pic recouvrent l'hétérogénéité qualitative de la ressource et les contraintes économiques et énergétiques pour exploiter des ressources de plus en plus faibles et difficilement accessibles.

Si le volume de minerai encore disponible et l'échéance de son épuisement sont actuellement l'objet de débats entre experts, l'hétérogénéité de ces ressources fait généralement consensus, de même que leur moindre pureté. Viennent ainsi se rajouter des contraintes de pollution environnementale liées à l'exploitation d'un minerai contaminé par des métaux toxiques tels que le cadmium (Gilbert, 2009; Volokh et al., 1990). En réaction à la raréfaction des ressources naturelles et aux problèmes de durabilité des usages, la Commission Européenne a récemment lancé une consultation pour étudier les moyens d'utiliser le phosphore d'une manière plus durable (<http://ec.europa.eu/environment/natres/phosphorus.htm>).

A court terme, l'économie des productions phytoplanctoniques à grande échelle se heurtera à des difficultés liées à l'emploi des engrais azotés et phosphorés, qui freineront le développement de ce nouveau type de productions végétales. Il est nécessaire, dès aujourd'hui, de considérer les conditions d'approvisionnement pour s'efforcer d'en réduire l'impact sur l'économie de la filière. Une moindre dépendance vis à vis de l'industrie des engrais doit ainsi être envisagée. Dans la veine des recommandations du Rapport GCL Développement Durable (2010), l'approfondissement de notre connaissance de la nutrition minérale

des microalgues à travers un effort appuyé de recherche "agronomique-environnementale" pourra apporter des solutions à l'économie et à la durabilité de la filière. La substitution de sources organiques d'origine industrielle, animale ou urbaine (Weikard et Seyhan, 2009) aux engrais classiques est une voie de recherche prometteuse complémentaire, permettant par la même occasion, le traitement de rejets polluants. Enfin, le recyclage des milieux de culture des microalgues constitue une dernière piste alternative.

### 3 Présentation de l'étude

Cette thèse a l'ambition de contribuer à une meilleure compréhension des besoins des microalgues vis à vis des deux ressources clés que sont l'azote et le phosphore. Plus précisément, elle vise à mieux cerner les mécanismes grâce auxquels les microalgues accèdent et mobilisent ces ressources au profit de leur croissance, dans un contexte de limitations et d'interactions éventuelles entre les ressources. Cette question, importante au regard du contexte développé précédemment, possède des implications tant en écologie que pour les cultures à vocation industrielle.

Longtemps, les études de physiologie végétale se sont appuyées sur des approches monofactorielles, notamment pour des raisons de simplification expérimentale. Dans le cas particulier de la nutrition minérale, ces approches trouvaient une justification à travers les observations de Liebig et la loi dite du minimum (Liebig, 1855) ou celle de Blackman (1905), selon lesquelles seul l'élément en moindre disponibilité par rapport aux besoins limite le rendement en biomasse (Liebig) ou la vitesse de croissance (Blackman). Ces lois postulent, en effet, une indépendance des effets des éléments sur le développement des populations végétales. Néanmoins, dès 1985, Maberly attirait l'attention sur l'importance de considérer les interactions potentielles entre les facteurs influençant la croissance. En outre, les études sur les divers types de limitations nutritives du phytoplancton dans les océans et les lacs ont démontré l'évidence de limitations multifactorielles et ont progressivement conduit à l'émergence du concept de co-limitation (Arrigo, 2005; Saito et al., 2008).

Jusqu'à une époque récente, les évidences expérimentales ont contribué à considérer l'azote et le phosphore comme indépendants pour les limitations qu'ils exercent sur le développe-

ment du phytoplancton. Les nombreux exemples issus des études en milieu naturel (Maberly et al., 2002; Seppala et al., 1999; Zohary et al., 2005) ont appuyé des démonstrations obtenues en laboratoire (Rhee, 1978; Terry, 1980) : la co-limitation par l'azote et le phosphore n'existerait ainsi que dans la mesure où le rapport des concentrations en ces éléments dans le milieu correspondrait très exactement à celui des besoins du phytoplancton.

Au-delà des multiples observations expérimentales d'indépendance de l'azote et du phosphore, il est indéniable que les métabolismes azote et phosphore possèdent des connexions ; ces deux éléments interviennent dans des molécules communes comme les acides nucléiques et participent ensemble, avec des rôles propres, à divers types de réactions enzymatiques : en particulier, le phosphore, à travers son rôle dans l'énergie et le pouvoir réducteur est au centre de processus cellulaires impliquant l'azote et pouvant être le siège de phénomènes de co-limitation. Sur la base de ce constat et en conjonction avec un ensemble d'observations expérimentales issues de la littérature — porteuses d'interrogations nouvelles —, il nous a paru intéressant de revisiter le concept de co-limitation par l'azote et le phosphore chez les microalgues, au travers de cette thèse.

La démarche de ce travail s'articule autour de deux axes. Le premier s'appuie sur une synthèse des connaissances des limitations azote et phosphore et de leurs interférences sur la croissance des microalgues, conduisant à l'élaboration d'une hypothèse de co-limitation. Une fois formulée, celle-ci est traduite en un modèle mathématique de croissance des microalgues, par modification du modèle de Droop (1973) pour représenter le phénomène de co-limitation.

L'objectif poursuivi par le second axe est de rassembler des éléments de preuve ou — à défaut — des indications en faveur de (ou contraires à) l'hypothèse formulée, par une approche expérimentale : un premier jeu de données est ainsi produit et utilisé pour le paramétrage du modèle. Puis les capacités prédictives du modèle sont utilisées pour déterminer les protocoles expérimentaux les plus aptes à exprimer le processus de co-limitation supposé.

Cette thèse a été initiée au cœur du programme Shamash, premier programme français dédié à l'étude des biocarburants lipidiques à base de microalgues. Ainsi, dans une dernière dimension, plus appliquée, les expérimentations visent à évaluer les implications de

la co-limitation entre l'azote et le phosphore sur les cinétiques d'accumulation de lipides neutres, hautement valorisables dans le cadre de la production de biodiesel.

## 4 Organisation du manuscrit

Ce manuscrit s'articule autour de sept chapitres.

Le premier fournit un bilan des connaissances sur la nutrition minérale et les processus d'acquisition de l'azote et du phosphore. Il présente également la notion de limitation nutritive et le concept relativement récent de co-limitation, sous les différents aspects qu'il revêt.

Le second chapitre expose les méthodes et matériels mis en œuvre au cours de ce travail, avec un focus sur les techniques de culture et de dosage de l'azote et du phosphore dans les compartiments particuliers et dissous, ainsi que celles liées au dosage de l'ATP intracellulaire.

Le troisième chapitre est consacré au développement du modèle mathématique proposé pour traduire le phénomène supposé de co-limitation entre l'azote et phosphore. Il présente les diverses observations biologiques et la démarche de synthèse des connaissances qui ont conduit à l'élaboration de l'hypothèse de co-limitation ici proposée. Dans un second temps, le développement du modèle est exposé ainsi qu'une première étape de validation sur la base de données biologiques antérieures.

Les quatrième, cinquième et sixième chapitres présentent l'ensemble des travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse. Il s'agit, sur la base de simulations issues du modèle, de mettre à jour expérimentalement des comportements biologiques permettant d'évaluer les qualités du modèle mathématique développé, ainsi que l'hypothèse biologique sous-jacente. Dans un premier temps, des expériences en batch sous mono-limitation par l'azote ou le phosphore y sont conduites (chapitre quatre). Sur la base des résultats obtenus, des adaptations du modèle de co-limitation sont ensuite proposées (chapitre cinq). Enfin, dans le chapitre six, des expériences en chémostat sont mises en œuvre, en raison du contrôle des paramètres qu'elles procurent.

Dans le septième et dernier chapitre, nous discutons l'importance des résultats obtenus sur

la compréhension de la nutrition minérale des microalgues. Les implications écologiques et industrielles, à travers la production de lipides de microalgues à vocation biodiesel, y sont également mises en perspective.



# Chapitre 1

## Sur la nutrition minérale

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction . . . . .</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>La nutrition minérale . . . . .</b>	<b>18</b>
2.1	Des besoins essentiels en macro-éléments . . . . .	19
2.2	L'acquisition des nutriments . . . . .	20
	Approches de modélisation du transport . . . . .	21
	Transport d'azote et de phosphore . . . . .	24
	Transport actif d'azote . . . . .	24
	Transport actif de phosphore . . . . .	26
<b>3</b>	<b>La limitation nutritive . . . . .</b>	<b>27</b>
3.1	Le cas de la mono-limitation . . . . .	27
3.2	Le concept de co-limitation . . . . .	29
	Une grande variété de cas de co-limitations décrits . . . . .	31
	La co-limitation biochimique . . . . .	31
	La co-limitation par nutriments indépendants . . . . .	36
	La co-limitation N-P : une indépendance apparente ? . . . . .	40
3.3	Les limitations et les réserves en lipides . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>46</b>

---

## 1 Introduction

Ce premier chapitre présente un état des connaissances actuelles sur l'acquisition des substrats minéraux et ses conséquences sur le développement des populations de microalgues photoautotrophes.

Les besoins en éléments minéraux des microalgues y seront exposés en portant une attention particulière au rôle biologique des macronutriments essentiels que sont l'azote et le phosphore. Les microalgues ont acquis des stratégies particulièrement efficaces pour faire face à la variabilité temporelle de ces ressources dans l'environnement et aux conditions oligotrophes auxquelles elles sont parfois soumises. L'état des connaissances sur les mécanismes moléculaires et les caractéristiques cinétiques d'acquisition sera ici présenté, en association avec leur formulation mathématique

L'accès restreint aux ressources minérales induit des limitations de la croissance des populations. Au cours de la dernière décennie, la notion de limitation a considérablement évolué dans son acception générale et sa complexité, conduisant à l'émergence du concept de co-limitation. Le second volet de ce chapitre sera ainsi consacré à une revue des caractéristiques des limitations rencontrées dans le milieu naturel ou mises à jour au cours d'études en laboratoire. Le cas particulier des limitations par l'azote et le phosphore et de leurs interactions sera étudié plus en profondeur et les conséquences sur le stockage de carbone, sous forme de réserves lipidiques, envisagées.

## 2 La nutrition minérale

Au-delà du rôle prépondérant de la lumière pour des organismes photosynthétiques, la croissance photoautotrophe des microalgues est subordonnée à la disponibilité d'éléments minéraux indispensables au métabolisme cellulaire. Les microalgues accèdent à ces ressources sous leur forme dissoute dans le milieu environnant. La disponibilité limitée de ces nutriments peut entraîner des limitations, voire des carences qui se traduisent par un ralentissement du taux de croissance ou l'arrêt du développement des populations. La variété des besoins selon les espèces de microalgues et l'évolution des ratios entre nutriments (Howarth, 1988) conduit dans le milieu naturel à des phénomènes de compétition et à une

succession temporelle des espèces (Tilman et al., 1982). Selon leur importance quantitative dans la composition de la biomasse microalgale, les micro-éléments sont distingués des macro-éléments, parmi lesquels l'azote et le phosphore.

## 2.1 Des besoins essentiels en macro-éléments

La nature des macro-éléments susceptibles de limiter le développement des populations de microalgues marines (C, N, P) diffère de celle des plantes dites supérieures (N, P, K), en raison d'un accès au carbone inorganique qui peut être limité par la dissolution du  $\text{CO}_2$  dans l'eau et de fortes teneurs des eaux marines en K.

En régime photoautotrophique, les microalgues couvrent leurs besoins en N et P en recourant aux différentes formes d'azote minéral disponibles dans le milieu ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  et  $\text{NH}_4$ ) et en puisant le phosphore minéral sous forme de  $\text{PO}_4$ . Il a longtemps été considéré que la composition du phytoplancton reflétait ses besoins relatifs en nutriments. A l'échelle globale des océans, Redfield (1934) a décrit une augmentation proportionnelle des concentrations en azote et phosphore avec la profondeur, entraînant une stabilité du rapport moyen entre ces deux éléments (figure 1.1). Redfield a été le premier à proposer que cet accroissement stœchiométrique pouvait être lié au relargage d'azote et de phosphore des particules de matière organique en cours de sédimentation ; il en a déduit que la composition moyenne du phytoplancton en éléments C, N, P devait exprimer des concentrations relatives selon un rapport de 106 :16 :1, depuis nommé rapport de Redfield.

Néanmoins, lors d'un apport massif d'azote ou de phosphore, les microalgues peuvent consommer ces nutriments en quantité excessive par rapport à leur besoin, ce que Elrifi et Turpin (1985) ont qualifié de *consommation de luxe*. Les microalgues stockent alors des quantités significatives d'azote ou de phosphore et leur composition relative s'éloigne du rapport de Redfield. Selon les espèces, l'azote peut être stocké sous forme de  $\text{NO}_3$  ou de  $\text{NH}_4$  (Lomas et Glibert, 2000). Le phosphore est, quant à lui, préférentiellement stocké sous forme de polymères linéaires d'orthophosphate, appelés polyphosphates, associés à divers organites dans la cellule (Eixler et al., 2006). Chez *Selenastrum minutum* et à faible taux de croissance, Elrifi et Turpin (1985) rapportent une capacité de consommation de luxe quatre fois supérieure pour le phosphore, par rapport à l'azote.

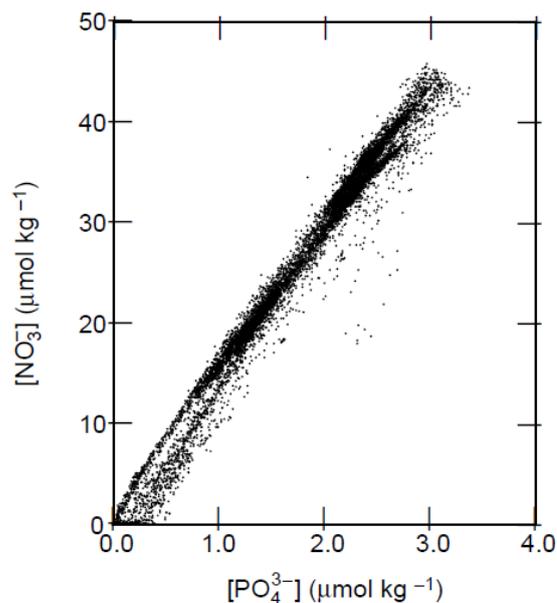


FIGURE 1.1 – Relevé des concentrations océaniques en  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  effectué lors de l'étude GEOSECS. Source : Tyrell (1999).

## 2.2 L'acquisition des nutriments

La littérature sur l'acquisition de l'azote par les végétaux et les microalgues est particulièrement fournie. Les études appréhendent les différents aspects, depuis la compréhension des mécanismes d'expression des gènes, jusqu'aux mesures des cinétiques de transport membranaire et d'assimilation d'azote, incluant les régulations. D'une manière générale, les travaux sur l'acquisition du phosphore sont moins nombreux et les connaissances plus parcellaires, notamment au niveau des gènes impliqués.

L'acquisition des nutriments recouvre un ensemble de processus différenciant tant par leur échelle de temps que par leur nature. L'*absorption*, ou *uptake* en Anglais, désigne la prise des nutriments, c'est à dire leur transport à travers la membrane plasmique. L'*assimilation* concerne la transformation des nutriments intracellulaires jusqu'à leur forme fonctionnelle. L'assimilation du  $\text{NO}_3$  nécessite donc les étapes de réduction en  $\text{NO}_2$ , puis en  $\text{NH}_4$  et d'amination pour son incorporation soit dans les acides aminés (Masclaux-Daubresse et al., 2010) et les protéines, soit dans les acides nucléiques. Bien que de nombreux aspects restent à découvrir, il existe un certain consensus sur le fait que le transport du  $\text{NO}_3$  représente une étape clé dans le contrôle de l'assimilation d'azote (Galvan et Fernandez, 2001). En croissance équilibrée, l'assimilation possède une constante de temps du même ordre de grandeur

que celle du taux de croissance spécifique. Au contraire, les régulations du transport lors d'une levée de carence sont très rapides, de l'ordre de la seconde à la minute. Elles se traduisent par le phénomène de *prise d'urgence* dont les modalités dépendent de l'état physiologique de la cellule (Droop, 1983), avec au tout premier plan, le type de transporteurs exprimé et leur densité dans la membrane.

### Approches de modélisation du transport

D'un point de vue modélisation, l'absorption est classiquement traduite par une fonction de type Michaelis-Menten (Klausmeier et al., 2004a) :

$$\rho = \frac{\rho_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (1.1)$$

où  $\rho$  et  $\rho_{max}$  représentent la vitesse d'absorption et son maximum à saturation, respectivement,  $K_m$  la constante de demi-saturation et  $S$  la concentration du substrat. Bien que très utilisé, ce type de modèle pose des difficultés d'interprétation des paramètres  $K_m$  et  $\rho_{max}$ . Particulièrement,  $K_m$  a pu être considéré comme une mesure de l'affinité pour le substrat. Cependant, l'existence de co-variations entre  $K_m$  et  $\rho_{max}$  a conduit à proposer le ratio  $\alpha = \frac{\rho_{max}}{K_m}$  comme un meilleur paramètre d'affinité (Harrison et al., 1989). Des modèles théoriques plus complexes s'appuient sur une description fine du phénomène de transport : Aksnes et Egge (1991) considèrent le nombre et la surface des transporteurs membranaires, le temps de traitement du nutriment par le transporteur et le phénomène de diffusion vers la cellule. Ce type de modèle mécaniste pose des difficultés liées à l'identification des paramètres, ce qui en limite l'intégration dans des modèles plus globaux.

Afin de rendre compte de l'existence de régulations par les pools internes de nutriments, différentes formulations ont été proposées. Celle de Dugdale (1967) décrit une absorption maximale inversement proportionnelle à la valeur du quota  $Q$

$$V_{max} = \frac{\rho_{max}}{Q} \quad (1.2)$$

où  $V_{max}$  représente la vitesse maximale d'absorption et  $\rho_{max}$  le taux maximal d'absorption de la cellule.

Plus tard, Zonneveld (1996) propose une formulation légèrement différente mais reposant sur la même idée

$$V_{max} = \frac{\rho_{max}}{Q - Q_0} \quad (1.3)$$

où  $Q_0$  représente le quota minimum ou quota de subsistance, pour lequel la vitesse de croissance est nulle. L'absorption est donc inversement proportionnelle à la valeur du quota de l'élément limitant. Cette formulation ne borne cependant pas l'absorption qui tend vers l'infini lorsque le quota tend vers son minimum  $Q_0$ , par exemple lors de situations transitoires relevant d'une brusque remise à disposition de l'élément limitant.

La formulation de Lehman et al. (1975), reprise notamment par Geider et al. (1998) et Davidson et Gurney (1999), présente l'intérêt d'utiliser un terme de régulation de type hyperbolique borné par les quotas  $Q_0$  et  $Q_{max}$ , permettant de rendre compte à la fois d'une forte absorption - mais bornée - en présence d'un faible quota et de limiter celle-ci lorsque le quota atteint sa valeur maximale.

$$V_{max} = \rho_{max} \frac{Q_{max} - Q}{Q_{max} - Q_0} \quad (1.4)$$

Enfin, Morel (1987) propose l'hypothèse de variations de  $V_{max}$  entre deux limites haute et basse en fonction du quota. Cette analyse qui permet d'établir un lien entre l'absorption à court terme et l'absorption régulée (assimilation) à l'équilibre nécessite néanmoins l'intégration d'un paramètre supplémentaire.

D'une manière générale, les microalgues possèdent de fortes affinités pour les substrats P et N et des constantes de demi-saturation pour l'absorption de l'ordre de la dizaine et de la centaine de nanomolaires, respectivement (tableau 1.1). Les algues de faible dimension possèdent des affinités et des capacités de vitesse spécifique d'absorption supérieures (Hein et al., 1995; Smith et Kalff, 1982). Ces différences de paramètres cinétiques en fonction de la taille sont attribuées principalement au rapport surface:volume ( $S : V$ ).

Tableau 1.1 – Paramètres cinétiques  $K_m$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) et  $V_{max}$  ( $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) de l'absorption de  $\text{NO}_3$  et de  $\text{PO}_4$  chez différentes espèces de microalgues.

Espèce	$\text{NO}_3$		$\text{PO}_4$		Source
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	
DIATOMÉES					
<i>Asterionella japonica</i>	0,7-1,3	-	-	-	Eppley et Thomas (1969)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,1-0,3	-	-	-	Eppley et Thomas (1969)
<i>Synedra acum</i>	-	-	0,06	15,6	Smith et Kalff (1982)
<i>Asterionella formosa</i>	-	-	0,06	18,0	Smith et Kalff (1982)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	0,67	-	Perry (1976)
<i>Cyclotella sp.</i>	0,18-0,49	-	-	-	Caperon et Meyer (1972)
<i>Tabellaria fenestrata</i>	-	-	0,01-0,45	-	Stross et Pemrick (1974)
<i>Fragilaria crotonensis</i>	-	-	0,01-0,45	-	Stross et Pemrick (1974)
<i>Fragilaria crotonensis</i>	-	-	0,03	132,3	Smith et Kalff (1982)
CHLOROPHYCÉES					
<i>Dunaliella sp.</i>	0,13-0,30	22,1-37,4	-	-	Caperon et Meyer (1972)
HAPTOPHYCÉES					
<i>Pavlova lutheri</i>	0,42	14,3	-	-	Caperon et Meyer (1972)
<i>Pavlova lutheri</i>	0,2	-	0,75	-	Terry (1982a)
<i>Pavlova lutheri</i>	-	-	0,51	-	Burmester et Chisholm (1979)
<i>Emiliania huxleyi</i>	-	-	0,34-0,44	12,4-23,0	Riegman et al. (2000)
RAPHDOPHYCÉES					
<i>Chattonella antiqua</i>	2,81	910	1,76	140	Nakamura et Watanabe (1983)

## Transport d'azote et de phosphore

D'une manière générale, les nutriments minéraux peuvent être transportés à travers la membrane cellulaire par diffusion passive sous l'effet d'un gradient ou par transport actif, qui utilise la capacité énergétique de la cellule. Cependant, les concentrations en N et P inorganiques du milieu naturel sont souvent très faibles — inférieures au micromolaire — au contraire des concentrations intracellulaires : Lourenco et al. (2002) rapportent que l'azote inorganique ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  et  $\text{NH}_4$ ) peut représenter entre 6 et 42 % de l'azote intracellulaire total, correspondant à des concentrations de l'ordre de plusieurs dizaines de millimolaire. De même, il est admis que les concentrations intracellulaires de phosphore inorganique dans les plantes sont d'un niveau 1000 à 10 000 fois supérieur à celui retrouvé dans le milieu environnant (Rausch et Bucher, 2002). Ainsi, malgré l'hétérogénéité de distribution des formes inorganiques, inhérente à la compartimentation cellulaire - par exemple la présence de vacuoles (Raven, 1976) - , le transport passif est généralement réfuté comme processus d'importance dans l'acquisition de l'azote et du phosphore (Aksnes et Egge, 1991; Collos et al., 1992).

**Transport actif d'azote** Les transports actifs de  $\text{NO}_3$  ou de  $\text{NO}_2$  connus chez les plantes, sont tous de type secondaire, c'est à dire liés à l'activité d'une  $\text{H}^+$ -ATPase (ou  $\text{Na}^+$ -ATPase, dans le cas des algues). Ils se traduisent, sous l'effet du gradient  $\text{H}^+$ , par un co-transport de 2  $\text{H}^+$  et de 1  $\text{NO}_3$  (ou  $\text{NO}_2$ ) par un symport. Une à deux moles d'ATP sont nécessaires pour transporter 1 mole de  $\text{NO}_3$  (Gniazdowska et al., 1998).

Au sein de la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily), les transporteurs NRT2 sont affiliés à la famille NNP (Nitrate Nitrite Porters), et les transporteurs de type NRT1 à la famille PTR (Peptide TRansporter) (Forde, 2000). La structure des transporteurs de nitrate semble remarquablement bien conservée entre ces deux familles. Ils sont constitués de douze hélices transmembranaires reliés entre elles par des boucles cytosoliques (figure 1.2). Selon les cas, leur expression est constitutive ou inductible (Crawford et Glass, 1998). Ils sont caractérisés par leur affinité pour le substrat et l'on distingue les transporteurs de type HATS (High Affinity Transport System), qui interviennent pour des concentrations en N

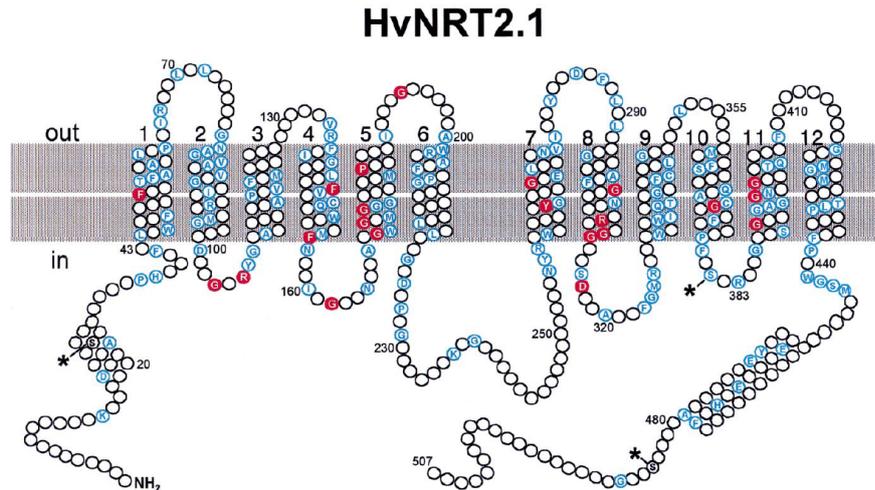


FIGURE 1.2 – Topologie membranaire prédite pour le transporteur d’azote HvNRT2.1 de *H. vulgare*. Les résidus conservés dans les plantes et les algues sont indiqués en bleu. Source : Forde (2000).

inférieures à  $250\ \mu\text{M}$  et de type LATS (Low Affinity Transport System) dont l’activité est reconnue pour des concentrations en N supérieures à  $1\ \text{mM}$  (Galvan et Fernandez, 2001). Des considérations thermodynamiques et des études électrophysiologiques ont pu montrer que, même pour les transporteurs de faible affinité, le transport est de type actif (Galvan et Fernandez, 2001).

*Chlamydomonas* est la microalgue la plus étudiée du point de vue des transporteurs de nitrate, bien que les premiers gènes de transporteurs de  $\text{NO}_3$  d’un organisme marin aient été clonés et caractérisés chez la diatomée *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand et Dahlin, 2000). *Chlamydomonas* sp. posséderait au moins quatre systèmes de transport de type NRT2 dont les caractéristiques principales sont présentées dans le tableau 1.2.

Les transporteurs du type NRT1, qui peuvent être inductibles ou constitutifs et concernent aussi bien les systèmes HATS et LATS, semblent nettement moins étudiés et ce constat est d’autant plus valable chez les microalgues.

**Régulations** Comme pour les autres ions, notamment le  $\text{PO}_4$ , il est connu que les gènes NRT2 sont dérprimés par la limitation de leur substrat. La particularité du système de transport de nitrate tient dans le fait qu’il peut également être induit par le  $\text{NO}_3$  (Forde, 2000). La régulation du transport du  $\text{NO}_3$  s’opère à deux niveaux. Crawford et Glass (1998) et Hildebrand et Dahlin (2000) décrivent une régulation principalement au

Tableau 1.2 – Caractéristiques des transporteurs NRT2 chez *Chlamydomonas reinhardtii*.  $K_m$  représente la constante de demi-saturation.

Transporteur	Spécificité	$K_m$	Inhibition / $\text{NH}_4$	Condition d'activité
Nar2-NRT2.1	$\text{NO}_3 / \text{NO}_2$	1,6 $\mu\text{M}$ / 1,8 $\mu\text{M}$	forte	$[\text{CO}_2]$ élevée
Nar2-NRT2.2	$\text{NO}_3$	11 $\mu\text{M}$	forte	$[\text{CO}_2]$ élevée
NRT2.3	$\text{NO}_3 / \text{NO}_2$	10 mM / 5 $\mu\text{M}$	forte	$[\text{CO}_2]$ élevée
NRT2.4	$\text{NO}_3 / \text{NO}_2$	40 $\mu\text{M}$ / 33 $\mu\text{M}$	faible	$[\text{CO}_2]$ faible

Source : Galvan et Fernandez (2001).

niveau transcriptionnel. A ce niveau, la régulation du transport semble différente chez les plantes supérieures et les microalgues. Forde (2000) décrit, chez les plantes dressées, un rétro-contrôle de l'absorption par les produits de réduction du nitrate et notamment par le ratio glutamine : glutamate. L'asparagine et l'arginine pourraient également intervenir. Rexach et al. (2002) suggèrent que, chez les microalgues et les champignons, l'expression des gènes de la prise du nitrate soit régulée par la nitrate réductase (NR), qui agirait en tant que capteur.

L'extrémité C-terminale des transporteurs aurait un rôle dans les régulations, de même qu'une boucle cytosolique, qui porte un site de reconnaissance de protéine kinase et qui suggère qu'une phosphorylation puisse intervenir à un niveau de régulation post-transcriptionnelle (Forde, 2000).

**Transport actif de phosphore** Chez les plantes, le transport actif du  $\text{PO}_4$  est également de type secondaire et étroitement lié à une  $\text{H}^+$ -ATPase. La stœchiométrie de ce transport n'est pas encore élucidée, mais il est probable que le co-transport  $\text{H}^+/\text{Pi}$  nécessite 4  $\text{H}^+$  pour 1  $\text{PO}_4$  transporté (Sakano, 1990). Reid et al. (2000) proposent également un co-transport  $\text{Na}^+-\text{P}_i$  chez le Charophyte d'eau douce *Chara corallina*, pour lequel la présence d'ATP et de  $\text{Na}^+$  est indispensable à l'activité de transport.

Hormis quelques études pionnières, la littérature ne fournit que peu d'informations sur les transporteurs de  $\text{PO}_4$  chez les microalgues. Parmi les micro-organismes marins cultivables, Monier et al. (2011) décrivent deux principaux types de transporteurs de  $\text{PO}_4$  codés par les gènes *pstS* chez les cyanobactéries, et par la superfamille PHO4 chez les eucaryotes et les bactéries. Les gènes de cette dernière superfamille codent pour des transporteurs à haute et faible affinité et ont été identifiés chez des algues diverses, telles que *Tetraselmis chui*

(Chung et al., 2003), *Emiliana huxleyi* (Dyhrman et al., 2006), *Micromonas* et *Ostreococcus* (Monier et al., 2011) et *Thalassiosira pseudonana* (Fu et al., 2013). Au regard de ces informations, ce type de transporteurs semble largement répandu chez les microalgues.

Comme chez les plantes supérieures, la configuration de ces transporteurs se rapprocherait de celle de la superfamille de MFS, avec douze hélices transmembranaires et des extrémités N et C terminales du côté cytoplasmique pour les transporteurs à haute affinité (Chung et al., 2003; Vance et al., 2003).

Les régulations au niveau transcriptionnel sont proposées comme un mécanisme majeur. Mais Raghothama (2000) et Smith (2000) soulignent la possibilité de sites de phosphorylation ou de glycosylation, sièges de régulations post-transcriptionnelles.

Les caractéristiques physiologiques de ces transporteurs ne sont pas bien documentées chez les microalgues. Chez les plantes supérieures, les transporteurs à haute affinité auraient des constantes de demi-saturation comprises entre 3,1 et 31  $\mu\text{M}$  selon Rausch et Bucher (2002) ou dans la gamme 1-10  $\mu\text{M}$  selon Raghothama (2000).

## 3 La limitation nutritive : déclinaison et conséquences

### 3.1 Le cas de la mono-limitation

Dans son acception la plus classique, la limitation des populations phytoplanctoniques résulte d'un déséquilibre entre la disponibilité de la ressource et la demande biologique ; l'élément dont la disponibilité relative est la plus faible impose la limitation. On parle dans ce cas de mono-limitation.

Deux grands types de limitations ont été décrits dans la littérature selon les effets induits sur les populations : la limitation selon Liebig (1855) se réfère à la capacité d'accroissement d'une population selon l'apport en substrat : « *quand une parcelle de terre contient une certaine quantité de tous les constituants minéraux en apport égal et dans une forme disponible, elle devient stérile ... quand un seul de ces composants a été épuisé à tel point que la quantité restante n'est plus suffisante pour une culture* ». La limitation de Liebig s'oppose à celle de Blackman (1905), selon lequel la disponibilité du substrat module non plus l'accroissement total de la population, mais sa vitesse de croissance.

La croissance du phytoplancton est dépendante d'une grande variété de substrats. Dans l'environnement naturel, des états de transition de la disponibilité relative des nutriments interviennent fréquemment. La question est alors de comprendre de quelle manière ces différents substrats modulent ou limitent la croissance : l'élément le plus limitant par rapport à la demande régit-il seul la croissance ? C'est le postulat de la loi du minimum :

$$\mu = \min[\bar{\mu} \cdot f(q_1), \bar{\mu} \cdot f(q_2), \bar{\mu} \cdot f(q_3)\dots] \quad (1.5)$$

où  $f(q_x)$  — valeur numérique comprise entre 0 et 1 — représente le contrôle exercé par le substrat  $x$  sur le taux de croissance  $\mu$  et  $\bar{\mu}$  représente le taux de croissance maximum.

Au contraire, plusieurs substrats peuvent-ils conjointement influencer ? C'est Droop (1973), qui le premier, pointe la possibilité d'introduire une loi multiplicative pour rendre compte d'un contrôle simultané de plusieurs nutriments sur la croissance. Il précise, qu'aucun postulat n'est nécessaire quant à la nature des éléments limitants et quant au niveau de limitation de chacun. La loi multiplicative tend à se réduire à la loi du minimum, dans le cas d'une limitation simple. Celle-ci peut être traduite par l'expression suivante :

$$\mu = \bar{\mu} \cdot f(q_1) \cdot f(q_2) \cdot f(q_3)\dots \quad (1.6)$$

A l'aide de cultures en chémostat, Droop (1974) a étudié l'effet de la disponibilité en vitamine B<sub>12</sub> et en PO<sub>4</sub> sur la croissance de *Monochrysis lutheri* et a pu tester dans ce cadre la validité de la loi multiplicative. Il conclut que cette dernière conduit à une prédiction du taux de croissance inférieure à celui réellement obtenu, alors que la loi du minimum reflète fidèlement la réalité expérimentale. Le décalage entre les deux prédictions est d'autant plus fort que le taux de croissance est élevé.

Dans la même veine, Rhee (1978) a évalué les prédictions de la loi multiplicative face à celles de la loi du minimum sur des cultures en chémostat de *Scenedesmus* sp., en modifiant le rapport d'enrichissement N:P à un taux de dilution constant. En calculant les taux de croissance prédits par les deux lois sur la base des quotas  $q_N$  et  $q_P$  mesurés, Rhee (1978) démontre que la loi multiplicative sous-estime de 33 % le taux de croissance réel, tandis

que la loi du minimum parvient à une prédiction très précise. Rhee (1978) en conclut qu'il n'y a pas d'effet multiplicatif des deux limitations et que la croissance est déterminée par le N pour des ratios de nutriments N:P inférieurs à 30 et seulement par le P au-delà. Il est à noter que le rôle physiologique et la teneur des éléments impliqués dans ces deux études (N et vitamine B<sub>12</sub>) sont très différents, ce qui pourrait convaincre de la généralité de la démonstration.

D'autres études apportent des éléments de preuve qui confortent la validité de la loi du minimum. Elrifi et Turpin (1985), dans leurs superbes travaux sur *Selenastrum minutum*, ainsi que Terry (1980), chez *Pavlova lutheri* (anciennement *Monochrysis*), proposent que le taux de croissance soit déterminé uniquement par l'élément le plus limitant. Terry n'exclut cependant pas l'existence d'une faible gamme de rapports N:P, dans laquelle il pourrait y avoir interaction entre les deux éléments. C'est également la conclusion à laquelle parviennent Ahlgren (1980) et Kunikane et al. (1984) dans leurs études respectives sur *Oscillatoria agardhii* et *Scenedesmus dimorphus*. Ces derniers auteurs suggèrent que ces interactions peuvent être des indices de validité de la loi multiplicative.

Il existerait donc une zone de transition, correspondant à un rapport de nutriments — qualifié de *rapport critique* (Leonardos et Geider, 2004a) — pour lequel la croissance bascule d'une limitation vers une autre. Selon Elrifi et Turpin (1985), le rapport critique serait une fonction négative du taux de croissance pour une même espèce. Au contraire, les résultats expérimentaux de Terry et al. (1985) montrent que, chez *Pavlova lutheri*, ce rapport critique connaît un maximum pour des taux de croissance intermédiaires. Cette même conclusion est avancée par Agren (2004), dans son étude théorique qui revisite les données de Elrifi et Turpin (1985).

## 3.2 Le concept de co-limitation

La conception des limitations phytoplanctoniques au travers de la loi du minimum, qui a prévalu pendant plusieurs décennies, a récemment cédé le pas à un paradigme plus complexe. Il est désormais largement admis que les interactions entre les facteurs de l'environnement, notamment les éléments nutritifs, sont déterminantes dans les processus phytoplanctoniques (Boyd, 2002) et peuvent altérer la croissance. Ces interactions ou limita-

tions simultanées par plusieurs ressources, répondent au concept générique de *co-limitation*, dont la distribution spatiale et l'importance demeurent à éclaircir (Moore et al., 2013). Ce concept recouvre une variété de mécanismes et d'échelles (Boyd, 2002), contribuant à la complexité de son interprétation (Saito et al., 2008). Au cours des années 2000, Arrigo (2005) et Saito et al. (2008) se sont ainsi efforcés d'en clarifier la définition, en proposant une classification des grands types de co-limitations rencontrés.

Arrigo (2005) distingue trois types principaux de co-limitations :

1. dans le cas de la co-limitation *multi-nutriments*, les nutriments sont présents en concentrations trop faibles pour être absorbés par le phytoplancton. L'addition simultanée des divers nutriments co-limitants est nécessaire pour stimuler la croissance.
2. dans la co-limitation *biochimique*, l'addition d'une ressource limitante facilite l'absorption ou l'assimilation d'une autre ressource limitante.
3. la co-limitation *communautaire* repose sur des besoins métaboliques distincts pour les diverses populations phytoplanctoniques. Un segment de la communauté peut répondre à l'augmentation d'une ressource limitante, quand un autre segment répond à l'apport d'une ressource différente.

Saito et al. (2005; 2008) proposent une typologie de co-limitations basée sur les liens biochimiques entre les éléments :

1. dans la co-limitation de type I, Saito et al. considèrent des nutriments qui ne sont pas reliés dans leurs fonctions biochimiques et qui sont à des niveaux suffisamment bas pour limiter la croissance simultanément. Le mécanisme mis en cause est une disponibilité trop faible de chacun des nutriments pour leur assimilation.
2. le type II regroupe les éléments qui peuvent se substituer pour accomplir une même fonction biochimique. Il s'agit essentiellement d'éléments métalliques effecteurs d'enzymes. Deux possibilités existent, selon que ces éléments se substituent sur une même enzyme ou que le même processus est réalisé par deux enzymes distinctes, qui nécessitent chacune un effecteur différent.

3. le type III se réfère aux nutriments biochimiquement dépendants, dans laquelle la capacité d'acquisition d'un nutriment est subordonnée à la disponibilité suffisante d'un second nutriment.

Comme le souligne Arrigo (2005), le concept de co-limitation intéresse donc des échelles variant de la cellule aux populations complexes du phytoplancton. La co-limitation communautaire sous-tend une variété de mécanismes qui ont récemment été développés par Harpole et al. (2011). Ce type de co-limitation dépasse le cadre de ce travail et ne sera pas considéré au-delà dans ce manuscrit ; nous ne nous intéresserons ici qu'aux processus prévalant à l'échelle cellulaire.

Parce que le métabolisme cellulaire est particulièrement complexe, tous les éléments possèdent un certain niveau de relations entre eux, ce qui nécessite de préciser la notion d'*indépendance* biochimique. Les co-limitations de type I, défini par Saito et al. et de type *multi-nutriments*, décrit par Arrigo, recouvrent des phénomènes identiques, dans lesquels les éléments sont dits *opérationnellement indépendants* du fait de l'absence d'interaction biochimique — encore ? — précisément établie. Ce premier type s'oppose donc à la notion de *co-limitation biochimique* (type III de Saito et al.) pour laquelle le processus d'interaction a pu être clairement identifié. Enfin, il est à noter que dans le type II, Saito et al. détaillent une modalité de la co-limitation biochimique, en précisant les interactions très particulières existant entre les espèces métalliques.

### Une grande variété de cas de co-limitations décrits

**La co-limitation biochimique** La littérature récente fait état d'une variété de cas de co-limitation biochimique, principalement mis à jour au cours d'études en laboratoire. De nombreux exemples d'interactions, entraînant des effets synergiques entre éléments nutritifs ou processus métaboliques, ont pu être décrits. Les mécanismes de ce type de co-limitations impliquent majoritairement des espèces métalliques.

**Les métaux** La co-limitation fer-éclairément est sans doute parmi les plus étudiées (Armstrong, 1999; Boyd, 2002; Bucciarelli et al., 2010; Maldonado et al., 1999; Sunda et

Huntsman, 1997; Timmermans et al., 2001), ce qui a permis d'éclairer les controverses sur les contrôles dominants de la production phytoplanctonique nette dans certaines régions océaniques HNLC (High Nutrient Low Chlorophyll), où persistent de concentrations inutilisées du N et du P.

L'application d'un protocole simple, utilisant des cultures en batch soumises à deux niveaux d'éclairement et à une gamme d'enrichissement en Fe, a permis à Timmermans et al. (2001) et Sunda et Huntsman (1997) de démontrer l'existence d'interactions entre Fe et l'éclairement chez plusieurs espèces de *Chaetoceros*, chez *Thalassiosira* et *Prorocentrum*, respectivement. Dans ces expériences, la croissance et la fluorescence de la Chl *a* présentent une sensibilité à l'éclairement modulée par l'apport en Fe (Timmermans et al., 2001). Sunda et Huntsman (1997) rapportent une proportionnalité entre les rapports Chl *a* :C et Fe:C et proposent une dépendance accrue au Fe pour les cellules acclimatées aux faibles éclairagements. Une augmentation de l'éclairement ou de la disponibilité en Fe parvient à stimuler la croissance des espèces étudiées. Cependant, la croissance maximale ne peut être obtenue que par une augmentation simultanée des deux facteurs. Les protéines redox associées au Fe dans la chaîne photosynthétique de transport d'électrons, qui mobilisent jusqu'à 70-80 % du Fe total (Raven, 1990), sont supposées être le siège de cette co-limitation.

La co-limitation silicium-fer est un autre exemple bien documenté d'interaction entre nutriments (Boyd et al., 1999; Brzezinski et al., 2011; De La Rocha et al., 2000; Franck et al., 2000). Ces deux nutriments sont en effet à l'origine de limitations chez les diatomées, notamment dans l'océan austral. En enrichissant en Fe et en Si des populations phytoplanctoniques naturelles prélevées dans l'océan antarctique, Franck et al. (2000) ont mis en évidence des mécanismes de limitation de la production de silice et de l'absorption de Si, différant selon les saisons. En absence de limitation par Si, ils notent un effet sensible de l'apport de Fe qui se traduit par une augmentation de la vitesse maximale d'absorption de Si.

Dans une étude en laboratoire sur *Thalassiosira weissflogii*, De La Rocha et al. (2000) notent que le stress en Fe inhibe la production spécifique de silice et conduit à des productions spécifiques maximales 2,5 à 3 fois inférieures. Le stress en Fe ne modifiant pas la constante de demi-saturation pour la production de silice, ces auteurs en déduisent que

le Fe agit en tant que co-facteur du transport de Si ou, de manière indirecte, à travers la fourniture d'énergie photosynthétique. Ils suggèrent ainsi que le stress en Fe entraîne une réduction du nombre de transporteurs actifs de Si dans la membrane. Au contraire, un stress en Zn ne modifie que la constante de demi-saturation de la production spécifique de silice, et ne semble donc pas intervenir sur le nombre de transporteurs actifs de Si, mais seulement sur leur activité. Ce résultat est conforté par les travaux de Grachev et al. (2005) sur l'existence d'un site potentiel de liaison au Zn dans les protéines impliquées dans le transport de l'acide silicique.

Milligan et Harrison (2000) ont par ailleurs démontré sur *Thalassiosira weissflogii* que la limitation par le Fe entraîne une baisse concomitante d'efficacité du PSII et de l'activité nitratre réductase, s'accompagnant d'une forte excrétion de  $\text{NO}_2$ , de l'ordre de 10 % de l'azote absorbé. Contrairement à Sugie et Yoshimura (2013), Milligan et Harrison n'observent pas de variations du rapport C:N selon l'apport de Fe. Ils suggèrent qu'en conditions de faible disponibilité en Fe, la baisse d'efficacité de la chaîne de transport d'électrons entraîne un plus faible approvisionnement en énergie, aboutissant à faire de la réduction du  $\text{NO}_2$  l'étape limitante de l'assimilation de N. Cette dernière hypothèse supporte l'existence d'une colimitation Fe-N.

Le zinc étant un co-facteur des phosphatases alcalines qui permettent aux microorganismes d'accéder au phosphore organique, Shaked et al. (2006) se sont intéressés aux répercussions sur la croissance de *Emiliana huxleyi* des interactions entre ces deux types de nutriments. En faisant varier les niveaux relatifs et en mesurant l'activité d'une phosphatase alcaline, ils notent que l'apport d'une seule de ces ressources parvient à augmenter le taux de croissance. Cependant, celui-ci n'atteint sa valeur maximale qu'en présence d'un apport conjugué de Zn et de P organique. Ils soulignent que cette co-limitation doit pouvoir se manifester dans les zones particulièrement oligotrophes mais qu'en raison de la disponibilité du phosphore organique et de l'efficacité des phosphatases, celle-ci ne doit pas être répandue dans les océans.

Lane et Morel (2000) ont pu mettre en évidence une co-limitation Zn- $\text{CO}_2$  sur l'expression de l'anhydrase carbonique chez *Thalassiosira weissflogii*. Le Zn est le co-facteur de l'isoforme majeure d'anhydrase carbonique chez cette espèce, lui permettant d'accéder à

l'espèce  $\text{HCO}_3^-$  du carbone inorganique. Sous faible concentration en  $\text{CO}_2$  et en présence de Zn, l'activité anhydrase carbonique et le taux de croissance sont élevés. Au contraire, une carence en Zn sous faible concentration en  $\text{CO}_2$ , conduit à une réduction du taux de croissance et de l'activité anhydrase carbonique. Ces auteurs montrent enfin qu'en présence d'un même niveau de limitation en Zn, l'augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$  permet de restaurer le taux de croissance au niveau des conditions suffisantes en Zn. Ces résultats mettent en valeur la dépendance de l'acquisition de carbone inorganique vis à vis du Zn. Lane et Morel ont également pu montrer que la substitution du Zn par du Co permet de rétablir une activité anhydrase carbonique et un taux de croissance équivalents à ceux obtenus en absence de limitation par le Zn. Ils mettent ainsi en évidence une co-limitation de type II, telle que définie par Saito et al. (2008).

Le cadmium ne fait pas partie des micro-éléments indispensables aux organismes. Cependant Price et Morel (1990) ont montré que le Cd peut se substituer au Zn dans une variété de macromolécules et qu'il permet de restaurer un taux de croissance maximal pour les cellules carencées en Zn. Contrairement à Lane et Morel (2000), Price et Morel (1990) ont montré que la substitution du Zn par du Co possède une moindre efficacité puisqu'elle ne permet de restituer que 60% de la capacité de croissance maximale. Price et Morel décrivent une distribution très similaire pour les différents métaux substituables dans les cellules et suggèrent ainsi que cette substitution pourrait avoir lieu sur une même enzyme. Ce sont là deux cas de co-limitation par substitution particulièrement évidents, dont les auteurs pensaient en 1990 qu'ils pouvaient représenter une stratégie commune parmi les espèces de phytoplanctons soumises à des conditions oligotrophes.

Glass et al. (2010) ont étudié les effets de la limitation par le molybdène sur la fixation de  $\text{N}_2$  chez deux cyanobactéries filamenteuses dulcicole et côtière. Le molybdène est un co-facteur des enzymes d'assimilation de l'azote que sont la nitrogénase et la nitrate réductase. A ce titre, il est susceptible d'entraîner une co-limitation en lien avec l'azote. Glass et al. montrent que des concentrations en Mo inférieures à  $1 \text{ nmol L}^{-1}$  induisent une co-limitation par l'azote chez les deux espèces, se traduisant par une moindre activité de la nitrogénase et se répercutant sur le ratio C:N ainsi que sur la teneur en Chl *a*.

Lorsque l'urée est utilisée comme source d'azote, la croissance de *Thalassiosira weissflogii*

nécessite la présence de nickel. Le nickel, co-facteur de l'enzyme uréase, est indispensable au catabolisme de l'urée. Price et Morel (1991) ont pu montrer que des concentrations limitantes en Ni aboutissent à une limitation par le N du taux de croissance, résultant d'une plus faible activité de l'uréase. De manière élégante, ils démontrent l'existence d'une co-limitation Ni-N en parvenant à restaurer une croissance maximale soit par un enrichissement en Ni, soit par un apport en  $\text{NH}_4$  dont l'assimilation ne nécessite pas Ni. Déjà en 1991, ces auteurs suggéraient que ce phénomène de co-limitation entre plusieurs éléments traces et un élément majeur tel que l'azote peut avoir lieu au sein d'un même organisme dans des conditions oligotrophes.

Outre les mécanismes faisant intervenir des espèces métalliques, d'autres cas de co-limitation biochimique ont été étudiés : entre la lumière et l'azote ou le silicium et entre les deux éléments majoritaires dans la matière biologique que sont le carbone et l'azote.

**Lumière et azote** Sciandra et al. (1997) ont étudié le comportement de *Dunaliella tertiolecta* en chémostat et en photopériode, face à des modifications de la limitation par l'éclairement, surimposées à une limitation par l'azote. Ces auteurs montrent que l'effet de l'éclairement sur le taux de fixation spécifique du carbone peut devenir secondaire face à la limitation imposée par l'azote ; la baisse d'absorption du  $\text{NO}_3$  au cours de la phase sombre s'avère modulée par le niveau d'éclairement au cours de la phase claire, mettant en évidence la dépendance de l'absorption du  $\text{NO}_3$  vis à vis des réserves de carbone accumulées par la photosynthèse. Ils soulignent des interactions fortes entre les voies d'assimilation de l'azote et du carbone : celles-ci sont, d'une part, toutes deux dépendantes du potentiel énergétique cellulaire lié à la capacité photosynthétique et, d'autre part, soumises au statut azoté de la cellule à travers les enzymes nécessaires à leur activité. Sciandra et al. précisent que les effets de co-limitation mis à jour ne peuvent être modélisés ni par une loi multiplicative ni par une loi du minimum en raison de l'existence d'interactions entre les voies d'assimilation. Ils proposent que la RUBISCO ou les pigments soient les sièges possibles de ces interactions.

**Lumière et silicium** En étudiant l'impact du Si sur la photosynthèse, Lippemeier et al. (1999) observent que la restauration de la fluorescence sur des cultures *Thalassiosira weissflogii* limitées en Si s'opère 20 minutes après un apport de Si frais. Ils en déduisent un couplage fort entre la capacité photosynthétique et le métabolisme du silicium, bien que ce dernier ne soit pas reconnu comme de première importance pour les processus photosynthétiques. Boyd (2002) souligne que les interactions entre silicium et éclaircissement demeurent mal connues, contrairement aux interactions Fe-éclaircissement et silicium-Fe.

**Azote et carbone** Clark (2001) suggère l'existence d'une co-limitation N-C chez *Thalassiosira weissflogii*. En présence de concentrations extracellulaires en N et en C pourtant détectables, des réductions de taux de croissance importantes, de l'ordre de 75 % de sa valeur maximale, sont enregistrées au cours des cultures. Ces réductions ne se traduisent pas par des déviations sensibles des rapports *Chl a*:C et C:N, relativement aux valeurs relevées au taux de croissance maximal, ce qui conduit Clark à conclure à l'existence d'une zone de co-limitation N-C.

Les deux dernières décennies ont permis de mettre au jour divers cas de co-limitation biochimique. En général, les approches expérimentales sont simples et démontrent une co-limitation dont le siège est un processus d'interaction connu et identifié par avance. C'est particulièrement le cas des interactions mettant en jeu les métaux en tant que co-facteurs enzymatiques. L'identification de processus précis de co-limitation demeure plus spéculative lors de l'implication de processus cellulaires plus globaux, comme la photosynthèse ou les métabolismes N et C.

**La co-limitation par nutriments indépendants** La co-limitation de type I, dans laquelle les éléments ne sont pas reliés par leurs fonctions biochimiques (Saito et al., 2008), a souvent été identifiée par des études réalisées dans le milieu naturel. Dans ce contexte, la distinction entre les types de co-limitations par *éléments indépendants* ou *communautaire*, tels que définis par Arrigo (2005) peut parfois s'avérer délicate.

**Azote, fer et phosphore** Mills et al. (2004) ont pu mettre en évidence un phénomène de co-limitation de la fixation de l'azote par le fer et le phosphore, chez les diazotrophes dans l'Atlantique nord tropical. En réalisant des bio-essais d'enrichissement en nutriments, ils démontrent que seul l'apport concomitant de Fe et de P permet d'augmenter la fixation de l'azote atmosphérique par ces espèces.

**Fer et cobalt** L'existence d'une co-limitation de la synthèse de Chl *a* par le fer et le cobalt a été révélée par Saito et al. (2008) sur des populations de *Synechococcus* dans l'upwelling du Costa Rica. Ces auteurs ont pu montrer qu'une augmentation de la Chl *a* totale ne peut être obtenue sur des cultures en phase stationnaire qu'à travers des apports conjugués de Fe et Co. Dans les mêmes conditions, un enrichissement en Co seul permet d'obtenir une augmentation de la population de *Synechococcus*. Les auteurs interprètent ces résultats comme une limitation de la population cellulaire par le Co, qui subit également un stress chlorophyllien en raison de la faible disponibilité en Fe. En absence de systèmes de substitution connus au niveau enzymatique entre le Fe et le Co, Saito et al. concluent à l'existence d'une co-limitation de type I.

**CO<sub>2</sub> et phosphore** Spijkerman (2010) décrit une co-limitation du même type entre le CO<sub>2</sub> et le P chez *Chlamydomonas acidophila*. En utilisant des cultures semi-continues enrichies ou non en CO<sub>2</sub>, il montre que celles-ci sont principalement limitées par le P, mais qu'un enrichissement simultané en P et CO<sub>2</sub> stimule le taux de croissance à un niveau excédant celui atteint avec un simple apport de P.

Poussant leurs investigations sur la base de ces mêmes observations, Spijkerman et al. (2011) ont cherché à identifier la nature de la co-limitation mise en jeu dans les interactions P-CO<sub>2</sub>. Ces auteurs montrent que l'utilisation de la loi multiplicative reflète mieux leurs observations et concluent que les effets limitants du P et du CO<sub>2</sub> sur la croissance sont indépendants les uns des autres. Spijkerman et al. postulent que la co-limitation est

régie par les vitesses maximales d'absorption des deux nutriments dont les taux respectifs pourraient dépendre de la compétition entre les deux types de transporteurs pour la surface cellulaire disponible.

**vitamine B<sub>12</sub> et fer** La vitamine B<sub>12</sub> est indispensable à l'activité de la méthionine synthase MetH, dernière enzyme impliquée dans la synthèse de la méthionine. Cette propriété serait, selon Croft et al. (2005), responsable de la dépendance d'une grande partie des espèces du phytoplancton vis à vis de cette vitamine. Au cours de leurs travaux dans la mer de Ross, Bertrand et al. (2007) ont pu montrer l'existence d'une co-limitation par la vitamine B<sub>12</sub> et le Fe sur la croissance de l'ensemble de la communauté phytoplanctonique. En l'absence de lien fonctionnel connu entre ces deux micronutriments, ces auteurs ont considéré que cette co-limitation était du type nutriments indépendants. Ils ont également souligné la possibilité de décrire la limitation par la vitamine B<sub>12</sub> comme une limitation secondaire, n'intervenant qu'en présence de conditions saturantes en Fe.

**Azote et phosphore** L'occurrence d'une co-limitation de la croissance phytoplanctonique par l'azote et le phosphore a fréquemment été décrite, aussi bien en milieu marin qu'en eau douce (Elser et al., 2007). Cette co-limitation se matérialise par un effet synergique de l'apport simultané des deux nutriments. Ainsi, Maberly et al. (2002) ont démontré une succession temporelle de limitations de la croissance dans des lacs du Royaume-Uni en fonction de la saison. Après une période de mono-limitations par le N ou le P au printemps, Maberly et al. notent des épisodes de co-limitations N-P, de l'ordre de 80% au cours de l'été. L'existence d'une co-limitation est démontrée par la nécessité d'apporter à la fois le N et le P pour stimuler la croissance. Maberly et al. soulignent néanmoins que la co-limitation observée pourrait résulter autant d'un remaniement des espèces présentes pour maximiser les ressources limitantes — il s'agirait alors d'une colimitation *communautaire* telle que définie par Arrigo (2005) — que de la modification des caractéristiques d'absorption d'un nutriment donné par une espèce, conduisant à une meilleure disponibilité de ce nutriment préalablement limitant.

Dans la zone ultra-oligotrophe de l'Est méditerranéen, Zohary et al. (2005) ont testé les limitations du phytoplankton, en mesurant la réponse de la Chl *a* et de la concentration cellulaire à des enrichissements en  $\text{NH}_4$  et  $\text{PO}_4$ . Ils déduisent l'existence d'une co-limitation N-P de la nécessité d'un enrichissement simultané en N et en P pour obtenir une stimulation de la production primaire, principalement attribuée à *Synechococcus*. Ce même constat a été fait par Seppala et al. (1999) sur la communauté phytoplanctonique du golfe de Riga en mer Baltique, en fin d'été et suite à l'occurrence d'un bloom cyanobactérien.

Enfin, l'étude de North et al. (2007) sur la communauté phytoplanctonique du lac Erie illustre bien la complexité de la notion de co-limitation et la difficulté de classification dans des types strictement définis : ces auteurs ont pu montrer que les apports conjugués de Fe, de N et de P permettaient une stimulation accrue de la croissance phytoplanctonique. Leur interprétation est que l'apport de Fe réduit la limitation par l'azote en permettant à la fois l'utilisation du  $\text{NO}_3$  et une plus forte absorption du P, conduisant finalement à une limitation accrue par le P. Si l'on reprend la classification communément retenue dans la littérature, le phénomène décrit par North et al. (2007) correspond alors à la co-existence d'une co-limitation biochimique entre le Fe et le N (Milligan et Harrison, 2000; Sugie et Yoshimura, 2013) et d'une co-limitation par nutriments indépendants entre le N et le P, telle que décrite par Maberly et al. (2002); Seppala et al. (1999); Zohary et al. (2005).

Cependant, l'interprétation de la co-limitation de type I dans le milieu naturel pose des problèmes particuliers. Lorsque celle-ci concerne des communautés d'espèces, les études se heurtent à l'ambiguïté d'une réponse globale, composée de réactions spécifiques différentes — correspondant à la co-limitation *communautaire* définie par Arrigo (2005) — ou d'un ensemble de réactions spécifiques concordantes, traduisant un phénomène commun aux différentes espèces présentes. Cette difficulté est très clairement énoncée par Maberly et al. (2002). Néanmoins, certains auteurs justifient ce choix expérimental par le besoin d'observations représentatives des conditions du milieu naturel. D'autre part, la justification d'une co-limitation de type I, à travers la nécessité d'enrichir le milieu à l'aide de plusieurs éléments, n'écarte pas la possibilité de limitations spécifiques, comme le notent Bertrand et al. (2007). Cet argument est partagé par Davidson et Howarth (2007), qui soulignent que les doses de nutriments employées dans les bio-essais, si elles sont suffisantes, peuvent

conduire à lever la limitation imposée par l'un puis par l'autre des nutriments, résultant en un effet synergique, sans pour autant remettre en question la loi du minimum. En outre, les mécanismes mis en jeu demeurent inexpliqués dans la plupart des cas.

A l'inverse, les expériences de laboratoire conduites pour identifier le type de co-limitation en vigueur sont beaucoup plus faciles à interpréter. Les multiples travaux présentés dans la littérature ont favorisé l'usage de la loi du minimum (Droop, 1968; Elrifî et Turpin, 1985; Rhee, 1978; Terry, 1980). A travers ces observations et les difficultés à réfuter la loi du minimum, la co-limitation de type I pourrait être envisagée comme un phénomène purement conjoncturel, reposant sur l'établissement d'une situation d'équilibre fin entre les disponibilités en N et P, d'une part et les besoins cellulaires respectifs, d'autre part. Pourtant, la fréquence d'apparition de ces situations ne plaide pas en faveur d'une telle hypothèse.

### **La co-limitation N-P : une indépendance apparente ?**

La classification des types de co-limitations s'appuie notamment sur la reconnaissance d'interactions identifiées entre plusieurs éléments. Les cas faisant intervenir une espèce métallique sont caractéristiques de ce point de vue. Pour des éléments dont les métabolismes interfèrent à différents niveaux — c'est le cas pour le N et le P —, l'identification d'un ou de quelques processus majeurs d'interaction demeure plus spéculative.

Outre leur rôle structurel, les éléments N et P sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires et participent tous deux à des molécules cruciales pour le métabolisme, comme par exemple les acides nucléiques. Mais ils interviennent également indépendamment dans d'autres molécules : N joue un rôle majeur dans la synthèse des protéines et notamment dans celles qui interviennent dans la composition des complexes photosynthétiques chlorophylliens, alors que P intervient dans le métabolisme énergétique cellulaire, le pouvoir réducteur et les régulations par phosphorylation d'une multitude de voies métaboliques (Nardozzi et al., 2010). Ainsi, le rôle du P peut être vu comme celui d'un activateur ou d'un régulateur des voies métaboliques (Ahlgren, 1988; Beardall et al., 2005).

Klausmeier et al. (2004a) a introduit le concept de répartition du N et du P au sein des

mécanismes d'*acquisition des ressources* et d'*assemblage*. La distinction entre ces grandes fonctions cellulaires constitue un socle performant pour modéliser la réponse du phytoplancton en lien avec ces deux ressources. La machinerie d'assemblage correspond aux ribosomes et, à ce titre, contient une forte proportion de N et de P. La machinerie d'acquisition regroupe, quant à elle, les protéines de transport de nutriments ainsi que la chlorophylle ; elle est donc riche en N, mais particulièrement pauvre en P.

Un certain nombre d'indices de la littérature laisse penser que l'hypothèse d'une indépendance d'action entre le N et le P dans le phénomène de co-limitation, n'est pas suffisante pour rendre compte de diverses observations biologiques.

Diaz et al. (2001) ont constaté le déficit quasi-permanent du  $\text{PO}_4$  par rapport au  $\text{NO}_3$  dans la couche euphotique de la Méditerranée nord-occidentale. L'enrichissement des populations naturelles avec du  $\text{PO}_4$ , a permis à ces auteurs de mettre en évidence un contrôle de l'absorption du  $\text{NO}_3$  par la disponibilité en  $\text{PO}_4$ .

Davies et Sleep (1989) ont démontré un effet synergique des apports de N et de P sur des cultures de *Skeletonema costatum* préalablement carencées en ces deux éléments. Comme dans le cas des bio-essais réalisés en milieu naturel, seule l'addition conjointe des deux éléments permet une augmentation significative de la fixation de carbone, ce qui plaide en faveur d'une co-limitation de type I. Leurs résultats les conduisent néanmoins à proposer un mécanisme selon lequel P gouverne directement le taux de photosynthèse — à travers la disponibilité en trioses phosphate —, alors que N n'intervient qu'indirectement à travers le contrôle du quota de chlorophylle. Davies et Sleep ont mis en évidence qu'un apport de N induit une répression de la fixation de carbone chez des cellules limitées en P. Ils émettent l'hypothèse que, dans le cas d'une limitation par le P, l'apport de P au chloroplaste est susceptible d'être davantage réduit soit par séquestration du P par des composés tels que le mannose sous des formes non facilement métabolisables, soit par une diversion du P pour la production d'ATP et de NADPH lors d'une demande métabolique particulière, comme le transport de N. Ces observations sont en accord avec la répression de l'activité photosynthétique obtenue par Healey (1979) chez *Scenedesmus quadricauda*, lors d'un apport de  $\text{NH}_4$  ou de  $\text{PO}_4$  sur des cellules préalablement carencées.

Terry (1982a) a réalisé une étude remarquable et pourtant assez peu citée dans la litté-

rature, dans laquelle il révèle une priorité de l'absorption de  $\text{PO}_4$  sur celle de  $\text{NO}_3$ , chez *Pavlova lutheri*. Au cours de ces expériences, l'interaction N-P se traduit par une inhibition de l'absorption de  $\text{NO}_3$ , lorsque les cultures sont simultanément enrichies en N et P. Terry fait état d'une réduction de la vitesse maximale d'absorption, sans modification de la constante de demi-saturation. Cette inhibition est d'autant plus marquée que le taux de croissance ou le rapport N:P sont élevés, deux situations conduisant à des besoins accrus en P. En outre, l'inhibition n'est pas totale et montre une relation linéaire avec l'absorption de P. L'ensemble de ces observations ont conduit Terry à proposer qu'une ressource énergétique limitée (ATP) puisse être le lien possible de l'interaction.

La mobilisation de l'ATP par différents processus en compétition, modulée par le niveau énergétique de la cellule, et ses conséquences ont également été soulevées par ailleurs. Chez *Skeletonema costatum*, Falkowski et Stone (1975), qui ont observé une inhibition de la fixation de carbone lors d'un apport de  $\text{NO}_3$  sur des cultures limitées par le N, suggèrent une compétition entre l'absorption du N et la fixation du C pour l'ATP disponible, durant la période qui suit l'apport en  $\text{NO}_3$ . La source d'ATP nécessaire au transport de  $\text{NO}_3$  serait liée à la photosynthèse acyclique (Falkowski, 1975). De la même manière, Beardall et al. (2005) suggèrent que l'acquisition de carbone assurée par le mécanisme de concentration du  $\text{CO}_2$  (CCM) soit régulée par la disponibilité en P intra-cellulaire.

Bien que l'ATP ne représente qu'une très faible part du quota cellulaire en P, il semble exister un lien fort entre les quotas d'ATP et de P dans diverses conditions de croissance. Perry (1976) a ainsi rapporté une relative insensibilité du rapport ATP:P chez *Thalassiosira pseudonana* au type de limitation N ou P ainsi qu'au taux de croissance. Par contre, Hunter et Laws (1981) et Laws et al. (1983a) décrivent des quotas d'ATP (ATP:C) plus faibles d'un facteur 2 en limitation par le P qu'en limitation par le N, et un accroissement de ce rapport avec le taux de croissance.

Des approches théoriques conduisent également à s'interroger sur l'hypothèse d'indépendance entre le N et le P dans la co-limitation du phytoplancton.

Au cours de ses travaux sur la stœchiométrie C:N:P des autotrophes, Agren (2004) suggère qu'à cause du rôle majeur joué par les ribosomes dans la synthèse protéique, le P

intervienne dans la régulation de la fixation de C par la disponibilité en N : les protéines étant synthétisées au niveau des ribosomes, riches en ARNr et donc en P, la production d'azote protéique serait elle-même sous le contrôle du quota  $q_P$ . Il en résulte que le taux de croissance dépendrait linéairement du quota  $q_N$  et quadratiquement du quota  $q_P$ , en accord avec les données expérimentales obtenues par Elrifi et Turpin (1985) chez *Selenastrium minutum*.

Bien qu'elle ne concerne pas le couple N-P, l'approche de modélisation développée par Davidson et Gurney (1999), qui rend compte des interactions entre le N et le Si, mérite d'être développée ici. Les fonctions de ces deux nutriments ne sont pas clairement reliées dans le métabolisme cellulaire, par opposition aux co-limitations engendrées par un métal et le N au niveau d'un système enzymatique. Leurs interactions pourraient donc relever d'une co-limitation de type I.

Ces auteurs ont étudié l'effet des limitations par le Si et le N sur des cultures mixtes de *Thalassiosira pseudonana*, d'*Heterosigma carterae* et d'*Alexandrium minutum*. Leur approche itérative et très didactique s'articule en trois étapes successives : ils démontrent tout d'abord que le modèle de Droop permet de reproduire les croissances monospécifiques de *H. carterea* et de *A. minutum* en batch, contrairement à celle de *T. pseudonana*. Une modification de la fonction d'absorption leur assure plus de succès en batch monospécifique, mais échoue en cultures plurispécifiques. Ils postulent alors l'existence d'une co-limitation par le Si et le N. L'analyse des rôles métaboliques de ces deux éléments les amène à considérer que le Si joue un rôle essentiellement structurel alors que le N possède, en outre, un rôle fonctionnel. Ainsi, lorsque le Si est limitant, le N peut exercer une modulation des processus métaboliques liés à l'acquisition des nutriments et à la croissance, bien qu'il ne soit pas limitant. Dans leur approche, Davidson et Gurney basent leur modèle sur la loi du minimum, et fondent les niveaux de limitation relatifs à chaque nutriment sur la comparaison de leur rapport  $\frac{Q}{Q_0}$ . Ainsi, leur modèle parvient à simuler fidèlement la croissance des différentes espèces, notamment en cultures plurispécifiques. Enfin, Davidson et Gurney concluent que, bien que le taux de croissance soit déterminé par l'élément le plus limitant, celui-ci peut également être modulé par la disponibilité de l'ensemble des nutriments.

La philosophie de la démarche de Davidson et Gurney est un élément essentiel de leurs

travaux et permet de tirer un certain nombre d'enseignements. Tout d'abord, la notion de co-limitation ne s'oppose pas systématiquement au concept de la loi du minimum pour la croissance. Ensuite, il est permis de considérer que, malgré l'absence de lien biochimique clairement identifié entre deux éléments, la co-limitation peut résulter du contrôle effectué par l'un d'eux, sans que celui-ci soit directement limitant pour le taux de croissance. Enfin, d'une manière plus générale, l'approche de Davidson et Gurney met en valeur que seules une observation et une compréhension fines de l'implication des éléments dans le métabolisme cellulaire peuvent conduire à une formalisation appropriée pour la modélisation d'un mécanisme particulier.

Dans le contexte de la co-limitation N-P, la distinction faite par Klausmeier et al. (2004a) entre les différentes machineries (assemblage *vs* acquisition) a comme corollaire de parvenir à identifier proprement les fonctions métaboliques qui y sont associées. Selon cette typologie, l'approche théorique de Agren (2004) place le siège des interactions au niveau de la machinerie d'assemblage. Au contraire, un certain nombre d'observations expérimentales plaide en faveur d'interactions entre le N et le P au niveau de la machinerie d'acquisition des nutriments et d'une compétition pour l'énergie et le pouvoir réducteur entre les processus cellulaires.

### **3.3 Les limitations par le N et le P et le stockage de réserves en lipides**

En réponse à une variété de stress, les algues sont capables d'accumuler des quantités importantes de triglycérides — de l'ordre de 20 à 50 % de leur poids sec — dans des globules lipidiques cytoplasmiques (Hu et al., 2008). Pendant longtemps, cette capacité a été considérée comme une simple stratégie de stockage énergétique, mais récemment Solovchenko (2012) apporte un nouvel éclairage sur le rôle joué par l'accumulation de lipides. Celle-ci permet de constituer une réserve d'acides gras à longue chaîne, impliqués dans le ré-arrangement des membranes de l'appareil photosynthétique; d'autre part, en consommant des photo-assimilats, la synthèse des triglycérides réduit également les risques de photo-oxydation. Enfin, ces globules constituent une ressource pour la synthèse de caroténoïdes secondaires.

Depuis l'essor des recherches sur la production de biocarburants par les microalgues, il est bien documenté qu'une carence ou une limitation minérale conduit à la synthèse de lipides de réserve, en créant un déséquilibre entre le métabolisme carboné et celui de la ressource limitante. Si le rôle de l'acétyl-CoA carboxylase est déterminant, des études de surexpression de cette enzyme ont montré qu'elle ne suffit pas à expliquer l'accumulation lipidique chez les microalgues (Khozin-Goldberg et Cohen, 2011). Fan et al. (2012) ont montré chez *Chlamydomonas reinhardtii* que l'accumulation de triglycérides est dans une large mesure indépendante des enzymes de biosynthèse, et est plutôt contrôlée par la disponibilité en carbone.

Au cours de la dernière décennie, la limitation par l'azote a été particulièrement étudiée dans le but de stimuler la synthèse lipidique chez les microalgues. Des productivités lipidiques de l'ordre de 100 à 400 mg L<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> ont pu être obtenues par exemple chez *Neochloris oleoabundans* (Li et al., 2008), *Nannochloropsis* sp. (Pal et al., 2011; Rodolfi et al., 2009) et *Chlorella* sp. (Hsieh et Wu, 2009). Les réponses du quota en lipides de *Tisochrysis lutea*, limitée ou carencée en azote, ont pu être observées (Lacour et al., 2012) et modélisées (Mairet et al., 2011). Cette approche a permis de montrer qu'en culture continue, la productivité lipidique varie positivement avec le taux de croissance et qu'un phénomène d'hystérésis résulte de dynamiques du quota de lipides très différentes après carence ou enrichissement en azote.

D'autres auteurs rapportent une accumulation sensible des lipides en réponse à une limitation par le P (Liang et al., 2013; Ruangsomboon et al., 2013; Spijkerman et Wacker, 2011). Chez la microalgue d'eau douce *Monodus subterraneus*, une carence en PO<sub>4</sub> entraîne simultanément une réduction des phospholipides (de 8,3 à 1,4 %) et une accumulation de triglycérides (de 6,5 à 39,3 %), par rapport aux lipides totaux (Khozin-Goldberg et Cohen, 2006). Kilham et al. (1997) ont montré chez *Ankistrodesmus falcatus* une augmentation significative des triglycérides, consécutive à une limitation par le P, supérieure à celle induite en limitation par le N et sans modification de la composition lipidique. Xin et al. (2010) ont aussi enregistré une hausse des lipides chez *Scenedesmus* sp., supérieure en limitation par le P, avec un contenu lipidique de 53% de la biomasse, contre seulement 30 % en limitation par le N. Néanmoins, l'effet d'une carence par le phosphore peut être différent selon les

espèces considérées : Reitan et al. (1994) rapportent en effet qu'en culture semi-continue, une limitation par le P accroît le contenu en lipides chez des Bacillariophycées (*Phaeodactylum tricornutum* et *Chaetoceros* sp.) et des Prymnesiophycées (*Isochrysis galbana* et *Pavlova lutheri*), alors qu'elle le réduit chez des microalgues flagellées vertes, telles que *Nannochloropsis atomus* et *Tetraselmis* sp.

Si les limitation par le N ou le P conduisent ainsi à stimuler l'accumulation de lipides, elles entraînent également une réduction du taux de croissance, qui nuit finalement à la productivité lipidique (Courchesne et al., 2009). Cette caractéristique est soulignée par Xin et al. (2010) qui, malgré des gains sensibles d'accumulation de lipides en limitation par le N ou le P, n'obtiennent pas d'amélioration de la productivité chez *Scenedesmus* sp..

Les conséquences d'une co-limitation par le N et le P sur la production de lipides n'ont, semble-t-il, jamais été étudiées. Pourtant, Piepho et al. (2012) rapportent que la synergie entre deux facteurs du milieu, tels que la température et le phosphore, peut modifier la concentration en stérols dans le phytoplancton. Dans ce contexte, il est raisonnable de s'interroger sur les conséquences de la co-limitation N-P sur le contenu en lipides et le taux de croissance des microalgues. En d'autres termes, cette co-limitation offre-t-elle des leviers supplémentaires susceptibles d'améliorer la productivité lipidique, par rapport aux limitations monofactorielles ?

## 4 Conclusion

Ce premier chapitre a été l'occasion de décrire les besoins des microalgues en ressources minérales, ainsi que l'importance de l'azote et du phosphore qui entrent dans la composition de molécules clés de leur métabolisme. Les microalgues ont élaboré une machinerie d'acquisition sophistiquée et performante leur permettant d'acquérir les minéraux essentiels à leur métabolisme, et ce malgré leurs très faibles concentrations dans le milieu naturel, et leurs variation spatio-temporelles. Les mécanismes moléculaires et les réponses cinétiques de cette machinerie requièrent une contribution active de l'énergie de la cellule. Située à l'interface des milieux intra- et extra-cellulaire, l'activité de la machinerie d'acquisition conditionne l'ensemble du métabolisme cellulaire.

Dans un second temps, les conséquences des limitations sur la croissance des microalgues

ont été exposées, selon l'acception classique de la limitation monofactorielle, liée à la loi du minimum. Puis, le concept de co-limitation — plus récent et complexe — a été explicité dans ses différentes formes et illustré grâce à de nombreux exemples tirés de la littérature. En absence d'interactions clairement identifiées entre les métabolismes de N et de P, et en raison de ses caractéristiques dans le milieu naturel, nous avons supposé que la co-limitation N-P est caractérisée par le fait que ces deux ressources agissent indépendamment sur leur voie métabolique propre, bien que certaines observations laissent penser qu'une telle conception peut être réductrice, voire erronée.



# Chapitre 2

## Matériel et Méthodes

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Dispositif expérimental . . . . .</b>	<b>50</b>
<b>2</b>	<b>Modes de culture . . . . .</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Matériel biologique . . . . .</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Entretien des souches . . . . .</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Cultures expérimentales . . . . .</b>	<b>59</b>
5.1	Cultures en mono-limitations . . . . .	59
5.2	Cultures en chémostat et co-limitation . . . . .	60
<b>6</b>	<b>Analyses biologiques . . . . .</b>	<b>62</b>
6.1	Éléments résiduels . . . . .	63
	Fraction minérale dissoute . . . . .	63
	Fraction organique dissoute . . . . .	64
6.2	Quotas C, N, P cellulaires . . . . .	65
	Concentration cellulaire . . . . .	65
	Analyse élémentaire . . . . .	65
	Analyse par oxydation humide . . . . .	65
6.3	ATP cellulaire . . . . .	67
	Extraction de l'ATP . . . . .	68
	Mesure de l'ATP par bioluminescence . . . . .	69

	Étalonnage de la méthode . . . . .	69
	Disponibilité de l'ATP pour la fixation de carbone . . . . .	70
6.4	Analyses lipidiques . . . . .	71
	Analyses par le fluorochrome Nile red . . . . .	71
<b>7</b>	<b>Expression des résultats . . . . .</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Modélisation . . . . .</b>	<b>72</b>
8.1	Logiciels . . . . .	72
8.2	Estimation de la qualité des simulations . . . . .	73

---

## 1 Dispositif expérimental de culture

Le laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues de l'IFREMER a développé un plateau technique de cultures expérimentales automatisées (figure 2.1). Doté d'une capacité de dix photobioréacteurs, il dispose de l'ensemble des fonctions nécessaires au contrôle des paramètres environnementaux pour des cultures en batch, chémostat ou turbidostat. Le dispositif consiste en une juxtaposition d'espaces unitaires identiques, baptisés alvéoles, pouvant accueillir tout type de photobioréacteur. Chaque alvéole offre les équipements de régulation et de suivi pour la culture en photoautotrophie :

- une dalle éclairante, constituée de 6 tubes fluorescents à haut rendement OSRAM 54W cool daylight, de type lumière du jour et gradables par l'intermédiaire d'un système de commande manuelle de type DALI (OSRAM)
- une alimentation basse tension variable pour moteur d'agitation
- un piquage d'air comprimé deshuilé, équipé d'un régulateur de débit et d'un filtre 0,2  $\mu\text{m}$  Sartorius Stedim
- un piquage de  $\text{CO}_2$  pur également équipé d'un régulateur de débit et d'un filtre stérilisant
- un transmetteur-régulateur pH HPT63 (LTH Electronics). Le transmetteur est complété par une électrode pH Inpro 4800 (Mettler-Toléro), munie d'une sonde température Pt1000
- une électrovanne asservie au régulateur pH, permettant l'injection de  $\text{CO}_2$ , au tra-

vers du piquage précédemment décrit, pour réguler le pH et la disponibilité en carbone inorganique des cultures

- un cryothermostat EZC80 (Thermo scientific) qui autorise la régulation en température d'un liquide caloporteur, mis en circulation au travers d'une canne de régulation thermique plongée dans les cultures
- une pompe doseuse (Stepdos 03 KNF Neuberger) d'injection du milieu de culture dans le cas de cultures en continu. Cette pompe permet des débits de renouvellement précis et reproductibles dans la gamme 0,03 à 30 mL min<sup>-1</sup>
- une poche de 20 ou 50 L Flexboy Sartorius Stedim de stockage du milieu de culture, reliée à la pompe d'injection précédemment citée. La poche est équipée d'un port muni d'un filtre hydrophile stérilisant 0,2 µm Sartorius Stedim et d'un second port muni d'un septum à travers lequel sont apportées les solutions d'enrichissement du milieu de culture, en conditions aseptiques. Dans le cas des cultures répliquées, les poches des photobioréacteurs sont reliées entre elles, afin de distribuer un milieu identique dans les deux cultures
- un automate embarqué, dont le rôle est à la fois d'assurer le niveau des paramètres de culture (débit de pompe de dilution, niveau d'éclairage, ...) et d'enregistrer les données des divers capteurs (pH, température, ...)
- un ordinateur de contrôle de l'ensemble des automates, qui permet leur paramétrage, l'enregistrement et la visualisation centralisée des données stockées dans leur mémoire interne

Les photobioréacteurs, construits en polyméthacrylate de méthyle, sont équipés d'un port de prélèvement stérile et de ports d'injection de CO<sub>2</sub>, d'air comprimé et de milieu de culture. D'autres ports spécifiques reçoivent l'électrode pH et la canne de régulation de température. Deux types de photobioréacteurs ont été employés au cours de ce travail, au fur et à mesure de l'évolution des besoins et des développements entrepris. Leurs caractéristiques particulières sont précisées ci-dessous :

- Le type 1 concerne des photobioréacteurs plans, d'un volume utile de 12L et de chemin optique de 200 mm. L'agitation de la culture est assurée par deux injections



FIGURE 2.1 – Plateau expérimental pour la culture de microalgues en photobioréacteurs au laboratoire Physiologie et Biotechnologies des Algues à IFREMER. Photo IFREMER.

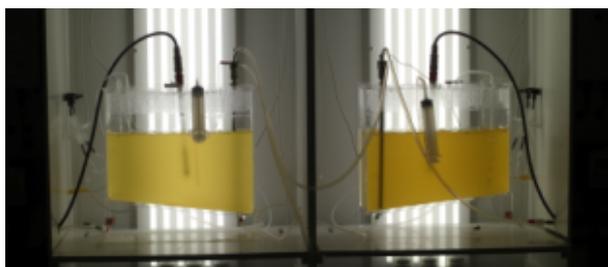


FIGURE 2.2 – Photobioréacteurs plans de 12 L et de chemin optique 200 mm (type 1). Photo IFREMER.



FIGURE 2.3 – Photobioréacteurs plans de 10 L et de chemin optique 40 mm (type 2). Photo IFREMER.

d'air positionnées aux extrémités de la cuve. En raison de leur fort volume, ces photobioréacteurs autorisent des prélèvements de culture conséquents.

- Le type 2 se réfère à des photobioréacteurs plans (figure 2.3), d'un volume utile de 10 L. Ces derniers ont été développés pour les besoins spécifiques de cette étude. Leur chemin optique de 40 mm permet un contrôle précis de l'éclairement. L'agitation et le mélange sont assurés par un arbre central, portant deux hélices marines et générant un flux descendant, auquel sont associées deux injections d'air latérales qui génèrent un flux ascendant de la culture. Le photobioréacteur est équipé de déflecteurs destinés à organiser les écoulements au sein de celui-ci. Ce dispositif garantit une excellente homogénéité, avec un temps de mélange de 20 s. L'ensemble est conçu de manière que des prélèvements conséquents peuvent y être réalisés sans compromettre le mélange ni modifier la pénétration de la lumière.

## 2 Modes de culture

Selon l'objectif visé, les cultures de microalgues sont réalisées en batch ou en chémostat. En mode batch (ou séquentiel), tous les éléments nécessaires à la croissance des microalgues sont apportés au temps initial dans la culture. Il se caractérise par différentes phases de développement de la population cellulaire (figure 2.4) : après une phase de latence généralement observée (a), traduisant une acclimatation des cellules aux nouvelles conditions, le taux de division cellulaire tend vers une valeur maximale  $\mu_{max}$ . La durée pendant laquelle cette valeur reste constante est appelée phase de croissance exponentielle (b). Suite à la raréfaction du substrat le plus limitant, le taux de croissance diminue progressivement et se traduit par la phase linéaire de croissance (c). Enfin, la carence en substrat aboutit à la cessation de la multiplication cellulaire lors de la phase stationnaire, où  $\mu = 0$  (d), puis à une augmentation de la mortalité cellulaire, traduite par la phase de déclin (e).

Le chémostat est un mode de culture plus sophistiqué et technique, inventé et décrit par Monod (1950) dans le cadre de cultures bactériennes. Le chémostat est une culture ouverte, alimentée en continu par du milieu frais à débit constant, dans lequel un élément nutritif limite la croissance. Le volume de culture est maintenu constant par l'exportation d'un volume équivalent à l'apport de milieu. Comme le souligne Monod (1950) une telle

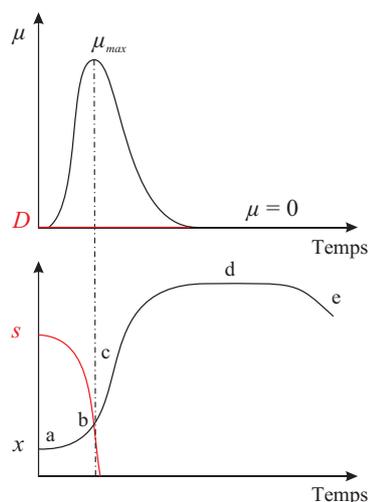


FIGURE 2.4 – Principe de la culture en batch.  $x$  représente la biomasse dans la culture,  $s$  l'élément limitant,  $D$  le taux de dilution et  $\mu$  le taux de croissance. Les lettres en minuscules se réfèrent aux différentes phases d'évolution de la biomasse :  $a$  phase de latence ;  $b$  phase de croissance exponentielle ;  $c$  phase de croissance linéaire ;  $d$  phase stationnaire ;  $e$  phase de déclin.

culture peut « croître indéfiniment à un taux constant et dans des conditions constantes et devient un objet extrêmement favorable pour l'expérimentation ». Dans un chémostat, le développement de la population cellulaire ressemble à celui observé dans une culture en batch, avec une phase de montée en puissance, suivie d'une stabilisation de la population. Mais, contrairement à cette dernière, l'état stable dans un chémostat se caractérise par un taux de croissance de la population  $\mu$  constant et non nul, égal au taux de dilution  $D$  imposé (figure 2.5). On parle ainsi d'état d'équilibre, par opposition à l'état stationnaire d'une culture en batch, pour laquelle  $\mu = 0$ . Toute modification apportée aux conditions de culture, qui influence le taux de croissance, altère l'équilibre et se traduit par une variation généralement durable et mesurable du niveau de la population au sein de la culture.

Le modèle de Droop (Burmester, 1979; Droop, 1968, 1983) est très couramment utilisé pour reproduire la croissance de microalgues sur un substrat limitant, en batch ou en chémostat. Son formalisme relativement simple permet de conduire une analyse mathématique de ses propriétés, sans avoir recours à la simulation (Bernard et Gouzé, 1995; Lange et Oyarzun, 1992; Vatcheva et al., 2006).

Le modèle de Droop postule que la croissance d'une population phytoplantonique  $x$  est

fonction du quota interne  $q_S$  de l'élément limitant  $s$ , contrairement au modèle de Monod qui considère la croissance dépendante de sa concentration dans le milieu. Si  $s$  désigne l'élément limitant — qui dans notre cas peut être l'azote ou le phosphore —, le modèle de Droop s'écrit comme suit :

$$\begin{cases} \dot{s} = D \cdot s_{in} - \rho_S(s) \cdot x - D \cdot s \\ \dot{q}_S = \rho_S(s) - \mu(q_S) \cdot q_S \\ \dot{x} = \mu(q_S) \cdot x - D \cdot x \end{cases} \quad (2.1)$$

où  $\dot{s}$ ,  $\dot{q}_S$  et  $\dot{x}$  représentent les variations dans le temps du substrat, du quota et de la population et  $s_{in}$ , la concentration du substrat entrant.

Les fonctions  $\rho_S$  et  $\mu$ , qui représentent les taux spécifiques d'absorption du substrat et de croissance, sont respectivement formalisées par des fonctions de Michaelis-Menten et de Droop :

$$\begin{aligned} \rho(s) &= \rho_{max} \frac{s}{s+K_s} \\ \mu(q) &= \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_0}{q}\right) \end{aligned} \quad (2.2)$$

où  $\rho_{max}$  et  $\bar{\mu}$  représentent le taux maximum d'absorption et le maximum théorique du taux de croissance. Il peut être prouvé que le quota interne d'un élément limitant demeure contraint entre deux bornes (Bernard et Gouzé, 1995)

$$q_0 \leq q \leq q_{exp} \quad (2.3)$$

Le quota maximum obtenu au taux de croissance maximum  $\mu_{max}$  (Bernard et Gouzé, 1995) peut alors être calculé :

$$q_{exp} = q_0 + \frac{\rho_m}{\bar{\mu}} \quad (2.4)$$

Le taux de croissance maximum s'exprime donc finalement comme  $\mu_{max} = \mu(q_{exp})$ .

**Remarque 1 :** dans la suite, nous écrirons :

$$\mu_{max} = \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_0}{q_{exp}}\right) \quad (2.5)$$

A l'équilibre dans un chémostat, nous avons  $\mu = D$ . L'équation de Droop s'écrit

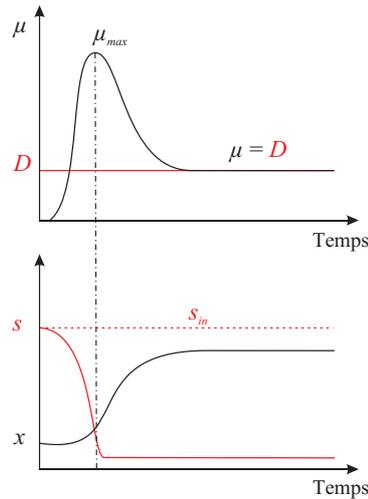


FIGURE 2.5 – Principe de la culture en chémostat. A l'équilibre, le taux de croissance des algues  $\mu$  est égal au taux de dilution  $D$  imposé au système.  $x$  représente la biomasse,  $s$  la concentration de l'élément limitant dans la culture,  $s_{in}$  la concentration à laquelle l'élément limitant est apporté dans la culture.

alors :

$$D = \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_0}{q^*}\right) \quad (2.6)$$

où l'exposant  $*$  se réfère à la valeur à l'équilibre. Le quota interne est ainsi une fonction croissante du taux de dilution :

$$q^* = q_0 \frac{\bar{\mu}}{\bar{\mu} - D} \quad (2.7)$$

Ce modèle a été largement validé et la qualité de ses prédictions a pu être vérifiée (Droop, 1983; Sciandra et Amara, 1994) pour représenter les limitations par l'azote et le phosphore, même dans des situations dynamiques (Bernard et Gouzé, 1999; Bernard et al., 1998).

### 3 Matériel biologique

La souche CCAP 927/14 de *Isochrysis affinis galbana* (Haines), récemment renommée *Tisochrysis lutea* par Bendif et al. (2013), a été acquise auprès de la Culture Collection of Algae and Protozoa (Ecosse). Cette microalgue dorée appartient à la division des *Prymne-*

*siophyta* et à la classe des *Prymnesiophyceae*. *Tisochrysis lutea* (T-Iso) est une microalgue flagellée de forme ovoïde, mesurant 4 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre et munie d'un plaste unique (figure 2.6). Elle est dotée de deux flagelles apicaux égaux (figure 2.7), grâce auxquels elle se déplace selon un mouvement hélicoïdal.

Cette microalgue est l'une des espèces les plus utilisées en aquaculture pour nourrir les larves d'huitres et de crevettes. Elle possède, pour cette application, une composition intéressante en raison de sa forte teneur en acides gras polyinsaturés à longue chaîne tels que les acides docosahexaénoïque (22 :6 (n-3)), stéaridonique (18 :4 (n-3)) et alpha-linolénique (18 :3 (n-3)) (Renaud et al., 1995). Sa teneur en acides gras totaux (supérieure à 250  $\text{mg gC}^{-1}$ ) et une répartition des acides gras dans les lipides neutres supérieure à 70% des acides gras totaux sous carence azotée, en font une algue oléagineuse, particulièrement depuis l'obtention d'une souche hyperproductrice de lipides neutres (Bougaran et al., 2012).

Ses conditions de croissance sont bien documentées, avec un optimum obtenu pour une température de 28 °C, un éclaircissement saturant de l'ordre de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et un pH de 7,0 (Marchetti et al., 2012). Le rapport critique N:P, qui représente le rapport entre les quotas d'azote et de phosphore (rapportés au carbone), pour lequel on observe la transition d'un type de limitation à l'autre à un taux de croissance donné, est élevé en comparaison du rapport de Redfield (N:P = 16) et varie de 70 à 50 pour des taux de croissance compris entre 0,3 et 0,8  $\text{j}^{-1}$  (Marchetti et al., 2012).

## 4 Entretien des souches et acclimatation des inocula

Les cultures souche sont maintenues dans des conditions de croissance lente, en Erlenmeyer de 250 mL, sous un faible éclaircissement de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et à une température de 20 °C. Les repiquages sont renouvelés mensuellement sur milieu de Walne (1966).

Les cultures servant d'inoculum pour les expériences sont produites en batch, dans des ballons de 2 L, sous un éclaircissement de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  — mesuré à l'aide d'un quantum-mètre sphérique (Li-Cor) au centre de la culture —, à une température de 27 °C et un pH de 8,0 pour garantir une période d'acclimatation aux conditions expérimentales ultérieures.

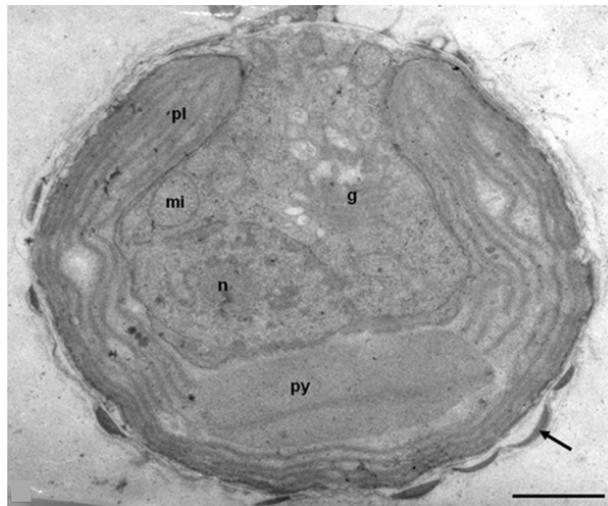


FIGURE 2.6 – Micrographie électronique à transmission de *TisochrYSIS lutea*. La barre d'échelle représente 1  $\mu\text{m}$ . pl : plaste pariétal; n : noyau; mi : mitochondrie; py : pyrénoloïde; g : golgi. D'après Bendif et al. (2013)

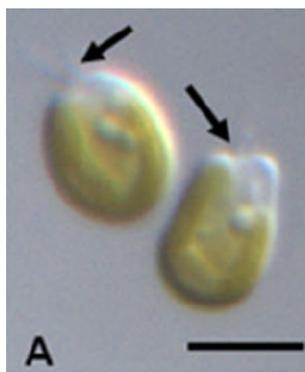


FIGURE 2.7 – Micrographie optique de deux cellules mobiles de *TisochrYSIS lutea*. Les flèches désignent la dépression apicale au niveau des flagelles. La barre d'échelle représente 5  $\mu\text{m}$ . D'après Bendif et al. (2013)

Nous avons retenu un pH légèrement plus basique que l'optimum pour cette espèce afin de réduire l'excrétion de carbone organique.

## 5 Cultures expérimentales

Selon l'objectif assigné à chaque expérience, des cultures en batch ou en chimostat sont utilisées, sous des conditions variables de limitation par l'azote ( $\text{NO}_3$ ) et le phosphore ( $\text{PO}_4$ ).

### 5.1 Cultures en mono-limitations

Les cultures sous mono-limitations sont réalisées dans le but de caractériser la réponse de microalgues dans des situations extrêmes de limitation. Deux expériences identiques ont été successivement menées.

Les cultures en batch sont effectuées dans des photobioréacteurs de type 1, dans un volume total de 11 L. Les conditions de culture sont identiques à celles précédemment décrites pour les inocula. Celles-ci sont réalisées en mono-limitation par l'azote (N) ou le phosphore (P), en modifiant les concentrations relatives de  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  dans la solution de Walne. Les cultures limitées par le N sont enrichies à l'aide d'un milieu dont les concentrations en  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  sont  $125 \mu\text{mol N L}^{-1}$  et  $125 \mu\text{mol P L}^{-1}$ , respectivement (rapport N:P = 1), alors que les cultures limitées par le P sont approvisionnées par un milieu avec des concentrations en  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  de  $560 \mu\text{mol N L}^{-1}$  et  $4 \mu\text{mol P L}^{-1}$ , respectivement (rapport N:P = 140). Afin de minimiser les variations de concentration de l'élément limitant, plusieurs précautions sont prises lors de la production des inocula : les cultures sont pré-acclimatées au ratio N:P utilisé pour l'expérience. Les inocula sont prélevés pendant la phase de croissance linéaire, une fois l'élément limitant épuisé dans le milieu externe. Enfin, les cultures expérimentales sont inoculées avec de faibles concentrations cellulaires pour réduire l'apport en élément limitant contenu dans les microalgues. Pour des concentrations cellulaires initiales de l'ordre de  $0,1 \times 10^9 \text{ cell L}^{-1}$ , la fraction particulaire inoculée représente ainsi moins de 1 à 2 % de l'enrichissement par l'élément limitant dans les cultures expérimentales.

La fréquence des prélèvements est adaptée au cours des cultures pour cerner au mieux les

dynamiques des variables. Ainsi, les cultures sont-elles échantillonnées deux fois par jour pendant les phases d'évolution lente et toutes les 15 ou 30 min lors des périodes de disparition ultime de  $\text{NO}_3$  ou de  $\text{PO}_4$  dans les cultures N ou P-limitantes, respectivement. Les prélèvements réalisés sont répartis selon les besoins des diverses analyses, et concernent les aspects populationnels (concentration cellulaire, carbone particulaire), les quotas cellulaires C, N et P, le quota en ATP, ainsi que les concentrations en N et P dissous sous formes minérales (NID et PID) et organiques (NOD et POD). Le détail de ces analyses est présenté dans la section 6.

## 5.2 Cultures en chémostat et co-limitation

En appui sur les prédictions du modèle, les cultures en chémostat sont réalisées pour évaluer l'impact de la co-limitation sur la croissance des microalgues, au cours des phases d'équilibre et dans les situations dynamiques transitoires.

Comme pour les cultures en mono-limitation, les inocula sont pré-conditionnés au rapport N:P utilisé ultérieurement pour atteindre plus rapidement le premier équilibre des cultures en chémostat. Les inocula limités par le N sont réalisés sur le même milieu que les cultures en batch (rapport N:P = 1), alors que la limitation par le P est obtenue par un enrichissement de  $125 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  et de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{PO}_4$  (rapport N:P = 62,5). Les conditions d'éclairage, de température et de pH sont identiques à celles présentées antérieurement pour les cultures en batch. Des concentrations initiales de cellules de  $0,5 \times 10^9 \text{ cell L}^{-1}$  sontensemencées dans les photobioréacteurs expérimentaux.

Les photobioréacteurs plans de type 2 sont utilisés lors de ces expériences pour autoriser les volumes de prélèvement nécessaires aux analyses variées, sans compromettre le bon fonctionnement du chémostat. Les cultures sont réalisées en duplicats, au taux de dilution de  $1 \text{ j}^{-1}$ , qui permet des dynamiques de transitoires rapides, et se décomposent en trois phases successives :

1. les cultures sont initiées sous des conditions de limitation en  $\text{NO}_3$ , obtenues pour un rapport N:P = 1 à l'aide de concentrations en  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  de  $125 \mu\text{mol N L}^{-1}$  et  $125 \mu\text{mol P L}^{-1}$  respectivement.
2. une fois l'équilibre atteint et caractérisé, la concentration d'enrichissement en  $\text{PO}_4$

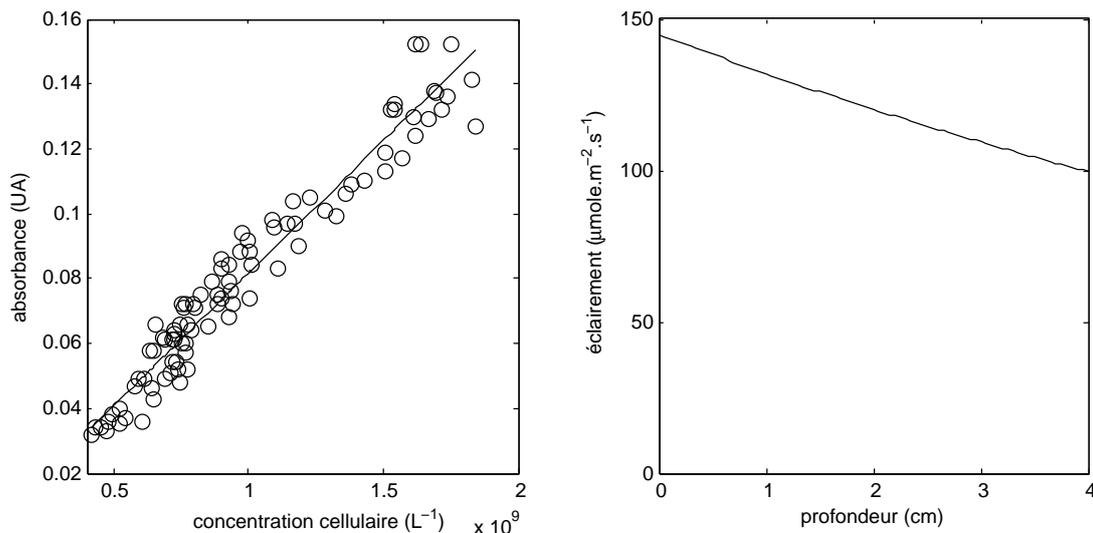


FIGURE 2.8 – Relation entre l'absorbance ( $\lambda_{680}$ ) et la concentration cellulaire d'une culture de *Tisochrysis lutea*. La pente de la droite de régression, divisée par la concentration cellulaire, correspond à un coefficient d'extinction de la loi de Beer-Lambert de  $2,04 \times 10^{-11} \text{ L cell}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (b) Atténuation de l'éclairement en fonction de la profondeur de culture, calculé par la loi de Beer-Lambert pour une concentration cellulaire de  $2 \times 10^9 \text{ cell L}^{-1}$  et un éclairement incident de  $145 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

est réduite à  $2 \mu\text{mol P L}^{-1}$ , sans modifier celle en  $\text{NO}_3$ , ce qui induit une limitation des cultures par le  $\text{PO}_4$ . Le rapport N:P imposé est alors de 62,5.

3. dans une troisième phase, le rapport initial est restauré pour atteindre un dernier équilibre.

Cette procédure, qui utilise un apport constant en  $\text{NO}_3$  pour limiter les algues successivement par le N et par le P et inversement, permet d'éviter l'apparition d'un pic de concentration cellulaire lors des phases transitoires entre deux équilibres. L'occurrence de ce pic de biomasse, dont l'intensité peut-être élevée, compromettrait l'analyse rigoureuse des phénomènes en phases transitoires en raison de modifications du niveau et du profil d'éclairement au sein des cultures.

Néanmoins, les variations de la concentration cellulaire induites par la procédure décrite ci-dessus nécessitent un ajustement de l'éclairement. Pendant les phases transitoires, l'éclairement incident est ainsi quotidiennement adapté de manière à assurer la constance de l'éclairement, mesuré en sortie de culture à l'aide d'un quantum-mètre plan (Li-Cor), sur la face non éclairée du photobioréacteur. Le coefficient de la loi de Beer-Lambert estimé

pour *Tisochrysis lutea*, à la longueur d'onde  $\lambda = 680$  nm, est de  $2,04 \times 10^{-11}$  L cell  $\text{cm}^{-1}$  (figure 2.8). Pour des concentrations cellulaires faibles comprises entre 1 et  $2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$ , la loi de Beer-Lambert prédit des profils d'éclairement proches de la linéarité pour des cultures de chemin optique de 40 mm. Ainsi, l'éclairement moyen des cultures peut-il être aisément contrôlé sur la base de la mesure de l'éclairement en sortie de culture.

Pour des raisons pratiques, les expériences en chémostat sont réalisées en deux périodes consécutives, sur des cultures distinctes : la première concerne l'équilibre en limitation azotée, puis la transition vers l'équilibre en condition de limitation par le P. La seconde période permet d'étudier la transition inverse, de l'équilibre limité par le P vers celui obtenu en limitation azotée.

Les prélèvements sont effectués une à deux fois par jour durant les phases d'équilibre, et une fois toutes les 8 heures en période de transitoires afin de décrire finement les dynamiques. Ces prélèvements autorisent la caractérisation des cultures sur les aspects populationnels (concentration cellulaire, carbone particulaire), les quotas cellulaires C, N et P, le quota en ATP, les concentrations en N et P dissous sous formes minérales (NID et PID) et organiques (NOD et POD), ainsi que le contenu en lipides des cellules. Les méthodologies relatives à chaque type de mesures sont décrites dans le détail ci-après, dans la section 6.

## 6 Analyses biologiques

Pour les expériences visant à mesurer les éléments dans les phases liquides et solides d'une culture de microalgues, la question de seuil de fractionnement entre ces phases est primordiale et le plus souvent délicate. Dans le cas présent, les composés particuliers et dissous sont séparés à l'aide de filtres en fibres de verre GF/C pré-calcinés, dont le seuil de rétention nominal est de  $1,2 \mu\text{m}$ . Ce choix permet de retenir les cellules de *Tisochrysis lutea* ( $4 - 6 \mu\text{m}$ ) sur le filtre et de s'affranchir, dans la fraction particulaire, d'éventuelles bactéries présentes dans les cultures xéniques. Le corollaire est la comptabilisation possible des bactéries dans le compartiment dissous, ainsi que celle de possibles débris cellulaires.

## 6.1 Éléments résiduels

L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide de matériel traité avec du HCl 0,1 N pour limiter les éventuelles pollutions par de la matière organique.

### Fraction minérale dissoute

**Analyses automatisées** Le suivi des concentrations des élément minéraux Résiduels (RES) dans les cultures porte exclusivement sur l'azote et le phosphore, sous leurs formes  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  et  $\text{PO}_4$ , respectivement. Les analyses sont réalisées selon la méthode décrite par Aminot et Kérouel (2007). Immédiatement après le prélèvement, un échantillon de 40 mL est filtré sur filtre GF/C pré-calciné (diamètre 47 mm) et le filtrat conservé à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à analyse. Après décongélation, les échantillons sont centrifugés sous une accélération de 3000 g. Les dosages sont effectués dans le surnageant par colorimétrie sur un autoanalyseur AA3 (SEAL Analytical<sup>®</sup>) associé au logiciel AACE 6.07, dans le laboratoire LER MPL de l'IFREMER à Nantes. Ce laboratoire est accrédité Cofrac N° 23-49 pour le dosage automatique des nutriments dans les eaux salines et saumâtres par spectrophotométrie en flux continu.

Le dosage du  $\text{PO}_4$  repose sur la réaction avec le molybdate, en présence d'antimoine. Cette réaction conduit à la formation du complexe phoshomolybdique qui est ensuite réduit par l'acide ascorbique pour former un composé bleu, dont la mesure est effectuée à  $\lambda = 820\text{ nm}$ . Les mesures d'azote résiduel présentées dans ce travail concernent la somme des espèces  $\text{NO}_3$  et  $\text{NO}_2$ . Le nitrate est initialement réduit en  $\text{NO}_2$  à l'aide d'une colonne de cadmium traitée au cuivre et en présence de deux réactifs (chlorure d'ammonium et hydroxyde de sodium). Le  $\text{NO}_2$  total est ensuite dosé par réaction avec la sulfanilamide, pour produire un diazoïque qui réagit à son tour avec le N-naphtyl-thylènediamine en milieu acide et donne une coloration rose, dosée à  $\lambda = 540\text{ nm}$ .

Les limites de quantification sont de  $1\ \mu\text{mol L}^{-1}$  pour le  $\text{NO}_3$  et le  $\text{NO}_2$  et de  $0,2\ \mu\text{mol L}^{-1}$  pour le  $\text{PO}_4$ .

**Analyses manuelles** L'autoanalyseur ne pouvant être utilisé en temps réel, des dosages manuels sont effectués dans les cultures en batch, pendant la phase qui précède

la disparition des substrats. Ces analyses sont destinées à cerner avec précision la fenêtre temporelle d'échantillonnage à haute fréquence, nécessaire au calcul des paramètres d'absorption de N ou de P. Avant dosage, les échantillons de culture sont filtrés comme précédemment.

En ce qui concerne l'azote, la méthode utilisée est celle développée par Collos et al. (1999), pour sa simplicité et sa rapidité. Celle-ci permet le dosage de concentrations micromolaires de  $\text{NO}_3$  et de  $\text{NO}_2$  par la seule mesure de l'absorption des ultra-violets ( $\lambda_{220}$ ), à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic Genesys équipé de cuves de 1 cm de chemin optique. La linéarité de cette méthode a été démontrée sur la gamme 1 - 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , avec une précision de 1,5 %.

Pour le dosage du  $\text{PO}_4$ , nous avons mis en œuvre la méthode développée par Aminot et Kérouel (2004). Cette méthode est basée sur le dosage colorimétrique ( $\lambda_{880}$ ) du complexe phosphomolybdique. Elle permet un dosage précis du  $\text{PO}_4$  jusqu'à des concentrations de 2  $\mu\text{M}$ , avec une précision de 1 %.

**Fraction organique dissoute** La fraction organique dissoute s'entend comme les formes organiques de phosphore et d'azote recueillies dans le filtrat, au seuil de filtration de 1,2  $\mu\text{m}$ . Le dosage de ces formes par l'autoanalyseur AA3 nécessite au préalable une minéralisation, réalisée par la méthode d'oxydation humide, développée par Pujon-Pay et Raimbault (1994) et décrite dans la section 6.2. Le résultat obtenu après oxydation humide permet le dosage de la somme des formes minérales et organiques d'azote et de phosphore dissous, désignée par le terme Résiduels Oxydés (ROX). Finalement, la fraction organique dissoute est calculée pour chaque élément par soustraction de la fraction résiduelle minérale RES à la fraction ROX.

Des échantillons de culture sont également soumis à l'oxydation humide sans avoir subi de fractionnement préalable par filtration. Hormis l'absence de fractionnement, les échantillons subissent le protocole analytique précédemment décrit. Le résultat obtenu (TOX) recouvre la totalité de formes minérales et organiques, particulières et dissoutes, présentes dans les cultures.

Il est à noter que les concentrations d'azote obtenues dans les fractions ROX et TOX doivent être minorées des 268  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de N apportées dans le milieu par l'EDTA.

## 6.2 Quotas C, N, P cellulaires

Deux approches distinctes sont conduites parallèlement pour mesurer les éléments C, N et P dans la fraction particulaire microalgale recueillie sur filtre GF/C. Une fois connues, les concentrations de N et P particulaires sont ensuite rapportées à la concentration de cellules (voir ci-après) ou de carbone particulaire pour calculer les quotas par cellule ou par unité de C.

**Concentration cellulaire** La concentration cellulaire des cultures est déterminée par analyse d'image, à l'aide du logiciel Samba (TITN Co). Les échantillons sont dilués au demi à l'aide d'une solution de Lugol et étalés sur lame de Malassez munies d'un fond argenté, qui permet d'augmenter le contraste des images. 40 images sont acquises au grossissement  $\times 100$ . Une fois numérisées celles-ci sont analysées à l'aide d'une application spécifiquement développée sous Samba pour la reconnaissance des cellules de *Tisochrysis lutea*. La valeur moyenne des 40 dénombrements est finalement prise en compte.

**Analyse élémentaire** L'azote et le carbone particulaires sont dosés grâce à l'analyse élémentaire. Celle-ci est réalisée sur un analyseur élémentaire Flash 2000 NC Soil analyzer (Thermo scientific).

Le volume de prélèvement est adapté de façon à filtrer  $4 \times 10^7$  cellules sur un filtre GF/C 25 mm pré-calciné à 450 °C, sous faible vide et sans subir de rinçage. Après filtration, les échantillons déposés dans une boîte de Pétri de 40 mm de diamètre sont soumis à dessiccation pendant un minimum de 12 h dans un four à 70 °C. Dans le cas où les échantillons ne sont pas analysés immédiatement, ceux-ci sont conservés à  $-20$  °C et soumis à un nouveau séchage avant analyse.

**Analyse par oxydation humide** L'azote et le phosphore intracellulaires sont mesurés par la méthode d'oxydation humide, développée par Pujo-Pay et Raimbault (1994). Celle-ci consiste en une digestion chimique de la matière organique en présence d'agents oxydants et sous haute température.

L'ensemble du matériel en contact avec les échantillons est stocké dans un bain de HCl à 10 % et abondamment rincé, avant utilisation, à l'eau désionisée 18,2 M $\Omega$  fraîchement

produite.

Le réactif est préparé par dissolution de 15 g de peroxydisulfate de potassium, puis de 7,5 g d'acide borique dans 70 mL de solution de soude (1,5 M) à une température de 45 °C. La solution est ensuite complétée à 250 mL avec de l'eau désionisée 18,2 M $\Omega$  fraîchement produite. Le réactif est stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation. Celui-ci cristallisant rapidement, seule la quantité nécessaire à la série d'échantillons analysée est préparée.

Les échantillons de culture sont filtrés sur filtres GF/C-25 mm pré-calcinés à 450 °C. Dans le cas des analyses de la phase particulaire, le volume de culture filtré est déterminé de façon à ce que la concentration finale d'azote total dans la solution d'oxydation demeure inférieure à 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Le filtre portant la phase particulaire est introduit dans un flacon d'oxydation en Téflon de 50 mL, rempli à l'aide de 40 mL d'eau désionisée 18,2 M $\Omega$ . 5 mL de réactif sont ensuite ajoutés. Pour les analyses de la fraction résiduelle oxydée (ROX), un volume de filtrat variable est ajouté de manière à respecter la concentration finale d'azote maximale de 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Dans le cas des analyses d'oxydation de la totalité d'un échantillon de culture (TOX), un volume constant de 2 ou 4 mL — selon les expériences — est introduit dans le flacon. Dans ces deux derniers cas, le volume d'eau désionisée est ajusté pour obtenir un volume final de 40 mL, auquel sont rajoutés 5 mL de réactif. Le flacon est fermé hermétiquement et l'ensemble homogénéisé. Trois réplicats sont généralement préparés pour chaque mesure. Des blancs d'oxydation, au nombre de 3, sont également préparés en suivant le même protocole, mais sans y introduire d'échantillon. Typiquement, la valeur des blancs obtenue est de  $0,81 \pm 0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$  pour  $\text{NO}_3$  et de  $0,080 \pm 0,019 \mu\text{mol L}^{-1}$  pour  $\text{PO}_4$ , ce qui correspond à moins de 4% de la gamme de mesure, pour chacun des éléments. L'oxydation humide proprement dite est réalisée par autoclavage, pendant 30 min sous 1 bar, à 121 °C. Après cette opération, l'ensemble des formes organiques et minérales réduites d'azote et de phosphore se retrouvent oxydées en  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$ . Les échantillons sont alors conservés à -20 °C en attente du dosage de  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  sur l'autoanalyseur.

Pour juger de la fiabilité des estimations des quotas par oxydation humide, des bilans de fractionnement sont conduits au cours de l'expérience 1. Le taux de recouvrement  $R$  est calculé à l'aide de l'équation 2.8.

$$R = \frac{S_{PART} + S_{ROX}}{S_{TOX}} \cdot 100 \quad (2.8)$$

où  $S_{PART}$ ,  $S_{ROX}$  et  $S_{TOX}$  représentent la concentration des formes minérales et organiques de l'élément  $S$ , dans les fractions particulaire et dissoute — ces deux fractions étant exclusives au seuil de fractionnement de  $1,2 \mu\text{m}$  — et dans un échantillon de culture, respectivement. La fiabilité de l'oxydation humide pour l'élément N peut également être jugée par comparaison des analyses du compartiment particulaire obtenues par l'analyse élémentaire et par l'oxydation humide.

### 6.3 ATP cellulaire

Le dosage de l'ATP cellulaire est basé sur la méthode développée par Laws et al. (1983a). Nous avons modifié cette dernière en profondeur pour l'adapter à l'utilisation du kit commercial ATPLite™ de Perkin-Elmer. La méthode utilise la bioluminescence résultant de la réaction catalysée par la Luciférase de la Luciole *Photinus pyralis* en présence d'ATP et de  $\text{Mg}^{2+}$  :



Après formation du complexe  $\text{E-LH}_2\text{-AMP}$  (équation 2.9), l'oxydation de ce dernier conduit à la formation d'Oxyluciférine, de  $\text{CO}_2$  et d'AMP : la Luciférine passe alors d'un état stable à un état électroniquement excité et instable. En retournant à son état stable, la Luciférine émet un photon (équation 2.10). La lumière émise est ainsi proportionnelle à la quantité d'ATP sous certaines conditions de pH et de température.

L'utilisation du kit ATPLite™ génère un signal dont la demi-vie dépasse 5 h, ce qui autorise l'utilisation d'un luminomètre sans injecteur. Néanmoins, le tampon d'extraction de ce kit n'est pas spécifiquement adapté aux microalgues et le fabricant n'a pas souhaité nous en communiquer la composition. Or, Laws et al. (1983a) soulignent la nécessité d'inhiber les phosphatases alcalines particulièrement actives chez les microalgues. Cet aspect est d'autant plus crucial que celles-ci connaissent une limitation par le phosphore. Il a donc

été nécessaire de substituer au tampon d'extraction commercial Perkin-Elmer un tampon Sorensen, comme proposé par Laws et al. (1983a).

**Extraction de l'ATP** L'ensemble du matériel en contact avec les échantillons est stocké dans un bain de HCl à 10 % et abondamment rincé à l'eau désionisée 18,2 M $\Omega$  avant utilisation. Du matériel ATP-free (Eppendorf Biopur<sup>®</sup>) a été utilisé pour réduire les contaminations.

La préparation du tampon d'extraction Sorensen consiste à dissoudre 24,0 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1 L d'eau 18,2 M $\Omega$  (solution A) et 35,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans 1 L d'eau 18,2 M $\Omega$  (solution B) pour obtenir deux solutions à 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . 117,5 mL de la solution A et 500 mL de la solution B sont mélangés et complétés à 1 L avec de l'eau 18,2 M $\Omega$  pour réaliser un tampon phosphate 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  à pH 7,4.

A l'aide d'un bain sec, 5 mL de tampon d'extraction sont portés à 100 °C dans des tubes à essai gradués de 15 mL, munis d'un bouchon. Une fois le tampon à température, 2 mL d'échantillon de culture sont injectés dans chaque tube. Les mises au point préliminaires du protocole ont montré qu'un dosage correct de l'ATP cellulaire nécessite d'employer des concentrations cellulaires d'échantillon comprises entre 0,3 et  $3 \times 10^6$  cellules/mL (figure 2.9a).

L'extraction se déroule pendant 5 min à cette même température, avec une homogénéisation régulière de chaque tube. Finalement, les tubes sont transférés dans un bain-marie à température ambiante. Après complet refroidissement, le volume de chaque tube est complété à 10 mL à l'aide d'eau 18,2 M $\Omega$ . Aux tubes d'échantillons se rajoute un tube dans lequel le volume de culture est remplacé par de l'eau de mer filtrée au seuil 0,2  $\mu\text{m}$ . Ce tube sert de référence pour chaque série d'extraction.

Une série d'essais préliminaires sur la température et la durée de conservation nous a montré que la teneur en ATP des échantillons n'est pas sensiblement affectée par les températures testées et une durée de conservation inférieure à 12 j (figure 2.9b). Les échantillons expérimentaux sont donc conservés à  $-20^\circ\text{C}$ , pendant une durée maximum de 12 j, en attente du dosage de l'ATP.

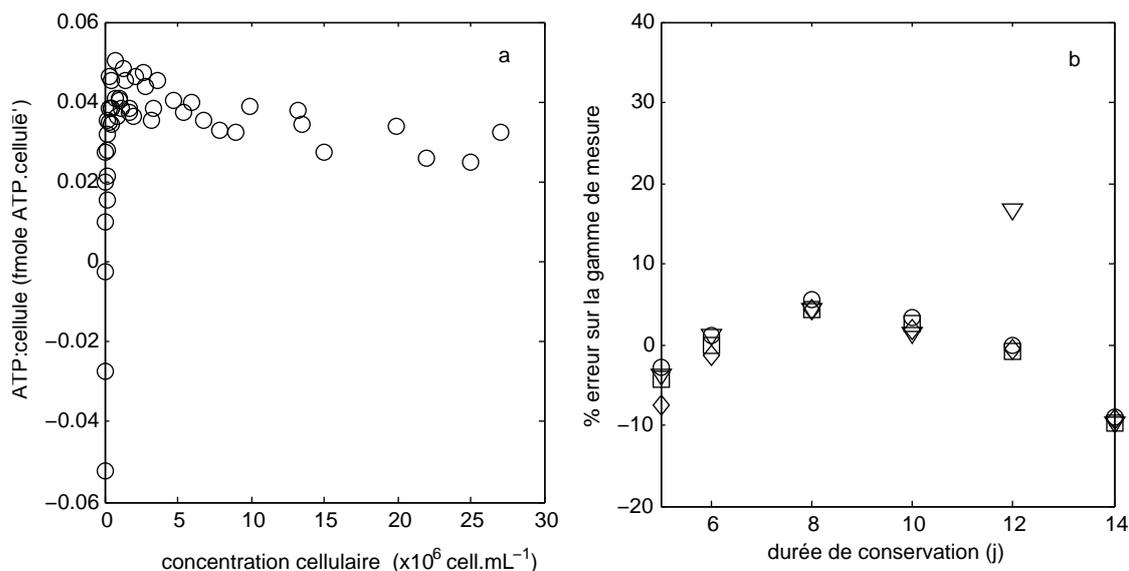


FIGURE 2.9 – (a) Variation de la teneur en ATP dosé dans les cellules en fonction de la concentration cellulaire de l'échantillon de culture. (b) Effet de la température et de la durée de conservation des échantillons sur la teneur en ATP.  $\diamond$  4 °C,  $\circ$  -20 °C,  $\square$  -80 °C,  $\nabla$  -196 °C.

**Mesure de l'ATP par bioluminescence** La solution tampon du substrat, fournie dans le kit ATPLite<sup>™</sup>, est injectée à température ambiante à raison de 5 mL dans le flacon de substrat lyophilisé du kit prévu pour 1000 dosages et contenant la Luciférine et la Luciférase. L'ensemble est homogénéisé et peut être conservé dans des Eppendorfs, pendant plusieurs semaines à -20 °C. Ceux-ci ne sont décongelés que 15 min avant utilisation et au fur et à mesure des besoins.

Les échantillons ou les solutions étalon ayant subi la phase d'extraction sont répartis, en triplicats, à raison de 150  $\mu$ L par puits dans une microplaque de 96 puits. Un volume de 50  $\mu$ L de la solution de substrat reconstituée précédemment est alors injecté dans chaque puits. Un film TOPSEAL-A (Perkin Elmer) est appliqué sur la surface de la microplaque avant d'effectuer le mélange sur un agitateur orbital pendant 5 min à 700 rpm. Le film est ensuite retiré délicatement et la plaque introduite dans un luminomètre Victor<sup>™</sup> Light 1420 (Perkin Elmer). Après un délai de 10 min à l'obscurité, la mesure de luminescence est effectuée.

**Étalonnage de la méthode** Le lyophilisat d'ATP, fourni dans le kit ATPLite<sup>™</sup>, est réhydraté avec la quantité d'eau 18,2 M $\Omega$  adéquate pour obtenir une solution à la concen-

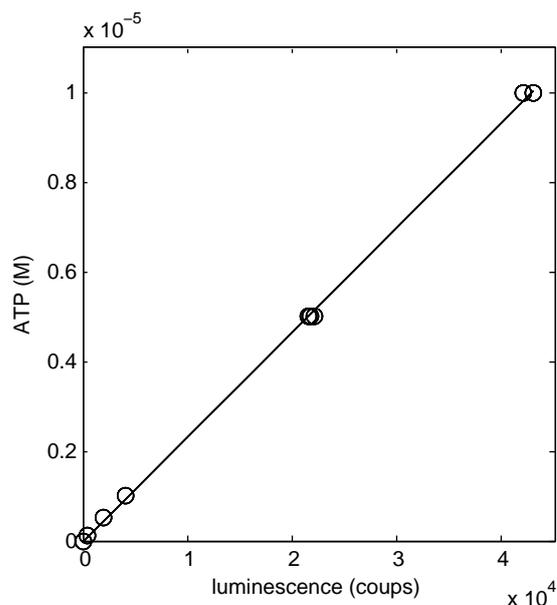


FIGURE 2.10 – Exemple de courbe d'étalonnage obtenue pour la mesure d'ATP par luminescence.

tration de  $1 \times 10^{-2}$  M (solution S), stable pendant plusieurs semaines à  $-20^\circ\text{C}$ . A partir de cette solution S, une gamme de 5 solutions étalon de concentrations comprises entre  $1 \times 10^{-5}$  M et  $1 \times 10^{-7}$  M est préparée dans de l'eau  $18,2 \text{ M}\Omega$ .

L'ensemble des solutions subit ensuite le traitement d'extraction décrit ci-dessus pour les échantillons, les 2 mL d'échantillon étant remplacés par 1,9 mL d'eau de mer filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  et 0,1 mL de solution étalon. Dans la gamme étudiée, la luminescence mesurée est proportionnelle à la concentration d'ATP (figure 2.10). Les valeurs typiques des blancs de luminescence sont de  $33 \pm 13$  coups ( $n = 27$ ) et représentent moins de 1 % de la gamme de mesure.

**Disponibilité de l'ATP pour la fixation de carbone** La disponibilité de l'ATP pour la fixation de carbone est calculée comme étant le rapport entre le quota d'ATP rapporté au carbone et le taux de croissance :

$$A_{ATP} = \frac{q_{ATP}}{\mu} \quad (2.11)$$

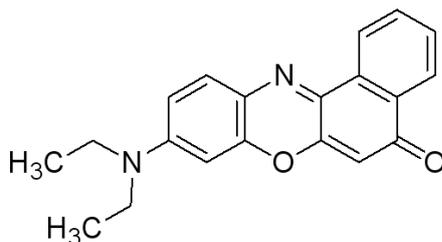


FIGURE 2.11 – Molécule du fluorochrome Nile Red.

## 6.4 Analyses lipidiques

**Analyses par le fluorochrome Nile red** Les évolutions du quota de lipides neutres intracellulaire sont suivies de manière indirecte, par la fluorescence du fluorochrome Nile red (figure 2.11). Il a pu être montré que la fluorescence du Nile Red est proportionnelle à la quantité de lipides neutres pour *Tisochrysis lutea* (Bougaran et al., 2012). En raison de sa simplicité de mise en œuvre, cette technique permet un suivi à haute fréquence, par comparaison avec les analyses en chromatographie gazeuse. Bien qu'en théorie la fluorescence du Nile Red puisse être utilisée à des fins de dosage absolu des lipides neutres (Bertozzini et al., 2011), cette technique demeure très sensible à de nombreux paramètres, dont tous ne sont pas encore cernés. La fluorescence du Nile Red n'est ainsi utilisée ici que pour suivre les variations relatives du quota de lipides neutres.

La solution de Nile Red est préparée par dissolution de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Nile Red dans l'acétone. Sa conservation est assurée à une température de  $-20^\circ\text{C}$  après aliquotage dans des Eppendorfs de 1,5 mL.

Avant analyse, la culture est diluée à l'aide d'eau de mer filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  pour adapter la concentration cellulaire au domaine de linéarité de la technique ( $< 2 \times 10^9 \text{ cell L}^{-1}$ ). La solution de Nile Red est ensuite apportée à raison de  $1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de culture, dans un Eppendorf et à l'abri de la lumière directe. La mesure de la fluorescence est effectuée immédiatement à l'aide d'un fluorimètre TECAN à microplaques. L'appareil est configuré pour une longueur d'onde d'excitation de 525 nm et une longueur d'onde d'émission de 580 nm.

## 7 Expression des résultats et analyses statistiques

Au cours des phases transitoires entre deux équilibres en chémostat, les taux spécifiques de fixation ou de production ( $\mu$ ) des différents éléments ou molécule (C, N, P ou ATP), constitutifs de la matière biologique sont calculés selon l'équation suivante :

$$\mu_e = \frac{de}{e \cdot dt} + D \quad (2.12)$$

où  $e$  représente l'un de ces éléments ou molécule.

Après lissage des données expérimentales par la fonction *Cubic Smoothing Spline* de Matlab<sup>®</sup> (Mathworks), les taux spécifiques sont calculés à l'aide de ce même logiciel, par dérivation de la fonction continue.

Les taux d'absorption sont calculés selon la même méthode, à partir de l'équation de bilan de matière :

$$\rho_e = \frac{dq_e}{dt} + \mu \cdot q_e \quad (2.13)$$

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R. La comparaison des caractéristiques cellulaires au cours des équilibres successifs en chémostat est effectuée à l'aide du test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis et du test posthoc *Kruskalmc* du paquet *Pgirmess*. Les résultats sont exprimés à travers la moyenne accompagnée de l'écart-type.

## 8 Modélisation

### 8.1 Logiciels

Le modèle de co-limitation a été mis en œuvre à l'aide de Matlab<sup>®</sup> (Mathworks) et du logiciel libre Scilab . Les deux scripts ont été utilisés indifféremment, pour paramétrer le modèle sur la base de données expérimentales, produire des prédictions destinées à définir les expériences les plus pertinentes et informatives et, enfin, évaluer la qualité des prédictions du modèle par rapport aux résultats expérimentaux acquis ou issus de la littérature.

## 8.2 Estimation de la qualité des simulations du modèle

Les écarts ( $\Delta_{rel}$ ) de prédiction du modèle ( $x_{pre}$ ) — exprimés en % —, par rapport aux mesures réalisées ( $x_{mes}$ ), sont calculés selon l'expression suivante :

$$\Delta_{rel} = \frac{x_{mes} - x_{pre}}{x_{mes}} 100 \quad (2.14)$$

Dans le cas des quotas  $q_N$  et  $q_P$ , ces écarts relatifs sont rapportés à l'amplitude des variations possibles des quotas et sont calculés comme suit :

$$\Delta_{rel} = \frac{q_{mes} - q_{pre}}{q_L - q_0} 100 \quad (2.15)$$

où  $q_{mes}$  et  $q_{pre}$  représentent les quotas mesurés expérimentalement et prédits par le modèle, respectivement.  $q_L$  et  $q_0$  représentent les quotas maximal et minimal pour l'élément considéré.



# Chapitre 3

## Développement du modèle de co-limitation

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction . . . . .</b>	<b>76</b>
<b>2</b>	<b>Modifications du modèle de Droop . . . . .</b>	<b>77</b>
2.1	Modélisation du taux de croissance . . . . .	78
2.2	Modélisation de l'absorption . . . . .	79
<b>3</b>	<b>Comparaison à des données expérimentales . . . . .</b>	<b>82</b>
3.1	Comparaison qualitative . . . . .	82
3.2	Calibration du modèle . . . . .	84
3.3	Comparaison quantitative . . . . .	85
<b>4</b>	<b>Discussion . . . . .</b>	<b>86</b>
4.1	Asymétrie entre les absorptions de N et P . . . . .	86
4.2	Prédictions du modèle aux limites physiologiques des quotas	87
4.3	Prédictions du modèle dans l'intervalle des limites physio- logiques . . . . .	88
<b>5</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>92</b>

---

## 1 Introduction

L'azote et le phosphore sont susceptibles de contraindre le développement des populations phytoplanctoniques et ont ainsi fait l'objet d'une attention particulière dans les années 70. Les diverses investigations ont tendu à admettre que les limitations imposées par ces deux nutriments répondaient à la loi du minimum, dans laquelle l'élément en moindre disponibilité par rapport aux besoins contrôle le taux de croissance (Leonardos et Geider, 2005; Rhee, 1978; Terry, 1980). Il a ainsi longtemps été considéré que ces deux nutriments agissaient de manière indépendante (Arrigo, 2005; Saito et al., 2008).

Depuis les années 90, de fréquentes observations dans le milieu naturel ont pourtant démontré la nécessité d'un enrichissement concomitant en N et P pour obtenir une réponse des populations (Maberly et al., 2002; Seppala et al., 1999), suggérant une synergie entre ces deux nutriments. Certains travaux expérimentaux, sur des cultures contrôlées mono-spécifiques ont également contribué à remettre en question la conception d'indépendance entre les deux nutriments. Par exemple, Davies et Sleep (1989) ont pu montrer que, dans des cultures *Skeletonema costatum* limitées par le N et le P, la fixation du carbone n'était stimulée que par un apport simultané de ces deux éléments et que l'enrichissement par le  $\text{NO}_3$  seul produisait une répression de la croissance. Terry (1982a) a également décelé des interactions fortes entre les processus d'absorption du N et du P. En outre, les travaux de Elrifi et Turpin (1985), notamment, ont mis en lumière une forte différence du comportement des quotas non limitants  $q_N$  et  $q_P$  en limitation par le P et par le N respectivement, révélant des contraintes différentes sur ces deux macro-nutriments. Beaucoup plus récemment, Agren (2004) a émis l'hypothèse que le phosphore mobilisé dans l'ARN ribosomique serait nécessaire à l'assimilation du N dans les protéines, proposant pour la première fois une interaction entre les deux métabolismes. La diversité des observations d'interactions rencontrée dans la littérature soulève encore de nombreuses interrogations sur les mécanismes sous-jacents au processus de co-limitation pour ces deux nutriments.

Ce chapitre présente une nouvelle hypothèse fonctionnelle de co-limitation, selon laquelle les interactions N-P s'opéreraient principalement au niveau de la machinerie d'acquisition,

plutôt que par le biais de l'ARN ribosomique. Les différentes étapes du développement d'un modèle de co-limitation — basé sur le modèle de Droop (1968) — y sont détaillées pas à pas et justifiées. Enfin, dans un troisième temps, les simulations du modèle sont comparées à des jeux de données expérimentales issues de la littérature afin d'obtenir une validation qualitative du pouvoir prédictif du modèle. Ces développements théoriques ont fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Theoretical Biology*, présentée en annexe I.

## 2 Modifications du modèle de Droop

Dans l'ensemble de ce chapitre, le lecteur se référera au tableau 3.1 pour la signification et les unités des différents paramètres ou variables.

Notre modèle s'appuie sur la distinction entre les machineries d'acquisition et d'assem-

Tableau 3.1 – Paramètres et variables du modèle de co-limitation.

Paramètre ou variable	Signification (unité)
$x$	biomasse carbonée ( $\mu\text{mol C L}^{-1}$ )
$\mu_{max}$	taux de croissance maximal ( $\text{j}^{-1}$ )
$\bar{\mu}$	taux de croissance hypothétique, pour un quota infini ( $\text{j}^{-1}$ )
$D$	taux de dilution ( $\text{j}^{-1}$ )
$n_{in}$	concentration du $\text{NO}_3$ dans le milieu de renouvellement ( $\mu\text{mol N L}^{-1}$ )
$p_{in}$	concentration du $\text{PO}_4$ dans le milieu de renouvellement ( $\mu\text{mol P L}^{-1}$ )
$n$	concentration ambiante du $\text{NO}_3$ ( $\mu\text{mol N L}^{-1}$ )
$p$	concentration ambiante du $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{mol P L}^{-1}$ )
$q_N$	quota d'azote ( $\text{mol N mol C}^{-1}$ )
$q_P$	quota de phosphore ( $\text{mol P mol C}^{-1}$ )
$q_{Nexp}$	quota d'azote à $\mu_{max}$ ( $\text{mol N mol C}^{-1}$ )
$q_{Pexp}$	quota de phosphore à $\mu_{max}$ ( $\text{mol P mol C}^{-1}$ )
$q_{N0}$	quota d'azote de subsistance ( $\text{mol N mol C}^{-1}$ )
$q_{P0}$	quota de phosphore de subsistance ( $\text{mol P mol C}^{-1}$ )
$q_{NL}$	quota d'azote maximal hypothétique ( $\text{mol N mol C}^{-1}$ )
$q_{PL}$	quota de phosphore maximal hypothétique ( $\text{mol P mol C}^{-1}$ )
$\rho_N$	taux d'absorption du $\text{NO}_3$ ( $\text{mol N mol C}^{-1} \text{j}^{-1}$ )
$\rho_P$	taux d'absorption du $\text{PO}_4$ ( $\text{mol P mol C}^{-1} \text{j}^{-1}$ )
$\bar{\rho}_{Nmax}$	taux d'absorption maximal hypothétique du $\text{NO}_3$ ( $\text{mol N mol C}^{-1} \text{j}^{-1}$ )
$\bar{\rho}_{Pmax}$	taux d'absorption maximal hypothétique du $\text{PO}_4$ ( $\text{mol P mol C}^{-1} \text{j}^{-1}$ )
$K_{sN}$	constante de demi-saturation pour l'absorption du $\text{NO}_3$ ( $\mu\text{mol N L}^{-1}$ )
$K_{sP}$	constante de demi-saturation pour l'absorption du $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{mol P L}^{-1}$ )

blage, proposée par Klausmeier et al. (2004a). La machinerie d'assemblage, qui peut être réduite à l'ARN ribosomique, est riche en N et en P. Au contraire, la machinerie d'ac-

quisition, qui représente l'ensemble des protéines membranaires de transport est riche en N, mais particulièrement pauvre en P. Malgré sa faible implication quantitative, P joue cependant un rôle majeur dans les processus de transport actif du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$ . Dans une hypothèse globale, nous considérons donc que l'absorption de l'un des nutriments est dépendante à la fois de sa concentration dans le milieu externe et de la valeur des quotas de chacun des nutriments. Nous faisons également l'hypothèse que le taux de croissance dépend de N ou de P. Ces hypothèses aboutissent au modèle générique suivant :

$$\begin{cases} \dot{n} = Dn_{in} - \rho_N(n, q_N, q_P)x - Dn \\ \dot{p} = Dp_{in} - \rho_P(p, q_N, q_P)x - Dp \\ \dot{q}_N = \rho_N(n, q_N, q_P) - \mu(q_N, q_P)q_N \\ \dot{q}_P = \rho_P(p, q_N, q_P) - \mu(q_N, q_P)q_P \\ \dot{x} = \mu(q_N, q_P)x - Dx \end{cases} \quad (3.1)$$

Cette structure générale s'accorde avec de nombreux modèles de la littérature (Davidson et Gurney, 1999; Klausmeier et al., 2004b; Legovic et Cruzado, 1997). Pour décrire le taux d'absorption d'un nutriment, Klausmeier et al. (2004b) propose en outre l'utilisation d'une fonction de Michaelis-Menten

$$\rho_P(p, q_P) = \rho_{Pmax}(q_P) \frac{p}{p + K_{SP}} \text{ et } \rho_N(n, q_N) = \rho_{Nmax}(q_N) \frac{n}{n + K_{SN}} \quad (3.2)$$

où les taux d'absorption maximaux  $\rho_{Pmax}$  et  $\rho_{Nmax}$  (voir équations 3.6 et 3.9) sont inhibés par le quota interne de l'élément correspondant, conformément à la formulation originale de Gotham et Rhee (1981).

Sur la base de ce modèle générique, nous allons maintenant définir la fonction retenue pour le taux de croissance  $\mu$  et les fonctions d'absorption  $\rho_N$  et  $\rho_P$  différant de celles de Klausmeier et al. (2004b) pour représenter l'interaction N-P.

## 2.1 Modélisation du taux de croissance

L'*Hypothèse du Taux de Croissance* ou *Growth Rate Hypothesis* postule que le taux de croissance est relié à la stoechiométrie de la biomasse. La conséquence de cette hypothèse

est que le taux de croissance est fortement corrélé au quota d'ARN ou de ribosomes (Flynn et al., 2010). Puisque le N et le P sont dans un rapport constant dans les acides nucléiques et particulièrement dans l'ARN, nous considérons que la croissance peut être contrainte soit par le N, soit par le P. Cette hypothèse est supportée par les résultats de Berdalet et al. (1994), selon lesquels le quota d'ARN chez *Heterocapsa* sp. est affecté par les carences en N et en P. En accord avec Droop (1973, 1974) et Rhee (1978), nous envisageons que le taux de croissance est sous le contrôle de l'élément le plus limitant, ce qui résulte en une loi du minimum :

$$\mu = \min(\mu_N(q_N), \mu_P(q_P)) \quad (3.3)$$

Par soucis de simplicité, nous retiendrons l'expression suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \min\left(\frac{1 - \frac{q_{N0}}{q_N}}{1 - \frac{q_{N0}}{q_{Nexp}}}, \frac{1 - \frac{q_{P0}}{q_P}}{1 - \frac{q_{P0}}{q_{Pexp}}}\right) \quad (3.4)$$

où les paramètres  $q_{Nexp}$  and  $q_{Pexp}$  représentent les quotas d'azote et de phosphore maximaux, atteints au cours la phase exponentielle de croissance, quand le taux de croissance est à son maximum  $\mu_{\max}$ . En conséquence, pour des cultures limitées par le N ou le P, le taux de croissance à l'équilibre s'écrit pour chacun des cas  $\mu = \mu_{\max} \left(\frac{1 - \frac{q_{N0}}{q_N}}{1 - \frac{q_{N0}}{q_{Nexp}}}\right)$  et  $\mu = \mu_{\max} \left(\frac{1 - \frac{q_{P0}}{q_P}}{1 - \frac{q_{P0}}{q_{Pexp}}}\right)$ . Le taux de croissance est ainsi une fonction croissante de chaque quota de la ressource limitante, en accord avec la théorie de Droop (équation 2.7). Précisons que lorsqu'un des nutriments est présent en excès par rapport aux besoins de la cellule — en ce cas, il n'est pas totalement consommé —, le quota correspondant est appelé *quota saturé*.

## 2.2 Modélisation de l'absorption

La modélisation classique de l'absorption d'un nutriment, proposée par Dugdale (1967), est basée sur une formulation de type Michaelis-Menten :

$$\rho(p, q_P) = \rho_{Pmax}(q_P) \frac{p}{p + K_p} \quad (3.5)$$

Pourtant, il a été démontré que cette formulation, combinée à l'équation de Droop, conduit à de fortes surestimations des taux d'absorption mesurés expérimentalement pour le nutriment non limitant, sous des rapports N:P extrêmes (Gotham et Rhee, 1981; Klausmeier et al., 2004b). Pour palier ce défaut, il est usuel d'utiliser un terme d'inhibition de l'absorption par le quota interne de l'élément correspondant (Morel, 1987). Ceci conduit à une formulation du taux d'absorption légèrement différente (Lehman et al., 1975).

A cette fin, nous introduisons un terme de régulation du taux maximum d'absorption du P par le quota  $q_P$  :

$$\rho_{Pmax}(q_P) = \bar{\rho}_{Pmax} \frac{q_{PL} - q_P}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (3.6)$$

où  $q_{PL}$  est la valeur théorique maximale pour le quota  $q_P$ , et  $\bar{\rho}_{Pmax}$  la valeur maximale du taux d'absorption atteinte lorsque  $q_P = q_{P0}$ . Comme le souligne Flynn (2008), il n'existe pas de raison particulière pour que ce niveau critique  $q_{PL}$  soit égal au maximum du quota du modèle de Droop, et cette remarque est valable pour  $q_{NL}$  également. Il est d'ailleurs notable que les données de Elrifi et Turpin (1985) font état de valeurs de quotas pour un nutriment non limitant qui sont supérieures à la valeur  $q_{exp}$  observée au taux de croissance maximum (équation 2.4). Cette capacité de stockage est à rapprocher du concept de *consommation de luxe*, qui peut être défini comme le rapport des quotas saturé et limitant à un taux de dilution donné. Chez *Selenastrum minutum*, Elrifi et Turpin (1985) rapportent une consommation de luxe correspondant à 16 fois les besoins effectifs en P et seulement 4 fois ceux en N.

Dans des conditions de limitation par l'azote et de disponibilité excessive en P ( $P \gg K_{SP}$ ), l'équation (3.1) donne :

$$\dot{q}_P = \bar{\rho}_{Pmax} \frac{q_{PL} - q_P}{q_{PL} - q_{P0}} - Dq_P \quad (3.7)$$

et il est possible de calculer le quota saturé à l'équilibre :

$$q_P^* = \frac{\bar{\rho}_{Pmax} q_{PL}}{\bar{\rho}_{Pmax} + D(q_{PL} - q_{P0})} \quad (3.8)$$

Il apparaît que le quota saturé  $q_P^*$  est une fonction décroissante du taux de dilution. Selon la théorie de Droop (voir équation 2.7), le quota limitant  $q_N^*$  étant une fonction croissante du taux de dilution, il s'en suit que  $q_P^*$  est une fonction décroissante de  $q_N^*$ . Cette relation

a effectivement été observée par Elrifi et Turpin (1985) (voir figure 3.2).

**Remarque 2 :** Cette conclusion est similaire à celle obtenue à l'aide du modèle de Klausmeier et al. (2004b) pour des situations de disponibilité excessive en P ( $P \gg K_{SP}$ ). Puisque les cinétiques d'absorption de P sont identiques (équation 3.2), l'équation 3.8 est également valable pour le modèle de Klausmeier et al. (2004b) à l'équilibre.

Le cas de l'absorption d'azote est bien différent. Elrifi et Turpin (1985) ont montré que le quota saturé  $q_N$  de cultures limitées par le P s'accroît avec le taux de dilution (figure 3.2). Le raisonnement tenu pour le P aboutirait à une décroissance de  $q_N^*$  avec le taux de dilution  $D$  et n'est donc pas suffisant pour rendre compte des évolutions de  $q_N$  dans ces conditions.

Nous explorons donc un mécanisme additionnel, basé sur l'idée que le transport du  $\text{NO}_3$  est un transport actif, requérant de l'énergie (*i.e.* ATP) et des co-facteurs pourvus par le pool de phosphore (Crawford et Glass, 1998; Forde, 2000). La modélisation de l'absorption du N doit donc tenir compte du fait que des cellules carencées en P possèdent un plus faible quota  $q_P$ , résultant en une moindre activité d'absorption du  $\text{NO}_3$  :

$$\rho_{Nmax}(q_N, q_P) = \bar{\rho}_{Nmax} \frac{q_{NL} - q_N}{q_{NL} - q_{N0}} \frac{q_P - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (3.9)$$

De cette hypothèse, nous pouvons attendre qu'en situation transitoire où le P devient limitant, le faible quota  $q_P$  entraîne une diminution de l'absorption de N et une situation de co-limitation N-P. A l'opposé, lorsque  $q_P$  est élevé, le terme de régulation par le P induit un potentiel d'absorption maximal pour le N. Il est à noter que la régulation de l'absorption du N par  $q_P$  intervient sur le taux maximum d'absorption.

Calculons maintenant le quota saturé  $q_N^*$  en conditions de limitation par le P. A partir de l'équation 3.4, le taux de croissance peut être représenté par le modèle de Droop sous limitation par le phosphore :

$$\mu(q_P) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_{P0}}{q_P}\right) \quad (3.10)$$

A l'équilibre, lorsque le N est apporté en excès (*i.e.*  $N \gg K_{S_N}$ ), nous avons  $\rho_{Nmax}(q_N^*, q_P^*) = \mu(q_P)q_N^*$ , et les équations 3.9 et 3.10 nous permettent d'écrire :

$$\bar{\rho}_{Nmax} \frac{q_{NL} - q_N^*}{q_{NL} - q_{N0}} \frac{q_P^* - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} = \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_{P0}}{q_P^*}\right) q_N^* \quad (3.11)$$

De cette dernière équation, le quota saturé d'azote peut être calculé comme suit :

$$q_N^* = \frac{\bar{\rho}_{Nmax} q_P^*}{\bar{\mu}(q_{NL} - q_{N0})(q_{PL} - q_{P0}) + \bar{\rho}_{Nmax} q_P^*} q_{NL} \quad (3.12)$$

Il apparaît que le quota saturé  $q_N^*$  est une fonction croissante du quota limitant  $q_P^*$ . Or, ce dernier est lui-même une fonction croissante du taux de dilution (équation 2.7). Il s'ensuit donc que le quota saturé  $q_N^*$  est cette fois une fonction croissante du taux de dilution. Il est notable que cette conclusion est opposée à celle établie pour  $q_P^*$  sous limitation par l'azote.

**Remarque 3 :** Si nous considérons l'équation 3.2 dans le cadre du modèle de (Klausmeier et al., 2004b) et en situation d'apport excessif en N ( $N \gg K_{S_N}$ ), nous obtenons :

$$0 = \rho_{Nmax} \frac{q_{NL} - q_N^*}{q_{NL} - q_{N0}} - Dq_N^* \quad (3.13)$$

et  $q_N^* = \frac{\bar{\rho}_{Nmax} q_{NL}}{\bar{\rho}_{Nmax} + D(q_{NL} - q_{N0})}$ . Dans ce modèle, le quota saturé  $q_N^*$  est donc décroissant avec le taux de dilution et cette prédiction est opposée à celle du modèle de co-limitation ici développé.

## 3 Le modèle face à des jeux de données expérimentales

### 3.1 Comparaison qualitative

Les expériences en chimostats de Marchetti et al. (2012) avec *Tisochrysis lutea* sous des rapports N:P extrêmes montrent des comportements contrastés pour les quotas respectifs,

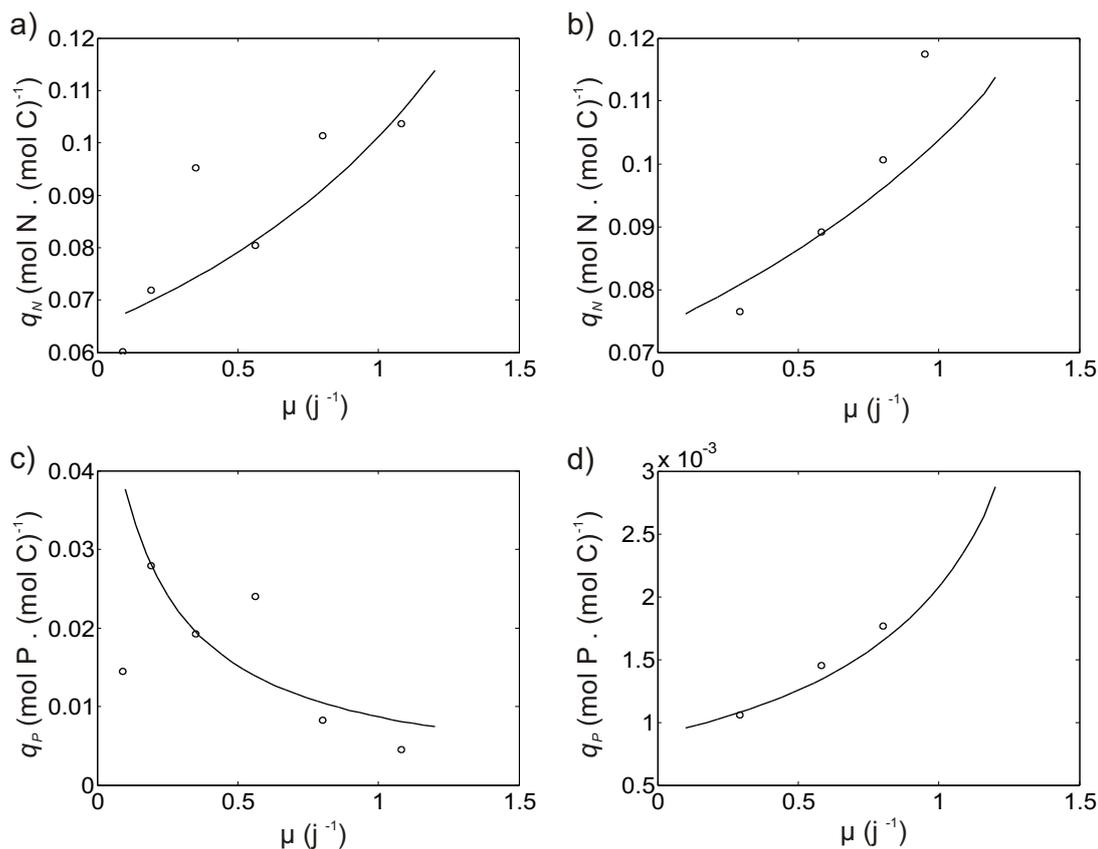


FIGURE 3.1 – Comparaison des prédictions de notre modèle de co-limitation aux données expérimentales de Marchetti et al. (2012) pour *Tisochrysis lutea* à l'équilibre en chémostat. Les graphiques supérieurs montrent les variations de  $q_N$  en fonction de  $\mu$  sous limitation azotée (a) et limitation par le phosphore ( b). Les graphiques inférieurs présentent celles de  $q_P$  en fonction de  $\mu$  sous limitation azotée (c) et limitation par le phosphore (d). Les paramètres utilisés pour le modèle sont donnés dans le tableau 3.2.

selon l'élément limitant (figure 3.1).

Les quotas limitants  $q_N$  et  $q_P$  augmentent avec le taux de croissance, en accord avec la théorie de Droop. Le quota non limitant  $q_P$  est une fonction décroissante du taux de croissance limité par le N et, au contraire, le quota non limitant  $q_N$  s'avère être une fonction croissante du taux de croissance limité par le P. La concentration de l'élément non limitant demeurant toujours détectable dans le milieu de culture, les quotas de ces mêmes éléments représentent les quotas saturés. Ces résultats mettent en valeur une plus forte capacité de consommation de luxe pour le P que pour le N.

Elrifi et Turpin (1985) ont observé chez *Selenastrum minutum* des tendances qualitatives similaires des quotas limitants et non limitants (figure 3.2). Comme dans l'étude précédente,

Elrifi et Turpin soulignent une consommation incomplète de l'élément non limitant, ce qui permet de caractériser les quotas correspondants comme des quotas saturés. Le maximum de  $q_P$  est observé à faible taux de croissance, alors que celui-ci est obtenu pour  $q_N$  à  $\mu_{exp}$  et montre une valeur équivalente à celle de  $q_{Nexp}$ .

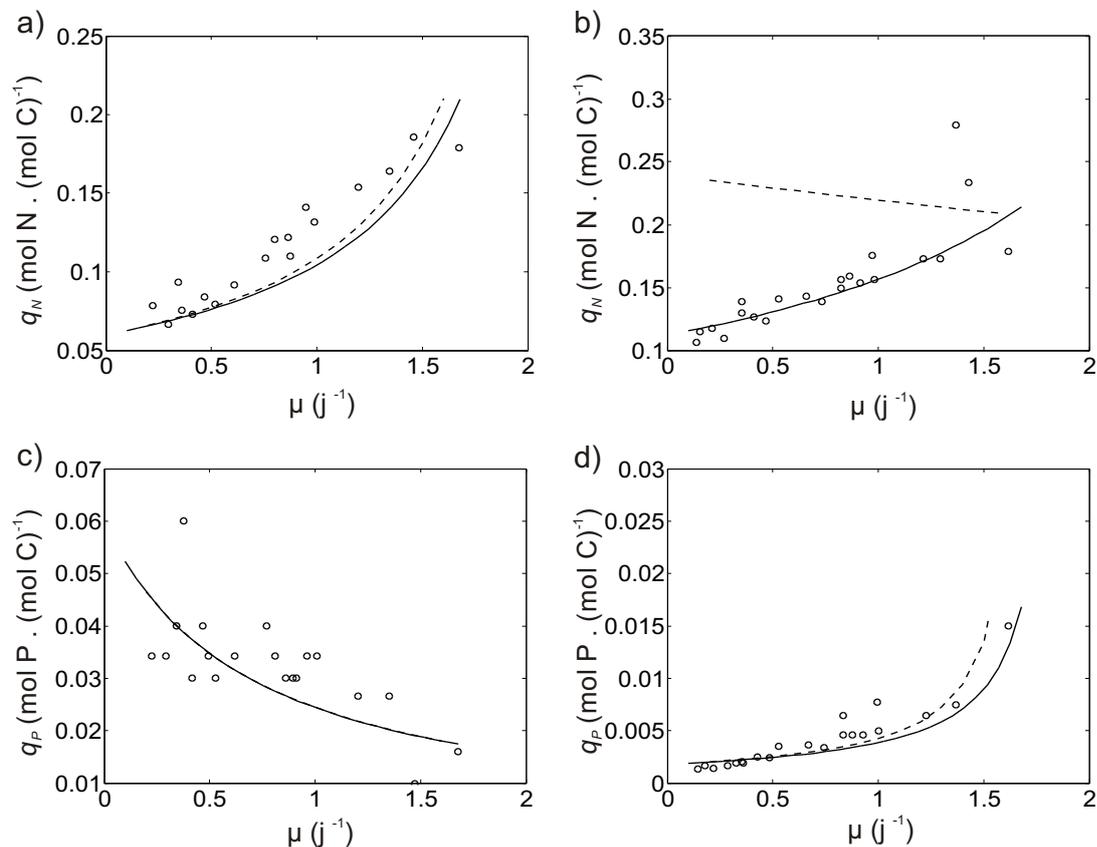


FIGURE 3.2 – Comparaison des prédictions du modèle de co-limitation au modèle de Klausmeier et al. (2004b) modifié. Les données expérimentales présentées proviennent des travaux en chémostat de Elrifi et Turpin (1985) sur *Selenastrum minutum* à l'équilibre. Les graphiques supérieurs montrent les variations de  $q_N$  en fonction de  $\mu$  sous limitation azotée (a) et sous limitation par le phosphore (b). Les graphiques inférieurs présentent celles de  $q_P$  en fonction de  $\mu$  sous limitation azotée (c) et sous limitation par le phosphore (d). Les prédictions du modèle de co-limitation sont représentées par la ligne continue et celles du modèle de Klausmeier et al. (2004b) par la ligne interrompue.

### 3.2 Calibration du modèle

Le paramètre  $\mu_{max}$  du modèle a été identifié en se basant sur les travaux de Elrifi et Turpin (1985) pour *Selenastrum minutum* et à l'aide d'expériences complémentaires pour

*Tisochrysis lutea*.  $q_{N0}$ ,  $q_{P0}$ ,  $\bar{\mu}_N$  et  $\bar{\mu}_P$  ont été identifiés par ajustement du modèle de Droop standard aux données expérimentales.  $\bar{\rho}_N$  et  $\bar{\rho}_P$  sont calculés par le moyen de l'équation suivante :

$$\bar{\rho}_{max} = \frac{\bar{\mu} \cdot \mu_{max}}{\bar{\mu} - \mu_{max}} q_0 \quad (3.14)$$

Enfin,  $q_{Nexp}$  et  $q_{Pexp}$  sont calculés à partir de l'équation 2.4. Les constantes d'affinité  $K_{S_N}$  and  $K_{S_P}$  pour *Selenastrum minutum* sont tirées des travaux de Nielsen (1978) et Ahlgren (1977) respectivement. Pour *Tisochrysis lutea*, la constante  $K_{S_N}$  est issue des travaux de Falkowski (1975). La constante  $K_{S_P}$  a été identifiée par des expériences complémentaires. Les valeurs de  $q_{PL}$ ,  $q_{NL}$ ,  $\bar{\rho}_{Nmax}$  et  $\bar{\rho}_{Pmax}$  proviennent de l'ajustement des sorties du modèle aux mesures expérimentales de  $q_P$  et  $q_N$  à l'équilibre.

### 3.3 Comparaison quantitative

Tableau 3.2 – Valeurs des paramètres utilisés pour le modèle de co-limitation N-P, pour *Selenastrum minutum* et *Tisochrysis lutea*.

Paramètre	Valeur		Unité
	<i>S. minutum</i>	<i>T. lutea</i>	
$\mu_{max}$	1.68	1.5	$\text{j}^{-1}$
$q_{n0}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$6.5 \cdot 10^{-2}$	$\text{mol N molC}^{-1}$
$q_{p0}$	$1.8 \cdot 10^{-3}$	$0.9 \cdot 10^{-3}$	$\text{molP molC}^{-1}$
$q_{NL}$	0.24	0.15	$\text{mol N molC}^{-1}$
$q_{PL}$	0.06	0.06	$\text{molP molC}^{-1}$
$q_{Nexp}$	0.21	0.14	$\text{mol N molC}^{-1}$
$q_{Pexp}$	0.015	0.006	$\text{molP molC}^{-1}$
$\bar{\rho}_{Nmax}$	9.6	9.6	$\text{mol N molC}^{-1} \text{j}^{-1}$
$\bar{\rho}_{Pmax}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$\text{molP molC}^{-1} \text{j}^{-1}$
$K_{S_N}$	0.05	0.1	$\mu\text{mol N L}^{-1}$
$K_{S_P}$	0.025	0.05	$\mu\text{molP L}^{-1}$

Les simulations du modèle sont comparées aux données expérimentales des quotas limitants et saturés pour *Tisochrysis lutea* et *Selenastrum minutum* (Elrifi et Turpin, 1985). Les figures 3.1 et 3.2 montrent que la calibration du modèle adoptée (tableau 3.2) lui permet de reproduire correctement les données expérimentales pour les deux espèces. Les simulations à l'équilibre reproduisent les tendances croissantes des quotas limitants  $q_N$  et  $q_P$  en fonction du taux de croissance et la forte asymétrie entre les quotas saturés  $q_N$  et

$q_P$ .

Le modèle de Klausmeier et al. (2004b), modifié pour y introduire la formulation d'inhibition de l'absorption proposée par Gotham et Rhee (1981), a également été ajusté à ces mêmes jeux de données. La figure 3.2 met en évidence que, si ce modèle décrit correctement les tendances croissantes des quotas limitants et du quota  $q_P$  saturé, il est incapable de reproduire la tendance croissante des données expérimentales du quota  $q_N$  saturé. Cette conclusion avait été anticipée dans la Remarque 3.

## 4 Discussion

### 4.1 Asymétrie entre les absorptions de N et P

Les limitations multiples par les nutriments ont récemment connu un regain d'intérêt. Dans le cas de N et de P, l'asymétrie de comportement des quotas non limitants  $q_N$  et  $q_P$ , respectivement limités par le P et par le N, a pu être mise en évidence expérimentalement. Une asymétrie supplémentaire existe pour  $q_P$  entre les conditions de limitation par le N et par le P, alors que  $q_N$  conserve la même tendance en fonction de  $\mu$ , quelle que soit la limitation.

La plupart des modèles de croissance du phytoplancton (Droop, 1974; Klausmeier et al., 2004b; Smith et Yamanaka, 2007) présentent une formulation symétrique et ne peuvent donc rendre compte de l'asymétrie observée. Ce constat est particulièrement clair lorsque le modèle de Klausmeier et al. (2004b) est confronté aux données de Elrifi et Turpin (1985). Notre modèle de co-limitation est basé sur l'idée — également développée par d'autres (Agren, 2004; Davidson et Gurney, 1999; Pahlow et Oschlies, 2009) — qu'un nutriment non limitant peut contrôler le niveau de limitation imposé par un autre nutriment. La structure asymétrique et la simplicité de formulation de ce modèle lui permettent de décrire qualitativement et quantitativement les données expérimentales observées chez *Selenastrum minutum* et *Tisochrysis lutea*. En outre, la structure proposée n'engendre pas de discontinuité et ne requiert pas un nombre important de paramètres supplémentaires. Ainsi, en accord avec Pahlow et Oschlies (2009), et contrairement à l'hypothèse généralement admise que le P et le N conduisent à des limitations indépendantes, notre étude

montre que ces deux nutriments devraient être considérés comme des nutriments biochimiquement dépendants, pour reprendre la terminologie de Arrigo (2005) et de Saito et al. (2008).

## 4.2 Prédications du modèle aux limites physiologiques des quotas

Dans un chémostat, le quota cellulaire d'un nutriment peut varier entre deux limites physiologiques qui dépendent du taux de croissance : si ce nutriment est limitant, son quota cellulaire sera à un niveau minimal ; au contraire, si ce nutriment est apporté en excès par rapport aux besoins et qu'un autre nutriment contrôle la croissance, alors le premier sera accumulé en excès et son quota connaîtra une valeur maximale. Ces valeurs extrêmes du quota d'un nutriment à un taux de croissance donné caractérisent ce que Elrifi et Turpin (1985) définissent comme les *limites physiologiques*. Puisque  $\rho = \mu \cdot q$  à l'équilibre, la *consommation de luxe*, à un taux de croissance donné est égale au rapport entre les quotas maximal et minimal.

Dans les conditions de rapports N:P extrêmes testés chez *Selenastrum minutum* et *Tisochrysis lutea*, la présence de concentrations résiduelles de l'élément non limitant nous a conduits à considérer son quota saturé, au contraire de l'élément limitant qui connaît une valeur de quota minimum. Ces observations permettent de conclure que les limites physiologiques y sont atteintes.

Sous les très faibles rapports N:P, le modèle reproduit les données et montre, pour le quota saturé  $q_P$ , une tendance décroissante en fonction du taux de croissance limité par le  $\text{NO}_3$ . Au contraire, les données expérimentales du quota saturé  $q_N$  sous limitation par le  $\text{PO}_4$  révèlent une tendance croissante en fonction du taux de croissance chez *Selenastrum minutum* et *Tisochrysis lutea*. Le comportement du quota saturé  $q_N$  est donc conforme à l'hypothèse de Droop (1983), selon laquelle le quota d'un élément non limitant suit l'équation de Droop avec une valeur de subsistance ( $q_{N0}$ ) supérieure à celle observée lorsque cet élément limite la croissance.

Comme l'a montré notre analyse, le modèle de Klausmeier et al. (2004b) modifié pour intégrer seulement la régulation de l'absorption par le quota interne de l'élément, prédit une

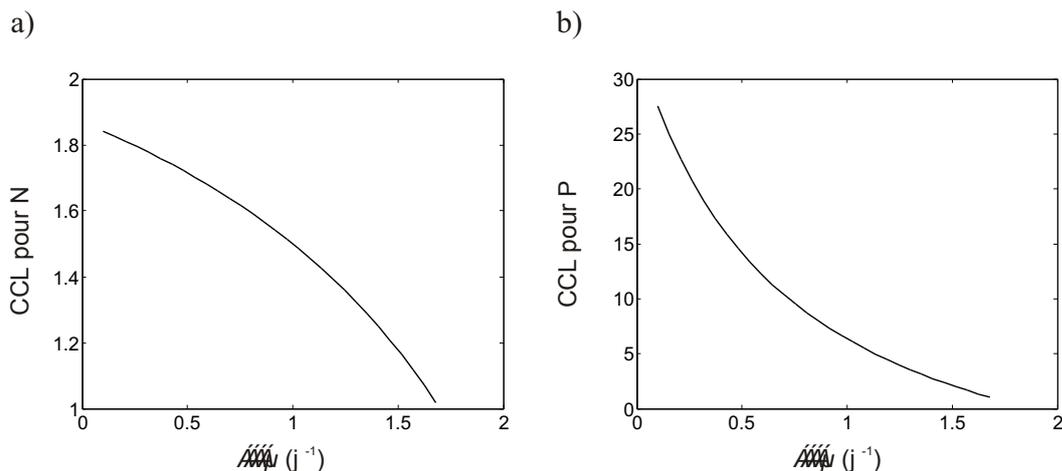


FIGURE 3.3 – Simulations du modèle de co-limitation pour la capacité de consommation de luxe (CCL) du  $\text{NO}_3$  (a) et du  $\text{PO}_4$  (b) en fonction du taux de croissance, et pour des rapports respectifs d’enrichissement N:P extrêmes (*i.e.* 100 et 1).

décroissance du quota saturé  $q_N$  avec le taux de croissance, de la même manière que pour  $q_P$  (voir l’équation 3.8). Ainsi l’effet limitant de  $q_P$  sur l’absorption du  $\text{NO}_3$  est-il nécessaire pour reproduire l’asymétrie de comportement aux limites physiologiques (équation 3.12). Les fonctions asymétriques pour le N (structurel) et le P (fonctionnel), et particulièrement le rôle énergétique du P au niveau de la machinerie d’acquisition, sont ainsi de la première importance dans notre approche.

Le processus de consommation de luxe de nutriments inorganiques par le phytoplancton a été bien étudié (Droop, 1974; Ketchum, 1939). La figure 3.3 met en évidence la diminution de la capacité de consommation de luxe pour le N et le P avec le taux de croissance. Le modèle décrit une plus faible capacité pour l’azote que pour le phosphore et ce résultat est en accord avec les observations de Elrifi et Turpin (1985) et Terry (1982a).

### 4.3 Prédications du modèle dans l’intervalle des limites physiologiques

Dans les cas où le ratio N:P est plus proche du rapport critique de chaque espèce, le comportement du quota non limitant peut être différent, dans la mesure où il n’atteint pas la saturation. En effet, la structure asymétrique du modèle entraîne des comportements

asymétriques des quotas  $q_N$  et  $q_P$ , ainsi que des contrôles de l'absorption différents selon le type de limitation et le taux de croissance considéré.

$q_P$  varie en accord avec les prédictions de Klausmeier et al. (2004b) : lorsque la croissance est limitée par le P ou pour des rapports N:P proches du rapport critique, le contrôle de l'absorption est exercé uniquement par la faible disponibilité de la ressource  $\text{PO}_4$  (*i.e.*  $P/(P + K_p) < 1$ ) et  $q_P$  évolue selon les prédictions du modèle de Droop (voir figure 3.4b, pour N:P=10-100).

Au contraire, sous limitation par le N, le modèle prédit que  $q_P$  peut croître ou décroître

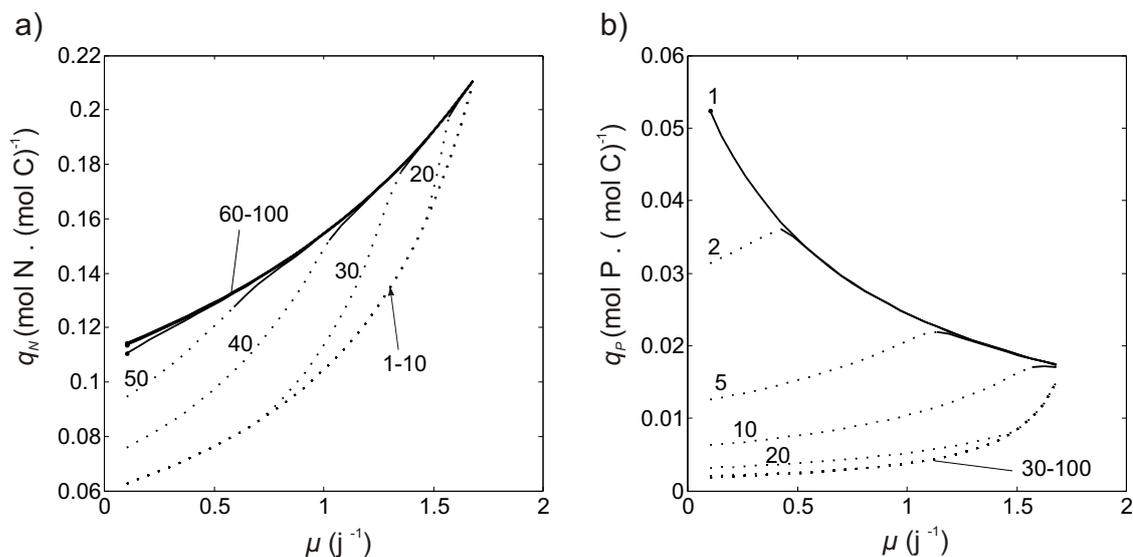


FIGURE 3.4 – Prédiction du modèle pour les quotas  $q_N$  (a) et  $q_P$  (b) à l'équilibre, en fonction du taux de croissance pour des rapports d'enrichissement N:P variant de 1 à 100. Les nombres indiquent les valeurs du rapport d'enrichissement N:P. Les lignes pointillées représentent les situations où l'absorption est limitée par le substrat ( $S/(S + K_S) < 0.9$ ) et les lignes continues les situations où la capacité d'absorption est limitante.

avec le taux de croissance selon la valeur de ce dernier et le rapport N:P imposé au chémostat. Tant que  $q_P$  n'est pas saturé, le contrôle de l'absorption n'est exercé que par la disponibilité du  $\text{PO}_4$ .  $q_P$  augmente ainsi avec le taux de croissance sous l'effet d'une disponibilité croissante du  $\text{PO}_4$  (*i.e.*  $P/(P + K_p) < 1$ ). Des taux de croissance supérieurs peuvent cependant aboutir à des situations où la capacité d'absorption du  $\text{PO}_4$  devient limitante, et  $q_P$  décroît alors avec le taux de croissance, pour converger vers la valeur  $q_{Pexp}$  (voir figure 3.4b, pour N:P= 2).

Dans l'intervalle des limites physiologiques, le contrôle de l'absorption du  $\text{NO}_3$  sous limita-

tion par le P est plus complexe en raison de l'interaction N-P : à faible taux de croissance, l'absorption du  $\text{NO}_3$  est fortement contrainte à la fois par la faible disponibilité en  $\text{NO}_3$  (*i.e.*  $N/(N + K_n) < 1$ ) et le faible niveau du pool d'ATP qui limite l'activité des transporteurs (figure 3.4a). Pour des taux de croissance supérieurs, la disponibilité du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$  s'accroissant,  $q_P$  augmente progressivement, stimule l'absorption du  $\text{NO}_3$  et conduit à une augmentation de  $q_N$ . Dans le cadre des interactions N-P, les bases mécanistes de notre modèle contrastent ainsi fortement avec l'hypothèse de Klausmeier et al. (2004a) selon laquelle la limitation par le P favoriserait l'absorption des autres nutriments.

Plusieurs autres jeux de données de la littérature présentent des variations de  $q_N$  et  $q_P$  en fonction du taux de croissance sous un rapport N:P variable. Néanmoins, ceux-ci sont rarement aussi exhaustifs ou ne considèrent pas des rapports N:P aussi extrêmes que l'étude de Elrifi et Turpin (1985). Il semble en effet que seules les travaux de Elrifi et Turpin (1985) et Rhee (1974) puissent fournir les preuves que les limites physiologiques y étaient effectivement atteintes.

Au cours de ses travaux sur les interactions entre l'éclairement et les nutriments chez *Synechococcus linearis*, Healey (1985) a testé une relativement large gamme de variation du rapport N:P. Les données montrent une tendance croissante des quotas limitants  $q_N$  et  $q_P$  avec le taux de croissance. Le quota non limitant  $q_N$  présente cette même tendance, avec un quota de subsistance  $q_{N0}$  légèrement supérieur, comme le prédit notre modèle et comme observé par Elrifi et Turpin (1985), mais pas par d'autres Laws et Bannister (1980). Néanmoins, en raison du bruit sur les données, le quota non limitant  $q_P$  de *Synechococcus linearis* ne montre pas de tendance particulière dans la gamme des taux de croissance testée.

Goldman et Peavey (1979) ont démontré chez *Dunaliella tertiolecta* que les quotas limitant  $q_N$  et non limitant  $q_P$  augmentent avec le taux de croissance pour des rapports N:P d'enrichissement des chémostats compris entre 5 et 15. Cependant, ces auteurs précisent qu'une grande part du  $\text{PO}_4$  disponible dans le milieu a été épuisée pour toutes les valeurs de  $\mu$  inférieures à  $1,1\text{ j}^{-1}$ . Il est donc envisageable que les limites physiologiques n'aient pas été atteintes dans ces conditions, et que  $q_P$  n'ait pas été saturé, même sous les plus

faibles rapports N:P testés. Par ailleurs, des calculs basés sur les données de Healey (1985) semblent indiquer une disponibilité résiduelle du  $\text{PO}_4$  sous limitation par le N. Healey ne fournit cependant pas de preuve directe de la saturation de  $q_P$ .

De manière intéressante, le modèle prédit des modifications importantes du comportement de  $q_P$  à proximité des limites physiologiques, même pour une faible augmentation du rapport N:P d'enrichissement dans la gamme 1 à 10. Les relativement faibles valeurs de ce rapport, testées par Goldman et Peavey (1979) (N:P = 5) et Healey (1985) (N:P = 2,5) pourraient expliquer pourquoi ces auteurs n'ont pas observé la décroissance typique du quota saturé  $q_P$  aux limites physiologiques. La figure 3.4b montre clairement que pour des rapports d'enrichissement compris entre 2 et 5,  $q_P$  augmente pour les faibles taux de croissance, alors qu'il décroît pour les taux de croissance supérieurs.

Enfin, dans son étude de l'absorption du  $\text{PO}_4$  sous limitation par le N, chez *Scenedesmus*.sp en chémostat, Rhee (1974) a testé des rapports d'enrichissement aussi faibles que 1:1. Malheureusement, en raison du bruit sur les données et parce que les quotas sont référencés à la cellule plutôt qu'au carbone particulaire, il est délicat de conclure si ces données supportent la tendance décroissante prédite par notre modèle pour le quota saturé  $q_P$ .

Notre modèle de co-limitation décrit une caractéristique importante pour  $q_P$ . En effet, contrairement à  $q_N$ ,  $q_P$  est très sensible au rapport d'enrichissement N:P. D'une part, une légère augmentation d'un rapport d'enrichissement très faible conduit à une forte sensibilité de  $q_P$  au taux de croissance. D'autre part,  $q_P$  demeure insensible au taux de croissance pour des rapports d'enrichissement proches du rapport critique, mais imposant une limitation par l'azote. Ce résultat possède de fortes implications pour les expériences visant à étudier l'effet de la co-limitation N-P, lesquelles devraient assurer que les limites physiologiques sont effectivement atteintes.

La figure 3.5 présente les simulations pour les variations de  $q_N:q_P$  en fonction du taux de croissance pour différents rapports d'enrichissement variant de 1 à 100. A faible taux de croissance,  $q_N:q_P$  reflète le rapport d'enrichissement tant que celui-ci demeure compris dans les limites physiologiques et qu'aucun des deux nutriments n'est limitant. L'augmentation du taux de croissance entraîne des modifications de  $q_N:q_P$  sous l'effet des limites physiologiques des quotas, comme décrit auparavant dans le cas de rapports d'enrichisse-

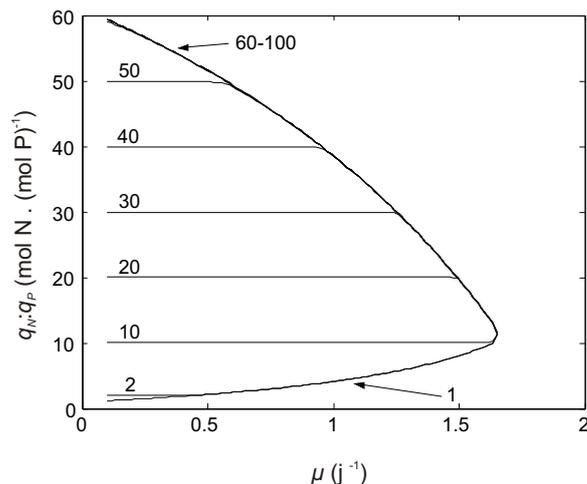


FIGURE 3.5 – Prédications du modèle de co-limitation pour le rapport  $q_N:q_P$  en fonction du taux de croissance et sous des rapports d'enrichissement variant entre 1 et 100. Les nombres indiquent les valeurs du rapport d'enrichissement.

ment extrêmes.

## 5 Conclusion

De nombreux indices présents dans la littérature nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'une interaction majeure entre le N et le P au niveau de la machinerie d'acquisition, en différenciant les rôles structurel et fonctionnel des nutriments N et P, respectivement : l'absorption active d'azote serait ainsi stimulée par un niveau énergétique cellulaire élevé, lui-même potentiellement contrôlé par le quota  $q_P$ .

Notre modèle possède les propriétés nécessaires pour reproduire qualitativement et quantitativement les comportements caractéristiques d'une co-limitation par le N et le P, tels que rapportés dans la littérature. Parmi ceux-ci, la différence de réponse des quotas  $q_N$  et  $q_P$  en fonction des conditions de limitation apparaît comme une propriété fondamentale de ce modèle.

Notre analyse a fait ressortir la forte sensibilité de  $q_P$  aux conditions de croissance, notamment au rapport d'enrichissement N:P et au taux de croissance, au voisinage des limites physiologiques. Ce résultat souligne l'importance du choix et de la maîtrise des rapports d'enrichissement extrêmes dans la conduite d'expérimentations sous limitation par le P.

Notre modèle de co-limitation fournit désormais un cadre théorique et prédictif, qui permet d'élaborer les protocoles expérimentaux les plus aptes à vérifier le processus de co-limitation supposé.



# Chapitre 4

## Paramétrisation du modèle de co-limitation par des expériences

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction . . . . .</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b>Résultats . . . . .</b>	<b>96</b>
2.1	Cultures . . . . .	96
2.2	Absorption du $\text{NO}_3$ et du $\text{PO}_4$ . . . . .	101
2.3	ATP . . . . .	102
2.4	Bilan de fractionnement par oxydation humide . . . . .	104
2.5	Calibration du modèle . . . . .	105
<b>3</b>	<b>Discussion . . . . .</b>	<b>106</b>
3.1	Comportement biologique des cultures . . . . .	106
3.2	Prédictions du modèle . . . . .	111
	Fraction particulaire . . . . .	111
	Fraction dissoute . . . . .	112
3.3	Enseignements sur la co-limitation N-P . . . . .	112
<b>4</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>113</b>

---

## 1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons formalisé une hypothèse fonctionnelle de co-limitation N-P au sein d'un modèle qui parvient à décrire les tendances observées sur des jeux de données indépendants issus de la littérature. L'objet de ce chapitre est d'exposer les résultats d'expériences conduites spécifiquement dans le but d'estimer les paramètres nécessaires à sa calibration. Nous avons pour cela utilisé des cultures en batch limitées soit par le N, soit par le P. Ce type d'expériences constitue également un terrain de choix pour observer les interactions entre l'azote et le phosphore et la différence de réponse des quotas  $q_N$  et  $q_P$ . Enfin, une attention particulière a été portée aux évolutions du quota  $q_{ATP}$  pour consolider l'hypothèse du rôle central qu'il joue dans le processus de co-limitation proposé.

## 2 Résultats

### 2.1 Cultures

D'une manière générale, les deux expériences successives, qui utilisent le même protocole de batchs limités par le N et par le P, ont produit des résultats comparables. L'acclimatation des inocula aux conditions de limitation ultérieures, conjuguée à des apports d'éléments limitants appropriés a permis de contraindre le développement de la biomasse dans les deux types de cultures à des niveaux similaires. En phase stationnaire, la biomasse carbonée maximale atteinte dans l'expérience 1 est de l'ordre de  $3000 \mu\text{molC L}^{-1}$  dans la culture limitée par le N et de  $4300 \mu\text{molC L}^{-1}$  dans la culture limitée par le P (figures 4.2 a et 4.3 a). Le taux de croissance maximal de la culture limitée par le N est légèrement supérieur ( $\mu_{max}=1,1 \text{ j}^{-1}$ ) à celui de la culture limitée par le P ( $\mu_{max}=1,0 \text{ j}^{-1}$ ).

Au cours de l'expérience 2, les cultures connaissent un développement analogue, bien que la biomasse atteinte en phase stationnaire dans la culture limitée par le P ( $5000 \mu\text{molC L}^{-1}$ ) soit sensiblement supérieure. Les taux de croissance maximaux sont du même ordre de grandeur que ceux observés dans la première expérience, avec, pour la culture limitée par

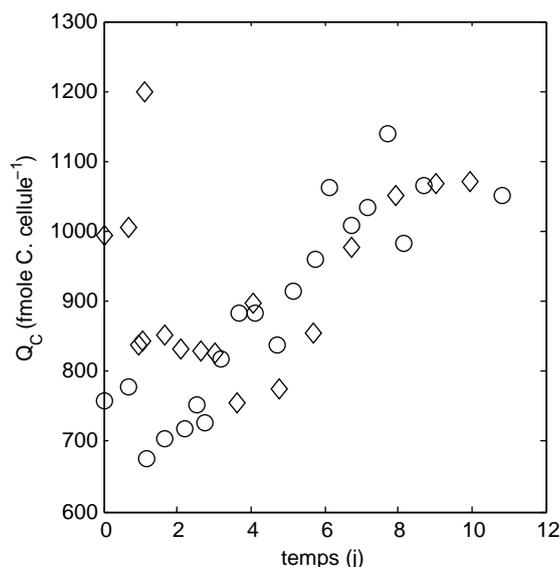


FIGURE 4.1 – Évolution du quota cellulaire en carbone  $Q_C$  dans les cultures limitées par le N (○) et par le P (◇) au cours de l'expérience 1.

le N,  $\mu_{max}=1,3j^{-1}$  et, pour la culture limitée par le P,  $\mu_{max}=1,2j^{-1}$ . Les phases stationnaires sont établies au bout de 5 à 6 jours.

Au cours de l'expérience 1, le quota en carbone des cellules ( $Q_C$ ) passe par un minimum, compris entre 700 et 800 fmolC cell<sup>-1</sup>, pendant la phase exponentielle puis augmente progressivement au cours de la limitation pour atteindre un maximum de l'ordre de 1050 fmolC cell<sup>-1</sup> en phase stationnaire (figure 4.1), ce qui indique de variations du volume cellulaire. A ce stade, il n'apparaît pas de différence sensible de quota cellulaire de carbone selon l'élément limitant la croissance.

La concentration en éléments limitants décroît rapidement pour atteindre des valeurs indétectables, au bout de 2,5j pour  $NO_3$  dans les cultures limitées par le N (figure 4.2 b) et de 1j pour  $PO_4$  dans les cultures limitées par le P (figure 4.3 f). En revanche, l'élément non limitant demeure disponible pendant toute la période de croissance de la population. Dans la culture limitée par le N,  $PO_4$  persiste à des concentrations supérieures à 80  $\mu\text{molP L}^{-1}$  jusqu'à la fin de la culture (figure 4.2 f).  $NO_3$  suit une cinétique plus complexe dans la culture limitée par le P (figure 4.3 b), avec des concentrations encore importantes ( $> 50 \mu\text{molN L}^{-1}$ ) au début de la phase stationnaire. Il convient de remarquer que, contre toute attente, la diminution de  $NO_3$  se poursuit au cours de la phase stationnaire, jusqu'à

sa complète disparition en fin de culture dans l'expérience 1. Une tendance similaire est observée au cours de l'expérience 2, mais avec une décroissance plus lente, de sorte que le  $\text{NO}_3$  n'est pas totalement épuisé en fin d'expérience.

Si la totalité de l'élément limitant est rapidement assimilé dans le compartiment microalgal — sur une période voisine de un à deux jours — (figure 4.2 d et figure 4.3 h), l'élément non limitant ne l'est que progressivement. Ceci est particulièrement visible dans le cas des cultures limitées par le N, où le P particulaire augmente régulièrement jusqu'en fin de culture (figure 4.2h). Dans les cultures limitées par le P, l'azote est accumulé dans le compartiment particulaire microalgal au cours de la croissance. Il est particulièrement visible sur les données de l'expérience 1 que le  $\text{NO}_3$  cesse d'être absorbé dès que la phase stationnaire est atteinte (figure 4.3d). De ce point de vue, l'augmentation du N dans la phase particulaire contraste avec la disparition de  $\text{NO}_3$  dans la culture.

Les dynamiques d'accumulation des éléments dans la phase particulaire se traduisent par l'évolution des quotas correspondants rapportés au carbone (figure 4.2 c et g ; figure 4.3 c et g). Lors de la phase de croissance exponentielle, le quota en azote atteint des valeurs maximales  $q_{Nexp}$  très similaires et stables sous les deux types de limitations, comprises entre 0,131 et 0,144 mol N mol C<sup>-1</sup> (tableau 4.1). Les quotas exponentiels de phosphore  $q_{Pexp}$  s'avèrent également comparables, bien que légèrement plus élevés dans l'expérience 2 et montrent des valeurs comprises entre 0,0108 et 0,0156 mol P mol C<sup>-1</sup>.

Si les quotas atteints en phase de croissance exponentielle ne sont pas sensiblement différents entre les deux types de limitations, en revanche, les quotas minimaux mesurés en phase stationnaire sont significativement plus faibles lorsque l'élément considéré est limitant. Ce constat est d'autant plus marqué pour le quota  $q_P$  : alors que  $q_{N0}$  varie seulement d'un facteur inférieur à 2 entre les deux conditions de limitations,  $q_{P0}$  s'avère 8 fois inférieur lorsque P limite la croissance. Il est à noter que dans les cultures limitées par le N,  $q_P$  connaît des dynamiques particulières par rapport aux cinétiques plus comparables des autres quotas, avec un léger déclin pendant la phase de croissance, auquel succède un accroissement pendant la phase stationnaire.

Selon la limitation imposée, les quotas  $q_N$  et  $q_P$  présentent des réponses relatives

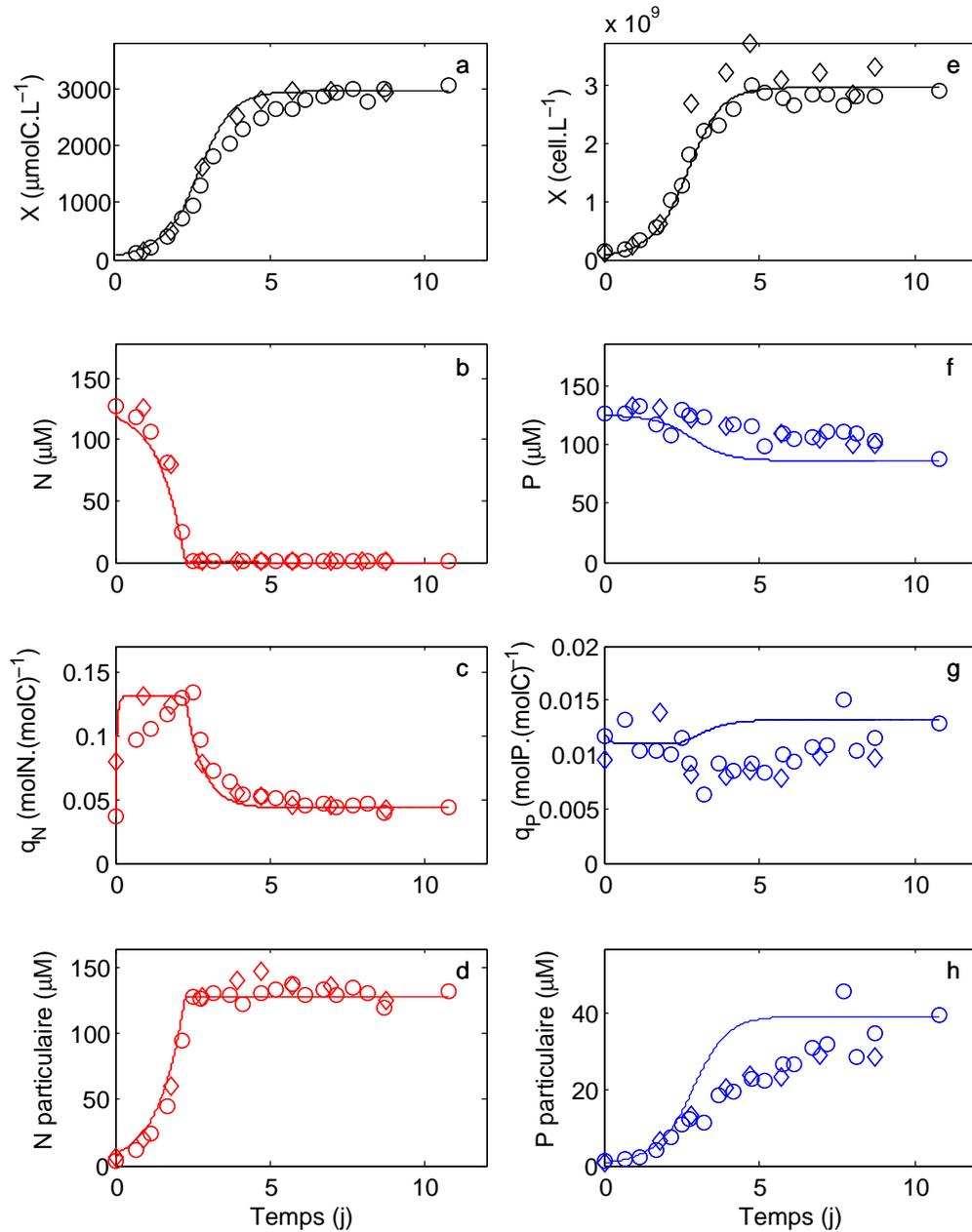


FIGURE 4.2 – Évolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le N des expériences 1 (○) et 2 (◇). La ligne continue représente la prédiction du modèle. (a) carbone particulaire; (b) N résiduel; (c)  $q_N$ ; (d) N particulaire; (e) concentration cellulaire; (f) P résiduel; (g)  $q_P$ ; (h) P particulaire.

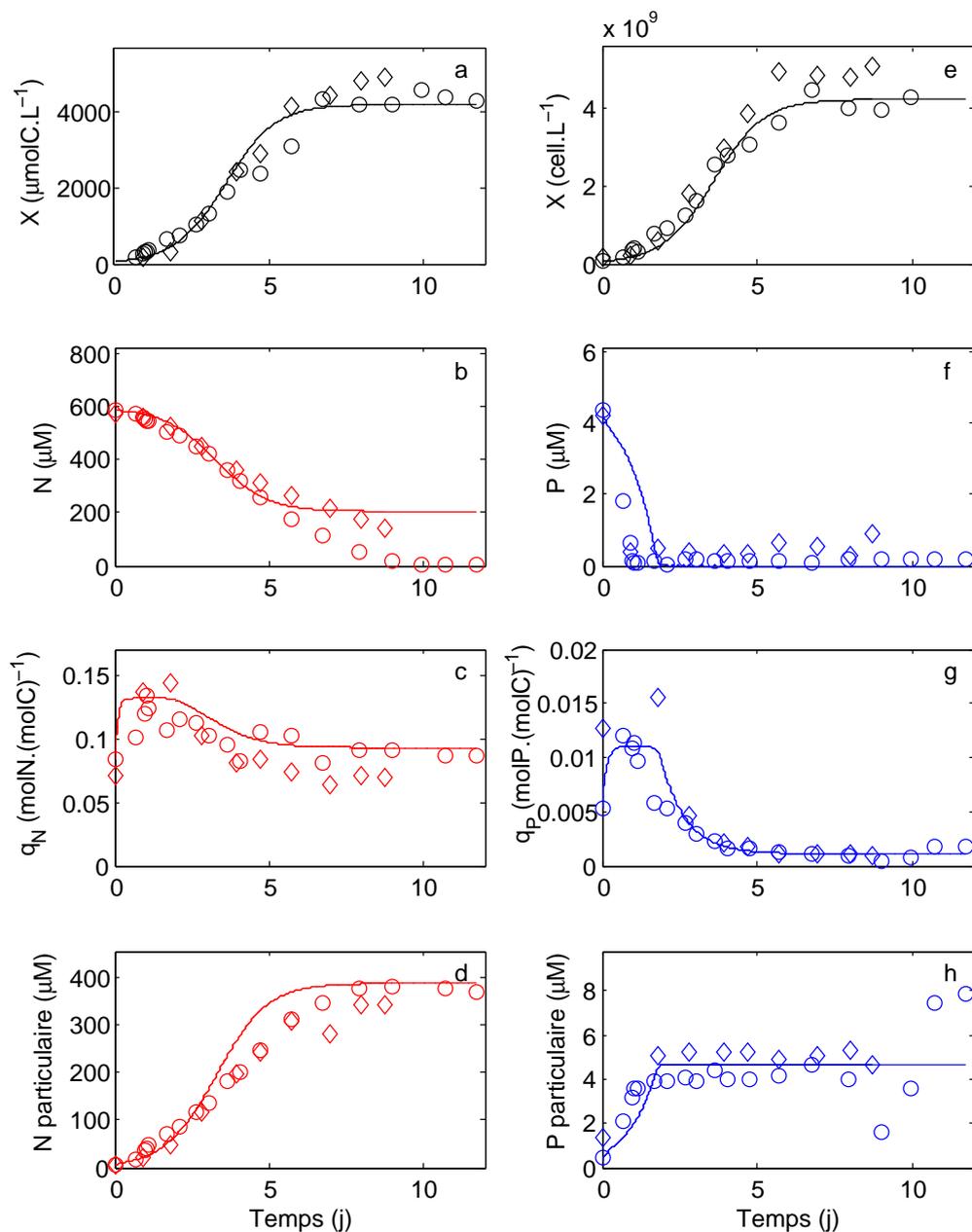


FIGURE 4.3 – Évolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le P des expériences 1 (○) et 2 (◇). La ligne continue représente la simulation du modèle de co-limitation. (a) carbone particulaire; (b) N résiduel; (c)  $q_N$ ; (d) N particulaire; (e) concentration cellulaire; (f) P résiduel; (g)  $q_P$ ; (h) P particulaire.

Tableau 4.1 – Valeurs minimales ( $q_{N0}$  et  $q_{P0}$ ) et maximales ( $q_{Nexp}$  et  $q_{Pexp}$ ) des quotas N et P, mesurées au cours des expériences 1 et 2. Les valeurs sont exprimées en mol molC<sup>-1</sup>. N-lim : culture limitée par le N ; P-lim : culture limitée par le P.

	Expérience 1		Expérience 2	
	N-lim	P-lim	N-lim	P-lim
$q_{N0}^a$	0,043 (0,002)	0,086 (0,004)	0,044 (0,002)	0,070 (0,004)
$q_{P0}^a$	0,0088 (0,0004)	0,0013 (0,0007)	0,0086 (0,0009)	0,0011 (0,0001)
$q_{Nexp}^b$	0,131 (-)	0,132 (-)	0,131 (-)	0,144 (-)
$q_{Pexp}^b$	0,0108 (-)	0,0113 (-)	0,0138 (-)	0,0156 (-)

a. Les données représentent la moyenne et l'écart-type calculés sur un minimum de trois valeurs.

b. Les valeurs correspondent à des données uniques.

contrastées, illustrées par la figure 4.4 qui présente les données de l'expérience 1. En situation de limitation par le P, le quota non limitant  $q_N$  décroît avec  $q_P$  selon une pente d'autant plus forte que la limitation s'accroît. Au contraire, dans les cultures limitées par le N, le quota non limitant  $q_P$  est peu sensible aux variations du quota limitant  $q_N$ . Ces évolutions se traduisent par une faible décroissance de  $q_P$  pendant la phase de croissance de la culture, suivie d'une augmentation lorsque la carence par le N s'installe.

## 2.2 Absorption du NO<sub>3</sub> et du PO<sub>4</sub>

Au cours de l'expérience 1 et lors de leur phase de disparition ultime, le suivi à haute fréquence des concentrations résiduelles d'éléments limitants, a permis d'acquérir les paramètres cinétiques d'absorption de NO<sub>3</sub> et de PO<sub>4</sub> par *Tisochrysis lutea*, par ajustement de la fonction de Michaelis-Menten.

L'absorption de NO<sub>3</sub> sature pour des concentrations supérieures à 20 μmol N L<sup>-1</sup> (figure 4.5 a), avec une valeur maximale de 0,163 mol N molC<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et une constante de demi-saturation de 1,3 μmol N L<sup>-1</sup> (tableau 4.2). Bien que les faibles concentrations de PO<sub>4</sub> utilisées dans l'expérience n'aient pas permis d'atteindre le niveau de saturation de l'absorption du PO<sub>4</sub>, un ajustement de l'équation de Michaelis-Menten (figure 4.5 b) prédit un taux d'absorption maximal de 0,044 molP molC<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, et une constante de demi-saturation  $K_m$  de 0,14 μmolP L<sup>-1</sup>, plus faible d'un ordre de grandeur que celle obtenue pour le NO<sub>3</sub> (ta-

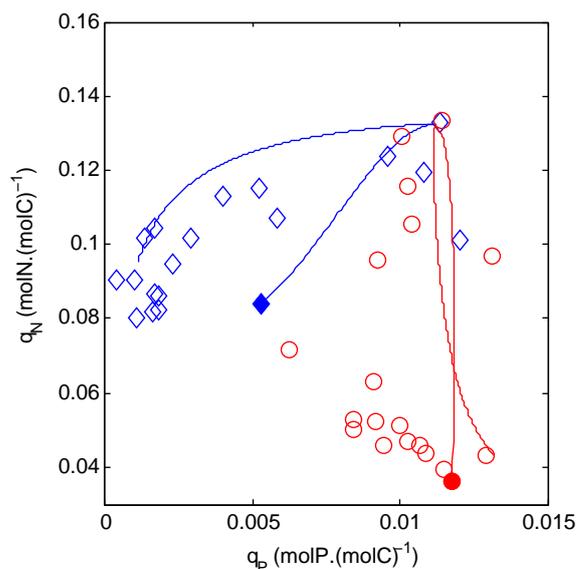


FIGURE 4.4 – Évolutions relatives de  $q_N$  et  $q_P$  au cours des cultures de l'expérience 1, limitées par le N (○) et par le P (◇). La ligne continue représente la simulation du modèle pour les cultures limitées par le N (rouge) et le P (bleu). Les marqueurs pleins signalent les données de début de culture et les flèches indiquent l'évolution temporelle.

bleau 4.2).

## 2.3 ATP

La mesure de  $q_{ATP}$  dans les cultures en batch de l'expérience 2, révèle des évolutions qualitativement comparables sous les deux types de limitations (figure 4.6 a) :  $q_{ATP}$  semble connaître un maximum précédant celui du taux de croissance, et est positivement corrélé au taux de croissance limité. Un phénomène d'hystérésis marqué est observé selon que le taux de croissance augmente ou diminue. Lorsque les cellules deviennent limitées par le P,  $q_{ATP}$  atteint des niveaux plus faibles que ceux obtenus avec une limitation par le N. Pour les taux de croissance les plus faibles ( $\leq 0,5 \text{ j}^{-1}$ ), le  $q_{ATP}$  moyen mesuré en carence  $\text{NO}_3$  est de  $0,62 \times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$ , alors qu'il ne représente plus que  $0,14 \times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$  en carence  $\text{PO}_4$ , ce qui correspond à une réduction de  $q_{ATP}$  d'un facteur 4 dans cette dernière condition.

La disponibilité de l'ATP pour la fixation de C ( $A_{ATP}$ ), présentée sur la figure 4.6 b, est

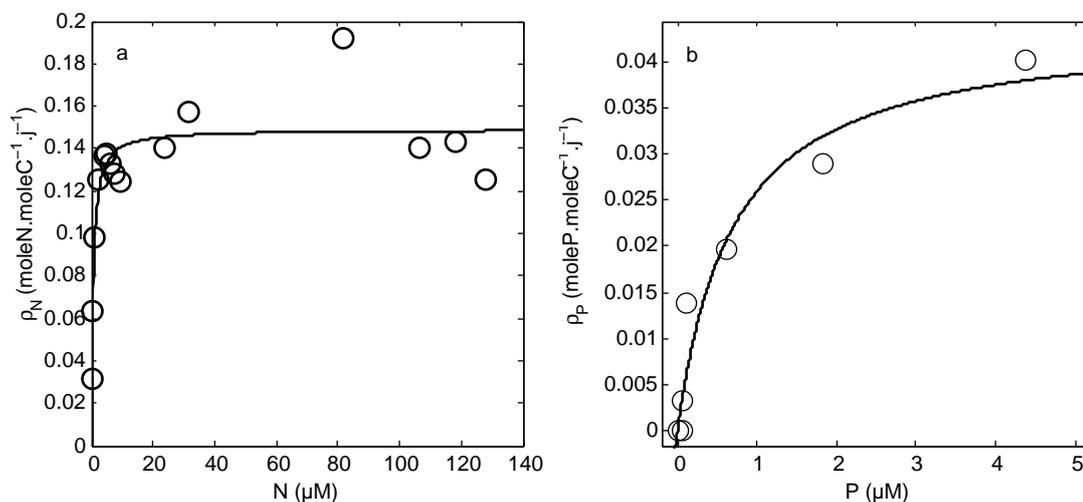


FIGURE 4.5 – Taux d’absorption de l’élément limitant ( $\text{NO}_3$  (a) ou  $\text{PO}_4$  (b)) mesurés chez *Tisochrysis lutea* au cours des cultures de l’expérience 1, limitées par le N et le P, en fonction des concentrations respectives dans le milieu.

Tableau 4.2 – Paramètres cinétiques de l’absorption du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$  obtenus chez *Tisochrysis lutea*. Les valeurs sont issues de l’ajustement de l’équation de Michaelis-Menten aux données de l’expérience 1.

	$\text{NO}_3$	$\text{PO}_4$
$\rho_{max}^a$ ( $\text{mol molC}^{-1} \text{j}^{-1}$ )	0,163 (0,026)	0,044 (0,014)
$\rho_{max}^b$ ( $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}$ )	4,75	1,56
$K_m^a$ ( $\mu\text{mol L}$ )	1,3 (1,1)	0,14 (0,16)

a. Les données entre parenthèses correspondent aux demi-intervalles de confiance à 95%.

b. Les données rapportées à la cellule sont calculées sur la base de  $q_C = 700 \text{ fmolC cell}^{-1}$  pour  $\text{NO}_3$  et de  $q_C = 850 \text{ fmolC cell}^{-1}$  pour  $\text{PO}_4$ .

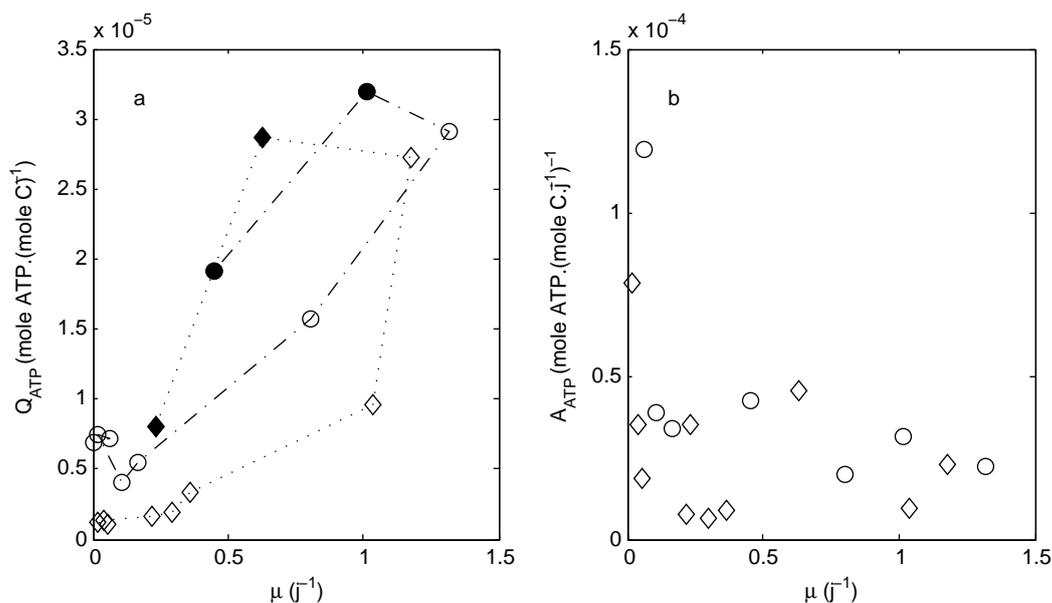


FIGURE 4.6 – Variation de  $q_{ATP}$  (a) et de  $A_{ATP}$  (b) en fonction du taux de croissance dans les cultures en batch de l'expérience 2, limitées par le N ( $\circ$ ) et par le P ( $\diamond$ ). Les symboles pleins signalent des mesures réalisées avant l'apparition du taux de croissance maximum et les flèches indiquent l'évolution temporelle.

une fonction décroissante du taux de croissance  $\mu$ , particulièrement dans le cas d'une limitation par le N et varie de  $0,2$  à  $1,2 \times 10^{-4}$  molATP molC $^{-1}$  j. Dans la culture limitée par le P,  $A_{ATP}$  suit les mêmes dynamiques mais avec une moindre amplitude de  $0,1$  à  $0,8 \times 10^{-4}$  molATP molC $^{-1}$  j. D'une manière générale,  $A_{ATP}$  s'avère supérieur en condition de limitation par le N, aux taux de croissance faibles. Enfin, si le rapport ATP:P semble augmenter avec le taux de croissance (figure 4.7), ces variations demeurent relativement contraintes, avoisinant un facteur 2. Il est notable que les données ne traduisent pas d'influence du type de limitation sur ce rapport.

## 2.4 Bilan de fractionnement par oxydation humide

Au cours de l'expérience 1, des bilans de fractionnement de N et P ont été réalisés pour évaluer la fiabilité de la méthode d'oxydation humide (annexe B) et la bonne estimation des quotas. Des taux de recouvrement  $R$  satisfaisants sont obtenus, ceux-ci étant de 101% pour le N et 92% pour le P dans la culture limitée par le N, et de 96% pour le N et 119 % pour le P, dans la culture limitée par le P.

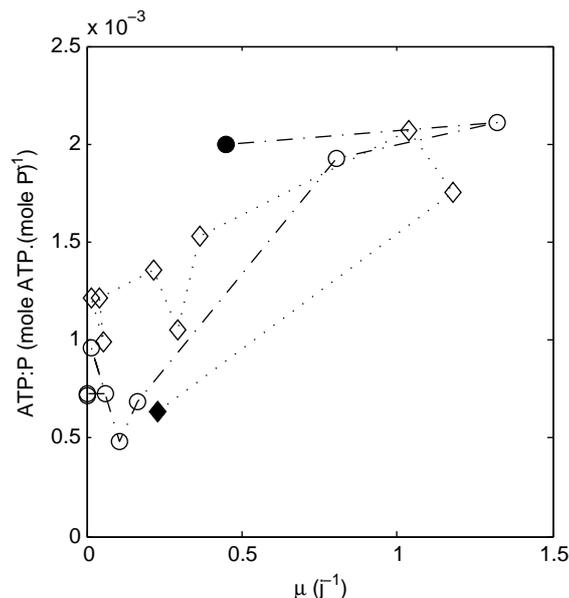


FIGURE 4.7 – Variation du rapport ATP:P en fonction du taux de croissance dans les cultures en batch de l'expérience 2, limitées par le N (O) et par le P (◇). Les symboles pleins représentent des mesures réalisées avant l'apparition du taux de croissance maximum et les flèches indiquent l'évolution temporelle.

L'accord entre l'accumulation du N particulaire et la disparition de l'azote dissous (figure 4.8a) dans la culture limitée par le N souligne la fiabilité du dosage de l'azote dans ces deux compartiments. Au contraire, la disparition de  $\text{NO}_3$  dans la culture limitée par le P ne reflète pas l'accumulation du N particulaire (figure 4.8 b), cette différence tendant à s'accroître avec l'âge de la culture. Une meilleure relation est obtenue en considérant, non plus la baisse de  $\text{NO}_3$ , mais la variation du N dissous total, qui tient compte à la fois des formes minérales et organiques dissoutes, récupérées au seuil de filtration  $1,2 \mu\text{m}$ .

## 2.5 Calibration du modèle

Les résultats de la calibration du modèle sur le jeu de données de l'expérience 1 sont présentés dans le tableau 4.3. L'annexe A décrit les procédures utilisées pour estimer les divers paramètres.

Le jeu de paramètres ainsi obtenu permet au modèle de simuler correctement les observations d'expériences, notamment les différents quotas  $Q_C$ ,  $q_N$  et  $q_P$  (figure 4.2 et 4.3). La figure 4.4, sur laquelle sont présentées les variations de  $q_N$  en fonction de  $q_P$  sous les deux conditions de limitation, souligne que le modèle reproduit la différence de comportement

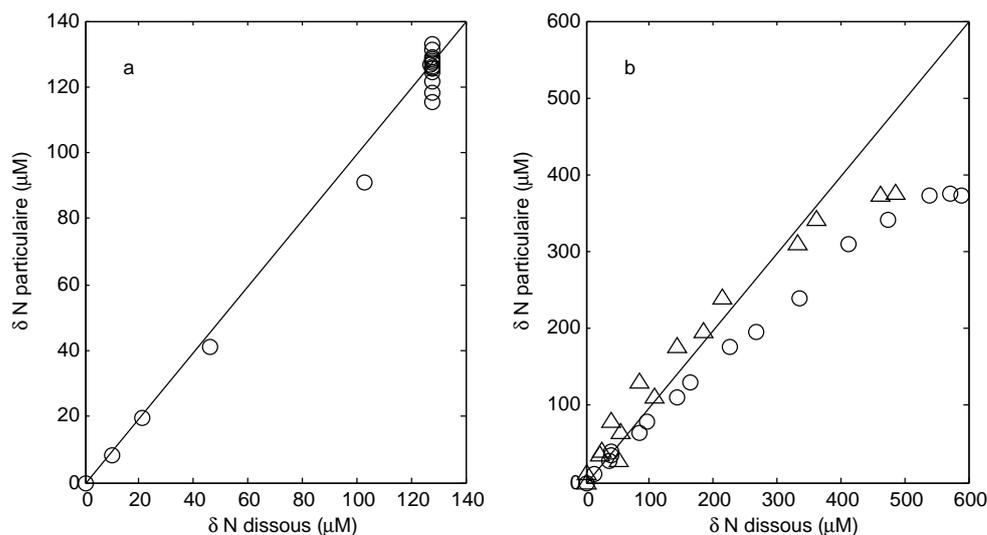


FIGURE 4.8 – Relation entre l’accumulation du N particulaire et la disparition du N dissous dans les cultures limitées par le N (a) et le P (b) au cours de l’expérience 1.  $\circ$  : N minéral dissous ;  $\triangle$  : N total dissous. La droite 1:1 est représentée pour faciliter la lecture des graphiques.

des quotas non limitants. Dans le cas de la culture limitée par le N, le modèle présente néanmoins une tendance à surestimer la vitesse de croissance de  $q_P$  lorsque le  $\text{NO}_3$  devient limitant.

En général, l’évolution de la fraction dissoute minérale est bien reproduite par le modèle. Cependant, dans la culture limitée par le P, le modèle ne parvient pas à décrire l’épuisement de  $\text{NO}_3$  observé expérimentalement. Il en résulte une erreur de prédiction de la concentration résiduelle de  $200 \mu\text{mol N L}^{-1}$  en fin de culture.

### 3 Discussion

#### 3.1 Comportement biologique des cultures

Les expériences 1 et 2 révèlent des comportements de cultures reproductibles, avec un ensemble de données cohérentes, qui soulignent la validité des observations qui en sont tirées.

Les valeurs de  $q_{Nexp}$  en phase de croissance exponentielle ne sont pas affectées par le type

Tableau 4.3 – Jeu de paramètres issu de la calibration du modèle sur la base de l’expérience 1.

Paramètre	Valeur	Unité
$\mu_{max}$ taux de croissance maximal en culture limitée par le N	1,1	$\text{j}^{-1}$
$\mu_{max}$ taux de croissance maximal en culture limitée par le P	1,0	$\text{j}^{-1}$
$q_{N0}$ quota N minimum	0,043	$\text{mol N molC}^{-1}$
$q_{P0}$ quota P minimum	0,0011	$\text{molP molC}^{-1}$
$q_{Nexp}$ quota N exponentiel	0,131	$\text{mol N molC}^{-1}$
$q_{Pexp}$ quota P exponentiel	0,011	$\text{molP molC}^{-1}$
$q_{NL}$ quota N maximum	0,143	$\text{mol N molC}^{-1}$
$q_{PL}$ quota P maximum	0,013	$\text{molP molC}^{-1}$
$\bar{\rho}_N$ taux d’absorption maximum de N	1,827	$\text{mol N molC}^{-1} \text{j}^{-1}$
$\bar{\rho}_P$ taux d’absorption maximum de P	0,071	$\text{molP molC}^{-1} \text{j}^{-1}$
$K_{mN}$ constante de demi-saturation	1,3	$\mu\text{mol N L}^{-1}$
$K_{mP}$ constante de demi-saturation	0,14	$\mu\text{molP L}^{-1}$

de limitation minérale. Bien que leur détermination s’appuie sur des données uniques dans chaque culture, la valeur moyenne observée dans les quatre cultures (associée à son écart-type) est de  $0,135 \pm 0,006 \text{ mol N molC}^{-1}$ .

Les valeurs mesurées pour  $q_{Pexp}$  varient de 0,011 à 0,015  $\text{molP molC}^{-1}$  d’une expérience à l’autre. Cette moindre répétabilité peut être attribuée au plus faible nombre de mesures de  $q_P$  durant la phase exponentielle de l’expérience 2. Les dynamiques de  $q_P$  se révèlent en outre très différentes selon que la culture est limitée par le N ou le P. Les cultures limitées par le N ne montrent pas de maximum pour  $q_P$  au cours de la phase exponentielle, ce que nous considérons comme la conséquence du pré-conditionnement des inoculums dans le milieu expérimental correspondant :  $q_P$  est ainsi saturé dès le début de l’expérience. Ce comportement est également prédit par le modèle dans ces conditions.

Parce qu’elles sont mesurées en phase de carence, les valeurs de quotas minimum  $q_0$  sont sensibles à la nature de cette dernière. Pour les deux types de nutriments, le quota en phase stationnaire de l’élément limitant est plus faible que lorsque ce même élément est en excès, ce que Droop (1974) traduit par la notion de *quota de subsistance apparent*. Néanmoins, en admettant des variations d’un facteur huit entre les deux conditions de limitation, le quota  $q_{P0}$  s’avère être beaucoup plus plastique que  $q_{N0}$ , qui ne signe des variations que d’un facteur deux.

Si l’on admet que la teneur en carbone d’une cellule co-varie avec son volume (Menden-

Deuer et Lessard, 2000), l'expérience 1 montre que le type de limitation n'influence pas le volume cellulaire de *Tisochrysis lutea*, qui n'est corrélé qu'au taux de croissance. Ce résultat est contradictoire avec l'observation par Rhee (1978) d'un volume cellulaire supérieur chez *Scenedesmus* sp. en conditions de limitation par le P. Cependant, Terry (1980) rapporte un volume cellulaire supérieur de *Pavlova lutheri* en conditions de limitation par le N, ce qui semble indiquer que la sensibilité du volume cellulaire au type de limitation pourrait être dépendante de l'espèce.

Les évolutions relatives des quotas  $q_N$ ,  $q_P$  et  $Q_C$  en fonction du taux de croissance se traduisent par la dynamique du rapport critique  $R_C$ . Dans le cadre du modèle de Droop, ce dernier peut être décrit par l'équation 4.1 (Elrifi et Turpin, 1985) :

$$R_C = \frac{q_{N0}}{q_{P0}} \frac{1 - \frac{\mu}{\bar{\mu}_P}}{1 - \frac{\mu}{\bar{\mu}_N}} \quad (4.1)$$

On peut alors montrer que  $R_C$  est une fonction monotone du taux de croissance  $\mu$  et décroissante si :

$$\alpha = \frac{\frac{q_{N0}}{q_{Nexp}}}{\frac{q_{P0}}{q_{Pexp}}} > 1 \quad (4.2)$$

Plus le rapport  $\alpha$  s'écarte de 1 et plus  $R_C$  est sensible au taux de croissance. Sur la base des données acquises au cours de nos expériences sur *Tisochrysis lutea*, ce rapport  $\alpha$  présente une valeur de 3,4 et démontre ainsi une forte sensibilité de  $R_C$  au taux de croissance.

Au cours des expériences 1 et 2, les données de quotas décrivent un rapport  $R_C$  compris entre 9 et 11 en phase de croissance exponentielle. D'une part, ce rapport est sensiblement inférieur au rapport de Redfield N:P=16. D'autre part, Marchetti et al. (2012) ont montré chez la même espèce une décroissance linéaire de  $R_C$ , passant de 70 à 50 mol N/mol P pour des taux de croissance variant de 0,3 à 0,8 j<sup>-1</sup>. La faible valeur calculée ici pour  $R_C$  en phase de croissance exponentielle et pour des taux de croissance compris entre 0,9 et 1,3 j<sup>-1</sup> indique que la décroissance de  $R_C$  s'opère sur toute la gamme du taux de croissance, reflétant un besoin relatif en P supérieur pour les forts taux de croissance. Ainsi, les données expérimentales auraient tendance à confirmer la monotonie de l'évolution de  $R_C$  prédite dans le cadre de la théorie de Droop, plutôt qu'à soutenir celle d'Agren (2004) qui prédit un maximum pour  $R_C$  à des taux de croissance intermédiaires.

Les vitesses d'absorption maximales mesurées pour le  $\text{NO}_3$  et le  $\text{PO}_4$  chez *Tisochrysis lutea* au cours de l'expérience 1, s'avèrent légèrement inférieures à celles rapportées dans la littérature pour d'autres Haptophycées (tableau 1.1). Le taux d'absorption maximum  $\rho_{max}$  pour le  $\text{NO}_3$  est environ 4 fois supérieure à celle observée pour le  $\text{PO}_4$ . Les constantes de demi-saturation pour ces deux substrats se trouvent dans la gamme du micromolaire, voire de l'infra-micromolaire, en accord avec les données de la littérature pour des espèces voisines. L'examen des coefficients d'affinité  $\alpha$ , définis par  $\alpha = \frac{\rho_{max}}{K_m}$ , confirme chez *Tisochrysis lutea* une plus faible efficacité catalytique spécifique pour le  $\text{NO}_3$  ( $\alpha = 0,13 \text{ L molC}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) que pour le  $\text{PO}_4$  ( $\alpha = 0,31 \text{ L molC}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ).

Au cours de l'expérience 2, le quota  $q_{ATP}$  évolue dans une gamme comprise entre 0,2 et  $3,0 \times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$  et se révèle plus faible que chez *Thalassiosira weissflogii*, où il varie entre 4 et  $10 \times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$  (Laws et al., 1983a). Néanmoins, Jones et al. (1995) qui ont étudié la variabilité de ce quota chez une variété d'espèces de microalgues limitées par le N, font état de valeurs de  $q_{ATP}$  sensiblement plus faibles chez les deux Haptophytes étudiées (*Isochrysis galbana* et *Pavlova lutheri*), celles-ci variant de 0,8 et  $1,4 \times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$ . Les valeurs minimales rencontrées ici pour *Tisochrysis lutea* ont été obtenues avec une limitation par le P et pour des taux de croissance très faibles, des conditions que Jones et al. n'ont pas rencontrées dans leur étude.

Les variations de  $q_{ATP}$  révèlent un phénomène d'hystérésis dans les cultures, qui se traduit, pour un taux de croissance donné, par un niveau de  $q_{ATP}$  supérieur chez les cellules non limitées. Une interprétation de ce phénomène d'hystérésis est qu'en absence de limitation, la forte disponibilité en ATP par rapport aux besoins permet de stimuler le taux de croissance. A l'inverse, l'apparition d'une limitation nutritive réduit la disponibilité d'ATP pour l'ensemble des fonctions cellulaires, et conduit à une réduction progressive du taux de croissance.

$q_{ATP}$  s'avère sensible au type de limitation et les différences de quota sont d'autant plus marquées que la limitation est accentuée. La contrainte exercée par la limitation en P aboutit à une réduction de  $q_{ATP}$  d'un facteur 4 chez *Tisochrysis lutea*. Ce résultat est à rapprocher de la réduction d'un facteur 2 observée par Hunter et Laws (1981) chez *Thalassiosira fluviatilis* ou de la diminution du rapport ATP:matière sèche rapportée par

Kunikane et al. (1986) chez *Scenedesmus dimorphus*, sous limitation croissante en P. L'ensemble des données disponibles dans la littérature (Hunter et Laws, 1981; Laws et al., 1983a; Perry, 1976) démontre, par ailleurs, que  $q_{ATP}$  est une fonction croissante du taux de croissance, ce qui est également observé ici pour *Tisochrysis lutea*. Il apparaît néanmoins clairement que la disponibilité de l'ATP pour la fixation du carbone ( $A_{ATP}$ ) diminue avec le taux de croissance dans des proportions importantes, particulièrement dans la culture limitée par le N (figure 4.6 b). Cette même tendance a pu être mise en évidence précédemment sur la base des données de Laws et al. (1983a) et Hunter et Laws (1981). Ainsi, particulièrement dans la gamme des faibles taux de croissance, la demande énergétique liée à la fixation du carbone augmente-t-elle plus rapidement que  $q_{ATP}$  avec le taux de croissance. Il est probable que cette augmentation de la contrainte sur l'énergie disponible conduise à une compétition accrue entre les différentes fonctions cellulaires, et notamment entre les fonctions d'acquisition de C, N et P.

Chez *Tisochrysis lutea*, le ratio ATP:P ne semble pas influencé par le type de limitation (figure 4.7). La stabilité de cette relation a par ailleurs été soulignée par Sakshaug et Holm-Hansen (1977) qui proposent d'y voir une relation *fondamentale*. Perry (1976) considère que ce rapport demeure constant chez *Thalassiosira pseudonana*, de l'ordre de  $1 \times 10^{-2}$  molATP molP<sup>-1</sup>. Au contraire, Kunikane et al. (1986) décrivent une relation positive de ce rapport avec le taux de croissance pour des ratios N:P faibles, et une relation négative pour des ratios supérieurs à 10. Il ne semble donc pas y avoir de consensus général dans les données de la littérature sur le comportement du rapport ATP:P. Néanmoins, les données disponibles pour *Tisochrysis lutea* semblent indiquer qu'à un taux de croissance donné, la cellule alloue une fraction constante du P cellulaire pour la synthèse d'ATP, indépendamment du type de limitation. La fraction allouée peut varier avec le taux de croissance, mais dans de faibles proportions. Ces observations justifient donc l'utilisation de  $q_P$  dans le terme de régulation de l'absorption de NO<sub>3</sub>, comme un indicateur de l'énergie disponible (ATP) pour les fonctions cellulaires.

## 3.2 Prédications du modèle

**Fraction particulaire** D'une manière générale, le modèle de co-limitation décrit de manière fidèle les dynamiques des différentes fractions, particulièrement dans le cas du jeu de données de l'expérience 1. Le modèle démontre également ses capacités à décrire les diverses tendances observées au cours de l'expérience 2.

Les évolutions du carbone particulaire sont fidèlement reproduites, tant sur leur cinétique que sur les niveaux atteints en phase stationnaire. Malgré les variations de  $Q_C$  en fonction du taux de croissance (figure 4.1), les prédictions de la population cellulaire s'avèrent également précises.

Les dynamiques des quotas limitants et non limitants  $q_N$  et  $q_P$  sont reproduites par le modèle qui parvient notamment à en prédire les valeurs caractéristiques en phases exponentielle et stationnaire. Sous les deux types de limitations,  $q_N$  est fidèlement prédit. Le modèle prédit moins bien le quota non limitant  $q_P$  dans les cultures limitées par le N. Il parvient néanmoins à décrire correctement l'ordre de grandeur de ce quota.

Au cours du développement du modèle (chapitre 3), il a été précisé qu'il n'y a pas de justification a priori pour que  $q_{NL}$  et  $q_{PL}$  ne puissent pas être supérieurs aux valeurs maximales rencontrées en phase de croissance exponentielle. Dans les faits, il s'avère que la valeur expérimentale déterminée en phase stationnaire de  $q_{PL}$  est légèrement supérieure aux quotas mesurés durant la phase de croissance exponentielle  $q_{Pexp}$ . Au contraire,  $q_{Nexp}$  est supérieur à toutes les valeurs expérimentales de ce quota en phase stationnaire, quelle que soit la limitation. Le quota théorique  $q_{NL}$ , identifié par l'équation A.5 comme étant de  $0,142 \text{ mol N mol C}^{-1}$ , est supérieur à sa valeur en phase exponentielle ( $0,131 \text{ mol N mol C}^{-1}$ ). Ces variations des quotas  $q_N$  et  $q_P$  en fonction du taux de croissance et du type de limitation vont dans le sens des observations de Elrifi et Turpin (1985) chez *Selenastrum minutum* et de celles que Marchetti et al. (2012) avaient antérieurement obtenues chez *Tisochrysis lutea* (voir chapitre 3) : le quota  $q_N$  est invariablement une fonction croissante du taux de croissance, alors que  $q_P$  ne présente de tendance croissante que sous une limitation par le P. En limitation par le N,  $q_P$  décrit une tendance décroissante dans les jeux de données précédemment cités, mais possède ici une dynamique plus complexe, bien que de faible amplitude. Il en résulte une asymétrie dans les données expérimentales des quotas, illustrée

par la figure 4.4.

**Fraction dissoute** Les techniques de séparation des cultures et d'analyse de ces fractions par oxydation humide nous ont permis de parvenir à une estimation fiable de l'azote et du phosphore particulaire au cours des cultures. Dans le cas du dosage de l'azote particulaire, l'accord entre les résultats d'oxydation humide et d'analyse élémentaire le confirme. La cohérence des bilans de matière assure une évaluation fiable du transfert des éléments entre les fractions dissoute et particulaire : c'est le cas pour le P dans toutes les situations de limitation. Il en va de même pour le N, lorsque les cultures sont soumises à une limitation par cet élément. En revanche, dans les cultures limitées par le P, l'arrêt de l'accumulation du N particulaire ne se traduit pas par une stabilisation de la concentration résiduelle en  $\text{NO}_3$  dans le milieu, cette dernière persistant à diminuer jusqu'à sa totale disparition (figure 4.3) dans l'expérience 1. Cette même tendance est observée au cours de l'expérience 2, où la disparition de  $\text{NO}_3$  ne montre pas de stabilisation, contrairement aux quotas  $q_N$  et  $q_P$ . En outre, le bilan du transfert de l'azote dissous vers la fraction particulaire est amélioré par la prise en compte de l'ensemble des formes dissoutes et non plus seulement de la fraction minérale (figure 4.8). Cela laisse supposer un transfert d'une part de l'azote minéral vers la fraction organique dissoute (comme définie au seuil de filtration 1,2  $\mu\text{m}$ ). La conversion du  $\text{NO}_3$  ailleurs que dans la biomasse microalgale peut avoir diverses origines, comme l'excrétion d'azote organique, le développement d'une population bactérienne compétitrice pour le substrat  $\text{NO}_3$  ou l'autolyse cellulaire.

### 3.3 Enseignements sur la co-limitation N-P

Dans les deux expériences présentées, une différence de comportement des quotas non limitants  $q_N$  et  $q_P$  apparaît selon la limitation imposée aux cultures. Sous limitation par le phosphore,  $q_N$  diminue de manière monotone avec  $q_P$ , alors qu'en limitation azotée,  $q_P$  demeure relativement constant pour des valeurs de  $q_N$  élevée et augmente pour les valeurs de  $q_N$  les plus faibles. Ces évolutions traduisent une dépendance de  $q_N$  pour le quota limitant  $q_P$  et, à l'inverse, l'absence de lien entre  $q_N$  et  $q_P$  lorsque N limite le taux de croissance. Ces

observations sont en accord avec les formulations différentes utilisées dans notre modèle de co-limitation pour l'absorption du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$  et se traduisent par des prédictions fidèles du modèle pour les tendances observées sur les dynamiques relatives de quotas.

L'hypothèse sous-jacente au modèle de co-limitation postule qu'en conditions de limitation par le P, les différentes fonctions métaboliques sont en compétition pour l'énergie cellulaire, dont le niveau et la disponibilité varient selon les conditions physiologiques. En accord avec les données de la littérature, les variations de  $q_{ATP}$  observées chez *Tisochrysis lutea* plaident en faveur d'une compétition pour l'énergie entre les fonctions métaboliques lorsque le P est limitant. La plus faible disponibilité d'ATP dans ces conditions de limitation pourrait résulter en une moindre activité de transport du  $\text{NO}_3$ , en accord avec les interactions observées par Terry (1982a).

Enfin, la faible sensibilité du rapport ATP:P au type de limitation et ses variations avec le taux de croissance justifient le choix d'un terme de régulation de l'absorption de nitrate basé sur  $q_P$ , en approximation de l'ATP. Il est clair que la seule mesure de l'ATP ne donne pas une vision globale du niveau énergétique cellulaire. Une évaluation de la charge énergétique, mesurée par le rapport  $\frac{ATP+1/2ADP}{ATP+ADP+AMP}$  (Atkinson et Walton, 1967) aurait donné une image plus juste de la capacité énergétique totale. Cependant cette technique n'était pas disponible au cours de la période expérimentale, et la mesure de  $q_{ATP}$  donne néanmoins une première évaluation de ce niveau énergétique. Il faut également souligner que le quota d'ATP représente la somme des concentrations de plusieurs compartiments cellulaires. Il indique donc le bilan des activités de synthèse (notamment par photophosphorylation et par phosphorylation oxydative) et de consommation d'ATP dans le métabolisme. Les conclusions relatives aux quotas d'ATP doivent ainsi être nuancées par cette complexité.

## 4 Conclusion

Les expériences 1 et 2 ont permis de caractériser la réponse de *Tisochrysis lutea* à des rapports d'alimentation extrêmes en  $\text{NO}_3$  et en  $\text{PO}_4$ .

Le modèle calibré grâce à ces observations est apte à simuler ces comportements, et en particulier, il parvient à restituer les réponses différentes des quotas en azote et en phos-

phore de cellules limitées par ces deux éléments.

En carence de phosphore, nous avons observé que la disparition du  $\text{NO}_3$  excédait la production d'azote cellulaire dans les cultures. Dans la mesure où notre modèle prédit bien les évolutions de l'azote particulaire, il ne peut simuler correctement la disparition du  $\text{NO}_3$ . Ce résultat suggère l'intervention de processus que le modèle ne prend pas en compte.

Les variations de  $q_{ATP}$  enregistrées au cours des cultures en batch confirment l'hypothèse de contraintes variables et parfois fortes sur le niveau énergétique cellulaire, en fonction des conditions de limitation. Ce résultat, associé à la réduction du taux net d'absorption de  $\text{NO}_3$  sous forte limitation par le phosphore, sous-tend l'existence d'une interaction N-P modulée par le niveau énergétique cellulaire.

# Chapitre 5

## Modifications du modèle de co-limitation

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction . . . . .</b>	<b>115</b>
<b>2</b>	<b>Les modifications proposées . . . . .</b>	<b>116</b>
	Population bactérienne . . . . .	116
	Excrétion d'azote organique . . . . .	117
<b>3</b>	<b>Résultats . . . . .</b>	<b>119</b>
	3.1 Simulation d'une population bactérienne . . . . .	119
	3.2 Simulation de l'excrétion d'azote organique . . . . .	119
<b>4</b>	<b>Discussion . . . . .</b>	<b>123</b>
<b>5</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>127</b>

---

## 1 Introduction

Le découplage entre la disparition du  $\text{NO}_3$  et l'accumulation de l'azote dans la biomasse microalgale, qui a été observé dans les expériences précédentes, révèle une complexité supérieure des flux d'azote, lorsque les cultures sont carencées par le P. La qualité des simulations du modèle pour l'accumulation de l'azote dans la fraction microalgale suggère,

en outre, que la disparition du  $\text{NO}_3$  dans les cultures doit recouvrir des processus que le modèle ne prend pas en compte.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la disparition du  $\text{NO}_3$  en absence d'accumulation dans la fraction microalgale. Nous avons considéré dans un premier temps le développement parallèle d'une population bactérienne dans les cultures. Puis nous avons envisagé la possible contribution de l'excrétion d'azote organique par les microalgues. Ces deux hypothèses ont conduit à proposer différentes modifications du modèle original.

## 2 Les modifications proposées

**Population bactérienne** Pour rendre compte de la totale disparition du  $\text{NO}_3$  au sein des cultures limitées par le P, une première option consiste à examiner le développement d'une population bactérienne hétérotrophe.

Un modèle de croissance bactérienne de type Monod, qui postule une croissance directement liée à la concentration de l'élément limitant, est ici utilisé (équation 5.1). En présence d'une source carbonée suffisante, liée à une forte excrétion de matière organique dissoute par le compartiment microalgal, le développement de la population bactérienne est alors supposé être limité par le  $\text{NO}_3$  :

$$\mu = \bar{\mu} \frac{N}{N + K_s} \quad (5.1)$$

La calibration de ce modèle s'appuie sur les données de la littérature. Selon Reay et al. (1999), la croissance des bactéries marines et dulcicoles sur le  $\text{NO}_3$  présente une constante de demi-saturation  $K_s$  variant entre 6 et  $120 \mu\text{mol N L}^{-1}$ , avec des taux de croissance maximum  $\mu_{max}$  variant de 0,07 à  $2,4 \text{ j}^{-1}$ . Les valeurs utilisées dans le modèle sont :  $K_s = 100 \mu\text{mol N L}^{-1}$  et  $\bar{\mu} = 1,35 \text{ j}^{-1}$ . Une concentration initiale de N bactérien  $N_{b0}$  de  $0,1 \mu\text{mol N L}^{-1}$  — soit 60 fois moins importante que celle du compartiment microalgal — est retenue. Soulignons que cette première modification du modèle de co-limitation introduit trois paramètres supplémentaires  $\bar{\mu}$ ,  $K_s$  et  $N_{b0}$ .

**Excrétion d'azote organique** L'excrétion de N organique ( $N_{org}$ ) dans les cultures limitées par le P peut également expliquer le découplage entre l'accumulation du N particulaire et la disparition du  $NO_3$ . Nous allons ici envisager successivement deux hypothèses.

**Première hypothèse** Baklouti et al. (2006) ont proposé une formulation de l'excrétion d'azote organique ( $\varepsilon_N$ ) qui est une fonction michaelienne de la concentration du  $NO_3$ , régulée inversement par le quota  $q_N$  :

$$\varepsilon_N = \bar{\rho}_N \frac{N}{N + K_s} \left(1 - \frac{q_{Nmax} - q_N}{q_{Nmax} - q_{N0}}\right) \quad (5.2)$$

Selon Baklouti et al., l'absorption brute de N est sous la seule dépendance de l'activité enzymatique des transporteurs et n'est donc pas régulée par le quota interne  $q_N$ . Néanmoins, pour intégrer l'excrétion dans notre modèle de co-limitation et représenter l'interaction N-P à travers l'activation des transporteurs de  $NO_3$  par l'ATP, nous introduisons un terme d'activation de l'absorption par  $q_P$ . L'absorption brute de N est alors :

$$\rho_{Nbrute} = \bar{\rho}_N \frac{N}{N + K_s} \frac{q_P - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (5.3)$$

L'excrétion est le résultat de la différence entre les absorptions brute et nette :

$$\varepsilon_N = \rho_{Nbrute} - \rho_{Nnette} \quad (5.4)$$

Si nous conservons l'expression initialement utilisée dans notre modèle pour  $\rho_{Nnette}$ ,

$$\rho_{Nnette} = \bar{\rho}_N \frac{N}{N + K_s} \frac{q_{NL} - q_N}{q_{NL} - q_{N0}} \frac{q_P - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (5.5)$$

nous obtenons finalement une formulation de l'excrétion apparentée à celle proposée par Baklouti et al. (équation 5.2), mais dans laquelle apparaît un terme de régulation par  $q_P$  :

$$\varepsilon_N = \bar{\rho}_N \frac{N}{N + K_s} \frac{q_N - q_{N0}}{q_{NL} - q_{N0}} \frac{q_P - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (5.6)$$

L'excrétion de N est alors une fonction croissante de  $q_N$  et  $q_P$ . Notons enfin que cette première hypothèse pour l'excrétion n'introduit pas de paramètres supplémentaires dans

le modèle de co-limitation.

**Seconde hypothèse** Une alternative peut être proposée pour rendre compte du processus supposé d'excrétion. Celle-ci traduit l'hypothèse que l'assimilation de N est dépendante de l'énergie cellulaire et donc de  $q_P$ . Pour de faibles valeurs de  $q_P$ , l'assimilation est limitée par l'énergie, et l'azote absorbé est alors excrété sous forme organique. Comme précédemment, l'absorption brute est la somme algébrique du taux d'assimilation et du taux d'excrétion (équation 5.4). La formulation de l'absorption utilisée dans le modèle initial de co-limitation (équation 5.5) est ici considérée comme représentant désormais le terme d'assimilation  $\rho_{Nnette}$ . L'excrétion est, quant à elle, représentée par une fonction michaelienne de la concentration du  $\text{NO}_3$  dans le milieu et inversement proportionnelle à  $q_P$ . Elle est décrite par l'équation suivante :

$$\varepsilon_N = \varepsilon_{Nmax} \frac{N}{N + K_s} \frac{q_{PL} - q_P}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (5.7)$$

L'absorption brute résultante est ainsi :

$$\rho_{Nbrute} = \bar{\rho}_N \frac{N}{N + K_s} \frac{q_{NL} - q_N}{q_{NL} - q_{N0}} \frac{q_P - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} + \varepsilon_{Nmax} \frac{N}{N + K_s} \frac{q_{PL} - q_P}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (5.8)$$

Par réarrangement, nous obtenons :

$$\rho_{Nbrute} = \frac{N}{N + K_s} \frac{q_P - q_{P0}}{q_{PL} - q_{P0}} \left( \bar{\rho}_N \frac{q_{NL} - q_N}{q_{NL} - q_{N0}} - \varepsilon_{Nmax} \right) + \varepsilon_{Nmax} \frac{N}{N + K_s} \quad (5.9)$$

L'équation 5.9 fait ainsi apparaître un premier terme d'absorption active, dépendant de  $q_P$  et un second terme indépendant de  $q_P$  ( $\varepsilon_{Nmax} \frac{N}{N+K_s}$ ). Ce dernier peut être considéré comme relevant soit d'un processus d'absorption passif, soit d'une activité de transport actif résiduelle, associée à la maintenance cellulaire.

La prise en compte de l'excrétion à travers cette hypothèse n'a que peu d'incidence sur les équations du modèle initial, puisque le terme d'assimilation qui, seul modifie le quota  $q_N$ , conserve la formulation initialement utilisée pour l'absorption. L'équation de la variation

de  $\text{NO}_3$  en est cependant affectée :

$$\dot{N} = -(\rho_{N_{nette}} + \varepsilon_N)X + D(N_{in} - N) \quad (5.10)$$

Cette seconde hypothèse pour l'excrétion n'introduit qu'un paramètre supplémentaire,  $\varepsilon_{N_{max}}$ , qui peut être identifié par régression d'une fonction spline sur la courbe de disparition de  $\text{NO}_3$  résiduel en culture batch limitée par le P, une fois que  $q_P$  atteint sa valeur minimale  $q_{P0}$  (voir équation 5.7), alors que la concentration du  $\text{NO}_3$  est encore élevée ( $N \gg K_s$ ). Cette seconde modification du modèle de co-limitation sera désignée plus loin sous le terme de modification par *Régulation Énergétique d'Excrétion* (REE).

## 3 Résultats

### 3.1 Simulation d'une population bactérienne

Sous les hypothèses que nous avons considérées, le développement de la population bactérienne conduit à une disparition totale du  $\text{NO}_3$  dans la culture limitée par le P (figure 5.1a). La population bactérienne est contrainte par la disponibilité du  $\text{NO}_3$  et donc par la compétition pour l'azote avec les microalgues (figure 5.1b). La prise en compte de ce compartiment biologique dans le modèle améliore la simulation de la cinétique de disparition du  $\text{NO}_3$ . Il est à noter que cette modification n'affecte pas l'évolution des autres variables.

### 3.2 Simulation de l'excrétion d'azote organique

Nous avons pris en compte l'excrétion de l'azote organique par le biais de deux hypothèses différentes. La première, basée sur les travaux de Baklouti et al. (2006), propose une excrétion croissante avec le quota  $q_N$  et l'absorption de  $\text{NO}_3$ . Cette formulation conduit aux prédictions exposées dans la figure 5.2, où il apparaît que l'absence de régulation par  $q_N$  de l'absorption de  $\text{NO}_3$  conduit à une absorption et une excrétion beaucoup plus rapides que celles enregistrées sur les données expérimentales de l'expérience 1. En outre, cette modification dégrade fortement l'ensemble des prédictions du modèle original, et no-

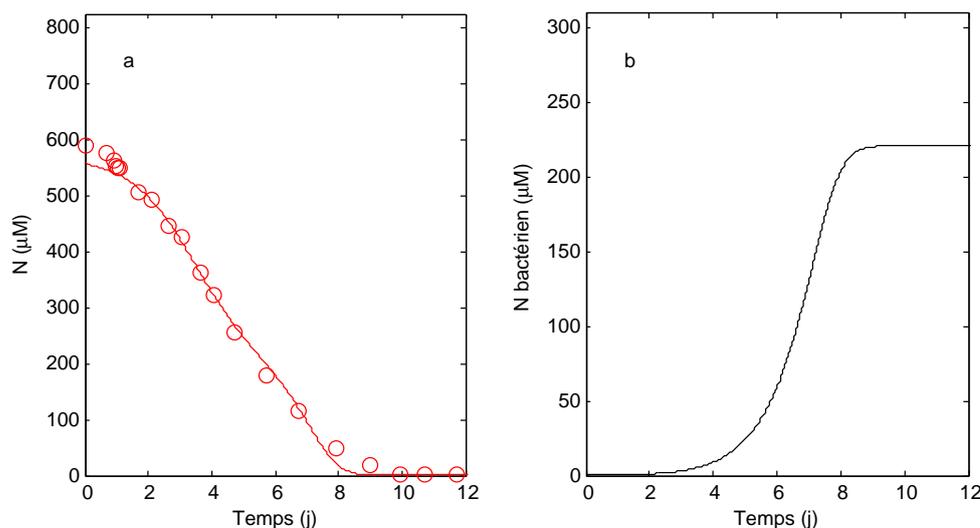


FIGURE 5.1 – Simulation de la cinétique de disparition de  $\text{NO}_3$  au cours de la culture limitée par le P de l'expérience 1 (a), en présence du développement d'une population bactérienne (b).

tamment le développement de la population de microalgues.

L'excrétion de l'azote organique peut également être représentée par la modification REE de notre modèle, qui traduit une régulation de l'assimilation de  $\text{NO}_3$  par le niveau énergétique cellulaire. Les estimations du taux d'excrétion maximal obtenues par régression sur les données de  $\text{NO}_3$  de l'expérience 1, sont comprises entre  $0,006$  et  $0,019 \text{ mol N mol C}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , avec un seuil de confiance de 95%. Ces valeurs correspondent à un maximum de taux d'excrétion  $\varepsilon_{Nmax}$  respectivement 300 et 100 fois plus faible que le maximum d'absorption théorique  $\bar{\rho}_N$  identifié dans le tableau 4.3, et 20 fois plus faible que le maximum expérimental (tableau 4.2). La prise en compte de la valeur moyenne  $\varepsilon_{Nmax} = 0,009 \text{ mol N mol C}^{-1} \text{ j}^{-1}$  conduit aux prédictions représentées sur la figure 5.3 pour les cultures limitées par le P dans les deux expériences : seule la décroissance de  $\text{NO}_3$  est affectée par la modification REE, et celle-ci permet au modèle de représenter l'épuisement total du  $\text{NO}_3$ , avec une cinétique conforme à celle des données expérimentales, particulièrement pour l'expérience 1 (figure 5.3b). Les prédictions du modèle REE pour des cultures limitées par le N sont en tout point comparables à celles de notre modèle initial. Enfin, le modèle REE représente de manière satisfaisante l'évolution de la fraction NOD, observée expérimentalement (figure 5.4) au cours de cette même expérience.

Le modèle REE permet une prédiction satisfaisante de l'évolution des différents compar-

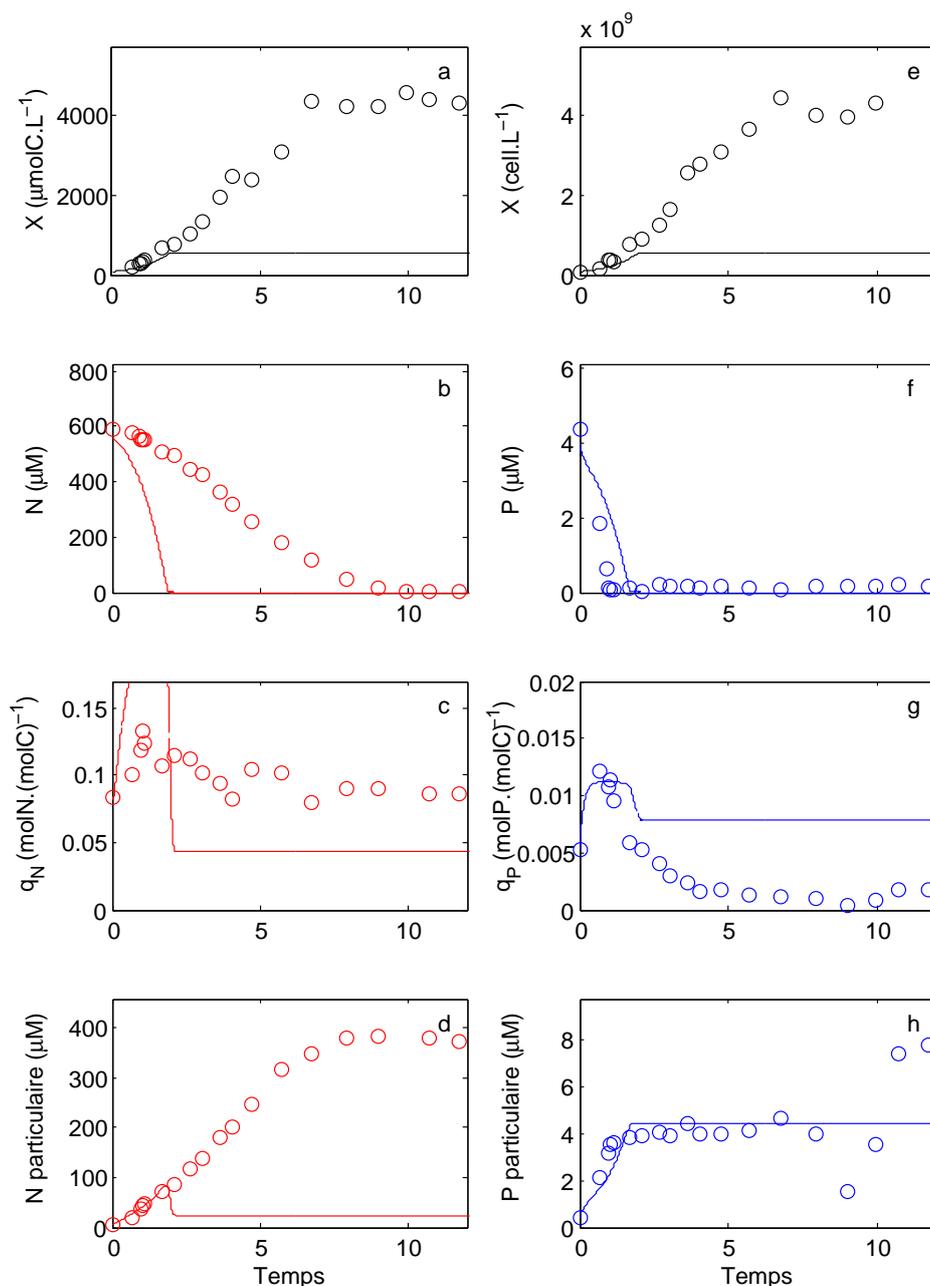


FIGURE 5.2 – Simulations de la modification du modèle de co-limitation pour l'excrétion, selon la formulation de Baklouti et al. (2006). L'absence de régulation de l'absorption de  $\text{NO}_3$  par  $q_N$  conduit à une absorption beaucoup trop rapide qui dégrade fortement les prédictions du modèle. Les données expérimentales correspondent à la culture limitée par le P dans l'expérience 1. (a) carbone particulaire; (b) N résiduel; (c)  $q_N$ ; (d) N particulaire; (e) concentration cellulaire; (f) P résiduel; (g)  $q_P$ ; (h) P particulaire.

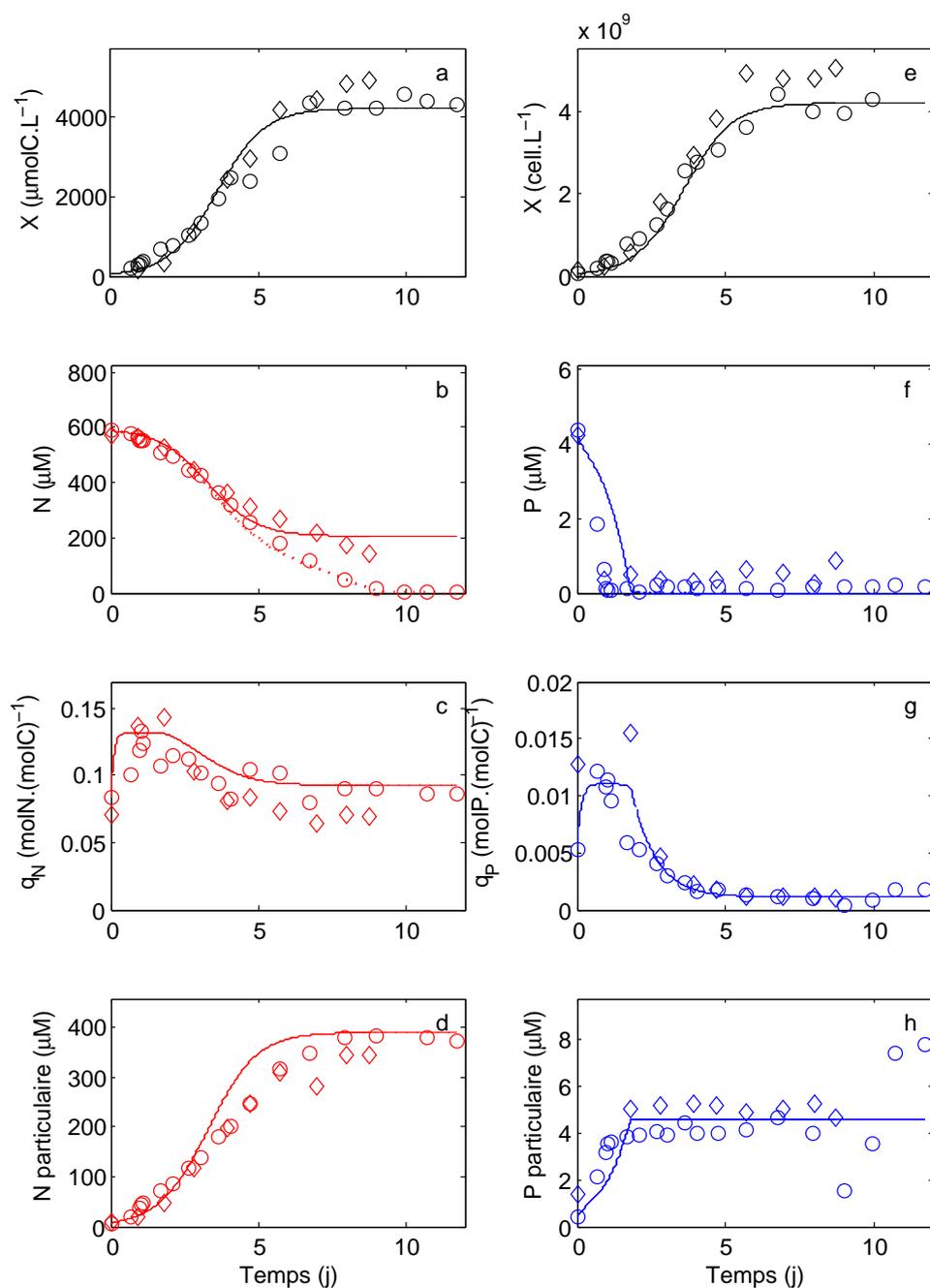


FIGURE 5.3 – Simulations de la modification REE du modèle de co-limitation. Les données correspondent aux cultures limitées par le P dans les expériences 1 (○) et 2 (◇). La ligne en tirets représente la simulation de la modification REE et la ligne continue celle du modèle de co-limitation initial. (a) carbone particulaire; (b) N résiduel; (c)  $q_N$ ; (d) N particulaire; (e) concentration cellulaire; (f) P résiduel; (g)  $q_P$ ; (h) P particulaire.

timents de l'expérience 2. Comme cela a été déjà souligné, la décroissance de  $\text{NO}_3$  est plus lente qu'au cours de l'expérience 1, et le modèle REE induit donc une cinétique plus rapide que celle des données expérimentales. Il représente cependant mieux la baisse persistante du  $\text{NO}_3$  que le modèle initial, qui prédit un niveau constant en carence de  $\text{PO}_4$ .

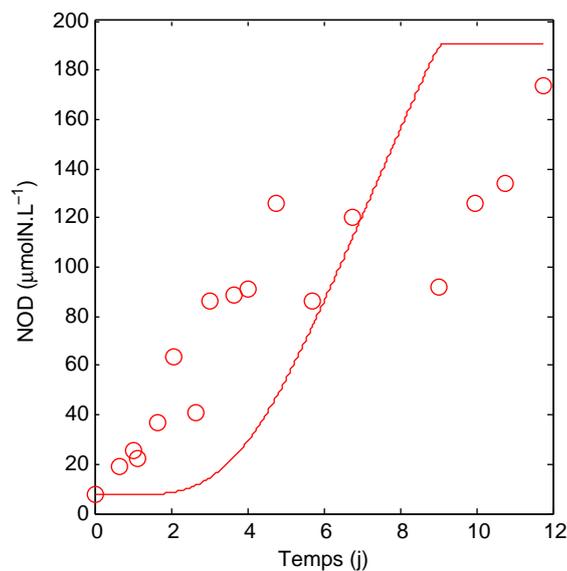


FIGURE 5.4 – Évolution du NOD au cours de la culture limitée par le P dans l'expérience 1. La ligne continue représente la prédiction de la variante REE de notre modèle de co-limitation.

## 4 Discussion

**Population bactérienne** Bien que les cultures soient stérilement mises en place, elles ne sont pas axéniques et sont donc susceptibles d'offrir un terrain favorable au développement d'une flore bactérienne hétérotrophe, par l'intermédiaire du carbone organique microalgal dont l'excrétion est favorisée par une limitation nutritive. Lancelot (1983) rapporte, en effet, de forts taux d'excrétion de matière organique — pouvant atteindre 70-80 % de l'assimilation photosynthétique — lors de la fin de blooms phytoplanctoniques sous l'effet d'une carence nutritive. Pour tester cette hypothèse, une population bactérienne a été intégrée au modèle; la possibilité de croissance de certaines bactéries hétérotrophes marines sur la base du  $\text{NO}_3$  ayant été démontrée par Kirchman et Wheeler (1998), les

besoins azotés de cette population sont supposés couverts exclusivement par la ressource minérale  $\text{NO}_3$ . Les simulations montrent qu'un développement bactérien (figure 5.1) peut conduire à l'épuisement du  $\text{NO}_3$  selon une cinétique semblable à celle observée au cours de l'expérience 1, sans modifier l'évolution des autres paramètres de la culture. L'hypothèse bactérienne paraît vraisemblable, puisqu'au terme de la culture limitée par le P, une population bactérienne a été effectivement observée.

Néanmoins, Obernosterer et Herndl (1995) ont pu montrer qu'en conditions de limitation par le P, les bactéries n'accèdent que difficilement à la matière organique excrétée par les microalgues, ce qui conduit à la formation éventuelle de mucilages. En outre, étant donnée la faible plasticité du ratio N:P chez les bactéries — un ratio N:P maximum de l'ordre de 18 est avancé par Vrede et al. (2002) sous conditions de limitation par le P —, la mobilisation de  $220 \mu\text{mol L}^{-1}$  de N dans le compartiment bactérien requerrait simultanément  $12 \mu\text{mol L}^{-1}$  de P. L'apport initial en  $\text{PO}_4$ , trois fois inférieur ( $4 \mu\text{mol P L}^{-1}$ ), et l'incorporation de sa majeure partie dans la biomasse microalgale ne permettent donc pas de considérer l'hypothèse bactérienne comme un acteur majeur de la consommation excédentaire de  $\text{NO}_3$ .

**Excrétion d'azote organique** L'excrétion d'azote organique est une alternative plus convaincante pour expliquer l'évolution de la fraction NOD dans la culture limitée par le P. Bien que ce processus soit reconnu, relativement peu d'études se sont intéressées aux mécanismes sous-jacents. Il semble néanmoins que l'apport d'azote sous forme de  $\text{NO}_3$  est particulièrement favorable à la production d'exsudats azotés organiques par le phytoplancton (Varela et al., 2005). Biddanda et Benner (1997) ont pu mesurer chez plusieurs espèces une excrétion d'azote organique représentant de 15 à 30% de l'azote inorganique apporté dans les cultures. Ces observations sont en accord avec celles réalisées ici. En phase de croissance active, le phytoplancton excrète des composés majoritairement de faible poids moléculaire, en particulier, des acides aminés riches en N (Bjornsen, 1988).

Sur la base des informations relativement parcellaires de la littérature, Baklouti et al. (2006) ont proposé une formulation générique de l'excrétion d'azote organique, en postulant qu'elle est une fonction croissante de  $q_N$  et de l'absorption du N (équation 5.2). Un

maximum d'excrétion est donc attendu au cours de la phase de croissance exponentielle des microalgues. L'intégration de ce terme d'excrétion d'azote organique à notre modèle de co-limitation se traduit par une modification critique de la cinétique de disparition de  $\text{NO}_3$  dès le début de la culture limitée par le P, conduisant à un épuisement de la ressource azotée au bout de 2 jours, à une diminution rapide de  $q_N$  et à un très faible développement de la culture. Les prédictions du modèle ainsi modifié sont donc fortement dégradées par rapport à celles du modèle initial. Ceci peut s'expliquer par le fait que la formulation de l'excrétion est rigide et aboutit à des taux d'absorption de  $\text{NO}_3$  et d'excrétion beaucoup plus élevés que ceux effectivement mesurés. L'hypothèse de Baklouti et al. (2006) — et notamment l'absence de régulation de l'absorption par le quota interne — ne semble donc pas convenir pour simuler les données expérimentales. Il demeure néanmoins possible que *Ti-sochrysis lutea* puisse utiliser la fraction organique excrétée pour assurer sa croissance, soit à travers la reminéralisation bactérienne de l'azote organique (Le Chevanton et al., 2013), soit directement. Admiraal et al. (1986) ont, en effet, signalé que certaines microalgues, comme les diatomées, sont capables d'assimiler des acides aminés.

D'un autre côté, les résultats de Admiraal et al. (1986) remettent en question la portée générale de l'hypothèse de Baklouti et al. (2006). Ces auteurs ont montré que, chez *Thalassiosira excentrica* limitée par le silicium, un excès de  $\text{NO}_3$  entraîne l'excrétion d'acides aminés lors de l'entrée en phase stationnaire des cultures, pouvant atteindre 5% de  $q_n$ . Pant et al. (2014) suggèrent que l'augmentation des acides aminés pourrait être un moyen de détoxifier l'ammonium lors d'une carence par le P. Notre première hypothèse, basée sur la formulation de Baklouti, ne peut pas rendre compte de cette excrétion tardive. *A fortiori*, l'activation de l'excrétion par  $q_P$  conduit à une excrétion nulle lorsque la culture limitée par le P parvient en phase stationnaire, ce que nous n'observons pas (voir la figure 5.4).

La modification REE proposée pour le modèle de co-limitation repose, quant à elle, sur un découplage entre l'absorption et l'assimilation de N dans les chaînes polypeptidiques, celui-ci étant rendu possible par l'excrétion. En comparaison de l'absorption, l'assimilation de l'azote dans les chaînes polypeptidiques est un processus coûteux en énergie. Turpin (1991) propose une dépense énergétique de 2 ATP pour le transport et l'assimilation de N dans les acide aminés par le cycle GS/GOGAT, et une dépense double pour son assimilation dans

les protéines. En condition de carence par le  $\text{PO}_4$ , les données expérimentales révèlent des niveaux de  $q_{ATP}$  particulièrement faibles, capables d'expliquer l'excrétion à travers une plus forte limitation énergétique de la synthèse protéique, relativement à l'absorption. Selon l'équation 5.9, l'absorption brute se décompose en deux termes respectivement dépendant et indépendant du quota  $q_P$ , le second reflétant soit une absorption passive, soit un transport actif résiduel associé à l'activité de maintenance cellulaire. Le niveau d'excrétion maximal  $\varepsilon_{Nmax}$  déterminé ici — environ 20 fois plus faible que le taux d'absorption maximal  $\rho_{max}$  pour  $\text{NO}_3$  — est cohérent avec une faible contribution du transport passif, relativement aux capacités du transport actif. Bien que les travaux de Collos et al. (1992) semblent infirmer une diffusion passive de  $\text{NO}_3$  chez des diatomées qui stockent l'azote sous forme  $\text{NO}_3$ , ce processus pourrait exister chez les flagellées, lesquelles stockent préférentiellement le  $\text{NH}_4$  (Lomas et Glibert, 2000) et seraient ainsi moins soumises à une régulation par le quota interne du  $\text{NO}_3$ .

Ajoutons — pour être tout à fait complet — qu'une dernière alternative pourrait reposer sur l'excrétion de phosphatases extracellulaires. Il est, en effet, reconnu que l'activité phosphatase est reliée à la limitation ou à la carence en  $\text{PO}_4$  et que celle-ci peut augmenter d'un facteur 30 dans ces mêmes conditions (Kuenzler et Perras, 1965). L'excrétion de ces enzymes sous forme libre dans le milieu extracellulaire n'est cependant pas claire, et Cembella et al. (1982) propose plutôt une localisation pariétale ou périplasmique.

A défaut d'une approche expérimentale ciblée, il est difficile de statuer définitivement sur le ou les mécanismes qui président à la disparition de  $\text{NO}_3$  dans les cultures limitées par le P. Les hypothèses d'excrétion et de séquestration bactérienne de l'azote ne sont évidemment pas exclusives l'une de l'autre. Néanmoins, les arguments développés et les approches de modélisation favorisent un processus d'excrétion marqué lorsque  $q_P$  ne peut couvrir les besoins énergétiques liés à l'assimilation de l'azote dans les protéines. Soulignons, en outre, que la prise en compte de l'excrétion d'azote, à travers le modèle REE, n'a qu'un faible coût en paramètres additionnels.

## 5 Conclusion

En carence de phosphore, nous avons observé que la disparition du  $\text{NO}_3$  excédait la production d'azote cellulaire dans les cultures. L'utilisation de la modélisation nous a permis de favoriser, parmi plusieurs hypothèses possibles, l'existence d'un phénomène d'excrétion d'azote organique.

Nous avons suggéré que la carence de phosphore entraîne un découplage entre l'absorption et l'assimilation de l'azote dans les chaînes polypeptidiques, qui conduit à l'excrétion d'azote organique. La prise en compte de ce découplage dans la variante REE de notre modèle de co-limitation nous a permis de simuler correctement les évolutions expérimentales du  $\text{NO}_3$ , de la fraction NOD et de l'azote cellulaire. A ce titre, nous proposons que l'influence du statut nutritionnel en phosphore sur le découplage entre l'absorption et l'assimilation de l'azote représente une composante importante des interactions entre l'azote et le phosphore.



# Chapitre 6

## Étude expérimentale de la co-limitation en chémostat

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction . . . . .</b>	<b>130</b>
<b>2</b>	<b>Résultats . . . . .</b>	<b>130</b>
2.1	Cultures . . . . .	130
2.2	Énergie cellulaire . . . . .	136
2.3	Lipides neutres . . . . .	137
2.4	Prédictions du modèle . . . . .	139
<b>3</b>	<b>Discussion . . . . .</b>	<b>141</b>
3.1	Qualité des prédictions du modèle . . . . .	141
	Importance de l'interaction N-P . . . . .	142
	Prédictions et transitoires . . . . .	143
3.2	Interactions N-P . . . . .	144
	Régulations transitoires . . . . .	144
	ATP : un rôle central? . . . . .	148
3.3	Lipides neutres . . . . .	151
<b>4</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>152</b>

---

## 1 Introduction

Le chapitre 4 a fait état de la forte asymétrie des quotas  $q_N$  et  $q_P$  observée chez *Tisochrysis lutea* en conditions de mono-limitation et des capacités de notre modèle à décrire les réponses des différentes fractions des cultures.

Dans le présent chapitre, l'objectif est d'étudier plus finement les effets de l'interaction N-P lors de la transition d'une limitation à l'autre. Les capacités prédictives du modèle précédemment démontrées sont mises à profit pour déterminer les conditions expérimentales les plus judicieuses à utiliser en chémostat. Le recours à des cultures contrôlées en photobioréacteurs instrumentés assure la maîtrise des paramètres nécessaire pour étudier les processus fins de co-limitation et en décrire les comportements caractéristiques.

Dans les conditions extrêmes des mono-limitations, des variations importantes de  $q_{ATP}$  ont été observées précédemment, suggérant une contrainte énergétique plus élevée sur les cultures limitées par le P. Il s'agit ici de vérifier, dans les conditions imposées aux chémostats, si cette contrainte énergétique persiste, et si elle permet d'envisager un contrôle sur les dynamiques du quota  $q_N$ , tant sur les phases d'équilibre qu'au cours des transitoires. Enfin, dans une dernier effort de caractérisation, les conséquences de la co-limitation sur l'accumulation des lipides neutres sont évaluées.

## 2 Résultats

### 2.1 Cultures

Les cultures en chémostat comprennent trois phases successives, réalisant un premier équilibre au cours duquel la croissance est limitée par le N, suivi de deux équilibres où le P limite la croissance, et enfin d'un quatrième dans lequel le N limite à nouveau la croissance. Après une longue phase initiale de stabilisation en limitation par le N (25 jours), les deux cultures présentent des niveaux de biomasse très comparables et voisins de  $1300 \mu\text{molC L}^{-1}$ . D'une manière plus générale, les caractéristiques étudiées sont très similaires dans les deux cultures, tant qualitativement que quantitativement, ce qui souligne la reproductibilité de ces cultures en photobioréacteurs contrôlés. En conséquence, les données des deux cultures

sont regroupées dans des graphiques communs et les valeurs d'équilibre propres à chacune sont fournies dans la table 6.1.

Au cours de la première transition N:P, effectuée au jour 31 et la progressive raréfaction en  $\text{PO}_4$  qui en résulte,  $q_P$  n'est affecté qu'après un délai de 3 jours.  $q_P$  connaît alors une diminution rapide, passe par un minimum ( $0,003 \text{ molP molC}^{-1}$ ) voisin du quota de subsistance avant de se stabiliser sur une valeur d'équilibre ( $0,005 \text{ molP molC}^{-1}$ ). Ces variations de  $q_P$  se traduisent 2 à 3 jours après par une baisse du carbone particulaire et une augmentation concomitante de  $q_N$  (figure 6.1). Le taux de croissance du carbone particulaire connaît alors un minimum de  $0,75 \text{ j}^{-1}$  au cours des jours 37 et 38 dans les deux chémostats (annexe D). Au contraire, la seconde transition, réalisée au jour 68, engendre un accroissement brutal et immédiat des quotas  $q_N$  et  $q_P$ , puis du carbone particulaire.

Une précision est nécessaire à ce niveau puisque, après la première transition N-P, le nouvel équilibre (équilibre 2) en condition de limitation par le P n'a pu être maintenu durablement et les cultures ont finalement été perdues. La cause de cette perte, probablement liée à la qualité du milieu de culture, ne tient cependant pas à un défaut d'alimentation en  $\text{PO}_4$  limitant, puisque le niveau du P particulaire attendu ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a effectivement été atteint. L'équilibre 3, obtenu dans les mêmes conditions, mais sur de nouvelles cultures, révèle des niveaux de biomasse plus élevés (de l'ordre de  $900 \mu\text{molC L}^{-1}$ ) qu'au cours de l'équilibre 2. La raison de cette différence n'est cependant pas connue (table 6.1). Une part seulement de cette différence trouve son origine dans un enrichissement en milieu légèrement supérieur au cours de la seconde expérience, relativement à la précédente (+ 10 %). Les valeurs des quotas  $q_N$  et  $q_P$  sont en revanche très similaires entre ces deux équilibres et les écarts majoritairement non significatifs (table 6.1).

Lors de la seconde transition N-P, opérée au jour 68, la population de microalgues répond à l'enrichissement en  $\text{PO}_4$  par une rapide accélération de son taux de croissance, une remarquable augmentation de  $q_P$  et un plus fugace accroissement de  $q_N$  (figure 6.2). Le nouvel équilibre (équilibre 4) atteint dans les conditions de limitation par le N, présente un niveau de carbone particulaire et des valeurs de  $q_P$  ( $0,004 \text{ molP molC}^{-1}$ ) non significativement différents de ceux de l'équilibre 1, qui a été obtenu avec les mêmes conditions de limitation. En revanche,  $q_N$  demeure supérieur (compris entre  $0,112$  et  $0,116 \text{ molP molC}^{-1}$ , selon la

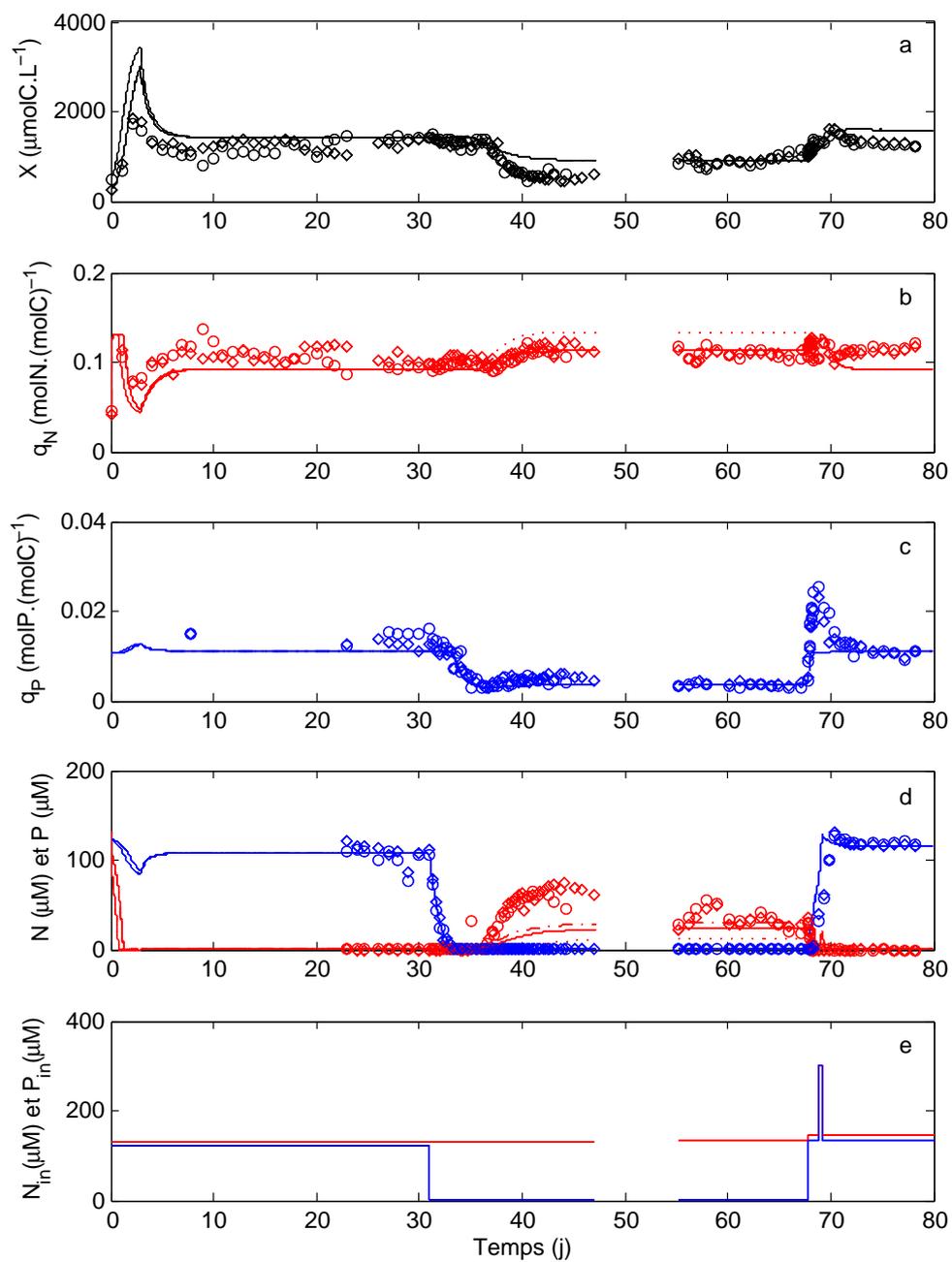


FIGURE 6.1 – Évolution des variables mesurées dans les cultures A ( $\diamond$ ) et B ( $\circ$ ) en chémostat. Les variables relatives au N et au P sont représentées en rouge et bleu, respectivement. ( - . - ) prédictions du modèle de co-limitation initial; (—) prédictions du modèle de co-limitation REE; (- - -) prédictions du modèle sans interaction N-P.

culture) au niveau atteint au cours du premier équilibre.

Consécutivement à la seconde transition N-P, le milieu a été accidentellement sur-enrichi au jour 69 (figure 6.1e). De faibles amplitude et durée et sans modification du rapport N:P, celui n'entraîne qu'une très faible réponse du carbone particulaire et ne signe pas au niveau de  $q_P$ . Cependant, la décroissance amorcée par  $q_N$  se trouve contrée par cet enrichissement et conduit à l'apparition d'un second pic pour ce quota (figure 6.2a).

Au cours des équilibres atteints pour les deux types de limitations, l'élément non limitant n'est pas totalement consommé et persiste à des niveaux largement détectables, supérieurs à  $30 \mu\text{mol N L}^{-1}$  pour le  $\text{NO}_3$  et  $100 \mu\text{mol P L}^{-1}$  pour le  $\text{PO}_4$ . En revanche, la première transition N-P se traduit par des niveaux de  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  indétectables au cours des jours 34 et 35. Cette situation se retrouve également, mais de manière beaucoup plus fugace, lors de la seconde transition, au jour 68.

Les bilans en N et en P montrent des variations du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$  cohérentes avec celles de la fraction particulaire. Nous avons tenté d'évaluer la fraction NOD par oxydation humide, puis en retranchant celles du  $\text{NO}_3$ . Cependant, l'apport de  $268 \mu\text{mol N L}^{-1}$  par l'EDTA ne nous a pas permis de mesurer les faibles niveaux d'azote organique de manière fiable. La somme de l'azote particulaire et du  $\text{NO}_3$  procure un autre moyen d'évaluer l'azote organique. Particulièrement pendant la première transition N-P, la somme de ces deux fractions révèle une baisse qui peut laisser supposer une augmentation du N organique de l'ordre de 5 à  $10 \mu\text{mol N L}^{-1}$  (voir annexe E).

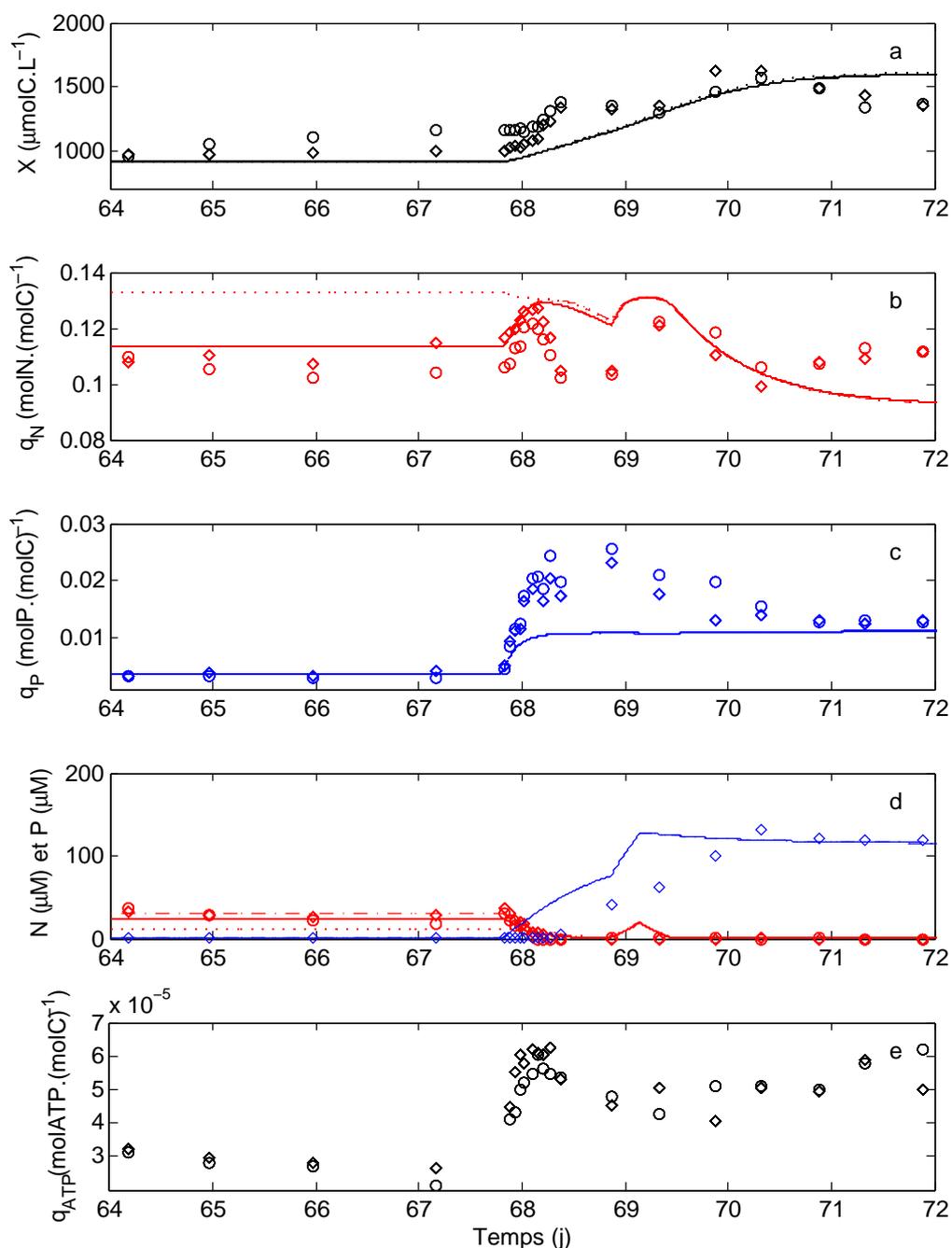


FIGURE 6.2 – Détails de l'évolution de  $X$ ,  $q_N$ ,  $q_P$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$  et  $q_{ATP}$  dans les cultures en chémostat A ( $\diamond$ ) et B ( $\circ$ ) lors de la seconde transition N-P. (---) prédictions du modèle de co-limitation initial; (—) prédictions du modèle de co-limitation REE; (-.-) prédictions du modèle sans interaction N-P. Les codes couleurs sont identiques à ceux de la figure 6.1.

Tableau 6.1 – Valeurs mesurées au cours des 4 équilibres successifs dans les chimostats (voir chapitre 2, section 5), pour le carbone particulaire  $X$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), les quotas  $Q_C$  ( $\text{fmolC cell}^{-1}$ ),  $q_N$  et  $q_P$  ( $\text{mol molC}^{-1}$ ), les éléments résiduels  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) et  $q_{ATP}$  ( $\times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$ ). Les cultures A1 et B1, d'une part, et A2 et B2, d'autre part, sont obtenues à l'aide de deux inocula différents.

condition	équilibre	$X$	$Q_C$	$q_N$	$q_P$	$\text{NO}_3$	$\text{PO}_4$	$q_{ATP}$
culture A								
-N+P	A1-1	$1315 \pm 70^a$	$488 \pm 32^a$	$0,103 \pm 0,004^a$	$0,012 \pm 0,001^a$	nd	$109 \pm 9$	$4,8 \pm 0,6^{a,b}$
+N-P	A1-2	$527 \pm 56^b$	$574 \pm 97^b$	$0,116 \pm 0,005^b$	$0,005 \pm 0,001^{b,c}$	$64 \pm 8$	nd	$4,0 \pm 0,5^{b,c}$
+N-P	A2-3	$928 \pm 76^a$	$546 \pm 39^b$	$0,108 \pm 0,004^a$	$0,004 \pm 0,000^b$	$33 \pm 8$	nd	$3,3 \pm 0,6^c$
-N+P	A2-4	$1313 \pm 38^a$	$479 \pm 22^a$	$0,112 \pm 0,003^{a,b}$	$0,011 \pm 0,001^{a,c}$	nd	$117 \pm 1$	$5,4 \pm 0,2^a$
culture B								
-N+P	B1-1	$1415 \pm 25^a$	$544 \pm 26^{a,b}$	$0,093 \pm 0,003^a$	$0,015 \pm 0,001^a$	nd	$104 \pm 11$	$4,6 \pm 0,7^{a,b}$
+N-P	B1-2	$588 \pm 78^b$	$551 \pm 54^{a,b}$	$0,111 \pm 0,005^b$	$0,005 \pm 0,001^{b,c}$	$58 \pm 6$	nd	$3,5 \pm 0,4^a$
+N-P	B2-3	$902 \pm 130^{b,c}$	$561 \pm 50^a$	$0,109 \pm 0,006^b$	$0,003 \pm 0,000^b$	$35 \pm 11$	nd	$3,4 \pm 0,9^a$
-N+P	B2-4	$1272 \pm 28^{a,c}$	$502 \pm 30^b$	$0,116 \pm 0,003^b$	$0,011 \pm 0,001^{a,c}$	nd	$119 \pm 1$	$5,8 \pm 0,8^b$

des lettres identiques figurant en exposant dénotent l'absence de différence significative ( $\alpha = 0,05$ ).

nd : concentrations non détectables.

## 2.2 Énergie cellulaire

Au cours des cultures,  $q_{ATP}$  suit des évolutions qualitatives comparables à celles de  $q_P$  et varie dans une gamme comprise entre 2 et  $6 \times 10^{-5} \text{ molATP molC}^{-1}$ . Pour les équilibres atteints dans une même condition de limitation (N ou P), les niveaux de  $q_P$  sont statistiquement non différents. A l'inverse, le bruit sur les données à l'équilibre ne permet pas de mettre systématiquement en évidence des différences statistiquement significatives entre les conditions de limitation (table 6.1). Cependant, les cinétiques de  $q_{ATP}$  présentées dans la figure 6.3 et les valeurs moyennes de la table 6.1 traduisent des niveaux de  $q_P$  globalement plus faibles au cours des équilibres limités par le P, notamment au cours de la seconde phase expérimentale.

Lors de la première transition,  $q_{ATP}$  suit les variations de  $q_P$  avec une baisse du niveau

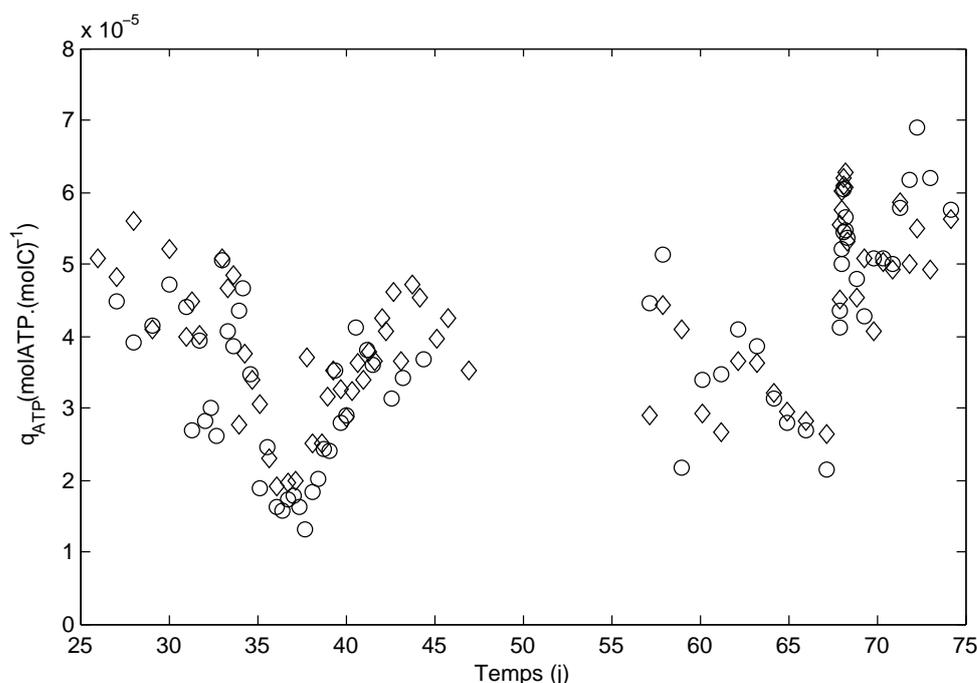


FIGURE 6.3 – Évolutions de  $q_{ATP}$  en fonction du temps dans les chémostats A (◇) et B (○). Les flèches représentent les transitions N-P.

d'ATP d'un facteur 2 à 3, lorsque  $q_P$  connaît son minimum au jour 37. Au contraire,  $q_{ATP}$  augmente très rapidement et de manière fugace au cours des 24 heures suivant la seconde transition, suite à l'enrichissement en  $\text{PO}_4$ , puis se stabilise à un niveau comparable à celui observé lors du premier équilibre.

La figure 6.4 met en lumière les différences de cinétiques et de niveaux des taux de crois-

sance ( $\mu$ ) pour les éléments C, N, P et de l'ATP particulières au cours du second transitoire N-P. Elle souligne en outre la reproductibilité des observations dans les deux cultures. Dès l'apport du  $\text{PO}_4$ ,  $\mu_P$  augmente brusquement pour atteindre des valeurs particulièrement élevées, de 12 à  $14\text{j}^{-1}$ , correspondant à un taux d'absorption de  $0,06\text{ molP molC}^{-1}\text{j}^{-1}$ . Celui-ci diminue ensuite rapidement pour tendre vers la valeur de  $\mu_C$ , 6 heures après l'enrichissement en  $\text{PO}_4$ .  $\mu_{ATP}$  suit une cinétique parallèle à celle de  $\mu_P$ , avec un maximum apparemment plus faible, bien que le premier point de mesure ne soit pas disponible. La cinétique de  $\mu_N$  se distingue de celles précédemment décrites, puisque  $\mu_N$  atteint un maximum de 1,6 à  $1,7\text{j}^{-1}$  sans délai et le conserve pendant plusieurs heures. Le taux d'absorption du  $\text{NO}_3$  est alors de  $0,2\text{ molN molC}^{-1}\text{j}^{-1}$  et se révèle légèrement supérieur à la valeur maximale de  $0,163\text{ molN molC}^{-1}\text{j}^{-1}$ , déterminée au cours des cultures en batch de l'expérience 1 (voir chapitre 4). La décroissance de  $\mu_N$  s'amorce ensuite, sous l'effet conjugué de la raréfaction du  $\text{NO}_3$  et de l'augmentation du taux de croissance des cultures. Il est enfin remarquable que  $\mu_C$  ne réponde à l'apport du  $\text{PO}_4$  qu'après un délai de plusieurs heures.

La figure 6.5 apporte un nouvel éclairage sur le lien entre  $q_{ATP}$  et  $q_P$ , et montre que, pour les plus faibles valeurs de  $q_P$ ,  $q_{ATP}$  est une fonction croissante de  $q_P$ , mais tend à saturer lorsque  $q_P$  tend vers ses niveaux les plus élevés, traduisant un découplage entre ces deux quotas. L'ensemble des données semble se répartir selon une fonction de Michaelis Menten, avec une constante de demi-saturation  $K_{q_P} = 0,0036\text{ molP molC}^{-1}$ . Le bruit lié aux mesures expérimentales ne permet cependant pas d'obtenir un ajustement très satisfaisant ( $R^2=0,66$ ).

### 2.3 Lipides neutres

La mesure de la fluorescence du Nile red, rapportée au carbone particulaire, révèle un niveau de bruit important dans les données. Ainsi, malgré des variations relatives d'un facteur 3, il demeure délicat d'analyser les variations entre les différentes phases d'équilibre des chémostats (figure 6.6). Contrairement aux autres indicateurs mesurés, les cinétiques de la fluorescence ne sont pas totalement comparables dans les deux cultures. Notamment,

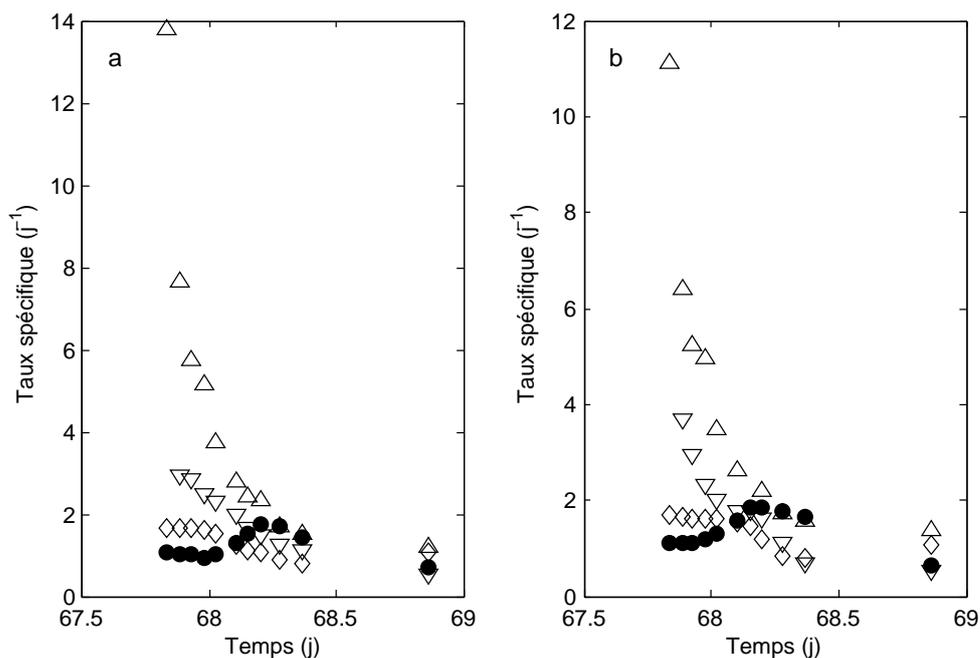


FIGURE 6.4 – Variations des taux spécifiques de fixation du carbone (●), de l’azote (◇) et du phosphore (△) particuliers et de production d’ATP (▽), au cours de la seconde transition N-P, dans les cultures A (a) et B (b) .

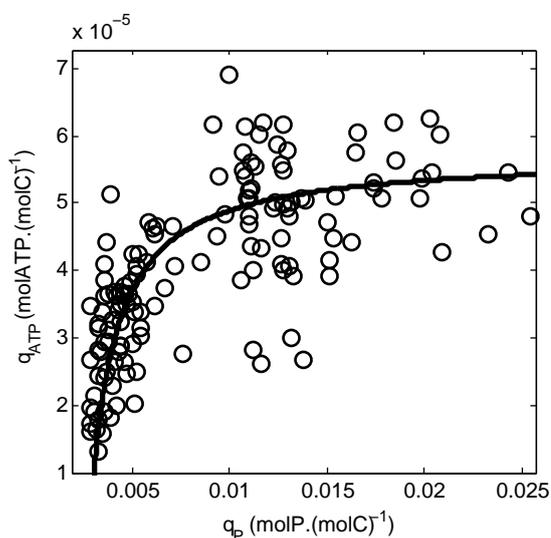


FIGURE 6.5 – Variation de  $q_{ATP}$  en fonction de  $q_P$  dans les chémostats.

la culture B montre une augmentation de la fluorescence au cours de la mise en place de la limitation P lors de la première transition N-P, augmentation qui n’est pas observée dans la culture A. En revanche, une baisse rapide de la fluorescence est enregistrée sur

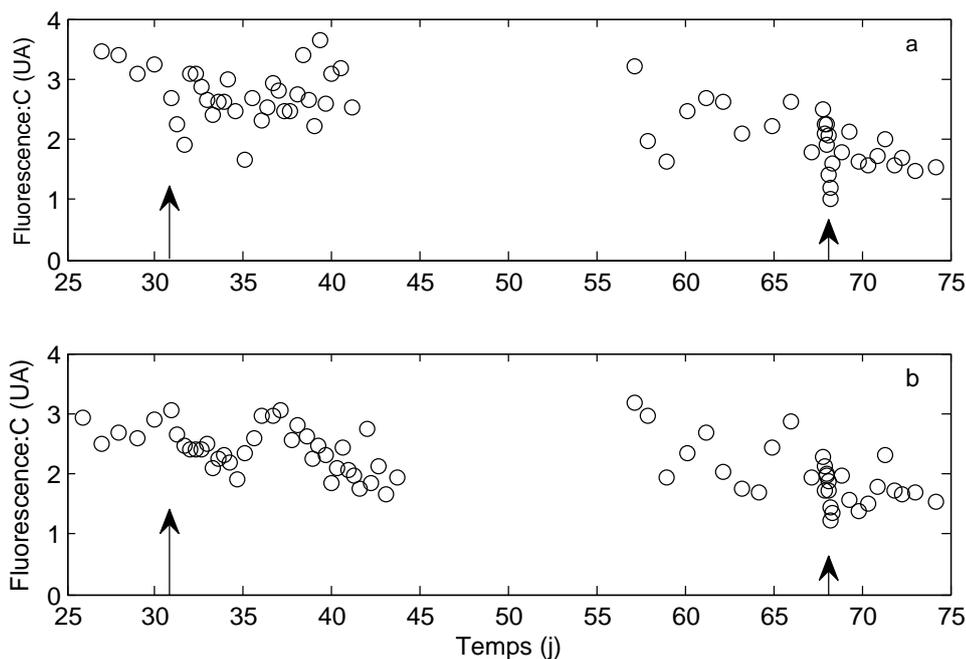


FIGURE 6.6 – Variations de la fluorescence Nile red rapportée au carbone particulaire dans les cultures en chémostat A (a) et B (b). Les flèches indiquent les transitions N-P.

les deux cultures, lors de la seconde transition, concomitante avec l'augmentation du taux de croissance. La variation de la fluorescence est marquée par un transitoire d'une durée de 24 heures, remarquablement lié à celui de  $q_{ATP}$ . Finalement, la fluorescence relative se stabilise sur une valeur d'équilibre plus faible que celle constatée au cours de l'équilibre 1.

## 2.4 Prédications du modèle de co-limitation

Une fois calibrés sur la base du jeu de données des cultures en batch (chapitre 4), le modèle de co-limitation initial et sa variante REE produisent des prédictions très similaires, pour l'essentiel. L'impact de la modification REE se traduit par l'apparition d'un compartiment NOD (N Organique Dissous) et une baisse équivalente des prédictions du  $\text{NO}_3$  en conditions de limitation par le P. Il est notable que le compartiment NOD simulé demeure très faible dans les conditions de dilution appliquées aux chémostat et ne dépasse pas  $7 \mu\text{mol N L}^{-1}$  (figure 6.7).

Le modèle REE reproduit fidèlement les niveaux d'équilibre et la plupart des dynamiques

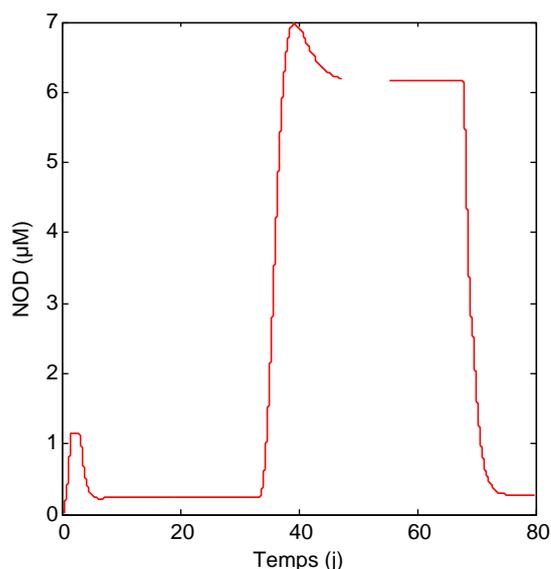


FIGURE 6.7 – Prédications du modèle REE pour l'excrétion du NOD au cours des cultures en chémostat.

transitoires des grandeurs mesurées dans les chémostats (figure 6.1). Le tableau 6.2, qui présente les écarts de prédiction du modèle REE par rapport aux données expérimentales moyennes, permet une analyse détaillée de ses capacités prédictives lors des équilibres. Au cours des équilibres précédant les transitions, les niveaux de carbone particulaire sont fidèlement reproduits par le modèle, avec un écart relatif aux mesures inférieur à 8%. Au contraire, le modèle REE surestime systématiquement le carbone particulaire résultant des transitions N-P, et conduit à des erreurs voisines de 20%. L'azote et le phosphore particulaires étant particulièrement bien simulés (annexe C), le modèle décrit également correctement les quotas  $q_N$  et  $q_P$  (tableau 6.2). Seules les prédictions de  $q_N$  lors de l'équilibre 4 s'avèrent faibles dans les deux cultures par rapport aux données expérimentales. Les cinétiques et les niveaux absolus du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$  révèlent encore les qualités du modèle, avec essentiellement des écarts très faibles entre simulations et observations. La précision de la simulation du  $\text{NO}_3$  est cependant notablement dégradée suite à la première transition conduisant à l'équilibre 2 (écart de l'ordre de 20 %).

De manière intéressante, les simulations des variations transitoires de  $q_N$ , consécutives aux transitions N-P, sont particulièrement pertinentes. La figure 6.1 montre que la première transition, qui se traduit par une augmentation de  $q_N$  est reproduite par le modèle avec une grande finesse, tant pour les niveaux atteints que pour la cinétique du transitoire. Les

variations de  $q_N$  lors de la seconde transition N-P sont également reproduites par le modèle, comme le montre la figure 6.2 : la cinétique du front montant, de même que le maximum de  $q_N$  sont fidèlement reproduits, bien que la persistance du transitoire simulé s'avère élevée par rapport aux données expérimentales. Il est à souligner enfin que le modèle reproduit l'impact de l'enrichissement en milieu nutritif accidentel, qui affecte principalement  $q_N$ .

Si le modèle parvient à décrire l'évolution du quota  $q_P$  lors de la première transition N-P, la figure 6.1 met en évidence son incapacité à reproduire l'intensité du pic de  $q_P$  consécutif à la seconde transition N-P. Le maximum atteint par  $q_P$  lors de ce transitoire ( $0,025 \text{ molP molC}^{-1}$ ) surpasse nettement la valeur de  $q_{PL}$  utilisée pour la calibration du modèle ( $0,013 \text{ molP molC}^{-1}$ ), bien que le taux d'absorption maximum calculé sur les données expérimentales ( $0,06 \text{ molP molC}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) demeure inférieur au paramètre  $\bar{\rho}_P$  du modèle ( $0,071 \text{ molP molC}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ).

Le modèle sans interaction N-P conduit à des prédictions identiques à celles du modèle de co-limitation pour la biomasse carbonée,  $q_P$  et le  $\text{PO}_4$  résiduel (figures 6.1 et 6.2). La prédiction de  $q_N$  n'est pas non plus altérée en conditions de limitation par le N (équilibres 1 et 4). En revanche, les prédictions de ce modèle divergent de celles des deux variantes du modèle de co-limitation lorsque la croissance n'est pas limitée par le N. Il ressort clairement de la figure 6.1b que le modèle sans interaction surestime les valeurs de  $q_N$  et sous-estime le  $\text{NO}_3$  résiduel lors des équilibres 2 et 3, ce qui conduit à des écarts relatifs de prédiction supérieurs à 20 % pour  $q_N$  et de 30 à 40 % pour le  $\text{NO}_3$ . De manière plus saillante encore, ce modèle s'avère incapable de saisir la dynamique transitoire caractéristique, observée sur les données expérimentales de  $q_N$ , lors de la seconde transition N-P (figure 6.2a).

## 3 Discussion

### 3.1 Qualité des prédictions du modèle

Les deux variantes du modèle de co-limitation conduisent à des prédictions très similaires et tout aussi pertinentes face aux données expérimentales. Elles démontrent les qualités nécessaires pour en prédire les tendances majeures. Tout particulièrement, les mo-

Tableau 6.2 – Écarts —en pourcentage— des prédictions du modèle aux valeurs expérimentales d'équilibre. Les écarts sont calculés relativement à l'étendue des variations possibles pour chaque facteur (voir chapitre 2, section 8).

équilibre	$X$	$q_N^a$	$q_P^a$	$\text{NO}_3$	$\text{PO}_4$
culture A					
1	8	-10	-8	0	6
2	23	-3	-11	-23	0
3	-2	4	-3	-5	0
4	17	-19	1	0	-3
culture B					
1	2	-2	-33	0	-1
2	19	2	-11	-30	0
3	3	3	-3	-5	0
4	20	-23	1	0	-2

*a.* dans le cas des quotas, l'étendue représente l'expression  $q_L - q_0$ , selon le paramétrage du modèle.

dèles capturent les principales évolutions qualitatives et quantitatives des quotas limitants et non limitants pour les deux éléments N et P, ce que le modèle sans interaction ne parvient pas à réaliser.

La similarité des prédictions de chaque modèle tient aux conditions expérimentales, et particulièrement au taux de dilution imposé. Dans les conditions de limitation par le P, le quota  $q_P$  conserve des valeurs suffisamment élevées pour ne pas conduire à une importante excrétion d'azote organique : le modèle REE prédit ainsi de faibles concentrations en N organique — de l'ordre de  $6 \mu\text{mol N L}^{-1}$  — qui sont difficilement accessibles à l'expérimentation, en raison de l'apport d'azote lié à l'EDTA. Le bilan des différentes fractions de l'azote (fractions particulaire et minérale dissoute ( $\text{NO}_3$ ) *versus* azote total) au cours de la première transition N-P, confirme cette prédiction.

**Importance de l'interaction N-P** Les dynamiques du quota  $q_N$  méritent d'être discutées à la lumière de la comparaison du modèle de co-limitation REE au modèle sans interaction N-P. La prise en compte de l'interaction N-P résulte en un comportement du quota  $q_N$  conforme aux données expérimentales. Durant l'établissement de la limitation

par le P au cours de la première transition, le modèle de co-limitation REE prédit une augmentation modérée du quota  $q_N$  jusqu'à une nouvelle valeur d'équilibre, qui reflète l'évolution des données expérimentales. Au contraire, le modèle sans interaction simule une augmentation excessive de  $q_N$  vers sa valeur de saturation pour le taux de croissance fixé. La mise en place de la limitation par le  $\text{NO}_3$  au cours de la seconde transition N-P, entraîne, dans ce dernier modèle, une baisse de  $q_N$  vers son nouveau niveau d'équilibre. Au contraire, le modèle de co-limitation REE simule un pic de  $q_N$ , qui est effectivement observé sur les données expérimentales. Il est à noter que le maximum mesuré pour le pic de  $q_N$  correspond au niveau de saturation du quota à ce taux de dilution, bien prédit par les deux modèles. Ces dynamiques de  $q_N$  observées expérimentalement montrent ainsi l'apport crucial des différentes formulations adoptées pour les absorptions de N et P dans le modèle de co-limitation.

**Prédictions et transitoires** Dans certaines situations, pourtant, notre modèle ne parvient pas à rendre compte des évolutions de toutes les variables. Notamment, les simulations pour la première transition N-P conduisent à une surestimation du carbone particulaire à l'équilibre et à une sous-estimation assez remarquable du  $\text{NO}_3$  résiduel, alors que les dynamiques de  $q_N$  sont bien reproduites. A ce stade des expériences, la perte ultérieure des cultures ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une situation transitoire, bien que le modèle et les données semblent finalement converger. Un tel comportement pourrait résulter d'une répression de la fixation de carbone, liée à l'accroissement de la disponibilité en  $\text{NO}_3$ , comme déjà observé par d'autres auteurs (Davies et Sleep, 1989; Falkowski et Stone, 1975). Ce type d'interaction avec le carbone n'étant pas pris en compte dans le modèle, ce dernier ne peut parvenir à en restituer les effets.

Consécutivement à la seconde transition N-P, sous l'effet de la brusque absorption de  $\text{PO}_4$ ,  $q_P$  augmente rapidement au-delà de sa valeur future d'équilibre, et cette cinétique n'est pas non plus correctement reproduite par le modèle de co-limitation. Bien que, dans ces conditions, le taux d'absorption de  $\text{PO}_4$  demeure inférieur au paramètre théorique  $\bar{\rho}_P$ , le quota expérimental  $q_P$  dépasse à la fois la valeur d'équilibre prédite et le paramètre  $q_{PL}$  du modèle. Cette observation, qui reflète la forte plasticité du quota  $q_P$  (Elrifi et Turpin, 1985), peut résulter d'un phénomène de prise d'urgence, bien connu sur les cultures de

microalgues carencées en P (Jansson, 1993).

Durant la dernière phase expérimentale, les cultures limitées par le N ne retrouvent pas un quota  $q_N$  et un niveau de carbone particulaire à l'équilibre équivalents à ceux de la première série expérimentale, et les simulations du modèles s'éloignent des données. Les causes de ce comportement demeurent obscures et le contrôle des divers paramètres de culture (éclairage, pH, température, taux de dilution ...) ne permet pas de l'expliquer. Les données suggèrent que ce niveau élevé du quota  $q_N$  pourrait être dû à une baisse du taux de fixation de carbone, plutôt que de l'azote particulaire (annexe C), qui est, par ailleurs, bien simulé par le modèle de co-limitation REE. Bien qu'il demeure spéculatif, un phénomène d'hystérésis du taux de fixation du carbone peut être envisagé, résultant de la seconde transition N-P ou du sur-enrichissement accidentel ultérieur. Selon les conditions de limitation, Healey (1979) souligne en effet la possibilité d'une répression durable de la fixation de carbone après un enrichissement en nutriment. Cette hypothèse est à rapprocher également de la baisse du taux de fixation du carbone suggérée à l'occasion de la première transition.

## 3.2 Interactions N-P

**Régulations transitoires** Au-delà de l'intensité de certains transitoires, le modèle capture les dynamiques qualitatives essentielles, ce qui permet d'en discuter les hypothèses sous-jacentes.

Au cours des deux transitions N-P, la fixation de carbone semble soumise à une contrainte énergétique imposée par la demande de l'absorption de  $\text{PO}_4$  et de  $\text{NO}_3$ , comme le propose la figure 6.8. Dans le cas de la première transition, la concomitance entre les minima de  $\mu_C$  et  $q_{ATP}$  (et  $q_P$ ) souligne cette contrainte. La disparition du  $\text{PO}_4$  conduit tout d'abord à une forte limitation du taux de croissance  $\mu_C$  (figure 6.8-A). L'absorption du  $\text{NO}_3$  est affectée proportionnellement, ce qui se traduit par une stabilisation de  $q_N$ . Dans un second temps, la décroissance du carbone particulaire tend à réduire la limitation par le  $\text{PO}_4$  (et le  $\text{NO}_3$ ) et permet une élévation de  $q_{ATP}$  (figure 6.8-B). La progressive levée de la contrainte énergétique profiterait dans un premier temps à l'absorption du  $\text{NO}_3$ , expliquant le plus

faible niveau de carbone particulaire, relativement aux prédictions du modèle, lors de la sortie de la première transition N-P.

A l'occasion de la seconde transition, le taux d'absorption de  $\text{PO}_4$  connaît une remarquable et brutale augmentation, de l'ordre d'un facteur 12 à 14. Un tel niveau de réponse a déjà été souligné par Laws et al. (2011) chez *Tetraselmis suecica*, où le taux spécifique d'absorption de phosphate peut atteindre des niveaux 20 à 30 supérieurs au taux de croissance. Dans les chémostats, ce taux d'absorption permet une restauration de  $q_{ATP}$  à un niveau élevé (figure 6.8-C). Parallèlement, les absorptions simultanées de  $\text{NO}_3$  et de  $\text{PO}_4$ , induisent une demande accrue en ATP : sous l'hypothèse de 4 moles d'ATP hydrolysées par mole de  $\text{PO}_4$  transporté (Sakano, 1990) et de 1 mole d'ATP par  $\text{NO}_3$  transporté (Turpin, 1991), la demande liée au transport de  $\text{NO}_3$  et de  $\text{PO}_4$  est multipliée par un facteur 3 lors du pic de la seconde transition N-P, relativement à l'équilibre antérieur, limité par le P. Dans le cas où l'on considère l'assimilation du N, qui nécessite 6 ATP par  $\text{NO}_3$  (Turpin, 1991), la demande est multipliée par un facteur 2. Le doublement de  $q_{ATP}$  serait ainsi totalement absorbée par l'accroissement de la demande liée au transport et à l'assimilation de  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$ . Ceci pourrait expliquer le temps de latence précédant la réponse du taux de croissance. Une fois les quotas  $q_N$  et  $q_P$  saturés, la baisse des taux d'absorption relaxerait la contrainte énergétique, au profit du taux de croissance  $\mu_C$  (figure 6.8-D). Enfin,  $q_P$  et  $q_N$  diminuent vers leur valeur d'équilibre sous l'effet de l'augmentation du taux de croissance.

Le retard du taux de croissance peut être rapproché des résultats rapportés par Falkowski et Stone (1975), Healey (1979) et Davies et Sleep (1989) qui, ayant constaté que l'enrichissement en N de cultures limitées réprime partiellement la fixation de carbone, suggèrent une compétition des deux fonctions pour l'énergie cellulaire, à travers l'ATP. Davies et Sleep (1989) ont également précisé que l'inhibition est d'autant plus marquée que les microalgues présentent un plus faible  $q_P$ . Chez *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricorutum* où cette répression a également été observée, Terry (1982a) propose que la fixation de carbone soit réprimée par l'absorption de  $\text{NO}_3$  plutôt que par son assimilation, sans exclure un lien possible avec cette dernière. Les résultats ici obtenus sont en accord avec ceux des précédents auteurs, et il semble que l'augmentation de  $q_{ATP}$  bénéficie prioritairement à l'acquisition de  $\text{PO}_4$  et de  $\text{NO}_3$ , tant que ces derniers demeurent non limitants

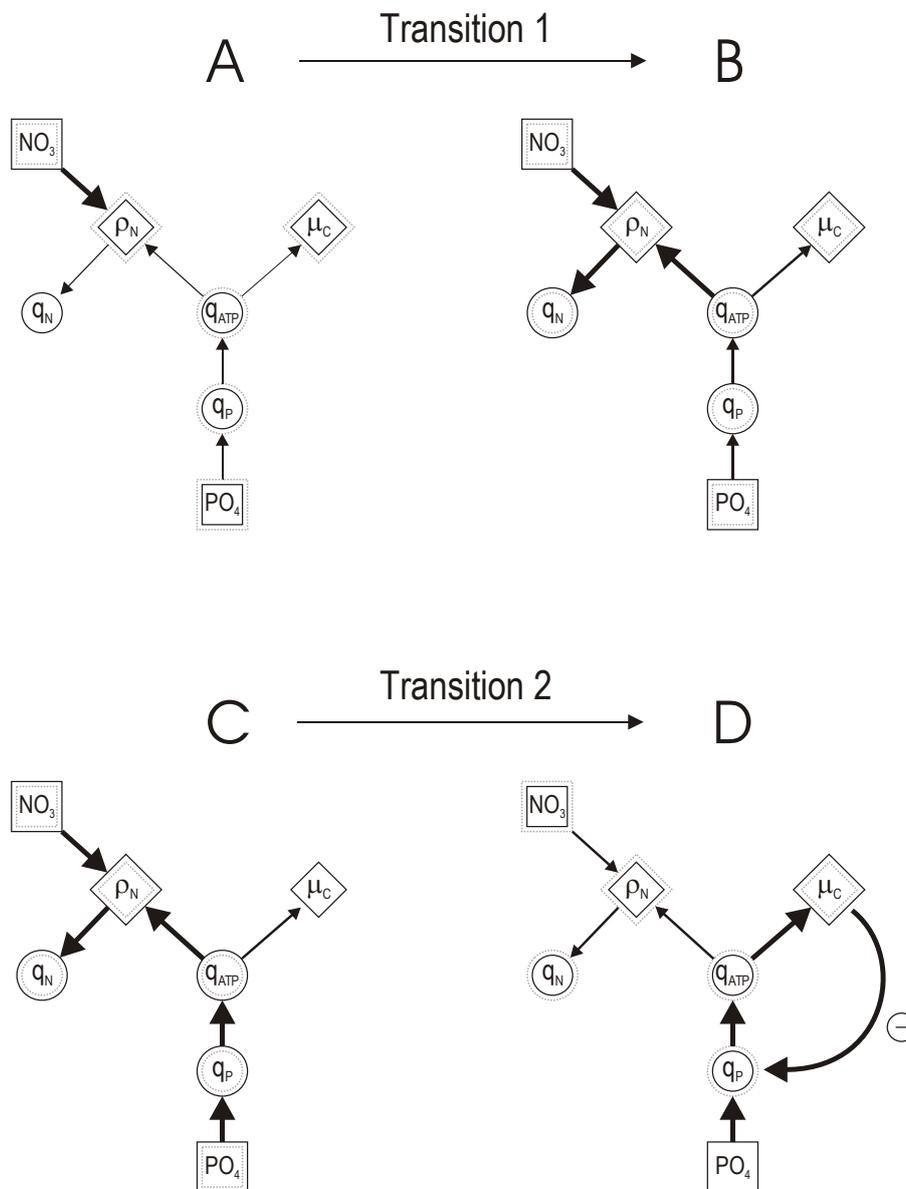


FIGURE 6.8 – Représentation schématique de l’hypothèse de compétition entre les fonctions d’absorption et de fixation de carbone pour l’ATP disponible lors des deux transitions N-P. Chacune des transitions comporte deux phases successives correspondant à la perte des conditions d’équilibre antérieures (A et C) et à l’adaptation progressive aux nouvelles (B et D). Pour chaque paramètre ou fonction, la tendance d’évolution est traduite par la taille du symbole, en adoptant une ligne pointillée grise pour l’état initial et une ligne continue noire pour l’état final. L’épaisseur des flèches traduit l’intensité des flux.

pour l'absorption.

Contrairement aux observations de Terry (1982a), nos données en chémostats ne révèlent pas d'inhibition de l'absorption de  $\text{NO}_3$  suite à un enrichissement en  $\text{PO}_4$ . Au contraire, l'absorption de  $\text{NO}_3$  atteint ici rapidement un maximum pendant le pic d'absorption de  $\text{PO}_4$ . Dans ces conditions, *Tisochrysis lutea* ne semble pas prioriser l'absorption du  $\text{PO}_4$  sur celle du  $\text{NO}_3$ , contrairement à ce qui a été observé chez *Pavlova lutheri*, *Thalassiosira weissflogii* ou encore *Phaeodactylum tricoratum*. Ce type d'interactions semble toutefois sujet à des modulations liées au statut nutritif de la cellule : Healey (1979) ont ainsi montré que l'effet de l'enrichissement sur la répression de la fixation de carbone est lié au degré de limitation initial en  $\text{NO}_3$  ou  $\text{PO}_4$ .

La simultanéité des évolutions des quotas  $q_P$ ,  $q_{ATP}$  et  $q_N$  au cours de la seconde transition rend difficile l'interprétation des processus mis en jeu. Il paraît évident que la limitation de l'absorption du  $\text{NO}_3$ , liée à la disparition du substrat est responsable de la baisse de  $q_N$ . Par ailleurs, le lien très fort entre les évolutions rapides de  $q_N$  et de  $q_{ATP}$  pourrait suggérer une sensibilité de  $q_{ATP}$  au statut azoté de la cellule. Le rapport N:P de l'ATP — égal à 1,7 — permet d'envisager une telle relation, mais les rares informations de la littérature à ce sujet ne permettent pas de l'étayer. En effet, Healey (1979) souligne que l'apport de  $\text{NH}_4$  ne génère qu'une très faible variation de  $q_{ATP}$  chez *Scenedesmus quadricauda*. En outre, la figure 6.4 ne montre pas de rupture dans l'évolution de  $\mu_{ATP}$  lors de l'épuisement du  $\text{NO}_3$ , ce qui semble également infirmer l'existence d'un lien direct.

Notre modèle de co-limitation postule que le siège de la co-limitation se situe au niveau de la machinerie d'acquisition. Il en résulte que la prise en compte de l'interaction N-P n'influence pas la relation entre le taux de croissance et les quotas, en accord avec les observations de Rhee (1978). Les simulations du modèle de co-limitation sont généralement concordantes avec les équilibres du carbone particulaire atteints dans les chémostats. En revanche, la première transition N-P, au cours de laquelle le  $\text{NO}_3$  et le  $\text{PO}_4$  décroissent simultanément à des niveaux très faibles et conduisent potentiellement à une situation de co-limitation, provoque une répression du taux de croissance et un niveau de biomasse plus faible, probablement de manière transitoire. Les observations de Rhee (1978) ne sont cependant pas nécessairement en désaccord avec nos résultats. Rhee n'a évalué les interac-

tions entre éléments limitants qu'à l'équilibre. Or, les interactions C-N-P mises à jour par des études plus anciennes (Falkowski et Stone, 1975; Healey, 1979; Terry, 1982a,b) n'ont été observées qu'en situations transitoires, à relativement court terme. La possible convergence des données de la première série d'expérience en conditions de limitation par le P vers les prédictions du modèle de co-limitation et le niveau d'équilibre effectivement atteint ultérieurement tend à soutenir l'hypothèse de phénomènes transitoires non décelables sur les croissances équilibrées.

**ATP : un rôle central ?** Bien que  $q_{ATP}$  ne représente qu'une très faible fraction de  $q_P$  (0,2 à 1 %), ce quota s'avère fortement affecté par la disponibilité en  $PO_4$  dans les chémostats. Les variations — d'un facteur 5 — enregistrées au cours des cultures font de cette molécule énergétique centrale un candidat crucial dans le processus de co-limitation. Malgré la variabilité des mesures,  $q_{ATP}$  semble décrire une fonction saturante de  $q_P$  dans les chémostats (figure 6.5). Ce type de relation peut être interprété par la forte capacité des microalgues à stocker un excédent de P sous forme de polyphosphates, jusqu'à 40 % du P cellulaire total (Eixler et al., 2006). Il en résulte que le pool fonctionnel de P possède des variations nettement plus faibles, et que l'activation de l'absorption de  $NO_3$  par  $q_P$  ne devrait intervenir que pour des valeurs de  $q_P$  relativement faibles. La figure 6.5 montre que  $q_{ATP}$  co-varie avec  $q_P$  pour des valeurs de  $q_P$  inférieures à environ  $0,01 \text{ molP molC}^{-1}$ . Il s'avère que la valeur maximale de cette gamme est proche de la valeur  $q_{PL}$  utilisée dans le modèle ( $0,013 \text{ molP molC}^{-1}$ ), ce qui justifie le recours à un terme de régulation linéaire. En conditions de limitation par le P,  $q_{ATP}$  subit une réduction moyenne de 26 % par rapport aux conditions de limitation par le N, au taux de dilution étudié. Ce résultat est en adéquation avec la baisse de 30 % observée chez *Thalassiosira weissflogii* sous les mêmes conditions de croissance (Laws et al., 1983a). L'ampleur de ces variations demeure toutefois limitée au regard de celles enregistrées sur la gamme des taux de croissance parcourue au cours des cultures en batch de *Tisochrysis lutea* (voir chapitre 4), et explique que les différences de  $q_{ATP}$  ne soient pas ici toujours significatives entre les équilibres (tableau 6.1). A l'équilibre, le taux de fixation de carbone est corrélé au taux de croissance et, par conséquent, celui-ci est identique sous les deux régimes de limitation. En raison de sa forte consommation d'énergie, l'assimilation du  $NO_3$  en conditions de limitation par le P pour-

rait représenter l'une des principales variables d'ajustement de la consommation d'ATP dans une logique d'allocation optimale (Shuter, 1979).

Les travaux de Theodorou et al. (1991) et Gauthier et Turpin (1994) sont en faveur de cette hypothèse. En effet, Theodorou et al. (1991) ont observé que l'apparition d'une limitation par le  $\text{PO}_4$  se traduit chez *Selenastrum minutum* par la réduction des taux de respiration et de photosynthèse et par une diminution de 70 % de  $q_{ATP}$  et du pool adénylate. Ils suggèrent que l'activité métabolique est limitée par la faible disponibilité en ADP et Pi. En réponse, la cellule privilégierait des voies glycolytiques alternatives, comme celles de la phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase et de la PEP phosphatase, indépendantes de l'ADP — et ne produisant donc pas d'ATP —, qui permettent un recyclage de Pi vers le chloroplaste pour la synthèse d'ATP par photophosphorylation, nécessaire à la fixation de carbone. Pant et al. (2014) ont récemment rapporté une baisse des métabolites phosphorylés chez *Arabidopsis thaliana* carencée par le P, concomitante avec une augmentation de certains acides aminés, qu'ils attribuent préférentiellement à une inhibition de la synthèse protéique. Ces travaux appuient l'hypothèse que le métabolisme limité par le P, en réduisant la disponibilité de l'ATP, puisse résulter en une limitation du transport actif de  $\text{NO}_3$  et *a fortiori* de son assimilation.

Au contraire, lors de la levée de la limitation par  $\text{PO}_4$ , Gauthier et Turpin (1994) proposent que l'activité de l'ATPase plasmalemmique, étroitement couplée au co-transport  $\text{H}^+/\text{Pi}$ , génère une demande accrue d'ATP. Celle-ci serait satisfaite par une augmentation de l'activité respiratoire chez *Selenastrum minutum*, soutenue à l'obscurité par la dégradation d'amidon. Gauthier et Turpin (1997) apportent des précisions sur les mécanismes mis en jeu en phase claire : la demande en trioses-P serait alors satisfaite par l'exportation d'intermédiaires du cycle de Calvin hors du chloroplaste, et pourrait ainsi conduire à une plus faible régénération du ribulose bi-phosphate et à la suppression de la fixation de carbone pendant l'assimilation du  $\text{PO}_4$ . En l'absence d'une stimulation forte de la respiration en phase claire, la demande d'ATP liée au transport de  $\text{PO}_4$  serait supportée pour l'essentiel par l'activité photosynthétique.

La levée de la limitation par le  $\text{NO}_3$  a également été étudiée chez *Selenastrum minutum* par Elrifi et Turpin (1986, 1987). L'assimilation du  $\text{NO}_3$  induit une demande accrue en

$\alpha$ -cétoglutarate, une augmentation de l'activité respiratoire et la suppression de 70 % de la fixation de carbone. La durée de la suppression est dépendante de l'apport du  $\text{NO}_3$ . Pour être soutenue, l'assimilation de  $\text{NO}_3$  stimulerait l'activité du cycle de Krebs, elle-même alimentée par l'exportation de trioses-P du chloroplaste. L'assimilation de N entraînerait donc une compétition pour les squelettes carbonés avec le cycle de Calvin, ce qui conduirait finalement à la suppression de son activité. En outre, il est notable, chez *Anabaena cylindrica* sous limitation azotée, que l'apport de  $\text{NH}_4$  se traduit par une baisse de  $q_{ATP}$  (Ohmori et Hattori, 1978). Ohmori et Hattori suggèrent que cette baisse d'ATP serait spécifiquement liée à la synthèse de glutamine. Cependant, l'existence d'un transport actif de  $\text{NH}_4$  couplé une ATPase membranaire n'est toujours pas claire (Ludewig, 2002), et il est envisageable que, dans le cas de  $\text{NO}_3$ , cette consommation d'ATP puisse également relever du transport, comme le suggèrent Elrifi et Turpin (1986).

Les études précédentes offrent un cadre mécaniste aux observations répétées de répression de la fixation de carbone consécutive à la levée d'une limitation par un élément nutritif (Healey, 1979; Terry, 1982a,b). Elles permettent également d'interpréter le délai observé lors de la seconde transition entre l'absorption de  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$  et l'augmentation du taux de croissance. Le retard, plutôt qu'une réelle suppression de la fixation de carbone, peut enfin être envisagé comme une modulation de l'impact de l'absorption sur le cycle de Calvin : Elrifi et Turpin (1986) proposent en effet que, chez *Selenastrum minutum*, selon le niveau des réserves, le carbone de stockage puisse apporter une contribution à la demande en trioses-P lors de l'enrichissement en  $\text{NO}_3$ . Enfin, le faible niveau de carbone particulaire atteint après la première transition N-P peut également être interprété à la lumière des hypothèses précédentes. Après la remarquable diminution de  $q_{ATP}$ , consécutive à l'épuisement du  $\text{PO}_4$ , la baisse de biomasse microalgale entraîne une remise à disposition progressive du  $\text{PO}_4$ . L'absorption de ce dernier conduirait alors à une répression de la fixation de carbone et à un niveau d'équilibre apparent de la biomasse plus faible que le niveau prédit par le modèle. Le fait que le niveau d'équilibre en conditions de limitation par le P soit supérieur au cours de la seconde phase expérimentale est en accord avec l'hypothèse d'une suppression temporaire. La répression de la fixation de carbone se traduirait enfin par une plus faible disponibilité de squelettes carbonés qui pourrait alors devenir limitante pour

l'assimilation du  $\text{NO}_3$ , expliquant le niveau élevé du  $\text{NO}_3$  résiduel effectivement mesuré dans les chémostats et sous-estimé par le modèle.

### 3.3 Lipides neutres

La précision des mesures du quota de lipides neutres estimées par la fluorescence du Nile red dépend d'un ensemble de conditions opératoires (De la Hoz Siegler et al., 2012; Pick et Rachutin-Zalogin, 2012). Les concentrations relatives en cellules et en Nile red, la température et la durée d'incubation, les conditions de conservation et l'évaporation du solvant acétone sont autant de facteurs qui affectent considérablement les résultats. Bien que les précautions dans ce sens aient été prises, les données de fluorescence Nile red présentent une variabilité élevée dans les chémostats, qui gêne l'analyse comparative du niveau de lipides neutres à l'équilibre pour les deux conditions de limitation par le N et par le P. Lors des transitions N-P, les cinétiques de fluorescence fournissent néanmoins des indications intéressantes sur la réponse du quota de lipides neutres.

Au cours de la première transition, l'évolution de la fluorescence dans le chémostat B traduit une accumulation de lipides neutres à partir du jour 34. Les variations de la fluorescence s'opèrent concomitamment, mais en opposition avec celles de  $q_{ATP}$  et du taux de croissance. L'accumulation de lipides neutres en conditions de limitation par le P a été signalée à maintes reprises (Guschina et Harwood, 2006; Khozin-Goldberg et Cohen, 2006; Ruangsomboon et al., 2013). Un phénomène analogue a été rapporté par Theodorou et al. (1991) chez la microalgue verte *Selenastrum minutum*, où le faible niveau énergétique s'accompagne d'une diminution des activités photosynthétique et respiratoire, et entraîne une accumulation d'amidon.

A l'occasion de la seconde transition N-P, la fluorescence du Nile red révèle une baisse importante du quota de lipides neutres, concomitante avec l'augmentation brutale de l'activité d'absorption du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$ . Si Falkowski et Stone (1975) identifient la source d'ATP pour le transport du  $\text{NO}_3$  comme provenant de la photophosphorylation acyclique, Terry (1982b) montre que l'absorption du  $\text{NO}_3$  demeure active à l'obscurité, ce qui serait également le cas pour le  $\text{PO}_4$  : il y aurait donc deux composantes d'absorption, dépendante ou non de la lumière. L'ATP nécessaire à la composante d'absorption indépendante

de la lumière trouverait sa source dans la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse est corroborée par Elrifi et Turpin (1986), selon lesquels l'assimilation d'un apport transitoire de  $\text{NO}_3$  est soutenue par une forte activité du cycle de Krebs. Ces observations supportent enfin l'idée que, lors de la seconde transition N-P, l'énergie nécessaire au transport et à l'assimilation des deux nutriments pourrait être fournie en partie par le catabolisme lipidique, et expliquent la baisse brutale du quota de lipides neutres observée.

Les différentes situations de limitations, simples ou conjuguées, générées au cours de ces expériences ne semblent pas produire d'effet particulier sur la production de lipides. Notamment, lors de la première transition N-P, les lipides neutres accumulés sont rapidement consommés lorsque les cultures abordent le nouvel équilibre, avec la reprise de la croissance.

## 4 Conclusion

Les expériences en chémostats nous apportent des éclaircissements sur les couplage dynamiques observés entre les quotas cellulaires. Les résultats suggèrent d'une part que les dynamiques de  $q_N$  sont intimement liées à celles de  $q_P$  et  $q_{ATP}$  et, d'autre part, qu'en absence de stockage de polyphosphates, il existe un lien fort entre  $q_{ATP}$  et  $q_P$ . Nos résultats concordent avec l'ensemble des études conduites sur le métabolisme et le statut nutritif N-P pour proposer un rôle central de l'ATP — direct ou non — dans l'interaction N-P.

Le modèle de co-limitation initialement proposé et sa variante REE génèrent des prédictions très similaires. Les deux modèles reproduisent la plupart des données expérimentales. Notamment, les niveaux d'équilibre sont bien prédits, ainsi que l'augmentation brutale de  $q_N$  consécutive à un apport de  $\text{PO}_4$ . Au contraire, le modèle sans interaction ne parvient pas à décrire les dynamiques observées expérimentalement pour  $q_N$ , ce qui souligne l'importance de la prise en compte de l'interaction N-P.

D'un autre côté, les transitions N-P expérimentalement générées produisent des dynamiques qu'aucune des variantes du modèle ne parvient à décrire. C'est le cas de la répression de la fixation du carbone observée au cours de la première transition, et de la prise d'urgence de  $\text{PO}_4$  lors de la seconde. Cette incapacité du modèle à reproduire ces dynamiques marque ses limites.

Enfin, les variations de la fluorescence Nile red enregistrées suggèrent un lien étroit entre

l'accumulation et le catabolisme des réserves lipidiques d'une part, et le niveau du quota  $q_{ATP}$  d'autre part. Les différentes limitations étudiées n'ont cependant pas permis de mettre en évidence un effet significatif de la co-limitation N-P sur la dynamique du quota en lipides, ni sur leur productivité.



# Chapitre 7

## Discussion générale

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Les interactions au cœur du débat . . . . .</b>	<b>156</b>
<b>2</b>	<b>Des hypothèses concurrentes . . . . .</b>	<b>157</b>
2.1	Quel médiateur pour l'interaction N-P ? . . . . .	159
	Sensibilité de l'ARN et de l'ATP aux limitations . . . . .	159
	Une absence de mesure directe du quota ARNr . . . . .	161
	Une efficacité ribosomique variable . . . . .	162
2.2	Quels mécanismes pour la co-limitation N-P ? . . . . .	162
	La régulation du transport . . . . .	162
	Le découplage absorption-assimilation . . . . .	163
2.3	Influence de la co-limitation N-P sur le taux de croissance . . . . .	165
<b>3</b>	<b>Les implications de la co-limitation N-P . . . . .</b>	<b>166</b>
<b>4</b>	<b>Perspectives . . . . .</b>	<b>168</b>
4.1	Vers des expériences complémentaires . . . . .	168
4.2	Quelles améliorations pour le modèle ? . . . . .	169

---

## 1 Les interactions au cœur du débat

Au cours des dernières décennies, un nombre croissant d'évidences expérimentales a convaincu de l'importance des interactions des facteurs du milieu sur le comportement des organismes phytoplanctoniques. La notion d'interaction recouvre des phénomènes et des échelles variés, se répercutant du niveau cellulaire à celui des populations. Les besoins propres à chaque espèce aboutissent à une compétition interspécifique ou communautaire (Arrigo, 2005) pour les ressources nutritives limitées, laquelle se reflète dans les successions temporelles des populations. A l'échelle de la cellule, les contraintes du milieu — physico-chimiques et nutritives — interfèrent sur le métabolisme à travers une diversité de processus ; Maberly (1985) souligne l'importance fondamentale de la prise en compte de ces interactions dans les études physiologiques.

Le développement des populations phytoplanctoniques dépend étroitement des combinaisons des facteurs physico-chimiques du milieu. Des interactions entre le pH, la disponibilité en carbone inorganique du milieu, la température et l'éclairement ont pu être mises en évidence tant sur la croissance (Marchetti et al., 2012) que sur l'activité photosynthétique (Maberly, 1985). Shatwell et al. (2014) ont fait état d'interférences entre la température et la limitation par le P sur le taux de croissance et l'absorption du  $\text{PO}_4$ .

Les interférences entre un facteur abiotique tel que l'éclairement et le statut nutritif sont aujourd'hui largement reconnues. C'est notamment le cas pour les interactions éclairement-azote (Sciandra et al., 1997) ou éclairement-fer, cette dernière ayant été maintes fois étudiées (Boyd, 2002; Timmermans et al., 2001).

Enfin, ainsi que cela a été démontré dans le chapitre 1, il existe une variété importante de processus impliqués dans les interactions entre ressources nutritives. Dans certains cas, la co-limitation entre les ressources peut être associée à un processus biochimique précis, et c'est notamment le cas des éléments métalliques. La nature de la co-limitation devient plus délicate lorsque les acteurs mis en jeu représentent une part importante de la composition élémentaire des microalgues. C'est pourquoi les hypothèses émises pour tenter d'expliquer les co-limitations N-C (Clark, 2001), N-Si (Davidson et Gurney, 1999) et particulièrement

l'interaction N-P demeurent plus spéculatives. Dans ce dernier cas, la suggestion d'un processus de co-limitation biochimique doit conduire à en identifier les mécanismes et à en étudier les répercussions sur le développement des populations phytoplanctoniques.

La fréquence des interactions justifie enfin leur prise en compte dans les approches de modélisation. Pour être opérationnelle à l'échelle de modèles globaux, cette démarche requiert des formulations capables de reproduire les réponses caractéristiques du phytoplancton tout en demeurant suffisamment simples pour garantir l'identification des paramètres. Cette simplicité permet en outre d'identifier plus clairement les processus clés responsables du phénomène de co-limitation.

## 2 Des hypothèses concurrentes

Certains auteurs ont récemment développé des approches de modélisation basées sur des hypothèses différentes de co-limitation, mais qui reproduisent également des différences de comportement des quotas  $q_N$  et  $q_P$ .

Agren (2004) a été le premier à proposer une interaction N-P au niveau de la machinerie d'assemblage. Il postule que le taux de synthèse protéique dépend du niveau d'ARN ribosomique (ARNr) disponible. L'ARN captant une part importante de  $q_P$ , il en résulterait une co-limitation biochimiquement dépendante entre les deux éléments. Ce modèle parvient à représenter la différence de comportement des quotas observée par Elrifi et Turpin (1985) chez *Selenastrum minutum*.

Dans une évolution de son modèle s'adressant aux végétaux en général, Agren et al. (2012) suppose une allocation différentielle de la ressource carbonée aux fonctions d'absorption de N et P, et différencie des pools structurels (non mobilisables) et labiles (mobilisables) pour les éléments N, P et C (annexe F). Trois niveaux d'interactions entre N et P sont considérés : l'absorption d'un nutriment est régulée par l'allocation différentielle de carbone photosynthétique aux fonctions d'absorption de N et de P (1), et par une rétroaction des pools structurels correspondants ; au-delà de la régulation de la synthèse protéique par l'ARNr (2), la synthèse de P structurel (ARNr) est sous dépendance de l'azote, par l'intermédiaire des enzymes impliquées (3). Ce modèle prédit une large gamme de rapports N:P pour laquelle il y aurait co-limitation, et la loi du minimum ne serait approchée que

pour des taux de croissance très faibles. La croissance est davantage stimulée par un apport conjugué des deux éléments co-limitants que par l'enrichissement en l'un ou l'autre exclusivement.

Pahlow et Oschlies (2009) ont proposé un modèle mécaniste complexe de co-limitation en chaîne (annexe G). Comme dans le modèle d'Agren (2004), la synthèse protéique est contrôlée par la disponibilité d'ARNr. Ce contrôle possède des répercussions sur la machinerie d'acquisition : alors que l'acquisition de  $\text{PO}_4$  ne dépend que de la disponibilité en protéines de transport, l'assimilation de  $\text{N-NO}_3$  ou  $\text{N-NO}_2$  nécessite des réductions successives faisant intervenir des chaînes de transformations enzymatiques. L'acquisition de N est donc dépendante à la fois des protéines de transport et du taux de synthèse des protéines enzymatiques, gouverné par l'ARNr. Enfin, puisque le N contrôle la synthèse des apoprotéines constitutives des complexes chlorophylliens et de la RUBISCO pour la fixation du carbone, le taux de croissance est ici directement déterminé par la taille de l'appareil photosynthétique en conditions de limitation par le N. Le contrôle de P sur le taux de croissance n'intervient qu'indirectement à travers le taux de synthèse protéique. Ce modèle prédit une croissance co-limitée dans une large gamme de rapports d'enrichissements N:P. En outre, il prédit l'invariance de  $q_N$  sous limitation N et P, un résultat qui est en contradiction avec les évidences expérimentales obtenues ici pour *Tisochrysis lutea* et par Healey (1985) et Elrifi et Turpin (1985)

Bonachela et al. (2013) ont développé un modèle basé sur les processus régulateurs de la synthèse des protéines d'acquisition (annexe H). Bonachela et al. considèrent une première fonction  $F$  qui active la synthèse des protéines d'absorption de N ou de P, en fonction du remplissage du quota de l'élément correspondant. Une seconde fonction  $G$  représente le contrôle de la synthèse des protéines de transport par  $q_P$  afin de prendre en compte le contrôle de l'ARNr sur la synthèse protéique. Le modèle intègre également une compétition des sites d'absorption de N et de P pour la surface cellulaire disponible, traduite par une fonction  $H$ . La formulation du nombre de sites d'absorption, dans laquelle les fonctions  $F$  et  $G$  interviennent, entraîne des différences de comportements des quotas  $q_N$  et  $q_P$ . Ce modèle prédit deux zones de mono-limitations, encadrant une large zone de co-limitation au sein de laquelle se retrouve le rapport « optimal ».

Tous ces modèles de co-limitation N-P sont basés sur l'idée originale d'Agren (2004), et font intervenir la disponibilité des protéines de transport. Certains auteurs ajoutent des niveaux d'interaction supplémentaires, à travers la compétition des sites d'absorption pour la surface cellulaire ou l'allocation différentielle de carbone photosynthétique. La complexification qui résulte des ces différents niveaux d'interactions rend l'identification et l'interprétation du mécanisme majeur de co-limitation délicates.

## 2.1 Quel médiateur pour l'interaction N-P ?

L'idée commune à ces modèles du rôle majeur l'ARNr s'oppose à notre hypothèse, qui est basée sur la disponibilité énergétique. Un argument fort, sous-jacent à l'hypothèse de l'ARNr, est qu'il représente une large part de  $q_P$  et qu'en conséquence les variations du quota d'ARNr ( $q_{ARN}$ ) doivent refléter celles de  $q_P$ . Au contraire, l'ATP ne mobilise qu'une très faible part du phosphore cellulaire. Quelle sont les indications disponibles dans la littérature quant à la sensibilité du quota d'ARN aux limitations N ou P ? Peut-on juger des niveaux de contrainte relatifs exercés sur l'ARN et l'ATP par les limitations, qui favoriseraient une hypothèse par rapport à l'autre ?

**Sensibilité de l'ARN et de l'ATP aux limitations N et P** Très peu de travaux expérimentaux fournissent les informations directes, nécessaires à cette comparaison. Quelques études permettent de calculer  $q_{ARN}$  à partir des données brutes présentées. Dans les expériences de Rhee (1978) sur *Scenedesmus* sp.,  $q_{ARN}$  connaît une variation de  $0,18 \text{ g g}^{-1}$  en conditions de limitation par le P à  $0,35 \text{ g g}^{-1}$  sous limitation azotée pour un même taux de croissance. La limitation par le  $\text{PO}_4$  entraîne donc une diminution de  $q_{ARN}$  d'un facteur 2.

Chez *Chaetoceros Muelleri*, Leonardos et Geider (2004b) ont observé des valeurs de  $q_{ARN}$  plus faibles — d'un facteur 4 en forte lumière et fort taux de croissance ( $\mu=0,6 \text{ j}^{-1}$ ) et d'un facteur 6 en faible lumière et faible taux de croissance ( $\mu=0,2 \text{ j}^{-1}$ ) — lorsque la limitation est imposée par le  $\text{PO}_4$  plutôt que par le  $\text{NO}_3$ .

Chez *Rhinomonas reticulata*, les données de Leonardos et Geider (2005) révèlent le même type de tendance, mais d'une moindre amplitude : à un même taux de croissance limité par le  $\text{PO}_4$ , les niveaux de  $q_{ARN}$  sont plus faibles d'un facteur 1,5 en forte lumière et d'un facteur 3 en faible lumière. Il est cependant notable que le rapport ARN:P est supérieur d'un facteur 2 lorsque P limite la croissance, relativement aux conditions de limitation par l'azote. Ceci dénote une plus forte allocation du P cellulaire à l'ARN lorsque  $\text{PO}_4$  limite le taux de croissance. De manière intéressante, Leonardos et Geider ont également calculé que  $q_{ARN}$  représente la presque totalité de  $q_P$  en conditions de limitation par le P ( $\text{N:P} > 45$ ) et concluent à un phénomène d'homéostasie pour l'ARN. Chez *Tisochrysis lutea*, nous avons pu observer qu'une forte limitation par le P entraîne également une augmentation du rapport ATP:P d'environ un facteur 2, relativement aux conditions de limitation par le N. Néanmoins, dans ce cas, ces variations du rapport ATP:P proviennent d'une plus forte sensibilité de  $q_P$  au type de limitation — relativement à  $q_{ATP}$  —, probablement liée à l'accumulation de polyphosphates sous limitation azotée.

Les données de Laws et al. (1983a,b) obtenues chez *Thalassiosira weissflogii*, montrent que  $q_{ARN}$  est une fonction croissante du taux de croissance, mais qu'il n'est pas sensible au type de limitation à un taux de croissance donné (figure 7.1a). A faible taux de croissance, le niveau de  $q_{ATP}$  est 1,5 fois plus faible en conditions de limitation par le  $\text{PO}_4$  que sous limitation par le  $\text{NO}_3$  (figure 7.1b). Le rapport ARN:ATP atteint ainsi des valeurs sensiblement plus élevées en conditions de limitation par le  $\text{PO}_4$ , qui pourraient traduire une sensibilité supérieure de  $q_{ATP}$  à la limitation par le phosphore. Une même tendance est rapportée par Hunter et Laws (1981) chez *Thalassiosira fluviatilis* où la limitation par  $\text{PO}_4$  à faible taux de croissance entraîne une baisse de  $q_{ATP}$  d'un facteur 2,5 par rapport à la limitation azotée, un résultat à rapprocher de la réduction d'un facteur 4 obtenue ici pour *Tisochrysis lutea*.

La littérature offre donc une diversité d'informations quant à la sensibilité de  $q_{ARN}$  aux limitations N et P. Certaines suggèrent que l'ARNr pourrait être moins sensible aux variations de P. C'est le cas de l'homéostasie pour l'ARN, avancée par (Leonardos et Geider, 2005), et du jeu de données de Laws et al. (1983a) qui décrit une allocation préférentielle du P cellulaire vers l'ARN, et une plus forte contrainte sur l'énergie cellulaire que sur l'ARN.

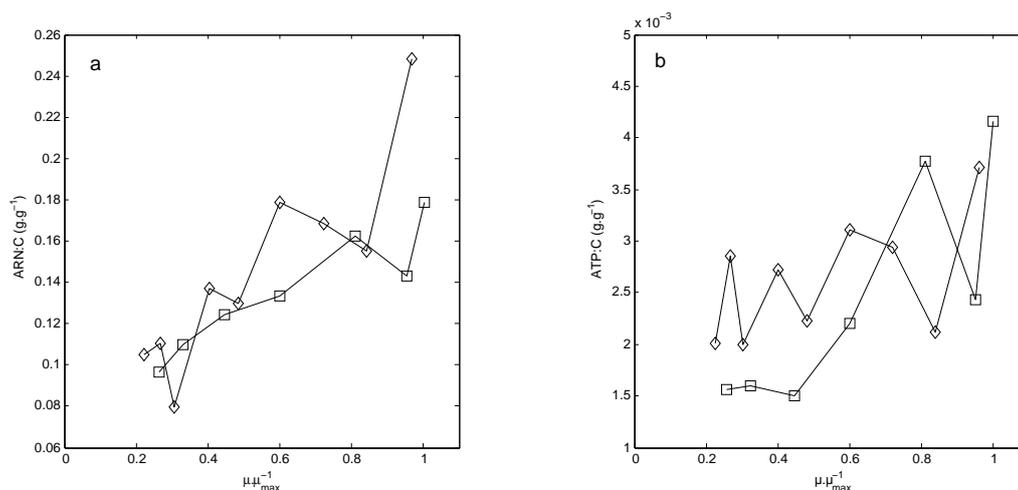


FIGURE 7.1 – Évolution des rapports ARN:C (a) et ATP:C (b) en fonction du taux de croissance chez *Thalassiosira pseudonana*, sur des cultures limitées par le  $\text{NO}_3^-$  ( $\diamond$ ) et le  $\text{PO}_4^-$  ( $\square$ ). Les données sont issues de l'étude de Laws et al. (1983a) et le rapport ARN:C a été recalculé à partir de celles-ci.

Ajoutons que le rapport N:P des molécules ARN et ATP — de 3,8 et 1,7 respectivement (Geider et La Roche, 2002) — laisse également supposer que l'ARN puisse répondre davantage à la limitation par le N que par le P.

En raison de la disparité des informations disponibles, il demeure difficile de statuer sur la sensibilité relative des quotas  $q_{ATP}$  et  $q_{ARN}$  au type de limitation N ou P. Bien qu'une variabilité interspécifique puisse être soupçonnée, il semble que les deux quotas varient dans des proportions proches en fonction du type de limitation. Cette analyse n'offre donc pas d'éléments décisifs quant à l'implication de l'ARN ou de l'ATP dans le processus de co-limitation.

**Une absence de mesure directe du quota ARNr** Un aspect important de la question est que tous les modèles basés sur l'hypothèse d'Agren (2004) supposent que l'ARNr varie dans les mêmes proportions que l'ARN total. Il est bien sûr probable que cette supposition soit fondée dans la mesure où  $q_{ARNr}$  représente environ 80 % de  $q_{ARN}$  (Loladze et Elser, 2011). Des techniques de mesure de l'ARNr ont été mises au point (Knauber et al., 1996; Simon et al., 1995), mais celles-ci ne semblent guère utilisées que pour identifier les

espèces et mesurer l'abondance ou la diversité. Nous n'avons pas connaissance de données expérimentales décrivant les variations de  $q_{ARNr}$  en fonction des limitations N ou P.

**Une efficacité ribosomique variable** Le modèle original d'Agren (2004) repose sur l'hypothèse selon laquelle le taux de croissance est directement lié au quota  $q_{ARN}$  (*Growth Rate Hypothesis*). Celle-ci a été vérifiée sur certains organismes, mais Flynn et al. (2010) se sont interrogés sur sa généralisation chez les microalgues. Les modèles concurrents passés en revue ci-dessus supposent également un taux de synthèse protéique proportionnel au quota d'ARNr.

S'il existe bien un lien biochimique direct entre la synthèse protéique et le quota d'ARNr, Laws et al. (1983a) soulignent cependant que  $q_{ARN}$  pourrait ne pas être lié de manière simple au taux de synthèse protéique. Matzek et Vitousek (2009) confirment cette restriction en observant un rapport ARN:Protéines variant avec le taux de croissance, et une efficacité ribosomique pour la synthèse protéique supérieure sous croissance faible. En outre, Berdalet et al. (1994) font état de la persistance de la synthèse protéique malgré une diminution drastique de  $q_{ARN}$  dans des cultures *Heterocapsa* sp. carencées en P. Sur la base de ces informations, nous pouvons supposer une efficacité ribosomique variable en fonction du type de limitation, supérieure en conditions P-limitantes. De telles observations seraient de nature à fragiliser le lien entre le quota d'ARNr et la synthèse des protéines de transport, supposé par certains auteurs.

## 2.2 Quels mécanismes pour la co-limitation N-P ?

**La régulation du transport** Les modèles d'Agren et al. (2012), de Bonachela et al. (2013) et de Pahlow et Oschlies (2009) considèrent une action de la co-limitation sur le niveau des protéines de transport membranaire et/ou d'assimilation. Il est en effet reconnu que le niveau d'expression des transporteurs répond à la disponibilité en substrat. Notre modèle ne prend pas en compte ces processus, néanmoins sa formulation contient cette information, au moins partiellement. En effet, en croissance limitée par le P, le terme de régulation de l'absorption de  $\text{NO}_3$  par  $q_P$  revient à considérer une moindre activité des transporteurs de nitrate et/ou leur moindre présence à la surface membranaire. Le trans-

port des ions à travers la membrane relève d'une chaîne de processus, depuis l'expression, les régulations post-transcriptionnelles, jusqu'à l'activité de transport des protéines. L'importance de la disponibilité de ces protéines, telle que vue par Pahlow et Oschlies, Agren et al. et Bonachela et al., nécessiterait ainsi une approche expérimentale considérant chacun de ces niveaux de régulation.

Par ailleurs, nos résultats expérimentaux et les démarches de modélisation ont montré l'importance de la régulation de l'absorption par le quota interne de l'élément, en accord avec les hypothèses d'Agren et al. (2012) et de Bonachela et al. (2013).

**Le découplage absorption-assimilation** Les processus d'excrétion du phytoplankton ont été étudiés à de nombreuses reprises (Admiraal et al., 1986; Granum et al., 2002; Mykkestad, 1995), mais relativement peu de travaux se sont focalisés sur l'azote organique et sur la nature des molécules azotées excrétées en présence d'un excès d'azote. Il est, de ce fait, difficile d'étayer nos résultats par ceux de la littérature.

Au-delà des régulations de l'absorption, nous avons suggéré un processus d'excrétion résultant du découplage entre l'absorption et l'assimilation d'azote, dans les conditions de limitation par le P (figure 7.2). Selon cette hypothèse, la limitation des taux d'assimilation de N et de synthèse des protéines pourrait participer à contraindre le quota  $q_N$ . L'excrétion supposée d'acides aminés est concordante avec l'hypothèse d'une régulation par l'ARNr, mais cette dernière n'est pas exclusive. L'excrétion pourrait également résulter du faible niveau d'ATP imposé par le métabolisme limité par le P (Theodorou et al., 1991), en regard de la forte demande énergétique (4 ATP) pour l'assemblage d'un acide aminé dans un chaîne polypeptidique.

Le processus d'excrétion n'est pas considéré par les différents auteurs qui s'appuient sur l'idée originale d'Agren (2004). Pourtant, le découplage entre l'assimilation et l'absorption de N pourrait apparaître comme l'un des processus clés des interactions N-P, et nous en avons souligné l'importance dans le chapitre 5.

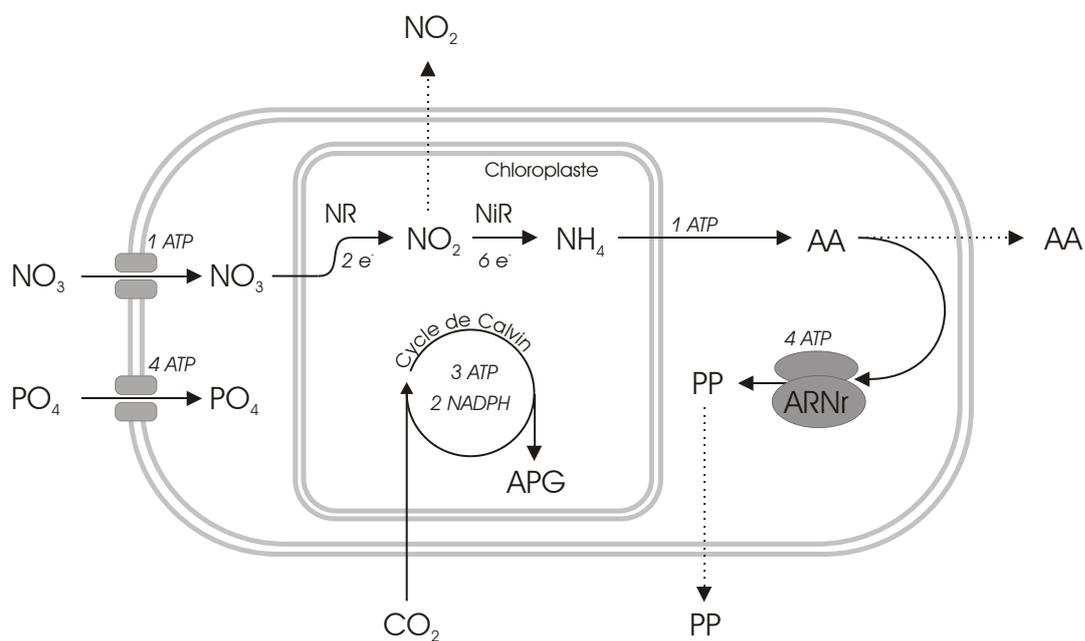


FIGURE 7.2 – Représentation schématique des consommations en ATP liées à l’assimilation du  $\text{NO}_3^-$ , au transport du  $\text{PO}_4$  et à la fixation du carbone. Les différents efflux de N sont signalés par des flèches en pointillés, comme repères pour la discussion. NR : nitrate réductase ; NiR : nitrite réductase ; AA : acides aminés ; PP : chaînes polypeptidiques ; APG : aldéhyde phosphoglycérique.

### 2.3 Influence de la co-limitation N-P sur le taux de croissance

Contrairement à notre modèle, les trois modèles de la littérature prédisent un impact de la co-limitation sur le taux de croissance. Bonachela et al. (2013) et Agren et al. (2012) concluent à une large zone de co-limitation, dans laquelle le taux de croissance est affecté simultanément par la disponibilité des deux nutriments. Sous l'hypothèse de co-limitation de Bonachela et al., le rapport d'enrichissement N:P impacte fortement la relation  $\mu=f(q_P)$  sur la gamme de variation de  $q_P$ , et la relation  $\mu=f(q_N)$  pour les faibles valeurs de  $q_N$ . Ce modèle prédit ainsi, pour des faibles valeurs de  $q_P$  et sous l'effet de l'accroissement du rapport d'enrichissement N:P de 25 à 80, un accroissement du taux de croissance pouvant atteindre un facteur 6.

Agren et al. (2012) décrivent un effet de la co-limitation et une déviation de la loi du minimum d'autant plus forts que le taux de croissance est élevé. Dans ces conditions, l'apport de N ou de P dans la zone de co-limitation conduit à une augmentation du taux de croissance, mais cet effet est d'autant moins sensible que le rapport d'enrichissement N:P s'écarte de la co-limitation. Les auteurs en concluent que la loi du minimum est une bonne approximation dans la plupart des cas.

A notre connaissance, il n'existe pas de démonstration expérimentale directe de l'effet de la co-limitation sur le taux de croissance des microalgues. Les multiples observations de co-limitation N-P, réalisées dans le cadre d'enrichissement en milieu naturel, ont démontré qu'un apport conjugué de N et de P induit une croissance supérieure à celle mesurée en réponse à l'apport d'un seul élément. D'une part, il est important de souligner que, dans ces expériences, la croissance est mesurée par un accroissement de la biomasse et non par sa vitesse de variation. D'autre part, comme le discutent Davidson et Howarth (2007), les résultats de ces expériences d'enrichissement peuvent refléter simplement les levées successives de mono-limitations, figurant ainsi un effet synergique. Enfin, Gorban et al. (2011) suggèrent que la fréquence des observations de la co-limitation N-P dans le milieu naturel pourrait être liée au *paradoxe de la loi du minimum* : les adaptations d'un écosystème (relevant de la microévolution, des modifications phénotypiques ou de la succession d'espèces) diminueraient les effets du facteur limitant et entraîneraient ainsi une homogénéisation de la pression exercée par les facteurs essentiels. Ces adaptations tendraient ainsi à masquer

les manifestations de la loi du minimum.

Les approches expérimentales en milieu naturel ne nous semblent donc pas constituer une base suffisamment pertinente pour conforter l'hypothèse d'une transition douce en zone de co-limitation, dans laquelle l'apport de l'un ou l'autre des éléments suffirait à stimuler le taux de croissance (Agren et al., 2012; Bonachela et al., 2013). D'autres évidences expérimentales plaident, en revanche, clairement en faveur de la loi du minimum. Les travaux de Rhee (1978), notamment, apportent des éléments de preuve expérimentaux de la validité de la loi du minimum particulièrement convaincants. Ces résultats ont pourtant été acquis avec un taux de croissance relatif  $\frac{\mu}{\mu_{max}} = 0,44$ , conditions dans lesquelles le modèle d'Agren et al. (2012) prédit un fort effet de la co-limitation.

Notre modèle, quant à lui, ne reproduit pas d'effet direct et durable de la co-limitation N-P sur le taux de croissance. Il est notable que ce modèle simule, dans la majorité des situations testées, la croissance observée expérimentalement. Néanmoins, nos résultats expérimentaux suggèrent également l'existence d'effets d'une inhibition transitoire de la fixation de carbone par l'acquisition des nutriments, et confirment ainsi des observations antérieures (Davies et Sleep, 1989; Falkowski et Stone, 1975). Comme le discutent Davies et Sleep, l'échelle de temps et l'impact de ces effets pourrait varier selon le statut nutritif en phosphore, ceux-ci étant d'autant plus durables que le quota  $q_P$  est plus faible. Ces interactions, qui ne sont pas prises en compte dans notre modèle, ne peuvent être prédites correctement ; ceci souligne l'intérêt de les considérer dans l'avenir.

### 3 Les implications de la co-limitation N-P

Dans le milieu naturel, les microalgues sont soumises à des fluctuations de leur environnement, selon les saisons ou le cycle diurne, qui modifient leur accès aux ressources nutritives comme l'azote et le phosphore, et entraînent des variations des espèces co-existantes (Sommer, 1984). La compréhension de l'acquisition et de la capacité de stockage de ces ressources est donc primordiale pour prédire le développement des populations naturelles ou des cultures à vocation industrielle. Quels que soient les mécanismes avancés, les différentes études sur la co-limitation N-P soulignent la différence de comportement des quotas N et P et soulèvent ainsi le rôle d'une limitation par le phosphore pour l'accès des microalgues

au  $\text{NO}_3$ .

Dans ce travail, nous avons montré la possibilité d'une forte excrétion d'azote organique lors d'une carence en phosphore. Nous proposons pour la première fois que celle-ci puisse jouer un rôle important dans le contrôle du quota d'azote et participer au processus de co-limitation. Dans les conditions de carence en phosphore qui empêchent la croissance des microalgues, la ressource minérale azotée serait assimilée puis partiellement excrétée dans le milieu sous forme de matière organique. Selon sa biodisponibilité et la capacité des organismes présents dans le milieu à le métaboliser, cette matière organique dissoute pourrait modifier les conditions de compétition interspécifique, notamment avec les bactéries hétérotrophes, et conformément au paradoxe phytoplancton-bactéries soulevé par Bratbak et Thingstad (1985).

Les situations transitoires telles que celles étudiées dans les chémostats nous ont conduits à observer une inhibition du taux de croissance, sans doute temporaire. Ces observations confirment les résultats de Davies et Sleep (1989) selon lesquels l'enrichissement en un nutriment peut paradoxalement conduire à une augmentation ou une diminution de l'activité photosynthétique selon le statut nutritionnel initial. Particulièrement, la répression de la fixation du carbone semble pouvoir perdurer pendant plusieurs jours après une période de forte limitation par le  $\text{PO}_4$ . Ainsi, ce processus pourrait, lui aussi, posséder des conséquences sensibles sur les dynamiques des populations phytoplanctoniques dans un environnement fluctuant.

Bien que les limitations par le  $\text{NO}_3$  et le  $\text{PO}_4$  entraînent toutes deux une accumulation de lipides neutres (Fields et al., 2014), le processus de co-limitation N-P ne semble pas induire de signature particulièrement favorable à leur production, pour les conditions expérimentales étudiées. Par exemple, nous avons pu montrer que le quota de lipides neutres paraît répondre davantage au déséquilibre entre le taux de fixation de carbone et l'assimilation des ressources limitantes N ou P, qu'à un effet synergique entre les deux éléments. Ces résultats ne mettent pas en évidence d'effet du rapport N:P sur l'accumulation de lipides, comme suggéré par Valenzuela et al. (2012) chez *Phaeodactylum tricorutum*.

Bien que la production de lipides en conditions de limitation par le P ait été beaucoup moins étudiée qu'en limitation azotée, ces deux types de limitations sont reconnus pour

en favoriser l'accumulation. Néanmoins, le processus d'excrétion d'azote organique suggère que ces limitations ne seraient pas d'un intérêt équivalent pour les productions industrielles. Pour être mise à profit dans des conditions économiquement viables, sans conduire à une sur-consommation de la ressource azotée, la limitation par le  $\text{PO}_4$  nécessiterait une définition précise des ratios d'enrichissement N:P. Au contraire, la limitation par l'azote peut être mise à profit pour améliorer la production de biodiesel tout en permettant l'épuration du  $\text{PO}_4$  contenu dans les eaux usées (Chu et al., 2014).

## 4 Perspectives

### 4.1 Vers des expériences complémentaires

Comme nous le soupçonnions dès l'initiation de ce travail, les interactions N-P mises en évidence ici et par le biais de la littérature sont nombreuses et complexes, au point de rendre délicates leur interprétation et l'identification des processus majeurs de co-limitation.

Au cours de cette étude, la conjugaison des démarches expérimentale et de modélisation a permis de soulever des interrogations nouvelles, auxquelles des réponses devront être apportées pour clarifier les processus de co-limitation N-P.

En tout premier lieu, il conviendrait de conduire des expériences en mono-limitations N ou P et de co-limitation, dans lesquelles les variations de  $q_{ATP}$  et  $q_{ARN}$  seraient mesurées concomitamment afin de déterminer leur réponse respective à une limitation par le phosphore ou l'azote. Dans ces conditions, il serait particulièrement intéressant d'évaluer l'efficacité ribosomique pour la synthèse des protéines.

Une approche complémentaire, basée sur des outils de transcriptomique, pourrait fournir des indications sur l'expression des transporteurs selon les conditions nutritives. En conjugaison avec des mesures de l'activité de transport, ces données pourraient permettre de mieux cerner le poids du transport trans-membranaire dans les processus de co-limitation. De nouvelles expériences seront également nécessaires pour confirmer l'absence d'impact de la co-limitation sur le taux de croissance, et appuyer l'élégante démonstration de Rhee (1978). Dans le même ordre d'idées, la répression de fixation de carbone liées aux transitions N-P devront être mieux cernées afin d'en apprécier l'effet et la persistance sur le

développement des populations de microalgues.

Le rôle de l'excrétion est un dernier aspect dont l'importance dans le processus de co-limitation demeure à préciser. Cette approche nécessitera cependant de disposer au préalable des outils nécessaires pour réaliser (1) une identification univoque de la répartition de l'azote dans les phases particulaire microalgale et dissoute et (2) l'identification des classes moléculaires excrétées.

## 4.2 Quelles améliorations pour le modèle ?

Quelles que soient les hypothèses sous-jacentes et les processus biologiques précis, le modèle de co-limitation REE décrit de manière intéressante les tendances majeures des différents compartiments, résultant de l'asymétrie N-P, en batch et en chémostat. Néanmoins, la répression de la fixation de carbone observée dans les chémostats nécessiterait que les processus de compétition supposés entre la fixation du carbone et l'acquisition des nutriments N et P soient pris en compte dans le modèle. Ces derniers pourraient modifier le comportement des populations phytoplanctoniques soumises à un environnement variable, et persister sur des périodes de plusieurs jours.



# Chapitre 8

## Bibliographie

- Admiraal, W., Peletier, H., Laane, R. W., 1986. Nitrogen metabolism of marine planktonic diatoms; excretion, assimilation and cellular pools of free amino acids in seven species with different cell size. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98 (3), 241–263.
- Agren, G. I., 2004. The C:N:P stoichiometry of autotrophs - theory and observations. *Ecology Letters* 7 (3), 185–191.
- Agren, G. I., Wetterstedt, J. A. M., Billberger, M. F. K., 2012. Nutrient limitation on terrestrial plant growth - modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. *New Phytologist* 194 (4), 953–960.
- Ahlgren, G., 1977. Growth of *Oscillatoria agardhii* in chemostat culture : 1. nitrogen and phosphorus requirements. *Oikos* 29 (2), 209–224.
- Ahlgren, G., 1980. Effects on algal growth rates by multiple nutrient limitation. *Archive of Hydrobiology* 1/2, 43–53.
- Ahlgren, G., 1988. Phosphorus as growth-regulating factor relative to other environmental factors in cultured algae. *Hydrobiologia* 170 (1), 191–210.
- Aksnes, D., Egge, J., 1991. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 70, 65–72.

- Aminot, A., K erouel, R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses. Editions Quae.
- Aminot, A., K erouel, R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu. Editions Quae.
- Andersen, R. A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity & Conservation* 1 (4), 267–292.
- Armstrong, R. A., 1999. An optimization-based model of iron-light-ammonium colimitation of nitrate uptake and phytoplankton growth. *Limnology and Oceanography* 44, 1436–1446.
- Arrigo, K. R., 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437 (15), 349–355.
- Atkinson, D. E., Walton, G. M., Oct. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation RAT LIVER CITRATE CLEAVAGE ENZYME. *Journal of Biological Chemistry* 242 (13), 3239–3241.
- Baklouti, M., Diaz, F., Pinazo, C., Faure, V., Qu guiner, B., 2006. Investigation of mechanistic formulations depicting phytoplankton dynamics for models of marine pelagic ecosystems and description of a new model. *Progress In Oceanography* 71 (1), 1–33.
- Barclay, W. R., Meager, K. M., Abril, J. R., 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology* 6 (2), 123–129.
- Beardall, J., Roberts, S., Raven, J. A., 2005. Regulation of inorganic carbon acquisition by phosphorus limitation in the green alga *Chlorella emersonii*. *Revue canadienne de botanique* 83 (7), 859–864.
- Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. C., Vargas, C., 2013. On the description of *Ti-sochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology* 25, 1763–1776.

- Benemann, J. R., 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology* 4, 233–245.
- Berdalet, E., Latasa, M., Estrada, M., 1994. Effects of nitrogen and phosphorus starvation on nucleic acid and protein content of *Heterocapsa* sp. *J. Plankton Res.* 16 (4), 303–316.
- Bernard, O., Gouzé, J.-L., May 1995. Transient behavior of biological loop models with application to the droop model. *Mathematical Biosciences* 127 (1), 19–43.
- Bernard, O., Gouzé, J.-L., Mar. 1999. Non-linear qualitative signal processing for biological systems : application to the algal growth in bioreactors. *Mathematical Biosciences* 157 (1-2), 357–372.
- Bernard, O., Sallet, G., Sciandra, A., Aug. 1998. Nonlinear observers for a class of biological systems : application to validation of a phytoplanktonic growth model. *IEEE Transactions on Automatic Control* 43 (8), 1056–1065.
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., Magnani, M., 2011. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods* 87 (1), 17–23.
- Bertrand, E. M., Saito, M., Rose, J. M., Riesselman, C. R., Lohan, M. C., Noble, A. E., Lee, P. A., DiTullio, G. R., 2007. Vitamin B<sub>12</sub> and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea. *Limnology and Oceanography* 52 (3), 1079–1093.
- Biddanda, B., Benner, R., 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 42 (3), 506–518.
- Bjornsen, P. K., 1988. Phytoplankton exudation of organic matter : Why do healthy cells do it ? *Limnology and Oceanography* 33 (1), 151–154.
- Blackman, F. F., 1905. Optima and limiting factors. *Annals of Botany* 19 (2), 281–296.
- Bonachela, J. A., Allison, S. D., Martiny, A. C., Levin, S. A., 2013. A model for variable phytoplankton stoichiometry based on cell protein regulation. *Biogeosciences* 10 (6), 4341–4356.

- Borowitzka, M. A., 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7 (1), 3–15.
- Borowitzka, M. A., 1997. Microalgae for aquaculture : opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9 (5), 393–401.
- Bougaran, G., Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., Lukomska, E., Le Coz, J.-R., Cadoret, J.-P., 2012. Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnology and Bioengineering* 109 (11), 2737–2745.
- Boyd, P., La Roche, J., Gall, M., Frew, R., Mc Kay, R., 1999. The role of iron, light and silicate in controlling algal biomass in Sub-Antarctic waters SE of New Zealand. *Journal of Geophysical Research* 104 (13), 395 :408.
- Boyd, P. W., 2002. Environmental factors controlling phytoplankton processes in the southern ocean. *Journal of Phycology* 38 (5), 844–861.
- Bratbak, G., Thingstad, T. F., 1985. Phytoplankton-bacteria interactions : an apparent paradox ? analysis of a model system with both competition and commensalism. *Marine Ecology Progress Series* 25, 23–30.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151 (1), 315–331.
- Brzezinski, M. A., Baines, S. B., Balch, W. M., Beucher, C. P., Chai, F., Dugdale, R. C., Krause, J. W., Landry, M. R., Marchi, A., Measures, C. I., Nelson, D. M., Parker, A. E., Poulton, A. J., Selph, K. E., Strutton, P. G., Taylor, A. G., Twining, B. S., 2011. Co-limitation of diatoms by iron and silicic acid in the equatorial pacific. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography* 58 (3-4), 493–511.
- Bucciarelli, E., Pondaven, P., Sarthou, G., Feb. 2010. Effects of an iron-light co-limitation on the elemental composition (Si, C, N) of the marine diatoms *Thalassiosira oceanica* and *Ditylum brightwellii*. *Biogeosciences* 7 (2), 657–669.

- Burmester, D. E., 1979. The continuous culture of phytoplankton : mathematical equivalence among three steady-state models. *The American Naturalist* 113 (1), 123–134.
- Burmester, D. E., Chisholm, S. W., 1979. A comparison of two methods for measuring phosphate uptake by *Monochrysis lutheri* Droop grown in continuous culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 39 (2), 187–202.
- Cadoret, J., Bernard, O., 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie* 202 (3), 201–211.
- Caperon, J., Meyer, J., 1972. Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton-II. uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 19 (9), 619–632.
- Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J., Jan. 1982. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae : A multidisciplinary perspective : Part I. *Critical Reviews in Microbiology* 10 (4), 317–391.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25 (3), 294–306.
- Chu, F.-F., Shen, X.-F., Lam, P. K. S., Zeng, R. J., 2014. Optimization of CO<sub>2</sub> concentration and light intensity for biodiesel production by *Chlorella vulgaris* FACHB-1072 under nitrogen deficiency with phosphorus luxury uptake. *Journal of Applied Phycology* 26 (4), 1631–1638.
- Chung, C.-C., Hwang, S.-P. L., Chang, J., 2003. Identification of a high-affinity phosphate transporter gene in a Prasinophyte alga, *Tetraselmis chui*, and its expression under nutrient limitation. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2), 754–759.
- Clark, D. R., 2001. Growth rate relationships to physiological indices of nutrient status in marine diatoms. *Journal of Phycology* 37 (2), 249–256.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., Harrison, P. J., 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* 11 (2), 179–184.

- Collos, Y., Siddiqi, M., Wang, M., Glass, A., Harrison, P., 1992. Nitrate uptake kinetics by two marine diatoms using the radioactive tracer  $^{13}\text{N}$ . *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 163 (2), 251–260.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., White, S., 2009. The story of phosphorus : Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19 (2), 292–305.
- Cordell, D., White, S., 2011. Peak phosphorus : Clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustainability* 3 (12), 2027–2049.
- Courchesne, N. M. D., Parisien, A., Wang, B., Lan, C. Q., 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology* 141 (1-2), 31–41.
- Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluses : an international survey. *Journal of Shellfish Research* 11 (2), 467–476.
- Crawford, N. M., Glass, A. D., 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3 (10), 389–395.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., Smith, A. G., 2005. Algae acquire vitamin B<sub>12</sub> through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438 (7064), 90–93.
- Davidson, E. A., Howarth, R. W., 2007. Nutrients in synergy. *Nature* 449 (7165), 1000–1001.
- Davidson, K., Gurney, W. S. C., 1999. An investigation of non-steady-state algal growth. II. mathematical modelling of co-nutrient-limited algal growth. *Journal of Plankton Research* 21 (5), 839–858.
- Davies, A. G., Sleep, J. A., 1989. The photosynthetic response of nutrient-depleted dilute cultures of *Skeletonema costatum* to pulses of ammonium and nitrate; the importance of phosphate. *Journal of Plankton Research* 11 (1), 141–164.

- De la Hoz Siegler, H., Ayidzoe, W., Ben-Zvi, A., Burrell, R., McCaffrey, W., 2012. Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures. *Algal Research* 1 (2), 176–184.
- De La Rocha, C. L., Hutchins, D. A., Brzezinski, M. A., Zhang, Y. H., 2000. Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 195, 71–79.
- Diaz, F., Raimbault, P., Boudjellal, B., Garcia, N., Moutin, T., 2001. Early spring phosphorus limitation of primary productivity in a NW mediterranean coastal zone (Gulf of Lions). *Marine Ecology Progress Series* 211, 51–62.
- Droop, M., 1968. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. IV. the kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of Marine Biology* 48, 689–733.
- Droop, M., 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology* 9, 264–272.
- Droop, M., 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. *Marine Biology Association U.K.* 54, 825–855.
- Droop, M., 1983. 25 years of algal growth kinetics. A personal view. *Botanica Marina* 26, 99–112.
- Dugdale, R., 1967. Nutrient limitation in the sea : dynamics, identification and significance. *Limnology and Oceanography* 12 (4), 685–695.
- Dyhrman, S. T., Haley, S. T., Birkeland, S. R., Wurch, L. L., Cipriano, M. J., McArthur, A. G., 2006. Long serial analysis of gene expression for gene discovery and transcriptome profiling in the widespread marine Coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1), 252–260.
- Eixler, S., Karsten, U., Selig, U., 2006. Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* 45 (1), 53–60.

- Elrifi, I. R., Turpin, D. H., 1985. Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios : a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 21 (4), 592–602.
- Elrifi, I. R., Turpin, D. H., 1986. Nitrate and ammonium induced photosynthetic suppression in N-limited *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 81 (1), 273–279.
- Elrifi, I. R., Turpin, D. H., 1987. The path of carbon flow during NO<sub>3</sub> induced photosynthetic suppression in N-limited *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 83 (1), 97–104.
- Elser, J. J., Bracken, M. E., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., Smith, J. E., 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 10 (12), 1135–1142.
- Eppley, R. W., Thomas, W. H., 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. *Journal of Phycology* 5 (4), 375–379.
- Falkowski, P. G., 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton : comparison of half-saturation constants from seven species. *Limnology and Oceanography* 20 (3), 412–417.
- Falkowski, P. G., 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281 (5374), 200–206.
- Falkowski, P. G., 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305 (5682), 354–360.
- Falkowski, P. G., Stone, D. P., 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton : energy sources and the interaction with carbon fixation. *Marine Biology* 32 (1), 77–84.
- Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J., Xu, C., 2012. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology* 53 (8), 1380–1390.
- Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B. M., Characklis, G. W., Gerlach, R., Apr. 2014. Sources and resources :

- importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 4815–4816.
- Flynn, J. K., 2008. The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models. *Journal of Plankton Research* 30 (4), 423–438.
- Flynn, K., Raven, J. A., Rees, T. A. V., Finkel, Z. V., Quigg, A., Beardall, J., 2010. Is the growth rate hypothesis applicable to microalgae? *Journal of Phycology* 46 (1), 1–12.
- Forde, B. G., 2000. Nitrate transporters in plants : structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 219–235.
- Franck, V. M., Brzezinski, M. A., Coale, K. H., Nelson, D. M., 2000. Iron and silicic acid concentrations regulate si uptake north and south of the polar frontal zone in the pacific sector of the southern ocean. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography* 47 (15-16), 3315–3338.
- Franklin, S. E., Mayfield, S. P., 2005. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5 (2), 225–235.
- Fu, M., Song, X., Yu, Z., Liu, Y., 2013. Responses of phosphate transporter gene and alkaline phosphatase in *Thalassiosira pseudonana* to phosphine. *PLoS ONE* 8 (3), e59770.
- Galvan, A., Fernandez, E., 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58 (2), 225–233.
- Gauthier, D. A., Turpin, D. H., 1994. Inorganic phosphate (Pi) enhancement of dark respiration in the Pi-limited green alga *Selenastrum minutum* (interactions between  $H^+$ /Pi cotransport, the plasmalemma  $H^+$ -ATPase, and dark respiratory carbon flow). *Plant Physiology* 104 (2), 629–637.
- Gauthier, D. A., Turpin, D. H., 1997. Interactions between inorganic phosphate (Pi) assimilation, photosynthesis and respiration in the Pi-limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant, Cell & Environment* 20 (1), 12–24.

- Geider, R., La Roche, J., 2002. Redfield revisited : variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37, 1–17.
- Geider, R. J., Delucia, E. H., Falkowski, P. G., Finzi, A. C., Grime, J. P., Grace, J., Kana, T. M., La Roche, J., Long, S. P., Osborne, B. A., 2001. Primary productivity of planet earth : biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology* 7 (8), 849–882.
- Geider, R. J., Macintyre, H. L., Graziano, L. M., McKay, R. M. L., 1998. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European Journal of Phycology* 33 (4), 315–332.
- Gilbert, N., 2009. The disappearing nutrient. *Nature* 461 (461), 716–718.
- Glass, J. B., Wolfe-Simon, F., Elser, J. J., Anbar, A. D., 2010. Molybdenum-nitrogen co-limitation in freshwater and coastal heterocystous cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 55 (2), 667.
- Gniazdowska, A., Mikulska, M., Rychter, A. M., 1998. Growth, nitrate uptake and respiration rate in bean roots under phosphate deficiency. *Biologia Plantarum* 41 (2), 217–226.
- Godos, I. d., Blanco, S., Garcia-Encina, P. A., Becares, E., Munoz, R., 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology* 100 (19), 4332–4339.
- Goldman, J., Peavey, D. G., 1979. Steady-state growth and chemical composition of the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited continuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 38 (5), 894–901.
- Gorban, A. N., Pokidysheva, L. I., Smirnova, E. V., Tyukina, T. A., 2011. Law of the minimum paradoxes. *Bulletin of Mathematical Biology* 73 (9), 2013–2044.
- Gotham, I. J., Rhee, G.-Y., 1981. Comparative kinetic studies of nitrate-limited growth and nitrate uptake in phytoplankton in continuous culture. *Journal of Phycology* 17 (4), 309–314.

- Grachev, M., Sherbakova, T., Masyukova, Y., Likhoshway, Y., 2005. A potential zinc-binding motif in silicic acid transport proteins of diatoms. *Diatom Research* 20 (2), 409–411.
- Granum, E., Kirkvold, S., Mykkestad, S. M., 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum* : diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series* 242, 83–94.
- Guiry, M. D., 2012. How many species of algae are there? *Journal of Phycology* 48 (5), 1057–1063.
- Guschina, I. A., Harwood, J. L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45 (2), 160–186.
- Habib, B., Parvin, H., Hasan, M., 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular FIMA/C1034*, Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Haimeur, A., Ulmann, L., Mimouni, V., Guéno, F., Pineau-Vincent, F., Meskini, N., Tremblin, G., 2012. The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids in health and disease* 11 (1), 147.
- Harpole, W. S., Ngai, J. T., Cleland, E. E., Seabloom, E. W., Borer, E. T., Bracken, M. E., Elser, J. J., Gruner, D. S., Hillebrand, H., Shurin, J. B., Smith, J. E., 2011. Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters* 14 (9), 852–862.
- Harrison, P., Parslow, J., Conway, H., 1989. Determination of nutrient uptake kinetic parameters : a comparison of methods. *Marine Ecology Progress Series* 52, 301–312.
- Healey, F. P., 1979. Short-term responses of nutrient-deficient algae to nutrient addition (1). *Journal of Phycology* 15 (3), 289–299.
- Healey, F. P., 1985. Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of *Synechococcus linearis* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology* 21 (1), 134–146.

- Hein, M., Pedersen, M. F., Sand-Jensen, K., 1995. Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 118, 247–253.
- Hildebrand, M., Dahlin, K., 2000. Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae) : mRNA levels controlled by nitrogen source and by the cell cycle. *Journal of Phycology* 36 (4), 702–713.
- Howarth, R. W., 1988. Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19, 89–110.
- Howarth, R. W., Billen, G., Swaney, D., Townsend, A., Jaworski, N., Lajtha, K., Downing, J. A., Elmgren, R., Caraco, N., Jordan, T., 1996. Regional nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean : Natural and human influences. *Biogeochemistry* 35 (1), 75–139.
- Hsieh, C.-H., Wu, W.-T., 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology* 100 (17), 3921–3926.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production : perspectives and advances. *The Plant Journal* 54 (4), 621–639.
- Hunter, B. L., Laws, E. A., 1981. ATP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass. *Limnology and Oceanography* 26 (5), 944–956.
- Jansson, M., 1993. Uptake, exchange, and excretion of orthophosphate in phosphate-starved *Scenedesmus quadricauda* and *Pseudomonas* K 7. *Limnology and Oceanography* 38 (6), 1162–1178.
- Jenssen, T. K., Kongshaug, G., 2003. IFS proceedings. *International Fertiliser Society Proceedings* 509, 1–28.
- Jones, D. R., Karl, D. M., Laws, E. A., 1995. DNA:ATP ratios in marine microalgae and bacteria : implications for growth rate estimates based on rates of DNA synthesis. *Journal of Phycology* 31 (2), 215–223.

- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., Gray, M. W., 2005. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution* 20 (12), 670–676.
- Ketchum, B. H., 1939. The absorption of phosphate and nitrate by illuminated cultures of *Nitzschia Closterium*. *American Journal of Botany* 26 (6), 399–407.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67 (7), 696–701.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., 2011. Unraveling algal lipid metabolism : Recent advances in gene identification. *Biochimie* 93 (1), 91–100.
- Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C., Lynn, S., 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38 (3), 591–596.
- Kirchman, D. L., Wheeler, P. A., 1998. Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-arctic pacific. *Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers* 45 (2), 347–365.
- Klausmeier, C., Litchman, E., Daufresne, T., Levin, S., 2004a. Optimal nitrogen to phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature* 429, 171–174.
- Klausmeier, C., Litchman, E., Levin, S., 2004b. Phytoplankton growth and stoichiometry under multiple nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* 49 (4), 1463–1470.
- Knauber, D. C., Berry, E. S., Fawley, M. W., 1996. Ribosomal RNA-Based oligonucleotide probes to identify marine green ultraphytoplankton. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43 (2), 89–94.
- Kuenzler, E. J., Perras, J. P., Jan. 1965. Phosphatases of marine algae. *The Biological Bulletin* 128 (2), 271–284.

- Kunikane, S., Kaneko, M., Maehara, R., 1984. Growth and nutrient uptake of green alga, *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio - I. Experimental study. *Water Research* 18 (10), 1299–1311.
- Kunikane, S., Kaneko, M., Maehara, R., 1986. Variation of atp content in *Scenedesmus dimorphus* cells grown in a chemostat culture and its comparison with chlorophyll-*a* content. *Water Research* 20 (12), 1569–1574.
- Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P., Bernard, O., 2012. Neutral lipid and carbohydrate productivities as a response to nitrogen status in *Isochrysis* sp. (T-iso). *Journal of Phycology* 48 (3), 647–656.
- Lancelot, C., 1983. Factors affecting phytoplankton extracellular release in the southern bight of the north sea. *Marine ecology progress series*. Oldendorf 12 (2), 115–121.
- Lane, T. W., Morel, F. M., 2000. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiology* 123 (1), 345–352.
- Lange, K., Oyarzun, F. J., Oct. 1992. The attractiveness of the droop equations. *Mathematical Biosciences* 111 (2), 261–278.
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology* 43 (17), 6475–6481.
- Laws, E. A., Bannister, T. T., 1980. Nutrient- and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean. *Limnology and Oceanography* 25 (3), 457–473.
- Laws, E. A., Karl, D. M., Redalje, D. G., Jurick, R. S., Winn, C. D., 1983a. Variability in ratios of phytoplankton carbon and RNA to ATP and chlorophyll *a* in batch and continuous cultures. *Journal of Phycology* 19 (4), 439–445.

- Laws, E. A., Pei, S., Bienfang, P., Grant, S., 2011. Phosphate-limited growth and uptake kinetics of the marine prasinophyte *Tetraselmis suecica* (kylin) butcher. *Aquaculture* 322–323, 117–121.
- Laws, E. A., Redalje, D. G., Karl, D. M., Chalup, M. S., 1983b. A theoretical and experimental examination of the predictions of two recent models of phytoplankton growth. *Journal of Theoretical Biology* 105 (3), 469–491.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., Fouilland, E., Bernard, O., Cadoret, J.-P., 2013. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research* 2, 212–222.
- Legovic, T., Cruzado, A., 1997. A model of phytoplankton growth on multiple nutrients based on the Michaelis-Menten-Monod uptake, Droop's growth and Liebig's law. *Ecological Modelling* 99 (1), 19–31.
- Lehman, J. T., Botkin, D. B., Likens, G. E., 1975. The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnol. Oceanogr* 20 (3), 343–364.
- Leonardos, N., Geider, R. J., 2004a. Effects of nitrate : phosphate supply ratio and irradiance on the C : N : P stoichiometry of *Chaetoceros muelleri*. *European Journal of Phycology* 39 (2), 173–180.
- Leonardos, N., Geider, R. J., 2004b. Responses of elemental and biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* to growth under varying light and nitrate :phosphate supply ratios and their influence on critical N :P. *Limnology and Oceanography* 49, 2105–2114.
- Leonardos, N., Geider, R. J., 2005. Elemental and biochemical composition of *Rhodomonas reticulata* (Cryptophyta) in relation to light and nitrate-to-phosphate supply ratios. *J. Phycol.* 41, 567–576.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (4), 629–636.

- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., Cong, W., 2013. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology* 25 (1), 311–318.
- Liebig, J. F. v., 1855. *Principles of Agricultural Chemistry : With Special Reference to the Late Researches Made in England*. Walton & Maberly.
- Lim, S.-L., Chu, W.-L., Phang, S.-M., 2010. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology* 101 (19), 7314–7322.
- Lippemeier, S., Hartig, P., Colijn, F., 1999. Direct impact of silicate on the photosynthetic performance of the diatom *Thalassiosira weissflogii* assessed by on- and off-line PAM fluorescence measurements. *Journal of Plankton Research* 21 (2), 269–283.
- Loladze, I., Elser, J. J., 2011. The origins of the redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. *Ecology Letters* 14 (3), 244–250.
- Lomas, M. W., Glibert, P. M., 2000. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Phycology* 36 (5), 903–913.
- Lourenco, S. O., Barbarino, E., Mancini Filho, J., Schinke, K. P., Aidar, E., 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture : an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41 (2), 158–168.
- Ludewig, U., 2002. Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *Journal of Biological Chemistry* 277 (16), 13548–13555.
- Maberly, S. C., 1985. Photosynthesis by *Fontinalis antipyretica*. I. interaction between photon irradiance, concentration of carbon dioxide and temperature. *New Phytologist* 100 (2), 127–140.
- Maberly, S. C., King, L., Dent, M. M., Jones, R. I., Gibson, C. E., 2002. Nutrient limitation of phytoplankton and periphyton growth in upland lakes. *Freshwater Biology* 47 (11), 2136–2152.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., Sciandra, A., 2011. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* under nitrogen limitation. *Biore-*

- source Technology Special Issue : Biofuels - II : Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells 102 (1), 142–149.
- Maldonado, M. T., Boyd, P. W., Harrison, P. J., Price, N. M., 1999. Co-limitation of phytoplankton growth by light and Fe during winter in the NE subarctic pacific ocean. Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography 46 (11-12), 2475–2485.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Déan, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R., Robert, R., Cadoret, J., 2012. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. Aquaculture 326-329, 106–115.
- Martinez, M. E., Sanchez, S., Jimenez, J. M., El Yousfi, F., Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology 73 (3), 263–272.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., Jun. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants : challenges for sustainable and productive agriculture. Annals of Botany 105 (7), 1141–1157.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications : a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (1), 217–232.
- Matzek, V., Vitousek, P. M., 2009. N:P stoichiometry and protein:RNA ratios in vascular plants : an evaluation of the growth-rate hypothesis. Ecology Letters 12 (8), 765–771.
- McFadden, G. I., 2001. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. Journal of Phycology 37 (6), 951–959.
- Menden-Deuer, S., Lessard, E. J., 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms and other protist plankton. Limnology and Oceanography 45 (3), 569–579.
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P., Lopes da Silva, T., 2009. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production : a review. Journal of Applied Phycology 21 (2), 199–214.

- Metting, B., Pyne, J. W., 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* 8 (7), 386–394.
- Metting Jr, F. B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology* 17 (5-6), 477–489.
- Milligan, A. J., Harrison, P. J., 2000. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 36 (1), 78–86.
- Mills, M. M., Ridame, C., Davey, M., Roche, J. L., Geider, R. J., 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical north atlantic. *Nature* 429 (6989), 292.
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Morant-Manceau, A., Schoefs, B., 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current pharmaceutical biotechnology* 13 (15), 2733–2750.
- Monier, A., Welsh, R. M., Gentemann, C., Weinstock, G., Sodergren, E., Armbrust, E. V., Eisen, J. A., Worden, A. Z., 2011. Phosphate transporters in marine phytoplankton and their viruses : cross-domain commonalities in viral-host gene exchanges. *Environmental Microbiology* 14 (1), 162–176.
- Monod, J., 1950. La technique de culture continue : théorie et applications. *Annales de l’Institut Pasteur. Service de physiologie microbienne* 79, 390–410.
- Moore, C. M., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W., Galbraith, E. D., Geider, R. J., Guieu, C., Jaccard, S. L., Jickells, T. D., La Roche, J., Lenton, T. M., Mahowald, N. M., Maranon, E., Marinov, I., Moore, J. K., Nakatsuka, T., Oschlies, A., Saito, M. A., Thingstad, T. F., Tsuda, A., Ulloa, O., 2013. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geoscience* 6 (9), 701–710.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B., Worm, B., 2011. How many species are there on earth and in the ocean ? *PLoS Biology* 9 (8), e1001127.

- Morel, F., 1987. Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *Journal of Phycology* 23, 137–150.
- Mykkestad, S. M., 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of The Total Environment* 165 (1–3), 155–164.
- Nakamura, Y., Watanabe, M. M., 1983. Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *Journal of the Oceanographical Society of Japan* 39 (4), 167–170.
- Nardozzi, J. D., Lott, K., Cingolani, G., 2010. Phosphorylation meets nuclear import : a review. *Cell Commun Signal* 8, 32.
- Nielsen, E. S., 1978. Growth of plankton algae as a function of N-concentration, measured by means of batch technique. *Marine Biology* 46 (3), 185–189.
- North, R. L., Guildford, S. J., Smith, R. E. H., Havens, S. M., Twiss, M. R., 2007. Evidence for phosphorus, nitrogen, and iron colimitation of phytoplankton communities in Lake Erie. *Limnology and Oceanography* 52 (1), 315–328.
- Obernosterer, I., Herndl, G. J., 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth : dependence on the inorganic N:P ratio. *Marine Ecology Progress Series* 116, 247–257.
- Ohmori, M., Hattori, A., 1978. Transient change in the ATP pool of *Anabaena cylindrica* associated with ammonia assimilation. *Archives of Microbiology* 117 (1), 17–20.
- Pahlow, M., Oschlies, A., 2009. Chain model of phytoplankton P, N and light colimitation. *Marine Ecology Progress Series* 376, 69–83.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S., 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (4), 1429–1441.
- Pant, B.-D., Pant, P., Erban, A., Huhman, D., Kopka, J., Scheible, W.-R., 2014. Identification of primary and secondary metabolites with phosphorus status-dependent abundance

- in *Arabidopsis*, and of the transcription factor PHR1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation : Metabolic reprogramming during p limitation. *Plant, Cell & Environment*, nd – nd.
- Perry, M. J., 1976. Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central north pacific. *Limnology and Oceanography* 21 (1), 88–107.
- Pick, U., Rachutin-Zalogin, T., 2012. Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *Journal of Microbiological Methods* 88 (2), 189–196.
- Piepho, M., Martin-Creuzburg, D., Wacker, A., 2012. Phytoplankton sterol contents vary with temperature, phosphorus and silicate supply : a study on three freshwater species. *European Journal of Phycology* 47 (2), 138–145.
- Price, N., Morel, F., 1991. Co-limitation of phytoplankton growth by nickel and nitrogen. *Limnology and Oceanography* 36 (6), 1070–1077.
- Price, N. M., Morel, F., 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *letters to Nature* 344, 658–660.
- Pujo-Pay, M., Raimbault, P., 1994. Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology Progress Series* 105, 203–207.
- Raghothama, K., 2000. Phosphate transport and signaling. *Current opinion in Plant Biology* 3, 182–187.
- Rapport GCL Développement Durable, 2010. Etat, perspectives et enjeux du marché des engrais. Tech. rep., Ministère de l’Alimentation, de l’Agriculture et de la Pêche.
- Rapport Oilgae, 2013. Comprehensive algae fuels report. Tech. rep., Oilgae.
- Rausch, C., Bucher, M., 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216 (1), 23–37.

- Raven, J. A., 1990. Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway. *New Phytologist* 116 (1), 1–18.
- Reay, D. S., Nedwell, D. B., Priddle, J., Ellis-Evans, J. C., 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake : reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Applied and environmental microbiology* 65 (6), 2577–2584.
- Redfield, A. C., 1934. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. University Press of Liverpool.
- Reid, R. J., Mimura, T., Walker, N., Smith, F., 2000. Phosphate uptake in *Chara* : membrane transport via Na/Pi cotransport. *Plant, Cell and Environment* 23, 223–228.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Olsen, Y., 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology* 30 (6), 972–979.
- Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L.-V., Woo, K. C., 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea* and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology* 7 (6), 595–602.
- Rexach, J., Llamas, A., Fernandez, E., Galvan, A., 2002. The activity of the high-affinity nitrate transport system I (NRT2;1, NAR2) is responsible for the efficient signalling of nitrate assimilation genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 215 (4), 606–611.
- Rhee, G.-Y., 1974. Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. and its ecological implications<sup>1</sup>. *Journal of Phycology* 10 (4), 470–475.
- Rhee, G. Y., 1978. Effects of N :P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnology and Oceanography* 23 (1), 10–24.
- Riegman, R., Stolte, W., Noordeloos, A., Slezak, D., 2000. Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3 :1 :3 :1) activity of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) during

- growth under N and P limitation in continuous cultures. *Journal of Phycology* 36 (1), 87–96.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R., 2009. Microalgae for oil : Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102 (1), 100–112.
- Ruangsomboon, S., Ganmanee, M., Choochote, S., 2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL 2. *Journal of Applied Phycology* 25 (3), 867–874.
- Saito, M., Rocap, G., Moffett, J., 2005. Production of cobalt binding ligands in a *Synechococcus* feature at the Costa Rica upwelling dome. *Limnology and Oceanography* 50 (1), 279–290.
- Saito, M. A., Goepfert, T. J., Ritt, J. T., 2008. Some thoughts on the concept of colimitation : Three definitions and the importance of bioavailability. *Limnology and Oceanography* 53 (1), 276–290.
- Sakano, K., 1990. Proton/Phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology* 93 (2), 479–483.
- Sakshaug, E., Holm-Hansen, O., 1977. Chemical composition of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve and *Pavlova (Monochrysis) lutheri* (Droop) green as a function of nitrate-, phosphate-, and iron-limited growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 29 (1), 1–34.
- Schwartz, R. E., Hirsch, C. F., Sesin, D. F., Flor, J. E., Chartrain, M., Fromtling, R. E., Harris, G. H., Salvatore, M. J., Liesch, J. M., Yudin, K., 1990. Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of industrial microbiology* 5 (2-3), 113–123.
- Sciandra, A., Amara, R., 1994. Effects of nitrogen limitation on growth and nitrite excretion

- rates of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Marine Ecology Progress Series 105, 301–309.
- Sciandra, A., Gostan, J., Collos, Y., Descolas-Gros, C., Leboulanger, C., Martin-Jezequel, V., Denis, M., Lefevre, D., Copin-Montegut, C., Avril, B., 1997. Growth-compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. Limnology and Oceanography 42 (6), 1325–1339.
- Seppala, J., Tamminen, T., Kaitala, S., 1999. Experimental evaluation of nutrient limitation of phytoplankton communities in the Gulf of Riga. Journal of Marine Systems 23 (1-3), 107–126.
- Shaked, Y., Xu, Y., Leblanc, K., Morel, F. M. M., 2006. Zinc availability and alkaline phosphatase activity in *Emiliana huxleyi* : implications for Zn-P co-limitation in the ocean. Limnology and Oceanography 51 (1), 299–309.
- Shatwell, T., Köhler, J., Nicklisch, A., 2014. Temperature and photoperiod interactions with phosphorus-limited growth and competition of two diatoms. PLoS ONE 9 (7), e102367.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A look back at the U.S. department of energy's aquatic species programm : biodiesel from algae. Tech. Rep. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, Colorado.
- Shuter, B., 1979. A model of physiological adaptation in unicellular algae. Journal of Theoretical Biology 78 (4), 519–552.
- Simon, N., LeBot, N., Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., 1995. Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. Applied and environmental microbiology 61 (7), 2506–2513.
- Smith, G. J., 2000. Transport makes the difference. Journal of Phycology 36 (4), 625–627.
- Smith, R. E. H., Kalff, J., 1982. Size-dependent phosphorus uptake kinetics and cell quota in phytoplankton. Journal of Phycology 18 (2), 275–284.

- Smith, S. L., Yamanaka, Y., 2007. Optimization-based model of multinutrient uptake kinetics. *Limnology and Oceanography* 54 (4), 1545–1558.
- Smith, V. H., 2006. Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment. *Limnology and Oceanography*, 377–384.
- Solovchenko, A. E., 2012. Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology* 59 (2), 167–176.
- Sommer, U., 1984. The paradox of the plankton : Fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnology and Oceanography* 29 (3), 633–636.
- Spijkerman, E., 2010. High photosynthetic rates under a colimitation for inorganic phosphorus and carbon dioxide 1 : photosynthesis under colimitation. *Journal of Phycology* 46 (4), 658–664.
- Spijkerman, E., de Castro, F., Gaedke, U., 2011. Independent colimitation for carbon dioxide and inorganic phosphorus. *PLoS ONE* 6 (12), e28219.
- Spijkerman, E., Wacker, A., 2011. Interactions between P-limitation and different C conditions on the fatty acid composition of an extremophile microalga. *Extremophiles* 15 (5), 597–609.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2), 87–96.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35 (2), 171.
- Stross, R. G., Pemrick, S. M., 1974. Nutrient uptake kinetics in phytoplankton : a basis for niche separation. *Journal of Phycology* 10 (2), 164–169.
- Sugie, K., Yoshimura, T., 2013. Effects of  $p$  CO<sub>2</sub> and iron on the elemental composition and cell geometry of the marine diatom *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae)<sup>1</sup>. *Journal of Phycology* 49 (3), 475–488.

- Sunda, W. G., Huntsman, S. A., 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature* 390 (6658), 389–392.
- Taylor, S., 1964. Abundance of chemical elements in the continental crust : a new table. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 28 (8), 1273–1285.
- Terry, K. L., 1980. Nitrogen and phosphorus requirements of *Pavlova lutheri* in continuous culture. *Botanica Marina* 23, 757–764.
- Terry, K. L., 1982a. Nitrate and phosphate uptake interactions in a marine Prymnesiophyte. *J. Phycol.* 18, 79–86.
- Terry, K. L., 1982b. Nitrate uptake and assimilation in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricornerutum* : interactions with photosynthesis and with the uptake of other ions. *Marine Biology* 69 (1), 21–30.
- Terry, K. L., Laws, E. A., Burns, D. J., 1985. Growth rate variation in the N :P requirement ratio of phytoplankton. *J. Phycol.* 21, 323–329.
- Theodorou, M. E., Elrifi, I. R., Turpin, D. H., Plaxton, W. C., 1991. Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 95 (4), 1089–1095.
- Tilman, D., Kilham, S. S., Kilham, P., 1982. Phytoplankton community ecology : the role of limiting nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13, 349–372.
- Timmermans, K., Davey, M., van der Wagt, B., Snoek, J., Geider, R. J., Veldhuis, M., Gerringa, L., De Baar, H. J. W., 2001. Co-limitation by iron and light of *Chaetoceros brevis*, *C. dictyota* and *C. calcitrans* (Bacillariophyceae). *Marine Ecology Progress Series* 217, 287–297.
- Turpin, D. H., 1991. Effects of inorganic n availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology* 27 (1), 14–20.
- Tyrell, T., 1999. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400, 525–531.

- Valenzuela, J., Mazurie, A., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K. E., Peyton, B. M., Fields, M. W., Jun. 2012. Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for Biofuels* 5 (1), 40.
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C., Allan, D. L., 2003. Phosphorus acquisition and use : critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157 (3), 423–447.
- Varela, M. M., Bode, A., Fernandez, E., Gonzalez, N., Kitidis, V., Varela, M., Woodward, E., 2005. Nitrogen uptake and dissolved organic nitrogen release in planktonic communities characterised by phytoplankton size-structure in the central atlantic ocean. *Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers* 52 (9), 1637–1661.
- Vatcheva, I., de Jong, H., Bernard, O., Mars, N. J. I., Apr. 2006. Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems. *Artificial Intelligence* 170 (4-5), 472–506.
- Vitousek, P. M., 1997. Human domination of earth’s ecosystems. *Science* 277 (5325), 494–499.
- Volokh, A., Gorbunov, A., Gundorina, S., Revich, B., Frontasyeva, M., Pal, C. S., 1990. Phosphorus fertilizer production as a source of rare-earth elements pollution of the environment. *Science of The Total Environment* 95, 141–148.
- Vrede, K., Heldal, M., Norland, S., Bratbak, G., 2002. Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6), 2965–2971.
- Walne, P. R., 1966. Experiments in the large scale culture of *Ostrea edulis* (L.). Vol. 25 of Fisheries investigations series II. Her Majesty’s Stationery Office, London.
- Weikard, H.-P., Seyhan, D., 2009. Distribution of phosphorus resources between rich and poor countries : The effect of recycling. *Ecological Economics* 68 (6), 1749–1755.
- Wilde, E., Benemann, J., 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology advances* 11 (4), 781–812.

- Woese, C. R., 1977. Endosymbionts and mitochondrial origins. *Journal of molecular evolution* 10 (2), 93–96.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101 (14), 5494–5500.
- Zohary, T., Herut, B., Krom, M. D., Fauzi C. Mantoura, R., Pitta, P., Psarra, S., Rasoulzadegan, F., Stambler, N., Tanaka, T., Frede Thingstad, T., Malcolm S. Woodward, E., 2005. P-limited bacteria but N and P co-limited phytoplankton in the Eastern Mediterranean—a microcosm experiment. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography On the Nature of Phosphorus Cycling and Limitation in the Eastern Mediterranean* 52 (22-23), 3011–3023.
- Zonneveld, C., 1996. Modeling the kinetics of non-limiting nutrients in microalgae. *Journal of Marine Systems* 9 (1-2), 121–136.



# Annexes



# Annexe A

## Paramétrisation du modèle

La paramétrisation du modèle est réalisée sur les jeux de données de l'expérience 1, comprenant deux cultures limitées par le N ou par le P. Les jeux de données des expériences 2 et 3 sont utilisées pour évaluer la validité du modèle. Le modèle sans interaction est également paramétré sur le premier jeu de données.

Trois paramètres du modèle —  $q_{N0}$ ,  $q_{PL}$  et  $q_{P0}$  — peuvent aisément être estimés à partir des données des cultures limitées par le N et par le P, en phase stationnaire, respectivement. D'autres, tels que les quotas maximaux  $q_{N_{exp}}$  et  $q_{P_{exp}}$  et les taux de croissance maximaux  $\mu_{max_N}$  et  $\mu_{max_P}$ , peuvent être estimés à partir des phases exponentielles de ces mêmes cultures. Les constantes de demi-saturation pour l'absorption du  $\text{NO}_3$  et du  $\text{PO}_4$  sont issues de l'expérience 1, au cours de laquelle une campagne de mesures a été menée à cette fin.

D'autres paramètres du modèle ne sont pas accessibles directement et nécessitent une étape calculatoire préalable. Dans le cadre du modèle de Droop, l'équation 2.5, permet de calculer  $\bar{\mu}$  à partir des quotas minimaux et maximaux et du taux de croissance maximal mesurés pendant l'expérience

$$\bar{\mu} = \mu_{max} \frac{q_{exp}}{q_{exp} - q_0} \quad (\text{A.1})$$

Les paramètres  $\bar{\rho}_N$  et  $\bar{\rho}_P$  sont également inaccessibles à l'expérience et doivent être calculés.

Dans le cas d'une culture limitée par le N,  $\bar{\rho}_N$  s'écrit :

$$\bar{\rho}_N = \mu_{maxN} \frac{q_{NL} - q_{N0}}{\frac{q_{NL}}{q_{Nexp}} - 1} \frac{q_{PL} - q_{P0}}{q_{Pexp} - q_{P0}} \quad (A.2)$$

De manière analogue, dans le cas d'une culture limitée par le P,  $\bar{\rho}_P$  s'écrit :

$$\bar{\rho}_P = \mu_{maxP} \frac{q_{PL} - q_{P0}}{\frac{q_{PL}}{q_{Pexp}} - 1} \quad (A.3)$$

Contrairement à  $q_{PL}$ , qui correspond à une réalité biologique, le paramètre  $q_{NL}$  ne peut pas être obtenu directement à partir des données expérimentales, en raison de la dépendance de  $\rho_N$  vis à vis de  $q_P$ . Dans le chapitre 3, il est démontré qu'en limitation par le P et à l'équilibre,  $q_N^*$  est une fonction croissante de  $q_P^*$  :

$$q_N^* = \frac{\bar{\rho}_{Nmax} q_P^*}{\bar{\mu}(q_{NL} - q_{N0})(q_{PL} - q_{P0}) + \bar{\rho}_{Nmax} q_P^*} q_{NL} \quad (A.4)$$

En conditions de limitation par le P et durant la phase exponentielle, la culture peut être considérée comme étant à l'équilibre :

$$q_{NL} = q_{Nexp} \frac{\bar{\rho}_N q_{Pexp} - q_{N0} \bar{\mu}_P (q_{PL} - q_{P0})}{\bar{\rho}_N q_{Pexp} - \bar{\mu}_P q_{Nexp} (q_{PL} - q_{P0})} \quad (A.5)$$

A fin de comparaison des données expérimentales aux prédictions du modèle de co-limitation, un modèle sans interaction N-P, mais incluant le contrôle de l'absorption d'un nutriment par le quota de ce même nutriment, est également considéré. La formulation de l'absorption y est donc identique pour le N et pour le P :

$$\rho_S = \bar{\rho}_S \frac{S}{S + K_S} \frac{q_{SL} - q_S}{q_{SL} - q_{S0}} \quad (A.6)$$

où  $S$  représente N ou P.

Dans ce cas, le paramètre  $q_{NL}$  est calculé d'après l'équation suivante :

$$q_{NL} = q_{Nexp} \frac{\bar{\rho}_N q_{Pexp} - q_{N0} \bar{\mu}_P (q_{Pexp} - q_{P0})}{\bar{\rho}_N q_{Pexp} - \bar{\mu}_P q_{Nexp} (q_{Pexp} - q_{P0})} \quad (A.7)$$

# Annexe B

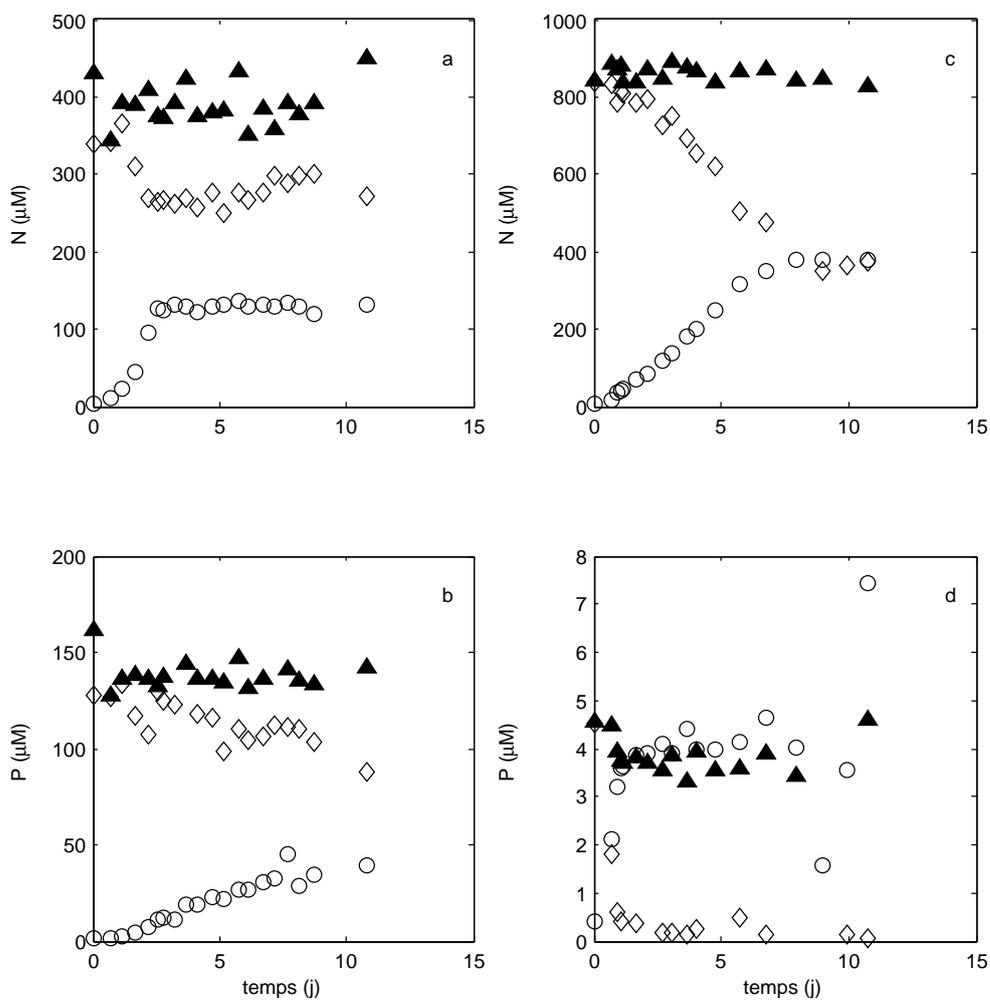


FIGURE B.1 – Bilan de compartimentation obtenu par la méthode d'oxydation humide au cours de l'expérience 1, pour l'azote et le phosphore dans les cultures limitées par le N (a et b) et par le P (c et d). triangle noir : total de l'élément dans la culture ; cercle : élément sous forme particulaire ; losange : élément sous forme dissoute.

# Annexe C

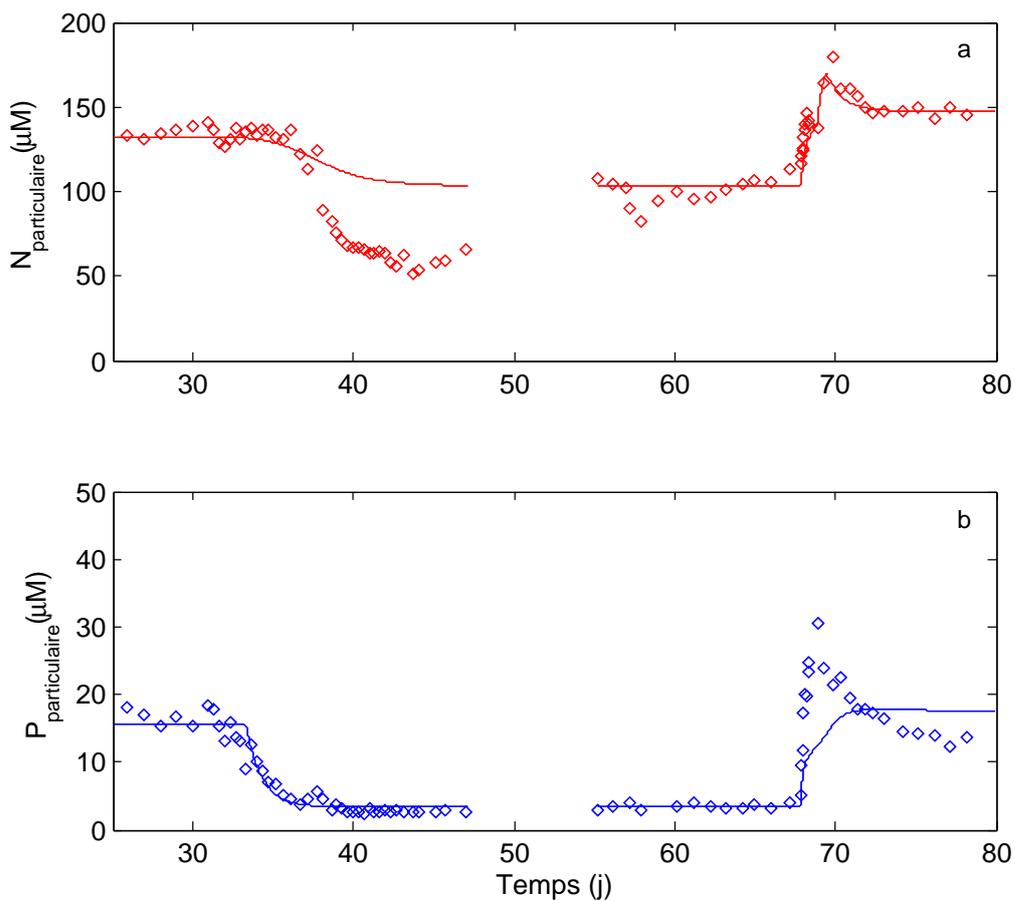


FIGURE C.1 – Évolution des fractions particulaires N et P dans les chémostats. Les lignes continues représentent les prévisions du modèle de co-limitation REE . (a) azote, (b) phosphore.

# Annexe D

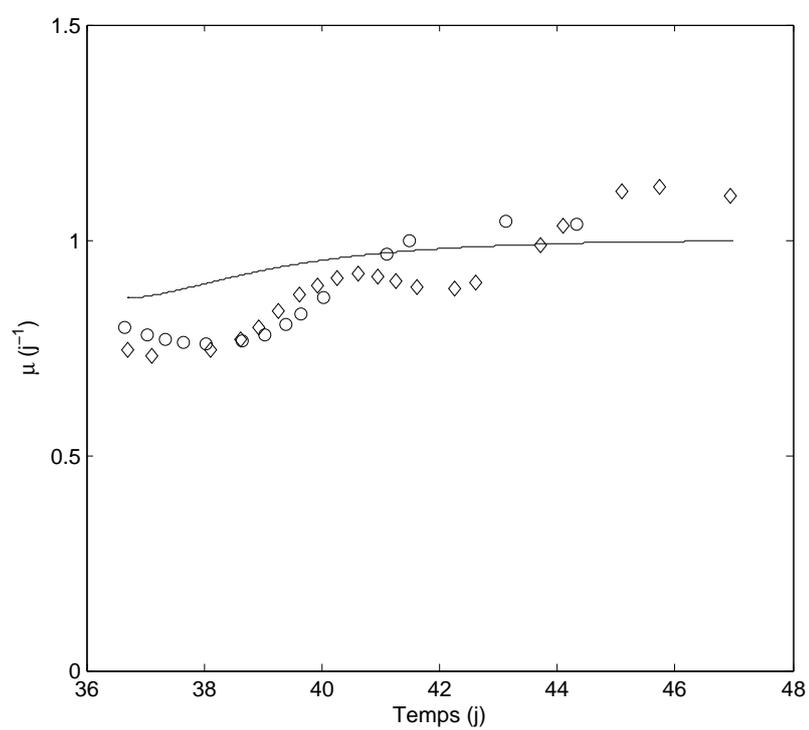


FIGURE D.1 – Évolution des taux de croissance dans les chémostats A ( $\diamond$ ) et B ( $\circ$ ) et simulation du modèle de co-limitation au cours de la première transition N-P.

# Annexe E

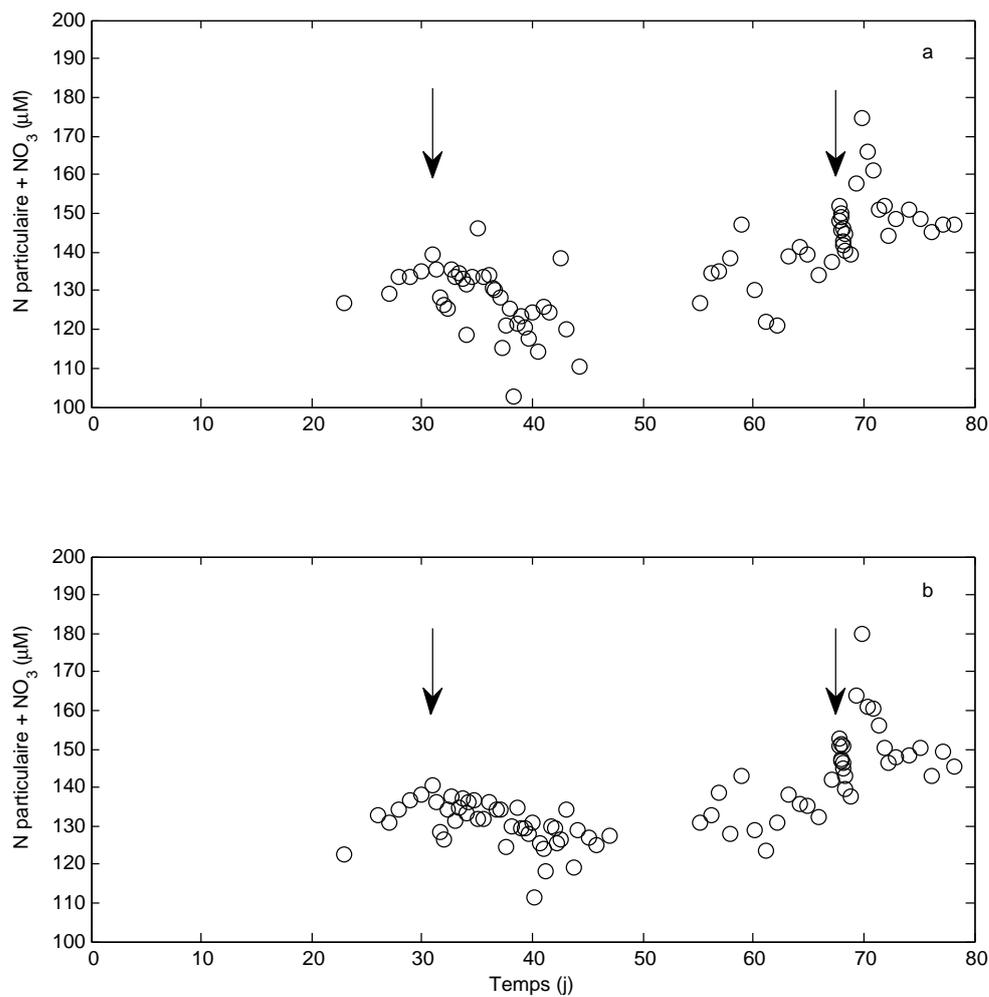


FIGURE E.1 – Évolution de la somme de l'azote particulaire et du NO<sub>3</sub> au cours des chémostats. Les flèches indiquent les transitions N-P. (a) culture 1 ; (b) culture 2.

# Annexe F

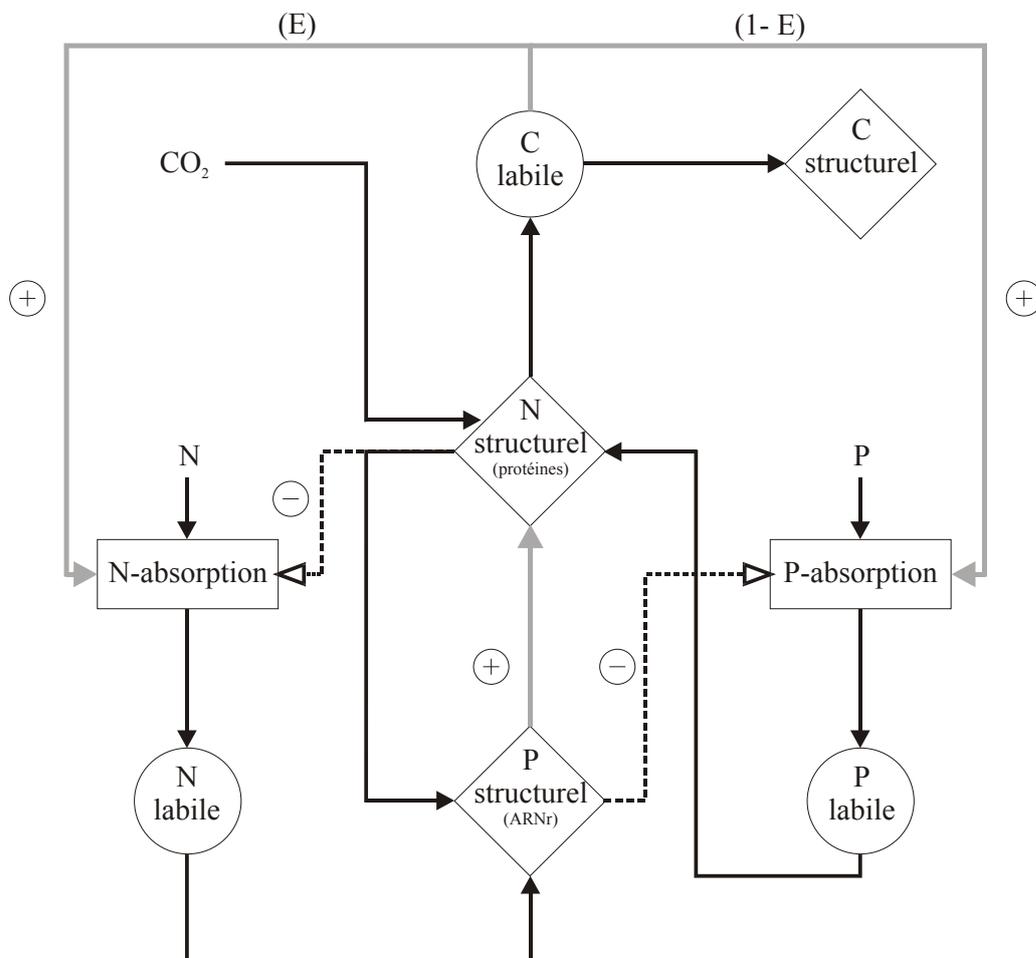


FIGURE F.1 – Représentation schématique du modèle d'interaction N-P proposé par Agren et al. (2012). Les flèches en pointillés représentent l'inhibition de l'absorption par le quota et les flèches grises la régulation de la synthèse protéique par l'ARNr et l'allocation différentielle des ressources carbonées aux protéines de transport, associée à la fonction de répartition  $E$ .

# Annexe G

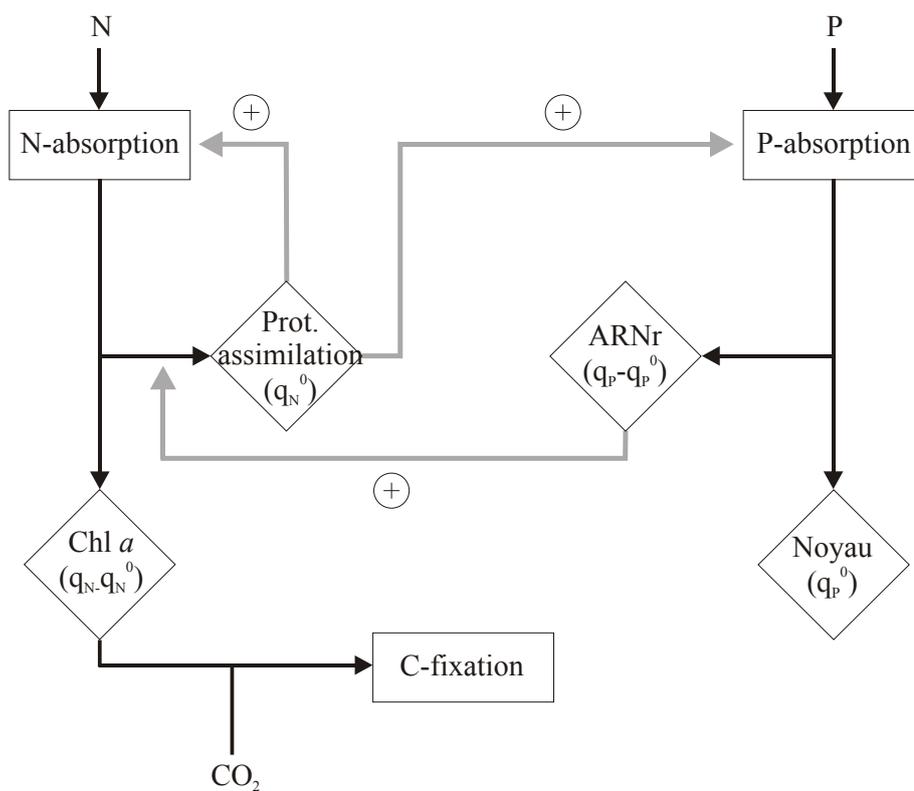


FIGURE G.1 – Représentation schématique du modèle en chaîne proposé par Pahlow et Oschlies (2009).  $q_N^0$  et  $q_P^0$  représentent les quotas de subsistance. Les flèches grises indiquent les régulations de la synthèse protéique par l'ARNr et celles de l'absorption par les protéines d'assimilation.

# Annexe H

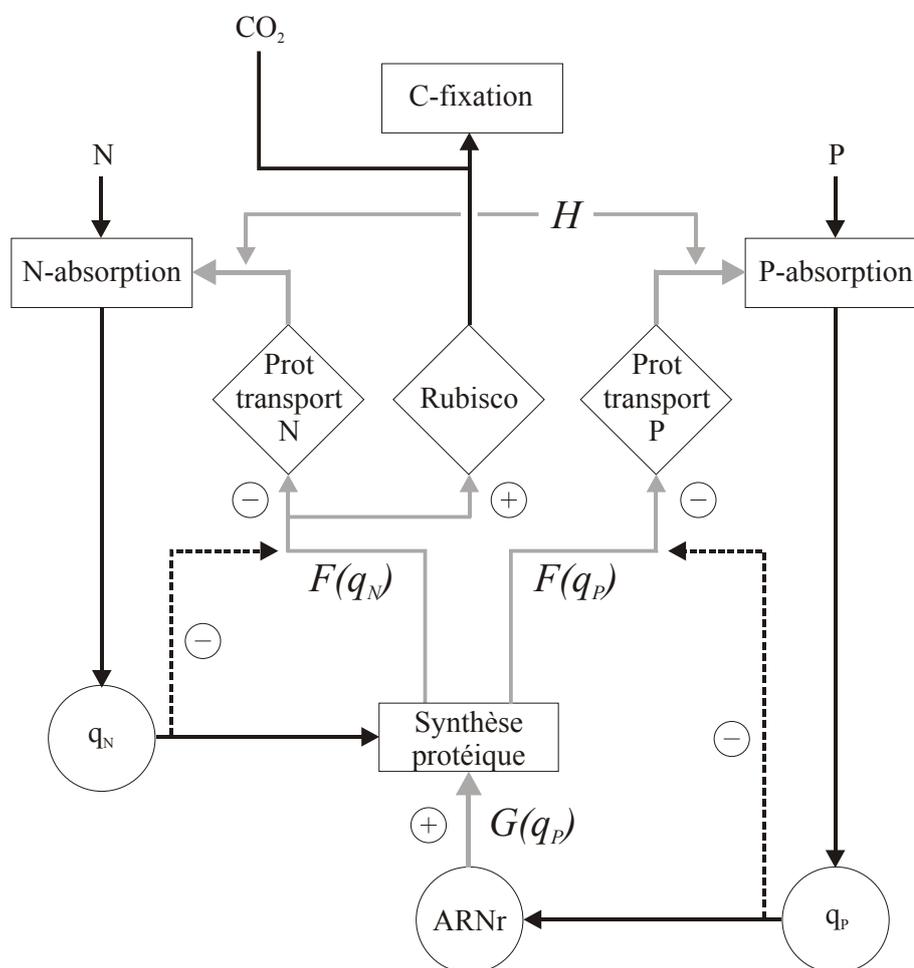


FIGURE H.1 – Représentation schématique du modèle d'interaction N-P proposé par Bonachela et al. (2013). La fonction  $F$ , qui représente l'expression des protéines, est une fonction croissante de  $q_N$  pour la Rubisco et une fonction décroissante de  $q_N$  ou  $q_P$  pour les transporteurs membranaires de N ou de P, respectivement. La fonction  $G$  est une fonction croissante de  $q_P$  et traduit la régulation de la synthèse des protéines par l'ARNr. Enfin, la fonction  $H$  représente la contrainte stérique limitant le nombre de transporteurs sur la membrane plasmique. Les flèches en pointillés indiquent l'inhibition par les quotas et les flèches grises les régulations par les trois fonctions.

# Annexe I



## Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus

Gaël Bougaran<sup>a,\*</sup>, Olivier Bernard<sup>b</sup>, Antoine Sciandra<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> PBA-IFREMER, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

<sup>b</sup> COMORE-INRIA, BP93, 06902 Sophia-Antipolis Cedex, France

<sup>c</sup> Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

<sup>d</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 September 2009

Received in revised form

19 April 2010

Accepted 19 April 2010

Available online 28 April 2010

#### Keywords:

Colimitation

Phytoplankton

Mathematical model

Quota

### ABSTRACT

It is well documented that the combination of low nitrogen and phosphorus resources can lead to situations where colimitation of phytoplankton growth arises, yet the underlying mechanisms are not fully understood. Here, we propose a Droop-based model built on the idea that colimitation by nitrogen and phosphorus arises from the uptake of nitrogen. Indeed, since N-porters are active systems, they require energy that could be related to the phosphorus status of the cell. Therefore, we assumed that N uptake is enhanced by the P quota. Our model also accounts for the biological observations that uptake of a nutrient can be down-regulated by its own internal quota, and succeeds in describing the strong contrast for the non-limiting quotas under N-limited and P-limited conditions that was observed on continuous cultures with *Selenastrum minutum* and with *Isochrysis affinis galbana*. Our analysis suggests that, regarding the colimitation concept, N and P would be better considered as biochemically dependent rather than biochemically independent nutrients.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nitrogen and phosphorus are major nutrients that are likely to limit growth of phytoplankton in the natural environment (Bergstrom et al., 2008; Davey et al., 2008; Persic et al., 2009). Situations of colimitation where both N and P resources are simultaneously low enough to limit growth have also been reported (Suttle and Harrison, 1988; Elser et al., 1990; Maberly et al., 2002; Ren et al., 2009; Zohary et al., 2005). These two nutrients play a major role in the cell metabolism as they are part of many biochemical processes. Cell nitrogen is mainly used to build proteins, amino acids and nucleic acids while phosphorus is mostly a constituent of nucleic acids and phospholipids (Geider and LaRoche, 2002). From a functional point of view and according to the terminology of Klausmeier et al. (2004a), the assembly machinery is rich in nitrogen and phosphorus, while the acquisition machinery (pigments and porters) is poor in phosphorus but rich in nitrogen. Although nitrogen and phosphorus are important constituents of the biomass, smaller pools of phosphorus in ATP and NADP also play a major role in the energetic processes.

Since the 1970s, several studies have focused on how interactions between nutrients could affect the growth of

phytoplankton. Two major models were tested to describe multi-nutrient limitation. The multiplicative model assumes that all nutrients for which the corresponding cell quota is not full contribute to growth limitation. This approach assumes that several nutrients can control growth simultaneously. In cases where several nutrient-quotas are suboptimal the multiplicative model can produce very depressed growth predictions. On the other hand, the threshold model (also called the minimum law) states that growth is always controlled by a single nutrient whose quota is the lowest relative to the actual needs of the cell (i.e. the lowest quota relative to the subsistence quota). This model therefore excludes nutrient colimitation for growth. Droop (1973, 1974), who worked on the interaction between vitamin B<sub>12</sub> and phosphorus on *Monochrysis lutheri*, first demonstrated that growth rate was limited by the most limiting nutrient. Rhee (1978) achieved the same conclusion on *Scenedesmus* sp. with nitrogen and phosphorus. Terry (1980), Elrifi and Turpin (1985) and Leonardos and Geider (2005) also argued in favor of modeling growth rate based on the minimum law.

On the other hand, N–P colimitation has frequently been invoked in the natural environment where it was demonstrated that N and P had to be available together in order to promote growth of the phytoplankton community (Maberly et al., 2002; Seppala et al., 1999; Zohary et al., 2005). Some laboratory experiments on monospecific cultures also gave evidence of more complex N–P interactions. For example, Davies and Sleep (1989)

\* Corresponding author. Tel.: +33 02 40 37 41; fax: +33 02 40 37 40 73.  
E-mail address: [gael.bougaran@ifremer.fr](mailto:gael.bougaran@ifremer.fr) (G. Bougaran).

demonstrated that carbon fixation of N and P starved *Skeletonema costatum* could be significantly stimulated only when both  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  were added simultaneously, but was repressed when only  $\text{NO}_3^-$  was added. Terry (1980) suggested that, while the minimum law prevailed for most N:P ratios, a synergetic effect on *Pavlova lutheri* could occur between the two nutrients in a narrow range of N:P ratio. Because no clear biochemical process of interaction could be identified between nitrogen and phosphorus metabolism, these two nutrients were previously classified as biochemically independent nutrients (Arrigo, 2005; Saito et al., 2008). Recently, however, Agren (2004) hypothesized that the P-content of ribosomes could perform the main link between N-assimilation and P quota. Under this hypothesis, Pahlow and Oschlies (2009) proposed a modeling approach of N–P colimitation where they categorized N and P as biochemically dependent, but the mechanisms leading to a physiological state where both nitrogen and phosphorus interfere for growth were not fully elucidated.

Here we propose a Droop-based model based on the idea that colimitation between nitrogen and phosphorus could arise from the uptake of nutrients rather than from the strict growth function. This model is an extension of the model studied by Klausmeier et al. (2004b). The proposed model resulted from a recursive reverse engineering approach, where a mathematical analysis guided the choice of model structure so that the model finally satisfies some qualitative properties. However, for the sake of clarity, only the final version of the model is presented and justified, and we demonstrate that its mathematical behavior structurally (i.e. independently of the choice of parameter values) matches the data trend. The mathematical developments that guided the modifications of the Droop model in order to end up with a colimitation model that presents an asymmetric response between N-limited and P-limited culture are therefore not detailed, and we refer the reader to Bernard et al. (2008) for an illustration of this approach.

We demonstrate the ability of our model, which is an extension of Bougaran et al. (2009), to produce a correct quantitative and qualitative representation of the experimental data obtained on *Selenastrum minutum* by Elrifi and Turpin (1985) and our own data on *Isochrysis affinis galbana*. We further compare the model output to the original model of Klausmeier et al. (2004b). Finally, we discuss the different modeling approaches for N–P colimitation and the biological basis for our model.

## 2. Material and methods

### 2.1. *Isochrysis affinis galbana*

*Isochrysis affinis galbana* CCAP 927/14 was grown in 2-L photobioreactor chemostats (Bougaran et al., 2003) at dilution rate ranging from 0.1 to  $1.1 \text{ d}^{-1}$  under different N:P ratios. Cultures were illuminated with continuous light ( $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), temperature was maintained at  $27^\circ\text{C}$  and pH at 7.2. The Walne medium was modified so as to obtain N- or P-limited medium: for the N-limited medium,  $\text{NaNO}_3$  was decreased from 1120 to  $115 \mu\text{M}$  (N:P=0.7); for the P-limited medium,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  was decreased from 159 to  $8 \mu\text{M}$  (N:P=137). Six cultures were grown under N limitation and four under P limitation.

All measurements were made on culture samples at steady-state. Chemical analyses of residual N and P concentrations were carried out on a DIONEX ion-chromatography (AS9-HC column). C and N quotas were measured on a CHN-elemental analyzer. P quota (denoted  $q_p$ ) was estimated at steady-state from residual

phosphate concentration (1):

$$q_p = \frac{p_{in} - p}{x} \quad (1)$$

where  $p_{in}$  is the phosphate concentration in the renewal medium,  $p$  the residual concentration of phosphate in the culture medium and  $x$  the carbon-biomass at steady-state.

### 2.2. *Selenastrum minutum*

Elrifi and Turpin (1985) grew *S. minutum* under phosphate or nitrate limitation in axenic chemostats, with dilution rate ranging from 0.1 to  $1.7 \text{ d}^{-1}$ . A constant photon flux density of  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  was provided at the surface of the culture. Nitrate-limited medium was supplied with  $100 \mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  and  $100 \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (N:P=1), whereas phosphorus limited medium was enriched with  $2000 \mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  and  $10 \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (N:P=200). Particulate carbon and nitrogen were measured on an elemental analyzer, whereas particulate phosphorus was analyzed following Afghan (1982). The data of Elrifi and Turpin (1985) were digitalized (using Epson 1640 SU scanner) and the C-based quotas were computed.

## 3. Model development

### 3.1. Presentation of the Droop model

The most widespread model to reproduce growth of microalgae under substrate limitation is the Droop model (Burmester, 1979; Droop, 1968b, 1983). It is widely used since it reproduces the ability of microalgae to uncouple substrate absorption and growth. Its simple structure made it possible to study and mathematically characterize its behavior (Bernard and Gouzé, 1995; Lange and Oyarzun, 1992; Vatcheva et al., 2006). However, when both nitrogen and phosphorus are at suboptimal growth level at the same time, a new model must be designed (Table 1).

In contrast to the Monod model, the Droop model (Droop, 1968b, 1983) states that growth of a phytoplanktonic population characterized by its carbon biomass ( $x$ ) is related to the cell quota ( $q$ ) of the limiting nutrient rather than to ambient extracellular concentration. When considering nitrogen in a chemostat the

**Table 1**  
Parameters used for model of N–P colimitation.

Parameter	Meaning (units)
$x$	Carbon-biomass ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$\mu_{max}$	Maximum growth rate ( $\text{day}^{-1}$ )
$\bar{\mu}$	Hypothetical growth rate when quota is infinite ( $\text{day}^{-1}$ )
$D$	Dilution rate ( $\text{day}^{-1}$ )
$n_{in}$	Nitrate concentration in the renewal medium ( $\text{molNL}^{-1}$ )
$p_{in}$	Phosphate concentration in the renewal medium ( $\text{molPL}^{-1}$ )
$n$	Ambient nitrate concentration ( $\text{molNL}^{-1}$ )
$p$	Ambient phosphate concentration ( $\text{molPL}^{-1}$ )
$q_N$	Nitrogen quota ( $\text{molN molC}^{-1}$ )
$q_P$	Phosphorus quota ( $\text{molP molC}^{-1}$ )
$q_{Nexp}$	Nitrogen quota at $\mu_{max}$ ( $\text{molN molC}^{-1}$ )
$q_{Pexp}$	Phosphorus quota at $\mu_{max}$ ( $\text{molP molC}^{-1}$ )
$q_{NO}$	Nitrogen subsistence quota ( $\text{molN molC}^{-1}$ )
$q_{PO}$	Phosphorus subsistence quota ( $\text{molP molC}^{-1}$ )
$q_{NL}$	Hypothetical maximum nitrogen quota ( $\text{molN molC}^{-1}$ )
$q_{PL}$	Hypothetical maximum phosphorus quota ( $\text{molP molC}^{-1}$ )
$\rho_N$	Nitrate uptake rate ( $\text{molN molC}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )
$\rho_P$	Phosphate uptake rate ( $\text{molP molC}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )
$\bar{\rho}_{Nmax}$	Nitrate maximum uptake rate ( $\text{molN molC}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )
$\bar{\rho}_{Pmax}$	Phosphate maximum uptake rate ( $\text{molP molC}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )
$K_{SN}$	Half saturation constant for nitrate uptake ( $\text{molNL}^{-1}$ )
$K_{SP}$	Half saturation constant for phosphate uptake ( $\text{molPL}^{-1}$ )

Droop model can be written as follows:

$$\begin{cases} \dot{n} = Dn_{in} - \rho_N(n)x - Dn \\ \dot{q}_N = \rho_N(n) - \mu(q_N)q_N \\ \dot{x} = \mu(q_N)x - Dx \end{cases} \quad (2)$$

where  $q_N$  is the internal carbon-based quota of nitrogen,  $D$  is the dilution rate of the chemostat, and  $n$  and  $n_{in}$  are the concentrations of inorganic nitrogen in the culture medium and in the renewal medium, respectively. The functions  $\rho_N$  and  $\mu$  represent inorganic nitrogen uptake and growth rate, respectively.

With a phosphorus limitation, the model is written as

$$\begin{cases} \dot{p} = Dp_{in} - \rho_P(p)x - Dp \\ \dot{q}_P = \rho_P(p) - \mu(q_P)q_P \\ \dot{x} = \mu(q_P)x - Dx \end{cases} \quad (3)$$

In this model the specific uptake rate  $\rho$  and growth rate  $\mu$  are Michaelis–Menten and Droop functions, respectively:

$$\rho(s) = \rho_m \frac{s}{s + K_s}$$

$$\mu(q) = \bar{\mu} \left( 1 - \frac{q_0}{q} \right) \quad (4)$$

where  $K_s$  is the half saturation constant for uptake,  $\rho_m$  the maximum uptake rate,  $q_0$  the minimal subsistence quota of starved cells for the limiting nutrient and  $\bar{\mu}$  the hypothetical maximum growth rate obtained for an infinite value of the quota for the limiting nutrient.

It can be proved (Bernard and Gouzé, 1995) that the internal quota for a limiting nutrient stays between two bounds

$$q_0 \leq q \leq q_{exp} \quad (5)$$

Then,  $q_{exp}$ , the maximum quota obtained at maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) (Bernard and Gouzé, 1995) can be computed:

$$q_{exp} = q_0 + \frac{\rho_m}{\bar{\mu}} \quad (6)$$

and finally the maximum growth rate is  $\mu_{max} = \mu(q_{exp})$ .

**Remark 1.** In the following, we will write as

$$\mu_{max} = \bar{\mu} \left( 1 - \frac{q_0}{q_{exp}} \right) \quad (7)$$

At steady-state, the internal quota is an increasing function of the dilution rate:

$$q^* = q_0 \frac{\bar{\mu}}{\bar{\mu} - D} \quad (8)$$

where the  $*$  denotes the value at steady state.

This model has been validated in depth and has been proved to be relevant (Droop, 1983; Sciandra and Ramani, 1994) to represent conditions of nitrogen or phosphorus limitations even in dynamic influent conditions (Bernard et al., 1998; Bernard and Gouzé, 1999).

### 3.2. Extension of Droop's model to handle colimitation

As in Klausmeier et al. (2004a), we propose to modify the Droop model in order to handle colimitation by nitrogen and phosphorus. Klausmeier et al. (2004a) categorized the various growth processes into the acquisition and assembly machineries. The acquisition machinery that combines pigments and membrane porters is N-rich but P-poor; we will, however, consider that phosphorus may play a major role at the acquisition level since it is involved in the active uptake of both nitrogen ( $\text{NO}_3^-$ ) and inorganic phosphorus. Conversely, the assembly machinery

corresponds to ribosomes and is N and P-rich. Consequently, we now state the general assumptions that uptake of a given nutrient is function of both its external concentration and the internal quota of both nutrients. We also assume that growth rate can be driven by either the nitrogen or the phosphorus quota. The resulting generic model is as follows:

$$\begin{cases} \dot{n} = Dn_{in} - \rho_N(n, q_N, q_P)x - Dn \\ \dot{p} = Dp_{in} - \rho_P(p, q_N, q_P)x - Dp \\ \dot{q}_N = \rho_N(n, q_N, q_P) - \mu(q_N, q_P)q_N \\ \dot{q}_P = \rho_P(p, q_N, q_P) - \mu(q_N, q_P)q_P \\ \dot{x} = \mu(q_N, q_P)x - Dx \end{cases} \quad (9)$$

This general model structure accounts for various models described in the literature (Davidson and Gurney, 1999; Legovic and Cruzado, 1997; Klausmeier et al., 2004b). In the model of Klausmeier et al. (2004b), the nutrient uptake rates  $\rho_P(p, q_N, q_P)$  and  $\rho_N(n, q_N, q_P)$  are represented by Michaelis–Menten kinetics:

$$\rho_P(p, q_P) = \rho_{Pmax}(q_P) \frac{p}{p + K_{Sp}} \quad \text{and} \quad \rho_N(n, q_N) = \rho_{Nmax}(q_N) \frac{n}{n + K_{SN}} \quad (10)$$

where the maximum uptake rates  $\rho_{Pmax}$  and  $\rho_{Nmax}$  are down-regulated by the corresponding internal quota, using the original inhibition formulation of Gotham and Rhee (1981).

We will base our uptake model on hypotheses differing from the kinetics in Eq. (10). We will now introduce the chosen expressions for  $\rho_N, \rho_P$  and  $\mu$ .

### 3.3. Modeling of the growth rate

We based our modeling approach on the assumption that N and P are both involved within a constant ratio in nucleic acids and particularly in RNA. Following the hypothesis that ribosome/RNA intra-cellular concentration is strongly correlated with growth rate (Klausmeier et al., 2004a), we assume that N or P can either limit growth depending on which of the two quotas is the most limiting. This hypothesis is supported by the results of Berdalet et al. (1994) on *Heterocapsa* sp. who found that both N and P starvation affected the RNA content.

We therefore assume, in line with Droop (1973, 1974) and Rhee (1978), that the most limiting nutrient will drive the growth rate, resulting in a minimum law:

$$\mu = \min(\mu_N(q_N), \mu_P(q_P)) \quad (11)$$

For the sake of simplicity, we chose the following expression:

$$\mu = \mu_{max} \min \left( \frac{1 - \frac{q_{N0}}{q_N}}{1 - \frac{q_{N0}}{q_{Nexp}}}, \frac{1 - \frac{q_{P0}}{q_P}}{1 - \frac{q_{P0}}{q_{Pexp}}} \right) \quad (12)$$

where parameters  $q_{Nexp}$  and  $q_{Pexp}$  represent the values of nitrogen and phosphorus quota for exponential growth when the growth rate has reached its maximum value  $\mu_{max}$ .

As a consequence, we will assume in the steady-state analysis that the N-limited growth rate is

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{1 - \frac{q_{N0}}{q_N}}{1 - \frac{q_{N0}}{q_{Nexp}}} \right)$$

while the P-limited growth rate is

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{1 - \frac{q_{P0}}{q_P}}{1 - \frac{q_{P0}}{q_{Pexp}}} \right)$$

Hence, following Droop's theory (see Eq. (8)), the limiting quota  $q_N$  is an increasing function of the growth rate for N-limited growth, while the limiting quota  $q_P$  is an increasing function of the growth rate for P-limited growth. When N is in excess, the internal quota of N is called the saturated quota (the same term is used reciprocally for P when P is in excess).

### 3.4. Modeling of the uptake rate

The classical modeling for uptake of an external nutrient is the Michaelis–Menten based modeling of Dugdale (1967)

$$\rho(p, q_P) = \rho_{Pmax}(q_P) \frac{p}{p + K_p} \quad (13)$$

However, it was demonstrated that the combination of the Droop's equation for the growth rate and the Michaelis–Menten uptake kinetics greatly overestimates the experimental uptake rates for the non-limiting nutrient under extreme N:P ratios (Gotham and Rhee, 1981; Klausmeier et al., 2004b). Indeed, it is usual to consider that uptake of a nutrient can be down-regulated by its own internal quota (Morel, 1987). This reasoning leads to a slightly different uptake model, as developed by Lehman et al. (1975).

We therefore introduced a down-regulation term in the maximum P-uptake rate:

$$\rho_{Pmax}(q_P) = \bar{\rho}_{Pmax} \frac{q_{PL} - q_P}{q_{PL} - q_{P0}} \quad (14)$$

where  $q_{PL}$  is the hypothetical maximum value for the P quota and  $\bar{\rho}_{Pmax}$  is the maximum value of the uptake rate, when  $q_P = q_{P0}$ . As Flynn (2008) pointed out, there is no particular reason for the

critical level  $q_{PL}$  to equal the Droop–maximum quota  $q_{Pexp}$  (and this obviously holds for  $q_{NL}$  also). Indeed, the data of Elrifi and Turpin (1985) showed that the maximum achievable quota of a non-limiting nutrient could exceed the observed  $q_{exp}$  (6). For a given dilution rate, Elrifi and Turpin (1985) defined the luxury consumption capacity as the ratio of the saturated quota to the limiting quota. Luxury uptake was observed to be particularly high for P that could be stored in quantities up to 16 times the actual needs of *S. minutum*, while luxury consumption of N did not exceed 4.

In conditions of nitrogen limitation and excess P supply ( $P \gg K_{Sp}$ ), we obtain the following from Eq. (9):

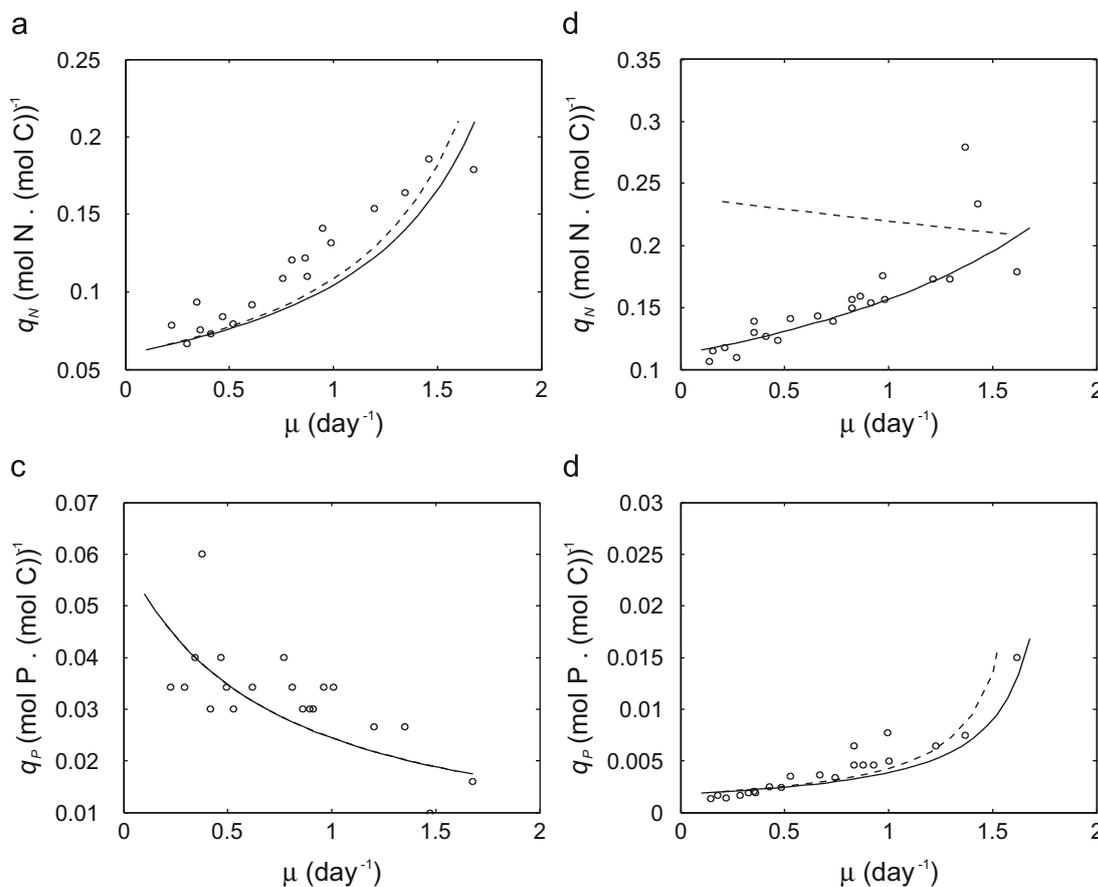
$$\dot{q}_P = \bar{\rho}_{Pmax} \frac{q_{PL} - q_P}{q_{PL} - q_{P0}} - Dq_P \quad (15)$$

and at steady-state, we can compute the saturated quota:

$$q_P^* = \frac{\bar{\rho}_{Pmax} q_{PL}}{\bar{\rho}_{Pmax} + D(q_{PL} - q_{P0})} \quad (16)$$

It follows that the saturated  $q_P^*$  is a decreasing function of the dilution rate. From Droop's theory (see Eq. (8)), the limiting  $q_N^*$  is an increasing function of the dilution rate, and consequently the saturated  $q_P^*$  is a decreasing function of the limiting  $q_N^*$ . This has already been reported by Elrifi and Turpin (1985), who observed that the saturated phosphorus quota decreased for N-limited culture (see Fig. 1).

**Remark 2.** This conclusion is similar to what can be expected with the model of Klausmeier et al. (2004b), in the situation of excess P supply ( $P \gg K_{Sp}$ ). Indeed, the kinetics for phosphorus uptake are identical (see Eq. (10)). Since, in both models, at steady state  $\mu = D$ , Eq. (16) also holds for the model of Klausmeier et al.



**Fig. 1.** Comparison of the two models output with the experimental results for *Selenastrum minutum* at steady-state (Elrifi and Turpin, 1985). The top figures show  $q_N$  against  $\mu$  under nitrogen limitation (a) and phosphorus limitation (b). The bottom figures show  $q_P$  against  $\mu$  under nitrogen limitation (c) and phosphorus limitation (d). Solid line: proposed colimitation model with parameter values as in Table 2. Dashed line: model of Klausmeier et al. (2004b).

(2004b), the predicted saturated phosphorus quota decreases with respect to  $D$ .

However, the situation is different for nitrogen. Elrifi and Turpin (1985) showed that the saturated nitrogen quota of P-limited culture increases with the dilution rate (see Fig. 1). Our previous reasoning for P-limitation proves that the N uptake rate cannot be regulated solely by the internal nitrogen quota. Otherwise, it would lead to an equation similar to (16), where the saturated  $q_N^*$  would decrease with  $D$ .

We will now explore another mechanism based on the idea that, as the transport of nitrate is active, it requires energy (i.e. ATP) and cofactors provided by the phosphorus pool (Crawford and Glass, 1998; Forde, 2000). Thus, the modeling of N uptake must reproduce the fact that the P quota of P-starved cells decreases and, as a consequence, the N uptake also decreases.

Therefore, we assume that the uptake of nitrogen is enhanced by the phosphorus quota:

$$\rho_{Nmax}(q_N, q_P) = \bar{\rho}_{Nmax} \frac{q_{NL} - q_N}{q_{NL} - q_{NO}} \frac{q_P - q_{PO}}{q_{PL} - q_{PO}} \quad (17)$$

We can thus infer that, in transient situations where P becomes limiting, the P-status of the cells could induce a N uptake reduction leading to N–P colimitation. Conversely, when  $q_P$  is high, the P-driven term allows a maximum potential for N uptake.

Let us compute the saturated quota  $q_N^*$  under P limitation. From Eq. (12) in P-limited conditions, the growth rate can be represented by the Droop model:

$$\mu(q_P) = \bar{\mu} \left( 1 - \frac{q_{PO}}{q_P} \right) \quad (18)$$

At steady-state in the chemostat, when N is supplied in excess (i.e.  $N \gg K_{S_N}$ ), we have  $\rho_{Nmax}(q_N^*, q_P) = \mu(q_P)q_N^*$ :

$$\bar{\rho}_{Nmax} \frac{q_{NL} - q_N^*}{q_{NL} - q_{NO}} \frac{q_P^* - q_{PO}}{q_{PL} - q_{PO}} = \bar{\mu} \left( 1 - \frac{q_{PO}}{q_P} \right) q_N^* \quad (19)$$

From this equation, the steady-state value of the saturated nitrogen quota can be computed as follows:

$$q_N^* = \frac{\bar{\rho}_{Nmax} q_P^*}{\bar{\mu}(q_{NL} - q_{NO})(q_{PL} - q_{PO}) + \bar{\rho}_{Nmax} q_P^*} q_{NL} \quad (20)$$

Thus, the saturated  $q_N^*$  is an increasing function of the limiting  $q_P^*$ . Since, from Eq. (8), the limiting  $q_P^*$  is itself an increasing function of the dilution rate, it follows that the saturated  $q_N^*$  is increasing with the dilution rate. It is notable that this conclusion is the opposite to the decreasing behavior of the saturated  $q_P^*$  under N limitation.

**Remark 3.** If we consider the model of Klausmeier et al. (2004b) in the situation of excess N supply ( $N \gg K_{S_N}$ ), we get from Eq. (10):

$$0 = \rho_{Nmax} \frac{q_{NL} - q_N^*}{q_{NL} - q_{NO}} - D q_N^* \quad (21)$$

and therefore  $q_N^* = \bar{\rho}_{Nmax} q_{NL} / (\bar{\rho}_{Nmax} + D(q_{NL} - q_{NO}))$ . As a consequence, the saturated  $q_N^*$  is a decreasing function of the dilution rate. This response is therefore opposite to our model prediction.

## 4. Comparison of the model output with the experimental datasets

### 4.1. Qualitative comparison

The chemostat experiments with *Isochrysis affinis galbana* under two extreme N:P ratios gave contrasting patterns for the N and P quotas depending on the limiting nutrient. The steady-state carbon quota of cells was high at low growth rates and decreased

to a minimum (0.5 pmol cell<sup>-1</sup>) at  $\mu = 0.8 \text{ d}^{-1}$ . At low growth rates, the steady-state carbon quota appeared to be slightly larger under P limitation (0.9 pmol cell<sup>-1</sup>) than under N limitation (0.8 pmol cell<sup>-1</sup>). The steady-state limiting quota for both N and P increased with growth rate, in agreement with the Droop theory. Steady-state non-limiting P quota was high at low growth rate under N limitation and declined with growth rate. The non-limiting P quota was always higher than that required to support that growth rate. On the other hand, the steady-state non-limiting N quota increased with growth rate and reached a maximum value for the highest dilution rate tested. Our results emphasize that luxury consumption capacity was much higher for P than for N. For all the dilution rates tested, the residual concentration of the non-limiting nutrient was high ( $N > 160 \mu\text{M}$  and  $P > 110 \mu\text{M}$ ), while it was undetectable for the limiting nutrient.

Elrifi and Turpin (1985) observed the same behavior for limiting and non-limiting quotas on *S. minutum*. They specified that ambient phosphorus was present (40–60  $\mu\text{M}$ ) under nitrate limitation, and that nitrate was present (1.25–1.50 mM) under phosphate limitation.

In both studies, the draw-down for the non-limiting nutrient was incomplete. The non-limiting quotas were always at their maxima and were assumed to be saturated. The maximum possible quota for P occurred at the lowest growth rate while the maximum N quota was achieved at  $\mu_{exp}$  and was equivalent to  $q_{Nexp}$ .

### 4.2. Model calibration

Model parameters were identified as follows.  $\mu_{max}$  for *S. minutum* was taken from Elrifi and Turpin (1985), and for *Isochrysis affinis galbana* it was determined from additional experiments.  $q_{NO}$  and  $q_{PO}$  and  $\bar{\mu}_N$  and  $\bar{\mu}_P$  were identified by fitting the experimental data to the standard Droop equation (7).  $\bar{\rho}_{Nmax}$  and  $\bar{\rho}_{Pmax}$  were computed from

$$\bar{\rho}_{max} = \frac{\bar{\mu} \mu_{max}}{\bar{\mu} - \mu_{max}} q_0 \quad (22)$$

Finally,  $q_{Nexp}$  and  $q_{Pexp}$  were computed from Eq. (6).

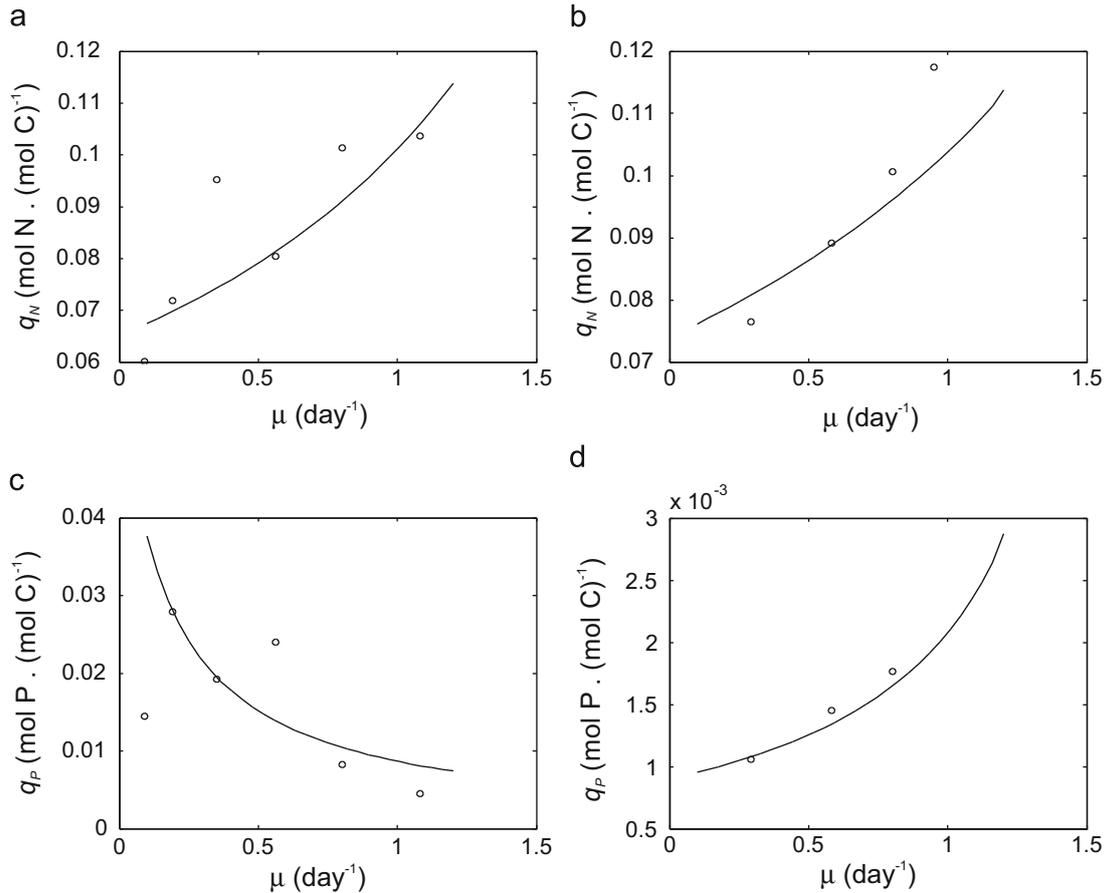
The affinity constants  $K_{S_N}$  and  $K_{S_P}$  for *S. minutum* were taken from Nielsen (1978) and Ahlgren (1977), respectively. They were identified thanks to additional experiments for *Isochrysis affinis galbana*.

The values of  $q_{PL}$ ,  $q_{NL}$ ,  $\bar{\rho}_{Nmax}$  and  $\bar{\rho}_{Pmax}$  have been adjusted in order to obtain the best fit between model predictions and steady-state measurements of  $q_P$  and  $q_N$ .

### 4.3. Quantitative comparison

The model output was compared to the experimental datasets for saturated and limiting quotas at steady-state for both *Isochrysis affinis galbana* and *S. minutum* (Elrifi and Turpin, 1985). Figs. 1 and 2 demonstrate the ability of our model to correctly represent the experimental data of the two species both qualitatively and quantitatively (parameter values are given in Table 2). The steady-state output of our model correctly reproduces the increasing trend of the limiting  $q_N$  and  $q_P$  and the strong asymmetry between the responses of the saturated quotas  $q_N$  and  $q_P$ .

We also fitted the experimental data for the two species with the model of Klausmeier et al. (2004b) extended with the uptake inhibition formulation of Gotham and Rhee (1981). Fig. 1 shows that, while this model succeeds in fitting the N and P limiting quotas and saturated  $q_P$  correctly, it predicts a decline of the saturated  $q_N$  with growth rate (as forecasted by our analytical computations and explained in Remark 3), which strongly contrasts with the increasing trend in the experimental data.



**Fig. 2.** Comparison of the model output to the experimental results for *Isochrysis affinis galbana* at steady-state. The top two figures show  $q_N$  against  $\mu$  under nitrogen limitation (a) and phosphorus limitation (b). The bottom figures show  $q_P$  against  $\mu$  under nitrogen limitation (c) and phosphorus limitation (d). Parameter values used for the model are given in Table 2.

**Table 2**

Parameter values used for model of N–P colimitation in *Selenastrum minutum* and *Isochrysis affinis galbana*.

Parameter	Value		Unit
	<i>S. minutum</i>	<i>I. aff. galbana</i>	
$\mu_{max}$	1.68	1.5	day $^{-1}$
$q_{n0}$	$6 \times 10^{-2}$	$6.5 \times 10^{-2}$	molN molC $^{-1}$
$q_{p0}$	$1.8 \times 10^{-3}$	$0.9 \times 10^{-3}$	molP molC $^{-1}$
$q_{NL}$	0.24	0.15	molN molC $^{-1}$
$q_{PL}$	0.06	0.06	molP molC $^{-1}$
$q_{Nexp}$	0.21	0.14	molN molC $^{-1}$
$q_{Pexp}$	0.015	0.006	molP molC $^{-1}$
$\rho_{Nmax}$	9.6	9.6	molN molC $^{-1}$ day $^{-1}$
$\rho_{Pmax}$	$4 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-2}$	molP molC $^{-1}$ day $^{-1}$
$K_{S_N}$	$0.05 \times 10^{-6}$	$0.1 \times 10^{-6}$	molNL $^{-1}$
$K_{S_P}$	$0.025 \times 10^{-6}$	$0.05 \times 10^{-6}$	molPL $^{-1}$

## 5. Discussion

### 5.1. Asymmetry between N and P uptake

Multi-nutrient limitation has recently become the focus of renewed attention. In the particular case of N and P, there is experimental evidence for an asymmetric response between the N and P non-limiting quotas under P and N limitation, respectively. An additional asymmetry is observed for the behavior of  $q_P$  under P- and N-limited conditions, while the  $q_N$  trend appears to be irrespective of what nutrient (N or P) is limiting growth. Most

modeling approaches for phytoplankton growth have a symmetric formulation and therefore cannot describe the observed asymmetry (Droop, 1974; Klausmeier et al., 2004b; Smith and Yamanaka, 2007). This was illustrated in the particular case of the model of Klausmeier et al. (2004b) with the experimental data of Elrif and Turpin (1985).

The model proposed in the present paper is based on the idea, also developed by others (Agren, 2004; Davidson and Gurney, 1999; Pahlow and Oschlies, 2009), that a non-limiting nutrient can control the limitation exerted by another nutrient. Its asymmetric structure and simple formulation allow our model to successfully predict the qualitative and quantitative behavior of the limiting and non-limiting quotas observed for *S. minutum* and *Isochrysis affinis galbana*. It does so without discontinuity and without introducing a great number of supplementary parameters. Hence, in accordance with Pahlow and Oschlies (2009), but contrary to the classical assumption that N and P lead to independent limitation, we conclude that these two nutrients would be better considered as biochemically dependent nutrients, as defined by Arrigo (2005) and Saito et al. (2008).

### 5.2. Model prediction at physiological limit boundaries

Phytoplankton cell nutrient quota at a given growth rate in the chemostat can vary between two boundaries. Indeed, if the growth is limited by the nutrient being considered, the internal quota is at its minimum level (Droop, 1968a). When this nutrient is in excess and growth is limited by another nutrient, cells accumulate the non-limiting nutrient up to a maximal quota. Hence, we can define the

physiological limit boundaries (Elrifi and Turpin, 1985) as the maximal and minimal attainable quota values for a given growth rate. Accordingly, the luxury consumption capacity, for a given growth rate can be defined from these physiological limit boundaries as the ratio of the maximum quota to the minimum quota.

Under the extreme N:P input-ratio tested experimentally with both *S. minutum* and *Isochrysis affinis galbana*, we assumed that the quota of the non-limiting nutrient was saturated, while the quota of the limiting nutrient was restricted to its minimum value for the given growth conditions. Therefore we can assume that the physiological limit boundaries were reached.

Under very low N:P input ratio, the model fits the data, with the saturated  $q_P$  decreasing as the N-limited growth rate increases, according to Eq. (16). On the contrary, the experimental data of the saturated  $q_N$  under P-limitation turned out to be an increasing function of the growth rate for both *S. minutum* and *Isochrysis affinis galbana*. The saturated- $q_N$  behavior matches the hypothesis of Droop (1983) that a non-limiting quota follows the Droop equation with a higher apparent  $q_{NO}$ . As our analysis pointed out, the model of Klausmeier et al. (2004b), which only integrates the inhibiting effect of  $q_N$  over N uptake, predicts a decreasing trend for the saturated- $q_N$  with the growth rate, as is observed for the saturated- $q_P$  under N-limiting conditions (see Eq. (16)). Therefore, the limiting effect of  $q_P$  on N uptake is necessary to fit the physiological boundaries correctly (Eq. (20)). The asymmetric functions for N (structural) and P (functional) and particularly the energetic role of P at the acquisition level were therefore critical in our modeling approach. Thus, although the acquisition machinery is P-poor, P appears to play a major role in the uptake of  $\text{NO}_3^-$ .

The phenomenon of luxury consumption of inorganic nutrients by phytoplankton has been widely documented (Ketchum, 1939; Droop, 1974). Fig. 3a shows that the capacity of N-luxury consumption decreases with growth rate, as does P (Fig. 3b). The capacity of N-luxury consumption has been reported to be lower than that of P (Elrifi and Turpin, 1985; Terry, 1982) and our model succeeds in describing this difference.

### 5.3. Model prediction inside the physiological limit boundaries

In cases where N:P input ratio is closer to the critical ratio for each species, one might suspect different behavior for the non-limiting quota, as it may not reach saturation. Indeed, the asymmetric structure of our model results in an asymmetric behavior for the non-limiting  $q_N$  and  $q_P$ , as well as in uptake-control

contrasts depending on (1) whether N or P is limiting and (2) the growth rate.  $q_P$  varies according to the description of Klausmeier et al. (2004b): under P-limited growth rate or near the critical ratio, uptake-control is exerted solely by the low P-resource (i.e.  $P/(P+K_P) < 1$ ) and  $q_P$  builds-up according to the Droop model (Fig. 4b for N:P=10–100).

Conversely, under N-limited growth rate, the model predicts that  $q_P$  may either increase or decrease, depending on the dilution rate and the N:P-input ratio in the chemostat. As long as  $q_P$ -saturation is not achieved, uptake control is solely exerted by the low P resource.  $q_P$  increases with growth rate because P resource increases (i.e.  $P/(P+K_P) < 1$ ). Higher N-limited growth rates can lead to situations where the P-uptake capacity then becomes limiting and  $q_P$  decreases and converges towards  $q_{Pexp}$  (see Fig. 4b for N:P=2).

Inside the physiological limit boundaries, N-uptake control under P-limited growth rate is even more complex because it is also governed by  $q_P$ : at low P-limited growth rate, N uptake is strongly forced by both the limited N-resource (i.e.  $N/(N+K_N) < 1$ ) and the low ATP-pool that limits the activity of N porters (Fig. 4a). Since both the available N and P resources increase with the P-limited growth rate,  $q_P$  increases and favors uptake of the less limiting N, which results in an increase of  $q_N$  with growth rate. The mechanistic basis of our model therefore contrasts with the hypothesis of Klausmeier et al. (2004a) that P-limitation favors resource acquisition, at least for nitrate.

There are several other datasets in the literature that describe the response of  $q_P$  and  $q_N$  to growth rate under varying N:P ratio, but few are as comprehensive as the work of Elrifi and Turpin (1985), or investigated such low N:P ratios. Indeed, as far as we know, only the studies of Elrifi and Turpin (1985) and Rhee (1974) provided evidence that the physiological limit boundaries were reached.

Healey (1985) investigated a rather large range of N:P input ratio (2.5–100) in his study on the interacting effects of light and nutrient limitation on *S. linearis*. The data showed an increasing trend for both N- and P-limiting quotas with growth rate. The experimental non-limiting  $q_N$  was confirmed to be an increasing function of the growth rate, with a rather higher apparent  $q_{NO}$ , as predicted by our model and observed by Elrifi and Turpin (1985), but not by others (Laws and Bannister, 1980). Nevertheless, given the scatter in the data, the non-limiting  $q_P$  of *S. linearis* exhibited no particular trend in the range of the growth rate tested.

Goldman and Peavey (1979) demonstrated that N-limited continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* exhibit increasing (limiting)  $q_N$  and (non-limiting)  $q_P$  with growth rate under N:P

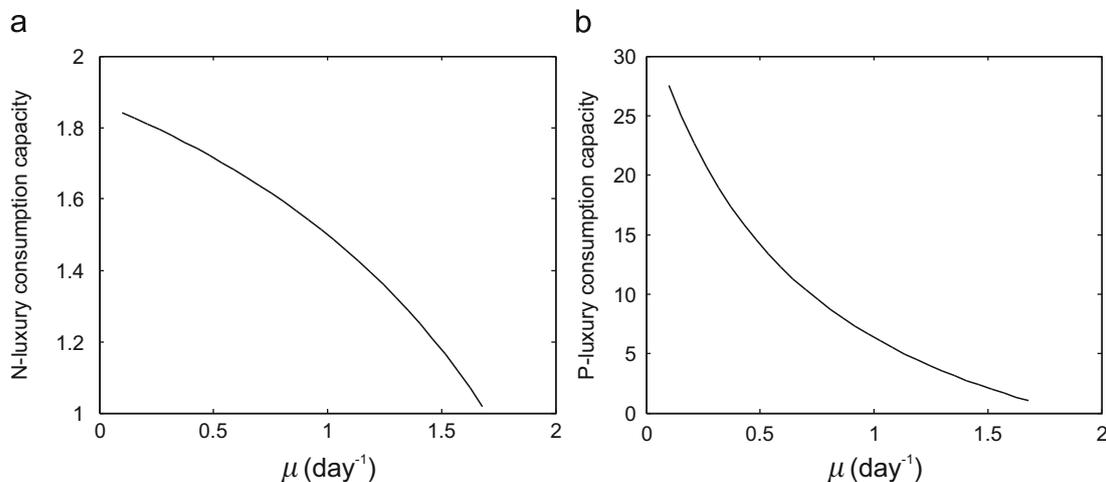
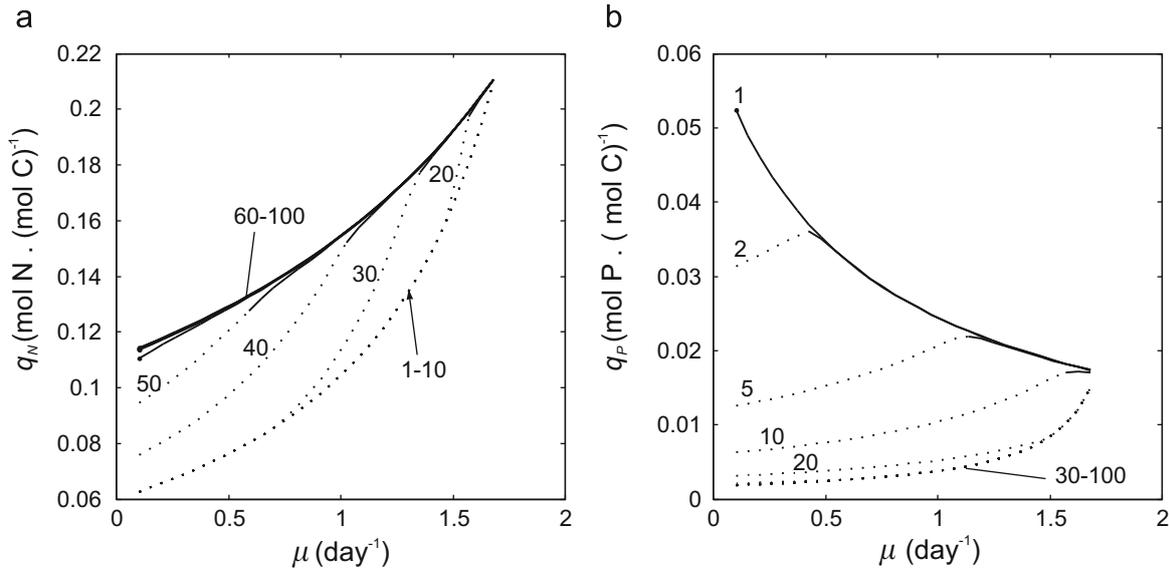


Fig. 3. Model simulation of N (a) and P (b) luxury consumption capacities computed at steady-state against growth rate. The luxury consumption capacities were calculated for two extreme N:P input ratios (i.e. 1 and 100).



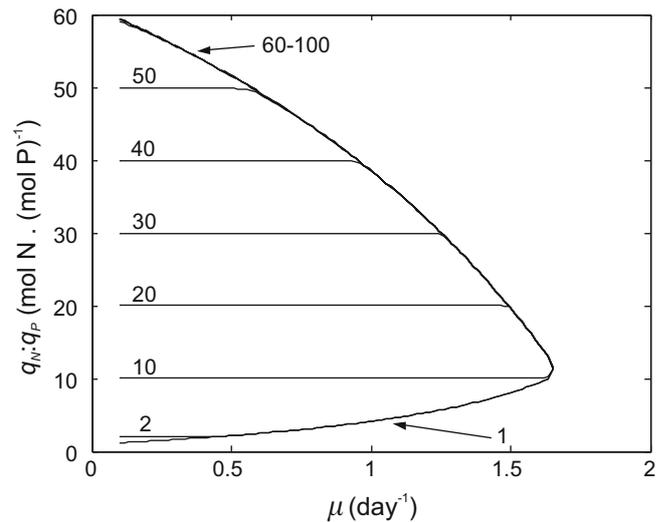
**Fig. 4.** Model predictions for the steady-state N quota (a) and P quota (b) against growth rate under different N:P input ratio ranging from 1 to 100. Numbers represent the values of the N:P input ratio. Dotted-lines represent situations where uptake is substrate-limited ( $S/(S+K_S) < 0.9$ ). The solid lines represent situations where the uptake-capacity is limiting.

ratios ranging from 5 to 15. However, the authors clearly specified that “virtually all the influent  $\text{PO}_4^{3-}$  was stripped from the medium at all the values of  $\mu$  up to  $1.1 \text{ d}^{-1}$ ”. This makes it possible to infer that the physiological limit boundary was not attained and that  $q_p$  was not saturated, even under the lowest N:P ratio tested. Calculations based on the dataset of Healey (1985) seem to indicate that ambient  $\text{PO}_4^{3-}$  was remaining under N limitation. Nevertheless, since Healey (1985) did not give any direct indications for ambient  $\text{PO}_4^{3-}$  it can hardly be ascertained whether  $q_p$  was saturated or not.

Interestingly, the model predicts striking modifications for  $q_p$  behavior near the limit physiological boundary even for a small increase of the N:P-input ratio in the range 1–10. The relatively high values for the minimal N:P-input ratio tested by Goldman and Peavey (1979) (N:P=5) and Healey (1985) (N:P= 2.5) could explain why none of the authors observed the typical decrease in the saturated  $q_p$  at the physiological boundary, as predicted by the model. Indeed, it is clear from Fig. 4b that under input ratio values of 2 and 5,  $q_p$  increases for low growth rates and decreases for higher growth rates. In his experiment on P uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. in a chemostat, Rhee (1974) investigated N:P ratios as low as 1:1. Unfortunately, due to the scatter in the data for  $q_p$  and because the quota is given as cell quota rather than carbon-based quota, it is difficult to ascertain whether these data support the model’s decreasing trend for saturated  $q_p$  or not.

Our model highlights an important feature for  $q_p$ : conversely to  $q_N$ , the  $q_p$  behavior is very sensitive to the N:P input ratio. On one hand, a slight increase of extremely low N:P input ratio can result in striking modifications in the  $q_p$  behavior. On the other hand, under N-limited growth but close to the critical ratio,  $q_p$  remains rather constant with growth rate (see Fig. 4 for N:P=5). This result has significant implications for experiments aiming to examine N–P colimitation, which should be designed so as to guarantee that the physiological limit boundaries are actually attained.

Fig. 5 shows simulation results for the variations of  $q_N:q_P$  against growth rate under different input N:P ratios ranging from 1 to 100. At low growth rates  $q_N:q_P$  remains equivalent to the input ratio as long as the input ratio falls within the physiological



**Fig. 5.** Steady-state predictions for the  $q_N:q_P$  ratio against growth rate under different N:P input ratio ranging from 1 to 100. Numbers represent the values of the N:P input ratio.

limit boundaries and neither of the two nutrients is limiting. Increase in growth rate results in alteration of the  $q_N:q_P$  ratio driven by the physiological limit boundaries to the quota, as we described above for extreme N:P input ratios.

#### 5.4. Comparison with other N–P colimitation models

The mechanisms of N–P colimitation remain ambiguous, because N and P are involved together in many biochemical processes. Different modeling approaches were thus proposed for N–P colimitation over the last decade. Some of these converged towards the hypothesis that interaction between nutrients takes place at the acquisition level, which characterizes the interface between the environment and the intracellular compartment (Flynn, 2008; Klausmeier et al., 2004b, 2007; Smith and

Yamanaka, 2007). On the other hand, both Agren (2004) and Pahlow and Oschlies (2009) developed models based on the idea that colimitation occurs in the assembly machinery.

Several models of colimitation have been based on the Droop theory and since Droop (1973, 1974) and Rhee (1978) demonstrated that the multiplicative law generally underestimates growth rate, the growth function was often represented as a minimum law rather than the multiplicative one (Davidson and Gurney, 1999; Klausmeier et al., 2004b; Smith and Yamanaka, 2007). In addition, an internal quota down-regulation of the uptake system was sometimes incorporated into the model to prevent overestimation of the quota for the non-limiting nutrient (Davidson and Gurney, 1999; Gotham and Rhee, 1981; Klausmeier et al., 2004b). Smith and Yamanaka (2007) used an alternate nutrient uptake model, built on the affinity-based uptake model (Aksnes and Egge, 1991; Pahlow, 2005) where phytoplankton allocate internal N between surface uptake sites and internal enzymes in the same proportion for all nutrients. This model was in good agreement with the fitted data of Droop (1974) and Rhee (1974), except at the extreme N:P ratios where it did not perfectly agree with the data of Rhee.

Interestingly, the model of Klausmeier et al. (2004b) reproduced the behavior of  $q_P$  under N and P limiting conditions, with general trends resembling those of our model. Nevertheless, as our analysis pointed out, the same behavior was assumed for  $q_N$ , although non-limiting  $q_N$  was experimentally demonstrated to be an increasing function of the growth rate, even under very high N:P ratio (Elrifi and Turpin, 1985; Healey and Hendzel, 1975; Terry, 1982).

Another important feature for models of N–P colimitation is their ability to describe the asymmetry between non-limiting N and P quotas. Hence, the modeling approaches can be categorized into two broad types depending on whether they include a symmetric or an asymmetric formulation for the different nutrients. The classical multiplicative formulation of multi-nutrients models induces a symmetric behavior for the different nutrients and is, therefore, inappropriate for describing N–P colimitation. Conversely, as discussed by Pahlow and Oschlies (2009), the threshold model, which links growth rate to the quota of a suboptimal resource, could principally achieve asymmetry but this is not mechanistically based and would restrict the range of  $q_N:q_P$  ratios observed experimentally. Flynn (2008) approached the asymmetry of the non-limiting  $q_P$  and  $q_N$  observed by Elrifi and Turpin (1985) for *S. minutum* with a two-state model, where the uptake functions were of the classical Michaelis–Menten type for the limiting nutrients, and were multiplied by a function depending on  $q_N$  and  $q_P$  in order to reproduce the kinetic of the non-limiting quota.

Very recently, Pahlow and Oschlies (2009) developed a chain model that includes P-control of N-assimilation in terms of the affinity-based uptake function, and where  $q_N$  ultimately determines growth rate. These authors based their modeling approach on the idea that the P content of ribosomes could act as the mechanistic link between  $q_P$  and N assimilation, as proposed by Agren (2004). This model succeeds in describing the asymmetric behavior of  $q_P$  and  $q_N$  for a range of experimental datasets for different phytoplankton species.

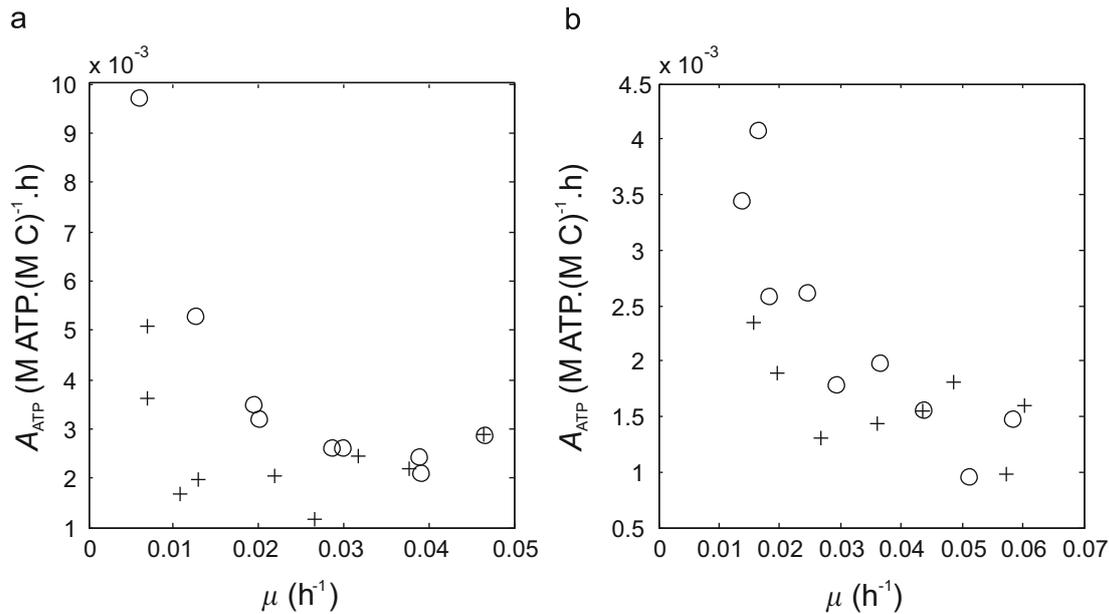
Here we propose another mechanism: that active N uptake can be regulated by the cellular P tied to the ATP-pool. Although the P fraction is low in the acquisition machinery, there are strong indications in the literature that nutrient uptake can compete with C-fixation for ATP. Falkowski and Stone (1975) showed that a pulse of either  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  resulted in a transitory decrease in carbon fixation per unit chlorophyll *a* for natural phytoplankton. Additional experiments with an uncoupler of the two light reactions led him to infer that cyclic photophosphorylation is a primary energy source for  $\text{NO}_3^-$  uptake. Davies and Sleep (1989)

also performed pulse-experiments on simultaneously N- and P-starved *S. costatum*. The authors reached the same conclusion as Falkowski and Stone (1975) that a pulse of either  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$  resulted in a decrease in the steady-state rate of carbon fixation. On the other hand, the joint addition of N and P resulted in a large stimulation of carbon fixation. Davies and Sleep (1989) assumed that the uptake of nitrogen was itself phosphate limited and that, under conditions of extreme and continuing phosphorus limitation, the repression of carbon fixation would be expected to be long-lasting. A similar decrease of carbon fixation rates for different inorganic nutrients has also been reported by several other investigators (Glover et al., 2007; Smalley et al., 2003; Beardall et al., 2001). Thus, pulse-experiments and particularly that of Davies and Sleep (1989) support our hypothesis that, under P limitation, competition for ATP occurs between N uptake and dark reactions.

One may suspect a more direct relationship between N and P uptake. Indeed, Terry (1982) demonstrated an asymmetric interaction between N and P uptake on *P. lutheri*, where P uptake could inhibit N uptake, whereas N uptake had no effect on P uptake. The severity of  $\text{PO}_4^{3-}$ -uptake inhibition of  $\text{NO}_3^-$ -uptake increased with the preconditioning N:P ratio (i.e. the lower the  $q_P$ , the higher the N-uptake inhibition). Terry (1982) postulated that the inhibition of  $\text{NO}_3^-$ -uptake by  $\text{PO}_4^{3-}$ -uptake may result from the allocation of a limited energy resource rather than from a direct action of  $\text{PO}_4^{3-}$  on the  $\text{NO}_3^-$  uptake system. As reflected by our uptake modeling, under P-limited steady-state where  $q_P$  is low, P uptake could directly compete with N uptake for the limited available energy.

Additionally, Perry (1976) showed that the ATP:C ratio in *Thalassiosira pseudonana* was consistently lower in P-limited than in N-limited chemostat cultures, while the ATP:P ratio remained unaffected. Hunter and Laws (1981) and Laws et al. (1983) also recorded with *Thalassiosira weissflogii* that, under P limitation, the ATP:C ratio was about 30 to over 50 percent lower than under N limitation, especially for low growth rate. It is worth noting that, in the two latter studies, ATP analyses were corrected for alkaline phosphatase activity (Karl and Craven, 1980) which may induce a drop in ATP:C ratio under P limitation. Hunter and Laws (1981) concluded that “the relationship between ATP:C ratios and growth rate is highly dependent on the factor limiting growth, at least at moderate or low growth rates”. These results confirm  $q_P$  as an indicator of the ATP pool level in the cell.

Our model specifies that under N limitation, the high P quota enhances N uptake, which we interpret as a high availability of ATP for cellular functions. However, investigation of the ATP pool by itself is not sufficient to reflect the metabolic rate within the cell: competition for ATP allocation between the different cell functions depends on the balance between (1) the level of metabolic and overall energy demand and (2) the level of available ATP pool. We define an indicator  $A_{ATP}$  of ATP availability relative to the rate of carbon fixation, computed as the ratio of ATP:C to growth rate. Calculations of  $A_{ATP}$  (Fig. 6) on the basis of the results of Perry (1976), Hunter and Laws (1981) and Laws et al. (1983) show that (1)  $A_{ATP}$  is a decreasing function of growth rate under N-limiting conditions and that (2) it is rather stable with growth rate under P limiting conditions (except perhaps for very low growth rates), (3) being generally lower under P limitation than under N limitation, especially at low growth rates. In the study of Hunter and Laws (1981) with *Thalassiosira weissflogii*,  $A_{ATP}$  under P limitation is only half that under N limitation for the lowest growth rates tested. The same trends are observed in Laws et al. (1983), although the scatter in the data makes the conclusions more delicate. Hence, one can infer that under N limitation, (1) competition for energy between the cellular functions is lower than under P limitation and that



**Fig. 6.** Computed steady-state  $A_{ATP}$  for *Thalassiosira weissflogii* under P limiting (+) and N limiting conditions (o). Data from Hunter and Laws (1981) (a) and from Laws et al. (1983) (b).

(2) competition is an increasing function of growth rate, as ATP availability is reduced due to the energy demand growing faster than the ATP pool. Moreover, Dai et al. (2008) recently demonstrated that the adenylate energy charge (the metabolic energy stocked in the adenine nucleotide pool) of *Microcystis aeruginosa* is an increasing function of the P-limited growth rate. From these various biological observations, one can expect that the restricted ATP-pool under P-limited growth should enhance the competition for ATP of (1) N uptake with carbon fixation and (2) between N and P-uptake systems. We therefore conclude that the behavior of  $q_P$  with growth rate qualitatively reflects the competition for energy between the cellular functions and these findings justify the  $q_P$  regulation in our N uptake modeling approach (17).

The biological results presented above motivated the asymmetric formulation for the two uptake functions. Our model assumes that no interactions occur between N status and P uptake and that, therefore, P uptake is solely governed by the internal P quota, as observed by Terry (1982). Indeed, the model fitted sufficiently well with the experimental data that it was concluded that such an additional interaction was not necessary to the model. Additionally, under phosphorus limitation, it was suggested that the constrained energy pool was preferentially allocated to P uptake rather than N uptake or carbon fixation.

There are various indications of competition for energy between the two functional machineries and between the active N- and P-uptake systems. These observations, together with the demonstration of Rhee (1978) that the minimum law correctly predict growth rate under different N:P ratios, led us to (1) consider the N–P interaction at the acquisition level rather than at the assembly level and (2) choose the minimum law for growth rate in our modeling of N–P colimitation.

Our analysis suggests that important traits of phytoplankton N–P colimitation can be captured under the assumption that competition for energy is the main link between N and P. Nevertheless, the complexity and the diversity of N–P interactions raise the question of multi-level interactions and of the pre-eminent process for N–P colimitation. Further investigations are needed to elucidate these particular points. Experiments investigating energy charge, RNA content and short-term uptake

measurements on chemostat cultures under varying and extreme N:P ratios should offer new insights. As our analysis pointed out, in agreement with Elrifi and Turpin (1985), the achievement of quota saturation (related to the range of N:P ratio explored) is a crucial condition for a better understanding of phytoplankton N–P colimitation. Under these extreme conditions, it would be interesting to confirm the model prediction that phytoplankton stoichiometry deviates from the input N:P ratio, particularly at very low dilution rates.

## 6. Conclusions

We proposed a new model of N–P colimitation. This Droop-based model hypothesizes that the interaction between N and P should be considered at the acquisition level rather than the assembly level. Indeed, we conclude that the Droop function between growth rate and quota remains unaffected by the N–P interaction, although N quota is largely determined by the cellular P status. The P control on N uptake through energy availability needed for  $\text{NO}_3^-$  porters combined with a negative retroaction of quota level on nutrient uptake allowed the model to reproduce the experimental data of Elrifi and Turpin (1985) and of experimental trials in the present study, made under extreme N:P input ratios. Furthermore, our uptake-based approach emphasizes that assimilation did not have to be modeled separately from uptake to reproduce the asymmetry between N and P. We therefore suggest that, regarding the colimitation concept, N and P would better be considered as dependent nutrients rather than biochemically independent ones.

As several authors already pointed out (Flynn, 2008; Klausmeier et al., 2007; Leonardos and Geider, 2005) there is a critical need for new experimental data considering N and P under different and extreme input ratios and growth rates.

## Acknowledgments

This paper presents research results supported by the ANR-06-BIOE-014 Shamash project. The authors are grateful to Julie

Marchetti for the experimental dataset with *Isochrysis affinis galbana*.

## References

- Afghan, B.K., 1982. Nutrients. In: Van Loon, J.C. (Ed.), Chemical Analysis of Inorganic Constituents of Water. CRC Press, West Palm Beach, FL, pp. 170–178.
- Agren, G.I., 2004. The c:n:p stoichiometry of autotrophs—theory and observations. *Ecology Letters* 7, 185–191.
- Ahlgren, G., 1977. Growth of *Oscillatoria agardhii* in chemostat culture: 1. Nitrogen and phosphorus requirements. *Oikos* 29 (2), 209–224.
- Aksnes, D., Egge, J., 1991. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 70, 65–72.
- Arrigo, K.R., 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437, 349–355.
- Beardall, J., Berman, T., Heraud, P., Kadiri, M.O., Light, B.R., Patterson, G.W., Roberts, S., Sulzberger, B., Sahan, E., Uehlinger, U., Wood, B., 2001. A comparison of methods for detection of phosphate limitation in microalgae. *Aquatic Sciences* 63, 107–121.
- Berdal, E., Latasa, M., Estrada, M., 1994. Effects of nitrogen and phosphorus starvation on nucleic acid and protein content of *Heterocapsa* sp. *Journal of Plankton Research* 16, 303–316.
- Bergstrom, A.K., Jonsson, A., Jansson, M., 2008. Phytoplankton responses to nitrogen and phosphorus enrichment in unproductive Swedish lakes along a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Aquatic Biology* 4 (1), 55–64.
- Bernard, O., Sciandra, A., Madani, S., 2008. Multimodel analysis of the response of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* to an elevation of  $p$  CO<sub>2</sub> under nitrate limitation. *Ecological Modelling* 211, 324–338.
- Bernard, O., Gouzé, J.L., 1995. Transient behavior of biological loop models, with application to the Droop model. *Mathematical Biosciences* 127 (1), 19–43.
- Bernard, O., Gouzé, J.-L., 1999. Nonlinear qualitative signal processing for biological systems: application to the algal growth in bioreactors. *Mathematical Biosciences* 157, 357–372.
- Bernard, O., Sallet, G., Sciandra, A., 1998. Nonlinear observers for a class of biological systems. Application to validation of a phytoplanktonic growth model. *IEEE Transactions on Automatic Control* 43, 1056–1065.
- Bougaran, G., Bernard, O., Sciandra, A., 2009. Modelling continuous cultures of microalgae colimited with nitrogen and phosphorus. In: Proceedings of the Mathmod 09 Conference, Vienna, Austria.
- Bougaran, G.L., Le Dean, L., Lukomska, E., Kaas, R., Baron, R., 2003. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana affinis* Tahiti. *Aquatic Living Resources* 16 (4), 389–394.
- Burmester, D., 1979. The unsteady continuous culture of phosphate-limited *Monochrysis lutheri* Droop: experimental and theoretical analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 39 (2), 167–186.
- Crawford, N.M., Glass, A.D.M., 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3, 389–395.
- Dai, R., Liu, H., Qu, J., Zhao, X., Ru, J., Hou, Y., 2008. Relationship of energy charge and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen-limited or phosphorus-limited cultures. *Toxicol* 51 (4), 649–658.
- Davey, M., Tarran, G.A., Mills, M.M., Ridame, C., Geider, R.J., LaRoche, J., 2008. Nutrient limitation of picophytoplankton photosynthesis and growth in the tropical North Atlantic. *Limnology and Oceanography* 53 (5), 1722–1733.
- Davidson, K., Gurney, W.S.C., 1999. An investigation of non-steady-state algal growth. II. Mathematical modelling of co-nutrient-limited algal growth. *Journal of Plankton Research* 21 (5), 839–858.
- Davies, A.G., Sleep, J.A., 1989. The photosynthetic response of nutrient-depleted dilute cultures of *Skeletonema costatum* to pulses of ammonium and nitrate; the importance of phosphate. *Journal of Plankton Research* 11, 141–164.
- Droop, M.R., 1968a. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of Marine Biology* 48, 689–733.
- Droop, M.R., 1968b. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. IV. The kinetics of uptake growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association* 48 (3), 689–733.
- Droop, M.R., 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology* 9, 264–272.
- Droop, M.R., 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54, 825–855.
- Droop, M.R., 1983. 25 years of algal growth kinetics. A personal view. *Botanica Marina* 26, 99–112.
- Dugdale, R.C., 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance. *Limnology and Oceanography* 12, 685–695.
- Elrifi, I.R., Turpin, D.H., 1985. Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios: a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (chlorophyta). *Journal of Phycology* 21, 592–602.
- Elser, J., Marzolf, E., Goldman, C., 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47 (7), 1468–1477.
- Falkowski, P.G., Stone, D.P., 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton: energy sources and the interaction with carbon fixation. *Marine Biology* 32 (1), 77–84.
- Flynn, J.K., 2008. The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models. *Journal of Plankton Research* 30, 423–438.
- Forde, B.G., 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 219–235.
- Geider, R.J., LaRoche, J., 2002. Redfield revisited: variability of c:n:p in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37, 1–17.
- Glover, H.E., Garside, C., Trees, C.C., 2007. Physiological responses of Sargasso Sea picoplankton to nanomolar nitrate perturbations. *Journal of Plankton Research* 29 (3), 263–274.
- Goldman, J.C., Peavey, D.G., 1979. Steady-state growth and chemical composition of the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited continuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 894–901.
- Gotham, I.J., Rhee, G.-Y., 1981. Comparative kinetic studies of phosphate-limited growth and phosphate uptake in phytoplankton in continuous culture. *Journal of Phycology* 17, 257–265.
- Healey, F.P., 1985. Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of *Synechococcus linearis* (cyanophyceae). *Journal of Phycology* 21 (1), 134–146.
- Healey, F.P., Hendzel, L.L., 1975. Effect of phosphorus deficiency on 2 algae growing in chemostats. *Journal of Phycology* 11, 303–309.
- Hunter, B.L., Laws, E.A., 1981. AtP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass. *Limnology and Oceanography* 26 (5), 944–956.
- Karl, D.M., Craven, D.B., 1980. Effects of alkaline phosphatase activity on nucleotide measurements in aquatic microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 40 (3), 549–561.
- Ketchum, B.H., 1939. The absorption of phosphate and nitrate by illuminated cultures of *Nitzschia closterium*. *American Journal of Botany* 26 (6), 399–407.
- Klausmeier, C.A., Litchman, E., Daufresne, T., Levin, S.A., 2004a. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature* 429, 171–174.
- Klausmeier, C.A., Litchman, E., Levin, S.A., 2004b. Phytoplankton growth and stoichiometry under multiple nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* 49, 1463–1470.
- Klausmeier, C.A., Litchman, E., Levin, S.A., 2007. A model of flexible uptake of two essential resources. *Journal of Theoretical Biology* 246, 278–289.
- Lange, K., Oyarzun, F.J., 1992. The attractiveness of the Droop equations. *Mathematical Biosciences* 111, 261–278.
- Laws, E.A., Bannister, T.T., 1980. Nutrient- and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean. *Limnology and Oceanography* 25 (3), 457–473.
- Laws, E.A., Karl, D.M., Redalje, D.G., Jurick, R.S., Winn, C.D., 1983. Variability in ratios of phytoplankton carbon and rna to atp and chlorophyll a in batch and continuous cultures. *Journal of Phycology* 19 (4), 439–445.
- Legovic, T., Cruzado, A., 1997. A model of phytoplankton growth on multiple nutrients based on the Michaelis–Menten–Monod uptake, Droop's growth and Liebig's law. *Ecological Modelling* 99 (1), 19–31.
- Lehman, J., Botkin, D., Likens, G., 1975. The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnology and Oceanography* 20 (3), 343–364.
- Leonardos, N., Geider, R.J., 2005. Elemental and biochemical composition of *Rhodomonas reticulata* (cryptophyta) in relation to light and nitrate-to-phosphate supply ratios. *Journal of Phycology* 41, 567–576.
- Maberly, S.C., King, L., Dent, M.M., Jones, R.I., Gibson, C.E., 2002. Nutrient limitation of phytoplankton and periphyton growth in upland lakes. *Freshwater Biology* 47, 2136–2152.
- Morel, F.M.M., 1987. Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *Journal of Phycology* 23, 137–150.
- Nielsen, E.S., 1978. Growth of planktonic algae as a function of n-concentration, measured by means of batch technique. *Marine Biology* 46 (3), 185–189.
- Pahlow, M., 2005. Linking chlorophyll-nutrient dynamics to the redfield n:c ratio with a model of optimal phytoplankton growth. *Marine Ecology Progress Series* 287, 33–43.
- Pahlow, M., Oschlies, A., 2009. Chain model of phytoplankton p, n and light colimitation. *Marine Ecology Progress Series* 376, 69–83.
- Perry, M.J., 1976. Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in oligotrophic waters of central North-Pacific. *Limnology and Oceanography* 21 (1), 88–107.
- Persic, V., Horvatic, J., Has-Schon, E., Bogut, I., 2009. Changes in n and p limitation induced by water level fluctuations in Nature Park Kopacki Rit (Croatia): nutrient enrichment bioassay. *Aquatic Ecology* 43 (1), 27–36.
- Ren, L., Rabalais, N.N., Turner, R.E., Morrison, W., Mendenhall, W., 2009. Nutrient limitation on phytoplankton growth in the upper Barataria Basin, Louisiana: microcosm bioassays. *Estuaries and Coasts* 32 (5), 958–974.
- Rhee, G.Y., 1974. Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. and its ecological implications. *Journal of Phycology* 10, 470–475.
- Rhee, G.Y., 1978. Effects of n:p atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnology and Oceanography* 23, 10–24.
- Saito, M.A., Goepfert, T.J., Ritt, J.T., 2008. Some thoughts on the concept of colimitation: three definitions and the importance of bioavailability. *Limnology and Oceanography* 53, 276–290.
- Sciandra, A., Ramani, P., 1994. The limitations of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 178, 1–15.
- Seppala, J., Tamminen, T., Kaitala, S., 1999. Experimental evaluation of nutrient limitation of phytoplankton communities in the Gulf of Riga. *Journal of Marine Systems* 23, 107–126.

- Smalley, G.W., Coats, D.W., Stoecker, D.K., 2003. Feeding in the mixotrophic dinoflagellate *Ceratium furca* is influenced by intracellular nutrient concentrations. *Marine Ecology Progress Series* 262, 137–151.
- Smith, S.L., Yamanaka, Y., 2007. Optimization-based model of multinutrient uptake kinetics. *Limnology and Oceanography* 54 (4), 1545–1558.
- Suttle, C., Harrison, P., 1988. Ammonium and phosphate uptake rates, n:p supply ratios, and evidence for n and p limitation in some oligotrophic lakes. *Limnology and Oceanography* 33 (2), 186–202.
- Terry, K.L., 1980. Nitrogen and phosphorus requirements of *Pavlova lutheri* in continuous culture. *Botanica Marina* 23, 757–764.
- Terry, K.L., 1982. Nitrate and phosphate uptake interactions in a marine prymnesiophyte. *Journal of Phycology* 18, 79–86.
- Vatcheva, I., de Jong, H., Bernard, O., Mars, N., 2006. Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems. *Artificial Intelligence* 170, 472–506.
- Zohary, T., Herut, B., Krom, M.D., Mantoura, R.F.C., Pitta, P., Psarra, F.R.S., Stambler, N., Tanaka, T., Thingstad, T.F., Woodward, E.M.S., 2005. P-limited bacteria but n and p co-limited phytoplankton in the Eastern Mediterranean—a microcosm experiment. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography on the Nature of Phosphorus Cycling and Limitation in the Eastern Mediterranean* 52, 3011–3023.





---

## RÉSUMÉ

Les interactions entre l'azote (N) et le phosphore (P) sur la croissance du phytoplancton demeurent mal comprises. Nous proposons ici l'hypothèse que le phosphore, qui joue un rôle central dans l'énergie, puisse contrôler le transport actif et l'accès des cellules au  $\text{NO}_3$ . Notre modèle de co-limitation N-P possède une structure asymétrique, qui rend compte des rôles respectifs des deux nutriments et de la différence de contrôle de leur absorption. Ce modèle permet de décrire les tendances différentes des contenus en N et en P, observées sur des jeux de données tirés de la littérature.

Nous avons également conduit des expériences en batch et en chémostat, en présence de rapports N:P variables. Celles-ci ont révélé que les cellules limitées par le P sont caractérisées par un contenu en ATP et une absorption nette du  $\text{NO}_3$  faibles. L'apport massif de  $\text{PO}_4$  à ces cellules se traduit par un accroissement brutal de l'absorption nette du  $\text{NO}_3$ . Au contraire, la limitation par le N n'interagit pas avec l'absorption du  $\text{PO}_4$ . Ces observations sont bien décrites par notre modèle. Les expériences ont également permis de soulever le rôle probable de l'excrétion de N organique dans la co-limitation N-P et nous ont conduits à proposer une variante du modèle initial. Enfin, les effets de la co-limitation N-P ne modifient pas l'accumulation des lipides de réserve, qui répond davantage au taux de croissance qu'au type de limitation imposé.

---

## MOT-CLEFS

co-limitation, azote, phosphore, modélisation, *Tisochrysis lutea*, lipides

---

## ABSTRACT

Interactions between nitrogen (N) and phosphorus (P) on the growth of phytoplankton are not fully elucidated. Here, we propose the hypothesis that, since phosphorus plays a central role in energy, it can control the active transport of  $\text{NO}_3$ . Our model for N-P co-limitation provides an asymmetric structure which reflects the respective roles of both nutrients and the differences in the control of absorption. The model succeeds in describing the different trends observed for N and P cell content in data sets taken from the literature.

We further conducted experiments in batch and chemostat under different N: P ratios. Our results highlighted that P-limited cells were characterized by a low content of ATP and a low net absorption of  $\text{NO}_3$ . When  $\text{PO}_4$  was resupplied, the cells showed a dramatic increase in the net absorption of  $\text{NO}_3$ . Conversely, N limitation did not interact with the absorption of  $\text{PO}_4$  and the observations were successfully described by our model. Our experiments also raised the probable role of organic N excretion in N-P co-limitation and led us to propose a variant of our initial model. Finally, the effects of N-P co-limitation did not clearly affect the storage of lipids that responds to growth rate rather than the type of limitation.

---

## KEYWORDS

co-limitation, nitrogen, phosphorus, modeling, *Tisochrysis lutea*, lipid

---

