Université Pierre et Marie Curie, École des Mines de Paris
& École Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts

Master 2 Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie

Parcours Hydrologie-Hydrogéologie

Production et respiration de cyanobactéries d'eau douce par des expérimentations *ex situ* et *in situ*

Elise MARECHAL

Directeurs de recherche : Nathaniel BENSOUSSAN, Alexis GROLEAU

Laboratoire de Géochimie des Eaux
Paris 7 - IPGP

Février-Septembre 2008

Résumé

Planktothrix rubescens et *Planktothrix agardhii* sont deux espèces de cyanobactérie, potentiellement toxiques, qui occupent des niches écologiques différentes. Le développement d'outils de suivi de leur croissance dans les lacs est mené dans le cadre du programme Proliphyc. En conditions contrôlées, les cultures de ces deux espèces ont été acclimatées à 20°C et 60 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Les relations entre la concentration en chlorophylle *a*, le nombre de cellules et l'absorbance ont été établies sur une gamme de concentration pour les deux espèces. Elles montrent une correspondance de 0,1 mg de chl *a*.L^{-1}.(10^6 cellules.mL^{-1})$^{-1}$ pour *P. agardhii* et 0,3 mg de chl *a*.L^{-1}.(10^6 cellules.mL^{-1})$^{-1}$ pour *P. rubescens*. La production et la respiration évoluent de manière linéaire en fonction de la biomasse. Outre les précautions à prendre pour les expérimentations, les productivités nette et brute ont montré une variabilité à l'échelle de la journée non reproductible, sans tendance marquée pour *P. agardhii* et *P. rubescens*, si ce n'est une productivité nette maximale au début de la phase lumineuse. A l'échelle du mois, on observe une phase de croissance puis une phase de saturation pour *P. agardhii*. La productivité nette et la concentration sont inversement corrélées. La concentration de la culture est doublée en 15 jours, tandis que l'activité photosynthétique diminue de moitié. D'après les courbes de la productivité nette en fonction de l'irradiance établies en conditions de stress lumineux, l'irradiance de compensation de la photosynthèse est de 7 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. rubescens* et de 6 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. agardhii*. La productivité est maximale à partir de 75 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour les deux souches (271 et 350 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} pour *P. rubescens* et *P. agardhii* respectivement). Puis, on observe une forte photo inhibition pour *P. rubescens* dans ces conditions qui sont différentes de celles de la littérature. Enfin, l'originalité des courbes P/I obtenues dans des conditions de stress lumineux est discutée.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Nathaniel Bensoussan et Alexis Groleau pour m'avoir accueillie et dirigée tout au long de mon stage. Ils m'ont appris énormément de choses, et je suis très fière d'avoir pu travailler à leur côté.

Nathaniel m'a encadrée avec beaucoup de gentillesse, une (immense !) patience, et une disponibilité de chaque instant. Merci infiniment.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du Laboratoire de Géochimie des Eaux pour son accueil et pour sa bonne humeur au cours de ces huit mois passés avec eux : Hassiba, Nadia, Emilie, Lucie, Gérard, Bruno, Didier, Marc, Amaury… et ceux que j'ai oublié !

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Muséum National d'Histoire Naturelle, Catherine Quiblier, qui m'a accueillie au sein du laboratoire ; Claude Yéprémian, pour sa relecture, sa disponibilité de tous les instants, et ses discussions très instructives ; Nicolas Escoffier, qui a patiemment répondu à toutes mes questions et qui m'a beaucoup aidé ; Arnaud et Charlotte pour leur disponibilité…

Un grand merci à Gérard Paolini pour son accueil au lac du Bourget et pour sa gentillesse. Je garde un très beau souvenir de mon séjour en Savoie, avec le plaisir d'avoir participé au cycle nycthéméral par une si belle nuit…

Merci à tous ceux qui ont répondu à mes nombreuses questions et qui m'ont encouragée dans mon entreprise.

Enfin, des remerciements particuliers à ma famille et mes amis pour avoir été à mes côtés, tout simplement.

Sommaire

Résumé 2
Remerciements 3
Sommaire 4
Introduction 6
1 Contexte et problématique 7
1.1 Présentation du projet Proliphyc 7
1.2 Présentation des espèces modèles 7
1.2.1 Espèces modèles 7
1.2.2 Bibliométrie sur *Planktothrix* 8
1.3 Conditions environnementales de *P. rubescens* et *P. agardhii* 9
1.3.1 Conditions de développement de *P. rubescens* et *P. agardhii* 9
1.3.2 Facteurs affectant la distribution de *P. rubescens* et *P. agardhii* 10
1.4 Ecophysiologie de *P. rubescens* et *P. agardhii* 11
1.4.1 Etude de la croissance de *P. rubescens* et *P. agardhii* 11
1.4.2 Etude de la photosynthèse de *P. rubescens* et *P. agardhii* 13
1.4.3 Dispositif de micro-respiration 15
2 Matériel et méthodes 17
2.1 Incubations *ex situ* 17
2.1.1 Dispositif expérimental 17
2.1.1.1 Matériel biologique 17
2.1.1.2 Dispositif de micro-respiration 20
2.1.2 Schéma d'expérimentation 23
2.1.2.1 Etudes des paramètres estimateurs de la biomasse et des activités photosynthétique et respiratoire sur une gamme de concentration 23
2.1.2.2 Variation de l'activité photosynthétique au cours de la phase lumineuse 24
2.1.2.3 Suivi de la croissance de *P. agardhii* 25
2.1.2.4 Stress lumineux 25
2.2 Incubations *in situ* 26
2.2.1 Incubations dans le lac du Bourget 26
2.2.2 Mesures des autres paramètres 27
2.3 Expression des résultats 27
3 Résultats et discussion 29
3.1 Expérimentations *ex situ* sur *P. agardhii* et *P. rubescens* 29

3.1.1 Etudes des paramètres estimateurs de la biomasse et des activités photosynthétique et respiratoire sur une gamme de concentration 29
3.1.1.1 Relations entre l'absorbance à 750 nm, le nombre de cellules et la concentration en chlorophylle a 29
3.1.1.2 Variation des activités photosynthétique et respiratoire sur une gamme de concentration 31
3.1.2 Variabilité temporelle des activités photosynthétiques et respiratoires 32
3.1.2.1 Variabilité au cours de la phase lumineuse 32
3.1.2.2 Variabilité sur une longue période 36
3.1.3 Variation des activités photosynthétiques et respiratoires selon l'irradiance .. 37
3.2 Expérimentations sur les communautés algales d'Enghien-les-Bains et du Bourget 39
3.2.1 Incubations *ex situ* sur la communauté algale d'Enghien-les-Bains 39
3.2.2 Incubations *in situ* sur la communauté algale du Bourget 40
3.3 Discussion 41
3.3.1 Relations entre la DO, la concentration chlorophyllienne et la concentration cellulaire 41
3.3.2 Variabilité de la productivité au cours du temps 41
3.3.3 Variabilité de la productivité en condition de stress lumineux 42
3.3.4 Expérimentations sur les communautés phytoplanctoniques 45
Conclusion 48
Bibliographie 50

Introduction

Le projet Proliphyc vise le développement d'un système opérationnel de surveillance et d'alerte en temps réel des proliférations phytoplanctoniques dans les plans d'eau. Il est basé entre autres sur la mesure en continu des paramètres indicateurs de la biomasse algale (oxygène dissous, chlorophylle *a*). Il est appliqué en particulier sur les cyanobactéries, notamment les espèces *P. agardhii* et *P. rubescens*. Celles-ci occupent deux sites d'étude, choisis pour leur représentativité de la diversité des plans d'eau européens. La typologie du grand lac alpin profond est représentée par le lac du Bourget (Savoie). Celle du petit plan d'eau urbain peu profond correspond au lac d'Enghien-les-Bains (Ile-de-France).

Pour pouvoir interpréter des mesures en continu en milieu naturel se rapportant à la variation de la concentration en oxygène, il est indispensable d'étudier les activités métaboliques de photosynthèse et respiration de manière isolée.
Pour cela, une étape préliminaire consiste en la mesure de la productivité sous des conditions contrôlées, sur les espèces prédominantes des sites d'étude, *P. agardhii* et *P. rubescens*.

Les 4 objectifs suivants ont été définis pour ce stage de Master 2 :

(1) Mettre en œuvre une nouvelle méthodologie basée sur l'emploi de micro-électrodes pour quantifier les activités photosynthétique et respiratoire de *P. agardhii* et *P. rubescens*.
(2) Déterminer la productivité de *P. agardhii* et *P. rubescens* dans des conditions contrôlées, proches des conditions optimales de croissance dans le milieu naturel.
(3) Etudier la variabilité de la productivité sur différentes échelles de temps, de l'heure au mois.
(4) Evaluer la dynamique de la productivité en réponse à des stress lumineux.

Pour répondre à ces objectifs, la première partie de ce travail est axée sur la synthèse bibliographiques des dernières études effectuées sur *P. rubescens* et *P. agardhii*. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes mis en place pour les différentes expérimentations. Enfin, les principaux résultats sont commentés dans la dernière partie.

1 Contexte et problématique

1.1 Présentation du projet Proliphyc

Le projet Proliphyc vise le développement d'un système opérationnel pour la surveillance et l'alerte en temps réel des proliférations phytoplanctoniques dans les lacs et plans d'eau avec une application particulière aux cyanobactéries. Les cyanobactéries sont des microorganismes procaryotes autotrophes photosynthétiques qui peuvent former des efflorescences colorées dans les plans d'eau douce et les cours d'eau à faible débit. Le danger réside dans leur toxicité potentielle et dans leur propension à déséquilibrer la teneur en oxygène. Les proliférations cyanobactériennes sont une préoccupation d'ordre mondial et elles touchent tous types de plan d'eau. Le lac du Bourget et le lac d'Enghien-les-Bains sont deux sites d'étude choisis pour les efflorescences cyanobactériennes qui s'y développent. Le premier, le plus grand lac naturel français, est occupé par *Planktothrix rubescens* (*P. rubescens*). Paradoxalement, cette espèce est apparue lors de la ré-oligotrophication du lac, qui a suivi plusieurs décennies d'eutrophisation. (Yon, 2004) Quant au second site d'étude, il s'agit d'un petit plan d'eau urbain, dont la communauté est prédominée par *Planktothrix agardhii* (*P. agardhii*).

Un prototype de système de surveillance a été installé en 2007 dans le lac du Bourget. Les capteurs y suivent l'évolution du compartiment phytoplanctonique par des mesures en continu de la concentration en oxygène, de la température et de la concentration en chlorophylle *a*. La chlorophylle *a* est un pigment photosynthétique présent chez toutes les espèces de cyanobactérie, qui est utilisée pour quantifier la biomasse phytoplanctonique dans les plans d'eau. Grâce aux premières mesures, on sait que *P. rubescens* forme un maximum de biomasse algale à 15 m de profondeur et que le pic de la concentration en oxygène se situe 2 m au dessus de ce maximum. Ce décalage reste inexpliqué et illustre la complexité des processus biochimiques dans la colonne d'eau.

1.2 Présentation des espèces modèles

1.2.1 Espèces modèles

P. agardhii et *P. rubescens* sont deux espèces de cyanobactérie qui colonisent respectivement le lac d'Enghien-les-Bains (Val-d'Oise) et le lac du Bourget (Savoie).
La sous-classe « cyanobactérie » est prédominante dans les deux plans d'eau, au milieu de communautés qui peuvent regrouper différents genres de cyanobactéries (*Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Aphazinomenon*…), ainsi que des Diatomées, des Chlorophycées et des Cryptophycées selon la période de l'année.

Dans le lac du Bourget, *P. rubescens* est responsable d'importantes proliférations algales, également appelées « blooms », notamment entre mai et octobre. (Jacquet et al, 2005) Celles-ci causent un déséquilibre en oxygène dans le lac : sursaturation de la couche superficielle du lac, qui est la plus chaude (épilimnion), et désoxygénation de la couche la plus froide, en profondeur (hypolimnion) (V. Yon, 2004). Elles sont d'autant plus dangereuses qu'elles sont potentiellement toxiques : en effet, lors de la lyse cellulaire, elles peuvent libérer des microcystines, qui sont des toxines hépatiques, des neurotoxines, qui causent des paralysies, voire des dermatotoxines (Willame R., Cauchie H.M., Hoffman L., rapport de 2004).

Si l'intérêt qui leur est manifesté réside dans leur risque de prolifération toxique et leur émergence à l'échelle mondiale, *P. Rubescens* et *P. agardhii* présentent des similitudes morphologiques, et des différences écologiques et écophysiologiques encore mal connues.

Figure 1 : Cultures de *Planktothrix rubescens* (gauche) et de *Planktothrix agardhii* (droite)

Ainsi, toutes deux sont des espèces filamenteuses. Elles sont procaryotes et autotrophes. Elles sont capables d'assurer la photosynthèse, grâce à leur contenu en chlorophylle *a*, un pigment photosynthétique présent chez toutes les espèces de phytoplancton, incluant les cyanobactéries. Elle est détectée par fluorescence.

Si *P. agardhii* et *P. rubescens* possèdent de la chlorophylle *a*, elles doivent leur couleur caractéristique à d'autres pigments. Toutes deux possèdent de la phycocyanine, un pigment vert, qui absorbe préférentiellement la lumière rouge. Mais *P. rubescens* se distingue par son contenu pigmentaire plus riche en phycoérythrine, qui est rosé à brun, et qui absorbe plus fortement la lumière verte ainsi qu'une plus grande proportion des radiations visibles (colloque de Jacquet, 2006 ; Davis et Walsby, 2002 ; Oberhaus *et al*, 2007). Fortement concentrées, *P. rubescens* apparait donc sous une couleur brune et *P. agardhii* sous une couleur verte (Figure 1).

Leurs différences proviennent des conditions environnementales favorables à leur croissance.

1.2.2 Bibliométrie sur *Planktothrix*

La recherche bibliographique a été effectuée sur ISI (*cc*) *Web of Knowledge*, dont le contenu est actualisé tous les 15 jours. Le 25 février 2008, sur les 31131 articles portant sur '*Cyanobacteria*', 332 sont sur '*Planktothrix*', et plus particulièrement 158 sur '*Planktothrix agardhii*' et 118 sur '*Planktothrix rubescens*'. Il s'agit principalement d'articles abordant la toxicité et la génétique des cyanobactéries. Les articles sont jugés pertinents s'ils traitent plutôt des aspects écophysiologiques et écologiques de *Planktothrix*. Par conséquence, on s'est intéressé à l'étude de l'activité photosynthétique ou du taux de croissance de *P. rubescens* ou de *P. agardhii* dans un premier temps, et d'autres cyanobactéries dans un

second temps, afin d'élargir le champ de recherche (écophysiologie). Les articles sur l'influence des paramètres de température et d'irradiance ont également été relevés (écologie). Ainsi, sur les différents résultats pour les deux sous-espèces de *Planktothrix*, seuls 19 sont retenus pour *P. rubescens* et 18 pour *P. agardhii*, en sachant que la plupart des articles sont communs aux deux.
Principalement quatre équipes ont travaillé sur *Planktothrix*, la plus prolifique étant celle constituée de chercheurs anglo-saxons, Walsby, Bright, Davis, de l'Université de Bristol, en Grande-Bretagne. Les trois autres équipes sont suisse, française et australienne. Les lacs étudiés sont divers et reflètent la diversité des chercheurs : lacs australiens (Kaiblinger, Dokulil, 2005 ; Kaiblinger et al, 2007), lacs anglais (Davis et al, 2003 ; Davis, Walsby, 2002 ; Walsby et al, 2004) et autres lacs européens, notamment le lac de Zürich (Bossard et al, 2001 ; Bright, Walsby, 2000 ; Davis, Walsby, 2002 ; Kromkamp et al, 2001 ; Krupa, Czernas, 2003 ; Vaughan et al, 2001 ; Walsby, 2001 ; Walsby et al, 2001 ; Walsby et al, 2004 ; Walsby, Schanz, 2002), sur lequel se sont penchés les équipes européennes. Seuls les français se sont intéressés à l'eutrophisation du lac du Bourget (Jacquet, et al. 2005).
Au final, à partir de la base de données ISI *Web of Knowledge*, 21 articles ont été retenus, qui ont été publiés récemment, c'est-à-dire après 1998 pour la majorité, et qui abordent aussi bien l'écophysiologie des deux sous-espèces de cyanobactéries qui nous intéressent, que leur écologie.

1.3 Conditions environnementales de *P. rubescens* et *P. agardhii*

1.3.1 Conditions de développement de *P. rubescens* et *P. agardhii*

P. rubescens et *P. agardhii* présentent des conditions de développement différentes dans le milieu naturel.

P. rubescens est une espèce prédominante dans le lac du Bourget depuis 1996 (Jacquet et al, 2005). Elle nécessite une faible irradiance (intensité lumineuse) pour se développer. Elle occupe principalement les lacs mésotrophes, c'est-à-dire qui sont riches en minéraux dissous et en algues.
Dans le lac du Bourget, le pic de *P. rubescens* est repéré par le maximum de chlorophylle *a*, qui se situe entre 12 et 15 m de profondeur en période de bloom de *P. rubescens*. Cet intervalle de profondeur s'associe à une température oscillant entre 11 et 19°C (Yon V., 2004), et à une intensité de lumière verte de 1 à 9% de l'irradiance perçue à la surface (Oberhaus et al, 2007). *P. rubescens* se situe au niveau de la thermocline, dans le métalimnion. C'est la couche d'eau intermédiaire, caractérisée par un fort gradient thermique, qui peut atteindre plusieurs dizaines de mètres. La thermocline est la partie supérieure du métalimnion, présentant le plus fort gradient de température, sur quelques mètres seulement. En été, c'est à cette profondeur que le maximum de biomasse algale se trouve, comprenant notamment *P. rubescens*. C'est également à cette saison que la concentration en *P. rubescens* est la plus importante. Yon (2004) a mis en évidence que le pic de biomasse est toujours 2 m en dessous du maximum de concentration en oxygène.

Quant à *P. agardhii*, elle est retrouvée en majorité dans les lacs eutrophes, qui sont très riches en éléments nutritifs (P, N…) et qui peuvent présenter un déséquilibre en oxygène. Elle occupe le plus souvent des plans d'eau peu profonds, où l'irradiance perçue est alors plus importante et la température est homogène sur toute la profondeur. C'est le cas du lac

d'Enghien-les-Bains, dans le Val-d'Oise. La température est variable, jusqu'à des valeurs élevées en été (25°C).
Cependant, si *P. agardhii* et *P. rubescens* présentent des caractéristiques différentes, cela ne les empêche pas de cohabiter dans un même plan d'eau. C'est le cas du Blelham Tarn, un petit lac abrité et ombrageux, du district lacustre en Grande-Bretagne, qui atteint 14,5 m de profondeur maximale et qui rassemble les deux espèces (Davis, Walsby, 2002 ; Davis et al, 2003).

1.3.2 Facteurs affectant la distribution de *P. rubescens* et *P. agardhii*

Deux facteurs affectent la distribution verticale du phytoplancton : les vents, qui peuvent engendrer des « seiches », et la régulation de la flottabilité des filaments de *P. rubescens*.

Dans le lac du Bourget, les vents de surface homogénéisent la température de l'épilimnion. Alors que les vents violents peuvent modifier la thermocline, provoquant alors des ondes de cisaillement, appelées « seiches », de plusieurs mètres d'amplitude en été, et jusqu'à 40 m au printemps et en automne. Si les seiches déplacent le métalimnion, elles perturbent la distribution verticale du phytoplancton, et notamment *P. rubescens*, positionnée selon la thermocline. (rapport SACYTOX, 2004)
Les oscillations des seiches consistent en un mouvement récurrent pour la population de *P. rubescens*. Elles sont sans incidence sur la température, mais elles se produisent sur des échelles de temps trop courtes pour permettre une photo-acclimatation.

Contrairement au lac du Bourget, le lac d'Enghien-les-Bains qui abrite *P. agardhii*, n'est pas suffisamment profond pour subir une stratification thermique ou des oscillations thermiques aussi nettes. Le phytoplancton est brassé continuellement par les vents de surface. La température et l'oxygène sont donc relativement homogènes dans la colonne d'eau.

La position des filaments de *P. rubescens* est également régulée sur un gradient vertical de lumière décroissant, grâce au volume variable des vésicules gazeuses. Walsby et al (2001) révèlent que *P. rubescens* augmente sa flottabilité dans les faibles irradiances, et diminuent sa flottabilité dans les irradiances élevées. Ainsi, les filaments gagnent de la flottabilité la nuit, et le jour, ils perdent de leur flottabilité et coulent lentement. A cause de leur petite taille, les filaments se déplacent à moins de 10 $\mu m.s^{-1}$, ce qui représente 0,86 $m.j^{-1}$ (Walsby et al, 2001). L'amplitude de leur mouvement vertical peut être inférieure à 0,10 $m.j^{-1}$, ce qui est très nettement inférieur à l'amplitude d'une seiche, mais reste significatif quand même.

Aussi, le mouvement des seiches générées par les vents perturbe facilement le compartiment phytoplanctonique et peut même générer une absence de productivité en déplaçant des cyanobactéries sous la zone euphotique. Au contraire, la régulation de la flottabilité est un mécanisme de préservation de la production et de la croissance. La distribution en un pic profond s'explique par une régulation de la flottabilité à la recherche d'un optimum de luminosité pour *P. rubescens*.

1.4 Ecophysiologie de *P. rubescens* et *P. agardhii*

1.4.1 Etude de la croissance de *P. rubescens* et *P. agardhii*

La croissance des cultures de *Planktothrix* suit une dynamique « classique » présentée dans la Figure 2.

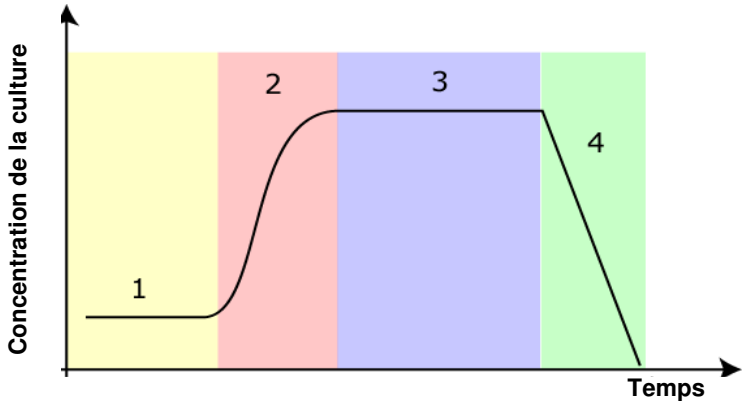


Figure 2 : Schématisation d'une dynamique de croissance.

On distingue généralement quatre étapes. La première est la phase de latence (1), qui suit un repiquage (renouvellement du milieu de culture) ou un ensemencement d'une culture. La croissance n'a pas encore démarrée ou à un faible rythme. La deuxième étape (2) correspond à une croissance rapide, de type exponentielle, jusqu'à un ralentissement. La croissance atteint ensuite un plateau : il s'agit de la phase de saturation (3), due à l'épuisement des nutriments dans la culture. Enfin, la sénescence de la culture (en 4) est la mort cellulaire.
Les phases de croissance sont dépendantes des conditions de température et de lumière.

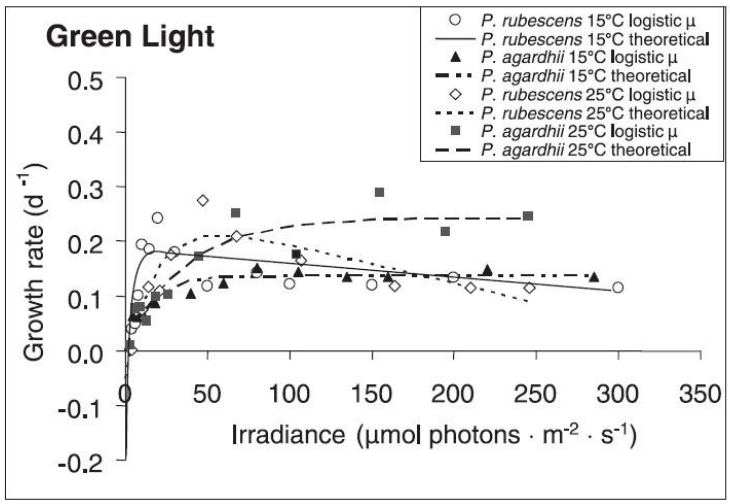


Figure 3 : Un exemple de courbes croissance/irradiance (µ/I) définissant les conditions de croissance de *P. rubescens* et *P. agardhii* à 15°C et 25°C sous une lumière verte. Figure extraite d'Oberhaus et al (2007).

La croissance de *P. agardhii* et *P. rubescens* a donc été étudiée sous diverses conditions d'irradiance et de température. Ainsi, Oberhaus et al (2007) ont comparé la croissance d'une souche de *P. agardhii* avec une souche de *P. rubescens*, isolées antérieurement du lac de Nantua et du lac du Bourget respectivement. Les monocultures sont placées sous diverses

conditions, sous une lumière verte, bleue ou rouge, avec des intensités lumineuses (de 3 à 300 µmol/m²/s) et des températures (15 ou 25°C) différentes, choisies pour être représentatives des conditions naturelles favorisant les blooms de chaque espèce. La courbe de la croissance, notée µ, en fonction de l'irradiance, notée I, a donc été établie (Figure 3).

La souche de *P. rubescens* semble adaptée aux faibles intensités de la lumière verte, à 15°C, qui est la température métalimnique estivale. Sa croissance est fortement inhibée sous de fortes intensités lumineuses. Elle est optimale pour une irradiance inférieure à 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Cela reflète bien les conditions environnementales sous lesquelles *P. rubescens* se développe dans le lac du Bourget. Alors que *P. agardhii* parait moins spécifique du point de vue de la qualité lumineuse et moins sensible à la photo inhibition sous des niveaux d'irradiance élevés. Ceci témoigne de la tendance de *P. agardhii* à se développer près de la surface, là où le niveau d'irradiance est élevé.
Les résultats d'Oberhaus et al (2007) montrent que les conditions optimales de croissance en culture sont très proches des conditions de croissance dans le milieu naturel (Tableau 1).

P. agardhii	*P. rubescens*
Croissance dans le milieu naturel	
Plan d'eau peu profond : lac d'Enghien-les-Bains (1,5 m de profondeur moyenne)	Plan d'eau profond : lac du Bourget (80 m de profondeur moyenne)
Distribution homogène	Maximum de chlorophylle *a* localisé à 10-15 m
Forts niveaux d'éclairement	Irradiance faible (1 à 9% irradiance de surface)
Température élevées, entre 15°C (hiver) et 25°C (été).	Températures faibles (métalimnion) : 11 à 13°C en période de stratification, jusqu'à 19°C en période de mélange.
Croissance en culture	
20°C	15°C
60 µmoles de photons.$m^{-2}.s^{-1}$	10 µmoles de photons.$m^{-2}.s^{-1}$ Lumière verte

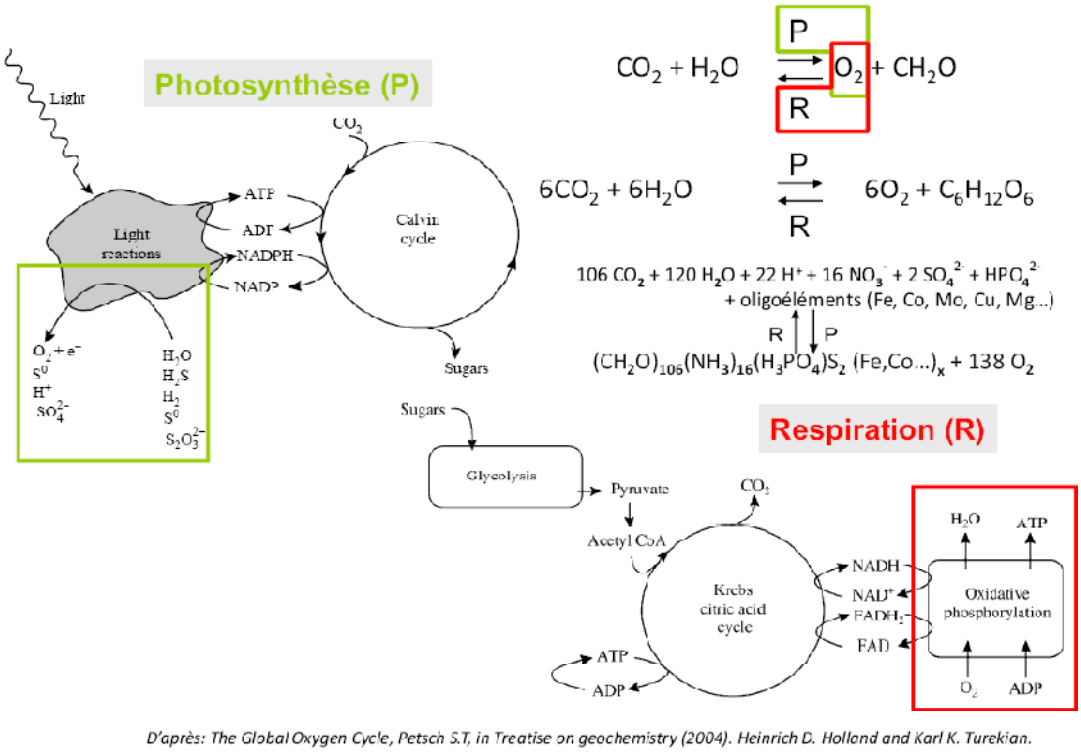
Tableau 1 : Principales conditions de croissance de *P. agardhii* et *P. rubescens* dans leur environnement naturel et en culture, d'après Oberhaus et al (2007). Le métalimnion est la couche intermédiaire du lac présentant un fort gradient thermique.

L'irradiance de compensation de la croissance se définit comme l'irradiance pour laquelle la croissance algale est nulle. Elle est déterminée à partir des courbes µ/I. Fortement dépendante de la température, pour *P. agardhii* (B9905) elle varie entre 1,58 µmoles de photons.$m^{-2}.s^{-1}$ à 10°C et 3,39 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ à 25°C ; alors que pour *P. rubescens* (B9972), elle varie entre 0,64 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ à 10°C et 2,31 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ à 25°C. (Davis et Walsby, 2002)
La croissance de *P. rubescens* démarre donc à une irradiance beaucoup plus faible que celle nécessaire pour la croissance de *P. agardhii*.
Ces faibles valeurs sont approuvées par Bright et Walsby (2000) qui obtiennent des points de compensation de 2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ sur une période de 12 h pour des cultures de *P. rubescens* à 20°C sous des cycles de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Et pour des cultures sous une lumière continue (soit 24 h de lumière), le point de compensation est atteint à seulement 1 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (moyenne sur les 24 h). Par ailleurs, l'irradiance qui sature la croissance de *P. rubescens* est obtenue à 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (Vaughan et al, 2001).

1.4.2 Etude de la photosynthèse de *P. rubescens* et *P. agardhii*

En présence de lumière, la photosynthèse est une réaction qui permet, à partir de CO_2 et d'H_2O, la production d'oxygène et de matière organique, sous forme de biomasse. A l'obscurité, cette réaction est inversée, et l'oxygène est consommé pour former du dioxyde de carbone : c'est la respiration. (Figure 4) La photosynthèse est étudiée à partir de la production en oxygène et de son évolution.

Les activités photosynthétiques et respiratoire correspondent aux mesures de l'accroissement et de la consommation de l'oxygène par la biomasse d'une population sur un intervalle de temps. S'il est complexe de les étudier avec précision dans le milieu naturel d'un point de vue technique, elles sont mesurées avec plus de facilité en laboratoire, en conditions contrôlées.



D'après: The Global Oxygen Cycle, Petsch S.T, in Treatise on geochemistry (2004). Heinrich D. Holland and Karl K. Turekian.

Figure 4 : Schématisation des processus de la photosynthèse et de la respiration. Figure extraite de Groleau et al (2008).

Dans les articles rapportés, les auteurs cherchent à déterminer sous quel seuil de lumière (irradiance, en µmoles de photons.m^{-2}.s^{-1}, exprimée par la suite en µmol.m^{-2}.s^{-1}), la production d'oxygène est la plus importante, et sous lequel elle est limitée. Il est commode de « résumer » ces informations sous forme d'une courbe P/I, avec P la production d'O_2 lors de la photosynthèse, en fonction de l'irradiance, à une température donnée. Ces courbes sont obtenues pour des cultures de *P. rubescens* et de *P. agardhii*, à partir desquelles les coefficients photosynthétiques sont calculés (Walsby et al, 2001 ; Vaughan, Davis, Walsby, 2001). Ces coefficients sont très sensibles, et dépendent du moment de la journée (Walsby et al, 2001). Ils permettent de passer par des équations algorithmiques, telles que celles données par Walsby (2001) :

$$P = P_m\,[1 - \exp(-\alpha I/P_m)] + R + \beta I$$

Avec P_m l'activité photosynthétique maximale rapportée à la biomasse, exprimée en µmoles d'O_2.(unité de biomasse)$^{-1}$.h^{-1},. Elle est atteinte à l'irradiance de saturation, entre 50 et 170 µmol.m^{-2}.s^{-1}, à 20°C et pour la souche B9972 de *P. rubescens*, pour Davis et Walsby (2002) ;

c'est la valeur au niveau du plateau (Figure 2). Pour *P. rubescens* et *P. agardhii*, P_m augmente avec la température.
R est la respiration, en µmol.(unité de biomasse)$^{-1}$.h^{-1}. Elle est négative, car elle correspond à la consommation d'O_2 à l'obscurité. Elle augmente quand la température augmente, pour *P. agardhii* et *P. rubescens*.
α est la pente de la courbe à I=0, en µmol.(unité de biomasse).h^{-1}.(µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$. Pour les deux sous-espèces de cyanobactérie, elle est globalement constante quelque soit la température.
β est la pente pour les fortes irradiances, en µmol.(unité de biomasse)$^{-1}$h^{-1}.(µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$, et négatif lorsqu'il y a de la photo inhibition. Ce phénomène apparait à des valeurs élevées de l'irradiance, pour lesquelles la production d'oxygène, une fois son maximum atteint, diminue.
I est l'intensité lumineuse (irradiance), en µmoles de photons.m^{-2}.s^{-1}. (Walsby, 2001 ; Davis et Walsby, 2002)
Le point de compensation de la photosynthèse correspond à l'irradiance pour laquelle la production d'oxygène lors de la photosynthèse égale la consommation de l'oxygène lors de la respiration (Davis et Walsby, 2002 ; Figure 5).
Bossard et al (2001) déclarent que l'intensité lumineuse à la profondeur de compensation pour la photosynthèse, appelée également profondeur euphotique, est équivalente à 1% de l'intensité lumineuse en surface.

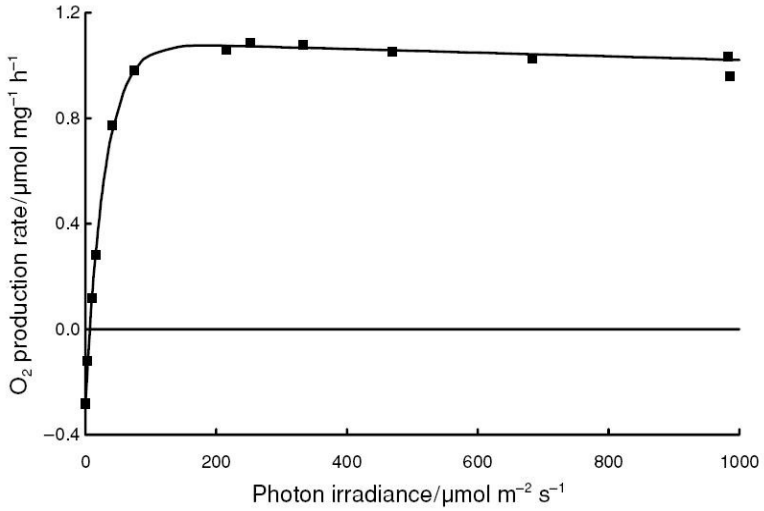


Figure 5 : Un exemple de courbe P/I, figure extraite de Davis et Walsby (2002).

L'importance de l'irradiance de compensation est telle, que l'établissement de la biomasse au niveau de la thermocline dépend aussi bien du gradient de radiation que de la profondeur la plus basse de la thermocline, où l'irradiance représente 1 à 2% de celle en surface (Walsby et al, 2004).

Parce que *P. rubescens* se stratifie à une profondeur généralement proche de la profondeur euphotique, les calculs de sa production photosynthétique sont très sensibles aux changements dans sa distribution verticale (Walsby et al, 2001).
Effectivement, il est clairement établi que *P. rubescens* s'accumule dans le métalimnion et qu'elle croit à des intensités lumineuses proches de l'irradiance de compensation de la photosynthèse (Davis et Walsby, 2000 ; Walsby et al, 2001 ; Walsby et al, 2004 ; Walsby et Schanz, 2002 ; Zotina et al, 2003). Ainsi, Zotina et al (2003) et Bright et Walsby (2000) ont observé que les populations stratifiées de *P. rubescens* dans le lac de Zürich sont au niveau ou à un niveau juste en dessous de celui de la profondeur de compensation.

On perçoit bien l'importance des déplacements verticaux de *Planktothrix* sur la photosynthèse, et des conditions environnementales d'une manière générale.

1.4.3 Dispositif de micro-respiration

Les proliférations phytoplanctoniques, notamment les blooms de *P. rubescens* et *P. agardhii*, sont irréguliers d'une année sur l'autre et sont difficiles à anticiper. La variabilité de la production en oxygène dans le milieu naturel est complexe et encore mal connue. Pour mieux comprendre les processus biochimiques qui ont lieu dans le milieu naturel, la photosynthèse et la respiration sont mesurées sur des monocultures de *P. agardhii* et *P. rubescens*. L'originalité de cette étude est l'utilisation d'un dispositif de micro-respiration pour effectuer les mesures de production et de respiration. Il est composé de micro-électrodes et de micro-chambres d'incubation de 500 µL, pouvant accueillir des cultures de *P. agardhii* et *P. rubescens*.

Le principal avantage de ce dispositif est la mesure des activités photosynthétique et respiratoire sur des faibles volumes de cultures. Les cultures sont délicates et longues à obtenir, et la micro-respiration ne nécessite qu'un petit volume d'échantillon. De plus, la micro-respiration est une technique de mesure non destructive, l'échantillon peut être récupéré pour d'autres analyses (lecture de l'absorbance par exemple).

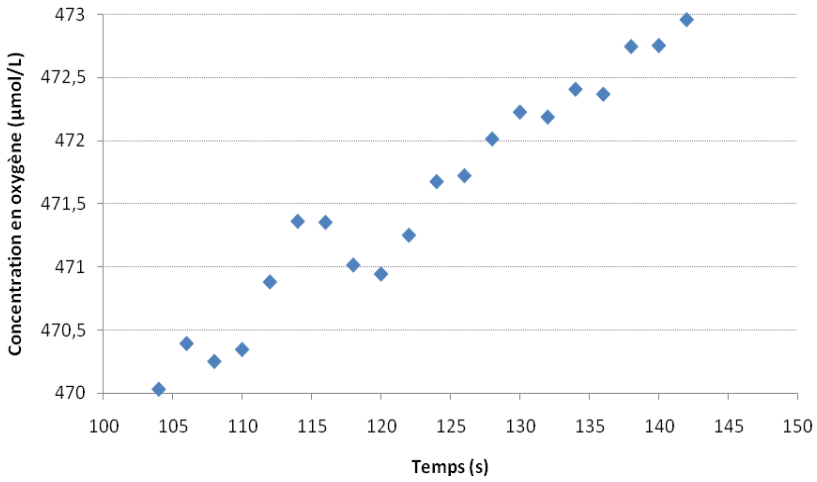


Figure 6 : Concentration en oxygène mesurée toutes les 2 secondes, sur une culture mère de *P. agardhii*, le 10 juin 2008.

Un autre avantage de cette technique est que la mesure peut se faire en continu sur une longue durée ou sur un cours laps de temps. En effet, il est possible de suivre des cycles d'incubation de 24h et plus, si la concentration de la culture incubée le permet, sans signe de confinement, c'est-à-dire sans saturation de la production ou de la consommation d'oxygène. Et la mesure ayant lieu en continu, il est donc envisageable d'écourter l'enregistrement quand le nombre de points est jugé suffisant pour l'exploitation du signal (Briand *et al*. 2004).
De plus, les micro-électrodes ont une précision de 0,1 µmol.L^{-1} (Figure 6) et un temps de réponse quasi-instantané, de l'ordre de la seconde. Briand et al. (2004) signalent que le bruit mesuré par l'électrode peut réduire la précision de la mesure à 0,5 µmol.L^{-1}.

Les articles de la littérature traitant de l'activité photosynthétique des cyanobactéries *Planktothrix* n'évoquent pas l'emploi de micro-électrode. Micheletti et al (1998), Vaughan et al (2001), Walsby (2001) et Walsby et al (2001) utilisent tous le même dispositif, consistant

en une électrode à oxygène de type Clark, montée sur une chambre disposée sur un agitateur magnétique, et éclairée par une lampe halogène dont l'irradiance est contrôlée par l'application de filtres de densité différente. Le modèle de l'électrode change parfois, en passant d'une électrode OXY 196 pour Micheletti et al (1998) et Walsby et al (2001), à une électrode Oxi 197, WTW, pour Zotina et al (2003). Davis et Walsby (2002) précisent utiliser une électrode de type Clarck pour mesurer l'oxygène de leurs cultures de *P. agardhii* et *P. rubescens*, en effectuant une mesure de la concentration en O_2 sur 200 s, la production moyenne étant calculée par régression analytique de l'activité mesurée entre 30 et 190 s sur chaque intervalle.

En revanche, dans la littérature, les dispositifs de micro-respiration sont employés sur d'autres organismes sous d'autres conditions. Les micro-électrodes sont évoquées par Lassen et al (1998) pour mesurer la production d'oxygène d'une population benthique de cyanobactéries en Méditerranée. Moodley et al (2008) emploie la micro-respiration pour l'étude des foraminifères et des nématodes. Staehr et Sand-Jensen (2006) utilisent déjà une micro-électrode de type Clarck pour déterminer la respiration communautaire d'une population phytoplanctonique. Par conséquence, aucun résultat de l'emploi d'une micro-électrode sur des cyanobactéries en culture n'a été publié à ce jour.

2 Matériel et méthodes

Les deux grands types d'expérimentations reposent (1) sur des incubations *in situ* de 65 mL selon la technique classique d'incubation, avec mesures aux temps initial et final en bouteilles claire et sombre (Bender et al, 1987). Et (2) sur des incubations *ex situ* dans des micro-chambres de 500 µL.

2.1 Incubations *ex situ*

2.1.1 Dispositif expérimental

2.1.1.1 Matériel biologique

- **Cultures de *P. rubescens* et *P. agardhii***

Les expérimentations ont porté sur une souche norvégienne non axénique de *P. agardhii* CYA 126/8 issue de l'algothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) et d'une souche non axénique de *P. rubescens* PCC 7821 de la Collection de Cyanobactérie de l'Institut Pasteur. Le maintien des cultures ainsi que les expérimentations ont été réalisées dans des phytotrons Binder qui sont des enceintes de grande dimension dans lesquelles la température, l'irradiance et la ventilation peuvent être contrôlées (Figure 7). Le phytotron est réglé sur une photopériode 16 :8 correspondant à 16 h de lumière et 8 h d'obscurité.

Figure 7 : Extérieur et intérieur du phytotron mobilisé pour le stockage et les expérimentations de *P. agardhii* et *P. rubescens*. A droite, on distingue le dispositif de micro-respiraiton sur l'étagère du haut, et plusieurs cultures de *P. agardhii* CYA 126/8 sur l'étagère du bas.

Les 500 mL de la culture de *P. agardhii*, stockés dans un erlenmeyer de 1 L, ont été acclimatés dans un phytotron réglé à 20°C et à 60 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Ces conditions sont proches des conditions optimales de croissance dans le milieu naturel (Oberhaus et al, 2007). Ce sont les conditions choisies pour les expérimentations.

De la même manière, il était planifié que les expérimentations sur la culture de *P. rubescens* se dérouleraient dans des conditions proches de son optimum de croissance (Oberhaus et al, 2007), à savoir 15°C et 10 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Néanmoins, les premières cultures de *P. rubescens*, acclimatées à l'Institut Pasteur sous ces conditions, n'ont pas survécu. Finalement, 200 mL d'une culture de *P. rubescens* (PCC 7821) conservée au MNHN à 20°C et 60 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ont été utilisées pour les expériences. L'acclimatation à une température étant longue, de l'ordre de plusieurs semaines, il était impossible de tenter une nouvelle acclimatation des cultures aux conditions prévues (15°C et 10 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Les conditions 20°C et 60 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ sont donc conservées pour le maintien et les expérimentations sur *P. rubescens*.

La culture de *P. agardhii* doit être repiquée régulièrement (Tableau 2), pour renouveler le milieu de culture, riche en nutriments, et éviter que les cyanobactéries ne s'agglomèrent entre elles. Pour cela, la moitié du volume de la culture est gardée dans l'erlenmeyer. Le même volume de milieu de culture est rajouté dans l'erlenmeyer. Le milieu de culture est un milieu Z8 axénique, stocké au réfrigérateur pour éviter tout éventuel développement bactérien. Le repiquage se déroule près d'un bec bunsen, afin d'assurer la stérilité du milieu de culture et d'empêcher un apport de bactéries ou de champignons dans la culture. On utilise des pipettes jaugées de 50 mL à usage unique et un Pipet Aid Drummond. La paillasse et le matériel (verrerie, pipette, Pipet Aid) sont préalablement nettoyés à l'éthanol à 70 %. Quotidiennement, les cultures les plus concentrées sont agitées à la main pour empêcher leur agglomération. *P. agardhii* a été repiquée le 20/05/08, date à laquelle les manipulations ont été débutées, le 04/06/08, le 18/06/08 et le 18/07/08.

	date de repiquage	date de mesure de la DO	10^6 cellules par mL
P. agardhii	20/05/2008	23/05/2008	5,2
	04/06/2008	05/06/2008	7,5
	18/06/2008	18/06/2008	9,9
	18/07/2008	21/07/2008	12,2
P. rubescens	13/06/2008	23/07/2008	12,3

Tableau 2 : Repiquages des cultures et concentrations cellulaires estimées pour *P. agardhii* et *P. rubescens*. Pour les deux premières dates, il s'agit du comptage des cellules. Pour les dates suivantes, le nombre de cellulaires a été estimé à partir des mesures de la DO à 750 nm.

Pour la culture de *P. rubescens*, aucun repiquage n'a été nécessaire durant la semaine de manipulation (Tableau 2). Mise en culture le 13/06/07, sa croissance est très lente et pendant un mois, aucune manipulation n'a été opérée sur cette souche très fragile.

- **Estimation de la concentration cellulaire et de la concentration en chlorophylle *a* de *Planktothrix***

Trois méthodes complémentaires les unes des autres ont été utilisées pour quantifier la biomasse des cultures. Elles requièrent des temps d'analyse variables. Le comptage du nombre de cellules et la concentration en chlorophylle *a* sont longs à obtenir. Il faut compter

au moins 30 min pour le comptage d'un échantillon et deux jours de manipulation pour obtenir une concentration en chlorophylle *a*. La mesure de la densité optique (DO) est une méthode plus rapide et plus simple. Elle a été utilisée systématiquement pour estimer la biomasse lors des différentes expérimentations. Les trois procédés ont été mis en relation lors de la première expérience, afin de relier l'absorbance à la concentration chlorophyllienne et au nombre de cellules.

- Mesure de l'absorbance à 750 nm :

La concentration cellulaire des échantillons est estimée par la mesure de la densité optique (DO) à 750 nm (longueur d'onde évaluant la turbidité), conformément à la littérature (Oberhaus et al, 2007 ; Vaughan et al, 2001 ; Bright et Walsby, 2000 ; Davis et Walsby, 2002 ; Zotina et al, 2003). Les mesures de la DO sont consécutives aux mesures de la micro-respiration. Elles sont effectuées dans des cuves en verre de 1,5 mL, de trajet optique 1 cm, sur un spectrophotomètre Cary 50 UV/Vis, à l'aide du module Advanced Reads. Les mesures s'effectuent à partir de 400 µL de culture, qui sont complétés à 1 mL par du milieu de culture, pour atteindre un volume suffisant pour la lecture optique. Le blanc s'effectue avec du milieu de culture Z8, en début et en fin de mesure. Chaque réplicat est lu au minimum trois fois.

- Comptage microscopique :

Les triplicats de mesures de la DO sont conservés pour le comptage microscopique des filaments de *Planktothrix*. Ils sont placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Une goutte de lugol (couleur brune) est ajoutée dans chacun, de manière à arrêter la croissance des filaments. Le comptage est réalisé sur une lame comportant deux cellules de Malassez, constituant chacune un volume de 1 µL. Chaque cellule se découpe en 100 rectangles de 0,01 mm^3 chacun, eux-mêmes subdivisés en rectangle de 0,001 mm^3. La solution est placée entre cette lame et une lame mince la recouvrant, par une pipette en verre. Elle est observée au microscope optique droit Nikon, avec un objectif 10x10. Un écran relié au microscope et disposant d'un logiciel de capture d'image, permet de visualiser, de compter et de mesurer la taille des filaments de *Planktothrix*. Les filaments étant longs, ils sont comptés sur un carreau de 0,01 µL. Le comptage du nombre de cellules et la mesure de la longueur des filaments sont effectués sur une cellule de Malassez. Sur la deuxième, seul le nombre de cellules est compté, afin de vérifier la répartition homogène des filaments sur toute la lame. Les filaments des deux souches de *Planktothrix* ont une largeur moyenne de 4 µm (3,99 ± 0,69 µm, n = 20, pour *P. agardhii* ; 3,95 ± 0,96 µm, n = 16, pour *P. rubescens*). La longueur moyenne des filaments de *P. agardhii* a été estimée à 127,2 ± 173,4 µm (moyenne ± écart-type ; n = 251), et pour *P. rubescens* 657,1 ± 738,4 (n = 90). Les valeurs des écart-types attestent de la très forte variabilité dans la longueur des filaments. Chaque filament est composé de cellules. On admettra que chacune a une taille moyenne de 4 µm (Komarek et Anagnostidis, 1986), aussi bien pour *P. rubescens* que pour *P. agardhii*. En rapportant la longueur moyenne des filaments à la taille moyenne des cellules, il est donc possible d'estimer le nombre moyen de cellule dans 1 mL de culture.

- Concentration en chlorophylle *a* (chl *a*) :

La méthode de quantification de la chlorophylle *a* la plus utilisée repose sur l'extraction à froid du pigment par un solvant organique, comme le méthanol, suivi de lectures spectrophotométriques. C'est un procédé fiable pour estimer la biomasse totale de phytoplancton. (Gregor, Marsalek, 2004 ; Kaiblinger et al, 2007)

Cette technique a été appliquée sur une gamme de dilution des cultures mères de *P. rubescens* et *P. agardhii* à des facteurs 2 (*P. rubescens* et *P. agardhii*), 5 (*P. rubescens* et *P. agardhii*) et 10 (*P. agardhii*). Des volumes de culture ont été filtrés lors de la première expérience. Pour les cultures mères de *P. agardhii* et *P. rubescens*, 30 mL et 22 mL respectivement ont été filtrés. Pour les cultures filles de *P. agardhii* diluées 5 et 10 fois, 70 mL et 95 mL respectivement ont été nécessaires pour la filtration. Pour *P. rubescens*, 26,2 mL ont été suffisants pour effectuer un dosage sur la culture fille d5. Il est préférable d'effectuer la filtration sur des triplicats. Mais compte tenu du faible volume de culture disponible, une seule filtration était effectuée pour chaque culture.

2.1.1.2 Dispositif de micro-respiration

- Description du dispositif :

Le dispositif de micro-respiration Micro-Respiro d'Unisense est composé d'un rack de quatre chambres d'incubation de 500 µL environ, d'une chambre de calibration, et d'une micro-électrode à oxygène OX-MR de type Clark. Celle-ci est reliée à un pico-ampèremètre via un convertisseur analogique numérique, lui-même connecté à un ordinateur par une prise réductrice de bruit placée à l'arrière du pico-ampèremètre (Figure 8). Le dispositif est nouveau pour le LGE, il a donc du être pris en main, testé et calibré.

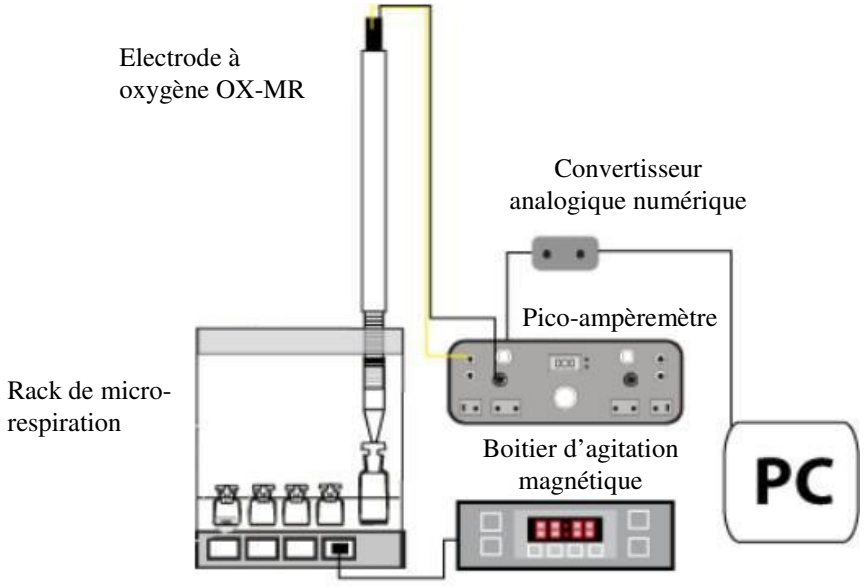


Figure 8 : Dispositif de micro-respiration, comprenant un rack de 4 micro-chambres, une micro-électrode, un agitateur magnétique, un pico-ampèremètre, un convertisseur analogique numérique et un ordinateur. Figure extraite du site d'Unisense.

L'électrode de type Clark consiste en une électrode de travail en platine (cathode), intégrée à un isolant cylindrique en verre. Une anode en argent est localisée autour de l'extrémité basse de l'isolant. C'est la référence interne. Les électrodes et le verre sont placés à l'intérieur d'une tige en verre qui contient de l'électrolyte (KCl). Une membrane perméable à l'oxygène en téflon ou en polyéthylène est fixée à l'extrémité de la tige. (Figure 9) (Revsbech, 1989 ; Taillefert, Luther, Nuzzio, 2000) Il en existe plusieurs sortes, se distinguant par l'épaisseur de leur extrémité par exemple. Une cathode de garde en argent, partiellement insérée dans l'électrode de travail, a été implantée dans la solution électrolytique pour supprimer l'oxygène

présent dans l'électrolyte, qui pourrait augmenter les bruits de fond (Taillefert, Luther, Nuzzio, 2000).

L'extrémité de l'électrode d'oxygène a un diamètre de 400 à 600 µm de diamètre (site d'Unisense), adaptée pour pénétrer dans la micro-cuve et combler l'ouverture au sommet des micro-cuves. Pour limiter les échanges d'oxygène et les fluctuations de température qui peuvent avoir une incidence sur la mesure, l'ensemble du rack et des micro-chambres a été maintenu immergé dans un bac rempli d'eau.
L'électrode est branchée à un pico-ampèremètre (PA2000), qui convertit le signal analogique enregistré en pA en Volt. Il est relié au convertisseur analogique-numérique qui permet l'enregistrement du signal analogique (V) sur un micro-ordinateur.

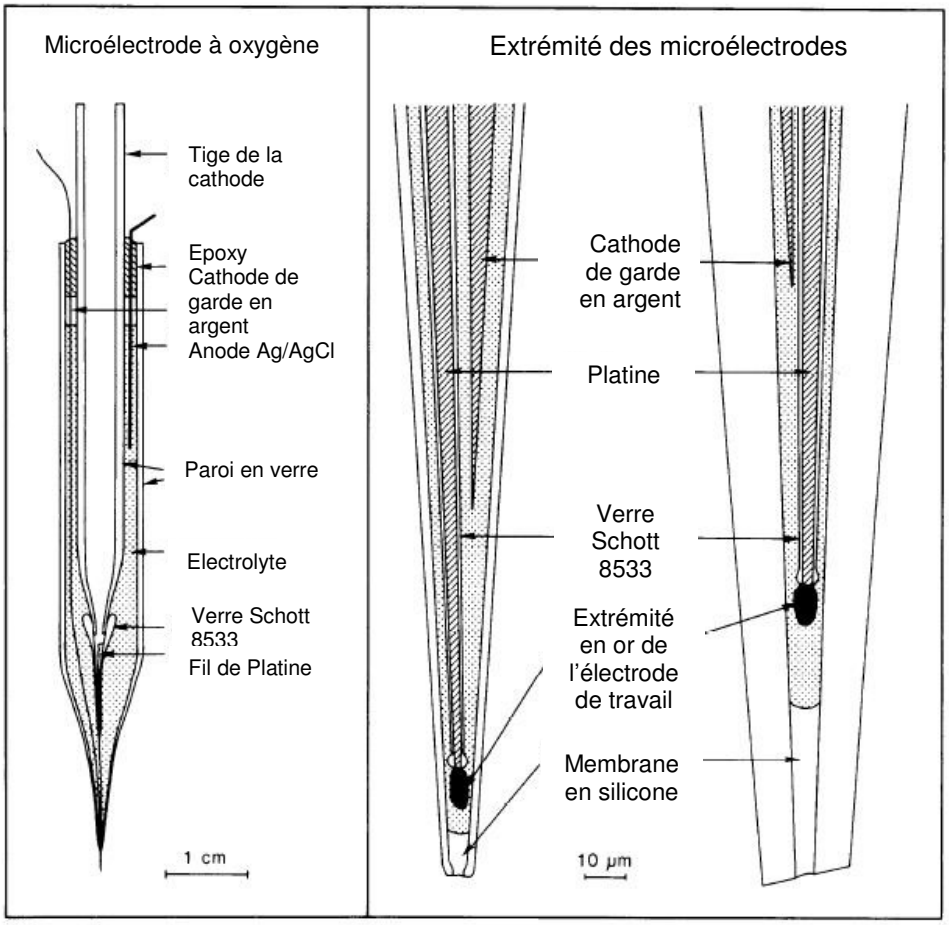


Figure 9 : A gauche, micro-électrode à oxygène avec une cathode de garde métallique en argent, entourée par une tige en verre, isolante. A droite, fine extrémité d'une micro-électrode à réponse rapide (gauche) et épaisse extrémité (droite) d'une micro-électrode plus lente et plus robuste. Image extraite de Revsbech (1989).

- Polarisation et calibration (0% et 100%) :

En pratique, l'électrode doit être polarisée quelques heures. Par expérience, elle sera toujours laissée à polariser dans l'eau au moins 24 h, pour s'assurer que l'oxygène contenu dans l'électrolyte soit consommée avant la mesure (B. Deflandre, comm. pers.).
Elle doit être calibrée en deux points ; la première calibration se fait dans une solution anoxique (de concentration en oxygène nulle) obtenue par diffusion et consommation de l'oxygène de l'eau distillée par une solution d'ascorbate de sodium, dans une chambre prévue

à cet effet. Deux heures sont nécessaires pour que l'eau déionisée, introduite dans le bouchon de la chambre de calibration, s'équilibre avec la solution d'ascorbate remplie dans le flacon. L'eau distillée ainsi obtenue est renouvelée toutes les deux semaines, conformément aux recommandations d'Unisense. La deuxième calibration est faite dans une solution à 100% d'oxygène, obtenue en faisant buller un bécher d'eau déionisée sous une température connue et renseignée dans le logiciel. Au total, la calibration de l'électrode prend 15 à 30 min. Une première micro-chambre de 500 µL est réservée pour la calibration à 100%. Elle est effectuée avant chaque début d'expérience.

- Principe de la méthode :

Les incubations *ex situ* se font dans trois micro-chambres de 500 µL. Elles reposent sur le principe de la comparaison entre une micro-chambre exposée à la lumière du phytotron et une micro-chambre entourée d'aluminium pour simuler l'obscurité. (Figure 10) Après une série de mesures montrant une activité respiratoire significative sur le milieu de culture supposé axénique, la quatrième micro-cuve a été utilisée pour la mesure de la respiration bactérienne du milieu de culture. La concentration en oxygène est enregistrée par le logiciel en $\mu mol.L^{-1}$ (µM) toutes les 2 s. La concentration en oxygène enregistrée est tracée en fonction du temps en seconde. Une droite de régression linéaire, d'équation y = ax + b, est établie sur 10 min environ. La pente a, exprimée en $\mu mol.L^{-1}.s^{-1}$, est convertie en $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$, pour exprimer la production d'oxygène et la respiration.

Le prélèvement de *Planktothrix* et de milieu Z8 ont été réalisés près d'une flamme, pour ne pas introduire de bactéries ou de champignons supplémentaire dans la culture ou le milieu de culture axénique. Une pipette stérile à usage unique de 1 ou 5 mL a été utilisée pour prélever les cyanobactéries et remplir les micro-chambres, en distribuant un volume minimum de 700 µL, afin d'éviter la formation de bulles d'air lors du rebouchage.

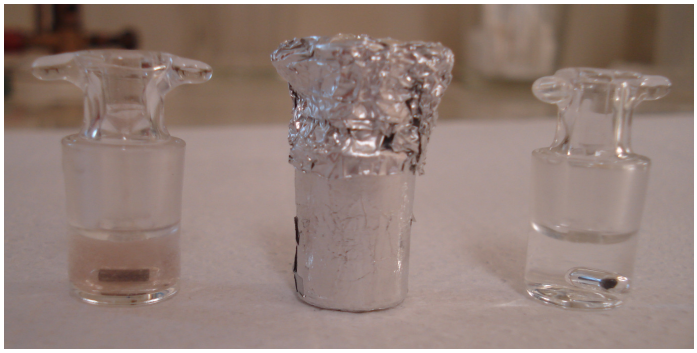


Figure 10 : Micro-chambres d'incubation, contenant de la culture mère de *P. rubescens*. A gauche, incubation à la lumière, au milieu, incubation à l'obscurité et à droite, le milieu de culture Z8.

Les mesures sont réalisées sur 10 min. Cela permet de capter un enregistrement suffisamment long pour obtenir une moyenne sur 10 min, même dans le cas de fluctuations du signal, qui peuvent être causées par l'environnement électrique et électromagnétique d'autres appareils en marche. Les conditions contrôlées par le phytotron assurent une température et une irradiance parfaitement maîtrisées et constantes durant toutes les manipulations.

2.1.2 Schéma d'expérimentation

Il est reconnu que la productivité de *P. rubescens* dépend fortement des conditions environnementales. Néanmoins, aucune étude ne porte sur la productivité d'oxygène, déterminée dans des conditions d'irradiance simulant les variations de la luminosité rencontrées dans le milieu. Aussi, dans le but d'étudier la variabilité de la production en oxygène sur différentes échelles de temps et sous différentes irradiances (Tableau 3), cinq séries d'expériences ont été menées sur *P. rubescens* et *P. agardhii*.
Les conditions d'expérimentations ont été de 20°C et 60 µmoles de photons.m^{-2}.s^{-1} pour les deux souches.

Expérimentations	Mesures	Méthode	Culture	T et I
Calibration des paramètres estimateurs de la biomasse	Mesures de ΔO_2, DO_{750}, comptage, concentration en chlorophylle *a*, sur 10 min durant la phase lumineuse et la phase d'obscurité.	Micro-respiration	*P. agardhii* *P. rubescens*	20 60
Suivi de la productivité à différentes échelles de temps	Suivi de ΔO_2 et DO_{750} : - Sur une seule journée, à plusieurs moments de la phase lumineuse, à partir du début de la phase lumineuse. - Sur un mois, à heure fixe.	Micro-respiration	*P. agardhii* *P. rubescens*	20 60
Stress lumineux	Suivi de ΔO_2 et DO_{750} en fonction des variations de l'irradiance sur 3 h, 3 h 30 après le début de la phase lumineuse.	Micro-respiration	*P. agardhii* *P. rubescens*	20 0 à 130
Incubations *ex situ* sur une communauté naturelle de *P. agardhii* (Enghien-les-Bains)	Production et respiration communautaire	Micro-respiration	Communauté naturelle	20 60
Incubations *in situ* sur une communauté naturelle de *P. rubescens* (lac du Bourget)	Production et respiration communautaire	Dosage Winkler	Communauté naturelle	Non mesurées

Tableau 3 : Schémas d'expérimentation pour *P. agardhii* et *P. rubescens*. T et I sont respectivement la température, en °C, et l'irradiance, en µmol.m^{-2}.s^{-1}.

2.1.2.1 Etudes des paramètres estimateurs de la biomasse et des activités photosynthétique et respiratoire sur une gamme de concentration

Pour vérifier la linéarité de la production et de la respiration sur une plage de concentration, des mesures sont effectuées sur une gamme de dilution des cultures mères de *P. agardhii* et *P. rubescens*.

L'étude de la biomasse algale nécessite d'établir la relation existant entre les paramètres caractéristiques de la biomasse : la densité optique, la densité cellulaire et la concentration en chlorophylle *a*. Pourtant, aucune relation n'est fournie sur ces différentes méthodes d'estimation de la biomasse, employées couramment dans la littérature.

Pour renseigner cette lacune, une expérimentation a été conduite sur une gamme de dilution de la culture de *P. agardhii*, à un instant donné de la croissance de la culture mère.

Pour cela, la culture mère a été diluée d'un facteur 2 et 5 le 05/06/08 (une journée après repiquage). La variation d'oxygène a été mesurée sur 10 min au moins, sur des triplicats des solutions mère et filles, pendant la phase lumineuse et pendant la phase d'obscurité. Ensuite, la DO à 750 nm a été mesurée sur chacun des échantillons. Ils ont ensuite été conservés pour le comptage microscopique. Enfin, le reste de chaque solution est filtré pour la mesure de la concentration en chlorophylle *a*.

La correspondance des différents paramètres caractéristiques de la biomasse de *P. rubescens* n'est pas renseignée. Pour documenter des relations, la concentration de la culture a été estimée par la DO, sur une gamme de dilution quarante jours après le repiquage de *P. rubescens*. Il s'agit de dilutions d'un facteur 2 et 5 de la solution mère de *P. rubescens* le 23/07/08. Le protocole est identique à celui de *P. agardhii* pour cette expérimentation.

2.1.2.2 Variation de l'activité photosynthétique au cours de la phase lumineuse

Davis et Walsby (2002) ont effectué des mesures de la production en oxygène entre 3 et 10 h après le début de la phase lumineuse, sur des cycles de 12 h : 12 h, pour éviter les premières heures durant lesquelles les activités photosynthétiques changent le plus rapidement.

Pour détailler les variations de l'activité photosynthétique au cours d'une même phase lumineuse, la production d'oxygène est mesurée à 3 moments de la phase lumineuse : au passage de l'obscurité à la lumière, 4 h et 7 h après ce passage.
Dans un premier temps, un tube falcon de 15 mL a été rempli de 10 mL de culture et est conservé dans le phytotron. Ceci a pour but d'éviter de sortir la culture cinq fois dans la journée et d'éviter de prélever à la flamme 5 fois dans la même journée, ce qui pourrait augmenter les risques de contamination. Quatre heures et sept heures après l'introduction dans le tube falcon, la culture mère a été échantillonnée dans trois micro-chambres à partir du contenu du tube, pour les mesures de la production en oxygène.
Dans un second temps, les échantillons ont été directement prélevés dans l'erlenmeyer de la culture mère. La productivité a été estimée à 5 moments de la phase lumineuse : au passage de l'obscurité à la lumière, 2 h, 4 h, 6 h et 7 h après ce passage.

Le suivi de la productivité consiste en la mesure de la DO, et de la variation de l'oxygène à la lumière ($\Delta O_{2\ \text{lumière}}$), à l'obscurité avec la micro-chambre entourée d'aluminium (R_{totale}) et dans le milieu de culture ($R_{\text{milieu de culture}}$). La DO est ensuite convertie en concentration chlorophyllienne, par la relation établie grâce aux courbes de calibration : 1 unité de DO = 3,0 $mg.L^{-1}$, pour exprimer la productivité nette ($\Delta O_{2\ \text{lumière}} - R_{\text{milieu}}$) en $\mu mol.(mg\ chl\ a)^{-1}.h^{-1}$.

Quand la respiration totale est trop faible, c'est-à-dire lorsqu'elle est inférieure à la respiration bactérienne du milieu de culture, elle est remplacée par la moyenne des premières mesures de la respiration totale, $-48 \pm 10\ \mu mol.L^{-1}.h^{-1}$, n=6. C'est le cas pour la première expérience (10/06/08), où les premières simulations de l'obscurité n'étaient pas suffisamment efficaces.

2.1.2.3 Suivi de la croissance de P. agardhii

Afin de suivre la productivité au cours des différentes phases de la croissance, la culture de *P. agardhii*, disponible plus longtemps, a été suivie sur un mois, après un repiquage le 18/06/08. Il s'agissait de mesurer la DO et la variation d'oxygène à la lumière et à l'obscurité sur 10 min, quotidiennement pendant les deux premières semaines, puis deux semaines après, à heure fixe, 3 h 30 après le passage de l'obscurité à la lumière.

2.1.2.4 Stress lumineux

Peu d'indications sont fournies dans la littérature sur les conditions précises d'expérimentation et la durée exacte d'un stress lumineux.
Cependant, compte tenu des variations de l'activité photosynthétique au cours de la phase lumineuse observées tant pour *P. agardhii* que pour *P. rubescens*, le stress lumineux doit impérativement s'effectuer sur une courte durée. En outre, Vaughan et al (2001) et Davis et Walsby (2002) démarrent les mesures de production d'oxygène pour les courbes P/I entre 3 et 10 h (sur des cycles 12 h : 12 h) après le début de la phase lumineuse, pour éviter les premières heures de la journée où les coefficients photosynthétiques changent le plus. L'expérimentation est donc débutée 4 h après le passage à la lumière, et dure au maximum 3h.

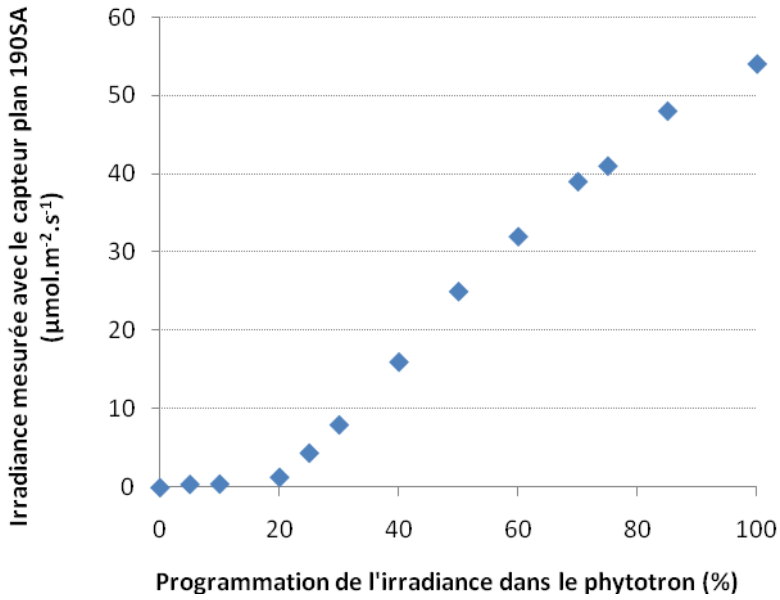


Figure 11 : Relation entre la programmation de l'irradiance dans le phytotron et l'irradiance mesurée par le capteur plan 190SA.

Le phytotron dispose d'un régulateur d'irradiance. L'intensité lumineuse perçue par la culture dépend de la distance de la culture des néons et de la programmation réglée dans l'enceinte. Le réglage de l'irradiance s'effectue en pourcentage de l'intensité lumineuse maximale. La programmation de l'irradiance dans l'enceinte de 50% correspond à 60 µmol.m^{-2}.s^{-1}, sur une culture située à 38 cm en dessous des néons. L'irradiance de 60 µmol.m^{-2}.s^{-1} a été mesurée au préalable avec une sonde sphérique US-SQS Walz ®, raccordé à un boitier Li-cor ® LI-250, qui capte les rayons lumineux incidents et réfléchis. Défectueuse par la suite, elle a été

remplacée par un capteur 190SA plan. Celui-ci perçoit 25 µmol.m^{-2}.s^{-1} d'irradiance incidente à 38 cm en dessous des néons.
A cette distance, l'irradiance a été mesurée avec le capteur plan sur l'étendue de la gamme de programmation du phytotron (Figure 11).

Une relation a donc été établie entre les mesures obtenues avec les deux capteurs, afin d'obtenir une correspondance entre la programmation du phytotron et l'irradiance dans l'incubateur. L'irradiance dans le phytotron a été estimée à 2,4 fois l'irradiance mesurée avec la sonde plate.

La culture mère a été mise en incubation dans une micro-chambre entourée d'aluminium et dans une micro-chambre, est introduite dans une micro-chambre et la variation en oxygène a été mesurée en continu pendant toute la durée de la variation lumineuse. Les expériences ont débuté à une irradiance de 60 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Des paliers ont été effectués à des intensités lumineuses croissantes ou décroissantes. Pour chaque palier, les mesures de la variation d'oxygène durent 5 à 10 min, pour laisser le temps aux néons de s'ajuster ou à la sonde de se stabiliser. A la fin de l'expérience, les conditions initiales ont de nouveau été appliquées.

Pour *P. agardhii*, le phytotron est programmé pour obtenir les paliers d'irradiance de : 60, 40, 10 et 0 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Deux électrodes mesurent simultanément la variation de la concentration en oxygène dans deux micro-chambres. La DO de la culture mère est ensuite mesurée sur chaque micro-cuve, puis les échantillons sont renouvelés. Cela dans le but d'éviter l'effet de confinement et que la mesure ne soit faussée par une saturation en O_2 dans la micro-chambre. Puis, les paliers d'irradiance ascendants sont de 95, 110 et 135 µmol.m^{-2}.s^{-1}, qui est considéré comme le maximum de lumière fournie par le phytotron.

Pour *P. rubescens*, la mesure de la concentration en oxygène a été réalisée sur un seul échantillon, avec les paliers d'irradiance descendants de : 60, 40, 20, 10, 3, 1, 0 puis 60 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Les paliers d'irradiance ascendants sont : 60, 75, 90, 110, 120 et 130 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Entre les deux évolutions de l'intensité lumineuse, l'échantillon dans la micro-chambre a été renouvelé.

2.2 Incubations *in situ*

2.2.1 Incubations dans le lac du Bourget

L'incubation a lieu le 10 juillet 2008, sous un ciel dégagé et très ensoleillé. Le maximum de fluorescence est repéré par la sonde BBE, à 14,5 m de profondeur à 11h55 (heure locale). L'incubation a été réalisée donc 1,5 m au dessus de la profondeur du pic, à 13 m de profondeur. A partir de 12h28, on effectue un prélèvement à l'aide d'une bouteille niskin, avec laquelle on remplit les 9 fioles de 25 mL réservées pour l'O_2.
Un triplicat d'échantillon est fixé immédiatement pour le dosage Winkler, correspondant au temps t_0. Et les 6 flacons restants, 3 flacons clairs et 3 flacons noirs, sont installés pour l'incubation.
La ligne d'incubation, préparée antérieurement, se compose d'une platine pouvant recevoir 3 flacons de 25 mL clairs et 3 flacons de 25 mL obscurs, qui sont en fait recouverts de scotch noir opaque sur le corps du flacon, et d'aluminium sur le bouchon. La ligne est descendue à 13h50, et à 19h, elle est remontée. Les échantillons sont alors immédiatement fixés.
La concentration en O_2 est dosée par la méthode Winkler.

2.2.2 Mesures des autres paramètres

Comme indiqué précédemment, la bouée implantée sur le site B du lac du Bourget porte plusieurs capteurs, situés à 15 m de profondeur au niveau supposé du pic algal. La sonde CTD enregistre en continu, toutes les 15 min, la conductivité, la température et la profondeur. Tandis que le capteur BBE est une sonde fluorimétrique, qui relève également la pression et la température. Les premières données enregistrées par la bouée indiquent que le pic d'efflorescence algale entre juillet 2007 et début 2008 se situait entre 12 et 14°C. Des mesures d'éclairement effectuées en 2006 indiquent qu'à 15 m de profondeur, la lumière varie entre 5 et 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

2.3 Expression des résultats

Si le mode opératoire des expérimentations *ex situ* et *in situ* n'est pas identique, le traitement des mesures de la concentration en oxygène dans les deux cas est le même.

A l'obscurité, seule la respiration a lieu. La consommation de l'oxygène de la culture est la somme de la respiration de la culture de *Planktothrix* et du milieu de culture (Figure 12) :

$$\Delta[O_2] / \Delta t = R_{culture} + R_{milieu} = R_{totale}.$$

Par convention, la respiration (R) possède un signe négatif, tandis que la photosynthèse (P) présente un signe positif. Par conséquent, pour la respiration : $|R_{totale}| > |R_{culture}| > |R_{milieu}|$.

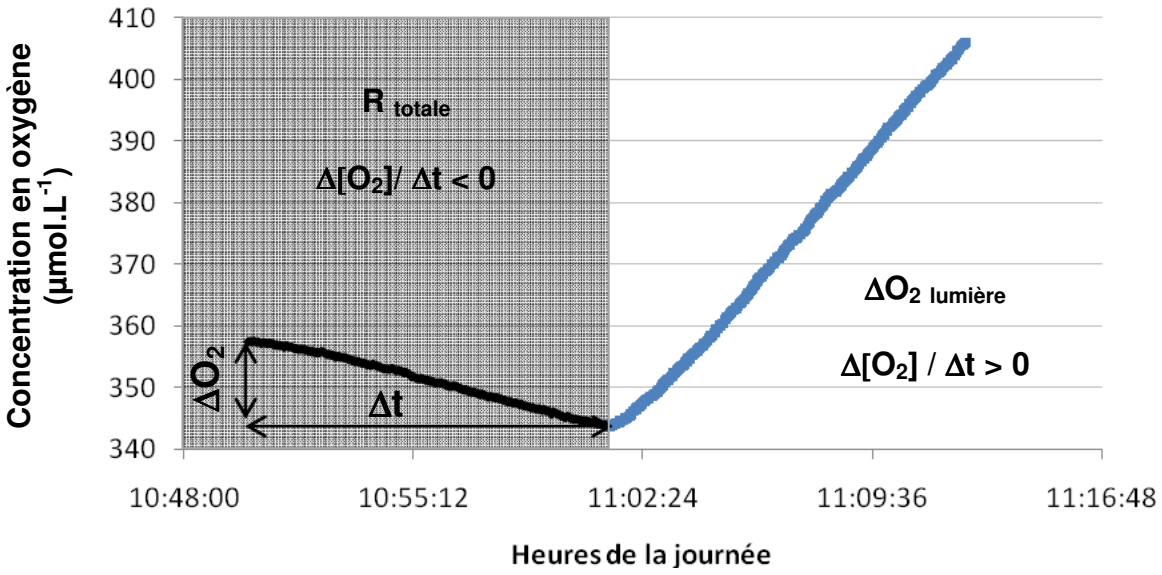


Figure 12 : Mesure de la concentration en oxygène dans la culture mère de *P. agardhii* au passage de l'obscurité à la lumière durant le cycle 16 h : 8 h.

A l'obscurité : $\Delta[O_2] / \Delta t = R_{Planktothrix} + R_{milieu} = R_{totale}$.

A la lumière : $\Delta[O_2]/ \Delta t = P_{Planktothrix} + R_{totale} = \Delta O_{2\ lumière}$.

A la lumière, la respiration et la production d'O_2 ont lieu en simultanée, mais c'est cette dernière qui est dominante (Figure 12).

$$\Delta[O_2] / \Delta t = P_{Planktothrix} + R_{totale} = \Delta O_{2\ lumière}$$

Le signal enregistré par le logiciel MicOx nous donne les mesures de la concentration en oxygène toutes les deux secondes, sur toute la durée de la mesure. La concentration est tracée en fonction des heures de la mesure, comme c'est le cas sur la Figure 12, ou du temps en secondes.

La production nette, en $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$, est déduite de la mesure à la lumière. C'est la résultante de la production et de la respiration à laquelle on soustrait la valeur de respiration du milieu de culture :

$$P_n = \Delta O_{2\ lumière} - R_{\ milieu}.$$

Et la production brute, qui correspond à la quantité totale d'O_2 produite par la culture, est alors :

$$P_b = \Delta O_{2\ lumière} - R_{\ totale}.$$

Par conséquent : $P_b > P_n > \Delta O_{2\ lumière}$.
Pour les incubations effectuées sur les communautés algales naturelles de *P. rubescens* et *P. agardhii*, la production nette est la différence de la concentration au début de l'incubation et à la fin de l'incubation, ramenée à la durée de l'expérimentation. Il s'agit de la production communautaire. De la même manière, la production communautaire brute est calculée en soustrayant la respiration totale.

La productivité est le rapport de la production (en $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$) sur l'unité de la biomasse (en (mg de chl *a*).L^{-1} par exemple). C'est cette grandeur, normalisée, qui a été utilisée pour exprimer les différents résultats. On parle alors de productivité nette et de productivité brute.

3 Résultats et discussion

3.1 Expérimentations *ex situ* sur *P. agardhii* et *P. rubescens*

3.1.1 Etudes des paramètres estimateurs de la biomasse et des activités photosynthétique et respiratoire sur une gamme de concentration

3.1.1.1 Relations entre l'absorbance à 750 nm, le nombre de cellules et la concentration en chlorophylle a

Dans un premier temps, il est nécessaire d'établir une relation entre les différents paramètres d'estimation de la biomasse, afin de relier les mesures de la DO effectuées en routine au nombre de cellules et à la concentration en chlorophylle *a*.

Les mesures de la DO de chaque culture ont été effectuées sur des triplicats. Elles ont été corrélées avec les mesures de la teneur en chlorophylle *a*, réalisées sur un unique réplicat des mêmes cultures. Les mesures de l'absorbance recouvrent une plage de valeurs comprises entre 0,021 ± 0,003 (moyenne ± écart-type) et 0,272 ± 0,040. Les concentrations moyennes en pigment chlorophyllien sont de 77,8 ± 0,2 µg.L^{-1} pour la culture fille d10, 405,5 ± 0,2 µg.L^{-1} pour la culture fille d2 et 822,2 ± 1,9 µg.L^{-1} pour la culture mère. La Figure 13 montre la concentration moyenne en chlorophylle *a* des cultures de *P. agardhii* en fonction de la DO moyenne.

Pour la DO, on retrouve bien les facteurs 2 et 10 pour la série de dilution du 05/06/08. Les écart-types augmentent avec la DO, la dispersion est plus importante sur des échantillons plus concentrés. Pour la chlorophylle *a*, les écart-types sont très faibles car la moyenne est établie à partir de 3 lectures sur un même échantillon.

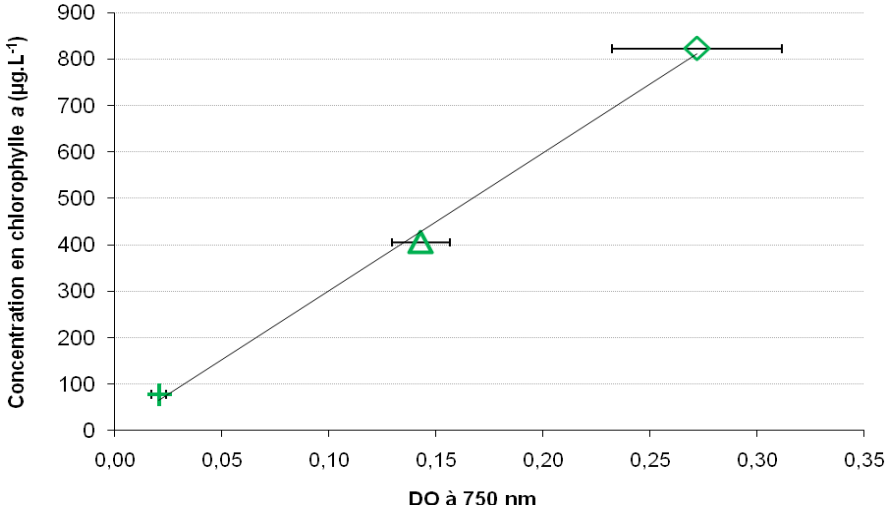


Figure 13 : Relation entre la DO à 750 nm et la concentration en chlorophylle *a* de la culture de *P. agardhii* sur une gamme de dilution : culture mère (losange), culture mère diluée par 2 (d2 ; triangle) et culture mère diluée par 10 (d10 ; croix) une journée après un second repiquage le 05/06/08 (R^2 = 0,99 ; y = 2967x + 4,6).

Avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,99, la relation DO/chl *a* parait donc linéaire pour la gamme du 05/06/07. En se basant sur l'équation de la droite de régression linéaire, y = 2967x + 4,6, la relation suivante a été déterminée : 1 unité de DO = 3,0 mg de chl *a*.L^{-1}.

Par ailleurs, le comptage des cellules pour chaque culture a été réalisé sur les échantillons utilisés pour les mesures de la DO. La figure 13 présente la mise en relation de la DO à 750 nm avec le nombre de cellules des cultures mère et filles du 05/07/08 et de la culture fille du 23/05/08 (pour laquelle la concentration en chlorophylle *a* n'a pas été mesurée). La culture mère atteint 7,5.10^6 cellules.mL^{-1}, et les cultures filles d2 et d10 sont à 2,0.10^6 cellules.mL^{-1} et 5,7.10^5 cellules.mL^{-1} respectivement.
Avec un coefficient de détermination de 0,91, l'absorbance moyenne et le nombre de cellules sont fortement corrélés pour les mesures de *P. agardhii* du 05/06/08 (Figure 14). A partir de l'équation de la droite de régression linéaire, y = 26,9x – 0,4, la correspondance suivante a été établie : 1 unité de DO = 2,6.10^7 cellules.mL^{-1}.
Entre la concentration cellulaire et la concentration chlorophyllienne de *P. agardhii*, la relation suivante est déterminée : 1 mg chl *a*.L^{-1} = 8,7.10^6 cellules.mL^{-1}.

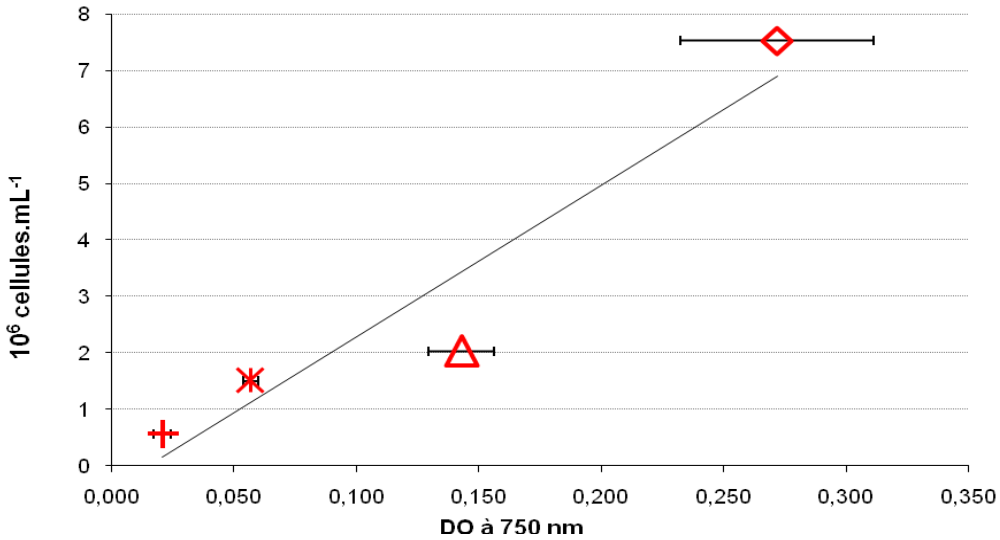


Figure 14 : Relation entre la DO à 750 nm et le nombre de cellules par mL de la gamme de dilution de *P. agardhii* : culture fille d5 (étoile) du 23/05/08, soit 3 jours après le premier repiquage ; culture mère (losange), culture fille d10 (croix) du 05/06/08, soit une journée après un second repiquage (R^2 = 0,91 ; y = 26,9x – 0,4).

Pour la culture de *P. rubescens*, l'absorbance, la concentration chlorophyllienne et le nombre de cellules ont été mesurées le 23/07/08 sur la culture mère pure et la culture mère diluée deux et cinq fois. La DO a été reliée à la teneur en chlorophylle *a* et aux résultats du comptage (Figure 15).
Les mesures de la DO s'étendent de 0,096 ± 0,004 à 0,472 ± 0,065. En outre, les mesures de la concentration en chlorophylle *a* sont de 475,7 ± 0,7 µg.L^{-1} et 2,62 ± 0,3 mg.L^{-1} respectivement. Et la concentration cellulaire est comprise entre 2,5.10^6 et 8,1.10^6 cellules.mL^{-1}.
La relation DO/chl *a* semble linéaire sur la gamme de dilution, avec une pente de 5,67 mg chl *a*.(unité de DO)$^{-1}$. Le coefficient de détermination est de 0,99.
La relation suivante est déduite de la droite de régression linéaire : 1 unité de DO = 5,5 mg chl *a*.L^{-1}.

Avec $R^2 = 0,97$, l'absorbance et le nombre de cellules de *P. rubescens* sont fortement corrélés. Et d'après l'équation de la droite de corrélation, on obtient la relation suivante :
1 unité de DO = $1,6.10^7$ cellules.mL^{-1}.
La correspondance entre le nombre de cellules et la concentration en chlorophylle *a* a été déterminée pour *P. rubescens* : 1 mg chl *a* = $3,0.10^6$ cellules.mL^{-1}.

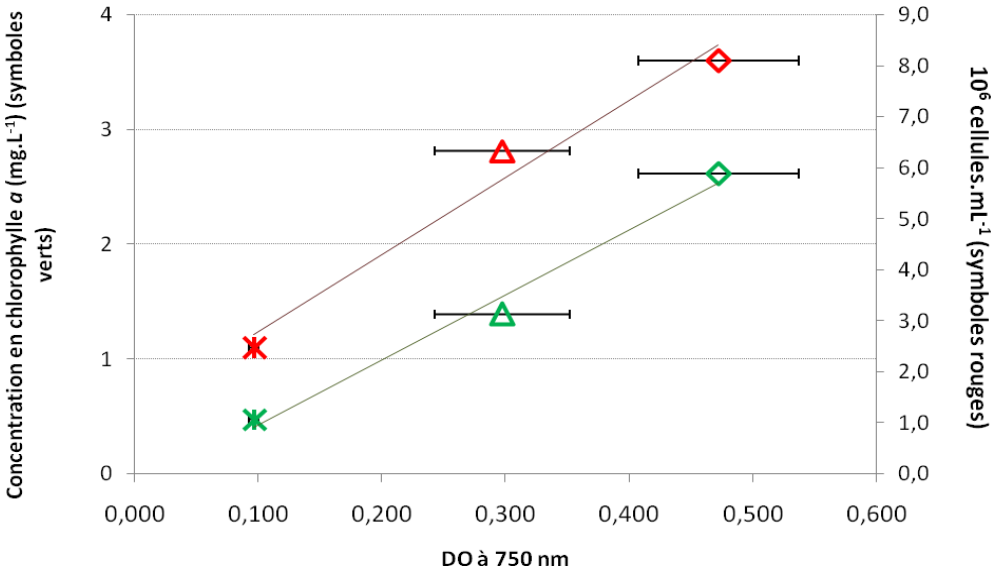


Figure 15 : Concentrations en chlorophylle *a* (symboles verts) et nombre de cellules (symboles rouges) en fonction de la DO à 750 nm, pour la culture mère de *P. rubescens* (losange), les cultures filles d2 (triangle) et d5 (étoile), le 23/07/08, soit 40 jours après le repiquage. Pour la concentration en chlorophylle *a*, R^2 = 0,98 ; y = 5668x – 1,3. Pour le nombre de cellules, R^2 = 0,97 ; y = 15,1x + 1,3.

3.1.1.2 Variation des activités photosynthétique et respiratoire sur une gamme de concentration

Pour les mesures des activités photosynthétiques et respiratoires, la DO est utilisée systématiquement, et permet d'estimer les concentrations en chlorophylle *a* ou le nombre de cellules. La DO est un proxy du nombre de cellules et traduit la turbidité de l'échantillon.

En plus de la DO et de la concentration chlorophyllienne, la variation d'oxygène a été mesurée pendant 10 min sur les mêmes échantillons. Le 06/06/08, la variation en oxygène est mesurée sur des triplicats d'échantillon des cultures filles d2 et d5 et de la culture mère, à la fin de la phase d'obscurité. Puis la DO à 750 nm est mesurée sur chaque échantillon. Les valeurs de la DO des échantillons du 06/06/07 s'étendent de 0,057 ± 0,008 à 0,332 ± 0,01, ce qui correspond à la gamme de DO des valeurs du 23/05/08 et du 05/06/08.
En considérant une respiration bactérienne de -13 ± 6 µmol.L^{-1}.h^{-1} (n = 33), établie à partir des mesures sur milieu de culture, la production nette d'oxygène a été déduite (µmol.L^{-1}.h^{-1}).

La Figure 16 reprend les activités photosynthétiques et respiratoires (production nette et respiration) des cultures filles et de la culture mère en fonction de la DO moyenne mesurée sur chaque triplicat d'échantillon de culture.

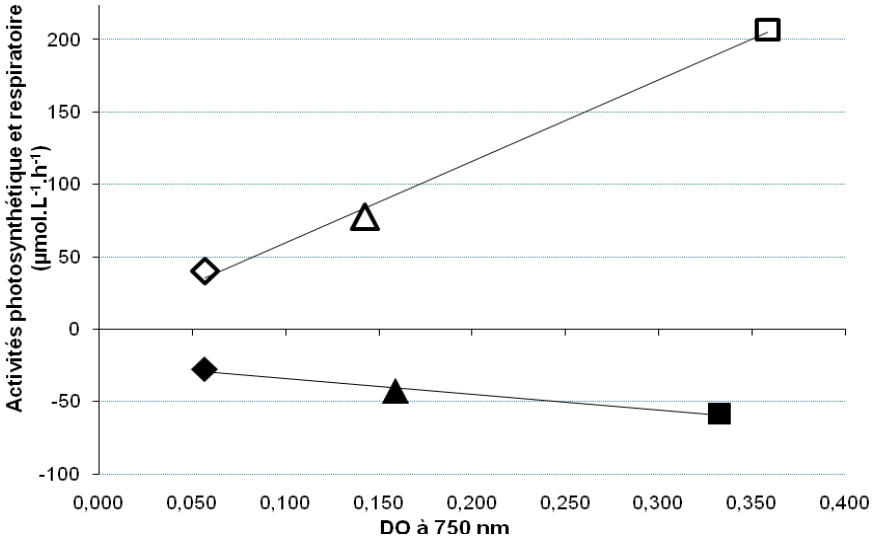


Figure 16 : Production nette (à la lumière, symboles clairs) et respiration (symboles foncés) de la culture mère (carré) et des cultures filles d2 (rond) et d5 (losange) de *P. agardhii*. A la lumière : y = 562,2x + 3,5, R^2 = 0,99. A l'obscurité : y = -108,6x – 23,0, R^2 = 0,98.

Sur la gamme de concentration, la production nette évolue de manière linéaire avec la DO avec une pente de 600 µmol.L^{-1}.h^{-1}.(unité de DO)$^{-1}$.
La respiration, qui est fortement corrélée avec la DO (R^2 = 0,98), décroit avec une pente de -109 µmol.L^{-1}.h^{-1}.(unité de DO)$^{-1}$.
La production nette et la respiration varient linéairement avec la DO, sur une courte plage de valeurs (DO < 0,35). Pour la culture fille d2 et la culture mère, le rapport des DO (2,5) est proche du rapport des productions nettes (2,7). A l'obscurité, le rapport des respirations (1,4) est bien inférieur au rapport des DO (2,1). De même, pour la culture fille d5 et la culture mère, les rapports entre les activités respiratoires, les productions nettes et les DO ne sont pas les mêmes.

Les activités photosynthétiques et respiratoires dépendent fortement de la concentration des échantillons, mais ne varient pas dans les mêmes proportions. Il est donc plus commode de les normaliser par la biomasse, pour exprimer les résultats en productivité (µmol.L^{-1}.h^{-1}.(unité de biomasse)$^{-1}$).

3.1.2 Variabilité temporelle des activités photosynthétiques et respiratoire

Les activités photosynthétiques et respiratoires des cultures de *Planktothrix* ont été étudiées en fonction du temps, sur une échelle de temps courte, de l'ordre de la journée, et sur une échelle de temps plus longue, de l'ordre du mois.

3.1.2.1 Variabilité au cours de la phase lumineuse

La production et la respiration de la culture mère de *P. agardhii* ont été mesurées à 3 puis à 5 moments de la phase lumineuse. La culture mère a été échantillonnée à partir du contenu d'un tube falcon rempli au préalable de culture mère, puis à partir de l'erlenmeyer.

La Figure 17 présente les productivités nette et brute et la respiration de la culture de *P. agardhii* le 10/06/08 et le 12/06/08. Le 10/06/08, la respiration totale n'ayant pas été mesurée, la productivité brute est estimée à partir d'une moyenne de la respiration sur des mesures ultérieures de respiration totale (R_{totale} = -48 ± 10 µmol.L^{-1}.h^{-1}, n=6). Le 12/06/08, la respiration totale est mesurée dans la micro-chambre recouverte d'aluminium.

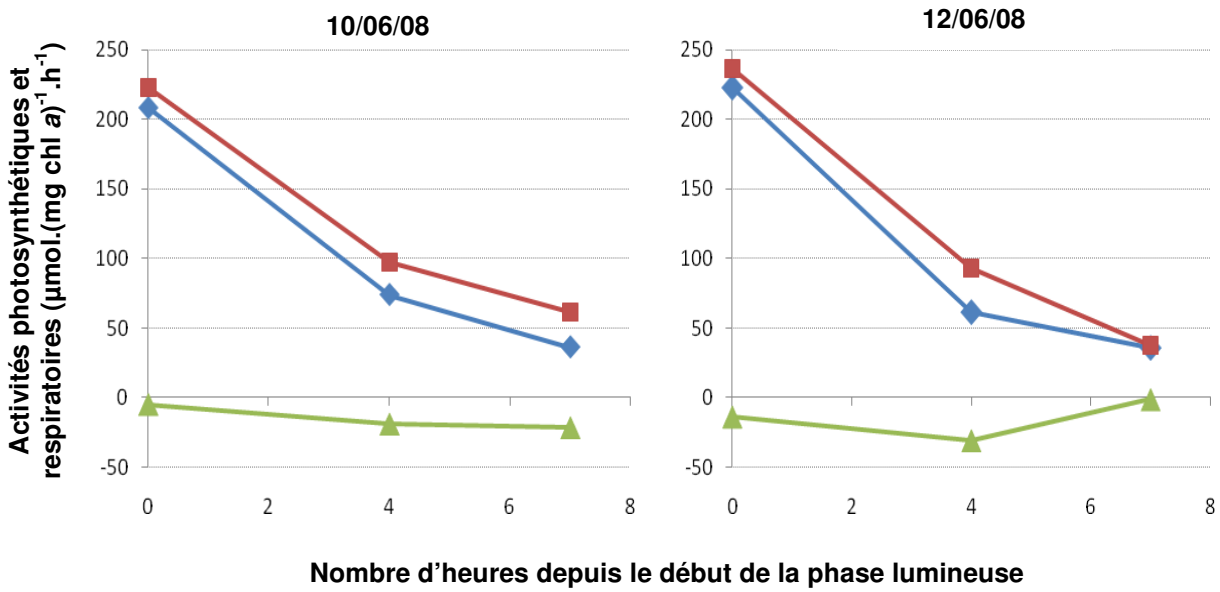


Figure 17 : Productivité nette (losange) productivité brute (carré) et respiration de la culture ($R_{totale} - R_{milieu}$; triangle) exprimées en µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} de la culture mère de *P. agardhii* conservée dans un tube falcon au cours de la phase lumineuse, le 10/06/08 (gauche) et le 12/06/08, soit 6 et 8 jours depuis le dernier repiquage.

Sur la Figure 17, on remarque une forte décroissance de la productivité au cours de la phase lumineuse pour les deux dates. En effet, le 10/06/08, la productivité nette décroit de 209 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} à 36 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} en 7 h, ce qui représente une diminution de 83% de la productivité nette. Et le 12/06/08, la productivité nette passe de 223 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} à 36 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} en 7 h, soit une diminution de 84%. La productivité brute suit les mêmes variations.
Une décroissance aussi importante en aussi peu de temps est inattendue et soulève des interrogations sur un biais méthodologique, lié au sous échantillonnage dans un tube falcon du début de la journée.

Pour tester l'effet du tube falcon, 4 mL de culture mère de *P. agardhii* sont prélevés à la flamme et introduits dans un tube de 15 mL, placé dans l'incubateur. La production en oxygène est mesurée après 5 h en parallèle sur des échantillons provenant de l'erlenmeyer et du tube falcon, sous forme de duplicats. La production nette est obtenue à partir de la moyenne des mesures de respiration sur le milieu de culture (avec R_{milieu} = -13 ± 6 µmol.L^{-1}.h^{-1}, n=33). D'après le Tableau 4, il y a 10 % de différence entre la moyenne de la productivité nette des duplicats de l'erlenmeyer et celle des duplicats du tube. Cette différence est faible et n'explique pas la forte décroissance observée le 10/06/08 et le 12/06/08.

Il apparait donc que c'est vraisemblablement la conservation d'un sous échantillon destiné aux expérimentations pour la journée qui est problématique. Pour s'affranchir de ce biais, les expériences ont été répétées en prélevant directement la culture mère dans l'erlenmeyer pour chaque mesure, toutes les 2 h depuis le début de la phase lumineuse.

	Erlenmeyer		Tube Falcon	
	chambre 1	chambre 2	chambre 3	chambre 4
P_n, µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}	137	136	128	116

Tableau 4 : Productivité nette de *P. agardhii* ramenée à la DO, issue de la culture mère conservée dans l'erlenmeyer (chambres 2 et 3) et de la culture mère conservée pendant 5 h dans un tube falcon de 15 mL (chambres 3 et 4), mesurées le 23/06/08 soit 5 jours après le repiquage de *P. agardhii*.

Les productivités nette et brute ainsi que la respiration de la culture ont été mesurées sur la culture mère, prélevée systématiquement de l'erlenmeyer, le 24/06/08, le 03/07/08 et le 18/07/08. Les résultats pour chaque journée de mesure sont rassemblés sur la Figure 18.

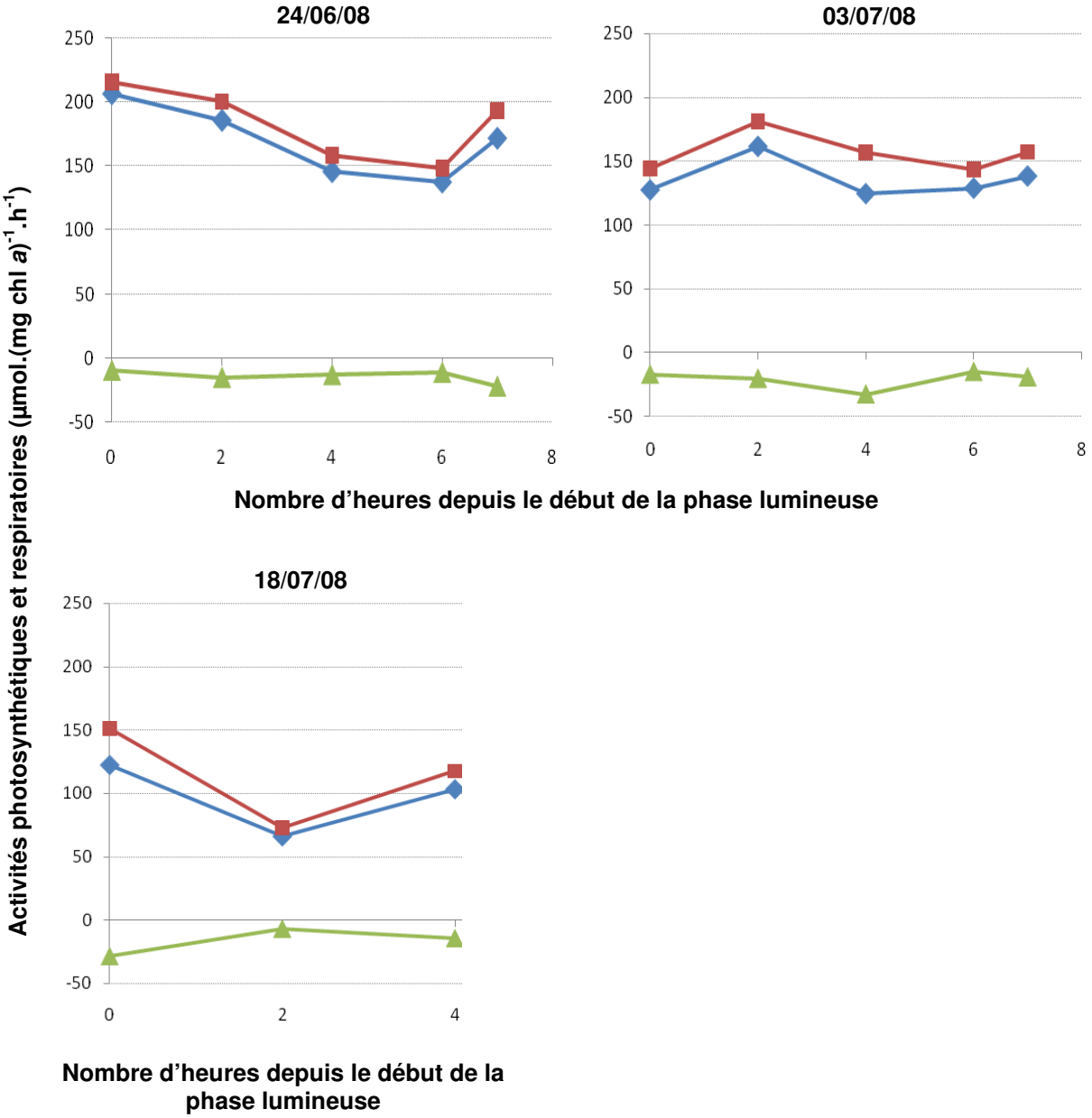


Figure 18 : Productivités nette (losange), brute (carré), et respiration de la culture (triangle) exprimées en µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}, mesurées le 24/06/08 (gauche haut), le 03/07/08 (droite haut) et le 18/07/08 (bas), soit 6 jours après le repiquage du 18/06/08 et 15 et 30 jours après le repiquage du 18/06/08, respectivement.

Les prélèvements à chaque moment de la phase lumineuse s'effectuent directement dans l'erlenmeyer contenant la culture mère.

Le 24/06/08, la productivité nette varie fortement, passant de 206 µmol.(mg de chl *a*) $^{-1}$.h^{-1} au début de la phase lumineuse, à 137 µmol.(mg chl *a*) $^{-1}$.h^{-1}, 6 h après. Cela représente une diminution de 33% de la productivité nette au cours de la phase lumineuse, ce qui va dans le sens des expérimentations du 10/06/08 et du 12/06/08.
Le 03/07/08, la productivité nette est de 161 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} 2 h après le passage de l'obscurité à la lumière, et elle diminue à 124 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} en 2 h (23% de décroissance).
Enfin, le 18/07/08, on passe d'une productivité nette culminant à 122 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} au début de la phase lumineuse, à 66 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} deux heures après (50% de diminution).
Les expérimentations en erlenmeyer n'ont jamais reproduit la même décroissance que celle observée le 24/06/08. En effet, les courbes de juillet n'affichent pas de décroissance de la productivité nette de la culture de *P. agardhii*. Les variations de la productivité sont plutôt erratiques au cours de la phase lumineuse.

Sur les deux derniers jours (Figure 18), la productivité brute n'a jamais présenté des valeurs aussi élevées que celles des premiers jours.
La productivité brute est maximale au début de la phase lumineuse pour les courbes de juin et du 18/07/08. Elle est du même ordre de grandeur pour les trois premières, comprise entre 222 µmol.(mg chl *a*) $^{-1}$.h^{-1} et 206 µmol.(mg chl *a*) $^{-1}$.h^{-1}. Elle diminue à 122 µmol.(mg chl *a*) $^{-1}$.h^{-1} au 18/07/08. Le 03/07/08, la productivité nette est maximale 2 h après le début de la phase lumineuse, avec une valeur de 161 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}, inférieure aux valeurs maximales des autres jours.

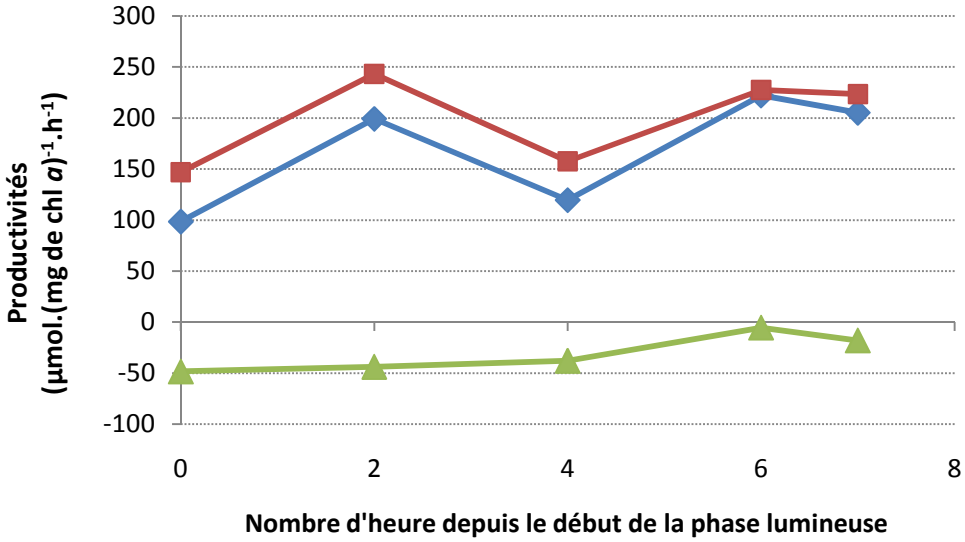


Figure 19 : Productivité nette (losange), productivité brute (carré) et respiration (triangle) de la culture mère de *P. rubescens* à différents moments de la phase lumineuse, le 24/07/08, soit 41 jours après le dernier repiquage. Les activités ont été ramenées à la concentration en chlorophylle *a*.

Sur les différentes courbes des activités photosynthétiques et respiratoire en fonction de la phase lumineuse, la respiration peut être considérée sinon constante, tout au moins faiblement variable au cours de la phase lumineuse : R_{totale} = -33 ± 13 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}, n=19.

La respiration totale a pu être mesurée à la fin de la phase d'obscurité, et ramenée à la concentration en chlorophylle *a* : R_{totale} = -39 ± 22 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}, n=4. Elle peut donc être considérée faiblement variable tout au long du cycle de 24 h.

De même que pour la culture de *P. agardhii*, les productivités nette et brute et la respiration de la culture mère de *P. rubescens* ont été déterminées au cours de la phase lumineuse (Figure 19). Les prélèvements ont été effectués directement depuis l'erlenmeyer.
Contrairement à *P. agardhii*, elles ne révèlent aucune tendance marquée sur la phase lumineuse : pas de décroissance de la productivité, mais des variations des productivités erratiques, avec notamment un maximum de productivité nette 6 h après le passage de l'obscurité à la lumière, à 222 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}.

3.1.2.2 Variabilité sur une longue période

Les activités photosynthétique et respiratoire de *P. agardhii* ont été suivies parallèlement tout au long de la croissance de la culture mère de *P. agardhii* sur un mois, du 18/06/08 (date de repiquage) au 18/07/08 (date du repiquage suivant).

Le suivi a porté sur la concentration cellulaire (mesures de DO), la production d'oxygène à la lumière, et la respiration à l'obscurité ainsi que dans le milieu de culture. La productivité nette est exprimée en µmol.(mg.chl *a*.L^{-1}).h^{-1}. La correspondance entre les concentrations cellulaires et en chl *a* peut être obtenue par les relations : 1 mg de chl *a*.L^{-1} = 8,7.10^{6} cellules.mL^{-1} de *P. agardhii* et 1 mg de chl *a*.L^{-1} = 3,0.10^{6} cellules.mL^{-1}. Les mesures ont été effectuées à heure fixe, afin de s'affranchir de la variabilité de la productivité sur la phase lumineuse.

La respiration de *P. agardhii*, la productivité nette et le nombre de cellules sont représentées en fonction des jours de croissance de la culture (Figure 20).
La courbe obtenue est typique d'une croissance exponentielle, avec une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire. La croissance et la biomasse évoluent de manière inversement corrélée, en deux temps, que l'on peut découper sur les périodes du 18/06/08 au 30/06/08 (phase exponentielle) et du 30/06/08 au 18/07/08 (phase de saturation).

Sur la première période, la biomasse augmente de 1,0 mg chl *a*.L^{-1} au deuxième jour des mesures à 2,1 mg chl *a*.L^{-1} sept jours après. La biomasse est donc doublée en une semaine. Inversement, la productivité nette de *P. agardhii* ne cesse de décroitre, passant de 226 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} à 139 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}. Elle a pratiquement diminué de moitié.
A noter que le 25/06/08, on observe une diminution de la concentration chlorophyllienne, associée à une augmentation de la productivité nette de *P. agardhii*. Cet accident n'enlève rien aux tendances observées mais suggère un stress, soit de la culture mère, soit de l'échantillon au moment du prélèvement.

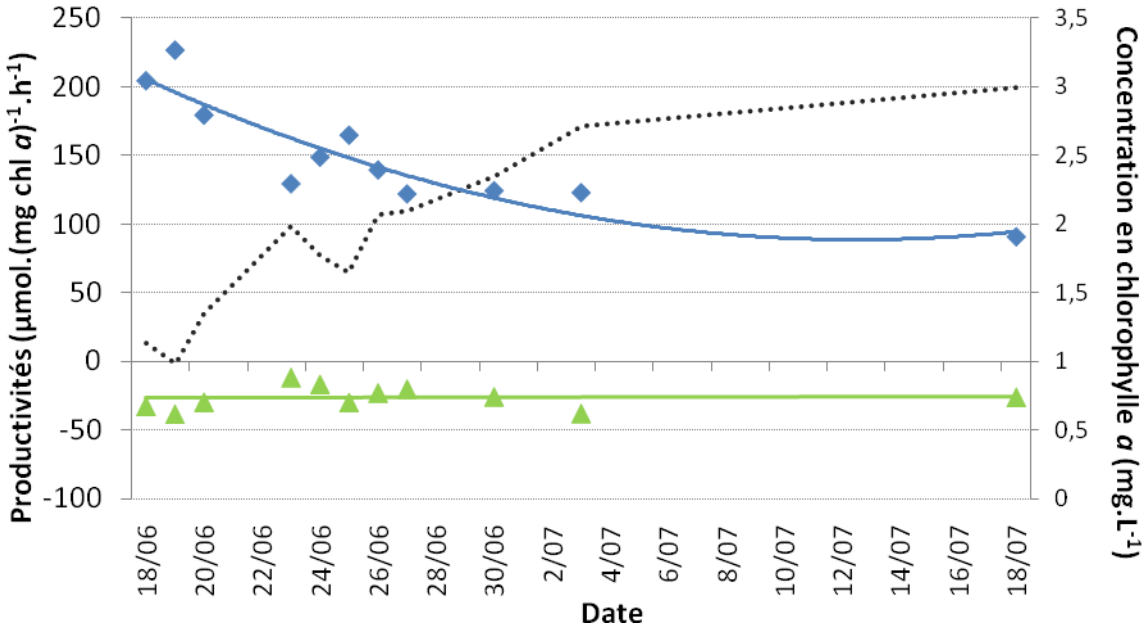


Figure 20 : Productivité nette de *P. agardhii* (losange), respiration de la culture de *P. agardhii* (triangle), et nombre de cellules estimées par mL (pointillés), sur un mois, du 18/06/08 au 18/07/08.

La deuxième période s'étend du 30/06/08 au 18/07/08. Les taux de croissance sont nettement plus faibles (de l'ordre de 0,3 mg chl *a*.L^{-1} en 15 jours). La biomasse atteint un maximum, 3,0 mg chl *a*.L^{-1}, tandis que la productivité nette de *P. agardhii* se stabilise autour de 91µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (n = 3). La phase « plateau » est atteinte, où la concentration de la culture sature.

Sur un mois, la productivité nette de *P. agardhii* diminue de moitié, jusqu'à atteindre une valeur de saturation.

En revanche, la respiration de *P. agardhii* reste globalement constante au cours du mois, avec une moyenne de -3 ± 1 µmol.(10^6 cellules)$^{-1}$.h^{-1} (n = 11).

3.1.3 Variation des activités photosynthétiques et respiratoires selon l'irradiance

Dans leur milieu naturel, *P. agardhii* et *P. rubescens* subissent des variations des conditions lumineuses importantes liées aux changements de l'irradiance incidente et à des changements de profondeur de plusieurs mètres, sous l'influence des seiches.
Pour étudier l'impact de ces variations sur la productivité, l'irradiance est changée sur des paliers de courte durée (10 à 15 min), à température constante.

Pour les deux souches, la production nette d'oxygène est ramenée à la concentration en chlorophylle *a*. Les mesures de la productivité nette en fonction de l'irradiance sont présentées sur la Figure 21 pour *P. agardhii* et sur la Figure 22 pour *P. rubescens*.
Les principales étapes des courbes P/I, rencontrées dans la littérature, sont identifiables sur celles obtenues pour *P. agardhii* et *P. rubescens*, avec la respiration, l'irradiance de compensation, l'irradiance de saturation, la productivité maximale et la photoihnibition.

A partir de ces mesures, les coefficients photosynthétiques, α, β, P_m et R, sont aisément déduits. Et ceux-ci permettent de tracer la courbe P/I dont l'équation est donnée par Walsby (2001) :

$$P = P_m (1 - \exp(-\alpha I/P_m)) + R + \beta I.$$

A l'irradiance nulle, la respiration de *P. rubescens* atteint -33 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}, alors que sur les expérimentations précédentes, elle était supérieure en valeur absolue (-50 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}). Pour *P. agardhii*, la respiration à I = 0 est de -22 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}.
La pente à l'origine, α, déterminée sur les trois mesures de *P. rubescens* à l'irradiance la plus faible, est de 6 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (µmol.m^{-2}.s^{-1}) $^{-1}$.
En extrapolant les trois mesures aux irradiances, 10 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 40 µmol.m^{-2}.s^{-1} et 60 µmol.m^{-2}.s^{-1}, la pente α de *P. agardhii* est de 3,5 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$. Elle est inférieure à celle de *P. rubescens*, qui est de 5,5 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$. Elle permet de déduire l'irradiance de compensation de la photosynthèse, à partir de laquelle la productivité devient positive. Elle apparait autour de 7 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour la culture de *P. rubescens* et de 6 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. agardhii*.
Le palier de saturation est atteint approximativement entre 75 et 90 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. rubescens*. Pour *P. agardhii*, la phase d'irradiance saturante peut être seulement estimée entre 60 et 100 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Et les valeurs maximales de la productivité nette atteinte par *P. rubescens* et *P. agardhii* à l'irradiance de saturation sont de 241 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} et 370 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} respectivement.

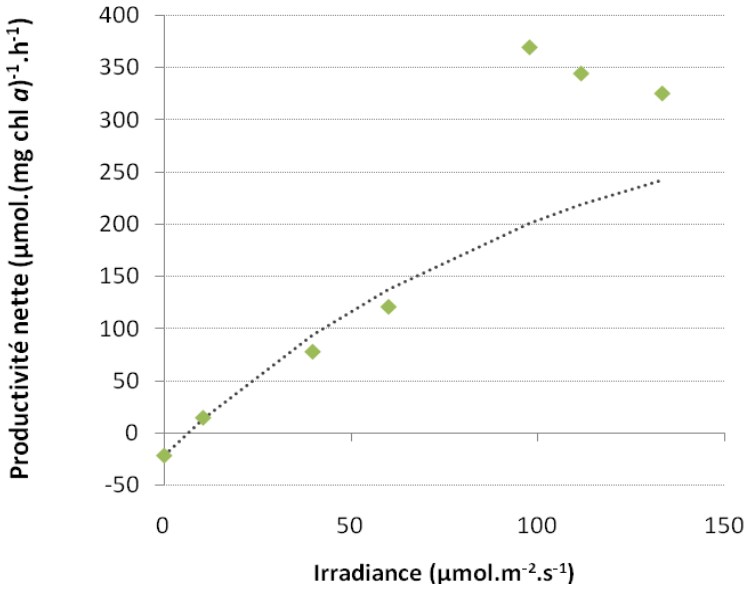


Figure 21 : Mesures de la productivité nette de *P. agardhii* à 20°C entre 0 et 130 µmol.m^{-2}.s^{-1} (losange), et la courbe P/I, obtenue à partir de l'équation de Walsby (2001) : $P = P_m (1 - \exp(-\alpha I/P_m)) + R$, avec les coefficients photosynthétiques (α et P_m) déterminés expérimentalement (pointillés).

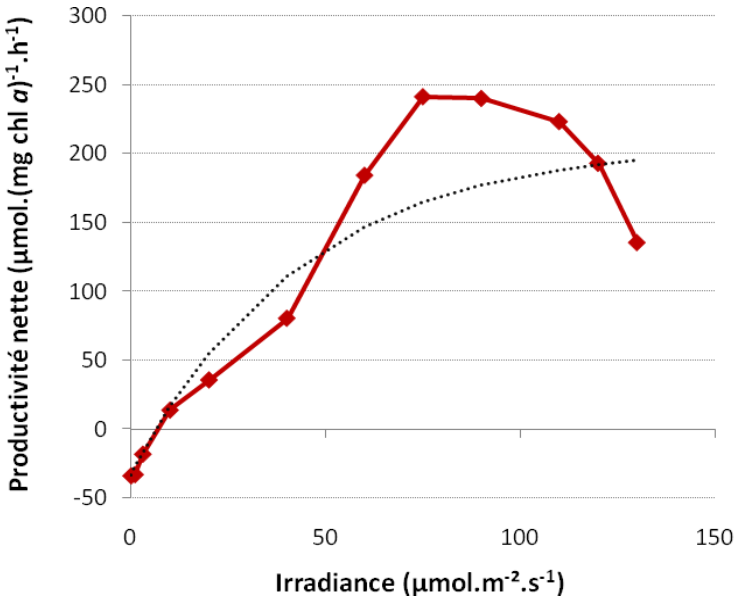


Figure 22 : Mesures de la productivité nette de *P. rubescens* à 20°C entre 0 et 130 µmol.m^{-2}.s^{-1} (losange), et la courbe P/I établie à partir de l'équation de Walsby (2001) (pointillés).

La photo inhibition pour *P. rubescens* est très forte, avec une pente β = -4 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$, déterminée sur les 3 points aux irradiances les plus élevées. Pour *P. agardhii*, la photo inhibition est nettement moins marquée, avec une pente β = -0,9 µmol.mg^{-1}.h^{-1}.(µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$, déterminée sur les deux derniers points aux irradiances les plus élevées.

Paradoxalement, pour obtenir une courbe P/I à partir de l'équation de Walsby correspondant le mieux aux valeurs expérimentales, la photo inhibition n'est pas prise en compte. On remarque, en particulier pour *P. agardhii*, que les courbes du modèle de Walsby ne représentent pas ou très mal la dynamique observée.
Et pour les deux cultures (Figure 21), l'ajustement de Walsby ne passe pas par tous les points de mesure. L'absence de photo inhibition renforce l'irradiance de saturation : elle est de 100 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. agardhii* environ pour les données expérimentales, et elle est supérieure à 130 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour la courbe d'ajustement. La productivité nette maximale mesurée à l'irradiance saturante (100 µmol.m^{-2}.s^{-1}) est sous-estimée de 45% par la courbe d'ajustement.
Pour *P. rubescens*, la courbe P/I est ajustée sur les premières mesures (Figure 22).

En conditions de stress lumineux, les réponses de la productivité en fonction de l'intensité lumineuse vont dans le sens attendu. Néanmoins, la dynamique observée ne peut être ajustée de manière satisfaisante par les modèles classiques de courbe P/I.

3.2 Expérimentations sur les communautés algales d'Enghien-les-Bains et du Bourget

3.2.1 Incubations *ex situ* sur la communauté algale d'Enghien-les-Bains

Les mesures des activités photosynthétiques et respiratoire ont été effectuées à 2 reprises sur la communauté phytoplanctonique d'Enghien-les-Bains, par des incubations *ex situ* sur des

échantillons naturels. Le 25/06/08, la concentration en chlorophylle *a* était de 104,4 ± 0,3 µg.L^{-1} et le 23/07/08, elle était de 47,5 ± 4,2 µg.L^{-1}.

Sur l'échantillon du 25/06/08, la production nette et la respiration communautaire étaient de 14 et -34 µmol.L^{-1}.h^{-1} respectivement. Ramenée à la concentration chlorophyllienne, la productivité nette de la communauté phytoplanctonique ce jour là est de 138 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} et la respiration communautaire est de -328 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (Tableau 5). Le 23/07/08, la production nette est de 17 µmol.L^{-1}.h^{-1}. La respiration communautaire est de -10 µmol.L^{-1}.h^{-1}. Le doublement de la productivité nette entre les deux dates est essentiellement du à une importante diminution (en valeur absolue) de la respiration communautaire (Tableau 5).

Date	Productivité nette (µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1})	Productivité brute (µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1})	R_{totale} (µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1})	Concentration en chl *a* (µg.L^{-1})
25/06/08	138	466	-328	104,4 ± 0,3
23/07/08	349	553	-205	47,5 ± 4,2

Tableau 5 : Productivités de la communauté phytoplanctonique prélevée à Enghien-les-Bains le 25/06/08 et le 23/07/08.

3.2.2 Incubations *in situ* sur la communauté algale du Bourget

Les incubations ont eu lieu à 13 m de profondeur au lac du Bourget le 10 juillet 2008, en pleine période de bloom algal. L'oxygène ne pouvant pas être repéré de manière aussi rapide, c'est le pic de biomasse qui est localisé promptement par la sonde fluorimétrique (BBE) à 14,5 m.
Les prélèvements sont immédiatement lancés, et les flacons Wheaton, une fois remplis, sont plongés pour 5 h.
Le Tableau 6 présente les moyennes des concentrations en oxygène mesurées sur un triplicat par la méthode Winkler, et les productions en oxygène déduites.

Profondeur de la mesure (m)		13
t_0	**Moyenne [O_2] (µmol.L^{-1})**	**225**
	Écart-type (µmol.L^{-1})	3
	Coefficient variation (%)	1,1
t_0 + 5h LUM	**Moyenne [O_2] (µmol.L^{-1})**	**246**
	Écart-type (µmol.L^{-1})	5
	Coefficient variation (%)	2,0
t_0 + 5h OBSC	**Moyenne [O_2] (µmol.L^{-1})**	**223**
	Écart-type (µmol.L^{-1})	1
	Coefficient variation (%)	0,5
Production nette (µmol.L^{-1}.h^{-1})		**4,3**
Respiration (µmol.L^{-1}.h^{-1})		**-0,3**
Production brute (µmol.L^{-1}.h^{-1})		**4,6**

Tableau 6 : Résultats de l'incubation *in situ* le 10 juillet 2008 au lac du Bourget, 1,5 m au dessus de la profondeur du maximum de fluorescence. Le coefficient de variation (en %) est le rapport de l'écart-type sur la moyenne de la concentration en O_2 des triplicats.

A t_0, avant l'incubation, la concentration à 13 m de profondeur est de 225 µmol.L^{-1} d'O_2.
Après 5 h d'incubation à la lumière, la concentration a augmenté de 4,3 µmol.L^{-1}.h^{-1}, ce qui correspond à la production nette.
A l'obscurité, la concentration est de 223 µmol.L^{-1}. La respiration est donc de 0,3 µmol.L^{-1}.h^{-1}. La production brute déduite est de 4,6 µmol.L^{-1}.h^{-1}.

3.3 Discussion

3.3.1 Relations entre la DO, la concentration chlorophyllienne et la concentration cellulaire

Les courbes de calibration DO/chl a et DO/nombre de cellules sont linéaires sur un intervalle de concentration compris entre 6.10^5 cellules.mL^{-1} et $7{,}5.10^6$ cellules.mL^{-1} pour *P. agardhii* et entre $2{,}5.10^6$ cellules.mL^{-1} et $8{,}0.10^6$ cellules.mL^{-1} pour *P. rubescens*. Cela correspond à une plage de concentration chlorophyllienne comprise entre 80 µg.L^{-1} et 800 µg.L^{-1} pour *P. agardhii* et entre 500 µg.L^{-1} et 2,6 mg.L^{-1} pour *P. rubescens*.

Ces courbes ont permis d'établir des relations préliminaires entre les différents paramètres d'estimation de la biomasse, jusque là non renseignées dans la littérature. L'intérêt est de disposer d'un outil simple pour quantifier en routine la concentration. Elle est estimée à partir des relations : 1 unité de DO = $2{,}6.10^7$ cellules.mL^{-1} pour *P. agardhii* et 1 unité de DO = $1{,}6.10^7$ cellules.mL^{-1} pour *P. rubescens*. Nos résultats sur *P.agardhii* sont en accord avec la relation 1 unité de DO = $2{,}1.10^7$ cellules.mL^{-1} établie au MNHN par E. Briand (C. Quiblier, com.pers., n=45). En outre, E. Briand a vérifié la linéarité de la relation sur un intervalle de DO plus important puisqu'il couvrait une gamme allant de 0 à 0.8. Nous avons donc considéré nos relations valides sur le même intervalle.

D'autre part, les courbes de calibration ont permis de déterminer le ratio de la concentration en chl *a* sur le nombre de cellules par mL, pour chacune des espèces. Pour *P. rubescens*, ce ratio est de 0,3 mg de chl *a*.L^{-1}.(10^6 cellules.mL^{-1})$^{-1}$ et pour *P. agardhii*, il est de 0,1 mg de chl *a*.L^{-1}.(10^6 cellules.mL^{-1})$^{-1}$. On constate donc que *P. rubescens* est trois fois plus riche en chlorophylle *a* que *P. agardhii*. *P. rubescens* est une espèce adaptée aux plus faibles éclairements, son contenu pigmentaire doit donc lui permettre de capter un maximum d'irradiance pour assurer la photosynthèse.

La production et la respiration ont montré une évolution linéaire en fonction de la biomasse. Cette vérification était fondamentale pour l'exploitation des résultats des expériences sur des biomasses variables au cours du temps.

3.3.2 Variabilité de la productivité au cours du temps

D'un point de vue méthodologique, nos expériences ont montré à quel point les cultures étaient sensibles à la manipulation, au sous échantillonnage et aux conditions de stockage. Les premiers résultats obtenus au cours des expériences sur la variabilité de la productivité de *P. agardhii* au cours d'un cycle lumineux en sont illustratifs. En utilisant un tube falcon pour le stockage d'un aliquot de volume suffisant pour les expériences de la journée, la productivité a diminué de 80% en 7 h. Alors que l'échantillonnage directement à partir de l'erlenmeyer, n'a

pas reproduit une décroissance aussi importante de la productivité. C'est donc en prélevant directement sur l'erlenmeyer contenant la culture mère, procédure beaucoup plus contraignante, que nous avons procédé pour la suite des expériences.

D'un point de vue écophysiologique, plusieurs résultats sur *P. agardhii* ont leur importance : (1) un maximum de productivité est constaté au début de la phase lumineuse ; (2) une variabilité de la productivité est observée au cours de la phase lumineuse, avec des expérimentations non reproductibles. Une décroissance de la productivité nette de 30 % a été obtenue sur les 7 premières heures de la phase lumineuse pendant la phase de croissance exponentielle de la culture, alors que des variations erratiques ont été observées pendant la phase de saturation de la culture. En dehors de cette observation de dynamiques différentes selon le stade de la culture et qui reste à confirmer, aucune tendance généralisée de la variabilité de la productivité ne se dégage des résultats. (3) le maximum de productivité diminue au cours du temps entre les deux repiquages de la culture de *P. agardhii*.
Pour *P. rubescens*, une seule mesure de la variation des activités photosynthétique et respiratoire a été effectuée sur la phase lumineuse (Figure 19). Elle aussi montre des variations erratiques de la productivité en quelques heures. L'absence de données sur la variabilité de la croissance de la culture ne permet pas d'étudier plus en détail ces résultats préliminaires sur *P. rubescens*.
A l'échelle du mois, la productivité nette et la croissance de *P. agardhii* présentent de fortes variations et des évolutions inverses. En 15 jours, la productivité diminue de moitié et la concentration en chlorophylle *a* est doublée. Sur le mois, la concentration de *P. agardhii* est triplée, en augmentant de 1 mg chl *a*.L^{-1} à 3 mg de chl *a*.L^{-1}.
A la différence de la productivité photosynthétique, la respiration (normalisée par la biomasse) a montré, au moins pour *P.agardhii*, une très grande stabilité dans le temps, aussi bien à l'échelle de la journée (au cours du cycle lumineux ou en fin de période obscure) que du mois.

3.3.3 Variabilité de la productivité en condition de stress lumineux

Ces expériences ont été les plus délicates à mener, d'un point de vue logistique et d'un point de vue méthodologique.

L'aspect logistique a été compliqué par les mesures de l'irradiance. Dans le phytotron, l'éclairage a eu du mal à se stabiliser pour des faibles valeurs de l'intensité lumineuse. Il est possible que la correspondance établie entre les mesures de l'intensité lumineuse incidente et l'intensité réelle ne soit pas linéaire. Elle reste incertaine à cause de l'incertitude sur le facteur de conversion, due à l'indisponibilité de la sonde sphérique.
En ce qui concerne la définition des conditions d'expérience, les schémas d'expérimentation de la littérature sont divers et imprécis. Ils ne fournissent pas d'information sur la durée de la manipulation. La durée des mesures a donc été restreinte de manière à limiter l'impact de la variabilité des activités photosynthétique et respiratoire sur le court terme. L'effet de cette variabilité sur la variabilité des activités métaboliques au cours du stress lumineux reste à déterminer.

D'un point de vue écophysiologique, les courbes P/I obtenues pour *P. agardhii* et *P. rubescens* en condition de stress lumineux présentent de manière similaire aux courbes P/I de la littérature les grandes tendances ; à savoir une irradiance de compensation faible, une augmentation de la productivité pour une irradiance croissante jusqu'à saturation, et enfin une

phase de photo inhibition. Elles se différencient néanmoins par la valeur des coefficients photosynthétiques, comme β et P_m qui se retrouvent amplifiés par rapport aux résultats de la littérature.

- La pente α de *P. agardhii*, de 3,5 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}.(µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$, est très proche de celle de *P. rubescens*, qui est de 5,5 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}.(µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$. Il existe peu de données comparatives sur les coefficients photosynthétiques dans la littérature, du fait de la diversité des unités employées pour exprimer la productivité.

Kromkamp et al (2001) ont établi plusieurs courbes P/I sur des échantillons d'eau du lac de Zürich, contenant des filaments de *P. rubescens*. Des bouteilles ont été incubées à différentes heures de la journée sur des durées variables. Kromkamp et al (2001) n'ont pas observé de photo inhibition et n'ont pas inclus le terme de respiration. Les courbes P/I ont donc été établies simplement à partir de l'équation : $P = P_m(1-\exp(-\alpha I/P_m))$. Les coefficients photosynthétiques obtenus par Kromkamp et al (2001) ont permis de retranscrire les courbes P/I dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**.

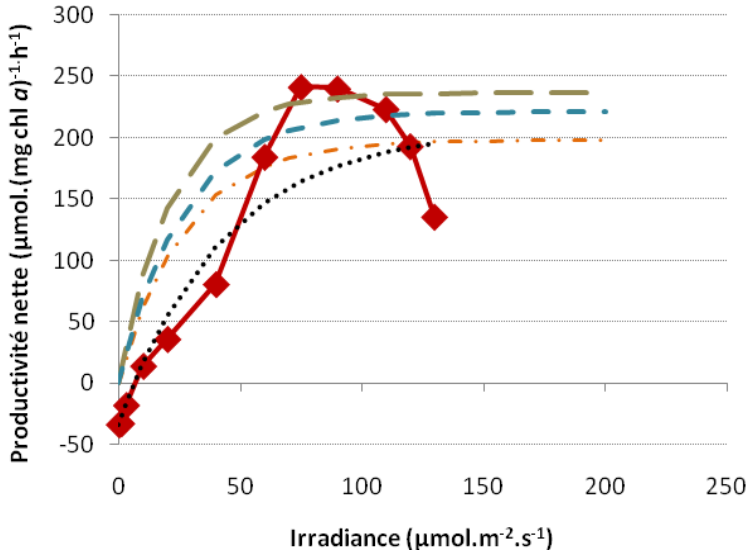


Figure 23 : Courbes P/I obtenues à partir des mesures des coefficients photosynthétiques par Kromkamp et al (2001), sur des échantillons d'eau du lac de Zürich contenant *P. rubescens*, en fonction de l'irradiance. La productivité nette est rapportée à la concentration en chlorophylle *a* des échantillons. Echantillons remontés à 10 h 30 (points-tirets), à 14 h 30 (grands tirets) et à 16 h 30 (petits tirets). Culture de *P. rubescens* (losange) et courbe d'ajustement de Walsby (2001) (pointillés).

La pente α varie en fonction des heures de la journée, entre 6,7 et 10,9 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (µmol.m^{-2}.s^{-1})$^{-1}$. Elle est très proche de la valeur obtenue pour la culture de *P. rubescens*.

- Pour *P. rubescens*, la productivité nette est positive à partir de 7 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Pour la culture de *P. agardhii*, elle est positive à partir de 6 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Bien que supérieures, ces deux valeurs sont assez proches de celles de la littérature. Ainsi, à 20°C, l'irradiance de compensation a été estimée par Davis et Walsby (2002) à 0,8 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. rubescens* et à 1,3 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. agardhii*. D'autres articles font état d'une irradiance de compensation inférieure à 2 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour les deux espèces (Vaughan et al, 2001 ; Walsby, 2001 ; Walsby et al, 2001 ; Davis et Walsby, 2002). Cela reste proche des irradiances déterminées pour *P. agardhii* et *P. rubescens*.

La différence entre les valeurs mesurées et celles de la littérature peut être due aux conditions d'expérimentation. Les souches utilisées ne sont pas les mêmes que celles des articles. Et les

courbes P/I ont été établies sous un stress lumineux, contrairement à celles de la littérature, supposées établies sur des cultures acclimatées.

- L'irradiance de saturation a été atteinte entre 75 et 90 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. rubescens* et *P. agardhii* (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** et Figure 21). Pour *P. rubescens*, ces mesures sont en accord avec les valeurs obtenues par d'autres auteurs, si l'on considère la variabilité des résultats publiés dans la littérature et non expliqués : 100 µmol.m^{-2}.s^{-1} atteints par Walsby (2001) et Davis et Walsby (2002) (Figure 5 et **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) à 20°C, 120 µmol.m^{-2}.s^{-1} atteints par Vaughan et al (2001), voire 200 µmol.m^{-2}.s^{-1} obtenus pour Bright et Walsby (2000) à 20°C et Walsby et al (2001). On remarquera également que l'irradiance saturante et la productivité correspondante de *P. rubescens* obtenus dans ce travail sont de même ordre que celles mesurées par Kromkamp et al (2001). Une différence de 12 % est observée entre la moyenne de la productivité nette maximale déterminée par Kromkamp et al (2001) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) et la productivité nette maximale de la culture mère de *P. rubescens* (241 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}).

Pour *P. agardhii*, la productivité nette maximale est supérieure à celle mesurée pour *P.rubescens* et atteint 370 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} à 90 µmol.m^{-2}.s^{-1}. L'accroissement de la productivité de l'irradiance de compensation jusqu'à l'irradiance de saturation n'est absolument pas linéaire et l'on observe une augmentation de plus de 200% entre 60 et 90 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Ce saut de la productivité pour un seuil d'éclairement n'a pas d'équivalent connu dans la littérature et reste inexpliqué, compte tenu du peu de données concernant les courbes P/I de *P. agardhii*.

- A partir de 90 µmol.m^{-2}.s^{-1}, la productivité nette d'oxygène de *P. rubescens* est fortement inhibée. Alors que dans la littérature, la photo inhibition de l'activité photosynthétique est très peu marquée à des irradiances supérieures, de 200 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Walsby, 2001 ; Vaughan et al, 2001) voire absente même au delà de 400 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Bright et Walsby, 2001). Elle représente au maximum 9,5 % du maximum de productivité nette pour Vaughan et al (2001), ce qui est très faible en comparaison de la photo inhibition estimée pour la culture de *P. rubescens* dans le cas présent.

D'autres travaux plus récents (Oberhaus et al, 2007) basés sur l'étude non pas de la productivité en O_2, mais de la croissance des monocultures de *P. agardhii* et *P. rubescens* ont également mis en évidence une photo inhibition à 15°C et 25°C. A 25°C, la photo inhibition est beaucoup plus marquée qu'à 15°C pour *P. rubescens* : pour des irradiances entre 60 et 120 µmol.m^{-2}.s^{-1}, elle représente une diminution de 25 % de la croissance journalière maximale atteinte. Cette décroissance est néanmoins toujours inférieure à la diminution de 46 % de la productivité nette de *P. rubescens* observée dans notre travail entre 80 et 130 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Pour la culture de *P. agardhii*, Oberhaus et al (2007) n'observent aucune photo inhibition, à 15°C ou à 25°C.
La productivité nette de *P. rubescens* est plus inhibée que celle de *P. agardhii* entre 60 et 130 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Pour *P. agardhii*, comme dans Oberhaus et al (2007), la photo inhibition est beaucoup moins marquée, ce qui est cohérent avec le développement de cette espèce sous de fortes irradiances dans le milieu naturel. Et bien qu'elle soit très marquée, la photo inhibition de *P. rubescens* dans cet intervalle d'intensité lumineuse n'est pas incohérente avec les observations de *P. rubescens* dans le milieu naturel. En effet, la croissance de *P. rubescens* est optimale pour les faibles irradiances (inférieures à 50 µmol.m^{-2}.s^{-1}). Inversement, *P. agardhii* se développe dans des eaux où l'irradiance est plus importante (Oberhaus et al, 2007).

Ces observations, et le fait que l'équation de Walsby (2001) s'ajuste mal aux courbes P/I de *P. agardhii* et *P. rubescens*, résultent très vraisemblablement des conditions d'expérimentations choisies dans notre travail, et qui diffèrent de celles choisies pour les autres travaux. En effet, bien que peu d'informations soient données sur les conditions précises de mesures, on peut supposer que la production (nette ou brute) est déterminée sur des cultures acclimatées aux différentes intensités lumineuses testées (C. Quiblier, com.pers.). Les mesures P/I de *P. agardhii* et *P. rubescens* ont été obtenues dans des conditions de stress lumineux, et montrent des différences notables avec les précédents résultats de la littérature. Elles nous semblent plus adaptées pour étudier l'influence de brusques variations lumineuses sur la productivité des cyanobactéries même si de nouveaux ajustements sont à développer pour suivre les points expérimentaux. De plus, il faut évoquer la variabilité des souches rencontrées dans la littérature avec celles de l'expérience de stress lumineux. Enfin, Vaughan et al (2001) indiquent que les coefficients photosynthétiques décrivant la relation P/I sont considérés constants sur la journée. Alors que la photosynthèse est reconnue pour varier selon les heures de la journée, il semble plus pertinent de déterminer une courbe P/I à chaque moment de la journée, et non de faire la moyenne des coefficients pour obtenir une seule courbe, comme c'est le cas de Micheletti et al (1998), où les coefficients photosynthétiques sont déterminés à partir de duplicat ou de triplicat de courbes P/I.

Etablir les courbes P/I est une expérimentation complexe par le manque d'informations fournies sur ce sujet, par la diversité des paramètres à prendre en compte (exactitude de l'irradiance, origine des souches) et des conditions à tester. Les courbes obtenues pour *P. agardhii* et *P. rubescens* en condition de stress lumineux présentent bien les grandes tendances d'une courbe P/I, et l'on retrouve d'ailleurs les mêmes ordres de grandeurs pour l'irradiance de compensation et l'irradiation saturante. La photo inhibition est plus importante pour *P. rubescens* que pour *P. agardhii*, et dans les 2 cas, supérieure à celle publiée dans la littérature. Par ailleurs, les courbes P/I obtenues dans le cas présent sont représentatives d'une situation à un instant donné de la phase lumineuse et de la croissance de la culture. Malgré ces difficultés et ces limites, ces premières expérimentations nous apparaissent informatives et prometteuses pour une approche plus réaliste des activités métaboliques des communautés *in situ*.

3.3.4 Expérimentations sur les communautés phytoplanctoniques

Les expérimentations effectuées sur les communautés naturelles d'Enghien-les-Bains et du lac du Bourget, même en nombre limitées, ont permis d'apporter de nouvelles informations sur le fonctionnement de ces écosystèmes contrastés.
Les mesures de micro-respiration sur la communauté algale d'Enghien-les-Bains ont tout d'abord mis en évidence une très forte respiration et une productivité nette faible, néanmoins positive. La productivité brute de la communauté naturelle a varié de 466 à 553 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}. Ces valeurs sont très largement supérieures à la productivité brute de la culture, dont la valeur maximale mesurée dans les mêmes conditions a été de 237 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} (le 12/06/08). Si l'on se base sur cette valeur maximale, la productivité brute relative à *P. agardhii* dans le lac correspond à 51% (le 25/06/08) et 43% (le 23/07/08) de la productivité brute communautaire. C'est là une information, confirmée par des comptages périodiques (N. Escoffier, com. pers.), qu'en période de bloom estival la communauté est constituée de *P. agardhii* ainsi que d'autres espèces phytoplanctoniques. On a ainsi une indication indirecte qu'à quantité de chlorophylle *a* comparable, la productivité de ces espèces « accompagnatrices » est supérieure d'au moins un facteur 2 à celle de *P. agardhii*.

Dans ce plan d'eau de faible profondeur (< 2 m en moyenne), la colonne d'eau est mélangée et la distribution de la communauté planctonique est considérée homogène. Les enregistrements en semi-continu d'O_2 effectués à 1 m de profondeur dans le cadre du projet de recherche Proliphyc mettent en évidence de larges variations nycthémérales de l'O_2, de l'ordre de 100 à 200 µmol.L^{-1} (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). La concentration en oxygène varie en fonction des cycles jour nuit, avec un accroissement tout au long de la journée et une diminution au cours de la nuit. Les valeurs de production et respiration mesurées *ex situ* sont de nature à expliquer ces variations. En effet, le 25/06/08, la production nette d'oxygène de la communauté est de 14 µmol.L^{-1}.h^{-1}, alors que l'accroissement enregistré au lac sur la journée du 25/06/08, avec une augmentation de la concentration en oxygène de 280 µmol.L^{-1} à 450 µmol.L^{-1} en 8 h, est de l'ordre de 22 µmol.L^{-1}.h^{-1}.

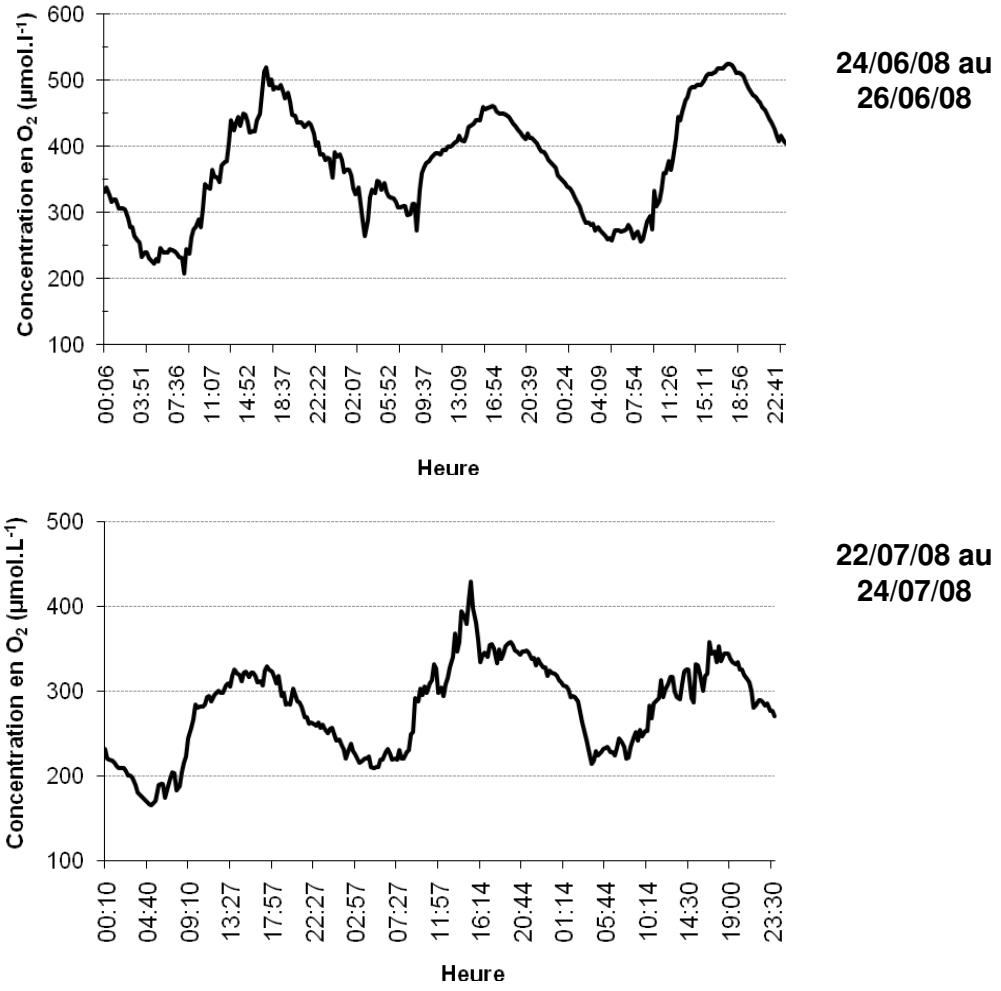


Figure 24 : Mesures de la concentration en oxygène à 1 m de profondeur par une optode Anderaa le 25/06/08 (haut) et le 23/07/08 (bas) au lac d'Enghien-les-Bains.

Dans le lac du Bourget, une quantification précise de la concentration en chlorophylle *a* n'a malheureusement pas pu être effectuée en parallèle aux incubations. D'après les profils verticaux effectués avec la sonde fluorimétrique environ 1 h avant l'incubation, la concentration en chlorophylle *a* au niveau de prélèvement peut être estimée entre 20 µg.L^{-1} et 40 µg.L^{-1}. La productivité brute est donc comprise entre 232 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} et 116 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1} respectivement. La valeur de la productivité brute mesurée dans le milieu naturel est très proche des valeurs de productivité brute estimée sur la culture de *P.*

rubescens, comprises entre 150 et 250 µmol.(mg chl *a*)$^{-1}$.h^{-1}. La correspondance entre ces valeurs obtenues pour des conditions environnementales (température, irradiance) différentes est peut être fortuite. Elle nous interpelle néanmoins sachant que le bloom estival au lac du Bourget est quasi mono-spécifique (G. Paolini, com. pers.).

A la différence d'Enghien-les-Bains, on observe de faibles valeurs de respiration. Les rapports P_b/R sont en effet très différents, indiquant de profondes différences dans la structure et le fonctionnement des communautés planctoniques de ces deux écosystèmes.
Par ailleurs, la production nette d'oxygène dans le lac du Bourget est de 4,3 µmol.L^{-1}.h^{-1}.Cette production est locale, associée au maximum profond de chlorophylle *a*. Les processus de mélange et de diffusion turbulente qui régissent la distribution de l'O_2 sont trop complexes pour permettre une mise en relation directe des taux de production *in situ* avec la distribution de l'O_2, mais c'est un axe de recherche qui reste à poursuivre.

Conclusion

Les résultats présentés dans ce mémoire sont des études préliminaires sur la photosynthèse et la respiration de monocultures de *P. agardhii* et *P. rubescens*, qui occupent des niches écologiques différentes.

Le dispositif de micro-respiration répond pleinement aux attentes. Il permet de quantifier de manière instantanée la production et la respiration de petits échantillons de *P. agardhii* et *P. rubescens*.

Dans un premier temps, les relations entre les différents paramètres estimateurs de la biomasse, à savoir la concentration en chlorophylle *a*, le nombre de cellules et la DO, ont été établies pour *P. rubescens* et *P. agardhii*. Elles sont différentes pour les deux espèces, qui présentent par ailleurs des cellules de taille comparable (4 µm). Pour *P. agardhii*, 1 mg de chl *a* = $8{,}7.10^6$ cellules.mL^{-1} et pour *P. rubescens* : 1 mg de chl *a* = $3{,}0.10^6$ cellules.mL^{-1}. *P. rubescens* contient 3 fois plus de chlorophylle *a* que *P. agardhii*.

La relation de la production et de la respiration en fonction de la biomasse est linéaire à un instant donné du cycle de croissance, ce qui permet d'exprimer les activités photosynthétique et respiratoire sous forme de productivité (production ramenée à la concentration en chlorophylle *a*), quelque soit la concentration de la culture.

La variabilité de la productivité a été étudiée à différentes échelles de temps. Sur la journée, les productivités nette et brute sont très variables pour *P. agardhii* et *P. rubescens*. La productivité nette en oxygène est maximale au début de la phase lumineuse. L'évolution de la productivité au cours de la phase lumineuse est très variable, et il n'y a pas de tendance marquée. La productivité maximale diminue au cours du temps. Et à l'échelle du mois, la productivité de *P. agardhii* est inversement corrélée à la croissance. La culture double sa concentration en 15 jours, en passant de 1 mg chl *a*.L^{-1} à 2 mg chl *a*.L^{-1}, et sa productivité nette est diminuée de plus de la moitié, de 226 à 91 µmol.(mg chl *a*).L^{-1}.h^{-1}. En revanche, la respiration des cultures reste constante sur l'ensemble des expérimentations effectuées au cours de la phase lumineuse et de la phase d'obscurité, comme à l'échelle du mois.

En ce qui concerne l'évolution de la productivité en condition de stress lumineux, les courbes P/I établies dans ce travail, partagent des caractéristiques communes avec les courbes P/I établies dans la littérature. Ainsi, pour les faibles valeurs d'irradiance, la pente à l'origine et l'irradiance saturante sont du même ordre de grandeur que celles relevées dans les articles. La pente est comprise entre 6 et 7 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour *P. agardhii* et *P. rubescens*. L'irradiance saturante apparait entre 75 et 90 µmol.m^{-2}.s^{-1} pour les deux cultures. Par contre, pour les irradiances plus élevées, la productivité nette maximale est de 240 et 350 µmol.(mg chl *a*).L^{-1}.h^{-1} pour *P. rubescens* et *P. agardhii* respectivement. La photo inhibition des deux espèces est également beaucoup plus marquée que dans la littérature. Les différences peuvent s'expliquer par les conditions d'expérimentation des courbes P/I de la littérature, pour lesquelles les cultures ont probablement été acclimatées.

La comparaison entre la productivité brute des monocultures et la productivité brute communautaire permet d'étudier la contribution de *Planktothrix* par rapport à la communauté algale dans les lacs. Elle traduit par ailleurs les différences environnementales entre les deux espèces et les mécanismes influençant la photosynthèse. *P. rubescens* est une espèce mono-spécifique, distribuée sur un intervalle de profondeur réduit. *P. agardhii* subit de manière continue le brassage, elle est homogène sur la colonne d'eau.

Ces premiers résultats portant sur la micro-respiration de monocultures de *P. rubescens* et *P. agardhii* sont très encourageants. En perspective, certains points doivent être approfondis par de nouvelles expérimentations :

- les correspondances entre les différents paramètres estimateurs de la biomasse doivent être étudiées dans la gamme des basses concentrations (de 10 à 200 µg chl *a*.L^{-1}) afin de s'approcher des teneurs présentes dans les milieux naturels ;
- les expérimentations de type stress lumineux doivent être poursuivies à différents moments de la phase lumineuse et/ou du cycle de croissance, afin d'obtenir des coefficients photosynthétiques plus représentatifs de la variabilité sur la journée et à l'échelle du mois. Les courbes P/I obtenues dans le cadre de ce travail sont significativement différentes de celles présentes dans la littérature. Il est essentiel d'identifier les raisons de cet écart : cela peut être du soit aux conditions de stress lumineux qui n'ont pas été explorées jusqu'alors, soit à la nouvelle méthodologie employée qui augmente la précision des mesures.
- enfin, ce travail pourrait être reproduit sur des souches axéniques de *P. agardhii* et *P. rubescens*, afin de déterminer la productivité et la respiration « réelles » de *Planktothrix*. Celles-ci sont néanmoins difficiles à obtenir et à conserver, d'une part à cause de la fragilité de l'espèce, et d'autre part, à cause des conditions requises pour préserver l'axénicité (prélèvement sous une hotte à flux laminaire, stérilité systématique de tout le matériel en contact avec la culture).

Bibliographie

- **Publications et rapports :**

Bender M., Grande K., Johnson K., Marra J., Williams P. J.L., Sieburth J., Pilson M., Langdon C., Hitchcock G., Orchardo J., Hunt C., Donaghay P., Heinemann K. (1987) *A comparison of four methods for determining planktonic community production*, Limnol. Oceanogr. 32(5), 1085-1098.

Bossard P., Gammeter S., Lehmann C., Schanz F., Bachofen R., Bürgi H.-R., Steiner D., Zimmermann U. (2001) *Limnological description of the Lakes Zürich, Lucerne, and Cadagno*. Aquat.sci.63 225-249.

Briand E., Pringault O., Jacquet S. et Torréton J.P. (2004) *The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency*. Limnol. Oceanogr. : Methods 2, 406-416.

Bright D. I., Walsby A.E. (2000) *The daily integral of growth by Planktothrix rubescens calculated from growth rate in culture and irradiance in Lake Zürich*. New Phytol. 146, 301-316.

Davis P.A., Dent M., Parker J., Reynolds C.S., Walsby A.E. (2003) *The annual cycle of growth rate and biomass change in Planktothrix spp. in Blelham Tarn, English Lake District*. Freshwater Biology 48, 852-867.

Davis P.A., Walsby A.E. (2002) *Comparison of measured growth rates with those calculated from rates of photosynthesis in Planktothrix spp. isolated from Blelham Tarn, English Lake District*. New Phytol. 156:225-239.

Epping E., Kühl M. (2000) *The responses of photosynthesis and oxygen consumption to short-term changes in temperature and irradiance in a cyanobacterial mat (Ebro Delta, Spain).* Environmental Microbiology 2(4), 465-474.

Gorchakova E. (2005) *Relations entre l'oxygène dissous et la biomasse algale dans le lac du Bourget : utilisation de la modélisation et de measures en continu*. Rapport de stage de Master 2 Hydrologie-Hydrogéologie. Université Pierre et Marie Curie.

Gregor J., Marsalek B. (2004) *Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods*. Water Research 38 517-522.

Groleau A., Bensoussan N., Calzas M., Cuypers Y., Drezen C., Escoffier N., Humbert J.F., Jézéquel D., Le Vu B., Paolini G., Pernet P., Prévot F., Quiblier C., Tassin B., Vinçon-Leite B., Viollier E., Freissinet C. (2008) *Efflorescences de Planktothrix rubescens dans le lac du Bourget : utilisation des mesures en continu de fluorimétrie et d'oxygène dissous de la bouée Proliphyc pour l'étude de la dynamique du bloom 2007*. Support de la conférence GIS Cyanobactéries du 28, 29 et 30 janvier 2008.

Jacquet, S., Briand J.-F., Leboulanger C., Avois-Jacquet C., Oberhaus L., Tassin B., Vinçon-Leite B., Paolini G., Druart J.-C., Anneville O., Humbert J.-F. (2005) *The proliferation of the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens following the restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget)*. Harmful Algae 4 651-672.

Jacquet, S., Paolini G., Lazzarotto J., Perga M., Domaizon I., Druart J.-C., Humbert J.-F., Perney P., Girel C., et Laine L. (Rapport 2007) *Suivi de la qualité des eaux du lac du Bourget pour l'année 2006*. 110 pp.

Kaiblinger C., Dokulil M. T. (2006) *Application of fast repetition rate fluorometry to phytoplankton photosynthetic parameters in freshwaters*. Photosynthesis Research 88: 19-30.

Kaiblinger C., Greisberger S., Teubner K., Dokulil M. T. (2007) *Photosynthetic efficiency as a function of thermal stratification and phytoplankton size structure in an oligotrophic alpine lake*. Hydrobiologia 578:29-36.

Komarek J., Anagnostidis K. (1986) *Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2-Chroocacales*. Arch. Hydrobiol. Suppl. 73, 157-226.

Kromkamp J. C., Domin A., Dubinsky Z., Lehmann C., Schanz F. (2001) *Changes in photosynthetic properties measured by oxygen evolution and variable chlorophyll fluorescence in a simulated entrainment experiment with the cyanobacterium Planktothrix rubescens*. Aquat.sci.63 363-382.

Krupa D., Czernas K. (2003) *Mass appearance of Cyanobacterium Planktothrix rubescens in Lake Piaseczno, Poland*. Water Qual. Res. J. Canada volume 38, No.1, 141-152.

Lassen C., Glud R. N., Ramsing N. B., Revsbech N. P. (1998) *A method to improve the spatial resolution of photosynthesis rates obtained by oxygen microsensors*. J. Phycol. 34, 89-93.

Lloyd Nigel D.H., Canvin David T., Culver David A. (1977) *Photosynthesis and Photorespiration in Algae*. Plant Physiol. 59, 936-940.

Micheletti S., Schanz F., Walsby A.E. (1998) *The daily integral of photosynthesis by Planktothrix rubescens during summer stratification and autumnal mixing in Lake Zürich*. New Phytol. 139, 233-246.

Moodley L., Steyaert M., Epping E., Middelburg J.J., Vincx M., van Avesaath P., Moens T., Soetaert K. (2008) *Biomass-specific respiration rates of benthic meiofauna: demonstrating a novel oxygen micro-respiration system*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 357: 41-47.

Oberhaus L., Briand J.F., Leboulanger C., Jacquet S., Humbert J.F. (2007) *Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of Planktothrix agardhii and P. rubescens*. J. Phycol. 43, 1191-1199.

Revsbech N. P. (1989) *An oxygen microsensor with a guard cathode*. Limnol. Oceanogr. 34(2), 474-478.

Rapport SACYTOX. (Mai 2004) *Prototype de système d'alerte pour les proliferations de cyanobactéries toxiques dans les lacs : diagnostic et prévision*.

Staehr P.A., Sand-Jensen K. (2006) *Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities*. Freshwater Biology 51, 249-262.

Taillefert M., Luther G.W. III, Nuzzio D.B. (2000) *The Application of Electrochemical Tools for In Situ Measurements in Aquatic Systems*. Electroanalysis 12, No. 6, 401-412.

Vaughan I.P., Davis P.A., Walsby A.E. (2001) *Changes in the photosynthetic coefficients* α *and* P_m *of Planktothrix rubescens grown on light-dark cycles*. Aquat.sci.63 350-362.

Walsby A.E. (2001) *Determining the photosynthetic productivity of a stratified phytoplankton population*. Aquat.sci.63 18-43.

Walsy A.E., Dubinsky Z., Kromkamp J.C., Lehmann C., Schanz F. (2001) *The effects of diel changes in photosynthetic coefficients and depth of Planktothrix rubescens on the daily integral of photosynthesis in Lake Zürich*. Aquat.sci.63 326-349.

Walsby A.E., Ng G., Dunn C., Davis P.A. (2004) *Comparison of the depth where Planktothrix rubescens stratifies and the depth where the daily insolation supports its neutral buoyancy*. New Phytologist 162: 133-145.

Walsby A.E., Schanz F. (2002) *Light-dependent growth rate determines changes in the population of Planktothrix rubescens over the annual cycle in Lake Zürich, Switzerland*. New Phytologist 154: 671-687.

Willame R., Cauchie H.M., Hoffmann L. (2004) *Les cyanobactéries (algues bleues) des eaux stagnantes du bassin Artois-Picardie et de ses régions avoisinantes*, Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann, Agence de l'Eau Artois-Picardie. Données de 2002 à 2004.

Yon V. (2004) *Mesure en continu de l'oxygène dissous dans le lac du Bourget (Savoie), relation avec la production phytoplanctonique*. Rapport de stage de DEA Hydrologie-Hydrogéologie, Université Pierre et Marie Curie.

Zotina T., Köster O., Jüttner F. (2003) *Photoheterotrophy and light-dependent uptake of organic nitrogenous compounds by Planktothrix rubescens under low irradiance*. Freshwater Biology 48, 1859-1872.

- **Sites internet :**

Aquoa.net, La culture en batch. Mickaël Guéret, 14 juin 2004. Site consulté en septembre 2008. www.aquoa.net/spip.php?article13.
Unisense. Site consulté en avril 2008. http://www.unisense.com/Default.aspx?ID=466
Projet Proliphyc. Site consulté en mai 2008. http://proliphyc.h2o.net/
Connaissance des micro-algues. Alain Couté, juillet 2007. Document consulté en mai 2008. www.watertwinning.saglik.gov.tr/index.php?id=3029&d=FR_A.%20Couté_1_Connaissance%20micro-algues.doc.