

ODE

Dyneco Pelagos

A. Chapelle, C. Le Bec (Coordinateurs)

Z. Amzil, C. Dreanno, L. Guillou, K. Klouch, C. Labry, M. Le Gac, L. Pineau, R. Siano (rédacteurs)

C. Abernot, F. Andrieux, F. Caradec, C. Destombe, A. Dia, A. Doner, A. Duval, J. Gouriou, P. Lazure, L. Le Brun, D. Le Gal, P. Malestroit, S. Petton, M. Plus, J. Quéré, V. Savar, S. Schmitt, A. Terre, A. Youéno

2014 Décembre - R.INT.ODE/Dyneco/Pelagos 2014-07

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

Projet Daoulex Rapport final : Décembre 2014

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

Projet Daoulex Rapport final : Décembre 2014

Résumé

Suite à l'événement de grande ampleur d'efflorescence d'*Alexandrium minutum* et des toxicités associées en Rade de Brest en 2012, un projet a été élaboré avec la Région Bretagne dans le cadre du développement du port de Brest. L'Ifremer a organisé un échantillonnage dans l'estuaire de la rivière de Daoulas, zone la plus touchée en 2012, au cours des printemps-été 2013 et 2014. Un suivi de la présence d'*A. minutum* dans les sédiments a également été réalisé en hiver 2014.

De ces suivis, des mesures réalisées au laboratoire à ce jour, des simulations du modèle Prévimer ainsi que des résultats du réseau Rephy et Velyger, il ressort que :

- La rade de Brest peut aujourd'hui être considérée comme une zone à risque pour *Alexandrium minutum*. En effet, depuis 2012 les blooms sont récurrents, dépassant le seuil d'alerte et entraînant une toxicité des coquillages. L'ensemble de la rade présente des sédiments contaminés par la présence d'*A. minutum*.
- La période à risque s'étend de mi-mai à fin août. Les estuaires du fond de rade, ainsi que le Sillon des Anglais sont les zones les plus touchées. En Baie de Daoulas et au Sillon des Anglais, l'année 2014 a été une année présentant un développement d'*A. minutum*, ainsi que des toxicités, sur une période très longue par rapport à 2012 et 2013. Le secteur Elorn a vu des concentrations en *A. minutum* ponctuellement supérieures au seuil d'alerte mais pas de toxicité.
- Le suivi Daoulex a mis en évidence l'importance de la température de l'eau pour le démarrage du bloom. 2014 est une année où les températures de l'eau ont été plus chaudes au printemps ce qui coïncide avec un démarrage beaucoup plus précoce, dès mi-mai du bloom. C'était la situation opposée en 2013.
- Les apports de nutriments par la rivière Mignonne semblent aussi être un facteur non négligeable, 2014 se situant entre les forts débits de 2012 et les débits plus faibles de 2013. L'intensité du bloom d'*A. minutum* présente cette même différence interannuelle.
- Les blooms d'*A. minutum* présentent des maxima pour les faibles coefficients de marée, c'est-à-dire lorsque les courants sont plus faibles et permettent un maintien du bloom dans les fonds d'estuaires, plus favorables à la croissance d'*A. minutum*.
- L'hydrodynamique de la rade seule ne peut expliquer la distribution d'*A. minutum* dans l'ensemble de la rade à partir d'un seul point de germination et de développement. Il s'agit vraisemblablement de plusieurs foyers de germination et de développement, qui ensuite vont contaminer, à de plus faibles abondances, le reste de la rade.
- *Alexandrium minutum* n'est qu'une espèce parmi l'ensemble de la communauté microphytoplanctonique mais elle peut devenir dominante au sein de cette communauté, comme en 2012 et 2014.
- Le séquençage de l'ensemble des ARN messagers de souches d'*A. minutum* a mis en évidence une diversité intra-spécifique extrêmement importante à la fois entre souches isolées au cours d'efflorescences distinctes (à la fois dans l'espace et dans le temps), mais également au sein d'une même efflorescence. L'impact de cette diversité sur la dynamique des efflorescences reste méconnu.
- Une approche de génétique des populations a pu mettre en évidence des différences de fréquences alléliques entre sites Bretons touchés par des efflorescences à *A. minutum*. Ceci indique que ces efflorescences se développent de manière indépendante, sans qu'il existe de forts flux de gènes entre sites.
- Les populations d'*A. minutum* de la rade synthétisent plusieurs types de toxines PSP au cours du bloom.
- Un test bandelette de détection et quantification d'*A. minutum* est en cours de développement.

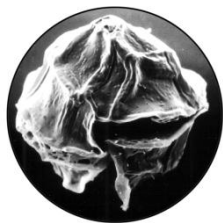
Sommaire

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUCTION | 10 |
| 2 | LA RADE DE BREST EST-ELLE UNE ZONE RISQUE POUR <i>ALEXANDRIUM MINUTUM</i> ? | 11 |
| 2.1 | La présence d' <i>Alexandrium minutum</i> dans l'eau en rade de Brest | 11 |
| | Données historiques | 11 |
| | Suivi 2014 | 13 |
| 2.2 | Les toxicités liées à <i>Alexandrium minutum</i> en rade de Brest | 14 |
| 2.3 | La présence d' <i>Alexandrium minutum</i> dans les sédiments de surface de la rade | 15 |
| | Caractérisation de l'Habitat sédimentaire | 16 |
| | Distribution de l'ADN spécifique d' <i>Alexandrium minutum</i> | 16 |
| 3 | QUELS SONT LES FACTEURS DE CONTROLE DES BLOOMS D'<i>ALEXANDRIUM MINUTUM</i>? | 19 |
| 3.1 | Facteurs hydrologiques | 19 |
| | Température de l'eau | 19 |
| | Irradiance | 20 |
| | Débits de la Mignonne | 21 |
| | Suivi des nutriments | 22 |
| | Coefficients de Marée | 23 |
| 3.2 | Facteurs hydrodynamiques | 24 |
| 3.3 | <i>A. minutum</i> au sein de la diversité des microalgues | 27 |
| | Communautés microphytoplanctoniques | 27 |
| | Diversité phytoplanctonique totale | 27 |
| 4 | DIVERSITE INTRA-SPECIFIQUE | 29 |
| 4.1 | Séquençage des ARN messager : Diversité génétique et physiologie moléculaire | 29 |
| 4.2 | Diversité au niveau populationnel | 31 |
| | Différenciation génétique spatio-temporelle | 32 |
| | Différenciations génétiques spatiales entre estuaires bretons : approche multivariée | 33 |
| 5 | QUELLE EST LA TOXICITE DES BLOOMS D'<i>A. MINUTUM</i> EN RADE DE BREST ? | 35 |
| 6 | LA DETECTION D'<i>A. MINUTUM</i> PAR TEST BANDELETTES ? | 39 |
| 6.1 | Principe du test développé pour détecter et quantifier <i>A. minutum</i> dans l'eau de mer | 40 |
| 6.2 | Mise au pont du test LFIA | 41 |
| | Optimisation du protocole | 41 |

| | |
|--|-----------|
| Caractérisation de la méthode avec des échantillons contrôlés (Etablissement des courbes de calibration) et test de spécificité. | 42 |
| Préparation de l'échantillon (concentration, congélation et fixation potentielle des échantillons d'eau de mer). | 43 |
| Inter-comparaison sur des échantillons issus du milieu marin. | 44 |
| 7 CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 44 |
| 8 BIBLIOGRAPHIE | 47 |
| 9 ANNEXE | 48 |
| 9.1 Surveillance Rephy (bulletins) | 48 |
| 9.2 Annexe 2 : Suivi terrain, été 2014 | 58 |
| Rappel de la stratégie Point fixe | 58 |

1 Introduction

Les algues toxiques sont des microalgues (invisibles à l'œil nu, de l'ordre de quelques millièmes de mm), que l'on trouve dans l'eau et qui produisent des toxines. Certaines de ces toxines, en s'accumulant dans les coquillages (toxines diarrhéiques, paralysantes, amnésiantes ...), peuvent être dangereuses pour les consommateurs. D'autres sont dangereuses pour la faune marine (poissons, coquillages ...).



Alexandrium minutum est une micro-algue qui appartient à la classe des dinophycées (ou dinoflagellés). Les cellules d'*A. minutum* sont de forme arrondie et de petite taille, entre 17 et 29 µm. *A. minutum* produit des toxines paralytiques (Paralytic Shellfish Poisoning, ou PSP). Ces toxines provoquent chez le consommateur de coquillages contaminés, une intoxication dont les effets apparaissent en moins de trente minutes. En cas d'intoxication faible ou modérée, les symptômes sont des fourmillements aux extrémités, des engourdissements autour des lèvres, des vertiges et des nausées, un pouls rapide, une incoordination motrice. Si l'intoxication est forte, la paralysie et les troubles respiratoires qui s'ensuivent peuvent être mortels. Les toxines PSP étant stables à la chaleur, la cuisson des coquillages ne diminue pas leur toxicité. (www.ifremer.fr/envlit/surveillance/rephy.htm).

Une partie du cycle de vie d'*A. minutum* se passe sous forme de kystes enfouis dans les sédiments (8 à 10 mois), c'est une forme de résistance. Lorsque les conditions sont favorables, les kystes germent et donnent naissance à la phase planctonique, les cellules se multiplient et peuvent atteindre de grandes abondances, on parle alors d'eau colorée.

En France, il existe deux systèmes de surveillance, le Rephy (Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton) coordonné par Ifremer qui contrôle les coquillages dans leur milieu naturel ainsi que le phytoplancton et la surveillance des coquillages sortis du milieu marin par les services vétérinaires et la DGAL. Ces systèmes permettent de consommer sans crainte les coquillages achetés et aussi, en se renseignant, les coquillages de pêche récréative. Les seuils légaux sont : un seuil d'alerte de 10 000 cellules par litre d'*A. minutum* qui déclenche alors les mesures de toxines dans les coquillages et un seuil de contamination de 800 µg eqSTX.kg⁻¹ qui déclenche la fermeture des zones conchylicoles.

En Rade de Brest, l'événement de grande ampleur d'efflorescence à *Alexandrium minutum* de l'été 2012 (jusqu'à plus de 40 millions de cellules par litre) et de toxicités PSP (plus de 8000 eqSTX.kg⁻¹) a été un phénomène nouveau. Il rappelle les épisodes de toxicité apparus en baie de Morlaix et en estuaire de la Penzé dans les années 90 ainsi qu'en Rance (1996). Les recherches antérieures (1990) n'ayant pas mis en évidence la présence de kystes d'*A. minutum* en rade de Brest (Erard, 1991) et le réseau de surveillance Rephy n'ayant révélé qu'une faible abondance des cellules dans l'eau durant les années passées, ce site ne faisait pas partie des sites à risque pour cette espèce.

Ce projet, *Alexandrium* en rade de Brest (Daoulex), a pour objectif de déterminer si la rade de Brest peut aujourd'hui être considérée comme une zone à risque et quelles sont les conditions de prolifération d'*A. minutum* en rade. Il a été mis en place dans le cadre des états initiaux des projets de développement du port de Brest, financé par la Région Bretagne.

Lancé début juillet 2013, l'étude Daoulex a déjà produit un premier rapport d'avancement présentant le suivi d'*A. minutum* réalisé durant l'été 2013 (Chapelle et al. 2013), un rapport d'avancement n°2 sur la présence d'*A. minutum* dans les sédiments de la rade (Chapelle et al. 2014).

Ce rapport final fait la synthèse des 18 mois d'étude et présente aussi le suivi réalisé au printemps-été 2014.

2 La rade de Brest est-elle une zone à risque pour *Alexandrium minutum* ?

2.1 La présence d'*Alexandrium minutum* dans l'eau en rade de Brest

Données historiques

L'analyse de l'ensemble des données historiques de l'abondance d'*Alexandrium minutum* en rade de Brest, données issues des programmes Rephy, Velyger et Daoulex montre qu'*A. minutum*, présent depuis les années 1990 à de faibles abondances a commencé à produire des efflorescences de plus de 100 000 cell.L⁻¹ dès 2010 en baie de Daoulas (figure 1). Depuis 2012, année record avec plus de 40M cell.L⁻¹, *A. minutum* dépasse chaque année (2013 et 2014) le seuil d'alerte (10 000 cell.L⁻¹) mais également les 100 000 cell.L⁻¹.

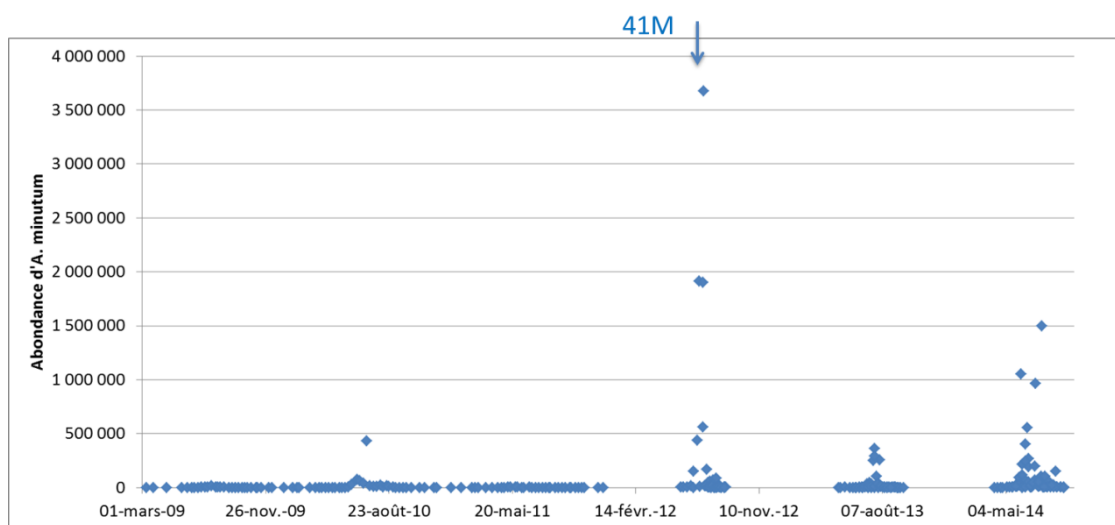


Figure 1. Données historiques d'*A. minutum* en rade

La période d'apparition des efflorescences d'*A. minutum* s'étend de mi-mai à fin août (figure 2). Elle peut être plus réduite selon les années ou exceptionnellement longue comme en 2014. C'est la niche temporelle d'*A. minutum* ou encore période à risque. On retrouve cette même niche temporelle dans les autres sites affectés par *A. minutum*, en estuaires de Penzé, Morlaix, Rance et dans les Abers (Chapelle et al. 2008).

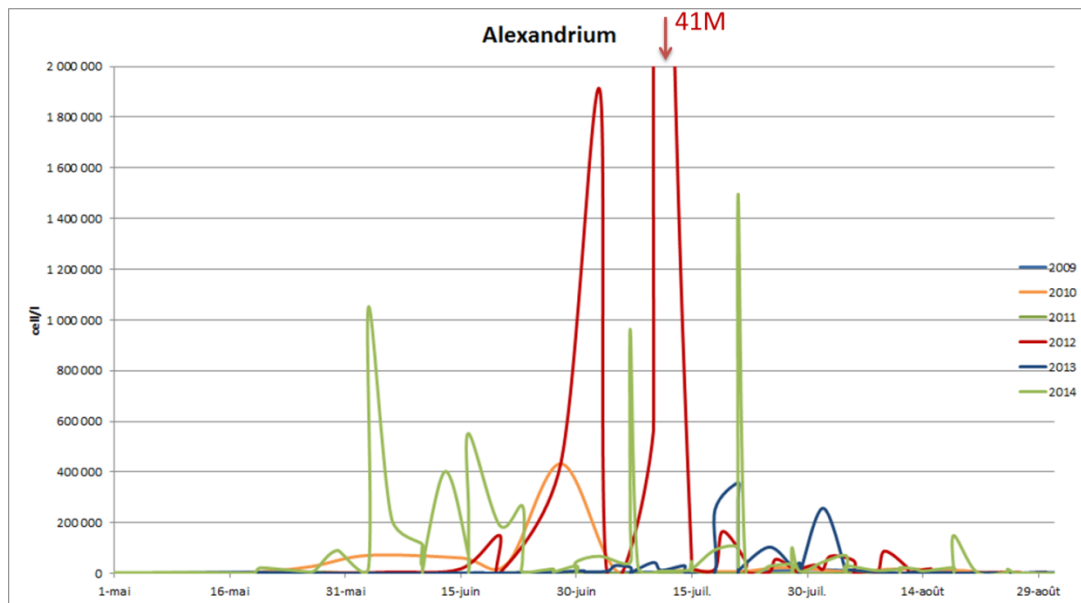


Figure 2. Période à risque d'*A. minutum* de mi-mai à fin août.

Un suivi spatial, réalisé en 2014 dans la rade, a permis d'évaluer l'étendue des blooms d'*A. minutum* (figure 3). Les secteurs les plus touchés sont les estuaires du fond de rade (baie de Daoulas, estuaires du Camfrout, du Faou) mais aussi le Sillon des Anglais, la Baie de Poulmic et l'estuaire de l'Elorn. Le centre rade ainsi que la rade ouest sont peu touchés.

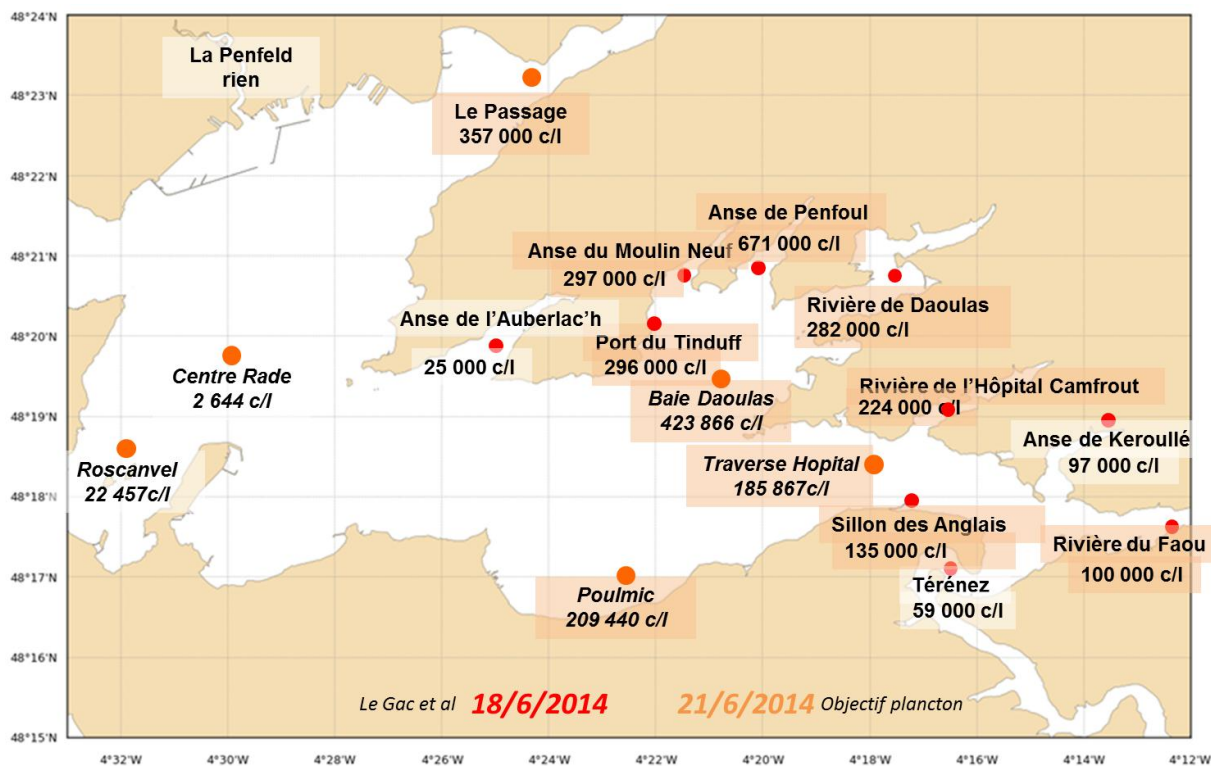


Figure 3. Suivi spatial réalisé en juin 2014 dans le cadre du programme Daoulex (points rouges) et en collaboration avec Objectif Plancton (points orange)

Suivi 2014

L'efflorescence 2014 a été suivie comme en 2013 (Chapelle et al. 2013 et annexe 2), deux fois par semaine au point fixe Rivière de Daoulas.

2014 est une année remarquable en terme de longueur de bloom. En effet, le bloom d'*A. minutum* a démarré dès le 25 mai (semaine 22) et a duré jusqu'au 11 août (semaine 33) au point rivière de Daoulas et même jusqu'au début septembre au point Pointe du château (figure 4). Il a duré du 1^{er} juin jusqu'au 15 août au Sillon des Anglais. Il a été plus tardif et plus réduit au Passage, du 23 juin au 7 juillet.

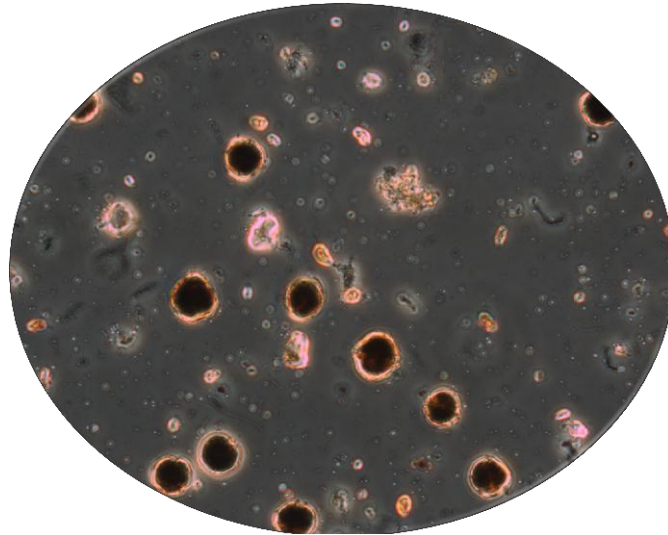


Figure 4. Bloom d'*A. minutum* du 6 juin 2014 observé au microscope (photo P. Malestroit)

Les efflorescences ont dépassé le million de cellules par litre en Rivière de Daoulas (1 052 002 cell.L⁻¹ le 6 juin, figure 4) et à la pointe du Château (1 496 480 cell.L⁻¹ le 22 juillet). Ces valeurs sont inférieures à 2012 mais bien supérieures aux abondances de 2013. Le secteur Elorn a également présenté un dépassement du seuil d'alerte le 7 juillet avec 199 100 cell.L⁻¹ (figure 5).

Associées à ces efflorescences, des toxicités ont été mesurées sur les coquillages par le Rephy.

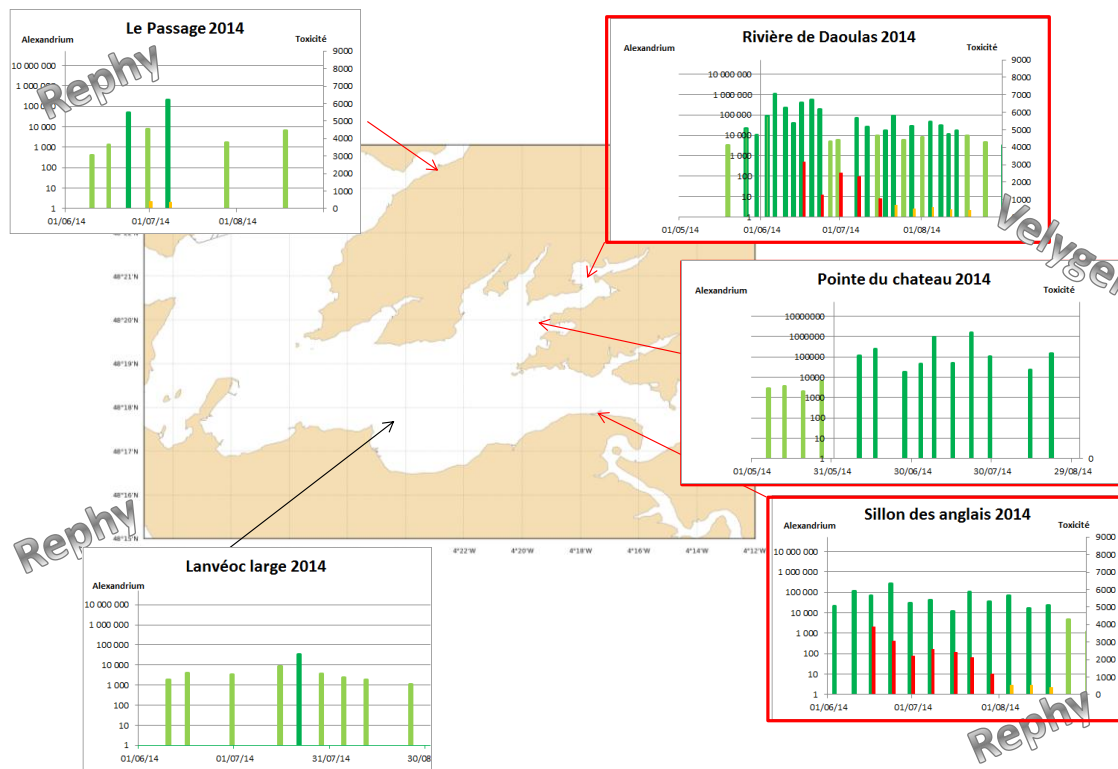


Figure 5. Abondances d'*Alexandrium minutum* (cell.L^{-1}) en vert (vert foncé quand dépassement du seuil d'alerte) et Toxicité ($\mu\text{g eq STX/kg}$) en orange (rouge quand dépassement du seuil toxique) en différents points de la rade pour 2014.

2.2 Les toxicités liées à *Alexandrium minutum* en rade de Brest

Lorsque le seuil d'alerte de $10\,000\ \text{cell.L}^{-1}$ est dépassé, le Rephy procède à des mesures de toxines de type PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) dans les coquillages. Ces toxines, produites par *A. minutum*, comprennent de la saxitoxine, neosaxitoxine, gonyautoxines... Les toxines, présentes dans les coquillages, sont extraites et injectées à des souris mâles de 20 g. Le temps de survie constaté permet de déterminer la teneur équivalente en saxitoxine. Lorsque le seuil réglementaire de $800\ \mu\text{g EQ STX/Kg}$ de chair est dépassé, la Préfecture prend la décision de fermer la zone contaminée.

Avant 2012, aucune toxicité PSP n'avait été constatée en rade de Brest. En 2012, des toxicités record ont été enregistrées avec plus de $10\,000\ \mu\text{g EQ STX/Kg}$ de chair sur les moules de Kersanton le 16 juillet. Tous les secteurs de la rade ont été contaminés au-dessus du seuil en 2012 (figure 5). En 2013, les niveaux de contamination ont été plus faibles, ne dépassant pas $1\,300\ \mu\text{g EQ STX/Kg}$ de chair. Seuls les secteurs Daoulas et Sillon des Anglais ont été contaminés.

En 2014, de même qu'en 2013, seuls les secteurs Daoulas et Sillon des Anglais ont été touchés mais à des plus forts niveaux de contamination, plus de $3\,000\ \mu\text{g EQ STX/Kg}$ de chair et surtout pendant une plus grande durée, du 8 juin au 27 juillet (figure 6).

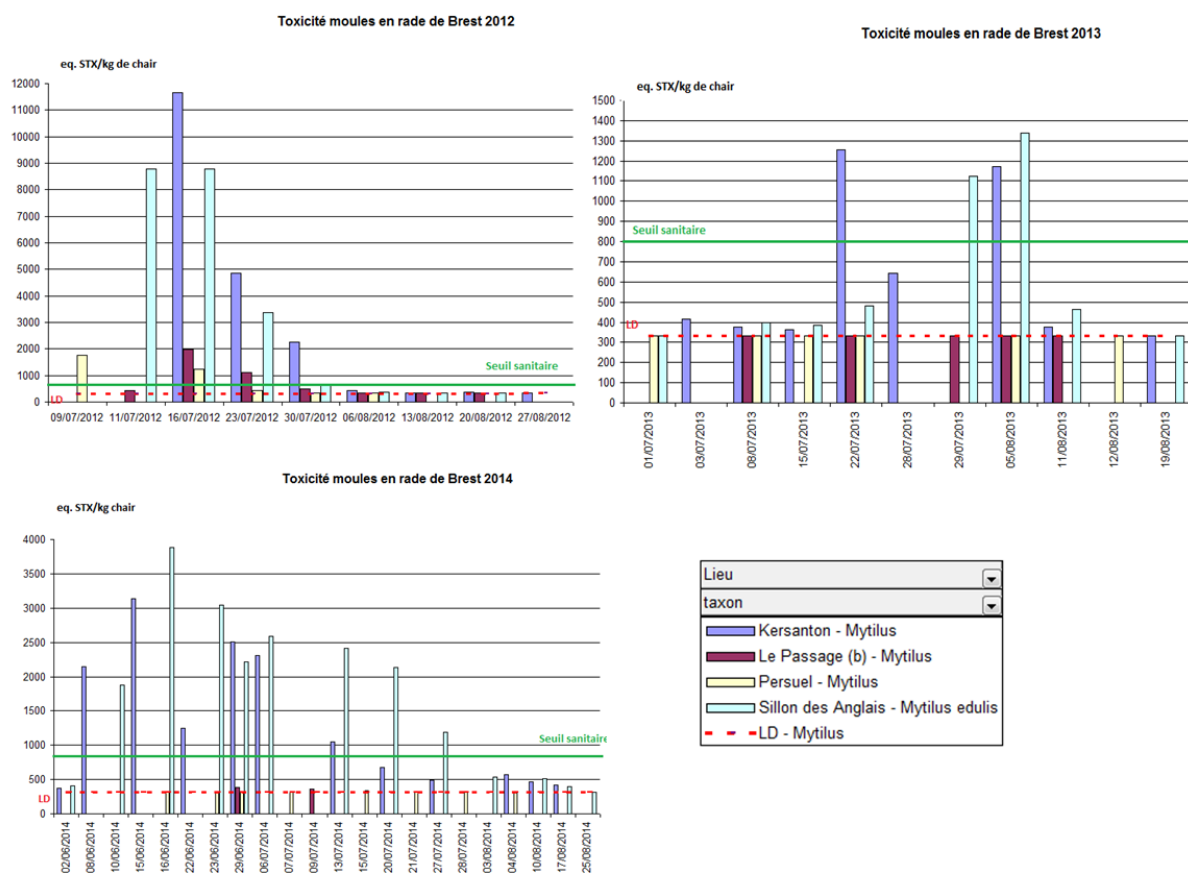


Figure 6 : Mesures des toxicités des coquillages en 2012, 2013 et 2014 dans les moules (données Rephy)

2.3 La présence d'*Alexandrium minutum* dans les sédiments de surface de la rade

Dans le cadre de cette étude nous avons mesuré la présence d'*Alexandrium minutum* par analyses biologiques (germination des kystes) et génétiques (détermination des traces génétiques) dans les sédiments de surface de la rade de Brest. Nous avons également procédé à des analyses biogéochimiques (granulométrie, carbone organique total, chlorophylle a) afin d'identifier les caractéristiques des habitats sédimentaires les mieux associées à cette présence pour pouvoir identifier les écosystèmes les plus susceptibles d'accumuler les kystes de cette espèce toxique. Ces analyses ont été réalisées dans les sédiments de surface (premiers 3 cm) prélevés à marée basse en décembre 2013 dans 30 stations de la Rade de Brest (Chapelle et al. 2014, figure 7).

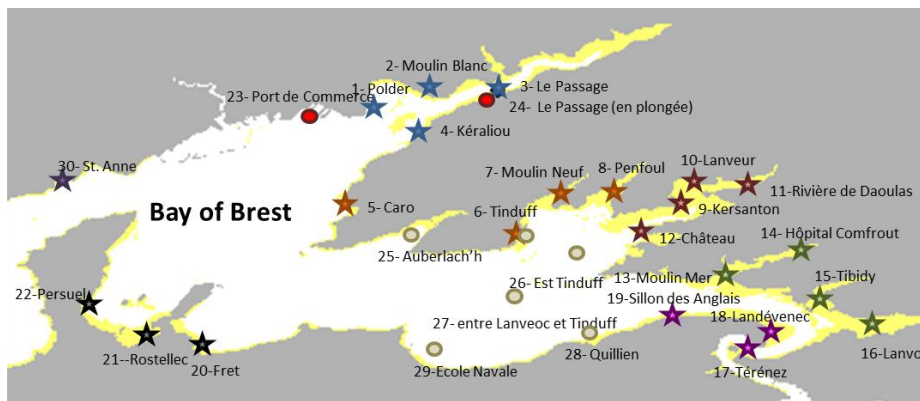


Figure 7. Echantillonnage des sédiments en rade de Brest en janvier 2013 (Chapelle et al. 2014)

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. 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.

Caractérisation de l'Habitat sédimentaire

Les teneurs en Carbone Organique total (COT) (figure 8) dans les sédiments de surface sont comprises entre 0,05 % ($\pm 0,02$) à la station 30 (St Anne) et 3,85 % ($\pm 0,18$) à la station 14 (Hôpital Camfrou) avec des valeurs dans l'ensemble très homogènes pour chaque station (coefficients de variation généralement inférieurs à 15 %). Les plus fortes concentrations en COT sont observées aux stations présentant les plus fortes proportions de particules fines. La matière organique a en effet une forte affinité pour les particules fines du sédiment car elle s'adsorbe sur les surfaces minérales (grande surface spécifique). Ces processus d'adsorption contribuent à une meilleure conservation de la matière organique et conduisent ainsi à une corrélation entre le COT et la proportion de particules fines ($< 63 \mu\text{m}$), linéaire (Yu et al., 2009) ou, comme dans la rade de Brest, exponentielle (Magni et al., 2008 ; figure 8) ($r^2 = 0,91$). Puisque l'ADN est une partie de la matière organique (COT), une corrélation positive et linéaire ($r^2 = 0,72$) entre ces deux variables est évidente (Figure 8).

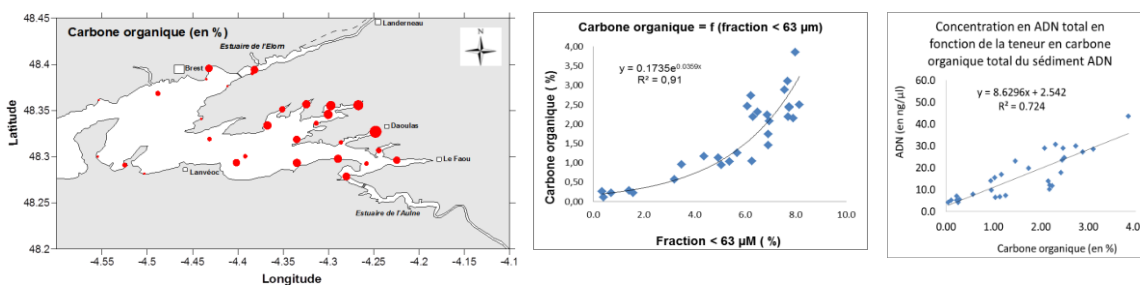


Figure 8 : Teneurs relatives en carbone organique dans les sédiments superficiels de la rade de Brest et corrélation avec la proportion de particules fines et d'ADN

Distribution de l'ADN spécifique d'*Alexandrium minutum*

L'ADN d'*A. minutum* présent dans les sédiments superficiels a pu être amplifié et quantifié par PCR¹ quantitative (qPCR). L'efficacité des réactions de qPCR exprimée par l'équation $E = 10^{(1/b)} - 1$, où b est la pente de la courbe standard, allait de 95 à 98,2 %. Les courbes de fusion présentaient un seul pic spécifique (température de fusion = $83,05 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) indiquant que l'amplification a bien été spécifique à *A. minutum* et de fait, qu'aucune autre espèce n'a été détectée simultanément.

¹ PCR : Polymerase Chain reaction : méthode d'amplification de l'ADN

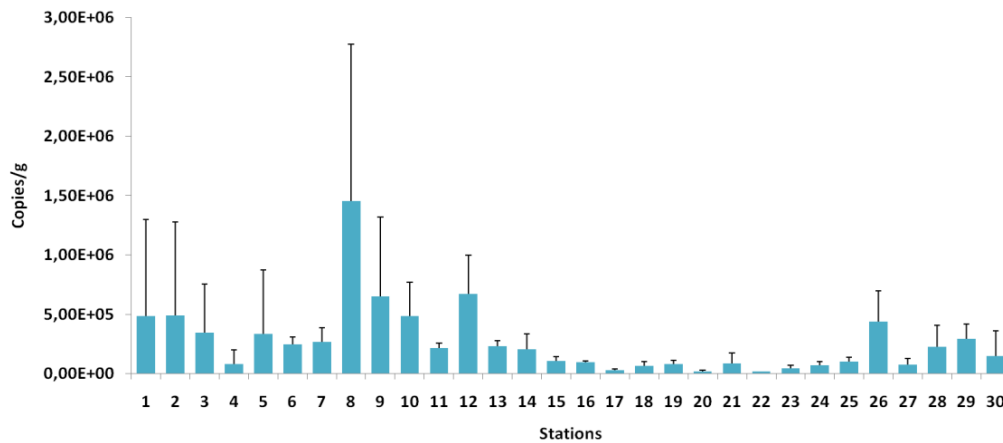


Figure 9. Concentrations moyennes d'*A. minutum* (copies d'ADN/g de sédiment) dans les sédiments superficiels de la rade de Brest. Les stations sont celles indiquées sur la figure 7.

La présence d'*A. minutum* dans les 30 stations étudiées a été déjà mise en évidence par PCR classique (Chapelle et al. 2014), les analyses de PCR quantitative confirment ce résultat. Les concentrations d'ADN sont exprimées en nombre de copies d'ITS1 rDNA² par gramme de sédiment prélevé (copies/g). On remarque une forte variabilité des concentrations d'ADN parmi les répliques comme en témoignent les écart-types sur la figure 9. Bien que les échantillons aient été prélevés à seulement 1 m d'écart les uns des autres, il existe une forte variabilité à courte échelle spatiale de la distribution d'*A. minutum* dans les sédiments. Les concentrations d'ADN sont très variables d'une station à l'autre, ($1,6 \times 10^4$ - $1,45 \times 10^6$ copies/g). L'espèce était présente en forte concentration dans les stations situées en Baie de Daoulas (8, 9, 10, 12).

Il faut noter que la PCR quantitative détecte tout type d'ADN dans le sédiment qu'il provienne de kystes, de cellules, ou qu'il soit simplement extracellulaire à l'état libre. Par conséquent, il n'est pas possible d'attribuer les concentrations mesurées à une densité de kystes. Par contre la germination de l'espèce a été mise en évidence dans toutes les stations analysées à partir d'une fraction de sédiments (<100 μ m) mise à germer dans des conditions optimales de croissance pour l'espèce (16°C, photopériode 12 : 12, milieu enrichi en sel nutritifs). Ces expériences, couplées aux analyses génétiques montrent la présence et la viabilité des kystes d'*A. minutum* au niveau des toutes les stations étudiées.

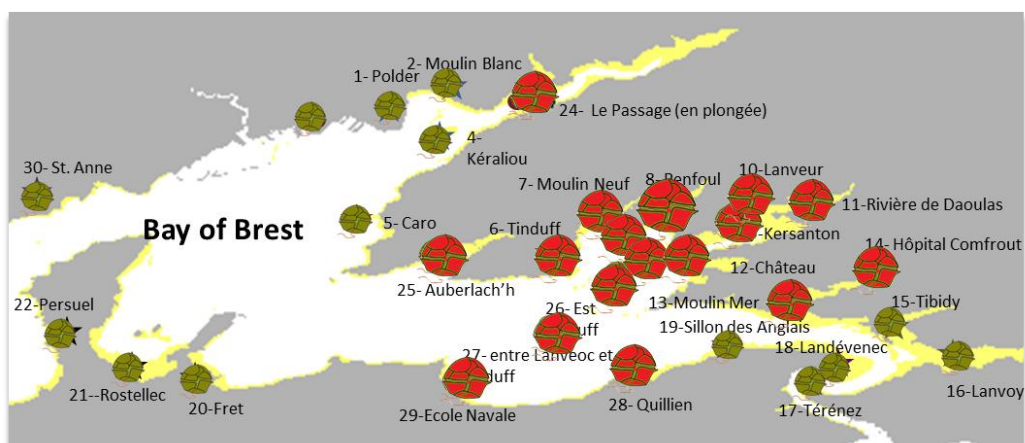


Figure 10. Le symbole indique la germination d'*Alexandrium minutum* dans les échantillons de sédiments, la taille des symboles en rouge est proportionnelle aux concentrations d'ADN spécifique d'*A. minutum* trouvées dans le sédiment

² ITS1 rDNA : fragment d'ADN ciblé par la qPCR

La distribution des traces d'*Alexandrium minutum* pourrait être la conséquence de l'évènement d'efflorescence de grande ampleur de 2012 dans la Baie de Daoulas et du transport des cellules par les courants marins. L'hydrodynamisme de la rade de Brest est très probablement la cause aussi de la distribution des particules fines et de la matière organique. En effet, les sites d'accumulation de particules fines (et donc de matière organique) sont en grande partie contrôlés par les processus de transport et de dépôt sédimentaire. Les zones de plus fortes concentrations de matière organique et donc d'ADN correspondraient ainsi à des zones où les vitesses des courants et la turbulence sont faibles, et permettent une sédimentation rapide, ce qui réduit aussi le contact de la matière organique avec l'oxygène et limite sa dégradation dans la colonne d'eau. Il est nécessaire d'effectuer dans le futur des analyses statistiques sur les données de granulométrie et d'ADN d'*A. minutum* pour établir une relation entre l'accumulation des traces biologiques de l'espèce toxique et son habitat sédimentaire. Il reste à vérifier si la quantité d'ADN dans les sédiments est aussi corrélée aux maxima d'abondances des cellules d'*A. minutum* pendant la phase de blooms en rade.

Les analyses sur le sédiment font partie de la thèse de doctorat de K. Klouch (2013-2016) et les analyses proposées dans ce rapport feront l'objet d'une publication scientifique qui est en cours de rédaction.

Au vu des données historiques, d'abondances dans l'eau, de présence dans les sédiments et de toxicité PSP, la rade de Brest peut aujourd'hui être considérée comme une zone à risque d'efflorescence toxique à *Alexandrium minutum*.

La période à risque s'étend de mi-mai à fin août. Les estuaires du fond de rade sont les plus touchés, ainsi que le Sillon des Anglais. Le secteur Elorn est également une zone à risque.

En Baie de Daoulas et au Sillon des Anglais, l'année 2014 a été une année particulière, présentant le développement d'*A. minutum* et des toxicités des coquillages sur une période très longue comparée à 2012 et 2013. Le secteur Elorn a vu des concentrations en *A. minutum* supérieures au seuil d'alerte mais pas de toxicité.

3 Quels sont les facteurs de contrôle des blooms d'*Alexandrium minutum*?

3.1 Facteurs hydrologiques

Température de l'eau

Les données de température sur l'année sont les moyennes journalières obtenues à partir d'une sonde haute fréquence située à la pointe du Château (bouée Smatch), ce sont des données du réseau Resco (Ifremer), figure 11. Lors du suivi estival, la température de l'eau a également été mesurée à chaque sortie au point Rivière du Château et sur les autres points échantillonnés par le Rephy.

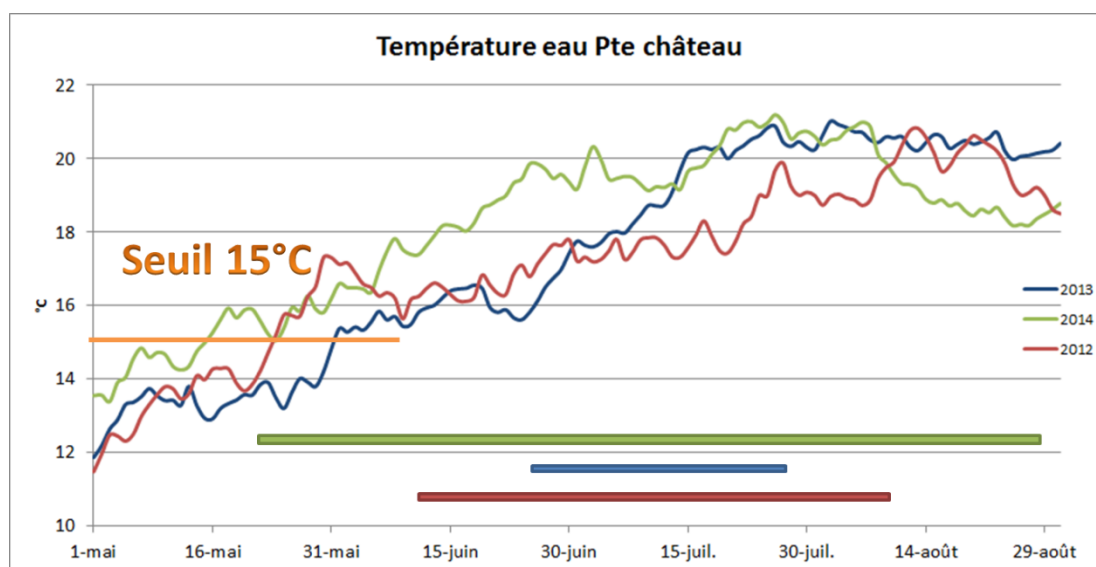


Figure 11 : Suivi de la température à la pointe du Château pour les années 2012, 2013 et 2014 et périodes où les abondances d'*Alexandrium minutum* ont dépassé le seuil des 10000 cell.L⁻¹ (traits)

Les trois années sont très différentes, 2014 étant une année où la température de l'eau a dépassé le seuil des 15°C très tôt au printemps (mi-mai) alors que 2013 présentait des températures beaucoup plus fraîches au printemps, avec un dépassement des 15°C début juin seulement (figure 11). En 2014, la température de l'eau s'est maintenue à des valeurs plus élevées que les autres années jusque mi-juillet. Ces valeurs de température de l'eau peuvent chaque année être comparées au démarrage des efflorescences d'*A. minutum*. En effet, le bloom a démarré très tôt en 2014, mi-mai, et tardivement en 2013, fin juin. Cela confirme l'importance du facteur température de l'eau pour le déclenchement des blooms, avec un seuil de 15°C nécessaire au dépassement du seuil d'alerte (Chapelle et al, 2008). Des études statistiques sur l'ensemble des blooms d'*A. minutum* ont également montré que c'est un des facteurs principaux de contrôle des blooms (Guallar-Morillo 2014).

Plusieurs mesures de température de l'eau sont également disponibles en rade, par des sondes comme les sondes de la Pointe du Château (Réseau Resco) ou la sonde Marel Iroise de Sainte Anne du Portzic, ainsi que par des mesures ponctuelles lors du suivi Rephy. Les données du printemps et de l'été 2014, présentées figure 12, montrent la variabilité spatiale des températures de l'eau à l'intérieur de la rade. En baie de Daoulas, les températures de l'eau sont toujours plus élevées (Pointe du Château et Rivière de Daoulas), ce qui pourrait expliquer un démarrage plus précoce du bloom dans ce secteurs par rapport au secteur Sillon et surtout le Passage (secteur Elorn). En effet les 15°C ont été dépassés dès mi-mai en estuaire de Daoulas et seulement début juin au Passage pour un dépassement du seuil d'*A. minutum* le 27 mai et le 23 juin respectivement.

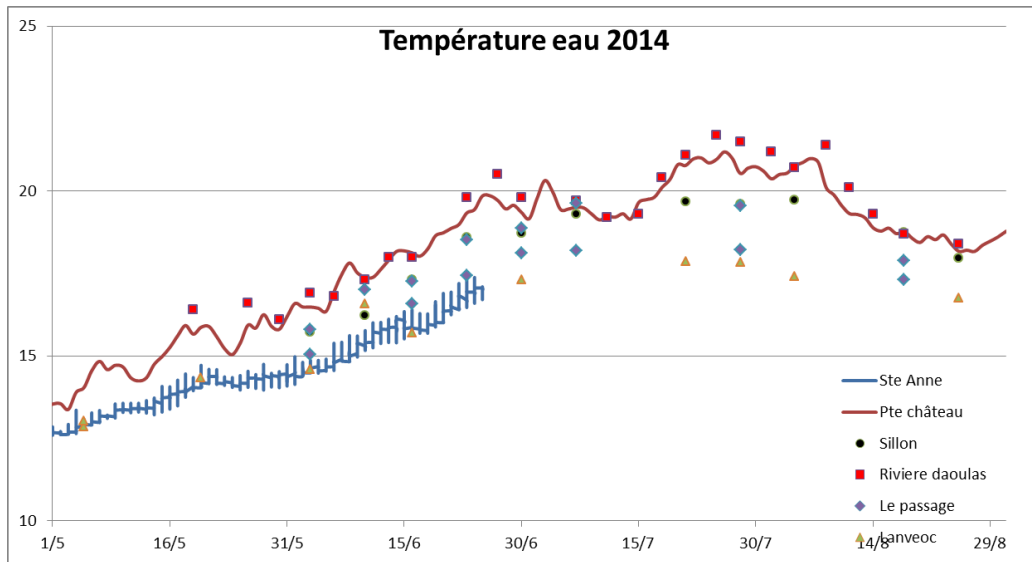


Figure 12. Températures mesurées *in situ* en rade de Brest en 2014 par les sondes Pointe du Château et Sainte Anne et aux points Rephy Sillon des Anglais, rivière de Daoulas, Lanveoc et Le Passage

Le modèle Previmer Rade de Brest à maille de 50m, simulant la température de l'eau et les courants (www.previmer.org) reproduit également cette différence moyenne de température de 1, 1°C entre les points le Passage et Rivière de Daoulas (figure 13). Cette différence est encore plus marquée avec la température à l'entrée de la rade (bouée Marel et le modèle au point Sainte Anne du Portzic).

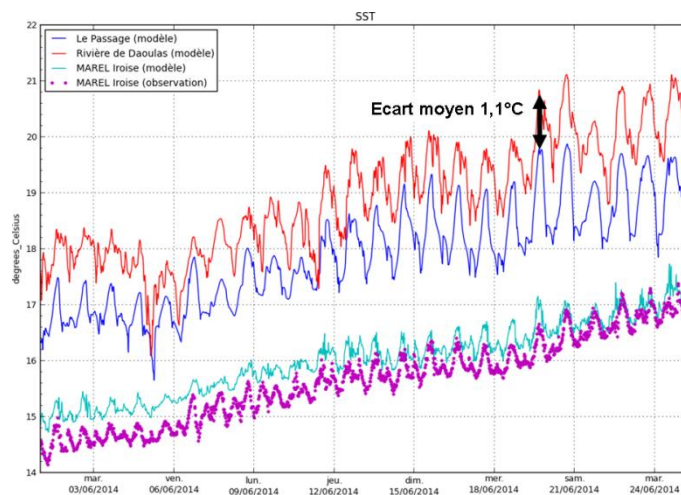


Figure 13. Température de l'eau simulée par le modèle Previmer Rade de Brest et données de la bouée Marel Iroise

Irradiance

Les données d'irradiance présentées ici sont des données satellite issues du centre OSI-SAF (Ocean and Sea Ice Satellite Application Facility, Centre de Météorologie Spatiale, CMS, Lannion) archivées et distribuées par le Cersat (IFREMER). Elles couvrent tout le spectre de l'UV à l'Infrarouge et correspondent à l'irradiance reçue cumulée sur la journée $J.cm^{-2}$ (figure 14). Ces données ne prennent pas en compte ni la partie réellement disponible pour la photosynthèse (PAR pour Photosynthetic Available Radiation, à peu près la moitié de l'irradiance totale) ni la partie adsorbée dans la colonne d'eau qui peut être très variable en fonction de la turbidité de l'eau de mer.

La période à laquelle se développe *Alexandrium minutum* en rade de Brest (et dans d'autres estuaires, Penzé, Cork en Irlande) correspond à la période de l'année où l'irradiance solaire est maximale (maximum de la sinusoïde) toujours supérieure à 1000 J.cm⁻². Or *A. minutum* est une espèce qui pousse bien même pour des éclaircissements faibles. Même si l'irradiance au printemps 2014 paraît plus élevée qu'en 2012 et surtout qu'en 2013, on peut douter de l'importance de ce facteur qui n'est guère limitant à cette saison.

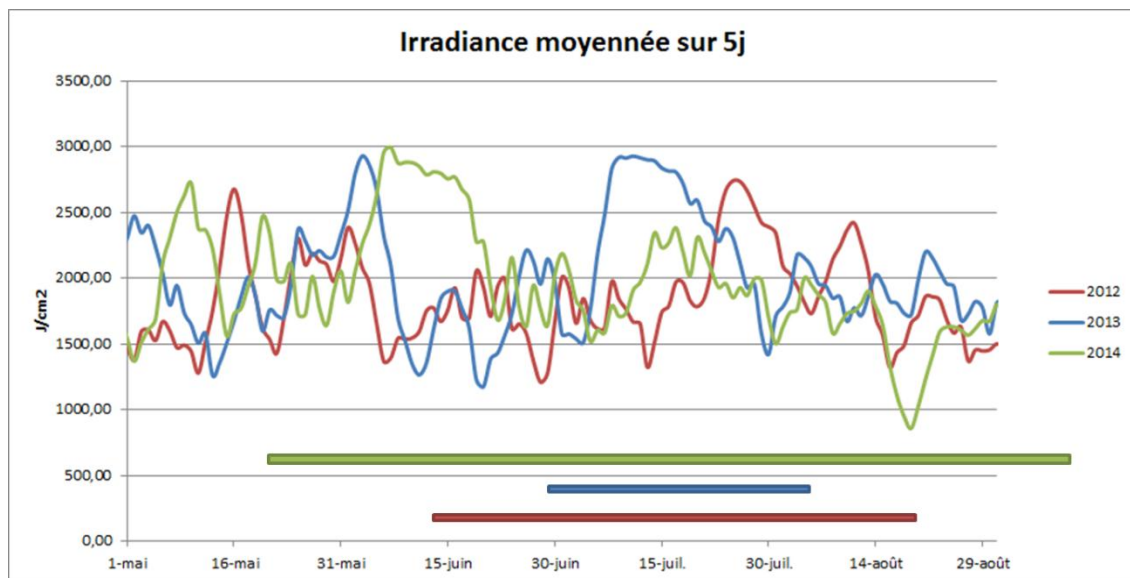


Figure 14. Irradiance journalière reçue en rade de Brest

Débits de la Mignonne

Les données de débit (Q_{amont}) ont été recueillies sur le site de la banque HYDRO (MEDD/DE, Banque Nationale de données pour l'hydrométrie et l'hydrologie). Les stations retenues sont celles situées le plus en aval du bassin versant. Ainsi les bassins versants pris en compte pour la Mignonne, l'Aulne et l'Elorn sont respectivement de 70, 1403 et 260 km² (S_{amont}) alors que la superficie totale (S_{aval}) est respectivement de 87,5 (Aurousseau, géoserveur GéoSAS <http://geowww.agrocampus-ouest.fr/web/>), 1806 et 353 km² (Guillaud et Bourriel 2005). Pour obtenir le débit à l'exutoire (Q_{aval}), une correction de la superficie totale du bassin versant aux exutoires est effectuée ainsi qu'une correction tenant compte d'une plus faible pluviométrie en zones côtières (Piriou comm. pers.). L'équation correspondante est la suivante: $Q_{\text{aval}} = Q_{\text{amont}} \cdot (1 + k \cdot (S_{\text{aval}} - S_{\text{amont}}) / S_{\text{amont}})$ avec $k = 0,8$

Les débits des cours d'eau sont indicatifs des apports d'eau douce dans la zone de développement d'*A. minutum* et dans les zones de contamination des coquillages. Ils sont responsables de l'enrichissement en nutriments des estuaires (nitrate, phosphate et silicate), augmentent la stratification de l'eau (par apport d'eau dessalée) et modifient la courantologie de l'estuaire.

Au printemps 2014, les débits de la Mignonne sont inférieurs à 2012 mais légèrement supérieurs à 2013 (figure 15). Les forts débits contribuent à apporter de plus grandes quantités de nitrate et phosphate du bassin versant, estimés à partir des données BMO (Brest Métropole Océane) de concentration sur la rivière de la Mignonne (27 mg/l de nitrate et 0.07 mg/l de phosphate en moyenne). Ces quantités de nutriments sont ensuite disponibles pour la croissance du phytoplancton, dont *A. minutum*. Ainsi en 2012, des débits importants en été ont probablement permis le développement massif d'*A. minutum*, et les débits plus faibles de 2014, un développement moindre. Ceci est néanmoins à nuancer avec l'abondance de l'ensemble du phytoplancton qui entre en compétition avec *A. minutum* pour l'assimilation des nutriments.

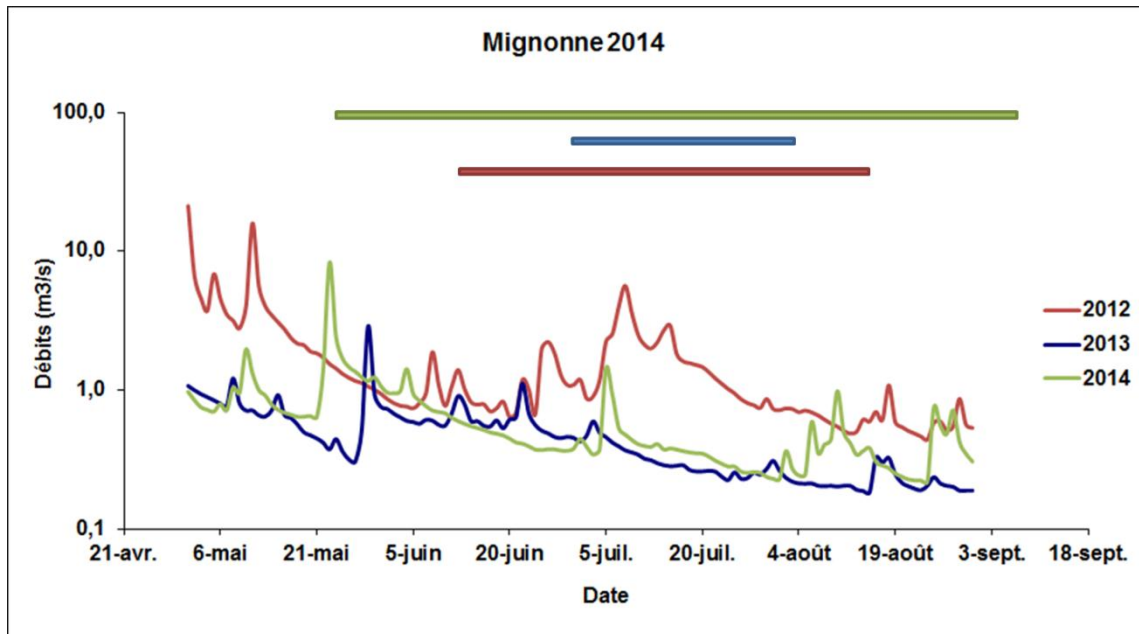


Figure 15. Débits de la Mignonne de mai à août 2012, 2013 et 2014

Suivi des nutriments

Les nutriments sont consommés par l'ensemble de la communauté phytoplanctonique incluant le picoplancton (< 3 μm), le nanoplancton (3- 10 μm), les diatomées, les dinoflagellés... *Alexandrium minutum* est une espèce consommatrice parmi d'autres. Les teneurs en nutriments sont indicatrices des conditions dans lesquelles la compétition avec le reste de la communauté phytoplanctonique se joue et des limitations nutritives éventuelles subies par ces espèces. Le phosphate (PO_4) et l'azote minéral (N_{min}) comprenant l'ammonium, le nitrite et le nitrate sont consommés par toutes les espèces micro-algales alors que le silicate ($\text{Si}(\text{OH})_4$) n'est consommé que par les diatomées. Les seuils considérés comme limitant pour la croissance phytoplanctonique sont pour l'azote minéral, le silicate et le phosphate respectivement de 0.1 μM , 2 μM et 0.05 μM .

En 2013 les teneurs en nutriments ont été élevées au début du suivi, au-dessus des seuils considérés comme limitant pour la croissance phytoplanctonique, correspondant à des masses d'eau relativement dessalées (salinité < 33) et à des débits de la Mignonne encore élevés (Figure 16). Puis les pics de concentration d'*A. minutum* observés ensuite correspondaient à des masses d'eau plus typiques des eaux de la rade (salinité > 33.5) dans lesquelles les teneurs en phosphate étaient à la limite du seuil limitant (0.05 μM). Le développement d'*A. minutum* a ainsi pu être limité par les teneurs en phosphate présentes en 2013. En 2014 en revanche, les teneurs en phosphate (> 0.15 μM) ont toujours été au-dessus du seuil pour des salinités similaires à celle de 2013. Ceci peut être expliqué par des débits plus élevés de la Mignonne ainsi qu'une température plus élevée dès la fin mai 2014 qui a pu favoriser une régénération plus importante du phosphate dans la colonne d'eau et à l'interface eau - sédiment.

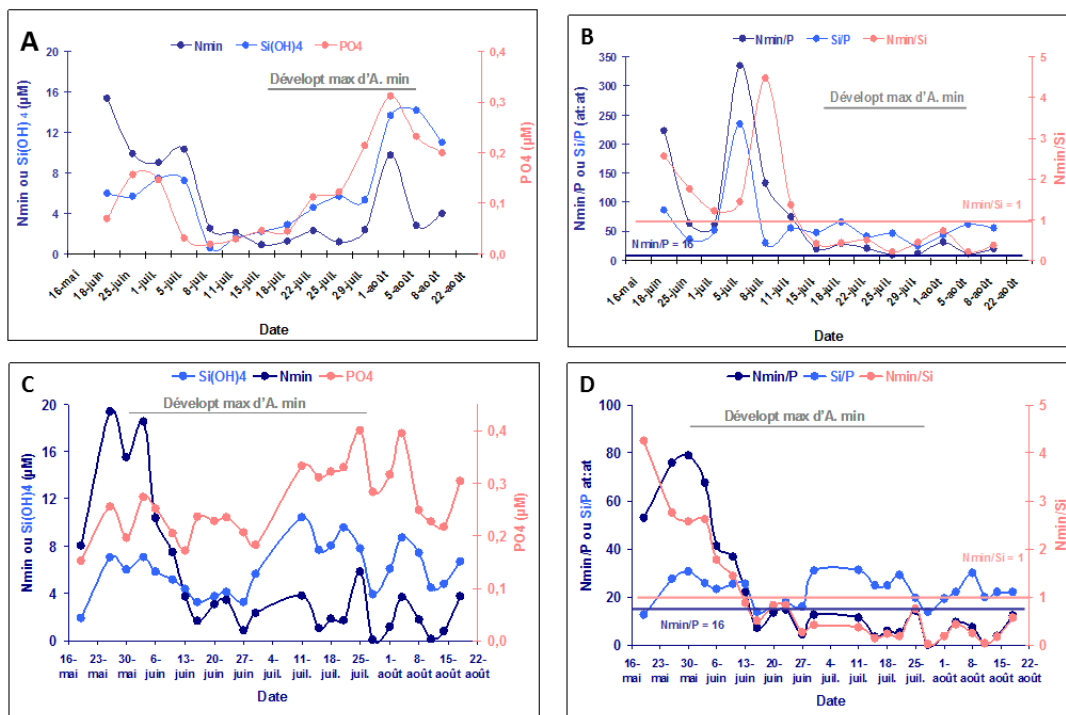


Figure 16. Evolution des sels nutritifs (azote minéral, phosphate et silicate) en 2013 et 2014 (A, C) et rapports molaires Nmin/P, Nmin/Si et Si/P (B, D) au point Rivière de Daoulas

Les rapports molaires des éléments nutritifs N/P/Si donnent aussi une indication de l'élément limitant la croissance des microalgues. En effet, en milieu marin non modifié par les activités humaines, le rapport N/P et N/Si est de 16/1 et 1/1 respectivement. Les microalgues assimilent de manière optimale les nutriments dans une eau de mer présentant ces ratios. En 2013, les rapports Nmin/P supérieurs à 16 sur toute la période montrent un excès d'azote minéral sous forme de nitrate essentiellement et une limitation de la croissance phytoplanctonique par le phosphate. En 2014, les rapports Nmin/P sont inférieurs à 16 à partir de mi-juin. Les teneurs en Nmin n'étant pas en dessous du seuil limitant, les faibles rapports Nmin/P reflètent plutôt une régénération supérieure du phosphate par rapport à l'azote minéral.

Coefficients de Marée

Les coefficients de marée sont un indicateur du mélange des masses d'eau. De forts coefficients entraînent de plus forts courants de marée et un mélange plus grand des eaux estuariennes.

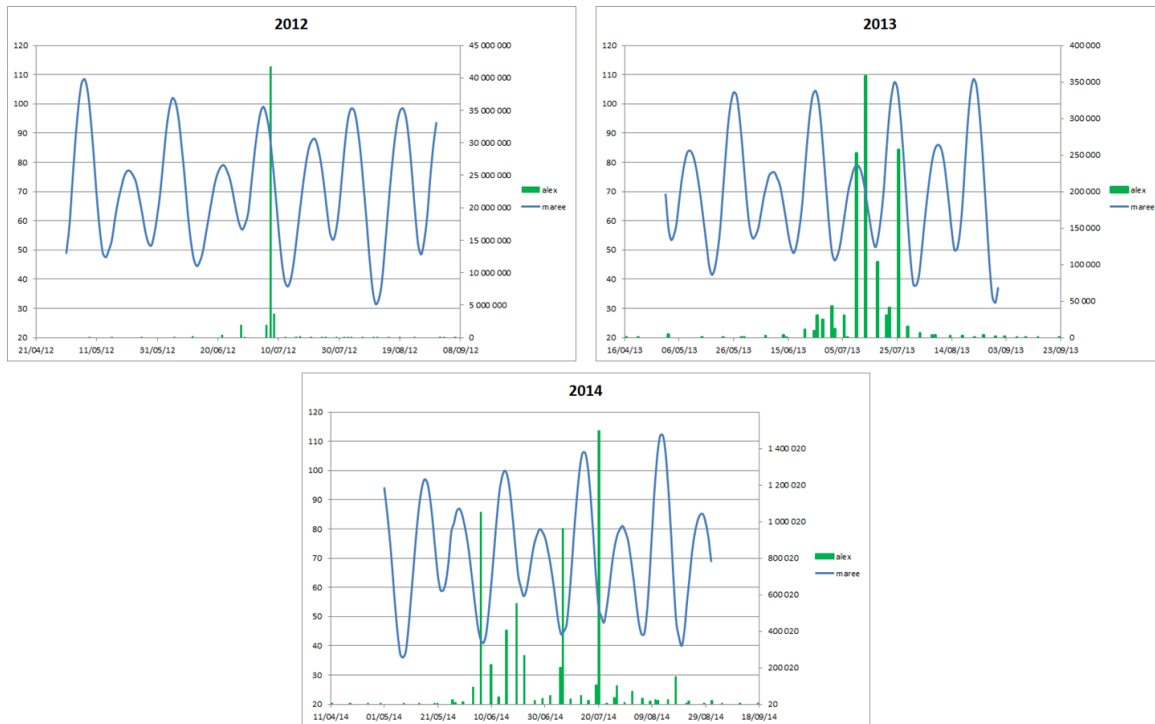


Figure 17. Coefficients de marée et Maximas d'abondance d'*Alexandrium minutum* (données Rephy, Daouex et Vélyger) en 2012, 2013 et 2014 dans l'estuaire de Daoulas aux points « Rivière de Daoulas » et « Pointe du château ».

Le suivi 2014 (figure 17) permet de bien repérer la succession des blooms et la coïncidence de chaque pic avec des mortes eaux (petits coefficients de marée). Ceci était déjà visible en 2012 et 2013 mais de manière moins nette (notamment 2012 car l'échantillonnage s'est mis en place tardivement). De manière plus générale les blooms se développent pour des coefficients inférieurs à 80 lorsque les coefficients diminuent..

On retrouve ce schéma en estuaire de Penzé et en baie de Cork, où le démarrage des blooms se fait toujours par marée de morte eau. Ceci s'explique par de plus faibles courants de marée qui permettent au bloom de se maintenir dans la zone optimale de développement, ici en fond d'estuaire, lors des petites marées.

3.2 Facteurs hydrodynamiques

Le modèle Mars 3D de la rade de Brest à 50 m (www.previmer.org) fournit les courants, les niveaux de marée et la température de l'eau. Le forçage météorologique provient du modèle AROME de Météo-France et les débits temps-réel des rivières sont pris en compte (Mignonne, Elorn et Aulne). Ce modèle a été exploité pour les simulations réalisées en temps différé.

Le logiciel ICTHYOP (Lett et al 2008), développé par l'IRD et cofinancé par l'Ifremer (projet PREVIMER <http://www.previmer.org/ichthyop>), est un outil de transport lagrangien pour la modélisation des trajectoires de particules. Ce logiciel est exploité pour modéliser la trajectoire des blooms d'*A. minutum*. Les particules fictives sont lâchées ponctuellement à l'endroit et au moment où le bloom est détecté (seuil de 10 000 cellules/l dépassé), puis elles sont transportées grâce aux courants modélisés. Les cartes générées permettent de suivre l'évolution des positions de ces particules.

Concernant le paramétrage d'ICTHYOP, le nombre de particules lâchées a été fixé à 1000, sur un rayon de 100 m et une épaisseur d'1 m. Ces particules sont passives (aucun paramètre biologique n'a été activé, comme le recrutement, la croissance ou la mortalité). Lorsqu'elles arrivent à la côte, elles

sont replacées en mer et ne s'échouent donc pas. Les particules relâchées sont virtuelles, et permettent de suivre le transport du bloom. Le nombre de particules, fixé de manière arbitraire, ne correspond pas nécessairement au nombre de cellules par litre ; dans cette étude, il a été fixé à 1000 particules fictives nombre optimal pour suivre l'évolution à l'échelle de la rade de Brest.

En 2014, plusieurs sources de lâchers ont été considérées, basées sur le suivi des kystes et l'échantillonnage spatial de juin 2014, soit aux points Rivière de Daoulas, Passage, estuaires du Camfrout et du Faou. Les particules ont été lâchées au 1^{er} juin.

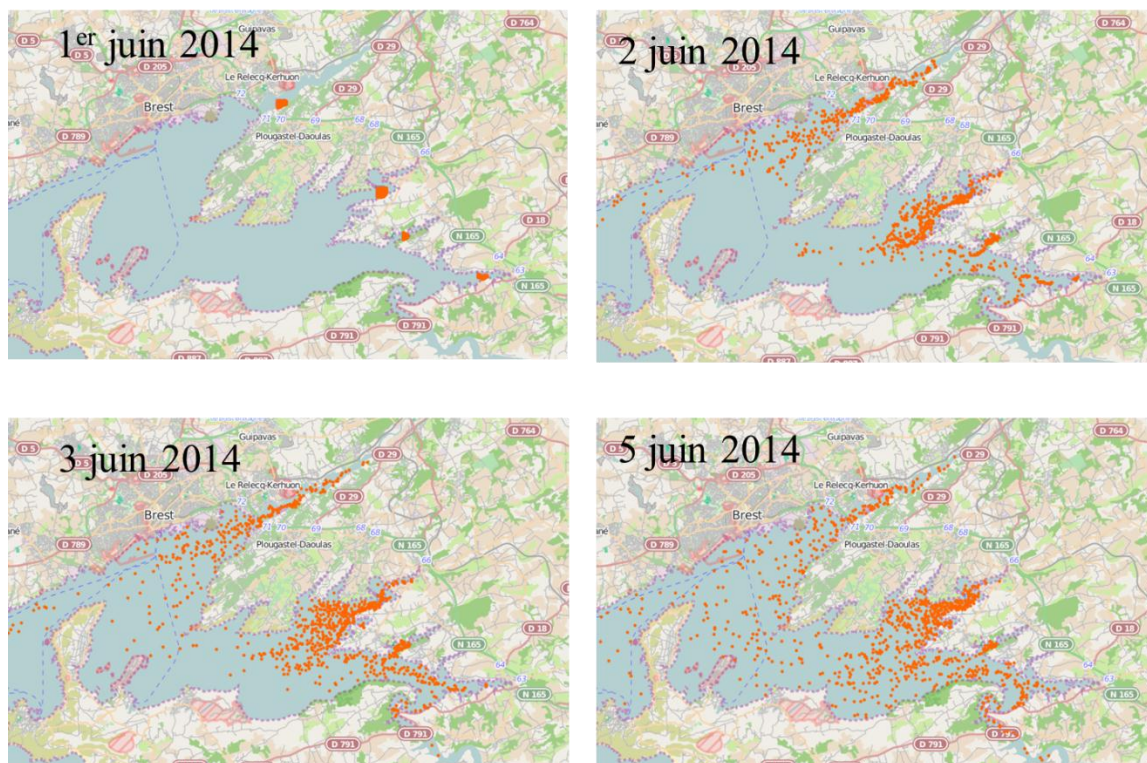


Figure 18. Simulation des trajectoires des particules d'*Alexandrium minutum*, lâchées au 1^{er} juin aux 4 points sources, Passage, Rivière de Daoulas, Camfrout et Faou

Les particules lâchées au Passage sortent rapidement de l'estuaire puis de la rade et ce dès le deuxième jour (figure 18). Les particules des estuaires du fond de rade restent un peu plus longtemps confinées au sein des estuaires. Elles remontent l'Aulne dès le deuxième jour. Dès 5 jours la rade entière est contaminée par les particules d'*A. minutum*.

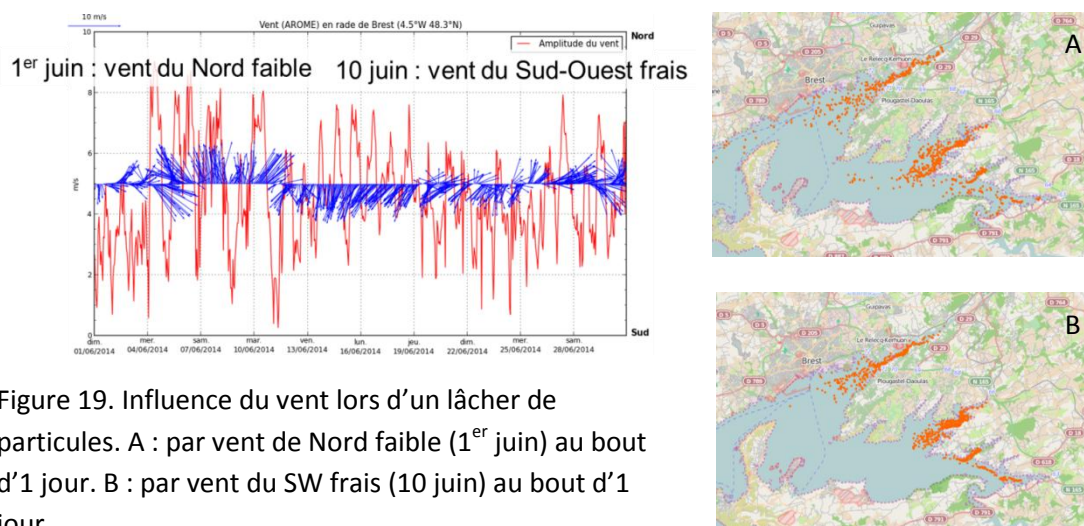


Figure 19. Influence du vent lors d'un lâcher de particules. A : par vent de Nord faible (1^{er} juin) au bout d'1 jour. B : par vent du SW frais (10 juin) au bout d'1 jour

Le vent a une influence sur la distribution des particules au premier jour, un vent de sud-ouest favorisant la rétention des particules d'*A. minutum* dans les estuaires du fond de rade (figure 19). Mais rapidement au bout de quelques jours les distributions redeviennent identiques.

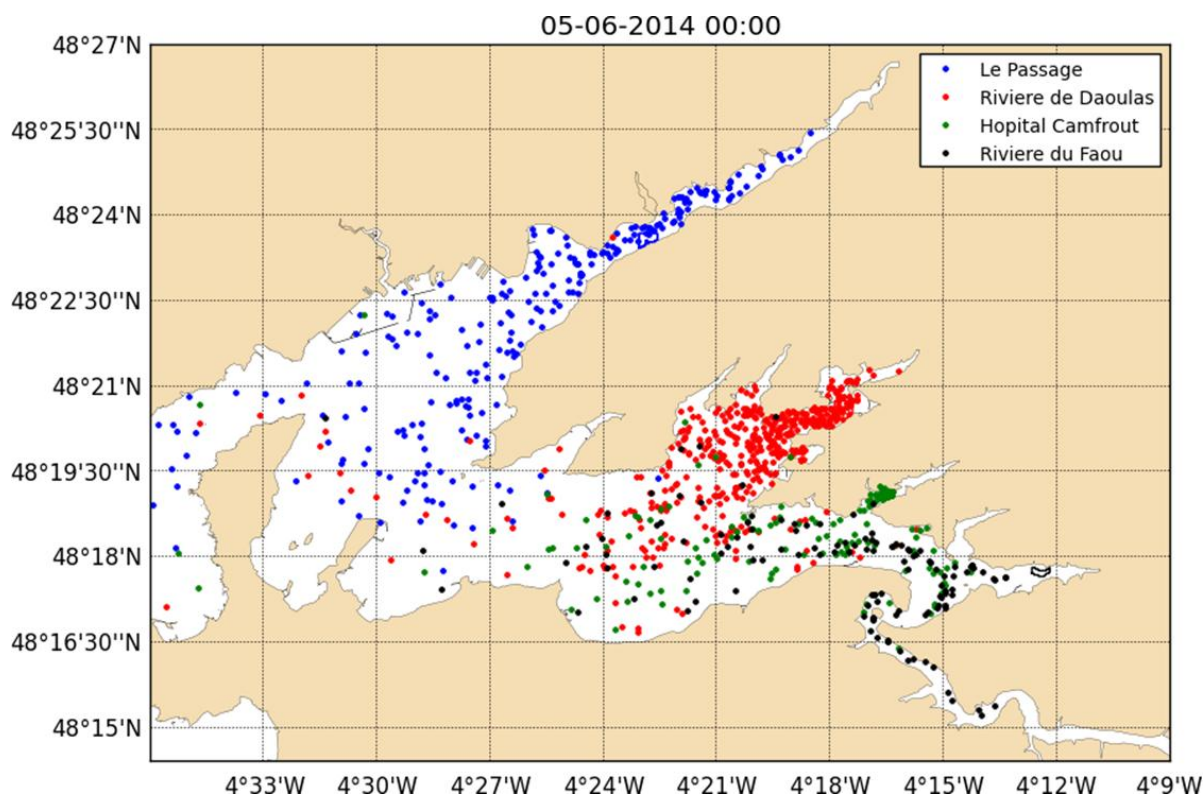


Figure 20. Trajectoire de chaque source d'*A. minutum* au bout de 4 jours de simulation.

Il est possible de marquer l'origine de chaque source dans le modèle. On constate alors (figure 20) que les *A. minutum* en provenance du Passage (Elorn) se répartissent dans la rade ouest et sortent rapidement du goulet. Peu de cellules viennent contaminer le secteur oriental de la rade. Inversement les *A. minutum* en provenance des estuaires du fond de rade ne remontent qu'exceptionnellement vers l'Elorn. Cette simulation permet d'étayer l'hypothèse que plusieurs sources de bloom sont nécessaires pour observer les répartitions d'*Alexandrium minutum* de 2012, 2013 et 2014. Il n'existe pas un seul foyer mais bien plusieurs, comme l'a montré aussi la présence de kystes dans toute la rade. Seule une source au niveau du secteur Elorn peut expliquer les efflorescences dans cette partie de la rade.

Le Sillon des Anglais, n'est pas considéré ici comme une source mais est néanmoins rapidement contaminé par les *A. minutum* en provenance du Faou, du Camfrout et aussi de la Baie de Daoulas.

Une étude génétique des *A. minutum* prélevés lors de l'échantillonnage spatial de juin 2014 pourra peut-être apporter de nouvelles informations sur la ressemblance entre populations des différents secteurs de la rade de Brest (travail en cours).

3.3 *A. minutum* au sein de la diversité des microalgues

Communautés microphytoplanctoniques

La flore totale du microphytoplancton (> 20µm) est comptée toutes les semaines à la Pointe du château (programme Velyger). Ces identifications et dénombrement sont présentés entre les mois de mai et septembre pour les années 2012, 2013 et 2014 (figure 21).

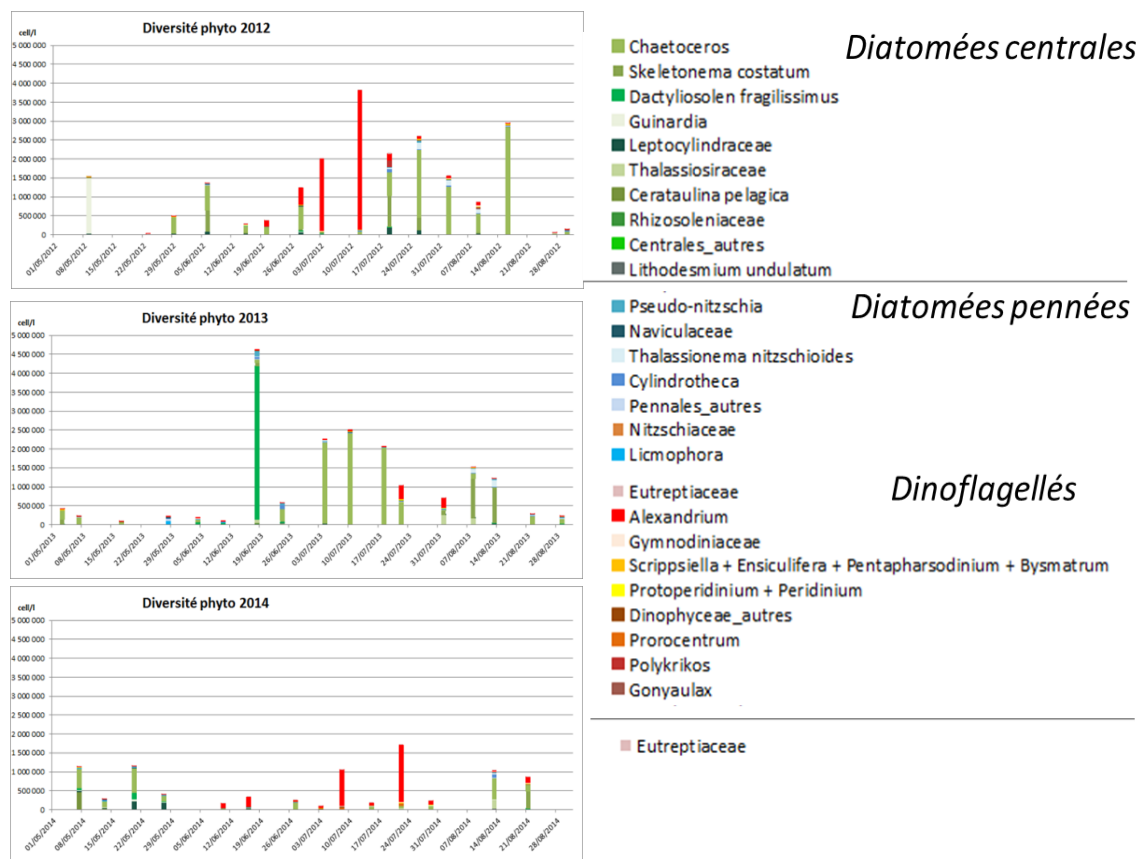


Figure 21. Abondances des grands groupes microphytoplanctoniques à la Pointe du Château en 2012, 2013 et 2014 (données Velyger)

Pour les trois années, on retrouve la dominance des diatomées centrales mais aussi d'*A. minutum*, représentant dominant du groupe des dinoflagellés. En 2012 et en 2014, *A. minutum* a largement dominé la communauté microphytoplanctonique, avec une plus grande abondance en 2012 et sur une plus grande période en 2014. Nous pouvons également noter une moindre abondance des diatomées en 2014

Diversité phytoplanctonique totale

La communauté micro-phytoplactonique, qui peut être identifiée et dénombrée au microscope optique ne représente qu'une fraction (plus ou moins importante) de la communauté. De façon à suivre la dynamique de l'ensemble de la communauté phytoplanctonique associée aux efflorescences à *A. minutum*, y compris les espèces nano (entre 3 et 20 µm) et pico-phytoplanctoniques (<3µm) de l'eau de mer a été filtrée en série sur filtres de 20, 3, et 0.2 µm, lors de chaque sortie bi-hebdomadaire de Daoulex. L'ADN total a été extrait à partir de ces filtres, puis une région de l'ADN utilisé comme « code barre » génétique pour l'identification des espèces (région V4 ou V9 de la petite sous unité de l'ADN ribosomal) a été amplifié par PCR. Ces produits PCR seront prochainement séquencés, puis les séquences confrontées à une base de données de référence (PR2, <http://ssu-rna.org/>). Cette approche, dite de meta-barcoding, permettra ainsi d'identifier les espèces associées à *A. minutum* au cours des efflorescences.

Daoulex a mis en évidence l'importance de la température de l'eau pour le démarrage du bloom. 2014 est une année où les températures de l'eau ont été plus chaudes au printemps ce qui coïncide avec un démarrage beaucoup plus précoce dès mi-mai du bloom

Les apports de nutriments par la rivière Mignonne semblent aussi être un facteur non négligeable, 2014 se situant entre les forts débits de 2012 et les débits plus faibles de 2013. L'intensité du bloom d'*A. minutum* présente cette même différence interannuelle.

Les blooms d'*A. minutum* présentent des maxima pour les faibles coefficients de marée, c'est-à-dire lorsque les courants sont plus faibles et permettent un maintien du bloom dans les fonds d'estuaires, plus favorables à la croissance d'*A. minutum*.

L'hydrodynamique de la rade seule ne peut expliquer la contamination de l'ensemble de la rade et notamment du secteur Elorn. Il s'agit vraisemblablement de plusieurs foyers de germination et de développement, qui ensuite vont contaminer à de plus faibles abondances le reste de la rade.

Alexandrium minutum n'est qu'une espèce parmi l'ensemble de la communauté microphytoplanctonique mais elle peut devenir dominante, comme en 2012 et 2014 lorsque les conditions sont favorables à sa croissance.

4 Diversité intra-spécifique

4.1 Séquençage des ARN messager : Diversité génétique et physiologie moléculaire

Les efflorescences phytoplanctoniques, et notamment à *A. minutum*, sont caractérisées par des tailles de populations gigantesques. A titre d'exemple, une efflorescence à *A. minutum* relativement modeste qui serait contenue dans un volume de 100m*100m sur 1m de profondeur (volume pouvant être très largement contenu dans la baie suivie dans le cadre de cette étude) avec une densité de 10 000 cellules par litre correspondrait à une population de 100 milliards d'individus. Le niveau de diversité intra-spécifique au sein de telles populations peut avoir des conséquences extrêmement importantes sur la dynamique des efflorescences. Si les populations sont composées d'individus essentiellement clonaux (comme attendu en cas d'initiation à partir d'un faible nombre de kystes), elles vont réagir de façon très homogène et potentiellement très rapide à une modification environnementale. A l'inverse si les populations sont composées d'individus très divers, cette diversité va permettre de tamponner l'impact des variations environnementales. Pour illustrer cette différence nous pouvons penser à l'impact que le niveau de diversité intra-spécifique peut avoir sur la fenêtre de temps favorable à la germination des kystes, à une croissance maximale, ou sur l'effet d'une attaque parasitaire.

Jusqu'à très récemment, le niveau de diversité génétique intra-spécifique pour des espèces « non modèle » n'était accessible que pour quelques régions génétiques connues pour avoir un intérêt taxinomique (ARN ribosomiaux) ou le développement de quelques marqueurs génétiques dédiés (microsatellites, voir ci-dessus). Le développement de nouvelles technologies de séquençage de l'ADN à partir des années 2005-2006 rend désormais envisageable l'étude de la diversité génétique intra-spécifique à l'échelle du génome entier pour les espèces non-modèles. Comme première approche pour caractériser la diversité génétique intra-spécifique d'*A. minutum* au sein d'une efflorescence, mais aussi entre efflorescences, nous avons sélectionné 18 souches (une souche correspond à une cellule isolée à partir du milieu naturel et se reproduisant de manière clonale dans un milieu de culture au laboratoire) d'*A. minutum* (figure 22).

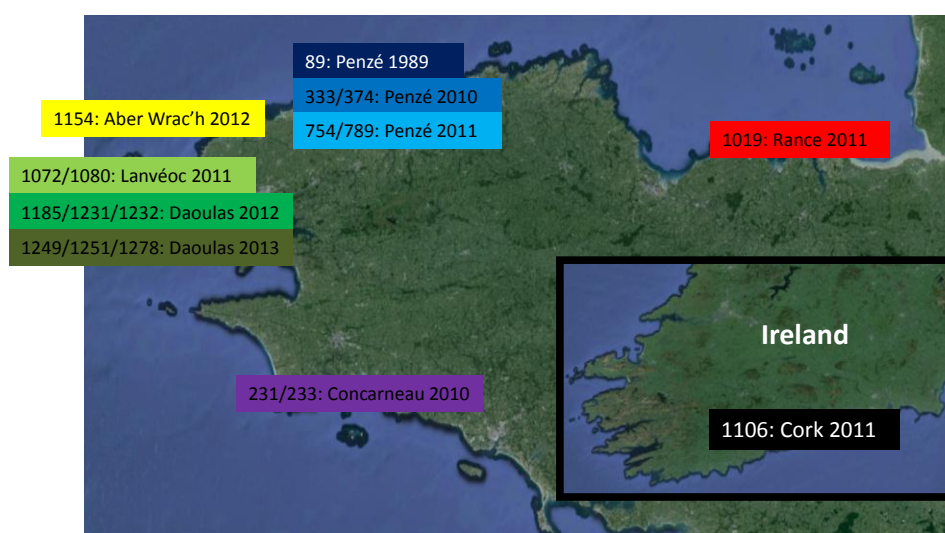


Figure 22: Carte indiquant le lieu et l'année d'origine des souches séquencées. Les identifiants des souches sont les chiffres précédents les « : ». Si plusieurs souches analysées ont été isolées dans un même lieu au cours d'une même année, leurs identifiants sont séparés par « / ». Le code couleur est repris sur la figure 23.

Nous avons séquencé non pas le génome complet de ces souches (qui est extrêmement complexe), mais la fraction du génome utilisée dans une condition donnée (ARNm, i.e. le transcriptome), soit plus de 150 000 régions du génome d'*A. minutum* correspondant une longueur totale de plus de 116 000 000 de bases (une base correspond à un des quatre nucléotides constituant l'ADN (A, C, T ou G)). En comparant la séquence de ces régions pour les 18 souches, ce sont plus de 1 400 000 sites variables qui ont été identifiés, soit 1 site variable toutes les 80 bases environ. Seul ce rapport de 1/80 n'est peut-être pas très parlant. Par contre, la comparaison avec le niveau de diversité révélé au sein de l'espèce humaine suite au séquençage de plus de 1000 humains, soit 1 site variable toutes les 520 bases (1000 genome project 2012) nous montre très clairement qu'*A. minutum* est une espèce très variable génétiquement.

Ces 1 400 000 de sites variables ont été utilisés pour reconstruire les relations de parentés entre les 18 souches. Deux groupes (un de 15 souches et l'autre de 3 souches) sont ainsi mis en évidence (figure 23).

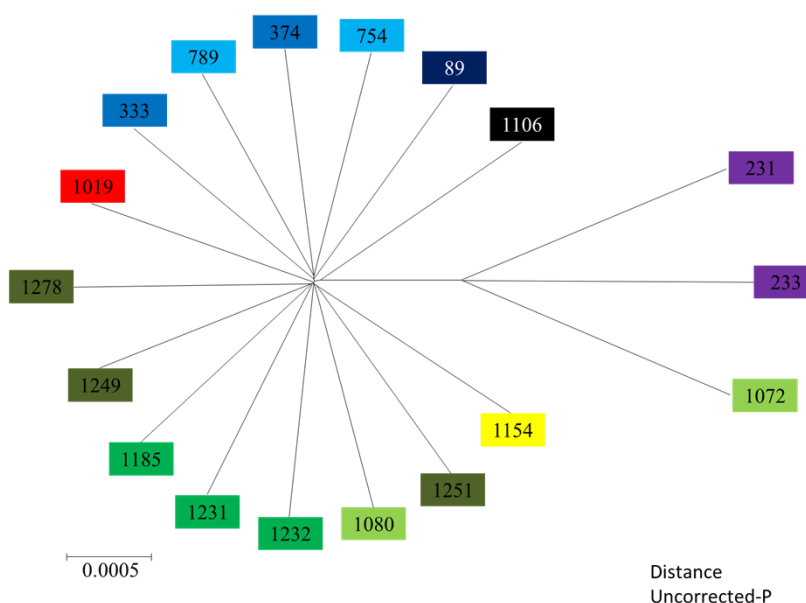


Figure 23 : Arbre de distances non enraciné représentant les relations de parentés entre les différentes souches séquencées. Les longueurs des branches sont proportionnelles aux distances génétiques séparant les souches.

Au sein du groupe de 15 souches, les différentes souches sont toutes quasiment aussi éloignées génétiquement les unes des autres. Ce sont entre 320 000 et 340 000 sites qui diffèrent lorsque l'on compare les souches deux à deux. Deux souches isolées au même endroit le même jour (souches 1231 et 1232 isolées à Daoulas en 2012 par exemple) sont ainsi très divergentes génétiquement et tout aussi divergentes d'une troisième souche isolée en un autre lieu une autre année (par exemple de la souche 789 isolée en Penzé en 2011). Ces résultats indiquent très clairement, que loin d'être constitués d'organismes clonaux, les efflorescences à *A. minutum* sont composées d'individus très divers génétiquement.

Perspectives

Le travail présenté ci-dessus met en évidence un très haut niveau de divergence génétique entre souches d'*A. minutum*. Cependant le nombre de souches séquencées (de 1 à 3 par population) rend impossible toute comparaison de populations. La suite du travail va consister à analyser les fréquences alléliques à l'échelle du transcriptome entier (transcriptome de référence généré au cours de l'étude ci-dessus) en séquençant directement les ARNm eucaryotes extraits à partir de filtres de 20µm et présents dans des volumes d'eau de mer allant de 2 à 7 litres prélevés en 2013 et

2014 au cours des sorties bi-hebdomadaires du projet Daoulex. Cette approche permet d'obtenir des données de séquençage sur des échantillons contenant de quelques dizaines de milliers à plusieurs millions de cellules d'*A. minutum* (selon la densité de cellules dans le milieu), sans passer par les étapes très consommatrices en temps d'isolement et de mise en cultures des souches. Elle permet en outre de s'intéresser à la dynamique de la diversité génétique au sein des populations en considérant plusieurs centaines de milliers de marqueurs génétiques. Ce type d'approche, qui tire partie des avancées récentes en termes de séquençage à haut débit et permet de s'affranchir des limites en termes de nombres de marqueurs génétiques utilisés et d'individus échantillonnés, vient en complément des approches de génétique des populations classiques (voir ci-dessous).

En plus d'apporter des informations sur la diversité génétique, le séquençage des ARNm apporte une information fonctionnelle. En effet, les ARNm reflètent directement la fraction du génome utilisée à un moment donné pour les besoins physiologiques (croissance, photosynthèse, reproduction sexuée, besoins nutritionnels...) des cellules. En identifiant les types de gènes exprimés et leurs niveaux d'expression à différents moments des efflorescences, le séquençage des ARNm permet donc de s'intéresser à la dynamique physiologique des efflorescences.

Un projet de thèse vient d'être déposé pour analyser à la fois en termes de diversité et de physiologie moléculaire la dynamique des efflorescences à *A. minutum*.

4.2 Diversité au niveau populationnel

Pour caractériser la divergence génétique entre les efflorescences ayant eu lieu en Bretagne dans les années 2010 et 2013, celles-ci ont été échantillonnées, en particulier les efflorescences en rade de Brest (Daoulas) en 2012 et 2013 (figure 24).

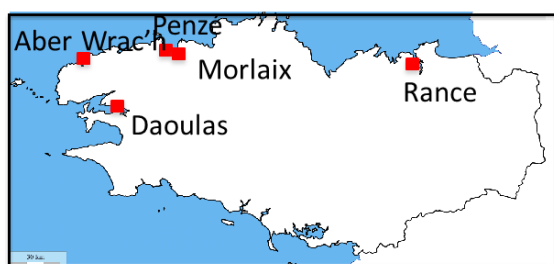


Figure 24. Situation géographique des différents sites d'échantillonnage. Penzé (PZ), Morlaix (ML), Rance (RC), Daoulas (DA), Aber Wrac'h (AW).

Les souches ont été isolées, puis génotypées à l'aide de 12 marqueurs microsatellites (Nagai et al. 2006). Un total de 346 souches, correspond à 8 années et/ou sites différents, ont été isolées (souches monoclonales). L'identité de l'ensemble de ces souches a été validée par le séquençage de la région intergénique de l'opéron ribosomique (ITS1, 5.8S, ITS2). Lorsque cela a été possible, les efflorescences ont été échantillonnées à différentes périodes (début, milieu et fin d'épisode, Tableau 1). Cette approche met également en évidence une très forte diversité génétique entre souches (aucune des 346 souches étudiées ne présente le même génotype pour les 12 marqueurs). Les analyses présentées ci-dessous tentent de déterminer si les fréquences des différents allèles varient d'une efflorescence à l'autre (dans l'espace et dans le temps), ce qui indiquerait des flux de gènes limités entre ces événements.

Table 1. Caractéristique des échantillons. Les codes respectifs de ces échantillons PZ, RC, ML, AW et DA correspondent aux localités : Penzé, Rance, Morlaix, Aber Wrac'h, et Daoulas, les chiffres 10, 11, 12 et 13 correspondent aux années : 2010, 2011, 2012 et 2013 et enfin, les lettres A, B, C et D correspondent à une représentation chronologique des efflorescences (période d'efflorescence).

| Sites / année | Date d'échantillonnage | Code des échantillons | Nb de souches génotypées |
|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Penzé / 2010 | 02 Juin | PZ10A | 24 |
| | 30 Juin | PZ10D | 09 |
| | 01 Juil. | | 08 |
| Penzé / 2011 | 01 Juin | PZ11A | 19 |
| | 15 Juin | PZ11B | 14 |
| | 17 Juin | | 15 |
| | 22 Juin | PZ11C | 24 |
| | 11 Juil. | PZ11D | 18 |
| Rance / 2010 | 02 Juin | RC10A | 40 |
| Rance / 2011 | 09 Mai | RC11A | 15 |
| | 23 Mai | RC11B | 25 |
| | 27 Mai | RC11C | 25 |
| | 03 Juin | RC11D | 10 |
| | 05 Juin | | 19 |
| Morlaix / 2010 | 28 juil. | ML10 | 10 |
| Aber Wrac'h / 2012 | 24 Août | AW12A | 14 |
| | 31 Août | AW12B | 16 |
| Daoulas 2012 | 13 juil. | DA12 | 8 |
| Daoulas 2013 | 22 Juil. | DA13A | 21 |
| | 29 Juil. | DA13B | 12 |
| Total | | | 346 |

Différenciation génétique spatio-temporelle

L'ACP réalisée sur l'ensemble du jeu de données spatio-temporel dans les estuaires bretons montre que les deux premiers axes sont significatifs et représentent plus de 32% de la variation (figure 25). Le premier axe représente 18,62% avec un F_{ST} de 0.017 (paramètre indicateur de la divergence entre populations). Cet axe sépare les échantillons de Daoulas (DA13_A et DA13B) de tous les autres échantillons (Fig. 25). Cet axe montre également la particularité des échantillons de 2010 en début d'efflorescence dans les estuaires de Penzé et Rance (PZ10A et RC10A) qui sont identiques et différenciés des autres échantillons bretons. L'axe 2 qui représente 14,20% de la variance avec un F_{ST} de 0,013, sépare le groupe Aber Wrac'h (AW12_A ; AW12_B) et Daoulas (DA13_A ; DA13B) de tous les autres échantillons (figure 25). Ces résultats montrent qu'il existe une différenciation spatiale marquée entre populations. Cela suggère que les flux de gènes sont limités.

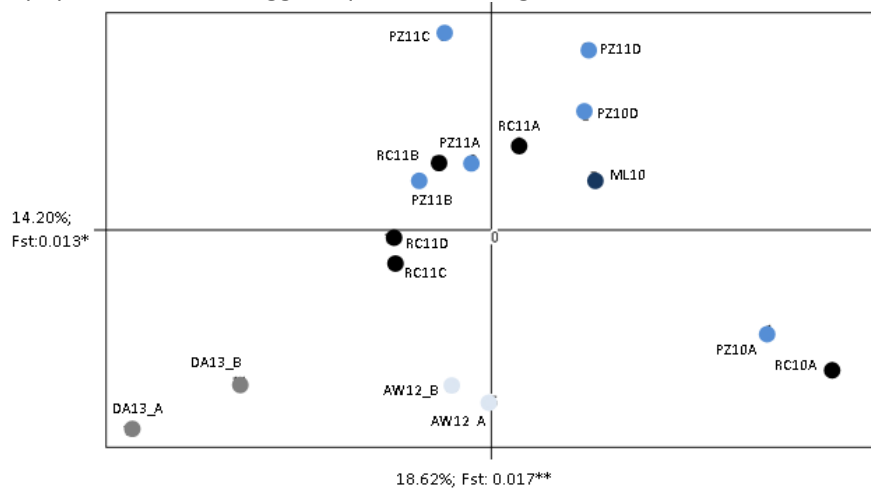


Figure 25. Analyse en composante principale basée sur les fréquences alléliques des 16 échantillons spatio-temporels d'*A. minutum* sur les côtes bretonnes entre 2010 et 2013. Cette ACP montre une différenciation globale significative de l'ordre ($F_{ST} = 0,093$; $P = 0,0001$). Les deux axes de cet ACP sont significatifs avec l'axe 1 qui explique 18% de la variance ($F_{ST} = 0,017$ $P = 0,013$) et l'axe 2 qui explique 14% de la variance ($F_{ST} = 0,013$, $P=0,004$).

Différenciations génétiques spatiales entre estuaires bretons : approche multivariée

Nous avons ensuite réunis les échantillons selon leurs origines géographiques (cinq sites au total : Penzé, Morlaix, Rance, Daoulas et Aber Wrac'h). Les échantillons issus des estuaires de Penzé et Rance en début des efflorescences de 2010 ont été écartés de ce jeu de données à cause de leur différenciation très marquée par rapport à tous les autres échantillons (voir étude précédente).

Nous avons analysé l'ensemble de ces données spatiales de la Bretagne par une approche multivariée (DAPC implémentée dans le package R d'ADEGENET) sans déterminer le nombre de groupes via le Bayesian Information Criterion (BIC). En d'autres termes, le nombre de groupes est équivalent au nombre de sites. Tandis qu'une ACP classique va résumer l'ensemble de la variabilité entre individus, qui inclut à la fois la divergence entre groupe (structure de la variabilité génétique) et la variation au sein des groupes (variabilité génétique), l'analyse discriminante va privilégier les relations entre différents groupes en se focalisant sur la variabilité entre groupes et négligeant celle au sein des groupes. En effet, cette méthode multivariée définit un modèle dans lequel la variabilité génétique est partitionnée en groupes et au sein des individus composant ces groupes et donne des variables synthétiques qui maximisent la première tout en minimisant la seconde. En d'autres termes, la DAPC va essayer de résumer la différenciation génétique entre groupes en minimisant les variations au sein de ces groupes. Quel que soit l'axe visionné de cette analyse, les échantillons de Penzé (1), de Morlaix (2) et de Rance (3) sont les plus proches génétiquement avec une proximité plus importante entre Penzé et Morlaix (figure 26). Sur le premier axe (horizontal), cette figure montre nettement la différence qui oppose les échantillons de l'Aber Wrac'h à tous les autres échantillons bretons malgré une distance moindre par rapport aux échantillons de Daoulas. Le second axe confirme l'existence d'une différenciation génétique importante entre les échantillons récoltés en rade de Brest par rapport aux échantillons récoltés sur l'ensemble des autres sites bretons.

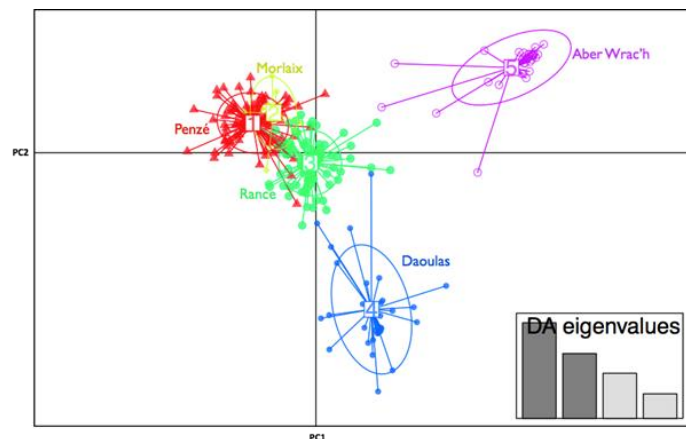


Figure 26. Représentation en nuage de points de l'analyse discriminante en composante principale (DAPC) faite sur les échantillons collectés en Bretagne. Cette figure montre les deux composantes principales de la DAPC utilisant le nombre de clusters équivalent au nombre total des échantillons spatiaux analysés (Penzé, Morlaix, Rance, Daoulas et Aber Wrac'h). Les groupes sont illustrés par les différentes couleurs et les inerties des ellipses, chacun des points représente un individu.

Conclusions

Contrairement à la phylogénie dont le but est de retracer l'histoire évolutive des lignées et des espèces au cours du temps, la génétique des populations s'intéresse plus particulièrement à l'histoire contemporaine des populations. Dans le cas d'*Alexandrium* dans le Nord-Ouest de la France, la génétique des populations devrait donc nous permettre de retracer l'histoire récente des

efflorescences. Notre analyse de la structure des populations d'*A. minutum* sur les côtes bretonnes montre que les souches prélevées en Penzé, Morlaix, Rance, Daoulas et Aber Wrac'h se répartissent en trois groupes génétiques distincts (Fig. 26). Le premier groupe correspond essentiellement aux clones isolés en Baie de Morlaix (Penzé – Morlaix) et Rance, le second groupe correspond principalement aux clones isolés dans l'estuaire de Daoulas et enfin le troisième groupe correspond aux clones isolés dans l'Aber Wrac'h. Les résultats obtenus en Baie de Morlaix quelle que soit l'année ou la saison de prélèvement soulignent que les sites de la Penzé et de Morlaix distant d'une dizaine de kilomètres sont connectés par des flux de gènes importants (Fig. 25). Par ailleurs, bien que l'ensemble des sites situés en Manche aient un système côtier original fortement influencé par un régime mégatidal de marée, la migration efficace d'*A. minutum* vers les autres estuaires semble être relativement restreinte. En effet, les souches conservent des caractéristiques génétiques bien marquées l'ensemble de ces sites quelle que soit la date d'isolement.

Nos résultats semblent démontrer que les efflorescences actuelles de cette microalgue toxique le long des côtes Bretonnes ne sont pas imputables à un seul événement de fondation, originaire de la Baie de Morlaix (premier lieu contaminé en Bretagne à la fin des années 80). En particulier, les récents événements qui se sont déclarés à Daoulas et dans l'Aber Wrac'h sont génétiquement différents des populations observées en Baie de Morlaix. Dans ces deux derniers cas, il pourrait donc s'agir de nouvelles introductions.

Perspectives :

* Ces résultats font l'objet d'une publication (manuscrit complet en cours de corrections) qui devrait être soumise avant la fin de l'année :

Dispersion and genetic differentiation of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* along the Brittany Coasts (France). A. Dia, L. Guillou, M. Valéro et C. Destombe

* Nous avons également sélectionné certaines souches appartenant à ces différentes populations afin d'obtenir les profils toxiques (collaboration avec le laboratoire Ifremer de Nantes, resp. Zouher Amzil). Le matériel nécessaire à cette étude a été envoyé au laboratoire de Nantes.

* L'ensemble des souches isolées sont maintenues vivantes au laboratoire de Roscoff, et resteront disponibles pour les partenaires du projet DAOULEX jusqu'à la fin de cette année (2014).

Le séquençage de l'ensemble des ARN messagers de souches d'*A. minutum* a mis en évidence une diversité intra-spécifique extrêmement importante à la fois entre souches isolées au cours d'efflorescences distinctes (dans l'espace et dans le temps), mais également au sein d'une même efflorescence. L'impact de cette diversité sur la dynamique des efflorescences reste méconnu.

Une approche de génétique des populations a pu mettre en évidence des différences de fréquences alléliques entre sites Bretons touchés par des efflorescences à *A. minutum*. Ceci indique que ces efflorescences se développent de manière indépendante, sans qu'il existe de forts flux de gènes entre sites.

5 Quelle est la toxicité des blooms d'*A. minutum* en rade de Brest ?

Dans le cadre du projet Daoulex, il était prévu de déterminer le profil toxinique durant le suivi estival du bloom d'*A. minutum*. Il s'agit de prélèvements bruts d'eau de mer réalisés à l'aide d'un filet à plancton afin d'avoir des échantillons concentrés en *A. minutum* pour l'analyse chimique des toxines paralysantes (PSP). Ces prélèvements et dosage ont eu lieu en 2013 (voir rapport d'avancement n°1). En 2014, la recherche de toxines PSP a été menée sur les échantillons prélevés durant la période 30 mai – 18 août 2014. Le contenu toxinique cellulaire est exprimé en pg de toxines PSP / cellule ainsi qu'en équivalent saxitoxine / cellule.

L'identification et la quantification des toxines paralysantes par analyse ont été réalisées par chromatographie liquide / détecteur par fluorescence (CL/FLD) (*van De Riet et al. 2009*). Les toxines paralysantes recherchées dans ces échantillons sont listées ci-dessous.

| Toxines Carbamates (les plus toxiques): | Toxines Décarbamoyles (de toxicité intermédiaire) | Toxines N-Sulfocarbamoyles (les moins toxiques) |
|---|--|--|
| la Saxitoxine (STX) | la Décarbamoyle Saxitoxine (dc-STX) | les Toxines "B" : B-1 (GTX-5) et B-2 (GTX-6) |
| la Néo-Saxitoxine (Néo-STX) | la Décarbamoyle Néo-Saxitoxine (dc-NéoSTX) | les Toxines "C" : C-1 , C-2 , C-3 , C-4 |
| les Gonyautoxines de 1 à 4 (GTXs) : GTX-1 , GTX-2 , GTX-3 , GTX-4 | les Décarbamoyles Gonyautoxines (dc-GTXs) : dc-GTX2, dc-GTX3 | |

Table 2 : Toxines recherchées dans les échantillons d'eau lors du bloom d'*A. minutum*

Les résultats 2014 montrent que :

- Il y a présence de toxines PSP dans tous les échantillons d'eau de mer prélevés sur la période de prolifération d'*A. minutum* : entre le 30 mai et 18 août 2014.
- Le profil toxinique, en particulier quantitatif exprimé en quantité de toxines par cellule, évolue en fonction du temps. Le pic de production toxinique se situe vers mi-juin, alors qu'en 2013 il l'était vers mi-juillet.
- Le profil toxinique est composé : i) principalement de toxines GTX-2,-3 ; C1,-2 présentent pratiquement pendant la durée du bloom ii) de dc-GTX-3 présente principalement en début de bloom, la 1^{ère} quinzaine de juin, à l'état de traces iii) de toxines STX ; dc-STX ; Néo-STX présentent principalement la 1^{ère} quinzaine de juin à des teneurs inférieures à 3%.
- En comparaison avec les données 2013, le profil toxinique était composé de GTX-3, GTX-2, C2, C1, C3, STX, dc-GTX-3 (traces). Concernant la présence du groupe STX, le constat 2014 est similaire à celui observé dans les échantillons d'*A. minutum* de l'été 2013 où la STX n'était présente qu'en début de bloom, en juillet, et avec un maximum de 2%. Pour 2013 et 2014, comme le maximum de la STX ne représente que 3% au maximum, il est probable que cette dernière soit présente ensuite à l'état de traces.

- Le profil toxinique est à exploiter en fonction des paramètres du milieu et des profils génétiques d'*A. minutum* (études en cours) afin de pouvoir expliquer la cause de la variation des toxines produites au cours du bloom (succession de souches ou changement de paramètres environnementaux).

| Date prélevement | Infos complémentaires | Profil Toxinique en pg éq STX di-HCl /cell | | | | | | | | |
|------------------|----------------------------------|--|-------|--------|---------|--------|------|------|------|---------------|
| | | dc-GTX3 | GTX3 | GTX2 | Néo-STX | dc-STX | STX | C1 | C2 | TOTAL |
| 30/05/2014 | Toxines + 2ml ac ac | <LD | 146.5 | 8.2 | <LD | <LD | <LD | <LD | 11.4 | 166 |
| 03/06/2014 | Toxines | <LD | 170.4 | 8.4 | <LD | 7.0 | 2.9 | 0.04 | 15.5 | 204 |
| 06/06/2014 | 1,5 ml | 0.7 | 400.7 | 20.0 | 8.0 | 12.4 | 10.4 | 0.2 | 44.9 | 497 |
| 10/06/2014 | Toxines | 1.1 | 704.5 | 51.3 | 7.4 | 9.3 | 6.7 | 0.3 | 63.9 | 845 |
| 13/06/2014 | Toxines culot + 1 ml ac. Ac. | <LQ | 224.0 | 15.6 | <LD | <LQ | <LQ | 0.1 | 23.0 | 263 |
| 16/06/2014 | Toxines culot + ac. Ac. | 1.7 | 930.9 | 31.3 | 103.0 | 31.3 | <LQ | 0.5 | 81.3 | 1180 |
| 20/06/2014 | Toxines | <LD | 177.5 | 1153.0 | <LD | <LD | <LQ | <LQ | 20.4 | 1351 |
| 23/06/2014 | Toxines culot 100 ml | <LD | 61.9 | 149.8 | <LD | <LD | <LD | <LQ | 7.7 | 219 |
| 27/06/2014 | Toxines culot | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LQ |
| 30/06/2014 | Toxines | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LQ |
| 11/07/2014 | Toxines | <LQ | 235.3 | 18.0 | <LD | <LD | <LD | <LQ | 32.0 | 285 |
| 15/07/2014 | Toxines | <LD | 283.8 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LQ | 35.9 | 320 |
| 18/07/2014 | 1 ml | <LD | 142.0 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | 16.9 | 159 |
| 21/07/2014 | Anse du Roz & Daoulex | <LD | 26.2 | 0.8 | <LD | <LD | <LD | 0.05 | 3.7 | 31 |
| 25/07/2014 | culot toxines | <LD | 139.9 | 36.8 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 16.7 | 193 |
| 28/07/2014 | | <LD | 136.8 | 16.5 | <LD | <LD | <LD | 0.3 | 26.0 | 180 |
| 01/08/2014 | | <LD | 46.8 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | 47 |
| 04/08/2014 | toxines | <LD | 232.2 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LQ | 34.3 | 266 |
| 08/08/2014 | filet [C] + 1ml ac. Ac. | <LD | 249.5 | 14.4 | <LD | <LD | <LQ | 0.3 | 41.6 | 306 |
| 11/08/2014 | [C] filet Ptopk + 2 ml d'ac. Ac. | <LD | 143.8 | 18.2 | <LD | <LD | <LD | <LQ | 8.0 | 170 |
| 14/08/2014 | [C] filet Ptopk | <LD | 53.8 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LQ | 54 |
| 18/08/2014 | | <LD | 61.9 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | 62 |

Table 3 : Résultat des analyses de toxines, profil toxinique en pg eq STX.cell-1 (Les 2 échantillons du 21/07/2014 (Anse du Roz & Daoulex) ont été regroupés par erreur et donc analysés comme un seul échantillon

| Date prélèvement | Infos complémentaires | Concentrations des toxines en pmol/cell | | | | | | | |
|---------------------|-------------------------------------|---|-------|-------|-------------|--------|-------|-------|-------|
| | | dc- GTX3 | GTX3 | GTX2 | Néo- STX | dc-STX | STX | C1 | C2 |
| 30/05/2014 | Toxines + 2ml ac ac | <LD | 0.656 | 0.055 | <LD | <LD | <LD | <LD | 0.307 |
| 03/06/2014 | Toxines | <LD | 0.763 | 0.056 | <LD | 0.019 | 0.008 | 0.018 | 0.416 |
| 06/06/2014 | 1,5 ml | 0.005 | 1.794 | 0.135 | 0.022 | 0.033 | 0.028 | 0.074 | 1.205 |
| 10/06/2014 | Toxines | 0.008 | 3.155 | 0.345 | 0.020 | 0.025 | 0.018 | 0.116 | 1.718 |
| 13/06/2014 | Toxines culot + 1 ml ac. Ac. | <LQ | 1.003 | 0.105 | <LD | <LQ | <LQ | 0.033 | 0.618 |
| 16/06/2014 | Toxines culot + ac. Ac. | 0.011 | 4.169 | 0.210 | 0.277 | 0.084 | <LQ | 0.211 | 2.185 |
| 20/06/2014 | Toxines | <LD | 0.795 | 7.744 | <LD | <LD | <LQ | <LQ | 0.549 |
| 23/06/2014 | Toxines culot 100 ml | <LD | 0.277 | 1.006 | <LD | <LD | <LD | <LQ | 0.207 |
| 27/06/2014 | Toxines culot | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ |
| 30/06/2014 | Toxines | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ |
| 11/07/2014 | Toxines | <LQ | 1.054 | 0.121 | <LD | <LD | <LD | <LQ | 0.860 |
| 15/07/2014 | Toxines | <LD | 1.271 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LQ | 0.964 |
| 18/07/2014 | 1 ml | <LD | 0.636 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | 0.453 |
| 21/07/2014 | Anse du Roz & Daoulex | <LD | 0.117 | 0.005 | <LD | <LD | <LD | 0.021 | 0.098 |
| 25/07/2014 | culot toxines | <LD | 0.626 | 0.247 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 0.450 |
| 28/07/2014 | | <LD | 0.612 | 0.111 | <LD | <LD | <LD | 0.144 | 0.699 |
| 01/08/2014 | | <LD | 0.210 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ |
| 04/08/2014 | toxines | <LD | 1.040 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LQ | 0.921 |
| 08/08/2014 | filet [C] + 1ml ac. Ac. | <LD | 1.117 | 0.096 | <LD | <LD | <LQ | 0.134 | 1.117 |
| 11/08/2014 | [C] filet Ptopk + 2 ml d'ac. Ac. | <LD | 0.644 | 0.122 | <LD | <LD | <LD | <LQ | 0.216 |
| 14/08/2014 | [C] filet Ptopk | <LD | 0.241 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LQ |
| 18/08/2014 | | <LD | 0.277 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ |

Table 4 : Résultat des analyses de toxines, concentrations en pmol.cell-1

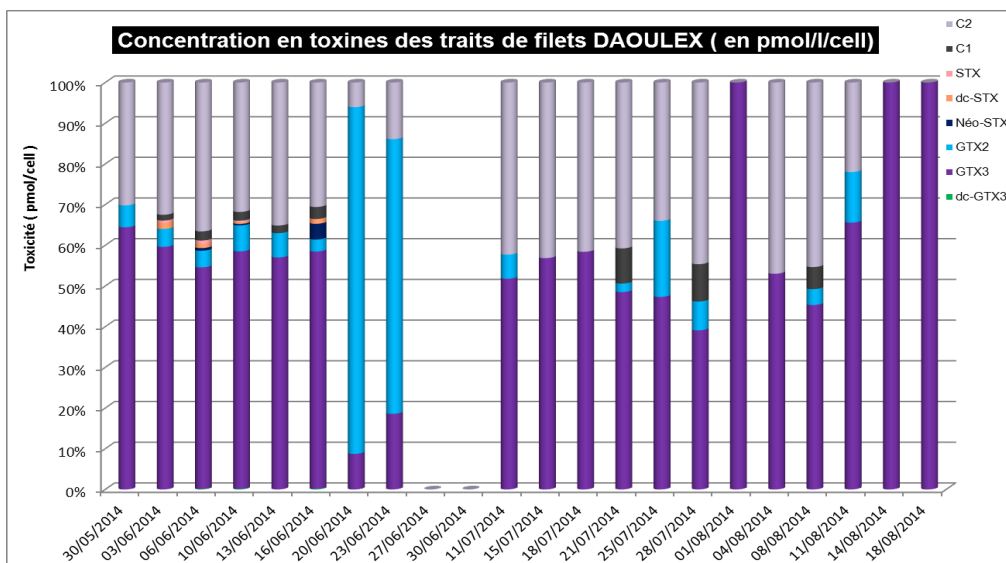
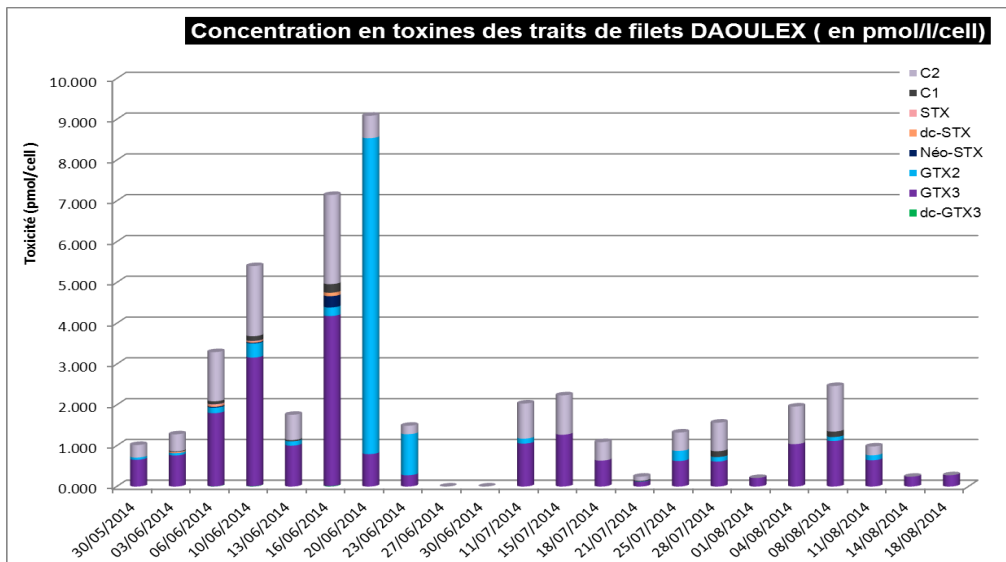
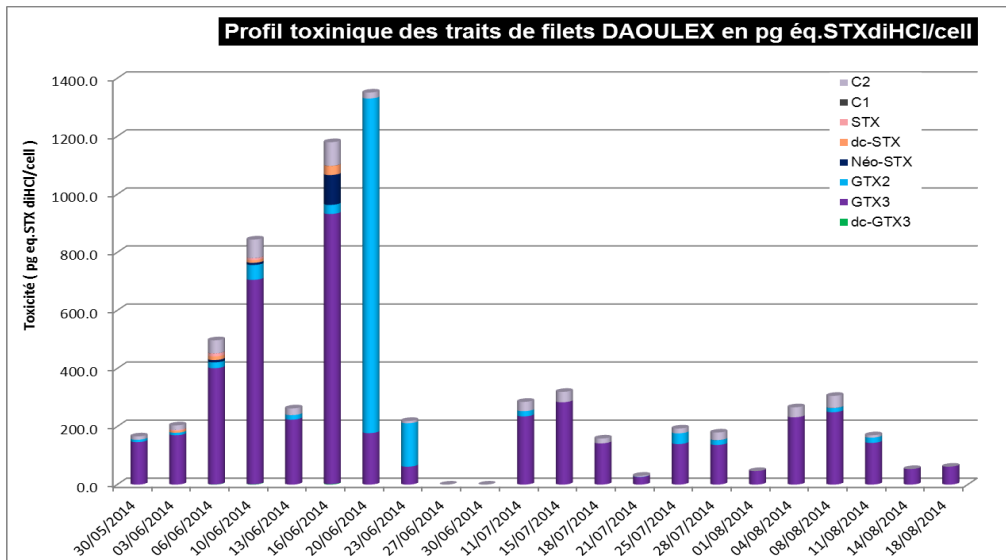


Figure 27. Résultats des analyses de toxines lors du suivi du bloom 2014 : profils toxiques et concentrations en valeur absolue et en %

6 La détection d'*A.minutum* par test bandelettes

Le projet Daoulex a permis de tester la capacité d'utiliser une méthode alternative aux comptages pour déterminer l'abondance d'*A. minutum*. Il s'agit du test bandelette.

La méthode LFIA (Lateral Flow Immunoassay) a été décrite pour la première fois dans les années 1960. Son application commerciale en tant que test diagnostic n'est apparue qu'au cours des années 1980. Elle est devenue un outil simple, rapide, robuste, fiable et utilisable par tous. Ceci explique qu'elle soit aujourd'hui aussi commune. C'est un système permettant de détecter la présence ou l'absence d'un analyte sans avoir besoin de matériel spécialisé ou coûteux.

Ces nouveaux tests d'alerte sont utilisés dans de nombreux divers secteurs d'activité, telles que la santé humaine et animale, l'agroalimentaire, mais aussi plus récemment pour la surveillance environnementale (Posthuma-Trumpie et al. 2009). Ces nouveaux outils de diagnostic sont utilisables sur le terrain par des non-spécialistes, ils évitent non seulement le transport des échantillons jusqu'au laboratoire mais permettent également d'obtenir rapidement le résultat de l'analyse. Cette dernière caractéristique est essentielle car elle diminue le délai entre le prélèvement de l'échantillon et la prise de décision en cas de contamination. Le Lateral Flow ImmunoAssay (LFIA) est une bandelette préfabriquée constituée classiquement de trois zones fixées ensemble sur un support plastique : une zone d'absorption, une zone de réaction et une zone de dépôt d'échantillon (Figure 28). Dans certains tests, une zone de dépôt du traceur est présente. Les traceurs (généralement des anticorps sur lesquels sont fixées des molécules permettant d'obtenir un signal colorimétrique, fluorescent, magnétique ou autre...) sont utilisés pour détecter et visualiser la présence de la molécule recherchée dans l'échantillon. La zone de réaction est constituée d'une membrane de nitrocellulose comportant deux lignes, la ligne test et la ligne contrôle. La ligne « test » est généralement constituée d'anticorps dirigés contre la molécule d'intérêt ou la cible recherchée. C'est le signal obtenu au niveau de cette ligne qui indiquera la présence ou non de la molécule à doser. La ligne « contrôle » contient des anticorps dirigés contre la molécule « traceur » et permet ainsi de s'assurer de la bonne réalisation du test.

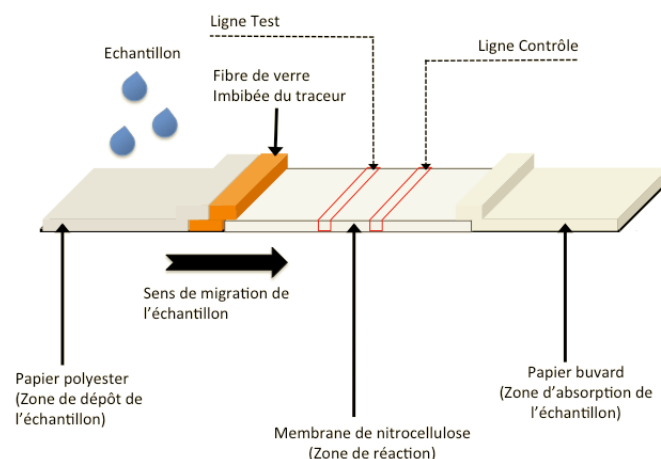


Figure 28. Représentation typique d'un test LFIA

Ce format de test de diagnostic est en plein essor et fait l'objet de nombreuses recherches et innovations. Les bio-marqueurs peuvent être des molécules toute sorte (protéine, gène, ...), la seule nécessité est de posséder un système de reconnaissance adéquate (anticorps, aptamères, sondes

nucléiques). Les tests LFIA sont extrêmement versatiles et les applications multiples. Leurs intérêts répondent parfaitement aux exigences et contraintes de la surveillance environnementale (robustesse, spécificité, sensibilité, rapidité, simplicité, coût et possibilité d'une analyse sur site).

6.1 Principe du test développé pour détecter et quantifier *A. minutum* dans l'eau de mer

Depuis peu, la technique LFIA, qui était essentiellement qualitative ou semi-quantitative, peut-être quantitative et être extrêmement sensible. En collaboration avec le CEA et la société Magnisense, nous avons développé un test d'identification et de quantification des cellules d'*A. minutum*. Le traceur utilisé dans ce test un anticorps monoclonal (AMI6) reconnaissant spécifiquement la surface de cette algue toxique. Il est couplé avec des nanoparticules supermagnétiques. Lorsque le test est terminé, le signal magnétique est alors mesuré grâce à un lecteur portable, ce signal est proportionnel au nombre de nanoparticules fixées par les cellules d'*A. minutum* retenues sur la zone test. On peut ainsi déduire le nombre de cellules de cette algue qui étaient présentes dans l'échantillon.

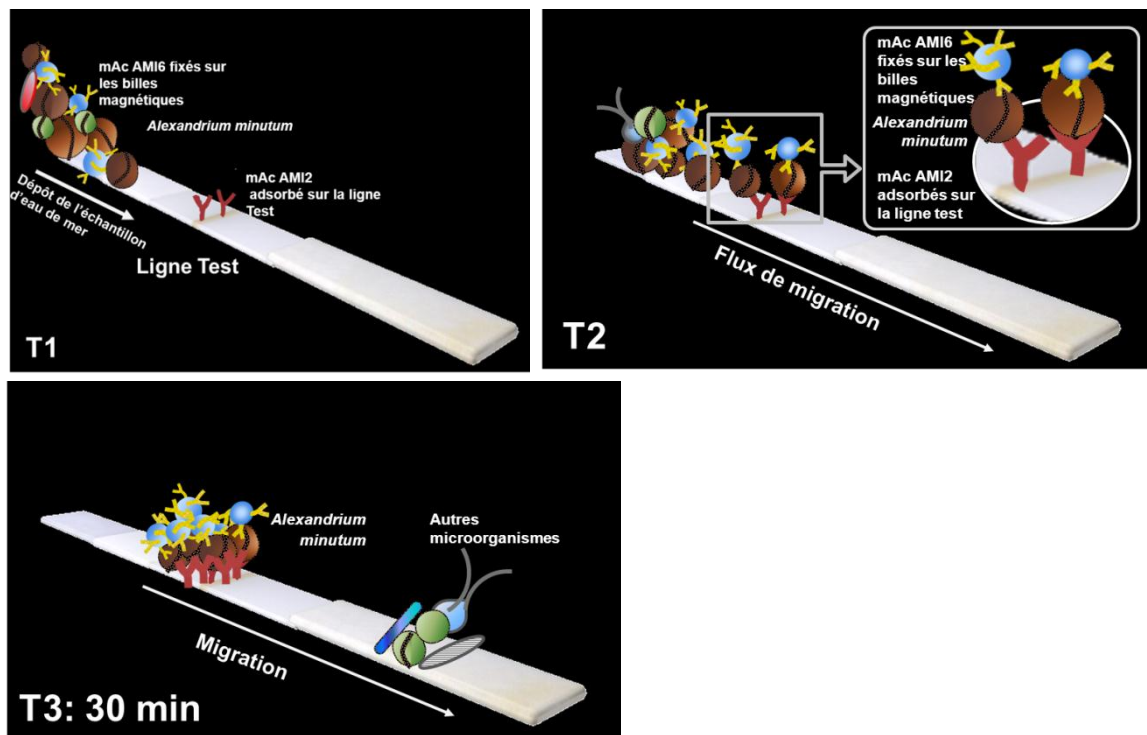


Figure 29. Cette méthode repose sur la spécificité de deux anticorps monoclonaux dirigés contre *A. minutum*: AMI 2 et AMI 6. Les anticorps AMI 2 sont adsorbés sur la membrane de nitrocellulose le long de la ligne test tandis que les anticorps AMI 6 sont couplés à des supra-particules magnétiques. La phase liquide comprenant les anticorps couplés et l'échantillon migre le long de la bandelette par capillarité (T1). Les deux anticorps vont alors se lier à leur antigène respectif, capturer et concentrer *A. minutum* sur la ligne test (T2). Grâce aux billes supra-magnétiques, le signal magnétique autour de la bandelette est proportionnel à la quantité de cellules immobilisées le long de la ligne test. Les autres microorganismes ne sont pas retenus par la ligne test et se retrouvent sur la zone d'absorption du test (T3). Après 30 min, le signal magnétique de la ligne test est alors mesuré, la concentration de cellules d'*A. minutum* est alors déduite.

6.2 Mise au point du test LFIA

Optimisation du protocole

Pour mettre au point ce test, plusieurs paramètres concernant la fabrication de la bandelette, la réaction, l'échantillon ont été testés et optimisés. Le test s'effectue selon un format « dip stick », L'échantillon d'eau de mer (100 μ l) est simplement mis en contact avec 50 μ l de conjugué (complexe billes magnétiques et anticorps) et la bandelette maintenue à la verticale dans un tube à hémolyse. La lecture du signal magnétique est alors effectuée grâce au lecteur Miatek après 30 min de réaction (fig 30). La figure 30 montre un exemple représentatif du test LFIA, utilisé avec différentes concentrations d'*A. minutum*. On observe un pic de signal magnétique sur la ligne test, ce signal est proportionnel à la quantité de cellules déposées sur la bandelette. Les billes magnétiques non retenues migrent jusqu'à l'extrémité de la bandelette (zone d'absorption, partie C de la figure 30), expliquant ainsi les signaux magnétiques mesurés dans cette partie.

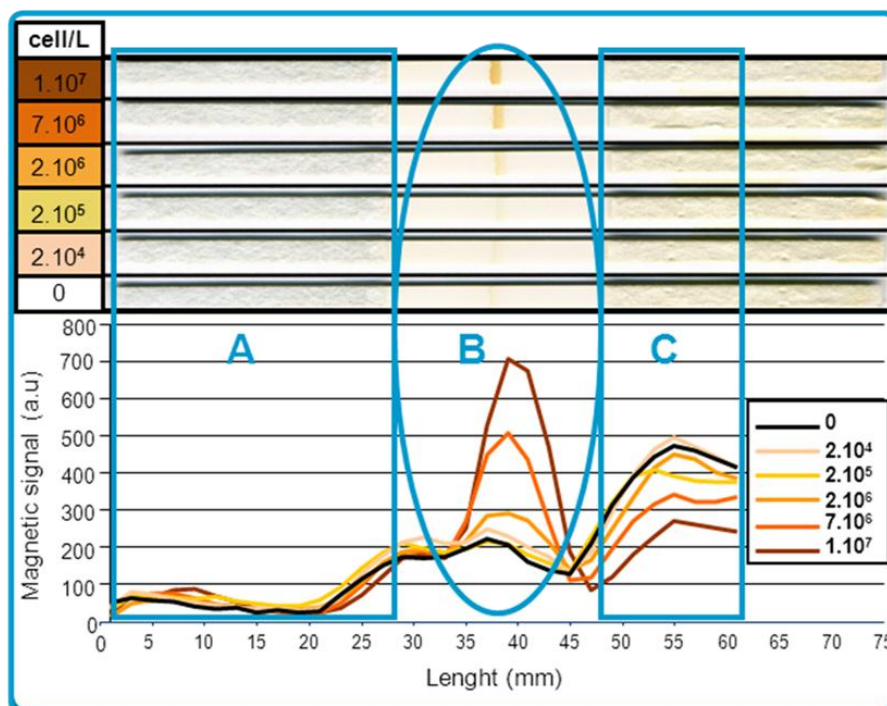


Figure 30. Analyses du signal magnétique le long des bandelettes LFIA. Plusieurs concentrations d'*A. minutum* ont été utilisées 107 cellules/L (marron), 7.10⁶ cellules/L (rouge), 2x10⁶ cellules/L (orange), 2.10⁵ cellules/L (jaune), 2.10⁴ cellules/L, le contrôle négatif (0 cellule/L, noir). Trois parties peuvent être distinguées. Partie A, le signal magnétique correspond à la zone de dépôt de l'échantillon. Partie B, le signal magnétique mesuré sur la membrane de nitrocellulose, comportant la ligne test. Partie C : le signal magnétique déterminé sur la zone d'absorption de l'échantillon.

Des temps de réactions plus longs (60 min, 90 min, 120 min) n'améliorent pas significativement la sensibilité du test.

Caractérisation de la méthode avec des échantillons contrôlés (Etablissement des courbes de calibration) et test de spécificité.

Plusieurs courbes de calibration ont été établies avec des cultures monoclonales d'*A. minutum*. Le signal magnétique est linéaire pour des concentrations supérieures à 1.10^5 cellules/L (Figure 31). Grâce à ces courbes d'étalonnage, la concentration d'*A. minutum* peut être ainsi déduite.

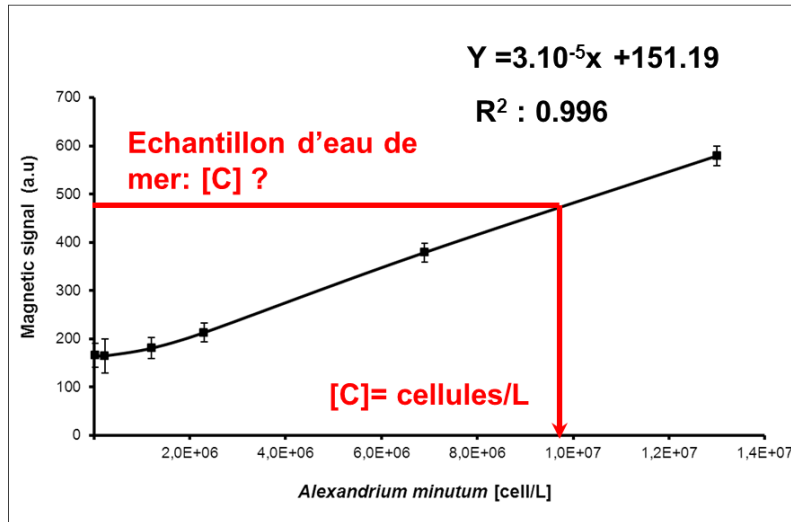


Figure 31. Courbe de calibration du test LFIA pour *A. minutum*

La spécificité du test a été vérifiée en utilisant de l'eau de mer naturelle enrichie avec des cultures d'autres espèces de dinoflagellés (Fig 32). Le signal magnétique obtenu pour l'eau de mer filtrée sur $0.2 \mu\text{m}$, c'est à dire ne contenant pas de microorganismes, est identique à ceux mesurés pour les autres échantillons contenant d'autres espèces qu'*A. minutum*. Seul le signal de l'échantillon contenant des cellules d'*A. minutum* est significativement supérieur à celui de l'eau de mer. Le test est donc spécifique d'*A. minutum*.

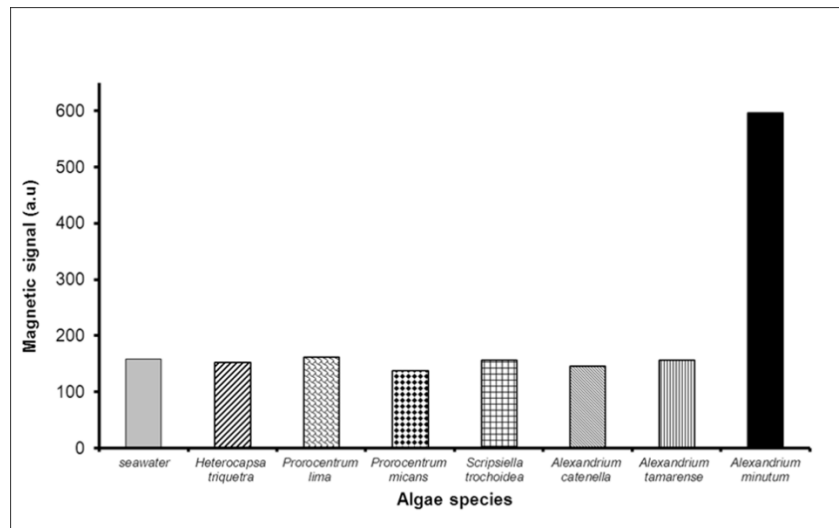


Figure 32. Spécificité du test LFIA. Les concentrations en algues ont été ajustées à 10^6 cellules par litre.

Préparation de l'échantillon (concentration, congélation et fixation potentielle des échantillons d'eau de mer).

Plusieurs solutions de fixation de type Lugol ont été essayées afin de répondre aux procédures de l'échantillonnage d'eau de mer, effectué dans le cadre de la surveillance. L'utilisation d'une solution de lugol acide perturbe la migration des algues le long de la membrane de nitrocellulose. Seules les solutions de Lugol alcalines ou neutres peuvent être utilisées sans interférence sur la migration et la lecture du signal magnétique.

Ce test peut être aussi utilisé avec des échantillons congelés sans modification du signal. Des courbes de corrélation ont été établies à partir d'étalons d'une même culture, certains ayant été congelés à 20°C et d'autres non. Aucune différence significative n'a été observée. Le test peut donc être effectué aussi bien sur ces cellules d'*A. minutum* vivantes et mobiles, que sur des cellules congelées et immobiles.

Afin d'améliorer la sensibilité du test et être en dessous du seuil d'alerte fixé par le Rephy (10 000 cellules/L) plusieurs méthodes de pré-concentration des algues ont été envisagées et testées, dont 1) la centrifugation des échantillons (10000 rpm, 15min) et récupération du culot cellulaire et 2) la pré-incubation des billes magnétiques fonctionnalisées et récupération du complexe algues-billes par aimantation.

La centrifugation est relativement performante, mais n'est pas applicable pour une utilisation du test sur le terrain. La pré-concentration par aimantation du complexe algues-billes magnétiques n'est pas envisageable (Figure 33). En effet le complexe déposé sur la bandelette, ne migre pas le long de la membrane de nitrocellulose, ceci est probablement dû à la taille trop grande du complexe par rapport à la porosité de la membrane. Ce complexe observé au microscope montre que les billes magnétiques ainsi récupérées par aimantation forment d'importants réseaux.

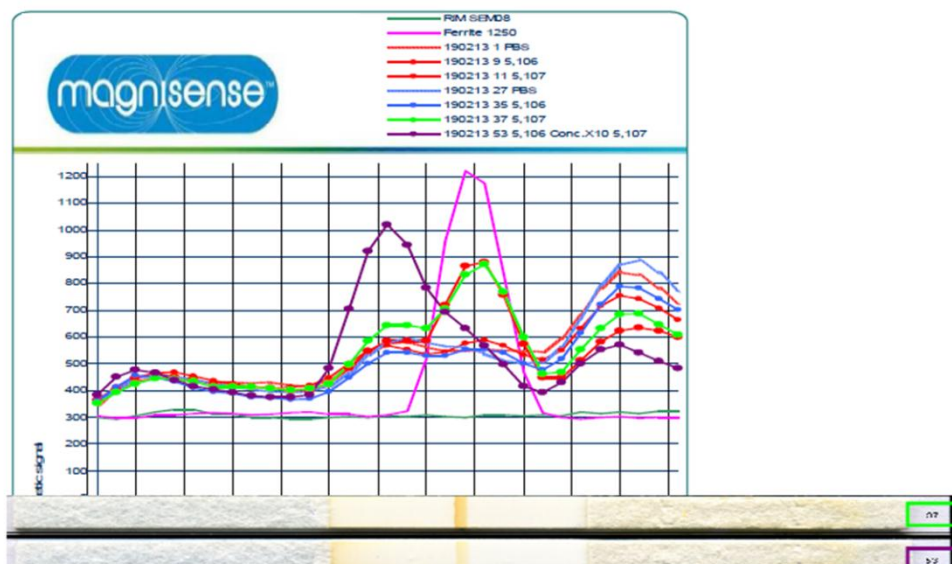


Figure 33: Pré-concentration des algues par incubation avec les billes magnétiques fonctionnalisées, suivi d'une aimantation.

La pré-concentration des échantillons par filtration a donc été envisagée. Deux systèmes de filtration automatique établis en collaboration avec M. Lunven (laboratoire Dyneco-Pelagos) et D. Le Vourch (bureau d'étude de l'unité RDT) ont été testés. Les deux systèmes utilisent des membranes de filtration jetables de type millipore, la différence réside sur le type de filtration, un système utilisant une filtration frontale et l'autre une filtration tangentielle. Le rendement de filtration déterminée par le rapport du nombre de cellules récupéré après filtration sur le nombre de cellules de l'échantillon

initial a été examiné sur des cultures d'*A. minutum* dont la concentration était de 10^6 cellules/L. Le rendement est de 19% pour la filtration tangentielle, et de 54% pour la filtration frontale lorsque le facteur de concentration est fixé à 10. Le rendement diminue lorsque le facteur de concentration est de 50, il est de 13.7% pour la filtration tangentielle et de 39% pour la filtration frontale. Le volume récupéré après pré-concentration est trop faible et non adapté au système. Des modifications de conception du concentrateur sont nécessaires pour améliorer l'efficacité de la filtration et la praticité du système pour une utilisation sur le terrain.

Inter-comparaison sur des échantillons issus du milieu marin.

Les échantillons issus de la première campagne d'échantillonnage du projet Daoulex (2013) ont été analysés en triplicat (figure 34). Les coefficients de variation entre les trois essais varient entre 2,4 et 7,7 %. On peut constater que le test bandelette surestime les concentrations en microalgues pour les valeurs basses (concentration < 50 000 cellules. L). Toutes les valeurs données par le lecteur Miatek sont au-dessus de la droite de corrélation théorique ($R^2=1$).

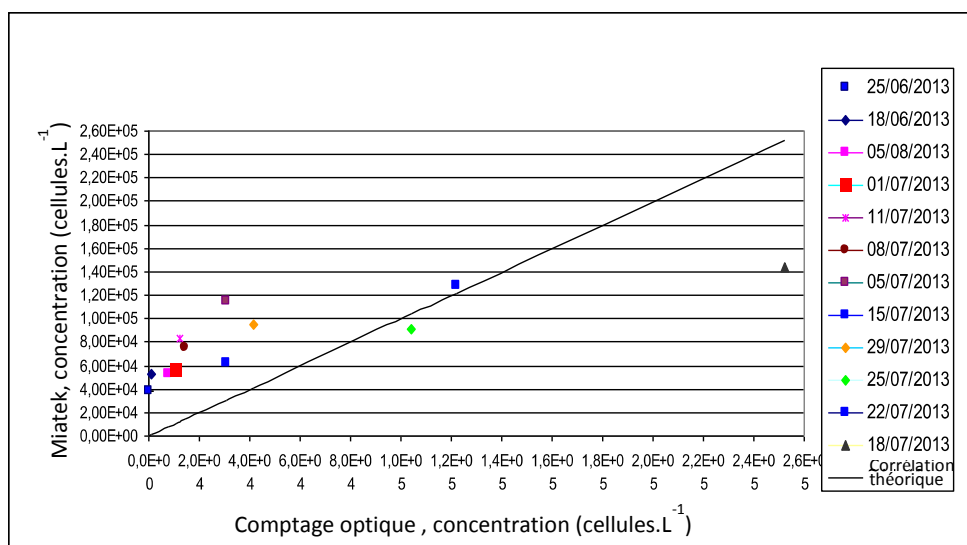


Figure 34: Corrélation entre les concentrations cellulaires obtenues par la méthode du test bandelette et par les comptages au microscope optique

L'analyse des échantillons issus de la campagne d'échantillonnage 2014 a pris du retard, car nous avons rencontré des problèmes de production d'anticorps monoclonaux et de fabrication de bandelettes. Nous venons de qualifier un nouveau lot de bandelettes produit en novembre. Les échantillons d'eau de mer congelés et conservés à -80°C , ou fixés au lugol neutre seront traités au premier semestre 2015.

7 Conclusion et perspectives

Daoulex a permis de suivre les efflorescences d'*A. minutum* en Baie de Daoulas au cours de deux années, 2013 et 2014. Ces deux années se sont révélées très différentes tant du point de vue des conditions environnementales que de la dynamique des efflorescences. En 2013, l'efflorescence a duré environ un mois en Rivière de Daoulas et au Sillon des Anglais, avec une toxicité ayant ponctuellement dépassé les seuils sanitaires. En 2014, l'efflorescence a été beaucoup plus longue.

Elle a duré près de 3 mois en Baie de Daoulas et au Sillon des Anglais avec des toxicités sur les moules dépassant les seuils sanitaires pendant 5 et 7 semaines, respectivement. Cette longue période de fermeture est particulièrement problématique au Sillon des Anglais du fait de la présence des filières à moules. A noter également, dans l'Elorn, une efflorescence de courte durée n'ayant pas entraîné de toxicité. Des efflorescences à *A. minutum* ont pu être observées en de nombreux points dans la partie orientale de la Rade de Brest. Il semble, du fait des transports hydrodynamiques et de la dynamique des blooms que ces efflorescences se développent indépendamment en différents sites, et notamment dans le secteur Elorn et en Rade Sud.

L'analyse des sédiments a mis en évidence la présence de traces d'ADN d'*A. minutum* non seulement dans la partie de la rade où des efflorescences se sont développées, mais également, en moindres concentrations, dans les sédiments échantillonnés dans l'ensemble de la Rade de Brest. Ces sédiments contiennent non seulement des traces d'ADN, mais aussi des kystes à même de germer dans des conditions environnementales favorables.

A l'échelle de la Bretagne, les populations d'*A. minutum* de la Manche et de la rade de Brest divergent génétiquement, ce qui indique une absence de flux de gènes réguliers entre les différents systèmes touchés par ces efflorescences.

Ce travail a également mis en évidence que les efflorescences sont composées d'individus très divers génétiquement. Cette diversité sera étudiée dans le cadre d'une thèse (sujet déposé) qui analysera, à partir des échantillons prélevés dans le cadre de Daoulex, si les efflorescences observées au niveau de la Rade Sud correspondent à un seul et même événement ou si elles résultent du développement indépendant de plusieurs populations. Cette thèse s'intéressera également à déterminer les états physiologiques par lesquels passent les populations d'*A. minutum* au cours des efflorescences et si celles-ci correspondent à la succession de plusieurs cohortes. Ces résultats seront analysés à la lumière des données environnementales mesurées et des profils toxiques déterminés au cours du suivi Daoulex.

Au niveau modélisation, les données environnementales mesurées sont analysées dans le cadre du projet Phytorisk (Ifremer - AELB) qui a pour objectif de déterminer l'influence des paramètres environnementaux sur les microalgues toxiques, en particulier *A. minutum* à partir de séries à long terme. Un autre projet de modélisation déterministe (thèse déposée) vise à intégrer la notion de compétition interspécifique pour la compréhension de la dynamique des efflorescences en simulant les efflorescences d'*A. minutum* au sein de la communauté phytoplanctonique totale (micro+nano+picoplancton) et dans son environnement hydrodynamique et hydrologique.

Un test de détection et de quantification d'*A. minutum* simple d'utilisation a pu être développé dans le cadre de ce projet. Il s'agira par la suite de développer un concentrateur pour augmenter la sensibilité du test pour permettre une quantification précise à des densités cellulaires proches du seuil d'alerte de 10 000 cellules par litre.

Ce projet de recherche a été mené en étroite collaboration avec d'autres projets aujourd'hui en cours sur la rade de Brest :

- l'ANR Acutox, menée par le Lemar et qui a pour objectif l'impact des efflorescences d'*A. minutum* sur la physiologie des huitres

- Le projet EC2C0 Palmito (Ifremer) dont l'objectif est d'étudier la présence de microalgues dans les archives sédimentaires.

Certains aspects développés dans Daoulex mériteraient une troisième année de suivi. Un échantillonnage différent, en plus du suivi au point fixe Rivière de Daoulas, impliquant l'aide des acteurs les plus souvent sur le terrain (conchyliculteurs ou pêcheurs de la rade, s'ils sont d'accord) permettrait d'optimiser le recueil d'échantillons d'eau. Un nouveau suivi spatial, comme celui de 2014, ainsi qu'une radiale le long de l'estuaire de l'Elorn, pour rechercher où et à quelle abondance se situe le maximum d'*A. minutum* dans ce secteur pourrait être programmés s'il s'avère que le point Rephy du Passage dépasse le seuil d'alerte.

8 Bibliographie

- Chapelle A., Andrieux F., Fauchot J., Guillaud J.F., Labry C., Sourisseau M., Verney R., 2008. Comprendre, Prédire et Agir sur les efflorescences toxiques. Jusqu'où peut-on aller aujourd'hui dans le cas d'*Alexandrium minutum* en Penzé ? Rapport Ifremer, AELB 29pp. (Version anglaise également.)
- Chapelle Annie, Le Bec Claude, Le Gac Mickael, Labry Claire, Amzil Zouher, Guillou Laure, Dreanno Catherine, Pineau-Guillou Lucia (2013). Etude sur la prolifération de la micro algue *Alexandrium minutum* en rade de Brest. Projet Daoulex. Rapport d'avancement n° 1 : Novembre 2013. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00191/30230/>
- Chapelle Annie, Le Bec Claude, Siano Raffaele, Caradec Florian, Andrieux Françoise (2014). 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. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00191/30231/>
- Guallar-Morillo (2014). Pressions environnementales et niches écologiques d'*Alexandrium minutum* sur les côtes françaises. Journées RePHY, Nantes.
- Guillaud J.-F., Bouriel L., 2005. Evolution des concentrations en nitrate et en phosphate dans les rivières bretonnes. Rapport de stage d'IUT Génie Biologie option Génie de l'Environnement. 51 pp.
- Lett C, Verley P, Mullon C, Parada C, Brochier T, Penven P, Blanke B (2008) A Lagrangian tool for modelling ichthyoplankton dynamics. *Environ Modell Softw* 23:1210-1214.
- Magni, P., Falco, G., Como, S., Casu, D., Floris, A., Petrov, A.N., Castelli, A., Perilli, A., 2008. Distribution and ecological relevance of fine sediments in organic-enriched lagoons : The case study of the Cabras lagoon (Sardinia, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56(3): 549-564.
- Nagai, S, McCauley L, Yasuda N, Erdner D L, Kulis D M, 2006. *Molecular Ecology Notes* 6.3 PRIMER NOTE: Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae), 756-758.
- Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A, 2009. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393:569–582
- The 1000 Genomes Projects Consortium (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491: 56-65.
- van de Riet, J. M., Gibbs, R. S., Chou, F. W., et al. (2009). Liquid chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops and oysters: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* 92, 1690-1704.
- Yu B., Dong H., Jiang H., LV G., Eberl D., Li S., Kim J., 2009. The role of clay minerals in the preservation of organic matter in sediments of Qinghai Lake, NW China. *Clays and Clays Minerals*, 57 (2): 213-226.

9 Annexe

9.1 Surveillance Rephy (bulletins)

Tableau

Eau - Alexandrium : nombre de cellules par litre

| Zone marine | Lieu de surveillance | Support analyse | Phytoplancton dénombré | du 12/05/2014 au 18/05/2014 (Semaine 20) | du 19/05/2014 au 25/05/2014 (Semaine 21) | du 26/05/2014 au 01/06/2014 (Semaine 22) | du 02/06/2014 au 08/06/2014 (Semaine 23) |
|---------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|--|--|--|--|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-017 Le Passage (d) | Eau de mer | Alexandrium | / | / | / | < LD |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-072 Lanvéoc large | Eau de mer | Alexandrium | / | 100 | / | < LD |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Eau de mer | Alexandrium | / | / | / | 21900 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-083 Lanvéoc | Eau de mer | Alexandrium | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-086 Pointe Ste Barbe | Eau de mer | Alexandrium | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-188 Rivière de Daoulas | Eau de mer | Alexandrium | / | 3400 | 22000 | 91000 |

Légende

| | |
|--|-----------------------------------|
| | Pas de résultat |
| | < LD (100 cellules par litre) |
| | Présence > 100 cellules par litre |

Eléments explicatifs sur Alexandrium

Les dénombrements phytoplanctoniques sont réalisés au microscope optique inversé, selon la méthode d'Utermöhl

< LD signifie "inférieur à la Limite de Détection", cette LD est généralement de 100 cellules par litre

Le seuil d'alerte Alexandrium retenu pour déclencher ou poursuivre la recherche de toxines paralysantes dans les coquillages de la zone concernée, est compris entre 1000 et 10 000 cellules par litre selon les régions

Tableau

Coquillages - Toxines paralysantes (PSP) : résultats des bio-essais sur souris par la méthode LNRBM-PSP 01 version en vigueur. Unité : µg équivalent STX/kg de chair totale de coquillage

| Zone marine | Lieu de surveillance | Coquillage | Toxines PSP | du 12/05/2014 | du 19/05/2014 | du 26/05/2014 | du 02/06/2014 |
|------------------------|------------------------------|--|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | au 18/05/2014 (Semaine 20) | au 25/05/2014 (Semaine 21) | au 01/06/2014 (Semaine 22) | au 08/06/2014 (Semaine 23) |
| 037 - Ouessant - Abers | 037-P-088 Baie des Anges | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | / | / | / |
| 038 - Iroise - Camaret | 038-P-005 Basse Jaune | Glycymeris glycymeris (amande) | PSP | / | / | / | Non exploité |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-007 Le Passage (b) | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-068 Pointe du Château | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | / | / | < LD 02/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | 407 02/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-080 Kersanton | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | 378 02/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-087 Les Fillettes | Glycymeris glycymeris (amande) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-089 Baie de Lanveur | Venerupis philippinarum (palourde japonaise) | PSP | / | / | / | < LD 02/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-093 Persuel | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | / |

Légende

| | |
|--|--|
| | Pas de résultat |
| | < LD (Limite de Détection) : toxine non détectée |
| | > LD, mais < seuil de sécurité sanitaire |
| | > seuil de sécurité sanitaire |

Éléments explicatifs pour les toxines paralysantes

Sont présentés ici les résultats pour les toxines réglementées appartenant à la famille des toxines paralysantes : saxitoxine (STX) et ses dérivés. La méthode utilisée est la méthode LNRBM-PSP 01, version en vigueur.

Le seuil de sécurité sanitaire défini dans la réglementation européenne est égal à 800 µg d'équivalent STX / kg de chair de coquillage. La limite de détection (LD) est variable selon le laboratoire d'analyse. S'agissant d'un bio-essai, la limite de quantification est assimilée à la limite de détection

Bulletin d'alerte n°2014-LER-BO-013
LER - Bretagne Occidentale - Concarneau

Diffusé le 03/07/2014
 Dino-LIPO-Alex-PSP-Psnz-ASP

Zone géographique : Bretagne Ouest
 Contact : littoral.lerbo@ifremer.fr

Tableau

Eau - Alexandrium : nombre de cellules par litre

| Zone marine | Lieu de surveillance | Support analyse | Phytoplancton dénombré | du 09/06/2014 au 15/06/2014 (Semaine 24) | du 16/06/2014 au 22/06/2014 (Semaine 25) | du 23/06/2014 au 29/06/2014 (Semaine 26) | du 30/06/2014 au 06/07/2014 (Semaine 27) |
|---------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|--|--|--|--|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-017 Le Passage (d) | Eau de mer | Alexandrium | 400 | 1300 | 51300 | 7900 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-072 Lanvéoc large | Eau de mer | Alexandrium | 1900 | 4100 | / | 3300 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Eau de mer | Alexandrium | 114200 | 67400 | 266500 | 30000 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-188 Rivière de Daoulas | Eau de mer | Alexandrium | 216500 | 403000 | 191100 | 5800 |

Légende

| | |
|--|-----------------------------------|
| | Pas de résultat |
| | < LD (100 cellules par litre) |
| | Présence > 100 cellules par litre |

Eléments explicatifs sur Alexandrium

Les dénombrements phytoplanctoniques sont réalisés au microscope optique inversé, selon la méthode d'Utermöhl

< LD signifie "inférieur à la Limite de Détection", cette LD est généralement de 100 cellules par litre

Le seuil d'alerte Alexandrium retenu pour déclencher ou poursuivre la recherche de toxines paralysantes dans les coquillages de la zone concernée, est compris entre 1000 et 10 000 cellules par litre selon les régions

Tableau

Coquillages - Toxines paralysantes (PSP) : résultats des bio-essais sur souris par la méthode LNRBM-PSP 01 version en vigueur. Unité : µg équivalent STX/kg de chair totale de coquillage

| Zone marine | Lieu de surveillance | Coquillage | Toxines PSP | du 09/06/2014 au 15/06/2014 (Semaine 24) | du 16/06/2014 au 22/06/2014 (Semaine 25) | du 23/06/2014 au 29/06/2014 (Semaine 26) | du 30/06/2014 au 06/07/2014 (Semaine 27) |
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|

| | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------|--|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-007 Le Passage (b) | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | / | / | < LD 29/06/2014 |
| | | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | 387 29/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-068 Pointe du Château | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | < LD 10/06/2014 | < LD 16/06/2014 | < LD 23/06/2014 | < LD 30/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Mytilus (moule) | PSP | 1879 10/06/2014 | 3881 16/06/2014 | 3042 23/06/2014 | 2218 29/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-080 Kersanton | Mytilus (moule) | PSP | 2142 08/06/2014 | 3132 15/06/2014 | 1253 22/06/2014 | 2506 29/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-087 Les Fillettes | Glycymeris glycymeris (amande) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-089 Baie de Lanveur | Venerupis philippinarum (palourde japonaise) | PSP | < LD 10/06/2014 | 450 16/06/2014 | 378 23/06/2014 | < LD 30/06/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-093 Persuel | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | < LD 16/06/2014 | < LD 23/06/2014 | < LD 29/06/2014 |
| | | Mytilus (moule) | PSP | / | < LD 16/06/2014 | < LD 23/06/2014 | < LD 29/06/2014 |

Légende

| | |
|--|--|
| | Pas de résultat |
| | < LD (Limite de Détection) : toxine non détectée |
| | > LD, mais < seuil de sécurité sanitaire |
| | > seuil de sécurité sanitaire |

Eléments explicatifs pour les toxines paralysantes

Sont présentés ici les résultats pour les toxines réglementées appartenant à la famille des toxines paralysantes : saxitoxine (STX) et ses dérivés. La méthode utilisée est la méthode LNRBM-PSP 01, version en vigueur.

Le seuil de sécurité sanitaire défini dans la réglementation européenne est égal à 800 µg d'équivalent STX / kg de chair de coquillage. La limite de détection (LD) est variable selon le laboratoire d'analyse. S'agissant d'un bio-essai, la limite de quantification est assimilée à la limite de détection

Bulletin d'alerte n°2014-LER-BO-018
LER - Bretagne Occidentale - Concarneau

Diffusé le 31/07/2014
 Dino-LIPO-Alex-PSP-Psnz-ASP

Zone géographique : Bretagne Ouest
 Contact : littoral.lerbo@ifremer.fr

Tableau

Eau - Alexandrium : nombre de cellules par litre

| Zone marine | Lieu de surveillance | Support analyse | Phytoplancton dénombré | du 07/07/2014 au 13/07/2014 (Semaine 28) | du 14/07/2014 au 20/07/2014 (Semaine 29) | du 21/07/2014 au 27/07/2014 (Semaine 30) | du 28/07/2014 au 03/08/2014 (Semaine 31) |
|---------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|--|--|--|--|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-017 Le Passage (d) | Eau de mer | Alexandrium | 199100 | < LD | / | 1700 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-072 Lanvéoc large | Eau de mer | Alexandrium | / | 8700 | 32800 | 3800 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Eau de mer | Alexandrium | 43300 | 12200 | 104300 | 35300 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-188 Rivière de Daoulas | Eau de mer | Alexandrium | 68200 | 9400 | 93100 | 28900 |

Légende

| | |
|--|-----------------------------------|
| | Pas de résultat |
| | < LD (100 cellules par litre) |
| | Présence > 100 cellules par litre |

Eléments explicatifs sur Alexandrium

Les dénombrements phytoplanctoniques sont réalisés au microscope optique inversé, selon la méthode d'Utermöhl

< LD signifie "inférieur à la Limite de Détection", cette LD est généralement de 100 cellules par litre

Le seuil d'alerte Alexandrium retenu pour déclencher ou poursuivre la recherche de toxines paralysantes dans les coquillages de la zone concernée, est compris entre 1000 et 10 000 cellules par litre selon les régions

Tableau

Coquillages - Toxines paralysantes (PSP) : résultats des bio-essais sur souris par la méthode LNRBM-PSP 01 version en vigueur. Unité : µg équivalent STX/kg de chair totale de coquillage

| Zone marine | Lieu de surveillance | Coquillage | Toxines PSP | du 07/07/2014 au 13/07/2014 (Semaine 28) | du 14/07/2014 au 20/07/2014 (Semaine 29) | du 21/07/2014 au 27/07/2014 (Semaine 30) | du 28/07/2014 au 03/08/2014 (Semaine 31) |
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|

| | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------|--|-----|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-007 Le Passage (b) | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | < LD 09/07/2014 | < LD 15/07/2014 | < LD 23/07/2014 | < LD 28/07/2014 |
| | | Mytilus (moule) | PSP | 365 09/07/2014 | Absence ressource | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-068 Pointe du Château | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | < LD 07/07/2014 | < LD 15/07/2014 | < LD 23/07/2014 | < LD 28/07/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Mytilus (moule) | PSP | 2592 06/07/2014 | 2419 13/07/2014 | 2131 20/07/2014 | 1190 27/07/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-080 Kersanton | Mytilus (moule) | PSP | 2304 06/07/2014 | 1051 13/07/2014 | 680 20/07/2014 | 486 27/07/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-087 Les Fillettes | Glycymeris glycymeris (amande) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-089 Baie de Lanveur | Venerupis philippinarum (palourde japonaise) | PSP | < LD 07/07/2014 | < LD 15/07/2014 | < LD 23/07/2014 | < LD 28/07/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-093 Persuel | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | 356 15/07/2014 | < LD 20/07/2014 | < LD 28/07/2014 |
| | | Mytilus (moule) | PSP | < LD 07/07/2014 | < LD 15/07/2014 | < LD 21/07/2014 | < LD 28/07/2014 |

Légende

| |
|--|
| Pas de résultat |
| < LD (Limite de Détection) : toxine non détectée |
| > LD, mais < seuil de sécurité sanitaire |
| > seuil de sécurité sanitaire |

Éléments explicatifs pour les toxines paralysantes

Sont présentés ici les résultats pour les toxines réglementées appartenant à la famille des toxines paralysantes : saxitoxine (STX) et ses dérivés. La méthode utilisée est la méthode LNRBM-PSP 01, version en vigueur.

Le seuil de sécurité sanitaire défini dans la réglementation européenne est égal à 800 µg d'équivalent STX / kg de chair de coquillage. La limite de détection (LD) est variable selon le laboratoire d'analyse. S'agissant d'un bio-essai, la limite de quantification est assimilée à la limite de détection

Bulletin d'alerte n°2014-LER-BO-022
LER - Bretagne Occidentale - Concarneau

Diffusé le 28/08/2014
 Dino-LIPO-Alex-PSP-Psnz-ASP

Zone géographique : Bretagne Ouest
 Contact : littoral.lerbo@ifremer.fr

Tableau

Eau - Alexandrium : nombre de cellules par litre

| Zone marine | Lieu de surveillance | Support analyse | Phytoplancton dénombré | du 04/08/2014 au 10/08/2014 (Semaine 32) | du 11/08/2014 au 17/08/2014 (Semaine 33) | du 18/08/2014 au 24/08/2014 (Semaine 34) | du 25/08/2014 au 31/08/2014 (Semaine 35) |
|---------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|--|--|--|--|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-017 Le Passage (d) | Eau de mer | Alexandrium | / | / | 6500 | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-072 Lanvéoc large | Eau de mer | Alexandrium | 2300 | 1800 | / | 1100 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Eau de mer | Alexandrium | 70600 | 16600 | 23300 | 4700 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-188 Rivière de Daoulas | Eau de mer | Alexandrium | 44900 | 11200 | 9500 | 4600 |

Légende

| | |
|--|-----------------------------------|
| | Pas de résultat |
| | < LD (100 cellules par litre) |
| | Présence > 100 cellules par litre |

Eléments explicatifs sur Alexandrium

Les dénombrements phytoplanctoniques sont réalisés au microscope optique inversé, selon la méthode d'Utermöhl

< LD signifie "inférieur à la Limite de Détection", cette LD est généralement de 100 cellules par litre

Le seuil d'alerte Alexandrium retenu pour déclencher ou poursuivre la recherche de toxines paralysantes dans les coquillages de la zone concernée, est compris entre 1000 et 10 000 cellules par litre selon les régions

Tableau

Coquillages - Toxines paralysantes (PSP) : résultats des bio-essais sur souris par la méthode LNRBM-PSP 01 version en vigueur. Unité : µg équivalent STX/kg de chair totale de coquillage

| Zone marine | Lieu de surveillance | Coquillage | Toxines PSP | du 04/08/2014 au 10/08/2014 (Semaine 32) | du 11/08/2014 au 17/08/2014 (Semaine 33) | du 18/08/2014 au 24/08/2014 (Semaine 34) | du 25/08/2014 au 31/08/2014 (Semaine 35) |
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|

| | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------|--|-----|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-007 Le Passage (b) | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | < LD 04/08/2014 | / | / | / |
| | | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-068 Pointe du Château | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | < LD 04/08/2014 | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Mytilus (moule) | PSP | 533 03/08/2014 | 515 10/08/2014 | 400 17/08/2014 | < LD 25/08/2014 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-080 Kersanton | Mytilus (moule) | PSP | 576 04/08/2014 | 461 10/08/2014 | 418 17/08/2014 | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-087 Les Fillettes | Glycymeris glycymeris (amande) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-089 Baie de Lanveur | Venerupis philippinarum (palourde japonaise) | PSP | < LD 04/08/2014 | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-093 Persuel | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | < LD 04/08/2014 | / | / | / |
| | | Mytilus (moule) | PSP | < LD 04/08/2014 | / | / | / |

Légende

| | |
|--|--|
| | Pas de résultat |
| | < LD (Limite de Détection) : toxine non détectée |
| | > LD, mais < seuil de sécurité sanitaire |
| | > seuil de sécurité sanitaire |

Eléments explicatifs pour les toxines paralysantes

Sont présentés ici les résultats pour les toxines réglementées appartenant à la famille des toxines paralysantes : saxitoxine (STX) et ses dérivés. La méthode utilisée est la méthode LNRBM-PSP 01, version en vigueur.

Le seuil de sécurité sanitaire défini dans la réglementation européenne est égal à 800 µg d'équivalent STX / kg de chair de coquillage. La limite de détection (LD) est variable selon le laboratoire d'analyse. S'agissant d'un bio-essai, la limite de quantification est assimilée à la limite de détection

Bulletin d'alerte n°2014-LER-BO-026
LER - Bretagne Occidentale - Concarneau

Diffusé le 22/09/2014
 Dino-LIPO-Alex-PSP-Psnz-ASP

Zone géographique : Bretagne Ouest
 Contact : littoral.lerbo@ifremer.fr

Tableau

Eau - Alexandrium : nombre de cellules par litre

| Zone marine | Lieu de surveillance | Support analyse | Phytoplancton dénombré | du 25/08/2014 au 31/08/2014 (Semaine 35) | du 01/09/2014 au 07/09/2014 (Semaine 36) | du 08/09/2014 au 14/09/2014 (Semaine 37) | du 15/09/2014 au 21/09/2014 (Semaine 38) |
|---------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|--|--|--|--|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-017 Le Passage (d) | Eau de mer | Alexandrium | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-072 Lanvéoc large | Eau de mer | Alexandrium | 1100 | / | 700 | < LD |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Eau de mer | Alexandrium | 4700 | 1200 | 800 | 200 |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-188 Rivière de Daoulas | Eau de mer | Alexandrium | 4600 | 3400 | 2100 | 1200 |

Légende

| |
|-----------------------------------|
| Pas de résultat |
| < LD (100 cellules par litre) |
| Présence > 100 cellules par litre |

Eléments explicatifs sur Alexandrium

Les dénombrements phytoplanctoniques sont réalisés au microscope optique inversé, selon la méthode d'Utermöhl

< LD signifie "inférieur à la Limite de Détection", cette LD est généralement de 100 cellules par litre

Le seuil d'alerte Alexandrium retenu pour déclencher ou poursuivre la recherche de toxines paralysantes dans les coquillages de la zone concernée, est compris entre 1000 et 10 000 cellules par litre selon les régions

Tableau

Coquillages - Toxines paralysantes (PSP) : résultats des bio-essais sur souris par la méthode LNRBM-PSP 01 version en vigueur. Unité : µg équivalent STX/kg de chair totale de coquillage

| Zone marine | Lieu de surveillance | Coquillage | Toxines PSP | du 25/08/2014 au 31/08/2014 (Semaine 35) | du 01/09/2014 au 07/09/2014 (Semaine 36) | du 08/09/2014 au 14/09/2014 (Semaine 37) | du 15/09/2014 au 21/09/2014 (Semaine 38) |
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|
|-------------|----------------------|------------|-------------|--|--|--|--|

| | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------|--|-----|--------------------|---|---|---|
| 039 - Rade de Brest | 039-P-007 Le Passage (b) | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | / | / | / |
| | | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-068 Pointe du Château | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-079 Sillon des Anglais | Mytilus (moule) | PSP | < LD 25/08/2014 | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-080 Kersanton | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-087 Les Fillettes | Glycymeris glycymeris (amande) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-089 Baie de Lanveur | Venerupis philippinarum (palourde japonaise) | PSP | / | / | / | / |
| 039 - Rade de Brest | 039-P-093 Persuel | Crassostrea gigas (huître creuse) | PSP | / | / | / | / |
| | | Mytilus (moule) | PSP | / | / | / | / |

Légende

| | |
|--|--|
| | Pas de résultat |
| | < LD (Limite de Détection) : toxine non détectée |
| | > LD, mais < seuil de sécurité sanitaire |
| | > seuil de sécurité sanitaire |

Eléments explicatifs pour les toxines paralysantes

Sont présentés ici les résultats pour les toxines réglementées appartenant à la famille des toxines paralysantes : saxitoxine (STX) et ses dérivés. La méthode utilisée est la méthode LNRBM-PSP 01, version en vigueur.

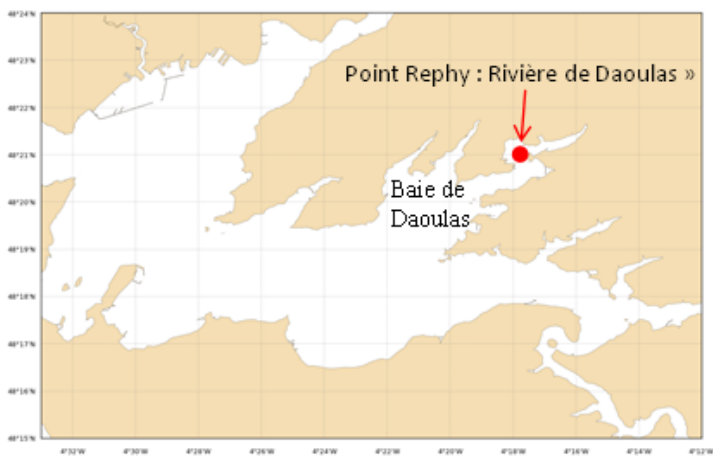
Le seuil de sécurité sanitaire défini dans la réglementation européenne est égal à 800 µg d'équivalent STX / kg de chair de coquillage. La limite de détection (LD) est variable selon le laboratoire d'analyse. S'agissant d'un bio-essai, la limite de quantification est assimilée à la limite de détection

9.2 Annexe 2 : Suivi terrain, été 2014

Rappel de la stratégie Point fixe

Le point fixe, nommé Rivière de Daoulas, se trouve au niveau de la Pointe de Rosmelec, Baie de Daoulas, lieu où l'efflorescence a été maximale en 2012. Il a été suivi en 2013 et 2014 avec le même protocole.

L'ensemble des mesures et prélèvements ont été réalisés au moment de la haute mer (+/-2 heures) à partir des embarcations de Mr Julien Coïc, ostréiculteur à Logonna Daoulas ou du Laboratoire Ifremer de Concarneau. Ce suivi a été initié, une fois que la température de l'eau mesurée en temps réel par les flotteurs de type Smatch (NKE technology) du Réseau d'Observations Conchylicoles (RESCO) de l'Ifremer, a dépassé les 15°C. Il est hebdomadaire tant que l'abondance d'*Alexandrium minutum* reste inférieure au seuil d'alerte (10000 cell. L⁻¹). Il passe en suite à la fréquence bi-hebdomadaire.



A



B

Figure 1 : A) Positionnement du point de suivi *in situ* « Rivière de Daoulas » en Rade de Brest. B) Station de filtration après échantillonnage en mer (Pointe du Château)

Ce suivi présente un double objectif, le premier objectif vise à réaliser une surveillance sanitaire de la zone à risque de façon à ce que l'état puisse prendre les mesures réglementaires appropriées le plus rapidement possible en cas de développement algal massif. Cette tâche a été assurée par le Laboratoire Environnement Ressource de Concarneau dans le cadre du Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (Rephy) de l'Ifremer. Les cellules d'*A. minutum* dans l'eau ont été prélevées à la station Rephy « Rivière de Daoulas » puis quantifiées par microscopie optique. A partir d'une température de l'eau supérieure à 15°C, les prélèvements ont été effectués chaque début de semaine et les résultats diffusés par mail sous forme de bulletin chaque semaine (voir annexe 1). L'antenne portuaire de Brest était destinataire.

Le second objectif vise à caractériser les conditions environnementales précédant une éventuelle efflorescence toxique à *A. minutum*. Cette tâche réalisée par le laboratoire Dyneco/Pelagos a consisté en des mesures de données environnementales *in situ* de température, salinité, et de la fluorescence (2013 seulement) émise par les organismes photosynthétiques. Température et salinité ont été mesurées à l'aide d'un salinomètre manuel en sub-surface et au fond. Un profil de température et de fluorescence a également été réalisé à l'aide d'une sonde WET Labs (2013 seulement). De façon à quantifier *A. minutum*, les nutriments, ainsi que la communauté photosynthétique totale, des prélèvements d'eau ont été réalisés en sub-surface à l'aide d'une bouteille Niskin horizontale de 5 litres. A partir de ces prélèvements :

- 200 ml sont fixés au Lugol de façon à quantifier les cellules d'*A. minutum*
- Des échantillons sont filtrés sur 0,45 µm et congelés de façon à quantifier d'une part les nutriments azotés (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) et phosphorés (PO_4^{3-}), et d'autre part les silicate ($\text{Si}(\text{OH})_4$).
- Entre 150 et 2000 ml (jusqu'à colmatage du filtre) sont filtrés sur GF/F et congelés pour quantifier les pigments chlorophylliens.
- 4 l (2 l fixés au Lugol et 2 l non-fixés) sont prélevés dans le cadre de la mise au point de tests de détection d'*A. minutum* par test bandelette.

Lorsque le seuil d'alerte officiel de 10 000 cellules d'*A. minutum* par litre d'eau de mer est dépassé, cela entraîne une intensification du suivi dans le cadre du projet Daoulex (et un dosage des toxines des coquillages commercialisables dans le cadre du RePHY). La fréquence d'échantillonnage passe d'une à deux fois par semaine. Des prélèvements supplémentaires visant à analyser le matériel génétique de la communauté phytoplanctonique (ADN et ARN), à isoler des souches d'*A. minutum* (2013 seulement) et à déterminer et quantifier les toxines présentes dans le milieu ont été réalisés. Plus particulièrement, suite à des prélèvements à partir d'une bouteille Niskin horizontale de 5 litres :

- Entre 1 l et 4 l (jusqu'à colmatage du filtre) ont été filtrés en série sur 20 µm. Puis 3µm et entre 180 et 790 ml (jusqu'à colmatage du filtre) de ce filtrat a été filtré sur 0,2µm. L'ensemble des filtres a été congelés dans l'azote liquide. Ces filtres seront exploités pour décrire la dynamique des communautés phytoplanctoniques par des approches basées sur le séquençage de l'ADN.
- Entre 1,7 l et 7 l (jusqu'à colmatage du filtre) filtrés sur 20 µm et congelés dans l'azote liquide pour analyser la dynamique des communautés micro-phytoplanctoniques (dont fait partie *A. minutum*) et de la dynamique des types de gènes exprimés par les communautés microphytoplanctoniques au cours d'une efflorescence par des approches basées sur le séquençage des ARNm (la fraction du génome utilisée par l'organisme à un moment donné).
- Environ 50 ml préservés de façon à isoler des souches d'*A. minutum* (2013 seulement).

Des prélèvements sont également réalisés à l'aide d'un filet à plancton de 20 µm pour concentrer les cellules phytoplanctoniques afin de déterminer et quantifier les toxines présentes.

Le tableau suivant résume les mesures et échantillonnages réalisés lors de ce suivi pour les différentes sorties.

Table 1 : Liste des sorties et des mesures réalisées dans le cadre du projet Daoulex en 2014

| Semaine | Date | Température | Salinité | Comptage <i>A. minutum</i> | Nutriments | Chlorophylle | Bandelettes | ARN | ADN | Toxines |
|---------|-------|-------------|----------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-----|-----|---------|
| 21 | 19/05 | | | | | | | | | |
| 22 | 26/05 | | | | | | | | | |
| | 30/05 | | | | | | | | | |
| 23 | 03/06 | | | | | | | | | |
| | 06/06 | | | | | | | | | |
| 24 | 10/06 | | | | | | | | | |
| | 13/06 | | | | | | | | | |
| 25 | 16/06 | | | | | | | | | |
| | 20/06 | | | | | | | | | |
| 26 | 23/06 | | | | | | | | | |
| | 27/06 | | | | | | | | | |
| 27 | 30/06 | | | | | | | | | |
| 28 | 07/07 | | | | | | | | | |
| | 11/07 | | | | | | | | | |
| 29 | 15/07 | | | | | | | | | |
| | 18/07 | | | | | | | | | |
| 30 | 21/07 | | | | | | | | | |
| | 25/07 | | | | | | | | | |
| 31 | 28/07 | | | | | | | | | |
| | 01/08 | | | | | | | | | |
| 32 | 04/08 | | | | | | | | | |
| | 08/08 | | | | | | | | | |
| 33 | 11/08 | | | | | | | | | |
| | 14/08 | | | | | | | | | |
| 34 | 18/08 | | | | | | | | | |
| 35 | 25/08 | | | | | | | | | |
| 36 | 01/09 | | | | | | | | | |
| 37 | 08/09 | | | | | | | | | |
| 38 | 15/09 | | | | | | | | | |
| 39 | 22/09 | | | | | | | | | |