

ODE DYNECO Pelagos

A. Chapelle, C. Le Bec (Coordinateurs)
R. Siano, F. Caradec, F. Andrieux (rédacteurs)
K. Klouch, M. Le Gac, J. Quéré, A. Youenou, M. Plus, P. Malestroit, X. Caisey

Avril 2014 - R.INT.ODE/DYNECO/PELAGOS 2014-03

Étude sur la prolifération de la micro algue *Alexandrium minutum* en rade de Brest

Projet Daoulex Rapport d'avancement n° 2 :

Analyse des traces biologiques d'*Alexandrium
minutum* dans les sédiments de la Rade de Brest.

Avril 2014

Analyse des traces biologiques d'*Alexandrium minutum* dans les sédiments de la Rade de Brest.

Projet Daoulex Rapport d'avancement n° 2 :

Avril 2014

RÉSUMÉ

Suite à l'efflorescence de grande ampleur d'*Alexandrium minutum* et des événements toxiques associés en Rade de Brest en 2012, un projet a été monté avec la Région dans le cadre du développement du port de Brest, pour élucider les contrôles de cette efflorescence. De juillet à août 2013, l'Ifremer a organisé un échantillonnage serré dans l'estuaire de Daoulas, zone la plus touchée en 2012 (rapport d'avancement n°1). Une autre partie de ce projet vise à la détection (rapport d'avancement n°2) et à la quantification (rapport d'avancement n°3) des traces biologiques d'*A. minutum* dans les sédiments de surface en différentes stations de la Rade de Brest présentant des caractéristiques sédimentaires différentes.

Pour la détection des traces biologiques (ADN extracellulaire et kystes) d'*A. minutum* dans les sédiments de surface de la Rade de Brest, 30 stations ont été échantillonnées à pied dans la zone intertidale ou en plongée. Ces stations ont été sélectionnées pour :

- i) leur géomorphologie côtière qui peut favoriser l'accumulation des kystes (baie, estuaires)
- ii) leurs typologies sédimentaires (de vaseuse à sableuse) qui peuvent garantir une meilleure conservation et accumulation des kystes de dinoflagellés
- iii) une faible bioturbation (l'absence d'organisme benthique)
- iv) leur situation stratégique d'un point de vue économique (ports, zones touristiques, zones conchylicoles) et écologiques (zones d'efflorescence d'*A. minutum*).

La détection de traces biologiques est faite par méthode génétique (PCR spécifique), une technique plus rapide que les méthodes classiques en microscopie optique basées sur l'identification morphologique des kystes. En parallèle une caractérisation de la typologie sédimentaire (granulométrie) des stations analysées est faite dans cette étude pour chercher une possible corrélation entre typologie sédimentaire et présence ou abondance d'*A. minutum*.

Les analyses génétiques mettent en évidence la présence de la microalgue potentiellement toxique *A. minutum* (kystes ou ADN libre extracellulaire) dans toutes les stations. Les analyses génétiques ne permettent pas de discriminer les cellules vivantes (kystes) du matériel biologique inerte (ADN extracellulaire). Toutefois, elles permettent d'affirmer que les sédiments de toutes les stations échantillonnées sont caractérisés soit par la présence de kystes ou ont été en contact avec la microalgue toxique *A. minutum*. L'étude granulométrique des sédiments superficiels a mis en évidence la prédominance des sédiments les plus fins, de type vase ou vase-sableux dans la partie orientale de la Rade. Une relation a été identifiée entre typologie des sédiments et quantité d'ADN totale extrait de sédiments, pour les stations des zones estuariennes. Les stations avec un pourcentage plus élevé de sédiments fins (< 0,63µm) et donc une typologie sédimentaire sablo-vaseuse sont caractérisés par des concentrations d'ADN total (tous les organismes) plus élevées.

Il n'est pas possible à partir de ces premières analyses d'affirmer qu'il existe une relation entre la typologie sédimentaire et la quantité d'ADN d'*A. minutum*. Cette relation sera analysée une fois que les analyses quantitatives de l'ADN d'*A. minutum* par PCR en temps réel seront conduites. Ces analyses, couplées avec des expériences de germination d'*A. minutum* à partir des sédiments, feront l'objet du rapport final du projet Daoulex qui sera présenté en Décembre 2014.

Table des matières

1. Introduction	6
1.1 Diversité et cycle de vie des dinoflagellés	6
1.2 Risque de prolifération toxique associée aux sédiments	8
1.3 Méthodes d'analyse de kystes dans les sédiments	10
1.4 Objectifs de l'étude et analyses envisagées	10
2. Echantillonnage et méthodes d'analyse	12
2.1 Sites d'échantillonnage et analyses effectuées	12
2.2 Extraction de l'ADN à partir de sédiments	13
2.3 Amplification de la région génomique cible (ITS) d'<i>A. minutum</i>	13
2.4 Granulométrie	13
3. Résultats	18
3.1 Caractérisation des sédiments : Granulométrie	18
3.2 Extraction de l'ADN total	20
3.3 Détection d' <i>A. minutum</i> par PCR spécifique	21
4. Conclusions	23
5. Perspectives	23
6. Références	25
7. Annexes	27

1. Introduction

1.1 Diversité et cycle de vie des dinoflagellés

Les dinoflagellés sont des micro-organismes planctoniques unicellulaires appartenant à la ligne évolutive des alvéolés (Alveolata), un groupe hétérogène d'eucaryotes unicellulaires (ou protistes) présents dans les écosystèmes marins et terrestres et ayant comme principale caractéristique morphologique en commun la présence d'alvéoles corticales. Les dinoflagellés sont exclusivement présents en milieu aquatique, ils sont aux trois quarts marins, le reste vivant en eau douce (Foissner & Hawksworth 2009). Le nombre d'espèces de dinoflagellés actuellement vivants est estimé à environ 2 400 (Gómez 2012; 2013), avec 2 500 espèces fossiles nommées (Taylor et al. 2007). Récemment, Gómez (Gómez 2012) a reconnu 1 555 espèces de dinoflagellés marins libres. Environ la moitié des espèces de dinoflagellés existante est photosynthétique, l'autre étant hétérotrophe, ou présentant les deux modes de nutrition (Gómez 2012). Les dinoflagellés sont unicellulaires, bien que certains puissent former des chaînes ou des pseudo-colonies. Leur noyau, appelé dinocaryon, est très caractéristique, car les chromosomes qu'il contient sont généralement nombreux et restent condensés à tous les stades cellulaires. Le stade mobile de leur cycle de vie est haploïde (n chromosomes), et la cellule possède alors en général deux flagelles dissemblables. Un flagelle en forme de ruban, situé dans une rainure transversale (cingulum), et un flagelle plus conventionnel émergeant d'un sillon ventral (sulcus) qui bat à l'arrière de la cellule (Fensome et al. 1998). La cellule est entourée par une membrane extérieure continue (amphiesma) dans laquelle se trouvent les vésicules amphiesmales. Certains dinoflagellés sont recouverts de plusieurs plaques polysaccharidiques formant une thèque plus ou moins épaisse, alors que d'autres ont des parois fragiles et sont appelés dinoflagellés nus, ou sans thèque. La cellule est divisée en deux parties, l'épithèque et l'hypothèque, séparées par le sillon équatorial (cingulum). L'extrémité antérieure de la cellule est appelée apex alors que l'extrémité postérieure est appelée antapex. La classification repose classiquement sur la morphologie externe. De façon générale il est possible de trouver de petites cellules sphériques, alors que d'autres espèces ont des structures complexes qui ressemblent à des cornes, des ailes ou des colliers. Depuis les années '80 la classification génétique des dinoflagellés accompagne la classification morphologique. Les deux approches combinées sont aujourd'hui incontournables pour la description des nouvelles espèces, mais de plus en plus aussi pour la détection des espèces connues dans le milieu. Enfin, certains dinoflagellés sont toxiques pour l'homme et les autres organismes marins. Certaines espèces de dinoflagellés, dont celles produisant des toxines, peuvent former de grandes efflorescences ou blooms « eaux colorées » qui peuvent fortement impacter l'activité économique dans les zones côtières (Hallegraeff 2003).

Le cycle de vie des dinoflagellés repose sur une alternance entre des phases sexuées et asexuées, et des stades motiles et benthiques. Dans le cas d'une reproduction asexuée, une cellule se divise par fission binaire pour donner deux cellules filles identiques à la cellule mère (c'est le cas lors des efflorescences). En cas de stress, les dinoflagellés peuvent former des kystes temporaires (ou kyste ecdysal) (Fistarol et al. 2004). Ces kystes temporaires apparaissent par exemple lors d'une variation soudaine dans l'environnement : carence en nutriments (Doucette et al. 1989), changement de température (Grzebyk & Berland 1996) ou encore lors d'interactions allélopathiques (interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives entre deux

organismes) (Fistarol et al. 2004). Ces kystes à membrane fine peuvent survivre pendant un temps limité. Par exemple dans le cas de *Scrippsiella trochoidea*, la période de dormance de ces kystes temporaires est de 6 à 13 jours (Wang et al. 2007). La paroi de ces kystes semble être faiblement perméable (Garcés et al. 1998) et peut résister à la digestion lors de leur consommation par des bivalves (Laabir et al. 2007). Une modification du contenu en toxines de ces kystes par rapport aux cellules végétatives a aussi été observée (Persson et al. 2006). Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la croissance de l'espèce, les dinoflagellés se reproduisent sexuellement et produisent des stades (diploïdes, $2n$ chromosomes) benthiques résistants (kystes de résistance ou hypnozygote). La reproduction sexuée a lieu soit à partir de la rencontre de « types » sexués différents (cycle hétérothallique) soit d'un même type sexué (cycle homothallique). Les kystes de résistance ont une durée de vie beaucoup plus importante que les kystes temporaires. Ils peuvent rester dormants pendant de nombreuses années dans les sédiments et l'ADN qu'ils contiennent est naturellement protégé par les structures extérieures qui les entourent. Bien que les dinoflagellés se reproduisent habituellement par voie végétative (notamment pendant les efflorescences), les deux modes de reproduction, asexué et sexué, peuvent être observés (Fig. 1).

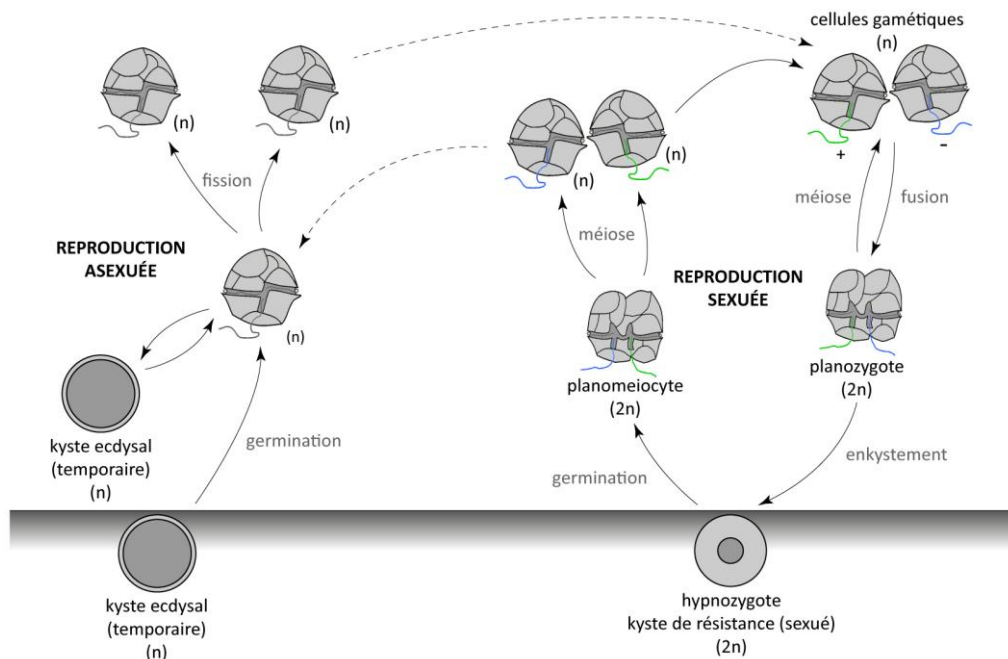


Figure 1 : Cycle de vie d'un dinoflagellé type

La paroi des kystes peut être calcaire, formé par des cristaux de CaCO_3 (par exemple *Scrippsiella trochoidea*) (Fig. 2A), ou organique, couverte d'épines ou protubérances (*Gonyaulax* spp.) (Fig. 2B) ou de strates de mucus (*Alexandrium* spp.) (Fig. 2C). La morphologie des kystes peut être utilisée pour la classification des dinoflagellés, mais le plus souvent la morphologie extérieure d'un kyste ne permet pas une identification spécifique car plusieurs espèces de dinoflagellés ont des kystes très similaires (par exemple les « round-brown ») (Fig. 2D). L'identification de l'espèce est alors impossible sans procéder à des expériences de germination et des analyses morphogénétiques sur le stade végétatif issu de la germination.

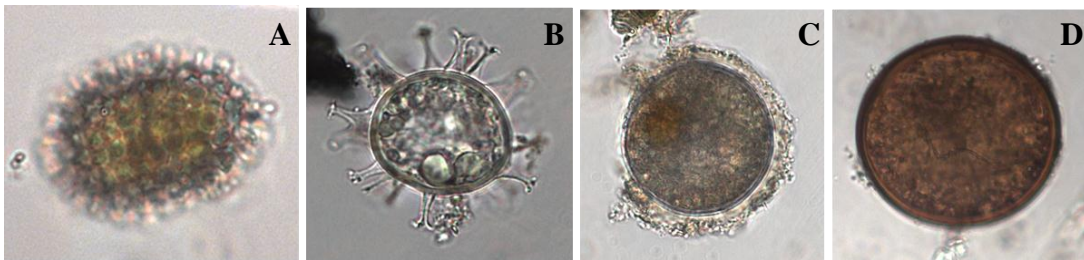


Figure 2 : Exemple de kyste calcaire (A, *Scripsiella trochoidea*) et organique avec : paroi épinée (B, *Gonyaulax spinifera*) , avec une strate de mucus (C, *Alexandrium* sp.) et avec une morphologie aspécifique (D, kyste du groupe de « round-brown »).

La présence de kystes de résistance dans le cycle de vie du dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* a été mise en évidence (Bolch et al., 1997). Les kystes de cette espèce sont hémisphériques et apparaissent circulaires (diamètre 24-29 μm) en vision frontale et réniformes (15-19 μm en hauteur) en vision latérale. Les kystes sont légèrement plus larges en moyenne que le stade végétatif (16-25 μm). La paroi est couverte de mucilage, l'intérieur est riche en granules et globules lipidiques, et présente un corps rouge évident (4-5 μm en diamètre) (Figure 3). Des études en laboratoire ont montré que la reproduction sexuée chez *A. minutum* inclut plusieurs types sexués. Selon la concentration en sels nutritifs, le planozygote issu de l'union de plusieurs gamètes peut se diviser végétativement ou s'enkyster. La présence de kyste temporaire a aussi été mise en évidence en laboratoire comme *in situ*. Les kystes de résistance des populations naturelles ont une période de dormance (période dans le cycle de vie d'un organisme la croissance, le développement et/ou l'activité métaboliques sont temporairement arrêtés) obligatoire de 1-1,5 mois (Figueroa et al., 2007 ; Anglès et al., 2012).

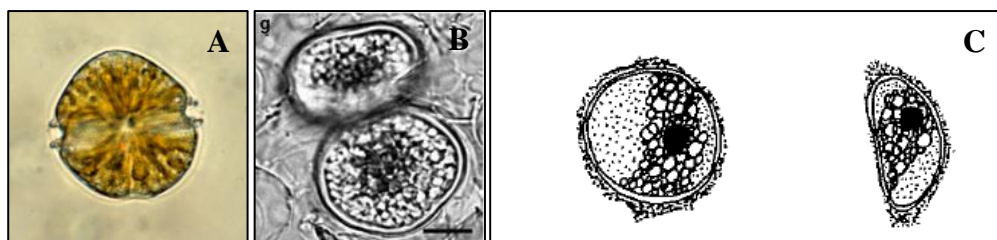


Figure 3 : Micrographie en microscopie optique de la forme végétative d'*Alexandrium minutum* (A) et de son kyste de résistance en vision ventrale et latérale (B : d'après Figueroa et al., (2007) ; C. d'après Bolch et al 1991 (dessin originaux)).

1.2 Risque de prolifération toxique associée aux sédiments

Les kystes de résistance permettent aux dinoflagellés d'échapper à la prédation ou à des conditions environnementales défavorables. Ils permettent d'entrer cycliquement en dormance dans les sédiments et sont donc un excellent mode de colonisation ou de contamination (dans les cas des espèces toxiques) des écosystèmes sur le long terme. Les kystes peuvent rester dormants pendant de nombreuses années dans les sédiments et l'ADN (le matériel génétique) qu'ils contiennent est naturellement protégé par les structures extérieures qui les entourent.

Ces « banques » de kystes représentent donc un inoculum potentiel pour des efflorescences. En effet des hautes densités de kystes ont été associées à des efflorescences massives de formes végétatives, y compris des espèces toxiques (Garcés et al., 2004). Les facteurs abiotiques (température, concentrations de sel nutritifs, irradiance, stabilité de la colonne d'eau, etc.) et les rythmes endogènes associés (Anderson et Rengefors, 2006) qui contrôlent la germination ainsi que la multiplication d'*Alexandrium* à partir de sédiments ont été étudiés *in situ* et *in vitro* (Garcés et al., 2004). Il a été montré que les kystes de dinoflagellés récents ou datant de plusieurs dizaines d'années ont pu germer à partir de sédiments récoltés puis remis en culture (Lundholm et al., 2010; Härnström et al., 2011), y compris des kystes d'*Alexandrium* (Miyazono et al., 2012). L'étude des kystes dans les sédiments représente donc une manière pour vérifier si un écosystème est contaminé par les kystes d'espèces phytoplanctoniques toxiques et donc s'il est potentiellement à risque d'efflorescences nuisibles.

La caractérisation de la typologie des sédiments peut contribuer à comprendre quels types de sédiment sont plus favorables à l'accumulation de kystes. Des densités élevées de kystes ont été retrouvées dans les 3 premiers cm de sédiment dans des baies, ports et lagunes (Erard –le Denn , 1993 ; Anglès et al., 2010 ; Genovesi et al. 2013). Plusieurs études ont aussi montré que l'accumulation des kystes dépend de la granulométrie du sédiment, elle serait majeure dans des sédiments de nature vaseuse plutôt que sableuse (Anglès et al. 2010). Une étude spécifique sur la relation entre la typologie des sédiments et l'accumulation des kystes d'*Alexandrium tamarense/catenella* dans la lagune de Thau a montré que les sédiments ayant une proportion élevée de vase (< 2µm) et de sables fins (20-50 µm) correspondent à la taille des kystes. Une concentration importante de matière organique (~5-15%) et une porosité élevée favoriseraient également l'accumulation des kystes. Les kystes d'*Alexandrium* se comporteraient comme des particules inorganiques de taille de 20-50 µm, et s'accumuleraient dans des zones avec une typologie sédimentaire de modérément vaseuse à sables fins, en correspondance à une plus forte concentration de matière organique et d'eau interstitielle, deux facteurs qui sont directement liés entre eux (Genovesi et al., 2013).

Les caractéristiques chimiques des sédiments peuvent aussi avoir une influence sur la conservation et la germination des kystes. Les kystes de dinoflagellés peuvent survivre pendant des années dans les sédiments anoxiques, mais leur germination peut être inhibée par l'absence d'oxygène. Des expériences en laboratoire ont en effet montré que des kystes de 5 espèces de dinoflagellés isolés dans des milieux de culture anaérobiques et avec l'ajout de sulfides (2.9 µM) et à pH 6.3 n'ont pas germé après 3 -7 semaines, contrairement à ceux sous conditions aérobiques. Ceci impliquerait que l'anaérobie dans les sédiments, phénomène engendré par l'accumulation de matière organique et la présence de sédiments fins, ne permettrait pas la germination des kystes (Anderson et al., 1987). Néanmoins l'exposition à des conditions anaérobiques n'a pas d'effet sur la viabilité des kystes sur le court terme. Les kystes exposés à des conditions expérimentales anaérobiques ont été capables de germer lorsqu'ils ont été remis à des conditions optimales de germination (Anderson et al., 1987). Il n'est pas exclu par contre que l'exposition à des conditions anaérobiques sur le long terme pourrait avoir un effet sur la viabilité et le potentiel germinatif de kystes. Ceci impliquerait que les kystes accumulés dans les sédiments plus profonds pourraient avoir perdu la capacité de régénérer une efflorescence (Anderson et al., 1987 ; Genovesi et al., 2013).

1.3 Méthodes d'analyse de kystes dans les sédiments

Classiquement la recherche des kystes dans les sédiments est faite à travers des méthodes de microscopie. Pour faciliter les analyses il est possible de séparer les kystes et d'autres matériaux organiques de la fraction inorganique par gradient de densité (Bolch et al., 1997) ou de marquer avec un colorant (primuline) les kystes, mais l'observation en microscopie est toujours incontournable pour identifier et quantifier les kystes de dinoflagellés. Les méthodes d'analyses des kystes par méthodes microscopiques sont chronophages et difficiles. Alternativement les méthodes génétiques d'analyses de présence/absence et de quantification du matériel génétique d'une espèce toxique (kyste ou ADN libre extracellulaire) sont beaucoup plus rapides.

À travers une approche d'amplification spécifique de l'ADN d'une espèce par PCR (Polymerase Chain Reaction) classiques il est possible de détecter la présence de traces biologiques d'une espèce dans les sédiments. Une évaluation de son abondance est faite par PCR en temps réel (ou PCR quantitative). Des adaptations de ces méthodes à l'analyse des kystes d'*Alexandrium* spp. dans les sédiments ont montré une bonne correspondance quantitative entre des comptages cellulaires des kystes obtenus en microscopie et la quantité d'ADN des espèces recherchées (Penna et al. 2010 ; Kamikawa et al., 2007 ; Erdner et al., 2010). Il est donc envisageable d'utiliser la PCR classique et la PCR quantitative pour la détection et la quantification des kystes d'*Alexandrium minutum*.

1.4 Objectifs de l'étude et analyses envisagées

En 1990 une étude sur l'abondance de kystes sur l'ensemble des côtes bretonnes effectuée par méthode de microscopie a montré l'absence de kyste d'*Alexandrium minutum* dans les sédiments de surface de la Rade de Brest dans les quatre stations analysées (estuaire de l'Elorn, Plougastel, Baie de Daoulas, Estuaire de l'Aulne) (Fig. 4A) (Erard –le Denn , 1993). De manière cohérente la présence d'*A. minutum* en Rade de Brest (site le Passage, dans l'estuaire de l'Elorn) a été remarquée pour la première fois par le REPHY en 1990-1991 à de faibles concentrations, mais des concentrations plus importantes (>400 cells/l) ont été détectées à partir du 1997 (Figure 4B) Des analyses préliminaires effectués sur des sédiments anciens paléodatés confirmeraient la présence d'*A. minutum* dans la Rade de Brest à partir de 1995 ± 2 (Klouch et al., 2014).

Depuis sa première détection en Rade de Brest *A. minutum* n'a atteint que de faibles concentrations, en général en dessous du seuil d'alerte du REPHY de 10000 cell/l jusqu'en 2012. L'efflorescence d'*A. minutum* de l'été 2012 (jusqu'à plus de 40 millions cell/l) et la détection de toxines dans les coquillages à des teneurs très supérieures au seuil sanitaire (plus de 8000 eqSTX.kg⁻¹) a été un phénomène nouveau et inattendu. Il est maintenant en cours d'étude (projet Daoulex Rapport d'avancement n°1).

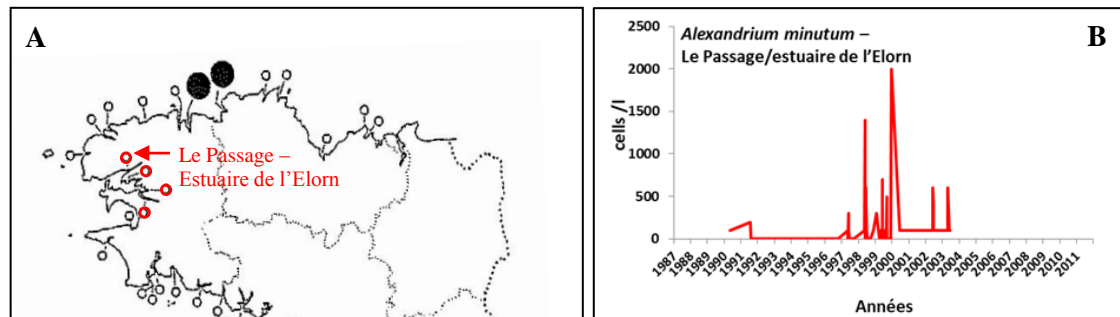


Figure 4 : A) Cartographie de la présence et abondance des kystes d'*Alexandrium minutum* dans les sédiments de surface de la Bretagne. Les cercles pleins indiquent où les kystes ont été retrouvés (Erard le Denn et al. 1991). Les cercles rouges indiquent les stations de la Rade de Brest. B) Abondances d' *A. minutum* dans la série temporelle du point REPHY « Le Passage » (Estuaire de l'Elorn).

Depuis l'arrivée d'*A. minutum* en Rade de Brest plusieurs baies, ports, estuaires pourraient être contaminés par la présence de cette espèce potentiellement toxique. Des efflorescences nuisibles pourraient donc se produire dans des zones qui ne sont pas sous surveillance. L'étude des sédiments par méthodes génétiques apparaît la manière plus efficace et rapide aujourd'hui pour obtenir une cartographie des écosystèmes contaminés par cette microalgue dans la Rade. Des analyses génétiques quantitatives associées à la caractérisation des sédiments peuvent mettre en évidence les sites les plus contaminés et donc ceux qui présentent le plus de risque d'efflorescences toxiques. Ces analyses pourraient également aider à prendre en compte le risque engendré par des opérations de dragage de sédiments dans des ports ou estuaires. En effet, les opérations de dragage de sédiment pourraient d'une part remettre en suspension dans la colonne d'eau des kystes d'*A. minutum* présents dans les sédiments qui feront office d'inoculum d'efflorescences potentiellement toxiques lors de la période de développement d'*A. minutum* (voir rapport n°1), d'autres part si les sédiments dragués sont déposés dans d'autres zones sous-marines ils peuvent contaminer des secteurs jusqu'alors exempts de la présence d'*A. minutum*.

Dans le cadre de cette étude nous proposons.

- 1) de prélever des sédiments de surface (1- 3 cm) en plusieurs sites de la Rade de Brest ;
- 2) d'extraire l'ADN dans les sédiments et de vérifier la présence de traces biologiques d'*Alexandrium minutum* dans les sites échantillonnés par PCR spécifique ;
- 3) de caractériser la granulométrie des sédiments prélevés ;
- 4) d'estimer l'abondance des traces biologiques d'*A. minutum* dans les différents sites échantillonnés par techniques de PCR en temps réel (analyse quantitative) ;
- 5) d'associer l'abondance d'*A. minutum* à la concentration de matière organique et de chlorophylle *a* ;

6) d'identifier les sites de la Rade de Brest dans lesquels les sédiments représentent un risque majeur d'inoculum d'efflorescence d'*A. minutum*.

Les résultats des points 1, 2 et 3 sont présentés dans ce rapport d'avancement, ceux des points 4, 5 et 6 seront présentés dans le rapport final en décembre 2014, les mesures au laboratoire étant en cours d'analyse.

Les résultats de ces analyses et l'interprétation écologique font également l'objet d'une partie de la thèse de doctorat de Khadidja Klouch (2013-2016).

2. Echantillonnage et méthodes d'analyse

2.1 Sites d'échantillonnage et analyses effectuées

Les stations échantillonnées dans cette étude ont été sélectionnées suite à une étude géographique, géologique et biologique (cartes de biotopes benthiques disponibles à Ifremer avec les types de faune et de sédiments) de la Rade de Brest.

Trente stations ont été sélectionnées pour :

- i) leur géomorphologie côtière qui peut favoriser l'accumulation des kystes (baie, estuaires)
- ii) leurs typologies sédimentaires (de vaseuse à sableuse) qui peuvent garantir une meilleure conservation et accumulation des kystes de dinoflagellés
- iii) une faible bioturbation (l'absence d'organismes benthiques)
- iv) leur accessibilité à pied (zone intertidale) ou en plongée (profondeurs relativement faibles)
- v) leur situation stratégique d'un point de vue économique (ports, zones touristiques, zones conchylicoles) et écologiques (zones d'efflorescence d'*A. minutum*) (Tableau 1, Fig. 5). Dans leur ensemble, les 30 stations couvrent de manière exhaustive, en longitude et latitude, la géographie de la Rade de Brest. Seul le centre de la rade n'a pu être échantillonné en raison de l'absence de sédiments meubles (plusieurs essais ont été effectués).

L'échantillonnage a été effectué du 6 au 10 décembre 2013. Une station, Ste. Anne du Portzic (n. 30), a été échantillonnée plus tard, le 3 février 2014. 24 stations ont été échantillonnées à pied dans la zone intertidale à marée basse et 7 stations ont été échantillonnées en plongée à une profondeur variable entre 6 et 27 m (Fig. 6).

Pour toutes les analyses effectuées dans cette étude les 3 premiers cms de sédiment ont été prélevés à l'aide d'une seringue stérile (1 seringue par station) (Fig.7). Les sédiments adéquatement conservés dans des tubes spécifiques, ont été préservés au laboratoire à 4°C ou -80°C selon le type de prélèvement.

Pour chaque station les prélèvements ont été effectués en triplicats, c'est-à-dire en trois points (A, B, C) distant d'1 m environ les uns des autres. Pour chaque réplicat, plusieurs échantillons ont été prélevés pour les analyses suivantes :

- extraction de l'ADN et PCR spécifique et quantitative (3 cm de sédiments (6-7 g) dans un flacon de 50ml)
- expérience de germination de kystes (3 cm de sédiments (6-7 g) dans un flacon de 50ml)
- granulométrie des sédiment (flacon de 5 ml))
- chlorophylle a (flacon de 5 ml)
- carbone organique (flacon 50 ml)

Les méthodes utilisées pour les données produites dans ce rapport sont expliquées par la suite.

2.2 Extraction de l'ADN à partir de sédiments

L'extraction de l'ADN du sédiment a été réalisée à l'aide du Kit d'extraction «PowerMaxSoil DNA isolation Kit» de MOBIO à partir de 5-8 g de sédiments initialement stockés à -80 °C. La procédure d'extraction repose sur une étape de lyse mécanique d'un échantillon de sédiment par des billes agitées à l'aide d'un vortex et d'une étape de purification de l'ADN sur colonnes de silice. Les extraits d'ADN sont récupérés dans environ 5 ml de tampon d'élution et sont immédiatement conservés à -80 °C.

2.3 Amplification de la région génomique cible (ITS) d'*A. minutum*

L'amplification de l'ADN par PCR spécifique a été réalisée pour détecter la présence d'*A. minutum* dans les échantillons de sédiments. La région de l'ITS1 de l'ADN ribosomique a été choisie pour sa spécificité et sa bonne résolution afin de démontrer de manière formelle la présence d'*A. minutum*. Les amorces ciblant cette région ont été choisies sur la base de la littérature (Penna et al., 2010). Le mélange réactionnel de PCR a été réalisé dans un volume de 10 µl contenant 1,25 µl d'ADN polymérase GoTaq (Promega), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de chaque amorce 1X de tampon, 2 mM de MgCl₂, 1µL de l'ADN à amplifier et de l'eau stérile. Pour chaque réaction de PCR un témoin négatif (mélange réactionnel + eau stérile remplaçant l'extrait d'ADN = T-) et un témoin positif (mélange réactionnel + extrait d'ADN dilué au 1/10 d'une culture de *A. minutum* = T+) ont été utilisés afin de vérifier le bon déroulement de l'amplification. Les tubes d'échantillons sont ensuite placés dans une machine à PCR (peqSTAR 2X, OZYME) et soumis à un programme d'amplification prédéfini. Le résultat de l'amplification par PCR est vérifié par migration électrophorétique sur gel d'agarose (1,5%) préparé en mélangeant de l'agarose (1,5 g), du TBE 1X (100 ml) et un intercalant de l'ADN GelRed 1000X (100 µL). Ce dernier permet de visualiser les acides nucléiques sous UV avec un imageur (BIO-RAD). Le poids moléculaire du fragment d'ADN amplifié est mesuré à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire nucléotidiques (MT). L'amplification de l'espèce est positive si dans le gel d'agarose une bande unique correspondant au poids moléculaire attendu du fragment amplifié est visible.

2.4 Granulométrie

A chaque station, des sédiments superficiels (2-3 cm) ont été prélevés et sous échantillonnés pour analyses ultérieures (C organique, granulométrie...). Les échantillons destinés à l'analyse granulométrique ont été conservés à 4 °C puis tamisés à 2 mm. Les analyses granulométriques ont été réalisées par granulomètre laser (LS 200 Beckman Counter).

Tableau 1 : Sites et coordonnées des prélèvements avec dates et heures d'échantillonnage. En rouge les stations effectuées en plongée.

Numéro Station	Localisation	Date et heure	Coordonnées (N/W)
1	Polder	06/12/13 14h00	48° 23' 02,8" 4° 26' 05,8"
2	Moulin Blanc	06/12/13 13h30	48° 23' 44,5" 4° 25' 55,3"
3	Le passage	02/12/2013 11h10	48° 23' 25" 4° 23' 03"
4	Kéraliou	02/12/2013 10h15	48° 22' 35" 4° 24' 41"
5	Caro	02/12/2013 9h50	48° 20' 5" 4° 26' 4"
6	Tinduff	02/12/2013 10h50	48° 20' 2" 4° 22' 03"
7	Moulin Neuf	02/12/2013 11h55	48° 21' 05" 4° 21' 04"
8	Penfoul	02/12/2013 12h50	48° 21' 29" 4° 19' 58"
9	Kersanton	03/12/2013 9h15	48° 20' 44,8" 4° 18' 01,6"
10	Lanveur	03/12/2013 10h15	48° 21' 19,2" 4° 17' 50,7"
11	Rivière de Daoulas	03/12/2013 11h45	48° 21' 21,0" 4° 16' 01,6"
12	Château	03/12/2013 12h30	48° 20' 10,8" 4° 18' 45,8"
13	Moulin Mer	03/12/2013 11h37	48° 19' 9" 4° 17' 14"
14	Hôpital Camfrout	03/12/2013 12h20	48° 19' 64" 4° 14' 84"
15	Tibidy	03/12/2013 9h20	48° 18' 41" 4° 14' 66"
16	Lanvoy	03/12/2013 10h15	48° 17' 74" 4° 13' 48"
17	Térénez	05/12/2013 13h26	48° 16' 75" 4° 16' 8"
18	Landévennec	05/12/2013 12h23	48° 17' 58" 4° 15' 63"
19	Sillon des Anglais	05/12/2013 11h05	48° 17' 89" 4° 17' 32"
20	Fret	05/12/2013 10h52	48° 16' 54,4" 4° 30' 13,1"
21	Rostellec	05/12/2013 11h33	48° 17' 27,5" 4° 31' 29,8"
22	Persuel	05/12/2013 12h30	48° 18' 00,8" 4° 33' 16,7"
23	Port de Commerce	09/12/2013 10h35	48° 22' 671" 4° 29' 18,2"
24	Le Passage	09/12/2013 12h15	48° 23' 63" 4° 22' 8,8"
25	Auberlac'h	10/12/2013 15h15	48° 19' 916" 4° 25' 053"
26	Est Tinduff	10/12/2013 10h15	48° 19' 751" 4° 20' 663"
27	Entre Lanveoc et Tinduff	10/12/2013 11h30	48° 18' 191" 4° 23' 031"
28	Quillien	10/12/2013 13h30	48° 17' 363" 4° 20' 568"
29	Ecole Navale	10/12/2013 12h35	48° 17' 370" 4° 24' 607"
30	Sainte Anne	03/02/2014 13h45	47° 4' 58" 2° 23' 47"

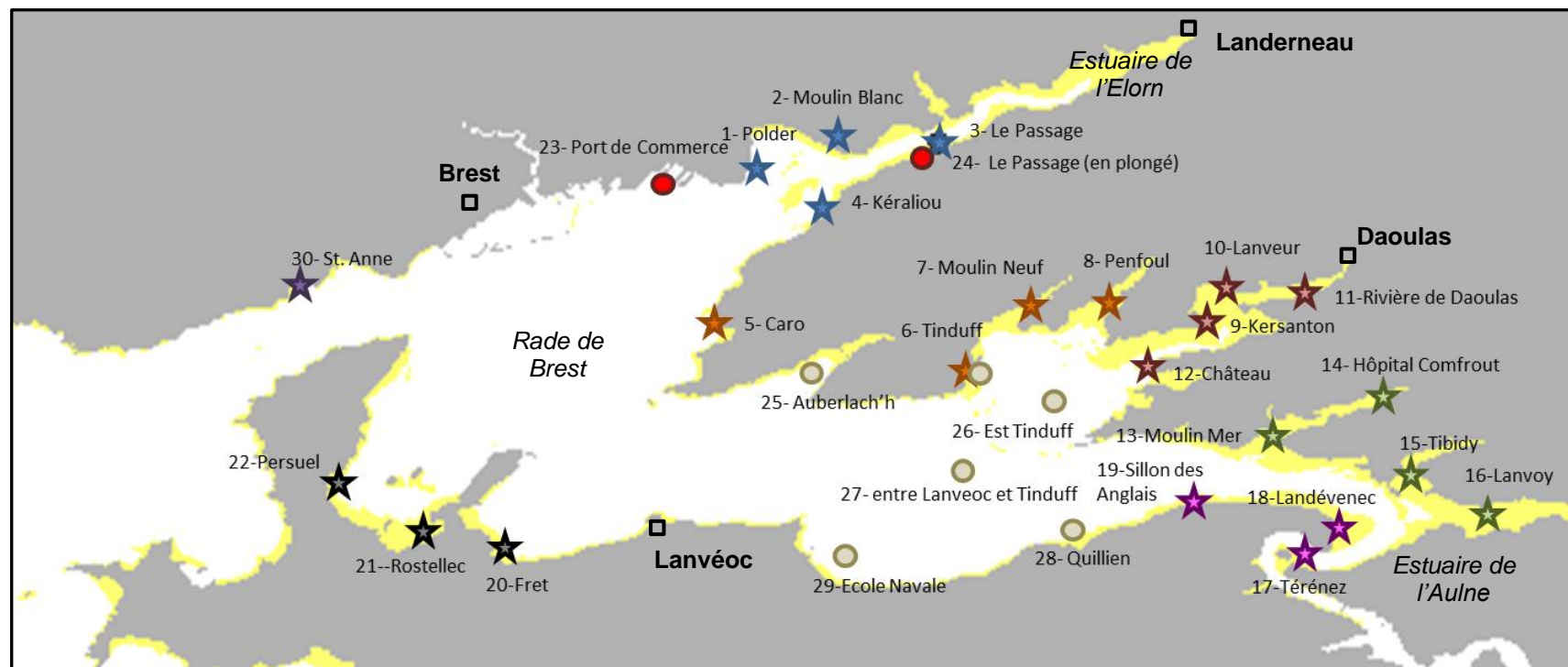


Figure 5 : Carte des sites d'échantillonnage. Les étoiles représentent les sites échantillonnés à pied, les cercles les sites échantillonnés en plongée. Les couleurs indiquent les différentes dates d'échantillonnage (se référer au tableau 1)



Figure 6: Images de l'échantillonnage et des préleveurs (Florian Caradec, Mickael Le Gac, Julien Quéré, Raffaele Siano, Annie Chapelle, Xavier Caisey, Martin Plus, Pascale Malestroit).



Figure 7 : Recueil de sédiment à pied avec l'aide de seringues :

- A) la seringue est enfoncée de 10 cm environ dans la vase,
- B) les 3 cms de surface sont gardés, le reste est éliminé,
- C) le sédiment est introduit dans les différents flacons pour les analyses au laboratoire,
- D) même procédé mais à partir de sédiments récoltés en plongée avec un tube en plexiglass

3. Résultats

3.1 Caractérisation des sédiments : Granulométrie

Les classes définies par Wentworth (1922) et Bellair et Pomerol (1977), associées à la caractérisation sédimentaire de Larsonneur (1971 : tableau A2 en Annexe) ont été utilisées pour la caractérisation des sédiments superficiels de la rade de Brest (tableau A1 en annexe).

Les résultats obtenus pour les triplicats (Tableau 2, Figure 8) mettent en évidence une nature granulométrique dans l'ensemble très homogène pour chaque station (coefficients de variation inférieurs à 15 %). Seules les stations, les plus sableuses présentent parfois de plus fortes hétérogénéités sédimentaires en particulier pour la fraction $< 63 \mu\text{m}$ (Silts + Argiles : coefficients de variation $> 50 \%$ aux stations 1 (Polder), 20 (Le Fret) et 22 (Persuel). Selon la classification de Larsonneur (1971), les sédiments superficiels de la Rade (tableau 2) présentent une large gamme de natures granulométriques, se répartissant entre les sables (Silts + argiles (lutites) $< 5 \%$: Keraliou et Caro : 2 stations) et les vases « pures » (silts + argiles $> 75 \%$: 9 stations). Les sédiments sableux à sablo-vaseux (silt + argiles de 5-25 % de fraction $< 63 \mu\text{m}$ ou lutites) sont généralement situés à l'embouchure de l'Elorn ou dans la rade, avec toutefois des vases sableuses au Port de commerce (station 23), au Moulin blanc (station 2) et au Passage (station 3). Les vases sableuses (25-75 % de lutites) et plus particulièrement les vases (Silts et argiles $> 75 \%$) prédominent dans la zone orientale de la rade de Brest, à partir de l'Auberlac'h (station 25) jusqu'à la rivière de Daoulas (station 11) et de l'école Navale (station 29) jusqu'à la zone de l'estuaire de l'Aulne (station 17, 18). La plus forte proportion de silts et argiles ($< 63 \mu\text{m}$: lutites) est observée dans l'Anse du Tinduff (Fig. 8 ; 82 % de lutites). La seule exception concerne le point subtidal situé entre Lanvéoc et l'Anse du Tinduff dont les sédiments sont constitués de seulement 35 % de fraction fine.

Ces résultats sont globalement cohérents avec les données antérieures de bionomie des fonds meubles de la rade de Brest (produit Rebent ; source C Hily, L Cronne et al., IUEM).

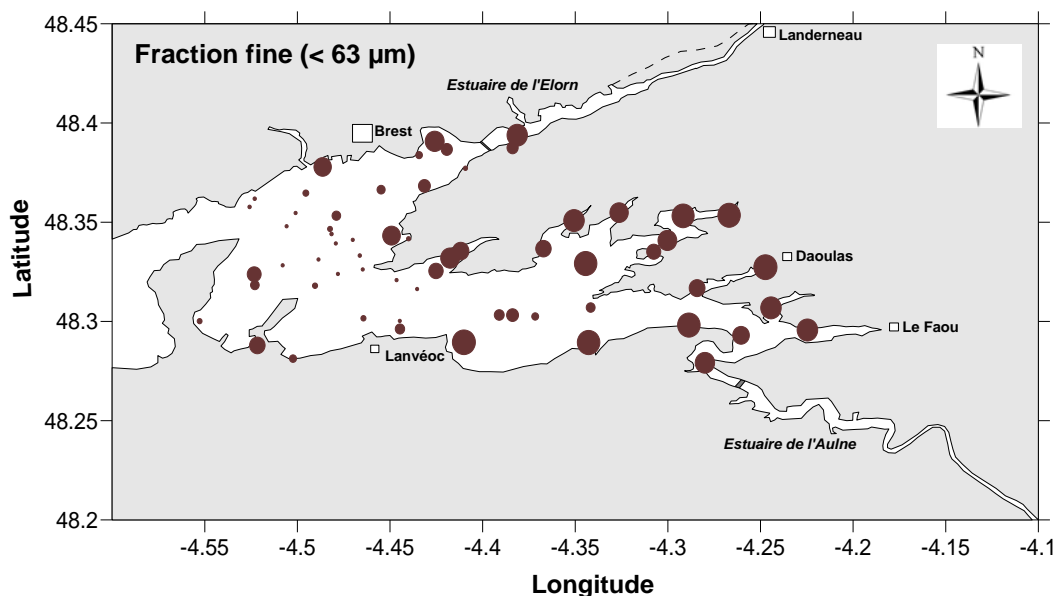


Figure 8 : Répartition des silts et argiles (fraction $< 63 \mu\text{m}$) dans les sédiments superficiels de la rade de Brest.

Tableau 2. Caractéristiques granulométriques des sédiments superficiels de la rade de Brest (0-3 cm). Les teneurs en argiles (< 2 µm), silts (2-3 µm), fraction fine (silt + argile (< 63 µm)), sont exprimées en %. Le diamètre médian est en µm.

En gras : moyenne pour chaque triplicat ; En italique : écart-type ; En bleu : coefficient de variation. (Sainte-Anne, mesures en cours)

Numéro du site	Site d'études	Argiles (<2 µm)			Silts (2-63 µm)			Fraction fine (<63 µm)			Sables (63-2000 µm)			Diamètre médian			Classification <i>selon Larssonneur 1971</i>
		%			%			%			%			µm			
1	Polder	1.2	<i>0.7</i>	<i>59</i>	13.1	<i>7.0</i>	<i>53</i>	14.3	<i>7.7</i>	<i>54</i>	85.7	<i>7.7</i>	<i>9</i>	234	<i>42</i>	<i>18</i>	Sables vaseux
2	Moulin Blanc	3.1	<i>0.1</i>	<i>4</i>	60.3	<i>4.7</i>	<i>8</i>	63.4	<i>4.7</i>	<i>7</i>	36.6	<i>4.7</i>	<i>13</i>	37	<i>6</i>	<i>16</i>	Vases sableuses
3	Le Passage	2.2	<i>0.2</i>	<i>7</i>	30.3	<i>0.4</i>	<i>1</i>	32.5	<i>0.6</i>	<i>2</i>	67.5	<i>0.6</i>	<i>1</i>	104	<i>1</i>	<i>1</i>	Vases sableuses
4	Kéraliou	0.3	<i>0.1</i>	<i>19</i>	3.8	<i>0.6</i>	<i>16</i>	4.1	<i>0.7</i>	<i>16</i>	95.9	<i>0.7</i>	<i>1</i>	404	<i>16</i>	<i>4</i>	Sables
5	Caro	0.3	<i>0.0</i>	<i>12</i>	3.3	<i>0.5</i>	<i>15</i>	3.6	<i>0.5</i>	<i>14</i>	96.4	<i>0.5</i>	<i>1</i>	194	<i>2</i>	<i>1</i>	Sables
6	Tinduff	2.9	<i>0.4</i>	<i>14</i>	79.0	<i>2.5</i>	<i>3</i>	81.9	<i>2.9</i>	<i>3</i>	18.1	<i>2.9</i>	<i>16</i>	20	<i>2</i>	<i>10</i>	Vases
7	Moulin Neuf	3.7	<i>1.5</i>	<i>41</i>	65.9	<i>5.2</i>	<i>8</i>	69.6	<i>6.5</i>	<i>9</i>	30.4	<i>6.5</i>	<i>21</i>	28	<i>7</i>	<i>27</i>	Vases sableuses
8	Penfoul	2.4	<i>0.4</i>	<i>16</i>	58.9	<i>5.0</i>	<i>8</i>	61.2	<i>5.4</i>	<i>9</i>	38.8	<i>5.4</i>	<i>14</i>	44	<i>7</i>	<i>17</i>	Vases sableuses
9	Kersanton	2.7	<i>0.8</i>	<i>30</i>	59.9	<i>4.2</i>	<i>7</i>	62.6	<i>5.0</i>	<i>8</i>	37.4	<i>5.0</i>	<i>13</i>	33	<i>8</i>	<i>23</i>	Vases sableuses
10	Lanveur	4.0	<i>0.5</i>	<i>12</i>	72.0	<i>1.7</i>	<i>2</i>	76.0	<i>2.1</i>	<i>3</i>	24.0	<i>2.1</i>	<i>9</i>	22	<i>1</i>	<i>7</i>	Vases
11	Rivière de Daoulas	3.4	<i>0.1</i>	<i>3</i>	73.8	<i>1.2</i>	<i>2</i>	77.2	<i>1.1</i>	<i>1</i>	22.8	<i>1.1</i>	<i>5</i>	21	<i>1</i>	<i>4</i>	Vases
12	Château	1.8	<i>0.1</i>	<i>8</i>	42.4	<i>3.1</i>	<i>7</i>	44.2	<i>3.2</i>	<i>7</i>	55.8	<i>3.2</i>	<i>6</i>	76	<i>7</i>	<i>10</i>	Vases sableuses
13	Moulin Mer	2.5	<i>0.1</i>	<i>5</i>	48.6	<i>11.1</i>	<i>23</i>	51.1	<i>11.1</i>	<i>22</i>	48.9	<i>11.1</i>	<i>23</i>	67	<i>28</i>	<i>42</i>	Vases sableuses
14	Hôpital Camfrout	3.3	<i>0.4</i>	<i>14</i>	76.9	<i>0.9</i>	<i>1</i>	80.1	<i>1.4</i>	<i>2</i>	19.9	<i>1.4</i>	<i>7</i>	21	<i>1</i>	<i>5</i>	Vases
15	Tibidy	3.4	<i>0.3</i>	<i>8</i>	66.3	<i>2.3</i>	<i>3</i>	69.6	<i>2.4</i>	<i>4</i>	30.4	<i>2.4</i>	<i>8</i>	33	<i>4</i>	<i>12</i>	Vases sableuses
16	Lanvoy	3.0	<i>0.6</i>	<i>19</i>	67.0	<i>12.1</i>	<i>18</i>	70.0	<i>12.7</i>	<i>18</i>	30.0	<i>12.7</i>	<i>42</i>	34	<i>18</i>	<i>52</i>	Vases
17	Térénez	3.5	<i>0.4</i>	<i>12</i>	61.7	<i>5.8</i>	<i>9</i>	65.3	<i>6.1</i>	<i>9</i>	34.7	<i>6.1</i>	<i>18</i>	34	<i>7</i>	<i>21</i>	Vases sableuses
18	Landévennec	2.7	<i>0.4</i>	<i>16</i>	51.6	<i>8.1</i>	<i>16</i>	54.3	<i>8.5</i>	<i>16</i>	45.7	<i>8.5</i>	<i>19</i>	59	<i>17</i>	<i>29</i>	Vases sableuses
19	Sillon des Anglais	3.3	<i>0.3</i>	<i>10</i>	74.5	<i>1.9</i>	<i>3</i>	77.7	<i>2.3</i>	<i>3</i>	22.3	<i>2.3</i>	<i>10</i>	22	<i>2</i>	<i>9</i>	Vases
20	Le Fret	1.2	<i>0.6</i>	<i>50</i>	14.6	<i>7.2</i>	<i>49</i>	15.8	<i>7.8</i>	<i>49</i>	84.2	<i>7.8</i>	<i>9</i>	246	<i>74</i>	<i>30</i>	Sables vaseux
21	Rostellec	2.3	<i>0.5</i>	<i>22</i>	54.2	<i>10.6</i>	<i>20</i>	56.5	<i>11.1</i>	<i>20</i>	43.5	<i>11.1</i>	<i>26</i>	67	<i>23</i>	<i>35</i>	Vases sableuses
22	Persuel	1.0	<i>0.6</i>	<i>59</i>	18.4	<i>20.4</i>	<i>111</i>	19.4	<i>21.0</i>	<i>108</i>	80.6	<i>21.0</i>	<i>26</i>	136	<i>3</i>	<i>3</i>	Sables vaseux
23	Port de commerce	5.5	<i>0.6</i>	<i>10</i>	51.7	<i>6.5</i>	<i>13</i>	57.3	<i>6.8</i>	<i>12</i>	42.7	<i>6.8</i>	<i>16</i>	45	<i>17</i>	<i>38</i>	Vases sableuses
24	Vehspa en plongée	4.0	<i>0.2</i>	<i>4</i>	65.1	<i>4.9</i>	<i>8</i>	69.1	<i>4.8</i>	<i>7</i>	30.9	<i>4.8</i>	<i>16</i>	27	<i>6</i>	<i>23</i>	Vases sableuses
25	Auberlach'h	4.2	<i>0.4</i>	<i>9</i>	59.1	<i>0.9</i>	<i>2</i>	63.3	<i>1.0</i>	<i>2</i>	36.7	<i>1.0</i>	<i>3</i>	43	<i>2</i>	<i>5</i>	Vases sableuses
26	Est Tinduff	5.3	<i>1.1</i>	<i>21</i>	72.1	<i>2.2</i>	<i>3</i>	77.4	<i>3.3</i>	<i>4</i>	22.6	<i>3.3</i>	<i>15</i>	16	<i>2</i>	<i>11</i>	Vases
27	Entre Lanvéoc et Tinduff	2.7	<i>0.1</i>	<i>5</i>	32.4	<i>2.6</i>	<i>8</i>	35.1	<i>2.8</i>	<i>8</i>	64.9	<i>2.8</i>	<i>4</i>	232	<i>26</i>	<i>11</i>	Vases sableuses
28	Quillian	5.3	<i>0.1</i>	<i>2</i>	72.4	<i>1.1</i>	<i>2</i>	77.7	<i>1.1</i>	<i>1</i>	22.3	<i>1.1</i>	<i>5</i>	15	<i>0</i>	<i>2</i>	Vases
29	Ecole Navale	7.0	<i>0.5</i>	<i>7</i>	72.4	<i>2.9</i>	<i>4</i>	79.4	<i>3.3</i>	<i>4</i>	20.6	<i>3.3</i>	<i>16</i>	14	<i>1</i>	<i>10</i>	Vases
30	Sainte Anne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 Extraction de l'ADN total

L'ADN génomique total a pu être extrait à partir de tous les échantillons de sédiments prélevés (toutes les stations, tous les réplicats). La concentration d'ADN varie entre 3,68 (station 30 : Ste. Anne) et 46,85 ng/μl (station 14 : Hôpital Camfrout) (Fig. 9).

Des concentrations plus élevées d'ADN ont été retrouvées dans de la zone orientale de la Rade de Brest à partir de l'Anse du Tinduff (stations 6-7), jusqu'à la zone de l'estuaire de l'Aulne (stations 17- 18) et au Sillon des Anglais (station 19).

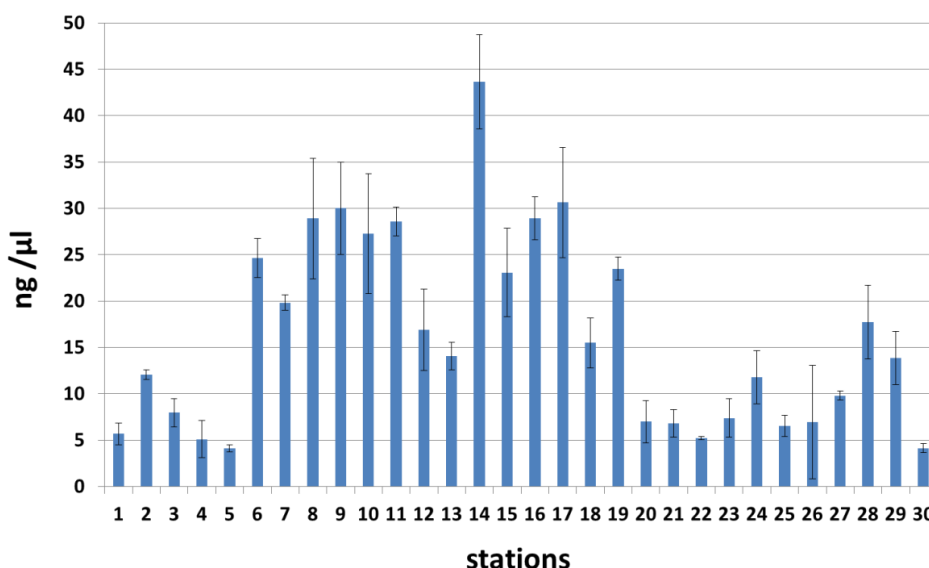


Figure 9: Concentration d'ADN extrait à partir des sédiments des stations échantillonnées.

Si l'on ne considère que les stations des zones estuariennes, échantillonnées à pied (stations 1-19), on remarque une corrélation positive et significative ($R^2 = 0.69$) entre les pourcentages des particules $< 0.63 \mu\text{m}$ (vase $< 2\mu\text{m}$ et sable $< 0.63\mu\text{m}$) et la concentration d'ADN (Fig. 10). Dans les stations à granulométrie sablo-vaseuse (Tableau 2) on mesure de plus fortes concentrations d'ADN.

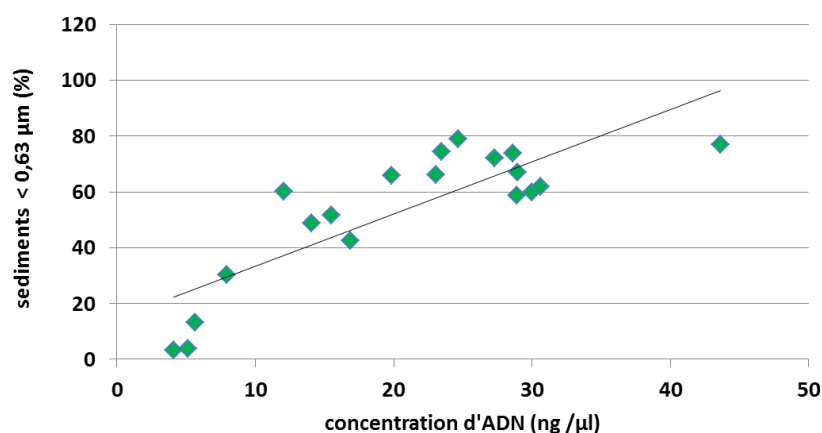


Figure 10: Corrélation entre concentration d'ADN et granulométrie sablo-vaseuse dans les stations des zones estuariennes de la Rade de Brest

L'ADN extrait à partir des sédiments représente une mesure de tout le matériel biologique présent dans ce substrat, animal et végétal. Il inclut à la fois du matériel biologique vivant et mort. L'abondance de l'ADN n'est en aucune mesure proportionnelle à l'abondance des traces biologiques d'une espèce. L'extraction de l'ADN et l'évaluation de sa quantité et qualité sont une étape essentielle avant d'analyser la présence (PCR spécifique) ou quantité (PCR en temps réel) d'une espèce.

3.3 Détection d'*A. minutum* par PCR spécifique

Les amplifications par PCR ciblent la région de l'ITS1 de l'ADN ribosomique d'*A. minutum* des 90 échantillons (30 stations x 3 réplicats). Les résultats permettent de constater la présence d'*A. minutum* dans tous les échantillons. Sur les gels d'agarose, des bandes uniques ont été observées à la taille attendue (212 paires de bases (bp)) (Fig. 11). Des bandes plus intenses ont été observées pour les stations 6 à 19 situées dans la partie orientale de la Rade (Estuaires de Daoulas, du Camfrout, du Faou et de l'Aulne) et pour les stations 23 à 29, les stations Elorn et centre Rade dont le prélèvement a été effectué en plongée. Ces stations sont caractérisées par des concentrations plus élevées de particules < 63µm, mais pas forcément d'ADN. Même si l'intensité de la bande sur les gels d'agarose pourrait indiquer une concentration plus élevée d'ADN amplifié, il est nécessaire de passer par des analyses plus précises (PCR en temps réel) pour quantifier l'abondance de l'ADN d'*A. minutum* dans chaque station.

Il est important de noter que les analyses par PCR détectent toutes les traces biologiques d'ADN d'*A. minutum* à savoir les kystes et l'ADN libre extracellulaire. Les kystes représentent du matériel biologique vivant et peuvent donc donner lieu à une efflorescence en cas de germination. L'ADN libre extracellulaire provient de la dégradation des cellules vivantes, il représente donc des traces biologiques de cellules mortes qui ne sont donc pas capables de germer. Les analyses par PCR basées sur l'ADN ne permettent pas de faire la distinction entre cellules vivantes (kystes) et ADN de cellule mortes, mais elles permettent d'identifier avec certitude si l'écosystème analysé a été affecté par la présence d'*A. minutum*.

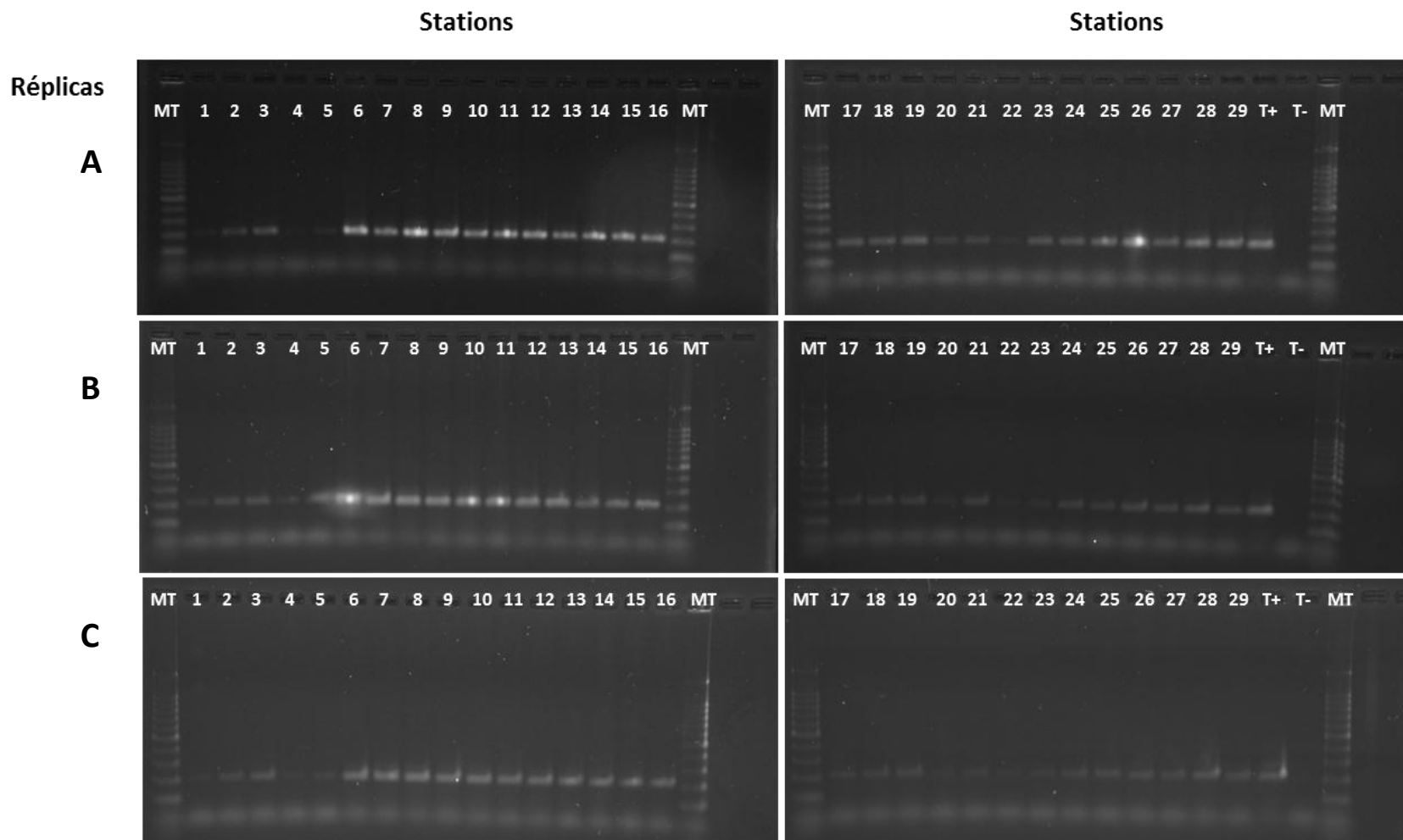
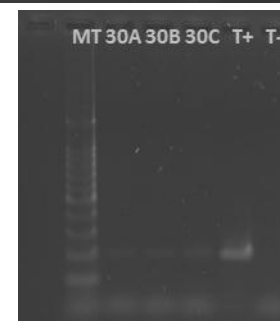


Figure 11: Images des gels à électrophores montrant les résultats de l'amplification PCR de différentes la région ITS1 de l'ADN ribosomal d'*A. minutum* pour toutes les stations échantillonnées (30) et pour leur 3 (A,B,C) réplicats. La bande unique visible dans le gel à la taille attendue de 212 bp indique la présence des traces biologiques (kystes ou ADN libre extracellulaire) d'*A. minutum*.



4. Conclusions

Les analyses génétiques par PCR spécifique à partir de l'ADN extrait dans les sédiments de surface (0-3 cm) de 30 stations de la Rade de Brest mettent en évidence la présence de la microalgue potentiellement toxique *Alexandrium minutum* (kystes ou ADN libre extracellulaire) dans toutes les stations. Les analyses génétiques ne permettent pas de discriminer les cellules vivantes (kystes) du matériel biologique inerte (ADN extracellulaire). Toutefois, elles permettent d'affirmer que les sédiments de toutes les stations échantillonnées sont caractérisés soit par la présence de kystes soit par la sédimentation de cellules d'*A. minutum* (zone d'efflorescence ou transport des cellules par les courants marins, voir le modèle hydrodynamique de dispersion dans le rapport d'avancement n.°1). Des expériences de germination de kystes d'*Alexandrium minutum* à partir des sédiments échantillonnés pourront confirmer la présence de kystes et tester le potentiel germinatif de cette espèce toxique à partir des sédiments des stations analysées.

L'étude granulométrique des sédiments superficiels de la Rade a mis en évidence la prédominance des sédiments les plus fins, de type vase ou vaso-sableux dans la partie orientale de la Rade.

Une relation entre la typologie de sédiments et la quantité d'ADN totale extrait de sédiments a été identifiée pour les stations des zones estuariennes. Les stations avec un pourcentage plus élevé de sédiments fins ($< 0,63\mu\text{m}$) et donc une typologie sédimentaire sablo-vaseuse sont caractérisées par des concentrations d'ADN total plus élevées.

5. Perspectives

Au vu de la présence d'*A. minutum* dans les sédiments de toutes les stations échantillonnées dans cette étude, il apparaît nécessaire d'identifier les stations et les zones de la Rade de Brest avec les concentrations les plus élevées. Pour cela les analyses en PCR en temps réel sont nécessaires. Le développement de cette technique est en cours au laboratoire DYNECO Pelagos et les analyses des données feront l'objet du rapport final du projet Daoulex (Rapport n°3) ainsi que d'une partie de la thèse de doctorat de Khadidja Klouch. Ces analyses permettront de discriminer les zones d'accumulation plus importantes d'*A. minutum*. Ces zones sont très probablement aussi les zones à plus forte concentration de kystes et donc les zones où le risque d'efflorescence toxique est plus élevé. La présence de kystes pourra être vérifiée avec des analyses de microscopie spécifiques ciblées et avec des expériences de germination.

Des expériences de germination en laboratoire permettraient de renseigner sur la viabilité des kystes d'*A. minutum* et sur leur aptitude à la germination, afin de déterminer les stations présentant un risque d'efflorescence toxique plus élevé. Il s'agit d'incuber en laboratoire les sédiments échantillonnés dans des milieux de culture et en conditions de lumière et température favorables à la croissance des dinoflagellés comme *A. minutum*. La germination pourrait être évaluée de manière qualitative au microscope optique en identifiant l'espèce sur la base des caractéristiques morphologiques. Cette étude sera conduite dans le mois prochain et fera l'objet du rapport final du projet Daoulex (Rapport n°3)

Une fois la germination avérée, d'autres analyses pourraient être envisagées pour tester la variabilité des populations d'*A. minutum* de la Rade (actions à prévoir en 2015/2016). Des cultures monoclonales pourraient être établies à partir de cellules végétatives germées issues des sédiments de sites clés, ceux présentant par exemple des concentrations plus élevées de traces biologiques d'*A. minutum*. Des analyses de génétique des populations sur les cultures obtenues pourraient contribuer à déterminer si les populations d'*A. minutum* de la Rade de Brest sont similaires ou géographiquement isolées. Des analyses de toxicité sur les différentes souches pourraient potentiellement mettre en évidence des souches plus toxiques, et une relation entre toxicité et site d'origine des souches pourrait être recherchée. Enfin il serait possible d'étudier la sensibilité des souches de différents sites à des facteurs biologiques naturels (par exemple les parasites) ou abiotiques (température, salinité, nutriments) qui peuvent induire la fin d'une efflorescence. Ces analyses pourraient contribuer à la compréhension des efflorescences d'*A. minutum* en Rade de Brest et du risque potentiel lié à ces phénomènes.

Il est aussi important de vérifier l'existence d'une relation directe entre typologie sédimentaire, accumulation de matériel organique et concentrations d'*A. minutum*, pour vérifier l'hypothèse établie par ailleurs que les cellules d'*Alexandrium* se comporteraient comme des particules inorganiques de taille de 20-50 μm , et s'accumuleraient dans des zones de typologie vaseuse à sables fins et en correspondance avec une plus haute concentration de matière organique (Genovesi et al., 2013). Pour cela il est nécessaire d'acquérir des données quantitatives d'ADN de *A. minutum* et de matériel organique déposé dans les sédiments. Les analyses conjointes de ces données, prévues pour la fin du projet Daoulex (rapport d'avancement n°3, décembre 2014), pourront élucider cet aspect. Parallèlement, les zones de dépôt privilégiées pourraient être investiguées à l'aide de modèles hydrodynamiques.

Il est aussi important de remarquer qu'il existe une variabilité interannuelle de l'accumulation des kystes. Cette variabilité dépend de la concentration de cellules végétatives produite en phase d'efflorescence et de la dispersion des cellules, variable selon les conditions hydrodynamiques. Nos analyses effectuées en décembre 2013 permettent de déterminer les zones d'accumulation récentes d'ADN d'*A. minutum* (rapport d'avancement n°1). Il serait envisageable d'effectuer une étude similaire mais étalée sur plusieurs années afin d'étudier les changements interannuels ou au contraire la récurrence du patron d'abondance du matériel génétique d'*A. minutum* dans les sédiments de la Rade de Brest, que nous avons observé dans cette étude.

6. Références

- Anderson D.M., Taylor C.D., Armbrust E.V. (1987). The effects of darkness and anaerobiosis on dinoflagellate cyst germination. *Limnology and Oceanography* 32: 340–351.
- Anglés S., Jordi A., Garcés E., Basterretxea G., Palanques A. (2010). *Alexandrium minutum* resting cyst distribution dynamics in a confined site. *Deep Sea Research II* 57: 210–221.
- Anglés S., Garcés E., Reñe A., Sampedro N. (2012) Life-cycle alternations in *Alexandrium minutum* natural populations from the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 16: 1-11.
- Anderson D.M., K. Rengefors (2006). Community assembly and seasonal succession of marine dinoflagellates in a temperate estuary: The importance of life cycle events. *Limnology and Oceanography* 51: 860–873.
- Bellair P., Pomerol P. (1977). *Éléments de Géologie*. Armand Colin, Paris, 528 pp.
- Bolch C.J.S. (1997). The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia*, 36: 472-478.
- Doucette G.J., Cembella A.D., and Boyer G.L. (1989) Cyst formation in the red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae): effects of iron stress. *Journal of Phycology* 25: 721–731.
- Erard-Le Denn E., Desbruyeres E., Olu K. (1993). *Alexandrium minutum*: resting cyst distribution in the sediments collected along the Brittany coast, France. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton in the Sea*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 109–114.
- Erdner D.L., Percy L., Lewis J., Anderson D.M. (2010). A quantitative real-time PCR assay for the identification and enumeration of *Alexandrium* cysts in marine sediments. *Deep-Sea Research Part II* 57: 279–287.
- Figuerola R.I., Garcés E., Bravo I. (2007). Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture. *Harmful Algae* 43: 1039–1053.
- Foissner W. and Hawksworth D.L. (2009) *Protist diversity and geographical distribution*. Springer vol.8
- Fensome R.A., Taylor F.J.R., Norris G., Sarjeant W.A.S., Wharton D.I., and Williams G.L. (1993) A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontology Press* 7: 1–351.
- Fistarol G.O., Legrand C., Rengefors K., and Graneli E. (2004) Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology* 6: 791–798.
- Garcés E., Delgado M., Maso M., and Camp J. (1998) Life history and in situ growth rates of *Alexandrium taylori* (dinophyceae, pyrrophyta). *Journal of Phycology* 34: 880–887.
- Garcés E., Bravo I., Vila M., Figuerola R.I., Masó M., Sampedro N. (2004). Relationship between vegetative cells and cyst production during *Alexandrium minutum* bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). *Journal of Plankton Research* 26: 637-645.
- Genovesi B., Mouillot D., Laugier T., Fiandrino A., Laabir M., Vaquer A., Grzebyk D. (2013). Influences of sedimentation and hydrodynamics on the spatial distribution of *Alexandrium catenella/tamarense* resting cysts in a shellfish farming lagoon impacted by toxic blooms. *Harmful Algae* 25: 15-15.
- Grzebyk D. and Berland B. (1996) Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research* 18: 1837–1849.

- Gómez F. (2012) A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *Systematics and Biodiversity* 10: 267–275.
- Gómez F. (2013) Problematic biases in the availability of molecular markers in protists: the example of the dinoflagellates. *Acta Protozoologica* 52: 21–33.
- Kamikawa R., Nagai S., Hosoi-Tanabe S., Itakura S., Yamaguchi M., Uchida Y., Baba T., Sako Y. (2007). Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and cysts from marine sediments. *Harmful Algae* 6: 413–420.
- Klouch K. (2012). Approche paléoécologique pour l'étude de la dynamique temporelle des Organismes Unicellulaires Photosynthétiques (UPOs) de la rade de Brest. Rapport de Stage de Master 2 Recherche Océanographie- Spécialité Biologie et Ecologie Marines. Université d'Aix-Marseille. 35 pp.
- Hallegraeff G.M. (2003) Harmful algal blooms: a global overview. *Phycologia* 11: 25–49.
- Härnström K., Ellegaard M., Andersen T., Godhe A. (2011). Hundred years of genetic structure in a sediment revived diatom population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 4252–4257.
- Laabir M., Amzil Z., Lassus P., Masseret E., Tapilatu Y., De Vargas R., and Grzebyk D. (2007) Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*. 20: 51–57.
- Larsonneur C. (1971) Manche Centrale et Baie de Seine: géologie du substratum et des dépôts meubles. Thèse d'Etat de l'Université de Caen, N° A.O.5404, 387 pp.
- Lundholm N., Ribeiro S., Andersen T.J., Koch T., Godhe A., Ekelund F., Ellegaard M. (2011). Buried alive – germination of up to a century-old marine protist resting stages. *Phycologia* 50: 629–640.
- Miyazono A., Nagai S., Kudo I., Tanizawa K. (2012). Viability of *Alexandrium tamarense* cysts in the sediment of Funka Bay, Hokkaido, Japan: over a hundred year survival times for cysts. *Harmful Algae* 16: 81–88.
- Penna A., Battocchi C., Garcés E., Anglés S., Cucchiari E., Totti C., Kremp A., Satta C., Giacobbe M. G., Bravo I., Bastianini M. (2010). Detection of microalgal resting cysts in European coastal sediments using a PCR-based assay. *Deep-Sea Research Part II* 57: 288–300.
- Persson A., Smith B.C., Wikfors G.H., and Quilliam M. (2006) Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 5: 678–684.
- Taylor F.J.R., Hoppenrath M., Saldarriaga J.F. (2007) Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation* 17: 407–418.
- Wang Z.H., Qi Y.Z., and Yang Y.F. (2007) Cyst formation: an important mechanism for the termination of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) bloom. *Journal of Plankton Research* 29: 209–218.
- Wentworth C.K. (1922) Grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology* 30 :327–392.

7. Annexes

Tableau A1. Définition des classes granulométriques selon Wentworth (1922) et Bellair et Pomerol (1977).

Taille des particules	Wentworth (1922)	Bellair et Pomerol (1977)
2 mm < \emptyset < 2 cm	Graviers et cailloutis	Graviers faisant partie de la classe des Rudites
1 mm < \emptyset < 2 mm	Sables très grossiers	
500 μm < \emptyset < 1 mm	Sables grossiers	
250 μm < \emptyset < 500 μm	Sables moyens	Sables et Sablons = classe des Arénites
125 μm < \emptyset < 250 μm	Sables fins	
63 μm < \emptyset < 125 μm	Sables très fins	
\emptyset < 63 μm	Silts et argiles	Lutites

Tableau A2. Caractérisation sédimentaire selon Larssonneur (1971)

Type de dépôt	Caractérisation
Cailloutis	Plus de 50 % de galets
Graviers	Plus de 50 % de graviers
Sables	Plus de 50 % de fraction < 2 mm et moins de 5 % de lutites
Sables graveleux	Plus de 15 % de graviers
Sables grossiers	Fraction 0,5-2 mm dominante
Sables fins	Fraction 0,2-0,5 mm dominante
Sablons	Fraction 0,05-0,2 mm dominante
Sédiments vaseux	Plus de 5% de lutites
Sables vaseux	De 5 à 25 % de lutites
Vases sableuses	De 25 à 75 % de lutites
Vases	Plus de 75 % de lutites