



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Physiologie et Biologie des Organismes – Populations – Interactions

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Variabilité interspécifique et intraspécifique des indices physiologiques chez les diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia* : influence du cycle de vie

Présentée et soutenue par
Aurore SAUVEY

Thèse soutenue publiquement le 14 décembre 2018
devant le jury composé de

M. Raffaele SIANO	Chercheur senior – HDR – IFREMER, Plouzané, France	Rapporteur
M. Jean-Luc MOUGET	Professeur – Université du Maine, Le Mans, France	Rapporteur
Mme. Asma SAKKA HLAILI	Professeur – Faculté des Sciences de Bizerte, Zarzouna, Tunisie	Examinatrice
M. Mickael LE GAC	Cadre de recherche – IFREMER, Plouzané, France	Examineur
Mme. Nathalie NIQUIL	Directrice de recherche CNRS – Université de Caen Normandie, Caen, France	Examinatrice
Mme. Juliette FAUCHOT	Maître de Conférences – Université de Caen Normandie, Caen, France	Encadrante scientifique
M. Pascal CLAQUIN	Professeur – Université de Caen Normandie, Caen, France	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Pascal CLAQUIN, UMR BOREA, Université de Caen Normandie



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Avant-propos

Aurore Sauvey a bénéficié d'une allocation du Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur (2015-2018).



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

Ce travail de recherche a été réalisé dans le cadre du projet PSEUDOPHY (2015-2019) : « Caractérisation de la diversité écophysiologique chez les diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia* en fonction des conditions nutritives : variabilité inter- et intraspécifique » financé par l'Agence de l'Eau Seine Normandie et coordonné scientifiquement par Juliette Fauchot (UMR BOREA).



Cette thèse a aussi bénéficié de financement dans le cadre du projet PSEUDOTOX (2015-2016) : « Basses moléculaires et facteurs induisant la synthèse d'acide domoïque au sein du genre *Pseudo-nitzschia* » financé par le programme INSU EC2CO du CNRS et coordonné par Mickael Le GAC (IFREMER – Laboratoire Dyneco/pelagos) en collaboration avec Juliette Fauchot (UMR BOREA).



Sommaire

Remerciements	VII
Liste des figures	IX
Liste des figures supplémentaires	XIV
Liste des tableaux	XV
Liste des communications	XVI

Introduction générale..... 1

1. Les diatomées.....	3
1.1. Origine et découverte des diatomées	3
1.2. Morphologie des diatomées et structure du frustule	3
1.3. Habitats des diatomées	6
1.4. Classification des diatomées	6
1.5. Cycle de vie particulier des diatomées	8
2. Les diatomées du genre <i>Pseudo-nitzschia</i>	14
2.1. Présentation du genre <i>Pseudo-nitzschia</i>	14
2.1.1. Classification et identification des espèces.....	14
2.1.2. Cycle de vie de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.....	19
2.2. Les efflorescences de <i>Pseudo-nitzschia</i>	22
2.2.1. Biogéographie des espèces de <i>Pseudo-nitzschia</i> et toxicité des efflorescences	22
2.2.2. Phénologie et contrôle environnemental des efflorescences des espèces de <i>Pseudo-nitzschia</i>	26
2.2.3. Influence des facteurs environnementaux sur la physiologie des espèces du genre <i>Pseudo-nitzschia</i>	28
2.2.3.1. La température et l'intensité lumineuse.....	28
2.2.3.2. Capacités d'absorption des éléments nutritifs chez <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	30
2.2.3.3. Les éléments nutritifs et la production d'acide domoïque	34
2.2.4. Diversité intraspécifique chez les espèces de <i>Pseudo-nitzschia</i> et influence du cycle de vie sur leur écophysiologie	35
3. Problématique et objectifs	36

Differential influence of life cycle on growth and toxin production of three *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae)..... 40

1. Introduction	46
2. Materials and methods.....	47

2.1. Strains	47
2.2. Experiment 1: Mating experiments.....	49
2.3. Experiment 2: Batch experiments.....	50
2.4. Statistics.....	52
3. Results	52
3.1. Life cycle characteristics	52
3.2. Growth rate: influence of strain age and cell size.....	55
3.3. The life cycle influences toxicity.....	57
4. Discussion	61
4.1. Cellular and dissolved domoic acid production in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> , and <i>P. fraudulenta</i>	61
4.2. Life cycle characteristics in relation to cell size and consequences on sexual reproduction in natural populations.....	63
4.3. Differential influence of life cycle stages and strain age on growth and DA production in <i>Pseudo-nitzschia</i> species	65
5. Conclusion.....	69

Physiological conditions favorable to domoic acid production and accumulation in three *Pseudo-nitzschia* species..... 74

1. Introduction	80
2. Materials and methods.....	81
2.1. Strains	81
2.2. Experimental protocol	82
2.3. Cell concentrations and growth rates.....	83
2.4. Chlorophyll <i>a</i> measurements	84
2.5. Dissolved inorganic nutrient analysis.....	84
2.6. Elemental analysis	84
2.7. Photosynthetic parameter analysis.....	84
2.8. Domoic acid.....	87
2.9. Statistical analyses	88
3. Results	89
3.1. Biomass dynamics, growth rates, and nutrient concentrations	89
3.2. Physiological parameters	94
3.2.1. Elemental ratios	94
3.2.2. Chlorophyll <i>a</i> cell content	96
3.2.3. Photosynthetic parameters	97

3.2.4. Domoic acid.....	100
4. Discussion	103
4.1. Differential physiological characteristics of the three <i>Pseudo-nitzschia</i> species	103
4.2. Dynamics of cellular cDA production and quotas in relation to the cell metabolism	105
4.3. Dynamics of extracellular dDA production and quotas in relation to the cell metabolism .	107
5. Conclusion.....	108
 Interspecific and intraspecific variability of the kinetics of nutrient uptake by four <i>Pseudo-nitzschia</i> species.....	112
1. Introduction	118
2. Materials and methods.....	119
2.1. Organisms and culture conditions.....	119
2.2. Batch experiments	121
2.3. Uptake experiments	122
2.4. Data analysis.....	123
2.5. Statistical analysis.....	124
3. Results	126
3.1. Nitrate uptake rates and nitrogen quotas.....	126
3.2. Phosphate uptake rates and phosphorus quotas	130
3.3. Silicate uptake rates and Si quotas.....	134
4. Discussion	137
4.1. A two-component NO ₃ uptake system in the four <i>Pseudo-nitzschia</i> species studied.....	137
4.2. Characterization of the NO ₃ , PO ₄ , and Si(OH) ₄ uptake profiles of <i>P. australis</i> , <i>P. delicatissima</i> , <i>P. fraudulenta</i> , and <i>P. pungens</i>	137
4.3. Implications of <i>Pseudo-nitzschia</i> interspecific diversity in nutrient uptake capacities and elemental quotas for bloom development.....	140
5. Conclusion.....	141
 Conclusion générale et perspectives.....	142
1. La diversité intraspécifique au sein du genre <i>Pseudo-nitzschia</i>	144
2. La diversité interspécifique au sein du genre <i>Pseudo-nitzschia</i>	150
3. Dynamique de la production de l'acide domoïque chez <i>P. australis</i>	155
4. Conclusions et perspectives.....	158
 6 Références bibliographiques.....	160

Remerciements

Mes premiers remerciements seront pour toi, Juliette. Je te remercie d'avoir cru en moi depuis de nombreuses années maintenant, d'avoir encadré ce travail de thèse, de m'avoir inculqué toute ta rigueur scientifique et de m'avoir fait partager ta passion pour la recherche. Merci pour ta bonne humeur, ta patience et tous nos échanges (scientifiques ou non). Merci pour tout le temps, jour et nuit, que tu as consacré à la recherche. Merci d'avoir toujours été là, merci pour tout !

Je remercie également mon directeur de thèse, Pascal Claquin pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour les conseils que vous avez pu m'apporter tout au long de ces trois années.

Je tiens à remercier M. Raffaele Siano et M. Jean-Luc Mouget d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Mme. Asma Sakka Hlaili, M. Mickael Le Gac et Mme. Nathalie Niquil pour avoir accepté d'évaluer de travail de doctorat.

Mickael, merci de m'avoir accueillie une semaine à Brest et merci pour tes conseils et suggestions lors de la rédaction du premier article. Nathalie, merci beaucoup pour tes précieux conseils et pour avoir toujours trouvé du temps à toutes nos questions.

Merci également à Mme. Dominique Lamy pour les échanges que nous avons eu sur les bactéries !

Merci à Pascal Sourdain et Sylvie Dufour pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR BOREA. Un grand merci aux membres du laboratoire BOREA de Caen et de Paris. Je ne citerai personne pour ne pas commettre d'oubli. Merci à tous !

Merci à Marie-Pierre Halm-Lemeille, Cécile Klein, Muriel Bardor et Emilie Poisson d'avoir suivi mes travaux de thèse au cours du CSI.

Merci à Annie Buchwalter pour les corrections d'anglais.

Merci à Amandine Caruana, Nicolas Chomérat, Mickael Le Gac et Elizabeth Nézan pour les souches de *Pseudo-nitzschia australis*.

Merci au personnel du CREC pour m'avoir rapporté tous ces bidons d'eau de mer. Et je tiens particulièrement à remercier Orianne, pour toutes ces analyses : elles sont enfin finies ! Et merci pour ta bonne humeur.

Merci à Didier Goux pour m'avoir ouvert les portes de la microscopie électronique.

Merci (énorme merci !) à Bertrand Le Roy sans qui cette thèse n'aurait pas été possible puisque tu m'as tout appris de la culture des algues et de leur isolement. Merci pour tes discussions. Merci pour ta bonne humeur communicative, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi ! Merci également à Fabienne, Sandra, Christophe, Myriam et Catherine pour toute votre aide précieuse.

Merci à mon stagiaire, Aurélien, grâce auquel j'ai découvert l'encadrement lors de ton stage de master 2. Merci à tous les préleveurs d'eau de mer d'avoir pensé à moi en vous baladant au bord des plages !

Merci à toutes les personnes qui ont partagé ces trois années à mes côtés. Merci, Baptiste, Maxime, Alexandre, Alexis, Maëva, Coralie, Charles, Louis et Quentin. Merci Stéphanie pour ta sagesse et tes précieux conseils. Merci Jérôme, chef de harem. Merci Lorane pour accepter mes moments de folie. Merci Christiane, Emilie et George pour votre bonne humeur si communicative et pour vos conseils. Je pense également à Natacha et à Brenda pour votre soutien et votre sympathie. Merci Pauline, mon binôme de master. Et merci aux filles, Laura, Julie, Floriane et Aurore ainsi qu'à Jean-Philippe (et à la petite merveille, Ambre) sans qui cette thèse n'aurait pas été possible, vous avez été ma joie durant ces trois années et bien plus encore pour les années à venir. Merci à vous !

Merci également à Annick et Jean-Claude ainsi qu'à Maïté et Gérard.

Merci à Bruno, Maxime et Tom d'avoir partagé, surtout ces derniers mois, Juliette avec moi !

Merci à mes amis que je ne pourrais tous citer. Merci à Marie d'être toujours présente auprès de moi depuis toutes ces années maintenant. Et merci aux copains de Saint-Lô, aux ami(e)s belges et ainsi que tous ceux que j'oublie pour avoir toujours suivi ce travail et pour tout ce que vous nous apporté, à Thomas et moi, au quotidien. Merci à vous !

Merci à ma famille. Merci à mes parents, ma sœur et Aurélien (ainsi que Crostî, tonton Lucien et ma Louloutte) d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours poussé à faire le maximum, de m'avoir permis de réaliser mes rêves et de votre aide tout au long de cette thèse. Merci à mes grands-parents d'avoir toujours été là pour moi. Merci à Pascal, Fabienne et Thibaud, de m'avoir acceptée, d'avoir également cru en moi et de prendre soin de moi.

Merci à Thomas et à Marcelle, de m'avoir toujours supportée malgré mes moments de doutes et de pleurs, de croire tellement en moi et de savoir me réconforter.

Thomas, tu fais que la vie est belle !

Liste des Figures

- Figure 1.1. Schéma des composantes siliceuses d'un frustule de diatomées (d'après Zurzolo et Bowler 2001). 4
- Figure 1.2. Diversité de la structure du frustule des diatomées nettoyées à l'acide. (a) *Thalassiosira pseudonana* (échelle = 1 µm), (b) détail du frustule de *Coscinodiscus wailesii* (échelle = 5 µm), (c) *Cocconeis* sp. (échelle = 10 µm), (d) rimoportula de *Thalassiosira weissflogii* (échelle = 500 nm), (e) structure en couronne de *Ditylum brightwellii* (échelle = 2 µm), (f) *Bacillaria paxillifer* (échelle = 10 µm), (g) détail des pores de *Gyrosigma balticum* (échelle = 2 µm), (h) *Skeletonema costatum* (échelle = 2 µm), (i) valve de *C. wailesii* (échelle = 50 µm), (j) détail des pores de *D. brightwellii* (échelle = 2 µm), (k) seta de *Chaetoceros gracilis* (échelle = 1 µm), (l) *Stephanopyxis turris* (échelle = 10 µm). D'après Hildebrand (2008). 5
- Figure 1.3. Dessin schématique de la multiplication végétative chez les diatomées (modifié d'après Montresor et al. (2016). 9
- Figure 1.4. Résumé des principales caractéristiques du cycle de vie des diatomées selon trois variantes principales : les diatomées centrées polaires et radiales et les diatomées pennées. F (-) et M (+) symbolisent respectivement les gamètes femelle non-mobile et mâle mobile. Modifiée d'après Kaczmarska et al. (2013). 11
- Figure 1.5. Photographies de forme tératologique de valves de diatomées. (A) *Diatom ehrenbergii* (microscopie électronique à balayage, échelle = 5 µm), (B) *Ulnaria ulna* (microscopie électronique à balayage, échelle = 5 µm) et (C) *Fragilaria arcus* (microscopie optique, échelle = 5 µm). D'après Falasco et al. (2009). 13
- Figure 1.6. Mécanisme d'action du glutamate (GLU) et de l'acide domoïque (DA) induisant la neurotoxicité des cellules nerveuses (d'après Lefebvre et Robertson 2010). 15
- Figure 1.7. Arbre phylogénétique des espèces de *Pseudo-nitzschia* basé sur l'analyse des séquences ITS2 avec l'intégration de caractères morphologiques : (A) présence / absence de nodule central, (B) nombre de rangs de pores, (C) nombre de secteurs dans chaque pore, (D) nombre de fibulae et de stries dans 10 µm, (E) forme des extrémités et (F) nombre de stries dans 10 µm. Les photographies en microscopie électronique de *Pseudo-nitzschia* spp. montrent la partie centrale des valves où la structure, le nombre de rangs de pores et le nodule central sont observables (modifié d'après Lim et al. 2018). 16
- Figure 1.8. Détails des mesures réalisées en microscopie électronique à transmission (MET) sur le frustule d'une cellule de *Pseudo-nitzschia* pour l'identification de l'espèce. a) mesure de la longueur de la valve, b) mesure de la largeur de la valve et présence d'un nodule central (rectangle noir), c) nombre de stries et d'interstices sur 10 µm et d) nombre de pores sur 1 µm et structure

des pores (rond noir). Photographies en microscopie électronique à transmission : Juliette Fauchot et Aurore Sauvey.	18
Figure 1.9. Cycle de vie de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. Détails de la diminution de la taille cellulaire lors de la multiplication végétative en microscopie optique et détails des différentes étapes de la reproduction sexuée en microscopie électronique à balayage (Photographies en microscopie optique : Aurore Sauvey ; photographies en microscopie électronique à balayage : Juliette Fauchot et Idir Issad).	21
Figure 1.10. Distribution mondiale des diatomées du genre <i>Pseudo-nitzschia</i> . Les espèces en gras accompagnées d'une étoile (*) sont les espèces identifiées comme toxiques (Lundholm 2018). Figure originale obtenue dans Lelong et al. (2012) modifiée d'après Lim et al. (2013), Orive et al. (2013), Teng et al. (2014, 2016), Li et al. (2017, 2018), Ajani et al. (2018), Frøsig Gai et al. (2018).	23
Figure 1.11. Distribution mondiale connue des événements toxiques ASP en juillet 2016. Figure modifiée dont l'original provient du site internet US National Office for Harmful Algal Blooms, Woods Hole Oceanographic Institution.....	24
Figure 1.12. Réseau trophique marin simplifié représentant le transfert de l'acide domoïque depuis <i>Pseudo-nitzschia</i> vers les consommateurs primaires et secondaires.	25
Figure 1.13. Illustration de l'équation du modèle de Michaelis-Menten.	31
Figure 2.1. Mean size of initial cells as a function of mean size of parent strains in <i>P. australis</i> (black), <i>P. pungens</i> (grey) and <i>P. fraudulenta</i> (white). Standard deviations represent the minimum and maximum sizes measured for initial cells and represent the variance for parental cells.	53
Figure 2.2. Size range of vegetative cells (white) and gametangia (grey and hatched pattern) in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> . Crosses and dots correspond to cell sizes for which mating experiments were performed. Crosses: no sexual reproduction observed. Hatched pattern and white dots: incomplete sexual reproduction observed (without initial cell production). Light grey and dark grey dots: complete sexual reproduction observed (with initial cell production). The size percentage was calculated based on the maximal initial size.	54
Figure 2.3. (A) Growth rate (μ , day ⁻¹) as a function of the age of the strains (months) since their isolation from natural populations in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> (F1 strains from sexual reproduction are not present in this graph). (B) Growth rate (μ , day ⁻¹) as a function of the cell size (μ m) for all strains studied in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i>	57
Figure 2.4. Cellular domoic acid content (cDA, fg.cell ⁻¹) as a function of cell size (μ m): (A) in <i>P. australis</i> and (B) in <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i>	58
Figure 2.5. Dissolved domoic acid (dDA, fg.cell ⁻¹) as a function of cell size (μ m): (A) in <i>P. australis</i> and (B) in <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i>	59

Figure 2.6. Monitoring of the cellular domoic acid content (cDA, fg.cell ⁻¹) of four strains of <i>P. australis</i> during their decrease in cell size.....	61
Figure 3.1. Variation of cell concentrations and silicate concentrations over time during the batch cultures for <i>P. australis</i> (A and D), <i>P. pungens</i> (B and E), and <i>P. fraudulenta</i> (C and F). Means $\pm$ SE (n = 3).....	90
Figure 3.2. Spearman correlation matrices between physiological parameters and cDA and dDA cellular concentrations and production rates in <i>P. australis</i> (A), <i>P. pungens</i> (B), and <i>P. fraudulenta</i> (C). Color dots indicate correlations at the $P < 0.05$ level. Blue dots represent positive correlations whereas red dots represent negative correlations. Color depth and size of the dots indicate the correlation strength. Each correlation matrix is ordered according to the correlation coefficient (hierarchical clustering). Biomass: cell concentration; μ : growth rate; Yield: F_v/F_m ; DP, DSi, and DN: phosphate, silicate, and nitrate concentrations in the culture medium; BSi: biogenic silica; POP: particulate organic phosphorus; PON: particulate organic nitrogen; POC: particulate organic carbon; Chl _a : chlorophyll <i>a</i> concentration <i>per cell</i> ; E_k : minimum saturating irradiance; ETR: electron transport rate; Alpha: efficiency of photosynthesis; cDA/cell: cellular domoic acid concentration; dDA/cell: dissolved domoic acid concentration per cell; Prod dDA: dDA production; Prod cDA: cDA production.....	92
Figure 3.3. Silicate (A), phosphate (B), and nitrate (C) concentrations in the culture medium when cell growth stopped. The boxplots present the medians (midlines), the 25 th and 75 th percentiles (boxes) and the extrema (whiskers) for all replicates of all strains for each species.....	93
Figure 3.4. Mean elemental ratios during the exponential growth phase in each <i>Pseudo-nitzschia</i> species: POC:PON (A), POC:POP (B), POC:BSi (C), BSi:PON (D), BSi:POP (E), and PON:POP (F). The boxplots present the medians (midlines), the 25 th and 75 th percentiles (boxes), the extrema (whiskers) and the outliers for all replicates of all strains for each species.....	95
Figure 3.5. Minimum BSi quotas measured when cell growth stopped in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> . The boxplots present the medians (midlines), the 25 th and 75 th percentiles (boxes) and the extrema (whiskers) for all replicates of all strains for each species.....	95
Figure 3.6. Chl <i>a</i> cell content of each <i>Pseudo-nitzschia</i> species. The boxplots present the medians (midline), the 25 th and 75 th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch culture.....	96
Figure 3.7. Maximum electron transport rates (ETR _{MAX}) expressed <i>per unit</i> of carbon (A) or <i>per unit</i> of Chl <i>a</i> (B) of the three <i>Pseudo-nitzschia</i> species. The boxplots present the medians (midlines), the 25 th and 75 th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch culture.	97
Figure 3.8. Photosynthetic efficiency (α) and minimum saturating light intensity (E_k) of the three <i>Pseudo-nitzschia</i> species. The boxplots present the medians (midlines), the 25 th and 75 th percentiles	

(boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch culture.	98
Figure 3.9. Variation of DA concentrations <i>per cell</i> (intracellular DA - cDA - in black, extracellular dissolved DA – dDA - in grey) and dDA:cDA ratios (red rounds) over time during the batch cultures in <i>P. australis</i> strains (A, B, C), <i>P. pungens</i> strains (D, E, F), and <i>P. fraudulenta</i> strains (G, H, I). Means $\pm$ SE (n = 3).	99
Figure 3.10. Total DA (tDA) production rates <i>per cell</i> calculated for the three <i>Pseudo-nitzschia</i> species. The boxplots present the medians (midlines), the 25 th and 75 th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch cultures.....	102
Figure 4.1. Kinetic curves of NO ₃ uptake by four <i>Pseudo-nitzschia</i> species. Specific uptake rates ($\times 10^{-3}$ h ⁻¹) of NO ₃ by <i>P. australis</i> (A), <i>P. delicatissima</i> (B), <i>P. fraudulenta</i> (C), and <i>P. pungens</i> (D) as a function of the NO ₃ concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). The insets (A', B', C' and D') provide a closer view of the concentration range < 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. The curves in the insets correspond to the Michaelis-Menten model. The dots are means of triplicate experiments.	125
Figure 4.2. Kinetic parameters of nitrate uptake: (A) maximum uptake rate (V _{max}), (B) half-saturation constant (K _S), and (C) affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α) in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). The values are means $\pm$ SE. Cellular nitrogen quotas (Q _N) expressed <i>per cell</i> (A) and <i>per cell volume</i> (B) in pmol.cell^{-1} and $\text{fmol.}\mu\text{m}^{-3}$, respectively, in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). Results are means $\pm$ SE.	128
Figure 4.3. Cellular nitrogen quotas (Q _N) expressed <i>per cell</i> (A) and <i>per cell volume</i> (B) in pmol.cell^{-1} and $\text{fmol.}\mu\text{m}^{-3}$, respectively, in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). Results are means $\pm$ SE.....	128
Figure 4.4. Kinetic curves of PO ₄ uptake by four <i>Pseudo-nitzschia</i> species. Specific uptake rates (h ⁻¹) of PO ₄ by <i>P. australis</i> (A), <i>P. delicatissima</i> (B), <i>P. fraudulenta</i> (C), and <i>P. pungens</i> (D) as a function of the PO ₄ concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). The curves correspond to the Michaelis-Menten model. The dots are means of triplicate experiments.....	129
Figure 4.6. Cellular phosphorus quotas (Q _P) expressed <i>per cell</i> (A) and <i>per cell volume</i> (B) in pmol.cell^{-1} and $\text{fmol.}\mu\text{m}^{-3}$, respectively, in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). Results are means $\pm$ SE.....	132
Figure 4.5. Kinetic parameters of phosphate uptake: (A) maximum uptake rate (V _{max}), (B) half-saturation constant (K _S), and (C) affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α) in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). The values are means $\pm$ SEs.	132

Figure 4.7. Kinetic curves of Si(OH)_4 uptake by four <i>Pseudo-nitzschia</i> species. Specific uptake rates ($\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) of Si(OH)_4 by <i>P. australis</i> (A), <i>P. delicatissima</i> (B), <i>P. fraudulenta</i> (C), and <i>P. pungens</i> (D) as a function of the Si(OH)_4 concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). The curves correspond to the Michaelis-Menten model. The dots are means of triplicate experiments.	133
Figure 4.8. Kinetic parameters of silicate uptake: (A) maximum uptake rate (V_{max}), (B) half-saturation constant (K_s), and (C) affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α) in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). The values are means $\pm$ SE.	136
Figure 4.9. Cellular silicon quotas (Q_{Si}) expressed <i>per cell</i> (A) and <i>per cell volume</i> (B) in pmol.cell^{-1} and $\text{fmol.}\mu\text{m}^{-3}$, respectively, in <i>P. australis</i> (P. aus), <i>P. delicatissima</i> (P. del), <i>P. fraudulenta</i> (P. fra), and <i>P. pungens</i> (P. pun). Results are means $\pm$ SE.	136
Figure 5.1. Acide domoïque cellulaire (fg.cellule^{-1}) en fonction de la taille cellulaire (μm) chez <i>Pseudo-nitzschia australis</i> . Les ronds noirs représentent les données issues du Chapitre 2 et les ronds blancs représentent les données issues du Chapitre 3 et des expériences supplémentaires. Le modèle appliqué aux données est un modèle de relation gaussienne ($P < 0.0001$, $r^2 = 0.77$ pour les données issues du Chapitre 2 et $r^2 = 0.97$ pour les données issues du Chapitre 3 et des expériences supplémentaires).	146
Figure 5.2. Paramètres de cinétiques de nitrates, phosphates et silicates chez <i>P. australis</i> en fonction de la taille cellulaire (μm). (A), (B) et (C) représentent les constantes de demi-saturation (K_s). (D), (E) et (F) représentent les vitesses d'absorption maximales (V_{max}). (G), (H) et (I) représentent le coefficient d'affinité ou l'efficacité d'absorption aux concentrations sous-saturantes (α). Les valeurs sont les moyennes des triplicats $\pm$ écart-type.	148

Liste des Figures supplémentaires

Figure S2.1. Relationship between cell size and strain age (month) since their isolation from the natural environment in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> (F1 strains are not taken into account). Linear regressions are not significant ($P > 0.05$).	71
Figure S2.2. Cellular domoic acid content (cDA, fg.cell ⁻¹ , mean $\pm$ SD) under phosphate limitation (black bars) or silicate limitation (grey bars) in <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> . The letters a, b and c indicate the significant differences ($P < 0.001$).	71
Figure S2.3. Cellular domoic acid content (cDA, fg.cell ⁻¹) as a function of the age of the strain (months) since their isolation from natural populations: (A) in <i>P. australis</i> and (B) in <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i>	72
Figure S2.4. Dissolved domoic acid (dDA, fg.cell ⁻¹) as a function of the age of the strain (months) since their isolation from natural populations: (A) in <i>P. australis</i> and (B) in <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i>	72
Figure S3.1. Variation of elemental quotas and Chl <i>a</i> cell contents over time during the batch cultures in the <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> , and <i>P. fraudulenta</i> strains. Mean $\pm$ SE (n = 3).	109
Figure S3.2. Variation of the maximum electron transport rate (ETR _{max}), the photosynthetic efficiency (α), and the minimum saturating light intensity (E _k) over time during the batch cultures for the <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> , and <i>P. fraudulenta</i> strains. Mean $\pm$ SE (n = 3).	110
Figure S3.3. Variation of cDA (black) and dDA (gray) production per cell over time during the batch cultures for the <i>P. australis</i> (A, B, C), <i>P. pungens</i> (D, E, F), and <i>P. fraudulenta</i> strains (G, H, I). Means $\pm$ SE (n = 3).	111

Liste des tableaux

Table 2.1. Strains of <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> used for mating and batch culture experiments. (A) for strains isolated from the Atlantic and (EC) for strains isolated from the English Channel. The age of the strain (in months, calculated from the date of isolation) and the cell size are indicated for each experiment.	48
Table 3.1. Strains of <i>P. australis</i> , <i>P. pungens</i> and <i>P. fraudulenta</i> used for mating and batch culture experiments. (A) for strains isolated from the Atlantic and (EC) for strains isolated from the English Channel. The age of the strain (in months, calculated from the date of isolation) and the cell size are indicated for each experiment.	82
Table 3.2. Specific growth rates (means $\pm$ SE) estimated during the exponential growth phase, and elemental quotas (minima and maxima) measure during the batch cultures.	91
Table 4.1. Strains of <i>P. australis</i> , <i>P. delicatissima</i> , <i>P. fraudulenta</i> , and <i>P. pungens</i> used in the uptake experiments. (A) strains isolated from the Atlantic Ocean; (EC) strains isolated from the English Channel. Age (in months, calculated from the date of isolation from natural populations), cell size, and cell volume are indicated for each strain.	120
Table 4.2. Kinetic parameters of NO ₃ uptake by <i>P. australis</i> , <i>P. delicatissima</i> , <i>P. fraudulenta</i> , and <i>P. pungens</i> . The values are means $\pm$ SE. The r ² column provides the coefficient of determination.	127
Table 4.3. Kinetic parameters of PO ₄ uptake by <i>P. australis</i> , <i>P. delicatissima</i> , <i>P. fraudulenta</i> , and <i>P. pungens</i> . The values are means $\pm$ SE. The r ² column provides the coefficient of determination.	131
Table 4.4. Kinetic parameters of Si(OH) ₄ uptake by <i>P. australis</i> , <i>P. delicatissima</i> , <i>P. fraudulenta</i> , and <i>P. pungens</i> . The values are means $\pm$ SE. The r ² column provides the coefficient of determination.	135
Table 5.1. Portrait écophysiolgique de <i>P. australis</i> , <i>P. fraudulenta</i> et <i>P. pungens</i> . Ce tableau résume les résultats obtenus au cours de cette thèse. AD : acide domoïque.	153
Table 5.2. Portrait écophysiolgique de <i>P. delicatissima</i> . Ce tableau résume les résultats obtenus au cours de la thèse.	154

Liste des communications

- **Communications orales**

« Differences in nutrient physiology and toxin production among three *Pseudo-nitzschia* species: influence of life cycle ». A. Sauvey, J. Fauchot, B. Le Roy, M. Le Gac & P. Claquin. 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA), 21-26 october 2018, Nantes, France.

« Interspecific and intraspecific variability in physiology among four *Pseudo-nitzschia* species ». A. Sauvey, P. Claquin & J. Fauchot. Conférence annuelle du GdR Phycotox & GIS Cyano, 14-16 mars 2017, Gif-sur-Yvette, France.

- **Communications écrites**

« Cell size changes linked to life cycle may influence toxin [DA] production in three *Pseudo-nitzschia* species ». A. Sauvey, J. Fauchot & P. Claquin. 25th International Diatom Symposium (IDS), 25-30 june 2018, Berlin, Germany. Obtention du 3^{ème} prix poster des étudiants.

« Interspecific and intraspecific variability in physiology among the toxic diatoms *Pseudo-nitzschia* spp: influence of life cycle ». A. Sauvey, P. Claquin & J. Fauchot. Forum des jeunes océanographes, 18-20 mai 2016, Cherbourg-en-Cotentin, France. Obtention du 1^{er} prix poster.

« Interspecific and intraspecific variability in physiology among the toxic diatoms *Pseudo-nitzschia* spp: influence of life cycle ». A. Sauvey, P. Claquin & J. Fauchot. Journées de l'école doctorale EdNBISE (JED 2016), 10-11 mars 2016, Caen, France.

Introduction générale

1. Les diatomées

1.1. Origine et découverte des diatomées

Les diatomées sont des microalgues eucaryotes unicellulaires photoautotrophes. Elles seraient apparues au début de l'ère Jurassique, il y a environ 210 millions d'années (Kooistra et al. 2007). Leur apparition résulterait d'un processus d'endosymbiose secondaire entre une algue rouge et un flagellé hétérotrophe (Armbrust 2009). Des études phylogénétiques récentes ont aussi évoqué la possibilité que des gènes chez certaines diatomées aient pour origine un événement endosymbiotique avec une algue verte, cependant la question reste en débat (Deschamps et Moreira 2012). Les diatomées ont été observées et décrites pour la première fois au début du XVIII^{ème} siècle par un naturaliste néerlandais, Antony Van Leeuwenhoek avant d'être référencées à la Royal Society of London. En 1782, Otto Muller décrivit la première espèce de diatomées qu'il nomma *Vibrio paxillifer* puis en 1788, Johann Friedrich Gmelin décrivit le genre *Bacillaria* dans la 13^{ème} édition de *Systema naturae* de Linné. Or, pour Otto Muller, les espèces du genre *Vibrio* étaient des animaux et la nature des diatomées fut un sujet de débat jusqu'à la moitié du XIX^{ème} siècle. C'est la publication de la monographie de Kützing en 1844 qui marqua la fin de cette période d'incertitude puisqu'il traite toutes les diatomées comme étant des plantes. À partir de cette date et jusqu'au début des années 1990, la description et la classification des diatomées ont progressé au rythme du développement des outils microscopiques (Round et al. 1990). La classification des diatomées est continuellement soumise à débat et évolue en fonction des découvertes scientifiques (fossiles, nouvelles espèces) mais également en fonction des progrès technologiques et scientifiques.

1.2. Morphologie des diatomées et structure du frustule

Les diatomées sont des organismes dont la taille varie entre 2 µm à plus de 2 mm pour l'espèce *Ethmodiscus rex* (Sarhou et al. 2005). Elles sont capables de former des chaînes de plusieurs cellules pouvant mesurer plusieurs millimètres. Le mot « diatomée » dérive des mots grecs « dia » et « tomos » qui signifient « deux » « parts ». L'étymologie de ce mot illustre parfaitement le critère distinctif de ces organismes. En effet, les cellules végétatives des diatomées sont entourées d'une paroi nommée frustule qui se compose de deux unités : l'épivalve (partie supérieure) et l'hypovalve (partie inférieure) imbriquées l'une dans l'autre et reliées entre elles par des structures plus fines appelées bandes intercalaires ou cingulaires (Fig.

1.1). Les diatomées peuvent être réparties en trois groupes morphologiques : les diatomées centrées radiales qui présentent des valves de forme circulaire et une symétrie radiale, les diatomées centrées polaires qui sont caractérisées par une symétrie bi- ou multipolaire et des valves généralement non circulaires et les diatomées pennées de forme allongée et à symétrie bilatérale.

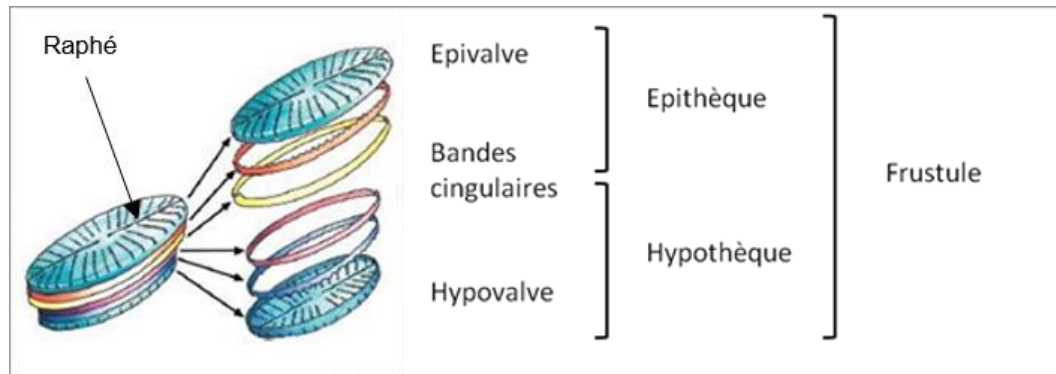


Figure 1.1. Schéma des composantes siliceuses d'un frustule de diatomées (d'après Zurzolo et Bowler 2001).

Le frustule des diatomées est un exosquelette siliceux constitué de silice biogène $((\text{SiO}_2)_n \cdot (\text{H}_2\text{O})_n)$ pouvant présenter des protubérances (épines, soies) et une fente longitudinale nommée raphé chez les diatomées pennées (Fig. 1.1). Le frustule présente une grande variété de forme et est percé de pores. L'ornementation résultante de l'organisation des pores est spécifique à chaque espèce (Fig. 1.2). Les pores permettent également à la cellule de communiquer avec le milieu extérieur en permettant le passage du milieu environnant la cellule (eau et éléments dissous) et la sécrétion de produits cellulaires.

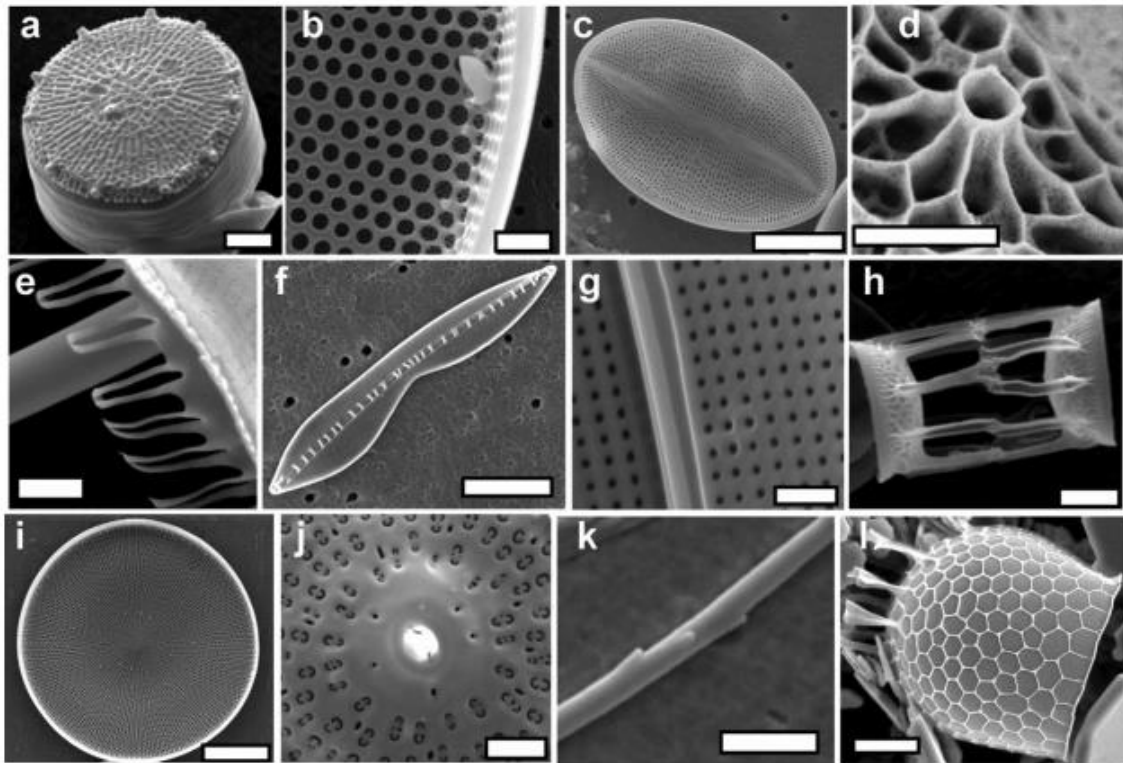


Figure 1.2. Diversité de la structure du frustule des diatomées nettoyées à l'acide. (a) *Thalassiosira pseudonana* (échelle = 1 μm), (b) détail du frustule de *Coscinodiscus wailesii* (échelle = 5 μm), (c) *Cocconeis* sp. (échelle = 10 μm), (d) rimoportula de *Thalassiosira weissflogii* (échelle = 500 nm), (e) structure en couronne de *Ditylum brightwellii* (échelle = 2 μm), (f) *Bacilaria paxillifer* (échelle = 10 μm), (g) détail des pores de *Gyrosigma balticum* (échelle = 2 μm), (h) *Skeletonema costatum* (échelle = 2 μm), (i) valve de *C. wailesii* (échelle = 50 μm), (j) détail des pores de *D. brightwellii* (échelle = 2 μm), (k) seta de *Chaetoceros gracilis* (échelle = 1 μm), (l) *Stephanopyxis turris* (échelle = 10 μm). D'après Hildebrand (2008).

Le rôle précis du frustule suscite encore des interrogations. Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer l'utilité et l'avantage écologique de cette caractéristique conservée par les diatomées au cours de l'évolution. Le frustule constituerait une barrière physique qui limiterait l'action des brouteurs et restreindrait l'accès des parasites (Smetacek 2001, Hamm et al. 2003). Cette protection physique présenterait également des avantages dans le positionnement vertical des cellules dans la colonne d'eau en jouant un rôle de « ballast ». Le frustule permettrait de contenir la pression de turgescence engendrée par le protoplaste et ce qui permettrait une remontée des cellules dans la colonne d'eau (Raven et Waite 2004, Armstrong et al. 2009). Cette barrière mécanique protégerait également la cellule des dommages induits par les rayons ultraviolets. En effet, le frustule posséderait des molécules permettant d'absorber les UV (Ingalls et al. 2010). Enfin, en plus des propriétés physiques citées ci-dessus, le frustule pourrait également jouer un rôle dans le maintien du tampon pH de la cellule en facilitant l'activité des anhydrases carboniques extracellulaires qui permettent la transformation du CO_2 en HCO_3^- et

inversement (Milligan et Morel 2002). Ces auteurs ont montré chez *Thalassiosira weissflogii* que la silice biogène (constituant le frustule) dépourvue de matière organique joue un rôle de « tampon pH » permettant la régénération du site actif des anhydrases carboniques tout en augmentant leur activité.

1.3. Habitats des diatomées

Les diatomées sont des organismes ubiquistes pouvant peupler un grand nombre de milieux humides (aérien, terrestre et aquatique) des plus favorables aux plus hostiles depuis le début de la période Jurassique (Kooistra et Medlin 1996). Dans les milieux aquatiques, les diatomées sont présentes en eau douce (lacs, mares, rivières) comme en eau salée (estuaires, milieu marin) et des zones polaires aux zones tropicales. En milieu marin, ceux sont des organismes coccoïdes¹ solitaires (exemple : *Cymbella* sp.) ou vivant en colonie (exemple : *Fragilaria* sp.). Les diatomées planctoniques se développant dans la colonne d'eau sont majoritairement représentées par des diatomées centriques tandis que les diatomées benthiques, majoritairement représentées par des diatomées pennées, peuvent être épilithiques², épipéliques³ ou épipsammiques⁴.

1.4. Classification des diatomées

La **morpho-taxonomie**. En 1990, Round et al. ont classé les diatomées en tant que division (Bacillariophyta) et les ont divisé en trois classes : Coscinodiscophyceae, Fragilariophyceae et Bacillariophyceae, qui correspondaient à trois caractéristiques morphologiques : les centrées (Coscinodiscophyceae), les pennées araphides (Fragilariophyceae) et les pennées raphides (Bacillariophyceae). En 1995, Van den Hoek et al. ont considéré les diatomées en tant que classe (Bacillariophyceae) au sein de la division des Heterokontophyta et ont proposé deux grands groupes de diatomées : les centrées (Coscinodiscophyceae) et les pennées (Fragilariophyceae et Bacillariophyceae).

¹ Coccoïde : se dit d'un organisme unicellulaire non mobile

² Epilithique : se dit d'un organisme qui croît attaché à un substrat rocheux

³ Epipélique : se dit d'un organisme vivant librement sur des surfaces sédimentaires

⁴ Epipsammique : se dit d'un organisme vivant attaché aux grains dans les sédiments sableux

La **phylogénie moléculaire**. Au cours des dernières années, des marqueurs moléculaires ont été utilisés pour permettre des analyses phylogénétiques afin de mieux comprendre l'évolution des organismes vivants et donc les liens de parenté entre organismes. A partir d'analyses moléculaires, en 2003, Kooistra et al. ont remis en cause la classification des diatomées basée sur la morphologie. En 2004, Medlin et Kaczmarska sur la base de données moléculaires et morphologiques, ont revu la systématique des diatomées basée sur les deux clades majeures (les diatomées centrées et pennées) en établissant trois classes de diatomées : Coscinodiscophyceae (= diatomées centrées radiales), Mediophyceae (= diatomées centrées polaires) et Bacillariophyceae (= diatomées pennées). En 2006, Sims et al. proposent une revue des connaissances de l'évolution des diatomées à partir des données fossiles, biologiques et moléculaires. En 2012, Mock et Medlin ont passé en revue l'évolution du groupe depuis ses origines jusqu'à l'étude de ses gènes. Depuis 2012, davantage de données moléculaires, de meilleures corrélations de clades moléculaires avec des caractéristiques morphologiques et plus d'informations sur la reproduction sexuée sont disponibles. Ainsi, à partir de ces nouvelles données et des revues de Sims et al. (2006) et de Mock et Medlin (2012), Medlin (2016) propose dans une revue de littérature une nouvelle classification des diatomées basée sur des analyses moléculaires [encadré n°1 : Classification des diatomées d'après Medlin (2016)].

[Encadré n°1]

Classification des diatomées d'après Medlin (2016)

Linda Medlin propose une classification différente basée sur des analyses moléculaires réalisées à partir d'alignements de la structure secondaire du gène de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal. Les diatomées se classent dans la lignée des Hétérokontophytes et dans la division des Bacillariophyta puis suivent la classification suivante :

- Sous-division des Coscinodiscophytina
 - Classe des Coscinodiscophyceae (= centrées radiales)
- Sous-division des Bacillariophytina
 - Classe des Mediophyceae (= centrées polaires)
 - Classe des Bacillariophyceae (= pennées)
 - Sous-classe des Urneidophycidae (= pennées araphides)
 - Sous-classe des Fragilariophycidae (= pennées araphides)
 - Sous-classe des Bacillariophycidae (= pennées raphides)

A noter qu'à ce jour, il a été admis que seulement 10 % de la diversité des diatomées est connue (Medlin 2018). Les diatomées présentent une riche diversité spécifique estimée à environ 100 000 espèces parmi lesquelles seulement 10 000 d'entre elles sont décrites (Mann et Vanormelingen 2013).

1.5. Cycle de vie particulier des diatomées

Les diatomées possèdent un cycle de vie monogénétique diplophasique fortement lié aux variations de taille cellulaire. La présence du frustule confère aux diatomées un cycle de vie particulier. Le cycle biologique complet des diatomées montre une alternance entre multiplication végétative, reproduction sexuée et formation de spores (sporulation). Ces étapes de développement sont principalement liées à la taille des organismes et aux conditions du milieu (en particulier la température, la lumière et les teneurs en éléments nutritifs). La phase de multiplication végétative s'accompagne obligatoirement d'une diminution de la taille des cellules dans une population. La restauration de cellules de grande taille se produit par l'un des deux processus suivants : l'agrandissement cellulaire végétatif seulement observé chez certaines espèces de diatomées ou la reproduction sexuée (Chepurnov et al. 2004, Kaczmarek et al. 2013).

1.5.1. La multiplication végétative et la règle de MacDonald-Pfitzer

La multiplication asexuée ou multiplication végétative des cellules consiste en une succession de divisions cellulaires (mitoses) qui, en raison de la présence du frustule siliceux, résulte en une réduction progressive de la taille moyenne des cellules dans une population c'est-à-dire d'une diminution de la longueur chez les diatomées pennées et du diamètre chez les diatomées centrées. Ainsi, chez les diatomées, la taille des cellules n'est pas constante au cours de leur cycle de vie. Au préalable de chaque division cellulaire, le volume de chaque cellule mère est augmenté d'un facteur deux. Le nombre de chloroplastes, mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique et vacuoles est doublé et les chromosomes sont répliqués. Tous les composants sont ensuite séparés à chaque pôle de la cellule afin de les répartir dans chaque cellule fille (Round et al. 1990). La formation des deux cellules filles se produit au sein du frustule de la cellule mère (Pickett-Heaps et al. 1990). Le frustule de chaque nouvelle cellule est composé d'une nouvelle valve néoformée juste avant la division et d'une valve issue de la cellule mère.

Ainsi, une cellule fille conserve l'épivalve de la cellule mère et génère une nouvelle hypovalve. Cette nouvelle cellule sera de taille similaire à la cellule mère. Quant à la deuxième cellule fille, elle conserve l'hypovalve de la cellule mère comme épivalve et génère une hypovalve. Elle sera donc de taille inférieure à la cellule mère (Fig. 1.3). C'est ce processus connu sous le nom de règle de MacDonald-Pfitzer (MacDonald 1869, Pfitzer 1869) qui entraîne la diminution de la taille moyenne des cellules dans une population au cours de la multiplication végétative. La diminution de la taille cellulaire se produit jusqu'à une taille minimale critique au-delà de laquelle les cellules ne sont plus viables.

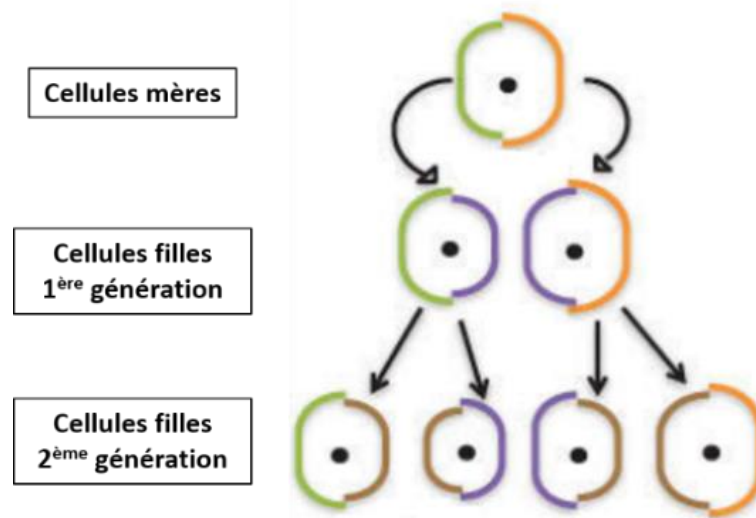


Figure 1.3. Dessin schématique de la multiplication végétative chez les diatomées (modifié d'après Montresor et al. (2016).

1.5.2. La reproduction sexuée

La caractéristique principale du cycle de vie des diatomées est la diminution progressive de la taille cellulaire concomitante à la division cellulaire. Chez les diatomées, l'induction de la reproduction sexuée dépend d'une taille cellulaire spécifique. En effet, seules les cellules présentes dans une gamme de taille spécifique à chaque espèce, se révèlent capables de reproduction sexuée (Kaczmarska et al. 2013). Ainsi, si la taille cellulaire spécifique n'est pas atteinte, aucune autre condition ne peut induire la gamétogénèse. Lorsque les cellules se situent dans la gamme de taille favorable à la reproduction sexuée, elles sont nommées gamétocystes.

Chez les diatomées, la reproduction sexuée ne permet pas seulement une recombinaison génétique mais permet également la restauration de cellules de taille initiale (taille maximale), indispensable à la survie de l'espèce (Chepurnov et al. 2004). La reproduction sexuée des

diatomées centrées et pennées coïncide sur certaines étapes et diverge sur d'autres dont les détails sont présentés dans les deux paragraphes suivants et dans la figure 1.4. Les diatomées sont des organismes diploïdes. Les gamètes mâles nommés (+) et de gamètes femelles nommés (-) sont formés par méiose. La fusion d'un gamète (+) et d'un gamète (-) appelé fécondation conduit à la formation d'un zygote. Puis, ce zygote se développe en auxospore, de taille supérieure à celle de la cellule-mère (gamétocyste), par le processus d'auxosporulation⁵. L'auxospore est une cellule spécialisée qui permet la régénération de la taille maximale et de la forme caractéristique d'une diatomée. L'auxospore est « mature » lorsqu'elle a terminé son expansion et contient la cellule initiale. En effet, la cellule initiale de grande taille est formée à l'intérieur de cette auxospore à la suite de l'élaboration de deux nouvelles valves. La cellule initiale est libérée dans le milieu lorsque l'auxospore s'ouvre à son extrémité (Kaczmarska et al. 2013). Les nouvelles cellules initiales présentent les caractéristiques typiques de chaque espèce et elles forment une nouvelle lignée par multiplication végétative.

Chez les diatomées et particulièrement chez les diatomées pennées, chaque espèce présente des gammes de taille relativement constantes qui ont conduit à l'élaboration du concept de points cardinaux caractérisant l'histoire de vie des diatomées (Edlund et Bixby 2001, Chepurnov et al. 2004, Kaczmarska et al. 2013). Ces points cardinaux comprennent (1) la taille des cellules initiales, (2) la taille maximale des gamétocystes c'est-à-dire des cellules capables de reproduction sexuée (seuil de taille de sexualisation supérieur), (3) la taille à laquelle les cellules perdent leur capacité de reproduction sexuée (seuil de taille de sexualisation inférieur) et (4) la taille minimale viable au-delà de laquelle les cellules meurent. Les deux derniers points cardinaux peuvent être égaux chez les espèces capables de reproduction sexuée jusqu'aux plus petites tailles cellulaires.

A noter que certaines espèces de diatomées peuvent restaurer des cellules de grande taille par un processus d'agrandissement asexué (Fig. 1.4, Kaczmarska et al. 2013). Les cellules végétatives à l'origine de cet élargissement sont généralement aux derniers stades du cycle de vie (donc de petites tailles cellulaires) et ne sont plus capables de méiose. Les nouvelles cellules formées par ce processus d'agrandissement seront de plus grande taille mais ne pourront pas atteindre la taille maximale caractéristique des cellules initiales.

⁵ L'auxosporulation fait référence à l'ensemble du processus par lequel une auxospore est formée, se développe en fonction de la morphologie de l'espèce et donne lieu à une nouvelle cellule initiale de grande taille (D'après, Kaczmarska et al. 2013).

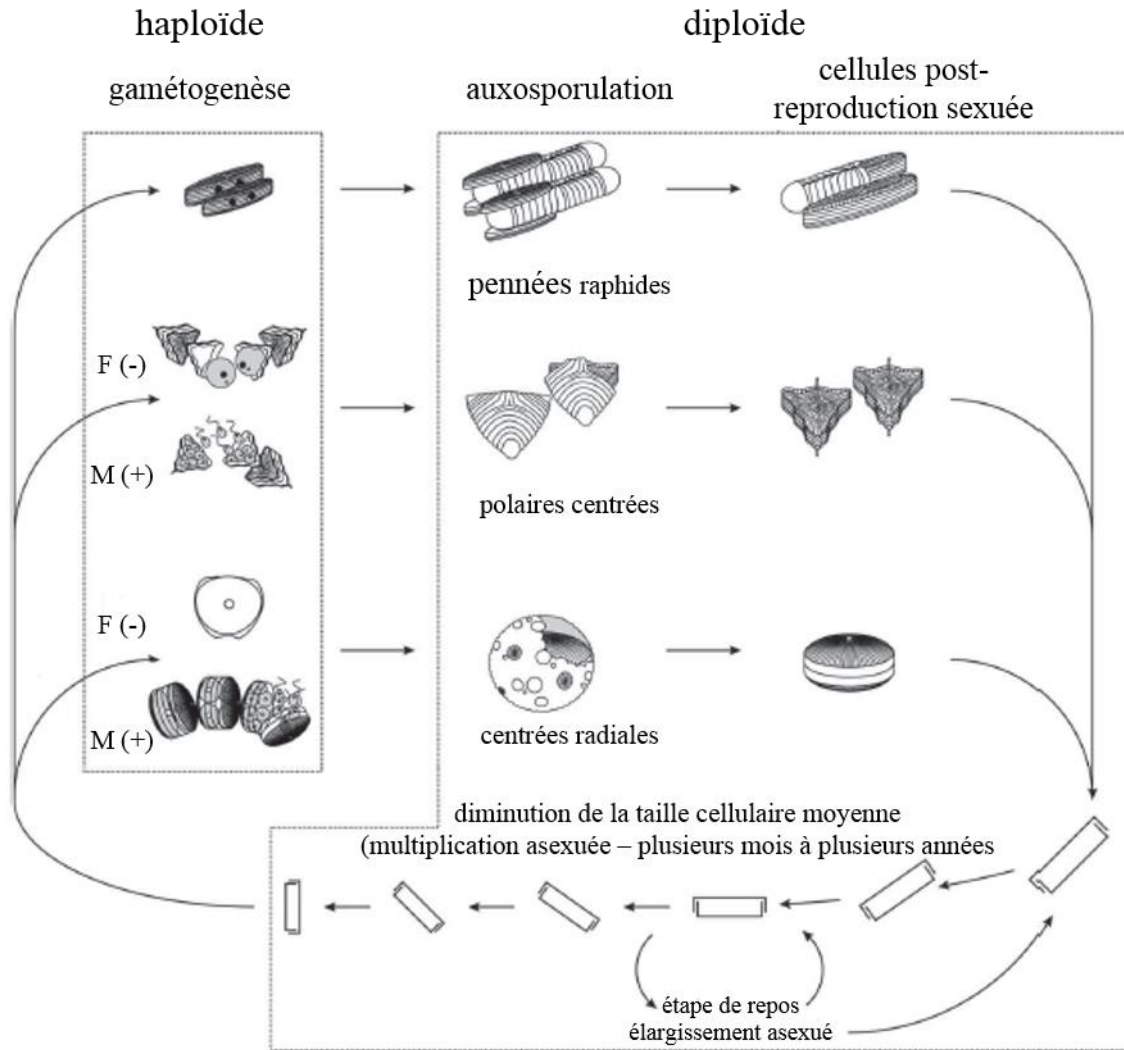


Figure 1.4. Résumé des principales caractéristiques du cycle de vie des diatomées selon trois variantes principales : les diatomées centrées polaires et radiales et les diatomées pennées. F (-) et M (+) symbolisent respectivement les gamètes femelle non-mobile et mâle mobile. Modifiée d'après Kaczmarzka et al. (2013).

Chez les diatomées centrées. La reproduction sexuée des diatomées centrées se produit, en règle générale, par oogamie. Ces diatomées sont pour la plupart homothalliques c'est-à-dire qu'ils n'existe pas de lignées de types sexuels différents (Kaczmarzka et al. 2013). Lorsque les cellules atteignent une gamme de tailles favorables à la reproduction sexuée, elles vont se différencier en cellule mâle ou cellule femelle. Ainsi, la cellule dite femelle (-) ou oogone ($2n$) va réaliser une oogenèse (succession de mitoses et de méiose) entraînant la formation d'un gamète non mobile de grande taille nommé oogonie (n) qui contient deux ou trois noyaux mais ont un ou deux dégénèrent et la cellule dite mâle (+) ou spermatocyste ($2n$) va réaliser une spermatogénèse entraînant la formation de petits gamètes flagellés et donc mobiles nommés spermatocytes (n). Une fois les spermatocytes libérés dans le milieu, ils vont se déplacer

activement vers l'oogonie pour la féconder et ainsi former un zygote ($2n$) qui deviendra une auxospore. Suite à l'expansion de l'auxospore, le nouveau frustule de la cellule initiale est synthétisé à l'intérieur de cette auxospore et lorsque la cellule initiale de grande taille est formée, elle est libérée dans le milieu (Chepurnov et al. 2004).

Chez les diatomées pennées. Les diatomées pennées sont principalement hétérothalliques c'est-à-dire que les deux types de gamètes (+ et -) sont produits par deux cellules de types sexuels différents (Kaczmarska et al. 2013). Chez la majorité des diatomées pennées, la reproduction sexuée se produit par isogamie morphologique et anisogamie physiologique (Kaczmarska et al. 2013) [seul type de reproduction sexuée chez les diatomées pennées présentés ici]. Les gamètes, non flagellés, sont de forme et de taille similaires mais sont fonctionnellement distincts (Chepurnov et al. 2004). Dans une gamme de taille favorable à la reproduction sexuée, les gamétocystes de types sexuels différents (type « + » et type « - ») vont s'apparier deux à deux avant de réaliser la gamétogenèse. Chaque gamétocyste va former deux gamètes. Les gamétocystes « + » produisent des gamètes dits actifs (mobiles) tandis que les gamétocystes « - » produisent des gamètes dits passifs (immobiles). Les deux valves des frustules s'ouvrent pour libérer les gamètes. Les gamètes passifs restent appariés au frustule du gamétocyste « - ». Les gamètes « + » actifs se déplacent pour fusionner avec les gamètes « - ». Comme pour les diatomées centrées, la fusion des gamètes entraîne la formation d'un zygote qui se développe en auxospore dans laquelle une cellule initiale est formée. La libération de cette cellule dans le milieu entraîne la formation d'une nouvelle lignée (Chepurnov et al. 2004).

1.5.3. Implications écologiques du cycle de vie des diatomées

Le maintien au cours de l'évolution de ce cycle de vie particulier suppose plus d'avantages que de coûts pour les espèces de diatomées (Lewis 1987). Certains avantages de la sexualité des diatomées sont communs à tous les organismes sexués avec par exemple, la recombinaison génétique permettant d'augmenter la diversité, l'hétérozygotie et l'expression de nouveaux génomes (Lewis 1987). Mais chez les diatomées, un important avantage de la reproduction sexuée est la restauration de la taille cellulaire puisqu'en raison des contraintes imposées par le mécanisme de division cellulaire régie par la règle de Mac-Donald-Pfitzer, la sexualité reste le principal mécanisme permettant aux espèces de restaurer leur taille maximale (Edlund et Stoermer 1997). Un second avantage très spécifique aux diatomées est la récupération de la forme puisqu'il est courant d'observer, suite à des dommages mécaniques liées à la mitose, des

formes aberrantes avec des valves difformes chez les diatomées (Fig. 1.5). La reproduction sexuée permet à ces lignées cellulaires de retrouver une morphologie normale au cours de l'auxosporulation (Edlund et Stoermer 1997).

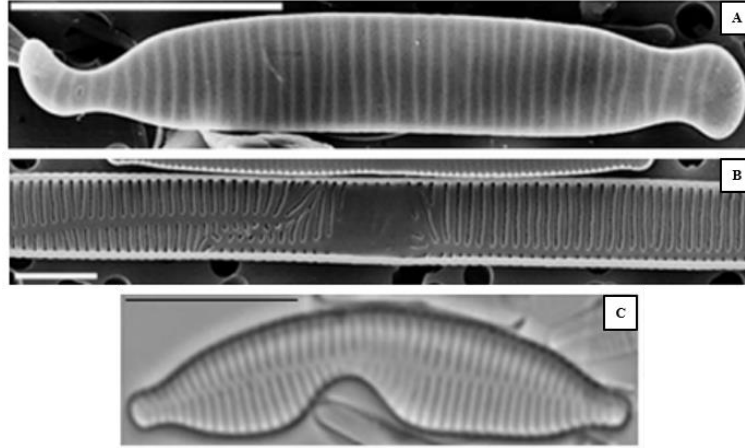


Figure 1.5. Photographies de forme tératologique de valves de diatomées. (A) *Diatom ehrenbergii* (microscopie électronique à balayage, échelle = 5 μ m), (B) *Ulnaria ulna* (microscopie électronique à balayage, échelle = 5 μ m) et (C) *Fragilaria arcus* (microscopie optique, échelle = 5 μ m). D'après Falasco et al. (2009).

Enfin, l'un des avantages écologiques du cycle de vie des diatomées et surtout de la diminution de la taille cellulaire liée à la présence du frustule serait l'instauration d'un « chronomètre », dit aussi « horloge interne » de la sexualité afin d'espacer de manière optimale dans le temps les événements de reproduction sexuée dans une population en fonction du coût de cette reproduction (Lewis 1984). Chez les diatomées, ce processus permet de maintenir des intervalles de plus d'un an entre deux événements de reproduction sexuée (Jewson 1992, D'Alelio et al. 2010, Montresor et al. 2016).

2. Les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*

Les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* ont été décrites pour la première fois par Hippolyte et Maurice Peragallo et recensées dans le livre « Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins » (Peragallo et Peragallo 1908). L'intérêt de la communauté scientifique pour ces diatomées s'est accru suite à la première intoxication répertoriée qui a eu lieu en novembre-décembre 1987 sur l'île du Prince Edouard dans le Golfe du Saint-Laurent au Canada (Bates et al. 1988, 1989). Cet événement a entraîné le décès de trois personnes et en a rendu malades plus d'une centaine d'autres (Bates et al. 1998, Trainer et al. 2008) suite à la consommation de moules bleues (*Mytilus edulis*). Ces moules contenaient de fortes quantités d'une neurotoxine, l'acide domoïque (AD) dont le mode d'action est décrit dans l'encadré n°2 : Mode d'action de l'acide domoïque. Les travaux de recherche menés, suite à cet événement, ont mis en évidence que cette neurotoxine était produite par la diatomée *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bates et al. 1989, Bates et Trainer 2006).

2.1. Présentation du genre *Pseudo-nitzschia*

2.1.1. Classification et identification des espèces

Les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* appartiennent à la sous-division des Bacillariophytina, à la sous-classe des Bacillariophycidae et à l'ordre des Bacillariales (Medlin 2016). Les progrès de la caractérisation moléculaire ont permis, grâce à l'étude de marqueurs génétiques, d'approfondir la phylogénie et donc la classification des espèces de *Pseudo-nitzschia*. Au début des années 2000, les séquençages de la grande sous-unité de l'ADN ribosomal (LSU ADNr, Lundholm et al. 2002) et de la région ITS1-5.8S-ITS2 (pour Internal Transcribed Spacer, région non codante de l'ADNr), très polymorphe (Lundholm et al. 2003) ont permis l'élaboration d'arbres phylogénétiques regroupant les espèces de *Pseudo-nitzschia*. De plus, afin d'améliorer la phylogénie de *Pseudo-nitzschia*, des études se sont intéressées plus spécifiquement à la structure de la région ITS2 (Lim et al. 2013, 2018, Teng et al. 2014) plus robuste pour la construction d'arbres phylogénétiques (Lim et al. 2013). En 2018, Lim et al. ont élaboré l'arbre phylogénétique des espèces de *Pseudo-nitzschia* (Fig. 1.7) basé sur le séquençage de la région ITS2 auquel ils ont ajouté des critères morphologiques de l'ultrastructure du frustule, afin de réconcilier les classifications phylogénétiques et morphologiques.

[Encadré n°2]**Mode d'action de l'acide domoïque**

L'acide domoïque (AD) est un acide aminé analogue de l'acide L-glutamique, un neurotransmetteur, capable d'engendrer des troubles neurologiques chez des espèces à système nerveux centralisé, comme par exemple les oiseaux, les mammifères marins ou les humains (Scholin et al. 2000, Lincoln et al. 2001, Bargu et al. 2002, Lefebvre et Robertson 2010). L'acide domoïque se fixe sur les neurones à la place de l'acide L-glutamique mais, au contraire de ce dernier, n'est pas libéré (Fig. 1.6). Il maintient ainsi une stimulation continue des neurones se situant dans la zone de l'hippocampe, les endommage et entraîne leur destruction conduisant à des pertes de mémoire (Todd 1993).

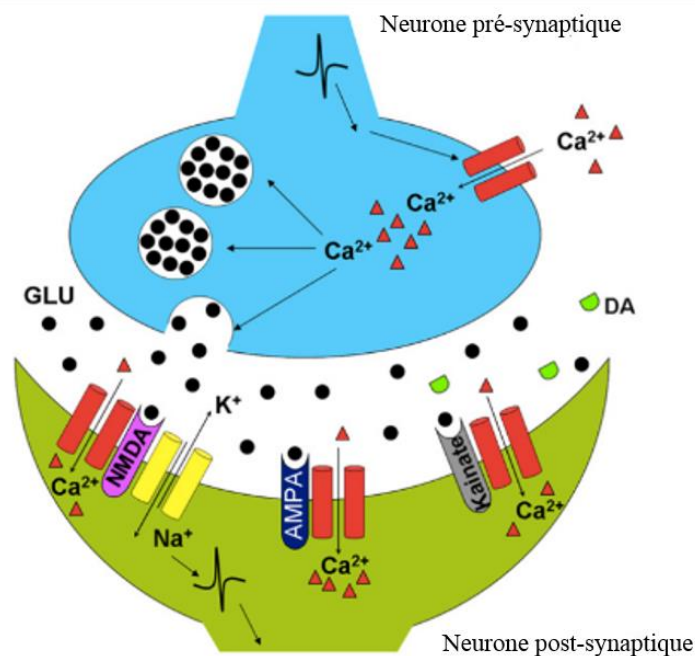


Figure 1.6. Mécanisme d'action du glutamate (GLU) et de l'acide domoïque (DA) induisant la neurotoxicité dans les cellules nerveuses (d'après Lefebvre et Robertson 2010).

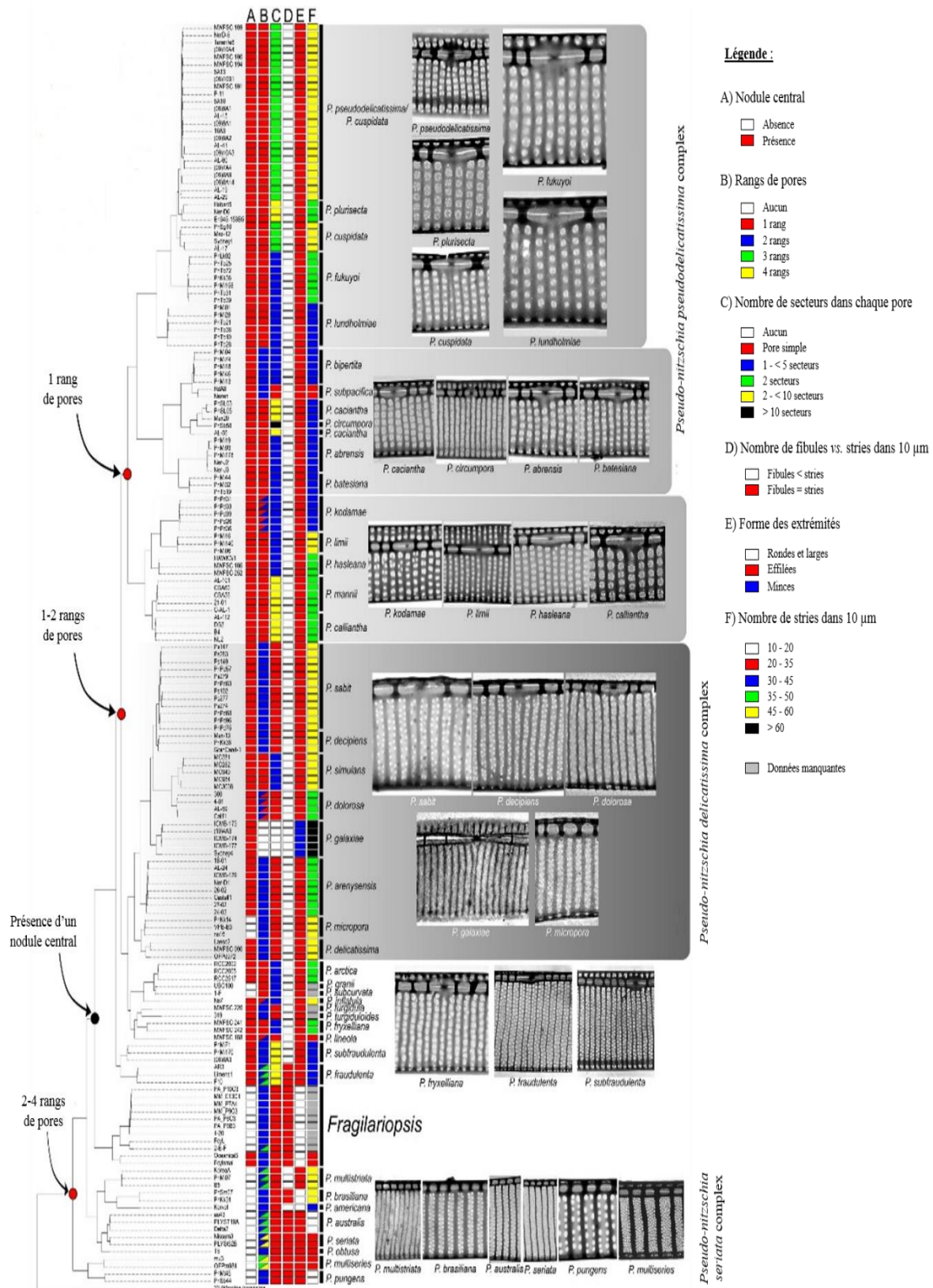


Figure 1.7. Arbre phylogénétique des espèces de *Pseudo-nitzschia* basé sur l'analyse des séquences ITS2 avec l'intégration de caractères morphologiques : (A) présence / absence de nodule central, (B) nombre de rangs de pores, (C) nombre de secteurs dans chaque pore, (D) nombre de fibulae et de stries dans 10 µm, (E) forme des extrémités et (F) nombre de stries dans 10 µm. Les photographies en microscopie électronique de *Pseudo-nitzschia* spp. montrent la partie centrale des valves où la structure, le nombre de rangs de pores et le nodule central sont observables (modifié d'après Lim et al. 2018).

La morphologie est, en effet, utilisée classiquement en routine pour identifier les *Pseudo-nitzschia* en microscopie optique et en microscopie électronique. L'identification des *Pseudo-nitzschia* réalisée en microscopie optique est basée sur des critères morphologiques qui permettent de discriminer des ensembles d'espèces appelés complexes. Afin d'identifier chaque espèce, la comparaison des caractères de l'ultrastructure en microscopie électronique est nécessaire. L'identification des *Pseudo-nitzschia* grâce à la microscopie est présentée dans l'encadré n°3 : Identification des complexes et des espèces du genre *Pseudo-nitzschia*. L'identification des espèces en microscopie électronique reste difficile pour des espèces cryptiques⁶ et pseudo-cryptiques dont les ultrastructures du frustule sont très proches. Ainsi, l'analyse des régions d'ADN ribosomales (LSU, ITS 1 et ITS 2) grâce à des outils moléculaires permet de discriminer finement les espèces entre elles. Plusieurs espèces cryptiques et pseudo-cryptiques ont donc été décrites dans le genre *Pseudo-nitzschia* : *P. arenysensis*, *P. caciaantha*, *P. calliantha*, *P. decipiens*, *P. delicatissima*, *P. dolorosa*, *P. mannii*, *P. pseudodelicatissima* et *P. pungens* (Lundholm et al. 2003, 2006, Orsini et al. 2004, Amato et al. 2005, 2007, Amato et Montresor 2008, Casteleyn et al. 2008, Quijano-Scheggia et al. 2009). De plus, afin de compléter l'identification et la discrimination de différentes espèces, en particulier des espèces cryptiques, certains auteurs testent aussi l'isolement reproductif de certains groupes proches (Amato et al. 2007).

Actuellement, environ 51 espèces de *Pseudo-nitzschia* sont décrites (Lelong et al. 2012, Lim et al. 2013, Orive et al. 2013, Teng et al. 2014, 2016, Li et al. 2017, 2018, Ajani et al. 2018, Frøsig Gai et al. 2018) parmi lesquelles, 26 sont considérées comme étant toxiques c'est-à-dire capables de produire de l'acide domoïque (Lundholm 2018).

⁶ Une espèce cryptique est une espèce qui ne présente aucune différence morphologique permettant de la différencier d'une autre espèce mais dont les différences génétiques sont notables et sont révélées grâce à l'étude des séquences ARN et ADN.

[Encadré n°3]**Identification des complexes et des espèces du genre *Pseudo-nitzschia***

La **microscopie optique** permet des observations de la forme des valves (et de leurs extrémités), des mesures de la taille cellulaire (longueur, largeur) et du taux de chevauchement des cellules dans une chaîne. Ces informations permettent de discriminer les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* en deux complexes regroupant plusieurs espèces morphologiquement proches : le complexe *seriata* dont la largeur du frustule est supérieur à 3 µm et le complexe *delicatissima* dont la largeur est inférieure à 3 µm (Hasle 1965, Hasle et Syvertsen 1997, Lassus et al. 2016). En Baie de Seine, deux complexes ont jusqu'à présent été identifiés :

- Le complexe « ***Pseudo-nitzschia seriata*** » regroupant les espèces *P. australis*, *P. fraudulenta*, *P. multistriata*, *P. multiseries* et *P. pungens*.
- Le complexe « ***Pseudo-nitzschia delicatissima*** » regroupant l'espèce *P. delicatissima*.

La **microscopie électronique à transmission (MET)** permet d'étudier les caractéristiques structurales du frustule des cellules c'est-à-dire les critères morphométriques donc l'ultrastructure des valves c'est-à-dire la présence ou l'absence d'un nodule central, la longueur et la largeur des cellules, le nombre de stries sur 10 µm, le nombre de pores sur 1 µm et la structure de ces pores (Fig. 1.8).

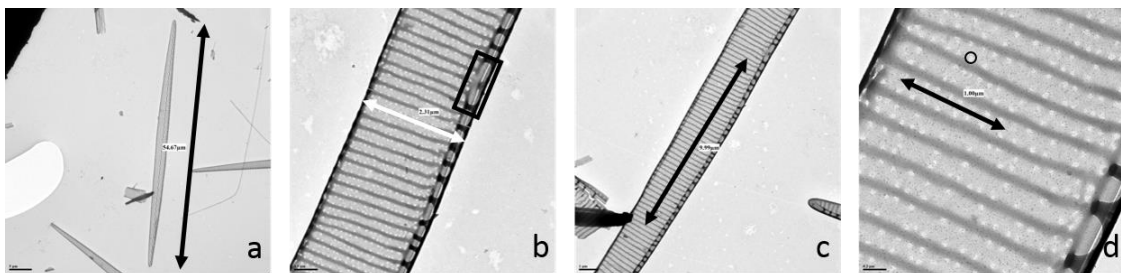
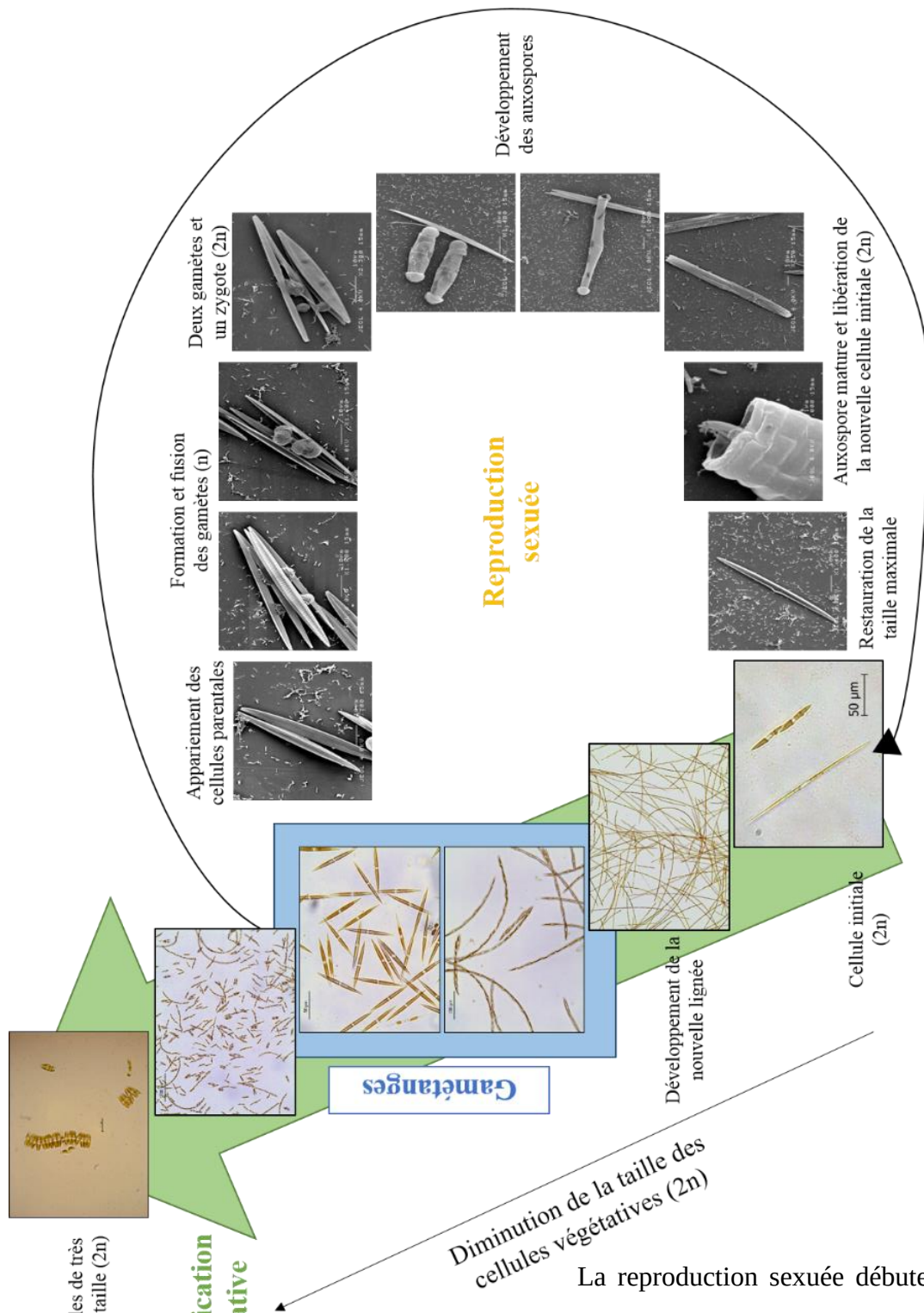


Figure 1.8. Détails des mesures réalisées en microscopie électronique à transmission (MET) sur le frustule d'une cellule de *Pseudo-nitzschia* pour l'identification de l'espèce. a) mesure de la longueur de la valve, b) mesure de la largeur de la valve et présence d'un nodule central (rectangle noir), c) nombre de stries et d'interstices sur 10 µm et d) nombre de pores sur 1 µm et structure des pores (rond noir). Photographies en microscopie électronique à transmission : Juliette Fauchot et Aurore Sauvey.

2.1.2. Cycle de vie de *Pseudo-nitzschia* spp.

La première description du cycle de vie a été faite en 1991 chez l'espèce *Nitzschia pungens* f. *multiseries*, maintenant *Pseudo-nitzschia multiseries* (Subba Rao et al. 1991). La grande majorité des espèces de *Pseudo-nitzschia* est hétérothallique nécessitant ainsi pour la reproduction sexuée la rencontre de deux cellules de types sexuels opposés (Chepurnov et al. 2004). A ce jour, l'homothallie n'a été observée que chez deux espèces de *Pseudo-nitzschia* : *P. brasiliensis* (Quijano-Scheggia et al. 2009) et *P. subcurvata* (Fryxell et al. 1991). Le cycle de vie de *Pseudo-nitzschia* spp présenté dans la figure 1.9 est typique du cycle de vie des diatomées pennées comme décrit dans le paragraphe « 1.5. Cycle de vie particulier des diatomées ». Chez *Pseudo-nitzschia* spp, la reproduction sexuée est possible que dans une gamme de taille cellulaire précise. Dans cette gamme de taille, lorsqu'elles sont capables de se reproduire sexuellement, les cellules sont nommées gamétocystes. Cette gamme de taille est spécifique à chaque espèce et est comprise entre 20 et 90 % de la taille cellulaire maximale chez *P. arenysensis* (Amato et al. 2005), entre 23 et 70 % chez *P. multiseries* (Hiltz et al. 2000), entre 39 et 71 % chez *P. multistriata* (D'Alelio et al. 2009) et entre 20 et 60 % chez *P. pungens* (Chepurnov et al. 2005).



sexuels
opposés identifiés comme « + » et « - ».

Multiplication végétative

identiques et non flagellés sont formés par méiose dans chaque cellule parentale. La fusion des gamètes deux à deux provenant de la cellule « + » et de la cellule « - » permet la formation de deux zygotes de forme sphérique généralement attachés à l'une des valves de la cellule « - » (Davidovich et Bates

Figure 1.9. Cycle de vie de *Pseudo-nitzschia* spp. Détails de la diminution de la taille cellulaire lors de la multiplication végétative en microscopie optique et détails des différentes étapes de la reproduction sexuée en microscopie électronique à balayage (Photographies en microscopie optique : Aurore Sauvey ; photographies en microscopie électronique à balayage : Juliette Fauchot et Idir Issad).

1998). L'élongation des zygotes aboutit à la formation d'auxospores se développant parallèlement l'une à l'autre et perpendiculairement à l'axe du frustule parental. La formation des valves de la cellule initiale de grande taille se fait à l'intérieur de l'auxospore après la fin de l'expansion de cette dernière et permet la régénération de la morphologie caractéristique de chaque espèce (Kaczmarek et al. 2013). Une fois la cellule initiale formée, celle-ci sort de l'auxospore en brisant un des capuchons situés aux extrémités (Davidovich et Bates 1998, Amato et al. 2005, D'Alelio et al. 2009) et débute une nouvelle phase de multiplication végétative. La taille cellulaire maximale déterminée en culture chez plusieurs espèces de *Pseudo-nitzschia* définit l'un des points cardinaux spécifiques à chaque espèce. Elle est comprise entre 78 et 94 μm chez *P. delicatissima* (ré-identifiée comme *P. arenysensis*, Amato et al. 2005), entre 120 et 130 μm chez *P. mannii* (Amato et Montresor 2008), entre 120 et 173 μm chez *P. multiseries* (Davidovich et Bates 1998), entre 72 et 82 μm chez *P. multistriata* (D'Alelio et al. 2009), entre 110 et 142 μm chez *P. pseudodelicatissima* (Davidovich et Bates 1998) et entre 157 et 173 μm chez *P. pungens* (Chepurnov et al. 2005).

2.2. Les efflorescences de *Pseudo-nitzschia*

2.2.1. Biogéographie des espèces de *Pseudo-nitzschia* et toxicité des efflorescences

Les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* sont largement répandues dans les assemblages phytoplanctoniques des eaux côtières et océaniques (Fig. 1.10) (Hasle 2002, Lelong et al. 2012, Trainer et al. 2012, Lassus et al. 2016) et peuvent dominer certaines efflorescences de diatomées.

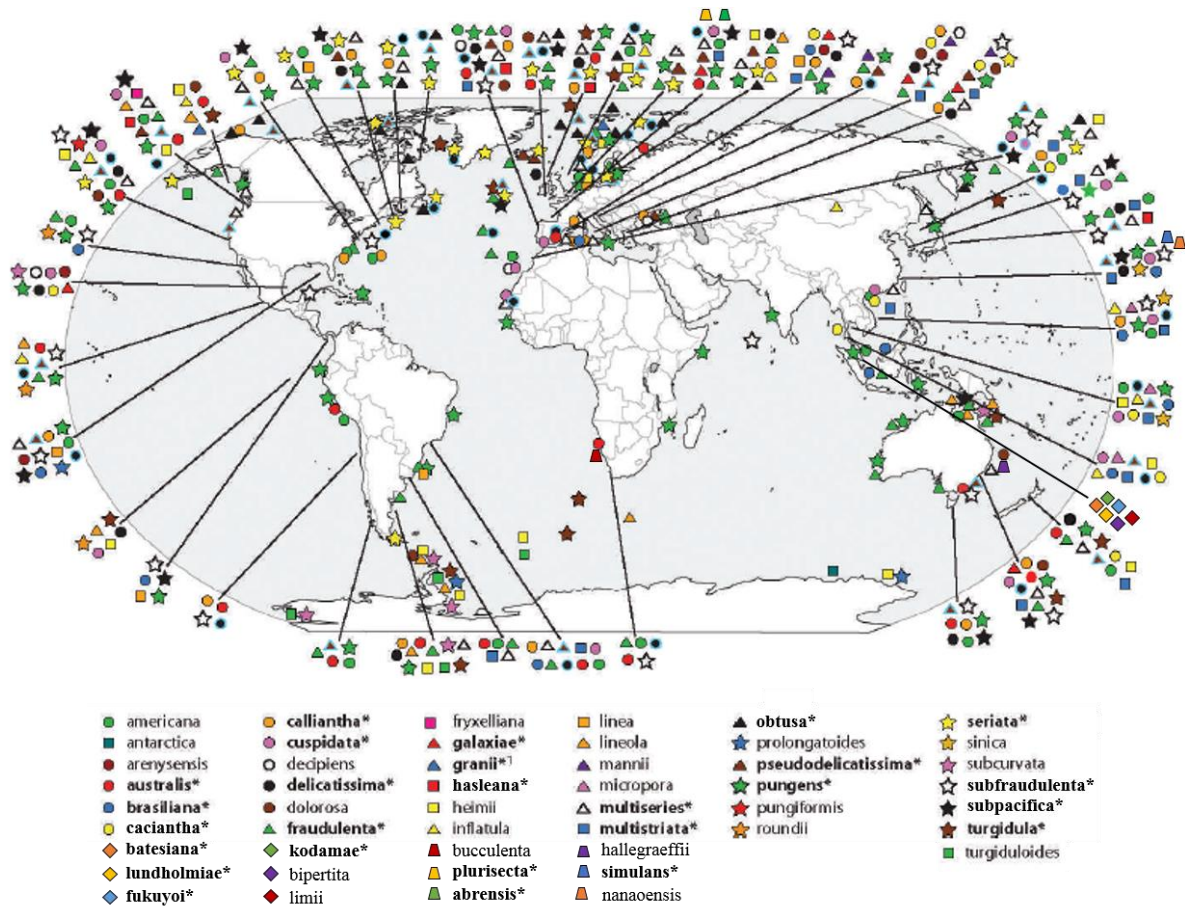


Figure 1.10. Distribution mondiale des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*. Les espèces en gras accompagnées d'une étoile (*) sont les espèces identifiées comme toxiques (Lundholm 2018). Figure originale obtenue dans Lelong et al. (2012) modifiée d'après Lim et al. (2013), Orive et al. (2013), Teng et al. (2014, 2016), Li et al. (2017, 2018), Ajani et al. (2018), Frøsig Gai et al. (2018).

De fortes abondances en *Pseudo-nitzschia* spp. ont été observées sur la côte ouest des Etats-Unis d'Amérique et dans le détroit de Juan de Fuca entre les Etats-Unis et le Canada (côte ouest), ces deux zones géographiques étant connues pour être des « hot-spots » de *Pseudo-nitzschia*. Des efflorescences de ces espèces ont également été recensées sur les côtes canadiennes (sud du golfe du Saint-Laurent, Baie de Fundy, Colombie britannique), les côtes d'Amérique centrale (mexicaine) et d'Amérique du Sud (Argentine, Pérou, Chili, Uruguay, Brésil), les côtes australiennes et néo-zélandaises, asiatiques (Viêt-Nam, Japon, Corée, Chine, Russie), africaines (Afrique du Sud, Namibie, Tunisie, Algérie, Maroc) et sur les côtes européennes (Royaume-Uni, Irlande, France, Danemark, Portugal, Espagne, Ecosse) (Trainer et al. 2012 et références incluses, Lassus et al. 2016). Dans certaines de ces zones géographiques, les efflorescences de *Pseudo-nitzschia* engendrent des événements toxiques de type ASP « Amnesic Shellfish Poisoning », lorsque l'acide domoïque est transféré dans les réseaux trophiques. Outre le premier événement ASP lié à *P. multiseries* sur l'île du Prince

Edouard, des évènements ASP ont aussi eu lieu dans différentes régions du monde (Fig. 1.11), par exemple sur la côte est du Canada en lien avec *P. pungens* f. *multiseries* (Bates et al. 1989), ainsi que sur les côtes françaises (dont la Baie de Seine, Nezan et al. 2006, Husson et al. 2016, Thorel et al. 2017) et sur les côtes Californiennes (Ryan et al. 2017, Bowers et al. 2018) dans les deux cas en lien avec *P. australis*. Durant les évènements toxiques ASP, les mollusques bivalves sont les principaux vecteurs de contamination des réseaux trophiques marins et de l'homme (Lelong et al. 2012, Trainer et al. 2012). L'encadré n°4 décrit le transfert de l'acide domoïque dans les réseaux trophiques marins.

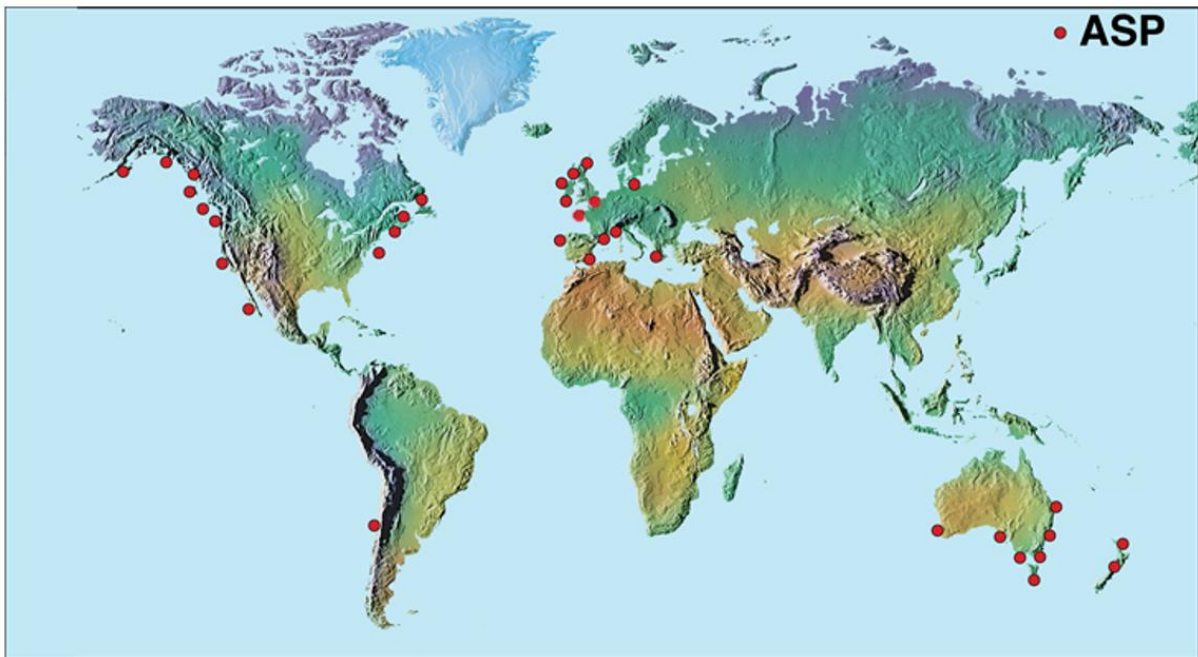


Figure 1.11. Distribution mondiale connue des événements toxiques ASP en juillet 2016. Figure modifiée dont l'original provient du site internet US National Office for Harmful Algal Blooms, Woods Hole Oceanographic Institution.

[Encadré n°4]**L'acide domoïque et son transfert dans les réseaux trophiques marins**

L'acide domoïque est intégré dans les réseaux trophiques marins par l'ingestion de *Pseudo-nitzschia* toxiques par les consommateurs primaires (zooplanctons, larves, mollusques filtreurs et certains poissons planctonophages) qui vont transférer cette toxique jusqu'aux consommateurs supérieurs dont les oiseaux, les mammifères marins et l'homme (Scholin et al. 2000, Lincoln et al. 2001, Bargu et al. 2002, Bates et Trainer 2006) (Fig. 1.12). Outre l'impact sur les oiseaux, les mammifères marins et l'homme, les efflorescences de *Pseudo-nitzschia* et les événements ASP liés vont avoir des répercussions importantes sur les filières conchylicoles et la pêche en provoquant la fermeture de secteurs de pêche à la coquille Saint-Jacques par exemple mais également en interdisant le ramassage et la vente de mollusques bivalves (Lelong et al. 2012). Ces efflorescences toxiques peuvent également impacter la biodiversité. Par exemple, en Californie, les efflorescences toxiques et les événements ASP liés peuvent entraîner la mortalité des lions de mer (Scholin et al. 2000). Mais, les efflorescences faiblement toxiques n'entraînant pas nécessairement d'événements ASP, exposent régulièrement ces mammifères marins à de faibles concentrations en acide domoïque et peuvent causer leur mort par exposition chronique (Akmajian et al. 2017).

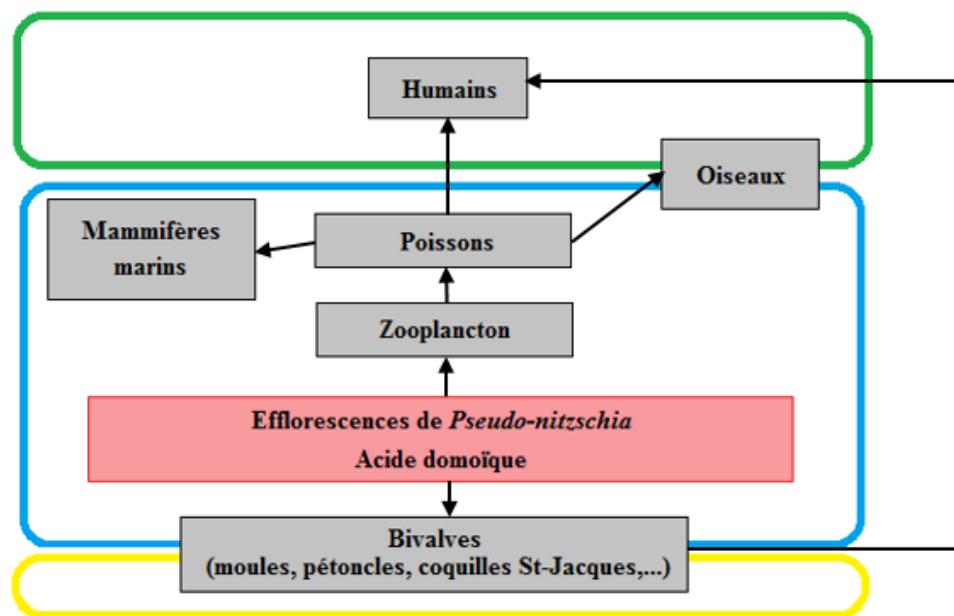


Figure 1.12. Réseau trophique marin simplifié représentant le transfert de l'acide domoïque depuis *Pseudo-nitzschia* vers les consommateurs primaires et secondaires.

2.2.2. Phénologie et contrôle environnemental des efflorescences des espèces de *Pseudo-nitzschia*

Le développement des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* spp., comme toutes les efflorescences phytoplanctoniques, est contrôlé par différents facteurs environnementaux, parmi lesquels la température, l'intensité lumineuse mais aussi la disponibilité en éléments nutritifs. Beaucoup d'études ont en particulier relié le déroulement et l'amplitude des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* à ce dernier facteur. De nombreuses efflorescences de *Pseudo-nitzschia* spp. sont en effet observées dans des zones d'upwelling ou dans des eaux côtières influencées par les apports d'eau douce (Lelong et al. 2012, Bargu et al. 2016, Ryan et al. 2017). Des études réalisées dans le golfe du Mexique et en Grèce ont montré que l'augmentation de l'abondance des différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* lors des efflorescences était potentiellement liée avec une augmentation des concentrations en nitrates liées à l'eutrophisation (Parsons et Dortch 2002, Spatharis et al. 2007). De plus, Marchetti et al. (2004) ont suggéré que les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* seraient particulièrement compétitives face aux autres diatomées dans les milieux pauvres en silicium. Cependant, la situation est plus complexe car il existe de nombreuses espèces de *Pseudo-nitzschia* et, dans de nombreuses régions, les efflorescences de *Pseudo-nitzschia* sont multi-spécifiques. Des successions saisonnières de plusieurs espèces sont ainsi souvent observées au cours d'une année (Schnetzer et al. 2007, 2013, Sahraoui et al. 2012, Shuler et al. 2012, Parsons et al. 2013, Bargu et al. 2016, Ryan et al. 2017, Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018, Delegrange et al. 2018). Les espèces de *Pseudo-nitzschia* présentent donc des phénologies d'efflorescences différentes. Par exemple, en Ecosse, les espèces appartenant au complexe *Pseudo-nitzschia delicatissima* sont majoritairement présentes lors de l'efflorescence printanière tandis que les espèces appartenant au complexe *Pseudo-nitzschia seriata* sont majoritairement présentes lors de l'efflorescence estivale. Fehling et al. (2006) ont observé que les développements de ces deux complexes étaient liés à des variations de photopériode, de température et de salinité. Des successions saisonnières de *Pseudo-nitzschia* spp. ont également été observées dans la partie occidentale de la Manche, au large de Plymouth. Dans cette zone, les espèces appartenant au complexe *Pseudo-nitzschia delicatissima* ont été observées toute l'année tandis que les espèces *P. pungens* et *P. multiseries* étaient présentes seulement au printemps/été puis étaient suivies vers la fin de l'été et à l'automne par une efflorescence d'espèces appartenant au complexe *P. seriata* (Downes-Tettmar et al. 2013). Ces successions semblaient liées à une influence de la température et de la disponibilité en éléments nutritifs spécifique à chaque complexe. De même,

lors d'une étude sur les côtes françaises au sud de la mer du Nord, les espèces appartenant au complexe *P. delicatissima* étaient majoritairement présentes au printemps tandis que les espèces appartenant au complexe *P. seriata* étaient observées principalement durant l'été et l'automne. Cette saisonnalité serait liée à la température et à la disponibilité en azote et en silicates (Delegrange et al. 2018). Les études qui se sont penchées plus finement sur la diversité spécifique des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* rapportent aussi une influence importante des concentrations et ratios en éléments nutritifs. Ainsi, l'augmentation des concentrations en azote et une augmentation de la température ont entraîné des changements de la composition spécifique lors des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* sur 100 ans dans un fjord danois, avec un passage d'efflorescences dominées par *P. multiseriata* à des efflorescences dominées par *P. pungens* (Lundholm et al. 2010). Dans une autre étude réalisée en Tunisie, l'abondance des espèces appartenant au complexe *P. delicatissima* est négativement associée aux concentrations en nitrates et en silicates, les efflorescences de *P. multiseriata* sont, elles, associées aux faibles salinités et concentrations en nitrates tandis que celles de *P. brasiliensis* sont associées aux plus fortes salinités et concentrations en nitrates et en silicates et aux faibles concentrations en nitrites et en phosphates (Sahraoui et al. 2012). En Argentine, les plus fortes densités de *P. pungens* et de *P. australis* ont été détectées lorsque les concentrations en éléments nutritifs sont faibles avec des températures et une salinité plus élevées, alors que les autres espèces (*P. heimii*, *P. lineola*, *P. turgidula* et *P. turgiduloides*) se développent plutôt à des températures et salinités plus faibles lorsque les éléments nutritifs sont abondants (Almandoz et al. 2007, 2008). Sur les côtes de Californie (USA) et les côtes de la péninsule de Baja California (Mexique), le développement de *P. australis* semble être favorisé par rapport à d'autres espèces de *Pseudo-nitzschia* par l'augmentation des concentrations en éléments nutritifs, en particulier les silicates (García-Mendoza et al. 2009, Bowers et al. 2018).

En Baie de Seine, des études ont permis de mieux connaître la phénologie des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* spp. avec la présence, tous les ans, de *P. pungens* et de *P. fraudulenta* tandis que *P. australis* et *P. delicatissima* ne semblent se développer que certaines années (Klein et al. 2010, Thorel et al. 2017). De plus, ces espèces présentent des dynamiques saisonnières différentes puisque *P. pungens* est observable toute l'année tandis que *P. fraudulenta* se développe principalement lors de l'efflorescence printanière. Les années où elles sont présentes en Baie de Seine, *P. australis* et *P. delicatissima* ne se développent qu'au printemps, au début de l'été et/ou à l'automne. Dans cet écosystème aussi, la disponibilité en nitrates influencerait le développement des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* spp. De plus, des relations ont aussi

été mises en évidence entre les ratios en éléments nutritifs et les différents complexes de *Pseudo-nitzschia* se développant (Thorel et al. 2017).

L'ensemble de ces résultats montre que les conditions nutritives, en plus de la lumière et de la température, jouent un rôle important dans le développement des efflorescences de *Pseudo-nitzschia*. D'après les études *in situ* sur des populations naturelles, il semble que les concentrations et les ratios en éléments nutritifs n'influencent pas de la même façon les différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* et pourraient ainsi jouer un rôle clé sur la structuration des communautés de *Pseudo-nitzschia*. Ainsi, afin de mieux comprendre le développement des efflorescences de *Pseudo-nitzschia*, il est nécessaire de connaître les réponses physiologiques des différentes espèces selon la disponibilité en éléments nutritifs. Cela est d'autant plus vrai que toutes les espèces de *Pseudo-nitzschia* ne présentent pas le même « potentiel toxique » puisque les concentrations cellulaires en acide domoïque sont plus importantes chez certaines espèces (Lelong et al. 2012). La toxicité des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* spp. peut donc dépendre de la composition spécifique de celles-ci (Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018). Ainsi, la variabilité interannuelle des événements toxiques peut aussi être liée à des différences de diversité spécifique des *Pseudo-nitzschia* selon les années. Il apparaît donc important de connaître aussi l'influence des facteurs environnementaux sur la production de toxine des différentes espèces de *Pseudo-nitzschia*.

2.2.3. Influence des facteurs environnementaux sur la physiologie des espèces du genre *Pseudo-nitzschia*

Afin de mieux comprendre le déterminisme environnemental des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* et de leur toxicité, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de différents paramètres tels que température, lumière et éléments nutritifs sur la croissance et la production d'acide domoïque chez différentes espèces de *Pseudo-nitzschia*.

2.2.3.1. Température et intensité lumineuse

L'influence de la température sur la croissance des espèces de *Pseudo-nitzschia* est assez bien connue et est typique de l'influence de ce paramètre sur la physiologie des microalgues avec une gamme de température favorable à la croissance et une température optimale de croissance (El-Sabaawi et Harrison 2006, Claquin et al. 2008, Santiago-Morales et García-Mendoza 2011).

Des études réalisées en laboratoire sur différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* ont montré que les températures optimales de croissance varient en fonction des espèces avec 4°C pour *P. seriata* isolée en Arctique (Hansen et al. 2011), 14 - 15°C pour *P. granii* isolée dans le Nord-Est du Pacifique (El-Sabaawi et Harrison 2006) ainsi que pour *P. australis* provenant du golfe du Mexique (Santiago-Morales et García-Mendoza 2011) et entre 20°C et 25°C pour *P. multiseriis* isolée sur la côte ouest du Canada (Lewis et al. 1993). Des études réalisées en laboratoire sur deux espèces de *Pseudo-nitzschia* provenant de la Baie de Seine ont confirmé le caractère spécifique de la température optimale de croissance chez les *Pseudo-nitzschia* puisqu'elle est de 17°C pour *P. australis* et de 21°C pour *P. pungens*. De plus, ces études ont montré que la gamme de températures favorables à la croissance était plus étroite chez *P. australis* (5 - 21°C) par rapport à *P. pungens* (5 - 28°C) (Thorel 2014, Thorel et al. 2014). L'influence de la température sur la production d'acide domoïque varie également en fonction des espèces étudiées. En effet, en laboratoire, *P. multiseriis* et *P. australis* ont montré une diminution de la concentration cellulaire en acide domoïque avec la diminution des températures (Lewis et al. 1993, Santiago-Morales et García-Mendoza 2011). En revanche, pour *P. seriata*, le contenu cellulaire en acide domoïque est plus élevé à 4°C par rapport à 15°C (Lundholm et al. 1994). Ces différences d'optimum de température favorable à la production d'acide domoïque sont aussi attribuables aux adaptations des espèces à leur environnement d'origine (*e.g.* eaux froides pour les souches de *P. seriata* isolées dans les eaux du Danemark) (Bates 1998). Quant aux espèces de *Pseudo-nitzschia* présentes en Baie de Seine, le contenu cellulaire en acide domoïque pour *P. australis* augmente avec la température entre 5°C et 18°C (Thorel et al. 2014).

L'influence de l'intensité lumineuse sur la croissance est assez homogène chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* et ne présente pas de caractère spécifique puisque l'intensité lumineuse optimale de croissance se situe autour de 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour de nombreuses espèces (Lelong et al. 2012). En effet, l'intensité lumineuse optimale est de 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *P. australis* provenant d'Irlande (Cusack et al. 2002) ainsi que pour *P. multiseriis* (Bates et al. 1998) et est de 150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour *P. granii* isolée dans le Nord-Est du Pacifique (El-Sabaawi et Harrison 2006). En laboratoire, sur des souches de *P. australis* et *P. pungens* isolées en Baie de Seine, les résultats obtenus confirment cet optimum de 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Thorel 2014, Thorel et al. 2014). A noter que l'intensité lumineuse influence également la toxicité cellulaire des différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* avec une

augmentation du contenu cellulaire en acide domoïque avec l'augmentation des intensités lumineuses (Bates et al. 1998, Cusack et al. 2002, Thorel et al. 2014).

L'influence de la température et de l'intensité lumineuse sur la croissance et la toxicité des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* est donc assez bien connue, y compris chez les espèces se développant en Baie de Seine.

2.2.3.2. Capacités d'absorption des éléments nutritifs chez *Pseudo-nitzschia* spp.

La disponibilité en éléments nutritifs joue un rôle important dans le développement des espèces phytoplanctoniques et la compétition interspécifique (Grover 1991, Yamamoto et Hatta 2004, Foullaron et al. 2007). Dans les milieux aquatiques, la production primaire est limitée par l'azote, le fer ou dans certains cas par le phosphore (Geider et al. 2001) et pour les diatomées, par le silicium (Martin-Jézéquel et al. 2000). De nombreuses études ont montré le rôle de l'azote et du phosphore dans le développement et la compétition spécifique des espèces phytoplanctoniques (Gotham et Rhee, 1981, Grover, 1989, Klausmeier et al. 2004). De plus, Eppley et al. (1969) et Nelson et Brzezinski (1990) ont suggéré que les différences interspécifiques des paramètres d'absorption des éléments nutritifs peuvent expliquer les possibles mécanismes de successions saisonnières, de dominance et de co-existence des espèces phytoplanctoniques. Etant donné l'ensemble des études qui suggèrent un lien entre les concentrations ou ratios en éléments nutritifs et le développement des efflorescences de *Pseudo-nitzschia*, mais aussi les changements de composition spécifique et les successions spécifiques dans les communautés de *Pseudo-nitzschia*, il semble important de mieux connaître les paramètres de cinétiques d'absorption des principaux éléments nutritifs (N, P et Si) pour chacune des espèces de *Pseudo-nitzschia*.

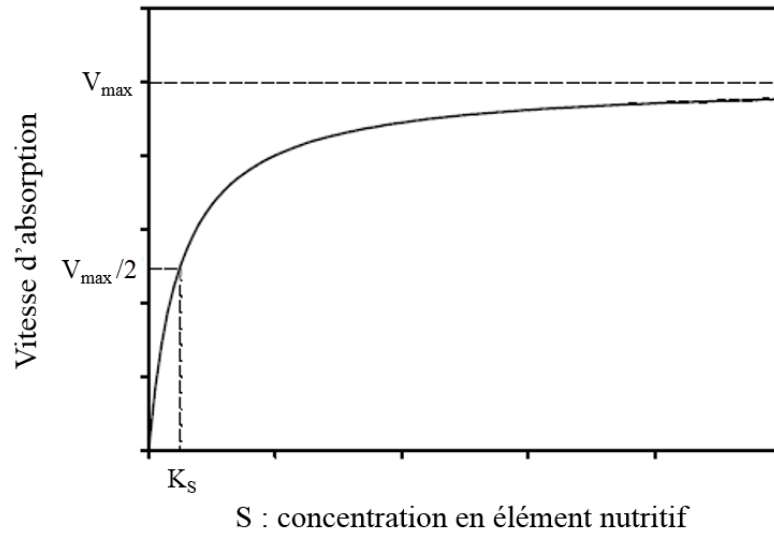
Cinétiques d'absorption des éléments nutritifs : la théorie

Figure 1.13. Illustration de l'équation du modèle de Michaelis-Menten.

La relation entre l'absorption et la disponibilité en un élément nutritif (Fig. 1.13) peut être représentée par une hyperbole de Michaelis-Menten (1913) décrivant la relation entre l'activité d'une enzyme et son substrat (MacIsaac et Dugdale 1969, Caperon et Meyer 1972) (équation 1.1) :

$$V = \frac{V_{\max} * S}{K_s + S} \quad (1.1)$$

Où V est le taux d'absorption spécifique de l'élément nutritif étudié (h^{-1}), $V_{\max}$ est le taux d'absorption spécifique à saturation (h^{-1}), S est la concentration de l'élément nutritif étudié dans le milieu de culture ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) et K_s est la constante de demi-saturation pour l'absorption (concentration de l'élément nutritif pour laquelle $V = \frac{1}{2} V_{\max}$) ($\mu\text{mol.l}^{-1}$).

Les variations du K_S reflètent l'adaptation des espèces à leur environnement :

- Les plus forts K_S indiquent une faible affinité pour un élément nutritif c'est-à-dire que les espèces présentant les plus forts K_S vont se développer préférentiellement dans des eaux riches en cet élément,
- Les espèces présentant de faibles K_S seront adaptées à des milieux avec de faibles concentrations en cet élément.

Toutefois, Healey (1980) et Aksnes et Egge (1991) ont souligné que la constante de demi-saturation (K_S) était insuffisante en tant qu'indice d'affinité ou d'efficacité d'absorption. Ainsi, le coefficient d'affinité - α - correspondant à la pente de la courbe de Michaelis-Menten a été proposé comme indicateur plus fiable de l'affinité du substrat (Healey 1980).

Ce coefficient d'affinité correspond au ratio entre $V_{\max}$ (vitesse maximale d'absorption) et K_S (constante d'affinité) et se définit grâce à l'équation suivante (équation 1.2) :

$$\alpha = \frac{V_{\max}}{K_S} \quad (1.2)$$

$V_{\max}$: Vitesse d'incorporation d'un élément lorsque la concentration de celui-ci ou d'un autre élément est saturante. Plus $V_{\max}$ est élevée, plus l'incorporation de l'élément est rapide.

K_S : Constante de demi-saturation correspondant à la concentration en un élément nutritif pour laquelle $V = \frac{1}{2} V_{\max}$. Cette valeur est un indicateur de l'affinité pour un élément (plus le K_S est faible, plus l'affinité est forte).

α : Coefficient d'affinité correspondant au rapport $V_{\max}/K_S$. Ce rapport est proportionnel à la pente initiale de la courbe d'absorption d'un élément et permet de déterminer l'efficacité d'absorption d'une espèce pour des concentrations sous-saturantes d'un élément.

Ce modèle est appelé Modèle de Monod ou modèle à un compartiment. C'est une description simple de la réalité car il suppose que l'absorption de l'élément nutritif et la croissance sont simultanées. La croissance dépend donc de la concentration extracellulaire en élément nutritif, comme le taux d'absorption. Les limites du modèle de Monod viennent du fait qu'il ne prend pas en compte les réserves intracellulaires qui peuvent être utilisées pour maintenir la division

cellulaire et donc la croissance lorsque l'élément considéré est épuisé dans le milieu. Le modèle de Droop ou modèle à deux compartiment considère ainsi une variable supplémentaire, le quota cellulaire de l'élément limitant, c'est-à-dire sa concentration intracellulaire par unité de biomasse. Ainsi, dans le modèle de Droop, le taux de croissance dépend du quota cellulaire en élément nutritif. On définit ainsi le quota minimum (Q_0) comme la concentration intracellulaire en dessous de laquelle la cellule ne peut plus se diviser.

La relation de Droop (1973) permet de lier les paramètres de l'absorption aux paramètres de la croissance par l'intermédiaire du quota cellulaire minimum Q_0 (équation 1.3) :

$$E = \alpha * \frac{1}{Q_0} \quad (1.3)$$

Où E est l'efficacité de croissance et Q_0 est le quota cellulaire minimum.

Cinétiques d'absorption des éléments nutritifs chez *Pseudo-nitzschia* spp.

Dans la littérature, il existe très peu d'études concernant les capacités d'absorption des éléments nutritifs chez les espèces de *Pseudo-nitzschia*. Les quelques études réalisées portent sur l'absorption de l'azote chez trois espèces isolées en Baie de Californie : *P. australis* (Cochlan et al. 2008), *P. delicatissima* (Loureiro et al. 2009), et *P. fryxelliana* (Auro et Cochlan 2013). Les résultats obtenus ont montré une nette préférence pour l'absorption des nitrates en comparaison à l'absorption de l'ammonium, de l'urée et de la glutamine pour *P. australis* (Cochlan et al. 2008) tandis que l'absorption de l'ammonium sera privilégiée par rapport à l'absorption des nitrates et de l'urée chez *P. delicatissima* et *P. fryxelliana* (Loureiro et al. 2009, Auro et Cochlan 2013). Ces résultats confirment donc l'existence d'une variabilité interspécifique dans l'absorption des formes azotées.

En Baie de Seine, seule une étude préliminaire a été réalisée sur les capacités d'absorption des nitrates et des silicates chez trois espèces de *Pseudo-nitzschia* : *P. australis*, *P. delicatissima* et *P. pungens* (Thorel 2014). Les résultats obtenus semblent indiquer que ces trois espèces auraient des affinités différentes pour les éléments nutritifs. En effet, *P. pungens* présente une forte affinité pour les nitrates et les silicates mais des vitesses maximales d'absorption faibles suggérant que cette espèce serait adaptée aux faibles concentrations en silicates et en nitrates.

En revanche, *P. australis* et *P. delicatissima* apparaissent être des espèces plus nitrophiles c'est-à-dire plus efficaces dans un milieu riche en nitrates. Enfin, ces deux espèces diffèrent dans leur efficacité d'absorption des silicates puisque *P. delicatissima* semble être plus compétitive pour les silicates lorsqu'ils sont limitants dans le milieu par rapport à *P. australis* (Thorel 2014). Cependant, ces résultats préliminaires n'ont été obtenus que sur une seule souche par espèce, ce qui fragilise les conclusions sur les différences interspécifiques. De plus, à notre connaissance, il n'existe pas de données sur les capacités d'absorption des phosphates et des silicates chez les espèces de *Pseudo-nitzschia*. Ainsi, il est nécessaire de réaliser des études portant sur les capacités d'absorption des nitrates, phosphates et silicates chez différentes espèces de *Pseudo-nitzschia*.

2.2.3.3. Les éléments nutritifs et la production d'acide domoïque

De nombreuses études réalisées chez différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* montrent que les conditions nutritives conduisant à une augmentation du contenu cellulaire en acide domoïque sont une limitation en silicium ou en phosphore (Bates 1998). Cette augmentation du contenu cellulaire en acide domoïque est souvent maximale en phase stationnaire de croissance lors de l'arrêt des divisions cellulaires (Pan et al. 1998). Par contre, une limitation en azote inhibe la production d'acide domoïque probablement car l'azote est nécessaire à la synthèse de cet acide aminé (Lelong et al. 2012).

Le silicium est un élément nutritif nécessaire à la division cellulaire. Une limitation en silicium induit ainsi un ralentissement et/ou un arrêt des divisions cellulaires (Martin-Jézéquel et al. 2000). Une augmentation du contenu cellulaire en acide domoïque lors d'une limitation en silicium a été montrée dans de nombreuses études réalisées chez plusieurs espèces de *Pseudo-nitzschia* : *P. multiseriata* (Pan et al. 1996a, 1996b, Bates et al. 1998, Kudela et al. 2003), *P. seriata* (Fehling et al. 2004) et *P. australis* (Kudela et al. 2003).

Le phosphore est également un élément nutritif essentiel pour la croissance cellulaire puisqu'il entre dans la composition des membranes cellulaires mais aussi des composés organiques indispensables au métabolisme cellulaire (ATP, ADN, ARN). Le phosphore joue aussi un rôle dans la régulation des activités de nombreuses protéines et processus métaboliques (Lin et al. 2015). De précédentes études chez *P. multiseriata* et *P. seriata* ont montré une diminution de la croissance cellulaire et une augmentation des concentrations cellulaires en acide domoïque lors

d'une limitation en phosphore (Pan et al. 1996c, Fehling et al. 2004, Hagstrom et al. 2010, Lema et al. 2017).

Ainsi, différentes études ont déjà montré l'influence des limitations en éléments nutritifs tels que l'azote, le silicium et le phosphore, sur la production d'acide domoïque. Les résultats des expériences en laboratoire montrent que, chez de nombreuses espèces de *Pseudo-nitzschia*, la production d'acide domoïque a lieu en phase exponentielle de croissance lors d'une limitation en silicium et en phosphore (Pan et al. 1996a, 1996c, Kudela et al. 2003, Fehling et al. 2004). Chez *P. australis*, les résultats de Thorel et al. (2014) suggèrent toutefois que la production d'acide domoïque n'a pas lieu uniquement en conditions de limitations en éléments nutritifs, mais que cette toxine peut aussi être produite en phase de croissance exponentielle sans aucune limitation. Ces résultats suggèrent que *P. australis* présenterait un profil de production d'acide domoïque atypique. Il semble donc important d'étudier la dynamique de la production d'acide domoïque en fonction des phases de croissance chez *P. australis*.

2.2.4. Diversité intraspécifique chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* et influence du cycle de vie sur leur écophysiologie

La synthèse des études réalisées sur différentes espèces semblent souligner une variabilité interspécifique et intraspécifique dans les réponses physiologiques au sein du genre *Pseudo-nitzschia*. La plupart des études physiologiques basées sur *P. multiseriata*, *P. australis* et *P. seriata* suggèrent une variabilité interspécifique (Bates et al. 1991, 1998, Garrison et al. 1992, Pan et al. 1998, 2001, Cusack et al. 2002, Fehling et al. 2004, Besiktepe et al. 2008, Thessen et al. 2009, Amato et al. 2010, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Martin-Jézéquel et al. 2015). Certaines études suggèrent également une certaine variabilité intraspécifique chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* pouvant être liées à l'origine des souches (écotypes) mais aussi à une diversité génétique dans les populations naturelles (Lelong et al. 2012). Par exemple, Thessen et al. (2009) ont observé des différences importantes de croissance et de toxicité entre différentes souches de *P. multiseriata*, *P. calliantha* et *P. fraudulenta* de différentes origines géographiques. Thorel (2014) a aussi montré, en laboratoire, de fortes variations de toxicité entre différentes souches de *P. australis*, *P. pungens*, *P. fraudulenta* et *P. delicatissima* provenant toutes de la Baie de Seine.

Différents résultats suggèrent que cette variabilité intraspécifique pourrait aussi être liée à la diminution de la taille cellulaire en lien avec le cycle de vie des espèces du genre *Pseudo-nitzschia*. Ces changements de taille pourraient ainsi influencer la physiologie des espèces de *Pseudo-nitzschia*. Amato et al. (2005) rapportent par exemple une diminution du taux de croissance maximal en culture chez *P. delicatissima* associée à une diminution de la taille moyenne des cellules. Certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'une réduction de taille au cours de la phase de multiplication végétative pourrait être associée à une baisse de la toxicité cellulaire chez *P. multiseriata* et *P. australis* (Lelong et al. 2012). De plus, quelques études rapportent que les grandes cellules végétatives issues de la reproduction sexuée pourraient être plus toxiques que leurs cellules « parentes » de plus petites tailles (Amato et al. 2005, Lundholm et al. 2012). Ces différentes études suggèrent donc que le cycle de vie des espèces de *Pseudo-nitzschia* pourrait avoir une influence sur leur physiologie et, en particulier, sur leur toxicité. Ainsi, lorsque l'on veut caractériser la physiologie des espèces du genre *Pseudo-nitzschia*, il semble important de prendre en compte la variabilité intraspécifique et l'influence des changements de taille cellulaire liés au cycle de vie.

3. Problématique et objectifs

En Baie de Seine, des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* ont lieu tous les ans (Husson et al. 2016). Cependant, les concentrations en acide domoïque dans le phytoplancton ne sont élevées que certaines années lors desquelles des événements ASP avec fermeture de zones de pêche à la coquille Saint-Jacques ont lieu (Klein et al. 2010, Husson et al. 2016, Thorel et al. 2017). Thorel et al. (2017) ont montré que la variabilité interannuelle des efflorescences toxiques de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine était liée aux variations de la diversité spécifique selon les années. Dans cet écosystème, sept espèces de *Pseudo-nitzschia* ont été identifiées (Nezan et al. 2006, Thorel et al. 2017). Parmi ces espèces, certaines se développent tous les ans (par exemple, *P. pungens*, *P. fraudulenta*), mais d'autres ne sont observées que certaines années (par exemple, *P. australis*, *P. delicatissima*). Klein et al. (2010) et Thorel et al. (2017) ont aussi observé des dynamiques saisonnières différentes selon les espèces : *P. pungens* est présente presque toute l'année alors que *P. australis* et *P. delicatissima* ne se développent qu'au printemps et/ou à l'automne. Or, les événements ASP en Baie de Seine n'ont lieu que lors des efflorescences de *P. australis*. Il est donc primordial de comprendre les facteurs contrôlant la diversité spécifique des *Pseudo-nitzschia* lors des efflorescences dans cet écosystème. D'après leurs observations

des dynamiques des efflorescences des espèces de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine, Thorel et al. (2017) ont suggéré que les concentrations et les ratios en éléments nutritifs pourraient jouer un rôle prépondérant dans la sélection des différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* dans cet écosystème. Ils ont émis l'hypothèse que des différences de capacité d'absorption des éléments nutritifs entre espèces de *Pseudo-nitzschia* pourraient en partie expliquer les différences de phénologie de leurs efflorescences. De plus, la variabilité interannuelle des événements ASP en Baie de Seine vient aussi du fait que toutes les espèces de *Pseudo-nitzschia* ne présentent pas le même « potentiel toxique » puisque les concentrations cellulaires en acide domoïque sont plus importantes chez certaines espèces (Lelong et al. 2012). En Baie de Seine, le gradient suivant de concentration cellulaire en acide domoïque a en effet été mesuré par Thorel (2014) : *P. australis* > *P. pungens* > *P. fraudulenta* > *P. delicatissima*, faisant de *P. australis* l'espèce la plus toxique. Cependant, Thorel (2014) a aussi observé une importante variabilité intraspécifique du contenu en acide domoïque chez ces quatre espèces. Enfin, comme indiqué précédemment, Thorel et al. (2014) ont observé qu'une souche de *P. australis* isolée de la Baie de Seine produisait de l'acide domoïque en phase exponentielle de croissance sans limitation en sels nutritifs, contrairement à la plupart des travaux sur la production d'acide domoïque chez d'autres espèces de *Pseudo-nitzschia*.

Afin de mieux comprendre l'influence des facteurs environnementaux, et en particulier des éléments nutritifs, sur le développement des efflorescences des espèces de *Pseudo-nitzschia* et sur leur toxicité, une meilleure connaissance de la physiologie de chaque espèce est nécessaire. Or, la caractérisation de la diversité interspécifique nécessite aussi de connaître la diversité intraspécifique qui est actuellement très peu étudiée.

L'objectif de cette thèse était donc d'étudier la diversité écophysiological au sein du genre *Pseudo-nitzschia* en caractérisant différents traits physiologiques et en évaluant l'influence de la variabilité intraspécifique sur ces traits chez des espèces caractéristiques des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine.

Les traits physiologiques étudiés étaient la croissance, la toxicité (les concentrations intra- et extracellulaire en acide domoïque, mais aussi le taux de production d'acide domoïque), différents indices physiologiques (quotas élémentaires, contenu cellulaire en Chl *a*, paramètres photosynthétiques), ainsi que les paramètres de cinétiques d'absorption du nitrate, du silicate et du phosphate.

La variabilité intraspécifique a été caractérisée par une approche « multi-souches », c'est-à-dire en étudiant plusieurs souches différentes de chaque espèce lors de chaque expérience. De plus, la caractérisation de la variabilité intraspécifique a été complétée en estimant l'influence des variations de taille cellulaire liées au cycle de vie sur les traits physiologiques étudiés (en particulier la croissance, la toxicité et les capacités d'absorption des éléments nutritifs).

Les quatre espèces de *Pseudo-nitzschia* étudiées ont été choisies car elles sont caractéristiques des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine et car elles présentent des phénologies d'efflorescences et des toxicités cellulaires contrastées (Klein et al. 2010, Thorel 2014). *P. australis* est l'espèce responsable des événements ASP en Baie de Seine, c'est la plus toxique et elle ne se développe que certaines années. *P. pungens* est une espèce observée presque toute l'année en Baie de Seine et qui présente des toxicités cellulaires non négligeables mais moins importantes que *P. australis*. *P. fraudulenta* est une espèce peu toxique présente tous les ans en Baie de Seine. Enfin, *P. delicatissima* est une espèce très peu toxique mais qui peut former d'importantes efflorescences dans cet écosystème.

Les travaux de cette thèse sont ainsi développés sous forme de trois chapitres :

- Le deuxième chapitre étudie l'influence du cycle de vie sur la croissance et la toxicité de trois espèces de *Pseudo-nitzschia* présentes en Baie de Seine : *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens* en prenant en compte la variabilité intraspécifique.
- Le troisième chapitre caractérise les conditions physiologiques associées à la production d'acide domoïque chez ces trois mêmes espèces en fonction des phases de croissance en culture en milieu fermé.
- Le quatrième chapitre étudie les cinétiques d'absorption du nitrate, du silicate et du phosphate chez *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*.

Enfin, ces trois chapitres sont suivis d'une discussion générale présentant la synthèse des principaux résultats ainsi que les perspectives.

*Differential influence of life cycle
on growth and toxin production
of three Pseudo-nitzschia species
(Bacillariophyceae)*

De nombreux résultats de la littérature ainsi que les résultats obtenus plus spécifiquement en Baie de Seine démontrent l'existence d'une grande variabilité interspécifique des réponses physiologiques au sein du genre *Pseudo-nitzschia*. Certaines études suggèrent qu'il existe aussi une variabilité intraspécifique chez ces espèces, y compris en ce qui concerne la toxicité. La variabilité entre souches d'une même espèce peut être en partie liée à l'origine de ces souches (différences écophysiologiques observées parmi différents écotypes d'une même espèce), mais aussi liée à une certaine variabilité génétique au sein d'une même population. Différents résultats suggèrent également que cette variabilité intraspécifique pourrait être liée à la diminution de la taille cellulaire en lien avec le cycle de vie caractéristique des diatomées. Enfin, chez les espèces du genre *Pseudo-nitzschia*, il est suspecté que la durée du maintien des souches en culture après leur isolement des populations naturelles affecte leur capacité à produire de l'acide domoïque.

Dans ce contexte, les expériences présentées dans le **chapitre 2** ont été menées en culture en milieu fermé afin d'étudier l'influence de la taille cellulaire et de l'âge des cultures sur la croissance et la toxicité de *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*. *P. delicatissima* n'a pas été étudiée lors de ces expériences du fait de sa très faible toxicité. Grâce à une approche multi-souches, ce travail a permis de mieux caractériser la variabilité intraspécifique chez trois espèces de *Pseudo-nitzschia* présentes en Baie de Seine.

Sauvey A., Claquin P., Le Roy B., Le Gac M., Fauchot J.

**Differential influence of life cycle on growth and toxin production
of three *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae)**

Article soumis à « Journal of Phycology »

1. Introduction

Diatoms are one of the most common eukaryotic phytoplankton groups in aquatic environments, with approximately 100,000 different species recorded (Not et al. 2012, Mann and Vanormelingen 2013). This ecological success is thought to be related, among others, to their unique life cycle that because the timing of sexuality is controlled. This life cycle is strongly related to variations in cell size, and characterized by two phases: long periods of vegetative multiplication, and short sexual events. During the vegetative phase, cell size decreases over the generations until reaching a minimum non-viable size. This decrease in size is one of the consequences of the presence of the silicified rigid cell wall called a frustule, which is typical of diatoms. While size decreases, vegetative diatom cells are only capable of sexual reproduction within a specific size range corresponding to the gametangia stage. Sexual reproduction then leads production of gametes through meiosis followed by fusion to produce a zygote; then the zygote enlarges to produce a specialized structure called an auxospore allowing for the regeneration of an initial cell of maximum size (Mann 1999, Chepurnov et al. 2004, Kaczmarek et al. 2013). The control of sexual reproduction by cell size affects the frequency, the timing, and the importance of sexual reproduction events (D'Alelio et al. 2010, Hense and Beckmann 2015). These in turn probably affect bloom dynamics in natural populations. The link between cell size and life cycle is thus an important characteristic to be explored in diatoms. Furthermore, as far as cell metabolism is concerned, according to allometric laws small cells are generally considered more competent physiologically than larger cells (*e.g.* thanks to better growth or nutrient acquisition; Edwards et al. 2012, Marañón et al. 2013, Otero et al. 2018), even if some authors reported a decrease in growth rate for smaller cells linked to certain life cycle stages (Chisholm and Costello 1980, Von Dassow et al. 2006). However, the influence of cell size reduction on diatom physiology as related to the life cycle is still poorly documented.

The heterothallic pennate diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia* are cosmopolitan. Fifty-one species of *Pseudo-nitzschia* are currently described, out of which 26 are considered to be toxic, *i.e.* capable of producing domoic acid (DA), a neurotoxin that will accumulate in marine food webs and cause amnesic shellfish poisoning (ASP) events (Lelong et al. 2012 and references herein, Lim et al. 2013, Orive et al. 2013, Fernandes et al. 2014, Teng et al. 2014, 2016, Li et al. 2017, Ajani et al. 2018, Frøsig Gai et al. 2018). According to the literature on different

Pseudo-nitzschia species, important interspecific differences in DA cellular content exist (e.g. Pan et al. 1996a, 1996b, Fehling et al. 2004, Howard et al. 2007, Lelong et al. 2012, Thorel et al. 2014, Martin-Jézéquel et al. 2015, Radan and Cochlan 2018). However, a few authors studied several strains *per* species and also reported significant intraspecific diversity (e.g. Garrison et al. 1992, Villac et al. 1993, Álvarez et al. 2009). Intraspecific diversity in DA production was even higher than interspecific diversity in *P. multiseriata*, *P. calliantha*, and *P. fraudulenta* from USA coastal waters (Thessen et al. 2009). In contrast, interspecific differences in DA production were greater than intraspecific variability in three *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* strains from the French coastal waters (Lema et al. 2017). These authors also pointed out that the time spent in culture since isolation might influence *Pseudo-nitzschia* species physiology, including DA production, as previously reported by Lelong et al. (2012). In addition, previous studies concluded that cell size reduction induced a decrease in DA production in several *Pseudo-nitzschia* species (Bates et al. 1999, Mafra et al. 2009, Amato et al. 2010).

The objective of this study was therefore to investigate the inter- and intraspecific variability of growth and domoic acid production in three *Pseudo-nitzschia* species from the French coastal waters, namely *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*. We applied a multi-strain approach to grasp intraspecific variability, by studying at least nine strains *per* species. In addition, we made a special effort to explore the influence of the life cycle on the physiology of each species by studying strains of different cell sizes and the same strains at different sizes during the cell size reduction process. This also allowed us to investigate the influence of strain age on growth and toxin production. Improving knowledge of intraspecific variability in *Pseudo-nitzschia* species is required for an accurate characterization of the physiology of each species, and thus a better understanding of their harmful bloom dynamics.

2. Materials and methods

2.1. Strains

Some *Pseudo-nitzschia* spp. strains were isolated from natural populations: from the west coast of Brittany and in Arcachon Bay (Atlantic coast, France) for *P. australis*, and from the Bay of Seine (English Channel, France) for *P. pungens* and *P. fraudulenta*. Other strains were obtained by isolating initial cells produced during sexual reproduction experiments (Table 2.1).

Chapitre 2. Differential influence of life cycle on growth and toxin production

Table 2.1. Strains of *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* used for mating and batch culture experiments. (A) for strains isolated from the Atlantic and (EC) for strains isolated from the English Channel. The age of the strain (in months, calculated from the date of isolation) and the cell size are indicated for each experiment.

Species	Strain information			Age of strain (months)	Size (µm)
	Collection reference	Origin (Sampling zone or crossing)	Isolation date		
<i>P. australis</i>	IFR-PAU-010	Ouessant (A)	07/2015	5	50
	PNaus P1D2	Camaret-sur-Mer (A)	03/2014	21	44
	PNaus P3B2	Plouzané (A)	03/2014	21	49
	IFR-PAU-16.2	Arcachon Bay (A)	05/2016	9 - 12 - 14 - 16	69 - 63 - 60 - 57
	PNaus P6B3	Plouzané (A)	04/2014	20 - 26	42 - 35
	PNaus F1-1A	P6B3 x P2B1			83
	PNaus F1-4A	P6B3 x P6C1			73
	PNaus F1-5	P6B3 x P1A3			97 - 82 - 65 - 61 - 57
	PNaus F2-1B	F1-5 x F1-1A			127 - 106
<i>P. pungens</i>	PNpun 47	Cabourg (EC)	08/2011	59	48
	PNpun 66	Ouistreham (EC)	09/2011	51 - 58	41 - 47
	PNpun 79	Cabourg (EC)	05/2012	50	52
	PNpun 88	Cabourg (EC)	07/2012	48	47
	PNpun 89	Cabourg (EC)	07/2012	41 - 48	42 - 49
	PNpun 129	Luc-sur-mer (EC)	07/2016	2	75
	PNpun 130	Luc-sur-mer (EC)	07/2016	2	95
	PNpun 133	Luc-sur-mer (EC)	07/2016	3	109
	PNpun 134	Luc-sur-mer (EC)	07/2016	3	102
	PNpun 136	Saint-Vaast-la-Hougue (EC)	07/2016	3	85
	PNpun F1-7A	66 x 89			157 - 175
	PNpun F1-7B	66 x 89			153
	PNpun F1-11	66 x 47			153
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 1	Cabourg (EC)	08/2011	62	27
	PNfra 10	Cabourg (EC)	08/2011	51 - 59	45 - 39
	PNfra 30	Cabourg (EC)	10/2011	49 - 57	41 - 36
	PNfra 31	COMOR 41 (EC)	07/2011	64	31
	PNfra 126	Luc-sur-mer (EC)	11/2015	3	65
	PNfra 132	Luc-sur-mer (EC)	10/2015	3	68
	PNfra 162	Saint-Vaast-la-Hougue (EC)	05/2016	5	69
	PNfra F1-8D	30 x 31			107 - 87
	PNfra F1-9A	10 x 31			78
	PNfra F1-9B	10 x 31			113 - 92
	PNfra F1-14A	10 x 1			110
	PNfra F1-14B	10 x 1			113

Single cells or short chains were isolated using a micropipette, washed three times with filter-sterilized (0.2 μm) seawater, and incubated in 4-well culture plates in K/2-medium (Keller et al. 1987) enriched in Si (54 μM) at a temperature of 16°C, an irradiance of 30 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and a 14h:10h L:D light cycle. When the clonal culture was established, it was maintained in 15 ml ventilated flasks in K/2-medium + Si in the same conditions. Cultures were not axenic, but they were periodically checked for bacterial development by optical microscopy observations, and hardly any bacteria were detected. *Pseudo-nitzschia* species were identified from measurements of frustule properties by transmission electron microscopy (TEM) and/or molecular sequencing of the entire internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) of the ribosomal RNA. For TEM observations, samples were cleaned to remove organic material according to Thorel et al. (2017). To characterize the cell size range of each species, the cell size of each strain was measured every month. The minimum cell size was characterized as the minimum viable size in four *P. australis* strains, six *P. fraudulenta* strains, and six *P. pungens* strains. The strains were observed under a Nikon Eclipse 80i light microscope equipped with a Nikon DS-Ri2 camera, and 20 cells were measured (length and width) using NIS-Elements Imaging Software. Cell size was calculated as the mean $\pm$ standard deviation of each batch of 20 cells (Lundholm et al. 2002).

2.2. Experiment 1: Mating experiments

The main objective of these experiments was to link *Pseudo-nitzschia* spp. cell size to shifts in life cycle stages, especially by defining the gametangia and the initial cell size ranges. Mating experiments were carried out monthly with *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains in the course of their cell size reduction process for one year. Strains were considered at the gametangia stage when they were capable of sexual reproduction. These experiments also provided large-size strains from initial cells (F1 strains). Before carrying out the experiments, the cultures (Table 2.1) were acclimated to the experimental conditions (16°C, 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 14h:10h L:D light cycle), and 20 cells from each culture were measured. Mating experiments were performed in 6-well culture plates in 5 ml of K/2-medium + Si, with an initial concentration of 5,000 cells.ml⁻¹ for each of the two strains of the compatible mating type. The mating type was assessed by crossing the strains with reference strains of known mating types. The strain that bore the auxospores was defined as “PN-”, and the other one as “PN+” (Kaczmarek et al. 2013). Plates were incubated in growth chambers (Economic Delux,

Snijders Scientific B. V., UK). The crosses were checked daily for the formation of sexual stages (gametes, zygotes, auxospores, or initial cells) under an inverted light microscope (Leica DMIL LED, Wetzlar, Germany). Initial cells were sampled from the successful crosses, and 20 cells were measured (length and width) under a Nikon Eclipse 80i light microscope equipped with a Nikon DS-Ri2 camera using NIS-Elements Imaging Software.

2.3. Experiment 2: Batch experiments

Batch experiments were performed to study two physiological indices, *i.e.* the growth rate and domoic acid production (cellular domoic acid – cDA – and extracellular dissolved DA – dDA – concentrations). The growth rate parameter was estimated during the exponential growth phase, and DA concentrations were measured on the second day of the stationary phase because DA production is higher during this phase before the culture starts declining (Cusack et al. 2002, Fehling et al. 2004, Thessen et al. 2009).

Batch experiments were carried out with *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains (Table 2.1). Before each experiment, each strain was acclimated to experimental conditions *i.e.* 16°C, 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and 14h:10h L:D light cycle in growth chambers (Economic Delux, Snijders Scientific B.V., UK). The experiments were carried out in 250 ml filter flasks (NESTTM) with 100 ml of K/2 + Si. Si(OH)_4^- and PO_4^{2-} concentrations were modified to obtain phosphate or silicate limitation in the stationary phase because DA production is obtained in *Pseudo-nitzschia* cultures after an exponential growth phase followed by quasi-exhaustion of P or Si which induces growth arrest (Pan et al. 1996a, 1996c, 1998, Fehling et al. 2004, Amato et al. 2010). Nitrogen, phosphorus, and silicon concentrations in the culture medium were as follows: 400 $\mu\text{M NaNO}_3$, 5 $\mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$, and 125 $\mu\text{M Na}_2\text{SiO}_3$ for P limitation, and 400 $\mu\text{M NaNO}_3$, 25 $\mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$, and 25 $\mu\text{M Na}_2\text{SiO}_3$ for Si limitation. At the beginning of each experiment, an acclimated culture in the exponential growth phase was centrifuged (10 min, 800 g, 16°C) in order to add only cells to the culture medium without affecting nutrient concentrations. The initial cell concentration for all experiments was around $2.5.10^3 \text{ cells.ml}^{-1}$ ($\pm 0.25.10^3$). Samples were collected once a day in the early afternoon to monitor cell concentrations using a Nageotte counting chamber. At the end of the experiment, each flask still contained at least half of the initial volume of culture.

The growth rate (d^{-1}) was calculated using the following equation (equation 2.1):

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} \quad (2.1)$$

Where t is time in days, and X_1 and X_2 are cell concentrations (cells.ml^{-1}) at t_1 and t_2 , respectively.

On the second day of the stationary phase, samples were taken for DA measurements. A 10 ml aliquot was taken from each flask, centrifuged, and the supernatant was recovered for extracellular dissolved DA (dDA) measurements. A second 10-ml aliquot was sonicated on ice with a sonication probe (Bioblock Scientific Vibracell 72442 ultrasons) for 4 minutes to disrupt cell membranes and release DA from the cells, and filtered on a 0.2- μm filter (33 mm, cellulose acetate membrane). This fraction was used to measure total DA (tDA). The samples were frozen at -20°C prior to analysis. DA quantification was performed using an ASP ELISA kit (Biosense Laboratories, Bergen, Norway) following the manufacturer's instructions. Each sample was analyzed in duplicate for quality control purposes. The absorbance was measured using a microplate spectrophotometer (iMarkTM Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc) equipped with a 450 nm filter.

The cellular domoic acid content (cDA, pg.cell^{-1}) was calculated from tDA and dDA (in pg.ml^{-1}) normalized to the cell concentration (cells.ml^{-1}) as follows (equation 2.2):

$$cDA = \frac{tDA - dDA}{\text{cell concentration}} \quad (2.2)$$

To characterize interspecific and intraspecific variability in growth and DA production, these batch experiments were performed on multiple strains for each of the three species, *i.e.* nine *P. australis* strains, thirteen *P. pungens* strains, and eleven *P. fraudulenta* strains (Table 2.1). Potential intraspecific variability may originate from genetic variability among strains, but also from the influence of cell size linked to the life cycle or the influence of the time spent in culture. Therefore, we calculated the age of strains isolated from natural populations as the time spent in culture between the date of isolation and the date of each experiment. Even if globally older strains tended to be characterized by smaller cells, there was no simple and direct relationship

between the cell size and the age for each strain when considering all strains used for one species. Since all strains were not isolated at the same cell size, some strains of the same age exhibited different cell sizes (Supplementary Fig. 2.1). Some strains (four *P. australis*, three *P. pungens*, and four *P. fraudulenta* strains) were also studied at different cell sizes in the course of the size reduction process to estimate the influence of cell size or time in culture (Table 2.1). Furthermore, we also performed batch experiments on F1 strains and their parent strains to compare their growth rate and DA production and test whether these were inherited characters or influenced by changes in cell size.

2.4. Statistics

After testing the normality and homoscedasticity of the data, ANOVA was used to test differences in initial size, growth rate, cDA and dDA concentrations among the three species using the “car” package in R version 3.5.1. Linear regressions were used to study the effect of cell size or age on the growth rates of *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains, and cDA or dDA in *P. pungens* and *P. fraudulenta* cells larger or smaller than 60 μm , using the “lm” package in R. Multiple linear regression analyses were performed to study the combined effect of cell size and age on growth rate, using the “lm” package in R. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$ in all tests.

3. Results

3.1. Life cycle characteristics

We characterized the minimum and maximum (initial cells) cell size for each species, along with the size range within which the cells were capable of sexual reproduction – the gametangia size range – to study the influence of the life cycle on *Pseudo-nitzschia* physiology.

The sizes of the initial cells issued from the mating experiments significantly differed among the three species ($P < 0.001$). The initial cell sizes ranged from 134 μm to 167 μm (144 μm on average) for *P. australis*, from 100 μm to 128 μm (113 μm on average) for *P. fraudulenta*, and from 149 μm to 183 μm (162 μm on average) for *P. pungens* (Fig. 2.1 and 2.2). Globally speaking, the multiple crosses showed that initial cell size was not dependent on parental cell size whatever the species (Fig. 2.1). The minimum cell size for a species was estimated as the

minimum cell size for which cells grew in culture. This mean minimum cell size was $29.5 \mu\text{m} \pm 1.7$ for *P. australis*, $22.3 \mu\text{m} \pm 0.8$ for *P. fraudulenta*, and $32.6 \mu\text{m} \pm 1.4$ for *P. pungens* (Fig. 2.2). These values corresponded to $17.6 \% \pm 1.0$, $17.5 \% \pm 0.6$, and $17.8 \% \pm 0.8$ of the maximum initial cell size, respectively. Microscopic observations revealed abnormal valve shapes in small-sized cells.

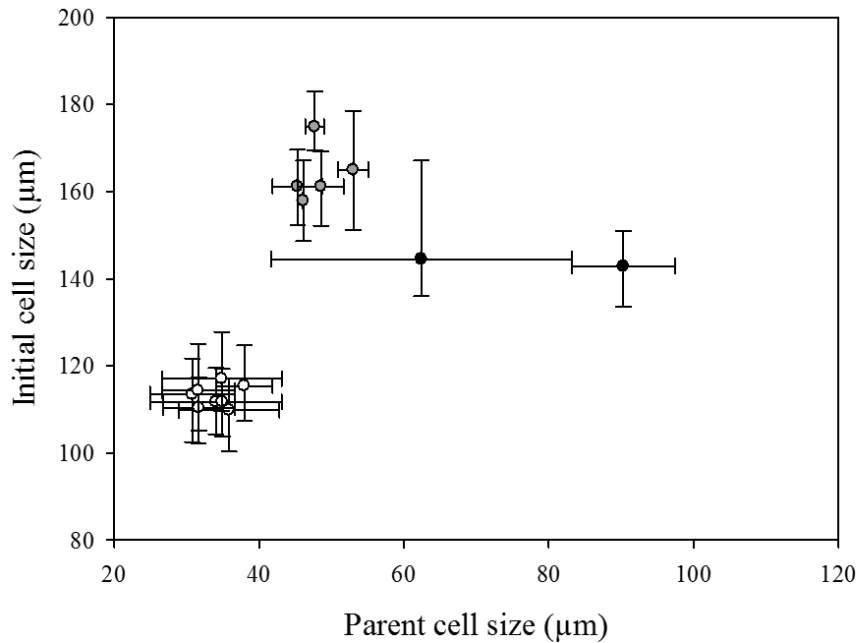


Figure 2.1. Mean size of initial cells as a function of mean size of parent strains in *P. australis* (black), *P. pungens* (grey) and *P. fraudulenta* (white). Standard deviations represent the minimum and maximum sizes measured for initial cells and represent the variance for parental cells.

Gametangia sizes ranged from 55 to 85 μm , 29 to 90 μm , and 43 to 75 μm in *P. australis*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*, respectively. These sizes corresponded to 33 - 51 %, 23 - 70 %, and 23 - 41 % of the maximum initial cell sizes, respectively (Fig. 2.2). These results mean that *P. fraudulenta* cells were at the gametangia stage for 57.5 % of their life cycle, *P. australis* for only 21.6 %, and *P. pungens* 21.3 %, even if these evaluations may have been influenced by variation in division rate with cell size (D'Alelio et al. 2009). These size ranges corresponded to gametangia capable of producing new initial cells through sexual reproduction. However, the mating experiments revealed that slightly smaller or larger cells were also able to produce gametes that fused to form zygotes; yet, in these parental cell sizes, the resulting auxospores did not fully develop and therefore did not produce initial cells (Fig. 2.2).

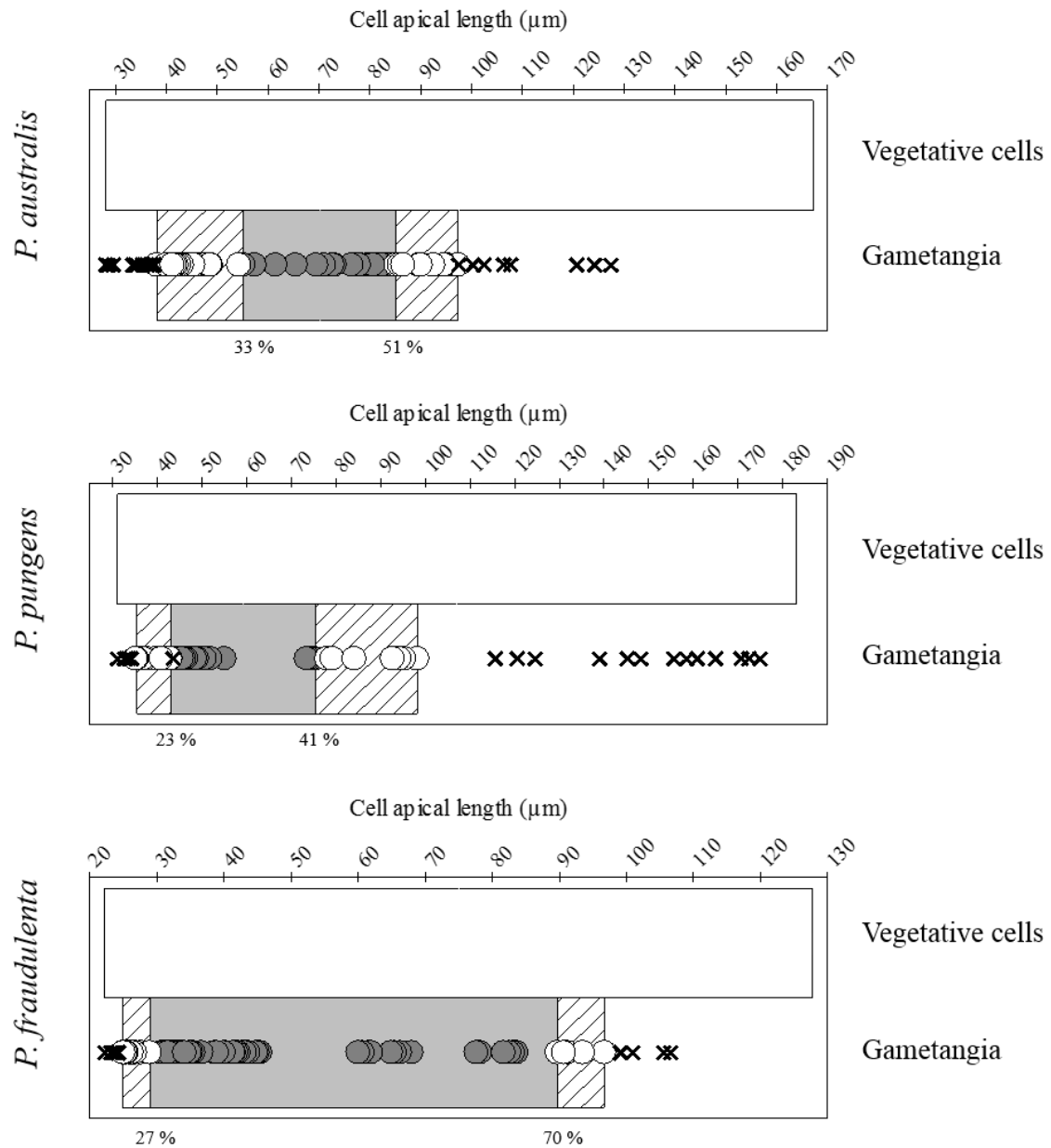


Figure 2.2. Size range of vegetative cells (white) and gametangia (grey and hatched pattern) in *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta*. Crosses and dots correspond to cell sizes for which mating experiments were performed. Crosses: no sexual reproduction observed. Hatched pattern and white dots: incomplete sexual reproduction observed (without initial cell production). Light grey and dark grey dots: complete sexual reproduction observed (with initial cell production). The size percentage was calculated based on the maximal initial size.

3.2. Growth rate: influence of strain age and cell size

The growth rate of *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* strains at 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 16°C spanned from 0.31 to 0.82 day^{-1} , 0.15 to 0.75 day^{-1} and 0.19 to 0.68 day^{-1} , respectively (Fig. 2.3). These results show great intraspecific variability in growth rate in *Pseudo-nitzschia* spp., while no significant difference among the three species emerged. The high diversity of the strains in terms of cell size and age allowed us to explore the relative influence of these two parameters on the growth rate. In *P. pungens* and *P. fraudulenta*, the growth rate decreased significantly with age ($P < 0.001$, Fig. 2.3A). However, we did not study strains of all ages, but rather two groups corresponding to two sampling periods (2011-2012 and 2016, Table 2.1). Therefore, some strains were more than 40 months old, and others were less than 10 months old. No tendency of growth rate evolution as a function of age emerged in either of these groups (Fig. 2.3A). For *P. australis*, the growth rate decreased significantly with age ($P < 0.001$, Fig. 2.3A), even if we studied only strains less than 33 months old. It is worth noting that we did not take into account F1 strains when we studied the effect of strain age because they were not isolated from natural populations. The relationship between the growth rate and cell size (Fig. 2.3B) was similar for the three species, with lower growth rates when cell sizes were below 60 μm . However, there was no relationship between cell size and growth rate in *P. fraudulenta*, except the difference below and above this threshold of 60 μm . In *P. pungens*, the growth rate decreased linearly with cell sizes above 60 μm , but below this size there was no significant tendency of growth evolution with cell size except that growth rates were the lowest. Finally, in *P. australis*, the growth rate significantly decreased with cell size ($P < 0.001$ above and below 60 μm). However, the decrease was more pronounced when cell sizes were below 60 μm (Fig. 2.3B).

In each strain cell size decreased with age, as in all diatom cultures, so we used multiple linear regression analyses to discriminate the effect of age from the effect of cell size on the measured growth rates (equations 2.3A, 2.3B, 2.4, and 2.5).

$$(2.3A) \text{ } P. \text{ australis, size } < 60 \mu\text{m}: \mu = -0.5113 + 0.0225 * \text{Size} \text{ (} P < 0.001 \text{)}$$

$$(2.3B) \text{ } P. \text{ australis, size } > 60 \mu\text{m}: \mu = 0.3847 + 0.0028 * \text{Size} \text{ (} P < 0.001 \text{)}$$

$$(2.4) \text{ } P. \text{ pungens: } \mu = 0.4563 - 0.0051 * \text{Age} + 0.0014 * \text{Size} \text{ (} P < 0.001 \text{)}$$

$$(2.5) \text{ } P. \text{ fraudulenta: } \mu = 0.6093 - 0.00481 * \text{Age} \text{ (} P < 0.001 \text{)}$$

The results show that *P. australis* growth rate could be predicted from cell size alone. The growth rate significantly decreased with decreasing cell size, without any influence of age. *P. australis* strains of different ages exhibited similar growth rates (e.g. around 0.60 day^{-1} for 9-month-old or 21-month-old strains), while strains of the same age grew at different rates (e.g. 0.60 or 0.30 day^{-1} for 20 month-old strains, Fig. 2.3A). In contrast, the largest *P. australis* strains ($> 60 \mu\text{m}$) had the highest growth rates ($> 0.60 \text{ day}^{-1}$), and the strains whose cell size was below $45 \mu\text{m}$ ($< 0.45 \text{ day}^{-1}$, Fig. 2.3B) had the lowest. In *P. pungens*, the growth rate was a function of both cell size and age. The growth rate decreased from around 0.60 to $0.15 - 0.38 \text{ day}^{-1}$ between young (less than 10 months old) and older *P. pungens* strains (more than 40 months old). But these changes in growth rate in *P. pungens* were also linked to changes in cell size: the strains whose cell size was above $60 \mu\text{m}$ exhibited the highest growth rates, while smaller strains grew slower (Fig. 2.3B). In contrast, the growth rate of *P. fraudulenta* was only a function of the strain age. For example, the growth rate was between 0.52 and 0.59 day^{-1} for strains less than 10 months old, but between 0.19 and 0.44 day^{-1} for more than 50-month-old *P. fraudulenta* (Fig. 2.3A).

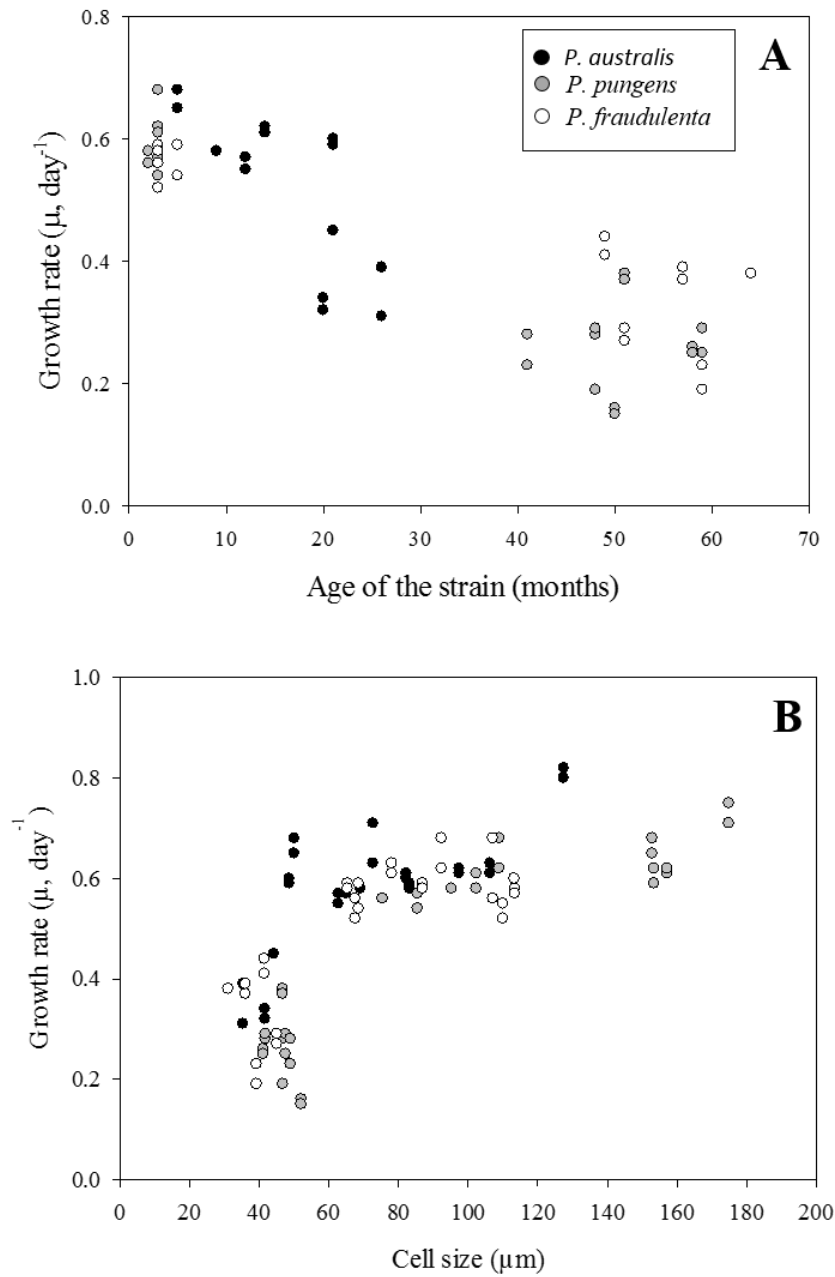


Figure 2.3. (A) Growth rate (μ , day⁻¹) as a function of the age of the strains (months) since their isolation from natural populations in *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* (F1 strains from sexual reproduction are not present in this graph). (B) Growth rate (μ , day⁻¹) as a function of the cell size (μ m) for all strains studied in *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta*.

3.3. The life cycle influences toxicity

All the strains of all three species produced domoic acid under our experimental conditions. Whatever the species, there was no significant difference in domoic acid cellular content (cDA) between phosphate limitation and silicate limitation (Supplementary Fig. 2.2). Even if, for each strain considered individually, cDA could be higher under Si or P limitation (Fig. 2.4 and 2.5),

there was no global tendency for one limitation to promote higher DA production. In contrast, we measured significant differences among species, with *P. pungens* maximum cDA one order of magnitude above *P. fraudulenta* maximum cDA, and *P. australis* maximum cDA also one order of magnitude above *P. pungens* maximum cDA ($P < 0.001$, Supplementary Fig. 2.2).

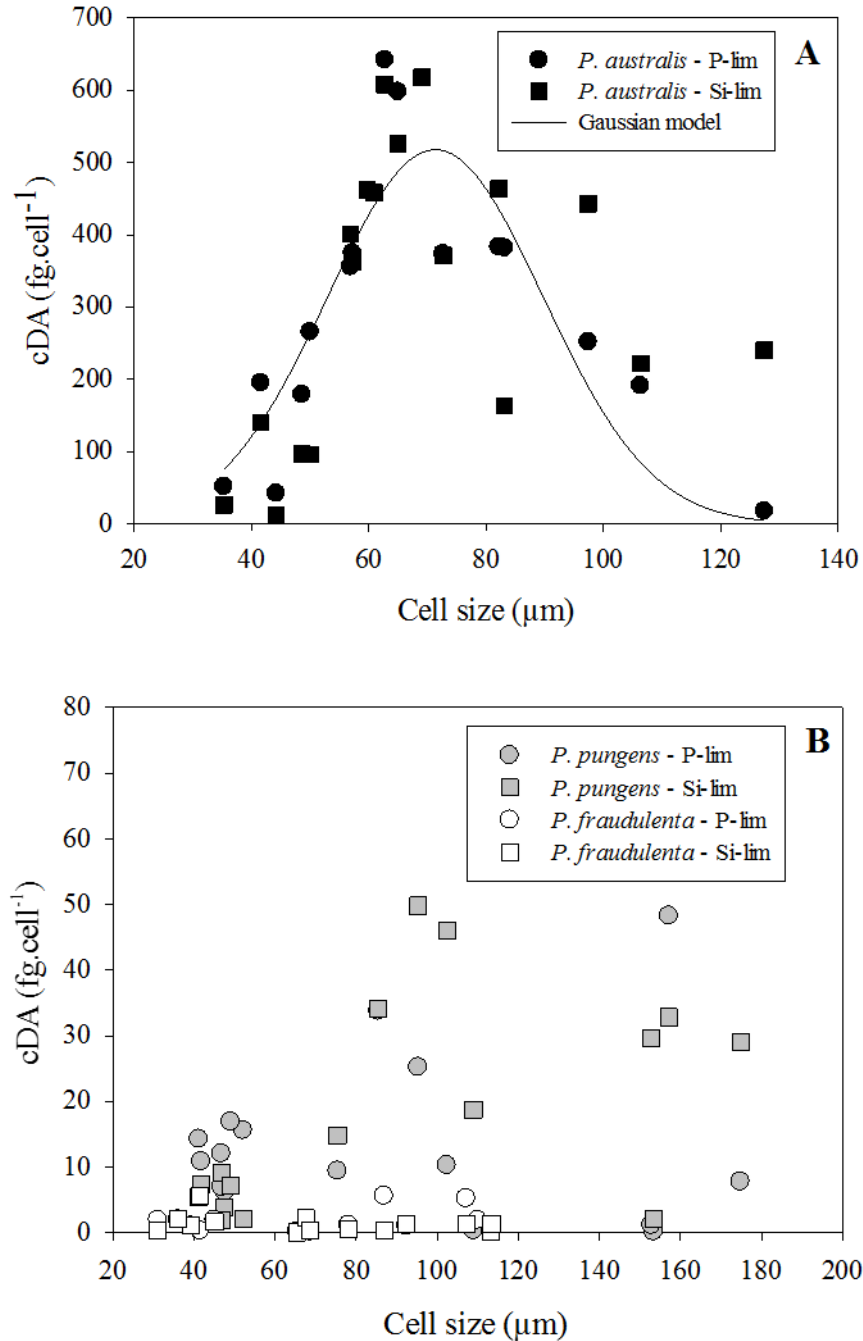


Figure 2.4. Cellular domoic acid content (cDA, fg.cell⁻¹) as a function of cell size (μm): (A) in *P. australis* and (B) in *P. pungens* and *P. fraudulenta*.

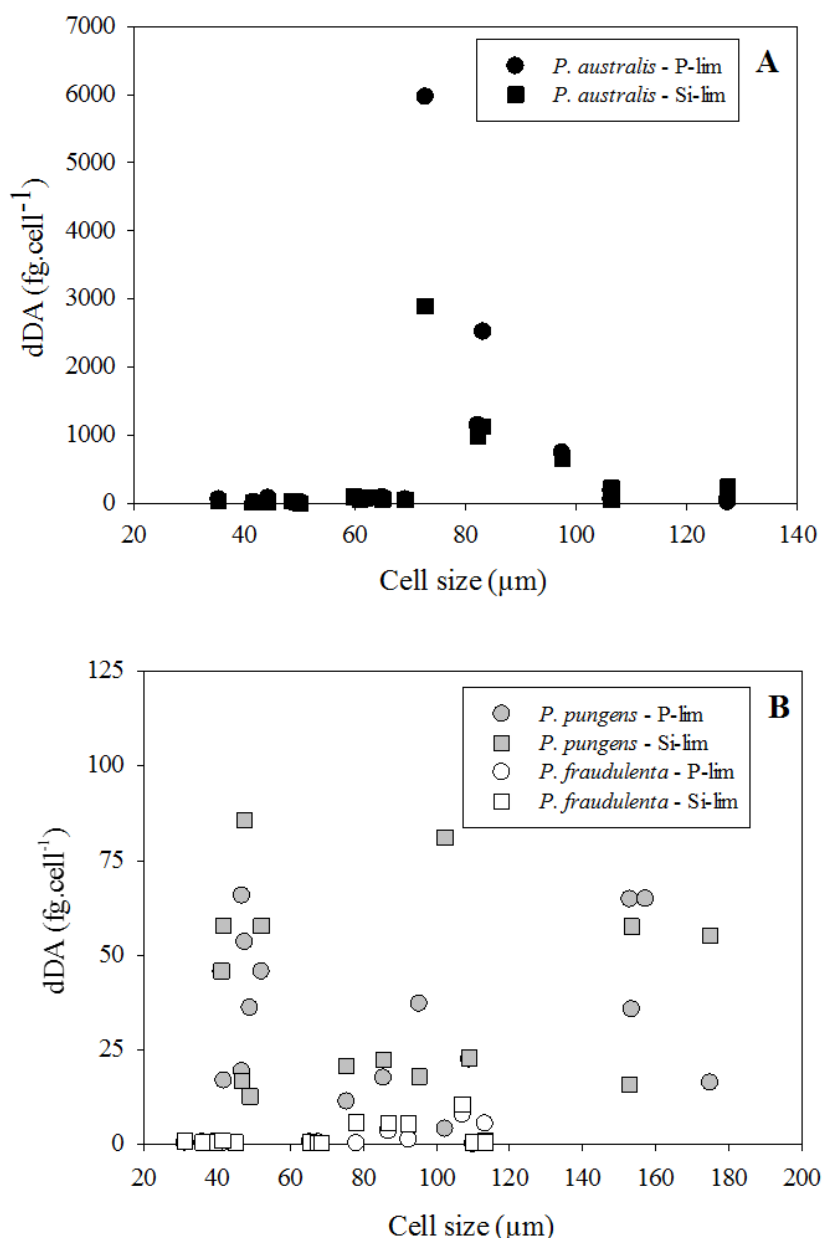


Figure 2.5. Dissolved domoic acid (dDA, fg.cell⁻¹) as a function of cell size (μm): (A) in *P. australis* and (B) in *P. pungens* and *P. fraudulenta*.

Figures 2.4 and 2.5 show cDA and dDA for the three species, respectively. In *P. australis*, cDA was between 12 and 645 fg.cell⁻¹ and dDA between 0.022 and 8 ng.ml⁻¹. In *P. pungens*, cDA was between 0.2 and 50 fg.cell⁻¹ and dDA between 0.04 and 0.395 ng.ml⁻¹. In *P. fraudulenta*, cDA was between 0.03 and 5.6 fg.cell⁻¹ and dDA between 0.03 and 0.215 ng.ml⁻¹. When considering the biomass in the cultures, dDA concentrations corresponded to 1-5,970 fg.cell⁻¹ for *P. australis*, 4-90 fg.cell⁻¹ for *P. pungens*, and 0.05-10 fg.cell⁻¹ for *P. fraudulenta* (Fig. 2.5). The measured dDA concentrations significantly differed among the three species ($P < 0.001$).

P. australis produced the highest amounts of dDA, followed by *P. pungens*, and then *P. fraudulenta* (Fig. 2.5).

cDA and dDA concentrations were not significantly influenced by strain age in *P. pungens* and *P. fraudulenta*, even if we measured a few higher cDA concentrations in some of the young strains. In *P. australis*, dDA concentrations increased when the strains were between 14 and 19 months old (Supplementary Fig. 2.3 and 2.4). However, this increase in dDA seemed to be rather related to *P. australis* cell size (see below). The cell size did not affect cDA concentrations in *P. fraudulenta* (Fig. 2.4B), while dDA concentrations in this species were significantly higher (although very low) in the F1 strains with cell sizes above 75 μm ($P < 0.05$, Fig. 2.5B). Measured dDA concentrations in *P. pungens* were not related to cell size (Fig. 2.5B). There was no clear relationship between cDA concentrations and *P. pungens* cell size (Fig. 2.4B). However, we recorded the highest cDA concentrations for this species ($> 20 \text{ fg.cell}^{-1}$) only in the large strains ($> 70 \mu\text{m}$), although some large-size strains also exhibited very low cDA concentrations. Furthermore, no clear relationship appeared between the cDA or dDA concentrations in F1 strains as compared to their parental strains whatever the species.

There was a strong relationship between DA and cell size in *P. australis*. Measured cDA concentrations varied with cell size following a Gaussian model ($P < 0.001$, Fig. 2.4A) (equation 2.6):

$$cDA = 524 * e^{(-0,5 * (\frac{Size - 71}{18})^2)} \quad (2.6)$$

cDA concentrations increased from 130 to 425 fg.cell^{-1} as cell size decreased from ~ 130 to 80 μm . Maximum cDA concentrations were between 600 and 645 fg.cell^{-1} for cell sizes between 62.7 and 69.1 μm . The Gaussian model gave a maximum cDA concentration for 71- μm cells. Below 60 μm , cDA concentrations decreased down to 10 fg.cell^{-1} (Fig. 2.4A). These results were confirmed by monitoring four *P. australis* strains whose cDA concentrations followed the Gaussian model over time while the cells were decreasing in size (Fig. 2.6). These results show that large (100 - 130 μm) and small (40 - 30 μm) *P. australis* strains could present cDA concentrations comparable to those of *P. pungens* strains (Fig. 2.4). Therefore, the difference in cDA between *P. australis* and the other two species was greater in the size range around 50 - 100 μm . Furthermore, in *P. australis*, measured dDA concentrations also increased in 70 -

100 μm strains (Fig. 2.5A). It is interesting to note that the cell size range for which cDA concentrations were higher in *P. australis* coincided with the size range characteristic of gametangial cells capable of sexual reproduction for this species (55 - 85 μm , Fig. 2.2). dDA concentrations were also higher in the upper part of the gametangial cell size range (70-85 μm).

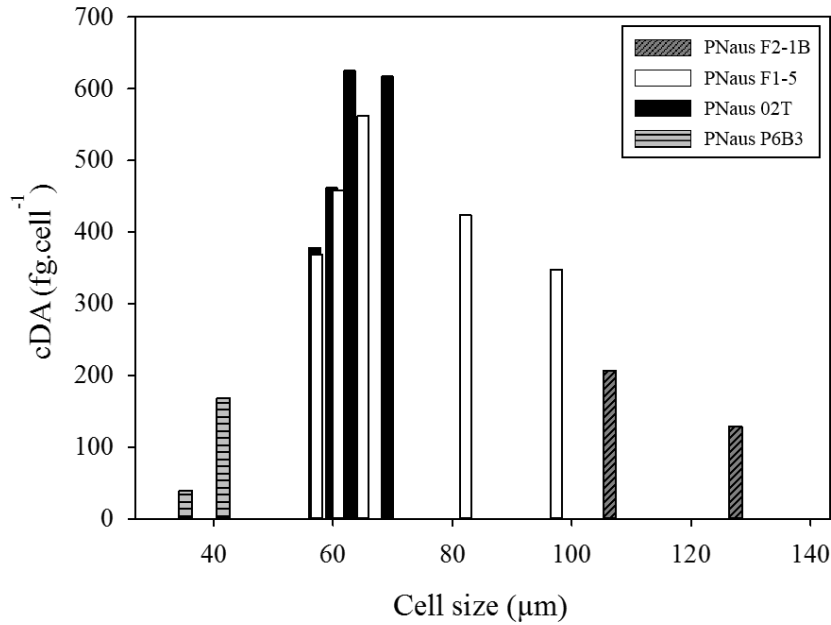


Figure 2.6. Monitoring of the cellular domoic acid content (cDA, fg.cell⁻¹) of four strains of *P. australis* during their decrease in cell size.

4. Discussion

Using a multi-strain approach for three *Pseudo-nitzschia* species, we studied the intra- and interspecific variability of growth rates and toxicity. This approach made it possible to disentangle the respective effects of strain age and cell size. Furthermore, taking into account cell size offered a unique perspective on the influence of the life cycle on the physiology of *Pseudo-nitzschia* species.

4.1. Cellular and dissolved domoic acid production in *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*

Pseudo-nitzschia species are not all systematically toxic, and even among toxic species some strains may not be able to produce DA (Lelong et al. 2012). Previous studies on strains of different geographic origins reported great variability in cDA concentrations in *P. pungens* and

P. fraudulenta. Although *P. fraudulenta* has sometimes been reported to be a non-producer of DA (Hasle 2002, Thessen et al. 2009, Quijano-Scheggia et al. 2010), our *P. fraudulenta* strains exhibited cDA concentrations between 0.03 and 5.6 fg.cell⁻¹. These concentrations are similar to those reported in the review by Trainer et al. (2012, up to 30 fg.cell⁻¹) and in Lema et al. (2017, up to 55 fg.cell⁻¹), though in the lower range of concentrations. For *P. pungens*, in contrast with studies reporting non-toxigenic strains (Villac et al. 1993, Bates et al. 1998 and references herein), each of our strains produced DA, even if the measured cDA concentrations (0.2 - 50 fg.cell⁻¹) were also in the lower range compared with previous studies (Bates et al. 1998, Baugh et al. 2006, Calu et al. 2009, Rhodes et al. 2013, Lema et al. 2017). *P. pungens* and *P. fraudulenta* also consistently produced dissolved domoic acid. To our knowledge, this is the first report of dDA production by *P. fraudulenta*, in contrast with Baugh et al. (2006) and Lema et al. (2017) who did not detect dDA production by this species. As for cDA, our results confirm variability in dDA production among *P. pungens* strains, in agreement with previous studies. Lema et al. (2017) did not detect any dDA in their *P. pungens* cultures, while Baugh et al. (2006) measured dDA levels similar to the lowest concentrations measured in the present study (at similar cell concentrations).

P. australis produced the highest cDA concentrations (between 12 and 645 fg.cell⁻¹), in the same range as those already measured in strains isolated on French coasts (maximum between 30 and 700 fg.cell⁻¹, Thorel et al. 2014, Martin-Jézéquel et al. 2015, Lema et al. 2017), but much lower than in strains isolated in Ireland (up to 26,000 fg.cell⁻¹, Cusack et al. 2002) and in the East Pacific coastal waters (up to 1,740 fg.cell⁻¹ in Chile, Álvarez et al. 2009; up to 1,870 fg.cell⁻¹ in Baja California, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011; and up to 37,000 fg.cell⁻¹ in California, Garrison et al. 1992). These differences in toxicity may point out the existence of different *P. australis* ecotypes with contrasting capacities of DA production, as previously shown for other *Pseudo-nitzschia* species by Thessen et al. (2009). In the present study, *P. australis* also produced the highest dDA concentrations, in accordance with previous reports by Maldonado et al. (2002, up to 7.6 ng.ml⁻¹), Martin-Jézéquel et al. (2015, up to 20.1 ng.ml⁻¹), and Lema et al. (2017, 430 fg.cell⁻¹).

These results confirm the high interspecific variability in DA production already highlighted by Lelong et al. (2012). More particularly, the gradation in toxicity between *P. fraudulenta*, *P. pungens*, and *P. australis* already observed by Lema et al. (2017) on strains from the same area confirms the hypotheses from an *in situ* study in the English Channel relating bloom toxicity to

Pseudo-nitzschia species diversity (Thorel et al. 2017). However, our results show that the most toxic *P. pungens* strains are as toxic as some *P. australis* strains. Therefore *P. pungens* also has to be considered when dealing with DA toxic events observed in French coastal waters, particularly in the English Channel where *P. australis* is mainly pointed out (Klein et al. 2010, Thorel et al. 2017).

Only few studies present dDA measurements during blooms (e.g. Bargu et al. 2008), while impacts on marine organisms have already been documented (Liu et al. 2007). All our strains produced dDA at significant concentrations, even if the extrapolation of dDA concentrations obtained in culture to *in situ* bloom situations is uncertain. Increased knowledge regarding this parameter is required to grasp its impact on marine ecosystems.

4.2. Life cycle characteristics in relation to cell size and consequences on sexual reproduction in natural populations

We characterized the link between cell size and life cycle stages in *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* by determining initial cell size, the vegetative cell size range, and the gametangia size range. As reported in the literature (Chepurnov et al. 2004, Kaczmarek et al. 2013), these cardinal points of the diatom life cycle were clearly species-specific. The initial cell sizes were between 134 μm and 167 μm for *P. australis*, 149 μm and 183 μm for *P. pungens*, and 100 μm and 128 μm for *P. fraudulenta*. To our knowledge, this is the first report of initial cell size for *P. fraudulenta*. However, the initial cell size range can be even larger in this species: Cusack et al. (2004) reported vegetative cells greater than 128 μm . *P. pungens* initial cell sizes are in agreement with those found by Chepurnov et al. (2005). Moreover, in *P. australis* and *P. pungens*, these sizes are similar to the initial cell sizes measured during a sexual reproduction event observed *in situ* during a bloom in Washington coastal waters (Holtermann et al. 2010). The relationship between the size of parental cells and the initial cell size has been studied in different pennate and centric diatoms. Some authors report a linear relationship both in centric (Jewson 1992) and pennate diatoms (Davidovich 1994, Edlund and Bixby 2001, Davidovich et al. 2010). However, Armbrust and Chisholm (1992), Davidovich (1994) and Fuchs et al. (2013) observed no relationship between parental size and initial cell sizes in *Thalassiosira weissflogii*, *Fragilariopsis kerguelensis*, and *Synedra tabulata*, respectively. In

the present study, the initial cell size was also independent of the parent cell size in all three *Pseudo-nitzschia* species within the studied size range.

Minimum sizes were 28 μm , 31 μm , and 22 μm in *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*, respectively. These values are close to those obtained for *P. pungens* (25-30 μm) by Chepurnov et al. (2005) or for *P. arenysensis* (~18 μm) in a laboratory study (Amato et al. 2005) and with a model of size reduction (Schwarz et al. 2009). Interestingly, the minimum cell size corresponded to $17.6 \% \pm 0.8$ of the maximum initial size for the three species. It could be interesting to explore if this threshold of 17 % is valid for other diatom species. These very small cells are rarely observed *in situ* and may not be representative of natural populations for physiological studies.

The gametangia size ranges observed in this study are in accordance with the size range favorable to sexual reproduction usually admitted for diatoms (~30-75 %, Mann et al. 2003, Chepurnov et al. 2004, Von Dassow et al. 2006, Davidovich et al. 2012, Fuchs et al. 2013, Vanormelingen et al. 2013). The three species presented closed gametangia size ranges, since the cells lost their ability to reproduce sexually before reaching the minimum viable cell size (Chepurnov et al. 2004). These gametangia size ranges fall within previous ranges measured for *Pseudo-nitzschia* species: 20 - 90 % for *P. arenysensis* (Amato et al. 2005), 23 - 70 % for *P. multiseriata* (Hiltz et al. 2000), 39 - 71 % for *P. multistriata* (D'Alelio et al. 2009), although *P. australis* and *P. pungens* presented narrower gametangia size ranges. For example, Chepurnov et al. (2005) found that their *P. pungens* strains could mate in a wider size range (20 - 60 % of initial cell size, according to their data), even if their strains belonged to the same clade as ours (clade I, Lim et al. 2014). When gametangia size ranges are narrower, it can be hypothesized that a smaller portion of the population is capable of sexual reproduction in natural populations. This may affect encounter rates during blooms, and in turn reproductive success. However, the fact that only a small portion of the population can sexually reproduce may also be an ecological advantage regarding competition with the rest of the phytoplankton community because most of the *Pseudo-nitzschia* population would carry on with vegetative multiplication during a sexual reproduction event (Lewis 1984). Furthermore, in *P. australis* and *P. pungens*, the narrower gametangia size range is linked to the fact that vegetative cells need to decrease more in size to reach the gametangia stage. These life cycle characteristics probably affect the frequency and the timing of sexual reproduction events in natural populations (Lewis 1984). The difference in gametangia size range observed in the three species therefore suggests that

their natural populations could present different sexual reproduction dynamics. This in turn could influence the general population and bloom dynamics (Jewson 1992, Edlund and Stoermer 1997, D'Alelio et al. 2010).

This study highlights an intermediate stage of the *Pseudo-nitzschia* life cycle. Our experiments revealed a size range wider than that of gametangia, within which cells were capable of gametogenesis and fertilization but could not produce initial cells. This second size range observed for the first time in this study suggests that the metabolic changes linked to the transition from vegetative cells to gametangia occur progressively during the decrease in cell size allowing cells to acquire the ability to reproduce sexually. When entering the larger size range, cells seem to acquire the physiological abilities required for pairing, gametogenesis, and fertilization. This may include production of pheromones for the recognition of complementary sexual types (Sato et al. 2011, Gillard et al. 2013, Frenkel et al. 2014), and mobility abilities for active pairing. In addition, in the larger size range, cells must be physiologically ready for meiosis which leads to gametogenesis (diatom are diplonts). Then, as the cells enter the narrower size range, they probably acquire supplementary physiological abilities that enable them to ensure complete auxosporulation. This process represents a high metabolic cost for the cells: they probably stop most syntheses during at least the first steps of sexual reproduction that lasts two to four days on average in *Pseudo-nitzschia* species (Davidovich and Bates 1998; Sauvey unpublished data). The zygote also needs lots of storage to restore a new large initial cell (Chepurnov et al. 2005). Therefore, in contrast to cells in the larger size range, gametangial cells in the narrower range may present a more efficient metabolism with higher storage capabilities – especially for silicium – to be able to synthesize the frustule of the new initial cell. These results stress the fact that gametangial cells probably present particular metabolic characteristics as compared to vegetative cells.

4.3. Differential influence of life cycle stages and strain age on growth and DA production in *Pseudo-nitzschia* species

The time spent in culture seemed to influence *P. fraudulenta* and *P. pungens* growth since growth rates decreased with increasing strain age. However, the strains had been isolated during two distant sampling periods, so it is difficult to tell whether this difference was a consequence of cell adaptation to natural environmental conditions (*i.e.* the difference reflected the period

when the population from which the strains were isolated) or a physiological change during the culturing period (*i.e.* the difference reflected strain age) (Lakeman et al. 2009). Further studies with strains of complementary ages are needed to state on this point. However, these results highlight that it is important to take into account the fact that strains in culture can evolve, so that ecophysiological studies should be performed as soon as possible (≤ 1 or 2 years) after *Pseudo-nitzschia* strains have been isolated.

In *P. australis*, the link between growth rate and strain age was probably the outcome of the weak relationship between age and cell size since cell size was sufficient to predict the growth rate. The same relationship was observed for the three species, with a sharp decrease in growth rate below a cell size threshold of 60 μm . Above this size, growth rates were similar in all *P. fraudulenta* strains whatever the cell size. However, above 60 μm in *P. pungens* and *P. australis*, the growth rate also decreased with cell size, although more slowly. Altogether, the growth rate decreased with decreasing cell size. This result is in contradiction with allometric rules generally accepted for phytoplankton populations. These rules predict an increase of growth rates with decreasing cell size due to higher surface-to-volume ratios that, for example, favor higher nutrient uptake (Amato et al. 2005, Von Dassow et al. 2006, Edwards et al. 2012, Marañón et al. 2013, Otero et al. 2018). Our results therefore show that allometric rules do not apply when dealing with intraspecific diversity in *Pseudo-nitzschia* species. The distinctive feature of the size-growth relationship for our three *Pseudo-nitzschia* species is the sharp decrease of the growth rate in small cells. Similar results have been reported for *Thalassiosira* species (Chisholm and Costello 1980; Von Dassow et al. 2006). These authors related the decrease of the growth rate in small cells to sexual reproduction. In contrast, in the present study, the lowest growth rates did not coincide with gametangia size ranges, and might rather represent a decrease in metabolism efficiency when cells approached their minimum viable size. Emphasizing this point, we often observed cells studied here displayed abnormal valve shapes in the smallest-size strains (data not shown), suggesting deficient valve deposition as reported by Von Dassow et al. (2006). In natural populations, the fact that small cells may be physiologically less efficient could explain why these size ranges are rarely observed: small cells may not be competitive enough to outcompete larger cells and survive. Consequently, it is important to pay attention to cell size in addition to strain age. Strains of large to medium cell sizes ($\geq$ gametangia sizes) should be used for ecophysiological studies on *Pseudo-nitzschia* species. Furthermore, choosing strains of similar cell sizes appears to be an important prerequisite for comparative (inter- or intraspecific) studies.

As far as domoic acid (cDA and dDA) production is concerned, strain age had no significant influence in the three species. However, a few young *P. pungens* strains presented higher cDA concentrations than the others, whatever their age. Beyond interspecific differences, this could explain why a decrease in cDA with time in culture was previously reported in the literature (Lelong et al. 2012 and references herein), in contrast with the present results.

As for the influence of cell size, we found the highest dDA concentrations in some large *P. fraudulenta* F1 strains, and the highest cDA concentrations in some large *P. pungens* strains. However, there was no clear evidence of an influence of cell size on *P. fraudulenta* and *P. pungens* DA production since large strains of these two species also exhibited very low cDA and dDA concentrations. These results do not confirm that DA production systematically decreases with decreasing cell size, as reported in *P. multiseriata* and *P. multistriata* (Bates et al. 1999, Mafra et al. 2009, Amato et al. 2010). However, they are not completely in disagreement for some strains, stressing once more the high intraspecific variability characteristic of *Pseudo-nitzschia* species. This great variability was also highlighted by the cDA and dDA concentrations measured in the F1 strains, which were not related to concentrations in parental strains. This result is in agreement with Amato et al. (2010), who studied *P. multistriata* and concluded that the inheritance of the ability to produce DA was not a simple Mendelian process.

Our results revealed that cDA concentrations could be predicted from cell size by a Gaussian model in *P. australis*. This is not completely in contradiction with previous results reporting a decrease in cDA with decreasing cell size (Bates et al. 1999, Mafra et al. 2009, Amato et al. 2010). Our cell size range was greater than in any other study because we took into account very large strains issued from initial cells obtained in mating experiments. In the literature, the decrease in cDA corresponds to sizes ranging from medium-sized to small cells (Bates et al. 1999, Mafra et al. 2009, Amato et al. 2010). We also observed a decrease in cDA with decreasing cell size in *P. australis* within that same size range. In addition, we brought supplementary information to currently available data about the relationship showing that showing that medium-sized cells are the most toxic ones and large cells issued from sexual reproduction present cDA concentrations comparable to small cells. These observations show that cDA concentrations are not linearly related to cell size in *P. australis*. Furthermore, the evolution of cDA and dDA concentrations suggests that they are not characteristic of any given strain because DA production is not stable over a whole life time in *P. australis*, in contrast to

results reported for *P. multistriata* (Amato et al. 2010). This discrepancy highlights the fact that (i) the relationship between cell size and DA production is species-specific, and (ii) it is important to study the whole size range of a species before drawing conclusions on this relationship.

The striking result of this study is that the increase in cDA in *P. australis* coincided with the size range within which the cells reached the gametangia stage, while dDA also increased in the larger gametangial cells. We can therefore hypothesize that the physiological changes occurring when vegetative cells become sexualized also result in an increase of DA production. During the sexual reproduction process (gametogenesis, fertilization, and auxosporulation), the cells cannot carry out photosynthesis and probably other metabolic pathways any more. Preparing vegetative cells for this step probably includes increasing cell metabolism efficiency and/or modifications of metabolic pathways to increase cellular quotas of the required cellular metabolites (Pan et al. 1998). This probable reorientation of the metabolism may also favor DA synthesis pathways. Bates et al. (1999) hypothesized that the ability of cells to produce domoic acid was not related to cell size but to general physiological changes. Our results suggest that these physiological changes can be linked to the life cycle and especially the sexualization of vegetative cells, at least for *P. australis*. Domoic acid synthesis pathways involve the Krebs cycle and the formation of derived compounds, *e.g.* glutamate (Pan et al. 1998). We can hypothesize that in *P. australis* the change in metabolism that the cells undergo for their sexualization affects the metabolic pathway of glutamate, resulting in an increase in DA production. Therefore, the increase in DA cellular content in gametangia cells might be a “physiological coincidence”. However, the role of this toxin still remains to be deciphered, so we can also wonder if DA could play a role in *P. australis* sexual reproduction. In pennate diatoms, interactions between sexualized cells are needed to trigger gametogenesis. The increased production of DA (and especially dissolved DA) therefore raises questions on the potential role of this toxin as a pheromone (previously mentioned by Lelong et al. 2012). Interestingly, the only pheromone identified in a pennate diatom up to now is a cyclic dipeptide derived from proline, whose synthesis is thus linked to amino acid biosynthesis (Gillard et al. 2013, Frenkel et al 2014). It is however surprising that a similar link between DA production and life cycle was not found in the two other *Pseudo-nitzschia* species which present the same sexual reproduction pattern. In addition, cells may be more vulnerable during sexual reproduction, so domoic acid could act as a grazer deterrent: its production has been shown to increase in the presence of copepods (Harðardóttir et al. 2015, Tammilehto et al. 2015). Finally,

different studies also showed an allelopathic effect of *Pseudo-nitzschia* or DA addition on different phytoplankton species (Lundholm et al. 2005, Smeti et al. 2015, Sobrinho et al. 2017, Van Meerssche et al. 2018). Higher DA production may therefore also represent an ecological advantage that could offset the growth arrest / decrease during sexual events in *Pseudo-nitzschia* blooms.

The link between DA and cell size, and therefore DA and life cycle stages, suggests that *P. australis* life cycle probably impacts bloom toxicity. First, *P. australis* populations can be more or less toxic depending on their cell size spectra. Cell size distribution varies across years in natural populations (D'Alelio et al. 2010), this might partly explain inter-annual variations in bloom toxicity. Furthermore, when a sexual event occurs in a natural population, it results in the production of initial cells and thus in a shift in size distribution towards large cells (Holtermann et al. 2010). During a *P. australis* bloom, this process is expected to result in a decrease in DA concentration in the population, especially as the large cells with slightly higher growth rates will progressively outnumber smaller cells in this population (Armbrust and Chisholm 1992). Life cycle events could therefore also impact DA concentrations in natural populations at the scale of a bloom.

5. Conclusion

This study characterizes the toxicity and cell size - life cycle relationship in three *Pseudo-nitzschia* species. Even if we evidenced species-specific characteristics, the importance of intra-specific variability proves that the number of studied strains *per* species greatly influences the conclusions on *Pseudo-nitzschia* physiology. Furthermore, our results advocate for the use of *Pseudo-nitzschia* strains not more than one or two years after their isolation, and of cell sizes at or above gametangia size when studying cellular metabolism. However, as far as toxicity is concerned, our results do not support the hypothesis of a decrease in DA production with time in culture in these three species. Most importantly, this study shows that *P. australis* cDA can be predicted from cell size by a non-linear relationship. In this species, cDA is maximum in medium-sized cells at the gametangia stage of their life cycle. These results suggest that either the metabolic changes occurring in gametangia cells favor DA production as compared to vegetative cells, or that DA is involved in sexual reproduction. The *Pseudo-nitzschia* life cycle may therefore influence the toxicity of blooms. Furthermore, the cell size – cDA relationship

revealed by our results may be useful to predict bloom toxicity based on the cell size spectra of a *P. australis* population. Finally, a comparative understanding of the cellular metabolism of *P. australis* at different life cycle stages may help to identify the DA biosynthesis pathway.

SUPPLEMENTARY FIGURES

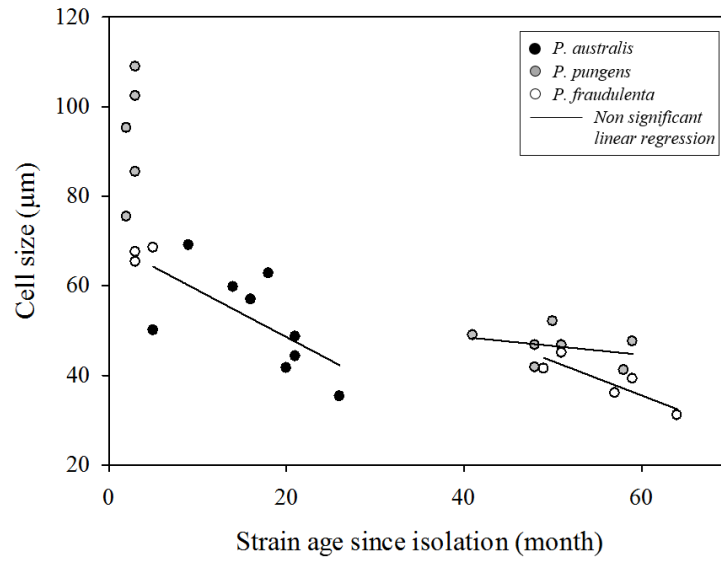


Figure S2.1. Relationship between cell size and strain age (month) since their isolation from the natural environment in *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* (F1 strains are not taken into account). Linear regressions are not significant ($P > 0.05$).

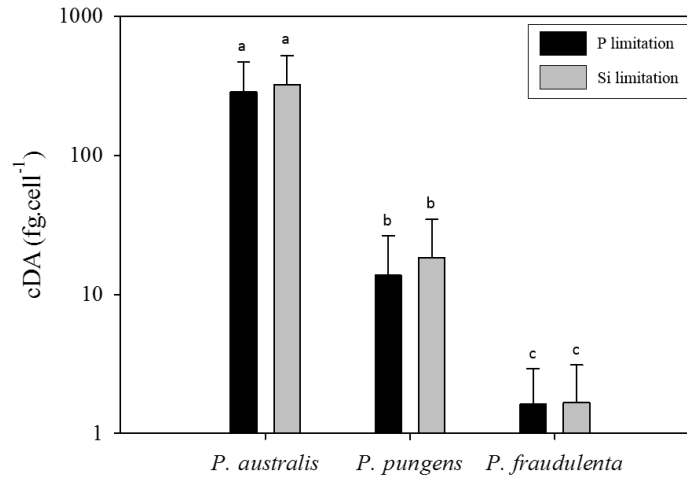


Figure S2.2. Cellular domoic acid content (cDA, fg.cell⁻¹, mean $\pm$ SD) under phosphate limitation (black bars) or silicate limitation (grey bars) in *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta*. The letters a, b and c indicate the significant differences ($P < 0.001$).

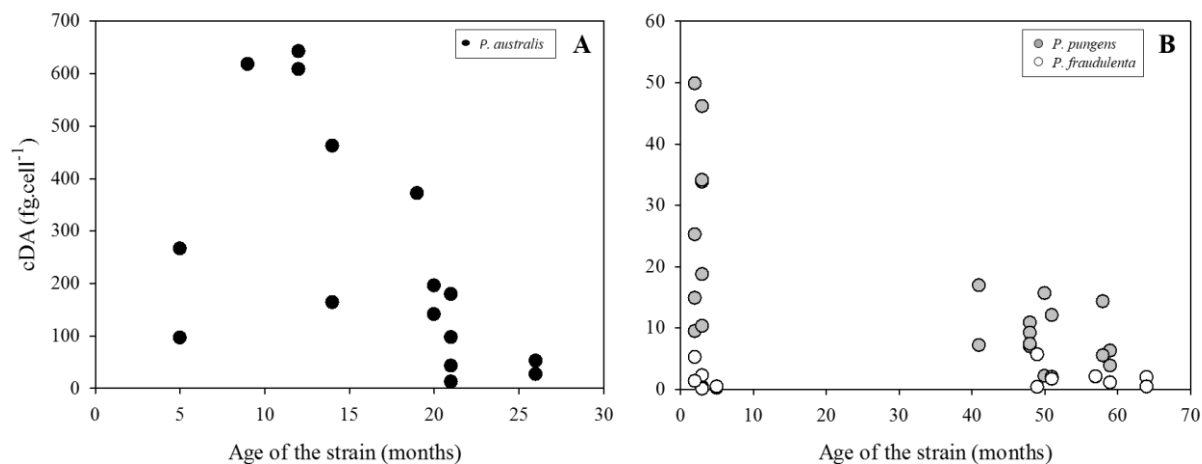


Figure S2.3. Cellular domoic acid content (cDA, fg.cell⁻¹) as a function of the age of the strain (months) since their isolation from natural populations: (A) in *P. australis* and (B) in *P. pungens* and *P. fraudulenta*.

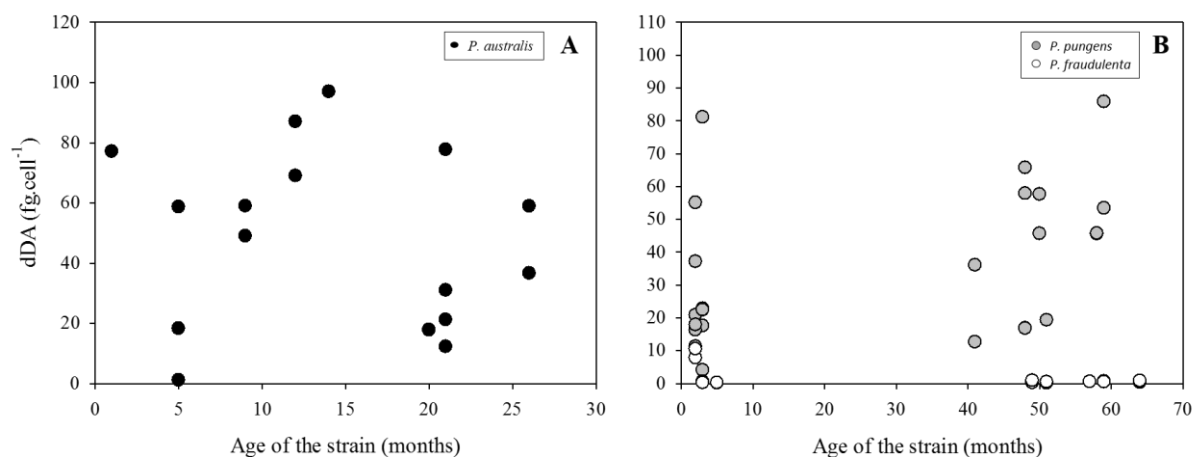


Figure S2.4. Dissolved domoic acid (dDA, fg.cell⁻¹) as a function of the age of the strain (months) since their isolation from natural populations: (A) in *P. australis* and (B) in *P. pungens* and *P. fraudulenta*.

*Physiological conditions favorable
to domoic acid production and
accumulation in three Pseudo-
nitzschia species*

Chez les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, les études physiologiques réalisées sont basées principalement sur une espèce, *Pseudo-nitzschia multiseries*, avec quelques études réalisées sur *P. australis* et *P. seriata*. A partir des résultats obtenus chez ces espèces, des généralités ont été émises afin de caractériser physiologiquement le genre *Pseudo-nitzschia*, en particulier concernant la toxicité. Or, des études montrent pourtant des variabilités interspécifiques en terme de physiologie. En particulier, d'après les résultats obtenus principalement chez *P. multiseries*, il est généralement admis que la production d'acide domoïque chez les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* augmente lors du ralentissement ou de l'arrêt de la croissance en conditions de limitation en silicates ou phosphates. Cependant, d'une part peu d'études se sont penchées sur la physiologie d'autres espèces et, d'autre part, il y a souvent confusion dans la littérature entre production d'acide domoïque et quotas cellulaires en acide domoïque. Enfin, une étude précédente sur une souche de *P. australis* de Baie de Seine démontre que cette espèce peut produire de l'acide domoïque en phase de croissance exponentielle, sans limitation en éléments nutritifs. Cela suggère que les mécanismes et dynamiques de production de toxine pourraient être différents selon les espèces.

Dans ce contexte, le **chapitre 3** présente la caractérisation de plusieurs traits physiologiques tels que la croissance, les quotas élémentaires, le contenu cellulaire en chlorophylle *a* et les capacités photosynthétiques chez *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*. L'objectif de cette étude était d'identifier les conditions physiologiques favorisant la production et l'accumulation d'acide domoïque, en particulier chez l'espèce *P. australis* responsable des événements ASP en Baie de Seine. *P. delicatissima* n'a pas non plus été étudiée lors de ces expériences du fait de sa très faible toxicité. Etant donné la variabilité intraspécifique observée dans le Chapitre 2, une approche multi-souche a aussi été utilisée et les souches ont été choisies selon les recommandations issues des résultats du Chapitre 2.

Sauvey A., Claquin P., Le Roy B., Fauchot J.

Physiological conditions favorable to domoic acid production and accumulation in three *Pseudo-nitzschia* species

1. Introduction

Diatoms are ubiquitous in the marine environment (Not et al. 2012), produce 40 % of the total primary productivity in the ocean, and play an essential role in the biogeochemical cycles of nitrogen, phosphorus, and silicon (Sarhou et al. 2005). However, they can have negative impacts on marine ecosystems when they cause harmful algal blooms (HABs). In 1987, following an amnesic shellfish poisoning (ASP) event on Prince Edward Island (Canada), Bates et al. (1989, 1998) discovered that the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* could produce a neurotoxin, domoic acid, that contaminated blue mussels (*Mytilus edulis*) and caused the death of three people. Among the fifty-one species of *Pseudo-nitzschia* described to date, 26 species are considered to be toxic, *i.e.* capable of producing domoic acid (DA) (Lelong et al. 2012, Lim et al. 2013, Orive et al. 2013, Teng et al. 2014, 2016, Li et al. 2017, 2018, Ajani et al. 2018, Frøsig Gai et al. 2018, Lundholm 2018). It is currently accepted that cellular DA increases in *Pseudo-nitzschia* species in the late exponential growth phase and in the stationary phase when cell division declines or ceases under silicate or phosphate limitation (Bates et al. 1991, 1998, Garrison et al. 1992, Pan et al. 1998, 2001, Cusack et al. 2002, Fehling et al. 2004, Besiktepe et al. 2008, Thessen et al. 2009, Amato et al. 2010, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Martin-Jézéquel et al. 2015). However, most physiological studies deal with one species, *P. multiseries*, while a few deal with *P. australis* and *P. seriata*. Most publications are focused on cellular DA concentrations, while only a few on *P. multiseries* and one on *P. pseudodelicatissima* really investigate DA production rates (Pan et al. 1996c, 2001). Contrasting results were obtained, with greater DA production rates during the stationary phase in *P. multiseries* and during the exponential phase in *P. pseudodelicatissima* (Pan et al. 1996c, 2001). Moreover, DA production by *P. multiseries* was inversely correlated with the growth rate. Therefore, it is currently accepted that DA is a secondary metabolite produced when cell division slows down or stops under nutrient limitation, and the cell metabolism is redirected to toxin production. However, in *P. australis*, *P. seriata*, and *P. multistriata*, significant intracellular DA concentrations were found in the lag and exponential growth phases when the growth rate was optimal and nutrients were not limiting (Garrison et al. 1992, Cusack et al. 2002, Fehling et al. 2004, Amato et al. 2010, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Thorel et al. 2014, Martin-Jézéquel et al. 2015). Different studies also highlighted that DA synthesis requires biogenic energy and a certain level of light suggesting that DA production is also linked to photosynthetic activity (Pan et al. 1998, Brunson et al. 2018). More work on DA

production rates and the physiological conditions favorable to it in the different *Pseudo-nitzschia* species involved in ASP events is therefore needed to grasp the potential diversity of the DA production dynamics. In addition, little attention has been paid to the dynamics of DA excretion by *Pseudo-nitzschia* cells, while there is increasing evidence of the potential adverse impacts of dissolved DA on marine organisms (Bargu et al. 2006, Liu et al. 2007, De Rijcke et al. 2015).

A large diversity of *Pseudo-nitzschia* species is observed on the French coast and more particularly in the English Channel, with the presence of *P. multiseriata*, *P. australis*, *P. pungens*, *P. fraudulenta*, *P. delicatissima*, *P. multistriata*, and *P. americana* (Klein et al. 2010, Downes-Tettmar et al. 2013, Thorel et al. 2017, Delegrange et al. 2018). *P. australis* was held responsible for ASP events in 2004, 2011, and 2012, causing the closure of great scallop (*Pecten maximus*) fishing areas (Nezan et al. 2006, Thorel et al. 2017). Therefore, the objective of this study was to finely characterize the dynamics of DA production and DA accumulation as a function of growth phases, so as to identify the physiological conditions favorable to toxin production. We conducted batch culture experiments to estimate several physiological traits along with DA measurements on *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*, three species representative of the *Pseudo-nitzschia* community of the French coastal waters. As the conditions influencing DA production have been related to nutrient limitations, growth rate variations and eventually to photosynthetic activity, the physiological traits followed were the growth rate, the elemental intracellular quotas, the Chl *a* cell content and the photosynthetic parameters. In addition, we chose a multi-strain approach to take the intraspecific diversity inherent to *Pseudo-nitzschia* species into account (Thessen et al. 2009, Sauvey et al. *submitted* , Chapter 2), and thus better characterize interspecific differences.

2. Materials and methods

2.1. Strains

One *P. australis* strain was isolated in Arcachon Bay (Atlantic coast, France). *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains came from the Bay of Seine (English Channel, France) (Table 3.1). The other strains were obtained by isolating initial cells produced during sexual reproduction experiments (Table 3.1).

Table 3.1. Strains of *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* used for mating and batch culture experiments. (A) for strains isolated from the Atlantic and (EC) for strains isolated from the English Channel. The age of the strain (in months, calculated from the date of isolation) and the cell size are indicated for each experiment. SR: Sexual reproduction.

Species	Strain information			Cell size length (µm)	Strain age (months)
	Collection reference	Origin (Sampling zone or crossing)	Isolation date		
<i>P. australis</i>	IFR-PAU-16.2	Arcachon Bay (A)	05/2016	67	10
	PNaus F1-4A	SR: P6B3 x P6C1	10/2014	55	24
	PNaus F1-5	SR: P6B3 x P1A3	10/2014	78	25
<i>P. pungens</i>	PNpun 146	Luc-sur-mer (EC)	06/2016	73	7
	PNpun 150	Luc-sur-mer (EC)	06/2016	60	18
	PNpun F1-7A	SR: 66 x 89	10/2015	157	7
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 144	Luc-sur-mer (EC)	07/2016	57	15
	PNfra 162	Saint-Vaast-la-Hougue (EC)	05/2016	76	10
	PNfra F1-14B	SR: 10 x 1	03/2016	85	20

Single cells or short chains were isolated using a micropipette, washed three times with filter-sterilized (0.2 µm) seawater, and incubated in 4-well culture plates in K/2-medium (Keller et al. 1987) enriched in Si(OH)₄ (54 µM) at a temperature of 16°C, an irradiance of 30 µmol photons.m⁻².s⁻¹, and a 14h:10h L:D light cycle. When the clonal culture was established, it was maintained in 15-ml ventilated flasks in K/2-medium + Si(OH)₄ in the same conditions. Cultures were not axenic, but they were periodically checked for bacterial development by optical microscopy observations, and hardly any bacteria were detected. *Pseudo-nitzschia* species were identified from measurements of frustule properties by transmission electron microscopy (TEM) and/or molecular sequencing of the entire internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) of the ribosomal RNA. For TEM observations, samples were cleaned to remove organic material according to Thorel et al. (2017). Before each experiment, the strains were observed under a Nikon Eclipse 80i light microscope equipped with a Nikon DS-Ri2 camera, and 20 cells were measured (length and width) using NIS-Elements Imaging Software. Cell size was calculated as the mean ± standard deviation of each batch of 20 cells (Lundholm et al. 2002).

2.2. Experimental protocol

The main objective of these experiments was to finely characterize the dynamics of domoic acid (DA) production along with cell physiological conditions (growth rate, elemental composition, photosynthetic parameters) in *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* during

the different growth phases. Before each experiment, each strain was acclimated to the experimental conditions, *i.e.* 16°C, 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and a 14h:10h L:D light cycle in growth chambers (Economic Delux, Snijders Scientific B.V., UK). The experiments were carried out in 2,000-ml polycarbonate Erlenmeyer flasks with 1,600 ml of K/2-medium + Si(OH)_4 modified to obtain silicate limitation in the stationary phase. DA production is obtained in *Pseudo-nitzschia* cultures after an exponential growth phase followed by quasi-exhaustion of Si which induces growth arrest (Pan et al. 1996a, 1996c, 1998, Fehling et al. 2004, Amato et al. 2010). The concentrations of nitrate (NO_3), phosphate (PO_4) and silicate (Si(OH)_4) in the culture medium were as follows: $932 \pm 32 \mu\text{M NaNO}_3$, $42 \pm 7 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$, and $53 \pm 6 \mu\text{M Na}_2\text{SiO}_3$. The experiments were carried out in triplicates. At the beginning of each batch experiment, an acclimated culture in the exponential growth phase was centrifuged (10 min, 800 g, 16°C) in order to add only cells to the culture medium without affecting nutrient concentrations. The initial cell concentration for all experiments was around $1.3.10^3 \text{ cells.ml}^{-1}$ ($\pm 0.3.10^3$). Samples were collected once a day in the early afternoon to analyze the following parameters: growth, chlorophyll *a*, nutrients, elemental composition, photosynthetic parameters, and domoic acid. At the end of the experiment, each flask still contained at least half of the initial volume of culture.

2.3. Cell concentrations and growth rates

Pseudo-nitzschia cell concentrations were estimated using a Nageotte counting chamber. Then growth rates (μ , day^{-1}) were calculated using the following equation (equation 1):

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Where *t* is time in days and X_1 and X_2 are cell concentrations (cells.ml^{-1}) at t_1 and t_2 , respectively.

The estimation of the exponential growth phase duration was made by determining the best coefficient of straight line (r^2) when plotting the logarithm of cell abundance as a function of the days of the experiment.

2.4. Chlorophyll *a* measurements

Samples for chlorophyll *a* (Chl *a*) measurements were collected by centrifugation (10 min, 3,000 g, 16°C) of 10 ml of culture and stored at -20°C until analysis. Chl *a* was extracted in 10 ml of 90 % (v/v) acetone overnight in the dark at +4°C. The Chl *a* concentrations expressed in $\mu\text{g.l}^{-1}$ were measured by Trilogy® Laboratory Fluorometer (Turner Designs, Sunnyvale, USA) according to the method of Lorenzen (1967).

2.5. Dissolved inorganic nutrient analysis

Samples for the determination of inorganic nutrient (nitrate, phosphate, and silicate) concentrations in the culture medium were filtrated on a 0.45- μm cellulose acetate membrane. Samples were stored at -20°C for the nitrate and phosphate assays and at +4°C for the silicate assay prior to analysis. Dissolved nutrients were quantified with an auto-analyzer (Technicon III) following standard protocols (Aminot and Kérouel 2007).

2.6. Elemental analysis

Samples for particulate organic carbon (POC), particulate organic nitrogen (PON), and particulate organic phosphorus (POP) measurements were collected by filtration of 10 ml of cultured cells on previously burned filters (4h at 450°C). Then, the filters were desiccated at 60°C overnight in a glass box that was also previously burned. The filters in the glass box were stored in a desiccator in the dark at room temperature until analysis. For POC and PON, the analyses were carried out an isotopic mass spectrometer coupled to an autoanalyzer. For POP, the analyses were carried out by the persulfate wet oxidation method developed by Pujo-Pay and Raimbault (1994). Samples for biogenic silica (BSi) analyses were collected by centrifugation of 10 ml of cultured cells (10 min, 3,000g, 16°C). Samples were stored at +4°C prior to analysis. BSi was determined by the method of Ragueneau and Tréguer (1994).

2.7. Photosynthetic parameter analysis

The photosynthetic parameters were obtained using a Multi-Color (MC)-PAM fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) coupled with Pam-Win-3 software by using the protocol of

Schreiber et al. (2012). Photosynthetic measurements were performed only at 440 nm as described by Morelle and Claquin (2018).

$\Sigma(II)_\lambda$ at $\lambda = 440$ nm measurements were performed by using the “single turnover” method available on the MC-PAM. This method enables estimation of the constant time of Q_A -reduction during the O-I1 rise and calculation of the functional absorption by using routine (Schreiber et al. 2012). The $\Sigma(II)_\lambda$ values in nm^2 were calculated on 3-ml samples.

For the maximum quantum yield of photosystem II (PSII), also called $Y(II)_{\max}$, a 3-ml sample was transferred to the measuring chamber after 10 minutes of dark acclimation. The sample was excited at a low measuring light frequency ($1 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $\lambda = 440$ nm) in order to measure the minimum fluorescence (F_0) prior to application of a saturation pulse ($2,500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $\lambda = 440$ nm) at maximum fluorescence (F_m), allowing the entire pool of quinones A (Q_A) to be reduced. The $Y(II)_{\max}$ ratio was calculated according to the following equation (equation 2, Schreiber et al. 2012) after subtraction of the blank measured on a sample of seawater filtered on Whatman GF/F filter paper:

$$Y(II)_{\max} = \frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (2)$$

The samples were then exposed to 14 increasing levels of blue light (E , $\lambda = 440$ nm) from 0 to $1,854 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at each step ($E = 0; 3; 22; 40; 59; 106; 145; 193; 269; 448; 669; 963; 1,317; \text{ and } 1,854 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). At each level of irradiance, the steady-state fluorescence (F_s) was measured and then, following a saturating flash of light, the maximum fluorescence (F'_m) was obtained. The maximum quantum efficiency of the PSII - $Y(II)$ - for each irradiance was determined according to the following equation (equation 3, Schreiber et al. 2012):

$$Y(II) = \frac{F'_m - F_s}{F'_m} \quad (3)$$

The relative electron transport rate (rETR, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) corresponds to a measurement of the linear electron transport rate through the PSII. For each irradiance (E), rETR was calculated using the following equation (equation 4):

$$rETR(E) = Y(II) \times E \quad (4)$$

P versus *E* curves. The relationships between $rETR(E)$ and irradiance (E) were investigated. In order to estimate the photosynthetic parameters, the mechanistic model of Eilers and Peeters (1988) was applied to the data using SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc. Chicago, USA). The model of Eilers and Peeters (1988) runs as follows (equation 5):

$$ETR(II)(E) = \frac{E}{aE^2 + bE + c} \quad (5)$$

From this model, the equation coefficients (a , b , and c) were extracted to calculate the maximum electron transport rate, $rETR_{max}$ in $\mu\text{mole} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (equation 6), the quantum efficiency of photosynthesis, α , which corresponds to the slope of the P/E curve (equation 7), and the minimum saturating irradiance, E_k , in $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (equation 8):

$$rETR_{max} = \frac{1}{b + 2\sqrt{ac}} \quad (6)$$

$$\alpha = \frac{1}{c} \quad (7)$$

$$E_k = \frac{c}{b + 2\sqrt{ac}} \quad (8)$$

Calculation of the electron transport rate. The electron transport rate ($ETR(II)_{max}$) by PSII - named ETR_C or ETR_{Chla} - was estimated using the σ_{PSII} values (nm^2) and was converted in $\text{mmole} \cdot \text{mgC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ or in $\text{mmole} \cdot \text{mgChla}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ according to the following equation from Schreiber et al. (2012) (equations 9 and 10):

$$ETR_C = \frac{rETR_{max} * \sigma_{PSII}}{F_v/F_m} * \frac{[PSII] * 36.10^5}{[C]} \quad (9)$$

$$ETR_{Chla} = \frac{rETR_{max} * \sigma_{PSII}}{F_v/F_m} * \frac{[PSII] * 36.10^5}{[Chla]} \quad (10)$$

[C] is the carbon concentration expressed in mg.ml^{-1} , [Chla] is the chlorophyll *a* concentration expressed in mg.ml^{-1} , and [PSII] is the concentration of the PSII reaction centers in PSII.ml^{-1} obtained as follows (equation 11):

$$[PSII] = \frac{[Chla] * L}{900 * 1000} \quad (11)$$

[Chla] is expressed in g.ml^{-1} assuming a molecular weight of 900 g.mol^{-1} *per* chlorophyll and a photosynthetic unit size of 1,000 molecules of chlorophyll *per* electron transport chain as described by Schreiber et al. (2012), and L is Avogadro's constant ($L = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

From ETR_C and ETR_{Chla} , ETR_{C-MAX} and $\text{ETR}_{Chla-MAX}$ were determined as the maximum of the electron transport rate for each strain studied.

2.8. Domoic acid

Samples for DA measurements were taken daily. A 10-ml aliquot was taken from each flask, centrifuged, and the supernatant was recovered for extracellular dissolved DA (dDA) measurements. A second 10-ml aliquot was sonicated on ice with a sonication probe (Bioblock Scientific Vibracell 72442 ultrasons) for 4 minutes to disrupt cell membranes and release DA from the cells, and filtered on a $0.2\text{-}\mu\text{m}$ filter (33 mm, cellulose acetate membrane). This fraction was used to measure total DA (tDA). The samples were frozen at -20°C prior to analysis. DA quantification was performed using an ASP ELISA kit (Biosense Laboratories, Bergen, Norway) following the manufacturer's instructions. Each sample was analyzed in duplicate for quality control purposes. The absorbance was measured using a microplate spectrophotometer (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc) equipped with a 450-nm filter.

The cellular domoic acid content ($cDA, \text{pg.cell}^{-1}$) was calculated from tDA and dDA (in pg.ml^{-1}) normalized to the cell concentration (cells.ml^{-1}) as follows (equation 12):

$$cDA = \frac{tDA - dDA}{\text{cell concentration}} \quad (12)$$

The production of total, cellular, and dissolved domoic acid (tDA production, cDA production or dDA production) was determined using the following equations from Pan et al. (2001) (equations 13, 14, and 15):

$$tDA\ production = \frac{tDA_2 - tDA_1}{0.5 * (CC_1 + CC_2) * (t_2 - t_1)} \quad (13)$$

$$cDA\ production = \frac{cDA_2 - cDA_1}{0.5 * (CC_1 + CC_2) * (t_2 - t_1)} \quad (14)$$

$$dDA\ production = \frac{dDA_2 - dDA_1}{0.5 * (CC_1 + CC_2) * (t_2 - t_1)} \quad (15)$$

Where tDA, cDA, or dDA production is domoic acid production (pg.cell⁻¹.day⁻¹), t is time in days, tDA₁ and tDA₂, cDA₁ and cDA₂, dDA₁ and dDA₂ are cellular domoic acid (pg.ml⁻¹), and CC₁ and CC₂ are cell concentrations (cells.ml⁻¹) at t₁ and t₂, respectively.

2.9. Statistical analyses

After testing the normality and homoscedasticity of the data, ANOVA was used to test differences in physiological parameters among the three species using the “car” package in R version 3.5.1. Spearman’ rank correlations were used to study the relationship between physiological parameters using the “cor” package in R. Correlograms were used to present significant Spearman correlation coefficients for each pair of parameters. These correlograms were performed using the “corrplot” package in R. The correlation matrices were reordered according to correlation coefficients using hierarchical clustering. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$ in all tests.

3. Results

3.1. Biomass dynamics, growth rates, and nutrient concentrations

The biomass dynamics of all three strains followed the classical logistic growth pattern for batch cultures (Fig. 3.1A, 3.1B, 3.1C). A lag phase of one to six days, corresponding to the absence of a biomass increase, was observed only in the strains derived from sexual reproduction. The exponential growth phases lasted four to nine days depending on the strains, without any difference among species. The mean specific growth rates during this period did not present any significant intraspecific (strain-related) or interspecific differences and ranged between 0.35 and 0.57 day⁻¹ (Table 3.2). The average maximum biomass was 31.10³ cells.ml⁻¹ for *P. australis*, 27.10³ cells.ml⁻¹ for *P. pungens*, and 42.10³ cells.ml⁻¹ for *P. fraudulenta*. Except for *P. pungens*, the maximum cell concentrations did not differ among the three strains of each species. Therefore, the species did not significantly differ in growth dynamics, whether in terms of maximum cell concentrations or specific growth rates.

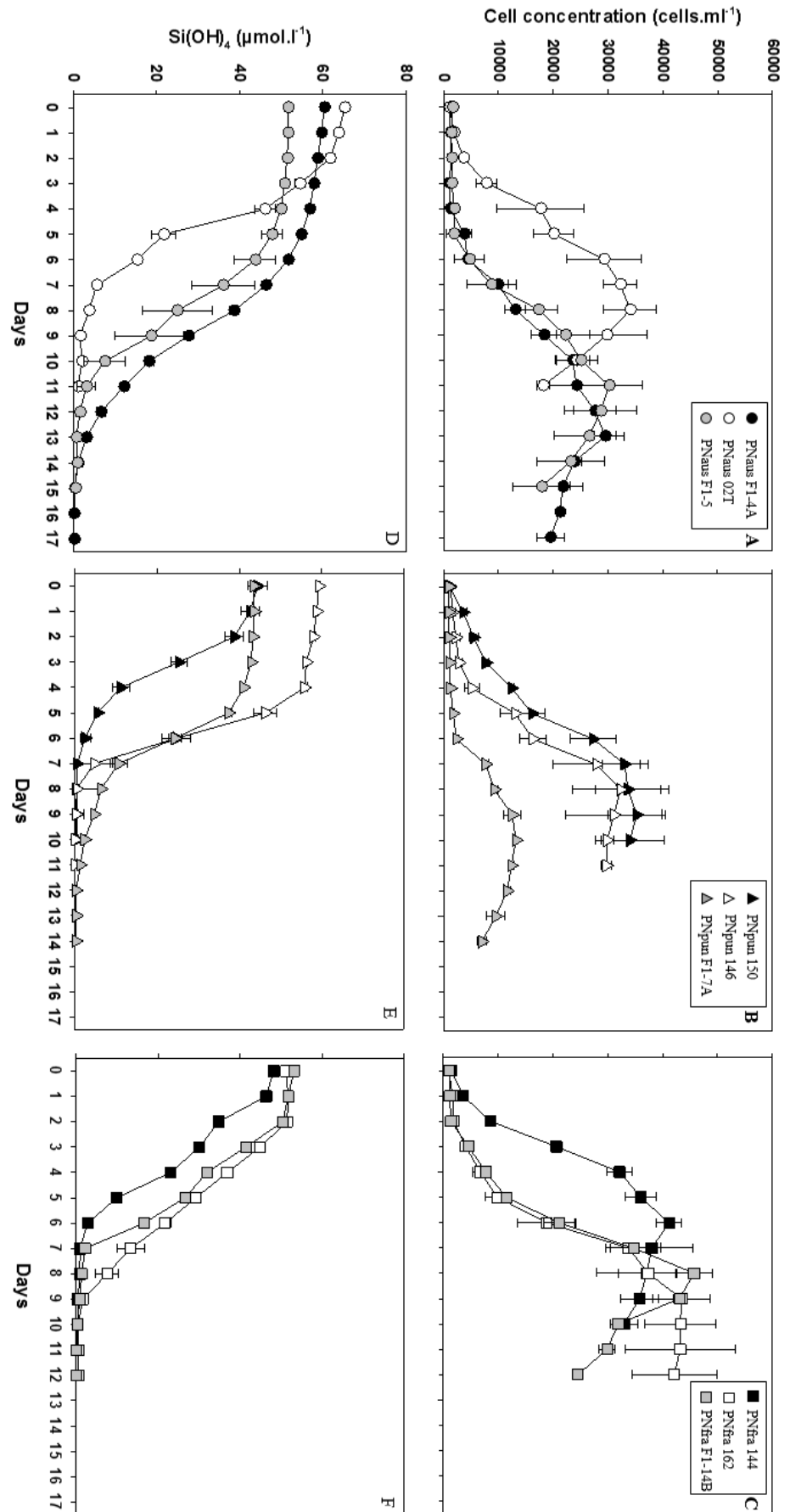


Figure 3.1. Variation of cell concentrations and silicate concentrations over time during the batch cultures for *P. australis* (A and D), *P. pungens* (B and E), and *P. fraudulenta* (C and F). Means $\pm$ SE (n = 3).

Table 3.2. Specific growth rates (means $\pm$ SE) estimated during the exponential growth phase, and elemental quotas (minima and maxima) measure during the batch cultures.

Species	Strains	Growth rate (μ , day ⁻¹)	POC (μ mol.cell ⁻¹)	PON (μ mol.cell ⁻¹)	POP (μ mol.cell ⁻¹)	BSi (μ mol.cell ⁻¹)
<i>P. australis</i>	IFR-PAU-16.2	0.44 $\pm$ 0.03	10.5 – 119	1.85 – 17.11	0.18 – 2.17	1.53 – 4.26
	PNaus F1-4A	0.36 $\pm$ 0.03	9.9 – 64.4	1.56 – 8.46	0.16 – 0.71	1.33 – 9.80
	PNaus F1-5	0.43 $\pm$ 0.03	11.3 – 94.4	1.93 – 13.6	0.15 – 2.49	1.37 – 7.46
<i>P. pungens</i>	PNpun 146	0.40 $\pm$ 0.02	4.55 – 38.02	0.73 – 7.54	0.19 – 0.89	0.59 – 4.08
	PNpun 150	0.37 $\pm$ 0.04	5.48 – 82.9	1.11 – 9.86	0.17 – 1.87	0.69 – 2.83
	PNpun F1-7A	0.35 $\pm$ 0.02	19.00 – 132.6	2.82 – 14.26	0.27 – 2.59	1.50 – 13.50
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 144	0.57 $\pm$ 0.02	4.13 – 37.6	0.62 – 5.57	0.08 – 0.76	0.33 – 1.98
	PNfra 162	0.41 $\pm$ 0.06	5.60 – 94.4	0.90 – 14.04	0.23 – 1.55	0.59 – 8.77
	PNfra F1-14B	0.51 $\pm$ 0.01	5.60 – 66.3	1.01 – 16.07	0.13 – 3.97	0.62 – 4.60

The growth rate was significantly correlated to the silicate and nitrate concentrations in *P. australis* and *P. fraudulenta* ($P < 0.05$, Fig. 3.2A and 3.2C). Moreover, the arrest of cell division coincided with low silicate concentrations (maximum 1.6 μ M, Fig. 3.1D, 3.1E, 3.1F, and 3.3A) for all strains, while the phosphate and nitrate concentrations were still replete (15 and 250 μ M minimum, respectively, Fig. 3.3B and 3.3C). Silicate concentrations in the culture medium when growth stopped were significantly higher in *P. australis* cultures (between 0.76 and 1.61 μ M, $P < 0.01$) than in *P. pungens* (0.12 - 0.48 μ M) and *P. fraudulenta* (0.16 - 0.97 μ M, Fig. 3.3A) cultures. This result shows that *P. australis* did not grow under the same low silicate concentrations as the other two species. Phosphate concentrations at growth arrest (Fig. 3.3B) showed that *P. fraudulenta* used significantly less phosphate for their growth ($P < 0.05$) than the other two species. In contrast, *P. australis* strains used more nitrate for their growth (Fig. 3.3C), even if their growth stopped when silicate concentrations were higher than in *P. pungens* and *P. fraudulenta* cultures. Therefore, despite similar growth dynamics across the three species, our results suggest that *P. australis* exhibited distinctive characteristics related to the use of silicate and nitrate.

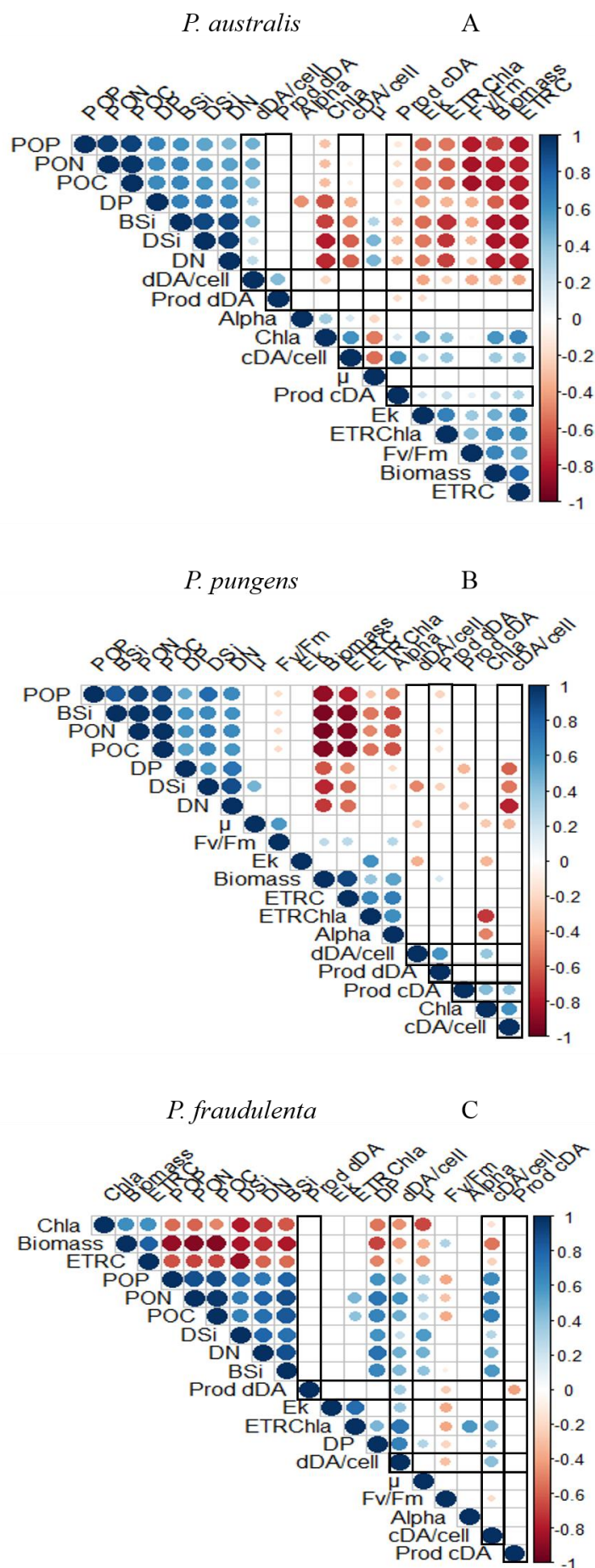


Figure 3.2. Spearman correlation matrices between physiological parameters and cDA and dDA cellular concentrations and production rates in *P. australis* (A), *P. pungens* (B), and *P. fraudulenta* (C). Color dots indicate correlations at the $P < 0.05$ level. Blue dots represent positive correlations whereas red dots represent negative correlations. Color depth and size of the dots indicate the correlation strength. Each correlation matrix is ordered according to the correlation coefficient (hierarchical clustering). Biomass: cell concentration; μ : growth rate; Yield: F_v/F_m ; DP, DSI, and DN: phosphate, silicate, and nitrate concentrations in the culture medium; BSi: biogenic silica; POP: particulate organic phosphorus; PON: particulate organic nitrogen; POC: particulate organic carbon; Chla: chlorophyll *a* concentration *per cell*; E_k : minimum saturating irradiance; ETR: electron transport rate; Alpha: efficiency of photosynthesis; cDA/cell: cellular domoic acid concentration; dDA/cell: dissolved domoic acid concentration *per cell*; Prod dDA: dDA production; Prod cDA: cDA production.

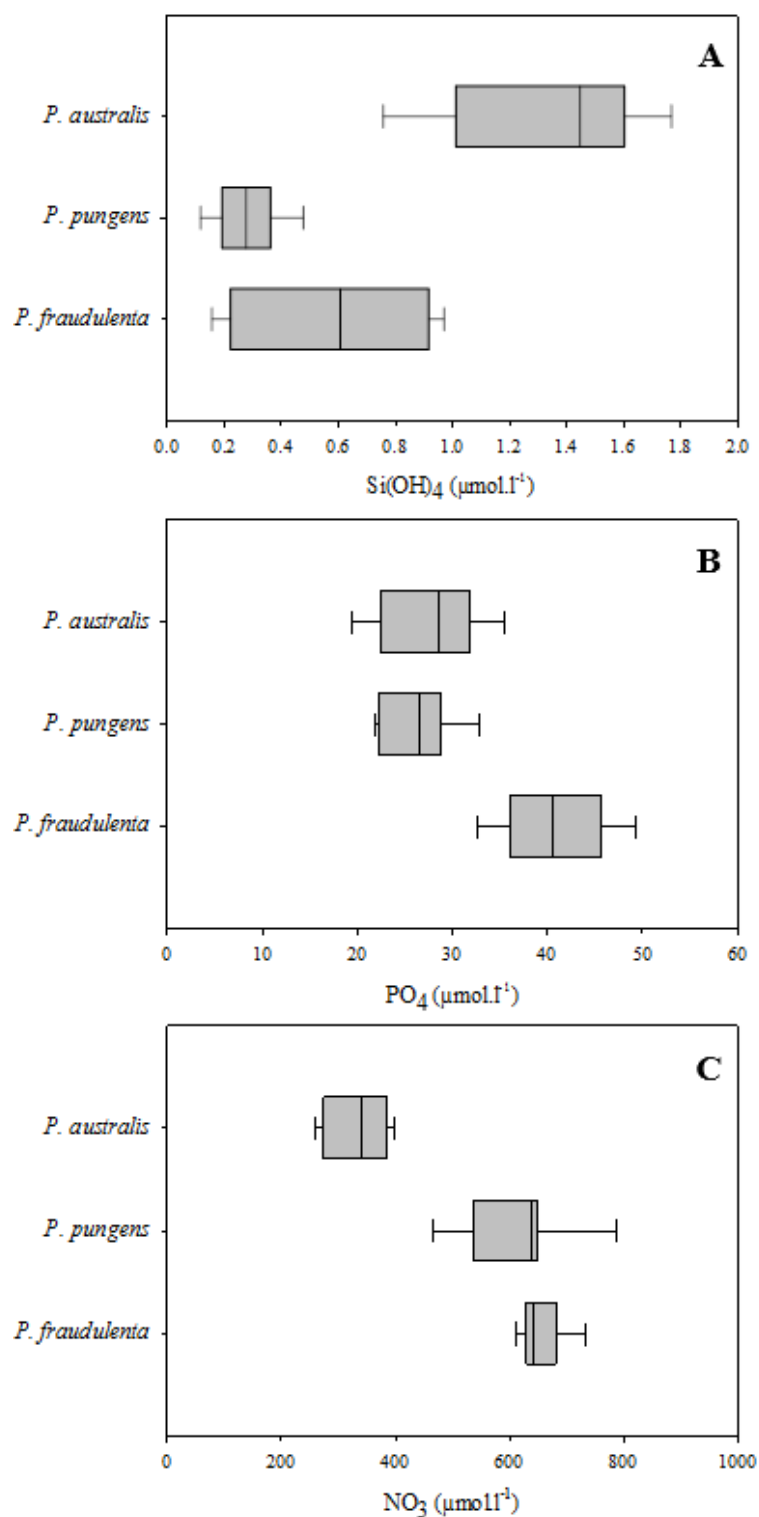


Figure 3.3. Silicate (A), phosphate (B), and nitrate (C) concentrations in the culture medium when cell growth stopped. The boxplots present the medians (midlines), the 25th and 75th percentiles (boxes) and the extrema (whiskers) for all replicates of all strains for each species.

3.2. Physiological parameters

3.2.1. Elemental ratios

POC, PON, POP, and BSi contents decreased throughout all batch cultures (Supplementary Fig. 3.1). Their dynamics according to growth phases followed the same pattern for all three species. They were relatively high during the lag phase, decreased rapidly during the exponential phase of growth, and then they stabilized while entering the stationary phase. According to Spearman correlation analyses, elemental quotas were positively correlated with the silicate, phosphate, and nitrate concentrations ($P < 0.05$, Fig. 3.2A, 3.2B, 3.2C). Quotas were higher in large-size strains at the beginning of the experiment (Supplementary Fig. 3.1). However, there was no significant difference in elemental quotas among the three species: POC quotas ranged between 4.1 and 133 $\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$, PON quotas between 0.62 and 17 $\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$, POP quotas between 0.08 and 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$, and BSi quotas between 0.3 and 13.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$ (Table 3.2). The elemental ratios calculated from these cell quotas during the exponential growth phase are presented in Figure 3.4. These elemental ratios did not highlight any difference among the three species. Globally, POC:PON ratios were consistent with the Brzezinski ratio (1985). But BSi:PON, POC:POP, PON:POP, and BSi:POP were lower than Brzezinski ratios, and POC:BSi was higher. It is also worth noting that the highest POC:POP, PON:POP, BSi:PON, and BSi:POP ratios were recorded for *P. australis* (Fig. 3.4B, 3.4D, 3.4E, 3.4F). Minimum quotas of BSi ($Q_{0\text{BSi}}$) were also estimated for each strain when growth stopped; they were significantly higher in *P. australis* than in *P. pungens* and *P. fraudulenta* ($P < 0.001$, Fig. 3.5). These observations about elemental cell contents and ratios suggest differences in nutrient requirements among the three species.

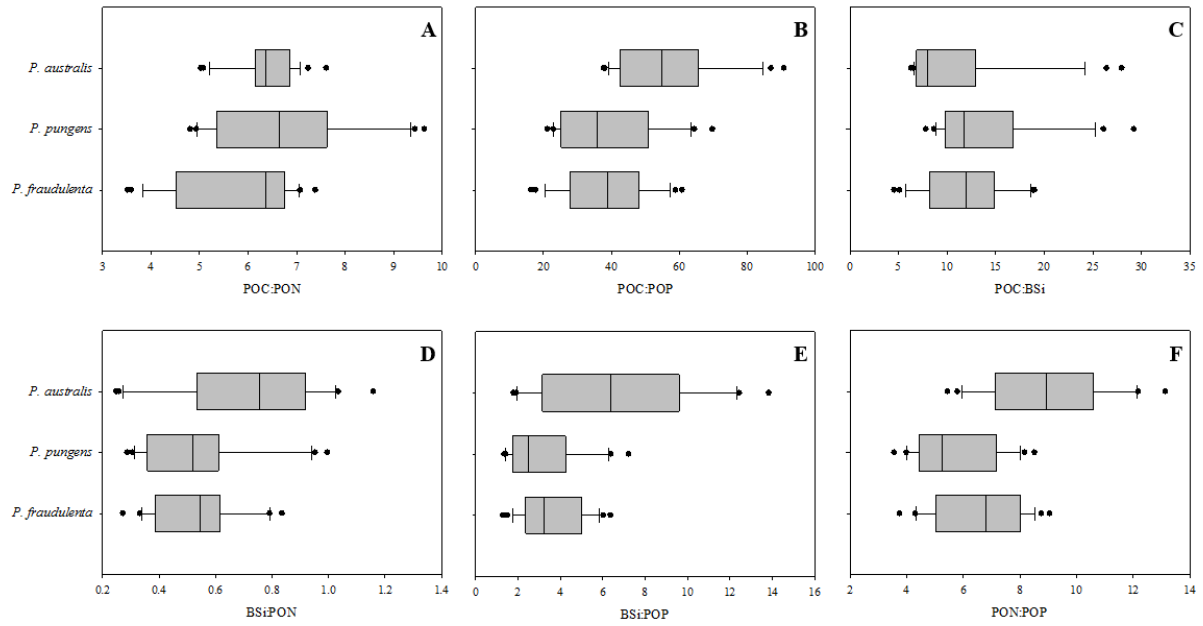


Figure 3.4. Mean elemental ratios during the exponential growth phase in each *Pseudo-nitzschia* species: POC:PON (A), POC:POP (B), POC:BSi (C), BSi:PON (D), BSi:POP (E), and PON:POP (F). The boxplots present the medians (midlines), the 25th and 75th percentiles (boxes), the extrema (whiskers) and the outliers for all replicates of all strains for each species.

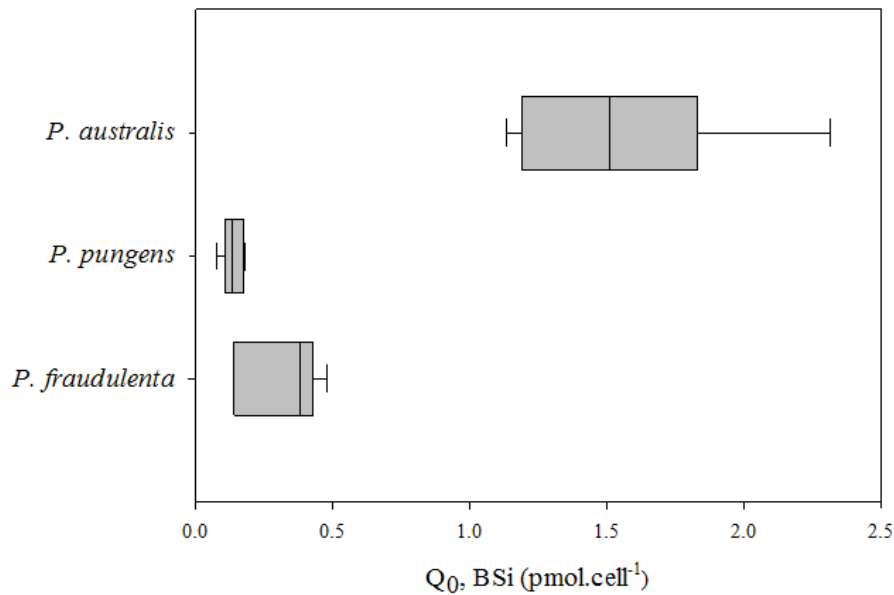


Figure 3.5. Minimum BSi quotas measured when cell growth stopped in *P. australis*, *P. pungens* and *P. fraudulenta*. The boxplots present the medians (midlines), the 25th and 75th percentiles (boxes) and the extrema (whiskers) for all replicates of all strains for each species.

3.2.2. Chlorophyll *a* cell content

The Chl *a* cell content increased during the batch cultures, and then stabilized or decreased during the stationary phase in some strains (Supplementary Fig. 3.1). Chl *a* to carbon ratio increased during the exponential growth phase and continue to increase or stabilize during stationary phase (data not shown). Chl *a* to carbon ratios were not significantly different between the three species (2 - 77 for *P. australis*, 0.5 - 36 for *P. pungens* and 0.9 - 60 for *P. fraudulenta*). Spearman correlation analyses showed significant negative correlations between the Chl *a* cell content and the growth rate ($P < 0.05$, Fig. 3.2A, 3.2B, 3.2C). In addition, chlorophyll *a* cell contents were significantly higher (3.6 to 13.3 pg.cell⁻¹) in all *P. australis* strains than in *P. pungens* and *P. fraudulenta* (0.7 to 4.7 pg.cell⁻¹ and 0.7 to 5.5 pg.cell⁻¹, respectively, Fig. 3.6). It appears from these results that *P. australis* cells contained more chlorophyll *a* than *P. pungens* or *P. fraudulenta* cells.

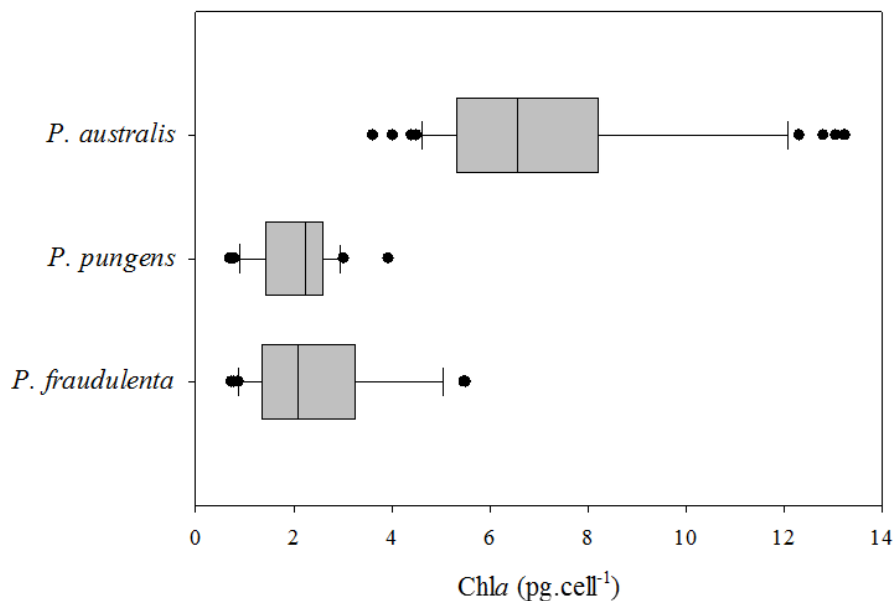


Figure 3.6. Chl *a* cell content of each *Pseudo-nitzschia* species. The boxplots present the medians (midline), the 25th and 75th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch culture.

3.2.3. Photosynthetic parameters

The maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m) followed the same pattern in all strains throughout the experiment (data not shown). F_v/F_m increased during the lag phase from 0.40 to around 0.68, and then it remained above 0.50 during the exponential and stationary phases, indicating a good physiological acclimation of the cells to the growth conditions.

The maximum electron transport rate ($ETR(II)_{max}$), which corresponds to the maximum photosynthetic capacity, increased during the exponential phase of growth, and then stabilized or decreased during the stationary phase in all strains (Supplementary Fig. 3.2). The maximum electron transport rate $ETR(II)_{max}$ was negatively correlated with nutrient concentrations ($P < 0.05$ in *P. australis* and *P. fraudulenta*, Fig. 3.2A, 3.2C). Globally, no significant difference in photosynthetic capacity among the three species emerged throughout the experiment. However, when ETR_{C-MAX} was expressed *per* unit of carbon (Fig. 3.7A), it was interesting to note that *P. australis* presented the highest maximum electron transport rates - $0.38 \text{ mmole} \cdot \text{mgC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ - while *P. fraudulenta* was characterized by much lower photosynthetic capacities (maximum around $0.05 \text{ mmole} \cdot \text{mgC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). In contrast, when expressed *per* unit of chlorophyll *a* (Fig. 3.7B), *P. australis*, with its high Chl *a* cell content, did not exhibit the highest photosynthetic capacity. Differences in Chl *a* cell content may therefore result in higher photosynthetic capacities in *P. australis* cells.

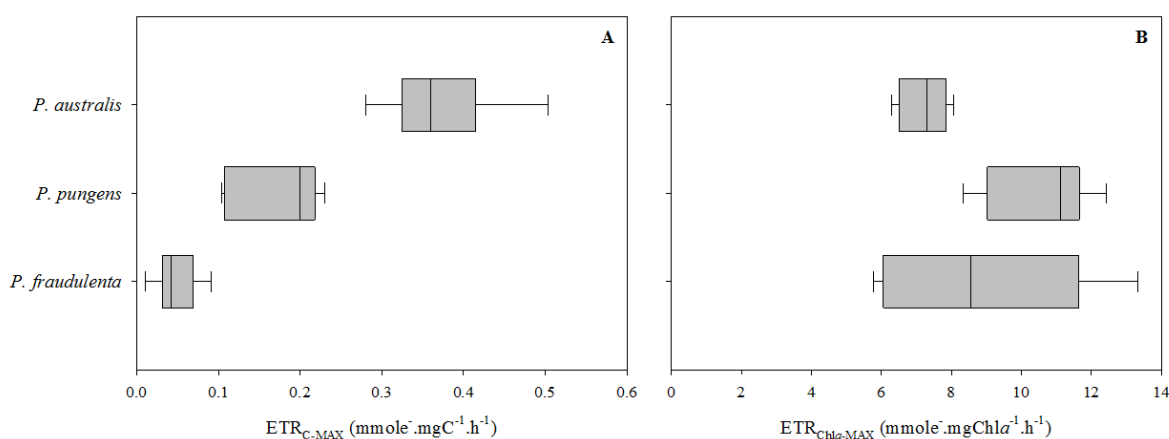


Figure 3.7. Maximum electron transport rates (ETR_{MAX}) expressed *per* unit of carbon (A) or *per* unit of Chl *a* (B) of the three *Pseudo-nitzschia* species. The boxplots present the medians (midlines), the 25th and 75th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch culture.

Photosynthetic efficiency - α - increased at the beginning of the exponential growth phase and then decreased at the end of this phase and during the stationary phase (Supplementary Fig. 3.2). In *P. australis*, photosynthetic efficiency ranged between 0.18 and 0.37 $\text{mmole}^{-1}.\text{mgC}^{-1}.\text{h}^{-1}.$ $(\mu\text{mol photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1})^{-1}$ (Fig. 3.8A). The photosynthetic efficiency of *P. pungens* and *P. fraudulenta* ranged between 0.14 and 1.02 $\text{mmole}^{-1}.\text{mgC}^{-1}.\text{h}^{-1}.$ $(\mu\text{mol photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1})^{-1}$ and between 0.25 and 0.74 $\text{mmole}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{h}^{-1}.$ $(\mu\text{mol photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1})^{-1}$, respectively. There was no significant difference among the three species, although one *P. pungens* strain occasionally presented higher photosynthetic efficiency.

The minimum saturating light intensity, E_k , tended to decrease during the lag phase or at the beginning of the exponential growth phase, and to increase or remain stable during the stationary phase (Supplementary Fig. 3.2). In *P. australis*, the minimum saturation light intensities were often greater than 100 $\mu\text{mol photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ during the exponential and stationary phases. Therefore, the light intensity during the experiments was not always saturating for *P. australis* strains. In contrast, E_k was constantly below 100 $\mu\text{mol photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for *P. pungens* and *P. fraudulenta*. The light conditions were therefore saturating for all *P. pungens* and *P. fraudulenta* strains (Fig. 3.8B).

To sum up, the characterization of all these physiological parameters highlights a few peculiarities of *P. australis*, in particular as far as elemental ratios, nutrient requirements, and photosynthetic activity are concerned.

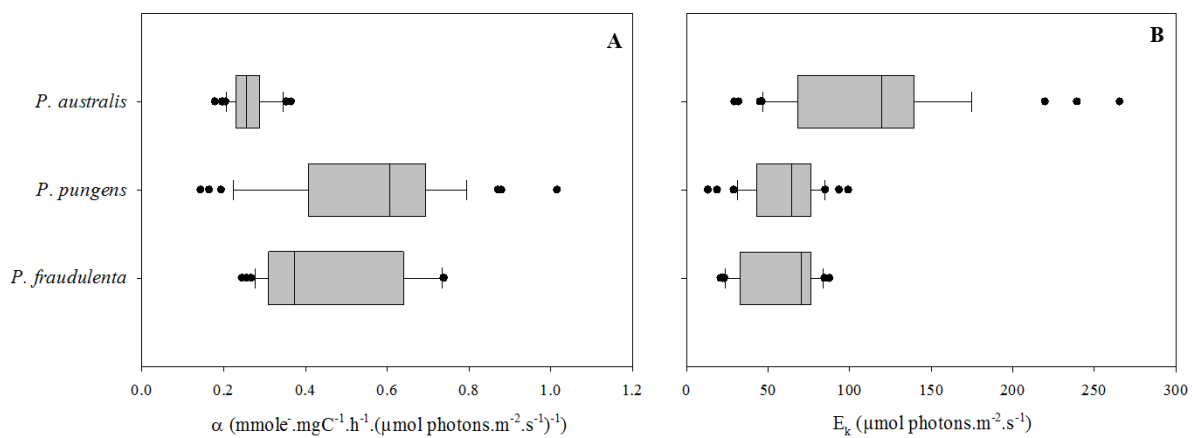


Figure 3.8. Photosynthetic efficiency (α) and minimum saturating light intensity (E_k) of the three *Pseudo-nitzschia* species. The boxplots present the medians (midlines), the 25th and 75th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch culture.

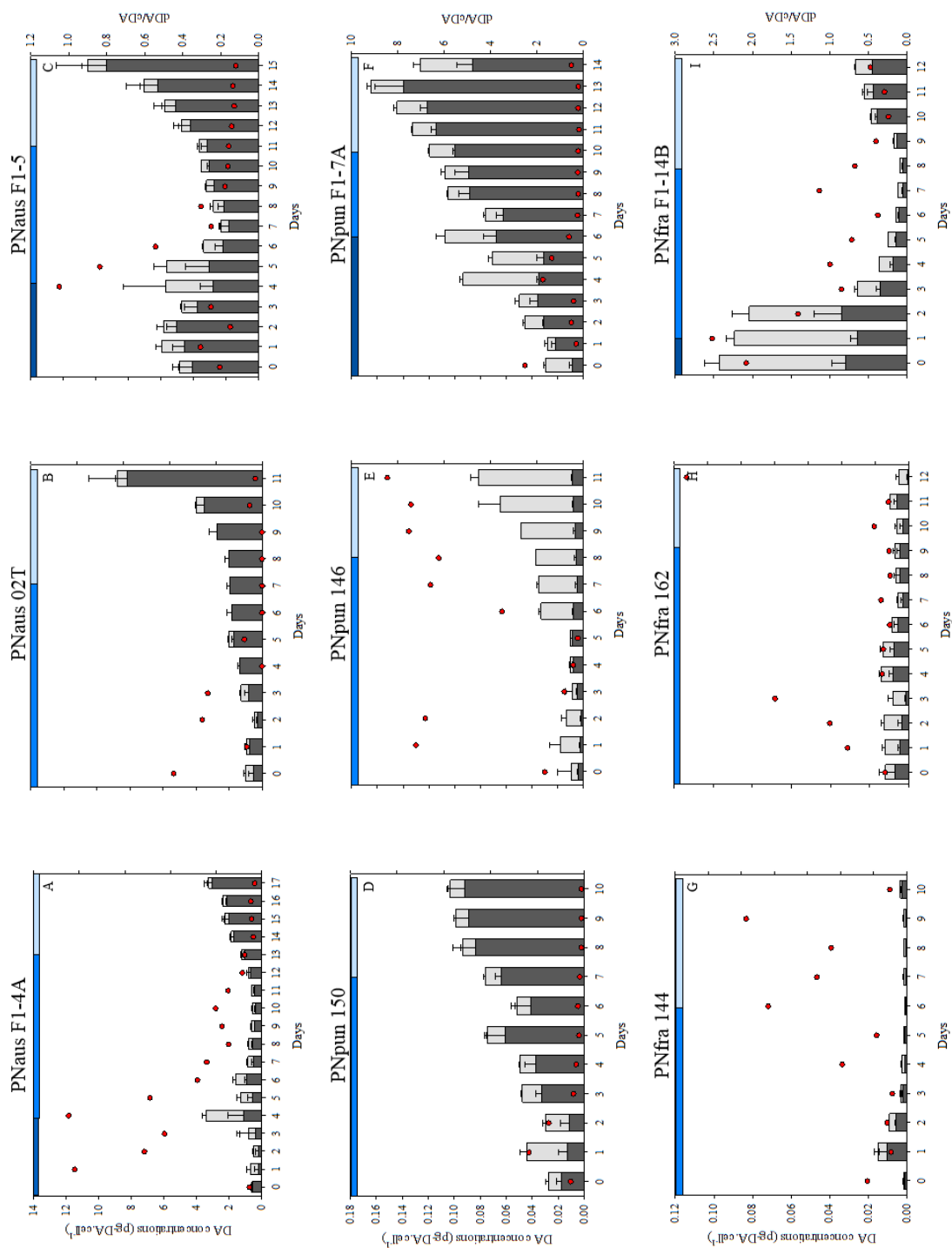


Figure 3.9. Variation of DA concentrations per cell (intracellular DA - cDA - in black, extracellular dissolved DA - dDA - in grey) and dDA:cDA ratios (red rounds) over time during the batch cultures in *P. australis* strains (A, B, C), *P. pungens* strains (D, E, F), and *P. fraudulenta* strains (G, H, I). Means $\pm$ SE (n = 3).

3.2.4. Domoic acid

The cellular DA quotas (cDA) and the extracellular dissolved DA (dDA) concentrations *per* cell were measured for each strain (Fig. 3.9). All strains produced domoic acid (DA) under our experimental conditions. The maximum cDA concentrations were 7.13 pg-cDA.cell⁻¹ for *P. australis*, 0.23 pg-cDA.cell⁻¹ for *P. pungens*, and 0.03 pg-cDA.cell⁻¹ for *P. fraudulenta* (Fig. 3.9). High cDA concentrations were characteristic of the stationary phase in *P. australis* and *P. pungens* (except for one *P. pungens* strain where cDA hardly varied, Fig. 3.9E). In *P. fraudulenta*, little variation of cDA concentrations was observed: only one strain exhibited higher cDA concentrations in the first days (Fig. 3.9I). In *P. australis*, cDA concentrations were positively correlated to photosynthetic parameters (ETR_C and E_k) and to the Chl *a* cell content, but it was negatively correlated to inorganic nutrient concentrations, the growth rate, and BSi quotas ($P < 0.05$, Fig. 3.2A). In *P. pungens*, cDA *per* cell was negatively correlated to inorganic nutrient concentrations and to the growth rate ($P < 0.05$, Fig. 3.2B). cDA *per* *P. fraudulenta* cell was positively correlated to inorganic nutrient concentrations ($P < 0.05$, Fig. 3.2C). Therefore, DA accumulation in the intracellular pools of *P. australis* and *P. pungens* was favored in the stationary phase under decreasing nutrient concentrations that resulted in a lower growth rate. In *P. australis*, DA accumulation was also favored when cells exhibited high photosynthetic capacities.

Maximum dDA concentrations in the culture medium were 28.13 ng.ml⁻¹ or 2.33 pg-dDA.cell⁻¹ for *P. australis*, 2.15 ng.ml⁻¹ or 0.07 pg-dDA.cell⁻¹ for *P. pungens*, and 0.21 ng.ml⁻¹ or 0.07 pg-dDA.cell⁻¹ for *P. fraudulenta* (data not shown). The proportions of dDA as compared to cDA are presented in Figure 3.9. In *P. australis*, DA was mostly present in the intracellular pool: the dDA / cDA ratio was mostly below 1, except for one strain during the lag phase (Fig. 3.9A, 3.9B, 3.9C). By contrast, in *P. pungens* dDA concentrations were up to eight times higher than cDA concentrations (Fig. 3.9D, 3.9E, 3.9F). However, the highest dDA concentrations (and the highest dDA / cDA ratios) mostly came from one of the *P. pungens* strains (Fig. 3.9E). In *P. fraudulenta*, the dDA / cDA ratio was close to 1, except on some occasions (Fig. 3.9G, 3.9H, 3.9I). dDA was recorded in the *P. australis* culture medium mostly during the lag phase and at the beginning of the exponential phase of growth (Fig. 3.9). In the other two species, dDA concentrations were in the same order of magnitude during all growth phases; only one *P. fraudulenta* strain was characterized by high dDA concentrations during the lag phase and the

beginning of the exponential phase (Fig. 3.9I). It is interesting to note that for *P. australis*, dDA concentrations and the photosynthetic parameters (F_v/F_m , ETR_C , $ETR_{Chl a}$ and E_k) were negatively correlated ($P < 0.05$, Fig. 3.2A). dDA concentrations *per P. australis* cell increased when ETR was low, especially during the lag phase or the beginning of the exponential growth phase (days 1 to 5, Fig. 3.9A, 3.9B, 3.9C, and Supplementary Fig. 3.2A). This result suggests that dDA concentrations increased when *P. australis* cells exhibited lower physiological state and photosynthetic capacities.

Using the daily recording of cDA and dDA concentrations, we calculated daily tDA production rates, but also cDA and dDA production rates (Fig. 3.10 and Supplementary Fig. 3.3). These calculations enabled us to really apprehend the variations in production rates and not only variations in quotas. Significant differences in total DA production were observed among the three species ($P < 0.001$, Fig. 3.10). *P. australis* production was one order of magnitude higher than *P. pungens* production, which was also one order of magnitude higher than *P. fraudulenta* production. The maximum total DA production levels were 2.95, 0.07, and 0.03 pg-DA.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*, respectively. The maximum cDA and dDA production rates were 2.16 and 1.27 pg-DA.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. australis*, 0.06 and 0.05 pg-DA.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. pungens*, and 0.03 and 0.01 pg-DA.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. fraudulenta*, respectively. It is worth noting that negative dDA production rates were estimated (Supplementary Fig. 3.3), suggesting degradation of DA in the culture medium. The observed production dynamics first showed that all three species produced cDA and dDA through all growth phases (Supplementary Fig. 3.3), although *P. pungens* produced cDA overall during the exponential growth phase. However, DA production rates and dynamics varied among strains within each species, and showed significant intraspecific variability. Second, the dynamics of cDA and dDA production appeared to be inversely proportional. Spearman correlation analyses revealed a significant negative correlation between the two productions, at least for *P. australis* and *P. fraudulenta* (Fig. 3.2A, 3.2C). When cells produced large amounts of cDA, little dDA was usually produced at the same time (Supplementary Fig. 3.3).

The measurements of different physiological parameters during the experiments made it possible to study how cDA and dDA production rates correlated with different indicators of the cell metabolism for each species. In *P. australis*, cDA production increased when cell elemental quotas (POP, POC, PON, BSi) and nutrient (nitrate, phosphate, and silicate) concentrations decreased and when photosynthetic parameters (E_k , Chl *a*, ETR_C or $ETR_{Chl a}$) increased ($P <$

0.05, Fig. 3.2A). In *P. pungens*, few correlations were found between cDA production and physiological parameters (Fig. 3.2B). cDA production only correlated positively with the Chl *a* cell content and negatively with the nitrate and phosphate concentrations. Finally, in *P. fraudulenta*, cDA production was not correlated with any of the physiological parameters (Fig. 3.2C). No significant correlation was found between cDA production and the growth rate in any of the three species, whereas the cDA concentration *per cell* was negatively correlated with the growth rate in *P. australis* and *P. fraudulenta*. It is worth noting that all the correlations between cDA production and physiological parameters exhibited relatively low correlation coefficients. As far as dDA production is concerned, very few correlations were found. In *P. pungens*, dDA production negatively correlated with elemental quotas and silicate, and positively correlated with the maximum photosynthetic capacity. In contrast, *P. fraudulenta* dDA production was negatively correlated with F_v/F_m . In *P. australis*, no correlation was found between dDA production and any of the physiological parameters. These results show that dDA production did not relate to the cell metabolism in the same way as cDA production.

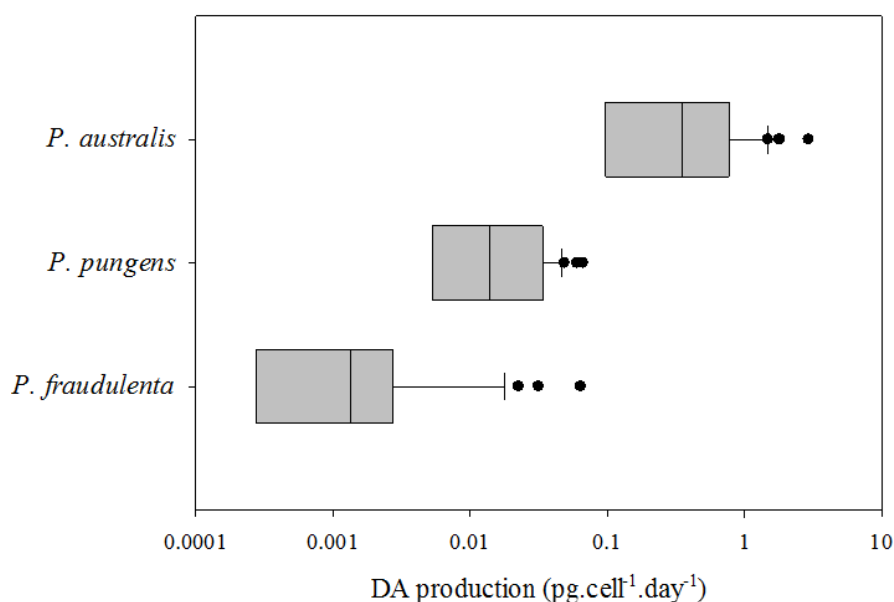


Figure 3.10. Total DA (tDA) production rates *per cell* calculated for the three *Pseudo-nitzschia* species. The boxplots present the medians (midlines), the 25th and 75th percentiles (boxes), the extrema (whiskers), and the outliers for all replicates of all strains for each species throughout the batch cultures.

4. Discussion

By finely monitoring numerous physiological parameters along with the intracellular and extracellular DA concentrations in several strains of *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*, we drew a physiological portrait of these species. Furthermore, calculating production rates highlighted the distinctive conditions favorable to cDA production as compared to cDA accumulation in the highly toxic *P. australis*. Finally, our results bring valuable data on dissolved extracellular DA, which had only scarcely been studied before.

4.1. Differential physiological characteristics of the three *Pseudo-nitzschia* species

The three species presented no difference in growth rate under our experimental conditions. Specific growth rates ($0.35 - 0.57 \text{ day}^{-1}$) were in agreement with previous measurements on different *Pseudo-nitzschia* species, including *P. australis* (Pan et al. 1996b, 2001, Fehling et al. 2004, Martin-Jézéquel et al. 2015). Although the strains issued from sexual reproduction experiments were the only ones that exhibited a lag in growth at the beginning of the experiments, they did not display any peculiarities as regards any of the physiological parameters afterwards. The lag phase may have resulted from the fact that these laboratory-obtained strains are less used to changes in culture conditions than strains isolated from natural populations. It is therefore interesting to note that these *Pseudo-nitzschia* strains may be used for physiological experiments.

The arrest of vegetative growth was most probably linked to silicate limitation which prevented frustule formation and cell division (Martin-Jézéquel et al. 2000). Silicate concentrations in the culture medium at growth arrest and the minimum biogenic silica quotas were higher in *P. australis* than in *P. pungens* and *P. fraudulenta*. These results point out that these species may present different uptake abilities and requirements for silicate. Our results therefore support the hypothesis of Thorel et al. (2017) on potential differences in nutrient uptake abilities, cell quotas, and stoichiometry between *Pseudo-nitzschia* species. The lower ratios of BSi to PON and POP as compared to Brzezinski ratios supports the statement of Marchetti et al. (2004) that *Pseudo-nitzschia* cells are slightly silicified. However, their hypothesis that *Pseudo-nitzschia* species have an advantage at low Si concentrations is not supported for all species: *P. australis*

appeared less capable of using low concentrations of silicate and may also have higher silicon and nitrogen requirements than *P. pungens* and *P. fraudulenta*.

The physiological characterization of the three species also revealed that *P. australis* had significantly higher Chl *a* cell contents. The values measured in our *P. australis* strains in exponential growth are in the same range as the Chl *a* concentrations reported for other strains from French coastal waters under replete-nutrient conditions (Thorel et al. 2014). This higher Chl *a* cell content may confer *P. australis* higher photosynthetic capacities. In contrast, *P. fraudulenta*, the least toxic species, presented the lowest photosynthetic capacity and efficiency. Our measured photosynthetic capacities are in agreement with Napoléon et al. (2013) for *P. pungens* but despite the similar order of magnitude, photosynthetic capacities are superior in *P. australis* and lower in *P. fraudulenta*. The measured photosynthetic capacities for *P. australis* are also superior to those obtained for the same species by Morelle and Claquin (2018). As far as the minimum saturating light intensity is concerned, the irradiance of 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ used during the experiment seemed to be sub-saturating during the exponential growth and stationary phases for *P. australis* strains. This is in agreement with the saturation intensity of approximately 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ reported by Bill et al. (2012) for a *P. australis* strain from the Californian coastal waters. However, these results contrast with the optimal light intensity for growth of 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ found by Thorel et al. (2014). In contrast, the minimum light intensity was consistently below this threshold for *P. pungens* and *P. fraudulenta*. This suggests different light optima and saturating light intensities depending on *Pseudo-nitzschia* species, even if the measured values remain within the previously reported range (Lelong et al. 2012). Furthermore, these results confirm the great acclimation capacities of *P. australis*, as stated by Bill et al. (2012) and Thorel et al. (2014).

The different physiological parameters therefore highlighted distinct ecophysiological profiles and confirmed the need to take specific diversity into account in studies on *Pseudo-nitzschia* spp., whether for bloom dynamics studies or model parameterization and calibration. Our results also revealed great intraspecific variability, partly linked to growth phases and nutrient limitation, but also due to physiological variability among strains. Significant genetic and in turn functional diversity is thus probably present among *Pseudo-nitzschia* populations, as previously found by Evans et al. (2005) and Thessen et al. (2009).

4.2. Dynamics of cellular cDA production and quotas in relation to the cell metabolism

In the literature, “domoic acid production” is often misused for intracellular DA concentration. Our goal was to monitor cellular and dissolved DA concentrations daily to calculate real production rates (Pan et al. 2001). Thus we characterized and discriminated the dynamics of DA production and DA accumulation in the intracellular and extracellular compartments to try and identify the physiological conditions favorable to these two mechanisms. It is important to note that we calculated net production rates resulting from the sum of different metabolic processes. The calculated cDA net production is therefore the result of the gross intracellular DA production and the DA excretion. The dDA net production results from the DA excretion and potential dDA losses in the culture medium.

Non-toxic and toxic strains have been mentioned in several *Pseudo-nitzschia* species (Villac et al. 1993, Bates et al. 1998 and references herein, Hasle 2002, Thessen et al. 2009, Quijano-Scheggia et al. 2010). In our study, intracellular DA was detected and quantified in all *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains. cDA concentrations were similar to those previously measured for the same species and sometimes the same strains (Bates et al. 1998, Maldonado et al. 2002, Baugh et al. 2006, Álvarez et al. 2009, Calu et al. 2009, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Rhodes et al. 2013, Martin-Jézéquel et al. 2015, Lema et al. 2017, Thorel et al. 2017, Sauvey et al. *submitted*, Chapter 2). Thus, our results confirm the decreasing gradient in cellular toxicity from *P. australis* to *P. pungens* and then *P. fraudulenta* reported by Lema et al. (2017) and Sauvey et al. (*submitted*, Chapter 2) for strains from the same ecosystems.

As far as production is concerned, the maximum total DA production rates were 2.95 pg.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. australis*, 0.07 pg.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. pungens*, and 0.03 pg.cell⁻¹.day⁻¹ for *P. fraudulenta*. The interspecific gradient was the same as for cDA concentrations, with *P. australis* the greater producer, *P. pungens* an intermediate producer, while *P. fraudulenta* produced very low amounts of DA. In addition, these results lie in the same range as the DA production rates previously reported for *P. multiseriata* (between 0.8 and 1.6 pg.cell⁻¹.day⁻¹, Pan et al. 1996) and *P. pseudodelicatissima* (between 0.007 and 0.04 pg.cell⁻¹.day⁻¹, Pan et al. 2001).

In *P. fraudulenta*, given that the low cDA amounts and production rates varied little, it is difficult to draw a conclusion on the physiological conditions favorable to DA production and accumulation in this species. In contrast, in *P. australis* and *P. pungens*, the dynamics of cDA quotas was characterized by an increase during the experiment, with maximum concentrations in the stationary phase. This increase in cellular toxin content took place when inorganic nutrients decreased, and was related to a decrease of the growth rate, especially in *P. australis*. These results are in agreement with the numerous studies reporting an increase in cellular DA concentrations when the growth rate decreases under nutrient limitation in different *Pseudo-nitzschia* species: *P. australis* (Garrison et al. 1992, Cusack et al. 2002, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Martin-Jézéquel et al. 2015), *P. calliantha* (Besiktepe et al. 2008), *P. multiseriis* (Bates et al. 1991, Thessen et al. 2009, Martin-Jézéquel et al. 2015), *P. multistriata* (Amato et al. 2010), *P. seriata* (Fehling et al. 2004), *P. fraudulenta* and *P. calliantha* (Thessen et al. 2009). But in addition, *P. australis* cDA concentrations were also positively correlated with photosynthetic parameters (mainly the maximum electron transport rate ETR_C). This result highlights the importance of active photosynthesis for the accumulation of cellular DA. In contrast to cDA quotas, the cDA production rates of *P. australis* and *P. pungens* did not vary according to the growth phases: no increase in production was observed in the stationary phase or when the growth rate decreased. This result is in contradiction with the increase in DA production observed in *P. multiseriis* during the stationary phase in batch cultures (Pan et al. 1998). In *P. australis*, cDA production rates tended to increase when inorganic nutrient concentrations decreased and photosynthetic capacity increased: these conditions were met in particular during the exponential growth phase when active cell growth took place. These results stress the importance of photosynthetic capacity for the production of this toxin. They corroborate previous studies which stated that high amounts of precursors (*e.g.* glutamate, geranyl pyrophosphate) and biogenic energy are required to sustain DA biosynthesis (Pan et al. 1998, Brunson et al. 2018). In addition, Bates (1998) showed that a minimum light intensity of $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ was required to sustain DA production by *P. multiseriis* and that DA production was interrupted after adding a photosynthesis inhibitor that blocked the electron transfer between PSII and PSI. The higher DA production in *P. australis* may therefore be linked to its potentially higher photosynthetic activity. In contrast, *P. pungens* lower DA production was not correlated to photosynthetic capacity.

When comparing the dynamics of cDA production and accumulation in the cells, our results therefore show that in *P. australis* the physiological conditions favorable to these two processes

are different. DA production required a certain level of photosynthetic capacity, but was not related to a decrease or an arrest of cell growth. In contrast, the accumulation of high cDA amounts in the cells was linked to a decrease or an arrest of cell division when a high photosynthetic capacity still allowed for production. Therefore, our results suggest that nutrient limitations do not favor cDA production, but rather favor its accumulation when cells stop dividing while still producing cDA. These results are not in contradiction with previous studies (Lelong et al. (2012) and references herein), since most of them considered the dynamics of DA contents, not its production rates. However, in *P. multiseriata*, Pan et al. (1998) found an inverse relationship between DA production and growth rates and related it to the increased availability in ATP when primary metabolism decreases. They hypothesized that the accumulation of precursors and energy during active cell growth allowed for DA production in *P. multiseriata* when growth slowed down and the cell metabolism was partly redirected to toxin production. Our results suggest that DA production is not necessarily linked to a reduction in growth rate in *P. australis* and *P. pungens*, and that high photosynthetic capacity allows for toxin production during active exponential growth, especially in *P. australis*. This conclusion is consistent with the observation that a *P. australis* strain from French coastal waters could produce DA under nutrient-replete conditions during exponential growth (Thorel et al. 2014). The difference in DA production dynamics between *P. australis* and *P. multiseriata* stresses once more the fact that it is not possible to extrapolate results from one *Pseudo-nitzschia* species to another and that species-specific studies are essential.

4.3. Dynamics of extracellular dDA production and quotas in relation to the cell metabolism

The maximum dDA concentrations measured for *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* were 28.13 ng.ml⁻¹, 2.15 ng.ml⁻¹, and 0.21 ng.ml⁻¹. These values lie within the range of dDA values previously reported for cultures of different *Pseudo-nitzschia* species (Baugh et al. 2006, Hansen et al. 2011). By comparison, the dDA production rates we measured (-0.30 - 1.27 pg.cell⁻¹.day⁻¹) were much lower than the rates measured for *P. seriata* (Maldonado et al. 2002). However, negative dDA production rates were measured. This finding indicates that dDA degradation occurred in the culture medium during the experiment, probably due to bacterial degradation or photodegradation (Lelong et al. 2012). Our (net) dDA production rates may therefore have underestimated the real dDA release from the cells. Our results also revealed

that dDA production rates were a significant inverse function of cDA production rates, at least for *P. australis* and *P. fraudulenta*. Intracellular DA production and release from the cell are therefore probably favored by opposite growth conditions. However, the low dDA concentrations and production rates in *P. fraudulenta* and the high intraspecific variability in dDA dynamics in *P. pungens* prevent us from drawing conclusions on the physiological conditions favorable to dDA production by these species. In *P. australis*, dDA concentrations increased during the lag phase when the cells in weaker physiological state presented lower photosynthetic capacities. This finding suggests that photosynthetic activity may influence DA release by *Pseudo-nitzschia* species. This mechanism might be species-specific: even if *P. australis* produced more dDA, *P. pungens* seems to have excreted proportionally more of its produced DA. These species might therefore manage DA cellular storage and excretion differently.

5. Conclusion

Our ecophysiological experiments did not detect any difference in growth between *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*. However, they suggest differences in nutrient requirements, uptake abilities, and light optima, consistent with their different bloom phenologies reported in different ecosystems (Downes-Tettmar et al. 2013, Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018, Delegrange et al. 2018). Regarding the dynamics of DA in *P. australis*, our results confirm that cellular DA accumulates when growth decreases or stops under silicate limitation. However, DA production is not influenced by nutrient limitation or the growth rate. Production rates are rather favored by high photosynthetic capacity. This point stresses how important it is to choose a species-specific approach and to study production rates, and not the sole cellular DA accumulation. These precise results on DA production and accumulation will be of great help to develop accurate models of DA production for *P. australis*, especially as we also took extracellular dissolved DA into account. In all three species, the dynamics of DA excretion greatly differed from the dynamics of DA production. Our data highlight the need to better understand the particular factors that control the release of DA from *Pseudo-nitzschia* cells, and especially its relationship with the photosynthetic metabolism.

SUPPLEMENTARY FIGURES

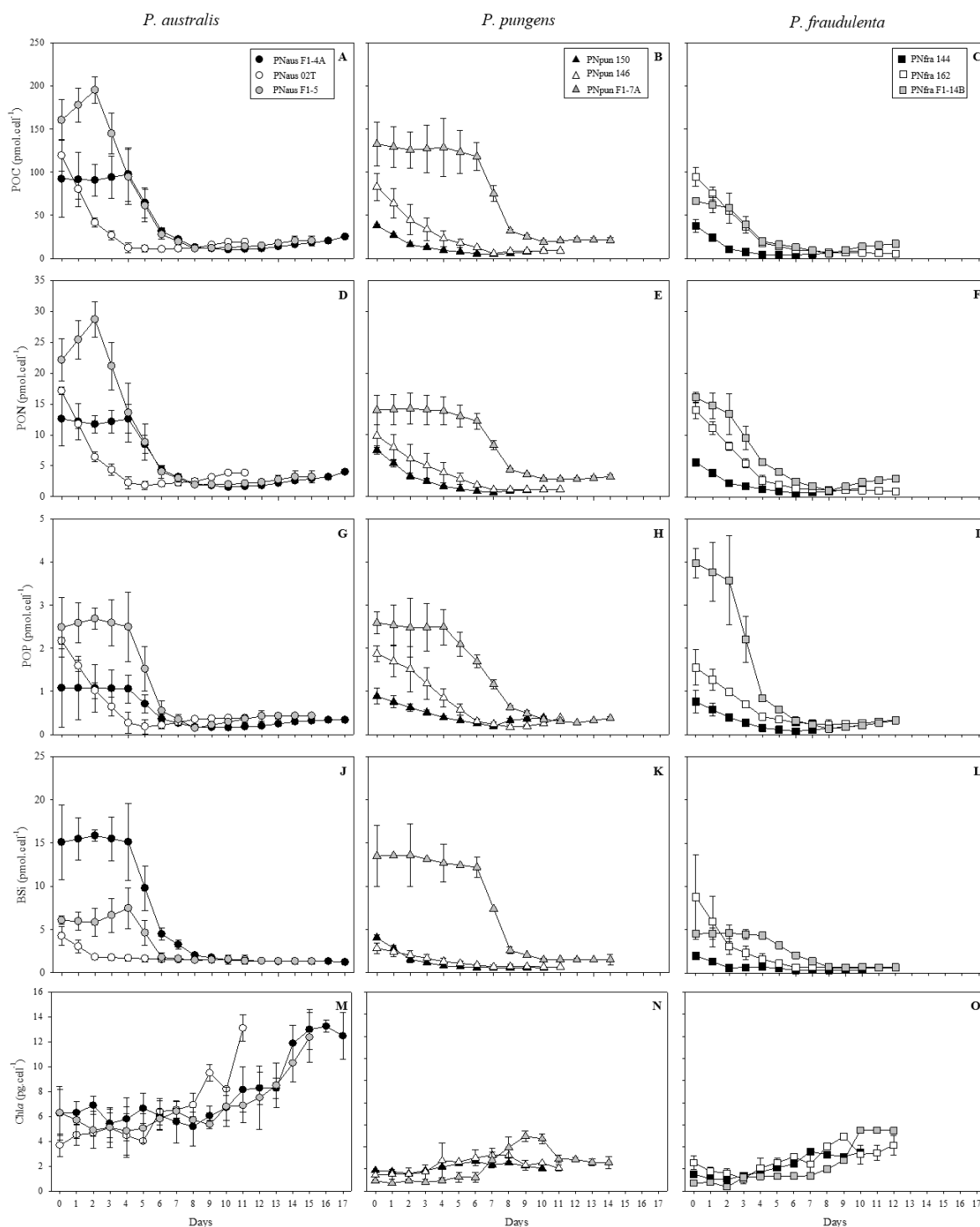


Figure S3.1. Variation of elemental quotas and Chl *a* cell contents over time during the batch cultures in the *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains. Mean $\pm$ SE ($n = 3$).

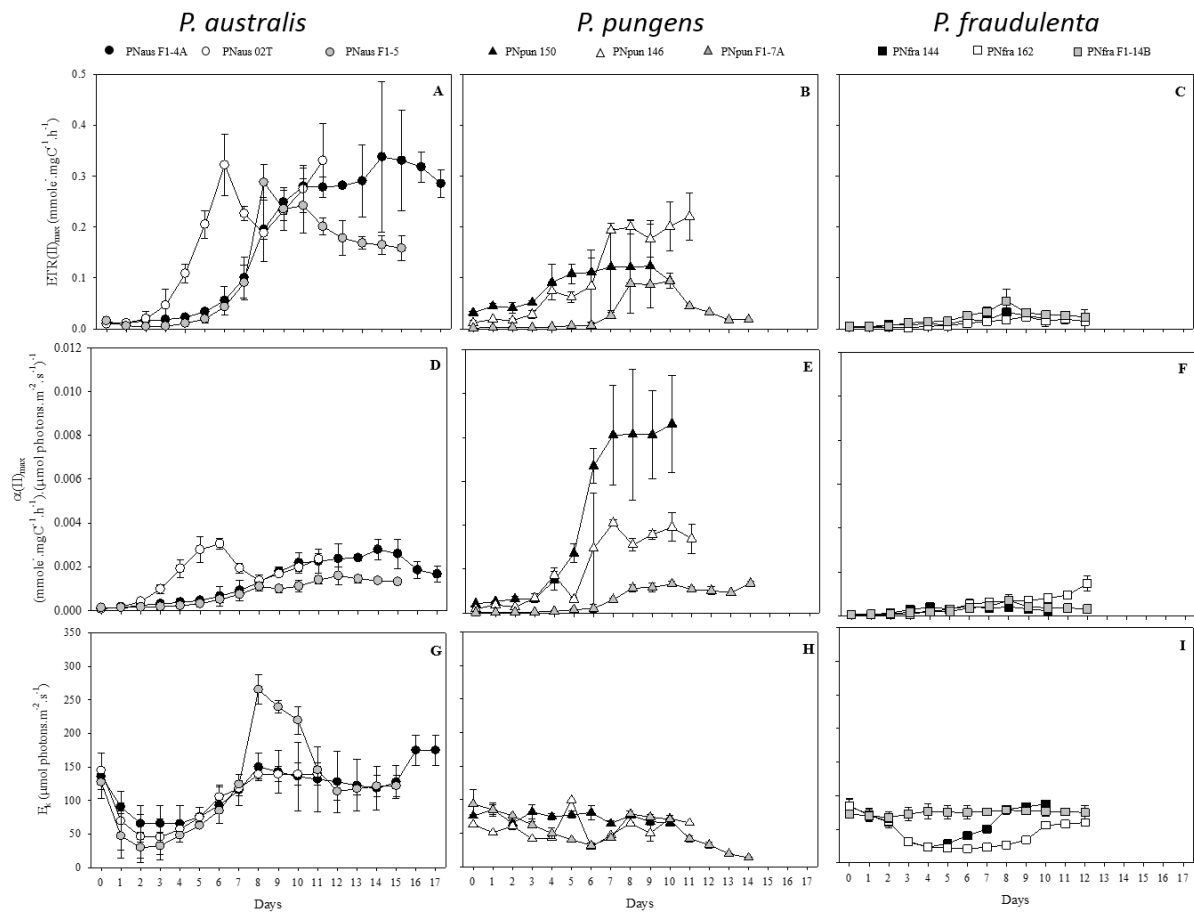


Figure S3.2. Variation of the maximum electron transport rate (ETR_{max}), the photosynthetic efficiency (α), and the minimum saturating light intensity (E_k) over time during the batch cultures for the *P. australis*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta* strains. Mean ± SE (n = 3).

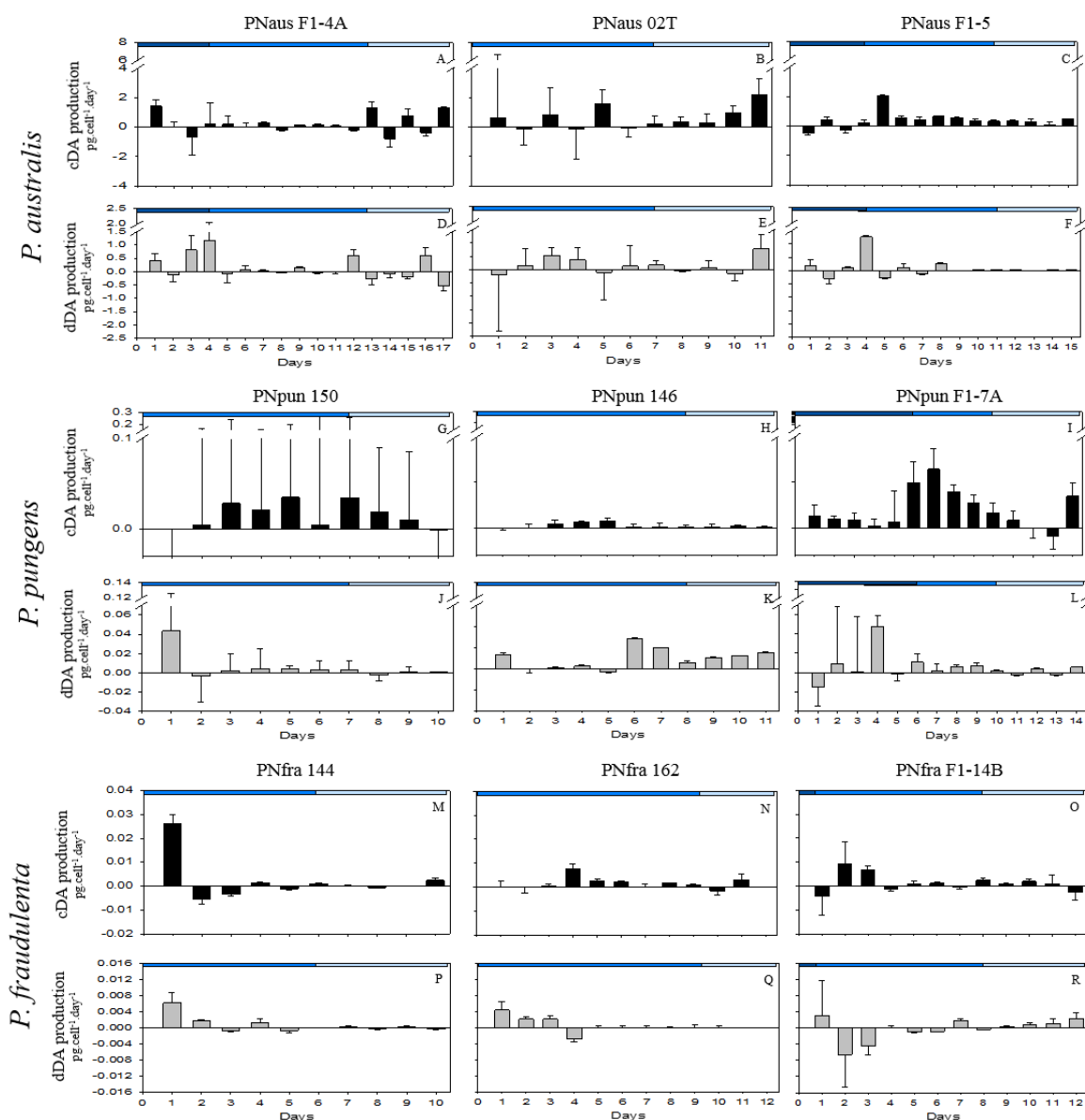


Figure S3.3. Variation of cDA (black) and dDA (gray) production per cell over time during the batch cultures for the *P. australis* (A, B, C), *P. pungens* (D, E, F), and *P. fraudulenta* strains (G, H, I). Means $\pm$ SE (n = 3).

*Interspecific and intraspecific
variability of the kinetics of
nutrient uptake by four Pseudo-
nitzschia species*

En Baie de Seine, il a été démontré que la variabilité interannuelle des événements ASP est liée à la variabilité de la diversité spécifique des *Pseudo-nitzschia* se développant chaque année. Différentes études, dans différentes régions, suggèrent que la diversité spécifique des *Pseudo-nitzschia* lors des efflorescences pourraient être liée aux concentrations et ratios en éléments nutritifs. La compétition pour la ressource nutritive est un facteur essentiel dans la compréhension de la structure des communautés phytoplanctoniques. Des différences de capacité d'utilisation des éléments nutritifs pourrait ainsi en partie expliquer les différences de phénologie des espèces de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine.

Dans ce contexte, le **chapitre 4** présente les expériences de cinétiques d'absorption des nitrates, phosphates et silicates réalisées chez *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* et *P. pungens* afin de caractériser les capacités d'utilisation de ces éléments nutritifs de chaque espèce. Etant donné la variabilité intraspécifique observée dans les deux premiers chapitres, une approche multi-souche a aussi été utilisée dans cette étude et les souches ont été choisies selon les recommandations du Chapitre 2.

Sauvey A., Claquin P., Le Roy B., Fauchot J.

**Interspecific and intraspecific variability of the kinetics of
nutrient uptake by four *Pseudo-nitzschia* species**

1. Introduction

The pennate diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia* are cosmopolitan species (Hasle 2002) and are a common part of the phytoplankton community. Among these species, many of them produce a neurotoxin called domoic acid (DA). This toxin can accumulate in marine food webs and causes amnesic shellfish poisoning (ASP) events following the contamination of organisms at the highest levels of food webs such as birds, marine mammals, and humans (Wright et al. 1989, Scholin et al. 2000). However, *Pseudo-nitzschia* blooms do not all generate ASP events (Lelong et al. 2012 and references herein). In some ecosystems, differences in bloom toxicity are thought to be influenced by the specific composition of the *Pseudo-nitzschia* community, and thus to depend on which species develop during the bloom and their toxicity (Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018). For example, in the Bay of Seine (English Channel, France), Thorel et al. (2017) showed that a toxic bloom was related to the presence of *P. australis* in 2012, while particulate domoic acid concentrations remained very low during a *P. delicatissima* bloom in 2013. Similarly, in Monterey Bay (California, USA), a survey of the specific composition of two blooms in 2013 and 2015 showed that low-toxicity blooms were related to the dominance of *P. fraudulenta*, whereas the bloom became highly toxic when *P. australis* dominated the community (Ryan et al. 2017, Bowers et al. 2018). The temporal variations of particulate domoic acid concentrations are also influenced by the seasonal successions of *Pseudo-nitzschia* species. In temperate coastal ecosystems, *Pseudo-nitzschia* spp. generally bloom in the spring / summer and/or fall seasons (Hasle et al. 1996, Bates et al. 1998, Anderson et al. 2006, 2009, García-Mendoza et al. 2009, Klein et al. 2010, Ryan et al. 2017, Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018). But many studies report different bloom phenologies for different *Pseudo-nitzschia* species (e.g. Bates et al. 1998, Fehling et al. 2006, Klein et al. 2010, Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018). In the Bay of Seine, Thorel et al. (2017) showed that during two years with contrasting toxicity levels, the development of the *P. seriata* complex was linked to a low Si:P ratio while the development of the *P. delicatissima* complex was linked to a low Si:N ratio. These authors also pointed out that when *P. australis* developed in the ecosystem, *P. delicatissima* was not present, and *vice versa*. They suggested that the phenologies specific to each species could be related to differences in nutrient uptake abilities or cell quotas. Lundholm et al. (2010) reported an increase in the relative abundance of *P. pungens* related to nutrient loading and temperature. It therefore appears that understanding how the different *Pseudo-*

nitzschia species use nutrients is important to better understand their bloom phenologies and the ensuing toxic bloom dynamics.

Studies on the nutrient uptake capacities of *Pseudo-nitzschia* species are scarce. The kinetics of nitrogen uptake has been studied in four *Pseudo-nitzschia* species from California (USA): *P. australis* (Cochlan et al. 2008), *P. delicatissima* (Loureiro et al. 2009), *P. cuspidata* and *P. fryxelliana* (Auro and Cochlan 2013). Cochlan et al. (2008) showed that *P. australis* could utilize both organic and inorganic forms of nitrogen. They also highlighted differences in the nitrogenous nutrition of this species. Loureiro et al. (2009) also observed differences in uptake capacities between two nitrogen forms, urea and ammonium, in *P. delicatissima*. Finally, Auro and Cochlan (2013) showed differences in the kinetics of nitrate, ammonium, and urea uptake by *P. fryxelliana*. It appears from the comparison of these studies that interspecific differences in nitrogen uptake (especially urea) do exist. However, the data needed to characterize *Pseudo-nitzschia* species uptake capacities and compare them are lacking. Furthermore, information is lacking on the kinetics of their phosphate and silicic acid uptake. Estimating the nutrient uptake capacities of different *Pseudo-nitzschia* species would be an important step to assess their competitive abilities and their development.

The objective of this study was therefore to characterize the interspecific and intraspecific variability in nitrate, phosphate, and silicic acid uptake parameters in four *Pseudo-nitzschia* species characteristic of the French coastal waters: *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*.

2. Materials and methods

2.1. Organisms and culture conditions

Pseudo-nitzschia spp. strains were isolated from natural populations, in Arcachon Bay (Atlantic coast, France) for *P. australis*, and from the Bay of Seine (English Channel, France) for *P. pungens* and *P. fraudulenta*. The other strains were obtained by isolating initial cells produced during mating experiments (Table 4.1). Single cells were isolated using a micropipette, washed three times with filter-sterilized (0.2 μm) seawater and incubated in 4-well culture plates in K/2-medium (Keller et al. 1987) enriched in silicic acid (54 μM) at a temperature of 16°C, an irradiance of 30 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and a 14h:10h L:D light cycle. *Pseudo-nitzschia* species

were identified from measurements of frustule properties by transmission electron microscopy (TEM). Samples were cleaned to remove organic material according to Thorel et al. (2017). When the clonal culture was established, it was maintained in 15-ml ventilated flasks in K/2-medium + Si in the same conditions. Cultures were not axenic, but they were periodically checked for bacterial development by optical microscopy observations; hardly any bacteria were detected.

The *Pseudo-nitzschia* strains were chosen in accordance with the recommendations made in Sauvey et al. (*submitted*, Chapter 2). The selected strains had a large or medium cell size ($\geq$ gametangia sizes) and had been in culture for less than two years (Table 4.1). For cell size estimation, strains were observed under a Nikon Eclipse 80i light microscope equipped with a Nikon DS-Ri2 camera before each experiment; 20 cells were measured (length and width) using NIS-Elements Imaging Software (Lundholm et al. 2002). The cell size of each strain was calculated as the mean $\pm$ standard deviation of the 20 measured cells (Table 4.1). In order to compare elemental quotas among strains of different sizes, cell volumes were calculated according to the equation of Lundholm et al. (2004) (equation 1):

$$Volume = (0.6 * L * W^2) + (0.4 * 0.5 * L * W^2) \quad (1)$$

Where L is cell length (μm) and W is cell width (μm).

Table 4.1. Strains of *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens* used in the uptake experiments. (A) strains isolated from the Atlantic Ocean; (EC) strains isolated from the English Channel. Age (in months, calculated from the date of isolation from natural populations), cell size, and cell volume are indicated for each strain.

Species	Strains – Collection reference	Strain origin	Cell size length (μm)	Cell volume (μm^3)	Strain age (months)
<i>P. australis</i>	PNaus F1-5	Sexual reproduction	61	1872	-
	IFR-PAU-16.2	Arcachon Bay (A)	67	2349	10
<i>P. delicatissima</i>	PNdel 145	Saint-Vaast-la-Hougue (EC)	35	91	15
	PNdel 154	Saint-Vaast-la-Hougue (EC)	34	89	15
	PNdel 160	Saint-Vaast-la-Hougue (EC)	45	116	7
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 126	Cabourg (EC)	46	1281	16
	PNfra 144	Luc-sur-mer (EC)	64	1389	12
	PNfra 162	Cabourg (EC)	75	1817	9
	PNfra 167	Luc-sur-mer (EC)	57	1233	17
	PNfra F1-9C	Sexual reproduction	77	1634	-
<i>P. pungens</i>	PNpun 150	Luc-sur-mer (EC)	78	899	16
	PNpun 165	Luc-sur-mer (EC)	91	748	16

2.2. Batch experiments

Batch experiments were performed to determine cell quotas in N, P, and Si and to obtain exponentially growing cultures with sufficient biomass for uptake experiments. Before each experiment, each strain was acclimated to the experimental conditions, *i.e.* in artificial seawater (Red Sea Salt) enriched in NO₃ (576 µM), PO₄ (36 µM), and Si(OH)₄ (54 µM), at a temperature of 16°C, an irradiance of 100 µmol photons.m⁻².s⁻¹, and a 14h:10h L:D light cycle in growth chambers (Economic Delux, Snijders Scientific B.V., UK). The batch experiments were carried out in the same conditions in filter flasks (NESTTM) with 1,000 ml of culture. In the exponential growth phase, when the biomass was sufficient for the uptake experiments, nine 10-ml samples were taken to carry out the cell quota analysis (three for nitrogen quotas (PON), three for phosphorus quotas (POP), and three for silica quotas (BSi)).

To determine the cellular quotas of phosphorus (POP) and nitrogen (PON), 10 ml of culture medium were filtered on a GF/F filter (WhatmanTM, Ø 25 mm and porosity 0.7 µm) previously burned at 450°C for 4 hours. The analyses were performed in triplicate. Then, the filters were placed in an oven at 60°C for 24 hours, and then stored in the dark in a desiccator prior to the analyses. To determine biogenic silica, 10 ml of culture were centrifuged and rinsed with artificial seawater. This step was carried out three times to eliminate any trace of culture medium. The resulting pellets were kept at +4°C until analysis. The cellular phosphorus quotas were determined according to the persulfate wet oxidation method developed by Pujo-Pay and Raimbault (1994), and the biogenic silica quotas were determined according to the method of Ragueneau and Tréguer (1994). The phosphate and silicate assays were performed with an auto-analyzer (Technicon III) following standard protocols (Aminot and Kérouel 2007). The cellular nitrogen quotas were determined by gas chromatography coupled with an isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

The cellular nitrogen (Q_N), phosphorus (Q_P), and silicon (Q_{Si}) quotas, which represent the nitrogen, phosphorus, or silicon requirements for cell division, were calculated using the following equation (equation 2):

$$Q_x = \frac{X}{\text{Cell concentration}} \quad (2)$$

Where Q_X are the quotas of nitrogen, phosphorus, or silicon in $\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$, X is the concentration in nitrogen, phosphorus, or silicon ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), and the cell concentration is in $\text{cells}\cdot\text{l}^{-1}$.

In order to compare the different species, the quotas were also normalized to cell volume of each species. The results were expressed in $\text{fmol}\cdot\mu\text{m}^{-3}$.

2.3. Uptake experiments

The uptake kinetics experiments were performed to determine the following kinetics parameters: the maximum absorption rate (V_{max}), the half-saturation constant (K_S), and the maximum affinity (α). The kinetics of phosphate and silicate uptake was determined by the disappearance method. This method consists in determining the concentration of a nutrient at the beginning and at the end of a given time period. This difference in concentrations between the end and the beginning of incubation corresponds to the net uptake rate by the cells in culture. The kinetics of nitrate uptake was determined by incorporating a stable nitrogen isotope, ^{15}N (^{15}N -sodium nitrate, 99at%), which makes it possible to calculate the gross uptake rate.

Cultures in the exponential growth phase were harvested, centrifuged (10 min, 1,750 g, 16°C) and re-suspended in artificial seawater without the studied nutrient (N, P, or Si). After homogenization, 150 ml of culture at a concentration of 5,000 $\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ were distributed in 10 filter flasks (NESTTM) where 250 ml of culture had been distributed beforehand. Each studied nutrient was added in order to reach the following concentrations: 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, and 100 μM for NO_3 and $\text{Si}(\text{OH})_4$, and 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 5, 10, and 25 μM for PO_4 . For each nutrient concentration tested, 50 ml of culture were distributed in filter flasks (NESTTM) in triplicate. These flasks were placed in growth chambers (Economic Delux, Snijders Scientific B.V., UK) at a temperature of 16°C, an irradiance of 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and a 14h:10h L:D light cycle for 4 hours.

For the kinetics of phosphate and silicate uptake, samples were taken at times T_{0h} and T_{4h} for nutrient determination with an auto-analyzer (Technicon III) following standard protocols (Aminot and Kérouel 2007). For the kinetics of nitrate uptake, following the 4 hours of

incubation, the cultures were filtered on GF/F filters previously burned for 4 hours at 450°C. Then, the filters were placed in a laboratory dryer at 60°C for 24 hours and then kept dry in a desiccator until the isotopic analyses by gas chromatography coupled with an isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

2.4. Data analysis

Calculation of uptake rates. The uptake rates of phosphate and silicate were obtained for each concentration by determining the decrease in nutrient concentration in the culture medium between T_{0h} and T_{4h} , *i.e.* after 4 hours of incubation. The following equation was applied (equation 3):

$$V = \frac{[X]_{T_4} - [X]_{T_0}}{\text{Cell concentration} * T} * \frac{1}{Q_X} \quad (3)$$

Where V is the uptake rate in h^{-1} , $[X]$ is the nutrient concentration in PO_4 and $Si(OH)_4$ at times T_0 and T_4 , cell concentration is in $cells.l^{-1}$, T is the incubation time (h), and Q_X is the phosphorus or silicon cell quota in $pmol.cell^{-1}$.

The nitrogen uptake rates were obtained from equation 2 of Dugdale and Wilkerson (1986) (equation 4):

$$V = \frac{\% \text{ } ^{15}N_p - \text{natural abundance}}{\% \text{ } ^{15}N_d * T} \quad (4)$$

Where V is the uptake rate in h^{-1} , $\% \text{ } ^{15}N_p$ is the percentage of ^{15}N in the particulate fraction, $\% \text{ } ^{15}N_d$ is the percentage of ^{15}N in the dissolved fraction (supposed constant throughout incubation, here 100 %), the natural abundance in ^{15}N (values determined during the analyses) is 0.36735, and T is the incubation time (h).

Determination of the kinetic parameters of nutrient uptake: V_{max} , K_S , and α . The Michaelis-Menten (1913) model is the most commonly used nutrient uptake model. In this model, the relationship between a nutrient uptake rate (V in h^{-1}) and its concentration (S in

$\mu\text{mol.l}^{-1}$) characterizes the maximum uptake rate (V_{max}) and the half-saturation (constant K_S) according to the following equation (equation 5):

$$V = \frac{V_{\text{max}} * S}{K_S + S} \quad (5)$$

Furthermore, the V_{max} to K_S ratio defines α , the affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations ($< K_S$), in $\text{l}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Healey, 1980). α was calculated as follows (equation 6):

$$\alpha = \frac{V_{\text{max}}}{K_S} \quad (6)$$

The Michaelis-Menten model was applied to the data using Sigma Plot 12.5 software.

2.5. Statistical analysis

After testing the normality and homoscedasticity of the data, ANOVA was used to test differences in cell quotas, uptake rates, the half-saturation constant, and affinity among strains and among species using the “car” package in R version 3.5.1. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$ in all tests.

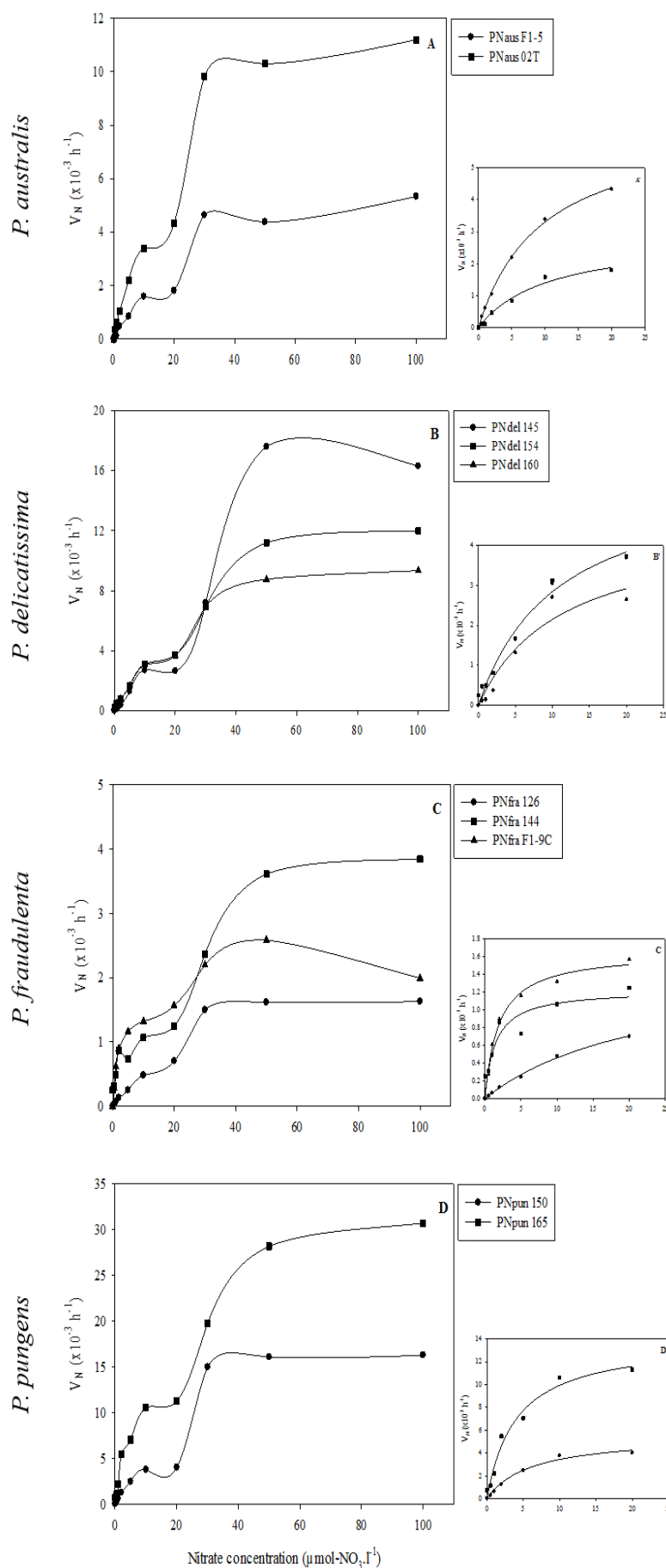


Figure 4.1. Kinetic curves of NO_3 uptake by four *Pseudonitzschia* species. Specific uptake rates ($\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) of NO_3 by *P. australis* (A), *P. delicatissima* (B), *P. fraudulenta* (C), and *P. pungens* (D) as a function of the NO_3 concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). The insets (A', B', C' and D') provide a closer view of the concentration range $< 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$. The curves in the insets correspond to the Michaelis-Menten model. The dots are means of triplicate experiments.

3. Results

3.1. Nitrate uptake rates and nitrogen quotas

The uptake rates of NO_3 for *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens* are presented in Figure 4.1 and summarized in Table 4.2. The Michaelis-Menten kinetic model was significant for lower concentrations ($P < 0.001$) for all strains. Significant intraspecific variability was observed among strains of each species, especially for maximum NO_3 uptake rates ($V_{\max}$) in *P. australis* and *P. pungens* (Table 4.2, $P < 0.001$). However, between 0 and 20 μM , all *Pseudo-nitzschia* strains exhibited saturation-type kinetics. After this transition point around 20 μM , NO_3 uptake rates increased again in all species to reach a second saturation threshold between 30 and 40 μM (Fig. 4.1). These results suggest the existence of a two-component uptake system for NO_3 in the four *Pseudo-nitzschia* species. Between 0 and 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, maximum NO_3 uptake rates ($V_{\max}$, between $0.20 \cdot 10^{-3}$ and $13.90 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) were not significantly different among the four species (Fig. 2A) due to the high intraspecific variability, especially in *P. pungens*. However, the result show that some *P. pungens* strains can reach high $V_{\max}$ (up to $13.9 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, Fig. 4.1D), while *P. fraudulenta* $V_{\max}$ were never very high whatever the strain (up to $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, Fig. 4.1C). *P. australis* and *P. delicatissima* exhibited significantly higher half-saturation constants ($K_s = 10.0$ and $9.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$, respectively, $P < 0.05$) than *P. fraudulenta* and *P. pungens* (2.3 and $5.0 \mu\text{mol.l}^{-1}$, respectively, Fig. 4.2B). In contrast, α – the affinity coefficient at sub-saturating concentrations ($< K_s$) – was not significantly different among the four species (Fig. 4.2C). However, the intraspecific variability of α within *P. pungens* shows that some *P. pungens* strains can present a high affinity for NO_3 at sub-saturating concentrations. In the second concentration range (between 20 and 100 $\mu\text{mol-NO}_3.\text{l}^{-1}$), the same trends were observed, with a higher $V_{\max}$ in *P. pungens* and a lower one in *P. fraudulenta* ($29.45 \cdot 10^{-3}$ and $3.28 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively) (Table 4.2).

To complete the study of the kinetics of nitrate uptake and to better grasp the nitrogen requirements of each species, nitrogen quotas (Q_N) were determined. Nitrogen cell quotas (in pmol.cell^{-1}) and nitrogen quotas standardized to cell volume (in $\text{fmol}.\mu\text{m}^{-3}$) are presented in Fig. 4.3A and 4.3B, respectively. Nitrogen quotas showed significant differences among species. *P. pungens* presented significantly higher nitrogen cell quotas ($2.15 \text{ pmol.cell}^{-1}$) than the other species, while *P. delicatissima* had the lowest cell quotas ($0.53 \text{ pmol.cell}^{-1}$, $P < 0.05$, Fig. 4.3A). *P. australis* and *P. fraudulenta* nitrogen cell quotas were at intermediate levels and

close (1.44 and 1.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$, respectively). When normalized to cell volume to take the differences in cell sizes among species into account, *P. delicatissima* nitrogen quotas were significantly much higher, with 5.7 $\text{fmol}\cdot\mu\text{m}^{-3}$, as compared to *P. pungens* with 2.6 $\text{fmol}\cdot\mu\text{m}^{-3}$ (Fig. 4.3B). Finally, *P. australis* and *P. fraudulenta* presented similar quotas *per volume*, lower than in *P. pungens* and *P. delicatissima* (0.7 and 0.9 $\text{fmol}\cdot\mu\text{m}^{-3}$, respectively, $P < 0.05$).

Table 4.2. Kinetic parameters of NO_3 uptake by *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*. The values are means $\pm$ SE. The r^2 column provides the coefficient of determination.

Species	Strains	Q_N ($\mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$)	$V_{\max}$ ($\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) (0-20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$V_{\max}$ ($\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) ($> 20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	K_S ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	α ($\times 10^{-4}$ $\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	r^2
<i>P. australis</i>	PNaus F1-5	1.54 ± 0.07	2.90 ± 0.20	4.78 ± 0.49	10.5 ± 1.7	2.77	0.98
	PNaus 02T	1.34 ± 0.03	6.50 ± 0.02	10.45 ± 0.69	9.6 ± 0.6	6.80	0.97
<i>P. delicatissima</i>	PNdel 145	0.52 ± 0.02	0.20 ± 0.04	16.95 ± 2.9	8.2 ± 3.2	0.24	0.87
	PNdel 154	0.50 ± 0.04	5.90 ± 0.7	11.60 ± 5.7	10.8 ± 2.5	5.49	0.95
	PNdel 160	0.56 ± 0.001	5.80 ± 0.7	9.05 ± 1.4	10.5 ± 2.5	5.52	0.95
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 126	1.26 ± 0.24	0.70 ± 0.01	1.58 ± 0.07	1.1 ± 0.7	6.14	0.95
	PNfra 144	1.13 ± 0.01	1.20 ± 0.4	3.28 ± 0.79	1.6 ± 0.6	7.69	0.77
	PNfra F1-9C	1.43 ± 0.05	2.5 ± 0.1	2.26 ± 0.03	4.2 ± 1.0	5.88	0.89
<i>P. pungens</i>	PNpum 150	2.23 ± 0.05	5.50 ± 0.30	15.80 ± 0.70	6.0 ± 0.8	9.11	0.98
	PNpum 165	2.08 ± 0.14	13.90 ± 0.80	29.45 ± 1.77	4.0 ± 0.6	34.40	0.96

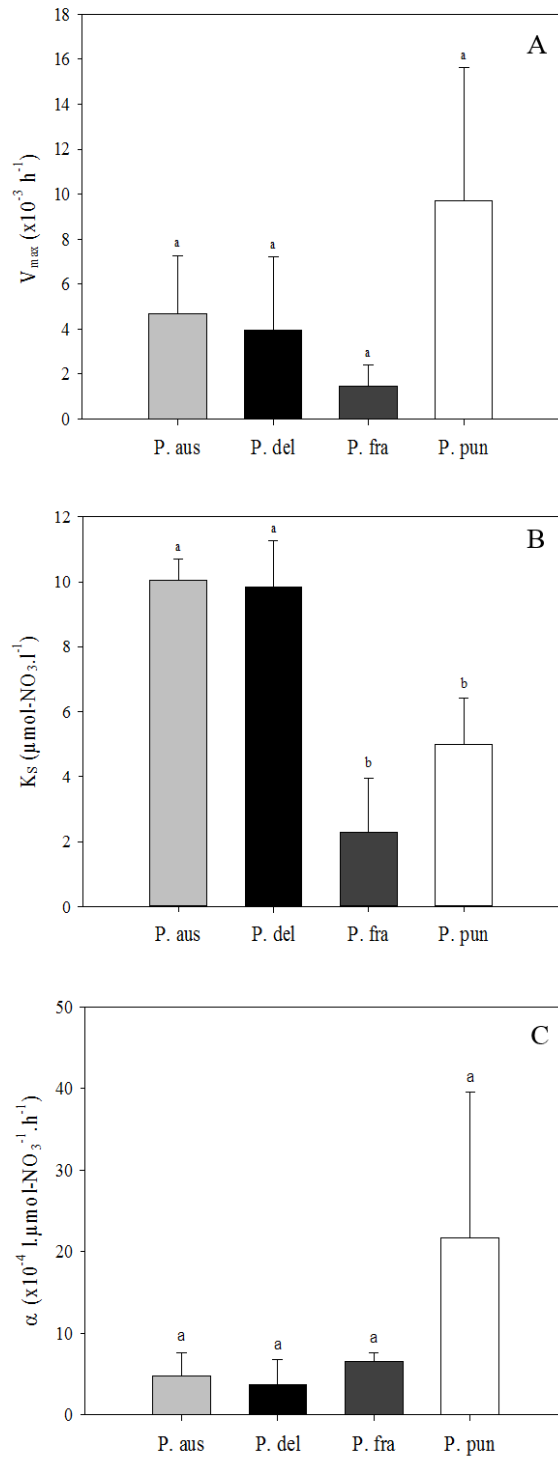


Figure 4.2. Kinetic parameters of nitrate uptake: (A) maximum uptake rate (V_{max}), (B) half-saturation constant (K_S), and (C) affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α) in *P. australis* (*P. aus*), *P. delicatissima* (*P. del*), *P. fraudulenta* (*P. fra*), and *P. pungens* (*P. pun*). The values are means $\pm$ SE.

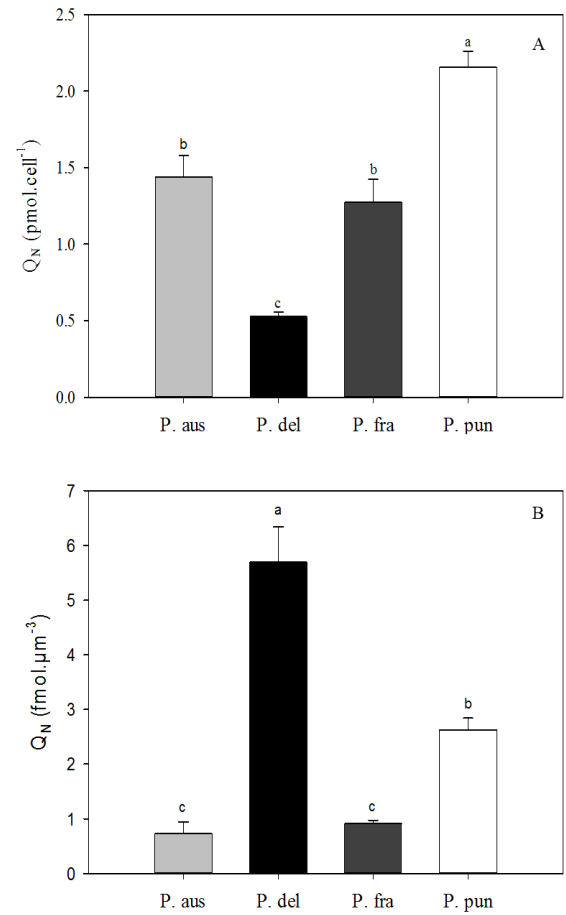


Figure 4.3. Cellular nitrogen quotas (Q_N) expressed *per cell* (A) and *per cell volume* (B) in $\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ and $\text{fmol}\cdot\mu\text{m}^{-3}$, respectively, in *P. australis* (*P. aus*), *P. delicatissima* (*P. del*), *P. fraudulenta* (*P. fra*), and *P. pungens* (*P. pun*). Results are means $\pm$ SE.

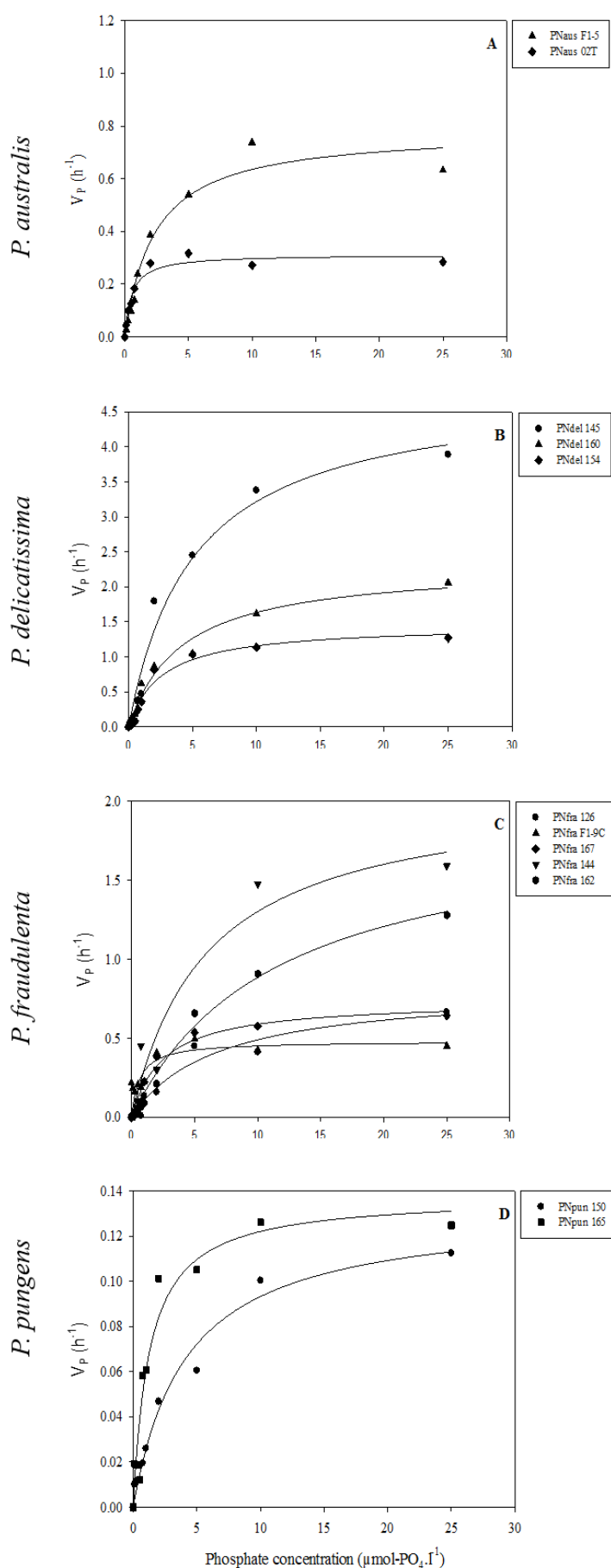


Figure 4.2. Kinetic curves of PO_4 uptake by four *Pseudo-nitzschia* species. Specific uptake rates (h^{-1}) of PO_4 by *P. australis* (A), *P. delicatissima* (B), *P. fraudulenta* (C), and *P. pungens* (D) as a function of the PO_4 concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). The curves correspond to the Michaelis-Menten model. The dots are means of triplicate experiments.

3.2. Phosphate uptake rates and phosphorus quotas

The uptake rates of PO_4 for *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens* are presented in Figure 4.4 and summarized in Table 4.3. The relationships between PO_4 uptake rates and PO_4 concentrations showed a saturation kinetics, and the Michaelis-Menten model was significant for all strains ($P < 0.001$). Maximum PO_4 uptake rates ($V_{\max}$) were significantly different among species (Fig. 4.5A). The greatest $V_{\max}$ was recorded in *P. delicatissima* (3.33 h^{-1} on average). This species is therefore capable of rapidly absorbing PO_4 at high concentrations as compared to the other three species. In contrast, *P. pungens* $V_{\max}$ for PO_4 was the lowest (0.14 h^{-1} on average). *P. australis* and *P. fraudulenta* PO_4 $V_{\max}$ were intermediate (0.45 and 1.06 h^{-1} on average, respectively). The results of the kinetic study also showed that *P. fraudulenta* and *P. delicatissima* had the highest half-saturation constants K_S , with 5.9 and 4.7 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, respectively (Fig. 4.5B). In contrast, *P. australis* presented a lower K_S than *P. delicatissima* and *P. fraudulenta*, with 1.2 $\mu\text{mol-PO}_4.\text{l}^{-1}$. The half saturation constant of *P. pungens* was at an intermediate level (2.7 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), not different from any other species. The PO_4 uptake efficiency at low concentrations (α) was significantly higher in *P. delicatissima* than in the other three species (0.70 $\text{l}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $P < 0.05$, Fig. 4.5C). *P. pungens* also presented a significantly lower PO_4 uptake efficiency than *P. australis* (0.07 and 0.35 $\text{l}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectively, $P < 0.05$). Finally, as far as cell phosphorus quotas are concerned, *P. australis* exhibited high intra-specific variability (0.030 and 0.167 pmol.cell^{-1} for the two strains, Table 4.3), which did not discriminate it from the other species. But among the other three species, *P. pungens* presented the highest cell quotas (0.173 pmol.cell^{-1} on average, Fig. 4.6A) and *P. delicatissima* the lowest (0.028 pmol.cell^{-1} on average). The phosphorus quotas standardized to cell volume were significantly higher in *P. delicatissima* and *P. pungens* with 0.18 $\text{fmol}.\mu\text{m}^{-3}$ and 0.19 $\text{fmol}.\mu\text{m}^{-3}$, respectively, as compared to *P. australis* and *P. fraudulenta* with 0.060 $\text{fmol}.\mu\text{m}^{-3}$ and 0.063 $\text{fmol}.\mu\text{m}^{-3}$, respectively ($P < 0.01$, Fig. 4.6B).

Table 4.3. Kinetic parameters of PO_4 uptake by *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*. The values are means $\pm$ SE. The r^2 column provides the coefficient of determination.

Species	Strains	Q_P (pmol.cell ⁻¹)	$V_{\max}$ (h ⁻¹)	K_S (μmol.l ⁻¹)	α (l.μmol ⁻¹ .h ⁻¹)	r^2
<i>P. australis</i>	PNaus F1-5	0.167 $\pm$ 0.021	0.63 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.22	0.42	0.94
	PNaus 02T	0.030 $\pm$ 0.005	0.28 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.19	0.28	0.97
<i>P. delicatissima</i>	PNdel 145	0.031 $\pm$ 0.002	3.89 $\pm$ 0.25	4.87 $\pm$ 0.68	0.79	0.92
	PNdel 154	0.028 $\pm$ 0.005	1.25 $\pm$ 0.28	4.87 $\pm$ 0.58	0.77	0.93
	PNdel 160	0.026 $\pm$ 0.0022	2.35 $\pm$ 0.11	4.30 $\pm$ 0.60	0.55	0.97
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 126	0.095 $\pm$ 0.006	1.20 $\pm$ 0.07	7.44 $\pm$ 1.12	0.16	0.99
	PNfra 144	0.062 $\pm$ 0.001	1.60 $\pm$ 0.02	8.00 $\pm$ 3.30	0.20	0.99
	PNfra 162	0.015 $\pm$ 0.001	1.58 $\pm$ 0.05	7.75 $\pm$ 1.21	0.17	0.97
	PNfra 167	0.083 $\pm$ 0.007	0.74 $\pm$ 0.03	2.52 $\pm$ 0.34	0.29	0.96
	PNfra F1-9C	0.037 $\pm$ 0.002	0.48 $\pm$ 0.03	3.64 $\pm$ 0.68	0.13	0.98
<i>P. pungens</i>	PNpun 150	0.178 $\pm$ 0.001	0.13 $\pm$ 0.01	4.12 $\pm$ 0.74	0.03	0.98
	PNpun 165	0.168 $\pm$ 0.059	0.14 $\pm$ 0.01	1.28 $\pm$ 0.18	0.11	0.94

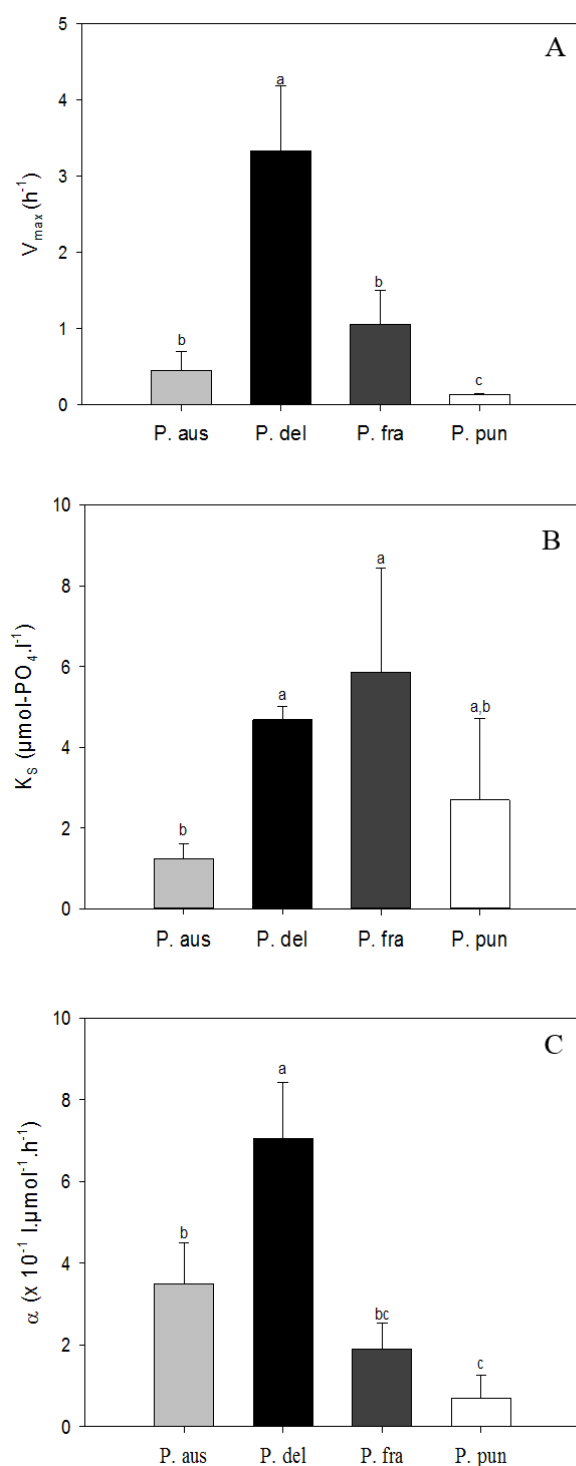


Figure 4.4. Kinetic parameters of phosphate uptake: (A) maximum uptake rate (V_{max}), (B) half-saturation constant (K_s), and (C) affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α) in *P. australis* (*P. aus*), *P. delicatissima* (*P. del*), *P. fraudulenta* (*P. fra*), and *P. pungens* (*P. pun*). The values are means $\pm$ SE.

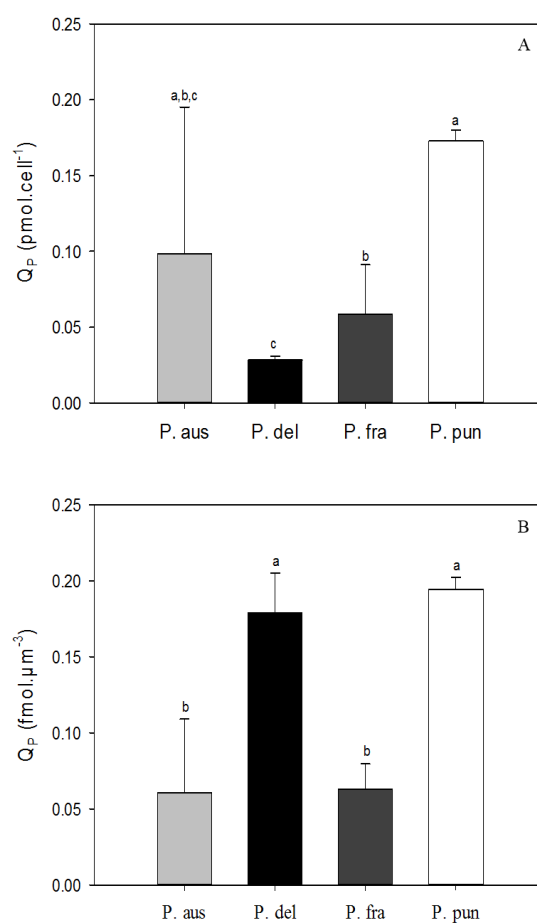


Figure 4.3. Cellular phosphorus quotas (Q_p) expressed *per cell* (A) and *per cell volume* (B) in $\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ and $\text{fmol}\cdot\mu\text{m}^{-3}$, respectively, in *P. australis* (*P. aus*), *P. delicatissima* (*P. del*), *P. fraudulenta* (*P. fra*), and *P. pungens* (*P. pun*). Results are means $\pm$ SE.

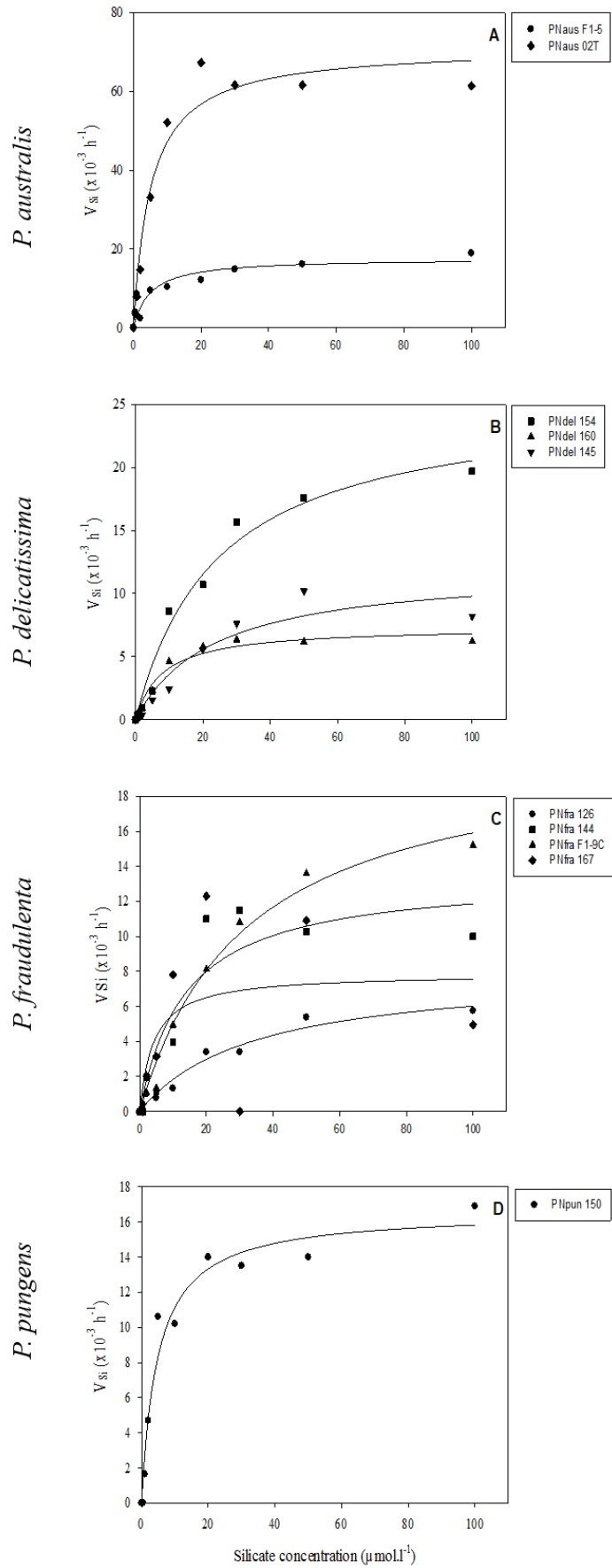


Figure 4.5. Kinetic curves of $Si(OH)_4$ uptake by four *Pseudo-nitzschia* species. Specific uptake rates ($x10^{-3} h^{-1}$) of $Si(OH)_4$ by *P. australis* (A), *P. delicatissima* (B), *P. fraudulenta* (C), and *P. pungens* (D) as a function of the $Si(OH)_4$ concentration ($\mu mol.l^{-1}$). The curves correspond to the Michaelis-Menten model. The dots are means of triplicate experiments.

3.3. Silicate uptake rates and Si quotas

The Si(OH)_4 uptake rates of *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens* are presented in Figure 4.7 and summarized in Table 4.4. The Michaelis-Menten kinetics model was significant for all strains ($P < 0.001$). No significant difference was found for Si(OH)_4 uptake parameters among the four species because intraspecific variability was substantial within each species (except *P. pungens* whose intraspecific diversity we could not explore). However, it is interesting to note that one *P. australis* strain exhibited a maximum uptake rate ($V_{\max}$) of $63.10^{-3} \text{ h}^{-1}$ while the maximum uptake rates of the other species were $17.10^{-3} \text{ h}^{-1}$ for *P. pungens*, $13.4.10^{-3} \text{ h}^{-1}$ for *P. fraudulenta*, and $26.4.10^{-3} \text{ h}^{-1}$ for *P. delicatissima* (Fig. 4.8A, Table 4.4). Consequently, the Si(OH)_4 uptake efficiency at low concentrations was also very high for that *P. australis* strain, with $157.10^{-4} \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Fig. 4.8C) as compared to the maximum efficiency of *P. pungens* ($36.2.10^{-4} \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$), *P. fraudulenta* ($23.8.10^{-4} \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$), and *P. delicatissima* ($13.10^{-4} \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$). However, the cell silicon quotas revealed that *P. australis* had much greater quotas ($1.69 \text{ pmol.cell}^{-1}$ on average, Fig. 4.9A) than the other three species (0.33 , 1.40 , and $0.56 \text{ pmol.cell}^{-1}$ on average for *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*, respectively). In contrast, the silicon quotas standardized to cell volume were significantly different among the four species ($P < 0.001$). The species ranked from the highest to the lowest quotas *per cell volume* as follows: *P. delicatissima* ($3.38 \text{ fmol.}\mu\text{m}^{-3}$) $>$ *P. pungens* ($1.46 \text{ fmol.}\mu\text{m}^{-3}$) $>$ *P. fraudulenta* ($1.00 \text{ fmol.}\mu\text{m}^{-3}$) $>$ *P. australis* ($0.71 \text{ fmol.}\mu\text{m}^{-3}$) (Fig. 4.9B).

Table 4.4. Kinetic parameters of Si(OH)_4 uptake by *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*. The values are means $\pm$ SE. The r^2 column provides the coefficient of determination.

Species	Strains	Q_{Si} (pmol.cell ⁻¹)	V_{max} ($\times 10^{-3}$ h ⁻¹)	K_s ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	α ($\times 10^{-4}$ l. μmol^{-1} .h ⁻¹)	r^2
<i>P. australis</i>	PNaus F1-5	1.67 $\pm$ 0.01	19.0 $\pm$ 2.0	6.74 $\pm$ 2.80	28.2	0.87
	PNaus 02T	1.71 $\pm$ 0.01	63.0 $\pm$ 3.0	4.01 $\pm$ 0.92	157.0	0.90
<i>P. delicatissima</i>	PNdel 145	0.18 $\pm$ 0.05	9.5 $\pm$ 0.6	8.01 $\pm$ 1.24	11.9	0.95
	PNdel 154	0.30 $\pm$ 0.001	26.4 $\pm$ 9.6	7.3 $\pm$ 5.28	12.4	0.95
	PNdel 160	0.51 $\pm$ 0.09	8.5 $\pm$ 0.9	6.54 $\pm$ 1.01	13.0	0.95
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 126	1.50 $\pm$ 0.90	8.1 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.42	23.8	0.85
	PNfra 144	1.18 $\pm$ 0.50	13.4 $\pm$ 2.8	13.2 $\pm$ 2.85	10.5	0.85
	PNfra 167	1.70 $\pm$ 0.22	9.8 $\pm$ 1.52	4.31 $\pm$ 0.72	22.7	0.65
	PNfra F1-9C	1.23 $\pm$ 0.12	13.1 $\pm$ 0.32	7.59 $\pm$ 0.65	17.2	0.94
<i>P. pungens</i>	PNpum 150	0.56 $\pm$ 0.08	17.0 $\pm$ 0.8	4.70 $\pm$ 1.11	36.2	0.92

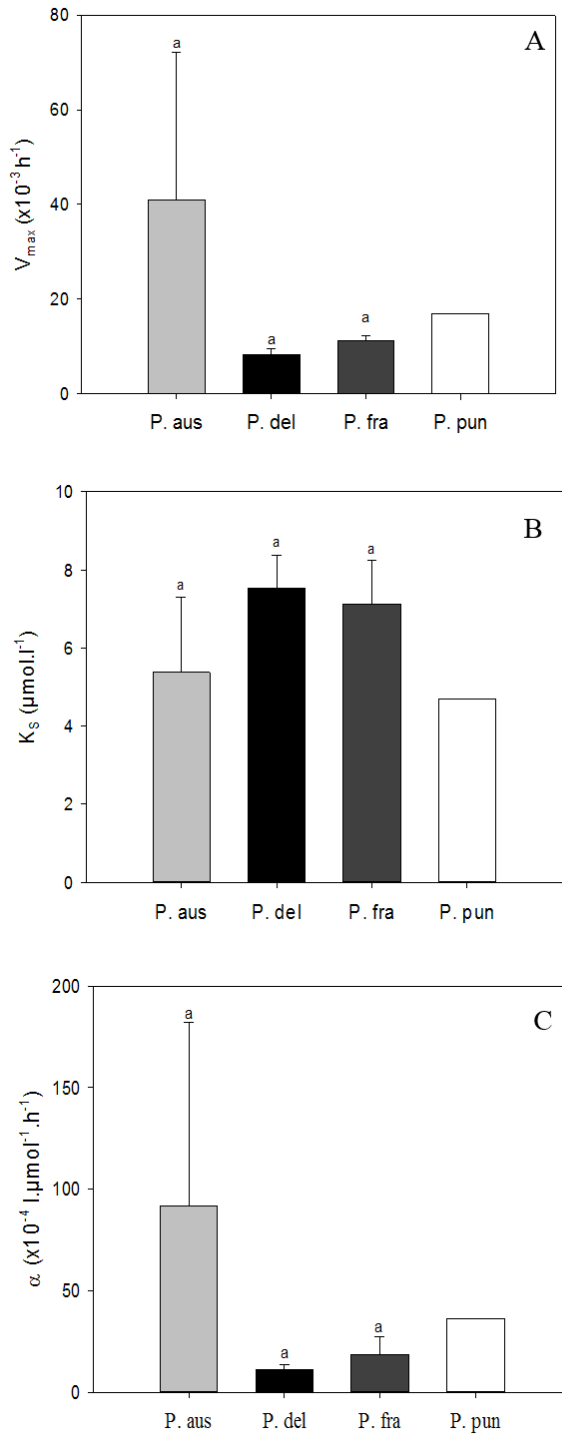


Figure 4.6. Kinetic parameters of silicate uptake: (A) maximum uptake rate (V_{max}), (B) half-saturation constant (K_S), and (C) affinity coefficient or uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α) in *P. australis* (*P. aus*), *P. delicatissima* (*P. del*), *P. fraudulenta* (*P. fra*), and *P. pungens* (*P. pun*). The values are means $\pm$ SE.

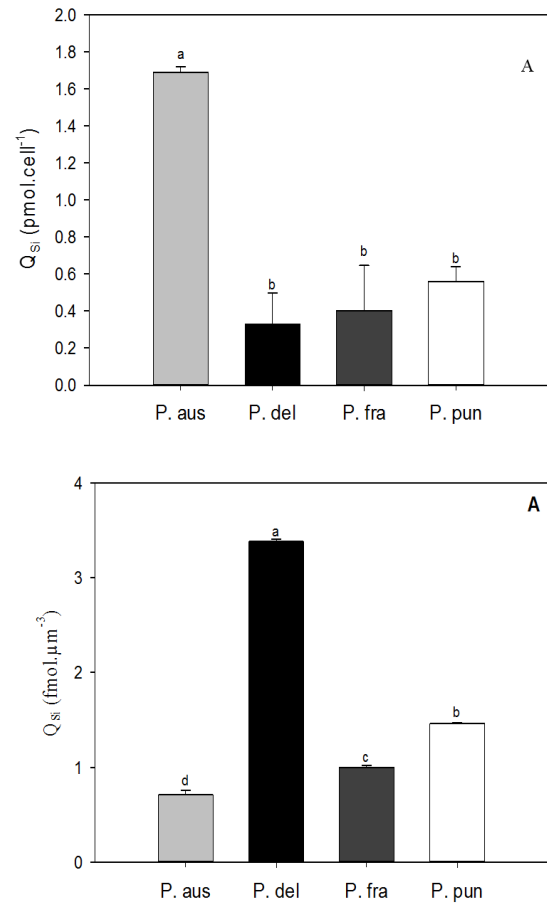


Figure 4.7. Cellular silicon quotas (Q_{Si}) expressed *per cell* (A) and *per cell volume* (B) in $pmol.cell^{-1}$ and $fmol.\mu m^{-3}$, respectively, in *P. australis* (*P. aus*), *P. delicatissima* (*P. del*), *P. fraudulenta* (*P. fra*), and *P. pungens* (*P. pun*). Results are means $\pm$ SE.

4. Discussion

4.1. A two-component NO₃ uptake system in the four *Pseudo-nitzschia* species studied

Our results show the existence of a two-component NO₃-uptake system based on external NO₃ concentrations in all four *Pseudo-nitzschia* species. These two saturation thresholds suggest the activation of high-affinity low-capacity transporters at low nitrate concentrations and the activation of low-affinity but high-capacity transporters at high nitrate concentrations. The existence of two-component systems has already been demonstrated in other diatom species, *e.g.* *Chaetoceros* sp. (Lomas and Glibert 2000), *Thalassiosira weissflogii*, and *Skeletonema costatum* / *marinoi* (Collos et al. 1992, Lomas and Glibert 2000). Armbrust et al. (2004) also identified multiple transporters for NO₃ in *Thalassiosira pseudonana*. However, to our knowledge, this is the first kinetic experiment reporting a two-component NO₃ uptake system in *Pseudo-nitzschia* species. Previous experiments carried out with *P. australis* (Cochlan et al. 2008) and *P. fryxelliana* (Auro and Cochlan 2013) did not evidence such multiphasic kinetics. Our results are in agreement with the work of Rogato et al. (2015), who identified saturable, high-affinity NO₃ transporters expressed under NO₃-limiting conditions in *P. multiseriata* and *P. multistriata*, and also low-affinity transporters in *P. multiseriata*. These findings suggest that *Pseudo-nitzschia* could benefit from the diversity of its nitrogen transporters as an ecological advantage in the variable nutrient conditions characteristic of the coastal waters where they develop.

4.2. Characterization of the NO₃, PO₄, and Si(OH)₄ uptake profiles of *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*

Our knowledge of the kinetics of nutrient uptake by *Pseudo-nitzschia* species is scarce, although many studies relate their bloom dynamics and even their species diversity to nutrient availability (Parsons and Dortch 2002, Klein et al. 2010, Ryan et al. 2017, Thorel et al. 2017). Therefore, our results bring valuable data on the kinetic parameters of NO₃, PO₄, and Si(OH)₄ uptake by four *Pseudo-nitzschia* species characteristic of the phytoplankton successions in many coastal waters. These species-specific parameters can be used to draw assumptions on the relative competitive ability of each species as compared to the others according to nutrient

concentrations. Thus, our study helps understand how differences in nutrient uptake capacities could at least partly explain species-specific bloom phenologies.

Nitrate uptake characteristics. The maximum NO_3 uptake rates ($V_{\max}$, for the upper range concentrations) of the four species ranged between $1.5 \cdot 10^{-3}$ and $29.45 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. These values are in the same order of magnitude as the $V_{\max}$ previously measured for different diatoms, including *Pseudo-nitzschia* species, even though in a lower range (e.g. Lomas and Glibert 2000, Cochlan et al. 2008, Thametrakoln and Hildebrand 2008, Auro and Cochlan 2013). The higher $V_{\max}$ ($105 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ versus $29 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ here) found by Cochlan et al. (2008) for a *P. australis* strain from Monterey Bay (USA) may in part be due to the fact that their result was obtained with a N-depleted culture while our experiments were conducted with N-replete cultures. The half-saturation constants (K_s) were between 1.1 and $10.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$, similar to or higher than (especially for *P. delicatissima* and *P. australis*) the K_s values reported for different diatoms (Lomas and Glibert 2000), for *P. australis* (Cochlan et al. 2008) and for *P. fryxelliana* (Auro and Cochlan 2013). The affinity coefficient values are difficult to compare because previous studies did not observe any two-component NO_3 uptake system; therefore, our affinity coefficients are lower because we calculated them from the $V_{\max}$ values at the first saturation plateau in the lower range of NO_3 concentrations. Therefore, globally, according to the kinetic parameters of their NO_3 uptake, none of the four *Pseudo-nitzschia* species is very competitive for NO_3 as compared to other diatoms. As for species-specific differences, both *P. delicatissima* and *P. australis*, with their higher K_s values, seem to be more nitrophilic than the other two species. However, *P. delicatissima* can be expected to take better advantage of high NO_3 concentrations because of its lower N requirements (lower nitrogen cell quotas) than *P. australis*. In contrast, *P. fraudulenta* and *P. pungens* present a less contrasted profile for NO_3 uptake, with lower K_s and higher $V_{\max}$ (for *P. pungens*). *P. pungens* can therefore be expected to take advantage of high concentrations, but both species will also thrive in lower NO_3 environments.

Phosphate uptake characteristics. Very few studies report about the phosphate uptake capacities of diatoms and, to our knowledge, this study is a first on the kinetics of PO_4 uptake by *Pseudo-nitzschia* species. The PO_4 uptake parameters ranged between 0.13 and 3.89 h^{-1} for the maximum uptake rates ($V_{\max}$), between 0.98 and $8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for the half-saturation constants (K_s), and between 0.03 and $0.79 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for the affinity coefficient (α) at sub-saturating concentrations. Compared to previous studies, *Pseudo-nitzschia* spp. had typical diatom

phosphate uptake characteristics within relatively similar phosphate concentration ranges (Nishikawa et al. 2009, 2010, Shi et al. 2015). However, some *P. fraudulenta* strains presented higher K_S values. When the kinetic parameters of PO_4 uptake by the four *Pseudo-nitzschia* species were compared, *P. pungens* and *P. fraudulenta* appeared to be the species that would grow better in high PO_4 environments because they displayed low affinity and higher phosphorus cell quotas. In contrast, *P. delicatissima* presented the highest affinity and also higher maximum uptake rates and lower phosphorus cell quotas, so this species could grow under low or high PO_4 concentrations. Finally, *P. australis* presented intermediate PO_4 uptake parameters, so that PO_4 may not be discriminating for its development as compared to the other three species.

Si(OH)₄ uptake characteristics. The kinetic parameters of Si(OH)₄ uptake ranged between 7.10^{-3} and $63.10^{-3} \text{ h}^{-1}$ for the maximum absorption rates ($V_{\max}$), between 4.0 and $15.40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for the half-saturation constant (K_S), and between $6.5.10^{-4}$ and $157.10^{-4} \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for the uptake efficiency at sub-saturating concentrations (α). These results are to our knowledge the first kinetic parameters of Si(OH)₄ uptake by *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens*. They are typical of diatom uptake kinetics (Martin-Jézéquel et al. 2000 and references herein, Spilling et al. 2010, Tantanararit et al. 2013). The results of the Si(OH)₄ kinetic experiments revealed great intraspecific variability, especially in the maximum uptake rates of the two *P. australis* strains and in the half-saturation constants among the *P. fraudulenta* strains. As a consequence, no interspecific difference was evidenced. Nevertheless, one *P. australis* strain presented a high maximum uptake rate and thus a high affinity coefficient, suggesting that this species can be efficient at sub-saturating Si(OH)₄ concentrations. However, the higher silicon cell quotas in *P. australis* indicate that it has higher silicon requirements for cell division because of its large cell and large-size frustule. In addition, it is interesting to note that if we look at the silicon quotas normalized to cell volume, *P. australis* was the least silicified species, while *P. fraudulenta* appeared to be more silicified. Therefore, *P. australis* high silicon cell quotas come from its greater cell size, not from an important silicification of its frustule. In contrast, the high silicon cell quotas of *P. fraudulenta* resulted both from its large cell size and its important silicification. Finally, the thin cells of *P. delicatissima* seem quite silicified, although to a lesser extent than *P. fraudulenta*, while *P. pungens* cells are larger than *P. delicatissima* cells, but less silicified.

Previous studies on *Pseudo-nitzschia* spp. bloom dynamics suspected differences in nutrient utilization to explain species-specific bloom dynamics and phenologies (e.g. Fehling et al. 2006, Thorel et al. 2017). Our findings therefore confirm the diversity of the *Pseudo-nitzschia* genus in terms of nutrient uptake capacities and requirements. The four *Pseudo-nitzschia* species present specific profiles as far as nutrient uptake and elemental quotas are concerned.

4.3. Implications of *Pseudo-nitzschia* interspecific diversity in nutrient uptake capacities and elemental quotas for bloom development

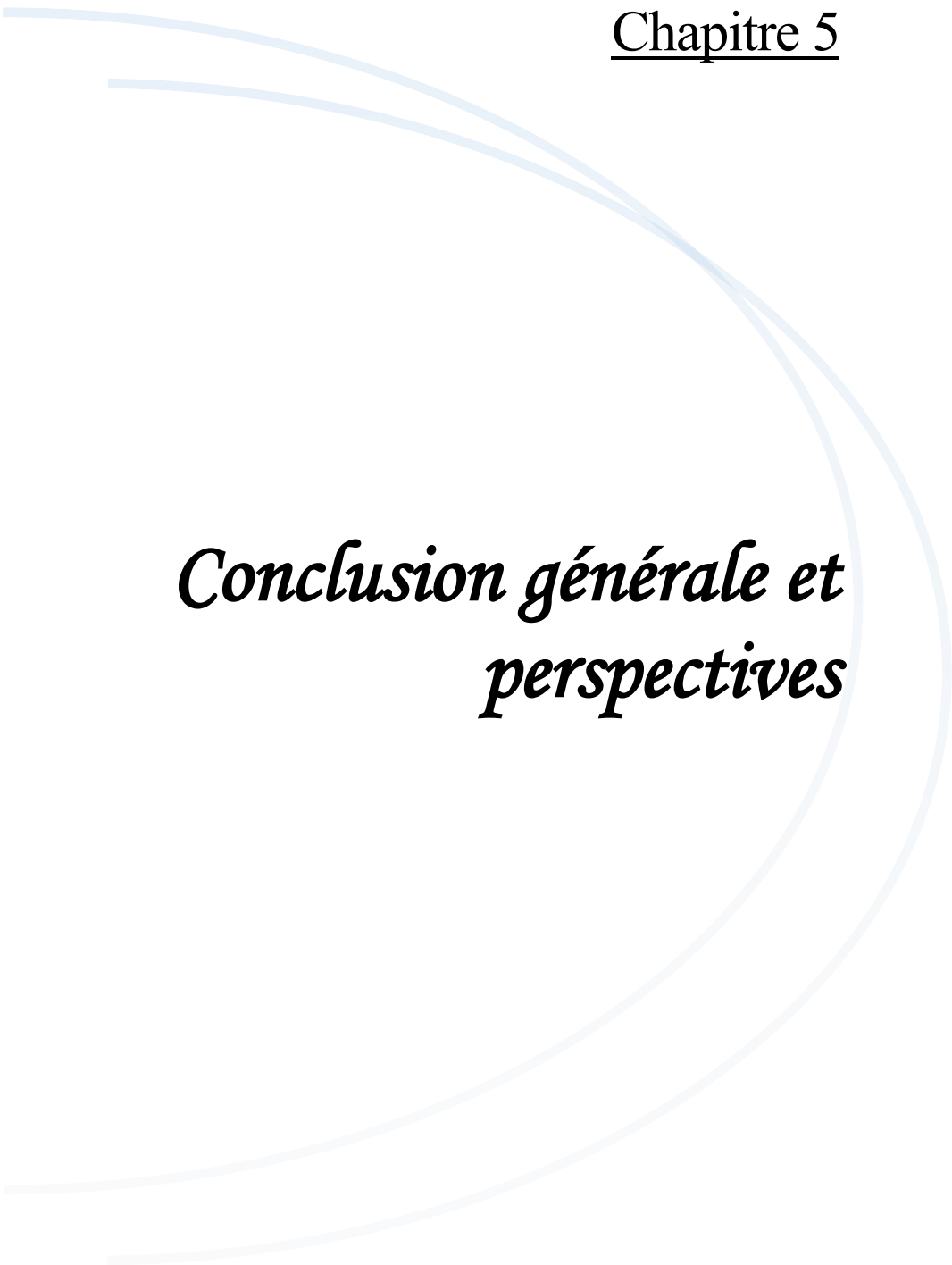
Our estimation of several nutrient uptake traits (the maximum uptake rate, the half-saturation constant for uptake, the affinity coefficient, and the quota) is useful to link the ecophysiology of the different species to the structure of *Pseudo-nitzschia* communities and their species-specific seasonal successions in relation to nutrient availability.

First, different studies have linked an increase in *Pseudo-nitzschia* abundance with high or increasing NO_3 concentrations (Parsons and Dortch 2002, Thorel et al. 2017) or with low Si:N ratios (Marchetti et al. 2004, Ryan et al. 2017). These observations are in agreement with the lower efficiency in NO_3 uptake we found in all four *Pseudo-nitzschia* species as compared to other diatoms. We therefore confirm that the development of *Pseudo-nitzschia* spp. is probably favored by increased NO_3 concentrations. However, the NO_3 uptake kinetic profile was not similar for all species: *P. australis* and *P. delicatissima* seemed to be more nitrophilic than *P. pungens* and *P. fraudulenta*. This may partly explain the difference in seasonality observed among these species. In the Bay of Seine, *P. fraudulenta* and *P. pungens* are present all summer while *P. australis* rather develops from spring to mid-summer and in early fall, and *P. delicatissima* in late spring/early summer (Klein et al. 2010, Thorel et al. 2017). Our findings therefore confirm the high acclimation capacities of *P. pungens*. In addition, the more nitrophilic nature of *P. australis* and *P. delicatissima* clearly explains the development of these species in high NO_3 environments, especially in spring and fall in coastal environments or in upwelling regions (Klein et al. 2010, Ryan et al. 2017, Thorel et al. 2017, Bowers et al. 2018). However, even if the four species presented similar Si(OH)_4 uptake capacities, *P. australis* and *P. delicatissima* seemed to differ by their Si(OH)_4 requirements; this suggests that, although they are both favored by high NO_3 environments, *P. australis* would also require higher Si(OH)_4 conditions. These results are in agreement with Thorel et al. (2017), who never observed *P.*

australis and *P. delicatissima* developing together during their two-year survey in the Bay of Seine, and concluded that *P. delicatissima* grew when the Si:N ratios were low. In light of our results obtained with strains from coastal French waters, we can therefore further hypothesize that high NO_3 concentrations along with low Si(OH)_4 concentrations may favor *P. delicatissima* rather than *P. australis* in the Bay of Seine, in agreement with previous findings on *P. delicatissima* in other regions of the world (Kaczmarek et al. 2007, Quijano-Scheggia et al. 2008). In contrast, *P. australis* appears to require high NO_3 and high Si(OH)_4 concentrations to bloom. This conclusion qualifies the idea that *Pseudo-nitzschia* species have an advantage at low Si(OH)_4 concentrations and advocates once more for a species-specific approach as far as *Pseudo-nitzschia* physiology and ecology are concerned.

5. Conclusion

This study is the first to estimate and compare the capacities for NO_3 , PO_4 , and Si(OH)_4 uptake by four *Pseudo-nitzschia* species. Our results show that *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, and *P. pungens* present different nutrient affinities and requirements, and especially confirm that NO_3 and Si(OH)_4 concentrations play a role in the selection of *Pseudo-nitzschia* species diversity during blooms. More *in situ* studies of *Pseudo-nitzschia* species successions across environmental gradients – especially gradients of nutrient availability – are needed to better understand this selection mechanism. In addition, the nutrient uptake traits characterized here for each species will be of particular interest for trait-based functional ecology studies of *Pseudo-nitzschia* blooms. Furthermore, the present uptake parameters can also be used to develop species-specific physiological models of growth that will be a first step in the development of predictive models for early warning or testing climate change scenarios.



Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

Les travaux menés au cours de cette thèse ont confirmé l'existence d'une importante diversité écophysiologique au sein du genre *Pseudo-nitzschia* en caractérisant différents traits physiologiques spécifiques à chaque espèce participant aux efflorescences de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine. L'originalité de ce travail tient dans la caractérisation de la variabilité intraspécifique pour chaque espèce, et en particulier l'influence du cycle de vie au travers des changements de taille cellulaire. Les résultats obtenus permettent de développer de nouvelles hypothèses pour la compréhension du déterminisme des efflorescences toxiques de *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine et des conditions physiologiques favorables à la production d'acide domoïque.

1. La diversité intraspécifique au sein du genre *Pseudo-nitzschia*

Les travaux d'écophysiologie réalisés au cours de cette thèse ont montré l'importance de la variabilité intraspécifique pour différents traits physiologiques chez *P. australis*, *P. pungens*, *P. fraudulenta* et *P. delicatissima*. L'étude de nombreuses souches issues des eaux côtières françaises pour chaque espèce révèle en effet une importante diversité intraspécifique en terme de taux de croissance, de contenu cellulaire en acide domoïque, de taux de production d'acide domoïque ainsi que pour l'utilisation des éléments nutritifs.

Taille cellulaire et toxicité

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle des changements de taille cellulaire liés au cycle de vie dans cette variabilité intraspécifique. L'approche multi-souches a ainsi permis d'étudier, pour chaque espèce, des souches de différentes tailles cellulaires mais aussi les mêmes souches à différentes tailles. Le résultat le plus marquant est la relation particulière reliant la taille cellulaire et le contenu cellulaire en acide domoïque chez *P. australis* (Chapitre 2). Cette relation se traduit par une augmentation du contenu cellulaire en acide domoïque chez les cellules de taille intermédiaire comprise entre 55 et 85 μm . Cette étude est la première mettant en évidence une telle relation chez une espèce de *Pseudo-nitzschia*. En effet, la relation observée précédemment dans la littérature concluait à une diminution de la toxicité avec la diminution de la taille cellulaire pour des souches dont la taille était généralement comprise entre 30 et 80 μm (Mafra et al. 2009, Amato et al. 2010). Nos résultats ne sont pas totalement en contradiction avec cette relation puisqu'ils montrent également une diminution du contenu cellulaire en acide domoïque avec la diminution de la taille entre 70 et 30 μm . Par contre, nous

avons complété le jeu de données grâce à l'étude de souches de grandes tailles ($> 80 \mu\text{m}$, entre autres issues des expériences de reproduction sexuée en culture). Ces données ont alors permis d'observer que chez *P. australis*, les souches de grandes et petites tailles ($> 100 \mu\text{m}$ et $< 50 \mu\text{m}$) présentent des contenus cellulaires en acide domoïque similaires, plus faibles, et que le contenu en acide domoïque augmente chez les souches dont la taille est comprise entre 55 et 85 μm . Chez *P. australis*, cette gamme de taille correspond à celle des gamétocystes, c'est-à-dire les cellules capables de reproduction sexuée. Ce résultat montre donc que des modifications du métabolisme cellulaire interviennent quand les cellules de *P. australis* acquièrent la capacité de se reproduire sexuellement entraînant une augmentation de la production d'acide domoïque. Cette augmentation de la toxicité chez les gamétocystes de *P. australis* pourrait être une « coïncidence physiologique » : une augmentation de l'efficacité du métabolisme cellulaire et/ou de quotas cellulaires en préparation de la reproduction sexuée pourraient aussi favoriser les voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse de l'acide domoïque (Pan et al. 1998). Cependant, on ne peut pas complètement exclure que l'acide domoïque joue un rôle lors de la reproduction sexuée, en tant que phéromone ou comme protection contre les brouteurs (Lelong et al. 2012, Tammilehto et al. 2015). Ce lien entre l'acide domoïque et les stades du cycle de vie suggère que le cycle de vie de *P. australis* pourrait influencer la toxicité des efflorescences. D'une part, comme la distribution des tailles cellulaires dans les populations lors des efflorescences varie en fonction des années (D'Alelio et al. 2010), les efflorescences de *P. australis* pourraient être plus ou moins toxiques en fonction du spectre de taille des populations lors de ces efflorescences. D'autre part, le fait que les grandes cellules soient moins toxiques suggère que la production de cellules de grande taille pourrait entraîner une diminution de la toxicité d'une efflorescence lors d'un événement de reproduction sexuée dans une population naturelle de *P. australis*.

Il est intéressant de noter que si l'on considère les contenus cellulaires en acide domoïque mesurés chez *P. australis* lors des expériences en milieu fermé présentées dans le Chapitre 3 et lors de deux expériences complémentaires non présentées (souches de tailles différentes en suivant le même protocole expérimental), on retrouve une relation gaussienne entre taille cellulaire et contenu cellulaire en acide domoïque similaire à celle du Chapitre 2 (Fig. 5.1). Ces résultats confirment donc la relation entre la taille cellulaire et les concentrations en acide domoïque chez *P. australis* et l'augmentation de la production d'acide domoïque dans la gamme de taille des gamétocystes. Par contre, si les tendances sont similaires, les concentrations en acide domoïque mesurées sont différentes : les plus importants contenus

cellulaires en acide domoïque ont été mesurés lors des expériences où les concentrations initiales en éléments nutritifs (en particulier en nitrates) étaient plus importantes (Chapitre 3). Ces observations sont en accord avec les nombreuses études qui montrent que l'azote est indispensable pour la synthèse de l'acide domoïque (Bates et al. 1998, Pan et al. 1998, Fehling et al. 2004). Cela confirme aussi que la production d'acide domoïque en phase stationnaire dépend de la croissance en phase exponentielle qui fournit les molécules précurseurs et l'énergie nécessaires (Pan et al. 1998). La relation décrite au Chapitre 2 qui permet de prédire le contenu en acide domoïque à partir de la taille cellulaire pourrait donc être améliorée en prenant en compte la disponibilité en éléments nutritifs.

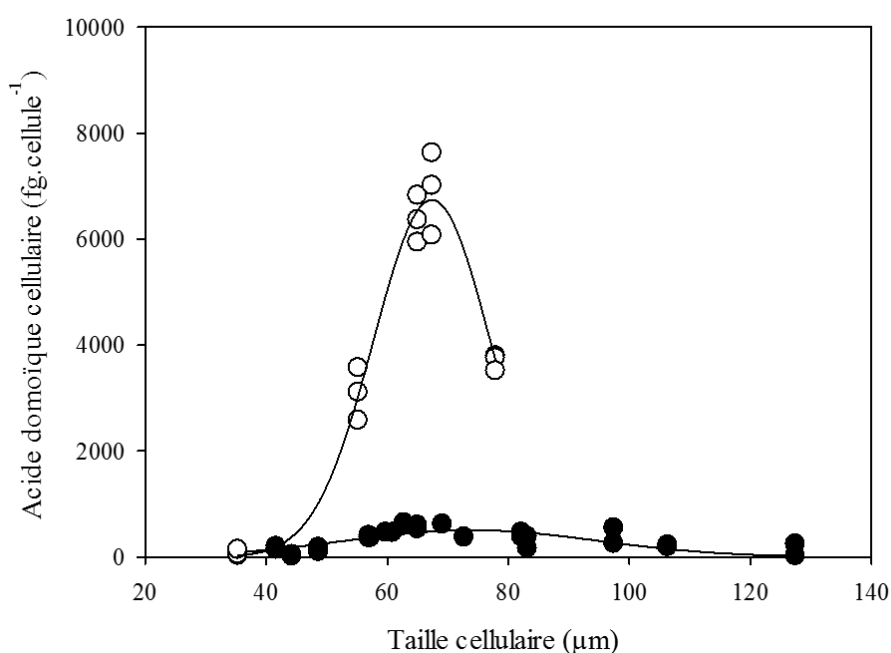


Figure 5.1. Acide domoïque cellulaire (fg.cellule⁻¹) en fonction de la taille cellulaire (μm) chez *Pseudo-nitzschia australis*. Les ronds noirs représentent les données issues du Chapitre 2 et les ronds blancs représentent les données issues du Chapitre 3 et des expériences supplémentaires. Le modèle appliqué aux données est un modèle de relation gaussienne ($P < 0.0001$, $r^2 = 0.77$ pour les données issues du Chapitre 2 et $r^2 = 0.97$ pour les données issues du Chapitre 3 et des expériences supplémentaires).

Taille cellulaire et croissance

Lors des expériences du Chapitre 2 sur l'influence de la diminution de la taille cellulaire au cours de la multiplication végétative sur la physiologie des *Pseudo-nitzschia*, nous avons aussi observé un effet de la taille cellulaire sur la croissance de *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens* (Chapitre 2). Chez ces trois espèces, une diminution du taux de croissance a été observée pour les souches dont la taille est inférieure à 60 μm. Les cellules de petites tailles semblent donc être physiologiquement moins efficaces en comparaison avec les cellules de

grandes tailles. Ces résultats, en accord avec les observations de Chisholm et Costello (1980) et Von Dassow et al. (2006) sur des diatomées du genre *Thalassiosira*, démontrent que les variations intraspécifiques du taux de croissance en fonction de la taille cellulaire chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* ne suivent pas les lois allométriques qui supposent une augmentation du taux de croissance avec la diminution de la taille cellulaire (Amato et al. 2005, Von Dassow et al. 2006, Edwards et al. 2012, Marañón et al. 2013, Otero et al. 2018).

Taille cellulaire et capacités d'absorption des éléments nutritifs

A la lumière de ces résultats et suite aux expériences de cinétiques d'absorption du Chapitre 4, une étude complémentaire a été réalisée pour explorer l'influence de la taille cellulaire sur les paramètres d'absorption des éléments nutritifs (nitrates, phosphates et silicates) chez *P. australis* et *P. fraudulenta* (article en préparation). Ces expériences complémentaires ont été réalisées à partir du même protocole expérimental que celui présenté dans le Chapitre 4 mais avec des souches de *P. australis* et *P. fraudulenta* de tailles différentes. Les résultats de cette étude complémentaire montrent une influence de la taille des cellules sur les capacités d'absorption des nitrates, phosphates et silicates chez *P. australis* (Fig. 5.2), mais aucune influence de la taille cellulaire chez *P. fraudulenta*. Pour l'absorption des nitrates et des phosphates, des tendances similaires ont ainsi été observées : l'efficacité d'absorption (α) reste constante quelle que soit la taille cellulaire (Fig. 5.2G et 5.2H). Cependant, les données d'affinité (K_s , Fig. 5.2A et 5.2B) et de vitesse maximale d'absorption ($V_{\max}$, Fig. 5.2D et 5.2E) démontrent que petites et grandes cellules de *P. australis* n'utilisent pas les nitrates ou les phosphates de la même façon. Les grandes cellules auraient peu de transporteurs présentant une plus grande affinité ($V_{\max}$ et K_s inférieurs) comparés aux cellules plus petites qui auraient de nombreux transporteurs dont l'affinité serait inférieure ($V_{\max}$ et K_s supérieurs). Aux vues de ces résultats, il semble que, lors de la diminution de la taille cellulaire, des changements physiologiques entraînent des stratégies d'utilisation des nitrates et des phosphates différentes selon les tailles cellulaires chez *P. australis*. En ce qui concerne les silicates, les résultats montrent une diminution de l'affinité (K_s , Fig. 5.2C), de la vitesse maximale d'absorption ($V_{\max}$, Fig. 5.2F) et de l'efficacité d'absorption (α , Fig. 5.2I) avec la diminution de la taille cellulaire. Ces résultats suggèrent que les cellules de grande taille possèdent plus de transporteurs avec une forte affinité et seraient ainsi plus efficaces pour l'absorption du silicium par rapport aux cellules de petite taille. L'efficacité accrue des grandes cellules peut être reliée au fait que ces grandes cellules ont des besoins en silicium plus importants pour leur division cellulaire étant donné la taille de leur frustule. Il est intéressant de noter que l'efficacité

d'absorption du silicium est particulièrement réduite pour les cellules dont la taille est inférieure à 60 μm . Or, nous avons aussi montré que les taux de croissance sont plus faibles chez ces petites cellules (Chapitre 2) Ce résultat confirme donc pour *P. australis* notre hypothèse selon laquelle les petites cellules présentent un métabolisme moins efficace.

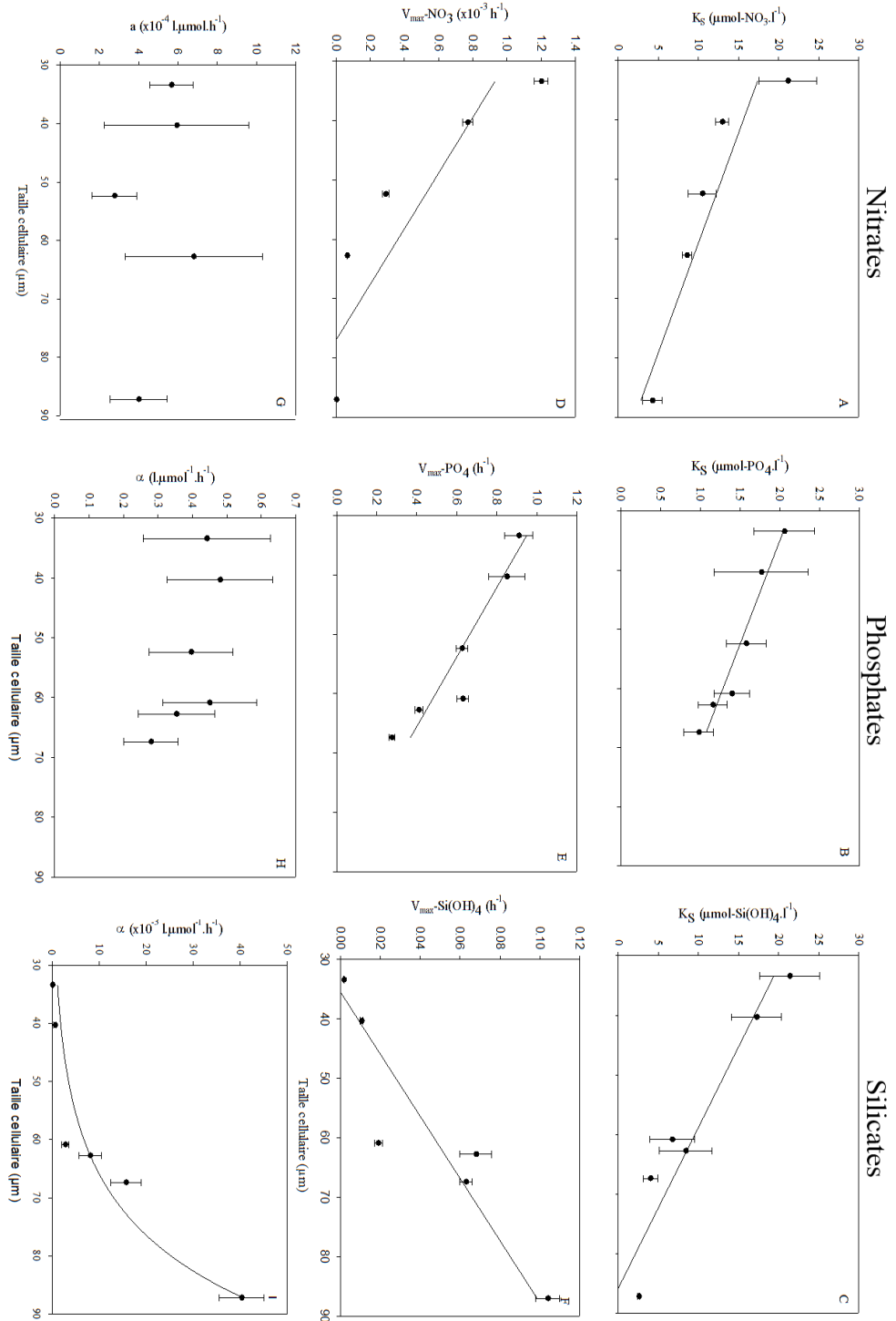


Figure 5.2. Paramètres de cinétiques de nitrates, phosphates et silicates chez *P. australis* en fonction de la taille cellulaire (μm). (A), (B) et (C) représentent les constantes de demi-saturation (K_s). (D), (E) et (F) représentent les vitesses d'absorption maximales (V_{max}). (G), (H) et (I) représentent le coefficient d'affinité ou l'efficacité d'absorption aux concentrations sous-saturantes (α). Les valeurs sont les moyennes des triplicats $\pm$ écart-type.

Age des cultures et croissance

De par la diminution progressive de la taille cellulaire dans les cultures de *Pseudo-nitzschia* au cours de la multiplication végétative, il existe forcément un certain lien entre la taille cellulaire et l'âge de la culture, c'est-à-dire le temps en culture depuis l'isolement à partir des populations naturelles (Amato et al. 2005, D'Alelio et al. 2009). L'utilisation de nombreuses souches isolées à différentes tailles a permis de minimiser ce lien (voir Chapitre 2). Durant ce travail de thèse, nous avons donc aussi étudié l'impact de l'âge des cultures sur la croissance et la toxicité de *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens* (Chapitre 2). Les résultats obtenus chez *P. australis* nous ont permis de conclure que l'âge des cultures n'impactait pas significativement la physiologie et notamment la croissance de cette espèce, l'effet de la taille cellulaire étant plus marqué. En revanche, chez *P. pungens* et *P. fraudulenta*, l'âge des cultures semble influencer la croissance avec une diminution des taux de croissance en fonction de l'âge des souches. Cependant, les souches ayant été isolées au cours de deux périodes d'échantillonnage lointaines, il est difficile de savoir si cette différence est une conséquence de l'adaptation des cellules aux conditions environnementales naturelles ou un changement physiologique au cours de la période de culture. De plus, comme nos résultats ont été obtenus à partir de deux groupes de souches d'âge très différent, il serait nécessaire de compléter ces résultats avec des souches d'âge intermédiaire.

Ce travail de thèse sur l'effet de la taille cellulaire et de l'âge des cultures sur la croissance et le contenu cellulaire en acide domoïque nous a permis d'émettre des recommandations quant à l'utilisation des souches en culture durant les études écophysiologiques. Ainsi, pour pouvoir caractériser physiologiquement les espèces du genre *Pseudo-nitzschia*, il semble préférable de travailler avec des souches maintenues depuis moins de deux ans en culture et dont la taille cellulaire est supérieure ou égale à la taille des gamétocystes.

Enfin, outre l'influence de la taille cellulaire, le travail réalisé sur plusieurs souches suggère l'existence d'une certaine diversité génétique au sein d'une même espèce. Les résultats obtenus dans les Chapitres 3 et 4 ont révélé une variabilité des traits physiologiques entre les souches d'une même espèce présentant des tailles similaires. Cette diversité intraspécifique s'est exprimée à travers la variabilité des capacités d'absorption des éléments nutritifs au sein d'une même espèce (pour des tailles similaires, Chapitre 4) ou encore à travers la variabilité des différents traits physiologiques étudiés dans le Chapitre 3 (quotas élémentaires, paramètres photosynthétiques, contenus cellulaires en Chl *a* et en acide domoïque).

En conclusion, ce travail de thèse a permis de caractériser finement la variabilité intraspécifique existant pour différents traits physiologiques. Nos résultats montrent qu'il existe une diversité intraspécifique certaine chez chacune des espèces étudiées. Cette diversité est en partie liée à la taille cellulaire et parfois sans doute au cycle de vie, mais aussi probablement à une diversité génétique non négligeable au sein des populations des espèces de *Pseudo-nitzschia*. Ces résultats confirment donc l'importance de la diversité intraspécifique qui avait déjà été observée chez quelques autres espèces du genre *Pseudo-nitzschia* (Kudela et al. 2004, Thessen et al. 2009, Amato et al. 2010).

2. La diversité interspécifique au sein du genre *Pseudo-nitzschia*

Cette thèse a permis d'étudier la diversité interspécifique des réponses physiologiques en comparant plusieurs espèces du genre *Pseudo-nitzschia* : *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*. La caractérisation de la variabilité intraspécifique a permis d'identifier clairement les différences existantes entre les espèces et de dresser un portrait spécifique basé sur les traits physiologiques étudiés pour chacune de ces espèces.

Parmi les traits morphologiques et écophysiologiques que nous avons étudiés au cours de cette thèse, beaucoup ont présenté des différences interspécifiques. Cependant, les espèces de *Pseudo-nitzschia* étudiées n'ont pas montré de différences de croissance entre elles (Chapitres 2 et 3). Par contre, des différences interspécifiques des paramètres morphologiques liés aux différents stades du cycle de vie (taille des cellules initiales et taille des gamétocystes) ont été observées. Et surtout, des différences ont été observées entre espèces pour les indices physiologiques suivants : quotas cellulaires en azote, phosphore et silicium, contenu cellulaire en chlorophylle *a*, capacité photosynthétique, paramètres d'absorption des nitrates et phosphates et bien sûr toxicité (concentrations en acide domoïque cellulaire et extracellulaire et taux de production d'acide domoïque). A partir de ces différences, un portrait écophysiologique de chaque espèce a été élaboré et les résultats sont résumés dans les tableaux 5.1 et 5.2.

Capacités d'absorption des éléments nutritifs chez *P. australis*, *P. pungens*, *P. fraudulenta* et *P. delicatissima*

L'un des objectifs de cette thèse était de comparer les capacités d'absorption des nitrates, phosphates et silicates chez différentes espèces de *Pseudo-nitzschia*. En effet, il existe très peu d'information à ce sujet pour les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* (Cochlan et al. 2008, Loureiro et al. 2009, Auro et Cochlan 2013), bien que de nombreuses études aient observé que leur dynamique d'efflorescence et même la diversité spécifique durant ces efflorescences étaient influencées par les conditions nutritives (Parsons et Dortch 2002, Klein et al. 2010, Ryan et al. 2017, Thorel et al. 2017). Ainsi, les différences dans les paramètres de cinétiques d'absorption des éléments nutritifs en conditions limitantes peuvent nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de compétitions interspécifiques et les successions saisonnières des espèces (Eppley et al. 1990, Nelson et Brzezinski, 1990). Les résultats du Chapitre 4 montrent que *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* et *P. pungens* présentent des différences d'affinités et de quotas notamment en nitrates et silicates. En effet, *P. australis* et *P. delicatissima* avec des constantes de demi-saturation (K_s) plus élevées semblent être des espèces plus nitrophiles par rapport à *P. fraudulenta* et *P. pungens*. Ce résultat suggère que *P. australis* et *P. delicatissima* seraient plus efficaces dans des milieux riches en nitrates. De plus, ces deux espèces semblent se distinguer, l'un de l'autre, par leur quota en silicium, plus élevé chez *P. australis*. Les résultats du Chapitre 4 suggèrent ainsi que *P. australis* a besoin d'environnements plus riches en silicium pour se développer comparée à *P. delicatissima*. Ces différences de besoin en éléments nutritifs peuvent en partie expliquer les différences de saisonnalité des efflorescences observées entre ces espèces en Baie de Seine puisque, par exemple, *P. pungens* est présente toute l'année (y compris l'été lorsque les concentrations en nitrates sont plus faibles) tandis que *P. australis* se développe du printemps au milieu de l'été et à l'automne et *P. delicatissima* se développe à la fin du printemps et au début de l'été c'est-à-dire lorsque les concentrations en nitrates sont plus élevées (Klein et al. 2010, Thorel et al. 2017). De plus il a aussi déjà été observé que les efflorescences de *P. delicatissima* étaient corrélées avec de plus faibles ratios Si:N (Thorel et al. 2017).

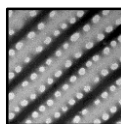
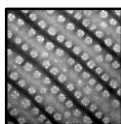
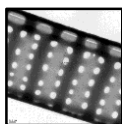
En complément, chez *P. australis*, lors des expériences en milieu fermé (batch, Chapitre 3), nos résultats ont montré qu'à l'arrêt de croissance, les concentrations en silicates dans le milieu de culture étaient plus importantes en comparaison avec les concentrations en silicates mesurées dans les cultures de *P. fraudulenta* et *P. pungens* (respectivement, 1.2 - 1.6 μM , 0.18 - 1 μM et

0.16 - 0.52 μM). De même, les quotas minimaux de silice biogène ainsi que les quotas par cellule (Chapitre 4) étaient plus élevés chez *P. australis* par rapport aux deux autres espèces (Tableau 5.1). Il est intéressant de noter que chez *P. australis*, les quotas cellulaires en silice mesurés durant les expériences de cinétiques du Chapitre 4 (Q_{Si} , en moyenne de 1.7 pmol.cellule^{-1}) ne semblent pas différents des quotas minimaux en silice mesurés durant les expériences en milieu fermé du Chapitre 3 ($Q_{0 \text{ Si}}$ en moyenne de 1.6 pmol.cellule^{-1}). En cas de limitation en silicium, les diatomées diminuent généralement leur silicification pour maintenir des taux de divisions cellulaires élevés (Martin-Jézéquel et al. 2000). Cependant, nos résultats sur les quotas et quotas minimaux en silice suggèrent qu'en conditions limitantes en silicium, les cellules de *P. australis* ne peuvent sans doute pas moduler beaucoup leur silicification pour maintenir leur taux de croissance. Cela pourrait expliquer pourquoi la croissance de *P. australis* s'arrête alors que les concentrations en silicates dans le milieu de culture sont encore assez importantes en comparaison avec *P. fraudulenta* et *P. pungens*. Afin de compléter les informations sur les paramètres d'absorption du silicium obtenues lors des expériences de cinétiques du Chapitre 4, il est possible d'utiliser les données de quotas minimum en silice mesurés durant les expériences en milieu fermé du Chapitre 3 pour calculer l'efficacité de croissance de *P. australis*, *P. pungens* et *P. fraudulenta* d'après le modèle de Droop (équation 1) :

$$E = \frac{\alpha}{Q_0} \quad (1)$$

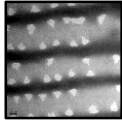
P. australis, *P. fraudulenta* et *P. pungens* présentent ainsi des efficacités de croissance vis-à-vis du silicium de $7.3.10^{-4}$, $57.7.10^{-4}$ et $266.7.10^{-4}$, respectivement. Ces résultats confirment donc que *P. australis* a une efficacité de croissance vis-à-vis du silicium inférieure à *P. fraudulenta* et à *P. pungens* et que l'espèce *P. pungens* semble être l'espèce présentant la plus grande efficacité de croissance. Ce résultat confirme les conclusions issues des expériences de cinétiques du Chapitre 4 : *P. australis* nécessite pour son développement des conditions beaucoup plus riches en silicates que *P. pungens* et *P. fraudulenta*. Il serait intéressant de mesurer les quotas minimums en silice pour *P. delicatissima* afin de pouvoir vérifier si celle-ci présente une efficacité de croissance vis-à-vis du silicium plus élevée que celle de *P. australis*, comme le laissent supposer ses quotas en silice moins élevés (Chapitre 4).

Table 5.1. Portrait écophysiotique de *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*. Ce tableau résume les résultats obtenus au cours de cette thèse. AD : acide domoïque.

		<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>						
Espèces										
<u>Traits morphologiques</u>										
Taille maximale		167 µm	113 µm	183 µm						
Taille minimale en culture		29 µm	22 µm	33 µm						
Gamme de taille de la phase sexuée		55-85 µm	29-90 µm	43-75 µm						
<u>Traits physiologiques liés à la croissance</u>										
Croissance		0.31 - 0.82 jour ⁻¹	0.19 - 0.68 jour ⁻¹	0.15 - 0.75 jour ⁻¹						
Photosynthèse	Taux maximum de transport des électrons ⁽¹⁾	0.29 - 0.39	0.02 - 0.06	0.09 - 0.22						
	Efficacité photosynthétique ⁽²⁾	0.18 - 0.36	0.24 - 0.74	0.14 - 1.02						
	Intensité lumineuse à saturation ⁽³⁾	29 - 266	21 - 88	13 - 99						
Contenu cellulaire	Chlorophylle <i>a</i> ⁽⁴⁾	3.6 - 13.3	0.7 - 5.5	0.7 - 4.7						
	Quotas en azote ⁽⁵⁾	1.34 - 1.54	1.13 - 1.43	2.08 - 2.23						
	Quotas en phosphore ⁽⁵⁾	0.030 - 0.167	0.015 - 0.095	0.168 - 0.178						
	Quotas en silicium ⁽⁵⁾	1.67 - 1.71	1.18 - 1.70	0.56						
	Quotas minimums en Si ⁽⁵⁾	1.13 - 2.31	0.14 - 0.48	0.07 - 0.18						
Absorption des éléments		N	P	Si	N	P	Si	N	P	Si
	Vitesse maximale d'absorption ⁽⁶⁾	7.6*	0.5	41*	2.4*	1.1	11*	22.6*	0.1	17*
	Constante de demi-saturation ⁽⁷⁾	10	1.2	5.4	2.3	5.9	7.1	5	2.7	4.7
	Coefficient d'affinité ⁽⁸⁾	4.8**	3.5	92**	6.6**	1.9	18**	22**	0.7	36**
<u>Traits physiologiques liés à la toxicité</u>										
Quotas en acide domoïque	AD cellulaire ⁽⁹⁾	0.13 - 7.13		0.0001 - 0.03		0.002 - 0.23				
	AD dissous par cellule ⁽⁹⁾	0.07 - 2.33		0 - 0.07		0.0002 - 0.07				
	AD dissous par ml ⁽¹⁰⁾	0.08 - 28.1		0 - 0.21		0.003 - 2.1				
Production d'AD	Production cellulaire ⁽¹¹⁾	-0.72 - 2.95		-5.5.10 ⁻⁶ - 0.03		-0.010 - 0.07				
	Production dissoute ⁽¹¹⁾	-0.30 - 1.27		-6.5.10 ⁻⁶ - 6.2.10 ⁻⁶		-0.015 - 0.05				

⁽¹⁾ETR_{C-MAX} en mmole.mgC⁻¹.h⁻¹, ⁽²⁾ α en mmole.mgC⁻¹.h⁻¹.(µmol photons.m⁻².s⁻¹)⁻¹, ⁽³⁾E_k en µmol photons.m⁻².s⁻¹, ⁽⁴⁾Chl *a* en pg.cellule⁻¹, ⁽⁵⁾Quotas cellulaires en pmol.cellule⁻¹, ⁽⁶⁾moyenne des V_{max} en h⁻¹, ⁽⁷⁾moyenne des K_s en µmol.l⁻¹, ⁽⁸⁾moyenne des α en l.µmol⁻¹.h⁻¹, ⁽⁹⁾cAD et dAD en pg.cellule⁻¹, ⁽¹⁰⁾dDA en ng.ml⁻¹ et ⁽¹¹⁾production de cAD et dDA en pg.cellule⁻¹.jour⁻¹, *x10⁻³ et **x10⁻⁴.

Table 5.2. Portrait écophysiotique de *P. delicatissima*. Ce tableau résume les résultats obtenus au cours de la thèse.

Espèce		Pseudo-nitzschia delicatissima		
				
<u>Traits physiologiques liés à la croissance</u>				
Contenu cellulaire	Quotas en azote ⁽⁵⁾	0.50 - 0.52		
	Quotas en phosphore ⁽⁵⁾	0.026 - 0.031		
	Quotas en silicium ⁽⁵⁾	0.18 - 0.51		
Absorption des éléments		N	P	Si
	Vitesse maximale d'absorption ^{*(6)}	12.5*	3.3	8*
	Constante de demi-saturation ^{*(7)}	9.8	4.7	7.5
	Coefficient d'affinité ^{*(8)}	3.8**	7.0	11**
<u>Traits physiologiques liés à la toxicité</u>				
Quotas en acide domoïque	AD cellulaire ⁽⁹⁾	0.0004 - 0.003		
	AD dissous par cellule ⁽⁹⁾	Non détecté		
	AD dissous par ml ⁽¹⁰⁾	Non détecté		

⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾, ⁽⁷⁾, ⁽⁸⁾, ⁽⁹⁾, ⁽¹⁰⁾ * et ** : se référer au tableau précédent pour la signification.

Variabilité interspécifique de la toxicité

Cette thèse avait, également, bien sûr pour objectif d'étudier la production d'acide domoïque en comparant les trois espèces les plus toxiques de la Baie de Seine : *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens* (Chapitre 3). Tout d'abord, les résultats que nous avons obtenus ont confirmé l'importante variabilité interspécifique de la toxicité existant entre les espèces de *Pseudo-nitzschia* soulignée par Lelong et al. (2012). Plus particulièrement, nos résultats (Tableaux 5.1 et 5.2) viennent confirmer le gradient de toxicité observé précédemment entre ces espèces en Baie de Seine avec *P. australis* la plus toxique, puis *P. pungens*, *P. fraudulenta* et enfin *P. delicatissima* la moins toxique (Thorel 2014, Lema et al. 2017). De plus, au cours de cette thèse, nous avons également caractérisé les concentrations en acide domoïque dissous. Comme pour les concentrations cellulaires en acide domoïque, nos résultats ont montré un gradient de concentration avec les plus fortes concentrations en acide domoïque dissous retrouvées dans les cultures de *P. australis* puis de *P. pungens* et enfin de *P. fraudulenta*. Chez *P. delicatissima*, l'acide domoïque n'a jamais été détecté dans le milieu de culture. Ces différences de toxicité entre espèces confirment que *P. australis* est l'espèce la plus susceptible de provoquer des

événements ASP sur les côtes françaises. Cependant, il est à noter que *P. pungens* peut aussi présenter des contenus cellulaires en acide domoïque assez importants, parfois aussi importants que *P. australis*. Cette espèce n'est donc pas à négliger dans les études sur les efflorescences toxiques en particulier en Baie de Seine.

Enfin, en termes de différences interspécifique, les résultats des expériences du Chapitre 3 montre que *P. australis* est caractérisée par des contenus en Chl *a* plus importants que les autres espèces. En conséquence, il est aussi apparu que cette espèce présentait des capacités photosynthétiques supérieures. Le lien entre photosynthèse et production d'acide domoïque a déjà été démontré (Bates et al. 1991, Pan et al. 1998). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les plus fortes capacités photosynthétiques de *P. australis* pourraient, au moins en partie, expliquer sa plus forte production de toxine.

En conclusion, l'étude de la diversité interspécifique des traits physiologiques a permis d'élaborer des portraits physiologiques des espèces de *Pseudo-nitzschia* présentes en Baie de Seine. Nos résultats montrent que ces espèces se différencient non seulement de par leur toxicité cellulaire, mais aussi par différents traits physiologiques. Tout d'abord, les différences de capacités d'absorption et de quotas en éléments nutritifs observées apportent des éléments importants pour la compréhension des phénologies des efflorescences. De plus, les particularités de *P. australis* en ce qui concerne les capacités photosynthétiques sont une piste pour mieux comprendre les fortes capacités de production d'acide domoïque chez cette espèce.

3. Dynamique de la production de l'acide domoïque chez *P. australis*

Il existe beaucoup de données sur la dynamique des concentrations cellulaires en acide domoïque en fonction des conditions de croissance (Lelong et al. 2012). Il existe par contre, très peu d'études qui s'intéressent aux taux de production de l'acide domoïque (Pan et al. 1996c, 2001). Une particularité de ce travail est donc que, lors des expériences en milieu fermé du Chapitre 3, nous avons cherché à distinguer les processus d'accumulation de l'acide domoïque dans les cellules ou dans le milieu et les taux de production d'acide domoïque cellulaire et dissous.

Chez *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*, nos résultats montrent que lors de l'arrêt de croissance induit par une limitation en silicates dans le milieu de culture, l'acide domoïque s'accumule plus dans les cellules qu'en phase de croissance exponentielle. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études précédentes qui montrent que les espèces de *Pseudo-nitzschia* sont plus toxiques lors de la phase stationnaire de croissance (Bates et al. 1991, Garrison et al. 1992, Cusack et al. 2002, Fehling et al. 2004, Besiktepe et al. 2008, Thessen et al. 2009, Amato et al. 2010, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Martin-Jézéquel et al. 2015).

A partir des mesures journalières de concentrations intracellulaire et extracellulaire d'acide domoïque durant les expériences en milieu fermé (Chapitre 3), nous avons calculé les taux de production d'acide domoïque cellulaire et de production d'acide domoïque dissous. Un gradient interspécifique similaire au gradient des concentrations cellulaire et dissoute en acide domoïque a été mesuré, avec *P. australis* l'espèce produisant le plus d'acide domoïque, puis *P. pungens* et enfin *P. fraudulenta* l'espèce produisant de très faibles quantités d'acide domoïque.

Chez *P. australis* l'espèce la plus toxique, nous avons caractérisé la dynamique d'accumulation et la dynamique de production d'acide domoïque en fonction des traits physiologiques (Chapitre 3). En comparant ces deux dynamiques, il apparaît que chez *P. australis* les conditions physiologiques favorables à ces deux processus sont différentes. Nos résultats suggèrent que la production d'acide domoïque nécessite un certain niveau d'activité photosynthétique mais que cette production n'est pas liée à une diminution ou à un arrêt de la croissance cellulaire. En revanche, l'accumulation de l'acide domoïque dans les cellules de *P. australis* est bien liée à une diminution ou à un arrêt des divisions cellulaires lorsque les conditions (activité photosynthétique notamment) permettent encore la production. Par conséquent, nos résultats suggèrent que, chez *P. australis*, les limitations en éléments nutritifs ne favorisent pas la production d'acide domoïque cellulaire mais favorisent plutôt son accumulation lorsque les cellules cessent de se diviser tout en continuant de produire de l'acide domoïque. Cela n'est pas forcément en contradiction avec les études précédentes car la plupart d'entre elles considéraient la dynamique du contenu cellulaire en acide domoïque et non les taux de production de l'acide domoïque (Garrison et al. 1992, Cusack et al. 2002, Santiago-Morales and García-Mendoza 2011, Martin-Jézéquel et al. 2015). Cependant, Pan et al. (1998) avaient mis en évidence une relation inverse entre le taux de production d'acide domoïque et les taux de croissance chez *P. multiseries* et l'ont associée à une disponibilité accrue d'ATP lorsque le métabolisme primaire

diminue. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'accumulation de précurseurs et d'énergie au cours de la croissance cellulaire active permettait la production d'acide domoïque chez *P. multiseriis* lorsque la croissance ralentissait et que le métabolisme cellulaire était en partie réorienté vers la production d'acide domoïque. Au contraire, nos résultats suggèrent que la production d'acide domoïque n'est pas liée à une diminution ou un arrêt des divisions cellulaires chez *P. australis*, et qu'une capacité photosynthétique élevée permet la production d'acide domoïque pendant la croissance exponentielle chez cette espèce.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études portant sur *P. australis* et rapportant une production d'acide domoïque en phase exponentielle de croissance (Thorel et al. 2014, Martin-Jézéquel et al. 2015). La différence de dynamique de production de toxine entre *P. australis* et *P. multiseriis* (Pan et al. 1998) souligne qu'il est délicat d'extrapoler les résultats d'une espèce de *Pseudo-nitzschia* à une autre. De plus, le fait que *P. australis* soit capable de produire de l'acide domoïque en phase de croissance exponentielle influence forcément la dynamique de production d'acide domoïque durant les efflorescences (Bates et al. 2018).

En plus de l'acide domoïque cellulaire, la production d'acide domoïque dissous a aussi été caractérisée. Les concentrations d'acide domoïque dissous mesurées étaient en accord avec le peu de données rapportées dans la littérature pour différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* (Baugh et al. 2006, Hansen et al. 2011). Les taux de production d'acide domoïque dissous calculés (Chapitre 3) étaient par contre inférieurs à ceux mesurés pour *P. seriata* (Maldonado et al. 2002). Cependant, les taux calculés sont des taux nets qui sous-estiment probablement les taux réels d'excrétion d'acide domoïque par les cellules car une certaine dégradation de l'acide domoïque a pu avoir lieu dans le milieu durant les cultures soit par dégradation bactérienne, soit par photodégradation (Lelong et al. 2012). Il est intéressant de noter que les taux de production d'acide domoïque dissous étaient corrélés négativement avec les taux de production d'acide domoïque intracellulaire, ce qui indique que les conditions physiologiques favorable à la production et à l'excrétion de l'acide domoïque sont probablement très différentes. Chez *P. australis*, les concentrations en acide domoïque dissoutes avaient d'ailleurs tendance à augmenter en phase de latence quand les cellules présentaient un moins bon état physiologique et des capacités photosynthétiques faibles.

4. Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont démontré l'existence d'importantes variabilités intraspécifique et interspécifique des traits physiologiques au sein du genre *Pseudonitzschia* et ont mis en évidence l'influence du cycle de vie sur l'écophysiologie de ces espèces.

Les principales conclusions de cette thèse sont donc :

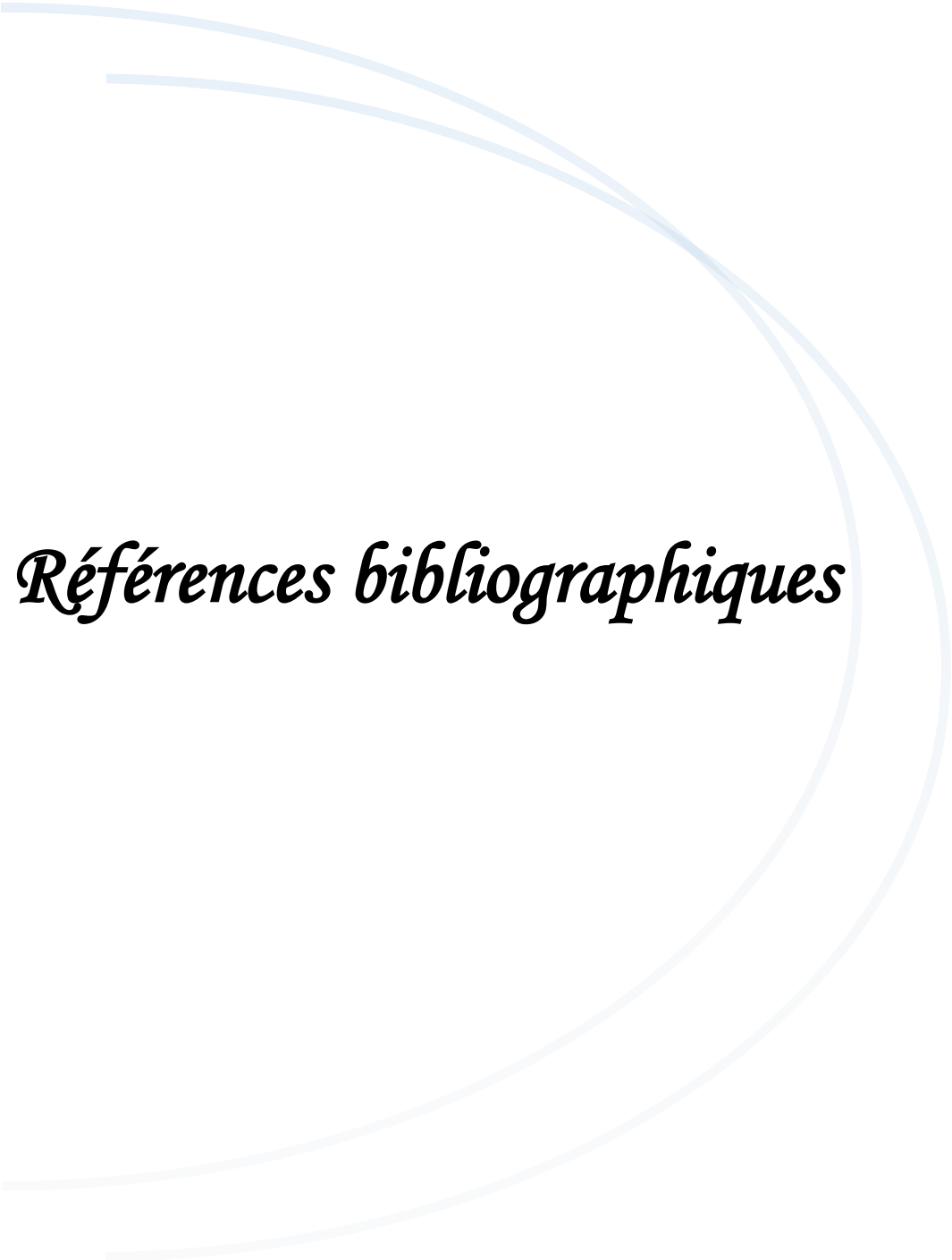
- Une importante diversité intraspécifique a été mesurée au niveaux de nombreux traits physiologiques étudiés (taux de croissance, capacité d'absorption des éléments nutritifs, toxicité).
- La diminution de la taille cellulaire au cours de la multiplication végétative affecte le taux de croissance chez *P. australis*, *P. pungens* et *P. fraudulenta*, mais aussi la toxicité et les capacités d'absorption des éléments nutritifs chez *P. australis*.
- En effet, chez *P. australis*, les cellules au stade gamétocyste produisent plus d'acide domoïque que les cellules plus petites ou plus grandes.
- Malgré une importante diversité intraspécifique, des différences physiologiques entre les espèces ont été identifiées :
 - Les concentrations intracellulaires et extracellulaires en acide domoïque, mais aussi les taux de production d'acide domoïque présentent le gradient suivant entre les espèces : *P. australis* > *P. pungens* > *P. fraudulenta* > *P. delicatissima*.
 - L'espèce la plus toxique *P. australis* présente des contenus cellulaires en Chl *a* supérieurs par rapport à *P. pungens* et *P. fraudulenta*. En conséquence, cette espèce est aussi caractérisée par des capacités photosynthétiques supérieures. Sa plus forte toxicité pourrait être liée à ces caractéristiques.
 - Les quatre espèces étudiées présentent des différences de capacités d'absorption des éléments nutritifs. *P. australis* et *P. delicatissima* sont nitrophiles comparées à *P. pungens* et *P. fraudulenta*. Mais *P. australis* nécessiterait des environnements riches en silicates pour se développer contrairement à *P. delicatissima*.

- *P. australis* présente une dynamique de production d'acide domoïque particulière. La production a lieu quelle que soit la phase de croissance (y compris en phase exponentielle) et semble favorisée par une capacité photosynthétique élevée. L'arrêt de croissance lors d'une limitation en silicates n'affecte pas la production mais favorise l'accumulation de l'acide domoïque produit dans les cellules.
- La production et l'excrétion d'acide domoïque sont liées à des conditions physiologiques différentes.

Les travaux réalisés durant cette thèse apportent ainsi de nombreuses données permettant (i) de mieux comprendre le déterminisme du développement des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* et la diversité spécifique selon les années, (ii) de comprendre les processus et les conditions physiologiques soutenant la production d'acide domoïque et (iii) de paramétrer des modèles de développement et de production de toxine. Enfin, au travers de ces données, de nouvelles informations sont également disponibles pour l'amélioration des cultures de *Pseudo-nitzschia* et le choix des souches pour la réalisation d'expériences écophysiologiques représentatives de la variabilité existante au sein de chaque espèce.

Les résultats de cette thèse suggèrent aussi de nouvelles perspectives de recherche :

- Il serait intéressant de comparer le métabolisme des cellules végétatives de *P. australis* à différents stades du cycle de vie (gamétocyste et non gamétocyste) afin de mieux comprendre les modifications physiologiques intervenants lors de la diminution de la taille cellulaire et ainsi les processus de biosynthèse de l'acide domoïque.
- Une étude de la diversité spécifique au sein des populations naturelles *Pseudo-nitzschia* en fonction des concentrations en éléments nutritifs sur plusieurs années permettrait de tester les hypothèses sur la compétition entre espèces issues des expériences de cinétiques.
- L'acide domoïque dissous produit en quantités significatives par trois des quatre espèces étudiées mériterait de plus amples connaissances : quelles concentrations *in situ* selon la diversité des *Pseudo-nitzschia* ?
- Enfin, à partir des résultats des expériences en milieu fermé, il serait intéressant de développer un modèle de production d'acide domoïque spécifique à *P. australis*.



Références bibliographiques

-A-

- Ajani, P.A., Verma, A., Lassudrie, M., Doblin, M.A. & Murray, A. 2018. A new diatom species *P. hallegraeffii* sp. nov. belonging to the toxic genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from the East Australian Current. *PLoS ONE*. 13(4): e0195622.
- Akmajian, A.M., Scordino, J.J. & Acevedo-Gutiérrez, A. 2017. Year-round algal toxin exposure in free-ranging sea lions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 583:243–8.
- Aksnes, D.L. & Egge, J.K. 1991. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70:65–72.
- Almandoz, G.O., Ferrario, M.E., Ferreyra, G.A., Schloss, I.R., Esteves, J.L. & Paparazzo, F.E. 2007. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in continental shelf waters of Argentina (Southwestern Atlantic Ocean, 38-55°S). *Harmful Algae*. 6:93–103.
- Almandoz, G.O., Ferreyra, G.A., Schloss, I.R., Dogliotti, A.I., Rupolo, V., Paparazzo, F.E., Esteves, J.L. & Ferrario, M.E. 2008. Distribution and ecology of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in surface waters of the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* 31:429–42.
- Álvarez, G., Uribe, E., Quijano-Scheggia, S., López-Rivera, A., Mariño, C. & Blanco, J. 2009. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. *Harmful Algae*. 8:938–45.
- Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D. & Montresor, M. 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41:542–56.
- Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Ghiron, J.H.L., Mann, D.G., Pröschold, T. & Montresor, M. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist.* 158:193–207.
- Amato, A. & Montresor, M. 2008. Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia*. 47:487–97.
- Amato, A., Lüdeking, A. & Kooistra, W.H.C.F. 2010. Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea, Italy). *Toxicon*. 55:157–61.
- Aminot, A. & Kérouel, R. 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu.
- Anderson, C.R., Brzezinski, M.A., Washburn, L. & Kudela, R. 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 327:119–33.
- Anderson, C.R., Siegel, D.A., Kudela, R.M. & Brzezinski, M.A. 2009. Empirical models of toxigenic *Pseudo-nitzschia* blooms: Potential use as a remote detection tool in the Santa Barbara Channel. *Harmful Algae*. 8:478–92.
- Armbrust, E.V. & Chisholm, S.W. 1992. Patterns of cell size change in marine centric diatom: variability

- evolving from clonal isolates. *J. Phycol.* 28:146–56.
- Armbrust, E.V., Berges, J. a, Bowler, C. & Green, B.R. 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana* : Ecology , Evolution , and Metabolism. *Science.* 306:79–86.
- Armbrust, E.V. 2009. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature.* 459:185–92.
- Armstrong, R.A., Peterson, M.L., Lee, C. & Wakeham, S.G. 2009. Settling velocity spectra and the ballast ratio hypothesis. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56:1470–8.
- Auro, M.E. & Cochlan, W.P. 2013. Nitrogen utilization and toxin production by two diatoms of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* Complex: *P. cuspidata* and *P. fryxelliana*. *J. Phycol.* 49:156–69.

-B-

- Bargu, S., Powell, C.L., Coale, S.L., Busman, M., Doucette, G.J. & Silver, M.W. 2002. Krill: A potential vector for domoic acid in marine food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 237:209–16.
- Bargu, S., Lefebvre, K. & Silver, M.W. 2006. Effect of dissolved domoic acid on the grazing rate of krill *Euphausia pacifica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312:169–75.
- Bargu, S., Powell, C.L., Wang, Z., Doucette, G.J. & Silver, M.W. 2008. Note on the occurrence of *Pseudo-nitzschia australis* and domoic acid in squid from Monterey Bay, CA (USA). *Harmful Algae.* 7:45–51.
- Bargu, S., Baustian, M.M., Rabalais, N.N., Del Rio, R., Von Korff, B. & Turner, R.E. 2016. Influence of the Mississippi River on *Pseudo-nitzschia* spp. abundance and toxicity in Louisiana Coastal Waters. *Estuaries and Coasts.* 39:1345–56.
- Bates, S.S., Bird, C.J., Boyd, R.K., De Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Hanic, L.A., Jamieson, W.D., McCulloch, A.W., Odense, P., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A. & Wright, J.L.C. 1988. Investigations on the source of domoic acid responsible for the outbreak of amnesic shellfish poisoning (ASP) in eastern Prince Edward Island. *Atl. Res. Lab. Tech. Rep.* 57. 66 p.
- Bates, S.S., Bird, C.J., Freitas, A.S.W. de, Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R, McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A. & Wright, J.L.C. 1989. Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46:1203–15.
- Bates, S.S., Freitas, A.S.W. de, Milley, J.E., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Smith, J.C. & Worms, J. 1991. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in culture: Nutrients and Irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:1136–44.
- Bates, S.S., Garrison, D. & Horner, R. 1998. Bloom dynamics and physiology producing *Pseudo-nitzschia* ppecies. *NATO ASI Ser. G Ecol. sciences*, 41, 267–92.
- Bates, S.S. 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. *Phycol. Ecol. harmful algal*

- Bloom. 41:405–426.
- Bates, S.S., Hiltz, M.F. & Léger, C. 1999. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseries* resulting from sexual reproduction. *Sixth Can. Work. Harmful Mar. Algae*. 21–6.
- Bates, S.S. & Trainer, V.L. 2006. The Ecology of Harmful Diatoms. *Harmful Algae*. 189.
- Bates, S.S., Hubbard, K.A., Lundholm, N., Montresor, M. & Leaw, C.P. 2018. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae*. in press.
- Baugh, K.A., Bush, J.M., Bill, B.D., Lefebvre, K.A. & Trainer, V.L. 2006. Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. 28:403–7.
- Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V. & Lee, R. 2008. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (bacillariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae*. 7:438–42.
- Bill, B.D., Cochlan, W.P. & Trainer, V.L. 2012. The effect of light on growth rate and primary productivity in *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia turgidula*. *Proc. 14th Int. Conf. Harmful Algae. Int. Soc. Study Harmful Algae Intergov. Oceanogr. Comm. UNESCO*. 78–80.
- Bowers, H.A., Ryan, J.P., Hayashi, K., Woods, A.L., Marin, R., Smith, G.J., Hubbard, K.A., Doucette, G.J., Mikulski, C.M., Gellene, A.G., Zhang, Y., Kudela, R.M., Caron, D.A., Birch, J.M. & Scholin, C.A. 2018. Diversity and toxicity of *Pseudo-nitzschia* species in Monterey Bay: Perspectives from targeted and adaptive sampling. *Harmful Algae*. 78:129–41.
- Brunson, J.K., Mckinnie, S.M.K., Chekan, J.R., Mccrow, J.P., Miles, Z.D., Bertrand, E.M., Bielinski, V.A., Luhavaya, H., Obornik, M., Smith, G.J., Hutchins, D.A., Allen, A.E. & Moore, B.S. 2018. Biosynthesis of the neurotoxin domoic acid in a bloom-forming diatom. *Science*. 365:1356–8.
- Brzezinski, M.A. 1985. The Si:C:N ratio of marine diatoms: Interspecific variability and the effect of some environmental variables. *J. Phycol.* 21:347–57.

-C-

- Calu, G., Martin-jezequel, V., Lefau, E., Lassus, P., Weigel, P., Amzil, Z., Phycotoxines, L. et al. 2009. The influence of nitrogen speciation on growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pungens* in batch and continuous cultures. *7th Int. Conf. on molluscan shellfish safety*. 2001:1–7.
- Caperon, J. & Meyer, J. 1972. Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton - II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 19:619–32.
- Casteleyn, G., Chepurinov, V.A., Leliaert, F., Mann, D.G., Bates, S.S., Lundholm, N., Rhodes, L., Sabbe, K. & Vyverman, W. 2008. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae*. 7:241–57.
- Chepurinov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K. & Vyverman, W. 2004. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. Elsevier. 91-154 pp.

- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Peperzak, L., Vyverman, W. 2005. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 40:379–95.
- Chisholm, S.W. & Costello, J.C. 1980. Influence of environmental factors and population composition on the timing of cell division in *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) grown on light/dark cycles.
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S. & Veron, B. 2008. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquat. Microb. Ecol.* 51:1–11.
- Cochlan, W.P., Herndon, J. & Kudela, R.M. 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae.* 8:111–8.
- Collos, Y., Siddiqi, M.Y., Wang, M.Y., Glass, A.D.M. & Harrison, P.J. 1992. Nitrate uptake kinetics by two marine diatoms using the radioactive tracer ¹³N. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 163:251–60.
- Cusack, C.K., Bates, S.S., Quilliam, M.A., Patching, J.W. & Raine, R. 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. 1112:1106–12.
- Cusack, C., Raine, R. & Patching, J.W. 2004. Occurrence of species from the genus *Pseudo-nitzschia* peragallo in Irish waters. *Biol. Environ.* 104:55–74.

-D-

- D'Alelio, D., Amato, A., Luedeking, A. & Montresor, M. 2009. Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Harmful Algae.* 8:225–32.
- D'Alelio, D., D'Alcalà, M.R., Dubroca, L., Sarno, D., Zingone, A. & Montresor, M. 2010. The time for sex: A biennial life cycle in a marine planktonic diatom. *Limnol. Oceanogr.* 55:106–14.
- Davidovich, N.A. 1994. Factors controlling the size of initial cells in diatoms. *Russ. J. Plant Physiol.* 41:220–4.
- Davidovich, N.A. & Bates, S.S. 1998. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-Nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 34:126–37.
- Davidovich, N.A., Kaczmarek, I. & Ehrman, J.M. 2010. Heterothallic and homothallic sexual reproduction in *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta). *Fottea.* 10:251–66.
- Davidovich, N.A., Gastineau, R., Gaudin, P., Davidovich, O.I. & Mouget, J.L. 2012. Sexual reproduction in the newly-described blue diatom, *Haslea karadagensis*. *Fottea.* 12:219–29.
- De Rijcke, M., Vandegheuchte, M.B., Vanden Bussche, J., Nevejan, N., Vanhaecke, L., De Schamphelaere, K.A.C. & Janssen, C.R. 2015. Common European harmful algal blooms affect the viability and innate immune responses of *Mytilus edulis* larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 47:175–81.

- Delegrange, A., Lefebvre, A., Gohin, F., Courcot, L. & Vincent, D. 2018. *Pseudo-nitzschia* sp. diversity and seasonality in the southern North Sea, domoic acid levels and associated phytoplankton communities. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 214:194–206.
- Deschamps, P. & Moreira, D. 2012. Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol. Evol.* 4:683–8.
- Downes-Tettmar, N., Rowland, S., Widdicombe, C., Woodward, M. & Llewellyn, C. 2013. Seasonal variation in *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in the Western English Channel. *Cont. Shelf Res.* 53:40–9.
- Dugdale, R.C. & Wilkerson, F.P. 1986. The use of ¹⁵N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans; experimental considerations,. *Limnol. Oceanogr.* 31:673–89.

-E-

- Edlund, M.B. & Stoermer, E.F. 1997. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. *J. Phycol.* 33:897–918.
- Edlund, M.B. & Bixby, R.J. 2001. Intra- and inter-specific differences in gametangial and initial cell size in diatoms.
- Edwards, K.F., Thomas, M.K., Klausmeier, C.A. & Litchman, E. 2012. Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 57:554–66.
- Eilers, P.H.C. & Peeters, J.C.H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol. Modell.* 42:199–215.
- El-Sabaawi, R. & Harrison, P.J. 2006. Interactive effects of irradiance and temperature on the photosynthetic physiology of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia granii* (Bacillariophyceae) from the northeast subarctic Pacific. *J. Phycol.* 42:778–85.
- Eppley, R.W., Rogers, J.N. & Mccarthy, J.J. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton.
- Evans, K.M., Kühn, S.F. & Hayes, P.K. 2005. High levels of genetic diversity and low levels of genetic differentiation in North Sea *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) populations. *J. Phycol.* 41:506–14.

-F-

- Falasco, E., Bona, F., Badino, G., Hoffmann, L. & Ector, L. 2009. Diatom teratological forms and environmental alterations: A review. *Hydrobiologia.* 623:1–35.
- Fehling, J., Davidson, K., Bolch, C.J. & Bates, S.S. 2004. Growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation. *J. Phycol.* 40:674–83.
- Fehling, J., Davidson, K., Bolch, C. & Tett, P. 2006. Seasonally of *Pseudo-nitzschia* spp.

- (Bacillariophyceae) in western Scottish waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 323:91–105.
- Fernandes, L.F., Hubbard, K. a., Richlen, M.L., Smith, J., Bates, S.S., Ehrman, J., Léger, C., Mafra Jr, L.L., Kulis, D., Quilliam, M., Libera, K., McCauley, L. & Anderson, D.M. 2014. Diversity and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Gulf of Maine, Northwestern Atlantic Ocean. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 103:139–62.
- Fouillaron, P., Claquin, P., L’Helguen, S., Huonnic, P., Martin-Jézéquel, V., Masson, A., Longphuir, S.N., Pondaven, P., Thouzeau, G. & Leynaert, A. 2007. Response of a phytoplankton community to increased nutrient inputs: A mesocosm experiment in the Bay of Brest (France). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 351:188–98.
- Frenkel, J., Vyverman, W. & Pohnert, G. 2014. Pheromone signaling during sexual reproduction in algae. *Plant J.* 79:632–44.
- Frøsig Gai, F., Kirketerp Hedemand, C., Louw, D.C. & Grobler, K. 2018. Morphological , molecular and toxigenic characteristics of Namibian *Pseudo-nitzschia* species – including *Pseudo-nitzschia bucculenta* sp . nov . *Harmful Algae.* 76:80–95.
- Fryxell, G.A., Garza, S.A. & Roelke, D.L. 1991. Auxospore formation in an Antarctic clone of *Nitzschia subcurvata* Hasle. *Diatom Res.* 6:235–45.
- Fuchs, N., Scalco, E., Kooistra, W.H.C.F., Assmy, P. & Montresor, M. 2013. Genetic characterization and life cycle of the diatom *Fragilariopsis kerguelensis*. *Eur. J. Phycol.* 48:411–26.

-G-

- García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortiz, A., Almazán-Becerril, A., Castañeda-Vega, C. & Peña-Manjarrez, J.L. 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae.* 8:493–503.
- Garrison, D., Conrad, S., Eilers, P. & Waldrom, E. 1992. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol.* 28:604–7.
- Geider, R.J., Delucia, E.H., Falkowski, P.G., Finzi, a C., Grime, J.P., Grace, J., Kana, T.M. et al. 2001. Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Glob. Chang. Biol.* 7:849–82.
- Gillard, J., Frenkel, J., Devos, V., Sabbe, K., Paul, C., Rempt, M., Inzé, D. et al. 2013. Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom Sex Pheromone. *Angew. Chemis Int. Ed.* 52:854–7.
- Gotham, I.J. & Rhee, G.Y. 1981. Comparative kinetic studies of phosphate-limited growth and phosphate uptake in phytoplankton. *J. Phycol.* 17:257–65.
- Grover, J.P. 1989. Phosphorus-dependent growth kinetics of 11 species of freshwater algae. *Limnol. Oceanogr.* 34.
- Grover, J.P. 1991. Non-steady state dynamics of algal population growth : experiments with two chlorophytes. *J. Phycol.* 27:70–9.

-H-

- Hagstrom, J. a., Graneli, E., Moreira, M.O.P. & Odebrecht, C. 2010. Domoic acid production and elemental composition of two *Pseudo-nitzschia multiseries* strains, from the NW and SW Atlantic Ocean, growing in phosphorus- or nitrogen-limited chemostat cultures. *J. Plankton Res.* 33:297–308.
- Hamm, C.E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K. & Smetacek, V. 2003. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature*. 421:841–3.
- Hansen, L.R., Soylu, S. í, Kotaki, Y., Moestrup, Ø. & Lundholm, N. 2011. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. *Harmful Algae*. 10:689–96.
- Harðardóttir, S., Pančić, M., Tammilehto, A., Krock, B., Møller, E., Nielsen, T. & Lundholm, N. 2015. Dangerous relations in the Arctic marine food web: Interactions between toxin producing *Pseudo-nitzschia* diatoms and *Calanus* Copepodites. *Mar. Drugs*. 13:3809–35.
- Hasle, G.R. 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudo-nitzschia*. *Skr. Nor. Vidensk-Akad. I. Mat.-Nat. Kl. Ny Ser.* 18:1–45.
- Hasle, G.R., Lange, C.B. & Syvertsen, E.E. 1996. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgolaender Meeresuntersuchungen*. 50:131–75.
- Hasle, G.R. & Syvertsen, E.E. 1997. Marine diatoms. In Tomas, C. R. [Ed.] *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press: San Diego. ISBN 0-12-693018-X. XV, 858 pp, pp. 5–385.
- Hasle, G.R. 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae*. 1:137–46.
- Healey, F.P. 1980. Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. *Microb. Ecol.* 5:281–6.
- Hense, I. & Beckmann, A. 2015. A theoretical investigation of the diatom cell size reduction-restitution cycle. *Ecol. Modell.* 317:66–82.
- Hildebrand, M. 2008. Diatoms, Biomineralization Processes, and Genomics. *Chem. Rev.* 108:4855–74.
- Hiltz, M., Bates, S.S. & Kaczmarska, I. 2000. Effect of light: dark cycles and cell apical length on the sexual reproduction of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture. *Phycologia*. 39:59–66.
- Holtermann, K.E., Bates, S.S., Trainer, V.L., Odell, A. & Armbrust, E.V. 2010. Mass sexual reproduction in the toxigenic diatoms *Pseudo-nitzschia australis* and *P. pungens* (bacillariophyceae) on the Washington coast, USA. *J. Phycol.* 46:41–52.
- Howard, M.D.A., Cochlan, W.P., Ladizinsky, N. & Kudela, R.M. 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae*. 6:206–17.

Husson, B., Hernández-Fariñas, T., Le Gendre, R., Schapira, M. & Chapelle, A. 2016. Two decades of *Pseudo-nitzschia* spp. blooms and king scallop (*Pecten maximus*) contamination by domoic acid along the French Atlantic and English Channel coasts: Seasonal dynamics, spatial heterogeneity and interannual variability. *Harmful Algae*. 51:26–39.

-I-

Ingalls, A.E., Whitehead, K. & Bridoux, M.C. 2010. Tinted windows: The presence of the UV absorbing compounds called mycosporine-like amino acids embedded in the frustules of marine diatoms. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 74:104–15.

-J-

Jewson, D.H. 1992. Size reduction, reproductive strategy and the life cycle of a centric diatom. *Phil.* 336:191–213.

-K-

Kaczmarska, I., Martin, J.L., Ehrman, J.M. & LeGresley, M.M. 2007. *Pseudo-nitzschia* species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. *Harmful Algae*. 6:861–74.

Kaczmarska, I., Pouličková, A., Sato, S., Edlund, M.B., Idei, M., Watanabe, T. & Mann, D.G. 2013. Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxospores and resting stages. *Diatom Res.* 1–32.

Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W. & Guillard, R.R.. 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23:633–8.

Klausmeier, C.A., Litchman, E., Daufresne, T. & Levin, S.A. 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*. 429:171–4.

Klein, C., Claquin, P., Bouchart, V., Le Roy, B. & Véron, B. 2010. Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae*. 9:218–26.

Kooistra, W.H.C.F. & Medlin, L.K. 1996. Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 6:391–407.

Kooistra, W.H.C.F., De Stefano, M., Mann, D.G. & Medlin, L.K. 2003. The phylogeny of the Diatoms. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 33:59–97.

Kooistra, W.H.C.F., Gersonde, R., Medlin, L.K. & Mann, D.G. 2007. The origin and evolution of the Diatoms. Their Adaptation to a Planktonic Existence. 207-249 pp.

Kudela, R., Roberts, A. & Armstrong, M. 2003. Laboratory analyses of nutrient stress and toxin production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California. *Harmful Algae*.

-L-

- Lakeman, M.B., von Dassow, P. & Cattolico, R.A. 2009. The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae*. 8:746–58.
- Lassus, P., Chomérat, N., Hess, P. & Nézan, E. 2016. Toxic and Harmful Microalgae of the World Oceaen / Micro-algues toxiques et nuisibles de l’océan mondial. International Society for the Study of Harmful Algae / Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. IOC Manuals and Guides, 68. (Bilingual English/French), Denmark. 523 pp.
- Lefebvre, K. a. & Robertson, A. 2010. Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicon*. 56:218–30.
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P. & Bates, S.S. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning : revisiting previous paradigms. *Phycologia*. 51:168–216.
- Lema, K.A., Latimier, M., Nézan, É., Fauchot, J. & Le Gac, M. 2017. Inter- and intra-specific growth and domoic acid production in relation to nutrient ratios and concentrations in *Pseudo-nitzschia*: phosphate an important factor. *Harmful Algae*. 64:11–9.
- Lewis, W.M. 1984. The diatom sex clock and its evolutionary significance.
- Lewis, W.M. 1987. The cost of sex.
- Lewis, N.I., Bates, S.S., McLachlan, J.L. & Smith, J.C. 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morpholgy of the diatom *Nitzschia pungns* f. multiseriess. *Toxic Phytoplankt. Bloom. sea*. 601–6.
- Li, Y., Huang, C.X., Xu, G.S., Lundholm, N., Teng, S.T., Wu, H. & Tan, Z. 2017. *Pseudo-nitzschia simulans* sp. nov. (Bacillariophyceae), the first domoic acid producer from Chinese waters. *Harmful Algae*. 67:119–30.
- Li, Y., Dong, H., Teng, S.T., Bates, S.S. & Lim, P.T. 2018. *Pseudo-nitzschia nanaoensis* sp. nov. (Bacillariophyceae), a novel species from the Chinese coast of the South China Sea. *J. Phycol.*
- Lim, H.C., Teng, S.T., Leaw, C.P. & Lim, P.T. 2013. Three novel species in the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex: *P. batesiana* sp. nov., *P. lundholmiae* sp. nov., and *P. fukuyoi* sp. nov. (Bacillariophyceae) from the Strait of Malacca, Malaysia. *J. Phycol.* 49:902–16.
- Lim, H.C., Lim, P.T., Teng, S.T., Bates, S.S. & Leaw, C.P. 2014. Genetic structure of *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) populations: Implications of a global diversification of the diatom. *Harmful Algae*. 37:142–52.
- Lim, H.C., Tan, S.N., Teng, S.T., Lundholm, N., Orive, E., David, H., Quijano-Scheggia, S., Leong, S.C.Y., Wolf, M., Bates, S.S., Lim, P.T. & Leaw, C.P. 2018. Phylogeny and species delineation in the marine diatom *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) using *cox1*, *LSU*, and *ITS2* rRNA genes: A perspective in character evolution. *J. Phycol.* 54:234–48.
- Lin, S., Litaker, R.W. & Sunda, W.G. 2015. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *Eff. Br. mindfulness Interv. acute pain Exp. An Exam.*

- Individ. Differ.* 1:10–36.
- Lincoln, J.A., Turner, J.T., Bates, S.S., Léger, C. & Gauthier, D.A. 2001. Feeding, egg production, and egg hatching success of the copepods *Acartia tonsa* and *Temora longicornis* on diets of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the non-toxic diatom *Pseudo-nitzschia pungens*. *Hydrobiologia*. 453:107–120.
- Liu, H., Kelly, M.S., Campbell, D. a, Dong, S.L., Zhu, J.X. & Wang, S.F. 2007. Exposure to domoic acid affects larval development of king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Aquat. Toxicol.* 81:152–8.
- Lomas, M.W. & Glibert, P.M. 2000. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *J. Phycol.* 36:903–13.
- Loureiro, S., Jauzein, C., Garcés, E., Collos, Y., Camp, J. & Vaqué, D. 2009. The significance of organic nutrients in the nutrition of *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Plankton Res.* 31:399–410.
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R. & Moestrup, Ø. 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia*. 33:475–8.
- Lundholm, N., Daugbjerg, N. & Moestrup, Ø. 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *Eur. J. Phycol.* 37:115–34.
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G.R. & Hoef-Emden, K. 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39:797–813.
- Lundholm, N., Hansen, P.J. & Kotaki, Y. 2004. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 273:1–15.
- Lundholm, N., Hansen, P.J. & Kotaki, Y. 2005. Lack of allelopathic effects of the domoic acid-producing marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 288:21–33.
- Lundholm, N., Moestrup, O., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C. & Miller, P. 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *J. Phycol.* 42:464–81.
- Lundholm, N., Clarke, A. & Ellegaard, M. 2010. A 100-year record of changing *Pseudo-nitzschia* species in a sill-fjord in Denmark related to nitrogen loading and temperature. *Harmful Algae*. 9:449–57.
- Lundholm, N., Bates, S.S., Baugh, K.A., Bill, B.D., Connell, L.B., Léger, C. & Trainer, V.L. 2012. Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms-with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. *J. Phycol.* 48:436–54.
- Lundholm, N. 2018. Bacillariophyceae.

-M-

- Macdonald, J.D. 1869. I. On the structure of the Diatomaceous frustule, and its genetic cycle. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 3:1–8.
- MacIsaac, J.J. & Dugdale, R.C. 1969. The kinetics of nitrate and ammonia uptake by natural populations of marine phytoplankton. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 16:45–57.
- Mafra, L.L., Bricelj, V.M., Ouellette, C., Léger, C. & Bates, S.S. 2009. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. I. Filtration and pseudofeces production. *Aquat. Biol.* 6:201–12.
- Maldonado, M.T., Hughes, M.P., Rue, E.L. & Wells, M.L. 2002. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. *Limnol. Oceanogr.* 47:515–26.
- Mann, D.G. 1999. The species concept in diatoms. *Phycologia*. 38:437–95.
- Mann, D.G., Chepurinov, V.A. & Idei, M. 2003. Mating system, sexual reproduction, and auxosporulation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 39:1067–84.
- Mann, D.G. & Vanormelingen, P. 2013. An inordinate fondness? the number, distributions, and origins of diatom species. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60:414–20.
- Marañón, E., Cermeño, P., López-Sandoval, D.C., Rodríguez-Ramos, T., Sobrino, C., Huete-Ortega, M., Blanco, J.M. & Rodriguez, J. 2013. Unimodal size scaling of phytoplankton growth and the size dependence of nutrient uptake and use. *Ecol. Lett.* 16:371–9.
- Marchetti, A., Trainer, V.L. & Harrison, P.J. 2004. Environmental conditions and phytoplankton dynamics associated with *Pseudo-nitzschia* abundance and domoic acid in the Juan de Fuca eddy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 281:1–12.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M. & Brzezinski, M. a. 2000. Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth. *J. Phycol.* 36:821–40.
- Martin-Jézéquel, V., Calu, G., Candela, L., Amzil, Z., Jauffrais, T., Séchet, V. & Weigel, P. 2015. Effects of organic and inorganic nitrogen on the growth and production of domoic acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. australis* (bacillariophyceae) in culture. *Mar. Drugs*. 13:7067–86.
- Medlin, L.K. & Kaczmarek, I. 2004. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia*. 43:345–270.
- Medlin, L.K. 2016. Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia*. 55:79–103.
- Medlin, L.K. 2018. Mini review: Diatom species as seen through a molecular window. *Rev. Bras. Bot.* 41:457–69.
- Michaelis, L. & Menten, M.L. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z.* 49:333–69.
- Milligan, A.J. & Morel, F.M.M. 2002. A proton buffering role for silica in diatoms. *Science* (80-.). 297:1848–50.

- Mock, T. & Medlin, L.K. 2012. Genomics and Genetics of Diatoms. 245-284 pp.
- Montresor, M., Vitale, L., D'Alelio, D. & Ferrante, M.I. 2016. Sex in marine planktonic diatoms: insights and challenges. *Perspect. Phycol.* 3:61–75.
- Morelle, J. & Claquin, P. 2018. Electron requirements for carbon incorporation along a diel light cycle in three marine diatom species. *Photosynth. Res.* 137:201–14.

-N-

- Napoléon, C., Raimbault, V. & Claquin, P. 2013. Influence of nutrient stress on the relationships between PAM measurements and carbon incorporation in four phytoplankton species. *PLoS One.* 8:e66423.
- Nelson, D. & Brzezinski, M. 1990. Kinetics of silicic acid uptake by natural diatom assemblages in two Gulf Stream warm-core rings. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62:283–92.
- Nezan, E., Antoine, E., Fiant, L., Amzil, Z. & Billard, C. 2006. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* and *P. multiseries* in the Bay of Seine. Was there a relation to presence of domoic acid in king scallops in autumn 2004? *Harmful Algae News.* 1–12.
- Nishikawa, T., Tarutani, K. & Yamamoto, T. 2009. Nitrate and phosphate uptake kinetics of the harmful diatom *Eucampia zodiacus* Ehrenberg, a causative organism in the bleaching of aquacultured *Porphyra* thalli. *Harmful Algae.* 8:513–7.
- Nishikawa, T., Tarutani, K. & Yamamoto, T. 2010. Nitrate and phosphate uptake kinetics of the harmful diatom *Coscinodiscus wailesii*, a causative organism in the bleaching of aquacultured *Porphyra* thalli. *Harmful Algae.* 9:563–7.
- Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Simon, N., Vaultot, D. & Probert, I. 2012. Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. Elsevier. 1-53 pp.

-O-

- Orive, E., Pérez-Aicua, L., David, H., García-Etxebarria, K., Laza-Martínez, A., Seoane, S. & Miguel, I. 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in a temperate estuary with description of two new species: *Pseudo-nitzschia plurisecta* sp. nov. and *Pseudo-nitzschia abrensis* sp. nov. *J. Phycol.* 49:1192–206.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D. & Montresor, M. 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 271:87–98.
- Otero, J., Bode, A., Álvarez-salgado, X.A. & Varela, M. 2018. Role of functional trait variability in the response of individual phytoplankton species to changing environmental conditions in a coastal upwelling zone. 596:33–47.

-P-

- Pan, Y., Subba Rao, D., Mann, K.H., Rg, B. & Pocklington, R. 1996a. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. *Mar.* 131:225–33.
- Pan, Y., Subba Rao, D. V., Mann, K.H., Li, W.K.W. & Harrison, W.G. 1996b. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. II. Continuous culture studies. *Mar Ecol Prog Ser.* 131:235–43.
- Pan, Y., Subba Rao, D. V & Mann, K.H. 1996c. Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* under phosphate limitation.
- Pan, Y., Bates, S.S. & Cembella, A.D. 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Nat. Toxins.* 6:127–35.
- Pan, Y., Parsons, M.L., Busman, M., Moeller, P.D.R., Dortch, Q., Powell, C.L. & Doucette, G.J. 2001. *Pseudo-nitzschia* sp. cf. *pseudodelicatissima* - a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220:83–92.
- Parsons, M.L. & Dortch, Q. 2002. Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnol. Oceanogr.* 47:551–8.
- Parsons, M.L., Dortch, Q. & Doucette, G.J. 2013. An assessment of *Pseudo-nitzschia* population dynamics and domoic acid production in coastal Louisiana. *Harmful Algae.* 30:65–77.
- Péragallo, H. & Péragallo, M. 1908. Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins.
- Pfitzer, E. 1869. Über den Bau und Zellteilung der Diatomeen. *Bot. Z.* 27:774–6.
- Pickett-Heaps, J.D., Schmid, A.M.M. & Edgar, L.A. 1990. The cell biology of diatom valve formation. *Progr. Phycol.* 7:1–168.
- Pujo-Pay, M. & Raimbault, P. 1994. Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105:203.

-Q-

- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Flo, E., Fernández-Tejedor, M., Diogène, J. & Camp, J. 2008. Bloom dynamics of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in two coastal bays (NW Mediterranean Sea). *Sci. Mar.* 72:577–90.
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K., Fortuño, J.M. & Camp, J. 2009. Homothallic auxosporulation in *Pseudo-nitzschia brasiliiana* (bacillariophyta). *J. Phycol.* 45:100–7.
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K.B., De la Iglesia, P., Diogène, J., Fortuño, J.M. & Camp, J. 2010. *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. *Sci. Mar.* 74:395–

410.

-R-

- Radan, R.L. & Cochlan, W.P. 2018. Differential toxin response of *Pseudo-nitzschia multiseries* as a function of nitrogen speciation in batch and continuous cultures, and during a natural assemblage experiment. *Harmful Algae*. 73:12–29.
- Ragueneau, O. & Tréguer, P. 1994. Determination of biogenic silica in coastal waters: applicability and limits of the alkaline digestion method. *Mar. Chem.* 45:43–51.
- Raven, J.A. & Waite, A.M. 2004. The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytol.* 162:45–61.
- Rhodes, L., Jiang, W., Knight, B., Adamson, J., Smith, K., Langi, V. & Edgar, M. 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand: Analysis of the last decade's monitoring data. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 47:490–503.
- Rogato, A., Amato, A., Iudicone, D., Chiurazzi, M., Ferrante, M.I. & D'Alcalà, M.R. 2015. The diatom molecular toolkit to handle nitrogen uptake. *Mar. Genomics*. 24:95–108.
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. Diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge. 747 pp.
- Ryan, J.P., Kudela, R.M., Birch, J.M., Blum, M., Bowers, H.A., Chavez, F.P., Doucette, G.J. et al. 2017. Causality of an extreme harmful algal bloom in Monterey Bay, California, during the 2014–2016 northeast Pacific warm anomaly. *Geophys. Res. Lett.* 44:5571–9.

-S-

- Sahraoui, I., Grami, B., Bates, S.S., Bouchouicha, D., Chikhaoui, M.A., Mabrouk, H.H. & Hlaili, A.S. 2012. Response of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations and domoic acid to environmental conditions in a eutrophied, SW Mediterranean coastal lagoon (Tunisia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 102–103:95–104.
- Santiago-Morales, I.S. & García-Mendoza, E. 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO₃ ratios. *Harmful Algae*. 12:82–94.
- Sarthou, G., Timmermans, K.R., Blain, S. & Tréguer, P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: A review. *J. Sea Res.* 53:25–42.
- Sato, S., Beakes, G., Idei, M., Nagumo, T. & Mann, D.G. 2011. Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms. *PLoS One*. 6.
- Sauvey, A., Claquin, P., Le Gac, M., Le Roy, B. & Fauchot, J. (submitted). Differential influence of life cycle on growth and toxin production of three *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae).
- Schnetzler, A., Miller, P.E., Schaffner, R. a., Stauffer, B. a., Jones, B.H., Weisberg, S.B., DiGiacomo, P.M., Berelson, W.M. & Caron, D.A. 2007. Blooms of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the

- San Pedro Channel and Los Angeles harbor areas of the Southern California Bight, 2003-2004. *Harmful Algae*. 6:372–87.
- Schnetzer, A., Jones, B.H., Schaffner, R.A., Cetinic, I., Fitzpatrick, E., Miller, P.E., Seubert, E.L. & Caron, D.A. 2013. Coastal upwelling linked to toxic *Pseudo-nitzschia australis* blooms in Los Angeles coastal waters, 2005-2007. *J. Plankton Res.* 35:1080–92.
- Scholin, C. a, Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J. et al. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*. 403:80–4.
- Schreiber, U., Klughammer, C. & Kolbowski, J. 2012. Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* 113:127–44.
- Schwarz, R., Wolf, M. & Müller, T. 2009. A probabilistic model of cell size reduction in *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyta). *J. Theor. Biol.* 258:316–22.
- Shi, P., Shen, H., Wang, W., Chen, W. & Xie, P. 2015. The relationship between light intensity and nutrient uptake kinetics in six freshwater diatoms. *J. Environ. Sci.* 34:28–36.
- Shuler, A.J., Paternoster, J., Brim, M., Nowocin, K., Tisdale, T., Neller, K., Cahill, J.A. et al. 2012. Spatial and temporal trends of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia* in the Southeastern Atlantic United States. *Harmful Algae*. 17:6–13.
- Sims, P.A., Mann, D.G. & Medlin, L.K. 2006. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia*. 45:361–402.
- Smetacek, V. 2001. A watery arms race. *Nature*. 411:745.
- Smeti, E., Roelke, D.L., Gremion, G., Linhart, J.M., Danielidis, D.B. & Spatharis, S. 2015. Potential mechanisms of coexistence between two globally important *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) species. *Hydrobiologia*. 762:89–101.
- Sobrinho, B.F., De Camargo, L.M., Sandrini-Neto, L., Kleemann, C.R., Da Costa Machado, E. & Mafra, L.L. 2017. Growth, toxin production and allelopathic effects of *Pseudo-Nitzschia multiseries* under Iron-enriched conditions. *Mar. Drugs*. 15.
- Spatharis, S., Danielidis, D.B. & Tsirtsis, G. 2007. Recurrent *Pseudo-nitzschia calliantha* (Bacillariophyceae) and *Alexandrium insuetum* (Dinophyceae) winter blooms induced by agricultural runoff. *Harmful Algae*. 6:811–22.
- Spilling, K., Tamminen, T., Andersen, T. & Kremp, A. 2010. Nutrient kinetics modeled from time series of substrate depletion and growth: Dissolved silicate uptake of Baltic Sea spring diatoms. *Mar. Biol.* 157:427–36.
- Subba Rao, D. V., Partensky, F., Wohlgeschaffen, G.D. & Li, W.K.W. 1991. Flow cytometry and microscopy of gametogenesis in *Nitzschia pungens*, a toxic, bloom-forming, marine diatom. *J. Phycol.* 27:21–6.

-T-

- Tammilehto, A., Nielsen, T.G., Krock, B., Møller, E.F. & Lundholm, N. 2015. Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods. *Aquat. Toxicol.* 159:52–61.
- Tantanasarit, C., Englande, A.J. & Babel, S. 2013. Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 446:67–75.
- Teng, S.T., Lim, H.C., Lim, P.T., Dao, V.H., Bates, S.S. & Leaw, C.P. 2014. *Pseudo-nitzschia kodamae* sp. nov. (Bacillariophyceae), a toxigenic species from the Strait of Malacca, Malaysia. *Harmful Algae.* 34:17–28.
- Teng, S.T., Tan, S.N., Lim, H.C., Dao, V.H., Bates, S.S. & Leaw, C.P. 2016. High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae)1. *J. Phycol.*
- Thamatrakoln, K. & Hildebrand, M. 2008. Silicon uptake in diatoms revisited: A model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters. *Plant Physiol.* 146:1397–407.
- Thessen, A.E., Bowers, H.A. & Stoecker, D.K. 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae.* 8:792–810.
- Thorel, M. 2014. Ecologie et écophysiologie des espèces du genre *Pseudo-nitzschia*. 198pp.
- Thorel, M., Fauchot, J., Morelle, J., Raimbault, V., Le Roy, B., Miossec, C., Kientz-Bouchart, V. & Claquin, P. 2014. Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae.* 39:232–41.
- Thorel, M., Claquin, P., Schapira, M., Le Gendre, R., Riou, P., Goux, D., Le Roy, B., Raimbault, V., Deton-Cabanillas, A.-F., Bazin, P., Kientz-Bouchart, V. & Fauchot, J. 2017. Nutrient ratios influence variability in *Pseudo-nitzschia* species diversity and particulate domoic acid production in the Bay of Seine (France). *Harmful Algae.* 68:192–205.
- Todd, E.C.D. 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - a review. *J. Food Prot.* 56:69–83.
- Trainer, V.L., Hickey, B.M., Bates, S.S., Walsh, P.J., Smith, S.L. & Fleming, L.E. 2008. Toxic diatoms. *Ocean. Hum. Heal. risks remedies from sea.* 219–37.
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G. & Trick, C.G. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae.* 14:271–300.

-V-

- Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge. Cambridge, UK.
- Van Meerssche, E., Greenfield, D.I. & Pinckney, J.L. 2018. Coastal eutrophication and freshening:

- Impacts on *Pseudo-nitzschia* abundance and domoic acid allelopathy. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 209:70–9.
- Vanormelingen, P., Vanelslander, B., Sato, S., Gillard, J., Trobajo, R., Sabbe, K. & Vyverman, W. 2013. Heterothallic sexual reproduction in the model diatom *Cylindrotheca*. *Eur. J. Phycol.* 48:93–105.
- Villac, M.C., Roelke, D.L., Chavez, F.P., Cifuentes, L.A. & Fryxell, G.A. 1993. *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production. *J. Shellfish Res.* 12:457–65.
- Von Dassow, P., Chepurinov, V.A. & Armbrust, E.V. 2006. Relationships between growth rate, cell size, and induction of spermatogenesis in the centric diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 42:887–99.

-W-

- Wright, J.L.C., Boyd, R.K., Freitas, A.S.W., De Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M. V. et al. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* 67:481–90.

-Y-

- Yamamoto, T. & Hatta, G. 2004. Pulsed nutrient supply as a factor inducing phytoplankton diversity. *Ecol. Modell.* 171:247–70.

-Z-

- Zurzolo, C. & Bowler, C. 2001. Exploring bioinorganic pattern formation in diatoms. A story of polarized trafficking. *Plant Physiol.* 127:1339–45.

Variabilité interspécifique et intraspécifique des indices physiologiques chez les diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia* : influence du cycle de vie

Chez les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, certaines espèces produisent une neurotoxine, l'acide domoïque responsable chez l'homme d'intoxications amnésiantes suite à la consommation de mollusques contaminés. En Baie de Seine, la variabilité interannuelle de ces efflorescences toxiques, qui provoquent certaines années des fermetures de zones de pêche à la coquille Saint-Jacques, est liée à des changements de diversité spécifique au sein des communautés de *Pseudo-nitzschia*. Cette thèse avait pour objectif de caractériser la diversité écophysiologique au sein du genre *Pseudo-nitzschia* afin de mieux comprendre les facteurs qui influencent les différences de toxicité et de phénologies des efflorescences des principales espèces de *Pseudo-nitzschia* de Baie de Seine. Différents paramètres physiologiques, tels que la croissance, la production d'acide domoïque, les quotas élémentaires, les paramètres photosynthétiques, ainsi que les paramètres de cinétiques d'absorption du nitrate, du silicate et du phosphate, ont été étudiés chez quatre espèces : *P. australis*, *P. pungens*, *P. fraudulenta* et *P. delicatissima*. De plus, la variabilité intraspécifique a été évaluée en étudiant de nombreuses souches par espèce et en estimant l'influence des variations de la taille cellulaire liées au cycle de vie de *Pseudo-nitzschia* sur les paramètres physiologiques. Les résultats montrent une importante diversité intraspécifique de la physiologie des quatre espèces, en partie liée à la taille cellulaire et parfois au cycle de vie. La connaissance de cette diversité intraspécifique a permis de caractériser différents traits physiologiques pour chaque espèce. Les résultats apportent des éléments de compréhension sur les conditions physiologiques favorables à la production d'acide domoïque et le rôle des éléments nutritifs dans le déterminisme des efflorescences des espèces de *Pseudo-nitzschia*.

Mots-clés : *Pseudo-nitzschia*, écophysiologie, variabilité interspécifique, variabilité intraspécifique, cycle de vie, acide domoïque, éléments nutritifs

Interspecific and intraspecific variability in physiology among the toxic diatoms *Pseudo-nitzschia*: influence of life cycle

In the diatom *Pseudo-nitzschia*, some species produce a neurotoxin called domoic acid responsible for amnesic shellfish poisoning in humans following the consumption of contaminated molluscs. In the Bay of Seine (English Channel), the variability of bloom toxicity is linked to differences in the *Pseudo-nitzschia* species diversity. The aim of this thesis was to characterize the ecophysiological diversity within the genus *Pseudo-nitzschia* in order to better understand the physiological parameters influencing differences in toxicity and bloom phenology among the main *Pseudo-nitzschia* species of the Bay of Seine. Growth, domoic acid production, elemental intracellular quotas, photosynthetic parameters and kinetic parameters for nitrate, phosphate, and silicic acid uptake were studied in four *Pseudo-nitzschia* species: *P. australis*, *P. pungens*, *P. fraudulenta* et *P. delicatissima*. The intraspecific variability was characterized with a multi-strain approach and also considering the effect of cell size on the studied physiological parameters. The results highlight the importance of the intraspecific variability in the physiology of the four species, in part due to cell size reduction linked to *Pseudo-nitzschia* life cycle. Delineate the intraspecific diversity allowed to characterize different physiological traits for each species. This work brings new information on the physiological conditions favorable to domoic acid production and on the role of nutrients in controlling *Pseudo-nitzschia* species diversity during blooms.

Keywords: *Pseudo-nitzschia*, ecophysiology, interspecific variability, intraspecific variability, life cycle, domoic acid, nutrients