

Les eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum* et leurs conséquences sur les productions aquacoles en région Pays de la Loire : de l'acquisition de connaissances vers un futur système d'alerte (Projet Lepido-Pen)

Rapport de fin de projet – AAP 2019 « Aquaculture – Pêche » de la région des Pays de la Loire – convention n°2019-06582 financé par la Région Pays de la Loire





## Fiche documentaire

**Titre du rapport :** Les eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum* et leurs conséquences sur les productions aquacoles en région Pays de la Loire : de l'acquisition de connaissances vers un futur système d'alerte (Projet Lepido-Pen) - *Rapport de fin de projet – AAP 2019 « Aquaculture – Pêche » de la région des Pays de la Loire – convention n°2019-06582*

---

**Référence interne :**

R.ODE/UL/LER-MPL 23-05

**Date de publication :** 2023/06/30

**Version :** 2.0.0

**Diffusion :**

libre (internet)

restreinte (intranet) – date de levée d'embargo : 2023/12/31

**Référence de l'illustration de couverture**

Lesbats Stephane (2022). Phénomène d'eau colorée verte en baie de Vilaine - Prélèvements et échantillonnage d'eau depuis le zodiac. Ifremer.

<https://image.ifremer.fr/data/00787/89932/>

interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ

**Langue(s) :** Français

---

### Résumé/ Abstract :

Les efflorescences de dinoflagellés toxiques ou nuisibles en milieu marin côtier sont des phénomènes fréquemment observés à l'échelle mondiale. La prolifération massive de certaines espèces peut notamment engendrer une coloration de l'eau de mer et impacter les activités économiques locales telles que le tourisme ou la production conchylicole. C'est le cas des efflorescences du dinoflagellé non-toxique *Lepidodinium chlorophorum* connu pour produire des Eaux Colorées Vertes le long de la côte Atlantique Française et plus particulièrement en Loire Atlantique. Des mortalités d'organismes marins ont été associées à ces événements sans toutefois pouvoir faire directement le lien de cause à effet. La production de Particules Exo-polymériques Transparentes (TEP), visqueuses et riches en carbone, pourrait représenter une propriété nuisible de ce dinoflagellé. Les travaux réalisés dans le cadre du projet Lepido-Pen fournissent de premiers éléments de compréhension sur l'écologie de *L. chlorophorum* à travers une approche multidisciplinaire allant de la biologie cellulaire de l'espèce à l'impact sur l'écosystème et les espèces exploitées.

**Mots-clés/ Key words :** *Lepidodinium chlorophorum*. ; Dinoflagellés ; Efflorescences algales nuisibles ; Eaux colorées vertes ; Ecologie côtière ; Particules Exo-polymériques Transparentes ; Reminéralisation ; Hypoxie ; Ammonium ; ADN environnemental ; Viscosité ; Ecophysiologie ; *Crassostrea gigas*

### Comment citer ce document :

Schapira, M., Roux, P. et al. (2023). Les eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum* et leurs conséquences sur les productions aquacoles en région Pays de la Loire : de l'acquisition de connaissances vers un futur système d'alerte (Projet Lepido-

[Les eaux colorées vertes à \*Lepidodinium chlorophorum\* et leurs conséquences sur les productions aquacoles en région Pays de la Loire : de l'acquisition de connaissances vers un futur système d'alerte \(Projet Lepido-Pen\) – Avril 2023](#)

Page 3 sur 115

Pen). Rapport de fin de projet – AAP 2019 « Aquaculture – Pêche » de la région des Pays de la Loire – convention n°2019-06582. R.ODE/UL/LER-MPL 23-04, 115p.

Disponibilité des données de la recherche :

---

DOI :

---



<b>Commanditaire du rapport : Région des Pays de la Loire</b>	
<b>Nom / référence du contrat :</b> AAP 2019 « Aquaculture et Pêche » Région des Pays de la Loire – convention N°2019-06582 <input type="checkbox"/> Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) <input checked="" type="checkbox"/> Rapport définitif	
<b>Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit</b> (programme européen, campagne, etc.) :	
<b>Auteur(s) / adresse mail</b>	<b>Affiliation / Direction / Service, laboratoire</b>
Schapira Mathilde/ mathilde.schapira@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Roux Pauline/ Pauline.Roux1@univ-nantes.fr	Nantes Université, ISOMer, UR 2160
Siano Raffaele/ raffaele.siano@ifremer.fr	Ifremer Brest PDG-ODE-DYNECO-PELAGOS
Glize Philippe/ philippe.glize@dmidap.fr	SMIDAP
Gernez Pierre : pierre.gernez@univ-nantes.fr	Nantes Université, ISOMer, UR 2160
Fleury Elodie/ elodie.fleury@ifremer.fr	Ifremer Brest PDG-RBE-PHYTNESS
Collin Karine / karine.collin@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Retho Michael/ Michael.retho@ifremer.fr	Ifremer Lorient PDG-ODE-LITTOR
Manach Soazig/ soazig.manach@ifremer.fr	Ifremer Lorient PDG-ODE-LITTOR
Bouget Jean-François / jean.francois.bouget@ifremer.fr	Ifremer Lorient PDG-ODE-LITTOR
Schmitt Anne/ anne.schmitt@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Pierre-Duplessix Olivier/ Olivier.pierre.duplessix@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Le Merrer Yoann/ yoann.le.merrer@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Bizzozero Lucie/ lucie.bizzozero@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Souchu Philippe/ philippe.souchu@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-ODE-LITTOR
Colliec-Jouault Sylvia/ sylvia.colliec.jouault@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-RBE-MASAE-LEMMMB
Marchand Laetitia/laetitia.marchand@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-RBE-HALGO-EMH
Sinquin Corinnes/ corinne.sinquin@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-RBE-MASAE-LEMMMB
Zykwinska Agata/ agata.zykwinska@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-RBE-MASAE-LEMMMB
Baron Régis/ regis.baron@ifremer.fr	Ifremer Nantes PDG-RBE-MASAE
Treguier Cathy/ cathy.treguier@ifremer.fr	Ifremer Lorient PDG-ODE-LITTOR
Destinataire : Région Pays de la Loire	
<b>Validé par : Cathy Tréguier, Ifremer Lorient PDG-ODE-LITTOR</b>	



## Sommaire

### Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>17</b>
1.1	Etat de l'art .....	17
1.1.1	<i>Lepidodinium chlorophorum</i> : un dinoflagellé pas comme les autres.....	17
1.1.2	Distribution de <i>L. chlorophorum</i> .....	18
1.1.2.1	Dans l'océan mondial .....	18
1.1.2.2	Sur les côtes françaises.....	19
1.1.3	Ecologie de <i>L. chlorophorum</i> .....	20
1.1.3.1	Niche écologique et cycle de vie .....	20
1.1.3.2	Particules exo-polymériques transparentes (TEP) : un trait biologique particulièrement développé chez <i>L. chlorophorum</i> .....	22
1.2	Contexte et objectifs de l'étude .....	24
<b>2</b>	<b>Approches professionnelles des épisodes d'eaux colorées vertes sur les productions aquacoles en baie de Pen Bé. ....</b>	<b>25</b>
2.1	Contexte et Objectifs.....	25
2.2	Résultats .....	26
2.2.1	Volet Mytilicole.....	26
2.2.1.1	Mortalités éventuelles observées en 2018 .....	26
2.2.1.2	Observations éventuelles de mortalités antérieures .....	27
2.2.1.3	Commentaires laissés par les répondants.....	27
2.2.2	Volet Ostréicole .....	28
2.2.2.1	Mortalités éventuelles observées en 2018 .....	28
2.2.2.2	Observations éventuelles de mortalités antérieures .....	29
2.2.2.3	Commentaires laissés par les répondants.....	29
2.3	Conclusions.....	30
2.4	Remerciements.....	31
<b>3</b>	<b>Phénologie des efflorescences de <i>Lepidodinium chlorophorum</i> et leurs conséquences sur les écosystèmes .....</b>	<b>32</b>
3.1	Initiation des efflorescences de <i>L. chlorophorum</i> .....	32
3.1.1	Contexte et objectifs .....	32
3.1.2	Mise en œuvre.....	32
3.1.2.1	Recherche des cellules de <i>L. chlorophorum</i> et paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau .....	32
3.1.2.2	Recherche des kystes de <i>L. chlorophorum</i> dans les sédiments superficiels au large de la Loire et en Baie de Vilaine. ....	34
3.1.3	Résultats .....	34
3.1.3.1	Dynamique de <i>L. chlorophorum</i> et des paramètres environnementaux dans la colonne d'eau .....	34

3.1.3.2	Recherche de <i>Lepidodinium</i> dans les sédiments superficiels .....	39
3.1.3.2.1	Observation des kystes en microscopie.....	39
3.1.3.2.2	Isolement de kystes et identification en PCR .....	40
3.1.3.2.3	Analyses de l'ADNe .....	40
3.1.4	Discussion.....	41
3.1.4.1	Origine de l'inoculum de <i>Lepidodinium chlorophorum</i> .....	41
3.1.4.2	Facteurs environnementaux .....	42
3.2	Dynamique spatio-temporelle des efflorescences de <i>L. chlorophorum</i> et propriétés biogéochimiques des eaux colorées vertes .....	43
3.2.1	Analyse des séries à long terme.....	43
3.2.1.1	Contexte et objectifs.....	43
3.2.1.2	Mise en œuvre .....	43
3.2.1.3	Résultats.....	44
3.2.1.3.1	Variabilité spatiale .....	44
3.2.1.3.2	Variabilité interannuelle .....	45
3.2.1.3.3	Dynamique saisonnière .....	47
3.2.1.4	Conclusions .....	47
3.2.1.5	Perspectives .....	49
3.2.2	Dynamique spatio-temporelle d'une eau colorée verte.....	50
3.2.2.1	Contexte et objectifs.....	50
3.2.2.2	Mise en œuvre .....	50
3.2.2.2.1	Suivi saisonnier .....	50
3.2.2.2.2	Echantillonnage dans une eau colorée verte.....	51
3.2.2.3	Résultats.....	52
3.2.2.3.1	Dynamique spatiale et temporelle des efflorescences de <i>L. chlorophorum</i> .....	52
3.2.2.3.2	Dynamique spatio-temporelle d'une eau colorée verte .....	56
3.2.2.3.3	Caractéristiques biogéochimiques d'une eau colorée verte .....	59
3.2.2.4	Discussion.....	59
3.2.2.5	Conclusions et perspectives.....	62
<b>4</b>	<b>Rôle des bactéries dans la production de substances polymériques extracellulaires par <i>L. chlorophorum</i> .....</b>	<b>63</b>
4.1	Contexte et objectifs.....	63
4.2	Mise en œuvre .....	63
4.2.1	Souches et conditions de culture .....	63
4.2.2	Protocole d'axénisation .....	64
4.2.3	Dispositif expérimental .....	64
4.2.4	Analyses chimiques et biologiques .....	65
4.2.4.1	Dosages des nutriments.....	65

4.2.4.2	Dosage du POC .....	65
4.2.4.3	Concentrations cellulaires de <i>L. chlorophorum</i> et de bactéries .....	65
4.2.4.4	Etat physiologique des cellules de <i>L. chlorophorum</i> .....	65
4.2.5	Etude des EPS : dosage de TEP et caractérisation des SEP .....	65
4.2.6	Mesures de viscosité .....	66
4.3	Résultats .....	66
4.3.1	Evaluation du protocole d'axénisation .....	66
4.3.2	Croissance de <i>L. chlorophorum</i> .....	67
4.3.3	Caractérisation des EPS .....	68
4.3.3.1	Concentrations en TEP .....	68
4.3.3.2	Composition des SEP .....	69
4.3.4	Modification de la viscosité .....	73
4.3.5	Comparaison des conditions axéniques et pseudo-axéniques .....	73
4.4	Discussion .....	74
4.5	Conclusion et perspectives .....	76
<b>5</b>	<b>Impact des eaux colorées verte sur la croissance et la mortalité des espèces exploitées .</b>	<b>77</b>
5.1	Contexte et objectifs .....	77
5.2	Mise en œuvre .....	77
5.2.1	Suivi hydro-biologique .....	78
5.2.2	Suivi ostréicole .....	78
5.2.2.1	Estimation de la mortalité .....	80
5.2.2.2	Estimation de la croissance .....	80
5.2.2.3	Biométrie .....	80
5.2.2.4	Traitement des données haute fréquence .....	81
5.2.3	Suivi mytilicole .....	81
5.3	Résultats .....	81
5.3.1	Contexte hydro-biologique .....	81
5.3.2	Suivi ostréicole .....	84
5.3.2.1	Mortalité .....	84
5.3.2.2	Croissance .....	85
5.3.2.3	Indice de remplissage de Lawrence et Scott (LS) .....	85
5.3.3	Suivi mytilicole .....	86
5.3.3.1	Mortalités .....	86
5.3.3.2	Croissance .....	87
5.4	Discussion .....	87
5.5	Conclusions et perspectives .....	88
<b>6</b>	<b>Conclusions générales .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>92</b>

<b>8</b>	<b>Valorisation</b> .....	<b>93</b>
8.1	Article scientifiques (rang A).....	93
8.1.1	Publiés.....	93
8.1.2	En préparation.....	93
8.2	Conférences.....	94
8.2.1	Internationales.....	94
8.2.2	Nationales.....	94
8.3	Thèse de doctorat.....	95
8.4	Rapports de stage.....	95
8.5	Vulgarisation scientifiques.....	95
8.5.1	Articles de presse écrite / web.....	95
8.5.2	Interviews télévision et radio.....	97
<b>9</b>	<b>Références</b> .....	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>Annexes</b> .....	<b>108</b>
10.1	Annexe 1: Questionnaire.....	108
10.2	Annexe 2 : Courrier accompagnant le questionnaire.....	111
10.3	Annexe 3 : Méthodes d'analyses.....	112
10.3.1	Concentration en nutriments inorganiques.....	112
10.3.2	Estimation de la biomasse phytoplanctonique : [Chla].....	112
10.3.3	Identification et énumération du phytoplancton en microscopie optique.....	112
10.3.4	Dosage des TEP (Transparent Exopolymer Particles).....	112
10.3.5	Carbone organique dissous, particulaire et azote organique particulaire.....	113
10.3.6	Analyse des SEP.....	113
10.4	Annexe 4 : Biométries des huitres de 18 mois.....	114

## Liste des figures

- Figure 1 : *Lepidodinium chlorophorum* contenant des plastes dérivés de chlorophytes. Les plastes (p) sont entourés de quatre membranes, avec une double membrane autour de chaque plaste, et une autre double membrane séparant l'endosymbionte de l'hôte. Entre ces doubles membranes se trouvent des structures reliques du cytoplasme de l'endosymbionte, dont des ribosomes apparents, des vésicules (v) et un possible nucléomorphe (n). Photographie de Kazuya Takahashi (Waller and Koreny, 2017). D'après Roux 2022. .... 17
- Figure 2 : Photographie aérienne d'une efflorescence de *L. chlorophorum*. Préfaïlles (France, 44), le 1<sup>er</sup> Aout 2014 (Minyvel, Yves Le Médec). .... 18
- Figure 3 : Recensement des observations du genre *Lepidodinium* (en rouge) et des deux espèces *L. viride* (en jaune) et *L. chlorophorum* (en vert) dans le monde selon les différentes techniques de détection utilisées : microscopie (cercles), biologie moléculaire (triangles) et observation satellitaire (étoiles). D'après Roux 2022..... 19
- Figure 4 : Cartographie résumant les observations de *L. chlorophorum* dans le cadre du réseau de surveillance REPHY sur la période allant de 1999 à 2018. Les résultats sont présentés par gamme de concentrations, en cellules par litre d'eau de mer. La taille des symboles est proportionnelle au P90 de la concentration cellulaire. La transparence des cercles varie linéairement avec le nombre d'observations de *L. chlorophorum* (cercle transparent = 1 observation ; cercle opaque = 240 observations) (d'après Belin *et al.*, 2021)..... 19
- Figure 5 : Eaux colorées signalées par les citoyens en 2013, 2014 et 2015 et taxons dominants identifiés par les taxonomistes phytoplanctoniques du consortium Phenomer dans les échantillons d'eau. Les stations d'échantillonnage du système national de surveillance du phytoplancton REPHY de l'Ifremer sont également indiquées (Siano *et al.*, 2020). .... 20
- Figure 6 : Kystes provenant d'une station d'échantillonnage d'eau de mer située La Brèche d'Hermanville (Calvados, France) maintenus en culture de laboratoire. Diamètre = 19-21  $\mu\text{m}$  (Ch. Billard) (Sournia *et al.*, 1992)..... 22
- Figure 7 : TEP associés à une cellule de *Lepidodinium chlorophorum*. Les TEP sont teintés en bleu par le Bleu Alcian (d'après Claquin *et al.*, 2008)..... 23
- Figure 8 : Réponses des mytiliculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalité au cours de l'année 2018. .... 26
- Figure 9 : Réponses des mytiliculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalités antérieurs..... 27
- Figure 10 : Réponses des ostréiculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalité au cours de l'année 2018. .... 28
- Figure 11 : Réponses des ostréiculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalités antérieurs..... 29
- Figure 12 : Stations d'échantillonnage de la colonne d'eau (étoile rouge) et du sédiment superficiel (cercles). Des échantillons d'eau ont été récoltés à une fréquence bi-mensuelle au cours des campagnes Lepido-Pen durant deux automne-hiver : de septembre 2019 à mars 2020, et de septembre 2020 à mars 2021. Les sédiments superficiels ont été récoltés en janvier-février 2019, à pied (cercles orange) ou à partir d'un bateau (cercles bleus) dans le cadre du projet EPICE (Schapira *et al.*, 2021)..... 33
- Figure 13 : Variabilité spatiale et temporelle des paramètres biologiques et physico-chimiques le long de la colonne d'eau sur la station Basse-Michaud au cours des périodes automne/hiver de 2019-2020 et 2020/2021. (A-B) Température ( $^{\circ}\text{C}$ ) ; (C-D) salinité ; (E-F) Turbidité (FNU) ; (G-H) concentration en ammonium ( $\text{NH}_4$ ;  $\mu\text{M}$ ) ; (I-J) Abondance relative du genre *Lepidodinium* au sein de la communauté de protistes (%) détectée par analyse de l'ADN environnemental (metabarcoding) ; (K-L) Abondance *L. chlorophorum* au sein de la communauté de protistes (cell

- L<sup>-1</sup>) déterminée à partir des comptages en microscopie optique. Représentation réalisée avec Ocean data view, 5.3.0. D'après Roux et al. (2023). ..... 35
- Figure 14 : Indices de stratification ( $\epsilon$ ) calculés pour chaque date d'échantillonnage sur les stations Ouest Loscolo (A, C) et Basse-Michaud (B, D) au cours de deux automne/hiver étudiés (2019-2020) et (2020-2021). D'après Roux et al. (2023). ..... 36
- Figure 15 : Variabilité spatiale et temporelle des paramètres biologiques et physico-chimiques le long de la colonne d'eau sur la station Ouest Loscolo au cours des périodes automne/hiver de 2019-2020 et 2020/2021. (A-B) Température (°C) ; (C-D) salinité ; (E-F) Turbidité (FNU) ; (G-H) concentration en ammonium (NH<sub>4</sub>;  $\mu$ M) ; (I-J) Abondance relative du genre *Lepidodinium* au sein de la communauté de protistes (%) détectée par analyse de l'ADN environnemental (metabarcoding) ; (K-L) Abondance *L. chlorophorum* au sein de la communauté de protistes (cell L<sup>-1</sup>) déterminée à partir des comptages en microscopie optique. Représentation réalisée avec Ocean data view, 5.3.0. D'après Roux et al. (2023). ..... 37
- Figure 16 : Analyse en Composante Principale (ACP) résumant les similarités et les différences entre les paramètres environnementaux et les abondances relatives de *Lepidodinium* sur les deux stations et au cours de deux automne/hiver étudiés. (A) Dim 1, Dim 2 et (B) Dim3 décrivent 76% de la variance totale observée. Les flèches noires représentent les variables quantitatives utilisées pour calculer la PCA : l'abondance relative de *Lepidodinium* par analyse de l'ADN environnemental (*Lepidodinium*, %) ; les concentrations en TEP ([TEP] ;  $\mu$ g Xeq L<sup>-1</sup>) ; azote inorganique ([NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>],  $\mu$ M) ; phosphate inorganique ([DIP] ;  $\mu$ M) ; silicates ([DSI],  $\mu$ M) ; ammonium ([NH<sub>4</sub>],  $\mu$ M) ; turbidité (Turb, FNU) ; saturation en oxygène ([O<sub>2</sub>], %) ; salinité (Sal) ; température (Temp, °C) ; profondeur (Depth, m). Les triangles bleus représentent les échantillons de Basse-Michaud et les cercles verts, les échantillons de Ouest Loscolo. Les ellipses de confiance (intervalle de confiance de 95%) permettent de distinguer les stations : Basse-Michaud en bleu et Ouest Loscolo en vert. D'après Roux et al. (2023). ..... 38
- Figure 17 : Diversité des kystes les plus fréquemment observés dans les sédiments superficiels au large de la Loire and et de la Vilaine. (A) *Votadinium spinosum*, (B) *Lingulodinium machaerophorum*, (C) *Gymnodinium impudicum*, (D) *Protoperidinium oblongum*, (E) Diplopsalids, (F) *Gonyaulax verior*, (G) *Spiniferites belerius*, (H) *Alexandrium minutum*, (I) kyste marron et épineux non identifié. D'après Roux et al. (2023). ..... 39
- Figure 18 : Kystes identifiés par PCR sur cellule unique. (A) kystes de *L. chlorophorum* observés par Sournia et al. (1992), (B) *Poterioochromonas malhamensis*, (C) kystes de dinoflagellés, (D) kystes de Cercozoa, (E) kyste de ciliés. D'après Roux et al. (2023). ..... 40
- Figure 19 : Distribution de l'ADN environnemental de *Lepidodinium* dans les sédiments superficiels au large de la Loire et de la Vilaine. Des duplicats d'échantillons de sédiment ont été prélevés et analysés pour chaque station (cercles orange et vert). La taille des cercles est proportionnelle à l'abondance relative de *Lepidodinium* dans les échantillons. Les stations échantillonnées sont : La Coupelasse (COUP), Croisic Large (CROI), Estuaire Loire (ESTL), Estuaire Vilaine (ESTV), Pointe Saint Gildas (GILS et GILV), Gourmalon (GOUR), Maresclé (MARE), Nord Dumet (NODU), Noirmoutier (NOIR), Penbé (PENB), Pénerf (PENF), Pont Mahé (PMAE), Pornichet (PORS et PORV), Traict du Croisic (TCRO) et La Turballe (TURB). D'après Roux et al. (2023). ..... 41
- Figure 20 : Exemple de tableaux établis pour cartographier les données disponibles et utilisables dans le cadre de cette étude. .... 44
- Figure 21 : Localisation des 5 baies : Brest (station « Lanvéoc »), Douarnenez (station « Kervel »), Concarneau (station « Concarneau »), Quiberon (station « Men er Roué ») et Vilaine (station « Ouest Loscolo ») d'où proviennent les séries temporelles REPHY étudiées sur la période allant de 1998 à 2019. D'après Roux (2022). ..... 44
- Figure 22 : Nombre d'observations de *L. chlorophorum* au sein de chacune des baies suivies dans le cadre du réseau REPHY entre 1998 et 2019. Une efflorescence de *L. chlorophorum* est définie



comme un évènement présentant des concentrations cellulaires > 10 <sup>5</sup> cells L <sup>-1</sup> (stratégie DCE). D'après Roux (2022).	45
Figure 23 : Abondances de <i>L. chlorophorum</i> (concentrations (Cell L <sup>-1</sup> ) enregistrées dans le cadre du REPHY sur les 5 baies étudiées et pour la période 1998-2015.	46
Figure 24 : Dynamique saisonnière des abondances de <i>L. chlorophorum</i> (échelle log) au cours de la période d'étude et sur les 5 sites. La ligne horizontale représente la valeur médiane pour chaque mois calculé sur la période d'étude et les boîtes représentent les premiers et troisième quartile. Les points représentent des valeurs extrêmes.	48
Figure 25 : Localisation des 6 stations suivies dans le cadre du projet Lepido-Pen au cours des années 2019, 2020 et 2021. Le point jaune représente la station Nord Dumet sur laquelle est positionnée une bouée instrumentée haute-fréquence (bouée MOLIT).	49
Figure 26 : (A–F) Exemples d'images Sentinel-2 (11, 16 et 21 Juillet 2019) acquises pendant l'épisode d'eau colorée verte de l'été 2019. Panel supérieur : images RGB; panel inférieur: rapport de réflectance $R_{rs}(705)/R_{rs}(665)$ utilisé comme un proxy des concentrations en chlorophylle a. (G) Localisation des stations suivies dans le cadre du suivi saisonnier en Baie de Vilaine ainsi que les stations d'échantillonnage de l'eau colorée verte étudiées le 9 juillet 2019. La carte montre une estimation qualitative des concentrations en chlorophylle a à partir d'une image Landsat-8 acquise le 9 juillet 2019. (H) Photographie de la surface de l'eau au sein de l'eau colorée verte étudiée. D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	51
Figure 27 : Variations des paramètres environnementaux et biologiques enregistrées au cours de l'année 2019 sur les deux stations de la Baie de Vilaine (« Ouest Loscolo » et « Nord Dumet ») et la station de la Baie de Quiberon (« Men Er Roue »). Les abondances de <i>L. chlorophorum</i> sont représentées en échelle log (cell L <sup>-1</sup> ). Les lignes pleines représentent les valeurs mesurées en sub-surface (1 m) et les lignes pointillées les valeurs relevées à proximité du fond. Les valeurs mesurées au maximum de fluorescence ne sont pas présentées sur la figure mais sont données dans le tableau 2. D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	53
Figure 28 : Données enregistrées sur la station Nord Dumet par la bouée instrumentée MOLIT. (A) Concentrations en oxygène dissous (mg L <sup>-1</sup> ), (B) salinité et (C) température (°C). En bleu clair les données enregistrées en sub-surface et en bleu foncé à proximité du fond. La ligne rouge sur la figure (A) représente le seuil d'hypoxie (2,9 mg L <sup>-1</sup> ). D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	54
Figure 29 : Abondance relative des principaux groupes micro-phytoplanctoniques observés en 2019 sur les trois stations étudiées en sub-surface (A, C et E) et à proximité du fond (B, D, F). Les cryptophycées (bleu), les diatomées (jaune), les dinoflagellés (vert foncé) et <i>L. chlorophorum</i> (vert clair). D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	54
Figure 30 : Débit de la Vilaine (m <sup>3</sup> sec <sup>-1</sup> ) enregistré entre Mai et Décembre 2019. Les données ont été acquises auprès de la banque Hydro ( <a href="http://www.hydro.eaufrance.fr/">http://www.hydro.eaufrance.fr/</a> ). D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	55
Figure 31 : Variations des concentrations en nutriments mesurées au cours de l'année 2019 sur les deux stations de la Baie de Vilaine (« Ouest Loscolo » et « Nord Dumet ») et la station de la Baie de Quiberon (« Men Er Roue »). Les lignes pleines représentent les valeurs mesurées en sub-surface (1 m) et les lignes pointillées les valeurs relevées à proximité du fond. D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	55
Figure 32 : Abondances relatives (%) des principaux groupes micro-phytoplanctoniques observés à l'intérieur (St1, St2 et St 3) et à l'extérieur (St4, St5 et St6) de l'eau colorée verte (A) en sub-surface et (B) à proximité du fond. Diatomées (jaune), dinoflagellés (vert foncé), <i>L. chlorophorum</i> (vert clair) et autres groupes (gris). Abondances relatives (%) des principaux genres phytoplanctoniques observés en sub-surface (C) et à proximité du fond (D). D'après Roux <i>et al.</i> (2022).	57

- Figure 33 : Distribution spatiale des paramètres biologiques et physico-chimiques le long du transect. **(A)** Abondances de *L. chlorophorum*, **(B)** température, **(C)** salinité, **(D)** silicates, **(E)** ammonium (NH<sub>4</sub>), **(F)** phosphates (DIP), **(G)** azote organique dissous (DON), **(H)** particules exopolymériques transparentes (TEP), **(I)** concentrations en chlorophylle *a* (Chl*a*), **(J)** nitrite (NO<sub>2</sub>), **(K)** nitrate (NO<sub>3</sub>), **(L)** carbone organique dissous (DOC), **(M)** carbone organique particulaire (POC), **(N)** azote organique particulaire (PON) mesurés à l'intérieur de l'ECV (St1, St2 et St3) et à l'extérieur (St4, St5 et St6). Ocean Data View, 5.3.0. D'après Roux *et al.* (2022). ..... 58
- Figure 34 : Boxplot représentant les variations des paramètres physico-chimiques de surface (température, salinité, turbidité, Chlorophylle *a* et concentrations en nutriments) entre 1998 et 2019 en Baie de Vilaine (station « Ouest Loscolo ») et Baie de Quiberon (station « Men Er Roue »). Données REPHY. D'après Roux *et al.* (2022). ..... 60
- Figure 35 : Concentrations en nutriments (A) silicates (DSI), phosphates (DIP) et ammonium (NH<sub>4</sub>) mesurées le long du gradient de salinité dans l'estuaire de la Vilaine. Les concentrations enregistrées le 8 juillet 2019 sur la station la plus amont de l'estuaire (salinité= 32) ont été ajoutées afin d'évaluer l'origine des différents éléments nutritifs. D'après Roux *et al.* (2022). ..... 62
- Figure 36 : Concentrations cellulaires de *L. chlorophorum* (lignes continues ; cell mL<sup>-1</sup>) et de bactéries (lignes discontinues ; bacteria cell mL<sup>-1</sup>) pour les trois souches étudiées (RCC1489 en bleu ; KL1C4 en vert ; MAR1D2 en orange), **(A)** en condition non-axénique (NA) et **(B)** condition pseudo-axénique (PA). Les symboles représentent la moyenne et les barres d'erreur les écarts type entre les trois répliques de culture. D'après Roux *et al.* (2021). ..... 68
- Figure 37 : Concentrations moyennes en TEP (mg Xeq L<sup>-1</sup>) mesurées sous conditions **(A)** non-axénique (NA) et **(B)** pseudo-axénique (PA) et production cellulaire moyenne de TEP (mg Xeq cell<sup>-1</sup>) estimée pour les conditions **(C)** NA et **(D)** PA pour les trois souches étudiées (RCC1489 en bleu ; KL1C4 en vert ; MAR1D2 en orange) et durant les trois différentes phases de croissance. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types (n=3). D'après Roux *et al.* (2021). ..... 69
- Figure 38 : Composition en monosaccharides, protéines et sulfate (% en poids) de SEP provenant de surnageants, à trois temps de croissance, pour les trois souches de *L. chlorophorum* dans des conditions non axéniques (NA) : A) RCC1489, C) KL1C4, E) MAR1D2 et pseudo- conditions axéniques (PA) : B) RCC1489, D) KL1C4, F) MAR1D2 (n = 1). Prot : Protéines ; S : Soufre ; Rha : rhamnose ; Homme : Mannose ; Gal : Galactose ; Gc : Glucose ; GlcA : acide glucuronique ; GalA : acide galacturonique ; Fuc : Fucose. \* Les échantillons n'ont pas été analysés pour leur teneur en soufre en raison d'une quantité d'échantillon insuffisante pour l'analyse élémentaire. D'après Roux *et al.*, (2021). ..... 70
- Figure 39 : Profils HPSEC (avec détecteurs UV et RI) des surnageants de culture obtenus pour trois souches de *L. chlorophorum*, au cours des trois temps de croissance, dans des conditions non axéniques (NA) : A) RCC1489, C) KL1C4, E) MAR1D2 et pseudo-axénique ( PA) conditions : B) RCC1489, D) KL1C4, F) MAR1D2. (Logiciel Astra 6.1 (TECHNOLOGIE WYATT)). D'après Roux *et al.* (2021). ..... 71
- Figure 40 : Profils HPSEC (détecteurs RI) des surnageants de culture obtenus pour trois souches de *L. chlorophorum* en phase stationnaire : RCC1489, KL1C4, MAR1D2 en conditions non axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). D'après Roux *et al.* (2021). ..... 72
- Figure 41 : Electrophorèse des surnageants de culture de *L. chlorophorum* (souches RCC1489, KL1C4 et MAR1D2) en phase stationnaire en conditions NA et PA après coloration SYPROTM Ruby (A), Schiff (B) et Stains All (C). Pistes 1 à 5 : références comme suit, piste 1 : albumine de sérum bovin, piste 2 : E. coli O111:B4 LPS, piste 3 : sulfate de galactane 7,7 % S, piste 4 : sel de sodium de sulfate de dextrane (MW 50 000, 16,0- 19,0 % S), piste 5 : sel de sodium de sulfate de dextran (MW 500 000, 16,0-19,0 % S). Pistes 6 et 7 : RCC1489 en conditions NA et PA, pistes 8 et 9 : KL1C4 en conditions NA et PA et pistes 10 et 11 : MAR1D2 en conditions NA et PA. D'après Roux *et al.* (2021). ..... 72

Figure 42 : Analyse en Composante Principale (ACP) réalisée sur l'ensemble du jeux de données. Cette représentation illustre les similarités et différences entre les conditions non-axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). Dim1 et Dim2 expliquent 79,6% de la variance totale. Les flèches noires représentent les variables quantitatives utilisées dans le calcul de la PCA. Concentration cellulaire en bactéries ([bacteria cells mL<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.65; Dim2 = 0.61); concentration cellulaire des dinoflagellés ([Cell] in cells mL<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.70; Dim2 = -0.60); concentration en TEP ([TEP] in mg Xeq L<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.89; Dim2 = 0.03); concentration en carbone organique particulaire ([POC] in mg L<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.96; Dim2 = -0.03); concentration en azote ([NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>] in μM: Dim1 = -0.92; Dim2 = 0.31), phosphate ([PO<sub>4</sub>] in μM: Dim1 = -0.85; Dim2 = -0.07) et ammonium ([NH<sub>4</sub>] in μM: Dim1 = 0.39; Dim2 = 0.64). Les flèches en pointillés bleus représentent les variables illustratives : temps en jours ([Days]) et augmentation relative de viscosité ([Viscosity] en %). Les différentes souches sont représentées comme : RCC1489 (cercles bleus), KL1C4 (carrés verts) and MAR1D2 (triangles oranges) en condition non-axénique (NA ; symboles pleins) et pseudo-axénique (PA ; symboles vides). Les grands symboles sont les barycentres de chaque groupe et les ellipses (intervalle de confiance de 95%) permettent de distinguer les conditions NA (ellipse noire) et PA (ellipse grise). D'après Roux *et al.* (2021). ..... 74

Figure 43 : Localisation des sites d'étude..... 78

Figure 44 : Echantillonnage et mesure des paramètres physico-chimiques. (A) sonde multi-paramètres (NKE MP6) immergé. (B) : prélèvement des échantillons à partir de la bouteille NISKIN. .... 78

Figure 45 : Dispositif expérimental déployé sur le site de Pen Bé. .... 79

Figure 46 : Dispositif expérimental déployé sur le site de Pen Bé/Pont Mahé..... 81

Figure 47 : Abondances de *L. chlorophorum* (A), concentrations en chlorophylle *a* (B ; [Chl*a*] ; μg L<sup>-1</sup>) et en TEP (C ; μg Xeq L<sup>-1</sup>) mesurées sur le site de Merquel en 2019, 2020 et 2021. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type..... 82

Figure 48 : Evolution de la concentration en oxygène dissous([O<sub>2</sub>] ; mg/L) dans l'eau de mer en juillet et aout 2019, 2020 et 2021. Le trait pointillé rouge représente le seuil d'hypoxie des bivalves, seuil fixé à 2,9 mg/l (Diaz et Rosenberg, 2008) et les différentes couleurs correspondent aux différentes sondes positionnées sur le site expérimental..... 83

Figure 49: Evolution de la mortalité cumulée (Mc) moyenne (3 poches) du naissain et des huitres de 18 mois au cours des années 2019 (en vert), 2020 (en rouge) et 2021 (en bleu). En 2019, les cercles verts vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles verts colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N+2N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium Costale*. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type. .... 84

Figure 50 : Evolution de la croissance cumulée (Cc ;%) moyenne (3 poches) du naissain et des huitres de 18 mois au cours des années 2019 (en vert), 2020 (en rouge) et 2021 (en bleu). En 2019, les cercles verts vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles verts colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N+2N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium costale*. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type..... 85

Figure 51 : Évolution de la valeur moyenne de l'indice de Lawrence et Scott (LS) calculé à partir des biométries réalisées sur les 30 individus de 18 mois prélevés à chaque sortie au cours des années 2019 (en rouge), 2020 (en bleu) et 2021 (en vert). En 2019, les cercles verts vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles verts colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N+2N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium costale*. En

2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type.....	86
Figure 52 : Evolution de la mortalité instantanée (Mi (%); A et C) et de la mortalité cumulée (Mc (%); B et D) des moules au cours des années 2019 (A et B) et 2020 (C et D).....	86
Figure 53 : Evolution de la structure de taille des moules au cours du temps entre la mise en poche (A et C) et la fin du suivi (B et D) pour l'année 2019 (A et B) et l'année 2020 (C et D).....	87
Figure 54 : Expérimentation en milieu contrôlé visant à étudier la physiologie de l'huître creuse <i>C. gigas</i> exposée à <i>L. chlorophorum</i> (Projet CloClo). (A) Phase d'exposition des huîtres. Les trois bacs sans huîtres permettent de suivre le comportement des cultures de micro-algue au cours du temps. (B) Banc écophysologique. (C) Enceintes individuelles. ....	89
Figure 55 : (A) Longueur moyenne de la coquille (mm), (B) masse totale moyenne (g), (C) masse moyenne de la coquille(g) et (D) masse sèche moyenne (g) sur les 30 individus de 18 mois prélevés lors de chaque sortie sur le site de Pen Bé entre avril 2019 et décembre 2021. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance 95% (n=30). En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire.....	114

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Observations des eaux colorées vertes recensées par le projet de sciences participatives Phenomer au cours de l'été 2018 sur la zone d'étude et abondances maximales observées. Les stations échantillonnées au cours de l'hiver 2019/2020 sont localisées sur les figures 12 et 19. D'après Roux <i>et al.</i> (2023).....	42
Tableau 2 : Abondances de <i>L. chlorophorum</i> enregistrées au maximum de fluorescence (Fmax) sur les trois stations étudiées. D'après Roux <i>et al.</i> (2022).....	52
Tableau 3 : Estimation de la surface du bloom à partir des observations des images Sentinel-2 (NA: Bloom visible mais surface non calculée à cause la couverture nuageuse), conditions tidales, hauteurs d'eau et cycle de marée (données SHOM). D'après Roux <i>et al.</i> (2022). ....	56
Tableau 4. Nombre moyen de bactéries par cellule de <i>L. chlorophorum</i> (moyenne $\pm$ s.d.) dénombrées au cours des trois différentes phases de croissance (stationnaire: « Lag » ; exponentielle : « Expo. » ; stationnaire : « Stat. ») pour les trois souches (RCC1489, KL1C4 et MAR1D2) dans des conditions non axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). Les valeurs moyennes et d'écart type ont été calculées à partir des valeurs mesurées dans les trois réplicats (n = 3). Le pourcentage d'axénisation a été calculé selon la formule suivante : $Axénisation \% = 100 - (PANA * 100)$ . D'après Roux <i>et al.</i> (2021). ....	67
Tableau 5 : Rendements des SEP (Y ; g L <sup>-1</sup> ) à partir du surnageant des trois souches de <i>L. chlorophorum</i> au cours des différentes phases de croissance, pour les conditions non-axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). nd : non déterminé car les valeurs ont été surestimées dû à la présence de sel. D'après Roux <i>et al.</i> , 2021. ....	70
Tableau 6 : Moyenne de l'augmentation relative de viscosité $\eta$ (%) au cours des différentes phases de croissance sous les conditions non-axénique (NA) et pseudo-axénique (PA) et pour les trois souches de <i>L. chlorophorum</i> étudiées (RCC1489, KL1C4 et MAR1D2). D'après Roux <i>et al.</i> (2021). ....	73
Tableau 7 : Concentration maximale de TEP (TEPmax ; mg Xeq L <sup>-1</sup> ) produite par différentes espèces de phytoplancton cultivées en culture (majoritairement non axénique). CCMP : Centre National de Culture de Phytoplancton Marin Provasoli-Guillard ; PML : Laboratoire marin de Plymouth ; UNC : Université de Caroline du Nord ; RCC : Collection Culture Roscoff ; NS : isolat de la mer du Nord ; SBC : isolé du canal de Santa Barbara, au large de la Californie ; AS : isolat d'Ariake Sound (Japon) ; OW : Oyashio Waters (Japon). D'après Roux <i>et al.</i> (2021).....	76
Tableau 8 : Caractéristiques des lots d'huîtres suivi sur le site de Pen Bé en 2019, 2020 et 2021	79

# 1 Introduction

## 1.1 Etat de l'art

### 1.1.1 *Lepidodinium chlorophorum* : un dinoflagellé pas comme les autres

*Lepidodinium chlorophorum* appartient à la classe des Dinophyceae, ordre des Gymnodiniales, genre *Lepidodinium*.

Au sein des dinoflagellés, le genre *Lepidodinium* est reconnaissable par sa couleur verte qui lui est spécifique (Siano *et al.*, 2009 ; Figure 1). D'un point de vue phylogénétique, le genre *Lepidodinium* constitue un clade distinct, démontrant qu'il aurait suivi une lignée évolutive différente au sein des Gymnodiniales. Cette séparation monophylétique du clade *Lepidodinium* permet de bien identifier le genre à l'aide d'outils génétiques (qPCR et métabarcoding).

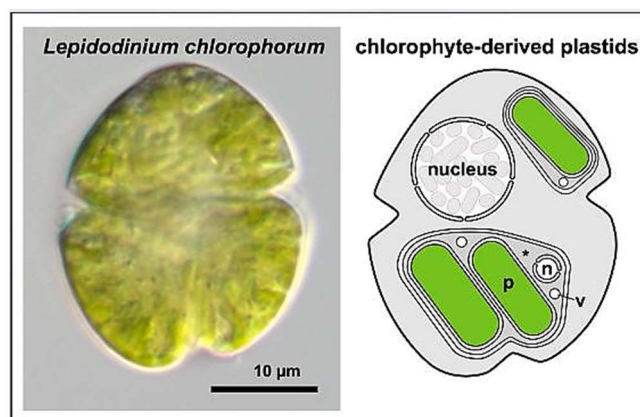


Figure 1 : *Lepidodinium chlorophorum* contenant des plastes dérivés de chlorophytes. Les plastes (p) sont entourés de quatre membranes, avec une double membrane autour de chaque plaste, et une autre double membrane séparant l'endosymbionte de l'hôte. Entre ces doubles membranes se trouvent des structures reliques du cytoplasme de l'endosymbionte, dont des ribosomes apparents, des vésicules (v) et un possible nucléomorphe (n). Photographie de Kazuya Takahashi (Waller and Koreny, 2017). D'après Roux 2022.

La présence de pigments verts, notamment la chlorophylle *b*, chez les membres du genre *Lepidodinium* suggère un remplacement des plastes chez ces dinoflagellés au cours de leur évolution (Watanabe *et al.*, 1987). Minge *et al.* (2010) ont démontré que *Lepidodinium* exprimait des protéines plastidiques ayant des origines diverses, probablement acquises par transfert endosymbiotique de gènes. Des analyses phylogénétiques plus récentes ont établi que cet endosymbionte appartiendrait au groupe des algues vertes pedinophyceae (Matsumoto *et al.*, 2011, 2012 ; Kamikawa *et al.*, 2015) et Jackson *et al.* (2018) ont estimé à ~ 553 Ma la divergence de la lignée plastidiale de *Lepidodinium* par rapport à ses sœurs pedinophyceae.

A ce jour, seules deux espèces appartenant au genre *Lepidodinium* ont été identifiées à travers le monde : *L. viride* (Watanabe *et al.*, 1990) et *L. chlorophorum* (Elbrachter and Schnepf, 1996 ; Hansen, Botes and Salas, 2007). Les deux espèces possèdent une gamme de taille similaire (Honsell and Talarico, 2004). Cependant, *L. viride* se distingue par la présence d'écaillés à la surface de ses cellules qui ne sont pas présentes chez son congénère *L. chlorophorum* (Siano *et al.*, 2009).

*Lepidodinium chlorophorum* un dinoflagellé « nu » car il ne possède pas de thèque (Waller and Kořený, 2017). Ses cellules sont de forme ovoïde dont la taille varie entre 18-33 µm en longueur et 12-18 µm en largeur (Elbrachter and Schnepf, 1996) et présentent une forte coloration verte en microscopie optique (Figure 1). *L. chlorophorum* possède en effet un contenu pigmentaire particulier composé de néoxanthine, violaxanthine, chlorophylle *a* et *b*, ainsi que d'un nouveau caroténoïde majoritaire (Zapata *et al.*, 2012), décrit par Gavalàs-Olea *et al.* (2016) et nommé lepidoxanthine.



La prolifération massive de *L. chlorophorum* en période estivale est à l'origine d'eaux colorées vertes (Figure 2).



Figure 2 : Photographie aérienne d'une efflorescence de *L. chlorophorum*. Préfailles (France, 44), le 1<sup>er</sup> Aout 2014 (Minyvel, Yves Le Médec).

## 1.1.2 Distribution de *L. chlorophorum*

### 1.1.2.1 Dans l'océan mondial

Très peu d'études ont été menées sur la distribution de *L. chlorophorum* et peu d'observations de cette espèce ont été recensées à travers le monde (Figure 3).

Concernant l'espèce *L. viride*, des souches ont été isolées en 1985 sur la côte nord du Japon (souche Y-100 ; Watanabe *et al.*, 1987) et en Afrique du sud en 1997 (souche CTCC 17 ; Hansen *et al.*, 2007). Néanmoins, *L. viride* a principalement été observé en mer Méditerranée notamment dans le Golfe de Naples (Siano *et al.*, 2009) et le long de la côte Catalane (René, 2014 ; Sampedro *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, cette espèce n'a jamais été détectée le long de la côte Atlantique française.

La distribution de l'espèce *L. chlorophorum* est relativement mieux répertoriée (Figure 3). Bien que de rares études aient mis en évidence la présence de cette espèce en zone tropicale (*i.e.* Golfe de Californie (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014) ; Mer Rouge (Georges *et al.*, 2021) ; côte Pakistanaise (Khokhar *et al.*, 2021), cette dernière a principalement été observée en zone tempérée. En effet, *L. chlorophorum* a été identifié le long de la côte Algérienne (Illoul *et al.*, 2008), en mer de Chine orientale (souche NIES-1867 ; Takishita *et al.*, 2008) mais également sur les côtes de la Tasmanie (Hansen *et al.*, 2007 ; McCarthy, 2013), du Chili (Iriarte *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Benito *et al.*, 2020) et d'Argentine (Uhart *et al.*, 2009). En Europe, *L. chlorophorum* a été observé en mer Adriatique (Honsell and Talarico, 2004), en mer du Nord (Elbrächter and Schnepf, 1996), le long de la côte Belge (Mitra *et al.*, 2021) ou encore sur les côtes Danoises (Karlson *et al.*, 2021). La présence de *L. chlorophorum* est bien documentée en Manche (Napoléon *et al.*, 2014 ; Serre-Fredj *et al.*, 2021) et dans le Golfe de Gascogne (Sournia *et al.*, 1992 ; Sourisseau *et al.*, 2016 ; Benedetti *et al.*, 2019 ; Belin *et al.*, 2021).

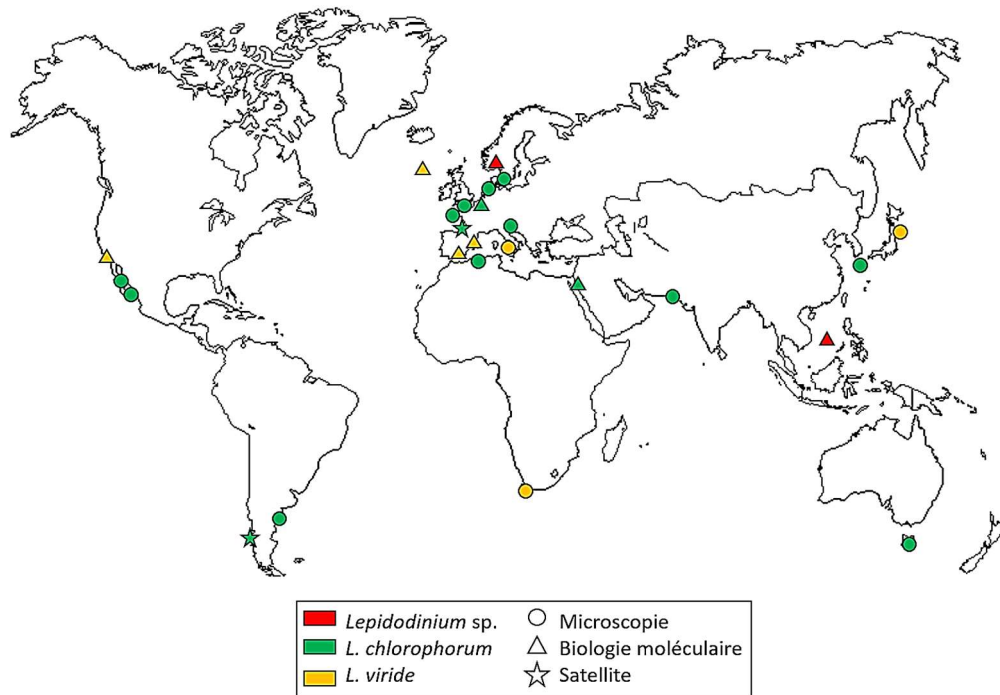


Figure 3 : Recensement des observations du genre *Lepidodinium* (en rouge) et des deux espèces *L. viride* (en jaune) et *L. chlorophorum* (en vert) dans le monde selon les différentes techniques de détection utilisées : microscopie (cercles), biologie moléculaire (triangles) et observation satellitaire (étoiles). D'après Roux 2022.

#### 1.1.2.2 Sur les côtes françaises

En France, les données issues du réseau de surveillance REPHY montrent que les proliférations massives de *L. chlorophorum* (concentrations cellulaires  $> 10^6$  cellules par litre d'eau de mer) se produisent régulièrement en Bretagne sud (Belin *et al.*, 2021 ; Figure 4).

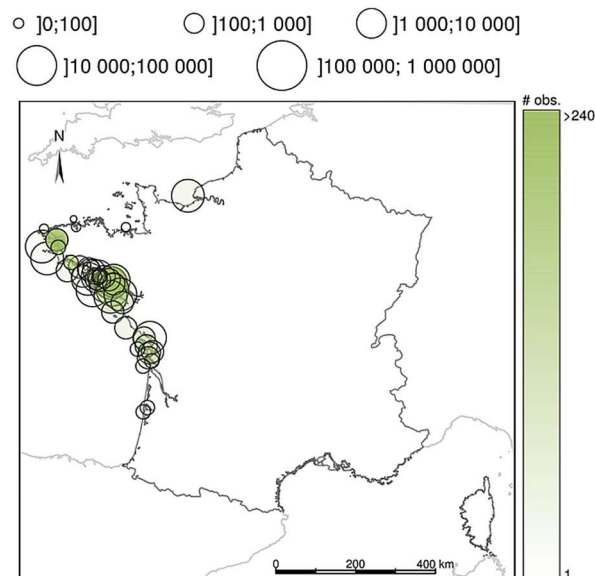


Figure 4 : Cartographie résumant les observations de *L. chlorophorum* dans le cadre du réseau de surveillance REPHY sur la période allant de 1999 à 2018. Les résultats sont présentés par gamme de concentrations, en cellules par litre d'eau de mer. La taille des symboles est proportionnelle au P90 de la concentration cellulaire. La transparence des cercles varie linéairement avec le nombre d'observations de *L. chlorophorum* (cercle transparent = 1 observation ; cercle opaque = 240 observations) (d'après Belin *et al.*, 2021).

Depuis le premier épisode d'eau colorée verte à *L. chlorophorum* observé en 1982 (Sournia *et al.*, 1992), ces événements ont lieu presque chaque année.

Les données acquises dans le cadre du projet de sciences participative Phenomer montrent également que les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* ont été les phénomènes les plus fréquemment rapportés par les citoyens sur ce secteur entre 2013 et 2015 (Siano *et al.*, 2020) (Figure 5).

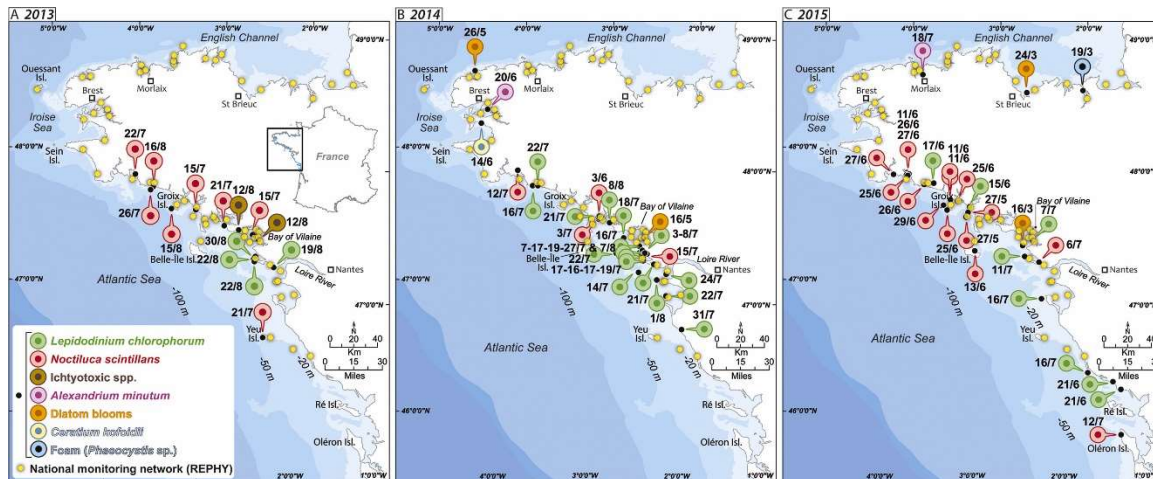


Figure 5 : Eaux colorées signalées par les citoyens en 2013, 2014 et 2015 et taxons dominants identifiés par les taxonomistes phytoplanctoniques du consortium Phenomer dans les échantillons d'eau. Les stations d'échantillonnage du système national de surveillance du phytoplancton REPHY de l'Ifremer sont également indiquées (Siano *et al.*, 2020).

Enfin, un inventaire des eaux colorées observées sur cette zone a mis en évidence une augmentation de la fréquence des épisodes d'eaux colorées vertes depuis les années 1980 (Projet DIETE ; Souchu *et al.*, 2018). Ces proliférations apparaissent donc récurrentes et massives sur le littoral de Bretagne sud (Souchu *et al.*, 2018; Siano *et al.*, 2020). Cette zone côtière, sous l'influence directe des panaches de la Loire et de la Vilaine, est un secteur très impacté par le phénomène d'eutrophisation<sup>1</sup> anthropique (Ratmaya *et al.*, 2019). L'augmentation de la biomasse phytoplanctonique ainsi que l'intensification et la multiplication des efflorescences d'espèces phytoplanctoniques toxiques ou nuisibles sont un des symptômes de l'eutrophisation couramment observés à l'échelle globale (Cloern, 2001 ; Heisler *et al.*, 2008 ; Glibert *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Ecologie de *L. chlorophorum*

A l'instar de sa distribution, l'écologie de *L. chlorophorum* est relativement mal connue car peu d'études ont été menées à ce jour sur cette espèce (Sourisseau *et al.*, 2016). Les quelques éléments disponibles sont détaillés ci-après.

#### 1.1.3.1 Niche écologique et cycle de vie

En France, ce dinoflagellé a été principalement recensé en Bretagne sud et à proximité de l'estuaire de la Loire (Sournia *et al.*, 1992 ; Belin *et al.*, 2021). Il est observé d'avril à novembre dans la colonne d'eau avec des abondances maximales pouvant excéder 10 millions de cellules

<sup>1</sup> L'eutrophisation anthropique est définie comme l'ensemble des réponses biogéochimiques d'un écosystème aquatique à un enrichissement en nutriments, azote et phosphore (Smith, 2003 ; Pinay *et al.*, 2017), se manifestant par une augmentation de la production de matière organique (Nixon, 1995 ; Cloern, 2001). L'enrichissement des écosystèmes aquatiques en nutriments est majoritairement provoqué par les rejets d'eaux usées domestiques et industrielles et les activités agricoles.



par litre d'eau de mer au cours de l'été (Belin *et al.*, 2021). Cependant, de rares efflorescences ont déjà été observées au début du printemps, lorsque l'intensité lumineuse commence à augmenter (Karasiewicz *et al.*, 2020).

En milieu contrôlé, il a été suggéré que ce dinoflagellé puisse supporter d'importantes variations de température (12 à 30°C ; Claquin *et al.*, 2008) indiquant qu'il s'agit d'une espèce eurythermale. De plus, *L. chlorophorum* se développant principalement dans les eaux côtières sous l'influence de panaches fluviaux, il peut être considéré comme une espèce euryhaline (Sournia *et al.*, 1992 ; Sourisseau *et al.*, 2016). De manière plus générale, une étude récente a décrit la niche écologique de ce dinoflagellé qui se caractérise par des conditions environnementales estivales (*i.e.* irradiance, salinité et température élevées associées à de faibles concentrations en nutriments ; Karasiewicz *et al.*, 2020). D'autre part, des études ont suggéré que *L. chlorophorum* pourrait être capable de migrer dans la colonne d'eau. En effet, dans le Golfe de Gascogne, Sourisseau *et al.* (2016) ont enregistré de fortes abondances de *L. chlorophorum* ( $> 10^6$  cells L<sup>-1</sup> à au niveau de la pycnocline  $\approx 25$  m). Toutefois, la migration verticale n'a jamais été directement observée pour cette espèce.

Les connaissances concernant les conditions nutritives soutenant la croissance de *L. chlorophorum* restent parcellaires. A l'instar de nombreux dinoflagellés (Bressler and Ahmed, 1984), *L. chlorophorum* pourrait avoir une forte affinité pour l'ammonium. En effet, une étude *in situ* menée au sein d'une efflorescence de *L. chlorophorum* a mis en évidence l'activité de la glutamine synthétase, principale enzyme assimilant l'ammonium (Iriarte *et al.*, 2005). D'autre part, un pédoncule d'alimentation a été observé par microscopie électronique dans les cellules de *L. chlorophorum*, suggérant que cette espèce pourrait être mixotrophe (Hansen and Moestrup, 2005). Cependant, le caractère vestigial ou non de cette structure reste à étudier. Certaines études menées en laboratoire en conditions contrôlées ont utilisé le genre *Lepidodinium* comme prédateur (Wai *et al.*, 2017 ; Deng *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2021) et tendent à renforcer l'hypothèse d'un régime mixotrophe chez ces dinoflagellés. Liu *et al.* (2021) ont également suggéré que le genre *Lepidodinium* serait mixotrophe facultatif, c'est-à-dire qu'il présenterait un mode de vie phototrophique obligatoire mais pourrait ajuster son alimentation phagocytaire en fonction des concentrations en nutriments inorganiques présentes dans le milieu. Cependant, ces travaux ont été menés sur le genre *Lepidodinium* sans préciser davantage l'espèce étudiée et, à notre connaissance, la mixotrophie n'a pas encore été clairement établie chez l'espèce *L. chlorophorum*.

Le cycle de vie de *L. chlorophorum* a également peu été étudié à ce jour. En effet, le cycle de vie de certains dinoflagellés repose sur l'alternance entre une phase planctonique et une phase benthique. Brièvement, lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, ces espèces sont capables de former des kystes de dormance qui sédimentent sur le fond. Ces kystes benthiques sont capables de germer et redonner des cellules végétatives planctoniques, capables de générer un nouveau bloom dans la colonne d'eau. La remise en suspension du sédiment, sous l'action des courants, des tempêtes ou lors de dragage, peut donc contribuer à la génération d'un nouveau bloom. Les sites sur lesquels s'accumulent les kystes constituent donc des zones à risque. L'existence de kystes de résistance chez *L. chlorophorum* a été suggérée par les observations de Sournia *et al.* (1992). En effet, ces auteurs ont observé des kystes dans des échantillons d'eau de mer frais ainsi que dans des échantillons conservés au formol et au glutaraldéhyde. Ils décrivent ces kystes comme sphériques présentant une double membrane et dont le noyau reste visible à l'intérieur (Figure 6). Cependant, aucune germination de kystes n'avait été observée au bout de 3 mois d'incubation d'échantillons d'eau de mer *in vitro* (Sournia *et al.*, 1992). Ainsi, la formation de kystes benthiques par *L. chlorophorum* n'a pas été clairement établie et à l'instar d'autres dinoflagellés, la formation de stades de résistance pélagiques peut être envisagée. Une meilleure connaissance du cycle de vie de *L. chlorophorum* est essentielle à une meilleure compréhension de la phénologie des blooms que ce soit à l'échelle saisonnière comme à l'échelle interannuelle.



Figure 6 : Kystes provenant d'une station d'échantillonnage d'eau de mer située La Brèche d'Hermanville (Calvados, France) maintenus en culture de laboratoire. Diamètre = 19-21  $\mu\text{m}$  (Ch. Billard) (Sournia *et al.*, 1992).

Afin de mieux comprendre les déterminismes des efflorescences de *L. chlorophorum*, il reste donc à mettre en évidence les facteurs environnementaux contrôlant la dynamique spatio-temporelle de ce dinoflagellé. De plus, la question se pose de savoir si ces efflorescences de *L. chlorophorum* pourraient dériver d'une germination et/ou de la prolifération de formes de résistance de l'espèce.

#### 1.1.3.2 Particules exo-polymériques transparentes (TEP) : un trait biologique particulièrement développé chez *L. chlorophorum*

Les micro-organismes marins, autotrophes et hétérotrophes, peuvent excréter de grandes quantités de carbone sous la forme de substances polymériques extracellulaires (Extracellular Polymeric Substances ; EPS). En effet, chez les organismes phytoplanctoniques, une part non négligeable du carbone fixé au cours de la photosynthèse n'est pas intégrée dans les composés structurels, fonctionnels ou de réserve des cellules, mais peut être excrétée sous forme de substances dissoutes riches en polysaccharides (Passow, 2002 ; Wotton, 2004 ; Morelle, 2017). Les particules exo-polymériques transparentes (TEP) constituent la fraction particulaire des EPS (Bhaskar and Bhosle, 2005). Ils sont définis comme des particules (*i.e.*, Taille > 0,22  $\mu\text{m}$ ) pouvant être colorées par le Bleu Alcian (Aldredge *et al.*, 1993 ; Passow, 2002).

Une des rares études menées en laboratoire sur *L. chlorophorum* a mis en évidence des concentrations élevées TEP au sein de cultures non-axéniques de cette espèce (Claquin *et al.*, 2008). En effet, dans cette étude les auteurs ont mesuré des concentrations en TEP jusqu'à 10 fois plus élevées au sein des cultures de *L. chlorophorum* que celles mesurées dans les cultures de 7 autres espèces phytoplanctoniques. D'après ces auteurs, la part de carbone fixé excrété sous forme de TEP s'élèverait à 70,8% pour *L. chlorophorum*, alors qu'elle ne représenterait que 6,7 à 30% du carbone fixé chez les autres espèces testées dans cette étude. Ainsi, l'excrétion de carbone sous forme de TEP serait un trait biologique particulièrement développé chez *L. chlorophorum* qui pourrait en partie expliquer le caractère « nuisible » de ce dinoflagellé.

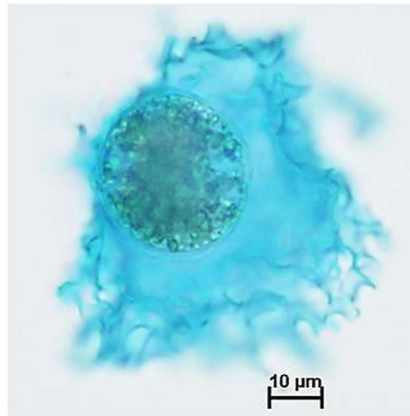


Figure 7 : TEP associés à une cellule de *Lepidodinium chlorophorum*. Les TEP sont teintées en bleu par le Bleu Alcian (d'après Claquin *et al.*, 2008).

En effet, les TEP peuvent jouer un rôle non-négligeable sur les cycles biogéochimiques et le fonctionnement des écosystèmes (Passow *et al.*, 2001 ; Mari *et al.*, 2017 ; Bittar *et al.*, 2018). Ils forment de parfaits microenvironnements au sein desquels l'activité bactérienne est élevée (Alldredge and Gotschalk, 1989 ; Schapira *et al.*, 2012a, b) et tendent à accélérer la sédimentation de la matière organique vers les fonds marins, pouvant ainsi favoriser les phénomènes d'hypoxie en milieu côtier (Passow *et al.*, 2001).

Les TEP représentent également une portion conséquente de la production primaire disponible pour les consommateurs et entretiennent donc les réseaux trophiques.

Les TEP sont également susceptibles de modifier les propriétés rhéologiques de l'eau de mer en augmentant sa viscosité (Passow, 2002) et de telles modifications peuvent avoir des conséquences sur les processus se déroulant à micro-échelle (*i.e.*, infection virale, acquisition d'éléments nutritifs, interactions proies-prédateurs). Par exemple, il a été démontré que des modifications de viscosité de l'eau de mer pouvaient contrôler la fréquence de battement des cils chez *Mytilus edulis* et donc impacter le taux de filtration chez les moules (Riisgard and Larsen, 2007).

*Ainsi, de fortes concentrations en TEP au sein d'une eau colorée verte à L. chlorophorum pourraient avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement des écosystèmes impactés, les cycles biogéochimiques et en partie expliquer les mortalités d'organismes marins sessiles et vagiles lors de ces épisodes. Pour valider cette hypothèse, il reste cependant à estimer les quantités de TEP produites lors d'une eau colorée verte à L. chlorophorum en milieu naturel. Par ailleurs, les bactéries peuvent aussi produire des exo-polysaccharides et donc contribuer au stock de TEP (Thornton, 2014 ; Zhang et al., 2015 ; Xiao and Zheng, 2016). Or, la production de TEP par L. chlorophorum a été montrée en culture non axénique (Claquin et al., 2008). Afin de comprendre la dynamique de production des TEP au cours d'une efflorescence, il convient donc d'identifier le rôle des bactéries et de L. chlorophorum dans cette production. Enfin, la composition des exo-polysaccharides produits par L. chlorophorum et/ou ses bactéries associées reste à étudier. Ces connaissances sont essentielles pour mieux comprendre et évaluer les processus de dégradation de cette matière organique au cours du temps.*

## 1.2 Contexte et objectifs de l'étude

Les écosystèmes côtiers peuvent être soumis à des phénomènes d'eutrophisation (e.g. de Jonge *et al.*, 2002). Parmi les effets majeurs de l'eutrophisation, une intensification des efflorescences d'espèces phytoplanctoniques toxiques ou nuisibles a été observée (e.g. Heisler *et al.*, 2008). Les pertes économiques liées à ces efflorescences toxiques et/ou nuisibles ont été évaluées à plusieurs millions d'euros, soulignant l'importance socio-économique de tels phénomènes en Europe (Stolte *et al.*, 2001).

Le secteur côtier situé sous l'influence de la Loire et de la Vilaine constitue la zone littorale la plus vulnérable de la côte Atlantique vis-à-vis de l'eutrophisation, et une multiplication des phénomènes d'eaux colorées a été observée sur ce secteur au cours des deux dernières décennies (Souchu *et al.*, 2018). Plusieurs types d'eaux colorées sont observées régulièrement sur cette zone, parmi lesquels les eaux vertes à *Lepidodinium chlorophorum*. Depuis les premières observations en 1982, plus des deux tiers des eaux colorées recensées sur la zone sont des eaux vertes à *L. chlorophorum*, et depuis 2007, de tels épisodes sont recensés pratiquement chaque année le long du littoral (Souchu *et al.*, 2018 ; Siano *et al.*, 2020).

Bien que *L. chlorophorum* ne soit pas toxique, les eaux colorées vertes liées au développement intense de ce dinoflagellé ont été associées à des mortalités massives de poissons et de bivalves le long du littoral dès le début des années 90 (e.g. Merceron, 1987 ; Sournia, 1992). Depuis cette période, des mortalités sont observées régulièrement le long du littoral. Pour exemple, en 2012, des mortalités de moules de plus de 40% ont été enregistrées entre juin et septembre (Rodriguez *et al.*, 2016). Les observations réalisées à l'époque font état de la présence d'une couche de mucus de couleur verte sur les coquillages. Encore très récemment, des mortalités de moules comprises entre 43% et 90% ont été reportées sur différents secteurs de Loire Atlantique et du Morbihan au cours de l'été 2018. Les premières mortalités ont été observées entre le 20 et le 23 juillet 2018, faisant suite à l'observation d'eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* sur ces mêmes zones à cette même période (Cochennec-Laureau *et al.*, 2018). Si la plupart des recensements de mortalités associées aux eaux vertes à *L. chlorophorum* disponibles à ce jour sur le secteur, concernent la production mytilicole, les huîtres sont aussi fortement impactées par ces épisodes. Pour exemple, des pertes engendrées suite à l'épisode le plus récent de l'été 2018 ont été évaluées à plus de 70 000 euros par un ostréiculteur exploitant sur la zone de Pen Bé (Président du syndicat conchylicole de Pen Bé-Mesquer). La récurrence de ces événements et les pertes substantielles qui en résultent sont donc susceptibles de fragiliser les professionnels de la région.

Malgré les conséquences potentielles de la multiplication de ces eaux colorées vertes sur le littoral de la Loire Atlantique, nos connaissances relatives à la dynamique des efflorescences de *L. chlorophorum* et à l'écologie de ce dinoflagellé restaient parcellaires (Sourisseau *et al.*, 2016). Sur la base de ces constats, les objectifs de cette étude étaient :

- 1) de dresser un état des lieux exhaustif des phénomènes d'eaux colorées rencontrés par les professionnels et de leurs impacts lors des dernières années,
- 2) d'identifier les principaux facteurs environnementaux contrôlant la formation des eaux colorées vertes,
- 3) d'estimer la concentration et la composition des exo-polysaccharides produits lors d'un bloom et leurs potentielles conséquences sur l'écosystème,
- 4) d'évaluer les effets de ces modifications sur la mortalité et la croissance des bivalves filtreurs.

## 2 Approches professionnelles des épisodes d'eaux colorées vertes sur les productions aquacoles en baie de Pen Bé.

### 2.1 Contexte et Objectifs

Le travail réalisé s'inscrit dans le cadre de l'Action 1 du projet Lepido-Pen, dont l'objectif était de dresser un état des lieux exhaustif des phénomènes d'eaux colorées rencontrés par les professionnels et de leurs impacts lors des dernières années.

Cette action a été mise en œuvre par le SMIDAP en étroite collaboration et partenariat avec le Syndicat des parqueurs du traict de Pen Bé-Mesquer et l'Ifremer. Le SMIDAP a réalisé la synthèse et l'analyse des résultats présentés ci-après et Philippe Glize du SMIDAP a rédigé cette partie du rapport.

Un questionnaire a été rédigé en commun et adressé à l'ensemble des conchyliculteurs détenteurs de concessions en baie de Pen Bé. Les informations acquises au travers de ce document ont été traitées en garantissant la propriété des données collectées et le respect de l'anonymat des producteurs.

Cette mission d'enquête avait pour finalité d'appréhender le ressenti des professionnels quant aux phénomènes d'eaux colorées vertes et leurs impacts lors des dernières années. Etaient intégrés la chronologie d'apparition des blooms de *L. chlorophorum*, leurs déplacements en termes de localisation géographique et de degré d'émersion, l'existence ou non et la quantification de mortalités en fonction des espèces de bivalves élevées.

Les différents thèmes abordés dans le questionnaire étaient les suivants:

- ✓ Mortalité éventuelle observée en 2018
  - Localisation géographique et dispersion éventuelle
  - Espèces concernées
  - Classes d'âge impactées
  
- ✓ Observations de mortalités antérieures
  - Recrudescence des phénomènes d'eaux colorées
  - Amplification potentielle des taux de mortalité
  - Variation en fonction des espèces
  - Localisation géographique et évolution potentielle
  
- ✓ Commentaires des répondants

Le questionnaire ainsi que courrier d'accompagnement co-signé par le syndicat conchylicole de Pen Bé-Mesquer et le SMIDAP sont présentés en annexes (Annexe 1 et 2). Au-delà des retours papier, des entretiens individuels par professionnel ou par entreprise ont été conduits afin de compléter ce questionnaire et de le rendre le plus représentatif possible de l'impact des eaux colorées vertes sur la production conchylicole du bassin.

## 2.2 Résultats

La consultation a été réalisée sur la période d'avril à novembre 2019. Elle a concerné les 32 entreprises conchylicoles du secteur.

### 2.2.1 Volet Mytilicole

17 entreprises ont été consultées. Le taux de retour est de 76% et peut donc être considéré comme élevé.

#### 2.2.1.1 Mortalités éventuelles observées en 2018

Sur l'ensemble des professionnels ayant répondu au questionnaire, 75% d'entre eux ont été confrontés à des mortalités sur leurs productions au cours de l'été 2018 (Figure 8A). Les 25% restant n'ont pas été impactés sur le secteur de Pen Bé, mais ont pu être touchés sur d'autres sites mitoyens, tel que Pénestin.

En 2018, la phase de mortalité a été observée sur la période du 15 juillet à début août et les taux de mortalités mesurés étaient compris entre 0 et 70%. La valeur médiane serait de l'ordre de 46%.

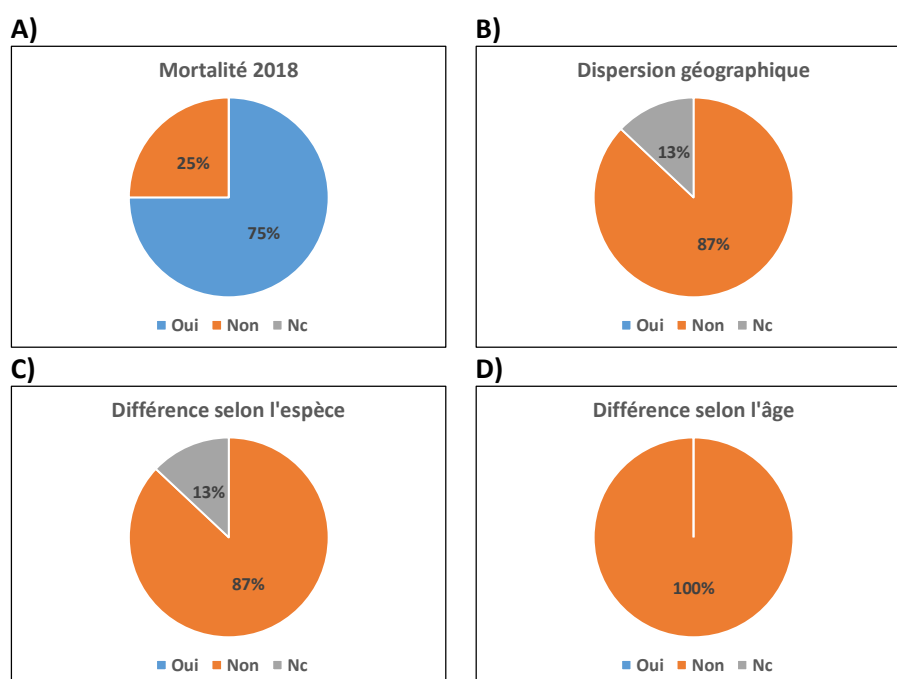


Figure 8 : Réponses des mytiliculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalité au cours de l'année 2018.

Pour 87% des mytiliculteurs, aucune dispersion géographique des phénomènes de mortalité n'a été observée (Figure 8B). La mortalité s'est limitée à certaines zones géographiques (à l'échelle de concessions) et s'est produite sur une durée de temps limitée. A noter l'absence de réponse pour 13% des répondants.

A la question concernant une différence de mortalité entre les espèces (Figure 8C), n'étaient concernés que les professionnels ayant une activité de production plurispécifique. Aucun impact sur les autres activités et espèces élevées n'a été observé. A noter l'absence de réponse pour 13% des répondants.

Aucune différence de mortalité en fonction de la classe d'âge des populations de moules n'a été notée (Figure 8D).

### 2.2.1.2 Observations éventuelles de mortalités antérieures

Pour la totalité des mytiliculteurs, l'année 2018 serait la seule à être impactée par des phénomènes de mortalité liés à des efflorescences d'eaux colorées vertes (Figure 9A). Il n'a pas été fait cas des mortalités rencontrées par le passé, notamment en 2007.

La recrudescence et l'amplification des blooms d'eaux colorées sont reconnues par la majorité des professionnels (67% ; Figure 9B). Sont concernées les efflorescences de *L. chlorophorum*, mais aussi celles d'autres micro-algues phytotoxiques (ex. *Dinophysis* sp.). Un tiers des répondants (33%) ne constaterait pas d'amplification des phénomènes de blooms.

Lors de développement de blooms de *L. chlorophorum*, les deux tiers des professionnels ne constatent pas d'augmentation des taux de mortalités mesurés (Figure 9C). L'ampleur des mortalités serait équivalente. Cependant, 33% des répondants considèrent rencontrer une augmentation des taux de mortalités. La régression éventuelle des mortalités mesurées n'a pas été évoquée par les professionnels.

Concernant l'évolution éventuelle de la localisation et de l'emprise géographique des phénomènes d'eaux colorées, les avis apparaissent très partagés (Figure 9D). Pour 43% des répondants, elle serait équivalente ou supérieure, et 14% ne se sont pas prononcés. A noter qu'aucun professionnel n'a cité une diminution éventuelle de l'emprise géographique.

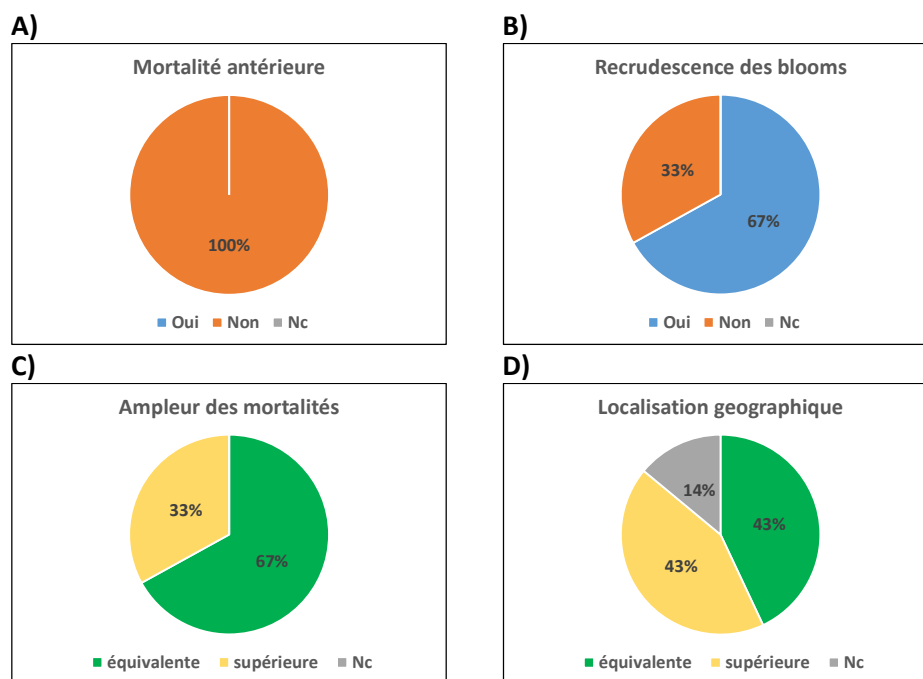


Figure 9 : Réponses des mytiliculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalités antérieures.

### 2.2.1.3 Commentaires laissés par les répondants

Différents commentaires ont été mentionnés par les répondants au questionnaire. Ceux-ci sont présentés ci-dessous tels quels, sans être ni commentés ni interprétés.

- ✓ *Les efflorescences d'eaux colorées vertes sont des phénomènes naturels.*
- ✓ *Elles sont corrélées aux conditions météorologiques et climatiques.*
- ✓ *Elles apparaissent lors de la conjonction de différentes conditions météo, lorsque les températures sont élevées, lors de fort ensoleillement et lors de faibles coefficients de marée.*



- ✓ Elles sont influencées par l'orientation des vents. Les vents d'Est (vent de terre) amplifieraient les phénomènes de mortalité.
- ✓ Les crues et orages observés en fin de printemps associés aux températures élevées et au fort ensoleillement du début d'été favoriseraient les efflorescences de *Lepidodinium*.
- ✓ La présence de naissains de moules sur les pieux d'élevage accentuerait la mortalité. Elle serait d'autant plus importante que la densité de naissains est abondante.

## 2.2.2 Volet Ostréicole

15 entreprises ont été consultées. Le taux de retour est de 67%, donc représentatif, et peut être considéré comme satisfaisant.

### 2.2.2.1 Mortalités éventuelles observées en 2018

La très grande majorité des entreprises (80%) n'a pas été ou faiblement concernée par les mortalités au cours de l'année 2018 (Figure 10A). Parmi les déclarants, seule une minorité (20%) a été impactée par des mortalités significatives au cours de l'été 2018. En revanche, la très grande majorité reconnaît néanmoins l'existence de mortalités faibles, notamment lors de l'efflorescence de *L. chlorophorum* au mois de juillet.

Les taux de mortalités mesurés étaient compris entre 0 et 35%. La valeur médiane serait de l'ordre de 13%.

La phase de mortalité a été observée sur la période du 10 juillet à début août.

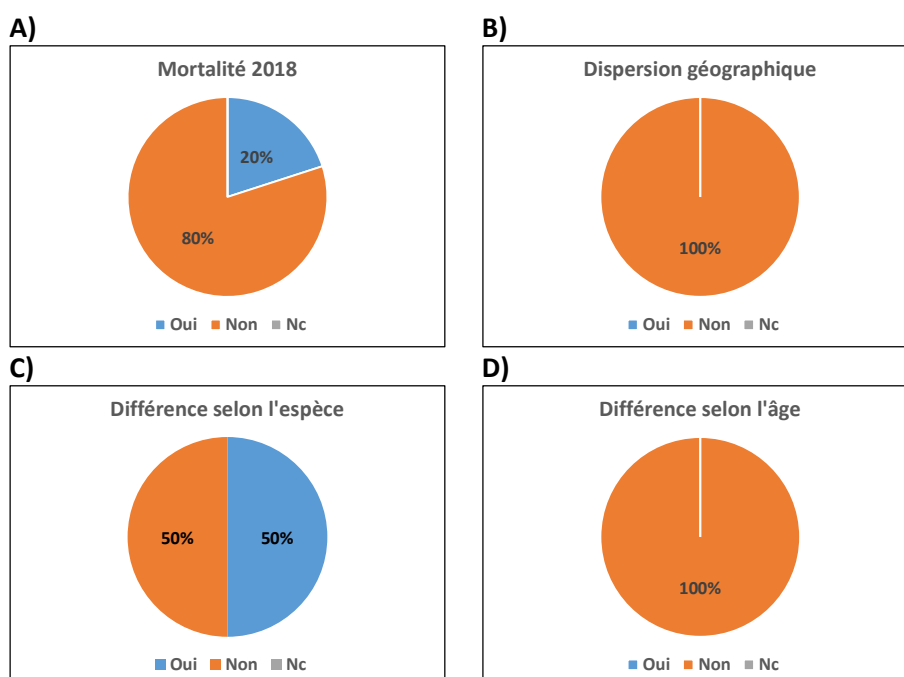


Figure 10 : Réponses des ostréiculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalité au cours de l'année 2018.

Aucun phénomène de dispersion de la mortalité n'a été observé (Figure 10B). Ceci suggère l'absence d'un effet de « contagion » et de dissémination du phénomène de mortalité, en dehors des zones impactées par les eaux colorées vertes.

Aucune différence n'a été observée en fonction de l'espèce élevée, sachant que 50% des répondants apparaissent non concernés, ne pratiquant que le seul élevage ostréicole (Figure 10C).



Aucune différence de mortalité n'a été observée en ce qui concerne les classes d'âge (Figure 10D). Elles sont cependant au nombre de trois, de 1 an (stade naissain) à 3 ans (stade adulte de taille marchande) en fonction du stade de développement.

#### 2.2.2.2 Observations éventuelles de mortalités antérieures

La totalité des ostréiculteurs reconnaît avoir été confrontée par le passé à des phénomènes de mortalité liés à des efflorescences d'eaux colorées vertes (Figure 11A). Il est fait état notamment des années 2012 et 2017. La période concernée est toujours l'été (juillet à septembre). Les taux de mortalités mesurés pouvaient atteindre les 30%.

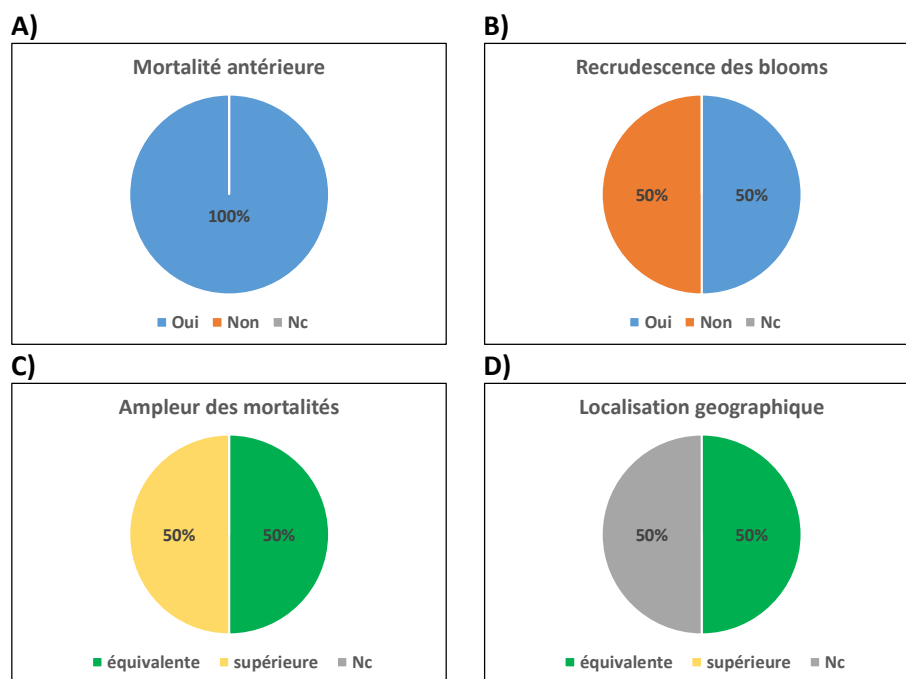


Figure 11 : Réponses des ostréiculteurs aux questions portant sur leurs observations éventuelles de mortalités antérieures.

Les avis apparaissent partagés quant à la recrudescence et l'amplification des phénomènes d'eaux colorées (Figure 11B). 50% des répondants constaterait une augmentation des blooms, alors qu'elle ne serait pas observée par les autres 50%.

Lors de développement de blooms de *L. chlorophorum*, les avis des ostréiculteurs sont partagés quant à l'augmentation des taux de mortalités mesurés (Figure 11C). L'ampleur des mortalités serait équivalente pour 50% d'entre eux et supérieure pour les autres 50%. La régression éventuelle des mortalités mesurées n'a pas été évoquée par les professionnels.

Concernant l'évolution éventuelle de la localisation et de l'emprise géographique des phénomènes d'eaux colorées, les avis apparaissent une nouvelle fois partagés (Figure 11D). Pour 50% des ostréiculteurs elle serait équivalente, et les 50% restants ne se sont pas prononcés. A noter qu'aucun professionnel n'a cité une diminution éventuelle de l'emprise géographique.

#### 2.2.2.3 Commentaires laissés par les répondants

Les différents commentaires ou principales remarques formulés par les ostréiculteurs sont les suivants:

- ✓ *L'activité et les entreprises ont été peu impactées en 2018 par les mortalités liées au bloom de *Lepidodinium chlorophorum*.*

- ✓ *Les phénomènes d'efflorescences d'eaux colorées vertes seraient en lien avec des phénomènes de pollutions.*
- ✓ *Elles seraient la traduction d'une dégradation de la qualité de l'eau de mer du traict de Pen Bé- Mesquer.*
- ✓ *La connaissance des apports du bassin versant est indispensable.*
- ✓ *Les efflorescences sont influencées par les conditions météorologiques (températures élevées, faibles coefficients de marée).*
- ✓ *Lors des blooms de *Lépidodinium*, il est difficile d'identifier et de quantifier les mortalités réelles. Elles se matérialisent uniquement sous forme de bandes ou de langues impactées au niveau des concessions.*
- ✓ *La mortalité se caractérise par la présence de dépôts noirâtres au sein des poches et/ou par une accumulation des algues au niveau des bords du manteau des huîtres (dépôt verdâtre).*
- ✓ *A l'échelle d'un parc, il n'y a pas d'homogénéité de la mortalité notamment en termes de taux.*

### 2.3 Conclusions

Les taux de retour du questionnaire adressé à l'ensemble des conchyliculteurs disposant de concessions sur le secteur, est apparu élevé et satisfaisant, avec respectivement de 76% de réponse pour les mytiliculteurs et 67% pour les ostréiculteurs.

Suite aux mortalités conchylicoles rencontrées au cours de l'été 2018, l'enquête diligentée auprès des conchyliculteurs sur l'approche professionnelle des épisodes d'eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum* sur les productions aquacoles en baie de Pen Bé, a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

1. Le pourcentage d'entreprises non impactées par des mortalités de leur cheptel en lien avec les efflorescences de *L. chlorophorum* dépend de l'activité conchylicole exercée. Il est de 25% pour la mytiliculture et de 80% pour l'ostréiculture, confirmant que l'activité mytilicole a été la plus touchée au cours de l'été 2018.
2. Les pourcentages de mortalités mesurés, varient de 0 à 70% (valeur médiane: 46%) pour le volet mytilicole et de 0 à 35% (valeur médiane: 13%) pour le volet ostréicole.
3. Indépendamment de l'activité exercée, la phase de mortalité a été observée sur la période du 10 juillet à début août.
4. L'absence et/ou une très faible diffusion spatiale de la mortalité (dispersion géographique) a été notée.
5. Aucune différence de mortalité en fonction de la classe d'âge des populations de moules ou d'huîtres élevées n'a été décelée.

En ce qui concerne la confrontation par le passé des conchyliculteurs à des phénomènes de mortalité en lien avec des blooms d'eaux colorées vertes à *L. chlorophorum*, les avis sont diamétralement opposés. L'ensemble des mytiliculteurs précise ne pas avoir subi de mortalités antérieures, alors que l'ensemble des ostréiculteurs reconnaît avoir déjà été impacté par le passé.

1. Une recrudescence des épisodes d'efflorescences d'eaux colorées vertes est mise en avant par pour 67% des mytiliculteurs et 50% des ostréiculteurs.

2. En ce qui concerne l'évolution des mortalités associées aux eaux colorées, il est noté soit l'absence, soit une amplification du phénomène (pour 33% des mytiliculteurs et 50% des ostréiculteurs). La régression éventuelle des mortalités mesurées n'a pas été évoquée par les professionnels.
3. Les causes ou facteurs déclenchants des phénomènes d'efflorescences d'eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum*, sont perçus de façon différente en fonction des acteurs conchylicoles :
  - *Pour les mytiliculteurs*, Les efflorescences d'eaux colorées vertes sont des phénomènes naturels. Elles sont corrélées aux conditions météorologiques et climatiques. Elles apparaissent lors de la conjonction de différentes conditions météo : températures sont élevées, fort ensoleillement et faibles coefficients de marée.
  - *Pour les ostréiculteurs*, les phénomènes d'efflorescences d'eaux colorées vertes seraient en lien avec des phénomènes de pollutions anthropiques. Elles seraient la traduction d'une dégradation de la qualité de l'eau de mer du trait de Pen Bé - Mesquer. Mais seraient également influencées par les conditions météorologiques (températures élevées et faibles coefficients de marée).

## 2.4 Remerciements

La mise en œuvre et la réalisation de cette action n'auraient pu être menées à terme sans la collaboration des conchyliculteurs de Pen Bé, Mesquer, Pont Mahé, Pénestin et de Vendée, disposant de concessions tant ostréicole que mytilicole sur le secteur de Pen Bé. Nous les remercions pour leur implication et le temps dédié au remplissage du questionnaire que ce soit par écrit ou au travers d'entretien individuel.

Qu'ils trouvent ici l'assurance de nos sincères remerciements.

## 3 Phénologie des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* et leurs conséquences sur les écosystèmes

### 3.1 Initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*

#### 3.1.1 Contexte et objectifs

Malgré la récurrence des efflorescences de *L. chlorophorum* le long des côtes de Loire Atlantique (Siano *et al.*, 2020 ; Belin *et al.*, 2021) et leurs potentielles conséquences néfastes sur le fonctionnement des écosystèmes et leurs usages, notre compréhension de la dynamique d'initiation de ces efflorescences était à ce jour limitée. Afin de mieux appréhender cette dynamique, il était nécessaire de rechercher la présence de cette espèce lorsque les conditions sont défavorables à sa prolifération, c'est dire en automne / hiver.

En effet, si certaines espèces persistent à de faibles abondances dans la colonne d'eau toute l'année (Sogin *et al.*, 2006) d'autres produisent des kystes de résistance benthiques (Bravo et Figueroa, 2014). Bien que la formation de kystes par *L. chlorophorum* ait été suggérée par Sournia *et al.* (1992), cette hypothèse restait à vérifier, en particulier en utilisant des méthodes de biologie moléculaire. Afin de mieux appréhender l'origine et l'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*, il est donc apparu essentiel de mieux connaître son cycle de vie et plus particulièrement d'élucider sous quelle forme (kystes de résistance benthiques ou maintien des cellules dans la colonne d'eau) ce dinoflagellé résistait aux conditions défavorables. De la même manière, il était nécessaire d'identifier les conditions environnementales nécessaires à l'initiation d'une efflorescence.

Pour répondre à ces objectifs, une recherche de kystes a été menée dans les sédiments superficiels prélevés en janvier-février 2019 au large de la Loire et en Baie de Vilaine dans le cadre du projet EPICE<sup>2</sup> (expériences de PCR sur cellule unique, germination de kystes et analyse de l'ADN environnemental). Cette étude des sédiments superficiels a été complétée par une analyse de l'ADN environnemental extrait d'échantillons d'eau de mer acquis de septembre à mars, en 2019-2020 et 2020-2021, au cours des campagnes Lepido-Pen. Les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau ont également été suivis au cours de ces campagnes afin de mieux appréhender les conditions environnementales à l'origine de l'initiation des blooms. Les analyses de l'ADN environnemental ont été financées par le GdR Phytotox dans le cadre du projet PICCOLO<sup>3</sup>.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un chapitre de la thèse de Pauline Roux (Roux, 2022) et ont été valorisés sous forme d'un article scientifique de rang A (Roux *et al.*, 2023).

Les principaux résultats sont présentés ci-après.

#### 3.1.2 Mise en œuvre

##### 3.1.2.1 Recherche des cellules de *L. chlorophorum* et paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau

L'échantillonnage a été conduit sur deux stations suivies dans le cadre des campagnes Lepido-Pen : Basse-Michaud et Ouest Loscolo de septembre à mars en 2019-2020 et 2020-2021 (Figure 12).

---

<sup>2</sup> Projet EPICE : Les Efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine : Déterminisme et conséquences sur la qualité des masses d'eau côtières. Financement : AELB [180408801]. 2018-2020.

<sup>3</sup> PICCOLO : Recherche de formes de résistance de *Lepidodinium chlorophorum* par analyse d'ADN environnemental dans la colonne d'eau en Bretagne sud. Financement : GdR Phytotox. 2021.

Les échantillons ont été collectés à une fréquence bi-mensuelle, autour de la pleine mer ( $\pm 2$ h) et à trois profondeurs différentes : (i) en sub-surface (0-1 m), (ii) à mi-profondeur et (iii) à 1 m au-dessus du fond.

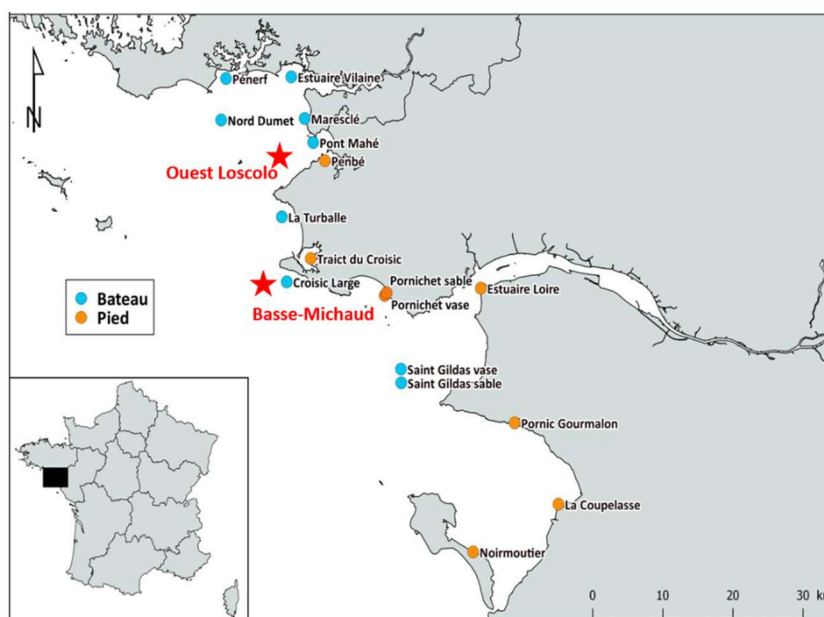


Figure 12 : Stations d'échantillonnage de la colonne d'eau (étoile rouge) et du sédiment superficiel (cercles). Des échantillons d'eau ont été récoltés à une fréquence bi-mensuelle au cours des campagnes Lepido-Pen durant deux automne-hiver : de septembre 2019 à mars 2020, et de septembre 2020 à mars 2021. Les sédiments superficiels ont été récoltés en janvier-février 2019, à pied (cercles orange) ou à partir d'un bateau (cercles bleus) dans le cadre du projet EPICE (Schapira et al., 2021).

L'ADN environnemental a été analysé sur chacun des échantillons prélevés. Pour cela, 500 à 1000 mL d'eau de mer ont été conservés immédiatement après le prélèvement dans des flacons propres en plastique jusqu'au retour au laboratoire où ils ont été filtrés sur des filtres polycarbonates de 3  $\mu\text{m}$  de porosité. Les filtres conservés dans des cryotubes de 5 ml, ont été immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant leur analyse. La méthode suivie pour l'analyse de l'ADN environnemental est détaillée dans Roux et al. (2023).

Des échantillons ont également été prélevés pour l'identification et l'énumération des espèces micro-phytoplanctoniques par microscopie optique. Pour cela 1000 mL d'eau de mer ont été fixés avec une solution de Lugol (2% f.c.) et conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  avant analyse. La méthode d'analyse est détaillée dans l'annexe 3.

Des aliquots d'échantillons ont également été prélevés pour la détermination (i) de la biomasse phytoplanctonique (concentration en chlorophylle a : [Chla],  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (ii) des concentrations en nutriments inorganiques (azote [DIN], silicates [DSi] et phosphates [DIP] ;  $\mu\text{M}$ ) et (iii) des concentrations en TEP ([TEP] ;  $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ ). Les méthodes d'analyse sont détaillées dans l'annexe 3.

Enfin, sur chaque station ont été réalisés des profils verticaux de température ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinité et turbidité (FNU) avec une sonde multi-paramètre (NKE, MP6) de la surface jusqu'à 1m au-dessus du fond. Un indice de stratification de la colonne d'eau a pu être calculé comme suit (Hansen et Rattray, 1966) :

$$\varepsilon = \frac{\rho_{\text{fond}} - \rho_{\text{su}}}{\rho_{\text{moy}}}$$

Avec  $\rho_{fond}$  étant la densité calculée au fond,  $\rho_{surf}$  la densité de l'eau en surface et  $\rho_{moy}$  la densité moyenne sur la colonne d'eau. La colonne d'eau est considérée comme homogène lorsque  $\varepsilon=0$  alors que la stratification verticale est maximale pour  $\varepsilon \approx 25 \times 10^{-3}$  (Hansen et Rattray, 1966).

### 3.1.2.2 Recherche des kystes de *L. chlorophorum* dans les sédiments superficiels au large de la Loire et en Baie de Vilaine.

Les protocoles de prélèvement et d'analyse sont détaillés dans le rapport EPICE (Schapira *et al.*, 2021) et dans Roux (2022) et Roux *et al.* (2023).

Brièvement, les prélèvements de sédiment ont été réalisés sur 17 stations entre le 15 janvier et le 14 février 2019 (Figure 12). Les échantillonnages se sont déroulés soit en bateau, soit à pied sur l'estran. Les sites d'échantillonnage ont été sélectionnés sur la base de plusieurs critères : (1) la présence d'eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* au cours de l'été précédent (2018), (2) leur géomorphologie et géographie propice à l'accumulation de kystes (baies fermées, ports etc.), (3) leur typologie sédimentaire : les zones vaseuses et sablo-vaseuses étant favorables à l'accumulation de kystes (e.g. Lewis, 1988) et à la préservation de l'ADNe (Boere *et al.*, 2011), et (4) leur accessibilité à pied ou à partir d'un navire.

Sur chaque site, trois répliques de sédiments ont été échantillonnées sur un rayon de 50 cm à l'aide de seringues stériles et calibrées.

Pour les analyses d'ADN environnemental, les sédiments récoltés sur chaque station ont été conservés dans des cryotubes stériles de 60 mL, plongés dans l'azote liquide immédiatement après le prélèvement et conservés au laboratoire à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse, suivant la procédure décrite dans Pawlowski *et al.* (2021). Le détail des analyses est donné dans Roux *et al.* (2023).

Des observations morphologiques ont également été menées sur des échantillons de sédiments collectés dans des tubes Falcon de 50 ml, fermés avec du para-film, recouverts d'aluminium et conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse en microscopie. Ces observations ont permis de réaliser deux types d'analyse : (1) des expériences de PCR sur cellule unique, et (2) germination de kystes. Les procédures détaillées sont données dans Roux *et al.* (2023).

Des échantillons ont également été prélevés sur chaque station pour l'analyse granulométrique des sédiments. Les mesures ont été réalisées par granulométrie laser (Mastersizer 3000). Les données ont été ensuite analysées avec le package Gradistat développé par Grégoire *et al.* (2017) et groupées par classe de taille selon Blott et Pye (2001).

### 3.1.3 Résultats

#### 3.1.3.1 Dynamique de *L. chlorophorum* et des paramètres environnementaux dans la colonne d'eau

Les dynamiques du genre *Lepidodinium*, en relation avec la variabilité des paramètres environnementaux sont présentées sur les figures 13 et 15. Les deux stations d'étude présentent des dynamiques similaires et par souci de concision seule la dynamique observée à Basse-Michaud sera décrite en détail ci-après.

A Basse-Michaud *la température* est restée relativement homogène sur la colonne d'eau au cours des deux automne/hiver étudiés (Figure 13A, B). La température moyenne a diminué de  $14,9 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$  à  $11,1 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  entre le 9 septembre 2019 et le 4 mars 2020, et de  $17,7 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  à  $10,8 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$  entre le 8 septembre 2019 et le 22 mars 2021.

Au cours des deux automnes étudiés, *la salinité* est restée homogène sur la colonne d'eau avec une moyenne de  $34,4 \pm 0,9$ . En revanche, des dessalures de surface ont été observées au cours des deux hivers étudiés, traduisant des apports d'eau douce en provenance de la Loire sur cette



station en décembre et janvier (Figure 13C, D). Ainsi, la salinité de surface a chuté de 31,8 à 22,6 entre le 3 et le 17 décembre 2019, et de 33,6 à 26,8 entre 8 décembre 2020 et le 4 janvier 2021.

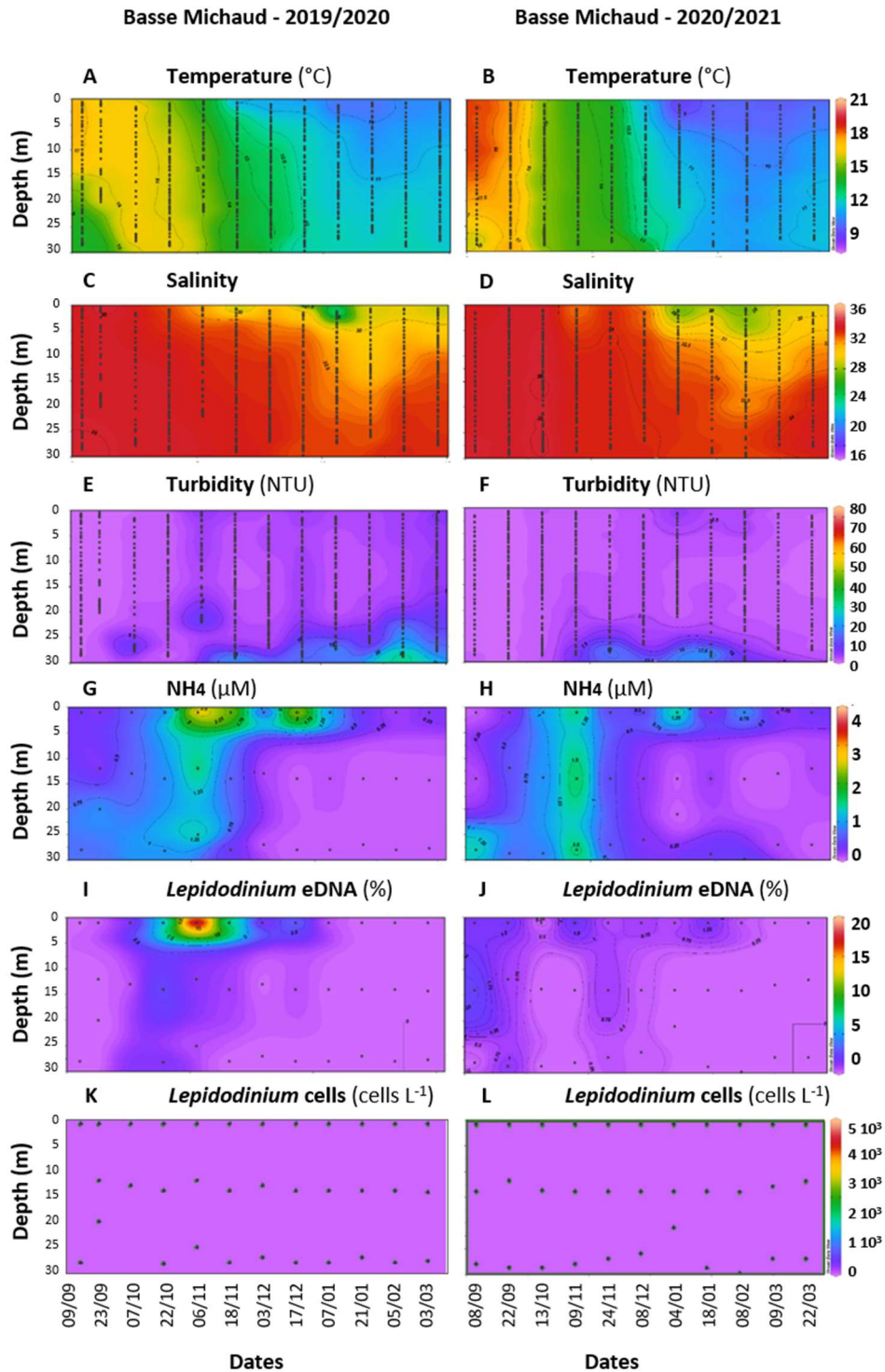


Figure 13 : Variabilité spatiale et temporelle des paramètres biologiques et physico-chimiques le long de la colonne d'eau sur la station Basse-Michaud au cours des périodes automne/hiver de 2019-2020 et 2020/2021. (A-B) Température (°C); (C-D) salinité; (E-F) Turbidité (FNU); (G-H) concentration en ammonium ( $\text{NH}_4$ ;  $\mu\text{M}$ ); (I-J) Abondance relative du genre *Lepidodinium* au sein de la communauté de protistes (%) détectée par analyse de l'ADN environnemental (metabarcoding); (K-L) Abondance *L. chlorophorum* au sein de la communauté de protistes ( $\text{cell L}^{-1}$ ) déterminée à partir des comptages en microscopie optique. Représentation réalisée avec Ocean data view, 5.3.0. D'après Roux et al. (2023).

Les indices de *stratification* de la colonne d'eau sont restés  $<0,05$  en septembre et octobre lors des deux années étudiées, confirmant un mélange vertical important de la colonne d'eau en automne sur la zone (Figure 14B, D). En revanche, la période hivernale s'est caractérisée par des indices de stratification ponctuellement  $>0,05$  qui traduisent d'une stratification haline marquée à certaines périodes au cours de l'hiver. Cette stratification haline est en lien avec l'arrivée du panache de la Loire sur la station Basse-Michaud. Une dynamique saisonnière équivalente est observée sur la station Ouest Loscolo, qui reçoit des apports d'eau douce en provenance de la Loire et de la Vilaine (Figure 15).

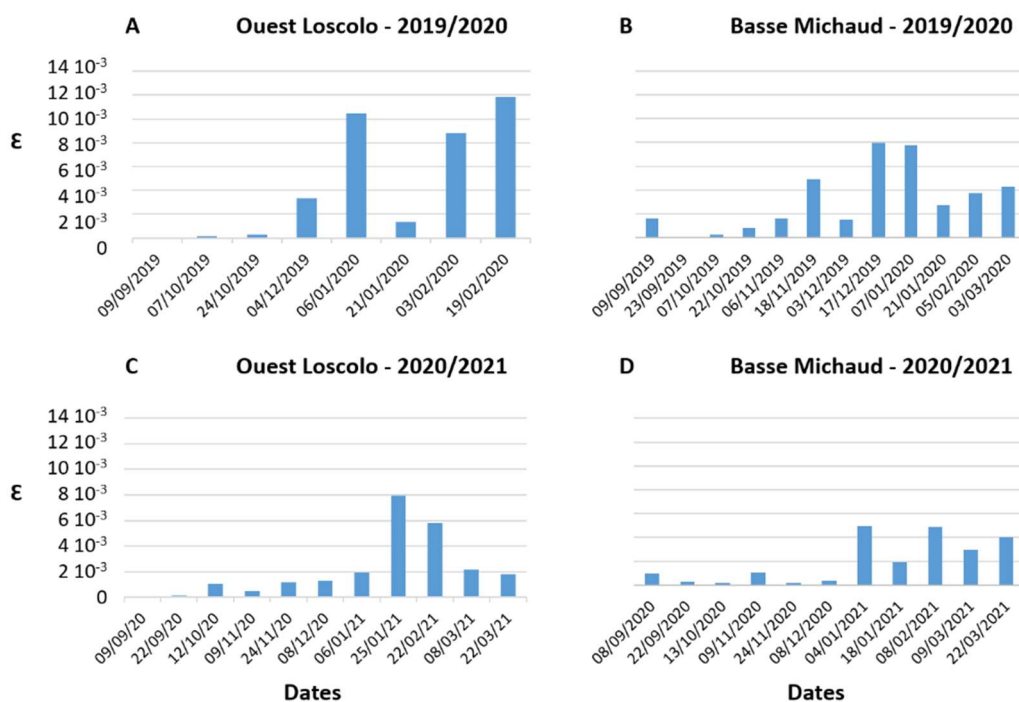


Figure 14 : Indices de stratification ( $\epsilon$ ) calculés pour chaque date d'échantillonnage sur les stations Ouest Loscolo (A, C) et Basse-Michaud (B, D) au cours de deux automne/hiver étudiés (2019-2020) et (2020-2021). D'après Roux et al. (2023).

Sur la station Basse-Michaud, la *turbidité* a varié entre 0,6 et 9,3 FNU en sub-surface et entre 1,4 et 14,2 FNU à proximité du fond au cours des deux automne/hiver étudiés (Figure 13E, F). Des valeurs de turbidité élevées ont été relevées en sub-surface et à proximité du fond le 6 novembre 2019 avec 6,3 et 12,0 FNU respectivement (Figure 13E). Ces résultats suggèrent une remise en suspension des sédiments importante à cette période. A la même date étaient enregistrées des concentrations en *ammonium* ( $\text{NH}_4$ ) plus élevées que celles relevées au cours de la période précédente sur toute la colonne d'eau, avec des valeurs variant entre 1,41  $\mu\text{M}$  au fond et 2,9  $\mu\text{M}$  en surface (Figure 13G). Une dynamique similaire a été observée le 9 novembre 2020, avec des valeurs de turbidité élevées (7,3 FNU) au fond (Figure 13F) accompagnées de concentrations en ammonium plus élevées sur toute la colonne d'eau (1,51 à 1,63  $\mu\text{M}$  ; Figure 13H). Sur la station Ouest Loscolo, des augmentations des teneurs en  $\text{NH}_4$  ont également été observées conjointement à des augmentations de la turbidité à proximité du fond, à deux reprises : le 7 octobre 2019 (3,4 – 4,0  $\mu\text{M}$ ) et le 12 octobre 2020 (2,1 – 3,0  $\mu\text{M}$  ; Figure 15G, H). Cette dynamique observée sur les deux stations peut être mise en relation avec une remise en suspension des sédiments superficiels et la libération de l'ammonium stocké dans les premiers cm des sédiments.



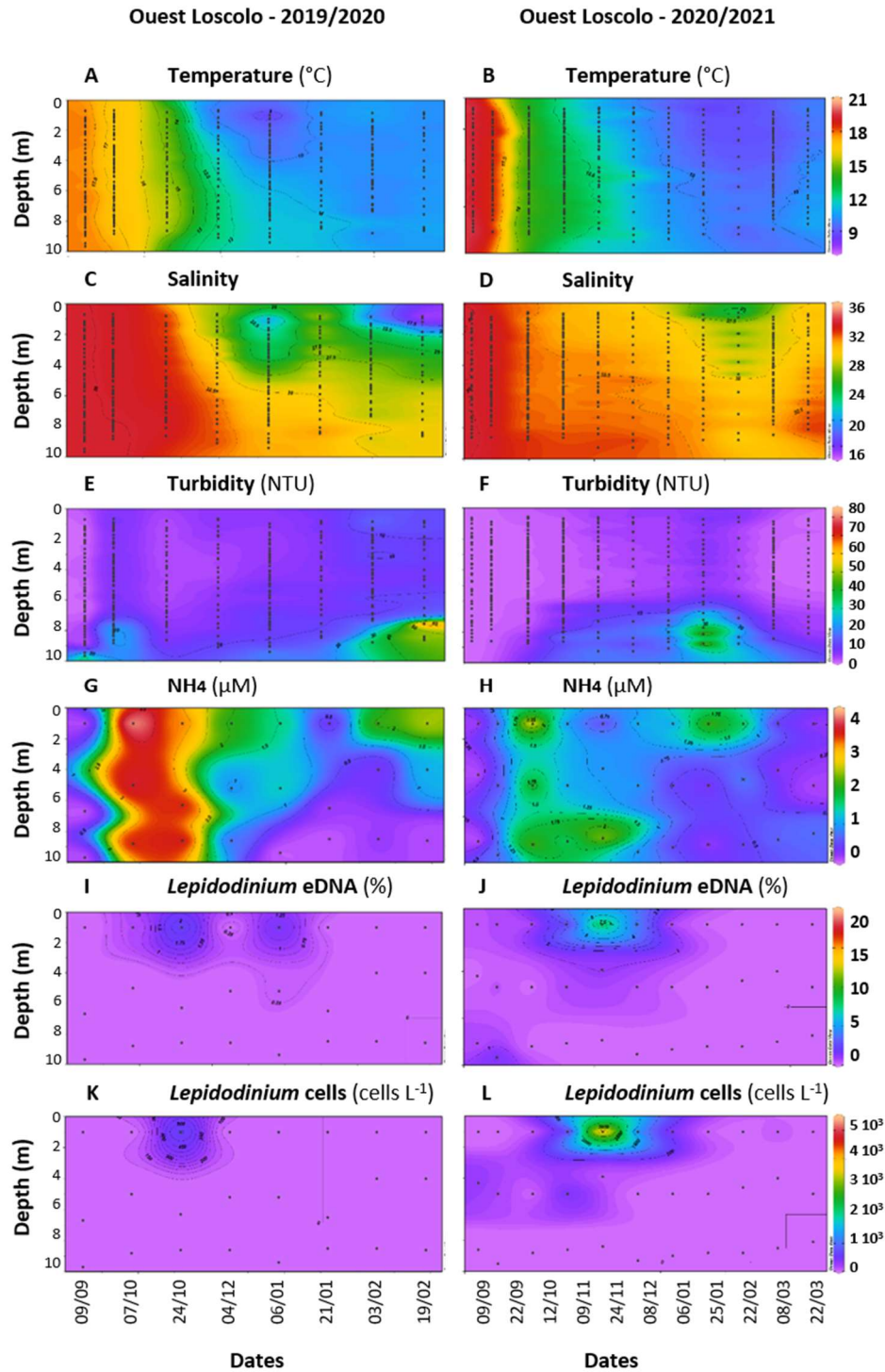


Figure 15 : Variabilité spatiale et temporelle des paramètres biologiques et physico-chimiques le long de la colonne d'eau sur la station Ouest Loscolo au cours des périodes automne/hiver de 2019-2020 et 2020/2021. (A-B) Température (°C); (C-D) salinité; (E-F) Turbidité (FNU); (G-H) concentration en ammonium (NH<sub>4</sub>; μM); (I-J) Abondance relative du genre *Lepidodinium* au sein de la communauté de protistes (%) détectée par analyse de l'ADN environnemental (metabarcoding); (K-L) Abondance *L. chlorophorum* au sein de la communauté de protistes (cell L<sup>-1</sup>) déterminée à partir des comptages en microscopie optique. Représentation réalisée avec Ocean data view, 5.3.0. D'après Roux *et al.* (2023).

De septembre 2019 à mars 2020, les *abondances relatives de Lepidodinium* enregistrées sur la station Basse-Michaud par les analyses d'ADN environnemental (ADNe) ont varié entre 0 et 20,5% (Figure 13I). Les abondances relatives maximales ont été observées le 6 novembre 2019 en sub-surface conjointement à l'augmentation des teneurs en  $\text{NH}_4$  décrites précédemment (Figure 13G). En 2020-2021, les abondances relatives de *Lepidodinium* sont restées plus faibles qu'en 2019-2020, avec des valeurs ne dépassant pas 2% (Figure 13J). En revanche, aucune cellule de *L. chlorophorum* n'a été observée en microscopie optique au cours de deux automne/hiver étudiés (Figure 13K, L). Sur la station Ouest Loscolo, l'ADNe met en évidence la présence du genre *Lepidodinium* au cours des deux automne/hiver étudiés, avec des abondances relatives maximales observées conjointement avec des concentrations en  $\text{NH}_4$  élevées en sub-surface (Figure 15I, J) : 2 % le 24 octobre 2019 et 9,8% le 24 novembre 2020. Sur cette station, les fortes abondances relatives de *Lepidodinium* ont pu être vérifiées par les observations en microscopie optique (Figure 15K, L). En effet des abondances maximales ont été observées le 24 octobre 2019 (600 cell  $\text{L}^{-1}$ ) et 24 novembre 2020 (5 200 cell  $\text{L}^{-1}$ ) en sub-surface, conjointement aux fortes abondances relatives relevées en ADNe. Il est intéressant de noter que sur les deux stations et au cours de deux années d'étude, les plus fortes abondances ont été observées en sub-surface.

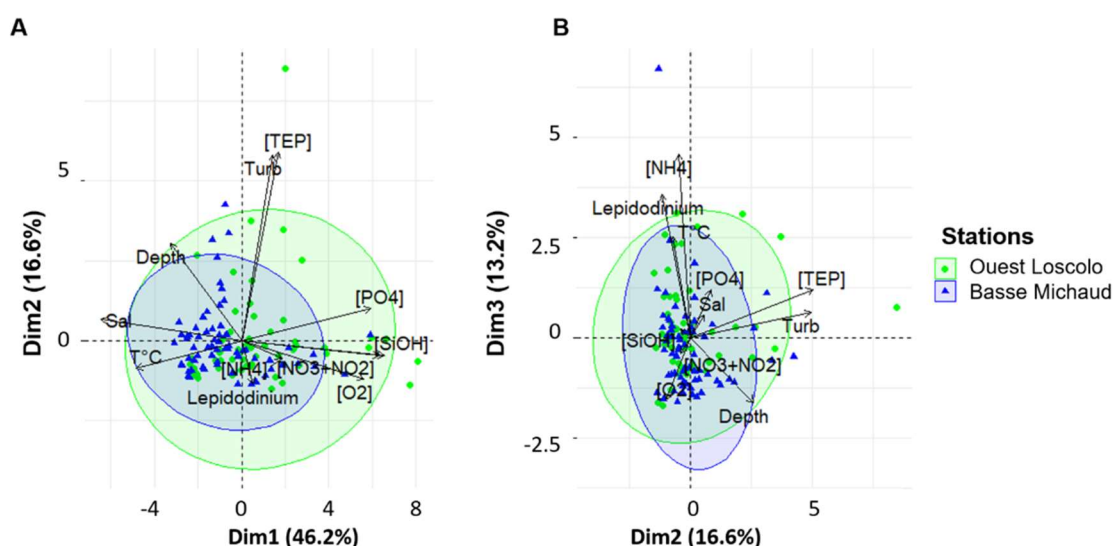


Figure 16 : Analyse en Composante Principale (ACP) résumant les similarités et les différences entre les paramètres environnementaux et les abondances relatives de *Lepidodinium* sur les deux stations et au cours de deux automne/hiver étudiés. (A) Dim 1, Dim 2 et (B) Dim3 décrivent 76% de la variance totale observée. Les flèches noires représentent les variables quantitatives utilisées pour calculer la PCA : l'abondance relative de *Lepidodinium* par analyse de l'ADN environnemental (*Lepidodinium*, %) ; les concentrations en TEP ([TEP] ;  $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ ) ; azote inorganique ([ $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ ],  $\mu\text{M}$ ) ; phosphate inorganique ([DIP] ;  $\mu\text{M}$ ) ; silicates ([DSi],  $\mu\text{M}$ ) ; ammonium ([ $\text{NH}_4$ ],  $\mu\text{M}$ ) ; turbidité (Turb, FNU) ; saturation en oxygène ([O<sub>2</sub>], %) ; salinité (Sal) ; température (Temp, °C) ; profondeur (Depth, m). Les triangles bleus représentent les échantillons de Basse-Michaud et les cercles verts, les échantillons de Ouest Loscolo. Les ellipses de confiance (intervalle de confiance de 95%) permettent de distinguer les stations : Basse-Michaud en bleu et Ouest Loscolo en vert. D'après Roux *et al.* (2023).

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée sur le jeu de données obtenu sur les deux stations et au cours des deux périodes d'étude (Figure 16). L'ACP décrit 76% de la variance sur les 3 premiers axes (Dim1, Dim2 et Dim3). Dim 1 est expliquée par la température (T°C), la salinité (Sal), la saturation en oxygène [O<sub>2</sub>] et les nutriments ([ $\text{NO}_3+\text{NO}_2$ ], [DIP] et [DSi]). Les nutriments et [O<sub>2</sub>] sont négativement corrélés avec la salinité. La Dim 2 est expliquée par la profondeur, la turbidité et [TEP]. La turbidité est positivement corrélée aux [TEP] et à la profondeur. L'abondance relative de *Lepidodinium* et [ $\text{NH}_4$ ] sont les variables le plus fortement

corrélées à la Dim3. Les abondances relatives de *Lepidodinium* sont positivement corrélées à  $[NH_4]$  et la température, et négativement corrélées à la profondeur.

Les résultats de cette analyse confirment donc l'existence d'un lien étroit entre l'abondance du genre *Lepidodinium* et les concentrations élevées en  $NH_4$  en sub-surface au cours de la période hivernale.

### 3.1.3.2 Recherche de *Lepidodinium* dans les sédiments superficiels

Afin d'évaluer si la présence de *Lepidodinium* dans la colonne d'eau est en lien avec la remise en suspension de kystes à partir des sédiments superficiels, plusieurs analyses ont été réalisées sur les échantillons récoltés sur la zone : (i) observation des kystes récoltés (expérience de germination et identification des kystes en microscopie), (ii) isolement de kyste unique et identification en PCR, et (iii) analyse de l'ADNe des sédiments.

#### 3.1.3.2.1 Observation des kystes en microscopie

L'analyse de trois classes de taille montrent une pré-dominance de kystes de taille  $>20 \mu m$  dans les sédiments récoltés sur la zone.

Les expériences de germination ont montré la présence de kystes appartenant à différentes espèces de dinoflagellés : *Alexandrium minutum*, *Gymnodinium aureolum*, *Heterocapsa* sp., *Scripsiella* sp., *Sourniaea diacantha*, *Protoceratium reticulatum* et *Levanderina fissa*.

Les observations en microscopie optique ont permis d'identifier d'autres espèces telles que : *Gymnodinium impudicum*, *Lejeunecysta* sp., *Lingulodinium machaerophorum*, *Spiniferites belerius*, *Votadinium* sp. et *Votadinium spinosum*. D'autres kystes, marron avec des épines, ont également été observés sans être identifiés de manière formelle (Figure 17).

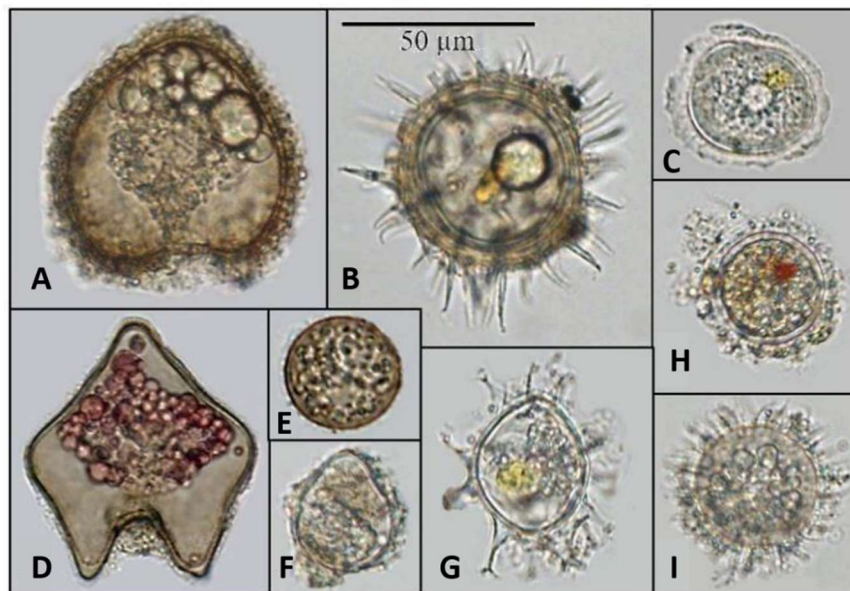


Figure 17 : Diversité des kystes les plus fréquemment observés dans les sédiments superficiels au large de la Loire and de la Vilaine. (A) *Votadinium spinosum*, (B) *Lingulodinium machaerophorum*, (C) *Gymnodinium impudicum*, (D) *Protoperidinium oblongum*, (E) Diplopsalids, (F) *Gonyaulax verior*, (G) *Spiniferites belerius*, (H) *Alexandrium minutum*, (I) kyste marron et épineux non identifié. D'après Roux et al. (2023).

### 3.1.3.2.2 Isolement de kystes et identification en PCR

80 kystes présentant des similitudes avec les kystes de *L. chlorophorum* décrits par Sournia *et al.* (1992) en termes de taille, de morphologie, de couleur, ont été isolés et analysés par PCR. Sur les 80 kystes, seulement 8 ont été correctement séquencés : trois d'entre eux ont pu être identifiés (similitude de 90-99% avec la séquence de référence) comme appartenant à l'espèce d'eau douce *Poterioochromonas malhamensis* (Figure 18B). Trois autres étaient proches à 90% du genre *Enciculifera* sp. (Figure 18C), deux à 94% du dinoflagellé *Ebria tripartita* (Cercozoa ; Figure 18D) et le dernier était proche à 91% du cilié *Strombidiniopsis batos* (Figure 18E).

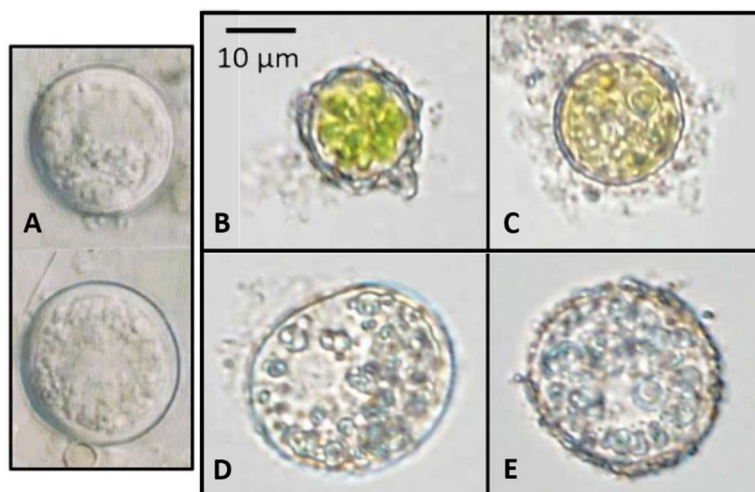


Figure 18 : Kystes identifiées par PCR sur cellule unique. (A) kystes de *L. chlorophorum* observés par Sournia *et al.* (1992), (B) *Poterioochromonas malhamensis*, (C) kystes de dinoflagellés, (D) kystes de Cercozoa, (E) kyste de ciliés. D'après Roux *et al.* (2023).

En conclusion, toutes ces analyses n'ont pas pu mettre en évidence l'existence de kystes de *Lepidodinium* dans les sédiments superficiels récoltés sur la zone d'étude.

### 3.1.3.2.3 Analyses de l'ADNe

L'analyse de l'ADNe met en évidence des traces du genre *Lepidodinium* dans les sédiments superficiels récoltés sur toutes les stations et dans les différents types sédimentaires (vases et sables) à l'exception de la station NOIR, sur laquelle aucune trace de *Lepidodinium* n'a été détectée dans les deux répliques analysés (Figure 19). Cependant, *Lepidodinium* représentait moins de 1% de l'abondance totale des protistes sur l'ensemble des stations. L'abondance relative la plus élevée (0,74%) a été observée dans les sédiments de la station PMAE. L'abondance relative de *Lepidodinium* était légèrement plus élevée dans les sédiments de la Baie de Vilaine qu'au large de la Loire ou dans la Baie de Bourgneuf.



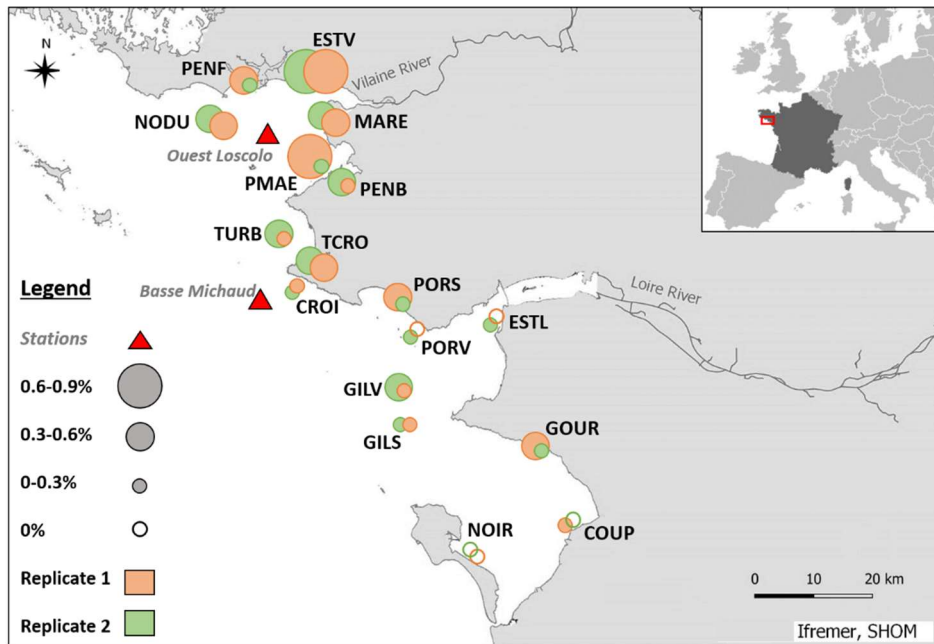


Figure 19 : Distribution de l'ADN environnemental de *Lepidodinium* dans les sédiments superficiels au large de la Loire et de la Vilaine. Des duplicats d'échantillons de sédiment ont été prélevés et analysés pour chaque station (cercles orange et vert). La taille des cercles est proportionnelle à l'abondance relative de *Lepidodinium* dans les échantillons. Les stations échantillonnées sont : La Coupelasse (COUP), Croisic Large (CROI), Estuaire Loire (ESTL), Estuaire Vilaine (ESTV), Pointe Saint Gildas (GILS et GILV), Gourmalon (GOUR), Maresclé (MARE), Nord Dumet (NODU), Noirmoutier (NOIR), Penbé (PENB), Pénerf (PENF), Pont Mahé (PMAE), Pornichet (PORS et PORV), Traict du Croisic (TCRO) et La Turballe (TURB). D'après Roux *et al.* (2023).

### 3.1.4 Discussion

#### 3.1.4.1 Origine de l'inoculum de *Lepidodinium chlorophorum*

Chez les dinoflagellés, il est souvent admis que la remise en suspension et la germination de kystes benthiques est à l'origine de l'initiation des blooms (e.g. Kirn *et al.*, 2005 ; Brosnahan *et al.*, 2020). En effet dans de nombreux environnements côtiers, un lien étroit a été établi entre les zones d'accumulation de kystes dans les couches superficielles des sédiments et les zones où des blooms d'envergure étaient observés (Anderson *et al.*, 2014). Cependant, dans notre étude malgré les nombreuses eaux colorées vertes observées au cours de l'été 2018 sur la zone d'étude (Table 1) et la multiplicité des techniques employées, aucun kyste de *L. chlorophorum* n'a pu être identifié dans les sédiments superficiels échantillonnés au cours de l'hiver 2019/2020.

En effet, les expériences de germination ainsi que l'identification des kystes par PCR, n'ont pas permis d'identifier des kystes de *L. chlorophorum* dans les sédiments récoltés. De la même manière, l'analyse de l'ADNe des sédiments n'a révélé que des traces d'ADN appartenant au genre *Lepidodinium*. Ces résultats peuvent suggérer la présence de kystes à de très faibles concentrations dans les sédiments superficiels de la zone. Cependant, l'ADN extracellulaire pouvant représenter une fraction significative de l'ADN stocké dans les sédiments (Pietramellara *et al.*, 2009), nous ne pouvons pas exclure que les traces de *Lepidodinium* détectées correspondent à de l'ADN extracellulaire. L'ensemble de ces résultats laissent à penser que la formation de kystes de résistance benthiques par *L. chlorophorum* serait peu probable.

En revanche, *Lepidodinium* a été détecté dans la colonne d'eau à plusieurs reprises sur les deux stations au cours des deux automne/hiver étudiés. Ces observations suggèrent que l'inoculum à l'origine des blooms pourrait être d'origine pélagique. Ainsi, les cellules de *Lepidodinium* pourraient séjourner, en faible concentration dans la colonne d'eau pendant l'hiver, sous forme

de cellule de dormance, en attendant la mise en place de conditions environnementales propices à leur croissance.

Tableau 1 : Observations des eaux colorées vertes recensées par le projet de sciences participatives Phenomer<sup>4</sup> au cours de l'été 2018 sur la zone d'étude et abondances maximales observées. Les stations échantillonnées au cours de l'hiver 2019/2020 sont localisées sur les figures 12 et 19. D'après Roux *et al.* (2023).

Stations	Date d'observation des eaux colorées vertes (projet Phenomer)	Max. Abondance <i>L. chlorophorum</i> (cells L <sup>-1</sup> )	Date de Max
La Coupelasse (COUP)	/	/	/
Croisic Large (CROI)	/	/	/
Estuaire Loire (ESTL)	/	/	/
Estuaire Vilaine (ESTV)	17/07/18	95.0 × 10 <sup>6</sup>	17/07/18
Pointe Saint Gildas (GILDS)	06/08/18	/	/
Pointe Saint Gildas (GILDV)	06/08/18	/	/
Gourmalon (GOUR)	03/08/18	2.0 × 10 <sup>6</sup>	03/08/18
Maresclé (MARE)	12/07/18	15.0 × 10 <sup>6</sup>	17/07/18
Nord Dumet (NODU)	/	6.0 × 10 <sup>5</sup>	23/07/18
Noirmoutier (NOIR)	/	/	/
Penbé (PENBE)	25/07/18	5.1 × 10 <sup>6</sup>	25/07/18
Penerf (PENF)	/	1.5 × 10 <sup>6</sup>	31/07/18
Pont Mahé (PMAE)	/	30.0 × 10 <sup>6</sup>	23/07/18
Pornichet (PORS)	/	/	/
Pornichet (PORV)	05/08/18	3.0 × 10 <sup>6</sup>	05/08/18
Traict du Croisic (TCRO)	/	/	/
La Turballe (TURB)	/	/	/

#### 3.1.4.2 Facteurs environnementaux

Les résultats acquis au cours de cette étude ont mis en évidence une corrélation entre les abondances maximales de *Lepidodinium* et les fortes teneurs en ammonium, ces dernières faisant suite à des augmentations de la turbidité à proximité du fond. Ces résultats suggèrent qu'une remise en suspension de l'ammonium contenu dans les sédiments superficiels, pourrait être un facteur favorable à l'initiation d'un bloom.

En effet, l'accumulation d'ammonium dans les sédiments est bien documentée (e.g. Chapelle *et al.*, 2000 ; Gribsholt *et al.*, 2005), et en Baie de Vilaine, Ratmaya *et al.* (2022) ont mesuré des concentrations en ammonium sous les 5 premiers cm de sédiment variant entre 300 µM en septembre et pouvant dépasser les 1200 µM en juin et août. Plusieurs études ont montré que l'adsorption et la désorption de l'ammonium des sédiments pouvait être réversible et que l'ammonium pouvait être libéré dans les eaux interstitielles lors d'un changement des conditions environnementales (Morin et Morse, 1999 ; Morse et Morin, 2005 ; Fitzsimons *et al.*, 2006 ; Ospina-Alvarez *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2015). Ainsi, lorsque la colonne d'eau est homogène, la remise en suspension des sédiments peut induire une augmentation des teneurs en ammonium

<sup>4</sup> Phenomer : [www.phenomer.org](http://www.phenomer.org)

dans la colonne d'eau favorable à la croissance du phytoplancton. A l'instar de nombreuses autres espèces phytoplanctoniques, *L. chlorophorum* présenterait une forte affinité pour l'ammonium. En effet, Iriate *et al.* (2005) ont mis en évidence une forte activité glutamine synthétase, principale enzyme d'assimilation de l'ammonium, au sein d'un bloom de *L. chlorophorum* au large du Chili. Les fortes abondances de *Lepidodinium* détectées conjointement à des teneurs élevées en ammonium au cours de cette étude, tendent à confirmer cette hypothèse. Ces observations suggèrent qu'un apport de NH<sub>4</sub> pourrait être à l'origine de l'initiation des blooms. Cependant, des expériences sur des cultures en milieu contrôlé sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Bien que l'apport de NH<sub>4</sub> dans la colonne d'eau peut avoir favorisé la croissance de *L. chlorophorum* au cours de l'hiver, aucun bloom n'a été observé pendant cette période. Des études précédentes ont montré que les blooms de *L. chlorophorum* étaient associés à des conditions estivales (i.e. température et salinité élevée, forte irradiance, stratification verticale ; Karasiewicz *et al.*, 2020 ; Sourisseau *et al.*, 2016 ; Roux *et al.*, 2022). L'absence de telles conditions au cours de la période d'étude a certainement limité la formation d'un bloom. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'un apport de NH<sub>4</sub> dans la colonne d'eau, quel que soit son origine (remise en suspension des sédiments, apports d'eau douce...), se produisant plus tardivement dans l'année lorsque la température de l'eau et l'irradiance sont plus élevées, pourrait être à l'origine de l'initiation d'un bloom conduisant, si les conditions se maintiennent, à la formation d'eaux colorées vertes.

## 3.2 Dynamique spatio-temporelle des efflorescences de *L. chlorophorum* et propriétés biogéochimiques des eaux colorées vertes

### 3.2.1 Analyse des séries à long terme

#### 3.2.1.1 Contexte et objectifs

Cette étude se base sur les données acquises par le REPHY<sup>5</sup> depuis les années 90. L'objectif de ce travail était d'étudier la variabilité interannuelle et la dynamique saisonnière des efflorescences de *L. chlorophorum* sur différentes stations réparties le long du littoral, afin d'identifier les facteurs environnementaux à l'origine de l'établissement et du maintien de ces blooms.

#### 3.2.1.2 Mise en œuvre

Pour ce faire, nous avons choisi d'analyser uniquement les données issues de la stratégie « FLORE TOTALE » du REPHY. Cette stratégie vise à identifier et dénombrer chacune des espèces phytoplanctoniques (> 20 µm), toxiques ou non, présentes dans un échantillon d'eau de mer.

L'étape suivante a été de choisir les stations d'échantillonnage et la période d'étude. Parmi les stations REPHY de la zone d'étude, nous avons choisi celles répondant à trois critères: (i) la récurrence des observations de *L. chlorophorum*, (ii) la régularité de la fréquence d'échantillonnage et (iii) la disponibilité des données environnementales. D'autre part, nous avons pris en compte les changements d'observateurs ainsi que les périodes de formation de ces derniers à la taxonomie du phytoplancton, susceptibles d'introduire une rupture dans les séries temporelles (Figure 20).

---

<sup>5</sup> REPHY : Réseau de surveillance du phytoplancton et des phytotoxines (<https://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Surveillance/REPHY>)

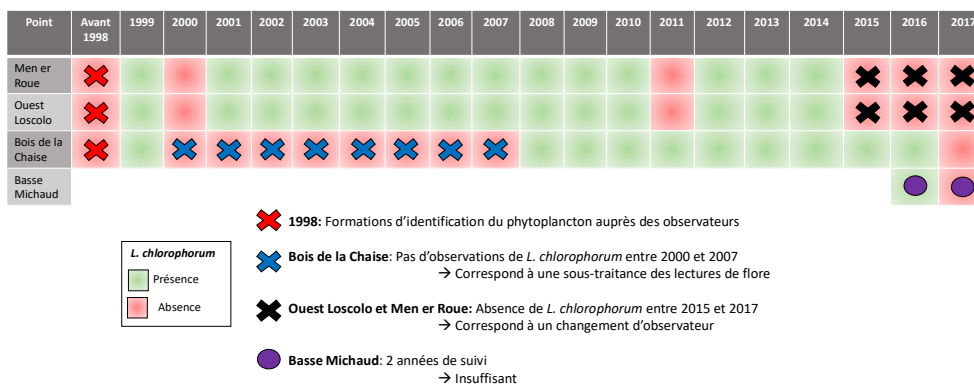


Figure 20 : Exemple de tableaux établis pour cartographier les données disponibles et utilisables dans le cadre de cette étude.

Nous nous sommes finalement concentrés sur la période d'étude allant de 1998 à 2019, pour les stations situées en baies de Vilaine (« Ouest Loscolo »), de Quiberon (« Men er Roué »), de Concarneau (« Concarneau »), de Douarnenez (« Kervel ») et de Brest (« Lanvéoc »), où des observations de *L. chlorophorum* ont été régulièrement recensées (Figure 21).

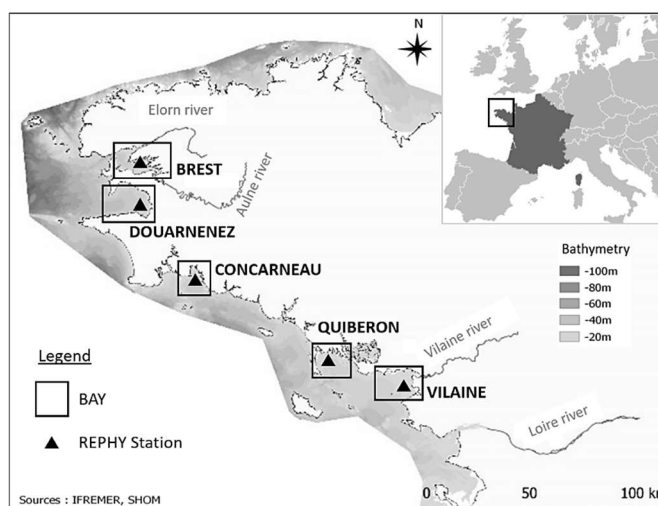


Figure 21 : Localisation des 5 baies : Brest (station « Lanvéoc »), Douarnenez (station « Kervel »), Concarneau (station « Concarneau »), Quiberon (station « Men er Roué ») et Vilaine (station « Ouest Loscolo ») d'où proviennent les séries temporelles REPHY étudiées sur la période allant de 1998 à 2019. D'après Roux (2022).

### 3.2.1.3 Résultats

#### 3.2.1.3.1 Variabilité spatiale

Au cours des deux dernières décennies, *L. chlorophorum* a été plus fréquemment observé dans la partie nord que dans la partie sud de la zone d'étude (Figure 22). Entre 1998 et 2019, le nombre d'observations a dépassé 145 dans les baies de Concarneau (N=168), Douarnenez (N=145) et Brest (N=194), alors qu'il était inférieur à 85 dans les baies de Quiberon (N=83) et de Vilaine (N=82).

Cependant, les efflorescences (abondances  $> 10^5$  cells  $L^{-1}$ ; seuil défini par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)) étaient plus fréquentes dans la partie sud, donc dans les baies de Vilaine (29% des observations) et de Quiberon (17%), que dans la partie nord (6%, 4% et 12% dans les baies de Concarneau, Douarnenez et Brest, respectivement).



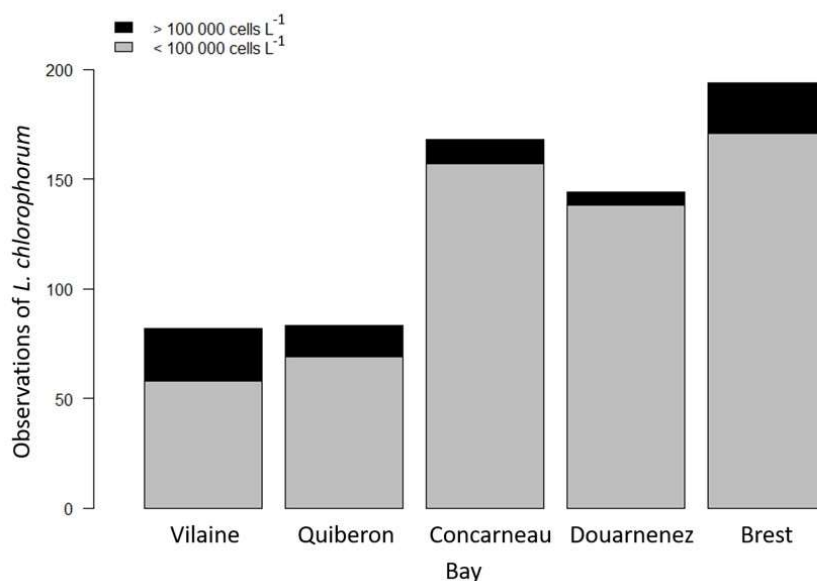


Figure 22 : Nombre d'observations de *L. chlorophorum* au sein de chacune des baies suivies dans le cadre du réseau REPHY entre 1998 et 2019. Une efflorescence de *L. chlorophorum* est définie comme un évènement présentant des concentrations cellulaires  $> 10^5$  cells L<sup>-1</sup> (stratégie DCE). D'après Roux (2022).

Sur la période d'étude, les efflorescences ont été plus fréquemment observées dans la partie sud (baies de Vilaine et Quiberon) que dans la partie nord (baies de Brest, Douarnenez et Concarneau). Une étude récente a émis l'hypothèse que l'eutrophisation et l'hydrodynamisme seraient des conditions propices à l'établissement des efflorescences de *L. chlorophorum* (Karasiewicz *et al.*, 2020). Nos résultats tendent donc à confirmer cette hypothèse. En effet, la baie de Vilaine a subi une eutrophisation au fil des décennies et est toujours considérée comme la zone la plus impactée de la façade atlantique française (Ratmaya *et al.*, 2019). En plus de recevoir d'importants apports d'eau douce de la Loire et de la Vilaine, les faibles courants de marée et résiduels au sein de cette baie favorisent l'établissement d'une stratification verticale de la colonne d'eau, qui serait propice au développement des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* (Roux *et al.*, 2022). En revanche, dans la partie nord, la stratification de la colonne d'eau est beaucoup moins fréquente, du fait de courants de marée plus élevés. Cette différence pourrait expliquer la variabilité spatiale observée en termes de fréquence d'apparition de blooms importants (i.e.  $> 100\ 000$  cell L<sup>-1</sup>).

### 3.2.1.3.2 Variabilité interannuelle

Les observations du REPHY mettent en évidence une forte variabilité interannuelle des blooms de *L. chlorophorum* sur les différentes stations étudiées (Figure 23). La fréquence et l'intensité des blooms apparaissent plus élevées en Baie de Vilaine que sur les autres stations au cours de la période étudiée. Pour une même année, les abondances maximales de *L. chlorophorum* peuvent être disparates sur la zone d'étude. Ainsi en 2007, de fortes abondances ont été relevées uniquement en Baie de Vilaine. En 1999, des blooms importants ont été observés en Baie de Vilaine et en Baie de Douarnenez, alors que les abondances sont restées relativement faibles sur les autres stations.

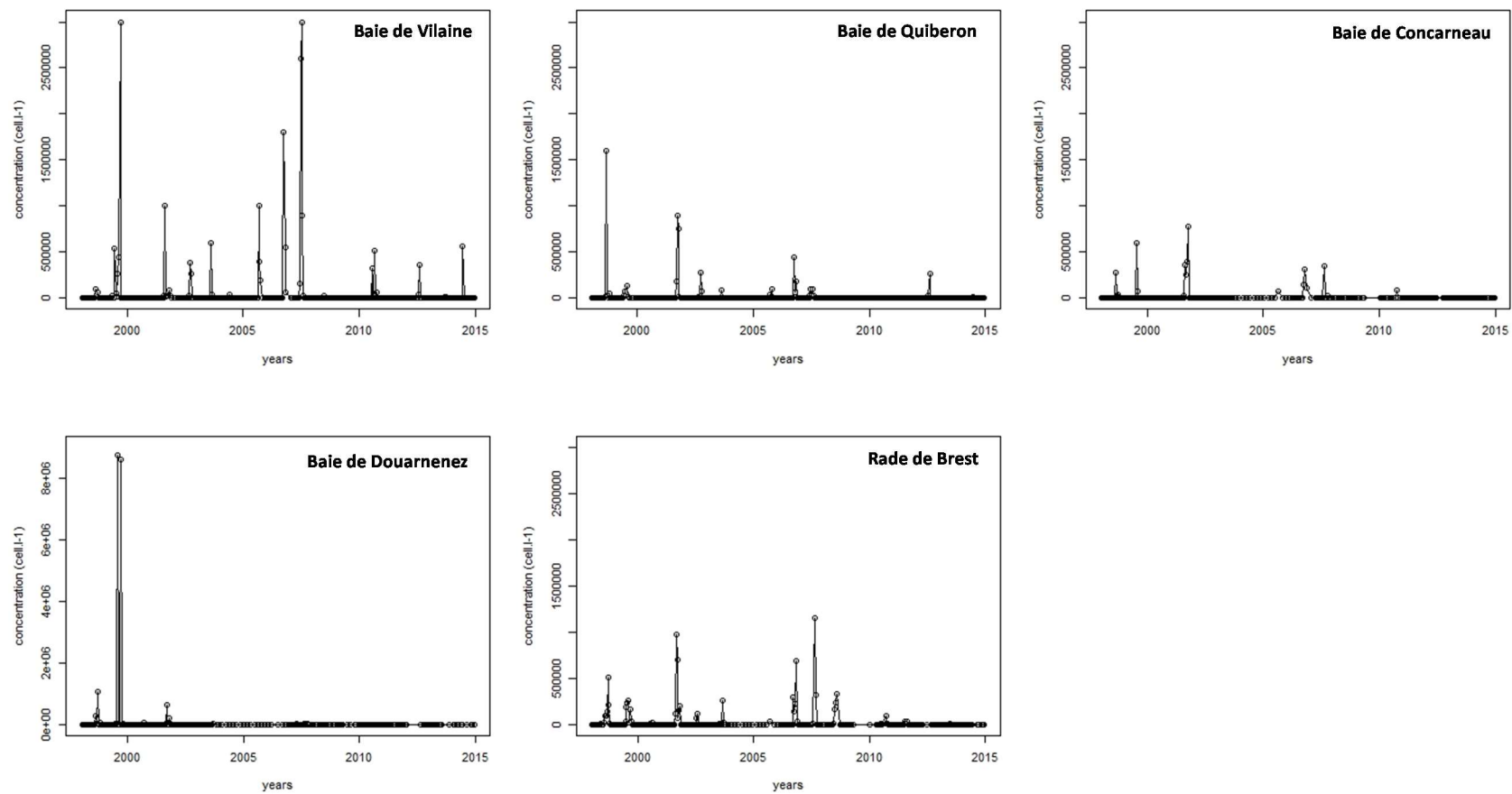


Figure 23 : Abondances de *L. chlorophorum* (concentrations (Cell L<sup>-1</sup>) enregistrées dans le cadre du REPHY sur les 5 baies étudiées et pour la période 1998-2015.

Par ailleurs, il semble exister une certaine contradiction entre le nombre d'eaux colorées vertes recensées sur la zone (recensement via Phenomer ou par le laboratoire) et les abondances maximales enregistrées sur un point fixe par le REPHY. Par exemple, de nombreuses eaux colorées vertes ont été observées au cours de l'été 2012, qui a également été marqué par un épisode de mortalité assez marqué en Baie de Vilaine (Souchu *et al.*, 2018) et au large de la Loire. Or, les abondances maximales de *L. chlorophorum* enregistrées sur la station REPHY au cours de ce même été n'ont pas atteint des valeurs exceptionnelles (Figure 23). Compte tenu de ces disparités, entre recensements et comptages du REPHY, il a été difficile d'identifier de manière objective et quantitative les années propices au développement des blooms de *L. chlorophorum*.

#### 3.2.1.3.3 Dynamique saisonnière

Concernant le cycle saisonnier de cette espèce, *L. chlorophorum* est observé entre mai et novembre, avec des concentrations maximales (pouvant atteindre  $10^6$  cell L<sup>-1</sup>) entre juillet et septembre sur les 5 sites étudiés (Figure 24). Cette saisonnalité avait été précédemment décrite par Belin et Soudant (2018). La représentation en boîte à moustache sur la figure 24 met également en exergue la forte variabilité interannuelle de l'intensité des blooms de *L. chlorophorum* sur les points fixes du REPHY.

#### 3.2.1.4 Conclusions

Au cours de cette étude, la phase de démarrage d'une efflorescence n'a pas pu être caractérisée car *L. chlorophorum* est difficile à identifier lorsqu'il est présent en faibles concentrations cellulaires dans les échantillons fixés. En effet, la fixation au Lugol modifie l'aspect (taille, forme, couleur) de la cellule ce qui la rend difficilement identifiable parmi les autres Gymnodiniacées.

De plus, l'échantillonnage à un point fixe, tel qu'il est réalisé dans le cadre du REPHY, n'est probablement pas la meilleure stratégie pour identifier la dynamique des efflorescences vertes de *L. chlorophorum* puisque ces dernières peuvent être fugaces et très localisées.

D'autre part, les concentrations en nutriments étaient disponibles uniquement à partir de 2008 pour les baies de Concarneau, Douarnenez et Brest, et seulement entre novembre et février en baies de Douarnenez et Brest (stratégie d'échantillonnage DCE). Ce jeu de données n'a donc pas permis de répondre aux objectifs fixés au début du projet. Des analyses statistiques plus poussées seraient probablement nécessaires pour apporter des éléments de réponse concernant la phénologie des efflorescences de *L. chlorophorum* à l'échelle interannuelle.

Par ailleurs l'inclusion de nouvelles stations ainsi que les dernières années (2020-2023), pourraient permettre d'apporter de nouveaux éléments. En effet, certaines stations suivies par l'Ifremer dans le cadre des réseaux d'observation, n'avaient pas été incluses dans l'analyse car la série était trop courte. C'est le cas par exemple de la station Basse-Michaud où le suivi n'a débuté qu'en 2016.

Enfin, cette étude met également en exergue l'importance d'un suivi régulier des paramètres environnementaux en complément des comptages phytoplanctoniques. Ces éléments sont essentiels à la compréhension des facteurs environnementaux qui contrôlent ces épisodes.

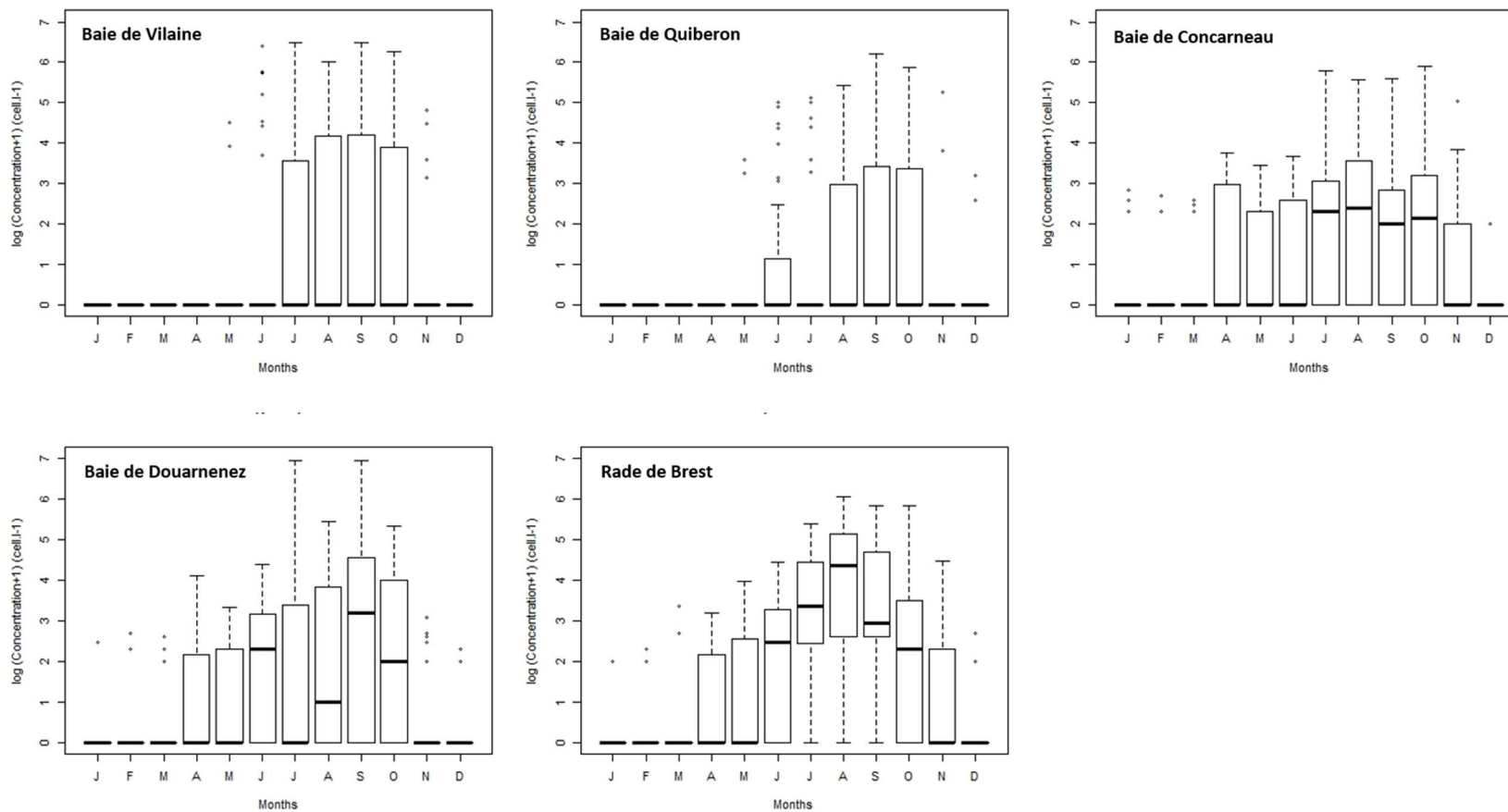


Figure 24 : Dynamique saisonnière des abondances de *L. chlorophorum* (échelle log) au cours de la période d'étude et sur les 5 sites. La ligne horizontale représente la valeur médiane pour chaque mois calculé sur la période d'étude et les boîtes représentent les premiers et troisième quartile. Les points représentent des valeurs extrêmes.

### 3.2.1.5 Perspectives

Un suivi saisonnier a été mis en place en avril 2019 et pendant deux années consécutives (Figure 25). Ce suivi environnemental, réalisé sur 6 stations contrastées situées au large de la Loire et de la Vilaine, avait pour objectif d'apporter de nouveaux éléments de réponse concernant la phénologie de l'espèce *L. chlorophorum* (e.g., facteurs environnementaux contrôlant le développement des efflorescences, distribution verticale de *L. chlorophorum*).

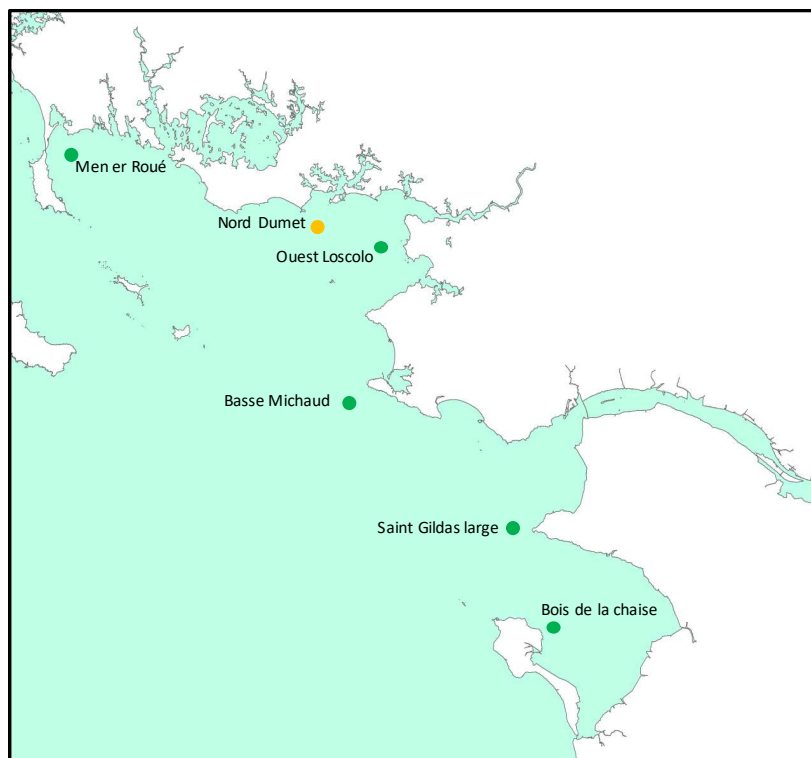


Figure 25 : Localisation des 6 stations suivies dans le cadre du projet Lepido-Pen au cours des années 2019, 2020 et 2021. Le point jaune représente la station Nord Dumet sur laquelle est positionnée une bouée instrumentée haute-fréquence (bouée MOLIT)

Par ailleurs, afin de mieux appréhender les conséquences des efflorescences de *L. chlorophorum* sur le fonctionnement des écosystèmes, des échantillonnages spécifiques au sein d'eaux colorées vertes étaient prévus au cours de ces deux années d'étude. Ainsi, une eau colorée verte à *L. chlorophorum* a été échantillonnée en juillet 2019. Afin de compléter les données acquises concernant les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum*, l'échantillonnage d'une nouvelle eau colorée verte devait être réalisé au cours de l'été 2020. Les objectifs fixés pour ce nouvel échantillonnage étaient (i) d'estimer les concentrations bactériennes présentes au sein d'une eau colorée verte et (ii) de mesurer un potentiel excès de viscosité *in situ*. Cependant, il n'a pas été possible de programmer un tel échantillonnage dans le contexte de la crise sanitaire liée au Covid-19. De la même manière, le suivi environnemental qui devait se poursuivre en 2020 a été largement tronqué durant le confinement. Ainsi, aucune donnée n'a pu être acquise entre mars et fin juin 2020. Il a donc été décidé de poursuivre l'échantillonnage en 2021 afin de pouvoir notamment échantillonner une nouvelle eau colorée verte au cours de l'été 2021. Toutefois, l'été 2021 a été marqué par des conditions environnementales atypiques (e.g., forts débits de la Loire et de la Vilaine au mois de juillet, températures relativement faibles pendant tout l'été). Si *L. chlorophorum* a pu être observé sur différentes stations, aucune eau colorée verte n'a été recensée au cours de cette dernière année de suivi.

### 3.2.2 Dynamique spatio-temporelle d'une eau colorée verte

#### 3.2.2.1 Contexte et objectifs

Dans les systèmes côtiers, les efflorescences phytoplanctoniques sont contrôlées par des facteurs physiques (*e.g.* débit fluvial, nutriments, température) et biologiques (*e.g.*, broutage, parasitisme, infections virales). Lorsqu'elles se produisent à forte biomasse, ces efflorescences peuvent induire une coloration de la surface de l'eau de mer (Siano *et al.*, 2020). Bien que la présence de *Lepidodinium chlorophorum* soit relativement bien documentée (*e.g.* Honsell *et al.*, 1988 ; Elbrachter and Schnepf, 1996 ; Karasiewicz *et al.*, 2020 ; Siano *et al.*, 2020 ; Serre-Fredj *et al.*, 2021), les propriétés biologiques et écologiques qui font le succès de cette espèce dans l'environnement n'ont pas encore été élucidées.

Les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum*, principalement observées en été (Belin *et al.*, 2021), pourraient être soutenues par le recyclage de l'azote organique en ammonium (Iriarte, 2005 ; Sourisseau *et al.*, 2016). Par ailleurs, ce dinoflagellé a été observé dans les panaches fluviaux et de fortes densités ont été ponctuellement mesurées au niveau de la pycnocline, dans des eaux stratifiées (Sourisseau *et al.*, 2016). En conditions contrôlées non-limitantes, *L. chlorophorum* excrète une grande quantité de TEP (Claquin *et al.*, 2008 ; Roux *et al.*, 2021). Si l'effet direct de ces TEP sur la faune marine reste à démontrer, les hypoxies/anoxies post-efflorescence sont suspectées d'être une cause majeure de mortalité (Sournia *et al.*, 1992 ; Siano *et al.*, 2020). Cependant, aucune étude n'a cherché à savoir si cette production de TEP représentait un avantage écologique pour *L. chlorophorum*.

Afin de répondre à ces questions, un suivi a été mené *in situ* d'avril 2019 à novembre 2021 pour caractériser le cycle saisonnier de cette espèce. Afin de décrire la dynamique spatio-temporelle et les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte, un échantillonnage spécifique a été réalisé en juillet 2019 au cœur d'une eau colorée verte et couplé à l'étude de données satellitaires. La concentration et la composition des EPS produites *in situ* ont été caractérisées. Enfin, la contribution des TEP (fraction particulaire des EPS) au pool de carbone organique a été estimée afin d'évaluer les effets potentiels de cette propriété biologique de *L. chlorophorum* sur le fonctionnement de l'écosystème.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un chapitre de la thèse de Pauline Roux (Roux, 2022) et a été valorisé sous forme d'un article scientifique de rang A (Roux *et al.*, 2022).

Les principaux résultats sont présentés ci-après.

#### 3.2.2.2 Mise en œuvre

##### 3.2.2.2.1 Suivi saisonnier

L'échantillonnage a été conduit sur six stations suivies dans le cadre des campagnes Lepido-Pen entre avril 2019 et décembre 2021 (Figure 25). A cause de la crise sanitaire liée au Covid-19 et du confinement du printemps 2020, aucune donnée n'a pu être acquise entre mars et fin juin 2020.

Les échantillons et les données ont été collectés à une fréquence bi-mensuelle, autour de la pleine mer ( $\pm 2$ h).

Sur chaque station ont été réalisés des profils verticaux de température ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinité, turbidité (NTU) et fluorescence (FFU) de la surface jusqu'à 1 m au-dessus du fond à l'aide d'une sonde multi-paramètre (NKE, MP6). Après lecture du profil de fluorescence, des échantillons ont été prélevés à trois profondeurs différentes : (i) en sub-surface (0-1 m), (ii) au maximum de fluorescence lorsqu'il était présent et (iii) à 1 m au-dessus du fond. Des sous-échantillons ont été utilisés pour l'identification et l'énumération des espèces micro-phytoplanctoniques par microscopie optique, la détermination de la biomasse phytoplanctonique ( $[\text{Chla}] ; \mu\text{g L}^{-1}$ ), des concentrations en

nutriments inorganiques ([DIN, DIP, DSi] ;  $\mu\text{M}$ ), des concentrations en TEP ([TEP ;  $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ ), des concentrations en carbone particulaire ([POC] ;  $\mu\text{M}$ ). Les procédures analytiques sont décrites dans l'annexe 3.

Sur la station « Nord Dumet », les échantillonnages ponctuels ont été complétés par l'acquisition de données haute fréquence à partir de la bouée instrumentée MOLIT du réseau COAST-HF (Coastal Ocean observing SysTem-High Frequency). Cette bouée instrumentée mesure la température, la salinité et les concentrations en oxygène dissous, toutes les heures, en surface et à 1 m au-dessus du fond. (Retho *et al.*, 2020).

Les débits de la Loire et de la Vilaine ont été extraits de la base de données Hydro (<https://www.hydro.eaufrance.fr/>). Les données journalières de vent proviennent des données enregistrées sur la station « Belle-Ile – Le Talus » ( $47^{\circ}17'39''\text{N}$  ;  $3^{\circ}13'05''\text{O}$ ) par Météo-France (<https://donneespubliques.meteofrance.fr/>).

### 3.2.2.2.2 Échantillonnage dans une eau colorée verte

Le 9 juillet 2019 un échantillonnage a été réalisé au cœur d'une eau verte à *L. chlorophorum* en Baie de Vilaine, afin d'étudier la structure spatiale et les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée. Cet échantillonnage a pu être mis en place suite aux observations des citoyens via le projet de sciences participatives Phenomer et l'observation des images satellites (Université de Nantes). Les mesures et échantillons ont été collectés sur 6 stations réparties le long d'un gradient côte-large, suivant la même procédure que celle suivie pour le cycle saisonnier et décrite précédemment (Figure 26G).

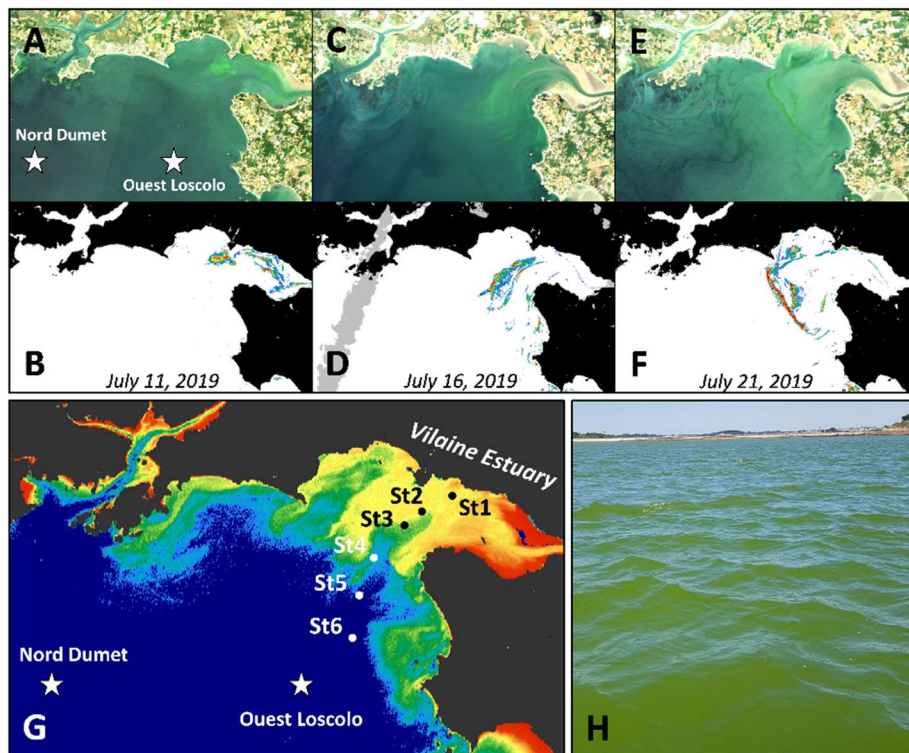


Figure 26 : (A–F) Exemples d'images Sentinel-2 (11, 16 et 21 Juillet 2019) acquises pendant l'épisode d'eau colorée verte de l'été 2019. Panel supérieur : images RGB; panel inférieur: rapport de réflectance  $R_{rs}(705)/R_{rs}(665)$  utilisé comme un proxy des concentrations en chlorophylle a. (G) Localisation des stations suivies dans le cadre du suivi saisonnier en Baie de Vilaine ainsi que les stations d'échantillonnage de l'eau colorée verte étudiées le 9 juillet 2019. La carte montre une estimation qualitative des concentrations en chlorophylle a à partir d'une image Landsat-8 acquise le 9 juillet 2019. (H) Photographie de la surface de l'eau au sein de l'eau colorée verte étudiée. D'après Roux *et al.* (2022).



De nouveaux paramètres ont cependant été suivis afin d'étudier la matière organique produite au sein d'une eau colorée : concentrations en carbone et azote organique ([DOC] et [DON] ;  $\mu\text{M}$ ) et concentrations en nitrite ( $[\text{NO}_2]$  ;  $\mu\text{M}$ ). Les procédures analytiques sont décrites dans l'annexe 3. De la même manière, des échantillons d'eau ont été récoltés sur la station St1 afin d'étudier la composition de la partie soluble des substances polymériques extracellulaires (soluble extracellular polymers, SEP) produite au cœur du bloom de *L. chlorophorum*. Les analyses sont décrites en détail dans Roux et al. (2022). L'étude des images satellite a permis d'évaluer l'étendue spatiale de l'eau colorée et la durée de cet événement. Le traitement des images satellites est détaillé dans Roux et al. (2022).

### 3.2.2.3 Résultats

#### 3.2.2.3.1 Dynamique spatiale et temporelle des efflorescences de *L. chlorophorum*

*L. chlorophorum* est observé de mai à décembre 2019 en sub-surface et à proximité du fond sur les 3 stations (Figures 27S, T, U). Les plus fortes abondances sont observées à Fmax ou à proximité du fond (Table 2). En effet, les plus fortes abondances sont enregistrées sous la surface le 22 juillet 2019 à Nord Dumet ( $2,6 \times 10^5 \text{ cell L}^{-1}$  à 10,5 m ; table 2) et à Ouest Loscolo ( $1,9 \times 10^5 \text{ cell L}^{-1}$  au fond ; Figure 27T), et le 6 août sur la station Men Er Roue ( $5,0 \times 10^5 \text{ cell L}^{-1}$  à 5,6 m ; table 2). Ces observations montrent que *L. chlorophorum* peut être abondant à différents niveaux de la colonne d'eau.

Tableau 2 : Abondances de *L. chlorophorum* enregistrées au maximum de fluorescence (Fmax) sur les trois stations étudiées. D'après Roux et al. (2022).

Station	Date	<i>L. chlorophorum</i> (cells L <sup>-1</sup> )	Profondeur (m)
Nord Dumet	11 June 2019	$1.3 \times 10^3$	6.5
Nord Dumet	08 July 2019	$9.0 \times 10^2$	13.0
Nord Dumet	22 July 2019	$2.6 \times 10^5$	10.5
Nord Dumet	09 September 2019	0	11.0
Ouest Loscolo	09 September 2019	0	6.7
Men er Roue	06 August 2019	$5.0 \times 10^5$	5.6

Sur la station Nord Dumet, les données enregistrées sur la bouée MOLIT mettent en évidence une forte diminution des concentrations en oxygène à proximité du fond le 27 juillet ( $2,4 \text{ mg L}^{-1}$  ; figure 28A). Cette chute des teneurs en oxygène fait suite à de fortes abondances de *L. chlorophorum* ( $2,6 \times 10^5 \text{ cell L}^{-1}$  à 10,5 m), des concentrations en Chl*a* élevées ( $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$  ; figure 27P) et de fortes teneurs en [POC] ( $39 \mu\text{M}$  ; figure 27M) le 22 juillet sur la station Nord Dumet. La communauté phytoplanctonique était alors largement dominée par *L. chlorophorum* à proximité du fond (Figure 29B). Des concentrations élevées en [TEP] ont également été observées peu de temps après, à proximité du fond sur cette station ( $2883 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$  ; figure 27J).

Un mois avant l'apparition de ce bloom de *L. chlorophorum*, la période a été marquée par un débit de la Vilaine inhabituellement élevé pour la saison, avec des valeurs qui ont atteint  $69 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  le 7 juin ; la moyenne interannuelle pour cette même période étant de  $10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Figure 30). Une dessalure de surface est observée mi-juin à Nord Dumet, caractérisant l'arrivée d'eau douce sur cette station (Figures 27D et 28B). Des concentrations élevées en nutriments, et en particulier en ammonium ( $[\text{NH}_4]$ ) sont observées à proximité du fond durant cette période (Figure 31). Suite à cet épisode, une stratification thermique de la colonne d'eau est observée sur cette station, avec des températures plus élevées en surface qu'à proximité du fond (Figures 27A et 28C).



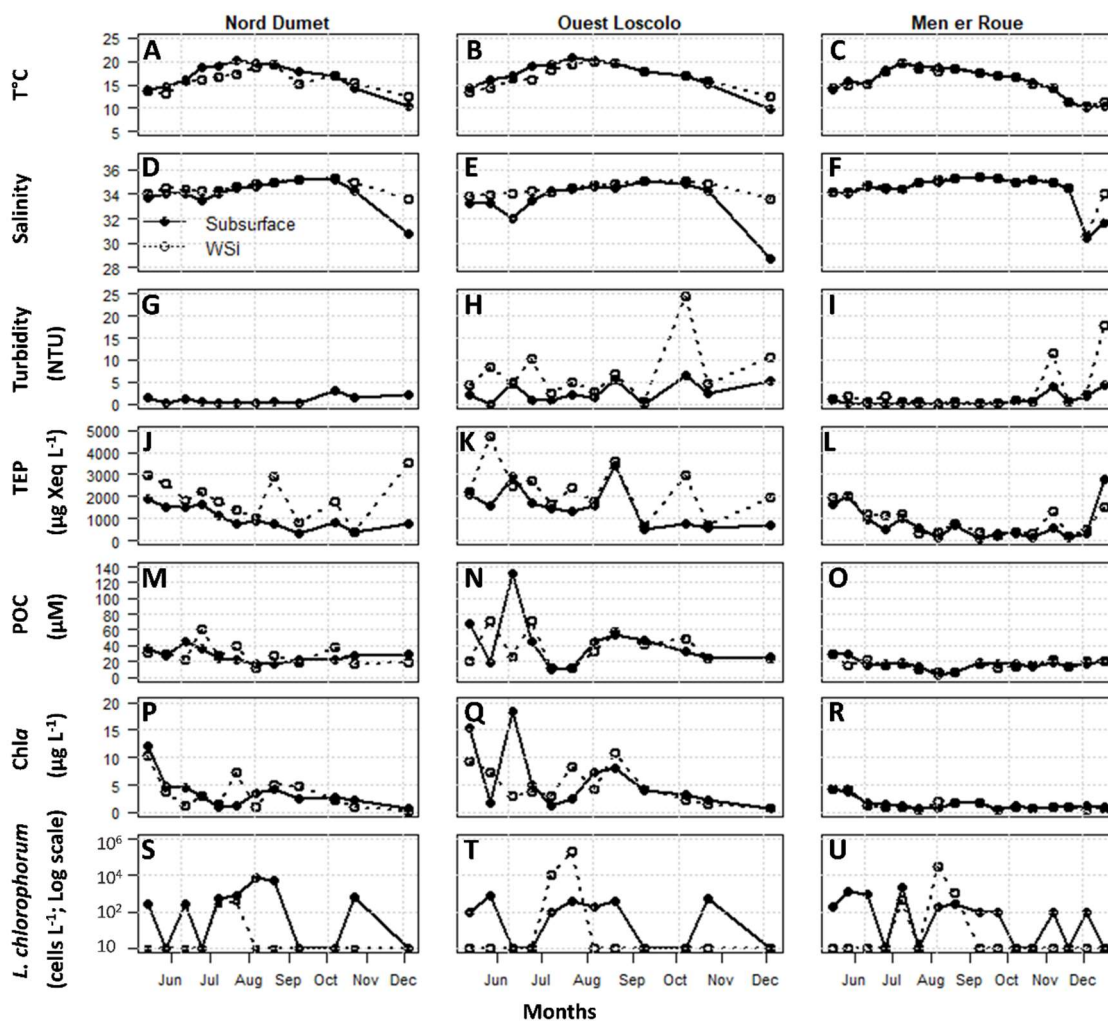


Figure 27 : Variations des paramètres environnementaux et biologiques enregistrés au cours de l'année 2019 sur les deux stations de la Baie de Vilaine (« Ouest Loscolo » et « Nord Dumet ») et la station de la Baie de Quiberon (« Men Er Roue »). Les abondances de *L. chlorophorum* sont représentées en échelle log (cell L<sup>-1</sup>). Les lignes pleines représentent les valeurs mesurées en sub-surface (1 m) et les lignes pointillées les valeurs relevées à proximité du fond. Les valeurs mesurées au maximum de fluorescence ne sont pas présentées sur la figure mais sont données dans le tableau 2. D'après Roux *et al.* (2022).

L'apport d'eau douce de début juin a également été enregistré sur la station Ouest Loscolo, avec des dessalures de surface observées en juin-juillet (Figure 27E) conjointement avec une augmentation des teneurs en nutriments et en particulier [NH<sub>4</sub>] à proximité du fond (Figure 31). Une augmentation de l'abondance de *L. chlorophorum* et des concentrations en Chla a été observée peu de temps après cet événement sur cette station (Figure 27T, Q).

La Baie de Quiberon est moins influencée par les apports d'eau douce et la salinité de surface est restée constante (≈34) durant tout l'été 2019 sur la station Men Er Roue (Figure 27F). Un bloom de *L. chlorophorum* a néanmoins été observé le 6 août à Fmax et à proximité du fond avec respectivement de  $5,0 \times 10^5$  cell L<sup>-1</sup> et  $3,1 \times 10^5$  cell L<sup>-1</sup> (Figure 27U et Table 2).

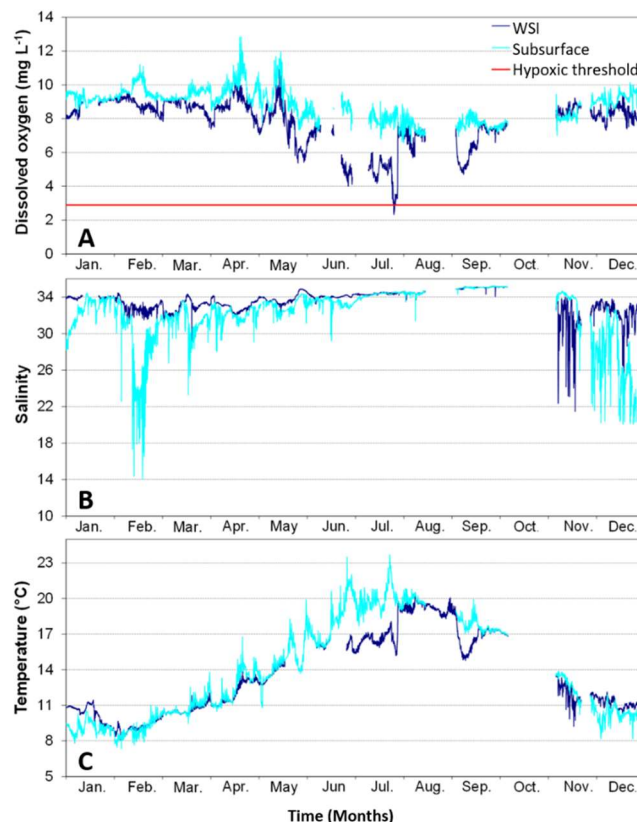


Figure 28 : Données enregistrées sur la station Nord Dumet par la bouée instrumentée MOLIT. (A) Concentrations en oxygène dissous ( $\text{mg L}^{-1}$ ), (B) salinité et (C) température ( $^{\circ}\text{C}$ ). En bleu clair les données enregistrées en sub-surface et en bleu foncé à proximité du fond. La ligne rouge sur la figure (A) représente le seuil d'hypoxie ( $2,9 \text{ mg L}^{-1}$ ). D'après Roux *et al.* (2022).

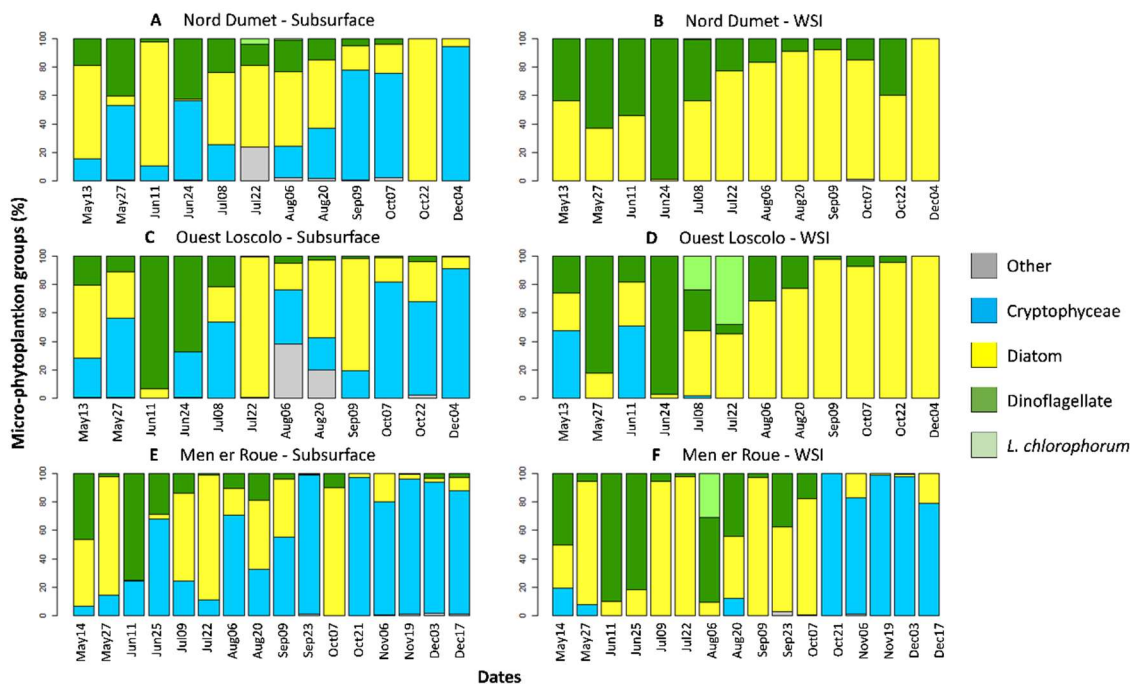


Figure 29 : Abondance relative des principaux groupes micro-phytoplanktoniques observés en 2019 sur les trois stations étudiées en sub-surface (A, C et E) et à proximité du fond (B, D, F). Les cryptophycées (bleu), les diatomées (jaune), les dinoflagellés (vert foncé) et *L. chlorophorum* (vert clair). D'après Roux *et al.* (2022).

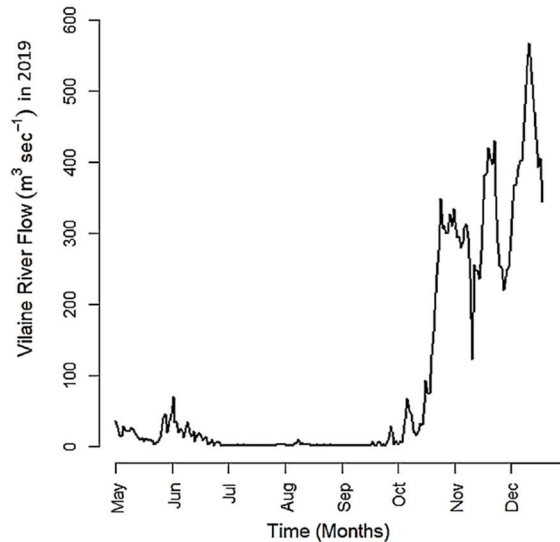


Figure 30 : Débit de la Vilaine ( $\text{m}^3 \text{sec}^{-1}$ ) enregistré entre Mai et Décembre 2019. Les données ont été acquises auprès de la banque Hydro (<http://www.hydro.eaufrance.fr/>). D'après Roux *et al.* (2022).

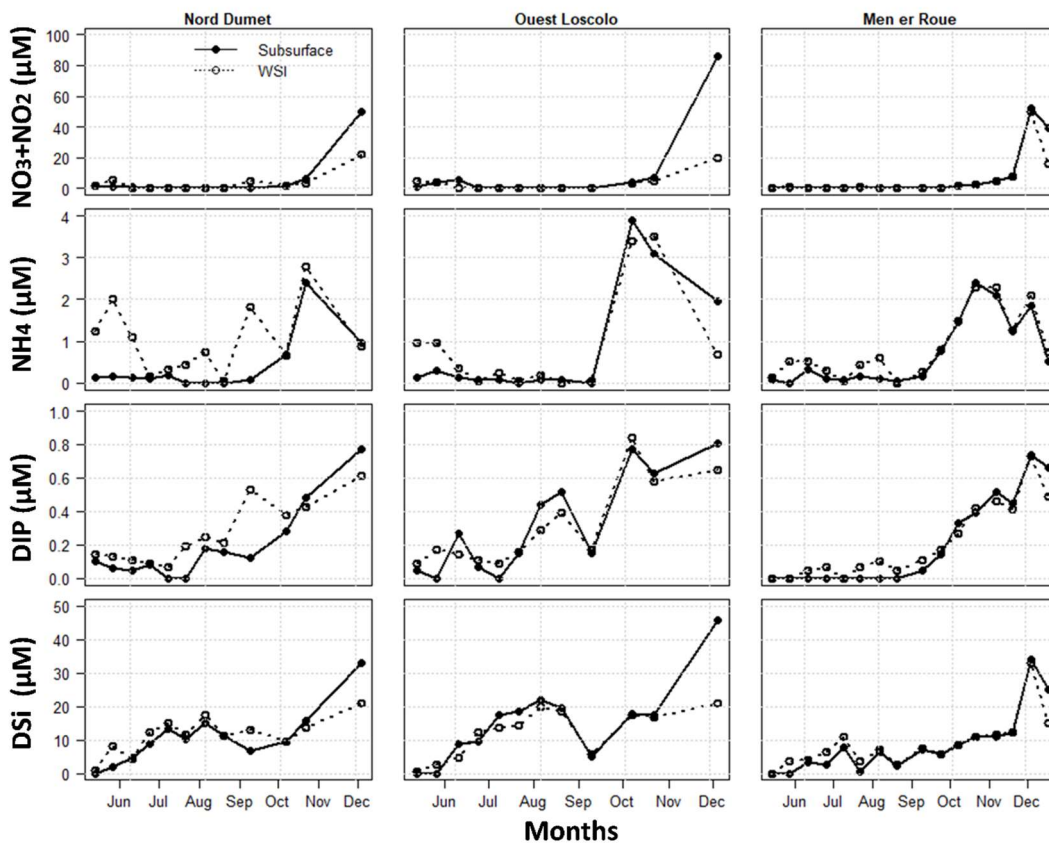


Figure 31 : Variations des concentrations en nutriments mesurées au cours de l'année 2019 sur les deux stations de la Baie de Vilaine (« Ouest Loscolo » et « Nord Dumet ») et la station de la Baie de Quiberon (« Men Er Roue »). Les lignes pleines représentent les valeurs mesurées en sub-surface (1 m) et les lignes pointillées les valeurs relevées à proximité du fond. D'après Roux *et al.* (2022).

### 3.2.2.3.2 Dynamique spatio-temporelle d'une eau colorée verte

L'eau colorée verte (ECV) détectée en juillet 2019 a été visible sur les images Sentinel-2 tout au long de l'événement (Figure 26). Les observations in situ, décrites ci-après, ont confirmé que cette ECV était liée à la prolifération du dinoflagellé *L. chlorophorum* avec des abondances en surface supérieure à  $10^6$  cell L<sup>-1</sup>, dans les eaux les plus vertes.

La résolution spatiale élevée des images S2 ont permis de suivre la distribution spatiale de cet événement en surface sur l'ensemble de la zone d'étude, complétant ainsi les observations réalisées en point fixe (cf. section précédente). Bien que la couverture nuageuse ait pu gêner occasionnellement l'observation par satellite, l'observation des images S2 sans couverture nuageuse, suggère que l'ECV aurait débuté autour de la mi-juin et se serait maintenue jusqu'à début août sur la zone (Table 3).

Le cycle tidal apparait comme le principal facteur déterminant la distribution spatiale de l'ECV en surface : des patchs de concentrations élevées en chlorophylle sont transportés à l'intérieur de l'estuaire de la Vilaine à marée haute (Figure 26A, B) et au large de l'estuaire au cours du jusant (Figure 26C, D). A marée basse, l'ECV est concentrée sur une fine zone frontale à l'extérieur de l'estuaire (Figure 26E, F). Au cours de cet événement, la surface du bloom a varié entre 2,27 et 12,95 km<sup>2</sup>, avec une étendue spatiale maximale observée fin-juin début juillet (Table 3).

Tableau 3 : Estimation de la surface du bloom à partir des observations des images Sentinel-2 (NA: Bloom visible mais surface non calculée à cause la couverture nuageuse), conditions tidales, hauteurs d'eau et cycle de marée (données SHOM). D'après Roux *et al.* (2022).

Date	Surface du bloom (km <sup>2</sup> )	Conditions de marée	Hauteur d'eau (m)	Cycle de marée
16 June 2019	NA	vive eau	1,72	flot
21 June 2019	2,67 (+/- 1,08)	morte eau	0,44	jusant
26 June 2019	12,95 (+/- 1,66)	morte eau	1,89	marée haute
01 July 2019	NA	vive eau	1,72	flot
06 July 2019	11,12 (+/- 4,75)	vive eau	0,61	jusant
11 July 2019	2,46 (+/- 1,14)	morte eau	3,00	marée haute
16 July 2019	2,37 (+/- 0,98)	morte eau	1,01	flot
21 July 2019	2,91 (+/- 1,03)	morte eau	0,57	jusant

L'échantillonnage conduit le 9 juillet 2019, a permis d'étudier la composition de la communauté micro-phytoplanctonique à l'intérieur de l'ECV. Trois stations (St1, St2 et St3) étaient situées dans des eaux extrêmement vertes, alors que les trois autres stations (St4, St5 et St6) étaient en dehors, comme le montrent à la fois les observations satellite et celles de terrain (Figure 26G, H).

L'analyse de la composition phytoplanctonique confirme la dominance de *L. chlorophorum* à l'intérieur de l'ECV : les cellules de *L. chlorophorum* représentant plus de 95% de l'abondance totale sur les trois stations localisées à l'intérieur de l'ECV (St1, St2 et St3) que ce soit en surface comme au fond (Figure 32). Sur les stations St5 et St6, l'abondance relative de *L. chlorophorum* est moindre avec des valeurs variant entre 23% en surface et 35% au fond. En revanche sur la station St4, alors que *L. chlorophorum* domine la communauté phytoplanctonique à proximité du fond (>94% ; Figure 32B), d'autres dinoflagellés dominent en surface (*Gymnodinium* spp., *Gyrodinium* spp., *Scropsiella* spp. et *Protoperidinium* spp. ; Figure 32C). A partir de la station St4, la proportion des dinoflagellés au sein de la communauté phytoplanctonique tend à décroître vers le large, au bénéfice de la diatomée *Leptocylindrus* spp., qui domine la communauté en surface sur la station St6 (Figure 32C). Les diatomées du genre *Chaetoceros* et les dinoflagellés du genre *Dinophysis* sont observés sur la station St6 à proximité du fond (Figure 32D).

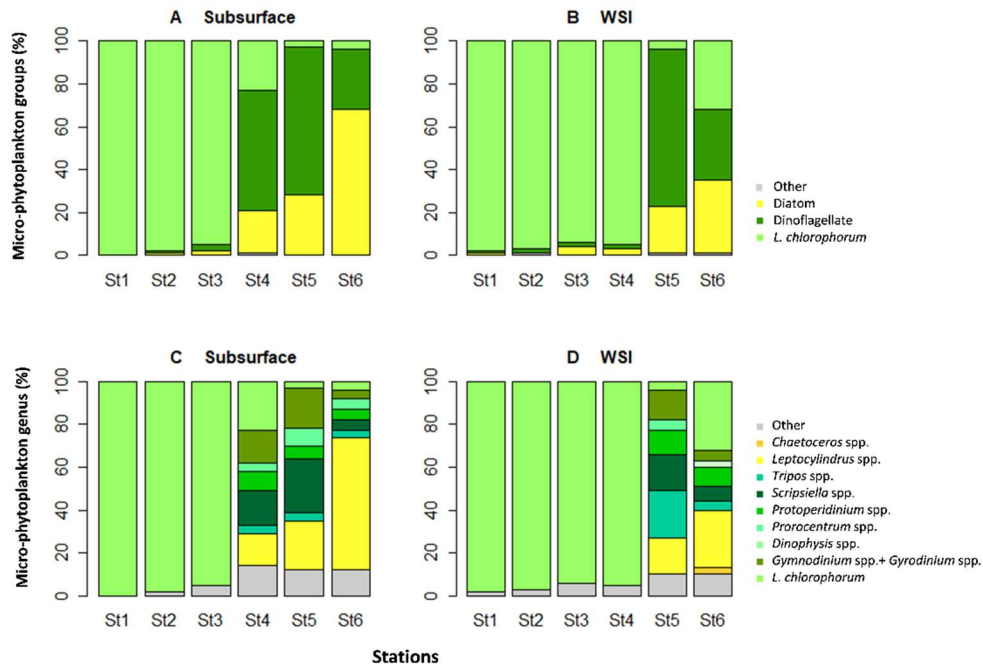


Figure 32 : Abondances relatives (%) des principaux groupes micro-phytoplanctoniques observés à l'intérieur (St1, St2 et St3) et à l'extérieur (St4, St5 et St6) de l'eau colorée verte (A) en sub-surface et (B) à proximité du fond. Diatomées (jaune), dinoflagellés (vert foncé), *L. chlorophorum* (vert clair) et autres groupes (gris). Abondances relatives (%) des principaux genres phytoplanctoniques observés en sub-surface (C) et à proximité du fond (D). D'après Roux *et al.* (2022).

Ces modifications de la composition de la communauté phytoplanctonique, s'accompagnent d'une diminution importante des concentrations en *Chla* et des abondances de *L. chlorophorum* le long du gradient côte-large (Figures 33A, I). En effet, la plus forte biomasse phytoplanctonique a été mesurée à la station St1 avec des [*Chla*] atteignant  $38 \mu\text{g L}^{-1}$  au fond et  $73 \mu\text{g L}^{-1}$  en surface (Figure 33I). En surface, *L. chlorophorum* était 2000 fois plus abondant à l'intérieur de l'ECV (St1) qu'à l'extérieur (St6). La plus forte abondance de *L. chlorophorum* a été relevée sur la St1 en surface avec  $8,9 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$  et la plus faible sur St6 avec  $4,1 \times 10^3 \text{ cell L}^{-1}$  (Figure 33A). *L. chlorophorum* a été observé à proximité du fond tout au long du transect, avec des valeurs variant de  $3,2 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$  à  $4,1 \times 10^3 \text{ cell L}^{-1}$  sur les stations St1 et St6 respectivement.

Une diminution de la température a été observée le long du gradient côte-large en surface et au fond, avec des températures passant de  $19,6 \pm 0,9^\circ\text{C}$  sur St1 à  $18,4 \pm 0,8^\circ\text{C}$  sur St6 (Figure 33B). A l'inverse, la salinité augmente de la côte vers le large, en surface (32,4 à 34,1) comme au fond (33,8 à 34,0 ; figure 33C). Alors que les concentrations en silicate diminuent progressivement de la côte vers le large, avec  $21 \mu\text{M}$  à St1 et  $13,7 \mu\text{M}$  à St6 en surface (Figure 33D), les autres éléments nutritifs montrent une distribution spatiale différente. En effet, à l'instar des abondances de *L. chlorophorum*, les concentrations les plus élevées en ammonium, phosphate et nitrite sont observées en sub-surface à l'intérieur de l'eau colorée ( $0,48 \mu\text{M}$ ,  $1,63 \mu\text{M}$  et  $0,14 \mu\text{M}$  respectivement sur St1) et décroissent ensuite rapidement de la côte vers le large (Figures 33 E, F et 33J). Les concentrations en nitrate sont restées en revanche inférieures à la limite de quantification ( $0,5 \mu\text{M}$ ) sur l'ensemble du transect et sur les deux profondeurs (Figure 33K).



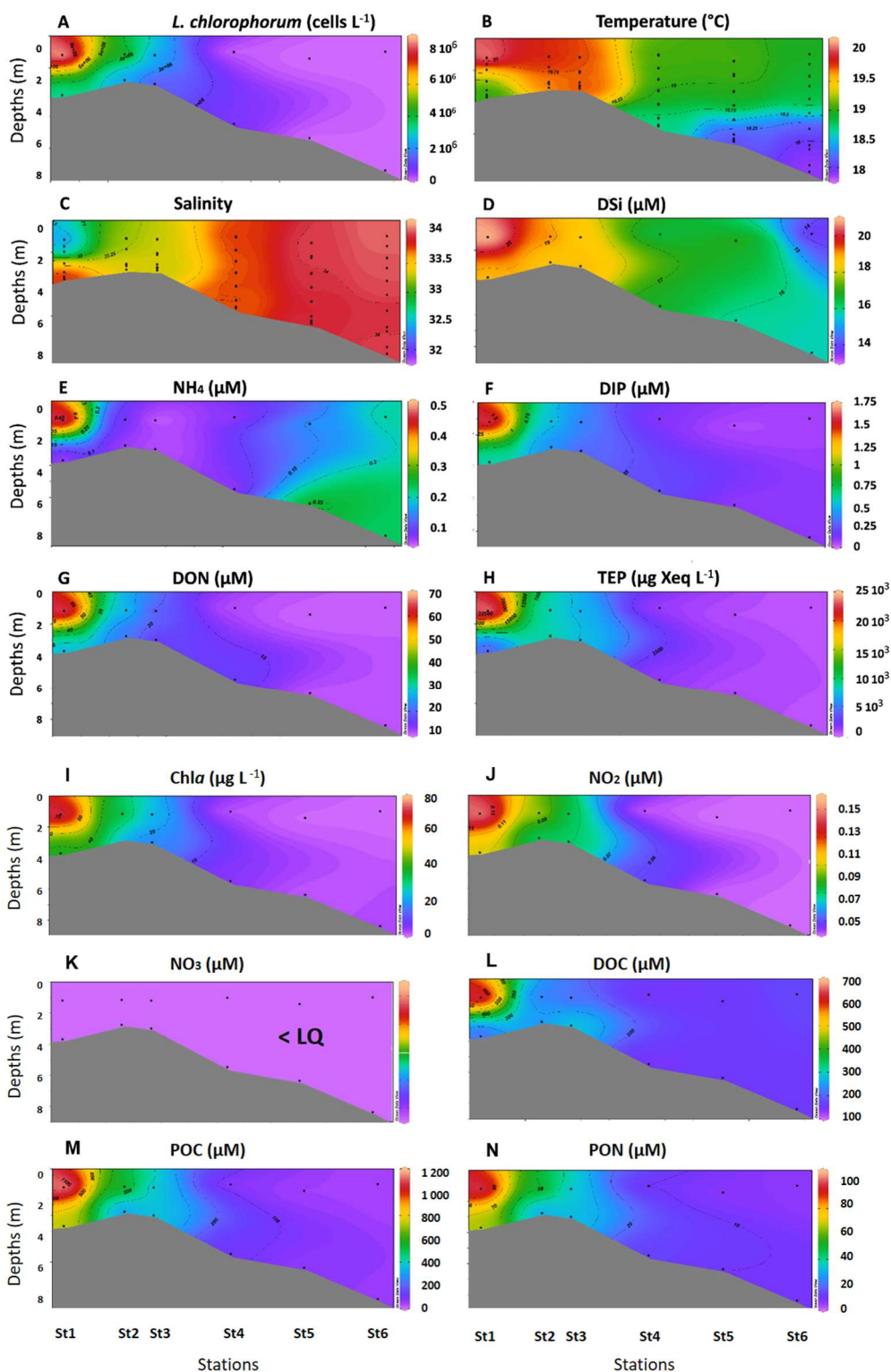


Figure 33 : Distribution spatiale des paramètres biologiques et physico-chimiques le long du transect. (A) Abondances de *L. chlorophorum*, (B) température, (C) salinité, (D) silicates, (E) ammonium (NH<sub>4</sub>), (F) phosphates (DIP), (G) azote organique dissous (DON), (H) particules exo-polymériques transparentes (TEP), (I) concentrations en chlorophylle *a* (Chl<sub>a</sub>), (J) nitrite (NO<sub>2</sub>), (K) nitrate (NO<sub>3</sub>), (L) carbone organique dissous (DOC), (M) carbone organique particulaire (POC), (N) azote organique particulaire (PON) mesurés à l'intérieur de l'ECV (St1, St2 et St3) et à l'extérieur (St4, St5 et St6). Ocean Date View, 5.3.0. D'après Roux *et al.* (2022).



### 3.2.2.3.3 Caractéristiques biogéochimiques d'une eau colorée verte

Les concentrations en carbone et azote dissous ([DOC] et [DON]) suivent la même distribution spatiale que les abondances de *L. chlorophorum* : les concentrations les plus élevées étant mesurées au cœur de l'ECV (655  $\mu\text{M}$  et 66  $\mu\text{M}$  respectivement ; figures (33G, L). [DON] et [DOC] diminuent ensuite rapidement en direction du large pour atteindre des valeurs minimales à St6 ([DON] < 1,2  $\mu\text{M}$  et [DOC] < 200  $\mu\text{M}$ ). Les rapports DOC/DON sont plus faibles à l'intérieur de l'ECV (7,4 à 9,9 sur St1) qu'à l'extérieur (13,8 à 16,6 sur St6).

[POC] et [PON] suivent une dynamique spatiale similaire à celle décrite pour la fraction dissoute, avec les plus fortes concentrations enregistrées à l'intérieur de l'ECV (1163 et 101  $\mu\text{M}$  respectivement sur St1 en sub-surface) qui décroissent rapidement en direction du large (Figures 33M, N). Les rapports POC/PON sont plus élevés à l'intérieur de l'ECV ( $\approx 11$  sur St1) qu'à l'extérieur (6,7 à 7,1 sur St6).

Les plus fortes concentrations en TEP ont également été mesurées sur St1, donc au cœur de l'ECV, avec des valeurs variant entre 3579 et 24446  $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$  du fond vers la surface (Figure 33 H). Les concentrations en TEP chutent ensuite rapidement en direction du large, pour atteindre des valeurs minimales sur St6 ([TEP] < 670  $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ ) sur l'ensemble de la colonne d'eau. En sub-surface les concentrations en TEP étaient 50 fois plus élevées à l'intérieur de l'ECV qu'à l'extérieur.

Les relations entre les paramètres biogéochimiques et les abondances de *L. chlorophorum* ont été évalué par le calcul d'une matrice de corrélation de Spearman. Le nombre de cellules de *L. chlorophorum* est positivement corrélé avec [Chl<sub>a</sub>], [DIP], [NO<sub>2</sub>] et [DON] ( $r > 0,9$  ;  $p < 0,05$  ;  $n=6$ ). [TEP] sont positivement corrélées à l'abondance de *L. chlorophorum* ( $r = 0,94$  ;  $p < 0,05$ ) et aux [POC] ( $r = 1$  ;  $p < 0,05$ ) en sub-surface. En revanche, [NH<sub>4</sub>] est négativement corrélé à l'abondance de *L. chlorophorum* et aux [Chl<sub>a</sub>] à proximité du fond ( $r = -0,89$  ;  $p < 0,05$ ). Globalement, l'abondance de *L. chlorophorum* est positivement corrélée avec la température, la matière organique (dissoute et particulaire), et les concentrations en ammonium [NH<sub>4</sub>] et phosphate [DIP].

### 3.2.2.4 Discussion

Cette étude a permis pour la première fois de décrire la dynamique d'une efflorescence de *L. chlorophorum* et de caractériser les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte. Les résultats acquis permettent de mieux caractériser à la fois, les conditions environnementales propices au développement de ce dinoflagellé dans les eaux côtières et les conséquences de ces efflorescences sur le fonctionnement des écosystèmes impactés.

Le suivi réalisé dans le cadre du projet Lepido-Pen confirme la présence de *L. chlorophorum* dans les eaux côtières de la zone d'étude entre mai et novembre, avec des abondances maximales observées au cours de l'été, dans les eaux eutrophes de la Baie de Vilaine. Si les conditions environnementales observées en 2019 sont restées conformes à celles généralement observées sur la zone d'étude (Figure 34), la fin du printemps 2019 a été marquée par des apports d'eau douce inhabituellement élevés pour la saison en lien avec une augmentation significative du débit des rivières. Ces apports tardifs, peuvent avoir contribué à créer des conditions propices au développement du bloom de *L. chlorophorum* observé au cours de l'été. En particulier, la stratification thermo-haline qui a suivi cet épisode peut avoir favorisé la croissance des cellules de *L. chlorophorum*. En effet, de nombreuses études ont montré que l'établissement d'une colonne d'eau stratifiée était une condition physique essentielle à l'établissement des blooms de dinoflagellé (e.g. Smayda, 2002a). Ces résultats corroborent l'hypothèse d'un lien étroit entre les apports d'eau douce et les efflorescences de *L. chlorophorum* formulée précédemment (Sournia *et al.*, 1992 ; Karasiewicz *et al.*, 2020). Les faibles vitesses de vent ( $> 8$  nœuds de secteur N à NE) et les faibles courants de marée (mortes eaux), ont contribué au maintien de cette stratification verticale pendant plus d'un mois, offrant à *L. chlorophorum* les conditions idéales à sa croissance.

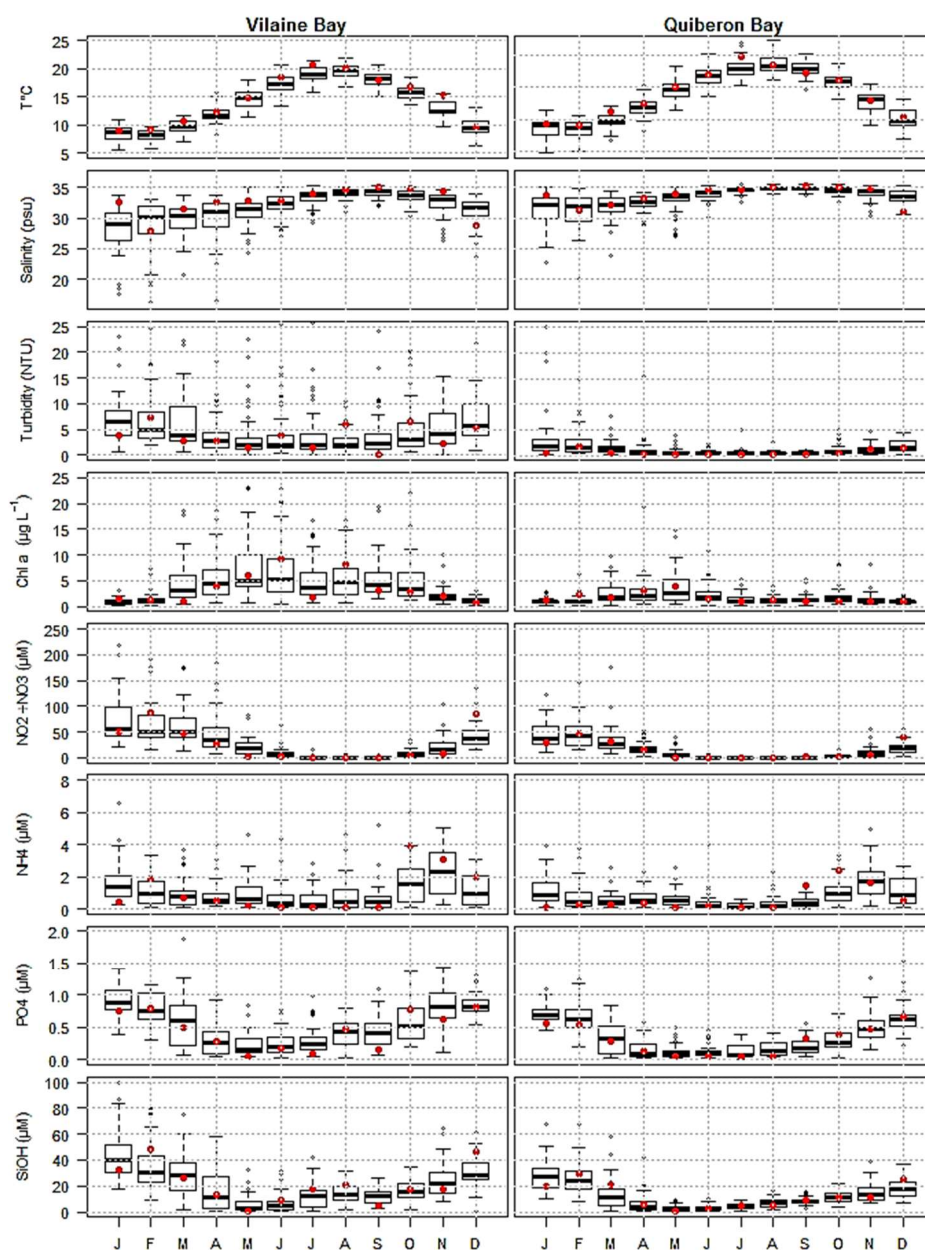


Figure 34 : Boxplot représentant les variations des paramètres physico-chimiques de surface (température, salinité, turbidité, Chlorophylle *a* et concentrations en nutriments) entre 1998 et 2019 en Baie de Vilaine (station « Ouest Loscolo ») et Baie de Quiberon (station « Men Er Roue »). Données REPHY. D'après Roux *et al.* (2022).

En amont de cet épisode, l'augmentation des concentrations en ammonium et phosphate observée au fond au mois de juin peut avoir également contribué à l'initiation du bloom de *L. chlorophorum*. Ces observations tendent à conforter l'hypothèse émise précédemment dans la partie 4.1. qui suggère que la remise en suspension de l'ammonium à partir des sédiments superficiels, pourrait être un facteur essentiel à l'initiation d'un bloom de *L. chlorophorum* (Roux *et al.*, 2023). Par la suite, l'établissement de conditions physiques favorables (i.e. stratification des masses d'eaux, fortes températures, faible turbulence) aurait conduit à la multiplication exponentielle des cellules de *L. chlorophorum* et la formation d'eaux colorées vertes au cours de l'été 2019. Comme mentionné précédemment, des études en milieu contrôlé sur des cultures,

sont cependant nécessaires pour tester la capacité des cellules de *L. chlorophorum* à assimiler l'ammonium.

Cette étude a permis pour la première fois d'évaluer la production de TEP dans une eau colorée verte à *L. chlorophorum*. En effet, si ce dinoflagellé était associé à une forte capacité de production de TEP en culture (Claquin *et al.*, 2008) jusqu'alors aucune étude n'avait évalué cette production au cours d'une efflorescence en milieu naturel. Les concentrations en TEP mesurées dans l'ECV font partie des plus fortes valeurs recensées en milieu côtier (Passow, 2002) et sont similaires à celles mesurées en culture pour des abondances cellulaires équivalentes (Roux *et al.*, 2021). Par ailleurs, la partie soluble des substances polymériques extracellulaire (soluble extracellular polymers, SEP) collectées au sein de l'ECV était composée principalement de protéines, glucose et galactose, et d'exo-polysaccharides sulphatés. Cette composition est très proche de celle observée dans des cultures mono-spécifiques de *L. chlorophorum* (Roux *et al.*, 2021). Enfin, les concentrations en TEP étaient 50 fois plus élevées à l'intérieur de l'ECV qu'à l'extérieur. L'ensemble de ces résultats suggère que *L. chlorophorum* serait le principal producteur de TEP au sein de l'ECV et confirme la capacité des efflorescences à *L. chlorophorum* à impacter fortement les écosystèmes par cette production intense matière organique.

Les fortes concentrations en [DIP] et [NH<sub>4</sub>] mesurées au cœur de l'ECV suggèrent un important recyclage de cette matière organique au sein même de l'efflorescence. En effet, si la dynamique spatiale de [DSi] le long de l'estuaire apparaît conservative, la distribution de [DIP] et [NH<sub>4</sub>] le long du gradient salin laisse en revanche supposer une production de ces éléments au sein de l'ECV (Figure 35). Ainsi, l'accumulation de matière organique produite par *L. chlorophorum* dans l'ECV pourrait favoriser le développement bactérien à l'origine d'intenses processus de reminéralisation. Les éléments nutritifs produit au cours de ce recyclage pourraient être à nouveau utilisés par les cellules de *L. chlorophorum*, contribuant ainsi au maintien du bloom sur une période prolongée. En 2019, le bloom de *L. chlorophorum* a été observé pendant plus d'un mois sur la zone. Cependant, si la production de TEP et de matière organique pourrait conférer un avantage écologique à *L. chlorophorum* via la régénération d'éléments nutritifs à l'intérieur même d'une eau colorée, cette intense activité de recyclage peut avoir de lourdes conséquences sur les conditions d'oxygénation des eaux impactées par ces blooms.

Les concentrations en oxygène mesurées au fond pendant l'été 2019 par la bouée MOLIT sur la station Nord Dumet tendent à confirmer cette hypothèse. Ainsi, de faibles concentrations en oxygène (2,4 mg L<sup>-1</sup>) ont été observées à proximité du fond à la suite du bloom de *L. chlorophorum* sur cette station. Pour beaucoup d'invertébrés benthiques, le seuil hypoxique est de 2,9 mg L<sup>-1</sup> (Diaz et Rosenberg, 2008) et en-dessous de ce seuil, une diminution de l'activité de nourrissage et de la consommation d'oxygène ont été observés chez certains bivalves (e.g. Hikes et McMahon, 2002). Ainsi, la production de TEP et de matière organique par *L. chlorophorum*, pourrait accentuer les hypoxies à proximité du fond, en particulier pendant les périodes calmes (e.g. vent faible, morte eau, stratification) et sur les zones où les temps de résidence des masses d'eau sont longs, telle que la Baie de Vilaine. Cependant, des données spatialisées d'oxygène sont indispensables à une meilleure compréhension du lien entre les blooms de *L. chlorophorum*, la matière organique et les processus de reminéralisation, que ce soit dans la colonne d'eau comme à proximité du fond.

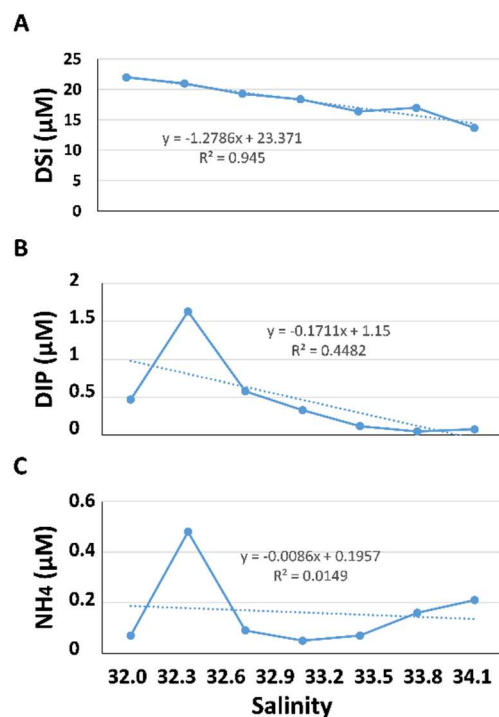


Figure 35 : Concentrations en nutriments (A) silicates (DSi), phosphates (DIP) et ammonium (NH<sub>4</sub>) mesurées le long du gradient de salinité dans l'estuaire de la Vilaine. Les concentrations enregistrées le 8 juillet 2019 sur la station la plus amont de l'estuaire (salinité= 32) ont été ajoutées afin d'évaluer l'origine des différents éléments nutritifs. D'après Roux *et al.* (2022).

### 3.2.2.5 Conclusions et perspectives

Le dinoflagellé *L. chlorophorum* peut former des eaux colorées vertes le long de la côte Atlantique française, et plus particulièrement dans les eaux eutrophes de la Baie de Vilaine. *L. chlorophorum* est observé entre mai et novembre sur la zone, avec des abondances maximales enregistrées en été (Juin-Juillet). Ce dinoflagellé peut être observé à différents niveaux de la colonne d'eau et les plus fortes abondances peuvent même être observées à mi-profondeur (Fmax) ou à proximité du fond.

Les blooms pourraient être initiés par des apports d'eau douce et/ou des apports d'éléments nutritifs (en particulier NH<sub>4</sub> et DIP) à partir des sédiments superficiels, quelques semaines auparavant. Par la suite, l'augmentation des températures de surface ainsi qu'une stratification thermo-haline de la colonne d'eau permettraient au bloom de se développer.

La dynamique spatiale des eaux colorées vertes apparaît étroitement liée au cycle de marée, avec un transport vers le large ou vers la côte avec le jusant et le flot respectivement.

Une grande quantité de TEP et de matière organique est produite au sein d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum*. Cette caractéristique pourrait conférer un avantage compétitif à ce dinoflagellé par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques. La production de TEP induirait une forte activité de reminéralisation par les bactéries au sein de l'ECV, qui pourrait fournir des éléments nutritifs régénérés (en particulier NH<sub>4</sub> et DIP) nécessaires au maintien du bloom au cours d'une longue période, si des conditions calmes persistent (vent faible, faibles coefficients de marée, stratification verticale). Cependant, le recyclage intense de l'importante matière organique produite pendant les blooms peut avoir des conséquences néfastes sur la faune marine et des bivalves cultivés, en entraînant des diminutions drastiques des concentrations en oxygène à proximité du fond. Cependant, une meilleure connaissance du compartiment bactérien accompagnant ces blooms sont nécessaires pour valider ces hypothèses.

## 4 Rôle des bactéries dans la production de substances polymériques extracellulaires par *L. chlorophorum*

### 4.1 Contexte et objectifs

Depuis 1982, des eaux colorées vertes dues au développement du dinoflagellé *L. chlorophorum* (Elbrächter et Schnepf, 1996 ; Hansen *et al.*, 2007) sont enregistrées presque chaque année en Bretagne sud (Siano *et al.*, 2020). Bien que cette espèce ne soit pas toxique, ses proliférations ont été associées à des mortalités massives d'organismes marins (Sournia *et al.*, 1992 ; Chapelle *et al.*, 1994).

Une première étude a suggéré que *L. chlorophorum* était capable d'excréter une grande quantité de particules exo-polymériques transparentes (TEP) riches en carbone (Claquin *et al.*, 2008). Les TEP, ainsi que les polymères extracellulaires solubles (SEP), sont des substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par certains micro-organismes (Bhaskar et Bhosle, 2005) dont le phytoplancton (*e.g.*, Passow, 2002 ; Underwood *et al.*, 2004) et les bactéries marines (*e.g.*, Thornton, 2015 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Xiao and Zheng, 2016). D'un point de vue écologique, ces EPS ont tendance à accélérer la sédimentation de la matière organique de la surface vers le fond marin (Passow *et al.*, 2011 ; Mari *et al.*, 2017 ; Bittar *et al.*, 2018). De cette manière, les EPS peuvent favoriser les épisodes d'hypoxie/anoxie lors de la dégradation de cette matière organique par les bactéries. Par ailleurs, les EPS peuvent augmenter la viscosité de l'eau de mer (Jenkinson, 1986 ; Alldredge et Gotschalk, 1989). Bien que *L. chlorophorum* soit connu pour produire de grandes quantités de TEP, cette production n'a été démontrée qu'en conditions non-axéniques (Claquin *et al.*, 2008). Il reste donc à savoir si cette production d'EPS est assurée par les cellules phytoplanctoniques ? Par le consortium bactérien associé ? Ou encore, si elle pourrait être le fruit d'une interaction entre les cellules de *L. chlorophorum* et ses bactéries ? Ces réponses sont essentielles pour mieux comprendre la dynamique de production des EPS.

L'objectif de cette étude était donc d'identifier le principal producteur d'EPS dans les cultures entre les cellules de *L. chlorophorum* et son consortium bactérien. Trois souches de *L. chlorophorum* ont été cultivées en batch dans des conditions (i) pseudo-axéniques et (ii) non-axéniques. Les concentrations en TEP ont été mesurées aux différentes phases de croissance et les SEP ont été caractérisés. Enfin, la part de carbone fixé excrétée sous la forme de TEP ainsi que l'impact de cette production sur la viscosité du milieu ont été évalués afin de mieux comprendre les conséquences de ces efflorescences sur l'écosystème.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un chapitre de la thèse de Pauline Roux (Roux, 2022) et ont été valorisés sous forme d'un article scientifique de rang A (Roux *et al.*, 2021).

Les principaux résultats sont présentés ci-après.

### 4.2 Mise en œuvre

#### 4.2.1 Souches et conditions de culture

Trois souches de *L. chlorophorum* ont été utilisées dans cette étude : 1) RCC1489 (RCC : Roscoff Culture Collection ; <http://roscoff-culture-collection.org/>) isolée en 2005 en Baie de Seine (Normandie, France), 2) KL1C4 (IFR CC 18-001, RCC6910) isolée en 2018 en Baie de Douarnenez (Bretagne Nord, France) et 3) MAR1D2 (IFR CC 19-001, RCC6911) isolée en 2019 en Baie de Vilaine (Bretagne Sud, France). Les trois souches ont été maintenues en culture dans du milieu L1 (Guillard et Hargraves, 1993) sans Si, à 20°C sous un cycle jour/nuit de 12h12 avec un éclairage de 90  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



Toutes les souches ont été génétiquement identifiées par séquençage Sanger en utilisant la région Large Sub Unit (LSU, 28S) de l'ADN ribosomique (ADNr). L'extraction de l'ADN des souches de *L. chlorophorum* et l'amplification par PCR ont été réalisées à l'aide du kit PCR BIO Rapid Extract PCR (PCR BIOSYSTEMS LDT, London). L'ADN a été extrait à partir de 20 µL de culture en phase de croissance exponentielle en suivant les recommandations du fabricant, sauf pour l'étape de dilution, où 190 µL d'eau sans nucléase (au lieu de 900 µL) ont été ajoutés dans l'étape de désactivation de la protéase. La PCR a été réalisée en utilisant les amorces D1R-D3B (Scholin et al., 1994 ; Nunn et al., 1996). Le cycle PCR comprenait une étape de chauffage initiale de 2 min à 95°C, suivie de 40 cycles de 95°C pendant 15 s, 56°C pendant 15 s et une extension à 72°C pendant 30 s. Les produits amplifiés par PCR ont été analysés sur un gel d'agarose TAE à 1 % (bromure d'éthidium ; BET 1X) et purifiés à l'aide du réactif ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (AFFYMETRIX, Cleveland, OH, USA). Le kit de séquençage de cycle Big Dye Terminator v. 3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS, Tokyo, Japon) et l'analyseur génétique ABI PRISM 3130 (APPLIED BIOSYSTEMS) ont été utilisés pour le séquençage des amplicons. Les séquences ont été vérifiées sur le site Web du National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) à l'aide de Nucleotide Blast. Les séquences des souches KL1C4 et MAR1D2 ont été déposées sur GenBank sous les numéros d'accès MT850080 et MT850081.

#### 4.2.2 Protocole d'axénisation

Afin de réduire l'abondance bactérienne dans les cultures de *L. chlorophorum*, un protocole antibactérien a été mis en place.

Pour chaque souche, 40 mL de cultures ont été prélevés en phase exponentielle de croissance. Les échantillons ont été doucement filtrés à travers des filtres à membrane en polycarbonate de 3 µm (WHATMAN Nuclepore Track-Etched Membrane). Les filtrats ont été jetés et les cellules rincées avec 40 ml de milieu L1 stérile. La solution contenant les cellules a ensuite été centrifugée (1 000 g pendant 10 min à 20°C). Cette étape de lavage a été répétée trois fois.

Enfin, les culots ont été remis en suspension dans du milieu L1 stérile pour une axénisation supplémentaire. Pour éliminer les bactéries épiphytes de la paroi cellulaire des dinoflagellés, les échantillons ont été incubés avec du Tween-80 (0,005 %) à 20°C pendant 10 min. Ensuite, les échantillons ont été lavés deux fois de suite avec du milieu L1 stérile. Enfin, sur la base d'un mélange spécifique d'antibiotiques (X100, CORNING, 30-002-CI), 100 UI de pénicilline et 100 µg de streptomycine par mL de culture ont été ajoutés.

Pour confirmer l'effet de ce protocole d'axénisation sur les cultures de *L. chlorophorum*, les bactéries hétérotrophes ont été dénombrées selon Marie *et al.* (1997), à l'aide d'un cytomètre en flux Accuri C6 (BECTON DICKINSON) équipé de lasers bleu (488 nm) et rouge (640 nm), de détecteurs de diffusion de lumière vers l'avant (FSC) et latérale (SSC) et de quatre détecteurs de fluorescence : 530 ± 15 nm (FL1), 585 ± 20 nm (FL2), > 670 nm (FL3) et 675 ± 12,5 nm (FL4). Les bactéries ont été colorées avec SYBR Green I, puis dénombrés sur la base des niveaux de fluorescence rouge FL3/FL1 et SSC/ FL1.

#### 4.2.3 Dispositif expérimental

Les trois souches de *L. chlorophorum* ont été cultivées pendant 16 jours dans des cultures en batch non axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA), à 20 °C, sous un cycle jour/nuit de 12h/12h et un éclairage de 90 µmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Pour les cultures PA, des antibiotiques ont été ajoutés au début de l'expérience (jour 0) pour maintenir la plus faible abondance de bactéries au cours de l'expérience. Pour chaque souche, neuf flacons de 500 mL ont été inoculés avec 2 000 cellules mL<sup>-1</sup> dans les conditions NA et PA. Dans trois de ces flacons, des sous-échantillons ont été prélevés tous les 2 jours pour suivre



l'évolution des concentrations cellulaires de *L. chlorophorum* et de bactéries. Des sous-échantillons de culture ont été prélevés dans trois flacons au cours des différentes phases de croissance : (i) phase de latence (jour 2), (ii) phase de croissance exponentielle (jour 9) et phase stationnaire (jour 16). Cette stratégie a été choisie afin d'obtenir une biomasse suffisante permettant des analyses en triplicat de (i) l'efficacité photochimique maximale du photosystème (II), (ii) des concentrations en nutriments inorganiques, (iii) des concentrations en POC et TEP et (iv) de la viscosité. Des analyses de SEP ont été effectuées sur la biomasse restante des trois réplicas pour chaque phase de croissance.

#### 4.2.4 Analyses chimiques et biologiques

##### 4.2.4.1 Dosages des nutriments

Afin de suivre les concentrations en azote inorganique dissous ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$ ) et en phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) dans les différentes conditions de culture, 7 mL (x 2) ont été prélevés dans trois flacons, pour les trois phases de croissance différentes, et stockés directement à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Les analyses ont été réalisées avec un auto-analyseur (SEAL ANALYTICAL AA3) selon les protocoles standards (Aminot et Kérouel, 2007). Les analyses sont détaillées dans l'annexe 3.

##### 4.2.4.2 Dosage du POC

Pour estimer la quantité de carbone particulaire (POC) lié à la production de TEP par *L. chlorophorum* et/ou les bactéries associées, des triplicats de 10 à 20 mL (provenant de trois flacons différents) ont été délicatement filtrés sur des filtres GF/F préalablement calcinés (WHATMAN Nuclepore ; pendant 4 h à  $450^\circ\text{C}$ ) et stockés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Les procédures d'analyse sont détaillées dans l'annexe 3.

Afin d'estimer l'enrichissement en carbone dû à l'ajout d'antibiotiques dans les cultures pseudo-axéniques (PA), la concentration de POC a été mesurée sur trois réplicas de milieu L1 avec des antibiotiques et la valeur moyenne a été soustraite.

##### 4.2.4.3 Concentrations cellulaires de *L. chlorophorum* et de bactéries

Pour quantifier les cellules de *L. chlorophorum*, des triplicats de 1,5 mL ont été fixés avec une solution acide de Lugol (1 % de concentration finale) et conservés à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Le dénombrement des cellules a été effectué dans une cellule de comptage Sedgewick Rafter de 1 mL sous un microscope inversé (LEICA DMI3000B). Le taux de croissance ( $\mu$ ) a été calculé pendant la croissance exponentielle en utilisant la méthode de régression des moindres carrés (Wood *et al.*, 2005).

Pour la détermination des abondances bactériennes, des triplicats de 1 mL ont été fixés avec du glutaraldéhyde (concentration finale de 0,1 %) (SIGMA-ALDRICH) et conservés à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Le dénombrement a été effectué à l'aide d'un cytomètre en flux Accuri C6.

##### 4.2.4.4 Etat physiologique des cellules de *L. chlorophorum*

L'état physiologique des cellules de *L. chlorophorum* au cours de l'expérience a été vérifié via la mesure de l'efficacité quantique maximale du photosystème II ( $F_v/F_m$ ) à 450 nm, à l'aide d'un fluorimètre Aquapen-C 100 (PHOTON SYSTEMS INSTRUMENTS). Des triplicats de 3 mL ont été maintenus dans l'obscurité pendant 15 min avant les mesures (Kromkamp et Forster, 2003).

#### 4.2.5 Etude des EPS : dosage de TEP et caractérisation des SEP

Pour les trois différentes phases de croissance, la concentration de TEP a été déterminée à l'aide d'une méthode semi-quantitative basée sur la détermination colorimétrique de la quantité de colorant complexé avec des particules extracellulaires (Claquin *et al.* (2008) adapté de Passow et

Allredge (1995)). Des sous-échantillons de culture de 5 à 20 ml ont été délicatement filtrés à travers des filtres à membrane en polycarbonate de 0,4 µm (WHATMAN Nuclepore Track-Etched Membrane) et stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Le détail de la procédure analytique est donné dans l'annexe 3.

Pour caractériser les SEP, environ 900 ml de biomasse de culture ont été centrifugés (4 000 g pendant 30 min à 20 °C). Les surnageants ont été concentrés et dessalés en utilisant un système d'ultrafiltration (PELLICON MILLIPORE) avec une membrane de coupure de 5 kD. Après lyophilisation, les pastilles ont été fixées pendant 1 heure à 20°C avec une solution de 5 % de formol/éthanol (p/p), et dialysées (membrane poreuse de 3,5 kD) pour éliminer les sels. Après une nouvelle lyophilisation, les pastilles ont ensuite été solubilisées dans de l'eau pendant 1 h à 60°C pour récupérer les SEP éventuellement associés aux cellules de *L. chlorophorum*. Les surnageants récupérés après centrifugation (4 000 g pendant 15 min) ont été lyophilisés. Avant les analyses, tous les échantillons ont été solubilisés dans l'eau à 3 mg/mL. Les analyses sont détaillées dans l'annexe 3.

#### 4.2.6 Mesures de viscosité

Les mesures de viscosité ont été effectuées en triplicat sur des échantillons de 2 mL à l'aide d'un viscosimètre Ubbelohde et en suivant la procédure décrite par Seuront *et al.* (2007). La viscosité mesurée  $\eta_m$  (cP) est la somme d'une composante de viscosité physiquement contrôlée  $\eta_{T,S}$  (cP) et d'une composante de viscosité biologiquement contrôlée  $\eta_{Bio}$  (cP) :

$$\eta_m = \eta_{T,S} + \eta_{Bio}$$

Pour les conditions non axéniques et pseudo-axéniques, les composantes physiquement contrôlées  $\eta_{T,S}$  ont été estimées à partir de mesures de viscosité réalisées respectivement sur milieu L1 stérile ou milieu L1 stérile avec antibiotiques. L'excès de viscosité biologiquement induit  $\eta_{Bio}$  (cP) a ensuite été défini pour chaque échantillon :

$$\eta_{Bio} = \eta_m - \eta_{T,S}$$

L'excès de viscosité relative  $\eta$  (%) a ensuite été calculé :

$$\eta = \frac{(\eta_m - \eta_{T,S})}{\eta_{T,S}}$$

Toutes les mesures ont été réalisées à température constante. Un thermomètre (DOSTMANN ELECTRONIC P655) et un conductimètre (HACH CDC401) ont été utilisés pour mesurer la température et la salinité, respectivement.

### 4.3 Résultats

#### 4.3.1 Evaluation du protocole d'axénisation

Le protocole d'axénisation n'a pas abouti à l'élimination complète des bactéries au sein des cultures de *L. chlorophorum*, mais a permis de réduire drastiquement le nombre de bactéries par cellule de dinoflagellé, qui est passé de  $1\,030 \pm 199$  dans la culture non axénique (NA) à  $104 \pm 2$  bactéries  $\text{cell}^{-1}$  après axénisation pour la souche RCC1489. Pour *L. chlorophorum* KL1C4,  $1\,639 \pm 443$  bactéries  $\text{cell}^{-1}$  ont été dénombrées dans la culture NA contre seulement  $80 \pm 1$  bactéries  $\text{cell}^{-1}$  après l'axénisation. Par conséquent, 90 et 95 % des bactéries par cellule ont été éliminées via l'axénisation dans les cultures RCC1489 et KL1C4, respectivement. Pour MAR1D2, le nombre de bactéries par cellule est passé de  $204 \pm 10$  dans des conditions NA à  $121 \pm 17$  bactéries  $\text{cell}^{-1}$  après l'axénisation et 41 % des bactéries par cellule ont donc été éliminées. Nos expériences ont donc été menées dans des conditions pseudo-axéniques (PA) (tableau 4).

Tableau 4. Nombre moyen de bactéries par cellule de *L. chlorophorum* (moyenne  $\pm$  s.d.) dénombrées au cours des trois différentes phases de croissance (stationnaire: « Lag » ; exponentielle : « Expo. » ; stationnaire : « Stat. ») pour les trois souches (RCC1489, KL1C4 et MAR1D2) dans des conditions non axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). Les valeurs moyennes et d'écart type ont été calculées à partir des valeurs mesurées dans les trois réplicats ( $n = 3$ ). Le pourcentage d'axénisation a été calculé selon la formule suivante :  $Axenisation (\%) = 100 - \left( \frac{PA}{NA} * 100 \right)$ . D'après Roux *et al.* (2021).

Souche	Temps (jours)	Phase de croissance	NA (bactéries cell <sup>-1</sup> )	PA (bactéries cell <sup>-1</sup> )	Axénisation (%)
RCC1489	2	Lag	1030 $\pm$ 199	104 $\pm$ 2	90
	9	Expo.	348 $\pm$ 19	59 $\pm$ 10	83
	16	Stat.	697 $\pm$ 84	71 $\pm$ 4	90
KL1C4	2	Lag	1639 $\pm$ 443	80 $\pm$ 1	95
	9	Expo.	450 $\pm$ 43	115 $\pm$ 6	74
	16	Stat.	795 $\pm$ 40	119 $\pm$ 2	85
MAR1D2	2	Lag	204 $\pm$ 10	121 $\pm$ 17	41
	9	Expo.	136 $\pm$ 16	60 $\pm$ 5	56
	16	Stat.	184 $\pm$ 23	78 $\pm$ 7	58

#### 4.3.2 Croissance de *L. chlorophorum*

La croissance de *L. chlorophorum* a été analysée pour les trois souches dans les conditions de culture NA et PA (Figure 36). Pour la condition NA (Figure 36A), des abondances maximales similaires ont été observées pour les trois souches (RCC1489 :  $1,4 \cdot 10^4 \pm 646$  ; KL1C4 ;  $1,2 \cdot 10^4 \pm 462$  ; MAR1D2 :  $1,4 \cdot 10^4 \pm 1549$  cell mL<sup>-1</sup>). L'abondance maximale de *L. chlorophorum* était deux fois plus élevée dans la condition PA que dans la condition NA pour les trois souches étudiées (RCC1489 :  $2,2 \cdot 10^4 \pm 577$  ; KL1C4 :  $2,4 \cdot 10^4 \pm 390$  ; MAR1D2 :  $2,4 \cdot 10^4 \pm 492$  cell mL<sup>-1</sup>) ( $p = 0,05$  pour chaque souche, test unilatéral de Wilcoxon ; Figure 36B).

Pour la condition NA, la concentration bactérienne maximale variait entre les souches : la concentration de MAR1D2 ( $3 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^5$  bactéries mL<sup>-1</sup>) étant inférieure à celles de RCC1489 ( $7 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$  bactéries mL<sup>-1</sup>) et KL1C4 ( $9 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$  bactéries mL<sup>-1</sup> ; Figure 36A). Dans les cultures PA, la croissance bactérienne ralentit et les concentrations bactériennes maximales ( $\approx 2 \cdot 10^6$  bactéries mL<sup>-1</sup>) restent inférieures aux valeurs minimales observées en NA pour les trois souches (Figure 36). Malgré la différence de nombre maximum de cellules de dinoflagellés et de cellules bactériennes, les taux de croissance de *L. chlorophorum* ( $\mu$ ), calculés pendant la phase exponentielle dans des conditions NA et PA, étaient similaires pour toutes les souches et conditions, allant de 0,24 et 0,31 jour<sup>-1</sup>.

Au cours du temps, l'efficacité quantique maximale du photosystème II (FV/FM) variait de 0,55  $\pm$  0,00 à 0,72  $\pm$  0,02 ce qui correspond à des valeurs quasi optimales obtenues pour des organismes contenant de la chlorophylle *b* (Gordillo *et al.*, 2001 ; Ekelund *et Aronsson*, 2007). Aucune différence significative n'a été observée concernant les valeurs (FV/FM) entre les conditions NA et PA ( $p = 0,8$  pour RCC1489 ;  $p = 0,3$  pour KL1C4 ;  $p = 0,2$  pour MAR1D2, test bilatéral de Wilcoxon). Ces résultats indiquent une efficacité élevée du photosystème II et, par conséquent, un bon état photo-physiologique des cellules tout au long de l'expérience dans toutes les conditions de culture et pour les trois souches étudiées.

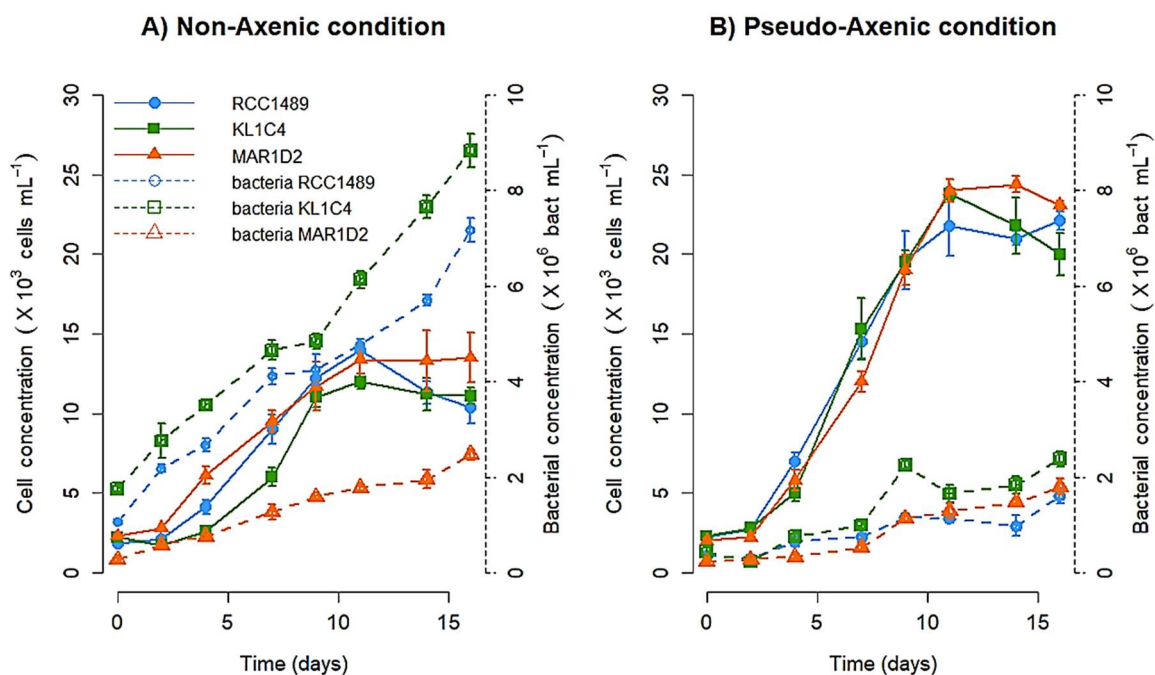


Figure 36 : Concentrations cellulaires de *L. chlorophorum* (lignes continues ; cell mL<sup>-1</sup>) et de bactéries (lignes discontinues ; bacteria cell mL<sup>-1</sup>) pour les trois souches étudiées (RCC1489 en bleu ; KL1C4 en vert ; MAR1D2 en orange), (A) en condition non-axénique (NA) et (B) condition pseudo-axénique (PA). Les symboles représentent la moyenne et les barres d'erreur les écarts type entre les trois réplicas de culture. D'après Roux *et al.* (2021).

### 4.3.3 Caractérisation des EPS

#### 4.3.3.1 Concentrations en TEP

Pour toutes les souches de *L. chlorophorum* testées, la concentration en TEP a augmenté significativement entre les phases de latence et stationnaire ( $p = 0,02$  pour chaque souche, test de Kruskal Wallis) dans les conditions NA et PA (Figure 37). Des concentrations maximales similaires de TEP ont été observées dans les conditions NA (RCC1489 :  $17,4 \pm 1,2$  ; KL1C4 :  $15,8 \pm 2,1$  ; MAR1D2 :  $17,2 \pm 4,9$  mg Xeq L<sup>-1</sup>) et PA (RCC1489 :  $9,9 \pm 0,9$  ; KL1C4 :  $11,1 \pm 1,5$  ; MAR1D2 :  $14,7 \pm 5,1$  mg Xeq L<sup>-1</sup>) (Figure 37AB). Pour toutes les souches, aucune différence significative n'a été observée concernant les concentrations de TEP entre les conditions NA et PA ( $p = 0,1$  pour RCC1489 ;  $p = 0,1$  pour KL1C4 ;  $p = 0,7$  pour MAR1D2, test de Wilcoxon) (Figure 37A, B). Ces résultats suggèrent que *L. chlorophorum* serait le principal producteur de TEP et que la production par la communauté bactérienne associée serait négligeable. De plus, des concentrations maximales de carbone organique particulaire (POC) similaires ont été observées dans les conditions NA (RCC1489 :  $20,4 \pm 0,2$  ; KL1C4 :  $18,6 \pm 0,5$  ; MAR1D2 :  $17,5 \pm 0,8$  mg L<sup>-1</sup>) et PA (RCC1489 :  $16,8 \pm 0,8$  ; KL1C4 :  $16,9 \pm 0,1$  ; MAR1D2 :  $16,9 \pm 1,1$  mg L<sup>-1</sup>).

Considérant que la majorité des TEP présents dans les cultures est attribuable à *L. chlorophorum*, il est possible d'estimer la production maximale de TEP par cellule de dinoflagellé. Aucune différence n'a été observée entre les souches, avec des valeurs variant entre  $1,3 \cdot 10^{-6} \pm 2,5 \cdot 10^{-7}$  pour MAR1D2 et  $2,4 \cdot 10^{-6} \pm 1,5 \cdot 10^{-7}$  mg Xeq cell<sup>-1</sup> pour KL1C4 dans la condition NA (Figure 37C) et entre  $7,3 \cdot 10^{-7} \pm 6,2 \cdot 10^{-8}$  pour KL1C4 et  $9,2 \cdot 10^{-7} \pm 1,4 \cdot 10^{-7}$  mg Xeq cell<sup>-1</sup> pour MAR1D2 dans des cultures PA (Figure 37D). Cependant les taux maximaux de TEP cell<sup>-1</sup> étaient significativement plus élevés sous les conditions NA que sous PA pour les trois souches ( $p = 0,05$  pour chaque souche, test de Wilcoxon) (Figure 37C, D). Pour la souche RCC1489, la production de TEP par cellule est restée constante dans le temps dans les conditions NA et PA : aucune différence significative n'a

été observée entre les différentes phases de croissance ( $p = 0,06$ , test de Kruskal Wallis) (Figure 37C, D). En revanche, pour la souche KL1C4, les taux de TEP par cellule ont diminué de manière significative entre les phases de latence et exponentielle ( $p = 0,02$ , test de Kruskal Wallis) dans les conditions NA et PA (figure 37C, D). Une dynamique différente a été observée pour la souche MAR1D2 : les taux de TEP sont restés constants au cours de l'expérience dans des conditions NA (Figure 37C) et une diminution significative a été observée entre les phases de latence et exponentielle dans des conditions PA ( $p = 0,03$ , test de Kruskal Wallis) (Figure 37D).

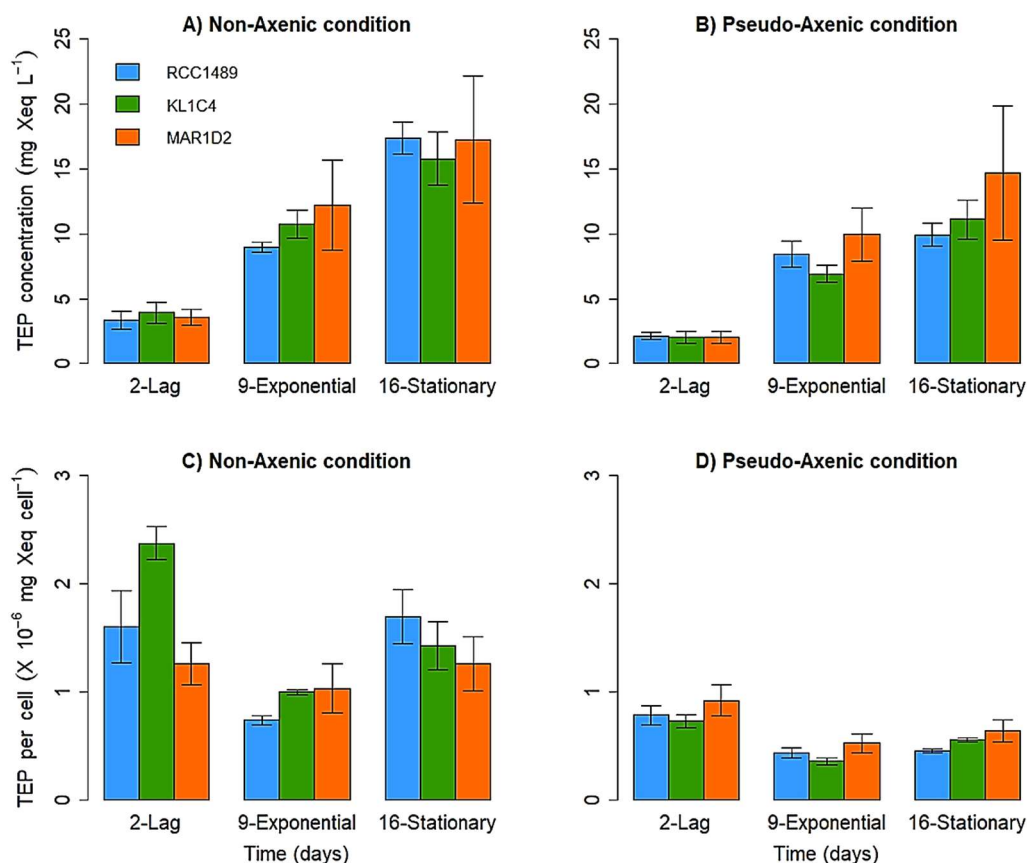


Figure 37 : Concentrations moyennes en TEP ( $\text{mg Xeq L}^{-1}$ ) mesurées sous conditions (A) non-axénique (NA) et (B) pseudo-axénique (PA) et production cellulaire moyenne de TEP ( $\text{mg Xeq cell}^{-1}$ ) estimée pour les conditions (C) NA et (D) PA pour les trois souches étudiées (RCC1489 en bleu ; KL1C4 en vert ; MAR1D2 en orange) et durant les trois différentes phases de croissance. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types ( $n=3$ ). D'après Roux *et al.* (2021).

#### 4.3.3.2 Composition des SEP

Pendant la phase stationnaire, les rendements en SEP étaient plus élevés sous PA que sous NA pour les trois souches. Pour toutes les souches dans les conditions NA et PA, les rendements de SEP ont augmenté avec le temps, à l'exception de la souche KL1C4 dans les conditions NA (tableau 5). Les rendements en SEP dans les surnageants de culture de *L. chlorophorum* ont été caractérisés pour les teneurs en protéines, en sucre et en soufre (Figure 38). Les analyses ont révélé que les SEP étaient principalement composés de protéines (< 20 %), suivis de sucres neutres (< 10 %) et de soufre (3-6 %). La composition de SEP était similaire pour les trois souches. Leur composition ne variait que légèrement entre les différentes phases de croissance, dans les conditions NA (Figure 38A, C, E) et PA (Figure 38B, D, F). Parmi les sucres neutres, Gal était présent en grande quantité dans les SEP de toutes les souches.

Tableau 5 : Rendements des SEP ( $Y$  ;  $g L^{-1}$ ) à partir du surnageant des trois souches de *L. chlorophorum* au cours des différentes phases de croissance, pour les conditions non-axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). nd : non déterminé car les valeurs ont été surestimées dû à la présence de sel. D'après Roux *et al.*, 2021.

Condition	Souches de <i>L. chlorophorum</i>					
	RCC1489		KL1C4		MAR1D2	
	NA	PA	NA	PA	NA	PA
Moyenne $Y$ ( $g L^{-1}$ )						
Latence	$7.8 \cdot 10^{-3}$	nd	$1.8 \cdot 10^{-2}$	nd	$9.9 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$
Exponentielle	$8.1 \cdot 10^{-3}$	$5.2 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$8.0 \cdot 10^{-3}$	$6.4 \cdot 10^{-3}$
Stationnaire	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$3.6 \cdot 10^{-2}$	$4.4 \cdot 10^{-2}$	$4.7 \cdot 10^{-2}$

La teneur en Gal la plus élevée a été détectée dans SEP à partir de MAR1D2 en phase stationnaire, dans les conditions NA (8,9 % en poids Gal) et PA (8,2 % en poids Gal). Des traces d'autres sucres neutres tels que Glc, Man, Rha et fucose (Fuc) ont également été détectées dans plusieurs échantillons. Les sucres anioniques, tels que les acides glucuronique (GlcA) et GalA, n'ont été observés pour SEP que dans la souche KL1C4 dans des conditions NA (figure 38C), et leur présence pourrait s'expliquer par la contamination du surnageant par des membranes cellulaires bactériennes lors de la préparation de l'échantillon. Une composition similaire a été obtenue pour le SEP étroitement associé aux cellules de *L. chlorophorum* solubilisées à partir de pastilles (c.f. Table S3, Roux *et al.*, 2021). La quantité de soufre détectée dans les échantillons était similaire pour chaque souche et indépendante de la phase de croissance. Le soufre peut être associé aux sucres et aux protéines. Les SEP des souches RCC1489 et KL1C4 n'étaient composées que de protéines et de soufre au cours de la phase de latence (Figure 38B, D).

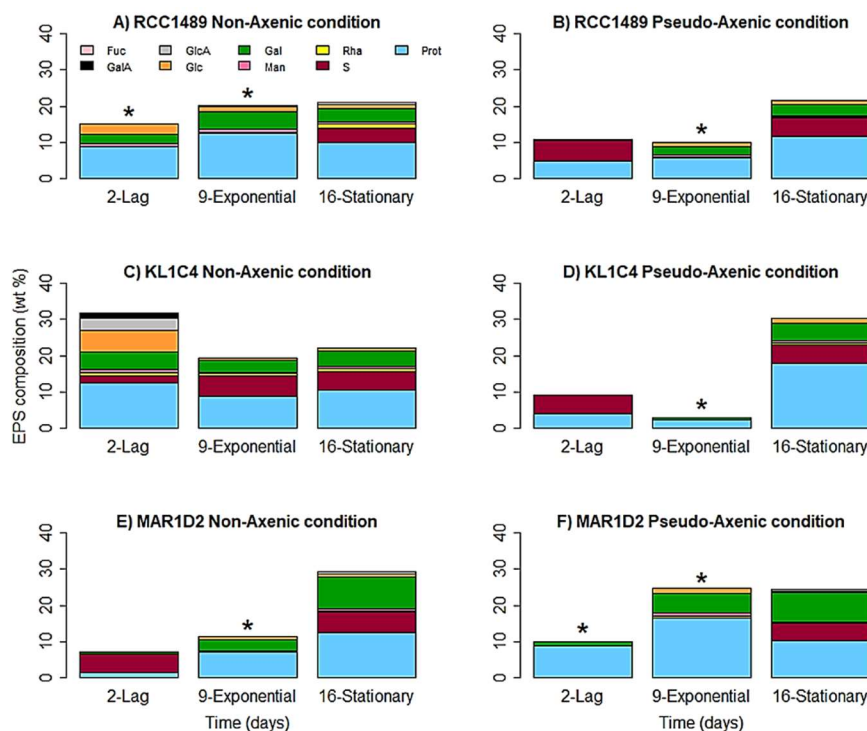


Figure 38 : Composition en monosaccharides, protéines et sulfate (% en poids) de SEP provenant de surnageants, à trois temps de croissance, pour les trois souches de *L. chlorophorum* dans des conditions non axéniques (NA) : A) RCC1489, C) KL1C4, E) MAR1D2 et pseudo-conditions axéniques (PA) : B) RCC1489, D) KL1C4, F) MAR1D2 ( $n = 1$ ). Prot : Protéines ; S : Soufre ; Rha : rhamnose ; Homme : Mannose ; Gal : Galactose ; Gc : Glucose ; GlcA : acide glucuronique ; GalA : acide galacturonique ; Fuc : Fucose. \* Les échantillons n'ont pas été analysés pour leur teneur en soufre en raison d'une quantité d'échantillon insuffisante pour l'analyse élémentaire. D'après Roux *et al.*, (2021).



Pour approfondir la caractérisation SEP dans des conditions NA et PA, des analyses HPSEC-MALS ont été réalisées (Figure 39). Plusieurs pics ont été observés sur les profils d'élution HPSEC des protéines (suivis par un détecteur UV), suggérant la présence de plusieurs populations de protéines (c.f. Table S4, Roux et al., 2021). Bien que les profils HPSEC étaient similaires parmi les trois souches de *L. chlorophorum* à différentes phases de croissance, ils variaient clairement entre les conditions NA et PA. Ce n'est que dans les cultures NA que des agrégats de protéines de haut poids moléculaire ont été produits ( $\geq 1\ 000\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ ; c.f. Table S4, Roux et al., 2021). Des populations de protéines moins hétérogènes ont été observées dans les cultures PA. Ces protéines étaient principalement de poids moléculaires moyens et faibles.

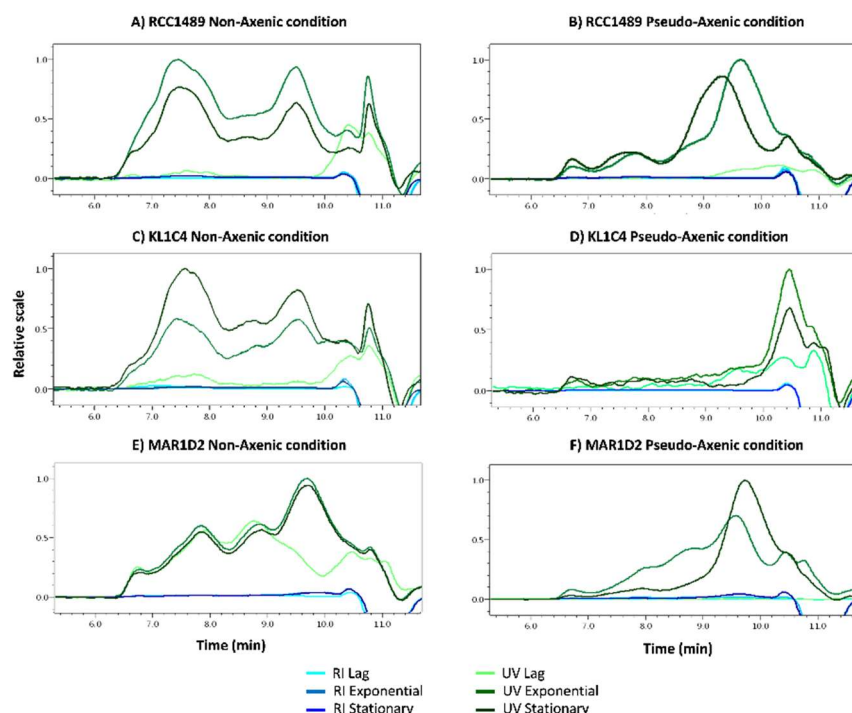


Figure 39 : Profils HPSEC (avec détecteurs UV et RI) des surnageants de culture obtenus pour trois souches de *L. chlorophorum*, au cours des trois temps de croissance, dans des conditions non axéniques (NA) : A) RCC1489, C) KL1C4, E) MAR1D2 et pseudo-axénique (PA) conditions : B) RCC1489, D) KL1C4, F) MAR1D2. (Logiciel Astra 6.1 (TECHNOLOGIE WYATT)). D'après Roux *et al.* (2021).

Contrairement aux protéines, les profils HPSEC des polysaccharides (détecteur RI, figure 40) étaient similaires dans les deux conditions de culture pour les trois souches de *L. chlorophorum*. Trois pics principaux ont été distingués (c.f. table S4, Roux *et al.*, 2021), mettant en évidence la présence de trois fractions polysaccharidiques de poids moléculaire élevé ( $> 1\ 000\ 000\ \text{g/mol}$ ), moyen et bas. Des polysaccharides similaires ont été produits dans des conditions NA ou PA, avec des quantités légèrement plus élevées sous NA. Certains pics de protéines et de polysaccharides élues en même temps en HPSEC-MALS, pourraient suggérer l'existence de glycoprotéines ou la présence de protéines et de polysaccharides liés entre eux par des interactions ioniques. Pour déterminer si les polymères sont des polysaccharides, des protéines ou des conjugués de glycoprotéine, nous avons analysé les composants SEP des phases stationnaires sur SDS-PAGE et électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 41). Aucune différence entre les conditions NA et PA et entre les souches n'a été observée. Malgré la coloration sensible au Sypro Ruby pour les protéines, aucune d'entre elles n'a été observée dans les échantillons. Les protéines quantifiées dans les échantillons par dosage colorimétrique et HPSEC-MALS n'ont pas pu être révélées par différentes techniques de coloration, ce qui nous amène à déduire que les agrégats de protéines ne pouvaient pas entrer dans le gel et migrer correctement avant d'être détectés par coloration. Cependant, l'électrophorèse a permis d'évaluer la présence d'une fraction polysaccharidique clairement

colorée par le colorant cationique Stains-All. La migration de ce polysaccharide en électrophorèse suggère la présence de polymère de galactose sulfaté, tel que le galactane sulfaté. En effet, des modèles de migration similaires ont été observés pour le sulfate de galactane et le sulfate de dextrane utilisés comme références.

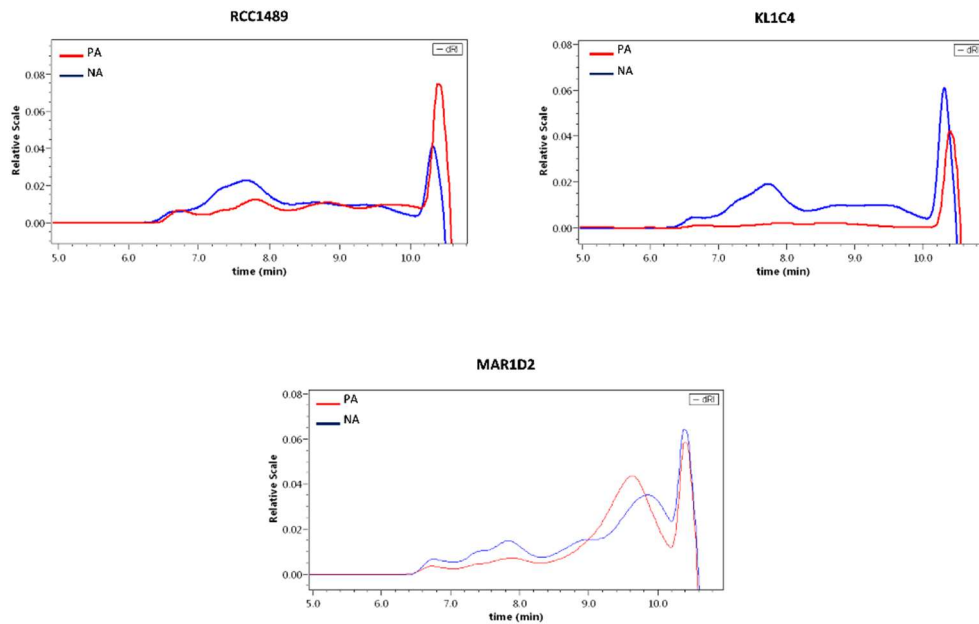


Figure 40 : Profils HPSEC (détecteurs RI) des surnageants de culture obtenus pour trois souches de *L. chlorophorum* en phase stationnaire : RCC1489, KL1C4, MAR1D2 en conditions non axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). D'après Roux *et al.* (2021).

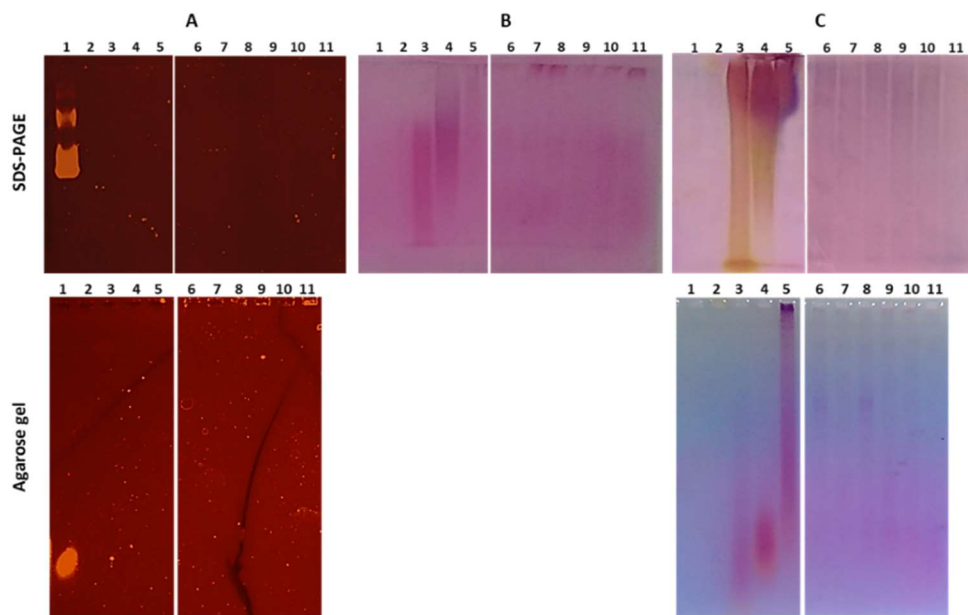


Figure 41 : Electrophorèse des surnageants de culture de *L. chlorophorum* (souches RCC1489, KL1C4 et MAR1D2) en phase stationnaire en conditions NA et PA après coloration SYPRO™ Ruby (A), Schiff (B) et Stains All (C). Pistes 1 à 5 : références comme suit, piste 1 : albumine de sérum bovin, piste 2 : *E. coli* O111:B4 LPS, piste 3 : sulfate de galactane 7,7 % S, piste 4 : sel de sodium de sulfate de dextrane (MW 50 000, 16,0-19,0 % S), piste 5 : sel de sodium de sulfate de dextran (MW 500 000, 16,0-19,0 % S). Pistes 6 et 7 : RCC1489 en conditions NA et PA, pistes 8 et 9 : KL1C4 en conditions NA et PA et pistes 10 et 11 : MAR1D2 en conditions NA et PA. D'après Roux *et al.* (2021).

#### 4.3.4 Modification de la viscosité

L'excès de viscosité maximal ( $\eta$ ) était de  $2,7 \% \pm 0,4 - 0,5$  pour les trois souches de *L. chlorophorum* étudiées et sous les deux conditions de culture (NA et PA ; tableau 2). Aucune différence de viscosité n'a été observée entre les conditions NA et PA pendant la croissance cellulaire.

Tableau 6 : Moyenne de l'augmentation relative de viscosité  $\eta$  (%) au cours des différentes phases de croissance sous les conditions non-axénique (NA) et pseudo-axénique (PA) et pour les trois souches de *L. chlorophorum* étudiées (RCC1489, KL1C4 et MAR1D2). D'après Roux *et al.* (2021).

Conditions	Souches de <i>L. chlorophorum</i>					
	RCC1489		KL1C4		MAR1D2	
	NA	PA	NA	PA	NA	PA
Moyenne $\eta$ (%)						
Latence $\pm$ s.d.	$2.1 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.4$	$2.7 \pm 0.4$	$1.6 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.5$	$1.1 \pm 0.4$
Exponentielle $\pm$ s.d.	$2.7 \pm 0.4$	$1.6 \pm 0.3$	$1.6 \pm 1.1$	$2.6 \pm 0.4$	$2.7 \pm 0.5$	$0.1 \pm 0.2$
Stationnaire $\pm$ s.d.	$2.0 \pm 0.4$	$2.4 \pm 1.6$	$2.0 \pm 0.4$	$2.4 \pm 0.8$	$0.8 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.3$

#### 4.3.5 Comparaison des conditions axéniques et pseudo-axéniques

L'analyse en composantes principales (ACP), calculée sur toutes les données acquises, résume les différences entre les conditions de culture NA et PA (Figure 42). L'ACP décrit 79,6 % de la variance totale selon deux dimensions principales (Dim1 et Dim2). La Dim1 explique les concentrations en cellules de *L. chlorophorum* et en bactéries, [TEP], [POC],  $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$ ,  $[\text{PO}_4^{3-}]$ . [TEP] sont positivement corrélées avec [POC], tandis que  $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$  et  $[\text{PO}_4^{3-}]$  sont négativement corrélés avec les cellules de *L. chlorophorum*, [TEP] et [POC]. Dans notre analyse PCA,  $[\text{NH}_4^+]$  est la variable la plus corrélée avec Dim2. Pour les souches RCC1489 et KL1C4, la PCA a fourni une distinction claire entre les échantillons dans les conditions NA et PA (Figure 42). En effet, les conditions NA sont positivement associées à des concentrations plus élevées de bactéries et d'ammonium, en particulier pendant la phase stationnaire de croissance de *L. chlorophorum*. En revanche, les conditions d'AP étaient positivement associées à des concentrations bactériennes plus faibles et à des concentrations de cellules de *L. chlorophorum* plus élevées (Figure 42). [TEP] et [POC] sont similaires dans les conditions NA et PA. L'excès de viscosité relative, utilisé comme variable illustrative, n'est corrélé à aucune condition de culture. Pour la souche MAR1D2, la PCA n'a pas fourni de distinction claire entre les échantillons dans des conditions NA et PA car les concentrations bactériennes initiales étaient inférieures à celles des deux autres souches dans des conditions NA.

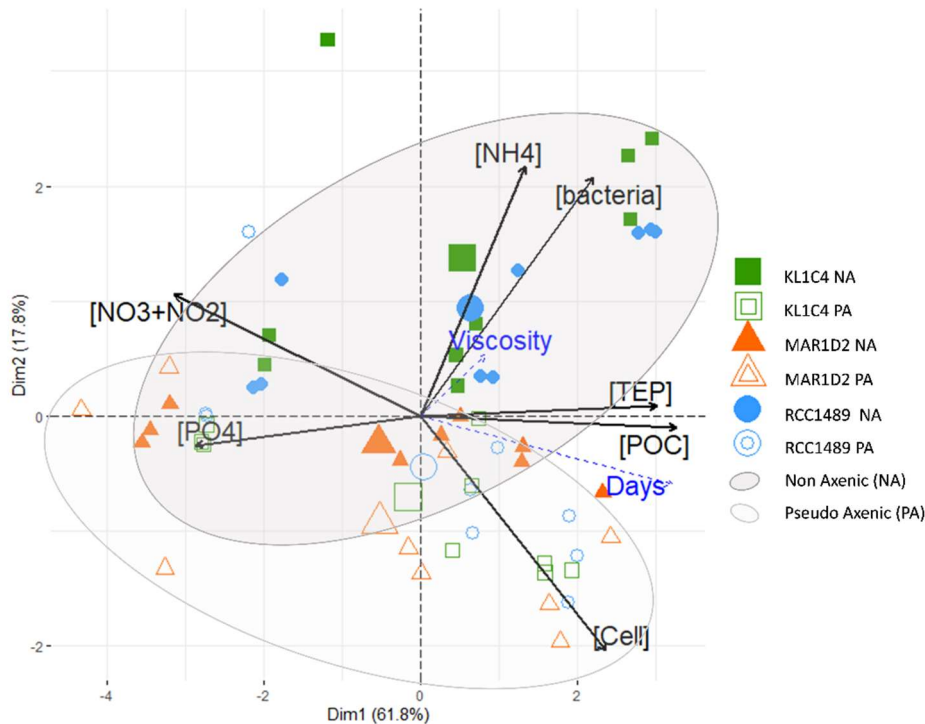


Figure 42 : Analyse en Composante Principale (ACP) réalisée sur l'ensemble du jeu de données. Cette représentation illustre les similarités et différences entre les conditions non-axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA). Dim1 et Dim2 expliquent 79,6% de la variance totale. Les flèches noires représentent les variables quantitatives utilisées dans le calcul de la PCA. Concentration cellulaire en bactéries ([bacteria cells mL<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.65; Dim2 = 0.61); concentration cellulaire des dinoflagellés ([Cell] in cells mL<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.70; Dim2 = -0.60); concentration en TEP ([TEP] in mg Xeq L<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.89; Dim2 = 0.03); concentration en carbone organique particulaire ([POC] in mg L<sup>-1</sup>: Dim1 = 0.96; Dim2 = -0.03); concentration en azote ([NO3+NO2] in μM: Dim1 = -0.92; Dim2 = 0.31), phosphate ([PO4] in μM: Dim1 = -0.85; Dim2 = -0.07) et ammonium ([NH4] in μM: Dim1 = 0.39; Dim2 = 0.64). Les flèches en pointillés bleus représentent les variables illustratives : temps en jours ([Days]) et augmentation relative de viscosité ([Viscosity] en %). Les différents souches sont représentées comme : RCC1489 (cercles bleus), KL1C4 (carrés verts) and MAR1D2 (triangles oranges) en condition non-axénique (NA ; symboles pleins) et pseudo-axénique (PA ; symboles vides). Les grands symboles sont les barycentres de chaque groupe et les ellipses (intervalle de confiance de 95%) permettent de distinguer les conditions NA (ellipse noire) et PA (ellipse grise). D'après Roux *et al.* (2021).

#### 4.4 Discussion

Nos résultats montrent des taux de croissance similaires sous les conditions non-axéniques (NA) et pseudo-axéniques (PA) pour les trois souches étudiées (entre 0,24 et 0,31 jour<sup>-1</sup>) et aucune limitation de la croissance par les teneurs en nutriments n'a été observée. Cependant, les concentrations cellulaires maximales en *L. chlorophorum* étaient deux fois plus élevées sous les conditions PA que dans les conditions NA. Ces résultats suggèrent que la présence de bactéries dans les cultures aurait un impact négatif sur la croissance des cellules de *L. chlorophorum*, réduisant de moitié le nombre maximal de cellules. Des études précédentes ont montré que les bactéries pouvaient fortement affecter les taux de croissance de certaines espèces de phytoplancton et réduire fortement les biomasses phytoplanctoniques maximales (e.g. Bowman, 2007 ; Mesek *et al.*, 2007). Cet effet algicide, pourrait être en lien avec la production de molécules actives par le consortium bactérien associé à *L. chlorophorum*, à l'instar de ce qui a été montré pour d'autres espèces de micro-algues (e.g. Lu *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016). Par

ailleurs, l'absence de thèque chez *L. chlorophorum* pourrait faciliter l'effet algicide des bactéries comme suggéré chez d'autres espèces de dinoflagellés dépourvues de thèque (Lovejoy *et al.*, 1998). Ces résultats mettent en évidence une complexe interaction entre *L. chlorophorum* et son consortium bactérien en culture. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre et caractériser ces interactions, qui peuvent être fortement conditionnées par les conditions de culture et la communauté bactérienne qui s'y développe.

Les concentrations totales de TEP étaient similaires dans les conditions NA et PA pour les trois souches de *L. chlorophorum* tout au long de la croissance. Les rendements de SEP étaient plus élevés sous PA que sous NA. Si les bactéries avaient contribué à la production d'EPS dans nos conditions de culture, nous aurions dû observer des concentrations plus élevées de TEP et de SEP dans des conditions NA. Nos résultats suggèrent donc que *L. chlorophorum* serait le principal producteur d'EPS dans ce consortium dinoflagellés-bactéries. Par ailleurs, la concentration maximale de TEP produite par *L. chlorophorum* était d'environ 17,4 mg Xeq L<sup>-1</sup>, l'une des concentrations les plus élevées mesurées dans des cultures monospécifiques de phytoplancton (Tableau 7).

De plus, des concentrations maximales de TEP similaires ont été observées pour toutes les souches, suggérant que la production de TEP ne dépendait pas de la variabilité intraspécifique. Cependant, les trois souches ont été isolées sur la façade atlantique française, alors que *L. chlorophorum* a été observé dans d'autres pays d'Europe (Honsell et Talarico, 2004) ainsi qu'au Chili (Iriarte *et al.*, 2005), en Californie (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014) et Australie (McCarthy, 2013). Par conséquent, la variation de la production de TEP entre les souches pourrait être due à des problèmes biogéographiques. Pour répondre à cette question, des souches provenant de différents environnements, localités et latitudes doivent être analysées.

Nos résultats mettent également en évidence une plus forte production de TEP par cellule dans les cultures non-axéniques (NA) que dans les cultures pseudo-axéniques. Ces observations suggèrent une surproduction de TEP par les cellules de *L. chlorophorum* en présence de bactéries. Des études précédentes ont également montré une surproduction de TEP par différentes espèces phytoplanctoniques en présence de bactéries (Azam et Smith, 1991 ; Smith *et al.*, 1995).

Cette étude a également permis pour la première fois de caractériser les SEP produits par *L. chlorophorum* : ils sont principalement composés de protéines et d'exopolysaccharides, à savoir le galactane sulfaté. La composition des SEP produits par les dinoflagellés est encore mal connue. Certaines études ont porté plus spécifiquement sur la composition des exopolysaccharides et la présence de résidus Gal semble être une caractéristique commune des exopolysaccharides produits par les dinoflagellés (Hasui *et al.*, 1995 ; Yim *et al.*, 2007 ; Mandal *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que l'exopolysaccharide à base de galactose pourrait être une caractéristique commune chez les dinoflagellés.

Des études récentes ont montré que les exopolymères produits par le phytoplancton pouvaient fortement augmenter la viscosité de l'eau de mer (Jenkinson, 1986 ; Kesaulya *et al.*, 2008 ; Seuront et Vincent, 2008). Cependant, malgré les concentrations élevées de TEP mesurées dans les cultures de *L. chlorophorum*, aucune augmentation significative de la viscosité n'a été observée dans aucune des conditions testées. Les propriétés physicochimiques des EPS sont attribuées à leur chimie diverse et complexe et changent avec la diversité des espèces, l'âge et les conditions de croissance (Bhaskar et Bhosle, 2005). Des facteurs physiques, tel que le régime de turbulence peut avoir un impact sur la formation et la persistance/dispersion de TEP in situ (Schuster et Herndl, 1995 ; Stoderegger et Herndl, 1999 ; Passow, 2002) et peut modifier la viscosité de l'eau de mer. Nos conditions de culture ont été réalisées dans un régime de turbulence stable, et donc, nos expériences peuvent difficilement être extrapolées aux conditions du milieu naturel. Des mesures de la viscosité de l'eau de mer lors d'un bloom de *L. chlorophorum* sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Tableau 7 : Concentration maximale de TEP (TEPmax ; mg Xeq L<sup>-1</sup>) produite par différentes espèces de phytoplancton cultivées en culture (majoritairement non axénique). CCMP : Centre National de Culture de Phytoplancton Marin Provasoli-Guillard ; PML : Laboratoire marin de Plymouth ; UNC : Université de Caroline du Nord ; RCC : Collection Culture Roscoff ; NS : isolat de la mer du Nord ; SBC : isolé du canal de Santa Barbara, au large de la Californie ; AS : isolat d'Ariake Sound (Japon) ; OW : Oyashio Waters (Japon). D'après Roux et al. (2021).

Espèces, souches	Classe	TEPmax (mg Xeq L <sup>-1</sup> )	Référence
<i>Chaetoceros affinis</i> , CCMP 159	Bacillariophyceae	1.1	Passow, 2002
<i>Chaetoceros sp.</i> , NS isolate		2.8	Passow, 2002
<i>Chaetoceros sp.</i> , UNC 1201		~ 1.1	Burns et al., 2019
<i>Coscinodiscus granii</i> , AS isolate	Bacillariophyceae	13.2	Fukao et al., 2010
<i>Skeletonema sp.</i> , AS isolate	Bacillariophyceae	22.4	Fukao et al., 2010
<i>Eucampia zodiacus</i> , AS isolate	Bacillariophyceae	16.9	Fukao et al., 2010
<i>Melosira nummuloides</i> , NS isolate	Bacillariophyceae	0.3	Passow, 2002
<i>Nitzschia sp.</i> , SBC isolate	Bacillariophyceae	3.2	Passow, 2002
<i>Rhizosolenia calcar-avis</i> , CCMP 1518	Bacillariophyceae	0.4	Passow, 2002
<i>Rhizosolenia setigera</i> , AS isolate		23.5	Fukao et al., 2010
<i>Stephanopyxis turris</i> , CCMP 815	Bacillariophyceae	9.3	Passow, 2002
<i>Thalassiosira nordenskiöldii</i> , OW isolate	Bacillariophyceae	1.5	Nosaka et al., 2017
<i>Thalassiosira pseudonana</i> , CCMP 1335		~ 0.8	Burns et al., 2019
<i>Thalassiosira rotula</i> , Meunier, NS isolate		0.6	Passow, 2002
<i>Thalassiosira sp.</i> , UNC 1203		~ 0.7	Burns et al., 2019
<i>Thalassiosira weissflogii</i> , CCMP 1336		0.4	Gärdes et al., 2011
<i>Emiliania huxleyi</i> , non-calcifying strain, PML 92d	Prymnesiophyceae	0.7	Passow, 2002
<i>Phaeocystis globosa</i> , CCMP 2754	Prymnesiophyceae	~ 0.5	Burns et al., 2019
<i>Gonyaulax polyedra</i> , CCMP 406	Dinophyceae	0.3	Passow, 2002
<i>Tetraselmis suecica</i> , NS isolate	Chlorodendrophyceae	0.9	Passow, 2002
<i>Prochlorococcus marinus</i> , RCC 0156	Cyanophyceae	1.5	luculano et al., 2017

#### 4.5 Conclusion et perspectives

Cette étude en milieu contrôlé a permis de vérifier que *L. chlorophorum* était le principal producteur de TEP dans les cultures. Néanmoins, nos résultats mettent en évidence des interactions complexes entre les cellules de *L. chlorophorum* et les communautés bactériennes. En effet, outre un effet algicide sur la croissance de *L. chlorophorum*, la présence de bactéries pourrait stimuler la production de TEP chez ce dinoflagellé. D'autres études en laboratoire et sur le milieu naturel, sont cependant nécessaires pour mieux caractériser ces interactions.

Par ailleurs, nos résultats confirment ceux de Claquin et al. (2008) qui mettent en évidence une forte production de TEP par ce dinoflagellé. Si nous n'avons pas pu mettre en évidence d'augmentation significative de viscosité dans les milieux de culture, la production de cette grande quantité de TEP lors d'une efflorescence de *L. chlorophorum* pourrait avoir de lourdes conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes impactés, que ce soit en termes d'accentuation des phénomènes d'hypoxie comme en termes de diminution des capacités de filtration des bivalves filtreurs.



## 5 Impact des eaux colorées verte sur la croissance et la mortalité des espèces exploitées

### 5.1 Contexte et objectifs

Bien que *Lepidodinium chlorophorum* ne soit pas connu pour produire des toxines, les eaux colorées vertes sont associées régulièrement à des mortalités massives de bivalves pendant l'été, entraînant des pertes importantes pour les conchyliculteurs de la zone (e.g. Cochennec-Laureau *et al.*, 2018). Ces événements mettent en évidence la nuisibilité potentielle de ce dinoflagellé sur les populations d'huîtres et soulignent la nécessité de mieux appréhender l'impact de ces blooms récurrents sur les populations de bivalves exploitées.

A ce jour, peu d'éléments étaient disponibles sur les mécanismes à l'origine de ces mortalités. Des études relativement récentes suggèrent que *L. chlorophorum* serait à l'origine d'une diminution de l'assimilation, voire de l'arrêt total de croissance chez l'huître creuse (Thomas *et al.*, 2016). Toutefois cette hypothèse se base uniquement sur des résultats de modélisation mécanistique utilisant la théorie des budgets énergétiques (DEB) et restent donc à être validés expérimentalement. Par ailleurs, les processus biologiques et physico-chimiques conduisant à cette interaction négative restent à élucider. Une première hypothèse de nuisibilité suggère un lien avec la production de TEP (Transparent Exopolymer Particles) par *L. chlorophorum* (Claquin *et al.*, 2008 ; Roux *et al.*, 2021, 2022) qui pourrait affecter les fonctions de base des bivalves. En effet en augmentant les taux de sédimentation de la biomasse produite lors du bloom, les TEP sont susceptibles d'accentuer les phénomènes d'hypoxie (e.g. David *et al.*, 2005). Par ailleurs, les TEP pourraient engendrer une augmentation significative de la viscosité de l'eau (e.g. Seuront et Vincent 2008) et ainsi altérer les mécanismes de filtration (e.g. Larsen et Riisgard, 2009). Afin de tester cette hypothèse, un suivi environnemental a été mis en place en avril 2019 dans le cadre du projet LEPIDO-PEN.

L'objectif de ce suivi environnemental était d'étudier les conséquences potentielles d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* sur la croissance et la mortalité de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis*), au cours de deux années consécutives (2019 et 2020). Cependant, suite à l'arrêt des suivis de terrain pendant la période de confinement du printemps 2020 et aux difficultés rencontrées en 2019 (suspicion d'un parasite dans les lots expérimentaux), il a été décidé de poursuivre le suivi au cours de l'année 2021.

Le suivi environnemental sur les huîtres a été réalisé par les équipes d'Ifremer et les résultats acquis ont été traités dans le cadre d'un stage de fin d'année Intechmer (Coline Giraud).

Le suivi sur les moules a été réalisé par le SMIDAP au cours des deux années d'étude.

Les principaux résultats sont présentés ci-après.

### 5.2 Mise en œuvre

Cette étude a été menée sur le site de Pen Bé entre Avril 2019 et décembre 2021 (Figure 43).

Ce site a été choisi car : (i) il est situé sur une zone conchylicole régulièrement impactée par des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum*, (ii) des mortalités avaient été recensées sur ce site les années précédentes, (iii) il est facilement accessible et (iii) les structures expérimentales ont pu être hébergées chez des professionnels. Les lots expérimentaux ont été placés au plus bas de l'estran, qui est la zone la plus fréquemment touchée par des épisodes de mortalité suite aux eaux colorées.

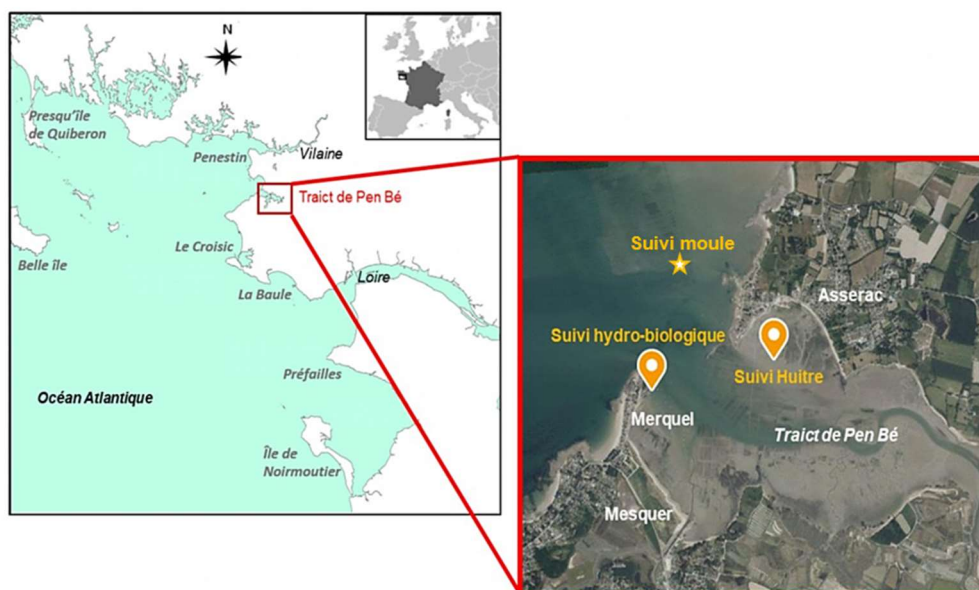


Figure 43 : Localisation des sites d'étude.

### 5.2.1 Suivi hydro-biologique

La fréquence d'échantillonnage sur le site de Merquel a été définie en fonction de la période propice aux blooms de *L. chlorophorum*. En période estivale (juin à septembre), la fréquence d'échantillonnage était hebdomadaire, puis mensuelle le reste de l'année (octobre à mai). Lors de chaque échantillonnage, les paramètres physico-chimiques (température (°C), salinité, turbidité, et oxygène) sont mesurés en surface à l'aide d'une sonde multi-paramètres (NKE MP6) et un prélèvement d'eau de mer est réalisé (Figure 44) pour les analyses des concentrations en nutriments, Chl<sub>a</sub> et TEP, ainsi que pour l'identification et l'énumération du phytoplancton. Le détail de chacune de ces différentes analyses est donné dans l'annexe 3.

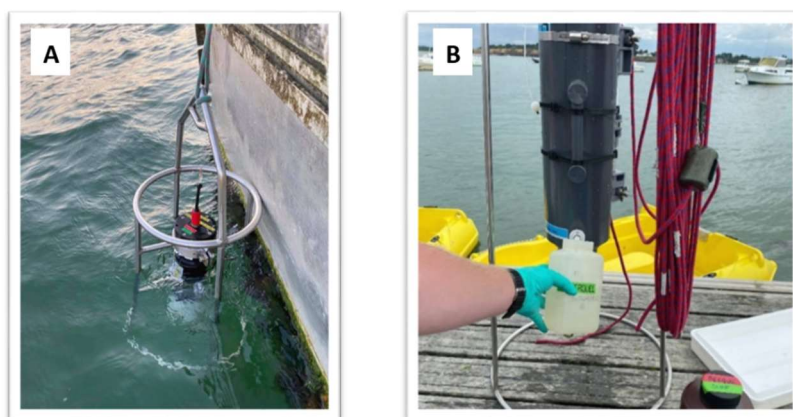


Figure 44 : Echantillonnage et mesure des paramètres physico-chimiques. (A) sonde multi-paramètres (NKE MP6) immergé. (B) : prélèvement des échantillons à partir de la bouteille NISKIN.

### 5.2.2 Suivi ostréicole

Sur le terrain, le protocole était similaire à celui réalisé par le réseau national ECOSCOPIA ([https://wwz.ifremer.fr/observatoire\\_conchylicole](https://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole)) afin de pouvoir comparer les données avec d'autres sites et périodes. Les lots suivis étaient composés de 2 classes d'âge : 6 mois (naissain) et

18 mois. Six poches d’huîtres sont déployées sur le site expérimental : 3 poches de naissain (300 individus/poche) et 3 poches de 18 mois (250 individus/poches) (Figure 45).



Figure 45 : Dispositif expérimental déployé sur le site de Pen Bé.

Dans un premier temps, la population de *C. gigas* était issue d’un lot de Naissain Standardisé Ifremer (NSI). Ce lot d’huîtres diploïdes (2n) avait été élevé en milieux contrôlés sur le site expérimental d’Argenton (RBE/PFOM/LPI) puis, sur la Plateforme Régionale d’Innovation de Bouin (SG2M-LSPC). Le NSI représente un matériel biologique standard et reproductible dont la variance inter-lots est minimisée grâce à l’utilisation d’un large pool de géniteurs d’origine sauvage et dont les traits d’histoire de vie précédant le déploiement sur site sont parfaitement connus (Fleury *et al.*, 2020). Les lots de 18 mois suivis en 2019 étaient les lots NSI de 2018 dont la croissance s’est effectuée sur le site ECOSCOPA de Pénérif (Baie de Vilaine).

Toutefois, suite à la suspicion de la présence d’*Haplosporidium coastale*, les lots NSI déployés en avril 2019 ont dû être retirés au cours de la semaine du 17 Juin 2019. En effet, ce parasite a été suspecté d’être responsable de la mortalité chronique d’un lot d’huîtres creuses juvéniles au sein de la station Ifremer de Bouin. Par conséquent, tous les lots d’huîtres issus d’Ifremer Bouin ont dû être détruits par mesure de précaution. Ainsi, pour continuer le suivi, ces lots NSI ont été remplacés par des lots constitués d’un mélange d’huîtres triploïdes (3n) et diploïdes (2n) fournis par un ostréiculteur sur le site de Pen Bé, et ont pu être installés au début du mois de juillet 2019. Suite à l’arrêt des suivis terrain durant le confinement lié à la crise sanitaire du Covi-19 au printemps 2020, il a été décidé de poursuivre le suivi en 2021.

Les lots d’huîtres ont été changés en mars 2020 et 2021. Lors de ce changement, les poches contenant le naissain de l’année N sont utilisées pour réaliser les poches de 18 mois pour l’année N+1. Le complément d’huîtres pour les poches de 18 mois, ainsi que la préparation des poches de naissain sont réalisés à partir des huîtres du professionnel hébergeant les structures expérimentales. Les caractéristiques des différents lots étudiés au cours de ce suivi sont détaillées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des lots d’huîtres suivi sur le site de Pen Bé en 2019, 2020 et 2021

Nom du lot	Origine	Ploidie	Date de mise à l’eau
Lot 1	Ecloserie Argenton (NSI)	2n	03/04/2019
Lot 2	Professionnel	3n et 2n	05/07/2019
Lot 3	Professionnel	3n et 2n	10/03/2020
Lot 4	Professionnel	3n et 2n	06/03/2021

La fréquence d'échantillonnage a été définie en fonction des périodes à risques : période de blooms de *L. chlorophorum* et d'augmentation des températures de l'eau. Ainsi le suivi s'est déroulé à une fréquence bimensuelle du mois d'avril au mois d'octobre, puis de façon mensuelle du mois d'octobre au mois de mars.

La température, la salinité et les concentrations en oxygène dissous ont été suivis à haute fréquence (15 minutes) à l'aide de sondes multi-paramètres placées à proximité des poches expérimentales. Lors de chaque sortie, les sondes multi-paramètres étaient relevées et remplacées par de nouvelles sondes propres et vérifiées par le service métrologie du laboratoire Ifremer LER/MPL.

### 5.2.2.1 Estimation de la mortalité

Lors de chaque sortie, les individus morts (correspondant à des coquilles ouvertes ou des coquilles vides) et les individus vivants sont dénombrés pour chacune des 3 poches (réplicas) et pour les deux classes d'âge (naissain et 18 mois).

Le taux de mortalité instantanée (MI) et de mortalité cumulés (MC) sont calculés comme suit :

$$MI = \frac{Nb_{morte(t)}}{Nb_{morte(t)} + Nb_{vivante(t)}}$$

Avec  $Nb_{morte(t)}$  et  $Nb_{vivante(t)}$  le nombre d'huîtres mortes et vivantes au temps  $t$  respectivement.

$$MC = 1 - (MC_{t-1} \times 1 - MI_t)$$

### 5.2.2.2 Estimation de la croissance

Pour chaque poche de naissain et de 18 mois, l'ensemble des individus vivants est pesé à l'aide d'un peson. Le taux de croissance cumulée (CC en %) est défini comme le gain de poids. Il est obtenu par la formule suivante :

$$CC = \frac{M_{tot\ viv(t)}}{Nb_{viv(t)}} - \frac{M_{tot\ viv(t_0)}}{Nb_{viv(t_0)}} \times 100$$

avec  $M_{tot\ viv(t)}$  la masse totale (g) des huîtres vivantes au temps  $t$  et  $M_{tot\ viv(t_0)}$  la masse totale des huîtres au temps  $t_0$ .

### 5.2.2.3 Biométrie

Lors de chaque sortie, 10 individus sont prélevés aléatoirement dans chacune des 3 poches de 18 mois, soit 30 individus au total. Les huîtres sont ensuite conservées dans une glacière jusqu'au retour au laboratoire. Les 30 individus sont soigneusement lavés et sont ensuite déposés sur une plaque numérotée afin d'identifier chaque individu.

La longueur de chaque coquille est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse (Mitutoyo IP67). Pour chaque individu sont déterminées : (i) la masse totale, (ii) la masse de coquille, (iii) la masse de chair humide et (iv) la masse de chair sèche (après lyophilisation). Ces mesures sont réalisées sur une balance de précision (Sartorius CP 423S).

L'indice de Lawrence et Scott (LS ; %) qui caractérise l'état d'engraissement et la qualité de la chair des huîtres, a été calculé pour chaque date et pour chaque individu de 18 mois. Cet indice est calculé selon la formule suivante :

$$LS = \frac{m_{cs}}{m_{tot} - m_{cq}} \times 100$$

où  $m_{cs}$  est la masse de chair sèche,  $m_{tot}$  la masse totale de l'individu et  $m_{cq}$  la masse de la coquille.

#### 5.2.2.4 Traitement des données haute fréquence

Les données (HF) acquises sur le site sont récupérées sur le logiciel WinMemo II. La concentration en oxygène est convertie en mg/L en utilisant les données de température, de salinité et de saturation en oxygène fournies par la sonde. Les données acquises au cours des différentes périodes ont été ensuite combinées dans un même fichier Excel afin de permettre le traitement des données sous Rstudio. Ce regroupement a nécessité une vérification du pas de temps de mesure afin de pouvoir bien aligner les colonnes de données les unes par rapport aux autres. Par ailleurs, un critère de salinité supérieure 10 a été appliqué au jeu de données brutes afin de retirer les valeurs mesurées lors de l'émersion. Les valeurs dites aberrantes ont également été retirées du jeu de données. Ces valeurs ont été définies comme telles sur la base des connaissances acquises sur la zone depuis de nombreuses années par le laboratoire.

#### 5.2.3 Suivi mytilicole

Le suivi des moules a été réalisé sur le site de Pen Bé / Pont Mahé par le SMIDAP, au cours des années 2019 et 2020 (Figure 43).

3 poches casiers (mini-poches) ont été installées le 5 mai 2019 et le 3 juin 2020 sur le site, chacune contenant 120 moules (Figures 46).

Le lot utilisé correspondait à des moules de 1 an, originaires de Pont Mahé (captage fin août 2018 et juillet 2019) de longueur moyenne initiale de 28,8 cm et 39,8 cm en 2019 et 2020 respectivement.

La mortalité a été suivie à une fréquence mensuelle au cours des deux années de suivi.



Figure 46 : Dispositif expérimental déployé sur le site de Pen Bé/Pont Mahé.

### 5.3 Résultats

#### 5.3.1 Contexte hydro-biologique

Le suivi des efflorescences de *L. chlorophorum* réalisé entre 2019 et 2021 sur le traict de Pen Bé, met en évidence une nette différence entre ces trois années de suivi. En effet, si un bloom de *L. chlorophorum* a pu être observé sur ce site entre le 11 juillet et le 5 août 2019 avec des abondances de plus de 7 millions de cells/L, les abondances maximales n'ont pas dépassé 58 400 cells/L au



cours de l'été 2020 et 360 000 au cours de l'été 2021 (Figure 47A). Ces observations sont en accord avec les autres résultats obtenus sur l'ensemble de la zone d'étude du projet Lepido-Pen qui mettent en évidence des blooms de *L. chlorophorum* et des eaux colorées vertes au cours de l'été 2019 (Roux *et al.*, 2022).

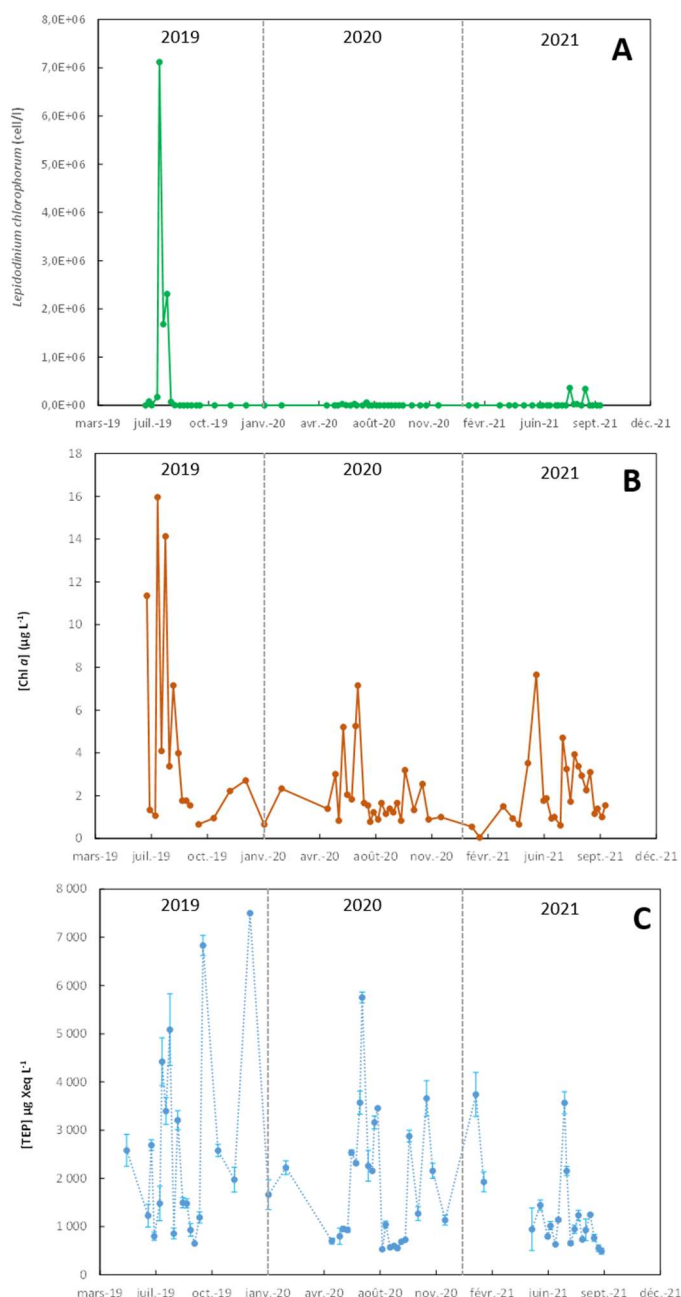


Figure 47 : Abondances de *L. chlorophorum* (A), concentrations en chlorophylle a (B ; [Chl a] ;  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et en TEP (C ;  $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ ) mesurées sur le site de Merquel en 2019, 2020 et 2021. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type.

Le bloom de *L. chlorophorum* de l'été 2019 s'est traduit également par une forte biomasse phytoplanctonique (Figure 47B). En effet, des concentrations en Chl a élevées ont été mesurées en juillet 2019 sur le traict de Pen Bé, avec des valeurs de plus de 16  $\mu\text{g/L}$ . En revanche, les concentrations en Chl a sont restées inférieures à 8  $\mu\text{g/L}$  sur ce site au cours des étés 2020 et 2021.

*L. chlorophorum* est un dinoflagellé qui a la particularité de produire de grandes quantités de TEP (Claquin *et al.*, 2018 ; Roux *et al.*, 2021). La reminéralisation de ces particules par les bactéries peut être à l'origine d'une chute drastique des concentrations en oxygène (Mari *et al.*, 2017). Si



les concentrations maximales en TEP observées en 2019 n'ont pas été supérieures à celles enregistrées en 2020 (5084  $\mu\text{g eqX/L}$  le 29 juillet 2019 et 5751  $\mu\text{g eqX/L}$  le 6 juillet 2020), en juillet 2019 les concentrations en TEP sont restées proches de 4 000  $\mu\text{g eqX/L}$  pendant les 3 semaines du bloom (Figure 47C). En 2021 les concentrations en TEP sont restées inférieures à 3 600  $\mu\text{g eqX/L}$  sur ce même site.

Ainsi, sur le traict de Pen Bé l'été 2019 a été marqué par un bloom de *L. chlorophorum* au cours du mois de juillet qui s'est traduit par une forte biomasse phytoplanctonique et des concentrations en TEP élevées tout au long du bloom. A contrario, les abondances de *L. chlorophorum* ainsi que la biomasse phytoplanctonique sont restées relativement faibles au cours des étés 2020 et 2021.

La concentration en oxygène dissous, enregistrée par les sondes haute fréquence disposées à proximité des poches expérimentales d'huîtres sur le site de Pen Bé, a chuté au cours de l'été 2019 passant de 10,2 mg/L le 16 juillet à des valeurs inférieures au seuil d'hypoxie (i.e. 2,9 mg/L ; Diaz et Rosenber 2008) entre le 24 et le 26 juillet avec des valeurs minimales de 2,5 mg/L enregistrées le 26 juillet 2019 (Figure 48). En revanche, les concentrations en oxygène sont restées supérieures à 5 mg/L sur ce même site au cours des étés 2020 et 2021 (Figure 48).

Ainsi l'accumulation des TEP et des fortes biomasses phytoplanctoniques lors du bloom de *L. chlorophorum* de 2019, pourrait être à l'origine de l'épisode d'hypoxie enregistré à Pen Bé après le bloom. Cette diminution des conditions d'oxygénation peut avoir eu des conséquences sur la mortalité et la croissance des espèces exploitées telles que les moules et les huîtres creuses.

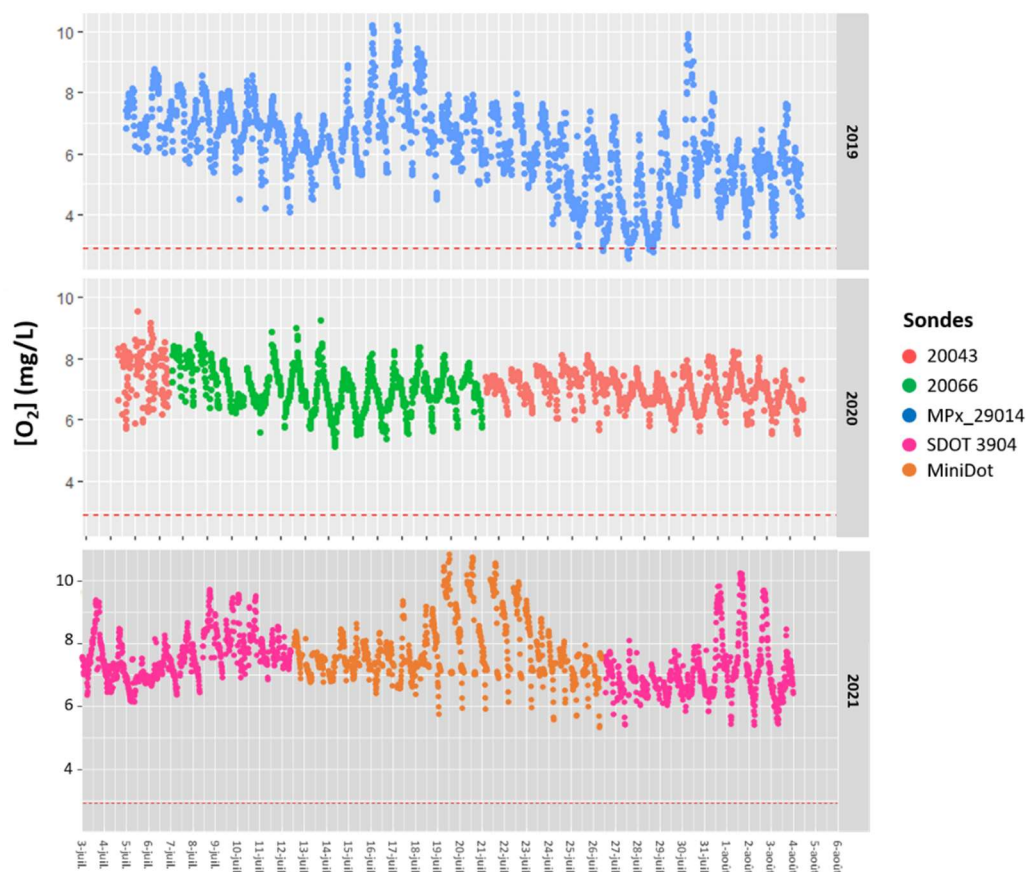


Figure 48 : Evolution de la concentration en oxygène dissous ( $[\text{O}_2]$  ; mg/L) dans l'eau de mer en juillet et août 2019, 2020 et 2021. Le trait pointillé rouge représente le seuil d'hypoxie des bivalves, seuil fixé à 2,9 mg/l (Diaz et Rosenberg, 2008) et les différentes couleurs correspondent aux différentes sondes positionnées sur le site expérimental.

## 5.3.2 Suivi ostréicole

### 5.3.2.1 Mortalité

Le suivi de la mortalité des huîtres creuses a été réalisé à partir des données issues du suivi sur le site de Pen Bé au cours des années 2019, 2020 et 2021 sur les deux classes d'âge, naissain et 18 mois (Figure 49).

Le taux de mortalité cumulée augmente au cours du temps, quel que soit l'âge et les lots d'huîtres étudiés. Cependant les deux classes d'âge montrent des dynamiques très différentes. Ainsi, un épisode de mortalité marqué a été observé chez le naissain au cours des trois années de suivi (Figure 49A). Cet épisode s'est produit au mois de juin en 2019 et 2020 avec des taux de mortalités de 0,34 et 0,29 le 17/06/2019 et le 04/06/2020 respectivement. En 2021, cet épisode a été un peu plus tardif et des forts taux de mortalité (0,11) ont été enregistrés seulement à la mi-juillet. La mortalité cumulée sur l'année a été plus élevée en 2020 avec un taux de 0,41, qu'en 2019 (0,30) et 2021 (0,23). Concernant le 18 mois aucun épisode de mortalité marqué n'a été observé au cours des trois années de suivi (Figure 49B). La mortalité cumulée a augmenté régulièrement au cours de la saison pour atteindre 0,09 en décembre 2019, 0,19 en 2020 et 0,37 en 2021. En 2021, le taux de mortalité a fortement varié entre les 3 poches de 18 mois étudiées.

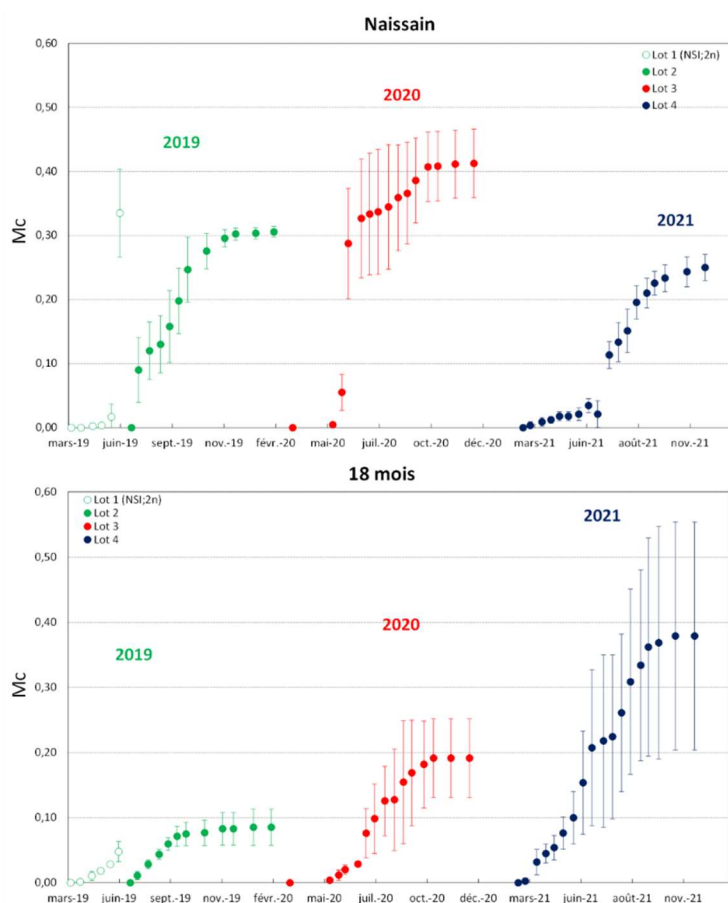


Figure 49: Evolution de la mortalité cumulée (Mc) moyenne (3 poches) du naissain et des huitres de 18 mois au cours des années 2019 (en vert), 2020 (en rouge) et 2021 (en bleu). En 2019, les cercles verts vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles verts colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N+2N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium Costale*. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type.

### 5.3.2.2 Croissance

Les différents lots d'huîtres croient au cours du temps, quel que soit l'âge des huîtres (naissain et 18 mois) et au cours des trois années de suivi (Figure 50). Une dynamique similaire est observée sur les deux classes d'âge étudiées, qui se caractérise par des croissances cumulées plus élevées en 2020 et 2021 qu'en 2019. Ainsi, pour le naissain, la croissance cumulée sur l'année était de 1,1% en 2019, contre 6 à 7% en 2020 et 2021 (Figure 50A). Pour le 18 mois, la croissance cumulée a également été plus faible en 2019 qu'en 2020 et 2021 avec 1,2% en 2019 et 6,8% et 7,5% en 2020 et 2021 respectivement (Figure 50B).

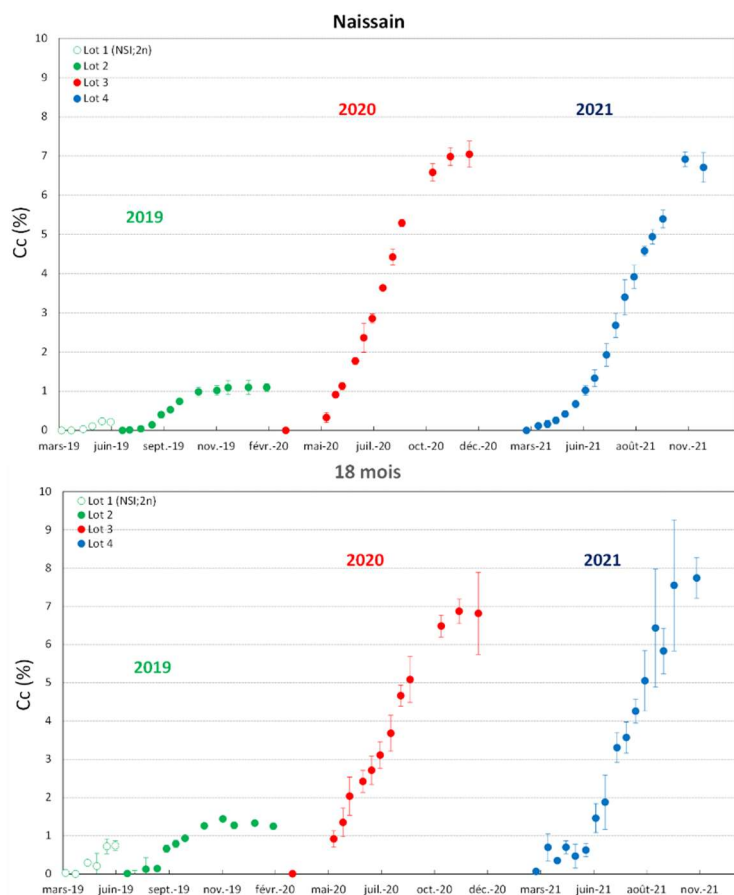


Figure 50 : Evolution de la croissance cumulée (Cc ;%) moyenne (3 poches) du naissain et des huitres de 18 mois au cours des années 2019 (en vert), 2020 (en rouge) et 2021 (en bleu). En 2019, les cercles verts vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles verts colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N+2N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium costale*. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type.

### 5.3.2.3 Indice de remplissage de Lawrence et Scott (LS)

L'indice de Lawrence and Scott (LS) nous renseigne sur le remplissage des huitres de 18 mois. Ce dernier est obtenu à partir de la masse de chair sèche, de la masse totale et de la masse de la coquille. L'évolution de ces différents paramètres est présentée dans l'annexe 4.

En 2019, une diminution significative de l'indice LS est observé au cours de l'été : l'indice chute de 8,04% le 16 juillet à 4,19% le 2 août (Figure 51). La même dynamique est retrouvée en 2020 avec une chute de l'indice LS au cours de l'été qui passe alors de 8,36% le 20 août à 6,66% le 3 septembre. En revanche en 2021 aucune diminution significative de l'indice LS n'est observée au cours de l'été.

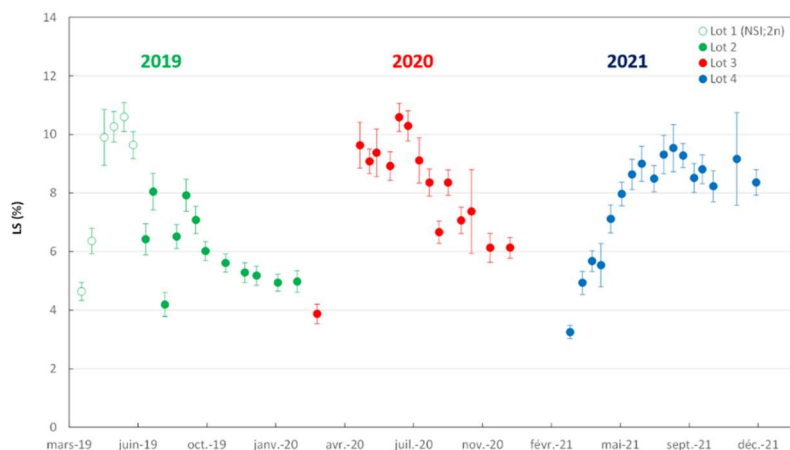


Figure 51 : Évolution de la valeur moyenne de l'indice de Lawrence et Scott (LS) calculé à partir des biométries réalisées sur les 30 individus de 18 mois prélevés à chaque sortie au cours des années 2019 (en rouge), 2020 (en bleu) et 2021 (en vert). En 2019, les cercles verts vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles verts colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N+2N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium costale*. En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type.

### 5.3.3 Suivi mytilicole

#### 5.3.3.1 Mortalités

En 2019, la mortalité cumulée sur 6 mois était de 10,3%, ce qui correspond à des taux de mortalité standard (Figure 52B). Cependant, la mortalité instantanée la plus élevée (> 3%) a été observée au mois d'août, suite à la période de bloom de *L. chlorophorum* (Figure 52A). En 2020, la mortalité cumulée est restée inférieure à 2,5% sur 6 mois (Figure 52D) et aucun événement majeur de mortalité n'a été observé au cours de l'été (Figure 52C).

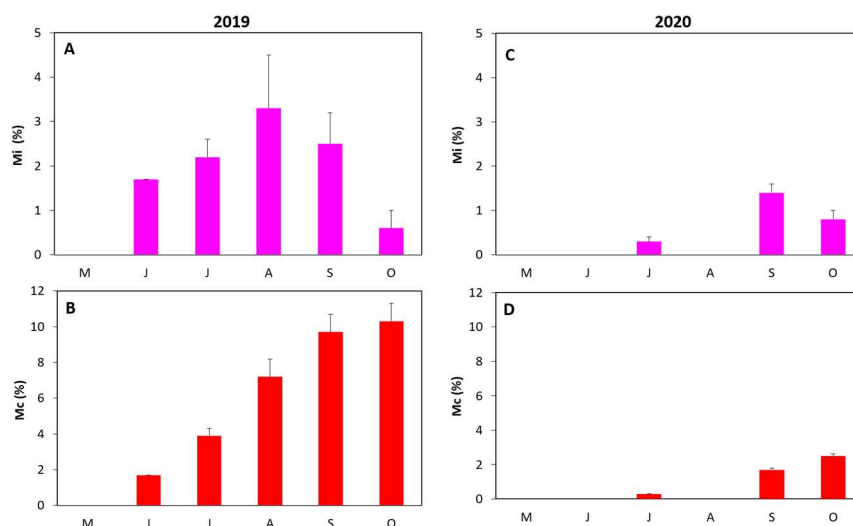


Figure 52 : Evolution de la mortalité instantanée (Mi (%)) ; A et C) et de la mortalité cumulée (Mc (%)) ; B et D) des moules au cours des années 2019 (A et B) et 2020 (C et D).

### 5.3.3.2 Croissance

La croissance a été plus importante en 2019 qu'en 2020, avec des gains de croissance de 39,6% en 2019 contre 19,1% en 2020. Au cours de ces deux années, on note une homogénéité de population produite en terme de taille (Figure 53).

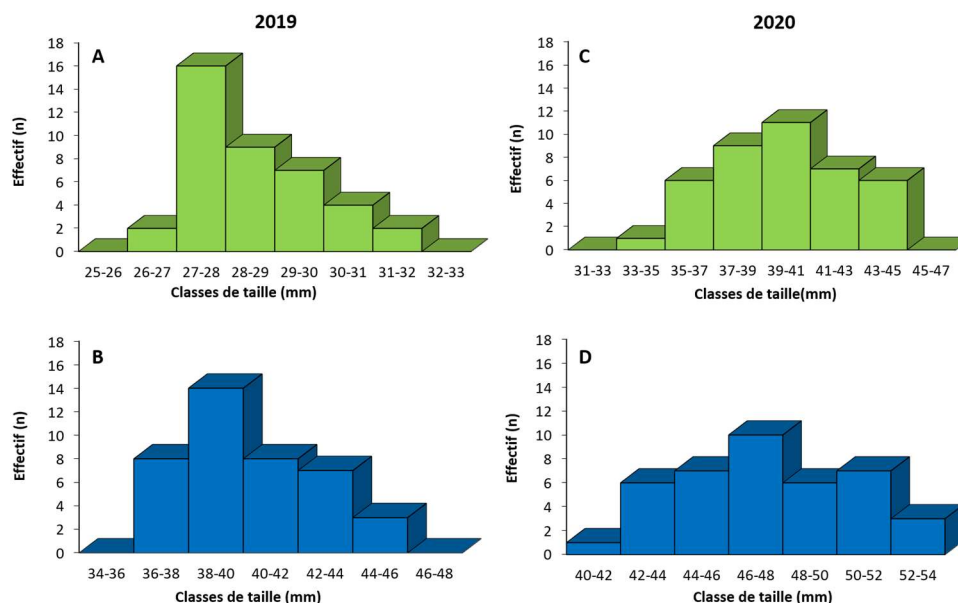


Figure 53 : Evolution de la structure de taille des moules au cours du temps entre la mise en poche (A et C) et la fin du suivi (B et D) pour l'année 2019 (A et B) et l'année 2020 (C et D).

## 5.4 Discussion

Le suivi des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* réalisé en 2019, 2020 et 2021 sur le traict de Pen Bé, met en évidence une nette différence entre ces trois années de suivi. En effet, si un bloom de *L. chlorophorum* a pu être observé sur ce site entre le 11 juillet et le 5 août 2019 avec des abondances de plus de 7 millions de cells/L, les abondances maximales n'ont pas dépassé 600 000 cells/L au cours des étés 2020 et 2021. Ces observations sont en accord avec les autres résultats obtenus sur l'ensemble de la zone d'étude du projet qui mettent en évidence des blooms de *L. chlorophorum* et des eaux colorées vertes au cours de l'été 2019 (Roux *et al.*, 2022). Ce bloom de *L. chlorophorum*, se traduit également par une forte biomasse phytoplanctonique. En effet, des concentrations en Chla élevées ont été mesurées en juillet 2019 sur le traict de Pen Bé, avec des valeurs de plus de 16 µg/L. En revanche, les concentrations en Chla sont restées inférieures à 8 µg/L sur ce site au cours des deux étés suivant.

*L. chlorophorum* est un dinoflagellé qui a la particularité de produire de grandes quantités de TEP (Claquin *et al.*, 2018 ; Roux *et al.*, 2021). Ces particules riches en carbone (Passow *et al.*, 2001 ; Claquin *et al.*, 2008) ont tendance à accélérer la sédimentation de la matière organique le long de la colonne d'eau. La reminéralisation de ces particules par les bactéries peut être à l'origine d'une chute drastique des concentrations en oxygène (Mari *et al.*, 2017). Pendant le bloom de 2019, les concentrations en TEP sont restés proches de 4 000 µg eqX/L pendant les 3 semaines du bloom. La reminéralisation de ces TEP et de la forte biomasse phytoplanctonique (Chla), peuvent avoir conduit à la diminution des concentrations en oxygène sur le site expérimental. En effet, une diminution progressive des concentrations en oxygène est observée dès la mi-juillet pour atteindre des niveaux inférieurs au seuil d'hypoxie (2,9 mg/L ; Diaz et Rosenberg, 2008) entre le 24 et le 26 juillet 2019. En comparaison, en 2020 et 2021, les concentrations en oxygène sont restées relativement stables pendant la période estivale avec des valeurs minimales ne

descendant pas en dessous de 5 mg/L d'oxygène dissous. Ainsi l'accumulation des TEP et des fortes biomasses phytoplanctoniques lors du bloom de *L. chlorophorum* de 2019, pourrait être à l'origine de l'épisode d'hypoxie enregistré à Pen Bé après le bloom. Cette diminution des conditions d'oxygénation peut avoir des conséquences sur la physiologie des bivalves.

La mortalité cumulée du naissain a été plus élevée que le 18 mois au cours des trois années d'étude. Ces épisodes de mortalité du naissain ont été observés en mai/juin pour les trois années d'observation. Ces événements sont observés régulièrement sur l'ensemble du littoral et seraient en lien avec l'augmentation de la température qui serait une source de stress pour l'huître, impactant la physiologie de l'animal en diminuant ses défenses immunitaires contre le virus OSHV-1 (Jolivel et Fleury, 2012). D'autre part, le fait de vider les poches tous les 15 jours durant cette période fragiliserait le naissain, favorisant ainsi leur état de stress (Jolivel et Fleury, 2012). Cet épisode de mortalité du naissain est commun aux trois années d'étude et se produit en amont du bloom de *L. chlorophorum*. Par ailleurs, aucune augmentation significative de la mortalité n'a été observée en 2019 suite au bloom de *L. chlorophorum*, et ce sur les deux classes d'âge étudiées.

Par ailleurs, l'hypoxie pourrait avoir eu un impact sur la croissance des huîtres en perturbant leur métabolisme énergétique. En effet, lorsque que la teneur en O<sub>2</sub> dissous diminue en dessous du seuil de 3,4 mg/L (à environ 20°C et sur une longue période), *C. gigas* aurait tendance à réduire fortement son taux de filtration et sa respiration, réduisant ainsi sa croissance (Le Moullac *et al.*, 2007). Une seconde hypothèse serait que *L. chlorophorum* ne soit pas bien assimilé par les huîtres, entraînant une perte de chair lors d'un bloom, et donc une diminution de l'indice de remplissage. Concernant la croissance cumulée, les résultats suggèrent que le bloom de *L. chlorophorum* n'aurait pas d'impact sur ce paramètre. Les huîtres croient durant cette période, que ce soit pour le naissain ou le 18 mois. Par ailleurs, bien que l'indice de remplissage des huîtres âgées de 18 mois (indice de Lawrence and Scott ; LS) montre une diminution significative juste après l'efflorescence de *L. chlorophorum* sur la zone, le mélange d'individus 2N et 3N mis en poches ne pas permis de conclure sur un potentiel effet de cette efflorescence sur la croissance de l'huître *C. gigas*. En effet, le phénomène de ponte observé chez les individus 2N peut entraîner une diminution temporaire de cet indice de remplissage, contrairement aux huîtres 3N qui sont stériles et ne pondent pas. Il n'a donc pas été possible de dissocier l'effet de la ponte et un potentiel effet lié à la présence *L. chlorophorum*. De la même manière, si une augmentation de la mortalité instantanée des moules a été observée suite au bloom de *L. chlorophorum*, les taux sont restés relativement faibles, et le bloom de 2019 n'a pas entraîné de pertes majeurs sur les zones étudiées. Nos résultats sont toutefois à nuancer.

En effet, les eaux colorées de *L. chlorophorum* peuvent recouvrir le site d'étude de façon hétérogène en formant des filaments à la surface de l'eau (Roux *et al.*, 2022). Par conséquent, *L. chlorophorum* peut avoir un impact limité spatialement. Cela pourrait expliquer pourquoi les lots suivis dans le cadre de cette étude n'ont pas subi de mortalité ni de modification sur leur croissance. D'autre part, les concentrations en oxygène n'ont été inférieures au seuil d'hypoxie que durant quelques heures entre le 24 et le 26 juillet 2019. On peut donc supposer qu'une durée d'hypoxie plus importante aurait pu plus fortement altérer le métabolisme et entraîner ainsi des mortalités plus élevées. Par ailleurs, le changement de lot en juillet 2019 suite à la crise *Haplosporidium*, ne nous permet pas de conclure de manière définitive sur l'absence d'effet des blooms de *L. chlorophorum* et des hypoxies associées, sur la survie des huîtres.

## 5.5 Conclusions et perspectives

Sur le site de Penbé, des concentrations en oxygène dissous en dessous du seuil d'hypoxie (2,9 mg L<sup>-1</sup>; Diaz and Rosenberg, 2008) ont été mesurées à la fin juillet 2019, faisant suite à une efflorescence de *L. chlorophorum*. Cependant, aucune surmortalité n'a été observée suite à cet événement. Bien que l'indice de remplissage des huîtres âgées de 18 mois (indice de Lawrence



and Scott ; LS) montre une diminution significative à cette même période, le mélange d'individus 2N et 3N mis en poches n'a pas permis de conclure sur un potentiel effet de cette efflorescence sur la croissance de l'huître *C. gigas*. Par ailleurs, le changement de lot d'huîtres au début du mois de juillet 2019, donc au début de l'efflorescence de *L. chlorophorum*, ne permet pas de conclure sur une conséquence potentielle de ces efflorescences sur la croissance ou la mortalité des huîtres creuses.

Ces 3 années de suivi n'ont donc pas permis de répondre aux objectifs initiaux du projet. Néanmoins, nous avons pu mesurer des concentrations en oxygène dissous inférieures au seuil d'hypoxie suite à l'épisode intense d'eau colorée verte observé au cours du mois de juillet 2019 qui pourraient avoir des conséquences importantes sur la physiologie des bivalves. L'expérience acquise au cours de ces trois années de suivi souligne par ailleurs l'importance de suivre des lots d'individus triploïdes (3N) afin de s'affranchir de « l'effet ponte (2N) » se produisant à la même période que les efflorescences à *L. chlorophorum* (période estivale).

Enfin, dans le but d'améliorer nos connaissances sur les effets des blooms de *L. chlorophorum* sur les bivalves cultivés, le projet CLOCLO (financement Ifremer) visait à compléter l'approche in situ, par une approche expérimentale en milieu contrôlé. L'objectif était de déterminer si les huîtres étaient capables de filtrer, d'ingérer et d'assimiler *L. chlorophorum*. Pour ce faire, des expérimentations ont été menées pour tester si une exposition à *L. chlorophorum* modifiait le comportement de filtration et l'efficacité d'assimilation de *C. gigas*. Les expérimentations ont comporté deux phases (1) une phase d'exposition des bivalves à *L. chlorophorum* seul (concentration = 10000 cell/mL, cf. blooms en milieu naturel) ; (2) une phase de « récupération » (sans *L. chlorophorum*) durant laquelle les bivalves ont été placés dans un banc écophysio-logique pour mesurer leur taux de filtration et leur efficacité d'assimilation, et comparer ces paramètres à ceux des animaux témoins non exposés à *L. chlorophorum* (Figure 54).

Les résultats de ces expérimentations font partie du chapitre 4 de la thèse de Pauline Roux (Roux, 2022) et un article est en cours de finalisation.

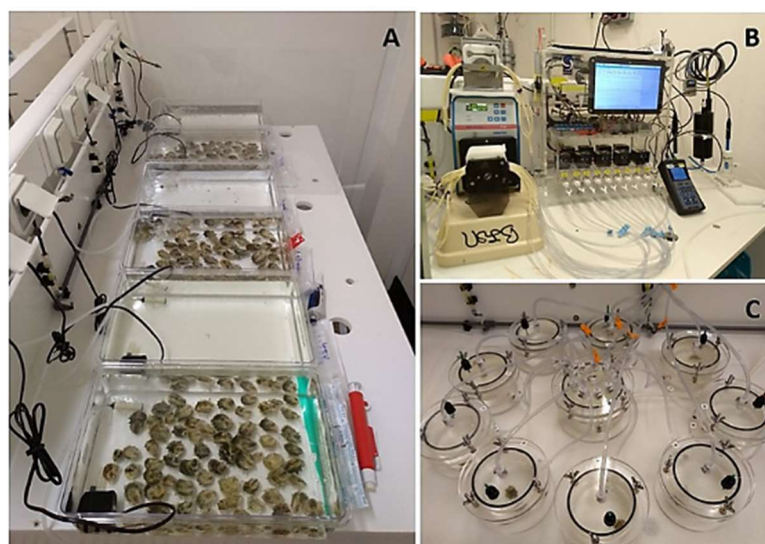


Figure 54 : Expérimentation en milieu contrôlé visant à étudier la physiologie de l'huître creuse *C. gigas* exposée à *L. chlorophorum* (Projet CloClo). (A) Phase d'exposition des huîtres. Les trois bacs sans huîtres permettent de suivre le comportement des cultures de micro-algue au cours du temps. (B) Banc écophysio-logique. (C) Enceintes individuelles.

## 6 Conclusions générales

Les résultats acquis au cours du projet Lepido-Pen ont permis d'améliorer notre connaissance de l'écologie de *L. chlorophorum*. Plus spécifiquement, les propriétés écologiques d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* ont été étudiées à travers différentes approches allant de la physiologie cellulaire de l'espèce à son impact sur l'écosystème. Ces résultats constituent la première étape vers la mise en place d'un système d'alerte.

Ces travaux ont notamment permis de montrer que :

- ✓ *L. chlorophorum* pourrait être une espèce holoplanctonique ne formant donc pas de kystes de résistance benthiques. Il pourrait se maintenir dans la colonne d'eau pendant la période défavorable (automne-hiver) (i) en faibles concentrations cellulaires, (ii) sous la forme de kystes temporaires pélagiques, ou encore (iii) sous la forme de « small cells », non contraintes par des conditions de germination spécifiques et présentant donc une capacité de prolifération accélérée lorsque les conditions redeviennent favorables.
- ✓ *L. chlorophorum* pourrait présenter une forte affinité pour l'ammonium (NH<sub>4</sub>). En effet, des corrélations positives entre les concentrations cellulaires en *L. chlorophorum* et les concentrations en NH<sub>4</sub> dans le milieu naturel ont été observées à petite- et méso-échelles. Des apports ponctuels en éléments nutritifs régénérés tels que le NH<sub>4</sub> et le PO<sub>4</sub> via (i) les fleuves, les rivières ou les rejets anthropiques (à la côte et/ou en mer); (ii) la re-suspension de sédiments ou (iii) la reminéralisation d'une efflorescence antérieure, pourraient donc favoriser le développement des efflorescences de *L. chlorophorum*.
- ✓ Les efflorescences de *L. chlorophorum* sont conditionnées par la stratification de la colonne d'eau en période estivale. Sur la zone d'étude, cette stratification pourrait être favorisée par (i) le réchauffement des eaux de surface ; (ii) les périodes de mortes-eaux ; (iii) les faibles régimes de vent. Dans ces conditions, les images satellites ont permis d'estimer que l'étendue d'une eau colorée verte pouvait atteindre 13 km<sup>2</sup>, représentant une zone à risque pour les hypoxies relativement large.
- ✓ *L. chlorophorum* est bien le principal producteur d'EPS. Il est probable que cette production représente un avantage écologique pour ce dinoflagellé en jouant un rôle de (i) protection contre les prédateurs ou (ii) contre les substances toxiques présentes dans le milieu, et (iii) en créant un microenvironnement riche en matière organique et donc propice au développement bactérien. Ces bactéries peuvent alors reminéraliser la matière organique et fournir des nutriments inorganiques régénérés permettant le maintien d'une efflorescence de *L. chlorophorum* pendant plus d'un mois. Par ailleurs, les résultats acquis mettent en évidence de profondes modifications de l'environnement physico-chimique de la colonne d'eau et suggèrent la formation de micro-habitats au sein des eaux colorées vertes, en lien étroit avec la production d'EPS. De telles modifications de l'écosystème pourraient ainsi modifier les processus écologiques à micro-échelle (e.g., relations proies-prédateurs, disponibilité des nutriments, infection virale).
- ✓ La reminéralisation de la matière organique au sein d'une eau colorée verte pourrait accentuer les phénomènes d'hypoxie. Si aucune surmortalité n'a été observée sur le terrain, des expérimentations in vitro ont suggéré que la production d'EPS par *L. chlorophorum* pourrait avoir un effet négatif sur la physiologie de l'huître creuse *C. gigas* selon plusieurs processus potentiellement combinées en milieu naturel : (i) des difficultés d'assimilation et un colmatage des branchies empêchant l'huître de se nourrir ; (ii) un affaiblissement physiologique de l'huître mal nourrie, la rendant plus sensible aux dangers

extérieurs (plastiques, pathogènes, prédation et hypoxie) ou, (iii) un effet hypoxique important.

- ✓ Enfin, les travaux réalisés dans le cadre du projet Lepido-Pen suggèrent le potentiel effet nuisible de *L. chlorophorum* pourrait être lié à sa production élevée d'EPS susceptible d'impacter le fonctionnement des écosystèmes côtiers.

## 7 Perspectives

Afin de mieux comprendre les raisons de la production accrue d'EPS par *L. chlorophorum*, des études complémentaires pourraient être menées en laboratoire et sur le terrain. Notamment, des expérimentations in vitro en condition de stress nutritif pourraient être réalisées afin d'évaluer si les cellules de *L. chlorophorum* produiraient davantage d'EPS dans ces conditions

D'autre part, l'évaluation des abondances bactériennes ainsi que l'estimation du potentiel excès de viscosité au sein d'une eau colorée verte in situ apparaissent nécessaires à la validation de l'hypothèse concernant la reminéralisation accrue au sein de cette dernière.

Des expérimentations en culture pourraient également être réalisées afin de vérifier la potentielle affinité de *L. chlorophorum* pour l'ammonium en définissant clairement les constantes d'assimilation de cet élément nutritif par ce dinoflagellé.

D'autre part, ces travaux suggèrent que, à elle seule, la stratégie d'échantillonnage réalisée dans le cadre du REPHY (points fixes, pas de temps régulier, prélèvements uniquement en surface à marée haute) ne peut pas amener les éléments nécessaires à une meilleure compréhension de la dynamique des efflorescences vertes de *L. chlorophorum* puisque ces dernières sont fugaces et très localisées. Cette stratégie pourrait être améliorée en multipliant les profondeurs d'échantillonnage de manière systématique et en proposant des campagnes spécifiques en lien avec la détection d'évènements ponctuels par images satellitaires et/ou via le projet de sciences participatives Phenomer.

En collaboration avec les conchyliculteurs de la zone, un nouveau suivi de croissance et de mortalité des huîtres creuses *C. gigas* pourrait être mis en place sur un site fréquemment impacté par des efflorescences de *L. chlorophorum*. Il serait alors judicieux d'utiliser des animaux triploïdes (3N) afin de s'affranchir du phénomène de ponte ayant lieu à la même période que les efflorescences de *L. chlorophorum* sur la zone. Ce nouveau suivi permettrait également de s'affranchir des limitations liées aux conditions de laboratoire (e.g., concentrations et volumes cellulaires disponibles, absence de turbulence et de courants de marée). Au cours de ce suivi, des prélèvements de tissus pourraient être réalisés sur les animaux avant, pendant et après une efflorescence de *L. chlorophorum* afin (i) de vérifier la production de glycoconjugués acides par les tubules digestifs de l'huître in situ et (ii) d'observer certaines lésions histologiques généralement constatées lors d'efflorescences d'autres micro-algues nuisibles.

## 8 Valorisation

Les données acquises dans le cadre du projet Lepido-Pen ont été valorisées sous forme de 4 articles scientifiques publiés dans des revues à comité de lecture (un cinquième est en préparation) et ont été (ou seront) présentées lors de 5 congrès internationaux et 6 congrès nationaux.

Ces données font partie intégrante de la thèse de doctorat de Pauline Roux soutenue au mois de juin 2022.

Par ailleurs, trois stages ont été réalisés dans le cadre de ce projet.

Enfin, différentes actions de communication ont permis de partager les résultats acquis au cours du projet Lepido-Pen avec les citoyens, au travers de la participation de l'équipe à une « web séries » et des interviews pour la radio, la télévision et la presse écrite au niveau régional et national.

Toutes les valorisations du projet Lepido-Pen sont détaillées ci-après.

### 8.1 Article scientifiques (rang A)

#### 8.1.1 Publiés

1. Roux, P., Schapira, M., Mertens, K., André, C., Terre-Terrillon, A., Schmitt, A., Manach, S., Collin, K., Serghine, J., Noel, C., Siano, R. (2023). When phytoplankton do not bloom: the case of the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* in southern Brittany (France) assessed by environmental DNA. *Progress in Oceanography* 212, 102999, <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2023.102999>.
2. Roux, P., Siano, R., Souchu, P., Collin, K., Schmitt, A., Manach, S., Retho, M., Pierre-Duplessix, O., Marchand, L., Collic-Jouault, S., Pochic, V., Zoffoli, M. L., Gernez, P. and Schapira, M. (2022). Spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of green seawater discolorations caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* along southern Brittany coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 275, 107950. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2022.107950>
3. Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Sinquin, C., Marchand, L., Zykwinska, A., Delbarre-Ladrat, C., Schapira, M. (2021). Bacteria enhance the production of extracellular polymeric substances by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Scientific Reports* 11, 4795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84253-2>
4. Mertens, K.N., Retho, M., Manach, S., Zoffoli, M.L., Gernez, P., Schapira, M., Bilien, G., Séchet, V., Lacour, T., Robert, E., Duval, A., Terre-Terrillon, A., Derrien, A. (2023). An unprecedented bloom of *Lingulodinium polyedra* on the French Atlantic coast during summer 2021. *Harmful Algae* 125, 102426, ISSN 1568-9883, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102426>.

#### 8.1.2 En préparation

1. Roux, P., Corona, J., Ragueneau, S., Schapira, M., Siano, R., Pernet, F., Queau, I., Malestroit, P., Tallec, K., Fleury, E. Ecophysiological response of the cupped oyster *Crassostrea gigas* exposed to the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *En preparation*.

## 8.2 Conférences

### 8.2.1 Internationales

1. Roux, P., Siano, R., Souchu, P., Collin, K., Schmitt, A., Manach, S., Retho, M., Pierre-Duplessix, O., Marchand, L., Collic-Jouault, S., Pochic, V., Zoffoli, M. L., Gernez, P. and Schapira, M. (2023). From cells to satellite: spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of green seawater discolorations in French Brittany. *ASLO Aquatic Sciences Meeting 2023: Resilience and recovery in Aquatic Systems*. 4-9 Juin 2023, Palma de Mallorca, Espagne. *Présentation orale* (accepté).
2. Roux, P., Schapira, M., Fleury, E., Siano, R. (2022). Ecological properties of the green seawater discoloration forming dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*: from cellular ecophysiology to ecosystem impacts. *International Conference on modern and fossil dinoflagellates (DINO12)*. 4-8 Juillet 2022, Las Palmas de Gran Canaria, Espagne. *Présentation orale*.
3. Roux, P., Schapira, M., Fleury, E., Siano, R. (2022). Ecological properties of *Lepidodinium chlorophorum* blooms: from cellular ecophysiology to ecosystem impacts. *Jacques Monod Conference (CJM4-2022)*. 5-9 Septembre 2022, Roscoff, France. *Poster*.
4. Roux, P., Schapira, M., Fleury, E., Siano, R. (2021). The harmful effect of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*: from water discolorations to impact on cultivated bivalves. *International Conference on Harmful Algae (ICHA)*. 10-15 Octobre 2021, La Paz, Mexico (Virtual meeting). *Poster*.
5. Roux, P., Siano, R., Fleury, E., Mertens, K., N., André, C., Cochenne Laureau, N., Schapira, M. (2019). Dynamics of the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* in Southern Brittany: controlling factors and consequences for exploited ecosystems. *Oceanext*. 3-5 Juillet 2019, Nantes, France. *Poster et speed talk*.

### 8.2.2 Nationales

1. Roux, P., Schapira, M., Mertens, K.N., André, C., Terre-Terrillon, A., Schmitt, A., Manach, S., Colin, K., Serghine, J. Noel, C. Siano, R. (2022). Bloom initiation dynamics of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* assessed by environmental DNA. *Colloque GdR Phycotox*. 31 May – 1 Juin 2022, Plouzané, France. *Présentation orale*.
2. Ragueneau, S., Roux, P., Queau, I., Malestroit, P., Siano, R., Schapira, M., Fleury, E. (2021). Ecophysiology of the cupped oyster *Crassostrea gigas* exposed to the green algae *Lepidodinium chlorophorum*. *Colloque d'Ecophysologie Animale (CEPA)*. 2-4 Novembre 2021, Montpellier, France. *Présentation orale*.
3. Zoffoli, L., Gernez, P., Pochic, V., Roux, P., Siano, R., Schmitt, A., Retho, M., Pierre-Duplessix, O., Schapira, M. (2021). Evaluating synergy between in situ and satellite observations to observe phytoplankton blooms. *Colloque ILICO/EVOLECO*. 2-5 Novembre 2021, La Rochelle, France. *Présentation orale*.
4. Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Sinquin, C., Marchand, L., Zykwincka, A., Delbarre-Ladrat, C., Schapira, M. (2020). Bacteria enhance the production of extracellular polymeric matrix by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Colloque GdR Phycotox*. 4-6 Novembre 2020 (Virtual meeting). *Présentation orale*.



5. Roux, P., Curd, A., Antoine, V., Chapelle, A., Le Gac-Abernot, C., Schapira, M., Siano, R. (2019). PHENOMER : Mieux connaître la phénologie des microalgues grâce aux observations des citoyens. *Colloque Les Sciences Marines pour Tous*. 6 Juin 2019, Paris, France. *Présentation orale*.
6. Roux, P., Siano, R., Fleury, E., Mertens, K., N., André, C., Cochennec Laureau, N., Schapira, M. (2019). Dynamics of the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* in Southern Brittany: controlling factors and consequences for exploited ecosystems. *Colloque GdR Phycotox*. 14-17 Mai 2019, Plouzané, France. *Présentation orale*.

### 8.3 Thèse de doctorat

1. Roux, P. (2022) Propriétés écologiques des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* : de l'écophysiologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème. *Thèse de doctorat*, Sciences de la Mer et du Littoral – Ecologie marine - Nantes Université. 330 pp. <https://www.theses.fr/2022NANU4026>

### 8.4 Rapports de stage

1. Giraud, C. (2021) Etude de l'impact des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* sur la croissance et la mortalité des huitres creuses (*Crassostrea gigas*). *Stage de fin d'étude Intechmer*. 49 pp.
2. Ragueneau, S. (2021) Ecophysiologie de l'huitre creuse *Crassostrea gigas* exposée à la microalgue *Lepidodinium chlorophorum*. *Stage de Master 2*, Université du Littoral Côte d'Opale, Mention Sciences de la Mer, Parcours Ecologie Marine et Halieutique (EMaH). 38 pp.
3. Grenet, T. (2020) Etude de la capacité du consortium bactérien associé au dinoflagellé *Lepidodinium chlorophorum* à produire des exo-polysaccharides. *Stage 2<sup>ième</sup> année de BTS Biotechnologie*, Lycée Talensac, Nantes. 16 pp.

### 8.5 Vulgarisation scientifiques

#### 8.5.1 Articles de presse écrite / web

1. Pelletier, S. (2022) Eaux vertes : un accusé étudié. *Cultures Marines*, N°361, novembre 2022.
2. Roux, P., Schapira, M. Gallé, J. (2021) Cette micro-algue qui se cache derrière les eaux colorées vertes de Bretagne Sud ». *The conversation*, 10 janvier 2021. <https://theconversation.com/cette-micro-algue-qui-se-cache-derriere-les-eaux-colorees-vertes-de-bretagne-sud-149749>.
3. *Le Parisien*, 27/07/2021 « Quand la mer vire au vert »
4. *Aujourd'hui en France*, 27/07/2021 - « Pourquoi l'eau devient verte. Aidez les scientifiques d'IFREMER en partageant vos observations. La couleur de la mer les intéresse ».
5. *Francetvinfo.fr*, 20/07/2021 – « Sciences : quand la mer se colore en vert fluo »

6. *Presse Océan Nantes Métropole, Nord et Sud*, 22/07/2021 – « Une algue étouffe les huîtres du littoral atlantique ».
7. *Ouest France*, 24/07/2021 - « Être acteur estival du programme Phenomer ».
8. *Ouest France*, 17/07/2021 – « Pourquoi la mer change-t-elle de couleur ? ».
9. *Le Télégramme Auray*, 28/07/2021 – « La teinte vert vif de la mer inquiète les scientifiques ».
10. *Ouest France Ancenis*, 21/07/2021 – « Des algues vert fluo prolifèrent en Bretagne ».
11. *cnews.fr*, 29/07/2021 – « Pourquoi l'eau de mer vire parfois au vert fluo en Loire-Atlantique et dans le Morbihan ».
12. *Lexpress.fr*, 29/07/2021 – « Environnement Des algues vert fluo prolifèrent en Bretagne ».
13. *jnews-france.fr*, 29/07/2021 – « Océan vert fluo en Bretagne et en Vendée: quelle est cette micro-algue qui intrigue les chercheurs? »
14. *bfmtv.com*, 28/07/2021 – « Une micro-algue colore la mer en vert fluo : les scientifiques appellent la population à leur signaler ce phénomène ».
15. *Orange.fr*, 31/07/2021 – « Pourquoi l'eau de mer vire parfois au vert fluo en Loire-Atlantique et dans le Morbihan »
16. *Msn (France)*, 29/07/2021 – « Verte, rouge ou brillante : pourquoi la mer change-t-elle de couleur en Bretagne ? »
17. *letelegramme.fr*, 27/07/2021 – « Quand la mer vire au vert fluo : l'étrange phénomène qui inquiète les scientifiques »
18. *Msn (France)*, 27/07/2021 – « La prolifération d'une micro-algue, le *Lepidodinium chlorophorum*, sur le littoral atlantique inquiète les scientifiques »
19. *atlantico.fr*, 27/07/2021 – « Ce phénomène qui rend l'eau du littoral atlantique verte inquiète les scientifiques ».
20. *Msn (France)*, 27/07/2021 – « Quand la mer vire au vert fluo : l'étrange phénomène qui inquiète les scientifiques ».
21. *LeParisien.fr*, 27/07/2021 – « Pourquoi l'eau de mer est vert fluo en Loire-Atlantique et dans le Morbihan ? ».
22. *pleinevie.fr*, 22/07/2021 – « Pourquoi la mer devient-elle vert vif sur le littoral Atlantique et inquiète les scientifiques ? ».
23. *Ouest-france.fr*, 20/07/2021 – « Loire-Atlantique et Morbihan. Quand la mer se colore en vert fluo ».

24. *PresseOcean.fr*, 20/07/2021 – « Eaux colorées sur le littoral : aidez les chercheurs dans leur enquête ».
25. *Actu-Environnement.com*, 20/07/2021 – « Bretagne et Loire-Atlantique : L'eau de mer est vert fluo ? Prenez une photo et faites avancer la science ».
26. *20Minutes.fr*, 20/07/2021 – « Appel à la mobilisation citoyenne pour mieux comprendre l'impact des eaux colorées vertes du littoral ».
27. *agglotv.com*, 20/07/2021 – « Cette micro-algue qui se cache derrière les eaux colorées vertes de Bretagne Sud ».

#### 8.5.2 Interviews télévision et radio

1. Web-series: « La Solitaire du Figaro - Ils vivent la mer autrement : portrait de Pauline Roux (Ifremer) » <https://www.youtube.com/watch?v=3Srflds5Bl8>. Département de la Loire-Atlantique. Juillet 2021.
2. Web-series: « Thèsez-vous ? » <https://www.youtube.com/watch?v=gym8e5uXR-w>. Ifremer. Juin 2021.
3. *CNEWS* – La matinale, 29/07/2021
4. *FRANCE 3 BRETAGNE* - 12/14 h, 21/07/2021
5. *FRANCE INTER* - Journal 08h00, 28/07/2021
6. *RMC INFO* - Appoline Matin, 28/07/2021

## 9 Références

- Allredge, A.L., and Gotschalk, C.C. (1989) Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Research* 36(2), 159-171. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(89\)90131-3](https://doi.org/10.1016/0198-0149(89)90131-3)
- Allredge, A.L., Passow, U., and Logan, B.E. (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research* 40(6), 1131-1140. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(93\)90129-Q](https://doi.org/10.1016/0967-0637(93)90129-Q)
- Aminot, A., and K erouel, R. (2004) *Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses*. Ed. Ifremer, France. 336 pp. ISBN 2-84433-133-5 [In French]
- Aminot, A., and K erouel, R. (2007) *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu*. Ed. Ifremer, France. 188 pp. ISBN-13 978-2-7592-0023-8 [In French]
- Azam, F., and Smith, D.C. (1991) Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view. In: *Particle Analysis in Oceanography*. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg. NATO Advanced Science Institutes Series 27, pp. 213-236. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-75121-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-75121-9_9)
- Belin, C., and Soudant, D. (2018) Trente années d'observation des microalgues et des toxines d'algues sur le littoral. Ed. QUAE, France. 261 pp. 978275922942 ISSN [In French]
- Belin, C., Soudant, D., and Amzil, Z. (2021) Three decades of data on phytoplankton and phycotoxins on the French coast: Lessons from REPHY and REPHYTOX. *Harmful Algae* 102, 101733. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101733>
- Benedetti, F., Jalabert, L., Sourisseau, M., Beker, B., Cailliau, C., Desnos, C., et al. (2019) The seasonal and inter-annual fluctuations of plankton abundance and community structure in a North Atlantic Marine Protected Area. *Frontiers in Marine Science* 6(214), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00214>
- Bhaskar, P.V., and Bhosle, N.B (2005) Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science* 88(1), 45-53. <https://www.jstor.org/stable/24110092>
- Bittar, T.B., Passow, U., Hamaraty, L., Bidle, K.D., and Harvey, E.L. (2018) An updated method for the calibration of transparent exopolymer particle measurements. *Limnology and Oceanography Methods* 16(10), 621-628. <https://doi.org/10.1002/lom3.10268>
- Blott, S.J., and Pye, K. (2001) Gradistat: A grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surface Processes and Landforms* 26(11), 1237-1248. <https://doi.org/10.1002/esp.261>
- Boere, A.C., Sinninghe D.J.S., Rijpstra, W.I.C., Volkman, J.K., and Coolen, M.J.L. (2011) Source-specific variability in post-depositional DNA preservation with potential implications for DNA based paleoecological records. *Organic Geochemistry* 42(10), 1216-1225. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.08.005>
- Bowman, L.P. (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* 5(4), 220-241. <https://doi.org/10.3390/md504220>
- Bravo, I., and Figueroa, R.I. (2014) Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms* 2(1), 11-32. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2010011>
- Bressler, S.L., and Ahmed, S.I. (1984) Detection of glutamin  synthetase activity in marine phytoplankton: optimization of the biosynthetic assay. *Marine Ecology Progress Series* 14(2-3), 207-217. <https://www.jstor.org/stable/44634730>

- Brosnahan, M.L., Fischer, A.D., Lopez, C.B., Moore, S.K., and Anderson, D.M. (2020) Cyst-forming dinoflagellates in a warming climate. *Harmful Algae* 91, 101728. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101728>
- Burns, W.G., Marchetti, A., and Ziervogel, K. (2019) Enhanced formation of transparent exopolymer particles (TEP) under turbulence during phytoplankton growth. *Journal of Plankton Research* 41(3), 349-361. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbz018>
- Chapelle, A., Lazure, P., and Ménesguen, A. (1994) Modelling Eutrophication Events in a Coastal Ecosystem. Sensitivity Analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 39(6), 529–548. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(06\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(06)80008-9)
- Chapelle, A., Ménesguen, A., Deslous-Paoli, J.M., Souchu, P., Mazouni, N., Vaquer, A., and Millet, B. (2000) Modelling nitrogen, primary production and oxygen in a Mediterranean lagoon. Impact of oysters farming and inputs from the watershed. *Ecological Modelling* 127(2–3), 161–181. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(99\)00206-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(99)00206-9)
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., and Veron, B. (2008) Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology* 51(1), 1–11. <https://doi.org/10.3354/ame01187>
- Cloern, J.E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210, 223 –253. <https://doi.org/10.3354/meps210223>
- Cochennec-Laureau, N., Schapira, M., Bouget, J.-F., Manach, S., Retho, M., Le Merrer, Y., et al. (2018) Expertise sur le contexte hydro-climatologique de la Baie de Pénestin pour décrire les conditions physico-chimiques environnementales et l'impact possible sur les mortalités de moules. DDTM 56 – Direction Départementale des territoires et de la mer du Morbihan, Délégation Mer et Littoral (DML), Pôle gestion de l'espace littoral et maritime, service aménagements mer et littoral (SAMEL), Unité Cultures Marine., Ref. LER/MPL/18.54/Tm – courrier du 31/07/2018, 37 pp. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00457/56879/> [In French]
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., and Moraga, D. (2005) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *The FEBS Journal* 272(21), 5635–5652. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x>
- De Jonge, V.N., Elliot, M. and Orive, E. (2002) Causes, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem: eutrophication. *Hydrobiologia* 475/476, 1-19.
- Deng, L., Cheung, S., and Liu, H. (2020) Protistal Grazers Increase Grazing on Unicellular Cyanobacteria Diazotroph at Night. *Frontiers in Marine Science* 7, 135. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00135>
- Díaz, R.J., and Rosenberg, R. (2008) Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science* 321(5891), 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Dubray, G., and Bezar, G. (1982) A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 119(2), 325-329. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90593-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90593-0)
- Ekelund, N.G.A., and Aronsson, K.A. (2007) Changes in chlorophyll a fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. *Environmental and Experimental Botany* 59(1), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.004>
- Elbrächter, M., and Schnepf, E. (1996) *Gymnodinium chlorophorum*, a new, green, bloom-forming dinoflagellate (Gymnodiniales, Dinophyceae) with a vestigial prasinophyte endosymbiont. *Phycologia* 35(5), 381-393. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-5-381.1>
- Fitzsimons, M.F., Millward, G.E., Revitt, D.M., and Dawit, M.D. (2006). Desorption kinetics of ammonium and methylamines from estuarine sediments: Consequences for the cycling of nitrogen. *Marine Chemistry* 101(1–2), 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.12.006>

- Fukao, T., Kimoto, K., and Kotani, Y. (2010) Production of transparent exopolymer particles by four diatom species. *Fisheries Science* 76, 755-760. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0265-z>
- Gárate-Lizárraga, I., Muñetón-Gómez, M.S., Pérez-Cruz, B., and Díaz-Ortiz, J.A. (2014) Bloom of *Gonyaulax spinifera* (Dinophyceae: Gonyaulacales) in ensenada de la Paz Lagoon, Gulf of California. *CICIMAR Oceanides* 29(1), 11-18. <http://dx.doi.org/10.37543/oceanides.v29i1.130>
- Gärdes, A., Iversen, M.H., Grossart, H.P., Passow, U., and Ullrich, M.S. (2011) Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME Journal* 5, 436-445. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.145>
- Gavalás-Olea, A., Álvarez, S., Riobó, P., Rodríguez, F., Garrido, J.L., and Vaz, B. (2016) 19,19'-Diacyloxy Signature: An Atypical Level of Structural Evolution in Carotenoid Pigments. *Organic Letters* 18(18), 4642-4645. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02272>
- Georges, O., Fernández, S., Martínez, J.L., and Garcia-Vazquez, E. (2021) DNA metabarcoding illustrates biological pollution threats of Red Sea - Dead Sea water conveyance to Dead Sea biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* 168, 112451. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112451>
- Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Chavarria, J., and Niell, F.X. (2001) Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis*. *Photosynthesis Research* 68, 225-235. <https://doi.org/10.1023/a:1012969324756>
- Gribsholt, B., Boschker, H.T.S., Struyf, E., Andersson, M., Tramper, A., De Brabandere, L., et al. (2005) Nitrogen processing in a tidal freshwater marsh: A whole-ecosystem <sup>15</sup>N labelling study. *Limnology and Oceanography* 50(6), 1945–1959. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.6.1945>
- Grossart, H.P. (1999) Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology* 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.3354/ame019001>
- Guillard, R.R.L., and Hargraves, P.E. (1993) *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32(3), 234-236. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1>
- Hansen, D.V., and Rattray, M. (1966) New dimensions in estuary classification. *Limnology and Oceanography* 11(3), 319–326. <https://www.jstor.org/stable/2833361>
- Hansen, G., Botes, L., and de Salas, M. (2007) Ultrastructure and large subunit rDNA sequences of *Lepidodinium viride* reveal a close relationship to *Lepidodinium chlorophorum* comb. nov. (= *Gymnodinium chlorophorum*). *Phycological Research* 55(1), 25–41. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00442.x>
- Hansen, G., and Moestrup, Ø. (2005) Flagellar apparatus and nuclear chambers of the green dinoflagellate *Gymnodinium chlorophorum*. *Phycological Research* 53(2), 169–181. <https://doi.org/10.1111/j.1440-183.2005.00383.x>
- Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., and Shigeta, S. (1995) In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *International Journal of Biological Macromolecules* 17(5), 293-297. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)98157-T](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)98157-T)
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., et al. (2008) Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>
- Honsell, G., and Talarico, L. (2004) *Gymnodinium chlorophorum* (Dinophyceae) in the Adriatic Sea: Electron microscopical observations. *Botanica Marina* 47(2), 152–166. <https://doi.org/10.1515/BOT.2004.016>
- Honsell, G., Talarico, L., and Cabrini, M. (1988) Interesting ultrastructural features of a green dinoflagellate. *Giornale Botanico Italiano* 122(1-2), 76–78



- Illoul, H., Masó, M., Fortuño, J.-M., Cros, L., Morales-Blake, A., and Séridji, R. (2008) Potentially harmful microalgae in coastal waters of the Algiers area (Southern Mediterranean Sea). *Cryptogamie Algologie* 29(3), 261–278.
- Iriarte, J.L., Quiñones, R.A., and González, R.R. (2005) Relationship between biomass and enzymatic activity of a bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) in southern Chile (41° S): a field approach. *Journal of Plankton Research* 27(2), 159–166. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh167>
- Iuculano, F., Mazuecos, I.P., Reche, I. and Agusti, S. (2017) *Prochlorococcus* as a possible source for transparent exopolymer particles (TEP). *Frontiers in Microbiology* 8, 709. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00709>
- Jackson, C., Knoll, A.H., Chan, C.X., and Verbruggen, H. (2018) Plastid phylogenomics with broad taxon sampling further elucidates the distinct evolutionary origins and timing of secondary green plastids. *Scientific Reports* 8, 1523. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18805-w>
- Jenkinson, I.R. (1986) Oceanographic implications of non-newtonian properties found in phytoplankton cultures. *Nature* 323, 435-437. <https://doi.org/10.1038/323435a0>
- Jolivel A, Fleury E. (2012) Analyse statistique des données de mortalité d’huîtres acquises par l’Observatoire National Conchylicole (RESCO). <https://archimer.ifremer.fr/doc/00130/24095/>
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G., and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochemical Journal* 151(3), 491-495. <https://doi.org/10.1042/bj1510491>
- Kamikawa, R., Tanifuji, G., Kawachi, M., Miyashita, H., Hashimoto, T., and Inagaki, Y. (2015) Plastid genome-based phylogeny pinpointed the origin of the green-colored plastid in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Genome Biology and Evolution* 7(4), 1133–1140. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv060>
- Kang, C.K., Lee, Y.W., Choy, E.J., Shin, J.K., Seo, I.S., and Hong, J.S. (2006) Microphytobenthos seasonality determines growth and reproduction in interannual bivalves. *Marine Ecology Progress Series* 315, 113–127. <https://doi.org/10.3354/meps315113>
- Karasiewicz, S., Chapelle, A., Bacher, C., and Soudant, D. (2020) Harmful algae niche responses to environmental and community variation along the French coast. *Harmful Algae* 93, 101785. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101785>
- Karlson, B., Andersen, P., Arneborg, L., Cembella, A., Eikrem, W., John, U., et al. (2021) Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae* 102, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101989>
- Kesaulya, I., Leterme, S.C., Mitchell, J.G., and Seuront, L. (2008) The impact of turbulence and phytoplankton dynamics on foam formation, seawater viscosity and chlorophyll concentration in the eastern English Channel. *Oceanologia* 50, 167-182
- Khokhar, F.N., Ahmed, N., Ali, A., Gabol, K., Khooharo, A.R., Faheem, M., et al. (2021) Distribution and abundance of dinoflagellates from the coastal waters of karachi, pakistan, northern part of the arabian sea. *Brazilian Journal of Biology* 82, e245124. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.245124>
- Kiørboe, T., and Hansen, J.L.S. (1993) Phytoplankton aggregate formation: observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *Journal of Plankton Research* 15(9), 993–1018. <https://doi.org/10.1093/plankt/15.9.993>
- Kirn, S.L., Townsend, D.W., and Pettigrew, N.R. (2005) Suspended *Alexandrium* spp. hypnozygote cysts in the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research* 52(19-21), 2543–2559. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.06.009>

- Kromkamp, J.C., and Forster, R.M. (2003) The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology* 38(2), 103-112. <https://doi.org/10.1080/0967026031000094094>
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. <http://doi.org/10.1038/227680a0>
- Larsen, P.S., and Riisgård, H.U. (2009) Viscosity and not biological mechanisms often controls the effects of temperature on ciliary activity and swimming velocity of small aquatic organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 381(2), 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.09.021>
- Le Moullac, G., Quéau, I., Le Souchu, P., Pouvreau, S., Moal, J., Coz, J.R., and Samain, J.F. (2007) Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research* 3(5), 357-366. <https://doi.org/10.1080/17451000701635128>
- Lewis, J. (1988) Cysts and sediments: *Gonyaulax Polyedra (Lingulodinium machaerophorum)* in Loch Creran. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 68(4), 701-714. <https://doi.org/10.1017/S0025315400028812>
- Liu, K., Ng, H.Y.T., Zhang, S., and Liu, H. (2021) Effects of temperature on a mixotrophic dinoflagellate (*Lepidodinium* sp.) under different nutritional strategies. *Marine Ecology Progress Series* 678, 37-49. <https://doi.org/10.3354/meps13865>
- Liu, Y., Zhang, J., Zhao, L., Li, Y., Dai, Y., and Xie, S. (2015). Distribution of sediment ammonia-oxidizing microorganisms in plateau freshwater lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 4435-4444. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6341-z>
- Lovejoy, C., Bowman, J.P., and Hallegraeff, G.M. (1998) Algicidal effects of a novel marine *Pseudomonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium* and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8), 2806-2813. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.2806-2813.1998>
- Microbiology and Biotechnology* 100, 5131-5139. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7352-8>
- Mandal, S.K., Singh, R.P., and Patel, V. (2011) Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Secreted by a Toxic Dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulbert 1957 and Its Probable Role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microbial Ecology* 62, 518-527. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9852-5>
- Mari, X., and Burd, A. (1998) Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Marine Ecology Progress Series* 163, 63-76. <https://doi.org/10.3354/meps163063>
- Mari, X., Passow, U., Migon, C., Burd, A. B., and Legendre, L. (2017) Transparent exopolymer particles: Effects on carbon cycling in the ocean. *Progress in Oceanography* 151, 13-37. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2016.11.002>
- Matsumoto, T., Kawachi, M., Miyashita, H., and Inagaki, Y. (2012) Prasinolanthin is absent in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* strain NIES-1868: Pigment composition and 18S rRNA phylogeny. *Journal of Plant Research* 125, 705-711. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0486-6>
- Matsumoto, T., Shinozaki, F., Chikuni, T., Yabuki, A., Takishita, K., Kawachi, M., et al. (2011) Green-colored Plastids in the Dinoflagellate Genus *Lepidodinium* are of Core Chlorophyte Origin. *Protist* 162(2), 268-276. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.07.001>
- McCarthy, P.M. (2013) Census of Australian Marine Dinoflagellates. Australian Biological Resources Study, Canberra. [http://www.anbg.gov.au/abrs/Dinoflagellates/index\\_Dino.html](http://www.anbg.gov.au/abrs/Dinoflagellates/index_Dino.html). Accessed 8 March 2022

- Merceron, M. (1987) Mortalités de poissons en baie de Vilaine (Juillet 1982) Causes-Mécanismes-Propositions d'action. Ed. Ifremer, France. 163 pp. [In French]
- Minge, M.A., Shalchian-Tabrizi, K., Tørresen, O.K., Takishita, K., Probert, I., Inagaki, Y., et al. (2010) A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *BMC Evolutionary Biology* 10, 191. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-191>
- Mitra, A., Flynn, K.J., Maselli, M., Hansen, P.J., Gypens, N., Martin, J.L., et al. (2021) Seasonal Distribution Of Non-Constitutive Mixoplankton Across Arctic, Temperate and Mediterranean Coastal Waters. Zenodo. 50 pp. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5993620>
- Morelle, J. (2017) Dynamique spatiale et temporelle de la production primaire dans l'estuaire de Seine. Biodiversité. Normandie Université. PhD Thesis [In French]. NNT : 2017NORMC252. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01729055>
- Morin, J., and Morse, J.W. (1999) Ammonium release from resuspended sediments in the Laguna Madre estuary. *Marine Chemistry* 65(1–2), 97–110. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00013-4)
- Morse, J.W., and Morin, J. (2005) Ammonium interaction with coastal marine sediments: Influence of redox conditions on K\*. *Marine Chemistry* 95(1–2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.08.008>
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., and Claquin, P. (2014) Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the english channel. *Marine Ecology Progress Series* 505, 49–64. <https://doi.org/10.3354/meps10772>
- Nixon S.W. (1995) Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41(1), 199–219. <https://doi.org/10.1080/00785236.1995.10422044>
- Nosaka, Y., Yamashita, Y., and Suzuki, K. (2017) Dynamics and origin of transparent exopolymer particles in the Oyashio region of the Western Subarctic Pacific during the spring diatom bloom. *Frontiers in Marine Science* 4, 79. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00079>
- Nunn, G.B., Theisen, B.F., Christensen, B., and Arctander, P. (1996) Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order *Isopoda*. *Journal of Molecular Evolution* 42, 211–223. <https://doi.org/10.1007/BF02198847>
- Ospina-Alvarez, N., Caetano, M., Vale, C., Santos-Echeandía, J., Bernárdez, P., and Prego, R. (2014) Exchange of nutrients across the sediment-water interface in intertidal ria systems (SW Europe). *Journal of Sea Research* 85, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.002>
- Passow, U. (2002) Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography* 55(3-4), 287–333. [https://doi.org/10.1016/S0079-6611\(02\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6611(02)00138-6)
- Passow U., and Alldredge A.L. (1995) A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography* 40(7), 1326–1335. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1326>
- Passow, U., Shipe, R.F., Murray, A., Pak, D.K., Brzezinski, M.A., and Alldredge, A.L. (2001) The origin of transparent exopolymer particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Continental Shelf Research* 21(4), 327–346. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00101-1)
- Pawlowski, J., Bruce, K., Panksep, K., Aguirre, F.I., Amalfitano, S., Apothéoz-Perret-Gentil, L., et al. (2021) Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. *Science in Total Environment* 818, 151783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151783>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G., and Nannipieri, P. (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils* 45, 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>

- Pinay, G., Gascuel, C., Menesguen, A., Souchon, Y., Le Moal, M., Levain, A., et al. (2017) Eutrophisation : Manifestations, causes, conséquences et prédictibilité. Ed. CNRS - Ifremer - INRA – Irstea, France. 148 pp. [In French]
- Ratmaya, W., Laverman, A.M., Rabouille, C., Akbarzadeh, Z., Andrieux-Loyer, F., Barillé, L., et al. (2022) Temporal and spatial variations in benthic nitrogen cycling in a temperate macro-tidal coastal ecosystem: Observation and modeling. *Continental Shelf Research* 235, 104649. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2022.104649>
- Ratmaya, W., Soudant, D., Salmon-Monviola, J., Plus, M., Cochennec-Laureau, N., Goubert, E., et al. (2019) Reduced phosphorus loads from the Loire and Vilaine rivers were accompanied by increasing eutrophication in the Vilaine Bay (south Brittany, France). *Biogeosciences*. 16(6), 1361–1380. <https://doi.org/10.5194/bg-16-1361-2019>
- [dataset] REPHY - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters (2021) REPHY dataset - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters. Metropolitan data. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/47248>
- [dataset] Retho, M., Quemener, L., Le Gall, C., Repecaud, M., Souchu, P., Gabellec, R., and Manach S. (2020) MOLIT Vilaine data and metadata from Coriolis Data Centre. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/46529>
- Rigouin, C., Delbarre Ladrat, C., Siquin, C., Collic-Jouault, S., and Dion, M. (2009) Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 76(2), 279-284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.022>
- Riisgård, H. (1988) Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of Northeast American bivalves. *Marine Ecology Progress Series* 45, 217–223. <https://doi.org/10.3354/meps045217>
- Roux, P. (2022) Propriétés écologiques des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* : de l'écophysologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème. Thèse de doctorat, Nantes Université, <http://www.theses.fr/2022NANU4026>.
- Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Siquin, C., Marchand, L., et al. (2021) Bacteria enhance the production of extracellular polymeric substances by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Scientific Reports* 11, 4795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84253-2>
- Roux, P., Siano, R., Souchu, P., Collin, K., Schmitt, A., Manach, S., et al. (2022) Spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of Green Seawater Discolorations caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (submitted)
- Roux, P., Schapira, M., Mertens, K., André, C., Terre-Terrillon, A., Schmitt, A., Manach, S., Collin, K., Serghine, J., Noel, C., Siano, R. (2023) When phytoplankton do not bloom: the case of the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* in southern Brittany (France) assessed by environmental DNA. *Progress in Oceanography* 212, 102999, <https://doi.org/10.1016/j.pcean.2023.102999>.
- Sampedro, N., Fraga, S., Penna, A., Casabianca, S., Zapata, M., Grunewald, C.F., et al. (2011) *Barrufeta bravensis* gen. Nov. Sp. Nov. (dinophyceae): A new bloom-forming species from the northwest Mediterranean sea. *Journal of Phycology* 47(2), 375–392. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00968.x>
- Schapira, M., McQuaid, C.D., and Froneman, P.W. (2012a) Metabolism of free-living and particle-associated prokaryotes: Consequences for carbon flux around a Southern Ocean archipelago. *Journal of Marine Systems* 90(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2011.08.009>
- Schapira, M., McQuaid, C.D., and Froneman, P.W. (2012b) Free-living and particle-associated prokaryote metabolism in giant kelp forests: Implications for carbon flux in a sub-Antarctic

- coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 106, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.04.031>
- Schapira, M., Roux, P., André, C., Mertens, K.N., Bilien, G., Terret-Terrillon, A., et al. (2021) Les efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine: Déterminisme et conséquences sur la qualité des masses d'eau côtières. Projet EPICE – Rapport final. Ed. Ifremer, France. 46 pp. [In French] <https://archimer.ifremer.fr/doc/00724/83598/>
- Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M., and Anderson, D.M. (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* 30(6), 999-1011. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x>
- Schuster, S., and Herndl, G.J. (1995) Formation and significance of transparent exopolymeric particles in the northern Adriatic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 124, 227-236. <https://doi.org/10.3354/meps124227>
- Serre-Fredj, L., Jacqueline, F., Navon, M., Izabel, G., Chasselin, L., Jolly, O., et al. (2021) Coupling high frequency monitoring and bioassay experiments to investigate a harmful algal bloom in the Bay of Seine (French-English Channel). *Marine Pollution Bulletin* 168, 112387. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112387>
- Seuront, L., Lacheze, C., Doubell, M.J.J., Seymour, J.R., Van Dongen-Vogels, V., Newton, K., et al. (2007) The influence of *Phaeocystis globosa* on microscale spatial patterns of chlorophylla and bulk-phase seawater viscosity. *Biogeochemistry* 83, 173-188. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9097-z>
- Seuront L., and Vincent, D. (2008) Increased seawater viscosity, *Phaeocystis globosa* spring bloom and *Temora longicornis* feeding and swimming behaviours. *Marine Ecology Progress Series* 363, 131-145. <https://doi.org/10.3354/meps07373>
- Siano, R., Chapelle, A., Antoine, V., Michel-Guillou, E., Rigaut-Jalabert, F., Guillou, L., et al. (2020) Citizen participation in monitoring phytoplankton seawater discolorations. *Marine Policy* 117, 103039. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.01.022>
- Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Montresor, M., and Zingone, A. (2009) Unarmoured and thin-walled dinoflagellates from the Gulf of Naples, with the description of *Woloszynskia cincta* sp. nov. (Dinophyceae, Suessiales). *Phycologia* 48(1), 44–65. <https://doi.org/10.2216/08-61.1>
- Smayda, T.J. (2002a) Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks.” *Harmful Algae* 1(1), 95–112. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00010-0)
- Smith, D.C., Steward, G.F., Long, R.A., and Azam, F. (1995) Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Research* 42(1), 75-97. [https://doi.org/10.1016/0967-0645\(95\)00005-B](https://doi.org/10.1016/0967-0645(95)00005-B)
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *PNAS* 103(32), 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Souchu, P., Cochenec-Laureau, N., Ratmaya, W., Retho, M., Andrieux-Loyer, F., Le Merrer, Y., et al. (2018) Diagnostic étendu de l'eutrophisation (DIETE) Rôle des sédiments dans le cycle des nutriments et impacts sur l'eutrophisation de la baie de Vilaine (2014-2017). Rapport de contrat RST/LER/MPL/18.04. Ed. Ifremer, France. 237 pp. [In French] <https://archimer.ifremer.fr/doc/00425/53695/>
- Sourisseau, M., Jegou, K., Lunven, M., Quere, J., Gohin, F., and Bryere, P. (2016) Distribution and dynamics of two species of Dinophyceae producing high biomass blooms over the French Atlantic Shelf. *Harmful Algae* 53, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.016>



- Sournia, A., Belin, C., Billard, C., Erard-Le Denn, E., Fresnel, J., Lassus, P., et al. (1992) The repetitive and expanding occurrence of green, bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) on the coasts of France. *Cryptogamie Algologie* 13(1), 1–13
- Stoderegger, K.E., and Herndl, G.J. (1999) Production of exopolymer particles by marine bacterioplankton under contrasting turbulence conditions. *Marine Ecology Progress Series* 189, 9-16. <https://doi.org/10.3354/meps189009>
- Stolte, W., Scatasta, S., Graneli, E., Weikard, H.P., Van Ierland, E. (2001). ECOHARM: The socio-economic impact of harmful algal blooms in european marine waters. Department of Biology and Environmental Science, Kalmar University, Sweden & Environmental Economics and Natural Resources Group, Wageningen University, The Netherlands.
- Takishita, K., Kawachi, M., Noël, M.H., Matsumoto, T., Kakizoe, N., Watanabe, M.M., et al. (2008) Origins of plastids and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Gene* 410(1), 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.11.008>
- Thomas, Y., Pouvreau, S., Alunno-Bruscia, M., Barillé, L., Gohin, F., Bryere, P., and Gernez, P. (2016) Global change and climate-driven invasion of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) along European coasts: a bioenergetics modelling approach. *Journal of Biogeography* 43(3), 568–579. <https://doi.org/10.1111/jbi.12665>
- Thornton, D.C.O. (2014) Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. *European Journal of Phycology* 49(1), 20-46. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.875596>
- Thornton, D.C.O., and Chen, J. (2017) Exopolymer production as a function of cell permeability and death in a diatom (*Thalassiosira weissflogii*) and a cyanobacterium (*Synechococcus elongatus*). *Journal of Phycology* 53(2), 245-260. <https://doi.org/10.1111/jpy.12470>
- Uhart, M.M., Rowntree, V., Sironi, M., Chrife, A., Mohamed, N., Pozzi, L.M., et al. (2009) Continuing southern right whale mortality events at Península Valdés, Argentina. *Journal of Cetacean Research and Management* 61(BRG18), 1–10
- Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., and Waldron, K. (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology* 40(2), 293-304. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03076.x>
- Utermöhl, H. (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitteilungen-Internationale Vereinigung für Limnologie* 9(1), 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>
- Waller, R.F., and Kořený, L. (2017) Plastid Complexity in Dinoflagellates: A Picture of Gains, Losses, Replacements and Revisions. *Advances in Botanical Research* 84, 105–143. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.06.004>
- Watanabe, M.M., Suda, S., Inouya, I., Sawaguchi, T., and Chihara, M. (1990) *Lepidodinium viride* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyta), a green dinoflagellate with a chlorophyll a- and b-containing endosymbiont. *Journal of Phycology* 26(4), 741–751. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00741.x>
- Watanabe, M.M., Takeda, Y., Sasa, T., Suda, S., and Sawaguchi, T. (1987) A green dinoflagellate with chlorophyll a and b: morphology, fine structure of the chloroplast and chlorophyll composition. *Journal of Phycology* 23(2), 382–389. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04148.x>
- Wood, A.M., Everroad, R.C., and Wingard, L.M. (2005) Measuring growth rates in microalgal cultures. In: *Algal culturing techniques*. Ed. Andersen, R.A., Elsevier Academic press. pp. 269-285.



- Wotton, R.S. (2004) The ubiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Scientia Marina* 68(1), 13–21. <https://doi.org/10.3989/scimar.2004.68s113>
- Xiao, R., and Zheng, Y. (2016) Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances* 34(7), 1225-1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., and Lee, H.K. (2007) Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresource Technology* 98(2), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.021>
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., and Garrido, J.L. (2012) Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series* 465, 33-52. <https://doi.org/10.3354/meps09879>
- Zhang, Z., Chen, Y., Wang, R., Cai, R., Fu, Y., and Jiao, N. (2015) The fate of marine bacterial exopolysaccharide in natural marine microbial communities. *PLoS ONE* 10(11), e0142690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142690>

## 10 Annexes

### 10.1 Annexe 1: Questionnaire

Syndicat des parqueurs  
du traict de Pen Bé-Mesquer



Ifremer

## MORTALITES CONCHYLICOLES DANS LE TRAICT DE PEN- BE/PONT-MAHE EN LIEN AVEC LES EAUX COLOREES : PROGRAMME LEPIDOPEN

### COORDONNEES

NOM : .....PRENOM : .....

ADRESSE : .....

TELEPHONE : .....

EMAIL:.....

SIEGE DE L'EXPLOITATION .....

### MORTALITES RENCONTREES EN 2018

- Votre production conchylicole a-t-elle été impactée au cours de l'été 2018 ?  
Oui Non

- Espèces concernées:  
Huître Moule Autre : .....

- N° de concession :

- Coefficient de découverte :

- Espèce élevée :

- Taux de mortalité mesuré (%) :

- Durée de l'épisode de mortalité:  
Début : ..... Fin : .....

- Diffusion spatiale de la mortalité (dispersion géographique) : Oui Non  
Si oui, préciser l'orientation (Sud-Nord, Ouest-Est,...): .....

- Différences éventuelles selon les espèces élevées Oui Non

Si oui, préciser l'espèce et la localisation les plus impactées: .....

- Différences éventuelles selon la classe d'âge ? Oui Non

Si oui, préciser la classe d'âge la plus impactée et sa localisation: .....

#### **MORTALITES ANTERIEURES LIEES AUX PHENOMENES D'EAUX COLOREES**

- Avez-vous déjà été confronté à ce type de mortalité par le passé ? Oui Non

Si oui, préciser :

-Années : .....

- Saisons : .....

-Nature des eaux colorées (couleur) : .....

-Concessions concernées : .....

- Taux de mortalité mesurés : .....

- Conditions météorologiques : .....

#### **PERCEPTION DES PHENOMENES D'EAUX COLOREES**

- Quel est votre ressenti vis-à-vis des phénomènes d'eaux colorées ?

- Recrudescence et amplification des phénomènes d'efflorescences : Oui Non

- Ampleur des épisodes de mortalité : Equivalente Supérieure Inférieure

- Localisation et emprise géographique : Equivalente Supérieure Inférieure

- Facteurs déclenchants : .....

.....

Facteurs aggravants : .....

.....

**Commentaires et observations concernant le questionnaire :** .....

.....

.....

.....

Date : Le .....

Signature :

Questionnaire à adresser, dûment complété au SMIDAP pour le vendredi 28 juin 2019 au plus tard.

Adresse : 3 rue Célestin Freinet, Bâtiment B sud 44200 NANTES Email : [contact@smidap.f](mailto:contact@smidap.f)



## 10.2 Annexe 2 : Courrier accompagnant le questionnaire



**Syndicat des parqueurs  
du traict de Pen Bé-Mesquer**

Nantes, le 11 juin 201

Madame, Monsieur,

Le secteur conchylicole de Pen Bé-Pont-Mahé est confronté à une augmentation de la fréquence de blooms colorés verts à *Lepidodinium chlorophorum*. Ces derniers ont été associés aux mortalités massives de bivalves rencontrées au cours de l'été 2018, entraînant des pertes économiques importantes pour les conchyliculteurs de la zone.

Face à cette situation et aux inquiétudes qu'elle soulève, un partenariat entre le syndicat des parqueurs du traict de Pen Bé/Mesquer, l'IFREMER, le SMIDAP et CAP'Atlantique a été engagé au travers d'un programme d'étude financé par la Région des Pays de la Loire dans le cadre de l'appel à projet Pêche et Aquaculture, dénommé Lépidopen. Il a pour objectif d'améliorer la connaissance sur la dynamique des blooms de cette espèce, mais aussi sur les processus physico-chimiques et biologiques conduisant aux mortalités de coquillages observées.

Une première étape vise à mieux appréhender la perception professionnelle des épisodes d'eaux colorées sur leurs productions. Le questionnaire joint a pour finalité de dresser, un état des lieux exhaustif des phénomènes d'eaux colorées rencontrés par les professionnels et de leurs impacts lors des dernières années. Sont concernés la chronologie d'apparition des blooms de *L. chlorophorum*, leurs déplacements potentiels en termes de localisation géographique et de degré d'émersion, l'existence ou non et la quantification de mortalités en fonction des espèces de bivalves élevées.

Les informations acquises au travers de ce document seront traitées en garantissant la propriété des données collectées et le respect de l'anonymat des producteurs.

Vous remerciant par avance de votre collaboration.

Veuillez agréer, Madame, Monsieur, nos sincères salutations.

Jean-Luc RETAILLEAU

GLIZE Président du syndicat des parqueurs  
Aquacole Régional  
de Pen Bé/Mesquer

Philippe  
Conseiller

## 10.3 Annexe 3 : Méthodes d'analyses

### 10.3.1 Concentration en nutriments inorganiques

300 mL d'eau de mer sont préfiltrés directement à partir de la bouteille Niskin sur une soie de 41  $\mu\text{m}$  de porosité. Pour le dosage des silicates, ( $\text{DSI}=\text{Si}(\text{OH})_4^-$ ) les échantillons sont ensuite filtrés sur une membrane en acétate de cellulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité et stockés à 4°C avant analyse. Pour les analyses de l'azote ( $\text{DIN}=\text{NO}_3^-+\text{NO}_2^-+\text{NH}_4^+$ ) et du phosphore ( $\text{DIP}=\text{PO}_4^{3-}$ ) inorganique, les échantillons sont stockés à -20°C en attendant l'analyse. Cette analyse est réalisée à l'aide d'un auto-analyseur (Seal analytical AA3) suivant les protocoles standards décrits par Aminot et Kerouel (2007). Les limites de quantification sont de 0,4  $\mu\text{M}$  pour le DSI, 0,5  $\mu\text{M}$  pour le  $\text{NO}_3^-+\text{NO}_2^-$  et 0,05  $\mu\text{M}$  pour le DIP et  $\text{NH}_4^+$ . Les incertitudes de mesure sont de 12% pour le DSI, 10% pour  $\text{NO}_3^-+\text{NO}_2^-$ , 15% pour le DIP et 27% pour  $\text{NH}_4^+$ .

### 10.3.2 Estimation de la biomasse phytoplanctonique : [Chla]

La biomasse phytoplanctonique est estimée via le dosage de la chlorophylle a (Chla). 500 à 1000 mL d'eau de mer sont filtrés sur des filtres GF/F et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. La chlorophylle est extraite pendant 12h dans 10 mL d'acétone 90%, dans le noir et à 4°C et analysée par spectrophotométrie monochromatique (Aminot et Kerouel, 2004).

### 10.3.3 Identification et énumération du phytoplancton en microscopie optique

L'abondance et la diversité du microphytoplancton sont déterminées après l'observation d'échantillons sous un microscope inversé (Zeiss Axio Observer). 1 L d'échantillon sont fixés avec une solution de Lugol iodine (2% f.c.) et conservés à 4°C en attente d'analyse. Après une homogénéisation rigoureuse et douce de l'échantillon, un aliquot de 10 mL est mis à décanter pendant >12h dans une cuve Hydro-bios (Utermöhl, 1958) avant l'observation et l'énumération au microscope. La limite de quantification est de 100 cell  $\text{L}^{-1}$ .

### 10.3.4 Dosage des TEP (Transparent Exopolymer Particles)

Les concentrations en TEP sont estimées par une méthode semi-quantitative basée sur la détermination colorimétrique de la quantité de colorant (le bleu Alcian) complexée aux particules (Claquin et al. (2008) adapté de Passow et Alldredge, 1995 ; Roux et al., 2021). Des triplicat de 50-150 mL d'eau de mer ou de 5-20 mL de culture, sont filtrés sur des membranes polycarbonate de 0,4  $\mu\text{m}$  de porosité (Whatman® Nucleopore™ Track-Etched membrane) et conservés à -20°C avant l'analyse. Après décongélation, les filtres sont trempés dans 5 mL d'une solution de Bleu Alcian (0,02%) et d'acide acétique (0,06% ; pH=2,5). Le bleu Alcian est un colorant cationique hydrophile qui se complexe avec des molécules anioniques portant un substituant négatif tels que des groupes carboxylés ou sulphatés. Après une centrifugation à 4000g pendant 30 minutes, les surnageant sont éliminés. Cette opération est répétée plusieurs fois après rinçage dans 5 mL d'eau MilliQ jusqu'à l'élimination totale du bleu Alcian en excès. Les filtres sont ensuite séchés pendant 12 h à 50°C dans une étuve. Les échantillons sont acidifiés avec 6 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 80% pendant 2h. L'absorption du surnageant à 787 nm est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (HIMADZU UV-2600). Une gamme étalon est réalisée lors de chaque analyse avec de la gomme de Xanthan et les concentrations en TEP des échantillons sont exprimés en  $\text{mg Xeq L}^{-1}$ .



### 10.3.5 Carbone organique dissous, particulaire et azote organique particulaire

250 à 500 ml d'eau de mer sont filtrés sur des filtres GF/F préalablement calcinés à 450°C pendant 4h et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse. Après décongélation, les carbonates sont éliminés en plongeant les filtres dans un bain d'acide phosphorique, avant d'être analysés grâce à un analyseur élémentaire (CHN ; Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) afin de mesurer [POC] et [PON] (Aminot et Kerouel, 2004). Le [DOC] est mesuré dans le filtrat récoltés dans des tubes en verre lavés soigneusement à l'acide et pré-calcinés. Les échantillons sont stockés à -20°C en attente de l'analyse sur un TOC-mètre (Shimadzu TOC-V<sub>CSH</sub>). L'incertitude de mesure est de 12%.

### 10.3.6 Analyse des SEP

La teneur en protéines a été estimée selon le dosage des protéines à l'acide bicinchoninique (BCA) et l'albumine sérique bovine a été utilisée comme standard (Smith et al., 1985).

La composition en monosaccharides a été déterminée par analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG) des dérivés de triméthylsilyle après méthanolyse acide (Kamerling et al., 1975). Les surnageants ont été hydrolysés en utilisant MeOH/HCl pendant 4h à 100°C. Le myo-inositol a été utilisé comme étalon interne. Les méthyl glycosides ainsi obtenus ont ensuite été convertis en dérivés de triméthylsilyle en utilisant du N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide et du triméthylchlorosilane (BSTFA : TMCS) 99:1 (MERCCK). La chromatographie en phase gazeuse (GC-FID, AGILENT TECHNOLOGIES 6890N) a été utilisée pour la séparation et la quantification des per-O-triméthylsilyl méthyl glycosides formés. La teneur en soufre a été déterminée par analyse élémentaire réalisée au BioCIS-UMR 8076 (Châtenay-Malabry, France). Les poids moléculaires des protéines et des polysaccharides ont été déterminés par HPSEC (High Performance Size-Exclusion Chromatography, HPLC Prominence SHIMADZU Co, Kyoto, Japon) couplé en ligne avec un détecteur à diffusion de lumière multiangle MALS (Dawn Heleos-II, WYATT TECHNOLOGY, Santa Barbara, CA, USA), un détecteur réfractif différentiel (RI) (Optilab WYATT TECHNOLOGY, Santa Barbara, CA, USA) et un détecteur UV à 280 nm. Les échantillons avec des concentrations de 2 à 3 mg mL<sup>-1</sup> ont été solubilisés et filtrés sur un filtre seringue de 0,45 µm ; 100 µL ont été injectés sur une colonne de garde PL aquagel-OH mixte, 8 µm (AGILENT) (U 7,5 mm x L 50 mm) et une colonne de séparation PL aquagel-OH mixte (AGILENT). L'élution a été effectuée à 1 mL min<sup>-1</sup> avec de l'acétate d'ammonium 0,1 M. Le chromatogramme a ensuite été traité avec le logiciel Astra 6.1 (WYATT TECHNOLOGY). Les incréments d'indice de réfraction utilisés étaient dn/dc = 0,145 mL g pour les polysaccharides et 0,185 mL g pour les protéines.

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et d'agarose a été appliquée pour affiner la composition des polymères. La SDS-PAGE avec un gel séparateur à 10 % de polyacrylamide a été préparée selon la méthode courante de Laemmli (1970). En bref, 25 µL de chaque échantillon ont été chargés sur un gel ; un gel d'agarose à 1 % a été préparé dans du TAE (base Tris 40 mM, acide acétique 1,1 mL/L, EDTA 2 mM). Les échantillons ont été mélangés 4:1 (v/v) avec un tampon de chargement d'échantillon (0,5 M Tris HCl pH 6,8, glycérol, 0,5 M EDTA, 0,5 % p/v bromophénol) et 10 µL de l'échantillon ont été chargés sur un gel. Les gels ont été passés dans du tampon TAE à 150 V. Après migration, les gels ont été colorés avec Stains-All pour détecter les polysaccharides anioniques comme décrit précédemment (Rigouin et al., 2009). Les glucides ont également été révélés par coloration de Schiff (Dubray et Bezard, 1982), tandis que les protéines ont été détectées par coloration Sypro Ruby (Sypro Ruby protein gel stain, INVITROGEN). Le lipopolysaccharide de la souche *Escherichia coli* O111:B4, l'albumine de sérum bovin et différents polysaccharides (sulfate de galactane à 7,7 % de soufre, sel de sodium de sulfate de dextran de *Leuconostoc* spp. (MW 500 000 avec 16,0-19,0 % de soufre et MW 50 000 avec 16,0- 19,0 % de soufre ; SIGMA-ALDRICH, Saint Quentin Fallavier, France)) ont été utilisés comme références.

## 10.4 Annexe 4 : Biométries des huitres de 18 mois

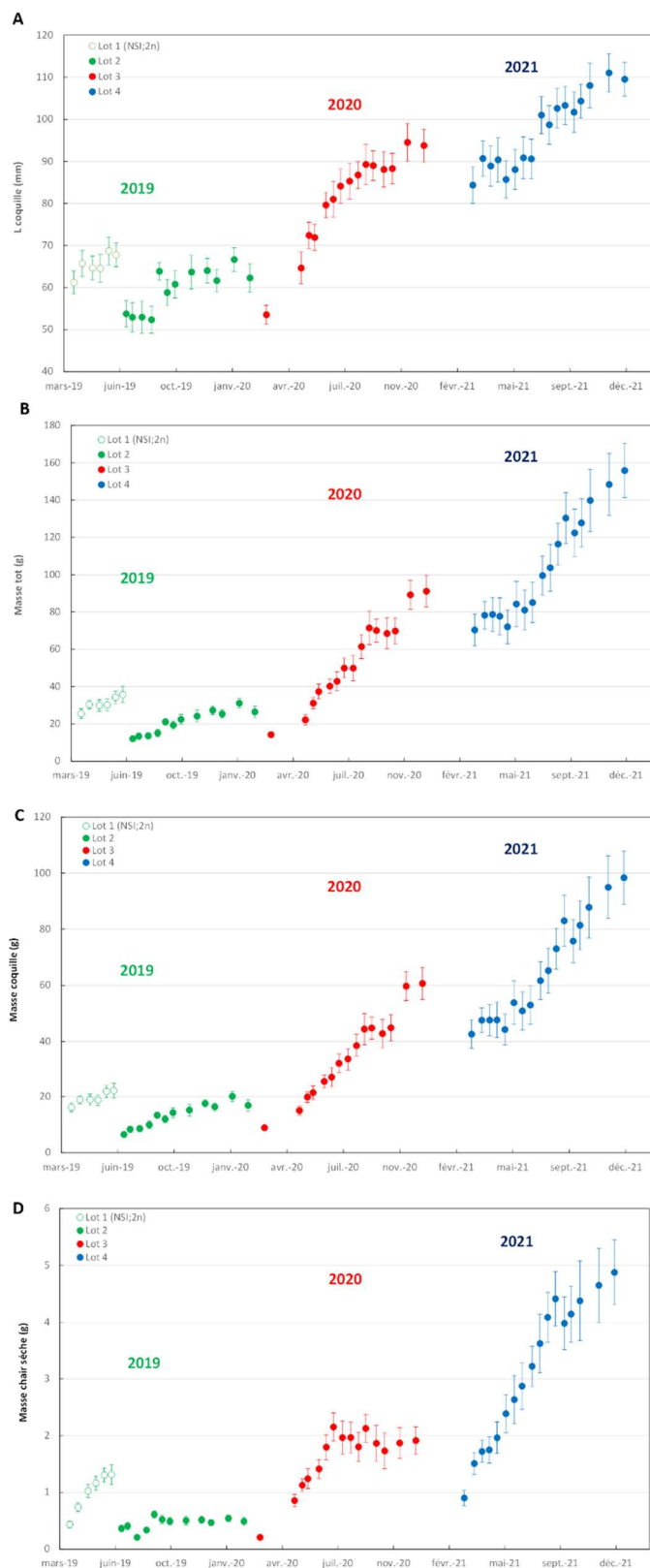


Figure 55 : (A) Longueur moyenne de la coquille (mm), (B) masse totale moyenne (g), (C) masse moyenne de la coquille (g) et (D) masse sèche moyenne (g) sur les 30 individus de 18 mois prélevés lors de chaque sortie sur le site de Pen Bé entre avril 2019 et décembre 2021. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance 95% (n=30). En 2020, les sorties n'ont pas pu être réalisées durant le confinement (mi-mars à début mai) lié à la crise sanitaire.

