

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude de l'assimilation des nitrates par une algue planctonique isolée de la Meuse : Dictyosphaerium chlorelloïdes

Vandenbogaert, Nadine

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

**ETUDE DE L'ASSIMILATION DES
NITRATES PAR UNE ALGUE
PLANCTONIQUE ISOLEE DE LA MEUSE:
*Dictyosphaerium chlorelloïdes***

**VANDENBOGAERT Nadine
1990-1991**

Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
tél. 081/72.41.11 - telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Etude de l'assimilation des nitrates par une algue planctonique isolée de la Meuse : *Dictyosphaerium chlorelloïdes*.

VANDENBOGAERT Nadine

Résumé

L'objectif de ce travail est une mise au point sur l'étude de l'assimilation des nitrates par une algue planctonique, *Dictyosphaerium chlorelloïdes* isolée d'un milieu eutrophe : la Meuse. Cette algue a été mise en culture (cultures en batch). Sa croissance est suivie journallement par des mesures de densité optique (663 et 750 nm) ainsi que par des comptages cellulaires. Nous avons déterminé les taux de croissance (en moyenne $0,80j^{-1}$ dans le cas d'un non carençage et $0,30j^{-1}$ dans le cas d'un carençage). Le stock intracellulaire minimal (Q_{0N}) a également été déterminé, celui-ci est en moyenne de 84 $uatg\ N/10^9$ cellules. La technique de carençage en azote a été utilisée afin de pouvoir déterminer les paramètres "absolus" (V_m et K_m) de l'assimilation, celle-ci étant suivie par mesure de NO_3-N dans le filtrat. Les différentes expériences menées au cours de ce travail montrent l'importance du suivi quotidien de l'état nutritionnel des cellules (rapport C:N). Des vitesses d'assimilation ont été mesurées à différentes concentrations en substrat, celle de 100 $ug\ N/l$ n'étant pas encore saturante.

Abstract

The aim of this work is to carry out a study of nitrate uptake by the planktonic alga *Dictyosphaerium chlorelloïdes*, isolated from an eutrophic water body, the Meuse river (Belgium). The alga was cultivated in batch cultures, which were followed daily through absorbance measurements at 663 and 750 nm, as well as by counting cells. The exponential growth rate was determined for non-depleted cultures (max. $0.80d^{-1}$ at $25^\circ C$) and for N-depleted cultures (about $0.3d^{-1}$). The minimum cell quota (Q_{0N}) was also determined on average 84 $uatg\ N$ per 10^9 cells. The N-depletion procedure was also used for NO_3-N uptake kinetics followed by measuring NO_3-N in the filtrate, in order to estimate the "absolute" parameters V_m and K_m . The experiments which have been carried out during this work stress the importance of controlling daily the nutritional status of the cells by means of the C:N biomass ratio. Uptake velocities were measured at various substrate concentrations; the saturation level was not reached yet for 100 $ug\ NO_3-N/l$.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 1991

Promoteur : J.-C. Micha

Co-promoteur : J.-P. Descy

Remerciements.

Au terme de ce mémoire, je remercie le Professeur Jean-Claude Micha qui m'a accueillie dans le Laboratoire d'Ecologie des eaux douces ainsi que le professeur Jean-Pierre Descy qui m'a proposé ce sujet de mémoire et m'a conseillée.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Hélène Ducobu pour son soutien, son aide très précieuse, ses conseils et sa disponibilité tout au long de cette année de travail.

Je remercie tous les membres du laboratoire d'Ecologie (U.N.E.C.E.D.) ainsi que mes collègues pour la bonne humeur et l'ambiance chaleureuse qu'ils ont apportées.

J'adresse également un grand remerciement à Yves Mine pour son aide technique au laboratoire.

Mes remerciements vont aussi aux différents laboratoires au sein des facultés qui m'ont accueillie : les Laboratoires de Physiologie végétale, de Microbiologie, de Biologie quantitative et le département d'Informatique.

Enfin, je remercie mes parents ainsi que les membres de ma famille et mes amis : Claire, Marie-Noëlle, Sophie et Jacques pour m'avoir soutenue tout au long de cette année.

SOMMAIRE

Résumé	
Remerciements	
Sommaire	
Introduction.....	1
Première partie:	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Rôle de l'azote dans la croissance du phytoplancton.....	3
I.1. Définition du taux de croissance.....	3
I.2. Relation entre le taux de croissance et la disponibilité en nutriments.....	4
I.2.1. Le modèle de Monod.....	4
I.2.2. Le modèle de Droop.....	5
I.2.3. Le Redfield ratio.....	6
I.2.3.1. Exemple in situ.....	6
I.2.3.2. Exemple en culture.....	6
I.2.4. Méthodes permettant d'évaluer une limitation nutritionnelle.....	7
I.2.4.1. Expérience d'enrichissement ou bioessai.....	7
I.2.4.2. Détermination expérimentale des rapports C:N:P.....	7
II. L'assimilation de l'azote.....	8
II.1. Les différentes formes d'azote assimilables.....	8
II.1.1. Les formes minérales.....	8
II.1.2. Les formes organiques.....	9
II.1.3. Influence de différentes formes d'azote sur la croissance.....	9
II.2. Etude de l'assimilation azotée.....	10
II.2.1. Généralités.....	10
II.2.2. Système de transport.....	10
II.2.3. Assimilation des nitrates.....	11
II.2.4. Réduction des nitrates et des nitrites.....	12
II.2.4.1. Nitrate réductase.....	13
II.2.4.2. Nitrite réductase.....	13
II.2.4.3. Influence des facteurs environnementaux sur l'activité de la nitrate réductase.....	14
II.2.5. Interaction entre l'assimilation d'ammonium et	

des nitrates.....	15
II.2.6. Interaction entre l'assimilation de l'azote et la photosynthèse.....	16
II.3. Biochimie de l'assimilation.....	17
II.3.1. L'équation de Michaelis-Menten.....	17
II.3.1.1. Effet de la concentration du substrat sur la vitesse de réaction.....	18
II.3.1.2. Transformations de l'équation de Michaelis-Menten.....	19
II.3.1.3. Les facteurs écologiques influençant V_m et K_m	20
a) facteurs abiotiques.....	20
- température.....	20
- lumière.....	20
- pH.....	21
- source de carbone.....	21
- milieu d'origine.....	22
b) facteurs biotiques.....	22
- stocks intracellulaires.....	23
- concentration en acides aminés.....	23
- taille cellulaire et forme.....	23
III. Description du milieu étudié : la Meuse.....	23
III.1. Profils longitudinaux de qualité de la Meuse.....	24
III.1.1. L'ammonium.....	24
III.1.2. Les nitrates.....	25
III.1.3. Le phosphore dissous.....	25
III.1.4. La silice réactive.....	25
III.1.5. Profil du phytoplancton.....	26
III.2. Problème de l'eutrophisation.....	26
III.2.1. Manifestation de l'eutrophisation : évolution de la concentration en chlorophylle <i>a</i>	28
III.2.2. Les causes de l'eutrophisation.....	28
III.2.2.1. Evolution des concentrations en nitrate et en ammonium.....	28
III.2.2.1.1 Les nitrates.....	29
III.2.2.1.2. L'ammonium.....	29
III.2.2.2. Evolution des concentrations en phosphates.....	30

III.2.2.3. Evolution des flux.....	30
------------------------------------	----

Deuxième partie:

MATERIEL ET METHODES

I. Culture d'espèces phytoplanctoniques isolées de la Meuse.....	32
I.1. Espèces étudiées.....	32
I.2. Isolement des espèces phytoplanctoniques.....	32
I.2.1. Le gradient de Percoll.....	32
I.2.1.1. Préparation de l'échantillon.....	33
I.2.1.2. Préparation du gradient.....	33
I.2.1.3. Fractionnement.....	33
I.2.2. Micromanipulation.....	33
I.3. Mode de culture.....	34
I.4. Suivi quotidien des cultures.....	35
I.4.1. Estimation de la biomasse.....	35
I.4.1.1. Densité optique.....	35
I.4.1.2. Comptages cellulaires.....	35
II. Assimilation des nitrates.....	36
II.1. Pré-conditionnement.....	36
II.2. Etude cinétique de l'assimilation azotée.....	37
II.2.1. Etude de l'assimilation en fonction du temps.....	37
II.2.1.1. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 24 mg N/l.....	37
II.2.1.1.1. Matériel nécessaire.....	37
II.2.1.1.2. Expérience.....	38
II.2.1.2. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 200 µg N/l.....	38
II.2.1.2.1. Matériel nécessaire.....	38
II.2.1.2.2. Expérience.....	39
II.2.2. Etude de l'assimilation en fonction de la concentration.....	40
II.2.2.1. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 200 µg N/l.....	40
II.2.2.1.1. Matériel nécessaire.....	40
II.2.2.1.2. Expérience.....	40
II.2.2.2. Détermination des paramètres cinétiques Km et Vm.....	41

II.2.3. Dosage des nitrates.....	41
II.2.3.1. Méthode à l'acide chromotropique.....	41
II.2.3.2. Méthode de la réduction des nitrates en nitrites.....	42
II.2.4. Dosage du phosphore soluble.....	42
II.3. Mesure de l'état nutritionnel des algues.....	43
II.3.1. Rapport C:N.....	43
II.3.1.1. Principe de la mesure.....	43
II.3.1.2. Protocole expérimental.....	43
II.3.1.2.1. Préparation des échantillons du phytoplancton.....	43
II.3.1.2.2. Préparation des standards.....	44
II.3.1.2.3. Préparation des blancs.....	44
II.4. Détermination des stocks intracellulaires Q_0 et Q_m	45

Troisième partie:

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Introduction.....	46
II. Etude de la croissance de <i>D. chlorelloïdes</i>	46
II.1. Estimation de la biomasse.....	46
II.2. Courbes de croissance.....	47
II.2.1. Culture non carencée en azote.....	47
II.2.2. Culture carencée en azote.....	48
II.3. Etat nutritionnel des cellules : rapport C:N.....	48
II.3.1. Calcul du taux de croissance.....	49
II.3.2. Comparaison avec les taux obtenus par comptage cellulaire.....	49
II.4. Calcul du stock intracellulaire minimal Q_0	49
III. Etude de l'assimilation des nitrates.....	50
III.1. Etude de l'assimilation en fonction du temps.....	50
III.1.1. Assimilation pour des concentrations de 2 et 24 mg N/l.....	50
III.1.1.1. Résultat obtenu avec une concentration de 2 mg N/l.....	51
III.1.1.2. Résultat obtenu avec une concentration de 24 mg N/l.....	51
III.1.2. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 200 µg N/l.....	51

III.1.2.1. Résultats obtenus en fonction de la concentration de départ.....	52
III.1.2.1.1. Concentration de 75 µg N/l.....	52
III.1.2.1.2. Concentration de 100 µg N/l....	52
III.1.2.1.3. Concentration de 200 µg N/l....	53
III.1.2.2. Présentation des autres résultats.....	53
III.1.2.2.1. Culture ayant reçu 1 µmole.....	53
III.1.2.2.2. Culture ayant reçu 5 µmoles....	53
III.1.2.3. Comparaison des rapports C:N.....	54
III.1.2.4. Reconstitution des stocks intracellulaires.....	54
III.1.2.5. Mesure des vitesses d'assimilation.....	56
III.1.2.5.1. Concentration de 20 µg N/l.....	56
III.1.2.5.2. Concentration de 37 µg N/l.....	56
III.1.2.5.3. Concentration de 100 µg N/l...	56
III.2. Etude de la relation vitesse - substrat.....	57
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	59
BIBLIOGRAPHIE.....	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
ANNEXES	

INTRODUCTION.

Le thème initial de notre travail de fin d'études devait être une contribution à l'étude du bilan azote d'écosystèmes agropiscicoles développés à proximité du lac Muhazi (Rwanda). Ces milieux sont des étangs résultant d'une pratique d'aménagement de zones humides, qui consiste notamment à exploiter les plans d'eau créés par creusement pour la pisciculture de poissons tropicaux à croissance rapide, comme les *Tilapia*. Les espèces choisies pour cet élevage sont à même d'utiliser au mieux la production naturelle des étangs, en particulier la production primaire. Or, cette dernière est fréquemment, en milieu tropical où les conditions de lumière et de température sont très favorables à la croissance végétale, limitée par les nutriments (N,P) disponibles. En fait, c'est la limitation par l'azote qui est le plus souvent invoquée, d'où l'intérêt de l'étude d'un bilan de ces nutriments, en particulier de l'apport par fixation de l'azote atmosphérique par des cyanobactéries.

Pour des raisons d'instabilité politique grave au Rwanda, le travail prévu n'a pu être entrepris. Néanmoins, le présent mémoire a été réorienté vers l'étude de l'assimilation azotée par des algues planctoniques et ce, en utilisant des techniques relativement simples susceptibles de servir un jour à une étude s'insérant dans le thème décrit brièvement ci-dessus.

Un tel travail sur l'assimilation azotée d'algues planctoniques isolées d'un milieu eutrophe, la Meuse, n'avait pas encore été entrepris au laboratoire d'Ecologie.

L'objectif de ce mémoire est donc de mettre au point une méthode permettant d'étudier l'assimilation de l'azote et plus particulièrement des nitrates sur des cultures d'algues monospécifiques carencées en azote.

Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance d'une Chlorophycée isolée de la Meuse nécessitant la mise en culture. Par la suite, nous avons tenté de déterminer les paramètres cinétiques "absolus" de l'assimilation K_m et V_{max} sur des cultures préalablement carencées en azote. Cette partie a demandé la mise

au point d'un protocole expérimental permettant cette étude d'assimilation.

Première partie :

Synthèse Bibliographique.

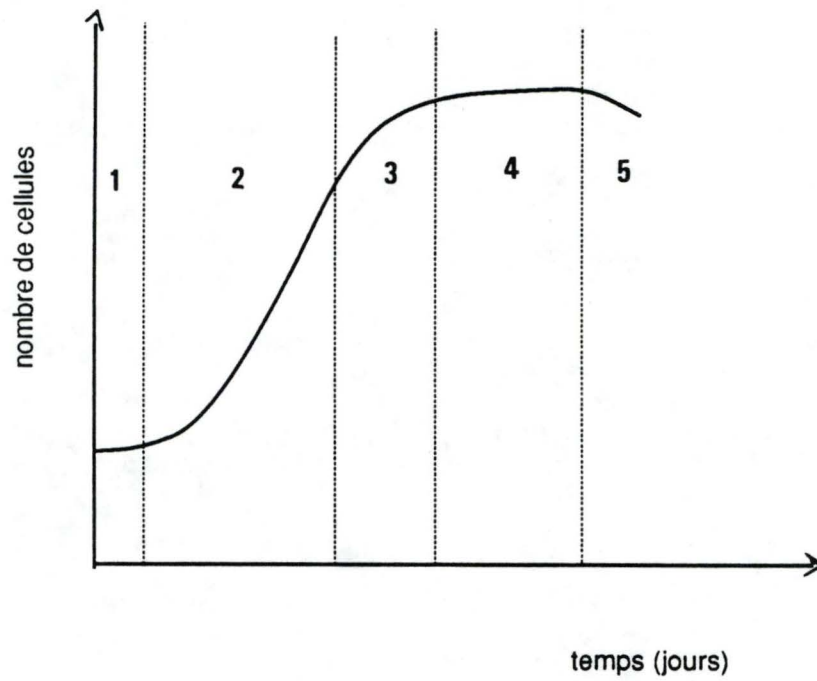


Figure 1.1. Courbe logistique de croissance d'une population cellulaire.

- phase 1: phase de latence;
- phase 2: phase de croissance exponentielle;
- phase 3: phase de ralentissement;
- phase 4: phase stationnaire;
- phase 5: phase de déclin.

I. Rôle de l'azote dans la croissance du phytoplancton.

Comme la lumière et la température, les nutriments jouent un rôle déterminant dans la dynamique du phytoplancton. Ces macronutriments sont le phosphore, l'azote et la silice. Une carence de l'un d'eux peut entraîner une diminution du taux de croissance.

I.1. Définition du taux de croissance.

Le taux de croissance, noté μ , se calcule à partir de la formule suivante:

$$\mu = \frac{\ln N_{t_2} - \ln N_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad \text{et s'exprime en temps}^{-1}$$

où N = nombre de cellules,
 $t_2 - t_1$ = intervalle de temps.

Graphiquement, la courbe de croissance d'une culture en batch se représente comme montré à la Fig.1.1. Cette courbe logistique présente différentes phases:

phase 1 : phase de latence où les cellules s'adaptent à leur nouveau milieu. La croissance est nulle;

phase 2 : phase de croissance exponentielle où le taux de croissance est maximum ($\mu = \mu_{\max}$);

phase 3 : phase de ralentissement de la croissance où le taux de croissance diminue progressivement;

phase 4 : phase stationnaire où il n'y a pas de croissance nette. Le taux de croissance compense exactement le taux de mortalité;

phase 5 : phase de déclin où le taux de croissance est inférieur au taux de mortalité.

Les nutriments peuvent agir comme facteur limitant la croissance du phytoplancton. Selon Liebig (1840), la croissance des végétaux est limitée par l'élément dont la concentration est inférieure à une valeur minimale en dessous de laquelle les synthèses ne peuvent plus se faire ("loi du minimum").

1.2. Relation entre le taux de croissance et la disponibilité en nutriments.

Deux équations relient le taux de croissance et la disponibilité en élément nutritif : le modèle de Monod et le modèle de Droop.

1.2.1. Le modèle de Monod.

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

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K + S}$$

où μ_{\max} (T,I) = taux de croissance spécifique maximum pour une température et une intensité données;

μ = taux de croissance pour une concentration en substrat donnée;

S = concentration externe en substrat;

K = constante de demi-saturation, c'est-à-dire la concentration pour laquelle $\mu = \mu_{\max}/2$.

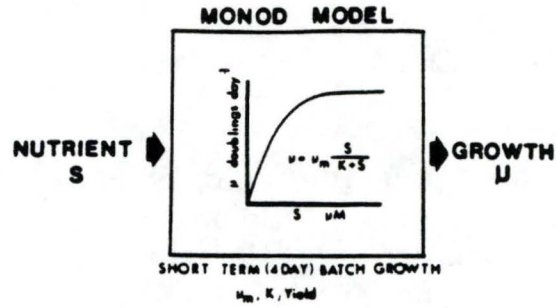


Figure 1.2. Diagramme représentant le modèle de Monod décrivant la relation entre la concentration externe en nutriment et le taux de croissance μ (d'après Kilham, 1978).

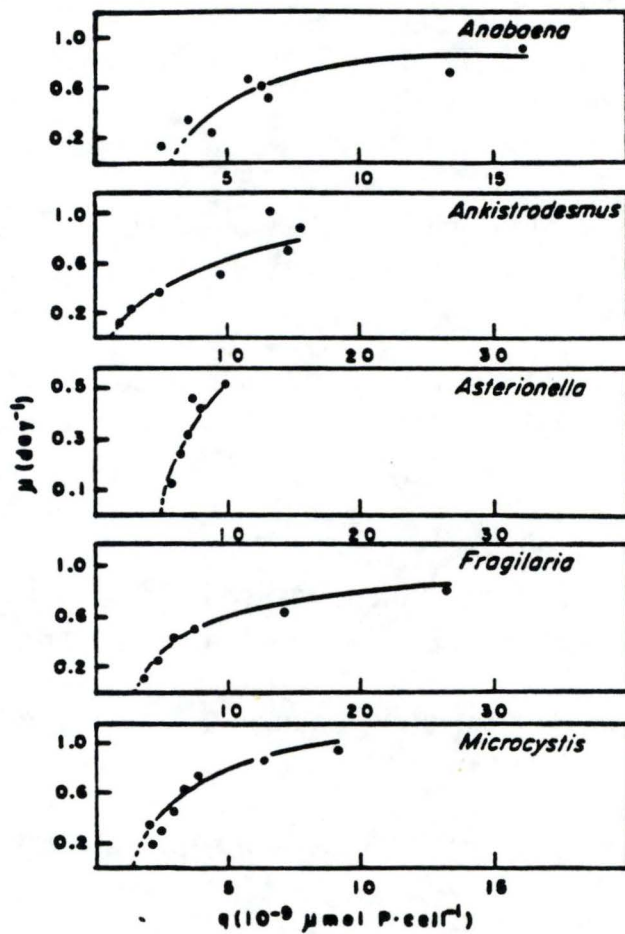


Figure 1.3. Modèle de Droop. Relation entre les stocks intracellulaires (Q) et le taux de croissance (μ) chez cinq espèces (d'après Gotham et Rhee, 1981).

Cette équation se représente graphiquement par une hyperbole (Fig.1.2). Aux faibles concentrations en substrat, le taux de croissance μ est limité par celui-ci. La relation entre μ et S est linéaire tandis qu'à de fortes concentrations le taux de croissance n'est plus limité par le substrat et la relation μ - S est non linéaire. Ce modèle est valable pour un milieu constant (conditions de "steady-state") dans lequel les concentrations en substances nutritives n'évoluent pas au cours du temps. Ces conditions sont réalisées dans les cultures en chémostat où le milieu est renouvelé en continu : de telles conditions ne sont réalisées qu'exceptionnellement en milieu naturel, les concentrations en éléments nutritifs fluctuant au cours du temps en fonction de différents processus.

1.2.2. Le modèle de Droop.

Le modèle de Droop (1973) relie la croissance du phytoplancton aux concentrations internes en nutriments. Ce modèle tient compte de la consommation de luxe qui consiste en une assimilation et stockage des éléments nutritifs essentiels afin de pallier aux futures carences. Les algues assimilent donc plus que nécessaire à leurs besoins de base. Ce modèle fournit une représentation raisonnable de la croissance algale limitée par les nutriments intracellulaires.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{(Q-Q_0)}{K + (Q-Q_0)}$$

$\mu_{\max} = f(T, I)$;

Q = quota intracellulaire en substances nutritives (élément limitant) au temps t ;

Q_0 = quota intracellulaire minimal.

Représentée graphiquement (Fig.1.3), cette équation a également l'allure d'une hyperbole. Lorsque $Q=Q_0$, le taux de croissance devient nul. En effet, les stocks intracellulaires minima spécifiques sont insuffisants pour permettre la croissance. Ils ne servent qu'au maintien du métabolisme de base. Par contre,

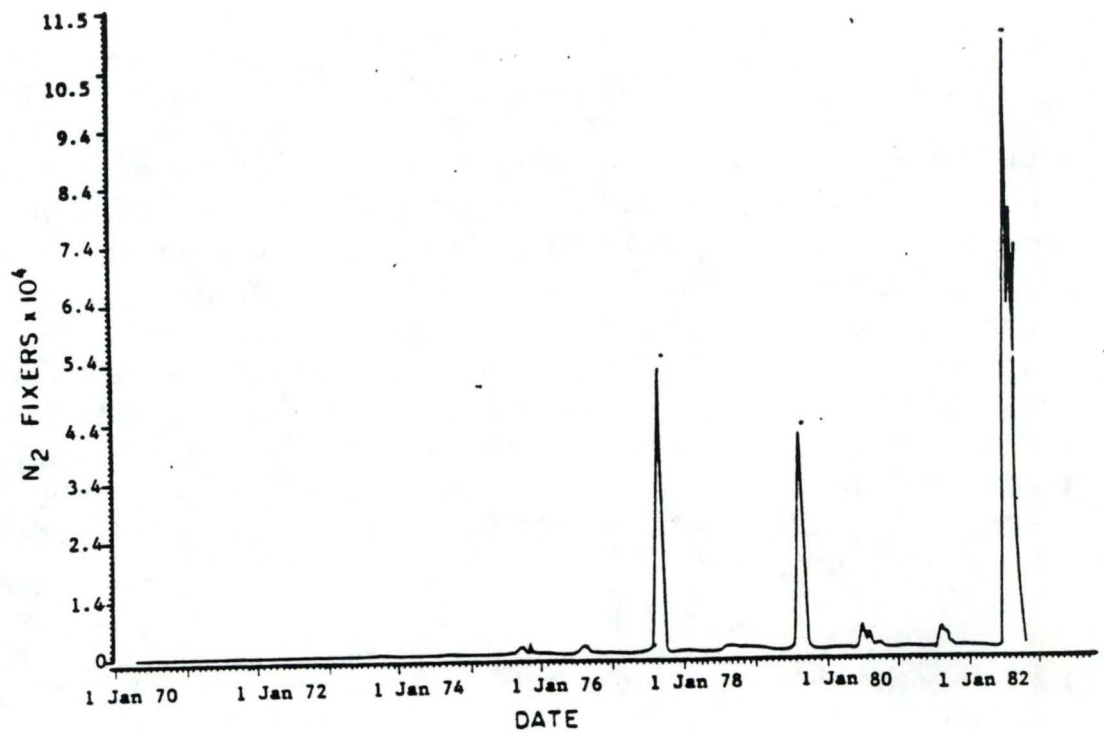


Figure 1.4. Evolution de la biomasse (mg m^{-3} wet wt) algale fixatrice de l'azote atmosphérique dans un lac expérimental du Nord-Ouest de l'Ontario (d'après Hecky et Kilham, 1988).

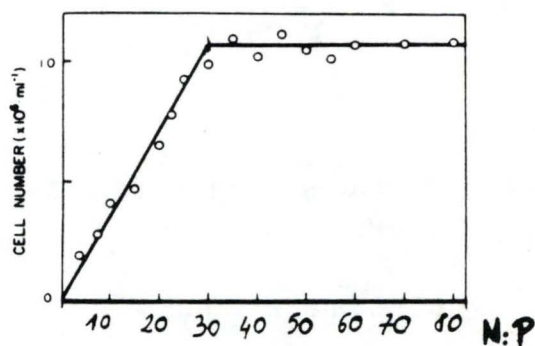


Figure 1.5. Evolution du nombre de cellules (en conditions steady state, taux de croissance fixé à $0,59\text{j}^{-1}$) en fonction des taux N:P du milieu (d'après Rhee, 1978).

lorsque les stocks intracellulaires sont maximums ($Q=Q_{max}$), le taux de croissance est maximal.

1.2.3. Le Redfield ratio.

Le Redfield ratio représente la composition élémentaire (C:N:P) de la biomasse algale en milieu non limité par les nutriments c'est-à-dire 106:16:1. Si la composition élémentaire de la biomasse s'écarte significativement du Redfield ratio, on peut inférer qu'une limitation nutritionnelle existe et que les algues voient leur croissance limitée. Lorsque ces rapports sont égaux au Redfield ratio, la croissance n'est alors limitée par aucun nutriment.

1.2.3.1. Exemple in situ.

En 1975, dans un lac expérimental du Nord-Ouest de l'Ontario, le rapport N:P est passé de 14:1 à 5:1 avec comme conséquence une augmentation de la biomasse des Cyanophycées capables de fixer l'azote atmosphérique dans les années qui suivirent (Fig.1.4) (Hecky et Kilham, 1988). Ces algues étaient en effet avantagées dans des conditions limitantes en azote.

1.2.3.2. Exemple en culture.

Rhee (1978) a effectué l'expérience suivante:

Des algues vertes, *Scenedesmus* sp. sont maintenues en culture en chemostat à un taux de croissance constant et dans un milieu inorganique avec des taux N:P variant de 5 à 80. Le nombre de cellules augmente linéairement avec les taux N:P allant jusqu'à 30 et reste par la suite stationnaire (Fig.1.5). Ces taux N:P variant en changeant seulement la concentration en nitrate, l'augmentation linéaire indique une limitation par l'azote (pour les taux N:P inférieurs à 30) et la phase stationnaire une limitation par le phosphore (au dessus de ce taux).

1.2.4. Méthodes permettant d'évaluer une limitation nutritionnelle.

1.2.4.1. Expérience d'enrichissement ou bioessai.

Ce type d'expérience consiste à comparer le taux de croissance d'espèces phytoplanctoniques avec et sans ajout d'un nutriment potentiellement limitant ou de plusieurs combinaisons de nutriments. Pour cela, un échantillon d'eau est filtré (afin d'éliminer le zooplancton) et distribué dans neuf récipients. Parmi ceux-ci, deux, les témoins, ne reçoivent aucun ajout. Trois sont enrichis avec un seul nutriment (Si, P ou N). Trois autres reçoivent une combinaison de deux nutriments (Si+P, Si+N, P+N). Enfin, le dernier reçoit la triple combinaison Si+P+N. Les différents nutriments sont rajoutés en excès afin que μ soit égal à μ max. Les cultures sont mises à incuber pendant trois jours à la température et la lumière prévalant in situ. Les cultures sont de type batch. Une incubation de courte durée et une dilution préalable des échantillons permettent de maintenir constantes les concentrations en nutriments au cours de l'expérience. Les cultures sont suivies par comptage des cellules de chaque espèce afin de déterminer le taux de croissance. Cette méthode permet ainsi de déterminer le ou les nutriments limitants en comparant les résultats obtenus pour chaque espèce. Ce test consiste donc à déterminer si l'ajout d'un nutriment ou l'autre stimule la croissance algale.

1.2.4.2. Détermination expérimentale des rapports C:N:P.

Expérimentalement, le C et l'N particulaire sont déterminés au moyen d'un analyseur élémentaire Carlo Erba. Le principe en sera donné dans la partie Matériel et Méthode (cfr. II.3.1.1.). Le phosphore particulaire est mesuré par spectrophotométrie, après hydrolyse.

Les informations obtenues à partir de la détermination des rapports C:N:P peuvent être ainsi complétées par celles obtenues à partir d'expériences d'enrichissement.

Un écart significatif par rapport au Redfield ratio indique une limitation nutritionnelle soit pour l'azote, soit pour le phosphore.

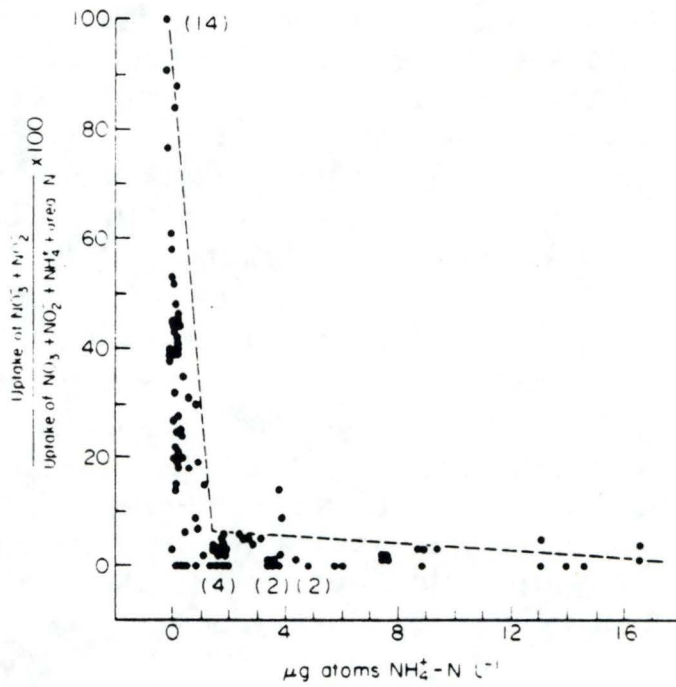


Figure 1.6. Effet de la concentration en ammonium du milieu sur l'assimilation de nitrates et de nitrites du phytoplancton (d'après McCarthy et al., 1975).

Ainsi, Healey et Hendzel (1980) ont vérifié, grâce à des expériences d'enrichissement parallèles, que le phytoplancton est carencé en phosphore à partir de C:P = 133 et en azote à partir de C:N = 8. Ce type d'approche doit cependant être utilisé avec prudence, du fait que les assemblages phytoplanctoniques peuvent comporter des espèces dont les exigences nutritionnelles varient dans une assez large gamme.

II. L'assimilation de l'azote.

II.1. Les différentes formes d'azote assimilables.

Ces différentes formes sont:

- Les formes minérales : NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- (et N_2 non directement assimilable);
- Les formes organiques : DON (azote organique dissous).

II.1.1. Les formes minérales.

-L'ammonium (NH_4^+) est la seule forme d'azote directement utilisable par le phytoplancton comme pour tous les végétaux. NH_4^+ est assimilé préférentiellement car il est directement employé pour la synthèse protéique. Dans les eaux courantes, la concentration en ammonium est habituellement faible par rapport aux autres nutriments et elle montre souvent une grande variabilité temporelle et spatiale. Dans les systèmes non pollués, la source majeure de cet ion est la dégradation de la matière organique par les bactéries (ammonification) ou l'excrétion animale (McCarthy, 1980).

-Les nitrates (NO_3^-) sont la seconde source d'azote assimilable lorsque la concentration en NH_4^+ diminue et atteint une valeur seuil d'environ $0.5 \mu\text{atg N/l}$ (Fig.1.6). De plus, l'utilisation des nitrates implique la capacité de synthèse de deux enzymes (nitrate et nitrite réductases) qui permettent la transformation de NO_3^- et NO_2^- en NH_4^+ , ce qui coûte de l'énergie à

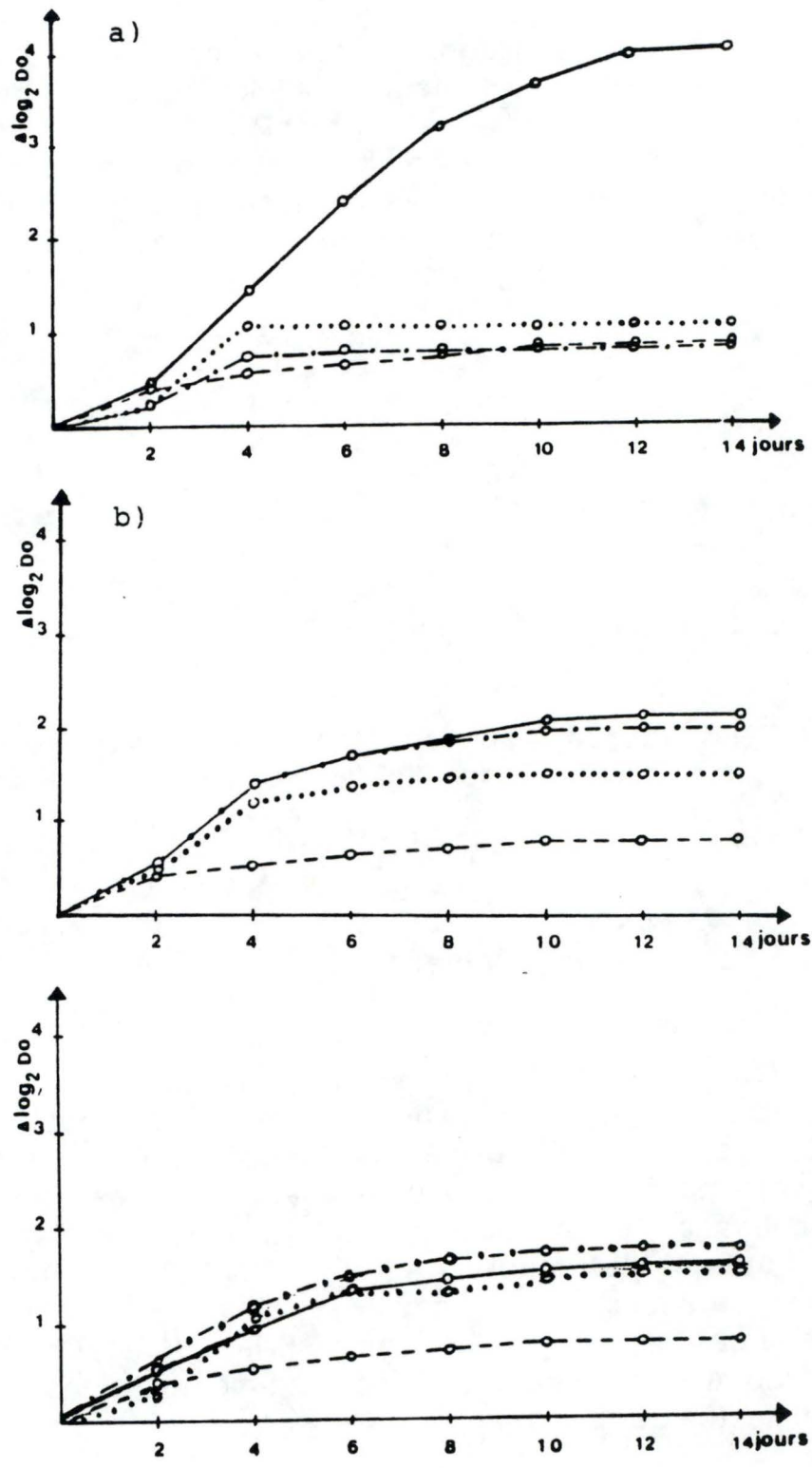


Figure 1.7. Courbes de croissance de *Staurastrum polymorphum* en fonction des différentes sources d'azote et des diverses concentrations (d'après Le Cohu et Gueune, 1976).

a) concentration de 8 mg N/l;
 b) concentrations de 1 et 0,5 mg N/l;

○—○, NaNO_3 ; ○····○, NH_4NO_3 ; ○-·-·-○, NH_4Cl ; ○- - -○, témoin.

la cellule. Néanmoins les nitrates sont une source importante d'azote pour la population phytoplanctonique car leur concentration dans l'eau est souvent beaucoup plus importante que celle d'autres nutriments azotés (Berman et al., 1984).

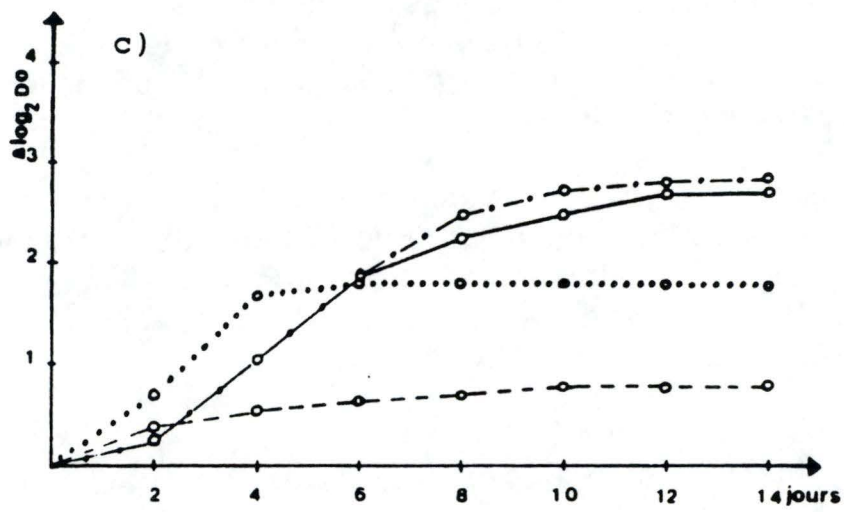
-Les nitrites (NO_2^-) généralement en faible concentration dans les milieux aquatiques jouent un rôle mineur dans l'alimentation azotée des algues phytoplanctoniques. Les nitrites peuvent être formés par l'activité bactérienne par oxydation de l'ammonium ou réduction des nitrates (McCarthy, 1980).

II.1.2. Les formes organiques.

Plusieurs formes d'azote organique dissous sont assimilables par le phytoplancton. Celui-ci est en effet capable de sécréter des hydrolases libérant ainsi différents composés organiques azotés dont les acides aminés et l'urée utilisables par le phytoplancton.

II.1.3. Influence de différentes formes d'azote sur la croissance.

Le Cohu et Gueune (1976) ont étudié l'influence de différentes formes d'azote (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl), à diverses concentrations, sur la croissance de la Desmidiacée *Staurastrum polymorphum* Bréb. L'algue étudiée provient de l'algothèque du Muséum d'Histoire Naturelle. Le milieu de base utilisé est purement minéral et les expériences sont effectuées à partir du milieu de base précipité. L'azote est apporté, à différentes concentrations, sous forme de NaNO_3 , NH_4NO_3 et NH_4Cl . Les algues sontensemencées sur les milieux contenant différentes concentrations en azote et placées dans un bain thermostaté à 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) dans des conditions lumineuses contrôlées (la photopériode utilisée est de 14 heures). Dans ces conditions, aux plus fortes concentrations retenues, c'est-à-dire 8 mg N/l, l'azote ammoniacal inhibe la croissance de cette algue; au contraire, l'azote nitrique en favorise le développement (Fig.1.7a). Aux plus faibles concentrations étudiées (0,5 et 0,2 mg N/l), l'effet inhibiteur de l'azote ammoniacal disparaît, la croissance de *S. polymorphum* n'est plus influencée par la forme d'azote fournie (Fig.1.7b).



c) concentration de 4 mg N/l.

○—○, NaNO₃; ○····○, NH₄NO₃; ○····○, NH₄Cl; ○-·-·○, témoin.

En conclusion, l'azote nitrique constitue la meilleure source d'azote pour la croissance de *S. polymorphum*, il est totalement assimilé. L'azote ammoniacal, par contre, pour les plus fortes concentrations, constitue toujours plus ou moins rapidement un facteur d'inhibition. En effet, même quand on observe un taux de croissance élevé pendant une courte période, par exemple pour 4 mg/l d'azote ammoniacal (Fig.1.7c), il y a ensuite blocage de la croissance et arrêt de l'assimilation de l'ammoniaque.

Cet effet inhibiteur de l'azote ammoniacal, mais à de plus fortes concentrations, a déjà été observé par Chu (1943) sur *S. paradoxum* Mey.

II.2. Etude de l'assimilation azotée.

II.2.1. Généralités.

Les flux majeurs se faisant à travers le plasmalemme des algues concernent l'eau et les solutés inorganiques. La nutrition des algues implique, en terme de transport, la prise des éléments essentiels requis pour la croissance mais aussi l'excrétion active de solutés qui sont produits lors des synthèses et qui pourraient être toxiques s'ils venaient à s'accumuler dans le cytoplasme, comme par exemple H^+ ou OH^- . Les algues sont capables d'assimiler certains éléments dans des proportions dépassant la quantité minimale requise pour assurer leur métabolisme. C'est ce qu'on appelle la consommation de luxe. L'étendue de celle-ci varie selon l'élément concerné. Cela peut refléter à la fois la rareté de l'élément (le P est plus souvent limitant que le K^+ par exemple) et la capacité à stocker l'élément sous une forme inoffensive. Le P est stocké sous forme de polyphosphates (Raven, 1976).

II.2.2. Système de transport.

Les cellules vivantes utilisent certains nutriments polaires existant dans leur environnement. Elles doivent donc posséder des systèmes de transport spécifiques qui permettent à la membrane de transporter certaines molécules. Le déplacement de solutés à

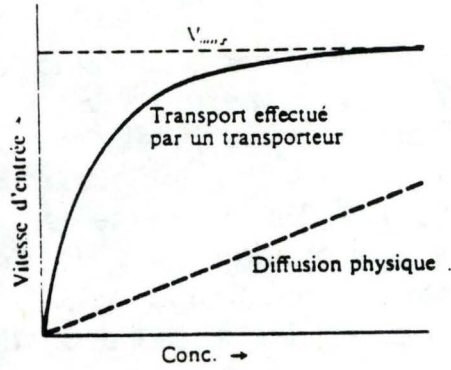


Figure 1.8. Cinétique montrant la saturation d'un système de transport membranaire (d'après Lehninger, 1979).

Tableau 1.1. Concentration en ions dans la vacuole et dans le cytoplasme de différentes algues dont *Nitella clavata* (d'après Raven, 1976) (modifié)

Alga	Ion	Concentration (mM)			Potential difference (mV)	
		Solution	Cytoplasm	Vacuole	ψ_{in}	ψ_{out}
<i>Chara australis</i>	K ⁺	0.1	[115] (e)	70 [48] (e)	-170	+18
	Na ⁺	1.0	-	50 (o)		
	Cl ⁻	1.6	[10] (i)	110 (i)		
	Ca ²⁺	0.5	-	2.6 (o)		
	SO ₄ ²⁻	1.3	-	17 (i)		
<i>Nitella clavata</i>	K ⁺	0.1	-	75-83 (i)	ψ_{in}	-120 to -160
	Na ⁺	3.0	-	34-36 (o)		
	Cl ⁻	4.1	-	120-124 (i)		
	Ca ²⁺	1.3	-	12-19 (o)		
	Mg ²⁺	3.0	-	11-22 (o)		
	SO ₄ ²⁻	0.67	-	12-20 (i)		
	H ₂ PO ₄ ⁻	0.0008	-	1.7-2.8 (i)		
	NO ₃ ⁻	1.8-1.9	-	3.3-5.3 (i)		
	H ⁺	10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁴	-	10 ⁻³ (o)		
<i>Nitella flexilis</i>	K ⁺	0.1	125 (e)	80 (e)	-170	+16
	Na ⁺	0.2	5 (o)	28 (i)		
	Cl ⁻	1.3	36 (i)	136 (e)		
<i>Nitella translucens</i>	K ⁺	0.1	119 (i)	75 (e)	-140	+18
	Na ⁺	1.0	14 (o)	65 (i)		
	Cl ⁻	1.3	65 (i)	150-170 (e)		
	Ca ²⁺	0.1	8 (o)	12 (e)		
<i>Acetabularia mediterranea</i>	K ⁺	10	400 (o)	355 (e)	-174	0
	Na ⁺	470	57 (o)	65 (e)		
	Cl ⁻	550	480 (i)	480 (e)		
	SO ₄ ²⁻	55	-	8.8 (i)		
	(COO) ₂ ⁻	0	-	110		
<i>Porphyra perforata</i>	K ⁺	11	480 (i)	-	-42	
	Na ⁺	485	51 (o)	-		
	Cl ⁻	590	81 (e)	-		
	NO ₃ ⁻	1-10 · 10 ⁻³	80-140 (i)	-		
	H ₂ PO ₄ ⁻	1-10 · 10 ⁻³	2.5 (i)	-		

travers la membrane par l'intermédiaire d'un transporteur est appelé transport médiat. Certains systèmes de transport membranaires permettent aux solutés de traverser la membrane dans le sens du gradient de concentration. Ce processus est le transport passif. Mais les systèmes de transport membranaires les plus importants correspondent à des transports actifs c'est-à-dire ceux s'effectuant contre un gradient de concentration. Ce système de transport actif joue un rôle important car il permet aux cellules d'extraire les substances énergétiques ou d'autres nutriments essentiels de leur environnement, même si leurs concentrations dans celui-ci sont très faibles (Lehninger, 1979).

Caractéristiques d'un transport médiat:

Le transport médiat possède un certain nombre de caractéristiques:

- saturation cinétique : le système de transport pourra être saturé par la substance transportée. En représentation graphique, la courbe obtenue est identique à celle de Michaelis-Menten (Fig.1.8). Ceci suggère que les transporteurs contiennent des sites spécifiques au niveau desquels les substances se fixent de façon réversible;
- spécificité pour la substance transportée : les membranes contiennent un site de liaison complémentaire de la substance transportée;
- inhibition spécifique : certains systèmes de transport sont inhibés de façon compétitive par des substances structurellement proches du substrat et qui se complexent avec les transporteurs.

II.2.3. Assimilation des nitrates.

Chez les algues marines (et *Nitella clavata*, tableau 1.1), il est évident que NO_3^- est présent, dans le cytoplasme (*Porphyra*) ou dans les vacuoles, à un potentiel électrochimique plus élevé que celui dans la mer (Jacques et Osterhout, 1938; Gutknecht et Dainty, 1968; Frazisket, 1973; Eppley et Rogers, 1970).

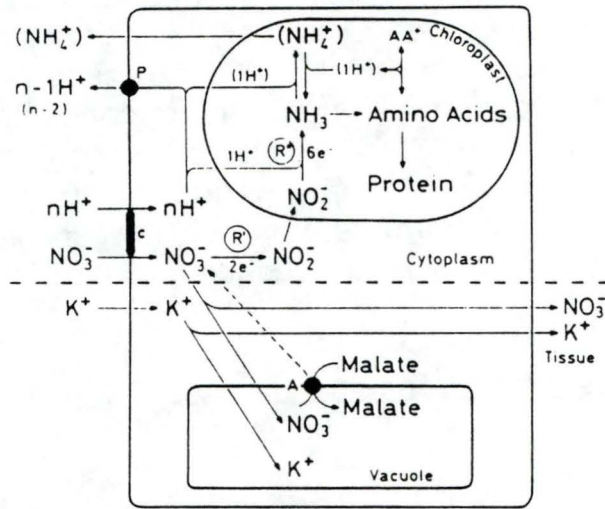


Figure 1.9. Schéma de l'assimilation des nitrates (d'après Ullrich, 1983).

- R' : nitrate réductase;
- R'' : nitrite réductase;
- A : antiport;
- C : co-transport;
- P : pompe à protons (ATPase).

Chez les algues d'eau douce, les nitrates mesurables sont négligeables à l'intérieur de la cellule. Cependant les nitrates sont connus pour être la source d'azote utilisée pour la croissance (Blinks et Nielsen, 1940; Ahmed et Morris, 1968). Il est probable que le transport des nitrates soit actif car la concentration cytoplasmique en nitrates doit être d'au moins 0,5 mM afin de rendre compte des taux de réduction de ceux-ci in vivo (Eppley et Rogers, 1970). Or, leur concentration dans la plupart des milieux naturels est d'environ 1 μ M (Corner et Davies, 1971). La concentration interne des algues ne peut donc pas être due à un simple transport passif (en accord avec la loi de Nernst). De plus, si l'on étudie les cinétiques d'assimilation des nitrates, elles suivent une courbe de saturation, chez la plupart des organismes, ce qui est caractéristique d'une assimilation se faisant via un transporteur ("carrier") ou "perméase" (Ullrich, 1983).

Chez les algues, le stockage des nitrates est peu ou pas possible car les cellules ne contiennent pas de vacuoles de stockage. Ainsi, l'assimilation et la réduction des nitrates sont étroitement couplées (Fig.1.9). Cependant, dans beaucoup de cas, la régulation et l'assimilation des nitrates peuvent être séparées de la réduction de ceux-ci (Ullrich, 1983).

II.2.4. Réduction des nitrates et des nitrites.

La réduction des nitrates, comme chez les plantes supérieures et les champignons, se fait en deux étapes :

1. la réduction des nitrates en nitrites;
2. la réduction des nitrites en ammoniacque.

Ces réactions sont catalysées par deux enzymes : la nitrate et la nitrite réductases.

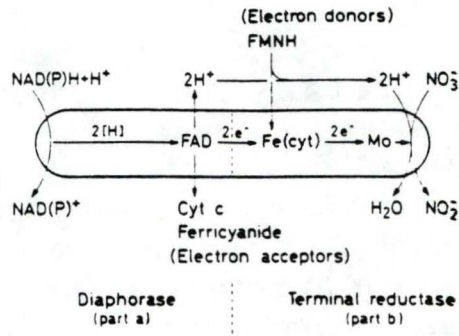


Figure 1.10. Illustration du transport des électrons lors de la réduction des nitrates (d'après Ullrich, 1983).

II.2.4.1. Nitrate réductase.

Chez la plupart des algues, c'est le NADPH qui joue le rôle de donneur d'électrons à la nitrate réductase comme chez *Ankistrodesmus braunii*, *Dunaliella* sp, *Chlamydomonas* sp. La nitrate réductase est un complexe protéinique qui contient une flavine, du molybdène et du fer. L'activité de l'enzyme peut être divisée en deux parties :

a) activité de la diaphorase concernant le transfert des électrons du NADPH au groupe flavine FAD de l'enzyme;

b) activité terminale concernant le transfert des électrons vers les nitrates (Fig.1.10).

Chez la plupart des espèces algales, une partie de la nitrate réductase semble être constitutive de la cellule, sa formation ne requiert pas une induction spéciale ou la formation d'une protéine précurseur inactive, même en présence d'ammonium.

L'activité de la nitrate réductase peut être réduite par des inhibiteurs. Le chlorate agit comme un inhibiteur compétitif, il entre en compétition avec les nitrates pour former des chlorites, lesquelles sont plus toxiques que les nitrites pour les cellules. L'azoture, le cyanate et le thiocyanate agissent aussi comme compétiteurs. Les cyanures et les sulfures inhibent la réduction des nitrates en se complexant avec le molybdène ou le fer. Une inhibition compétitive par les nitrites a été rapportée chez *Chlorella vulgaris* in vitro (Ullrich, 1983).

II.2.4.2. Nitrite réductase.

Le cofacteur utilisé pour la réduction des nitrites est la ferrédoxine réduite. Celui-ci peut être remplacé par la flavodoxine, aussi donneur d'électrons. Chez la plupart des algues, la nitrite réductase a une plus grande affinité pour son substrat que la nitrate réductase (K_M variant de 20 à 200 μM contre 100 à 200 μM respectivement).

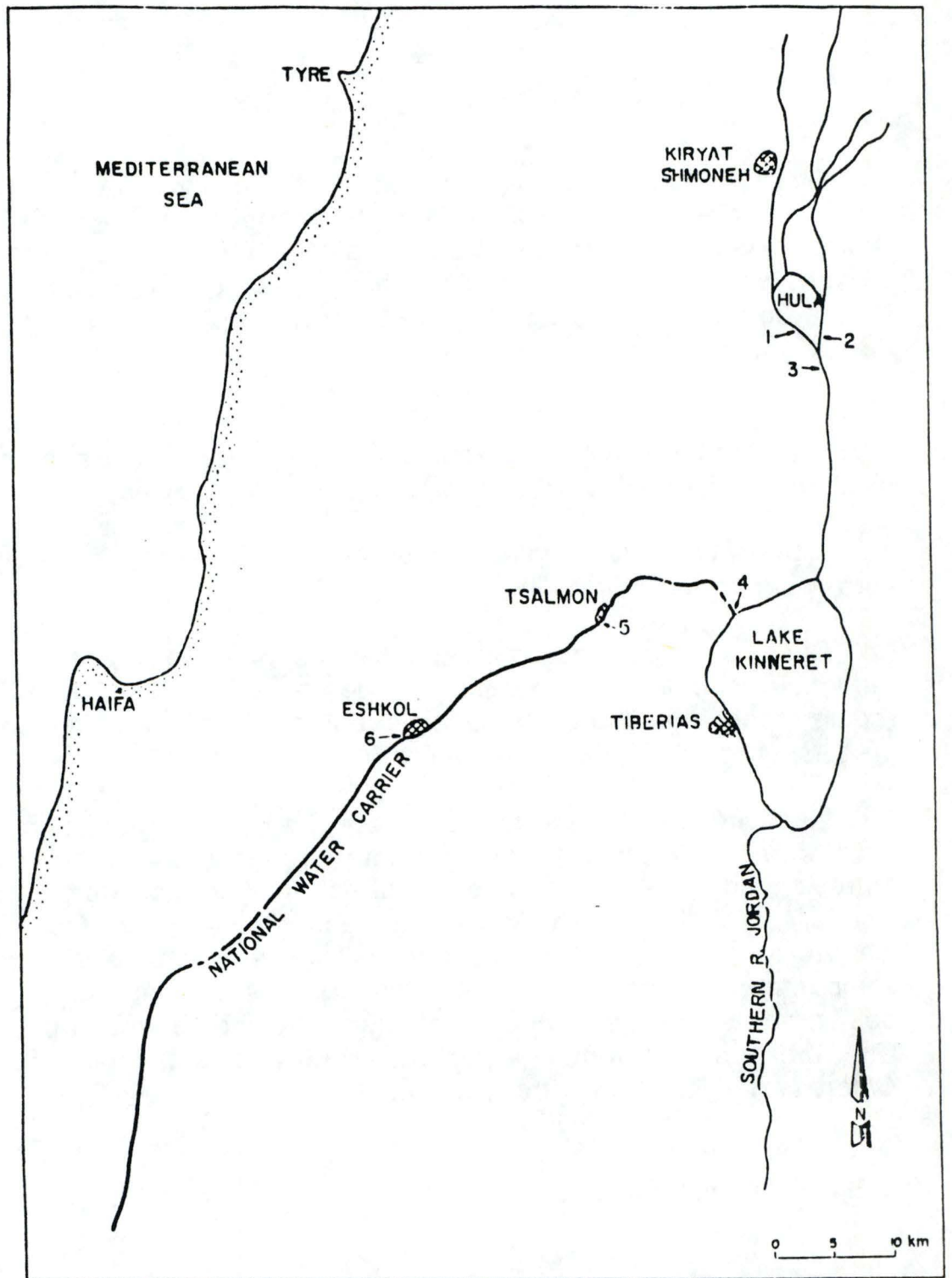


Figure 1.11. Localisation des stations d'échantillonnage du lac Kinneret en Israël (d'après Wynne et Berman, 1990) :

- WATERSHED (points 1, 2 et 3);
- NATIONAL WATER CARRIER (points 4, 5 et 6);
- lac KINNERET.

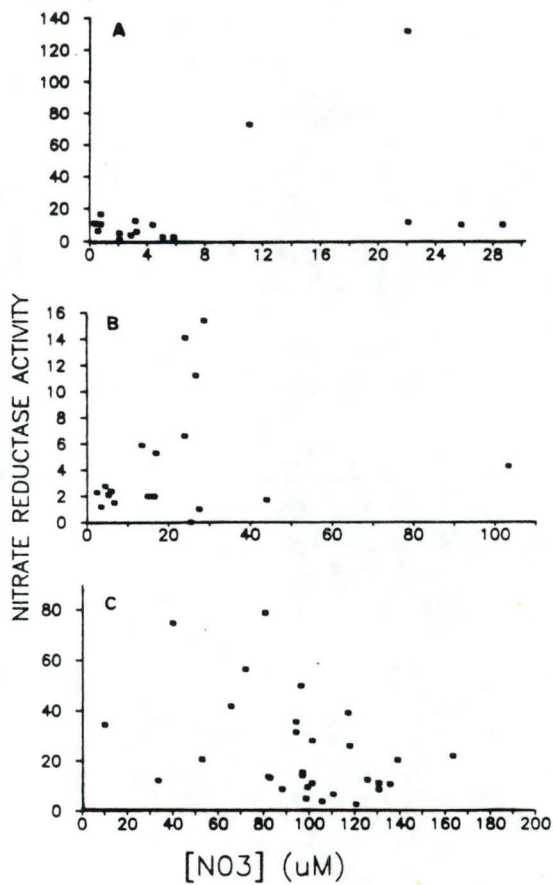
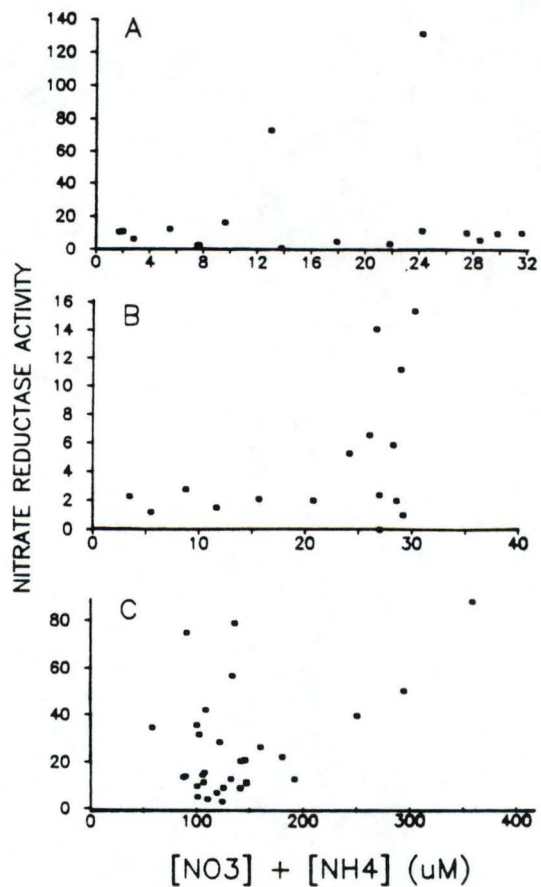


Figure 1.12. Activité de la nitrate réductase (nmoles NO_2 formée par μg de chlorophylle a et par heure) en fonction de la concentration ambiante en nitrates (d'après Wynne et Berman, 1990) :

- a) au lac Kinneret;
- b) au NWC;
- c) au WS.

Figure 1.13. Relation entre l'activité de la nitrate réductase (nmoles $\text{NO}_2/\mu\text{g chl.a/h}$) et les concentrations en azote inorganique total ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) (d'après Wynne et Berman, 1990).

- a) au lac Kinneret;
- b) au NWC;
- c) au WS.



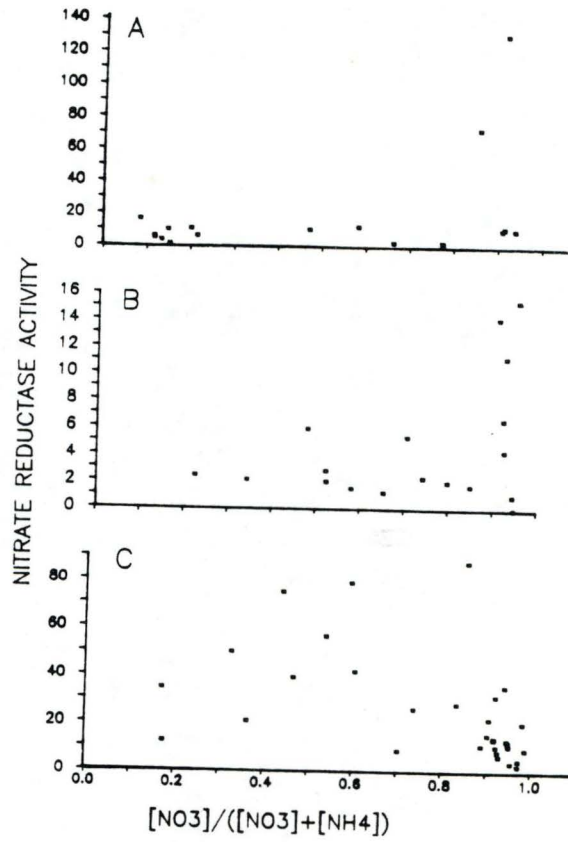


Figure 1.14. Activité de la nitrate réductase (nmoles $NO_2/\mu g$ chl.a/ h) en fonction de la concentration ambiante en ammonium (d'après Wynne et Berman, 1990).

- a) au lac Kinneret;
- b) au NWC;
- c) au WS.

La nitrite réductase est aussi sensible à une série d'inhibiteurs tels le cyanure, le monoxyde de carbone, les groupements sulfhydryles (Ullrich, 1983).

II.2.4.3. Influence des facteurs environnementaux sur l'activité de la nitrate réductase.

Une étude a été faite par Wynne et Berman (1990) sur le phytoplancton du lac Kinneret en Israël (Fig.1.11).

Les échantillons ont été prélevés à trois endroits différents :

- WATERSHED (WS);
- NATIONAL WATER CARRIER (NWC);
- lac KINNERET(station centrale).

Les auteurs ont examiné la relation entre l'activité de la nitrate réductase (NR) et les concentrations ambiantes en nutriments. Ils s'attendaient à ce que l'activité de la NR augmente avec une hausse des concentrations en nitrates. Seuls les échantillons pris au NWC montraient cette relation (Fig.1.12b, $r = 0,85$). L'activité de la NR des échantillons pris au lac KINNERET et au WS ne montrait pas de corrélation avec les concentrations en nitrates. Dans le lac, les périodes de concentration importante en ammonium ou nitrates sont bien marquées. Par contre, aux sites de WS et de NWC les fluctuations sont plus complexes. Par exemple, à WS, plusieurs périodes pendant lesquelles il n'y avait que de l'azote inorganique (NO_3^- ou NH_4^+) étaient observées. Cela peut expliquer pourquoi l'activité de la NR n'est pas en relation avec les concentrations ambiantes de l'un ou l'autre nutriment (Fig.1.12a et 1.12c) ou de l'azote inorganique total (Fig.1.13). Aucune relation n'est également notée entre l'activité de la NR et les concentrations en ammonium (Fig.1.14), son activité (au WS) est grande même quand les concentrations en ammonium atteignent 130 à 200 μM (Fig.1.14c).

D'après leurs résultats, les auteurs suggèrent que le contrôle de la NR dans les populations phytoplanctoniques naturelles est complexe et ne dépend pas directement des concentrations ambiantes en nitrates et/ou en ammonium.

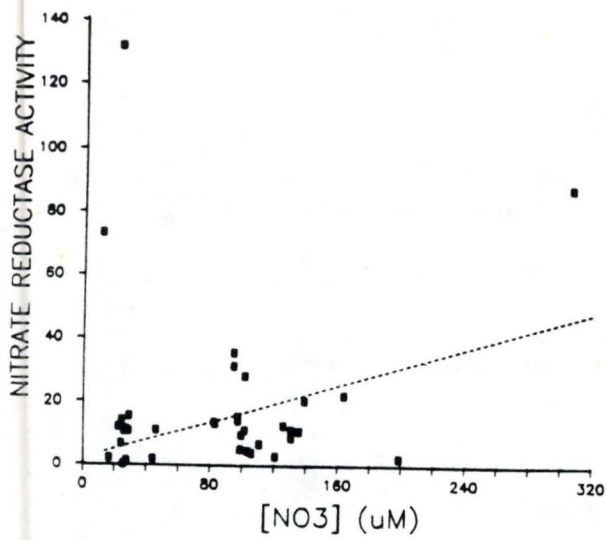


Figure 1.15. Activité de la nitrate réductase (nmol $\text{NO}_2/\mu\text{g chl.a/ h}$) en fonction de la concentration ambiante en azote (où les nitrates représentent plus de 80 % de l'azote inorganique total) (d'après Wynne et Berman, 1990).

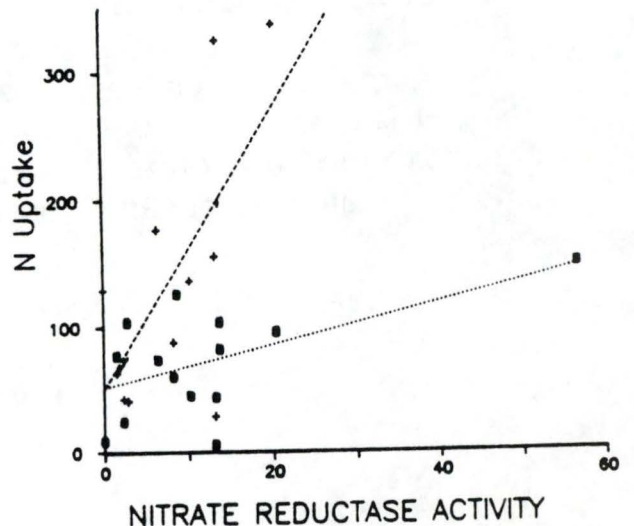
Tableau 1.2. Taux d'assimilation de l'azote marqué N^{15} ($\mu\text{moles N}$ assimilé/l/h) et préférence (index de préférence relatif-RPI; McCarthy et al., 1977) du phytoplancton naturel (d'après Wynne et Berman, 1990).

Date	Source (c)	150 μm fraction				20 μm fraction			
		N uptake		RPI		N uptake		RPI	
		NO_3	NH_4	NO_3	NH_4	NO_3	NH_4	NO_3	NH_4
10 Oct. 83	LK	2.9	11.2	0.2	6.2	3.0	10.6	0.3	6.0
9 Nov. 83	LK	0.2	99.2	0.1	1.0	0.0	56.6	0.0	1.0
27 Nov. 83	JR	45.0	2507.2	0.0	4.7	223.7	192.0	0.7	2.2
22 Mar. 84	LK	14.5	165.3	0.1	2.3	27.6	95.2	0.4	1.9
22 Mar. 84	JR	169.9	2260.8	0.1	14.9	294.6	2373.2	0.1	14.3
19 Aug. 84	JR	95.4	337.7	0.2	40.9	103.4	197.8	0.3	34.5
4 Nov. 84	ER	24.2	42.4	0.5	2.5				
	TR	103.8	40.7	1.4	0.6				
	SP	77.5	63.9	0.9	1.1				
	MD	149.1	1786.1	0.1	2.0				
21 Jan. 85	EC	81.9	325.2	0.2	9.5				
	JR	125.7	781.5	0.2	2.9				
	LK	44.9	136.4	1.7	0.9				

^a $\mu\text{moles N}$ taken up $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$.

^b Relative preference index (RPI; McCarthy et al., 1977).

Figure 1.16. Relation entre l'activité de la nitrate réductase (nmol $\text{NO}_2/\text{l/h}$) et les taux d'assimilation des nitrates (■) ou de l'ammonium (+) exprimés en $\mu\text{atg N}$ assimilé/l/h. (d'après Wynne et Berman, 1990).



Les échantillons analysés dans cette étude peuvent être divisés en deux groupes :

- ceux venant d'un environnement avec des concentrations élevées en nitrates et faibles en ammonium. Dans cette situation, l'activité de la NR mesurée est approximativement proportionnelle aux concentrations en nitrates du milieu (Fig.1.15, $r=0,61$).

- ceux venant d'un milieu riche en ammonium mais avec des concentrations variables en nitrates. Dans ce cas, les changements de l'activité de la NR sont complexes et reflètent peut-être, dans certains cas, l'inhibition de l'assimilation des nitrates par l'ammonium et/ou la synthèse de NR. Dans d'autres cas, elles peuvent refléter l'induction par les nitrates de la synthèse de nouvelles enzymes.

Les auteurs ont également déterminé les taux d'assimilation des nitrates et de l'ammonium (tableau 1.2). Ils ont observé une préférence pour l'ammonium. Ces taux d'assimilation sont directement corrélés avec les activités de la NR mesurées dans les mêmes échantillons (Fig.1.16), ce qui suggère que l'assimilation de l'azote et l'état nutritionnel en azote des cellules pourraient jouer un rôle dans la régulation de la NR.

II.2.5. Interaction entre l'assimilation d'ammonium et des nitrates.

Il est généralement admis que le taux d'assimilation des nitrates par le phytoplancton est réduit par la présence d'ammonium (Dortch, 1990). Mais il apparaît aussi que parfois l'ammonium peut stimuler l'assimilation des nitrates (Glibert et al., 1982), de même que l'assimilation des nitrates n'est pas toujours en relation avec la concentration en ammonium (Goering et al., 1970; Harvey et Caperon, 1976; Ronner et al., 1983; Kokkinakis et Wheeler, 1987; Kristiansen et Lund, 1989). Cela montre qu'il y a en fait plusieurs processus (et non un simple mécanisme) qui sont affectés différemment par l'ammonium et les conditions environnementales.

L'interaction entre l'ammonium et les nitrates peut être rendue par deux processus tout à fait distincts :

Tableau 1.3. Tableau montrant les préférences pour les nitrates ou l'ammonium (modifié, d'après Dortch, 1990).

Légende :

- + : taux significativement >1, c'est-à-dire préférence pour les nitrates;
- = : pas de différence, c'est-à-dire pas de préférence pour l'une ou l'autre forme;
- : taux significativement <1, c'est-à-dire préférence pour l'ammonium.

Espèce	$K_s \text{ NO}_3^-$ $K_s \text{ NH}_4^+$	$V_{\text{max}} \text{ NO}_3^-$ $V_{\text{max}} \text{ NH}_4^+$
Diatomées		
<i>Chaetoceros debilis</i>	-	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		-
<i>Skeletonema costatum</i>		+
<i>Thalassiosira gravida</i>	+	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>		-
Dinoflagellés		
<i>Amphidinium carterae</i>		-
<i>Chattonella antiqua</i>	+	-
<i>Dissodinium lunula</i>	+	-
<i>Gonyaulax excavata</i>	+	-
<i>Gyrodinium aureolum</i>		-
<i>Heterocapsa triquetra</i>		-
<i>Prorocentrum minimum</i>		-
<i>Pyrocystis fusiformis</i>	-	+
<i>Pyrocystis noctiluca</i>	-	+
<i>Scropsiella trochoidea</i>		-
Cyanobactéries		
<i>Anabaena flos-aquae</i>		-
<i>Anacystis nidulans</i>		+
<i>Oscillatoria aghardii</i>	+	-
Chlorophytes		
<i>Chlamydomonas reinhardi</i>		-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	-	-
Autres		
<i>Cyanidim calderium</i>		-
<i>Cryptomonas ovata</i>		-
<i>Micromonas pusilla</i>		-
<i>Monochrysis lutheri</i>	+	-

- une interaction indirecte : préférence pour l'ammonium;
- une interaction directe : inhibition de l'assimilation des nitrates par l'ammonium.

Ces deux interactions ne sont pas mutuellement exclusives. Elles sont influencées directement par les conditions environnementales et varient spécifiquement. Ce qui était appelé "inhibition" dans le passé est donc en fait le résultat indirect de la préférence pour l'ammonium manifesté par un V_{max} élevé et un K_S plus faible. Le tableau 1.3 montre que la vitesse d'assimilation maximale (V_{max}) de l'ammonium dépasse ou égale celle des nitrates (seulement 4 exceptions) (Dortch, 1990).

La préférence pour l'une ou l'autre forme peut être modifiée considérablement par les conditions environnementales. Ainsi, la déficience en azote augmente la préférence pour l'ammonium (V_{max} augmente) (Collos, 1983; Goldman et Glibert, 1983). De plus, la réduction des nitrates nécessite jusqu'à un tiers du pouvoir réducteur produit photosynthétiquement (Losada et Guerrero, 1979; Syrett, 1981). Il se pourrait donc que la préférence pour l'ammonium soit plus grande à de faibles intensités lumineuses.

En conclusion, la préférence pour l'ammonium n'est pas universelle, elle varie selon les conditions environnementales et l'état physiologique des cellules (faible intensité lumineuse ou faible disponibilité en azote) et il existe également de grandes variations interspécifiques (Dortch, 1990).

II.2.6. Interaction entre l'assimilation de l'azote et la photosynthèse.

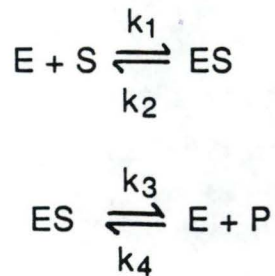
Il existe des interactions étroites entre l'assimilation du carbone et de l'azote durant la photosynthèse (Myers, 1949). Ces deux processus interagissent car les réducteurs (ferrédoxine réduite, NADPH) utilisés pour la réduction du CO_2 et de l'azote oxydé est produit durant la phase claire de la photosynthèse. Les formes oxydées d'azote (nitrates et nitrites) entrent donc en compétition avec le CO_2 pour le réducteur photogénéré (van Niel et al., 1953; Thomas et al., 1976). Ainsi l'assimilation de carbone

décroit si les nitrates ou nitrites sont ajoutés aux cultures d'algues (Thomas et al., 1976; Terry, 1982).

II.3. Biochimie de l'assimilation.

II.3.1. L'équation de Michaelis-Menten (Lehninger, 1979).

Le transport de l'azote à travers la membrane algale est facilité par une molécule transporteur. Cette relation substrat-transporteur est analogue à celle liant un enzyme et son substrat. L. Michaelis et M.L. Menten ont développé en 1913 une théorie générale du mécanisme d'action des enzymes et de la cinétique enzymatique. Une enzyme E réagit avec le substrat S pour former un complexe enzyme-substrat ES qui se décompose par la suite pour régénérer l'enzyme et libérer le produit de la réaction:



k_1 , k_2 , k_3 , k_4 sont les constantes de vitesse spécifiques des réactions. Dans les étapes initiales de la réaction, k_4 peut être négligée par rapport à k_1 , k_2 , k_3 .

L'équation de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + (S)}$$

établit la relation quantitative entre la vitesse de la réaction enzymatique et la concentration en substrat (S). Cette relation se

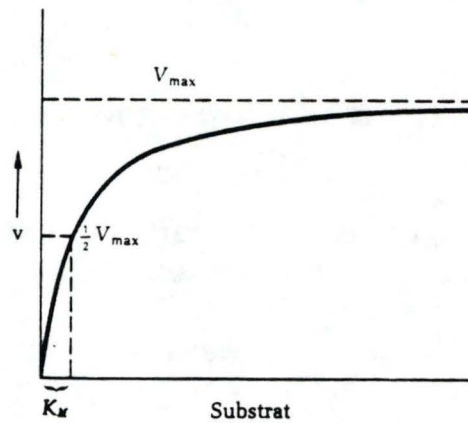


Figure 1.17. Courbe de Michaelis-Menten. Effet de la concentration de substrat sur la vitesse d'une réaction enzymatique (d'après Lehninger, 1979).

- V_{max} est la vitesse maximale d'assimilation;
- V est la vitesse d'assimilation pour une concentration en substrat donnée;
- S est la concentration en substrat.

représente graphiquement par une hyperbole (Fig.1.17) où K_M est la constante de demi-saturation c'est-à-dire la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de V_{max} .

Les paramètres V_{max} et K_M mesurent l'efficacité du système transporteur :

- V_{max} est une mesure de la capacité maximale du système transporteur;

- K_M est une mesure de l'affinité du système transporteur pour le substrat.

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

- k_2 et k_3 déterminent le taux de dissociation du complexe E;

- k_1 détermine le taux de formation du complexe E;

- K_M est la résultante de ces constantes.

II.3.1.1. Effet de la concentration du substrat sur la vitesse de réaction.

La Fig.1.17 montre que la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat lorsque celle-ci est basse. Lorsque cette concentration augmente, la vitesse n'augmente pas dans les mêmes proportions. Aux fortes concentrations, la vitesse devient constante et indépendante de la concentration en substrat. L'enzyme est saturé par celui-ci.

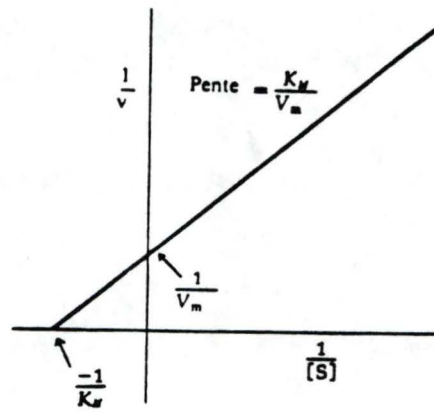


Figure 1.18. Représentation de Lineweaver-Burk (d'après Lehninger, 1979).

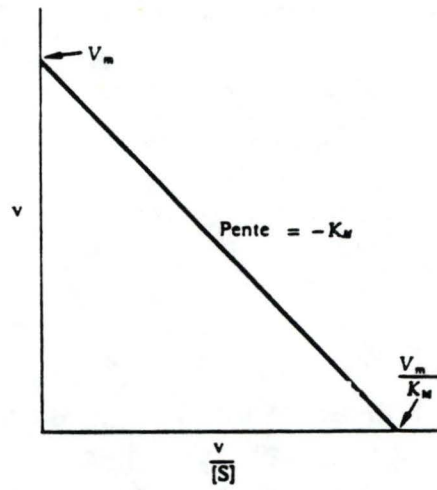


Figure 1.19. Représentation d'Eadie-Hofstee (d'après Lehninger, 1979).

II.3.1.2. Transformations de l'équation de Michaelis-Menten.

L'équation de Michaelis-Menten peut être transformée algébriquement en d'autres relations d'une utilisation plus aisée pour l'exploitation des résultats expérimentaux. On peut prendre par exemple l'inverse de l'équation de Michaelis-Menten :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + (S)}{V_m (S)} \quad (\text{équation 1})$$

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

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m (S)} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{équation 2})$$

Cette dernière équation est la relation de Lineweaver-Burk qui est représentée par une droite de pente K_m/V_m et d'ordonnée à l'origine $1/V_m$ (Fig.1.18). Cette représentation en double inverse ($1/V$ en fonction de $1/(S)$) est intéressante dans la mesure où elle permet d'établir la valeur de V_m avec une meilleure précision.

Une autre transformation pratique est celle d'Eadie-Hofstie (Fig.1.19) en multipliant les deux termes de l'équation 2 par $(V_m \cdot v)$, ce qui donne après réarrangement :

$$V = -K_m \frac{V}{(S)} + V_m$$

Cette représentation a le double avantage de donner simplement V_m et K_m mais aussi d'amplifier les défauts de linéarité qui peuvent être minimisés par la relation de Lineweaver-Burk.

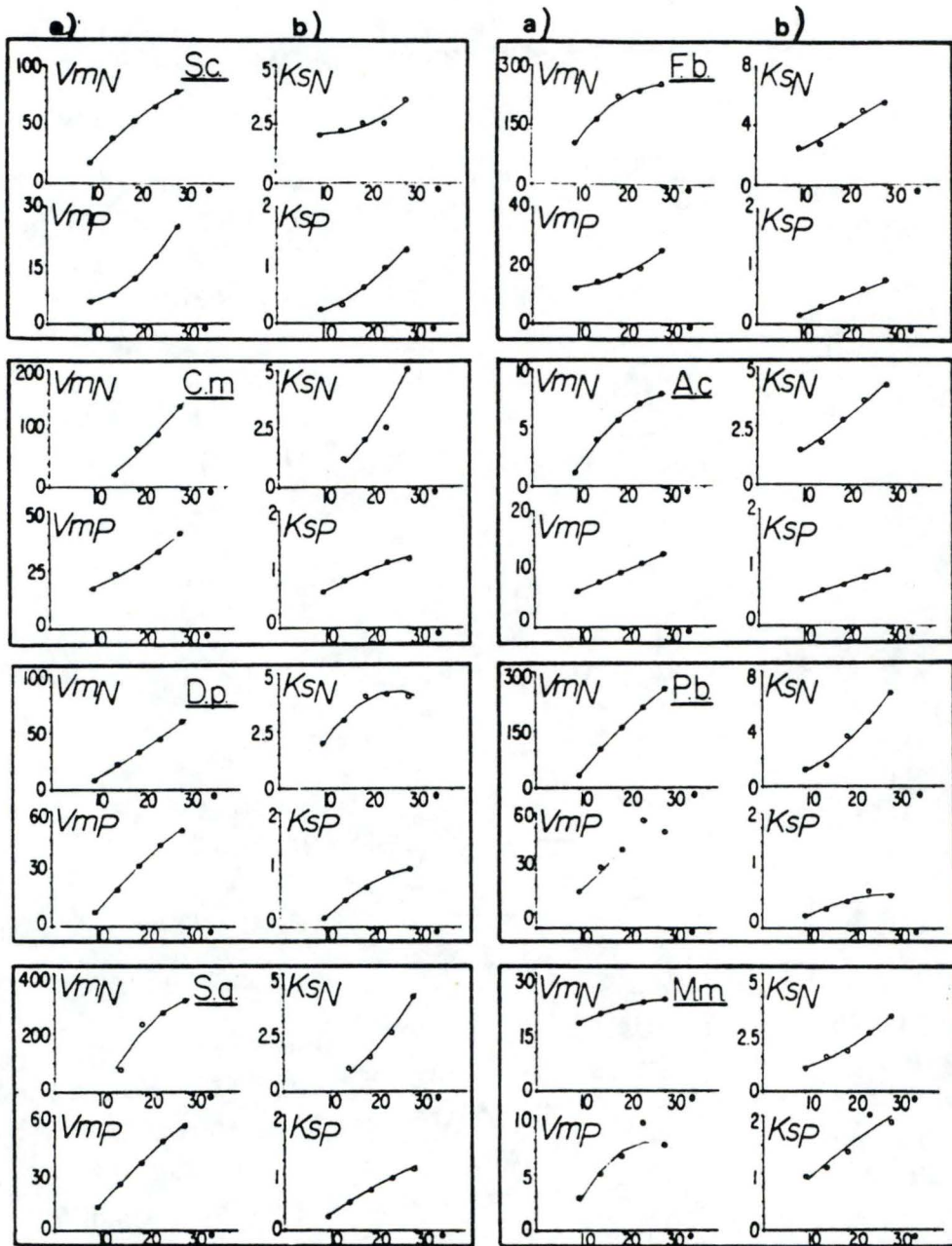


Figure 1.20. Evolution des paramètres V_m et K_m en fonction de la température (d'après Dauta, 1983) :

- a) relation entre la température et V_m ;
- b) relation entre la température et K_m .

- V_m est la vitesse d'assimilation maximale (est exprimée en $\mu\text{atg} / 10^9$ cellules/h.
 - K_s est la constante de demi-saturation (est exprimée en $\mu\text{atg/l}$).

II.3.1.3. Les facteurs écologiques influençant V_m et K_m .

a) facteurs abiotiques :

- température.

L'assimilation dépend du métabolisme et est donc influencée par la température. Une augmentation de température entraîne, chez certaines espèces, un accroissement des paramètres V_m et K_m . La Fig.1.20 représente les vitesses d'assimilation de l'azote pour huit espèces phytoplanctoniques (Dauta, 1983). L'augmentation de la vitesse de réaction avec la température peut s'expliquer par la loi d'Arrhenius:

$$\log K = A - E/RT$$

K : constante de vitesse de la réaction;

A : constante;

E : énergie d'activation de la réaction;

R : constante des gaz parfaits;

T : température.

La vitesse de réaction augmente avec la température jusqu'à une valeur maximale qui correspond à la température optimale. Au-delà, il se produit une dénaturation ou désactivation du système de transport.

L'effet inverse peut également se produire. Ainsi chez la diatomée marine *Skeletonema costatum*, on note une diminution du K_s quand la température décroît (Ullrich, 1983).

- lumière.

Le rôle joué par la lumière est complexe. L'assimilation du CO_2 et des nitrates sont deux processus qui utilisent le réducteur généré durant la photosynthèse. Les études de Kessler (1959) et Hattori (1962) suggèrent que les taux d'affinité des enzymes (pour

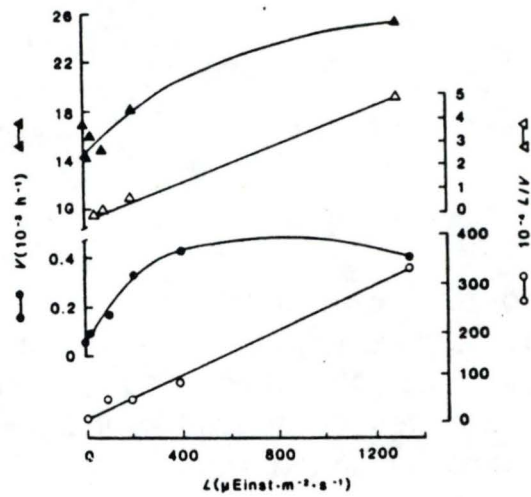


Figure 1.21. $V_{\text{NH}_4^+}$ (\blacktriangle) et $V_{\text{NO}_3^-}$ (\bullet , \circ) en fonction de l'intensité lumineuse et L/V en fonction de L (d'après Berman et al., 1984).

- L = intensité lumineuse;
- V = vitesse d'assimilation.

le réducteur) responsables de la réduction des nitrates en ammonium sont plus élevés à des taux d'irradiance faibles que ceux des enzymes impliqués dans la réduction du CO₂.

Il a aussi été remarqué, pour plusieurs espèces d'algues, une stimulation de l'assimilation des nitrates par la lumière (Kessler, 1964; McCarthy et al., 1982). Berman et al. (1984) ont examiné, sur des échantillons phytoplanctoniques provenant du lac Kinneret (Israël), l'effet de différentes intensités lumineuses sur l'assimilation de l'azote. Ainsi, dans la fraction nannoplanctonique où *Peridinium* est dominant, l'assimilation de NH₄⁺ et de NO₃⁻ augmente avec l'intensité lumineuse, mais à de hauts taux d'irradiance la vitesse d'assimilation des nitrates diminue (Fig.1.21). En mettant en graphique l'intensité lumineuse en fonction de L/V, ils ont obtenu une droite leur permettant de calculer une constante de saturation (K_{LT}) analogue à ce que l'on obtient pour des cinétiques enzymatiques (Fig.1.21).

Notons cependant que de petits taux d'assimilation des nitrates dans l'obscurité ou à de faibles intensités lumineuses ne reflètent pas nécessairement une limitation par le système de transport mais peuvent être dûs à de faibles taux de consommation intracellulaires.

- pH.

Beaucoup de données disponibles dans la littérature montrent ou suggèrent qu'il existe un pH optimum pour l'assimilation des nitrates, celui-ci variant d'un pH neutre à alcalin. Chez *Ankistrodesmus* par exemple, le pH optimum varie de 7,5 à 8,5 à la lumière tandis qu'à l'obscurité, il est de 6 (Ullrich, 1983).

- Source de carbone.

Il existe une interdépendance entre l'influence du pH et la source de carbone à la lumière. Davies (1953) mis en évidence une stimulation considérable de l'assimilation des nitrates par le glucose chez *Chlorella* à un pH de 6,5. Morris et Ahmed (1969) confirmèrent cela chez *Ankistrodesmus*. Ainsi, chez *A. braunii*, à la lumière et à un pH de 5-6, le CO₂ augmente les taux d'assimilation

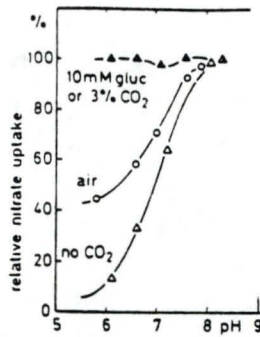


Figure 1.22. Effet des sources de carbone sur la dépendance au pH de l'assimilation des nitrates chez *Ankistrodesmus braunii* (d'après Ullrich, 1983).

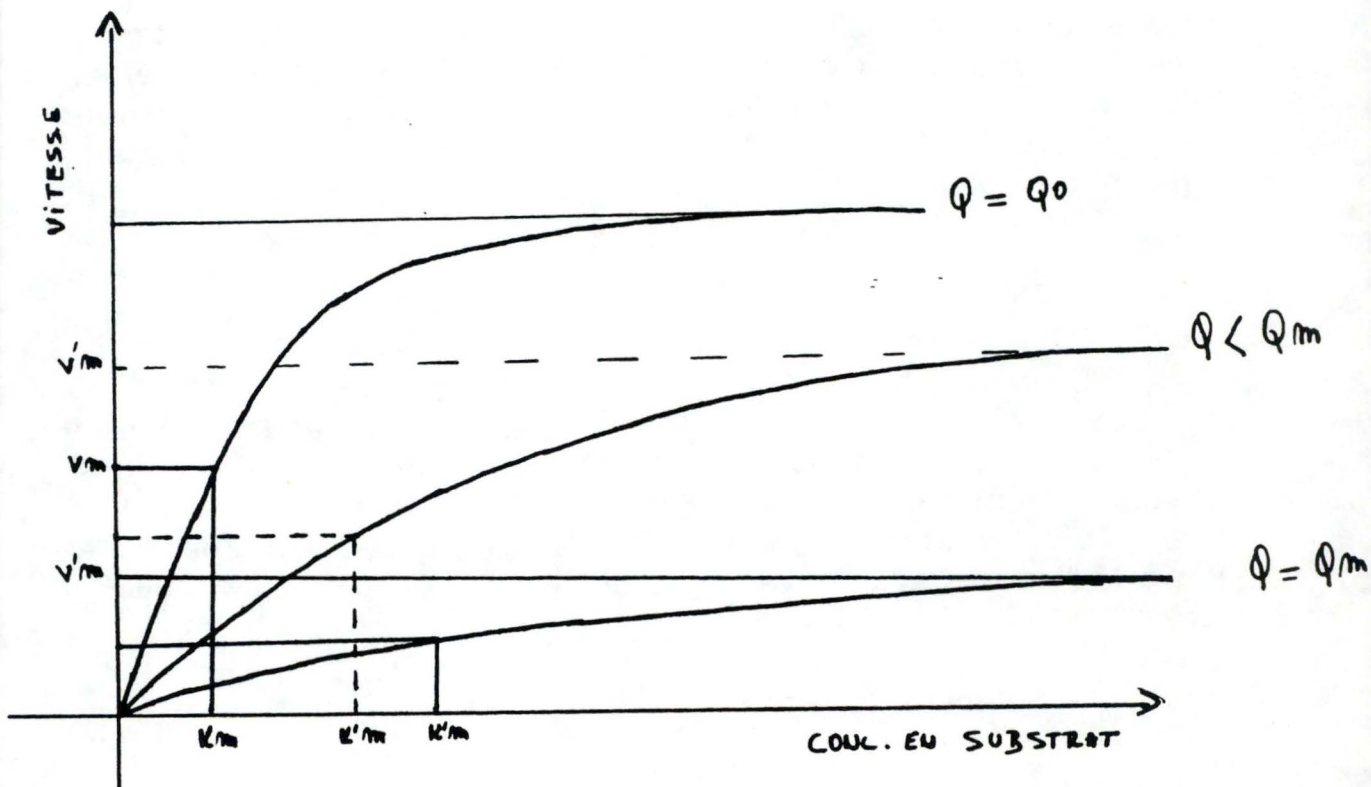


Figure 1.23. Relation entre la vitesse d'assimilation et la concentration externe en substrat en fonction de l'état des stocks intracellulaires (d'après Ducobu, 1989).

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

jusqu'à dix fois ou plus tandis qu'à l'obscurité ceux-ci n'augmentent que de 1,5 à 3 fois. Chez cette même algue, le glucose abolit la dépendance au pH (Fig.1.22). Mais comme montré par Grant et Turner (1969), l'effet stimuloire du glucose sur l'assimilation des nitrates ne concerne que quelques espèces, probablement celles possédant un système d'assimilation spécifique du glucose, comme *Chlorella fusca* (Ullrich, 1983).

- milieu d'origine.

En général, les algues d'eau douce (pour la plupart provenant de milieux méso ou eutrophe) ont une moindre affinité pour les nitrates que celles provenant de zones littorales ou de l'océan. Cela a été mis en relation avec le fait que les concentrations en nitrates dans la plupart des milieux d'eau douce sont plus élevées que dans la mer où les concentrations sont plus faibles, les algues planctoniques se nourrissant d'ailleurs principalement à partir d'autres sources azotées (Eppley et al., 1969). Ainsi, le K_S moyen de *Dunaliella tertiolecta*, espèce marine, est de $1,4 \mu\text{M}$ tandis que celui de *Chlorella sorokiniana*, espèce d'eau douce est de $4,3 \mu\text{M}$ (Ullrich, 1983).

b) facteurs biotiques:

- stocks intracellulaires.

Les stocks intracellulaires influencent les paramètres d'assimilation comme ceux de la croissance. Lorsque les stocks intracellulaires sont minima en azote, l'assimilation est maximale. Lorsque les algues sont en état de carence, il est possible de mesurer les paramètres V_m et K_m "absolus" c'est-à-dire les plus performants possible pour une espèce donnée. Par contre, si les stocks se rapprochent de leur valeur maximale, les besoins en azote diminuent et l'espèce devient moins performante pour l'assimilation. Les paramètres V_m et K_m ne sont donc que des paramètres apparents étant donné qu'ils varient avec la composition des stocks intracellulaires (Fig.1.23).

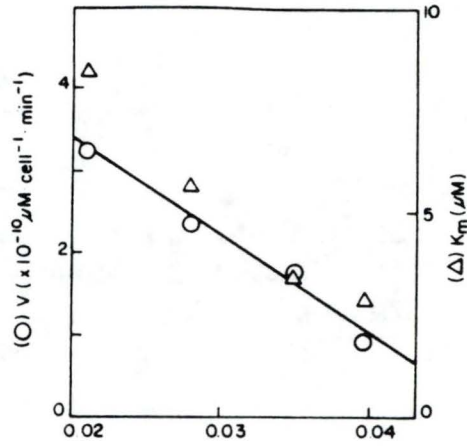


Figure 1.24. Valeurs de V et de K_M pour l'assimilation des nitrates en fonction des concentrations en acides aminés libres (d'après Rhee, 1978).

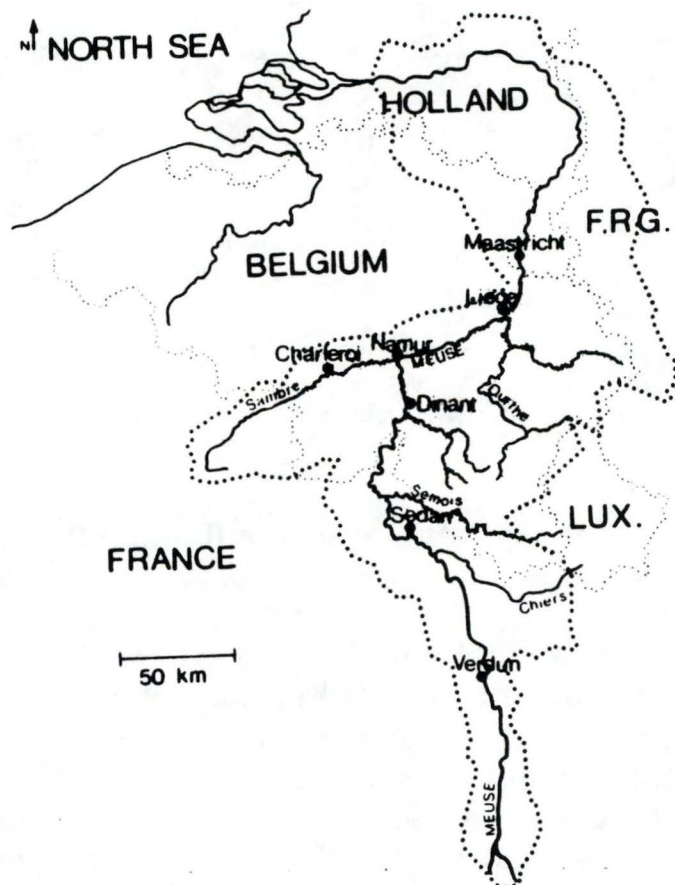


Figure 1.25. Représentation du bassin versant de la Meuse (d'après Micha et Borlee, 1989).

- concentration en acides aminés.

La variation de V semble être en relation avec la concentration en acides aminés libres (Fig.1.24). Chez *Anabaena cylindrica*, la nitrate, la nitrite et l'hydroxylamine réductases sont réprimées par l'ammonium et le glutamate (Hattori, 1962). Chez *Chlorella*, un apport exogène de certains acides aminés, incluant le glutamate, réprime la nitrate réductase (Abdullah et Ahmed, 1975). Une preuve indirecte de la dépendance de la vitesse d'assimilation en fonction de la concentration en acides aminés est montrée chez *Chlorella vulgaris*. Ainsi, l'assimilation du soufre varie positivement avec le niveau des acides aminés sulfurés dans le pool (Passera et Ferrari, 1975).

- taille cellulaire et forme.

Une espèce présentant un rapport S/V élevé sera plus performante en ce qui concerne la vitesse d'assimilation (V_{max}) car si la surface est plus élevée, le nombre de transporteurs l'est aussi (Ducobu, 1989).

III. Description du milieu étudié : la Meuse.

La Meuse est une rivière de près de 900 km, elle prend sa source dans le département français des Vosges, près du plateau de Langres et se jette dans la mer du Nord aux Pays-Bas. Son bassin hydrographique couvre une superficie d'environ 35.000 km² et s'étend sur cinq pays : la France, le Luxembourg, la Belgique, l'Allemagne et les Pays-Bas (Fig.1.25).

Depuis le 18ème siècle, la région couverte par des forêts décidues a été réduite à l'avantage du développement industriel et agricole (Génicot et al., 1973). Actuellement, en France, un quart du bassin est occupé par les forêts, tandis que les cultures et les pâturages occupent le reste (George, 1972). L'industrialisation s'est accompagnée de la concentration de la population dans les grandes villes (Charleville en France, Liège en Belgique, Maastrich aux Pays-Bas...). Cela mena notamment à un captage et à la diversion de l'eau souterraine et de surface afin de fournir celle-ci

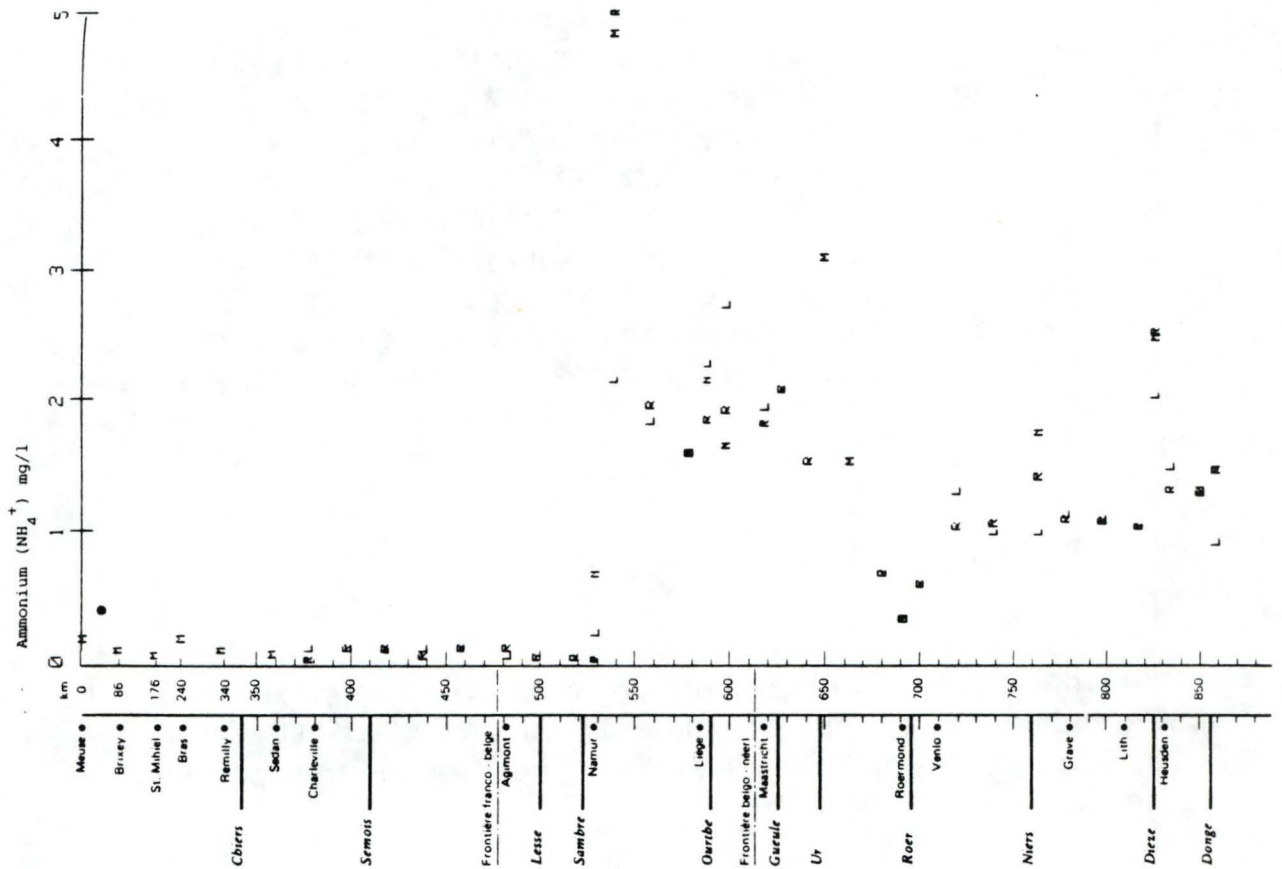


Figure 1.26. Profil de qualité de la Meuse en ce qui concerne l'ammonium (d'après Van Craenenbroeck et al., 1983).

Légende : L : rive gauche;
 r : au milieu;
 R : rive droite;
 * : échantillon composé;
 Z : affluent.

à la population et à l'industrie, avec comme conséquence une baisse du débit de la rivière (16,4 % entre 1900 et 1960 selon Vereestraeten, 1972). De plus, l'absence de stations d'épuration dans les grandes villes a mené à une altération de la qualité de l'eau (augmentation de la concentration en ammoniacque en aval de Liège) et à une certaine eutrophisation (van Craenenbroeck, 1986).

III.1. Profils longitudinaux de qualité de la Meuse.

La R.I.W.A. et la C.I.B.E. ont effectué une étude de la Meuse au mois de septembre 1982 pendant la période annuelle d'étiage de la rivière. La Meuse a été étudiée dans sa totalité sur des dizaines de sites entre sa source et son embouchure. Les mesures ont été effectuées pendant une période de faibles débits parce qu'à ce moment-là les concentrations des polluants sont supposées être plus élevées. Différents paramètres physico-chimiques ont été mesurés.

III.1.1. L'ammonium.

Pendant cette période d'étude, l'eau de la Meuse ne contenait presque pas d'ammonium entre la source et sa confluence avec la Sambre. Cette quasi-absence d'ammonium résulte entre autres de sa transformation par des bactéries nitrifiantes et de son assimilation par les algues. Par contre, en aval de la confluence avec la Sambre (Namèche) la Fig.1.26 montre des valeurs très élevées. On a relevé une concentration maximum de 5 mg NH_4^+/l ce qui dépasse la norme la moins contraignante de la C.E.E., c'est-à-dire la A3-1 de 4 mg NH_4^+/l . En aval de Namèche, on note une diminution de la concentration mais sans jamais revenir aux valeurs basses obtenues en aval de la Sambre. Ensuite l'influence des déversements à Liège, ceux près de l'Ur, de la Niers et de la Dieze se marque par une augmentation des concentrations. Les processus de dilution et de nitrification sont responsables des diminutions après ces valeurs de pointe. Il faut aussi noter que la diminution la plus prononcée a été enregistrée sur le tronçon Ur-Roermond. Ceci serait dû à une nitrification intensifiée dans la rivière, provoquée par des déversements d'eaux usées nitrifiantes provenant d'une usine chimique.

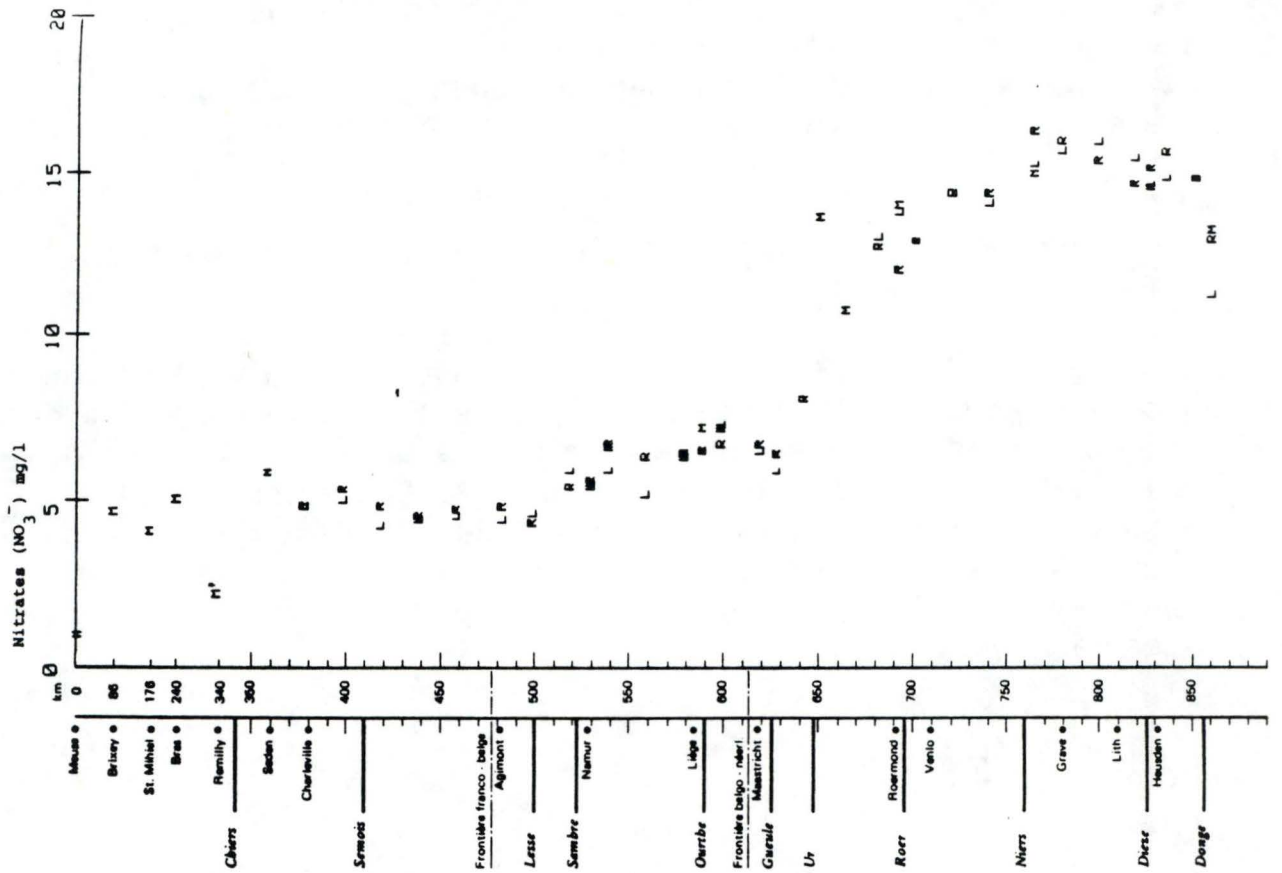


Figure 1.27. Profil de qualité de la Meuse en ce qui concerne les nitrates (d'après Van Craenenbroeck, 1983).

Légende :

- L rive gauche;
- r au milieu;
- R rive droite;
- * échantillon composé;
- Z affluent.

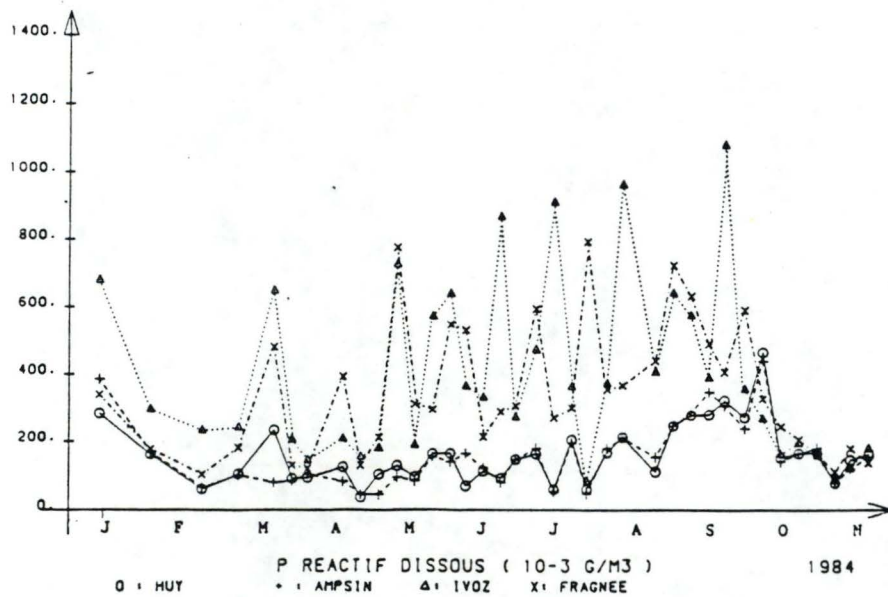
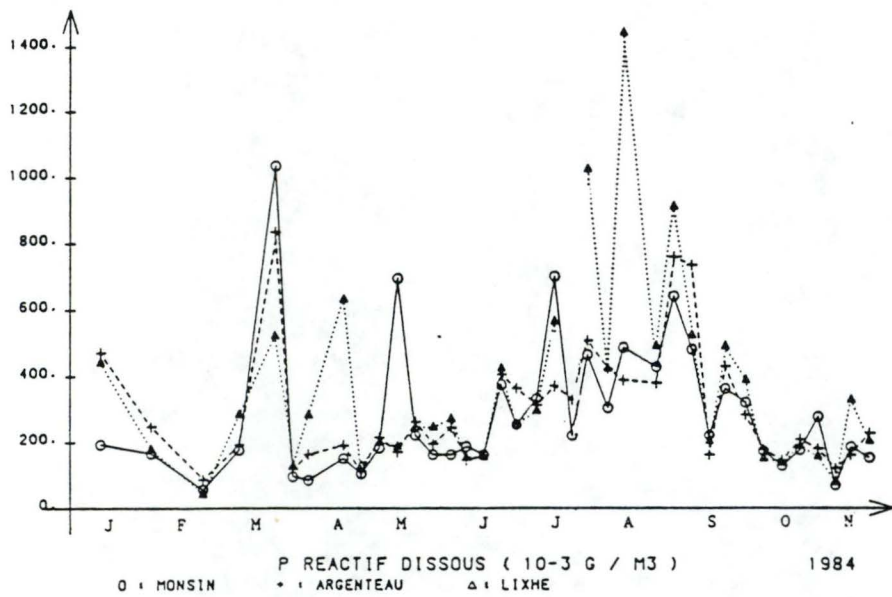


Figure 1.28. Evolution des concentrations en phosphore réactif dissous en différents points de la Meuse durant l'année 1984 (d'après le Ministère de la Région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1985).

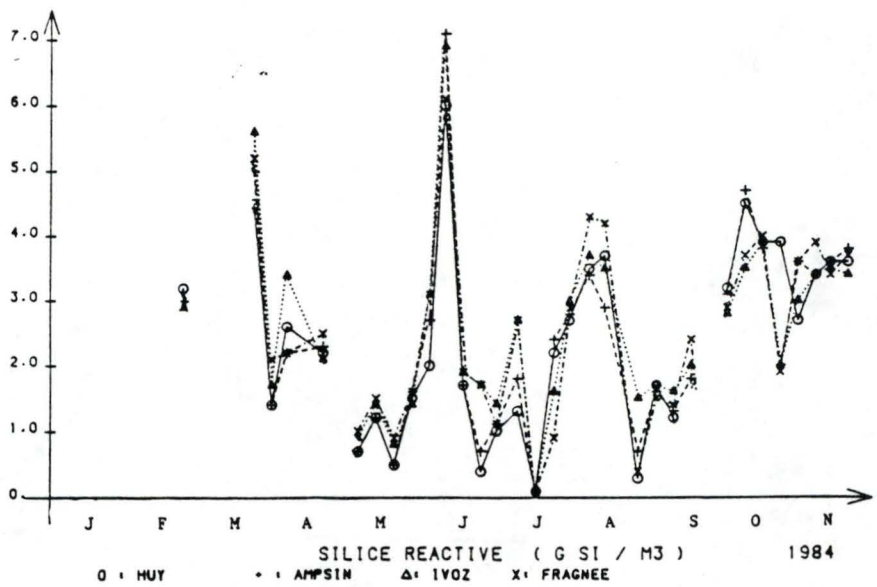
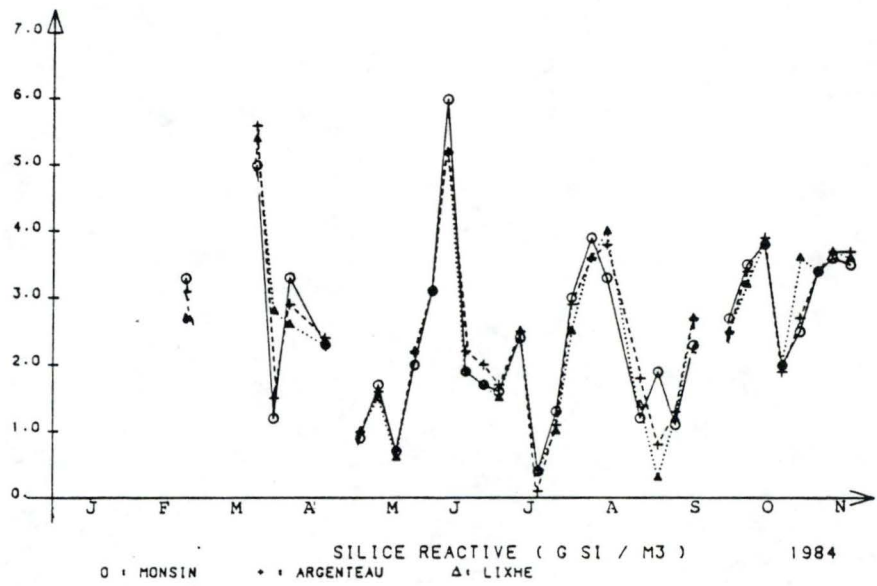


Figure 1.29. Evolution des concentrations en silice réactive en différents points de la Meuse durant l'année 1984 (d'après le Ministère de la Région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1985).

III.1.2. Les nitrates.

Entre la source et la Sambre le niveau des concentrations reste à peu près constant (Fig.1.27). La présence des nitrates est due à des rejets d'eaux usées mais aussi à l'agriculture. La concentration augmente légèrement en aval de la Sambre et à Liège. La plus forte augmentation est celle enregistrée en aval du confluent avec la déviation de l'Ur, dans laquelle une importante usine chimique déverse, après épuration biologique, des eaux usées contenant beaucoup de nitrates. La concentration en nitrates augmente encore en aval, ce qui est dû à une nitrification accélérée de déversements d'eaux par les affluents de la Roer et de la Niers. Notons cependant que les valeurs observées ne dépassent pas la norme la plus stricte de la C.E.E. (25 mg NO_3^-/l).

III.1.3. Le phosphore dissous.

Celui-ci est également très influencé par les rejets d'eaux usées, notamment d'origine industrielle. L'évolution des concentrations en phosphore dissous est similaire à Huy et à Amsin comme le montre la Fig.1.28. Par contre, de nombreux pics apparaissent à partir d'Ivoz-Ramet, répartis de façon très discontinue, ce qui est caractéristique de pollutions d'origine industrielle. Ces teneurs élevées en phosphore dissous se maintiennent en aval de Liège (Ministère de la région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1985). A Liège, un maximum de 5,5 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$ a été noté. Cette valeur dépasse de loin la norme la moins contraignante de la C.E.E. (0,9 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$) (van Craenenbroeck et al., 1983).

III.1.4. La silice réactive.

La Fig.1.29 montre une évolution remarquable en relation avec le développement du phytoplancton. Ce dernier est en effet constitué en majeure partie de diatomées qui forment une carapace siliceuse bivalve. Les pics de développement phytoplanctonique se marquent régulièrement par une diminution de la concentration en silice; des pics de silice apparaissent par contre pendant les périodes de faible croissance du plancton. Ainsi, sans pouvoir être

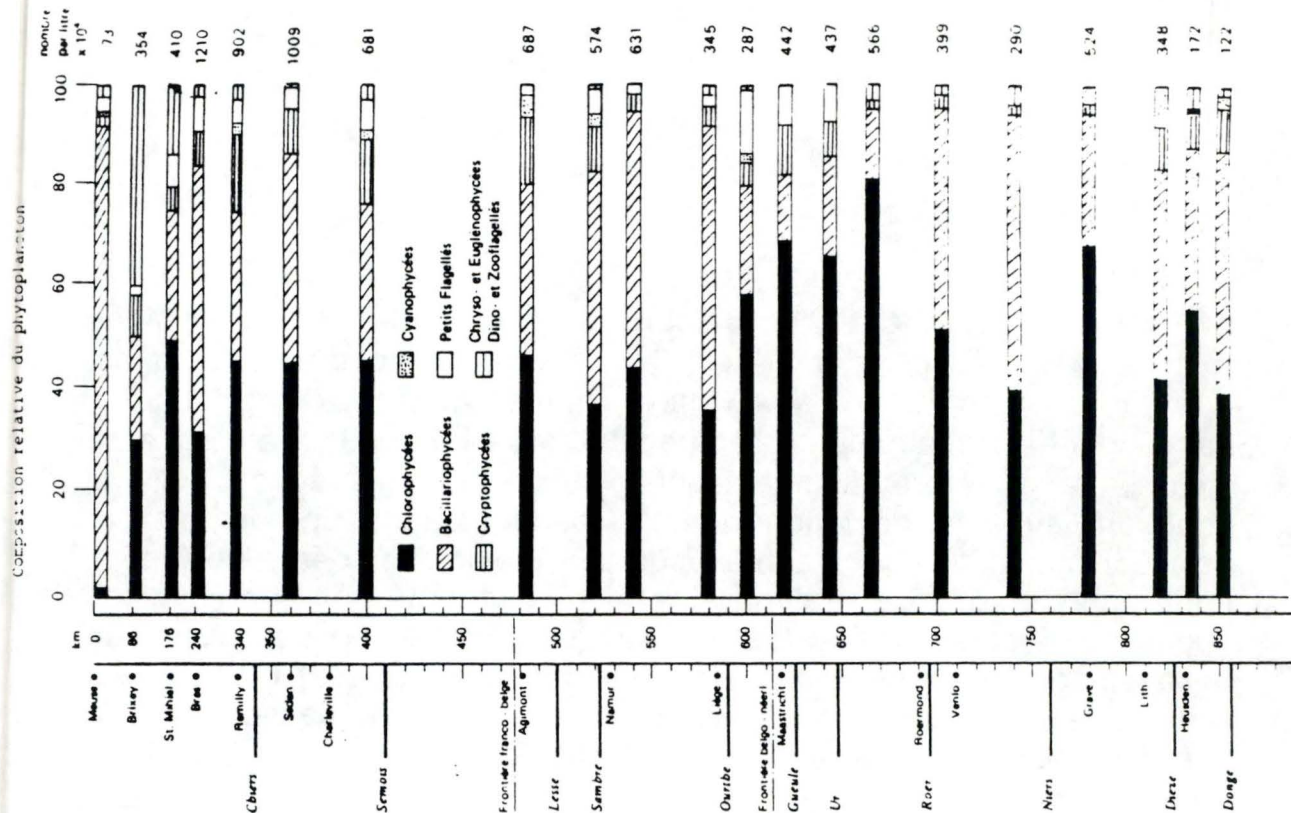


Figure 1.30. Profil de qualité de la Meuse. Composition relative du phytoplancton (d'après Van Craenenbroeck, 1983).

Tableau 1.4. Comparaison des différents groupes phytoplanctoniques de la Meuse belge supérieure entre l'été 1946, 1953 et l'automne 1981 (d'après Micha et Borlée, 1989).

	Summers 1946 and 1953 Index of abundance	Autumn 1981 Relative abundance (%)
CHLOROPHYTA		(30.9)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0	9.2
<i>Coelastrum microporum</i>	—	5.7
<i>Pediastrum boryanum</i>	ac	+
<i>Pediastrum duplex</i>	ar	+
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	0	3.6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	X	2.1
CHRYSOPHYTA		(63.0)
Chrysophyceae		
<i>Dinobryon divergens</i>	ac	—
<i>Synura uvella</i>	—	0
Bacillariophyceae (Diatomeae)		
<i>Asterionella formosa</i>	c	+
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	—	0.9
<i>Diatoma vulgare</i>	r	+
<i>Fragilaria crotonensis</i>	c	0.3
<i>Melosira italica</i>	ac	1.5
<i>Melosira varians</i>	ac	+
<i>Nitzschia acicularis</i>	X	+
<i>Nitzschia actinastroides</i>	X	0
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	—	50.1
<i>Synedra acus</i> (and var. <i>radians</i>)	ac	0
CYANOPHYTA		(6.0)
<i>Microcystis cf. aeruginosa</i>	—	6.0
EUGLENOPHYTA	rr	0.2
PYRROPHYTA		(0.3)
<i>Cryptomonas sp.</i>	0	0.2

— = not listed
c = common
ac = fairly common
ar = quite rare
r = rare
rr = very rare
x = present
+ = single case
0 = not indicated

considérée comme un élément limitant à proprement parler vu ses concentrations généralement élevées dans la Meuse, la silice pourrait limiter la croissance du phytoplancton lors des blooms importants (Ministère de la région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1985).

III.1.5. Profil du phytoplancton.

La Fig.1.30 donne le profil longitudinal des fréquences relatives cumulées des espèces d'algues les plus importantes. Il apparaît que le phytoplancton était composé sur tout le parcours de l'eau pour 80% de Chlorophycées (algues vertes) et Bacillariophycées (diatomées) à l'exception du site de Boriscey-aux-Chanoines où l'échantillon comprenait 40% de Chrysophycées et d'Euglénophycées (van Craenenbroeck et al., 1983).

Deux études importantes concernant le phytoplancton de la Meuse belge ont été menées durant l'été 1946 et 1953 et en automne 1981. En 1946 comme en 1981, les diatomées restent le groupe dominant du phytoplancton mais les espèces dominantes ont changé : *Asterionella formosa* connue comme étant une espèce mésotrophique à eutrophique a diminué en faveur de *Stephanodiscus hantzschii*, une espèce eutrophe. *Dinobryon divergens*, une espèce a tendance oligotrophe a également disparu. Notons aussi que les algues vertes ou Chlorophycées sont devenues plus abondantes (tableau 1.4) (Micha et Borlee, 1989).

III.2. Problème de l'eutrophisation.

L'écosystème des rivières et des fleuves se caractérise globalement par un apport de sels minéraux et de matières organiques à partir de l'amont. Ces substances sont utilisées par la biocénose, il en résulte une production de biomasse, de déchets et de substances dissoutes dont une partie est exportée vers l'aval. La structure des milieux lotiques suppose généralement un enrichissement progressif en sels minéraux et substances organiques de l'amont vers l'aval. En effet, les rejets d'eaux usées industrielles (chargées en matières organiques et/ou minérales), les déversements d'eaux usées domestiques (chargées en phosphate, ammonium et matière organique), le lessivage des

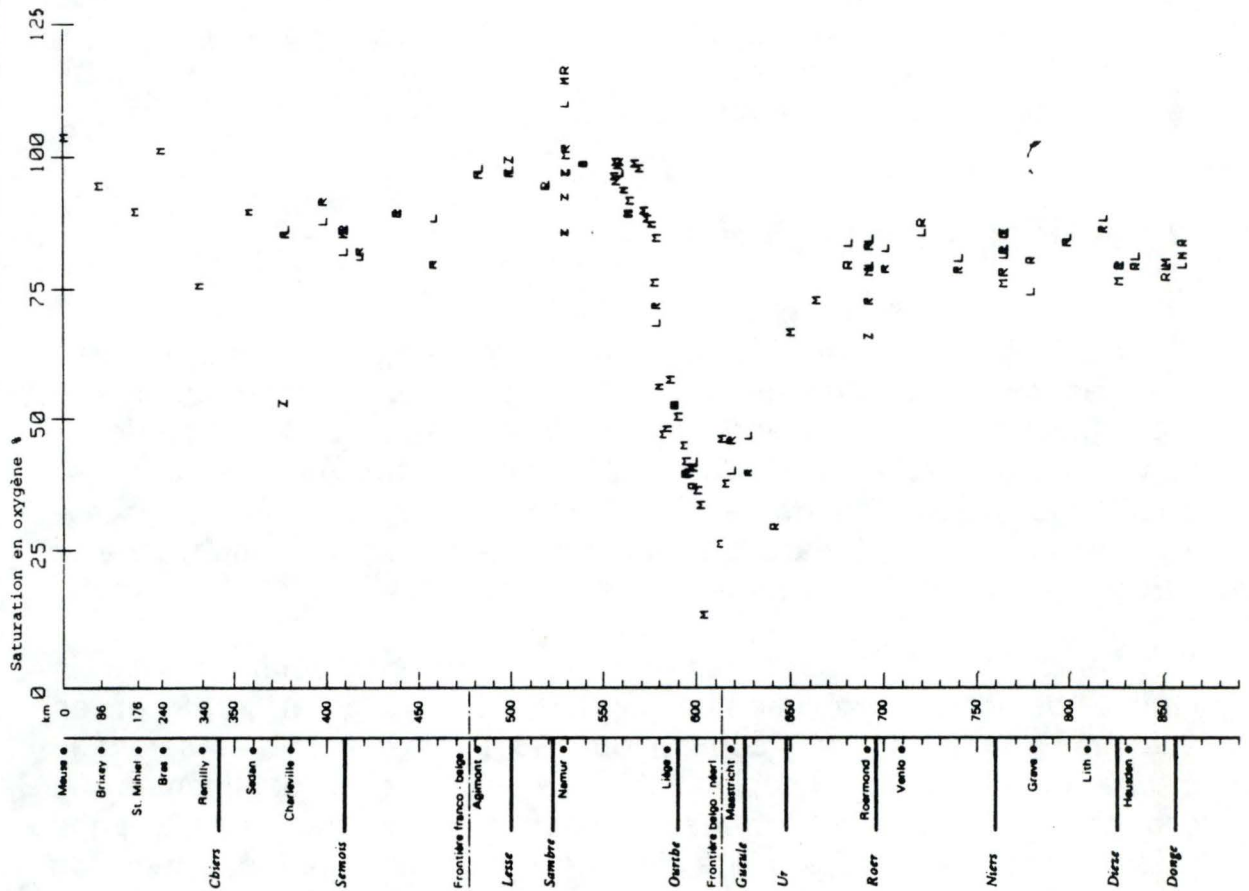


Figure 1.31. Profil longitudinal de la saturation en oxygène de la Meuse (d'après Van Craenenbroeck, 1983).

- Légende :**
- L : rive gauche;
 - r : au milieu;
 - R : rive droite;
 - * : échantillon composé;
 - Z : affluent.

terres agricoles entraînant des quantités importantes d'engrais provoquent un accroissement de la quantité de sels minéraux disponibles pour le métabolisme des plantes. Cet enrichissement des eaux en matières nutritives est, dans un premier temps bénéfique car il entraîne une augmentation de la masse d'algues présente dans le milieu et donc le nombre de consommateurs de la chaîne trophique (poissons, crustacés...). La production augmente donc sensiblement et avantageusement. Mais à la mort de cette génération d'algues, la masse de matière organique qu'elle constitue s'ajoute à la charge provenant des rejets divers. Cette abondance de substrat provoque une multiplication bactérienne plus importante qui diminue la teneur en oxygène de l'eau lors de l'activité minéralisante de ces bactéries. A Huy et à Waulsort par exemple, il ne se pose guère de problème d'oxygénation de la rivière (moyenne proche de 100 % de la saturation et valeur minimale de 72 % de la saturation). Des mesures effectuées sur l'ensemble du cours belge de la Meuse ont montré qu'il n'en était pas de même dans la partie aval de la Meuse belge (Servais, 1987). Le profil longitudinal (Fig.1.31) se caractérise surtout par un minimum très marqué qui s'étendait de Huy (Ben-Ahin) à Maasbracht, soit sur une longueur de plus de 100 km. La baisse de la concentration commençait en aval d'un déversement d'une sucrerie à Wanze. Au moment des prélèvements, cette sucrerie fonctionnait à plein rendement. L'effet cumulé des eaux d'égout des villes de Liège, de Huy et de la région industrielle de Seraing-Ougrée d'une part, et les rejets industriels de la sidérurgie et les rejets thermiques des centrales électriques d'autre part, menait à une situation de presque anaérobiose à Cheratte en aval de Liège (1,2 mg O₂/l). Il a d'ailleurs été constaté une mortalité importante de poissons à cet endroit. Sur le trajet français, une nette sous-saturation a été observée à Remilly.

En conclusion, l'eau de Meuse satisfait aux exigences de la C.E.E. pour la catégorie A₁ (70 %), à l'exception d'une zone de 80 km entre Ivoz-Ramet et Maaseik. La valeur limite de la catégorie A₃ (30 %) a même été dépassée sur une distance de 10 km en aval de Liège (van Craenenbroeck, 1983).

III.2.1. Manifestation de l'eutrophisation : évolution de la concentration en chlorophylle a .

Dans le cas de rivières à production planctonique comme la Meuse, l'eutrophisation se manifeste par de fortes augmentations de la densité algale. La teneur en chlorophylle a donne une idée de l'importance de la population d'algues photosynthétiques présentes dans le fleuve. Les figures en annexe 1 donnent l'évolution des concentrations en chlorophylle a en différents points de la Meuse durant ces vingt dernières années. Les trois stations étudiées (Liège-Monsin, Jambes et Namèche) montrent une augmentation de la teneur en chlorophylle a depuis les années 80-82. Celle-ci se marque par une augmentation de la biomasse phytoplanctonique qui se déplaçant plus ou moins vite suivant le débit et la section du fleuve, est transportée plus ou moins loin en aval, de sorte que la pollution n'est pas strictement localisée : elle affecte, au contraire, toute une portion du fleuve à l'aval du ou des points d'enrichissement en substances nutritives. De plus, le stockage intracellulaire du phosphore et de l'azote par les algues phytoplanctoniques peut encore contribuer à l'extension de la zone d'influence d'une source d'eutrophisation (Descy, 1988).

III.2.2. Les causes de l'eutrophisation.

III.2.2.1. Evolution des concentrations en nitrate et en ammonium.

Au cours d'une étude sur l'établissement d'un modèle de fonctionnement de la Haute Meuse belge, des informations diverses ont été recueillies sur la Haute Meuse en 1983 et 1984 .

En ce qui concerne les nitrates, les concentrations sont élevées pendant la période hivernale, moment où les apports par le bassin versant (lessivage des sols) et le débit (200-800 m³/sec.) sont élevés et où l'activité biologique est nulle ou faible. Par contre, en période de débits plus faibles (30-80 m³/sec.), la réduction des apports et l'utilisation par les végétaux autotrophes induit une nette diminution des concentrations qui ne descendent

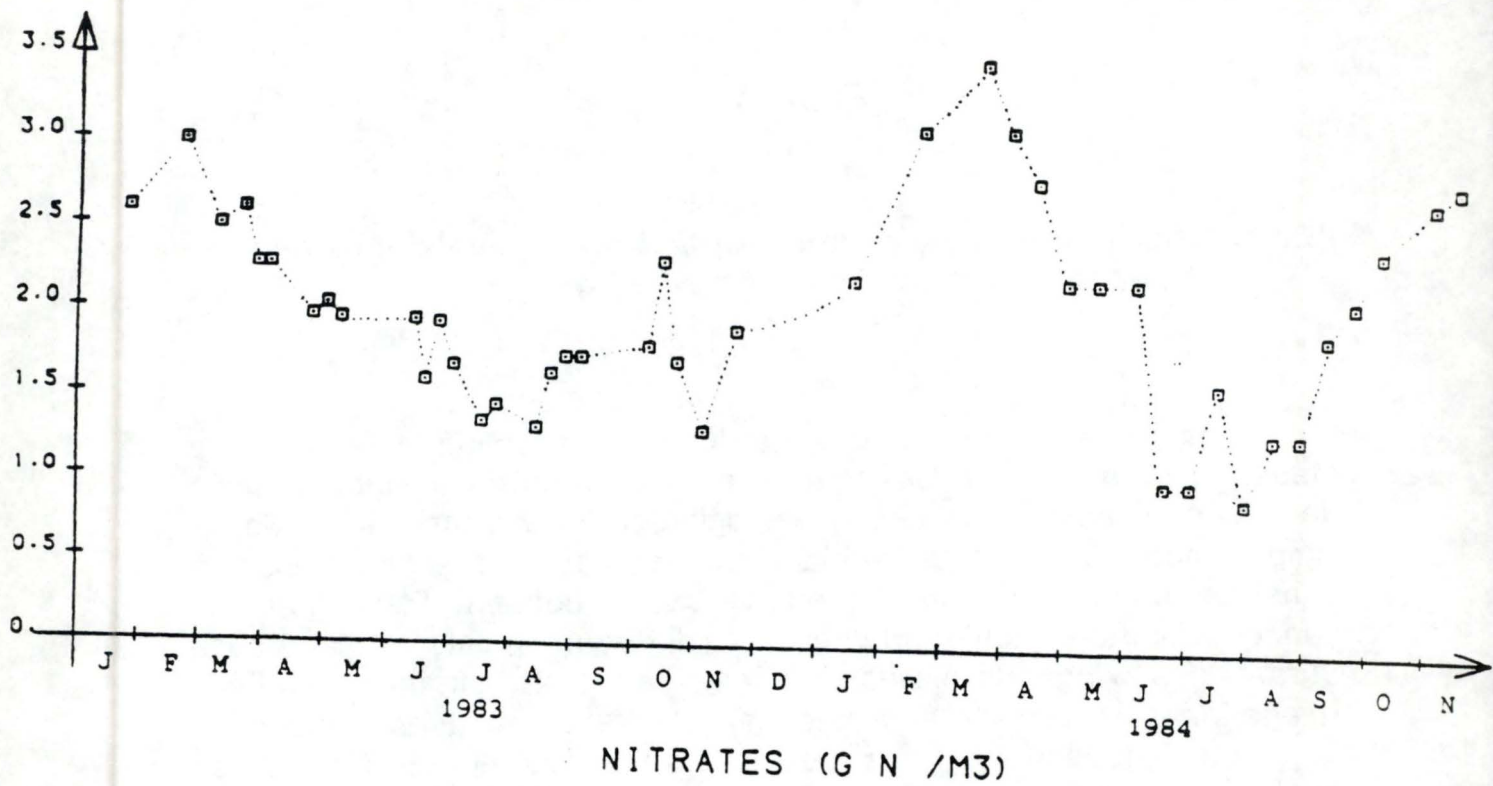


Figure 1.32. Concentrations en nitrates dans l'eau de la Meuse lors des campagnes de mesure (d'après Billen et al., 1985).

Figure 1.33. Evolution des concentrations en nitrates annuelle pour trois stations (Liège, Jambes, Namèche) de la Meuse belge de 1962 à 1986 (d'après Micha et Borlee, 1989).

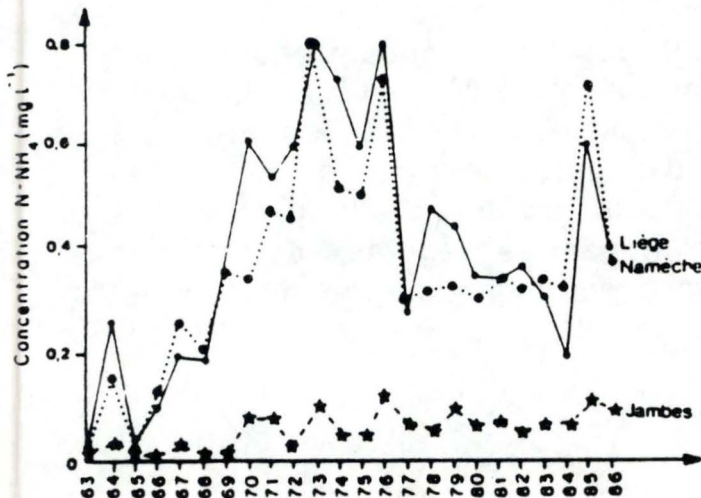
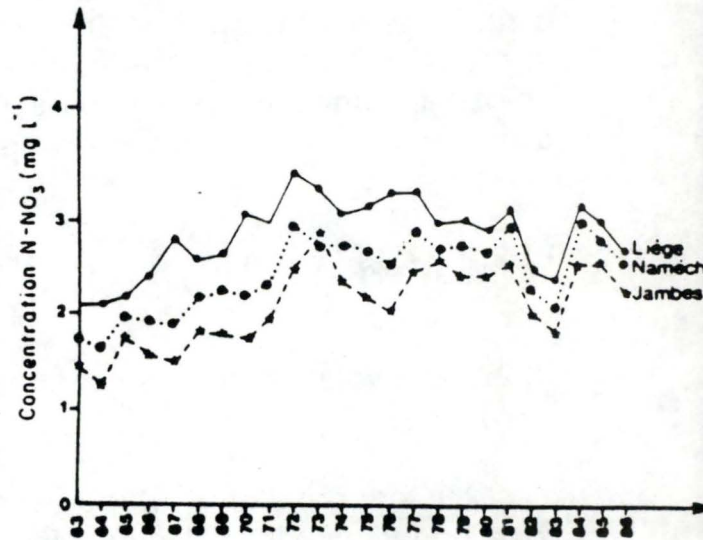


Figure 1.34. Evolution des concentrations en ammonium annuelles pour trois stations (Liège, Jambes, Namèche) de la Meuse belge de 1962 à 1986 (d'après Micha et Borlee, 1989).

cependant pas en-dessous de 1 mg N/l (Fig.1.32) (Billen et al., 1985).

Il est également intéressant de suivre l'évolution des concentrations en nitrates et en ammonium durant les vingt dernières années.

III.2.2.1.1. Les nitrates.

Les concentrations moyennes ont tendance à augmenter de 1962 (1,5 mg N/l) à 1974 (3,3 mg N/l) aux trois stations (Liège-Monsin, Jambes et Namèche, Fig.1.33) où les échantillons ont été prélevés. Ensuite, les concentrations en nitrates semblent se stabiliser et même diminuer lentement à partir de 1981 pour réaugmenter en 1983-1984 et rediminuer légèrement par la suite. Notons que les valeurs mesurées restent inférieures aux normes eaux potabilisables/ classe A2 (cfr. figures en annexe 2).

III.2.2.1.2. L'ammonium.

Les concentrations moyennes, sur ces vingt dernières années, sont restées basses dans la Meuse belge supérieure (station de Jambes) mais elles ont clairement augmenté, depuis 1967 dans la Meuse belge inférieure, changeant de quelques $\mu\text{g N/l}$ à 800 $\mu\text{g N/l}$ en 1976 (Namèche et Liège) et diminuant après à 400 $\mu\text{g N/l}$ (Fig.1.34) qui est encore une valeur élevée indiquant une altération de l'environnement aquatique (Micha et Borlee, 1989). On note une élévation importante des concentrations durant les années 1973, 76 et 85.

Les figures en annexe 3 donnent l'évolution de la concentration en ammonium par rapport à la norme classe A2.

Remarque :

La Directive de la C.E.E. 75/440 du 16 juin 1975 fait une distinction entre trois types d'eau de surface, en fonction des filières de traitement mises en oeuvre, appelés A1 (traitement physique : exigences les plus sévères), A2 (traitement physico-chimique simple) et A3 (traitement physico-chimique poussé :

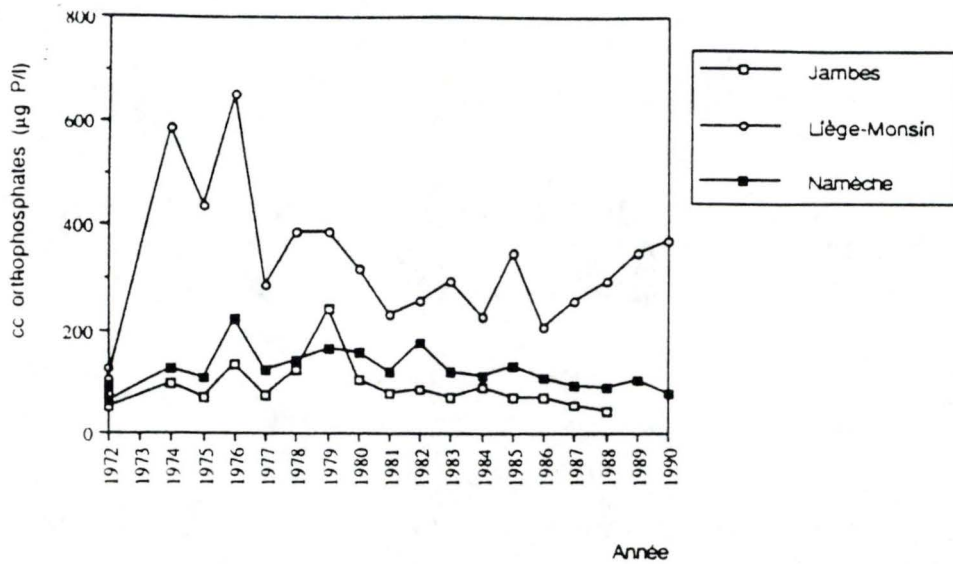


Figure 1.35. Evolution de la concentration en phosphates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

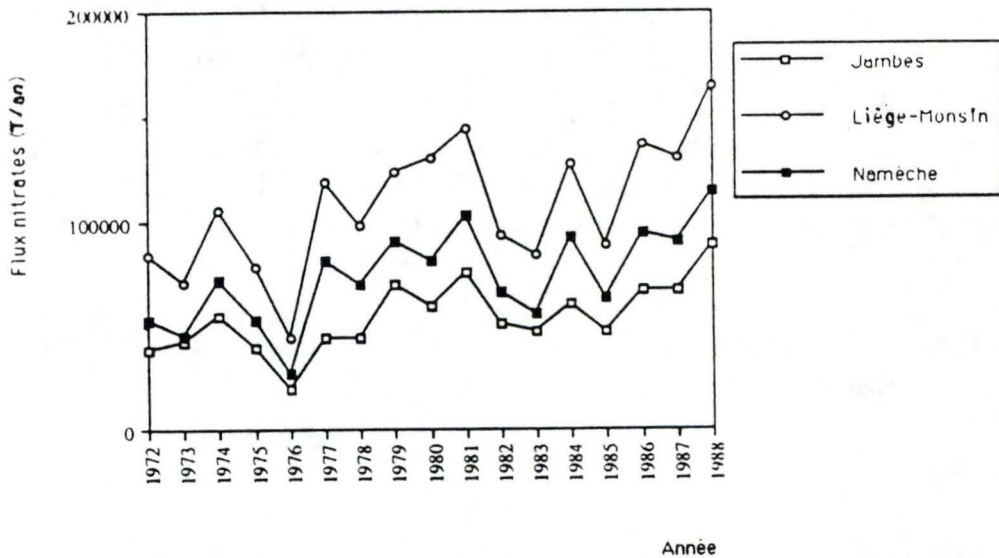


Figure 1.36. Evolution des flux de nitrates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) de 1972 à 1988 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

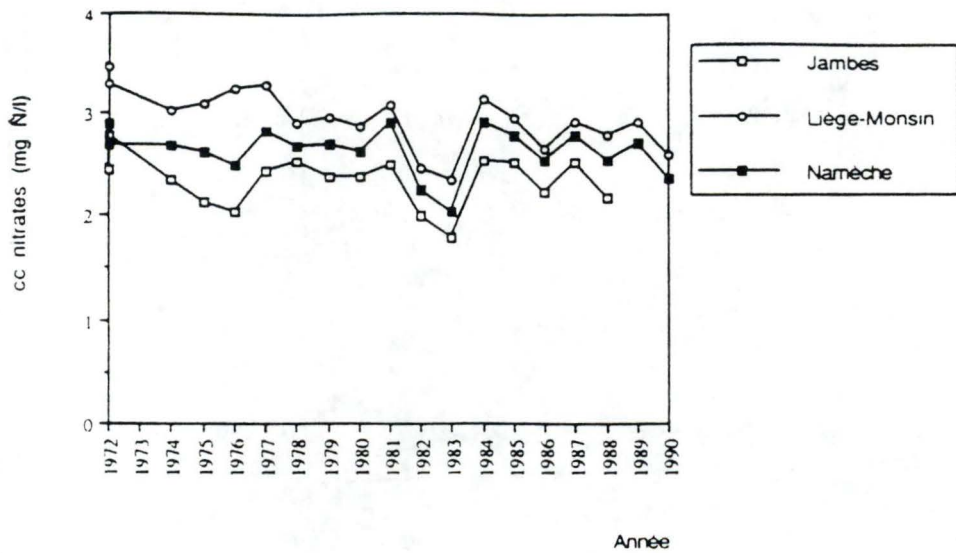


Figure 1.37. Evolution de la concentration en nitrates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

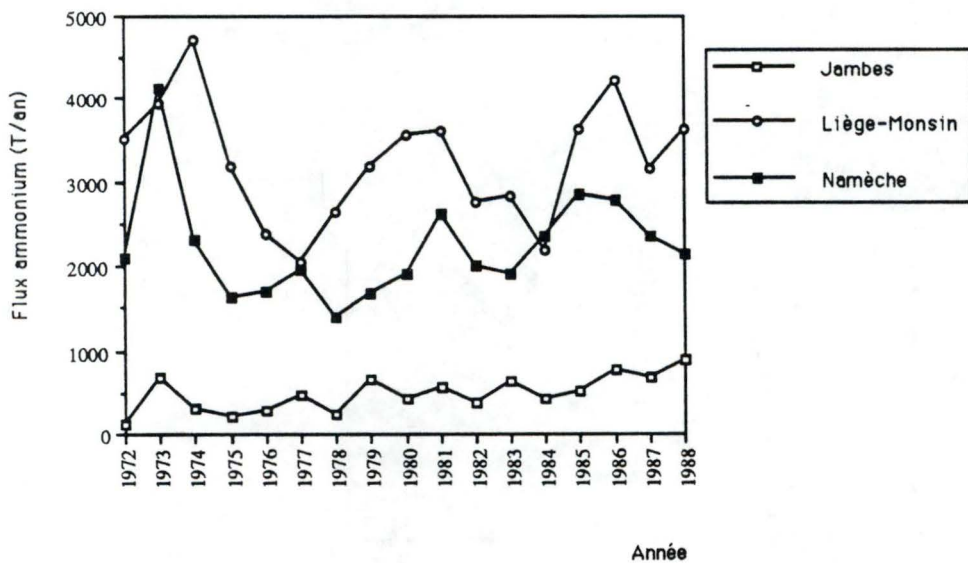


Figure 1.38. Evolution des flux d'ammonium en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

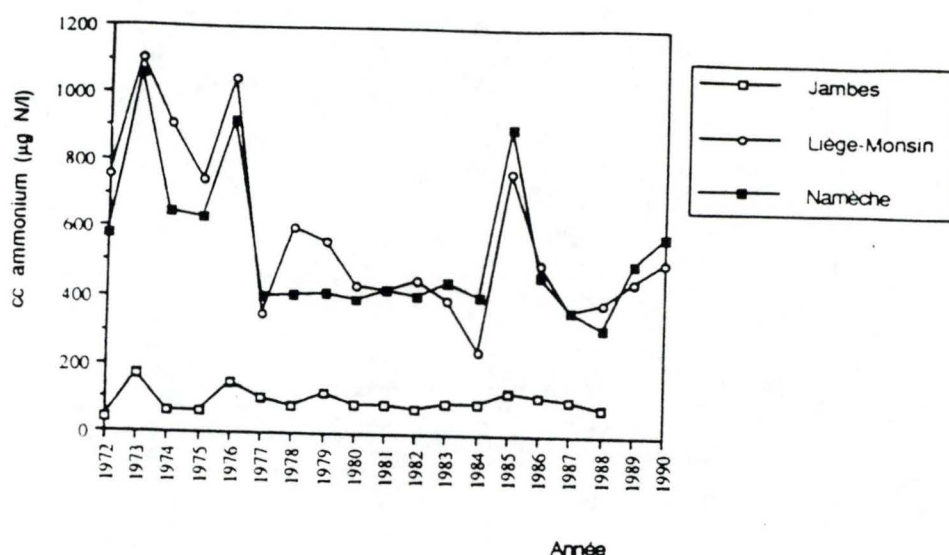


Figure 1.39. Evolution de la concentration en ammonium en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

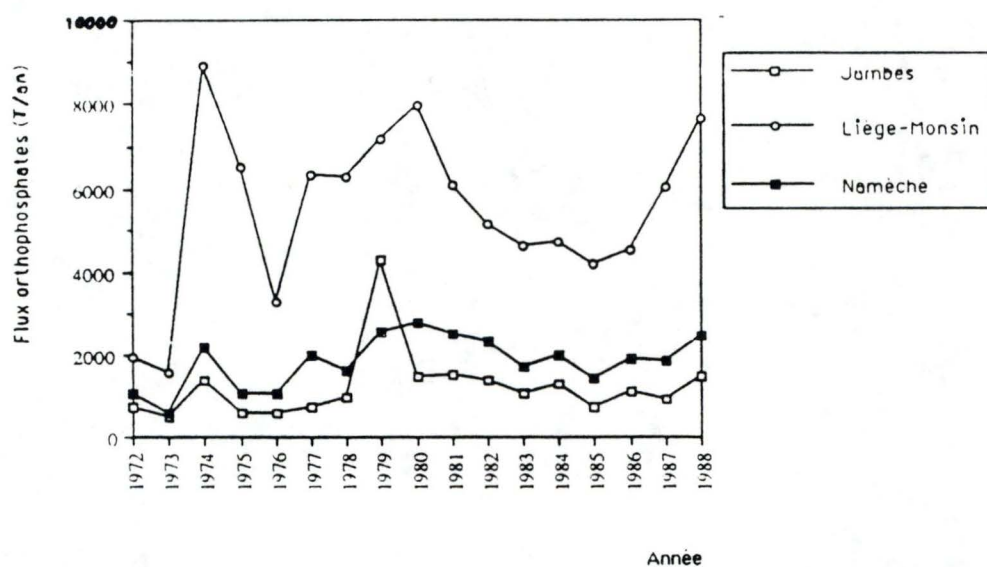


Figure 1.40. Evolution des flux d'orthophosphates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

exigences les moins contraignantes). La Directive donne aussi deux types de valeurs limites : valeurs I ou valeurs impératives, qui ne peuvent être dépassées par les Etats-membres, et les valeurs G, ou valeurs guides, qui doivent servir de fils conducteurs aux Etats-membres lors de la fixation des normes nationales (van Craenenbroeck, 1982).

III.2.2.2. Evolution des concentrations en phosphates.

Comme pour l'ammonium, c'est à Jambes que les concentrations restent les plus basses tandis qu'elles ont augmenté depuis les années 1973 à Liège-Monsin et depuis 1976 à Namèche (Fig.1.35), les valeurs restant inférieures à la valeur guide (cfr. figures en annexe 4). C'est à Liège-Monsin que la situation est la plus critique avec des valeurs dépassant de beaucoup celle-ci.

III.2.2.3. Evolution des flux.

En regardant l'évolution des flux de nitrates depuis 1972 à 1988 (Fig.1.36), nous remarquons une augmentation régulière depuis 1983. Ceci est intéressant car les flux représentent ce qui est réellement apporté par le drainage des sols du bassin versant. Il y a donc une augmentation des apports qui ne se marque pas en observant seulement l'évolution de la concentration en nitrates dans la rivière (Fig.1.37), les mesures physico-chimiques dépendant de toutes sortes de facteurs biotiques et abiotiques au moment des prélèvements. Ainsi, de la charge globale d'environ $40 \cdot 10^3$ T N/an, le quart disparaît du fleuve suite à la dénitrification (Dermine, 1985).

La Fig.1.38 représente l'évolution des flux d'ammonium. On peut remarquer une hausse durant les années 1972-73 et 86 à Jambes et à Liège-Monsin ceci correspondant à une augmentation de la concentration dans la rivière (Fig.1.39).

L'évolution des flux d'orthophosphates est représentée à la Fig.1.40. Ceux-ci augmentent régulièrement depuis 1986 à Liège-Monsin, correspondant également à une élévation de la

concentration en ce point (cfr.Fig.1.35). A Jambes et à Namèche, les flux restent stables.

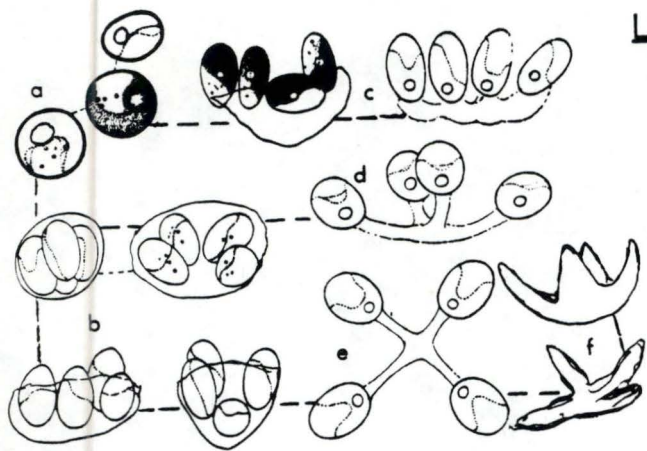
Les données relatives à ces différents graphes sont regroupées aux tableaux 1 et 2 présentés en annexe 5 et 6.

En résumé, si l'eutrophisation planctonique de la Meuse a fortement augmenté depuis le début des années 80, les concentrations en nutriments inorganiques ne semblent pas avoir augmenté de façon très significative; tout au plus, on peut remarquer une augmentation récente des flux d'azote nitrique. Cependant, l'azote inorganique, vu le niveau des concentrations atteint, n'est certainement pas limitant dans la Meuse belge. Il est vraisemblable que le développement de l'eutrophisation planctonique commença dans la partie française du fleuve, suite à un ou des apports de phosphore, et se poursuit dans la partie belge, tant que les algues ne sont pas limitées par la lumière.

Bien que l'on sache que la Meuse est moins polluée que d'autres rivières européennes, il faut cependant sauvegarder efficacement l'eau de celle-ci comme source d'approvisionnement en eau potable d'environ 5 millions de Belges et de Néerlandais (van Craenenbroeck et al., 1983).

Deuxième partie :

Matériel et Méthodes.



Légende :

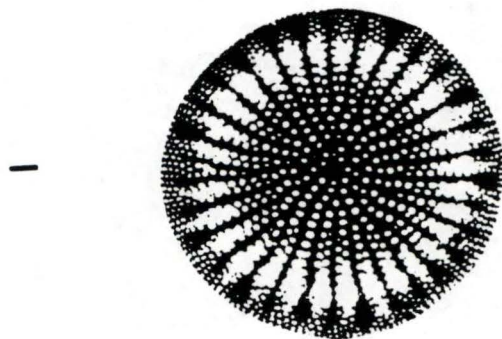
- a) cellules individuelles;
- b) développement de colonies;
- d-e) colonies;
- f) restes de la paroi de la cellule mère

Figure 2.1. Représentation de *Dictyosphaerium chlorelloïdes*.
(d'après Komarek et Fott, 1983).



Figure 2.2. Représentation d'un fragment de *Synedra ulna* (Nitzsch.)
Vue valvaire (d'après Bourrelly, 1969).

Légende : trait d'échelle = 1 μ m.



photos au M.E.T.

Figure 2.3. Photo de *Stephanodiscus hantzschii* Grun. (d'après Descy et Willems, 1991).

Légende : trait d'échelle = 1 μ m.

I. Cultures d'espèces phytoplanctoniques isolées de la Meuse.

I.1. Espèces étudiées.

Les espèces étudiées proviennent du phytoplancton de la Meuse. Il s'agit d'une Chlorophycée : *Dictyosphaerium chlorelloïdes* (Fig.2.1) et de plusieurs diatomées *Synedra ulna* (Fig.2.2), *Melosira* sp. et *Stephanodiscus hantzschii* (Fig.2.3). *Dictyosphaerium chlorelloïdes* provient de cultures souches entretenues au laboratoire d'Ecologie des eaux douces de Namur (souche isolée de la Meuse par l'Université de Liège). *Synedra acus* et *Melosira* sp. ont été isolées de la Meuse tandis qu'une souche de *Stephanodiscus hantzschii* nous a été envoyée d'une algothèque (CCAP, Ecosse) .

I.2. Isolement des espèces phytoplanctoniques.

Les paramètres V_m et K_m , comme les stocks intracellulaires (Q_0 et Q_m) varient d'une espèce à l'autre. En travaillant à partir d'un échantillon naturel, on mesure des paramètres non spécifiques or nous voulons les déterminer spécifiquement. Pour cela, deux techniques d'isolement ont été utilisées:

- isolement sur un gradient Percoll;
- isolement par micromanipulation.

I.2.1. Le gradient de Percoll.

Les échantillons naturels sont soumis à un gradient de densité discontinu de Percoll, ce produit étant non toxique pour les algues.

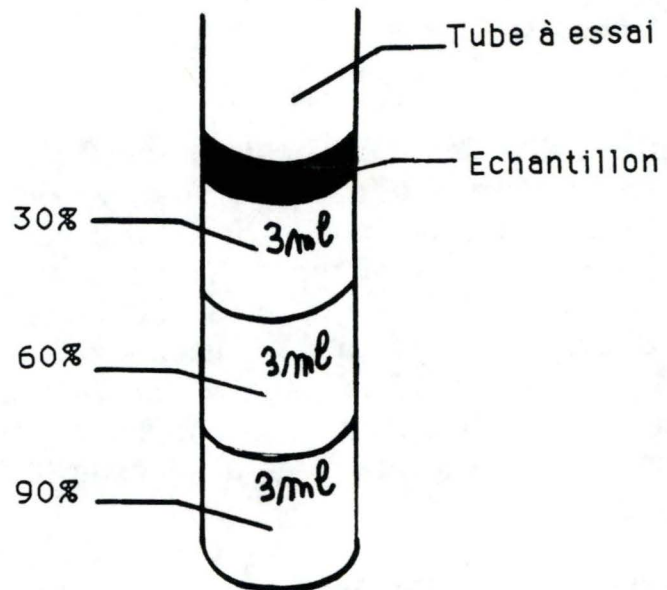


Figure 2.4. Représentation du gradient discontinu de Percoll.

1.2.1.1. Préparation de l'échantillon.

L'échantillon naturel est centrifugé pendant 30 minutes à 4000 tours/minute afin de le concentrer. Le culot est récupéré et disposé sur le gradient de Percoll (1 ml d'échantillon concentré pour 10 ml de gradient).

1.2.1.2. Préparation du gradient.

Des solutions de différentes densités (0,339; 0,678 et 1,017 g/ml) sont préparées par dilution d'une solution Percoll (1,13 g/ml). C'est le surnageant récupéré lors de la préparation de l'échantillon qui est utilisé pour préparer les différentes dilutions de Percoll. Nous disposons ensuite dans un tube en verre 3 ml des différentes solutions les unes au-dessus des autres en commençant par la plus dense (Fig.2.4). Cette opération doit se faire très délicatement afin de ne pas détruire le gradient.

1.2.1.3. Fractionnement.

Le tube est centrifugé pendant 10 minutes à 4000 tours/minute. Cette technique permet la séparation des organismes vivants des détritrus qui se retrouvent dans le fond du tube. Les autres composants se répartissent au niveau des différentes interfaces selon leur densité. Pour récupérer les différentes fractions, nous enlevons d'abord le surnageant et récupérons les organismes se trouvant aux interfaces à l'aide d'une pipette pasteur munie d'une poire. Ensuite nous fixons au lugol une partie de la fraction récupérée pour déterminer les différents organismes. L'autre partie pourra être remise en culture. Pour cela, plusieurs lavages, avec du milieu de culture, sont nécessaires afin d'éliminer toute trace de Percoll.

1.2.2. Micromanipulation.

Cette technique consiste à isoler les cellules au binoculaire à l'aide d'une micropipette. Pour fabriquer celle-ci, on affine la

Tableau 2.1. Composition du milieu W.C.

Composé	Concentration finale dans le milieu (mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,760
MgSO ₄ .7H ₂ O	36,970
NaHCO ₃	12,600
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,410
NaNO ₃	85,010
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	21,210
Na ₂ EDTA	4,360
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,150
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,010
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,010
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,180
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,006
H ₃ BO ₃	1,000
Thiamine HCl	0,100
Biotine	0,500 µg/l
Vitamine B ₁₂	0,500 µg/l

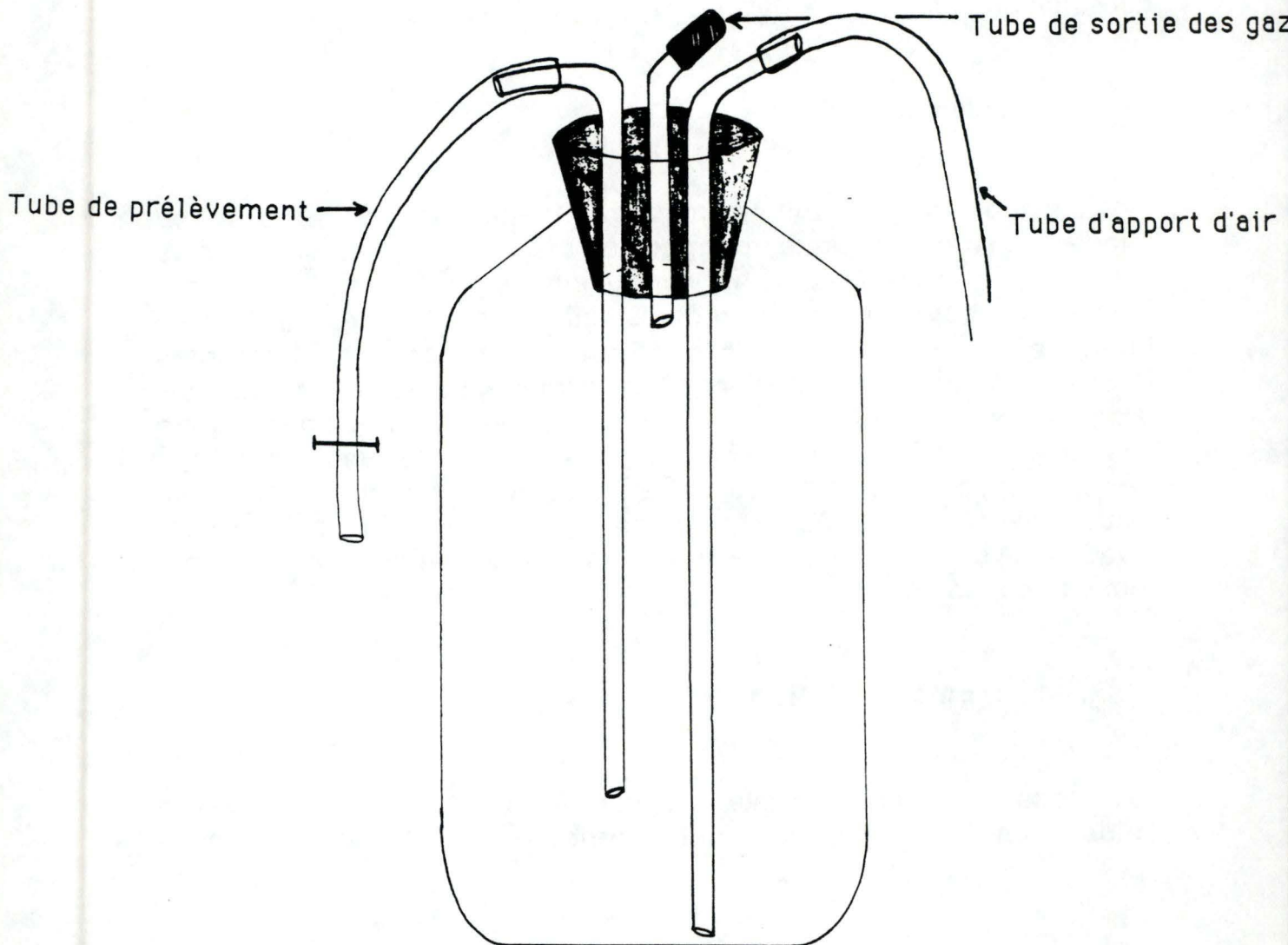


Figure 2.5. Schéma d'une bouteille de culture.

partie médiane d'un capillaire en verre en le passant à la flamme et en l'étirant rapidement. On obtient ainsi des micropipettes très effilées qui permettront de prélever un petit nombre de cellules à la fois, voire même, pour des algues de grande taille (100 μm), une seule cellule. L'isolement se fait sous le binoculaire où l'on repère la cellule à isoler et la prélève à l'aide d'une de ces micropipettes. La cellule est alors nettoyée quatre fois dans quatre gouttes de milieu disposées sur une lame microscopique. Elle est ensuite injectée dans un petit volume de milieu de culture et incubée quelques jours à 20 °C pour que la croissance s'amorce. Une fois que la croissance est en phase exponentielle, les cellules sont inoculées dans un plus grand volume. Ce travail est effectué en milieu stérile.

1.3. Mode de culture.

Nous avons utilisé le système de culture en milieu fermé (culture en batch), c'est-à-dire sans renouvellement du milieu. Le milieu de culture utilisé pour *D. chlorelloïdes* est le milieu W.C. dont la composition est donnée au tableau 2.1.

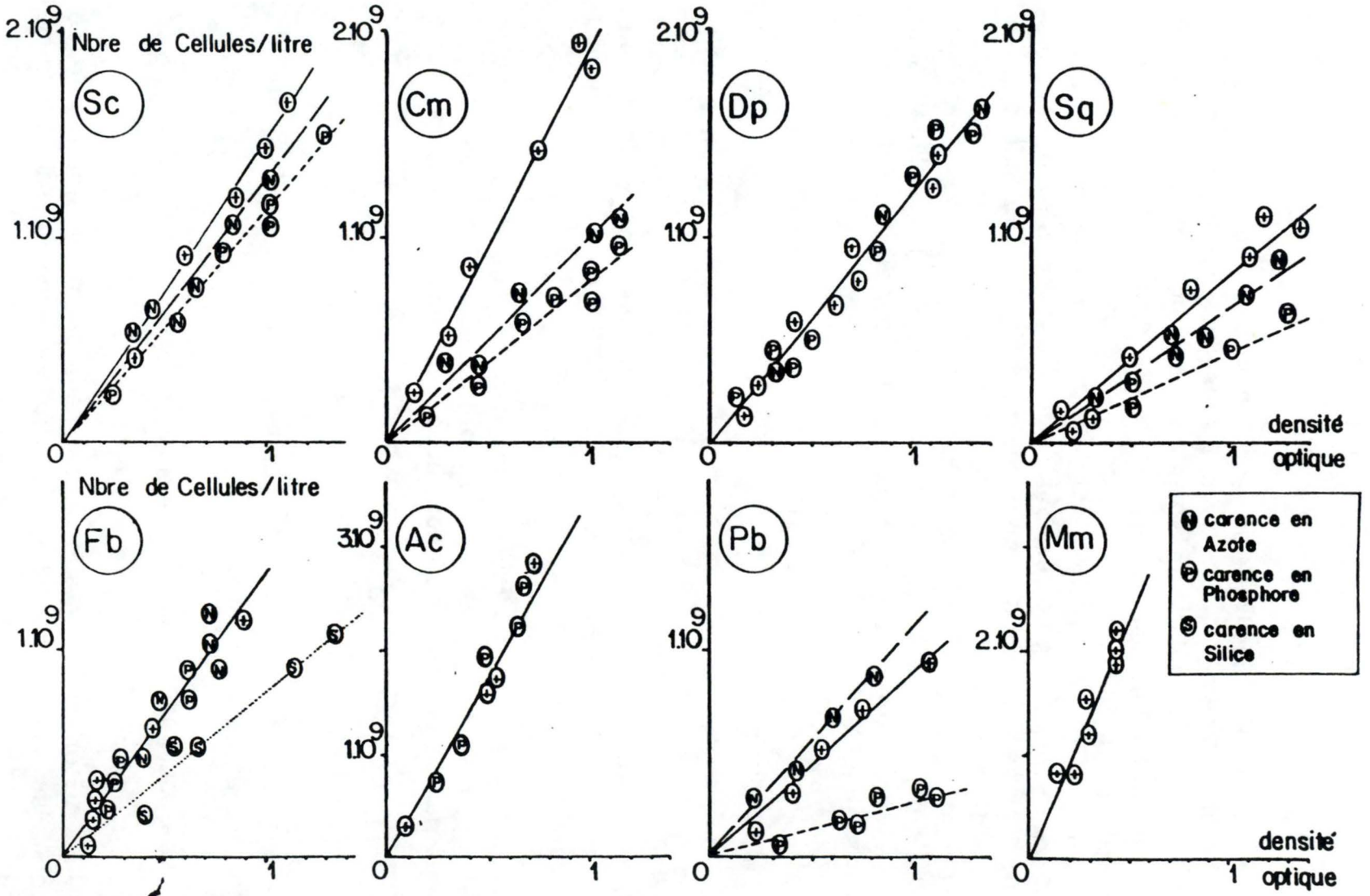
La mise en culture des algues se fait dans un litre de milieu liquide contenu dans de grandes fioles autoclavées préalablement et fermées par un bouchon de caoutchouc muni de trois tubes en verre (Fig.2.5) :

- un long tube permettant les prélèvements;
- un long tube d'apport d'air comprimé sur lequel est fixé un filtre de porosité égale à 0,2 μm ;
- un tube court pour la sortie des gaz.

Afin de prévenir un appauvrissement du milieu en dioxyde de carbone, les cultures sont fortement bullées avec de l'air comprimé filtré.

Les cultures de *D. chlorelloïdes* sont mises à incuber dans une pièce dont la température est de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Des tubes fluorescents de type industriel (TLD 36W/33) permettent d'éclairer les algues. L'intensité lumineuse ainsi fournie est de 1000 Lux à

Figure 2.6. Relations entre le nombre de cellules et la densité optique en fonction de l'état nutritionnel (d'après Dauta, 1983).



la surface de l'eau . Les cultures de *Stephanodiscus hantzschii*, de *Synedra acus* et de *Melosira* sp. sont par contre placées dans un incubateur à 13°C et soumises à une photopériode de 12L:12D.

1.4. Suivi quotidien des cultures.

1.4.1. Estimation de la biomasse.

Deux méthodes sont utilisées : la mesure de la densité optique et les comptages cellulaires.

1.4.1.1. Densité optique.

La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre avec des cellules de 2 cm de diamètre. La densité optique mesure l'absorbance de la chlorophylle *a* à une longueur d'onde de 680 nm. Elle dépend de la concentration en chlorophylle *a* de l'échantillon et est donc proportionnelle au nombre de cellules. On observe en effet de très bonnes corrélations entre la densité optique et la densité de cellules (Fig.2.6) (Dauta, 1983).

1.4.1.2. Comptages cellulaires.

Les comptages de cellules se réalisent au microscope à l'aide de la cellule de BÜRKER. Cette cellule est constituée de plusieurs carrés ayant chacun un volume de 0,004 mm³. En connaissant le nombre moyen de cellules comptées par carré, nous pouvons déterminer le nombre de cellules par ml grâce à la formule suivante:

$$N = \frac{x * d * 10^3}{v * n}$$

N : nombre de cellules par ml (cm^3);
x : nombre de cellules comptées par prélèvement;
d : dilution utilisée;
v : volume d'un carré (mm^3);
n : nombre de carrés comptés.

Le nombre de carrés comptés est de dix et le comptage est répété trois fois à partir de trois prélèvements différents du même échantillon. Nous faisons trois prélèvements afin de s'assurer que le nombre de cellules comptées lors du premier ne soit pas dû à une mauvaise homogénéisation du milieu. Le nombre de cellules calculé est donné par la moyenne de ces trois résultats.

II. Assimilation des nitrates.

L'étude de l'assimilation de l'azote par les espèces isolées nécessite quelques préliminaires. Le protocole suivi est celui proposé par Dauta (1983) que nous avons adapté à notre équipement et aux espèces étudiées.

II.1. Pré-conditionnement.

Les cultures en phase exponentielle sont placées dans un milieu riche en nutriments, le milieu W.C. dans des conditions précises de température et de lumière. Durant cette étape, on considère que les algues constituent des réserves proches de la limite supérieure (Q_m). Les algues en phase exponentielle sont récupérées par centrifugation et lavées plusieurs fois avec du milieu de culture dépourvu d'azote (le Na est apporté sous forme de NaCl au lieu de NaNO_3), les cellules sont remises dans un milieu neuf sans azote dans lequel les autres nutriments non étudiés sont fournis en excès afin de n'avoir qu'un facteur limitant. La densité des cultures suivie quotidiennement permet de déterminer l'arrêt de la croissance et on admet que cet arrêt correspond à l'instant où les réserves cellulaires tendent vers le minimum (Q_0).

Le carençage présente un double intérêt :

- le quota cellulaire est ramené à sa valeur minimale (Q_0) qui peut être facilement déterminée;

- lorsque $Q=Q_0$, la vitesse d'assimilation tend vers la vitesse maximale V_m (Dauta, 1983).

II.2. Etude cinétique de l'assimilation azotée.

Les études d'assimilation sont effectuées sur des cultures carencées en azote car les stocks intracellulaires sont alors à leur valeur minimale et il est possible de mesurer les paramètres d'assimilation absolus (cfr. Synthèse Bibliographique II.3.1.3). Notons que les algues reçoivent un très faible apport d'azote (1 μ mole de $N-NO_3/l$) vingt-quatre heures avant le début des expériences. Cet ajout a pour but de revitaliser les cellules carencées et de régénérer l'activité de la nitrate réductase impliquée dans le transport actif de l'azote.

II.2.1. Etude de l'assimilation en fonction du temps.

Cette étude préliminaire permet de préciser si l'assimilation de l'azote est linéaire au cours du temps. Il est en effet nécessaire de connaître la période de temps durant laquelle l'assimilation est linéaire et maximale. Cet intervalle de temps sera celui que nous utiliserons dans l'étude de l'assimilation en fonction de la concentration.

II.2.1.1. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 24 mg N/l.

II.2.1.1.1. Matériel nécessaire.

- matériel de filtration sous vide (fioles à vide millipore);
- filtres millipore de 25 mm de diamètre et de porosité 0,2 μ m;
- fine pince pour positionner et récupérer les filtres;

- agitateur;
- pipette de 5 ml pour prélever les échantillons à filtrer;
- petits tubes en plastic permettant le stockage des filtrats;
- chronomètre;
- solution stock de NaNO_3 1400 mg N/l.
- culture carencée;
- milieu de culture sans azote.

II.2.1.1.2. Expérience.

A 500 ml de culture, on ajoute une certaine concentration en azote et l'assimilation de celui-ci est suivie au cours du temps. La culture est agitée pendant l'incubation à l'aide d'un barreau magnétique afin d'assurer l'homogénéité du milieu. La durée d'incubation a été fixée à une heure et les prélèvements se font aux temps 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutes. Les échantillons sont filtrés sur filtres millipore 0,22 μm . Le volume filtré est de 5 ml. Nous avons besoin de 2,5 ml d'échantillon pour effectuer le dosage.

II.2.1.2. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 200 μg N/l.

II.2.1.2.1. Matériel nécessaire.

- vaisselle propre décontaminée dans un bain d'acide HCl 2% et rincée abondamment à l'eau distillée;
- matériel de filtration sous vide (rampe à filtration multiple);
- petits erlenmeyers de 50 ml servant à la récupération du filtrat;
- filtres Whatman GF/A de 25 mm de diamètre de porosité 1,6 μm ;

- une fine pince pour positionner et récupérer les filtres;
- chronomètre;
- plaque à agitation multiple;
- pissette d'eau distillée;
- milieu de culture W.C. sans azote qui servira éventuellement à diluer les algues;
- culture carencée;
- solution stock de NaNO_3 140 mg N/l.

Notons que le matériel de filtration a été spécialement conçu afin d'éviter toute contamination, les filtrats étant récupérés dans de petits erlenmeyers individuels.

II.2.1.2.2. Expérience.

Avant de commencer l'expérience, des essais de filtration sont réalisés afin de déterminer si il est nécessaire ou non de diluer la culture. Il faut en effet pouvoir filtrer environ 40 ml de culture en un temps assez court sans quoi les mesures de vitesse d'assimilation pourraient être faussées. Ce volume est nécessaire pour faire un dosage dans cette gamme de concentration. L'expérience est la même que celle décrite précédemment (cfr.II.2.1.1.2.) mais elle est effectuée pour deux concentrations. Celles-ci ont été choisies suivant la gamme utilisée pour la cinétique d'assimilation en fonction du substrat. Nous avons pris la plus faible ainsi que la médiane (100 μg N/l). La durée d'incubation est fixée à deux heures et les prélèvements sont faits aux temps 10, 20, 40, 60, 80, 100 et 120 minutes. Chaque volume prélevé est filtré sur filtre GF/A de 1,6 μm de porosité.

La dilution, si nécessaire, se fait dans du milieu de culture stérile carencé en l'élément étudié pour rester dans les mêmes conditions physiologiques. Celle-ci se fait une heure avant le début de l'expérience afin que les algues puissent s'y adapter.

Pour déterminer la concentration exacte en azote ajoutée au temps 0, nous avons utilisé des blancs car il n'était pas possible de doser directement, sur la culture, la concentration exacte ajoutée. En effet, il faut un certain temps pour ajouter l'azote, homogénéiser le milieu et filtrer; or durant ce temps, les algues sont capables d'assimiler. Le blanc consiste en 500 ml de milieu carencé auquel on ajoute une certaine quantité d'azote (la même que celle utilisée lors de l'expérience). On détermine alors la concentration en azote du blanc.

II.2.2. Etude de l'assimilation en fonction de la concentration.

Cette étude a pour but de déterminer les paramètres V_m et K_m .

II.2.2.1. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 200 $\mu\text{g N/l}$.

Pour le choix de cette gamme de concentration, nous nous sommes basés sur le protocole de Dauta (1983).

II.2.2.1.1. Matériel nécessaire.

cfr. II.2.1.2.1.

II.2.2.1.2. Expérience.

Des concentrations croissantes du nutriment étudié sont ajoutées à 50 ml de culture et l'assimilation de ce nutriment est suivie au cours du temps. Le temps d'incubation a été fixé à 90 minutes suivant les résultats obtenus lors des expériences d'assimilation au cours du temps.

II.2.2.2. Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_m .

La vitesse d'assimilation est déterminée pour différentes concentrations en substrat. En portant sur graphique la vitesse d'assimilation en fonction de la concentration en azote, on obtient une courbe de Michaelis-Menten dont l'équation est la suivante:

$$V = \frac{V_m * S}{K_m + S}$$

Les vitesses maximales et les constantes de demi-saturation peuvent être calculées après linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten par la méthode de Lineweaver-Burk (cfr.Synthèse bibliographique II.3.1.2.).

II.2.3. Dosage des nitrates.

L'assimilation des nitrates a été suivie dans différentes gammes de concentration, d'où l'utilisation de différentes méthodes de dosage. Deux méthodes ont été employées:

- méthode à l'acide chromotropique;
- méthode de la réduction des nitrates en nitrites.

II.2.3.1. Méthode à l'acide chromotropique.

Cette méthode permet de déterminer des concentrations en nitrates supérieures à 0,1 mg N/l (West et Ramachandran, 1966).

Le principe est le suivant : en milieu acide, la réaction des nitrates avec l'acide chromotropique donne une coloration jaune susceptible d'un dosage colorimétrique. La lecture se fait au spectrophotomètre à 410 nm.

II.2.3.2. Méthode de la réduction des nitrates en nitrites (Bodson, 1990).

Cette méthode nous a permis de déterminer des concentrations en nitrates variant de 0 à 200 $\mu\text{g N/l}$.

Le principe est le suivant : les nitrates sont réduits en nitrites par passage sur une colonne en verre contenant un complexe cadmium-cuivre. Le sulfanilamide forme avec les nitrates réduits un composé diazonium en milieu acide, qui forme avec le dihydrochlorure de N (1-Naphtyl) éthylène diamine un composé azoïque de coloration rose susceptible d'un dosage colorimétrique dont la lecture se fait par spectrophotométrie à 520 nm. On obtient ainsi la somme des nitrates et des nitrites. La quantité de nitrate est obtenue en faisant la différence entre une partie de l'échantillon passée sur la colonne (nitrates réduits + nitrites) et l'autre partie non passée sur la colonne (nitrates non réduits + nitrites).

Il est nécessaire avant tout dosage d'échantillons d'établir une droite d'étalonnage par passage de neuf solutions étalons (5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 $\mu\text{g N/l}$) préparées à partir d'une solution stock de 1000 $\mu\text{g N/l}$. Nous obtenons ainsi une droite d'étalonnage où la D.O. mesurée à 520 nm est fonction de la concentration en nitrates.

II.2.4. Dosage du phosphore soluble.

Nous avons également suivi la concentration en phosphore inorganique dans les cultures afin de s'assurer que cet élément ne soit pas limitant. La concentration en orthophosphates dans le milieu est mesurée à partir du milieu filtré sur des filtres whatman GF/C (25 mm de diamètre).

Le principe est le suivant : en présence d'un complexe de molybdate d'ammonium et en milieu acide se forme un complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue permettant un dosage colorimétrique. La lecture

se fait au spectrophotomètre, dans des cellules de grand diamètre (2 cm), à 882 nm.

II.3. Mesure de l'état nutritionnel des algues.

II.3.1. Rapport C:N.

Le C et l'N total de la fraction particulaire recueillie sur filtre sont mesurés au moyen d'un analyseur élémentaire Carlo Erba.

II.3.1.1. Principe de la mesure.

Les échantillons sont complètement oxydés à très haute température (1020°C). Au cours de cette combustion se forment du CO₂ et un mélange NO-NO₂. Les oxydes d'azote sont réduits en N₂ dans une colonne de réduction. Les gaz transportés par l'He sont élués par chromatographie en phase gazeuse puis mesurés par un détecteur catharométrique.

La concentration en C et en N de l'échantillon, exprimée en pourcentage du poids sec, est déterminée par régression linéaire (relation entre la concentration en C-N et la surface des pics d'éluion).

II.3.1.2. Protocole expérimental.

II.3.1.2.1. Préparation des échantillons du phytoplancton.

Pour la filtration, nous utilisons des filtres GF/C préalablement passés au four (500°C) pendant une heure afin d'éliminer toute impureté et pesés.

Un certain volume d'échantillon est filtré sur ces filtres qui sont par la suite séchés à 60°C pendant vingt-quatre heures.

Ceux-ci sont ensuite pesés afin de déterminer le poids sec en algues. Si l'analyse n'est pas réalisée tout de suite, les filtres sont conservés dans un dessiccateur. Au moment de la mesure, chaque filtre est plié plusieurs fois et déposé dans un petit container en étain.

II.3.1.2.2. Préparation des standards.

La droite de régression à partir de laquelle sont déterminées les concentrations en C et en N s'obtient en introduisant avant les échantillons, trois standards préparés de la façon suivante :

Dans un container, on introduit un filtre intact et une certaine quantité d'acétanilide. Avant chaque série d'analyse, nous pesons au moins trois standards acétanilide. Le poids à peser dépend de la quantité de C dans les échantillons. Celle-ci peut se déterminer grossièrement en connaissant le poids net d'algues. Nous avons choisi ce standard car il présente un rapport C:N semblable à celui du phytoplancton.

II.3.1.2.3. Préparation des blancs.

Avant les trois standards et les échantillons, on introduit:

- un container vide pour s'assurer qu'il ne reste pas d'impureté dans la colonne de combustion;
- un container avec une quantité de standard non pesé pour identifier les temps de rétention (paramètre du pic d'éluion à partir duquel l'intégrateur identifie l'N et le C);
- un blanc: container+filtre intact.

II.4. Détermination des stocks intracellulaires Q_0 et Q_m .

L'analyse par le Carlo Erba nous donne le pourcentage de C et d'N de l'échantillon. En connaissant le poids sec en algues, il est possible de déterminer le poids en C et en N de l'échantillon. Cela nous renseigne sur l'état des stocks intracellulaires des cellules et nous permet de connaître Q_0 , c'est-à-dire le stock intracellulaire minimum. Ainsi, si les rapports C:N:P s'éloignent des valeurs du Redfield ratio, nous pouvons déduire une limitation nutritionnelle plus ou moins forte (cfr. Synthèse bibliographique I.2.3.).

Troisième partie :

Résultats et Discussion.

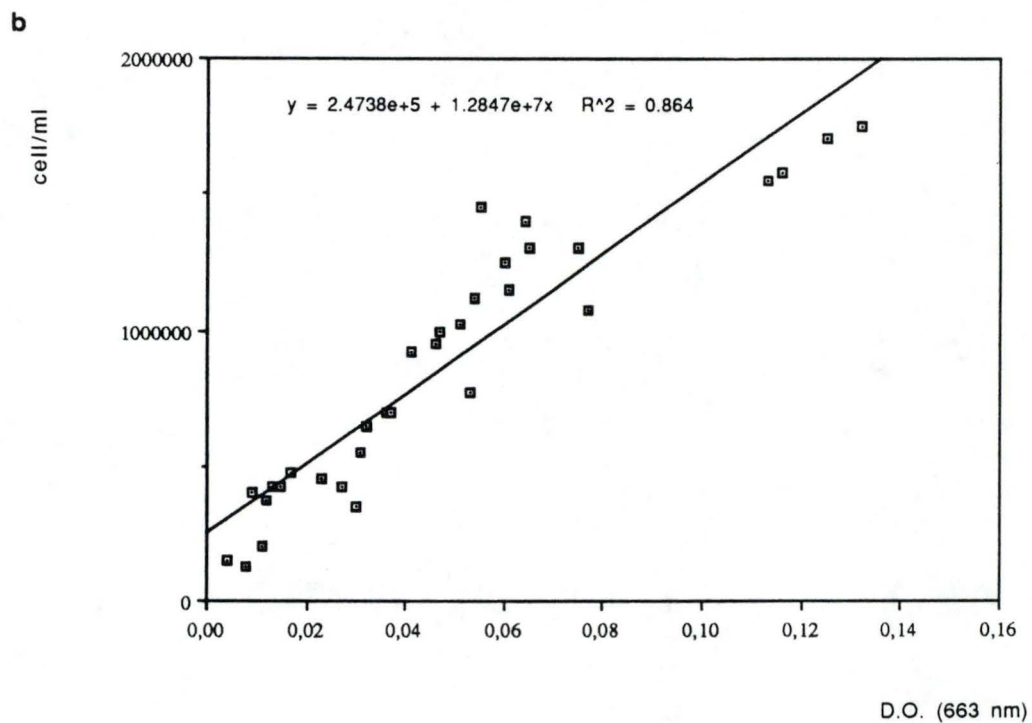
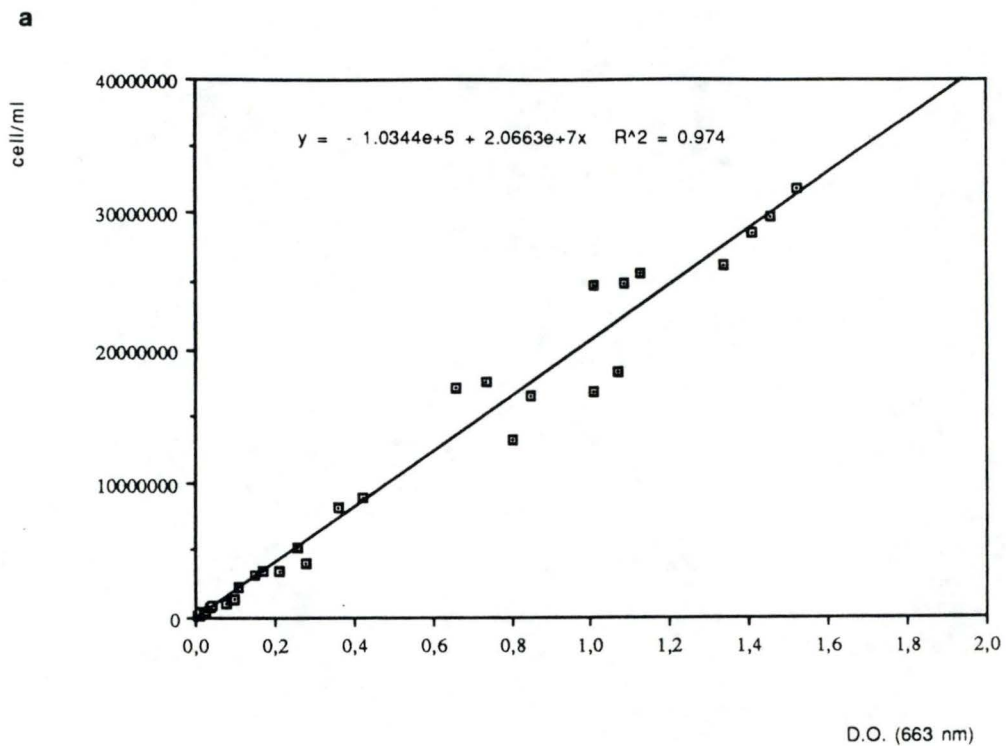


Figure 3.1. Relation entre la densité cellulaire et la densité optique à 663 nm (parcours optique : 1 cm) de la culture de *D.chlorelloïdes*.

a) culture non carencée en azote,

b) culture carencée en azote.

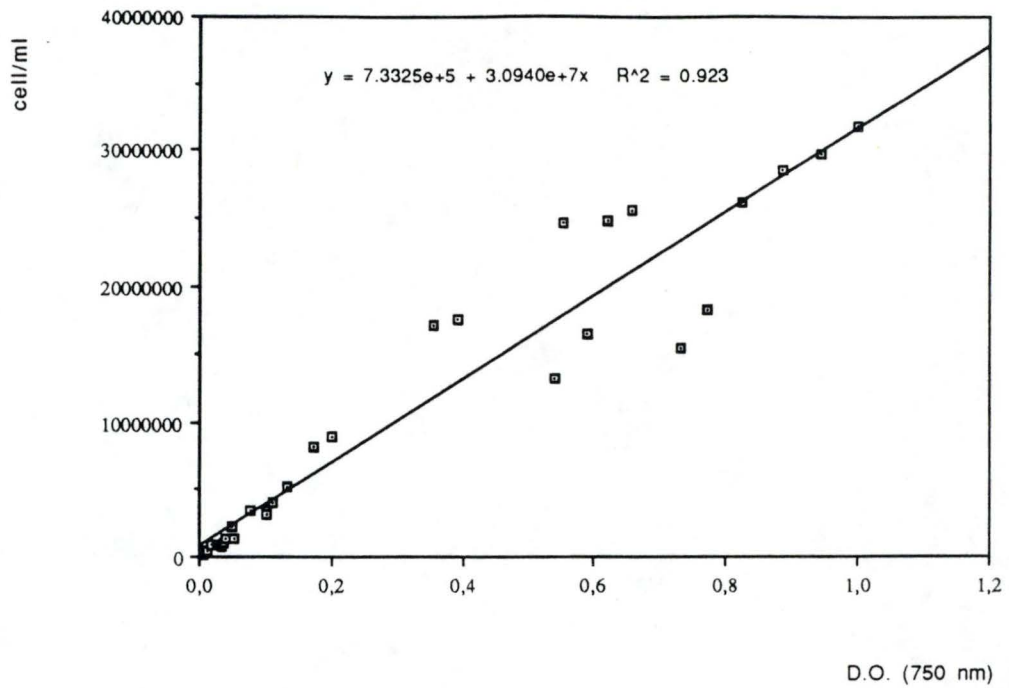


Figure 3.2a. Relation entre la densité cellulaire et la densité optique à 750 nm (parcours optique : 1 cm) d'une culture de *D.chlorelloïdes* non carencée en azote.

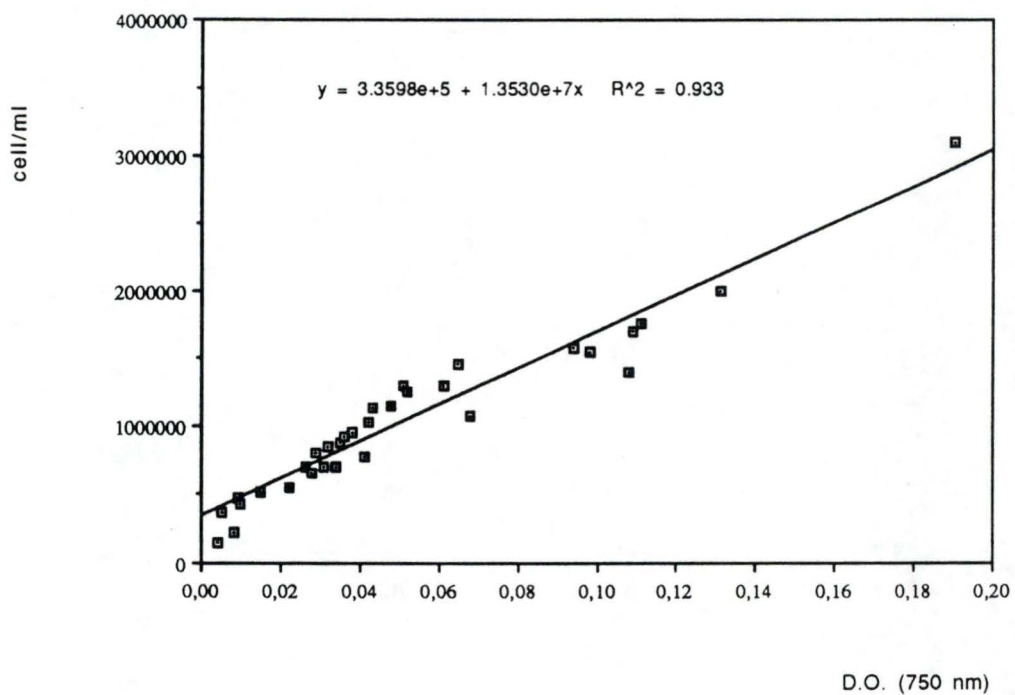


Figure 3.2b. Relation entre la densité cellulaire et la densité optique à 750 nm (parcours optique : 1 cm) d'une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote.

I. Introduction.

Les deux techniques d'isolement décrites dans la partie Matériel et Méthodes (cfr.1.2) ne nous ont pas permis d'isoler *Stephanodiscus hantzschii*, petite diatomée centrique et espèce eutrophe se développant de façon maximale au printemps (et parfois en été) lors de blooms phytoplanctoniques.

Les études de croissance et d'assimilation des nitrates ont alors été effectuées sur une espèce en culture : *Dictyosphaerium chlorelloïdes* isolée de la Meuse à l'Université de Liège et obtenue à l'origine auprès du laboratoire d'Ecologie animale du Professeur Jeuniaux (Section Ecotoxicologie, J.P. Thomé). Nous avons réalisé au total une trentaine de cultures mais tous les résultats obtenus ne sont pas présentés dans la suite de ce travail.

II. Etude de la croissance de *D. chlorelloïdes*.

D. chlorelloïdes est une algue d'eau douce faisant partie de la famille des Dictyosphaeriacees. Cette famille groupe des Chlorococcales se multipliant par autospores ou zoospores et dont les cellules restent en colonies par des fragments des membranes maternelles. Cette famille renferme 12 genres et une trentaine d'espèces.

II.1. Estimation de la biomasse.

Les cultures non carencées et carencées en azote ont été suivies quotidiennement par mesure de la densité optique à 663 et 750 nm. Parallèlement, nous avons effectué des comptages et avons pu établir une relation densité optique-nombre de cellules/ml. Les Figures 3.1. et 3.2. comparent la relation obtenue à la fois pour des cellules non carencées et carencées à 663 nm (Fig.3.1a et b) et 750 nm (Fig.3.2a et b). On note une plus grande dispersion des valeurs à 663 nm pour la culture carencée en azote (r^2 de 86,4 contre 97,4 dans le cas d'un non carencage) (Fig.3.1), ce qui ne s'observe pas à 750 nm (r^2 de 93,3 et de 92,3) (Fig.3.2). La mesure à cette longueur d'onde est donc applicable aux deux

Tableau 3.1. Evolution de la D.O. à 663 nm (parcours optique : 1 cm) d'une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote. L'ajout d'azote au jour 11 provoque une augmentation de la D.O., suite à la régénération de la chlorophylle.

Temps (jours)	D.O. (663 nm)
0	0.008
1	
2	
3	0.053
4	
5	0.068
6	0.060
7	0.081
8	
9	
10	0.064
11	0.053
ajout de l'azote	
12	0.097
13	0.166
14	0.190

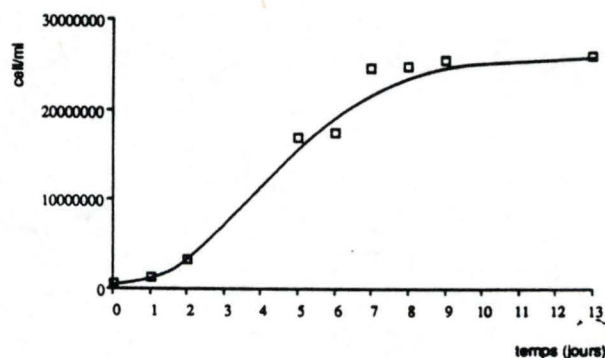
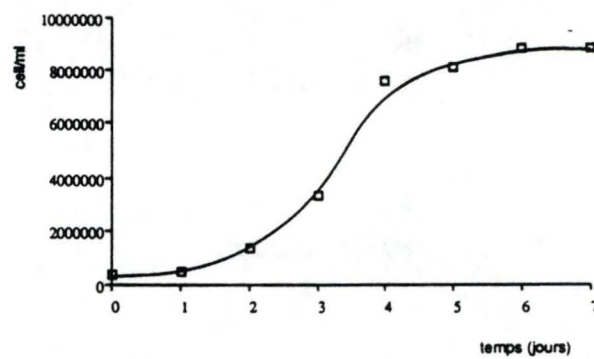
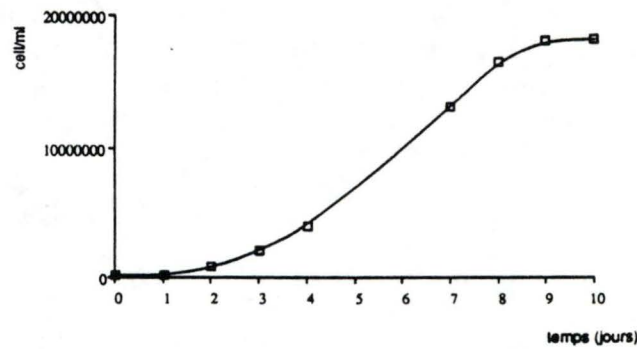


Figure 3.3. Courbes de croissance de *D.chlorelloïdes* à 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), dans le milieu de culture W.C. non carencé en azote.

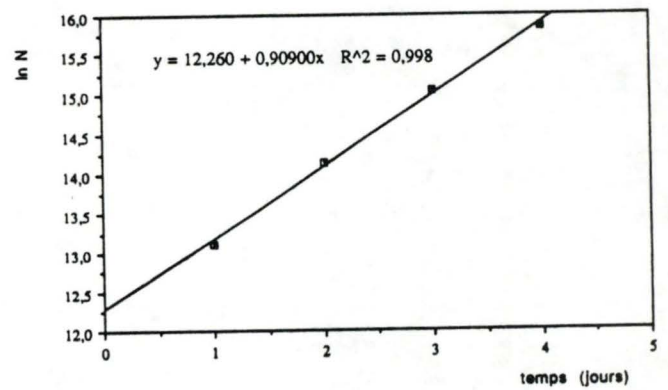
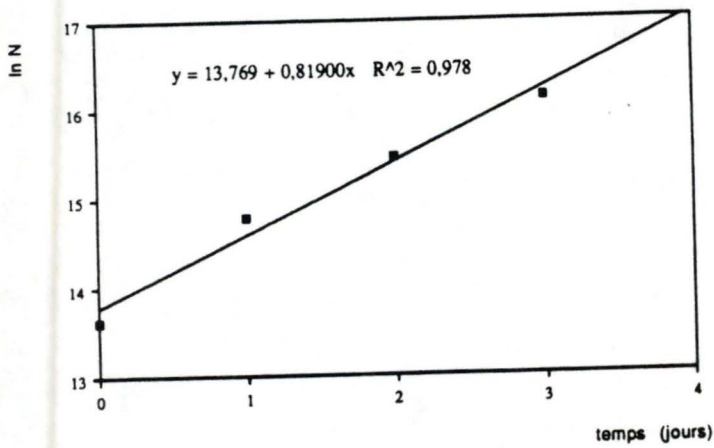
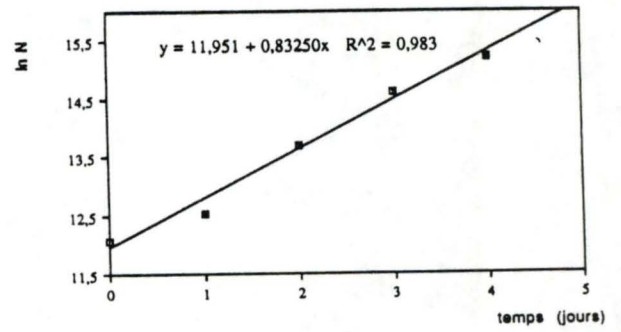
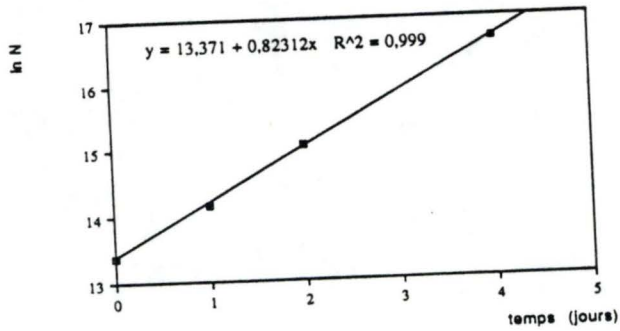


Figure 3.4. Détermination du taux de croissance de *D.chlorelloïdes* (milieu W.C. non carencé, 25 °C±1), par régression de ln de la densité cellulaire en fonction du temps.

types de culture. En comparant les résultats obtenus à 663 nm, nous observons que la relation est meilleure pour les cultures non carencées. Il est en effet connu que lorsque les cellules subissent un carençage en azote, celui-ci provoque une forte diminution de la quantité de chlorophylle par cellule. Cela se marque notamment par un changement de couleur des cultures passant d'un vert franc à une teinte jaunâtre. La relation densité optique (663 nm)-nombre de cellules est donc variable en fonction de l'état nutritionnel des cellules.

Comme Brunel et Guerri (1980), nous avons pu montrer que la régénération de la chlorophylle *a* des cellules d'une culture carencée en azote et recevant un ajout conséquent de ce nutriment s'effectue en 24 heures. Ceci est représenté au tableau 3.1 montrant l'évolution de la densité optique à 663 nm.

II.2. Courbes de croissance.

II.2.1. Culture non carencée en azote.

La Fig.3.3 représente les courbes de croissance obtenues à partir des comptages cellulaires. Celles-ci suivent bien les différentes phases classiques de la croissance d'une culture d'algues explicitées dans la partie Synthèse Bibliographique (cfr.I.1). En représentant le logarithme népérien du nombre de cellules par ml (en phase exponentielle) en fonction du temps, nous obtenons une droite de régression dont la pente nous donne le taux de croissance.

Pour les cultures de *D. chlorelloïdes* à 25°C et à une intensité lumineuse de 1000 Lux, les taux optimums varient de 0,82j⁻¹ à 0,91j⁻¹ (Fig.3.4) avec une valeur moyenne de 0,86j⁻¹. Il s'agit de taux assez élevés. Les taux de croissance les plus importants concernent en effet les Chlorophycées et ce pour des températures supérieures à 20°C (Dauta, 1983).

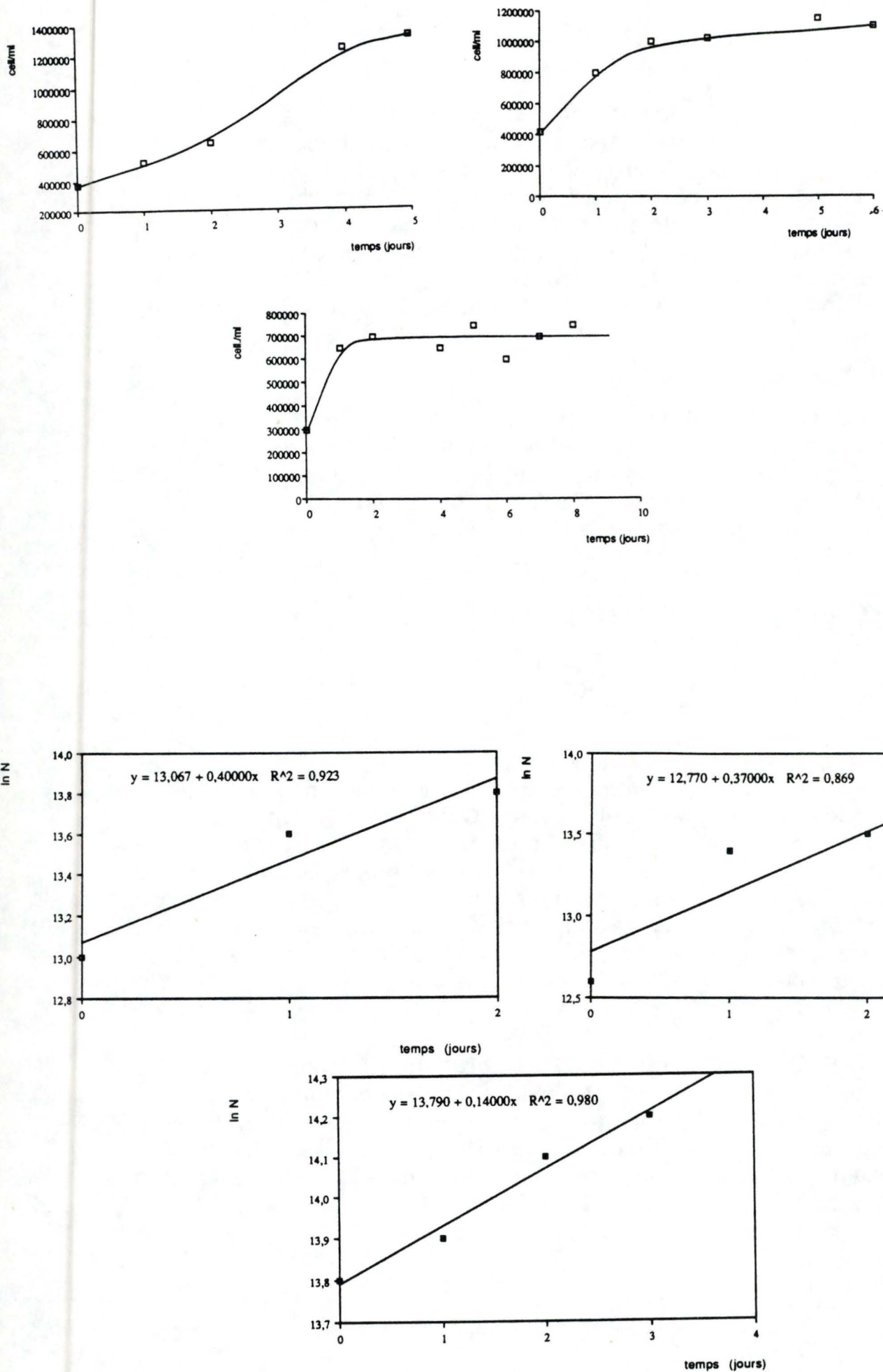


Figure 3.6. Détermination du taux de croissance de *D.chlorelloïdes* (milieu W.C. carencé en azote, 25 °C±1), par régression de ln de la densité cellulaire en fonction du temps.

Tableau 3.2a. Evolution des teneurs en carbone et en azote de la biomasse algale, dans une culture de *D.chlorelloïdes* non carencée en azote.

Temps (jours)	µg C/l	µg N/l	µatg C/l	µatg N/l	CN
0	11051,9	1494,64	920,99	106,76	8,63
1	20319,4	3251,6	1693,28	232,26	7,29
2	45440,3	6921,1	3786,69	494,36	7,66
3	85706	11884	7142,17	848,86	8,41
7	124846	15237	10403,83	1088,36	9,56
8	157606,7	17780,3	13133,89	1270,02	10,34

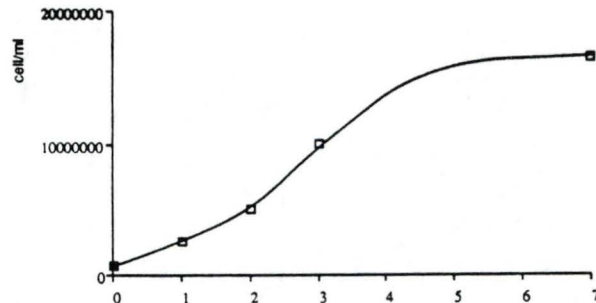


Figure 3.7. Courbe de croissance de la culture de *D.chlorelloïdes* dont les teneurs en C:N sont présentées au tableau 3.2a.

Tableau 3.2b. Evolution des teneurs en carbone et en azote de la biomasse algale, dans une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote.

Temps (jours)	µg C/l	µg N/l	µatg C/l	µatg N/l	CN
0	9492,6	1329	791,05	94,93	8,3
1	16906,8	1868,78	1408,9	133,48	10,6
5	25158,5	1610,9	2096,54	115,06	18,2
6	30108,7	1705,8	2509,06	121,84	20,6
7	34772,2	1932,8	2897,68	138,06	21
8	39761,5	2119,6	3313,46	151,4	21,9

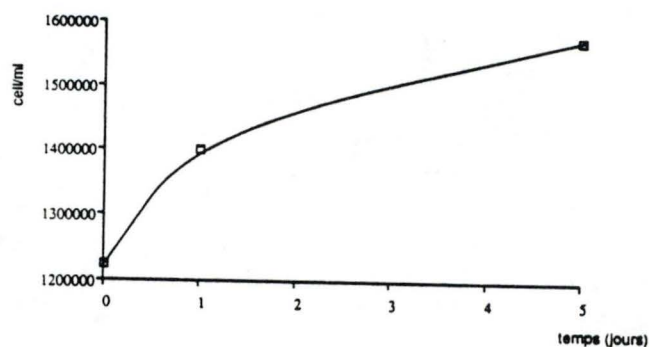


Figure 3.8. Courbe de croissance de la culture de *D.chlorelloïdes* dont les teneurs en C:N sont présentées au tableau 3.2b.

II.2.2. Culture carencée en azote.

La Fig.3.5 représente les courbes de croissance obtenues également à partir des comptages cellulaires effectués sur les cultures carencées. Les taux de croissance calculés comme précédemment (Fig.3.6) varient de 0,13 à 0,40 j^{-1} avec un taux moyen de 0,30 j^{-1} . On note donc une diminution d'au moins la moitié dans le cas d'un carençage en azote. Les cellules voient leur croissance diminuée par l'absence d'un nutriment, l'azote jouant ainsi le rôle de facteur limitant. La plus grande variabilité observée en ce qui concerne les taux de croissance (0,13 à 0,40 j^{-1} contre 0,82 à 0,91 j^{-1} dans le cas d'un non carençage) peut s'expliquer par un état nutritionnel variable au départ du carençage. En effet, il se peut que les algues utilisées se trouvaient déjà en fin de phase exponentielle et comme elles commençaient à être carencées en azote leur taux de croissance était plus faible.

II.3. Etat nutritionnel des cellules : rapport C:N.

Pour compléter les informations déjà obtenues par le suivi des paramètres habituels, nous avons également suivi l'évolution des rapports C:N des cellules algales dans les deux cas (carençage et non carençage). Le tableau 3.2a montre l'évolution de ce rapport d'une culture non carencée en azote. Au temps 0, les cellules sont placées dans un milieu complet. Notons que les rapports mesurés s'éloignent régulièrement du rapport C:N optimal pour la croissance algale de 6,7 donné par le Redfield ratio. Ainsi, après 6 jours, moment où la culture entre en phase stationnaire (Fig.3.7), il dépasse la valeur de 8 considérée par Healey et Hendzel (1980) comme une valeur au-delà de laquelle s'installe la limitation de la croissance algale par l'azote (cfr.Synthèse Bibliographique 1.2.4.2). Dans le cas de la culture carencée en azote (tableau 3.2b) le rapport atomique C:N dépasse 8 dès le deuxième jour, où la croissance est nulle ou très faible (Fig.3.8). A ce moment, les algues ont atteint leur quota minimal permettant tout juste la subsistance.

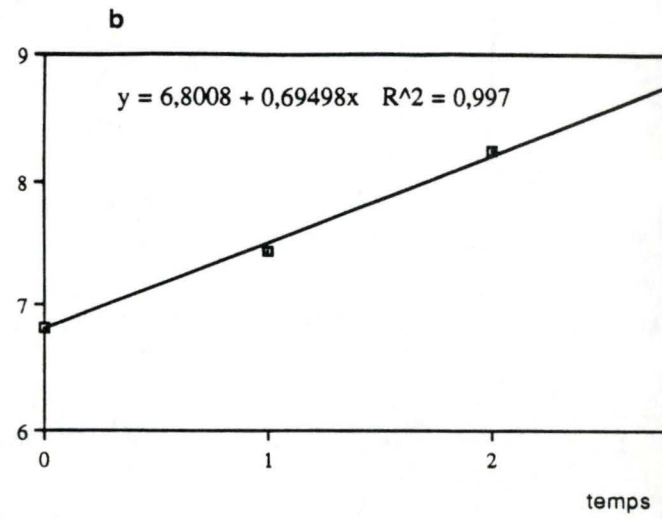
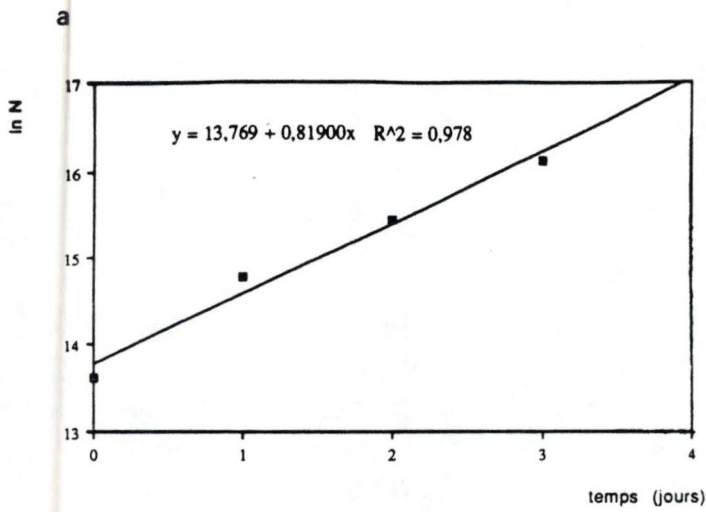


Figure 3.9. Calcul du taux de croissance d'une culture de *D.chlorelloïdes* non carencée en azote par deux méthodes :

- les comptages cellulaires,
- l'évolution du carbone cellulaire.

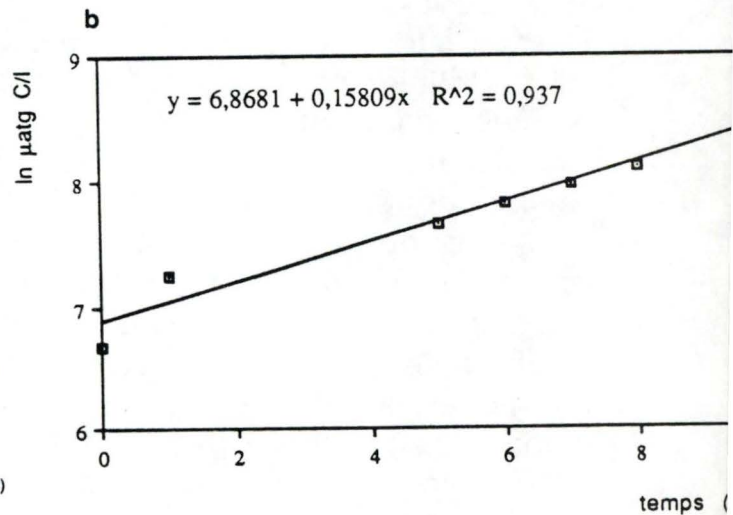
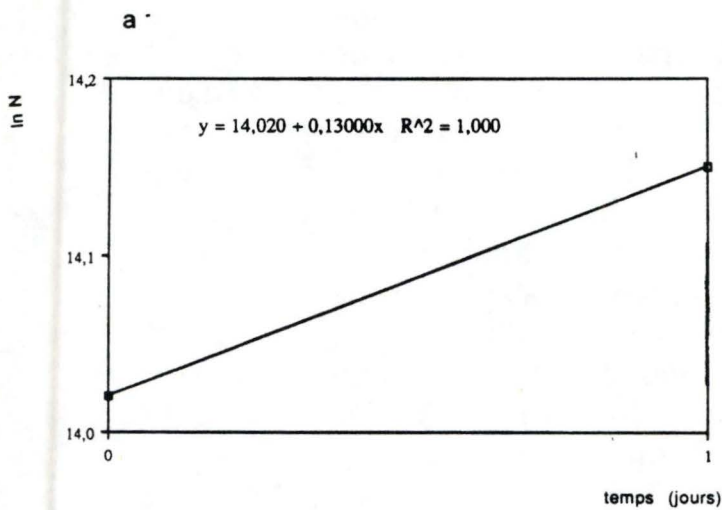


Figure 3.10. Calcul du taux de croissance d'une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote par deux méthodes :

- les comptages cellulaires,
- l'évolution du carbone cellulaire.

II.3.1. Calcul du taux de croissance.

Nous avons également déterminé le taux de croissance des cellules par le suivi de l'évolution de la concentration en carbone particulaire. Celui-ci a été calculé pour deux cultures, une non carencée et une carencée. Le taux s'obtient également par la pente de la droite de régression représentant le logarithme népérien de l'évolution de la concentration en carbone particulaire en fonction du temps en prenant les points correspondant à la phase exponentielle de la culture (Fig.3.9 et 3.10).

II.3.2. Comparaison avec les taux obtenus par comptage cellulaire.

Les taux obtenus dans le cas d'un carencage sont de 0,13 (3.9a) et $0,15j^{-1}$ (3.9b) et dans celui d'un non carencage de 0,82 (3.10a) et $0,69j^{-1}$ (3.10b). Les résultats sont donc du même ordre de grandeur par les deux méthodes.

Le suivi du carbone cellulaire est une méthode beaucoup plus précise que les comptages cellulaires pour déterminer le taux de croissance des algues en phase exponentielle, les comptages étant plus aléatoires. Il s'agit donc d'une bonne méthode pour le suivi de la croissance algale.

II.4. Calcul du stock intracellulaire minimal Q_0 .

Le stock intracellulaire minimal représente la quantité d'azote cellulaire lorsque le taux de croissance est nul. Celui-ci peut être calculé à partir de la quantité d'azote particulaire d'une culture en phase stationnaire ($\mu=0$). Cette valeur peut être mesurée grâce au Carlo Erba. Les Tableaux 3.2a et b donnent également l'évolution de la quantité d'azote/l (exprimée en $\mu\text{atg N/l}$). Pour la culture carencée par exemple, le poids en azote est de 138,06 $\mu\text{atg N/l}$ au jour 7, celui-ci correspondant à la phase stationnaire de la culture (cfr.Fig.3.8). Le nombre de cellules étant de $1700 \cdot 10^6/l$, nous obtenons :

$138,06/1700 \cdot 10^6 = 0,081 \cdot 10^{-6} \mu\text{atg N/cellule}$, ce qui nous donne $81 \mu\text{atg N}/10^9$ cellules.

Dans le cas de la culture non carencée, le poids en azote est de $1270,02 \mu\text{atg N/l}$ au jour 7 (cfr.Fig3.7). Le nombre de cellules à ce jour étant de $14625 \cdot 10^6$ cellules, nous obtenons :

$1270,02/14625 \cdot 10^6 = 0,087 \cdot 10^{-6} \mu\text{atg N/cellule}$, ou $87 \mu\text{atg N}/10^9$ cellules.

Ces valeurs calculées chez *D. chlorelloïdes* (81 et 87) sont proches de celles obtenues par Dauta (1983) sur une espèce du même genre, *D. pulchellum*, la valeur moyenne étant de 84 ± 6 (intervalle de confiance à 0,05). Ces valeurs correspondent à de faibles quotas minimums cellulaires par rapport à d'autres espèces comme *Pediastrum boryanum* ou *Scenedesmus quadricauda* dont les Q_0N sont respectivement de 180 ± 30 (intervalle de confiance à 0,05) et de 170 ± 25 (intervalle de confiance à 0,05). Les quotas sont exprimés en $\mu\text{atg N}/10^9$ cellules (Dauta, 1983).

III. Etude de l'assimilation des nitrates.

III.1. Etude de l'assimilation en fonction du temps.

III.1.1. Assimilation pour des concentrations de 2 et 24 mg N/l.

Nous avons d'abord étudié l'assimilation des nitrates dans cette gamme de concentration, la concentration de départ dans le milieu W.C. étant de 14 mg N/l .

Les cinétiques d'assimilation en fonction du temps ont été réalisées dans les mêmes conditions de température et de lumière que celles utilisées pour la croissance. Les algues ont été mises

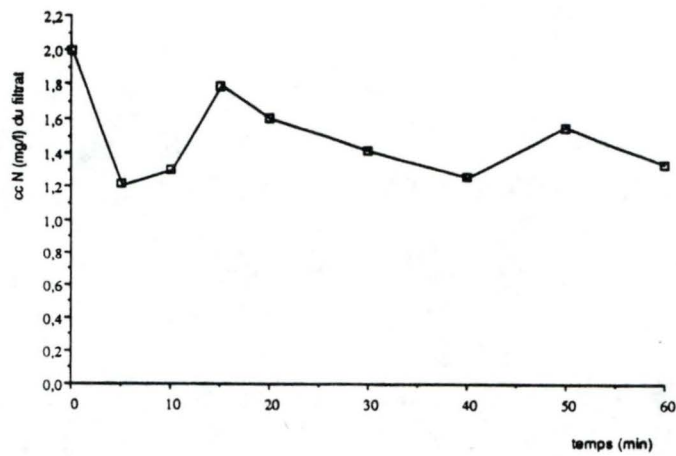


Figure 3.11. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 2 mg N/l.

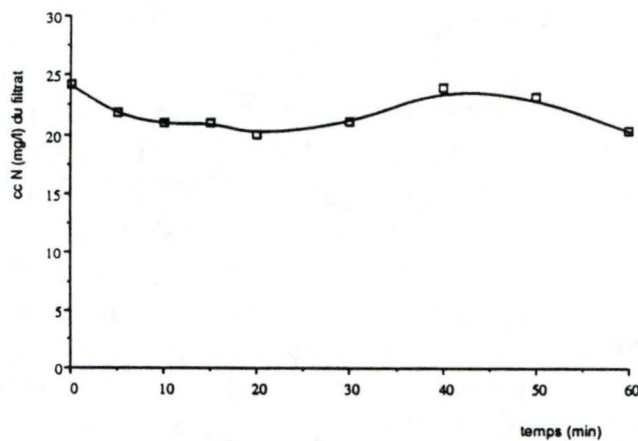


Figure 3.12. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 24 mg N/l.

P inorganique ($\mu\text{g P/l}$)
321,1
321,1
277,9
426,2
281,2
328,4
454,8
275,4
473,5
273,8

Tableau 3.3. Tableau reprenant les concentrations en phosphore inorganique mesurées lors des différentes expériences d'assimilation sur les cultures de *D.chlorelloïdes* carencées en azote.

en culture et carencées selon le procédé décrit dans la partie Matériel et Méthodes (cfr.II.1). La densité de cellules au moment de l'expérience était de 550000 cellules/ml.

III.1.1.1. Résultat obtenu avec une concentration de 2 mg N/l.

La Fig.3.11 représente ce que nous avons obtenu. Nous observons une diminution de la concentration en azote du filtrat durant les cinq premières minutes puis une augmentation, une nouvelle diminution après 15 minutes suivie d'une réaugmentation. Cette disparition très rapide (en 5 minutes) peut s'expliquer par la consommation de luxe (cfr.Synthèse Bibliographique I.2.2). Suite à celle-ci, on devrait observer un équilibre où la vitesse d'assimilation dépendrait de l'utilisation des nitrates pour suffire aux besoins métaboliques. Au contraire, nous observons une hausse de la concentration.

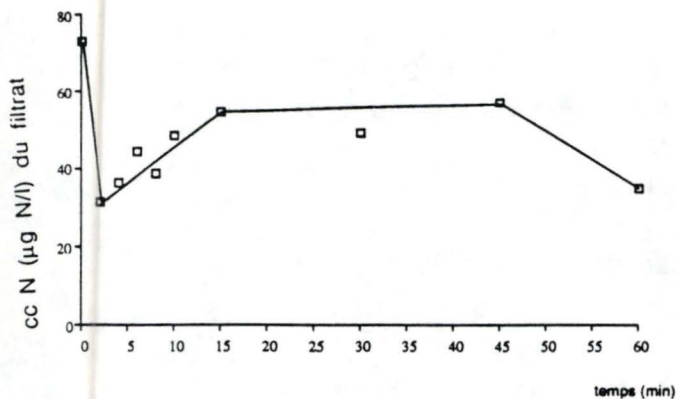
III.1.1.2. Résultat obtenu avec une concentration de 24 mg N/l.

Le résultat obtenu est présenté à la Fig.3.12. Une diminution de l'azote du filtrat durant les vingt premières minutes est suivie d'une augmentation et d'une nouvelle diminution.

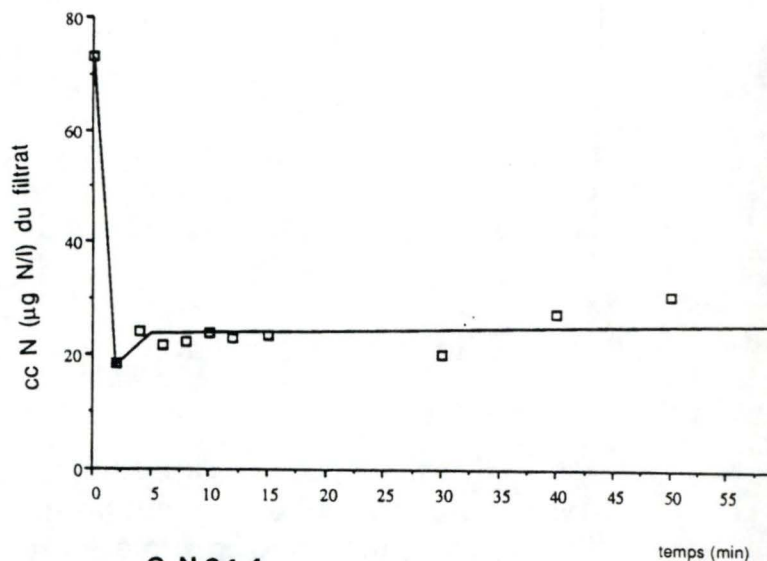
Vu la mauvaise qualité de ces résultats (alternance de phases de diminution et d'augmentation de la concentration en nitrates du filtrat), nous avons continué les expériences dans une autre gamme de concentration variant de 0 à 200 μ g N/l.

III.1.2. Assimilation pour des concentrations variant de 0 à 200 μ g N/l.

Les algues ont été mises en carencage de la même façon que précédemment. L'état nutritionnel des cellules au moment des expériences est déterminé ainsi que la concentration en phosphore inorganique afin de s'assurer que l'azote est bien le facteur limitant. Le tableau 3.3 donne les différentes concentrations en phosphore inorganique mesurées. La concentration de départ dans

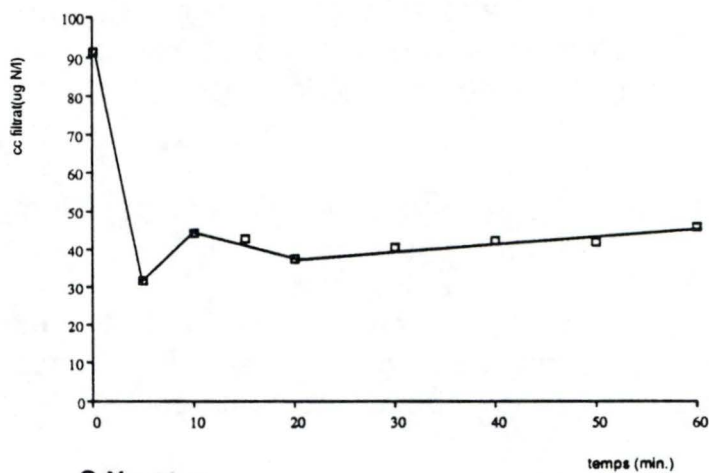


C:N=32.4

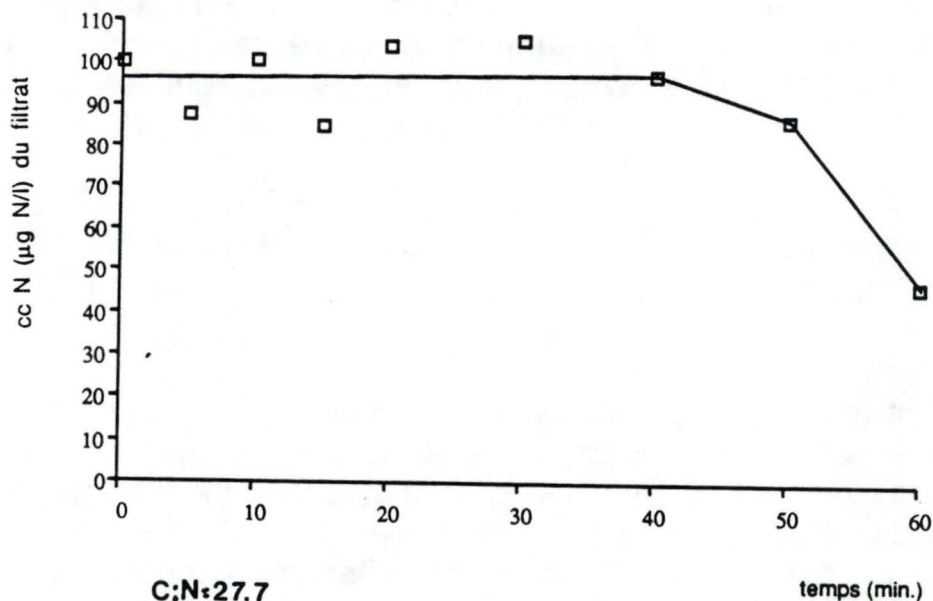


C:N=34.4

Figure 3.13a et b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 75 µg N/l.



C:N=41.8



C:N=27.7

Figure 3.14a et b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 µg N/l.

le milieu W.C. est de 1550 $\mu\text{g P/l}$. Celle-ci ne descend jamais en dessous de 270 $\mu\text{g P/l}$, ce qui peut être certainement considéré comme non limitante pour la croissance algale. Dans la suite des expériences, nous avons également dosé les nitrites présents dans le milieu des cultures au départ afin de s'assurer que ceux-ci n'interfèrent pas avec les résultats obtenus.

III.1.2.1. Résultats obtenus en fonction de la concentration de départ.

III.1.2.1.1. Concentration de 75 $\mu\text{g N/l}$.

Les résultats obtenus avec cette concentration de départ sont présentés à la Fig. 3.13a et b. Nous avons pu mettre en évidence, grâce à une première filtration après deux minutes, que les algues assimilent très rapidement.

III.1.2.1.2. Concentration de 100 $\mu\text{g N/l}$.

Les Fig.3.14a et b représentent les résultats obtenus sur deux cultures ayant reçu chacune une concentration de $\pm 100 \mu\text{g N/l}$ au temps 0. Les résultats sont tout à fait différents. A la Fig.3.14a, nous voyons que l'assimilation ne commence qu'après quarante minutes d'incubation, les algues assimilant la moitié de l'azote ajouté durant les vingt dernières minutes. Sur la Fig. 3.14b, par contre, plus de la moitié de l'azote est assimilé en cinq minutes.

Au vu de ces résultats, une filtration a également été effectuée après deux minutes d'incubation pour les expériences suivantes afin de voir ce qu'il se passe entre le moment de l'ajout de l'azote et la première filtration (après cinq minutes).

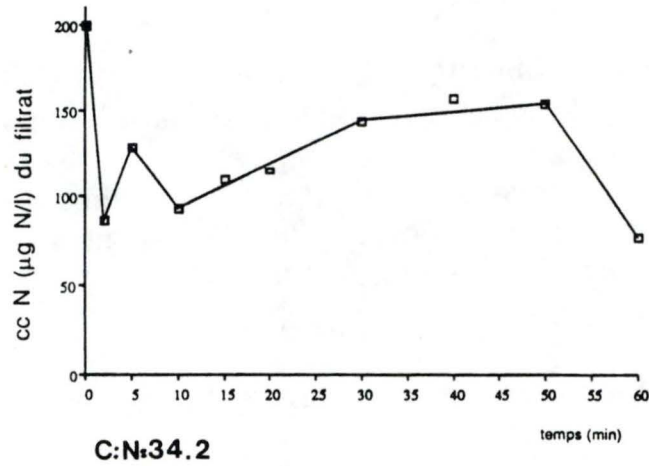


Figure 3.15. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 200 $\mu\text{g N/l}$.

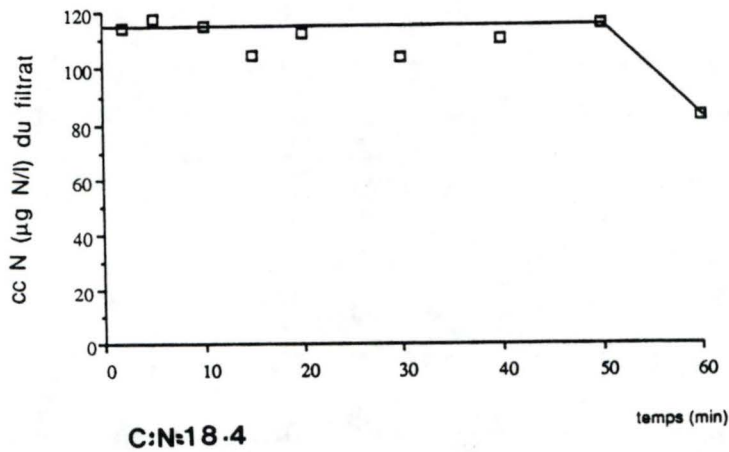


Figure 3.16a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps (culture ayant reçu 1 μmole d'azote).

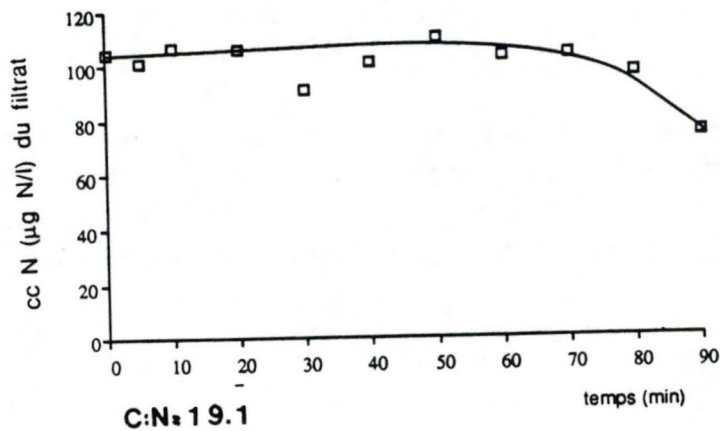


Figure 3.16b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps (culture ayant reçu 5 μmoles d'azote).

III.1.2.1.3. Concentration de 200 $\mu\text{g N/l}$.

Ce même type d'expérience a été effectué avec une concentration de départ de 200 $\mu\text{g N/l}$. La Fig.3.15 nous montre également une assimilation très rapide (de l'ordre de deux minutes).

III.1.2.2. Présentation des autres résultats.

Afin de vérifier que ces résultats obtenus ne soient pas dûs à une perturbation d'origine métabolique provenant d'un carençage trop poussé, nous avons divisé la culture utilisée en deux parties, l'une recevant 1 μmole de $\text{N-NO}_3/\text{l}$ vingt-quatre heures avant le début de l'expérience et l'autre 5 μmoles . Le fait de rajouter 5 μmoles permettrait aux cellules de réactiver la nitrate réductase (Dauta, 1983).

III.1.2.2.1. Culture ayant reçu 1 μmole .

Le graphe présenté à la Fig.3.16a nous montre que l'assimilation ne commence qu'après 50 minutes. Vu ce résultat, nous avons choisi un temps d'incubation beaucoup plus long pour la culture recevant 5 μmoles . Celui-ci a été fixé à 90 minutes au lieu de 60.

III.1.2.2.2. Culture ayant reçu 5 μmoles .

L'assimilation ne commence qu'après 70 minutes comme montré à la Fig.3.16b.

Nous n'avons donc pas noté de différence entre les deux résultats obtenus, l'assimilation ne débutant qu'après un certain laps de temps variable. En connaissant les rapports C:N mesurés nous voyons que ceux-ci sont respectivement de 18,4 et de 19,1; ceux-ci n'étant pas aussi éloignés de la valeur du Redfield ratio.

Temps (min)	CN
0	37,9
2	22,2
4	22,8
8	23,5
10	23,6

Temps (min)	CN
0	40,2
2	22,5
4	24,2
8	15,7
10	16,7
30	13,8

Tableau 3.4. Evolution des rapports C:N en fonction du temps lors de deux expériences d'assimilation sur des cultures de *D.chlorelloïdes* carencées en azote et auxquelles on rajoute une certaine concentration en nitrates.

Nous remarquons aussi que les cellules ayant reçu $5\mu\text{moles}$ commencent l'assimilation beaucoup plus tard, ceci pouvant s'expliquer par le fait qu'elles aient reçu une quantité d'azote supérieure leur permettant de reconstituer une partie plus importante de leur stock intracellulaire.

III.1.2.3. Comparaison des rapports C:N.

Ces mesures nous ont apporté de précieuses informations. Les valeurs mesurées sont indiquées en dessous de chaque graphique présentés ci-dessus.

En comparant les rapports C:N, nous voyons que les cultures présentant une assimilation très rapide ont des rapports égaux à 41,8 - 32,4 - 34,4 et 34,2. Ces rapports (très éloignés de la valeur de 8) montrent bien que les cellules sont très carencées en azote. Par contre, dans le cas où l'assimilation ne débute qu'après quarante minutes, le rapport C:N mesuré est de 27,7. Les différences observées, à savoir une assimilation très rapide ou une assimilation ne commençant qu'après un certain laps de temps pourraient s'expliquer par la différence observée au niveau de ces rapports.

III.1.2.4. Reconstitution des stocks intracellulaires.

Nous avons également mesuré les rapports C:N à différents moments lors de deux expériences correspondant aux Fig. 3.13a et b. Les résultats sont présentés au tableau 3.4. Les rapports C:N au temps 0 (au moment de l'ajout de l'azote) sont respectivement de 37,9 et de 40,2. Après deux minutes, ceux-ci ont baissé passant de 37,49 à 22,2 et de 40,2 à 22,5.

Tout ceci confirme donc le fait que l'azote disparu après deux minutes a bien été assimilé par les algues.

Ainsi, Dortch et al. (1991) ont également démontré une assimilation très rapide des nitrates sur des cultures en continu de *Thalassiosira pseudonana* carencées en nitrates. La vitesse

d'assimilation de ceux-ci est d'abord lente et augmente par la suite jusqu'à une valeur maximale atteinte entre une et trois minutes après l'ajout de l'azote sous forme de $N-NO_3^-$. Une fois le maximum atteint, la vitesse d'assimilation reste constante ou diminue. Ces résultats obtenus chez *T.pseudonana* confirment donc ceux que nous avons obtenus chez *D.chlorelloïdes*.

Il nous apparaît également que ce sont les cultures ayant des rapports C:N très élevés (de l'ordre de 32 à 40) qui présentent cette phase rapide d'assimilation suivie d'un arrêt. Cela peut s'expliquer par la consommation de luxe (cfr.Synthèse Bibliographique I.2.2).

Par contre, les cultures dont le rapport C:N lors de l'expérience est moindre ne commencent à assimiler les nitrates qu'après un certain laps de temps.

Les graphes des Fig.3.13a et b, 3.14a et 3.15 nous ont aussi permis de mettre un autre phénomène en évidence. En effet, après l'assimilation, on observe une remontée de la concentration en azote ne pouvant s'expliquer que par une excrétion. Les auteurs suivants Serra, Llama et Cadenas (1978) ont montré chez une diatomée marine, *Skeletonema costatum*, carencée en azote et mise en présence de nitrates que l'incorporation de ceux-ci est très rapide et est suivie d'une excrétion de nitrites. Ils proposent un modèle de la régulation de l'assimilation des nitrates chez cette diatomée. Une perméase P serait responsable du transport des nitrates tandis qu'une perméase P' permettrait le relargage des nitrites. Une fois à l'intérieur des cellules, une partie des nitrates est réduite en nitrites. La nitrite réductase réduit ensuite ceux-ci en ammonium qui peut être incorporé aux squelettes carbonés pour former les amino-acides. Mais, un affaiblissement ou une perturbation des activités de la nitrite réductase peuvent mener à une accumulation des nitrites à l'intérieur des cellules, ceux-ci devenant toxiques. Un mécanisme actif d'excrétion est donc nécessaire. Or, le dosage (cfr.Matériel et Méthodes II.2.3.2) utilisé nous donne la somme des nitrates et des nitrites du milieu. Ces hausses de concentration en azote après l'assimilation peuvent donc s'expliquer par le fait qu'il y ait eu une excrétion de nitrites également dosés.

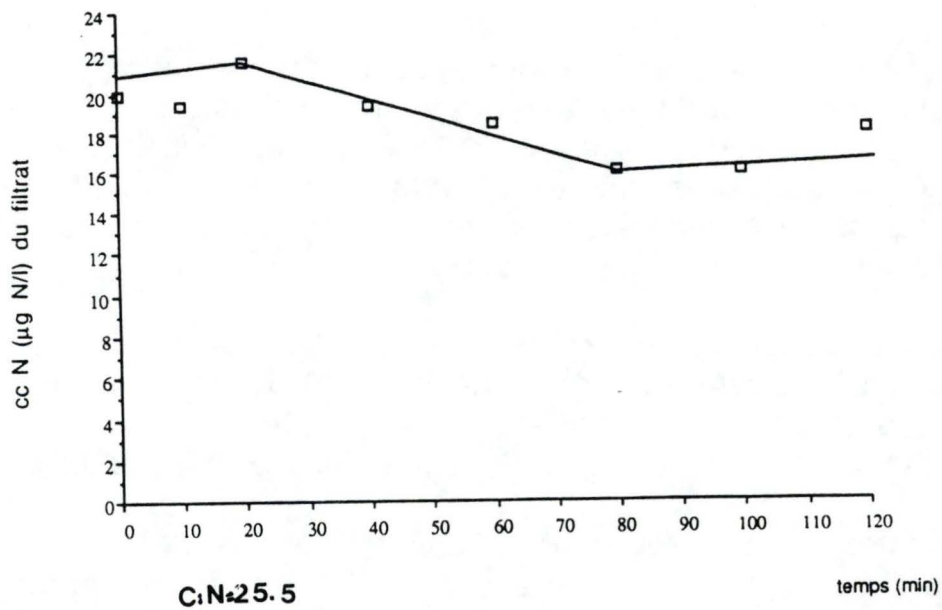


Figure 3.17a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 20 µg N/l.

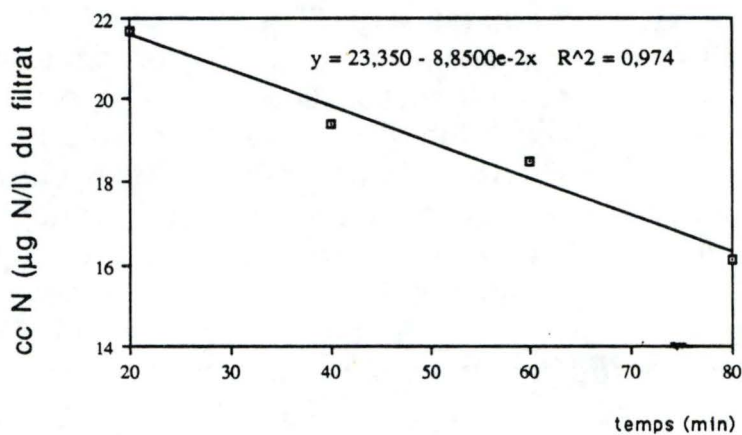
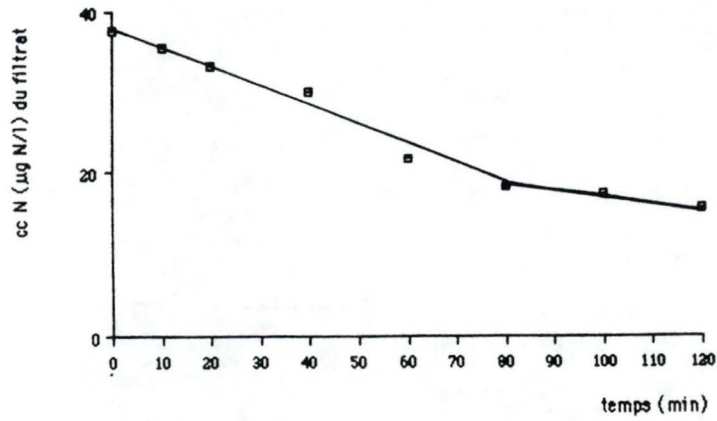


Figure 3.17b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 20 à 80 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en µg N/l/min.



C:N=22.5

Figure 3.18a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 37 µg N/l.

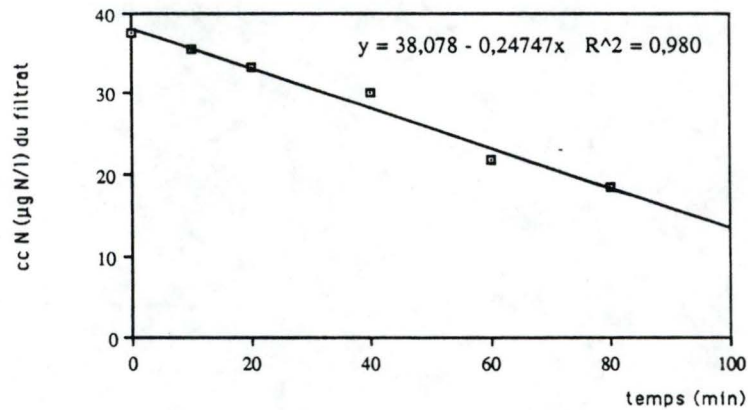


Figure 3.18b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 0 à 80 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en µg N/l/min.

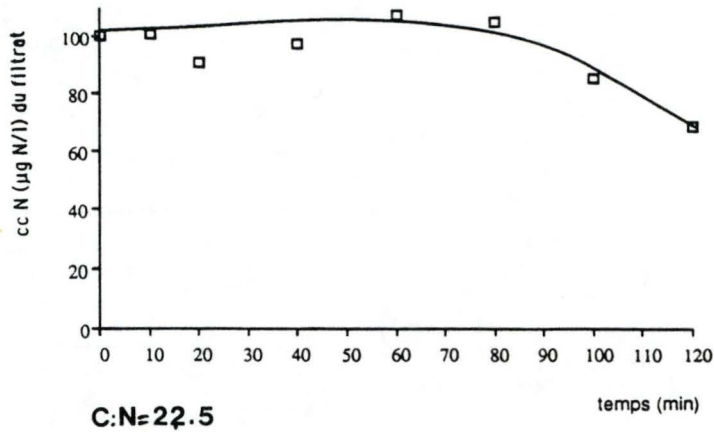


Figure 3.19a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 $\mu\text{g N/l}$.

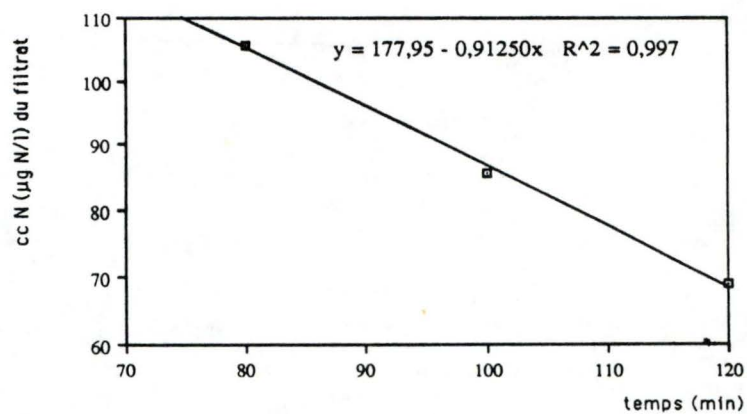


Figure 3.19b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 80 à 120 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Les résultats obtenus par la suite nous ont également permis de calculer des vitesses d'assimilation à différentes concentrations.

III.1.2.5. Mesure des vitesses d'assimilation.

III.1.2.5.1. Concentration de 20 $\mu\text{g N/l}$.

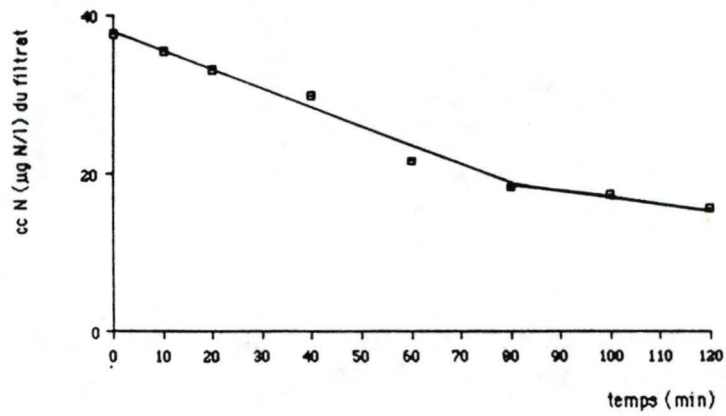
La Fig.3.17a représente la cinétique obtenue pour une concentration de départ de 20 $\mu\text{g N/l}$. Nous voyons que l'assimilation débute après 20 minutes et que les algues assimilent durant une heure. Durant ces 60 minutes, la vitesse d'assimilation est linéaire. Il nous a donc été possible de calculer une vitesse d'assimilation. Celle-ci est donnée par la pente de la droite (Fig.3.17b). Nous avons 0,0885 $\mu\text{g N/l/min.}$, c'est-à-dire 5,31 $\mu\text{g N/l/h}$. La densité de cellules étant de 525000 cellules/l, nous obtenons une vitesse d'assimilation de 0,010 $\mu\text{g N}/10^6$ cellules/h.

III.1.2.5.2. Concentration de 37 $\mu\text{g N/l}$.

L'assimilation en fonction du temps est représentée à la Fig.3.18a. Celle-ci est linéaire durant les 80 premières minutes, les algues assimilant la moitié de l'azote fourni au départ. La Fig. 3.18b représente la droite d'assimilation durant ces 80 minutes. La pente de la droite nous donne 0,25 $\mu\text{g N/l/min.}$, c'est-à-dire 15 $\mu\text{g N/l/h}$, ce qui donne, en connaissant la densité de cellules (800000 cellules/ml), 0,019 $\mu\text{g N}/10^6$ cell./h.

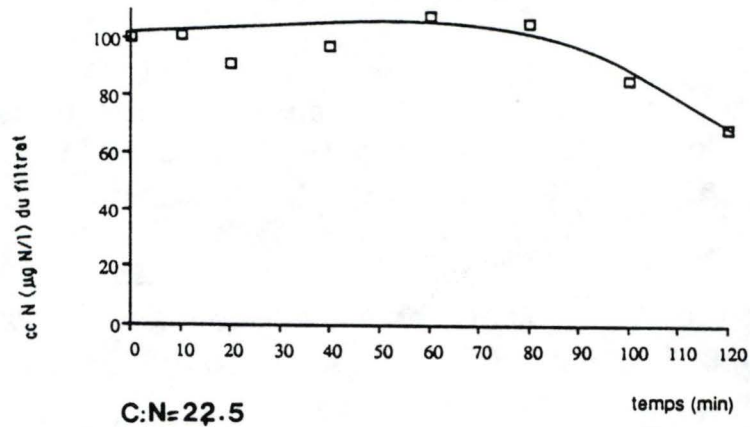
III.1.2.5.3. Concentration de 100 $\mu\text{g N/l}$.

La Fig.3.19a représente le résultat obtenu. L'assimilation débute après 80 minutes et se poursuit durant les 40 dernières minutes d'incubation. La droite d'assimilation est montrée à la Fig.3.19b dont la pente est de 0,91250 $\mu\text{g N/l/min.}$, c'est-à-dire



C:N=22.5

Figure 3.20a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 37 µg N/l.



C:N=22.5

C:N=22.5

Figure 3.20b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 µg N/l.

54,75 $\mu\text{g N/l/h}$. La densité de cellules étant de 525000 cell./ml, nous obtenons une vitesse de 0,104 $\mu\text{g N}/10^6$ cell./h.

Au fur et à mesure que la concentration en substrat augmente, la vitesse d'assimilation augmente également comme attendu. En effet, en représentant la vitesse d'assimilation en fonction de la concentration en substrat, on obtient une courbe de Michaelis-Menten (cfr. Synthèse Bibliographique II.3.1.1) où dans un premier temps la vitesse d'assimilation augmente linéairement avec la concentration en substrat pour atteindre ensuite un niveau de saturation.

III.2. Etude de la relation vitesse - substrat.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la vitesse d'assimilation est bien linéaire pour deux concentrations (37 et 100 $\mu\text{g N/l}$). Les résultats sont présentés à la Fig.3.20a et b. D'après ceux-ci, nous avons déterminé un temps d'incubation de 90 minutes, temps durant lequel les vitesses d'assimilation sont linéaires. Dans un second temps, nous avons mesuré la vitesse d'assimilation après 90 minutes aux concentrations suivantes : 20,1 - 25,6 - 61,2 - 128,1 et 186,9 $\mu\text{g N/l}$. L'évolution de la vitesse en fonction de la concentration en substrat est montrée à la Fig.3.21. La vitesse montre une saturation pour des concentrations en azote proches de 200 $\mu\text{g N/l}$. Les paramètres cinétiques K_m et V_m ont été déterminés de façon approximative :

$$-V_m = \pm 49 \mu\text{atg N} / 10^9 \text{ cellules /h.}$$

$$-K_m = \pm 3,3 \mu\text{atg N/l.}$$

Des vitesses maximales d'assimilation de l'azote ont été mesurées par Dauta (1983) sur 8 espèces phytoplanctoniques avec des valeurs variant dans une large gamme. A 20°C par exemple, elles varient de 9 à 512 $\mu\text{atg N}/10^9$ cell./h tandis que les valeurs de K_s N varient de 1 à 7,5 $\mu\text{atg N/l}$ pour l'ensemble des espèces. Pour *Dictyosphaerium* sp. les valeurs de V_m N sont comprises entre 27 et 175 $\mu\text{atg N}/10^9$ cellules/h. et les valeurs de K_s N entre

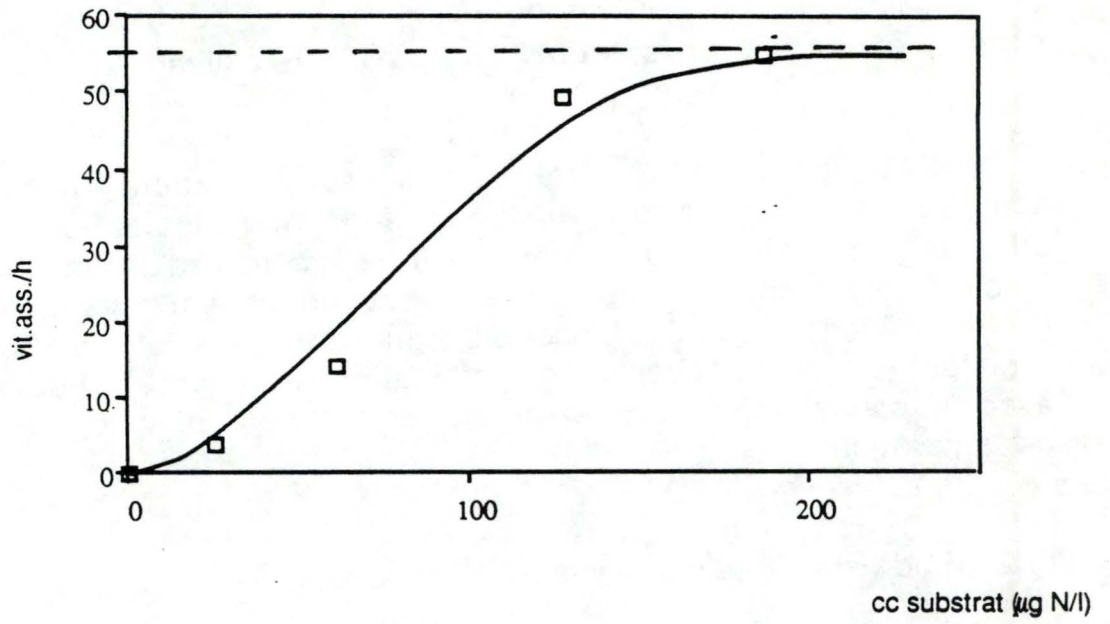


Figure 3.21. Graphe représentant la vitesse d'assimilation ($\mu\text{g N/l/h}$) en fonction de la concentration en substrat ($\mu\text{g N/l}$).

2 et 4 $\mu\text{atg N}/10^9$ cellules. Celles que nous avons obtenues tombent dans ces gammes.

Nous n'avons pas pu calculer plus précisément les valeurs de K_m et V_m car nous n'avons pas assez de points, de plus la courbe arrivait au plateau mais ne saturait pas encore (cfr.Fig.3.21).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

Rappelons que le but premier du mémoire était d'étudier la production algale et l'assimilation de l'azote dans les écosystèmes agro-piscicoles, ce qui n'a pu être réalisé. Notre travail, à savoir l'étude de l'assimilation azotée par une algue planctonique isolée de la Meuse, vise à la mise au point de l'étude de l'assimilation avec des techniques relativement simples susceptibles d'être utilisées sur des cultures d'algues planctoniques de milieux tropicaux, où l'azote est souvent le facteur limitant.

Dans un premier temps, la technique de culture et de carencage des algues a été maîtrisée. Des comptages de cellules et des mesures de densité optique nous ont permis de déterminer les taux de croissance de *D.chlorelloïdes* à 25°C, soit 0,8-0,9j⁻¹ en milieu complet et au minimum 0,4j⁻¹ en milieu carencé en azote. Ces taux ont également été déterminés par suivi du carbone cellulaire donnant également de bons résultats.

Dans notre cas, le fait d'utiliser des cultures en batch rendait les algues difficilement contrôlables du fait que les conditions de cultures n'étaient pas constantes (cfr. taux de croissance plus variables dans le cas des cultures carencées en azote), d'où l'intérêt d'employer des cultures en chemostat où la biomasse algale est maintenue constante. Le quota minimum cellulaire en azote a également été déterminé (en moyenne 84 µatgN/l), celui-ci étant confirmé par les valeurs de la littérature.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'assimilation des nitrates. La technique d'étude employée au cours de notre travail est simple et consiste à mettre des algues carencées en azote dans un milieu où la concentration initiale en nitrates est connue et suivre l'évolution de la concentration dans le filtrat.

Des problèmes se sont posés au niveau de l'étude de l'assimilation avec des concentrations en azote de l'ordre du mg. En effet, la mauvaise qualité des résultats obtenus nous fait penser à un problème de dosage, la technique utilisée n'étant pas adaptée à ce type d'étude. Nous avons donc choisi de travailler dans une gamme de concentration beaucoup plus faible, de l'ordre du µg. La technique utilisée, à savoir la réduction des nitrates en nitrites par passage sur une colonne oxydo-réductrice donne de bons résultats. En ce qui concerne l'assimilation en fonction du

temps, deux types de résultats ont été obtenus : dans le premier cas, une assimilation très rapide (en deux minutes) due à la consommation de luxe; dans le deuxième, une assimilation ne commençant qu'après un certain laps de temps (50 à 90 minutes). Ces différences observées peuvent s'expliquer par le degré de carence des algues. Celui-ci est estimé par la mesure du rapport C:N de la biomasse algale lors des expériences. Ces mesures nous ont également permis de vérifier le fait que les algues reconstituent leurs stocks intracellulaires, le rapport C:N passant, par exemple, de 40,2 à 22,5. Des vitesses d'assimilation ont également été déterminées pour différentes concentrations en nitrates. Celles-ci augmentent avec une concentration croissante en nitrates comme attendu, la concentration de 100 μg d'azote/l n'étant pas saturante. Un autre phénomène a été mis en évidence, résultant sans doute d'une excrétion de nitrites après l'assimilation.

Nous avons également fait une approche de l'assimilation en fonction de la concentration en substrat donnant un V_m et un K_m approximatifs :

V_m : $\pm 49 \mu\text{atg N}/10^9$ cellules/h;

K_m : $\pm 3,3 \mu\text{atg N/l}$,

ces valeurs tombant dans la gamme de celles trouvées pour *Dictyosphaerium sp.* par Dauta.

Nous suggérons donc au vu des résultats obtenus tout au long des expérimentations de :

- s'assurer du fait que les expériences d'assimilation se fassent dans des conditions constantes de lumière et de température, ces facteurs influençant l'assimilation des nitrates.

- mesurer la concentration en nitrites des filtrats récupérés au cours des expériences afin de vérifier le fait qu'il y a bien une excrétion par les algues.

Bibliographie.

- Abdullah, A.-N., Ahmed, J., 1975. Regulation of nitrate assimilation by amino acids in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.*, 16, 971-979.
- Ahmed, J., Morris, I., 1968. The effect of 2,4 dinitrophénol and other uncoupling agents on the assimilation of nitrate and nitrite by *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Acta*, 162, 32-38.
- Berman, T., Sherr, B.F. and E., Wynne, D., McCarthy, J.J., 1984. The characteristics of ammonium and nitrate uptake by phytoplankton in Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.*, 29 (2), 287-297.
- Billen, G., Descy, J.-P., Everbecq, P., Servais, P. et Smitz, J., 1985. Etude écologique de la Haute Meuse et modélisation du fonctionnement de l'écosystème aquatique. Evaluation de l'impact écologique des centrales nucléaires de Chooz. Rapport final. 250 p.
- Blinks, L.R., Nielsen, J.P., 1940. The cell sap of *Hydrodictyon*. *J. Gen. Physiol.*, 23, 551-559.
- Bodson, J.-P., 1990. Dosage de l'azote en milieu aquatique : mise au point de la mesure des ions nitrates, dans la gamme de 0 à 100 µg N/l, par réduction en ions nitrites sur une colonne cadmium-cuivre. Travail de fin d'étude, 70 p.
- Bourrelly, P., 1968. Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II : Les algues jaunes et brunes. Boubée, N. et Cie (Ed.), 438 p.
- Brunel-Delclaux, L., Guerri, M.M., 1980. Cinétiques d'assimilation et de croissance de *Scenedesmus crassus*. Etude expérimentale et modélisation. Thèse 3ème cycle, Toulouse, 226 p.
- Collos, Y., 1983. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 4. Non-linear phenomena and the estimation of the maximum uptake rate. *J. Plankton Res.*, 5, 677-691.
- Corner, E.D.S., Davies, A.G., 1971. Plankton as a factor in the nitrogen and phosphorus cycles in the sea. *Advan. Marine Biology*, 9, 101-204.

Chu, S.P., 1943. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of plankton algae. Part II. The influence of the concentration of inorganic nitrogen and phosphate phosphorus. *J. Ecol.*, 31 (2), 109-148.

Dauta, A., 1983. Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative de huit espèces en culture. Cinétiques d'assimilation et de croissance : étude expérimentale. Modélisation appliquée aux cultures et à un milieu naturel : le Lot. Thèse Doc., Université Paul Sabatier, Toulouse, 166 p.

Davies, E.A., 1953. Nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 28, 539-544.

Dermine, B., 1985. Bilan des charges en nutriments charriés au long du cours de la Meuse belge. Thèse Doc., F.N.D.P., Namur, 184p.

Descy, J.-P., 1988. Eutrophisation en rivière. *Probio-Revue*, 11, n° 1-2, 107-123.

Descy, J.-P., Willems, C., 1991. Contribution à la connaissance du phytoplancton de la Moselle (France). *Cryptogamie, Algol.*, 12 (2), 87-100.

Dortch, Q., 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, Vol.61, 183-201.

Dortch, Q., Thompson, P.A., Harrison, P.J., 1991. Variability in nitrate uptake kinetics in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J.Phycol.*, 27, 35-39.

Droop, M.R., 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J.Phycol.*, 9, 264-272.

Ducobu, H., 1989. Mise au point d'une méthode de mesure de l'assimilation du phosphore par le plancton de la Meuse. Mémoire de licence en Sc. Zool., F.N.D.P., Namur, 79 p.

Eppley, R.W., Rogers, J.N., 1970. Inorganic nitrogen assimilation of *Ditylum brightwellii*, a marine plankton diatom. *J. Phycol.*, 6, 344-350.

Eppley, R.W., Rogers, J.N., McCarthy, J.J., 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 14, 912-920.

Frazisket, L., 1973. Uptake and accumulation of nitrate and nitrite by reef corals. *Naturwiss.*, 60, 552.

Génicot, L., Manil, G., Bonenfant, P., Amand, M., Joris, A., Descy, G., Ruwet, J., Moureaux, P., Stiennon, S., Demoulin, R., Boland, A., 1973. Histoire de Wallonie. Edit. universitaire PRIVAT, Toulouse, 502 p.

George, P., 1972. La France. Presses universitaires de France, Paris, 269 p.

Glibert, P.M., Goldman, J.C., Carpenter, E.J., 1982. Seasonal variations in the utilization of ammonium and nitrate by phytoplankton in Vineyard Sound, Massachusetts, USA. *Mar. Biol.*, 70, 237-250.

Goering, J.J., Wallen, D.D., Naumann, R.A., 1970. Nitrogen uptake by phytoplankton in the discontinuity layer of the eastern subtropical Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 15, 789-796.

Goldman, J.C., Glibert, P.M., 1983. Kinetics of inorganic nitrogen uptake by phytoplankton. In Carpenter, E.J., Capone, D.G. (eds.), *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press, New York, 233-274.

Grant, B.R., Turner, I.M., 1969. Light-stimulated nitrate assimilation in several species of algae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, 995-1004.

Gutknecht, J., Dainty, J., 1968. Ionic relations of marine algae. *Oceanogr. Marine Biol. Ann. Rev.*, 6, 163-200.

Harvey, W.A., Caperon, J., 1976. The rate of utilization of urea, ammonium, and nitrate by natural populations of marine phytoplankton in a eutrophic environment. *Pacif. Sci.*, 30, 329-340.

Hattori, A., 1962. Light-induced reduction of nitrate, nitrite and hydroxylamine in blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, 3, 355-369.

Healey, M.-C., Hendzel, L.L., 1980. Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Vol.37, 442-453.

Hecky, R.E., Kilham, P., 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments : a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol. Oceanogr.*, 33 (4, part 2), 796-822.

Jacques, A.G., Osterhout, W.J.V., 1938. The accumulation of electrolytes. XI. Accumulation of nitrate by *Valonia* and *Halicystis*. *J. Gen. Physiol.*, 21, 767-773.

Kessler, E., 1959. Reduction of nitrate by green algae. In Symposium of Society for Experimental Biol., (XIII), published by Cambridge University Press, 87-105.

Kessler, E., 1964. Nitrate assimilation by plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 15, 57-72.

Komarek, von J., Fott, B., 1983. Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung : Chlorococcales. Das Phytoplankton des Süßwassers, Huber-Pestalozzi, G., 7 (1). In *Die Binnengewässer*, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1044 p.

Kokkinkis, S.A., Wheeler, P.A., 1987. Nitrogen uptake and phytoplankton growth in coastal upwelling regions. *Limnol. Oceanogr.*, 32, 1112-1123.

Kristiansen, S., Lund, B. Aa., 1989. Nitrogen cycling in the Barents Sea I. Uptake of nitrogen in the water column. *Deep Sea Res.*, 36, 255-268.

Le Cohu, R., Gueune, J., 1976. Influence de différentes formes d'azote sur la croissance de *Staurastrum polymorphum* Bréb. (Desmidiacées, Zygnématales). *C.R. Acad. Sc. Paris*, t.283, Série D, 1165-1168.

Lehninger, A.L., 1979. *Biochimie*. Flammarion France, 1088 p.

Liebig, J., 1840. *Die chemie in ihrer adwendungen in agricultur and physiologie*. 4 th ed., 1847. London, Taylor and Walton.

Losada, M., Guerrero, M.G., 1979. The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. In Barber, J. (ed.), *Photosynthesis in relation to model systems*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 363-408.

McCarthy, J.J., 1980. Nitrogen. In I. Morris (ed.), *The physiological ecology of phytoplankton*. Blackwell. Sc. Publ., Oxford, 191-233.

McCarthy, J.J., Wynne, D., Berman, T., 1982. The uptake of dissolved nitrogenous nutrients by Lake Kinneret (Israël) microplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 27, 673-680.

Micha, J.-C., Borlee, M.-C., 1989. Recent historical changes on the Belgian Meuse. In : *Historical Change of Large Alluvial Rivers : Western Europe*. Petts, G.E. (Ed.), 269-295.

Ministère de la région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1984. Surveillance écologique de la Meuse en aval du site de Tihange. Rapport de synthèse, Vol.1, 101 p.

Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, 3, 371-394.

Morris, I., Ahmed, J., 1969. The effect of light on nitrate and nitrite assimilation by *Chlorella* and *Ankistrodesmus*. *Physiol. Plant.*, 22, 1166-1174.

Myers, J., 1949. The patterns of photosynthesis in *Chlorella*. In Frank, J. and Loomis, W.E.(eds), *Photosynthesis Plants*, published by Iowa State College Press, 349-364.

Passera, C., Ferrari, G., 1975. Sulfate uptake in two mutants of *Chlorella vulgaris* with high and low sulfur amino acid content. *Physiol. Plant*, 35, 318-321.

Pégase, 1990. Evaluation de la qualité de la Meuse à Monsin par rapport aux niveaux de la norme eau potabilisable/classe A2.

Pégase, 1990. Evaluation de la qualité de la Meuse à Namèche par rapport aux niveaux de la norme eau potabilisable/classe A2.

Pégase, 1990. Evaluation de la qualité de la Meuse à Jambes par rapport aux niveaux de la norme eau potabilisable/classe A2.

Raven, J.A., 1976. Transport in algal cells. In Luttge, U. et Pitman, M.G. (Ed.), *Transport in Plants II. Part A Cells. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Volume 2*, 129-170.

Rhee, G.-Y., 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.*, 23 (1), 10-25.

Ronner, V., Sorensson, F., Holm-Hansen, O., 1983. Nitrogen assimilation by phytoplankton in the Scotian Sea. *Polar Biol. Ecol.*, 2, 137-147.

Serra, J.L., Llama, M.J., Cadenas, E., 1978. Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum*. I. Kinetics of nitrate uptake. *Plant Physiol.*, 62, 987-990.

Serra, J.L., Llama, M.J., Cadenas, E., 1978. Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum*. II. Regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.*, 62, 991-994

Servais, P., 1987. Etude de la matière organique par les bactéries hétérotrophes en rivière. Développement d'une démarche méthodologique et application à la Meuse belge. Thèse de doctorat (première partie), 156 p.

Syrett, P.J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. In Platt, T. (ed.), *Physiological bases of phytoplankton ecology*. Bull. No. 210, Canadian Government Publishing Center, Hull, Quebec, Canada, 182-210.

Terry, K.L., 1982. Nitrate uptake and assimilation in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricornutum* : Interactions with photosynthesis and with the uptake of other ions. *Mar. Biol.*, 69, 21-30.

Thomas, R.J., Hipkin, C.R. and Syrett, P.J., 1976. The interaction of nitrogen assimilation with photosynthesis in nitrogen deficient cells of *Chlorella*. *Planta*, 133, 9-13.

Ullrich, W.R., 1983. Uptake and reduction of nitrate : algae and fungi. In *Encyclopedia of Plant Physiology. Inorganic plant nutrition*. New Series. Vol. 15 A. Lauchli, A., et Bielski, R.L. (Ed.), 376-397.

Van Craenenbroeck, W., 1986. Characteristics of the water quality of the Meuse. The radiological exposure of the population in the Meuse basin Commission of the European Communities. Report Eur 10670 EN, Brussels, 166 p.

Van Craenenbroeck, W., van den Bos, M. et al., 1983. Profil de qualité de la Meuse. 19-30 septembre 1982. Amsterdam : RIWA, 146 p.

Van Niel, C.B., Allen, M.B. and Wright, B.E., 1953. On the photochemical reduction of nitrate by algae. *Biochem. Biophys. Acta*, 12, 67-74.

Vereerstraeten, J., 1972. Le bassin de la Meuse. Etude de géographie hydrologique. Rev. Bel. Géogr., 94, 1970, 1.2.3., Soc. r. bel. géogr., 339 p.

West, P.W., Ramachandran, T.P., 1966. Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. *Analytica Acta*, 35, 317-324.

Wynne, D., Berman, T., 1990. The influence of environmental factors on nitrate reductase activity in freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia*, 194, 235-245.

Liste des Figures.

Figure 1.1. Courbe logistique de croissance d'une population cellulaire :

- phase 1: phase de latence;
- phase 2: phase de croissance exponentielle;
- phase 3: phase de ralentissement;
- phase 4: phase stationnaire;
- phase 5: phase de déclin.

Figure 1.2. Diagramme représentant le modèle de Monod décrivant la relation entre la concentration externe en nutriment et le taux de croissance μ (d'après Kilham, 1978).

Figure 1.3. Modèle de Droop. Relation entre les stocks intracellulaires (Q) et le taux de croissance (μ) chez cinq espèces (d'après Gotham et Rhee, 1981).

Figure 1.4. Evolution de la biomasse (mg m^{-3} wet wt) algale fixatrice de l'azote atmosphérique dans un lac expérimental du Nord-Ouest de l'Ontario (d'après Hecky et Kilham, 1988).

Figure 1.5. Evolution du nombre de cellules (en conditions steady state, taux de croissance fixé à $0,59\text{j}^{-1}$) en fonction des taux N:P du milieu (d'après Rhee, 1978).

Figure 1.6. Effet de la concentration en ammonium du milieu sur l'assimilation de nitrates et de nitrites du phytoplancton (d'après McCarthy et al., 1975).

Figure 1.7. Courbes de croissance de *Staurastrum polymorphum* en fonction des différentes sources d'azote et des diverses concentrations (d'après Le Cohu et Gueune, 1976).

- a) concentration de 8 mg N/l;
- b) concentrations de 1 et 0,5 mg N/l;
- c) concentration de 4 mg N/l.

, NaNO_3 ; , NH_4NO_3 ; , NH_4Cl ; , témoin.

Figure 1.8. Cinétique montrant la saturation d'un système de transport membranaire (d'après Lehninger, 1979).

Figure 1.9. Schéma de l'assimilation des nitrates (d'après Ullrich, 1983).

- R' nitrate réductase;
- R'' nitrite réductase;
- A antiport;
- C co-transport;
- P pompe à protons (ATPase).

Figure 1.10. Illustration du transport des électrons lors de la réduction des nitrates (d'après Ullrich, 1983).

Figure 1.11. Localisation des stations d'échantillonnage du lac Kinneret en Israël (d'après Wynne et Berman, 1990) :

- WATERSHED (points 1, 2 et 3);
- NATIONAL WATER CARRIER (points 4, 5 et 6);
- lac KINNERET.

Figure 1.12. Activité de la nitrate réductase (nmoles NO_2 formée par μg de chlorophylle *a* et par heure) en fonction de la concentration ambiante en nitrates (d'après Wynne et Berman, 1990) :

- a) au lac Kinneret;
- b) au NWC;
- c) au WS.

Figure 1.13. Relation entre l'activité de la nitrate réductase (nmoles $\text{NO}_2/\mu\text{g}$ chl.a /h) et les concentrations en azote inorganique total ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) (d'après Wynne et Berman, 1990).

- a) au lac Kinneret;
- b) au NWC;
- c) au WS.

Figure 1.14. Activité de la nitrate réductase (nmoles $\text{NO}_2/\mu\text{g}$ chl.a / h) en fonction de la concentration ambiante en ammonium (d'après Wynne et Berman, 1990).

- a) au lac Kinneret;
- b) au NWC;
- c) au WS.

Figure 3.15. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 200 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.16a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps (culture ayant reçu 1 $\mu\text{mole d'azote}$).

Figure 3.16b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps (culture ayant reçu 5 $\mu\text{moles d'azote}$).

Figure 3.17a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 20 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.17b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 20 à 80 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Figure 3.18a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 37 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.18b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 0 à 80 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Figure 3.19a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.19b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 80 à 120 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Figure 3.20a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 37 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.20b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.21. Graphe représentant la vitesse d'assimilation ($\mu\text{g N/l/h}$) en fonction de la concentration en substrat ($\mu\text{g N/l}$).

Figure 1.23. Relation entre la vitesse d'assimilation et la concentration externe en substrat en fonction de l'état des stocks intracellulaires (d'après Ducobu, 1989).

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

Figure 1.24. Valeurs de V et de K_m pour l'assimilation des nitrates en fonction des concentrations en acides aminés libres (d'après Rhee, 1978).

Figure 1.25. Représentation du bassin versant de la Meuse (d'après Micha et Borlee, 1989).

Figure 1.26. Profil de qualité de la Meuse en ce qui concerne l'ammonium (d'après Van Craenenbroeck et al., 1983).

Légende : L rive gauche;
r au milieu;
R rive droite;
* échantillon composé;
Z affluent.

Figure 1.27. Profil de qualité de la Meuse en ce qui concerne les nitrates (d'après Van Craenenbroeck, 1983).

Légende : L rive gauche;
r au milieu;
R rive droite;
* échantillon composé;
Z affluent.

Figure 1.28. Evolution des concentrations en phosphore réactif dissous en différents points de la Meuse durant l'année 1984 (d'après le Ministère de la Région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1985).

Figure 1.29. Evolution des concentrations en silice réactive en différents points de la Meuse durant l'année 1984 (d'après le Ministère de la Région Wallonne pour l'eau, l'environnement et la vie rurale, 1985).

Figure1.30. Profil de qualité de la Meuse. Composition relative du phytoplancton (d'après Van Craenenbroeck, 1983).

Figure1.31. Profil longitudinal de la saturation en oxygène de la Meuse (d'après Van Craenenbroeck, 1983).

Légende : L rive gauche;
r au milieu;
R rive droite;
* échantillon composé;
Z affluent.

Figure1.32. Concentrations en nitrates dans l'eau de la Meuse lors des campagnes de mesure (d'après Billen et al., 1985).

Figure1.33. Evolution des concentrations en nitrates annuelle pour trois stations (Liège, Jambes, Namèche) de la Meuse belge de 1962 à 1986 (d'après Micha et Borlee, 1989).

Figure1.34. Evolution des concentrations en ammonium annuelles pour trois stations (Liège, Jambes, Namèche) de la Meuse belge de 1962 à 1986 (d'après Micha et Borlee, 1989).

Figure1.35. Evolution de la concentration en phosphates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Figure1.36. Evolution des flux de nitrates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) de 1972 à 1988 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Figure1.37. Evolution de la concentration en nitrates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Figure1.38. Evolution des flux d'ammonium en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Figure1.39. Evolution de la concentration en ammonium en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Figure 1.40. Evolution des flux d'orthophosphates en trois points de la Meuse belge (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) à partir de 1972 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Figure 2.1. Représentation de *Dictyosphaerium chlorelloïdes*. (d'après Komarek et Fott, 1983).

Légende :

- a) cellules individuelles;
- b) développement de colonies;
- d-e) colonies;
- f) restes de la paroi de la cellule mère.

Figure 2.2. Représentation d'un fragment de *Synedra ulna* (Nitzsch.) Ehrbg. Vue valvaire (d'après Bourrelly, 1969).

Légende : trait d'échelle = 10 μm

Figure 2.3. Photo de *Stephanodiscus hantzschii* Grun. (d'après Descy et Willems, 1991).

Légende : trait d'échelle = 1 μm .

Figure 2.4. Représentation du gradient discontinu de Percoll.

Figure 2.5. Schéma d'une bouteille de culture.

Figure 2.6. Relations entre le nombre de cellules et la densité optique en fonction de l'état nutritionnel (d'après Dauta, 1983).

Figure 3.1. Relation entre la densité cellulaire et la densité optique à 663 nm (parcours optique : 1 cm) de la culture de *D.chlorelloïdes*.

- a) culture non carencée en azote,
- b) culture carencée en azote.

Figure 3.2a. Relation entre la densité cellulaire et la densité optique à 750 nm (parcours optique : 1 cm) d'une culture de *D.chlorelloïdes* non carencée en azote.

Figure 3.2b. Relation entre la densité cellulaire et la densité optique à 750 nm (parcours optique : 1 cm) d'une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote.

Figure 3.3. Courbes de croissance de *D.chlorelloïdes* à 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), dans le milieu de culture W.C. non carencé en azote.

Figure 3.4. Détermination du taux de croissance de *D.chlorelloïdes* (milieu W.C. non carencé, 25 °C ± 1), par régression de ln de la densité cellulaire en fonction du temps.

Figure 3.5. Courbes de croissance de *D.chlorelloïdes* à 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), dans le milieu de culture W.C. carencé en azote.

Figure 3.6. Détermination du taux de croissance de *D.chlorelloïdes* (milieu W.C. carencé en azote, 25 °C ± 1), par régression de ln de la densité cellulaire en fonction du temps.

Figure 3.7. Courbe de croissance de la culture de *D.chlorelloïdes* dont les teneurs en C:N sont présentées au tableau 3.2a.

Figure 3.8. Courbe de croissance de la culture de *D.chlorelloïdes* dont les teneurs en C:N sont présentées au tableau 3.2b.

Figure 3.9. Calcul du taux de croissance d'une culture de *D.chlorelloïdes* non carencée en azote par deux méthodes :

- a) les comptages cellulaires,
- b) l'évolution du carbone cellulaire.

Figure 3.10. Calcul du taux de croissance d'une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote par deux méthodes :

- a) les comptages cellulaires,
- b) l'évolution du carbone cellulaire.

Figure 3.11. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 2 mg N/l.

Figure 3.12. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 24 mg N/l.

Figure 3.13a et b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 75 μg N/l.

Figure 3.14a et b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 μg N/l.

Figure 3.15. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 200 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.16a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps (culture ayant reçu 1 $\mu\text{mole d'azote}$).

Figure 3.16b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps (culture ayant reçu 5 $\mu\text{moles d'azote}$).

Figure 3.17a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 20 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.17b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 20 à 80 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Figure 3.18a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 37 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.18b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 0 à 80 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Figure 3.19a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.19b. Evolution de la concentration en azote du filtrat dans un intervalle de temps de 80 à 120 minutes correspondant à une vitesse d'assimilation linéaire. La pente de la droite donne la vitesse d'assimilation exprimée en $\mu\text{g N/l/min}$.

Figure 3.20a. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 37 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.20b. Evolution de la concentration en azote du filtrat au cours du temps. Concentration de départ : 100 $\mu\text{g N/l}$.

Figure 3.21. Graphe représentant la vitesse d'assimilation ($\mu\text{atgN}/10^9$ cellules/h) en fonction de la concentration en substrat ($\mu\text{atg N/l}$).

Liste des Tableaux.

Tableau 1.1. Concentration en ions dans la vacuole et dans le cytoplasme de différentes algues dont *Nitella clavata* (d'après Raven, 1976).

Tableau 1.2. Taux d'assimilation de l'azote marqué N¹⁵ (μmoles N assimilé/l/h) et préférence (index de préférence relatif-RPI; McCarthy et al., 1977) du phytoplancton naturel (d'après Wynne et Berman, 1990).

Tableau 1.3. Tableau montrant les préférences pour les nitrates ou l'ammonium (modifié, d'après Dortch, 1990).

Légende :

- + : taux significativement >1, c'est-à-dire préférence pour les nitrates;
- = : pas de différence, c'est-à-dire pas de préférence pour l'une ou l'autre forme;
- : taux significativement <1, c'est-à-dire préférence pour l'ammonium.

Tableau 1.4. Comparaison des différents groupes phytoplanctoniques de la Meuse belge supérieure entre l'été 1946, 1953 et l'automne 1981 (d'après Micha et Borlee, 1989).

Tableau 2.1. Composition du milieu W.C.

Tableau 3.1. Evolution de la D.O. à 663 nm (parcours optique : 1 cm) d'une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote. L'ajout d'azote au jour 11 provoque une augmentation de la D.O., suite à la régénération de la chlorophylle.

Tableau 3.2a. Evolution des teneurs en carbone et en azote de la biomasse algale, dans une culture de *D.chlorelloïdes* non carencée en azote.

Tableau 3.2b. Evolution des teneurs en carbone et en azote de la biomasse algale, dans une culture de *D.chlorelloïdes* carencée en azote.

Tableau 3.3. Tableau reprenant les concentrations en phosphore inorganique mesurées lors des différentes expériences d'assimilation sur les cultures de *D.chlorelloïdes* carencées en azote.

Tableau 3.4. Evolution des rapports C:N en fonction du temps lors de deux expériences d'assimilation sur des cultures de *D.chlorelloïdes* carencées en azote et auxquelles on rajoute une certaine concentration en nitrates.

Annexe 1

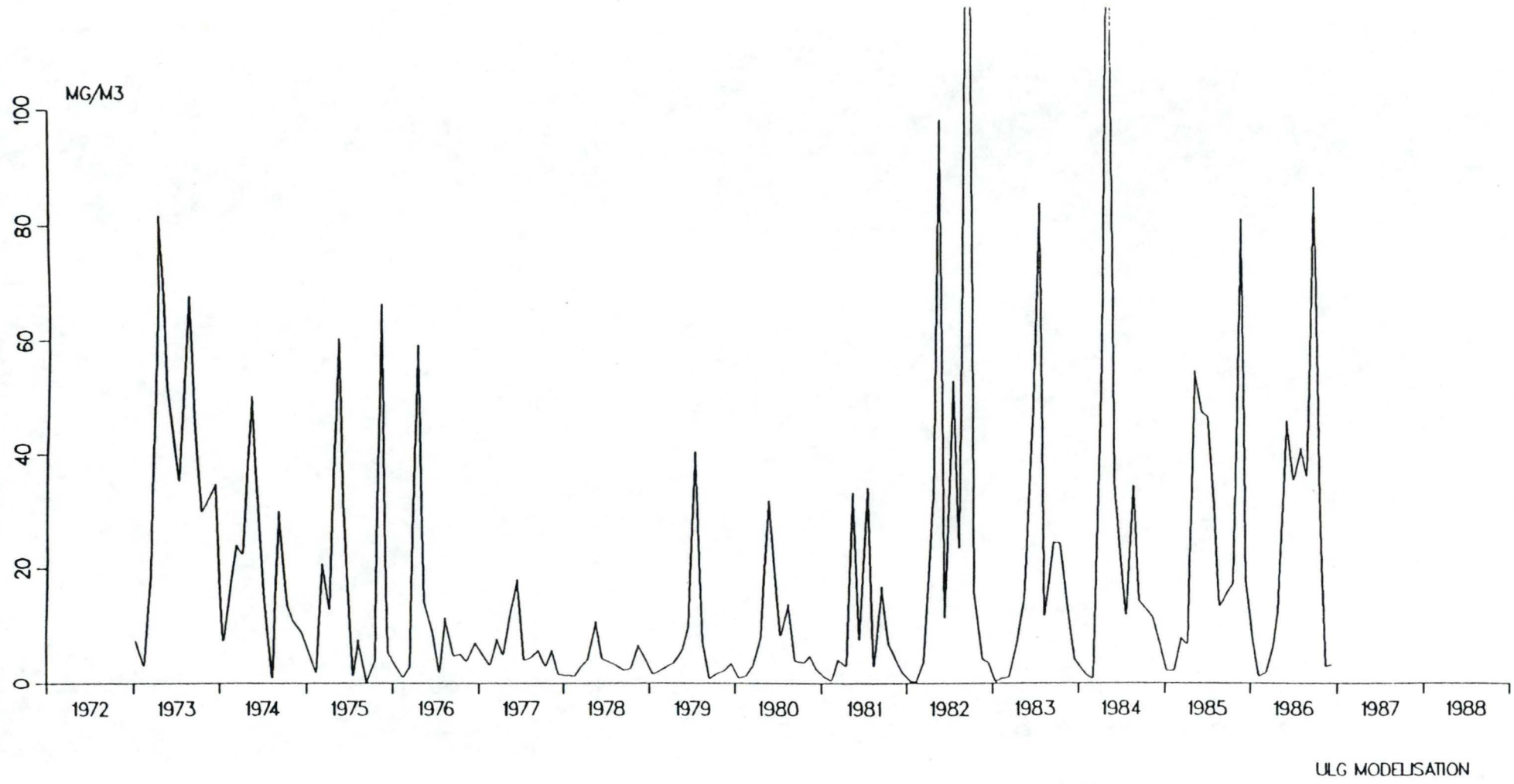
Evolution des concentrations en chlorophylle *a* de 1972 à 1988 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

- a) Jambes;
- b) Liège-Monsin;
- c) Namèche.

JAMBES

MESURES EN MEUSE (AWW)

CHLOROPHYLLE A

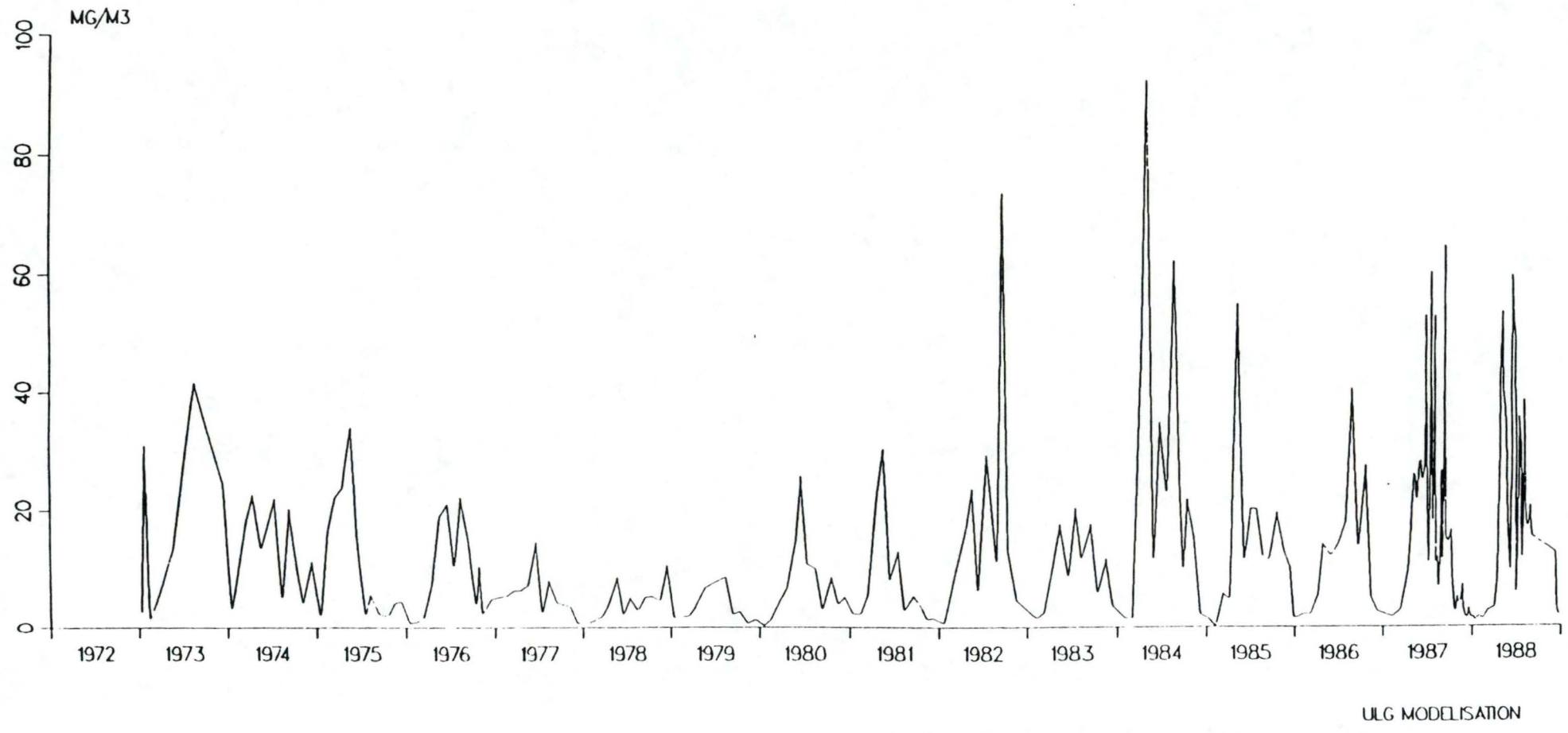


ULG MODELISATION

LIEGE-MONSIN

MESURES EN MEUSE (AWW)

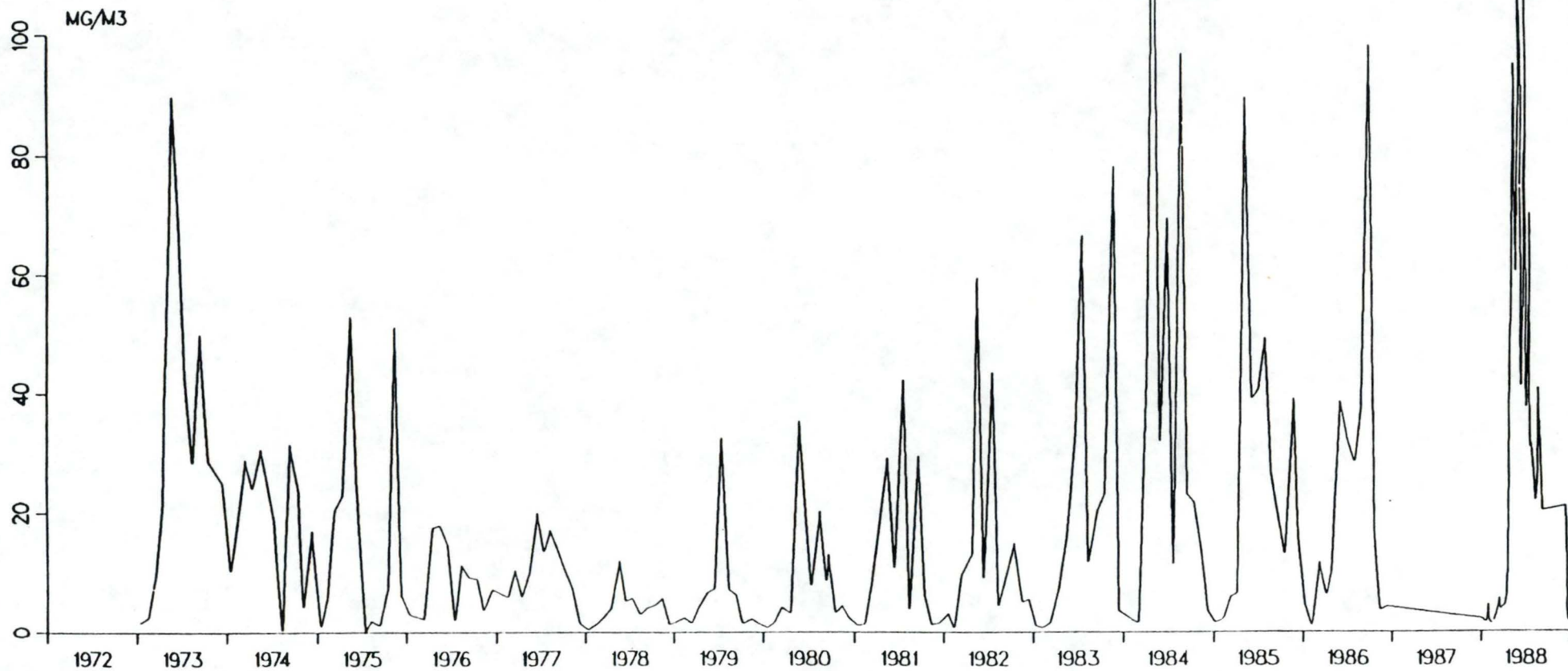
CHLOROPHYLLE A



NAMECHE

MESURES EN MEUSE (AWW)

CHLOROPHYLLE A



ULG MODELISATION

Annexe 2

Evolution des concentrations en nitrates de 1972 à 1988 par rapport à la norme classe A2 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

- a) Jambes;
- b) Liège-Monsin;
- c) Namèche.

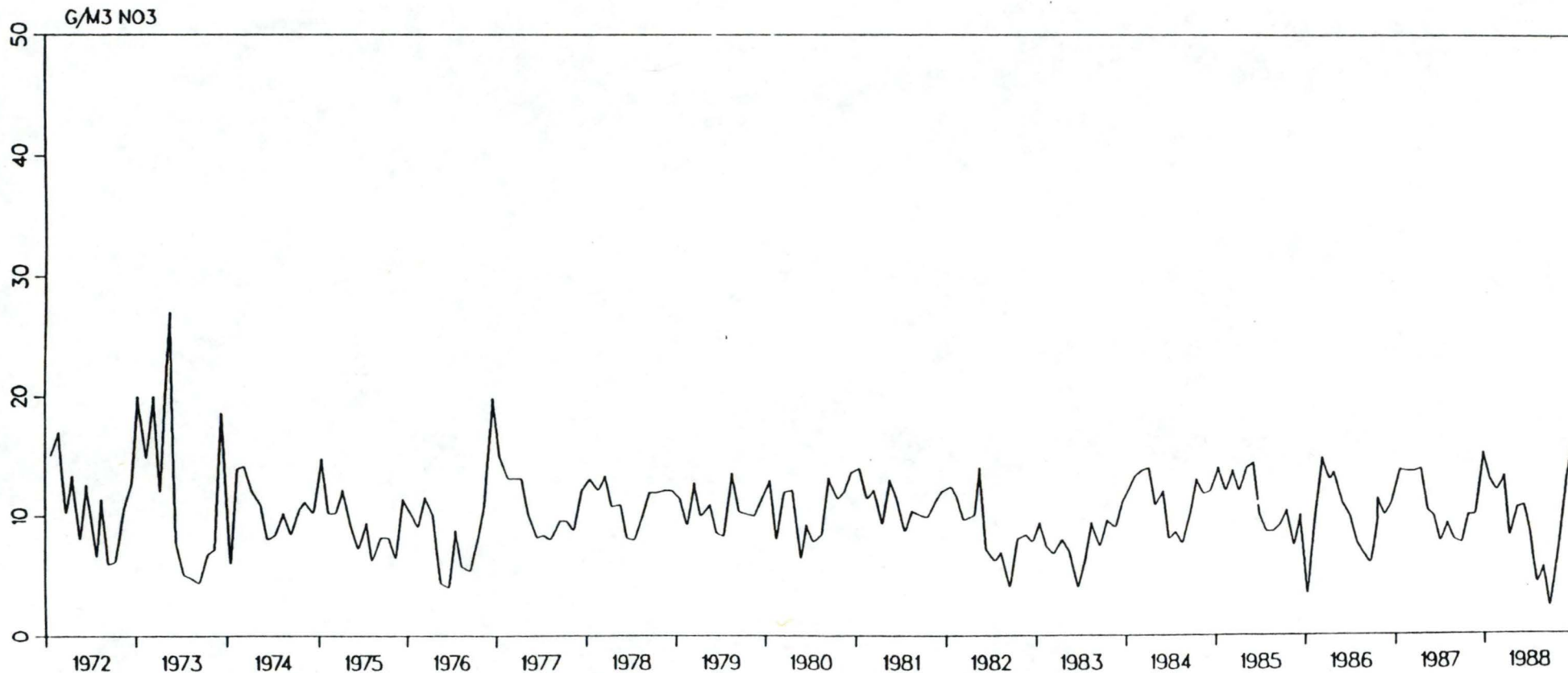
JAMBES

MESURES EN MEUSE (AWW)

NITRATES (7)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : -
—— VALEUR IMPERATIVE : < 50 G/M3 (95%) (0)



ULG MODELISATION

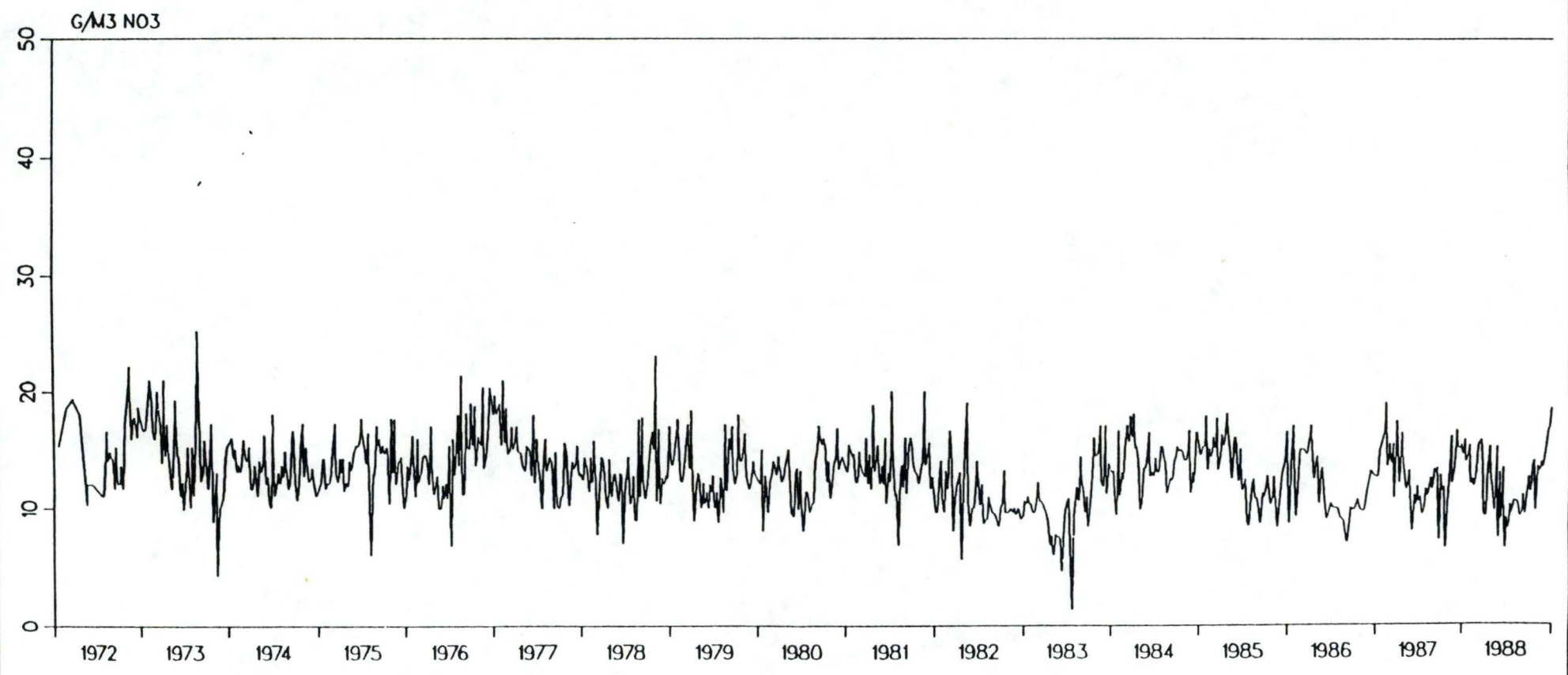
LIEGE-MONSIN

MESURES EN MEUSE (AWW)

NITRATES (7)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : -
—— VALEUR IMPERATIVE : < 50 G/M3 (95%) (0)



ULG MODELISATION

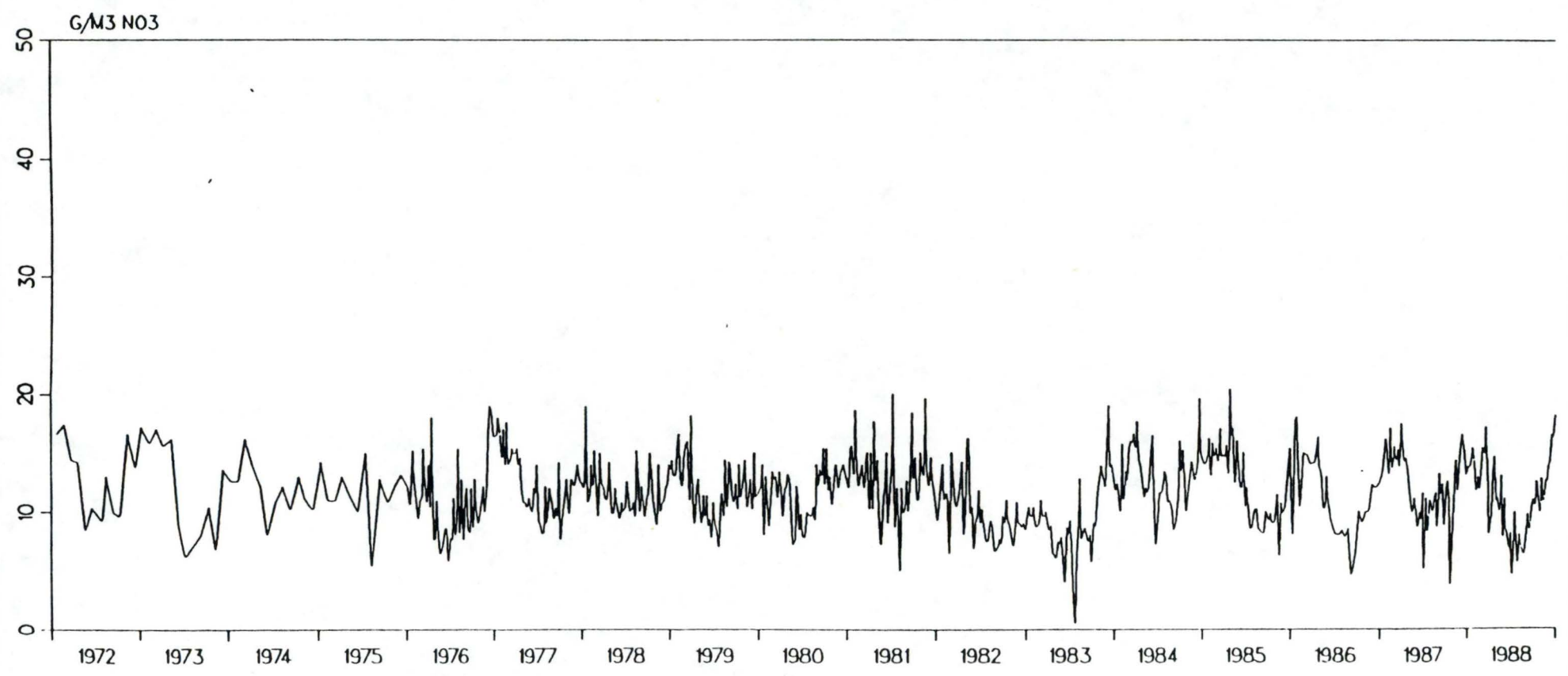
NAMECHE

MESURES EN MEUSE (AWW)

NITRATES (7)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : -
—— VALEUR IMPERATIVE : < 50 G/M3 (95%) (0)



ULG MODELISATION

Annexe 3

Evolution de la concentration en ammonium depuis 1972 à 1988 par rapport à la norme classe A2 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

- a) Jambes;
- b) Liège-Monsin;
- c) Namèche.

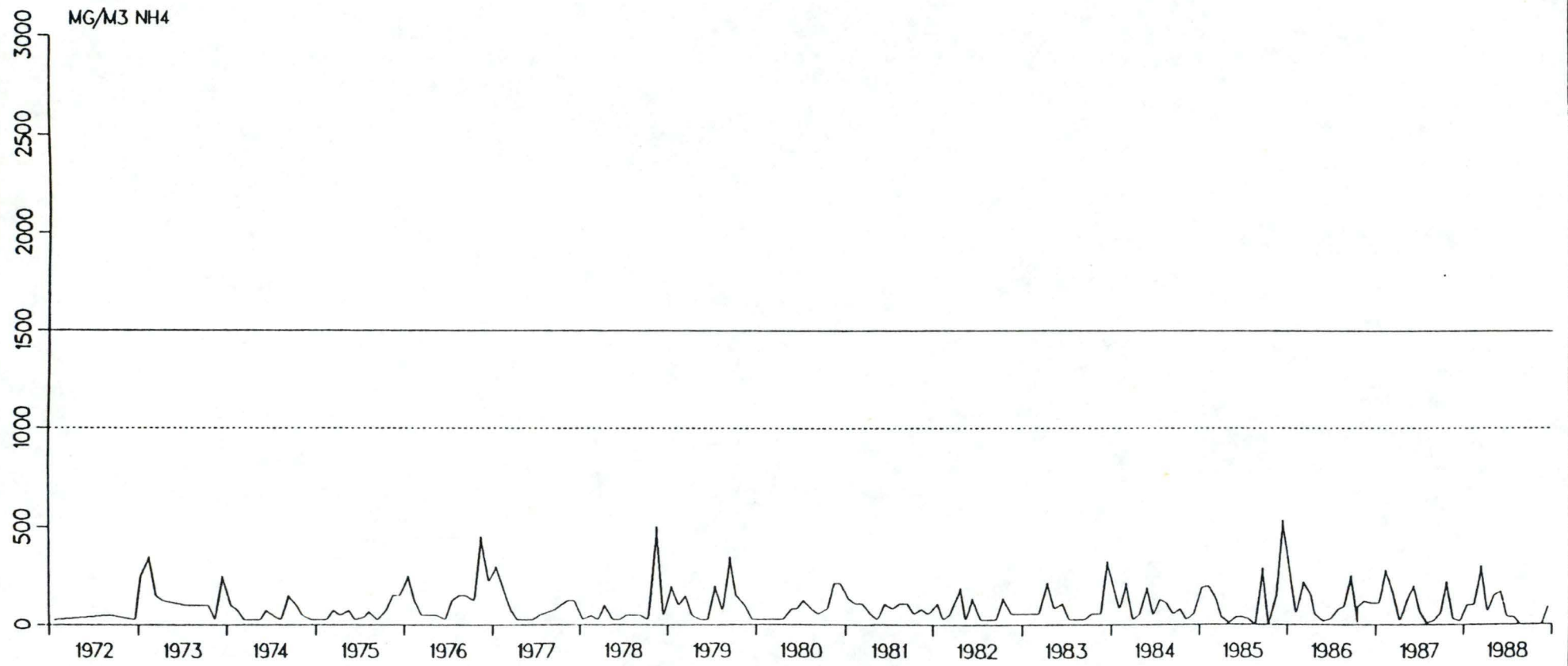
JAMBES

MESURES EN MEUSE (AWW)

AMMONIAQUE (39)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : < 1000 MG/M3 (90%)
—— VALEUR IMPERATIVE : < 1500 MG/M3 (95%)



ULG MODELISATION

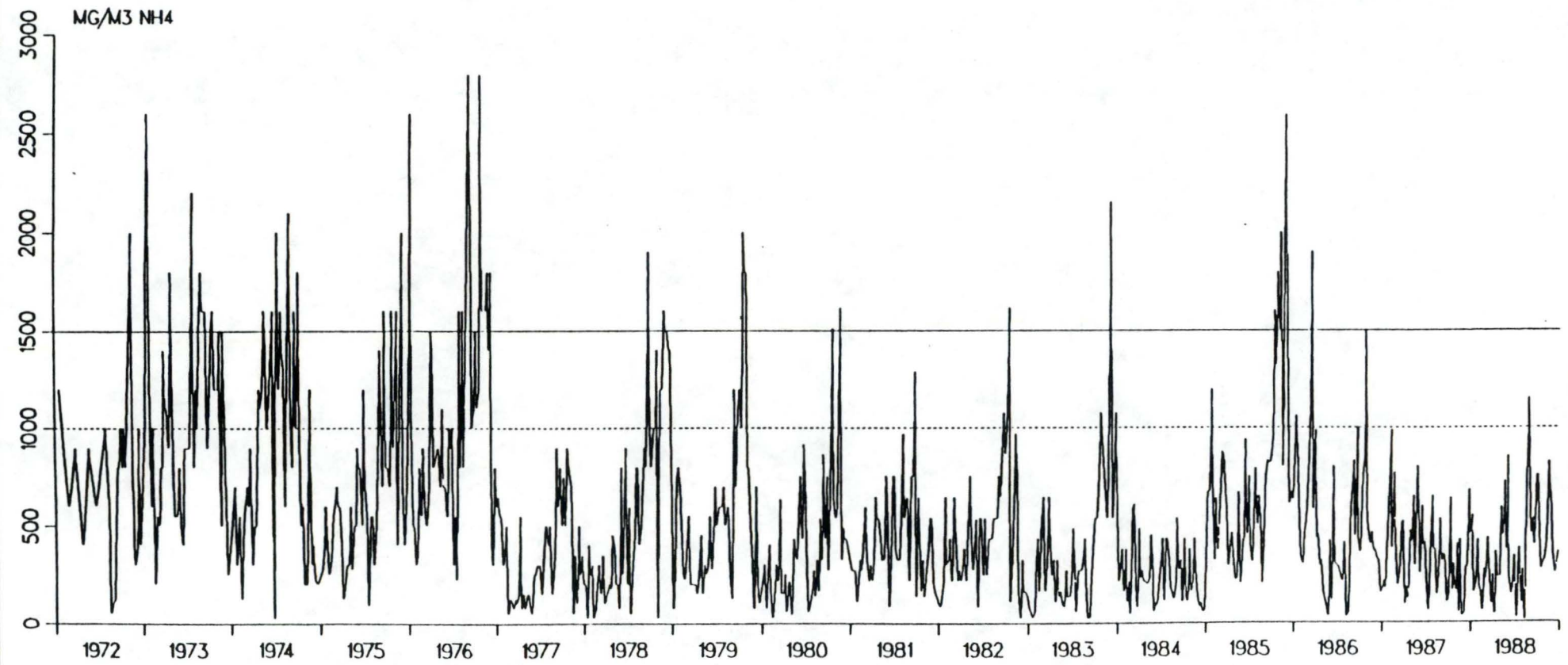
LIEGE-MONSIN

MESURES EN MEUSE (AWW)

AMMONIAQUE (39)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : < 1000 MG/M3 (90%)
—— VALEUR IMPERATIVE : < 1500 MG/M3 (95%)



ULG MODELISATION

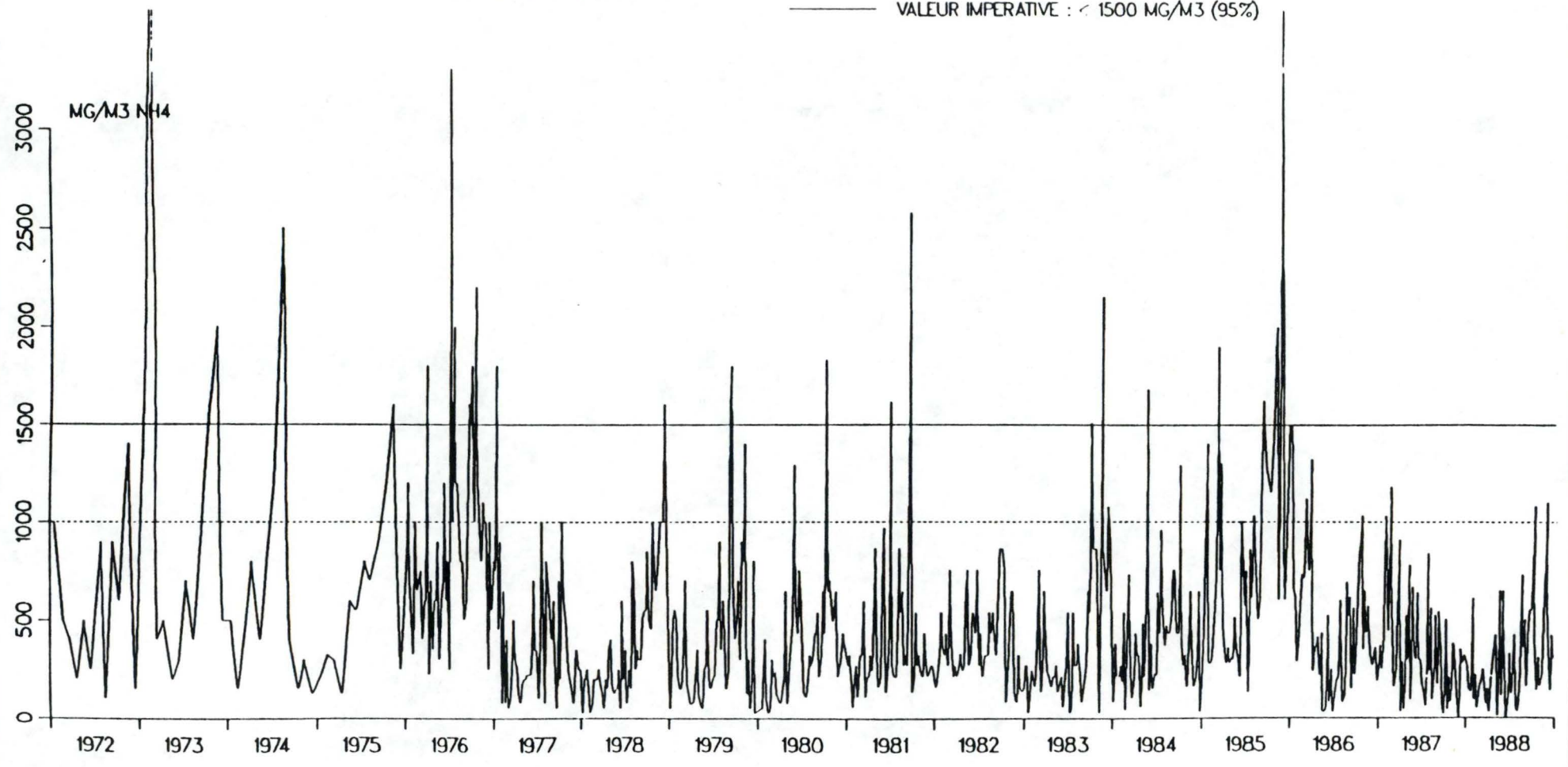
NAMECHE

MESURES EN MEUSE (AWW)

AMMONIAQUE (39)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : < 1000 MG/M3 (90%)
—— VALEUR IMPERATIVE : < 1500 MG/M3 (95%)



ULG MODELISATION

Annexe 4

Evolution de la concentration en orthophosphates depuis 1972 à 1988 par rapport à la norme classe A2 (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

- a) Jambes;
- b) Liège-Monsin;
- c) Namèche.

JAMBES

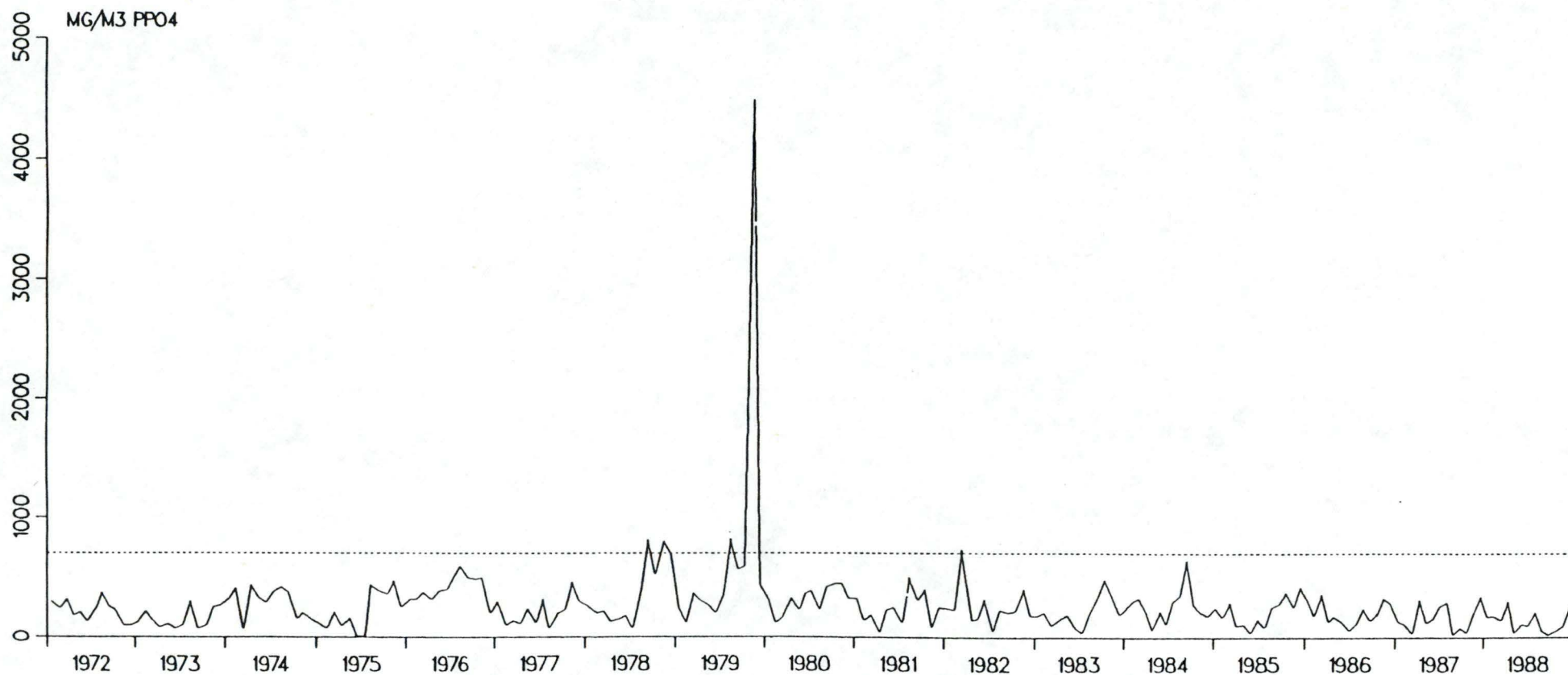
MESURES EN MEUSE (AWW)

ORTHO-PHOSPHATES (30)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : < 700 MG/M3 (90%)

———— VALEUR IMPERATIVE : —



ULG MODELISATION

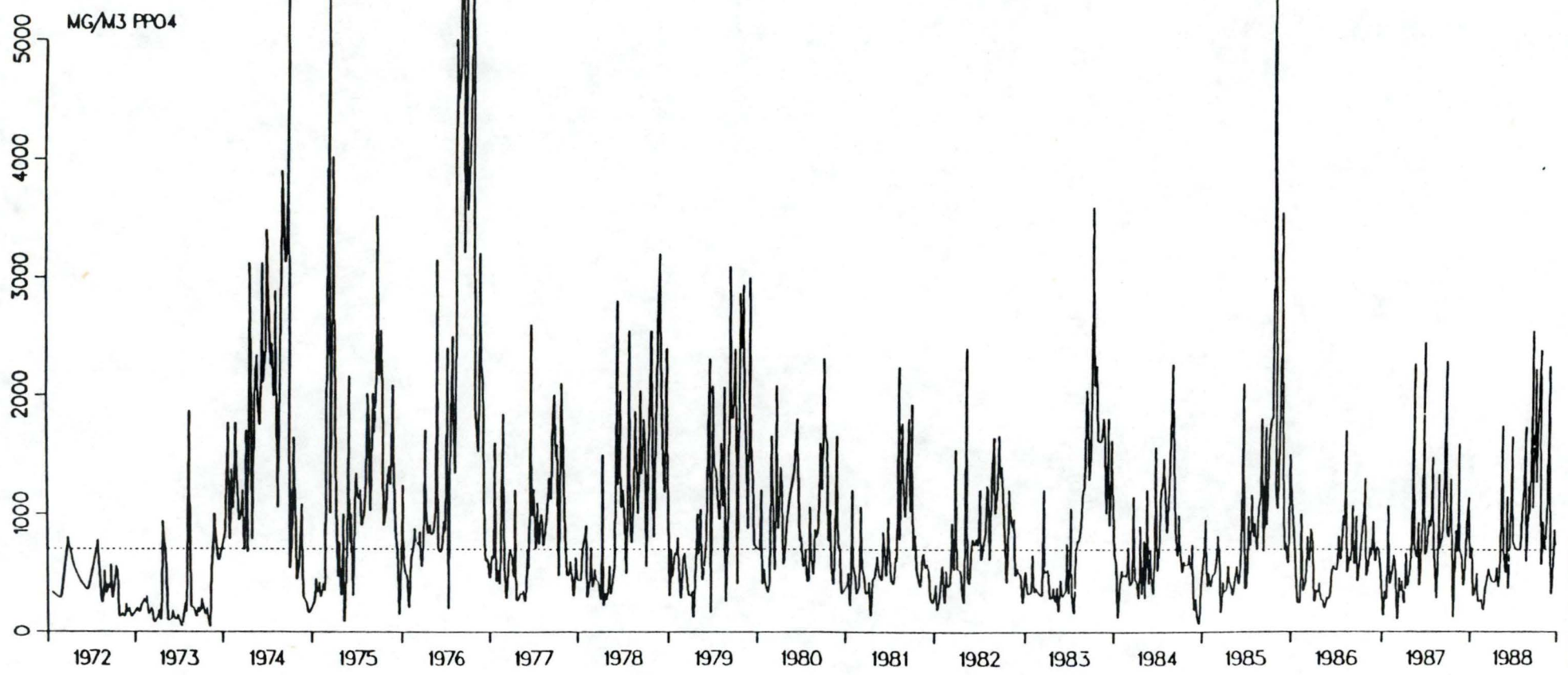
LIEGE-MONSIN

MESURES EN MEUSE (AWW)

ORTHO-PHOSPHATES (30)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : < 700 MG/M3 (90%)
—— VALEUR IMPERATIVE : —



ULG MODELISATION

NAMECHE

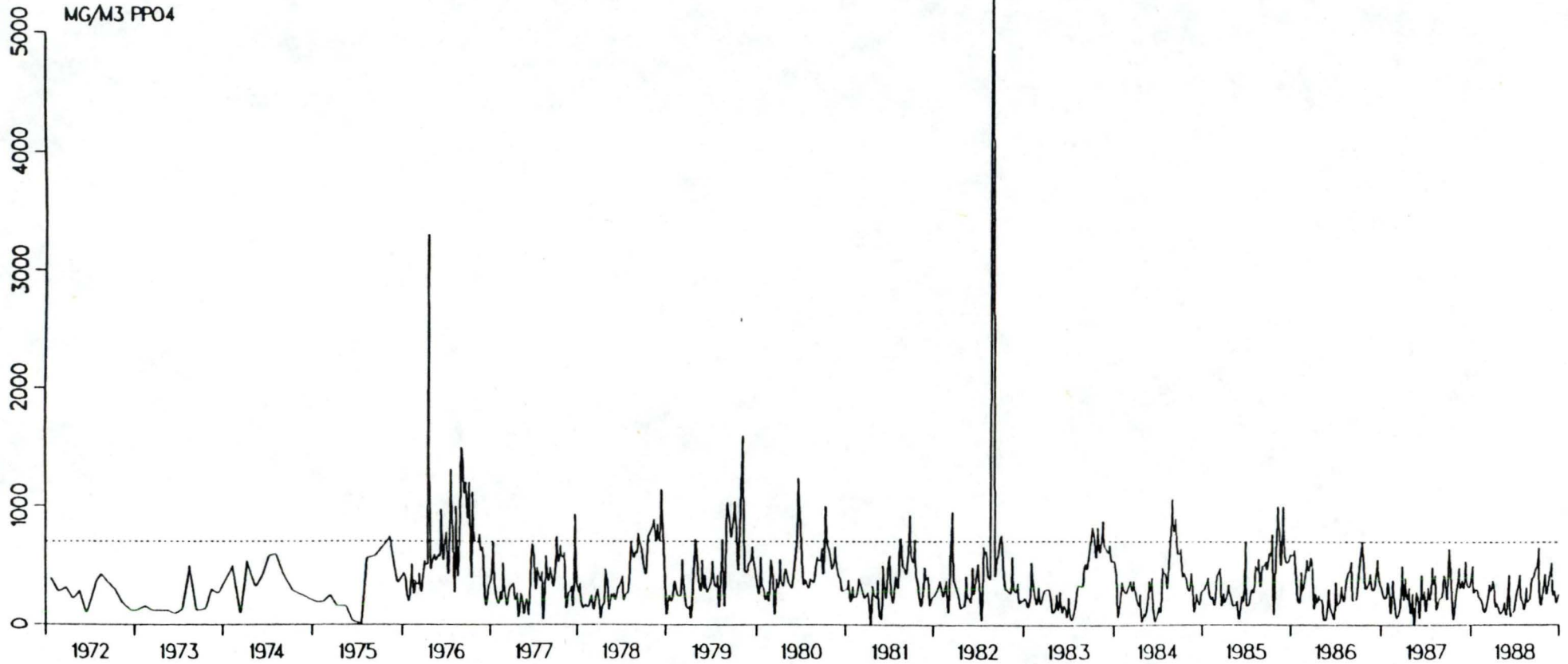
MESURES EN MEUSE (AWW)

ORTHO-PHOSPHATES (30)

EAUX POTABILISABLES A2

..... VALEUR GUIDE : < 700 MG/M3 (90%)

—— VALEUR IMPERATIVE : —



ULG MODELISATION

Annexe 5

Données concernant l'évolution des concentrations en nitrates, ammonium et orthophosphates en trois points de la Meuse (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Année	Nitrates (mg N/l)			Ammonium (µg N/l)			Orthophosphates (µg P/l)		
	Jambes	Liège-Monsin	Namèche	Jambes	Liège-Monsin	Namèche	Jambes	Liège-Monsin	Namèche
1972	2,44	3,46	2,89	37.50	753.79	575,00	73,75	127,41	92,05
1973	2,79	3,30	2,69	168.75	1102.08	1058.33	49,84	102,93	59,09
1974	2,34	3,03	2,69	60.42	910.71	647.92	96,68	587,33	126,63
1975	2,13	3,11	2,63	65.42	741.63	631.25	69,99	435,96	105,94
1976	2,03	3,26	2,49	147.92	1045.59	922.55	134,26	651,74	222,61
1977	2,43	3,29	2,83	100,00	350,00	397.45	70,53	285,72	120,52
1978	2,54	2,92	2,68	81.25	601.44	403.92	120,92	385,37	139,75
1979	2,39	2,98	2,71	120.83	559.31	413.24	239,38	385,78	162,61
1980	2,39	2,88	2,63	86.42	435.45	392.83	103,49	317,43	155,32
1981	2,50	3,09	2,91	85.50	424.74	421.59	77,34	228,18	117,17
1982	2,00	2,45	2,24	71.75	454.24	407.81	84,42	255,88	173,88
1983	1,79	2,34	2,04	93.09	395.42	446.11	66,99	293,65	117,15
1984	2,53	3,14	2,92	89.42	248.21	407.88	87,42	223,89	109,70
1985	2,51	2,96	2,78	127.69	770.59	902.35	69,63	348,45	128,44
1986	2,22	2,64	2,53	113.93	502.94	465.98	66,99	205,82	107,52
1987	2,51	2,92	2,79	102.31	366.92	362.88	52,66	255,28	92,04
1988	2,18	2,78	2,54	81.54	387.02	317.12	43,36	292,04	89,40
1989	/	2,92	2,70	/	450,00	500,00	/	346,00	101,00
1990	/	2,60	2,37	/	510,00	580,00	/	370,00	78,00

Annexe 6

Données concernant l'évolution des flux en nitrates, ammonium et orthophosphates en trois points de la Meuse (Liège-Monsin, Jambes, Namèche) (d'après les données du rapport Pégase, 1990).

Année	Flux annuels des nitrates (T/an)			Flux annuels de l'ammonium (T/an)			Flux annuels des orthophosphates (T/an)		
	Jambes	Liège-Monsin	Namèche	Jambes	Liège-Monsin	Namèche	Jambes	Liège-Monsin	Namèche
1972	38500	84200	53300	121	3520	2110	706	1930	1060
1973	42600	70600	45300	692	3930	4130	462	1560	554
1974	54300	106000	72000	305	4710	2320	1390	8930	2170
1975	39200	78300	52600	219	3180	1620	557	6500	1020
1976	19600	44500	27100	282	2380	1700	577	3290	1060
1977	44100	119000	80800	460	2060	1950	707	6330	1960
1978	44800	98100	69400	228	2650	1380	943	6270	1590
1979	70200	124000	90400	671	3180	1670	4290	7190	2570
1980	59800	130000	80700	414	3560	1920	1480	7990	2790
1981	75900	144000	103000	564	3600	2610	1490	6070	2480
1982	51200	93200	65600	379	2770	2000	1380	5160	2330
1983	47000	83600	55400	627	2820	1910	1050	4640	1690
1984	60200	127000	92300	436	2200	2360	1260	4700	1970
1985	46800	89000	63200	509	3640	2860	706	4200	1430
1986	67000	137000	94200	771	4230	2780	1080	4550	1900
1987	66700	130000	90900	675	3160	2360	886	6050	1860
1988	88700	164000	114000	904	3630	2150	1480	7630	2430