



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA – ALGERIE –
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER

LABORATOIRE DE BIORESSOURCES MARINES

THESE DE DOCTORAT

Préparée au sein de:
L'Unité de recherche **Écologie des systèmes marins côtiers**
ECOSYM UMR 5119
et
Laboratoire de Bioressources Marines LBM (UBMA)



Spécialité : **BIORESSOURCES MARINES**

THEME

**Caractérisation de la diversité écophysologique
d'*Alexandrium catenella/tamarense* au Nord (France) et au Sud
Ouest (Algérie) de la Méditerranée.**

présentée par

Imene HADJADJI

JURY

Mr Yves COLLOS, Directeur de recherche CNRS, Université Montpellier 2	Directeur
Mr Hocine FREHI, Maître de Conférences, Université d'Annaba	Directeur
M. Marc BOUVY, Directeur de recherche, IRD, Université Montpellier 2	Examinateur
Mr Hichme NASRI, Maître de Conférences Université d'El-Tarf	Examinateur
Mme Lamya CHAOUI, Professeur, Université d'Annaba	Présidente
Mr Djamel-Eddine BENOURETH, Professeur, Université de Guelma	Examinateur

A Amara HADJADJI

« Nous avons alors envoyé sur eux l'inondation, les sauterelles, les poux, les grenouilles et le sang, comme signes explicites » (Sourate 7:132-133).

« Toutes les eaux du Fleuve se changèrent en sang. Les poissons du Fleuve crevèrent ; et le Fleuve s'empuantit, et les Égyptiens ne purent plus boire l'eau du Fleuve »

(Exode 7, 20–21)

Remerciements

Tout d'abord j'aimerais dire un grand merci du fond du cœur à la direction du laboratoire Ecosym Professeurs Marc Troussellier et Marc Bouvy pour leurs gentillesse et leur soutien sans faille jusqu'à la fin de ma thèse. Monsieur Bouvy ; à des moments décisifs de ma thèse vous m'avez soutenu et vous n'avez jamais arrêté de croire en moi, ce que vous avez fait restera toujours gravé dans mon cœur et ma mémoire, sans vous ce projet n'aurait pas pu arriver à terme.

Je voudrais également remercier toute l'équipe de l'école doctorale Sibaghe ; Messieurs Michel Lebrun, Bernard Godel et Madame Joëlle Lopez de m'avoir soutenu durant 3 ans et d'avoir veillé à ce que cette thèse aboutisse.

Merci à mon Directeur de thèse Docteur Hocine Frehfi pour sans encadrement, sa gentillesse et son écoute tout au long de ma thèse.

J'aimerais remercier mon deuxième Directeur de thèse Professeur Yves Collos d'avoir eu la patience de m'apprendre et me former durant ces trois années de thèse, c'était un grand plaisir de faire des expérimentations avec vous au laboratoire.

Je tiens à remercier Professeur Kara Mohamed Hichem, Directeur du Laboratoire de Bioressources Marines à l'université Badji Mokhtar 'Annaba de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury :

Professeur Lamya Chaoui, de l'Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie), d'avoir accepté de présider ce jury.

Professeur Djamel-Eddine Benouareth, de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma (Algérie), et Docteur Hichem Nasri de l'Université d'El-Tarf, d'avoir accepté de juger ce travail

Un grand merci à Docteur Mohamed Laabir pour sa gentillesse, son aide et sa collaboration lors de ma thèse.

Merci à Corinne Bouvier, Eric Abadie, De Wit Rutger, Tatiana Vallaeys et Professeur Derbal Farid pour leurs attentions, leurs conseils et leurs amabilités.

Mes remerciements vont également à mes collègues et amis d'Annaba : Imene Zard, Nihed Omri, Hamdi Hanachi et tous les autres doctorants du laboratoire LMB à Annaba, j'ai passé avec vous les meilleurs moments de ma thèse, sans oublier Messieurs Retima Abdelkhalék et Ayada Mebarek pour leurs participations aux campagnes d'échantillonnages à Annaba.

Je remercie mes collègues de l'équipe ETDA ; Hatey Elise, Rieuvilleneuve Fabien, Lasserre Bernard de leur aide et participation dans ma thèse, j'ai passé des moments très agréables avec eux.

Je remercie mes adorables collègues de bureau à Ecosym, Amandine et Gaiton d'avoir rendu ces derniers mois au laboratoire très agréables.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ce travail, aussi bien au sein d'Ecosym ou au sein de LBM.

Je remercie madame Charlotte Jouzier Fischer de m'avoir soutenu, écoutée, aidée, encouragée durant toute ma thèse, charlotte pour moi tu es un ange, merci d'avoir veillée sur moi durant les plus durs moments de ma vie.

Je remercie monsieur Patrick Berrebi et madame Estelle Masseret pour leur collaboration dans les travaux de thèse.

Ces travaux de thèse ont été financés grâce à deux projets de recherche :

- Programme Ecosphère Continentale et Côtière-EC2CO 2010. (2010-2012) Diversité des banques de kystes du complexe Alexandrium tamarense (Dinoflagellés) en Méditerranée : implications dans la dynamique d'invasion. Coordinatrice : Estelle Masseret.

- Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité-FRB 2009. (2010-2012) Dynamique de l'invasion du complexe Alexandrium tamarense (Dinoflagellé) en Méditerranée. INVALEX. (AAP-IN-2009-036). Coordinatrice : Estelle Masseret.

A présent je tiens à remercier du fond de mon cœur mes parents, mes frères et ma sœur qui m'ont beaucoup encouragé durant ces 3 années , c'était très difficile pour moi et pour vous mais vous avez toujours été là pour moi dans les plus durs moments, merci maman d'avoir supporté tout ça et de m'avoir soutenu du mieux que tu pouvais , et merci papa de m'avoir encouragé du mieux que tu pouvais jusqu'à la fin, tu sais dans mes pires moments je garde entre mes yeux ton espérance en moi et j'ai tout fait pour que tu sois fière de moi papa et je sais que tu l'es, tu es le meilleur papa du monde, je t'aime.

J'aimerais remercier ma meilleure amie Nour Essa d'avoir été là durant 3 ans, je te remercie pour ton soutien dans ces moments difficiles, je te souhaite tout le bonheur du monde avec ton mari et ton futur bébé.

Enfin Je voudrai remercier l'homme de ma vie, mon cher et adorable mari Adel de m'avoir encouragé soutenu sans faille ces derniers mois de thèse, tu es le meilleur époux du monde tu illumines ma vie et chaque jour à tes cotés me remplit de bonheur et efface beaucoup de tristesse de mon cœur.

Je suis de retour à la vie.....

Table des Matières

Chapitre 1 : Introduction		1
I. Les efflorescences algales nuisibles		2
1. Notion de HAB (Harmful Algal Bloom)		2
2. Les groupes d'organismes impliqués		3
3. Les impacts des HAB		6
3.1 Impacts sanitaires des toxines		6
3.2 : Impacts des toxines sur les écosystèmes aquatiques		7
3.3 Impacts des toxines sur l'économie		8
4. Principales causes de l'expansion géographique et temporelle des HABs		9
4.1 Facteurs anthropiques		10
4.1.1 L'eutrophisation		10
4.1.2 Les changements climatiques		11
4.1.3 Facteurs physiologiques internes liés aux HABs		11
II. Les Dinoflagellés et le genre <i>Alexandrium</i>		12
1. Les Dinoflagellés		12
2. Le genre <i>Alexandrium</i>		12
3. Le genre <i>Alexandrium</i> en Méditerranée		12
4. Les efflorescences d' <i>Alexandrium catenella</i> /tamarensis dans l'étang de Thau, France		13
5. Les efflorescences d' <i>Alexandrium</i> dans la baie d'Annaba, Algérie		13
6. Cycle de vie d' <i>Alexandrium</i> (Figure 9)		13
III. Objectifs et organisation de la thèse		14
Références bibliographiques		18
Chapitre 2 : Matériel et méthodes		
I. Etude des blooms d'<i>Alexandrium catenella</i> dans la baie d'Annaba		24
1. Campagne d'échantillonnage		24
2. Choix et caractéristiques des stations		24
3. Prélèvement et conservation des échantillons		25
3.1. Paramètres physico-chimiques		25
3.2. Prélèvement du phytoplancton		25
3.3. Méthodes de mesures		27
3.3.1. Facteurs hydrologiques		27
3.3.2. Paramètres chimiques		27
3.3.2.1. Phosphate		27
3.3.2.2. Nitrate et nitrite		27
3.3.2.3. L'ammonium NH_4^+		28
3.3.3. Pigments		28
3.3.4 Analyse qualitative et identification du phytoplancton		28

3.3.5. Indices écologiques.....	29
A. L'abondance :.....	29
B. La dominance :.....	29
C. Indice de diversité :.....	29
II. Obtention du matériel biologique de la baie d'Annaba.....	30
1. Echantillonnage.....	30
2. Protocole d'obtention de cultures monoclonale d'<i>Alexandrium</i> à partir du sédiment récolté.....	30
2.1 Milieu de culture utilisé.....	31
2.2 Mise en culture.....	31
2.3 Isolement.....	31
2.4 Repiquage.....	32
III. Caractérisation des souches d'Annaba.....	33
1. Caractérisation morphologique.....	33
2. Caractérisation génétique.....	34
2.1 Extraction d'ADN.....	34
2.2 Détermination du ribotype par amplification par PCR pour le séquençage.....	34
2.3 Séquençage et traitement.....	35
3. Dosage des toxines.....	35
IV. Calibration et Suivi croissance.....	35
1. Milieu de culture et ensemencement.....	35
2. Conditions de cultures.....	36
3. Calcul des taux de croissances.....	36
4. Dénombrement cellulaire.....	37
5. Etablissement des courbes d'étalonnages.....	37
6. Mesure de la fluorescence in vivo FIV.....	37
V. Traitement statistique.....	38
1. Outils pour analyse de la diversité intra-spécifique.....	38
2. Analyses multivariées.....	38
Références bibliographiques.....	39
<i>Chapitre 3 : Etude annuelle des blooms d'<i>Alexandrium catenella</i> dans la baie d'Annaba en Algérie et la lagune de Thau en France</i>	
I. Introduction.....	42
II. Milieu.....	43
1. Description hydrologique de la baie d'Annaba.....	43
1.1. Situation géographique.....	43
1.2. Bathymétrie.....	43
1.3. Hydrodynamisme.....	43
1.3.1. Courants.....	44
1.3.2. Houles.....	44

2. Hydro-climatologie	44
2.1. Pluviométrie.....	44
2.2. Apport d'eaux douces.....	45
III. Résultats	45
1. Les paramètres physiques	45
1.1. La température.....	45
1.2. La salinité.....	47
1.3. L'oxygène dissous.....	47
2. Paramètres chimiques	48
2.1. L'ammonium (NH ₄).....	48
2.2 Les nitrates (NO ₃).....	49
2.3 Les nitrites (NO ₂).....	50
2.4. Les Phosphates (PO ₄ ⁻).....	51
3. Variables biologiques	52
3.1. Etudes qualitative et quantitative du phytoplancton.....	52
3.2. Indice de diversité (Shannon H')	58
4. Analyse statistique des données	59
IV. Discussion	62
1. Environnement physico-chimique	62
2. Les nutriments inorganiques dissous	64
3. Phytoplancton et <i>A. catenella</i>	70
4. Description des blooms d'<i>A. catenella</i> dans l'étang de Thau	73
4.1. Caractéristiques géographiques, hydrodynamiques et nutritives de l'étang de Thau.....	74
4.2. Le phytoplancton à Thau.....	76
4.3. <i>Alexandrium catenella</i> à Thau.....	77
Manuscrit A	78
Contexte de l'étude	78
A comparative analysis of <i>Alexandrium catenella/tamarense</i> blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France) ;phosphorus limitation as a trigger	80
Conclusion	86
Références bibliographiques	87
<i>Chapitre 4 : description d'<i>A. catenella</i> d'Annaba et diversité intraspécifique</i>	98
Manuscrit B	100
Contexte de l'étude	100
Characterization of <i>Alexandrium catenella</i> blooming in the Gulf of Annaba(Algeria, Mediterranean sea): morphology, toxin profiles and intraspecific variations	101
Conclusion	120

<i>Chapitre 5 : description Alexandrium tamarense de Thau</i>	121
Manuscrit C	122
contexte de l'étude	122
Clonal variation in physiological parameters of <i>Alexandrium tamarense</i>: implications for biological invasions and maintenance	123
Conclusion	130
Manuscrit D	131
Contexte de l'étude	131
Phased oscillations in cell numbers and nitrate in batch cultures of <i>Alexandrium tamarense</i> (dinophyceae)	132
Conclusion	138
Chapitre 6 : Discussion générale	139
Références bibliographiques	158
Chapitre 7 : Conclusions et perspectives	164

Remerciements

Tout d'abord j'aimerais dire un grand merci du fond du cœur à la direction du laboratoire Ecosym Professeurs Marc Troussellier et Marc Bouvy pour leurs gentillesse et leur soutien sans faille jusqu'à la fin de ma thèse. Monsieur Bouvy; à des moments décisifs de ma thèse vous m'avez soutenu et vous n'avez jamais arrêté de croire en moi, ce que vous avez fait restera toujours gravé dans mon cœur et ma mémoire, sans vous ce projet n'aurait pas pu arriver à terme.

Je voudrais également remercier toute l'équipe de l'école doctorale Sibaghe; Messieurs Michel Lebrun, Bernard Godel et Madame Joëlle Lopez de m'avoir soutenu durant 3 ans et d'avoir veillé à ce que cette thèse aboutisse.

Merci à mon Directeur de thèse Docteur Hocine Frehfi pour sans encadrement, sa gentillesse et son écoute tout au long de ma thèse.

J'aimerais remercier mon deuxième Directeur de thèse Professeur Yves Collos d'avoir eu la patience de m'apprendre et me former durant ces trois années de thèse, c'était un grand plaisir de faire des expérimentations avec vous au laboratoire.

Je tiens à remercier Professeur Kara Mohamed Hichem, Directeur du Laboratoire de Bioressources Marines à l'université Badji Mokhtar 'Annaba de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury :

Professeur Lamya Chaoui, de l'Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie), d'avoir accepté de présider ce jury.

Professeur Djamel-Eddine Benouareth, de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma (Algérie), et Docteur Hichem Nasri de l'Université d'El-Tarf, d'avoir accepté de juger ce travail

Un grand merci à Docteur Mohamed Laabir pour sa gentillesse, son aide et sa collaboration lors de ma thèse.

Merci à Corinne Bouvier, Eric Abadie, De Wit Rutger, Tatiana Vallaeys et Professeur Derbal Farid pour leurs attentions, leurs conseils et leurs amabilités.

Mes remerciements vont également à mes collègues et amis d'Annaba : Imene Zard, Nihed Omri, Hamdi Hanachi et tous les autres doctorants du laboratoire LMB à Annaba, j'ai passé avec vous les meilleurs moments de ma thèse, sans oublier Messieurs Retima Abdelkhalék et Ayada Mebarek pour leurs participations aux campagnes d'échantillonnages à Annaba.

Je remercie mes collègues de l'équipe ETDA; Hatey Elise, Rieuvilleneuve Fabien, Lasserre Bernard de leur aide et participation dans ma thèse, j'ai passé des moments très agréables avec eux.

Je remercie mes adorables collègues de bureau à Ecosym, Amandine et Gaiton d'avoir rendu ces derniers mois au laboratoire très agréables.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ce travail, aussi bien au sein d'Ecosym ou au sein de LBM.

Je remercie madame Charlotte Jouzier Fischer de m'avoir soutenu, écoutée, aidée, encouragée durant toute ma thèse, charlotte pour moi tu es un ange, merci d'avoir veillée sur moi durant les plus durs moments de ma vie.

Je remercie monsieur Patrick Berrebi et madame Estelle Masseret pour leur collaboration dans les travaux de thèse.

Ces travaux de thèse ont été financés grâce à deux projets de recherche :

- Programme Ecosphère Continentale et Côtière-EC2CO 2010. (2010-2012) Diversité des banques de kystes du complexe Alexandrium tamarense (Dinoflagellés) en Méditerranée : implications dans la dynamique d'invasion. Coordinatrice : Estelle Masseret.

- Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité-FRB 2009. (2010-2012) Dynamique de l'invasion du complexe Alexandrium tamarense (Dinoflagellé) en Méditerranée. INVALEX. (AAP-IN-2009-036). Coordinatrice : Estelle Masseret.

A présent je tiens à remercier du fond de mon cœur mes parents, mes frères et ma sœur qui m'ont beaucoup encouragé durant ces 3 années , c'était très difficile pour moi et pour vous mais vous avez toujours été là pour moi dans les plus durs moments, merci maman d'avoir supporté tout ça et de m'avoir soutenu du mieux que tu pouvais , et merci papa de m'avoir encouragé du mieux que tu pouvais jusqu'à la fin, tu sais dans mes pires moments je garde entre mes yeux ton espérance en moi et j'ai tout fait pour que tu sois fière de moi papa et je sais que tu l'es, tu es le meilleur papa du monde, je t'aime.

J'aimerais remercier ma meilleure amie Nour Essa d'avoir été là durant 3 ans, je te remercie pour ton soutien dans ces moments difficiles, je te souhaite tout le bonheur du monde avec ton mari et ton futur bébé.

Enfin Je voudrai remercier l'homme de ma vie, mon cher et adorable mari Adel de m'avoir encouragé soutenu sans faille ces derniers mois de thèse, tu es le meilleur époux du monde tu illumines ma vie et chaque jour à tes cotés me remplit de bonheur et efface beaucoup de tristesse de mon cœur.

Je suis de retour à la vie.....

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 . Bloom de <i>Karenia brevis</i> à San Diego, Californie, USA (2005). Photo : Scripps Institution of Oceanography Pier, La Jolla California.....	3
Figure 2 . Bloom de <i>Microcystis aeruginosa</i> à St. Petersburg, Floride, USA. Photo : GIS USE in public health and health care.....	3
Figure 3 . Groupe d'organismes impliqués dans les HAB (Glibert et al., 2005).....	3
Figure 4 . Structure commune des phycotoxines paralysantes (Laabir et al., 2013).....	7
Figure 5 . Mérou géant retrouvé mort sur la côte suite à un bloom de <i>Karenia brevis</i> en Floride en 2006. Photo : site de standeyo.com.....	8
Figure 6 . Mortalité massive de poissons suite à un bloom de <i>Cochlodinium polykrikoides</i> sur la côte iranienne du golfe Persique . Photo : Regional Aquaculture Information System (RAIS).....	8
Figure 7 . Expansion mondiale des événements toxiques de type PSP enregistrés entre 1970 et 2000 (Glibert et al. 2005).....	9
Figure 8 . Tendence à long terme de l'utilisation d'engrais azoté et évolution du nombre de proliférations formant des marées rouges dans les eaux côtières de Chine entre 1970 et 2000 (Heisler et al., 2008).....	10
Figure 9 . Cycle de vie d' <i>Alexandrium catenella</i> (Anderson et al., 2012).....	14

Chapitre 2

Figure 1 . localisation des stations en baie d'Annaba.....	24
Figure 2 . localisation de la station B dans la lagune de Thau.....	26

Chapitre 3

Figure 1 . Variations temporelles de la température des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.....	46
Figure 2 . Variation temporelles de la salinité des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.....	47
Figure 3 . Variation temporelles de de l'oxygène dissous des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.....	48
Figure 4 . Variations temporelles des teneurs en ammonium des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.....	49
Figure 5 . Variation temporelles des teneurs en nitrates des eaux de la station 1 et 2 de la baie	

d'Annaba entre 2010 et 2011.....	50
Figure 6. Variation temporelles des teneurs en nitrites des eaux de la station 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.....	51
Figure 7. Variation temporelles des teneurs en phosphore des eaux de la station 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.....	51
Figure 8. Evolution spatiotemporelle des peuplements phytoplanctoniques de la station 1.....	56
Figure 9. Evolution spatiotemporelle des peuplements phytoplanctoniques de la station 2.....	57
Figure 10. Evolution spatiotemporelles des concentrations d' <i>A.catenella</i> dans la baie d'Annaba.....	57
Figure 11. Evolution temporelle de l'indice de Shannon H' dans les deux stations d'études.....	58
Figure 12. Représentation graphique du plan de projection F1-F2 de l'analyse de correspondance principale, réalisée sur la matrice de données formée des observations des variables physico-chimiques et des abondances d' <i>Alexandrium</i> . Les indices 1 et 2 associés aux abréviations des variables correspondent respectivement aux stations 1 et 2.....	60
Figure 13. Lagune de Thau et station B d'échantillonnage.....	74

Chapitre 4

Figure 1. Sampling stations in Annaba bay.....	117
Figure 2. Toxin content (fmol/cell) of twenty six strains toxic <i>Alexandrium</i> isolates from sediment of station 2 at Annaba Bay.....	118
Figure 3. Toxin composition (fmol/cell %) of twenty six strains toxic <i>Alexandrium</i> isolates from sediment of station 2 at Annaba Bay.....	119
Figure 4. <i>Alexandrium catenella</i> Growth rates (day ⁻¹) of different strains on ESAW culture medium. Error bars show the standard deviation. Strains are grouped following ANOVA and Tukey's multiple comparison test. An-strain: unicellular cultures obtained by cultivation of sediment. Annaba-strain: cultures obtained from single isolated cysts from the sediment.....	119
Figure 5. <i>Alexandrium catenella</i> lag phase (days) of different strains on ESAW culture medium. Error bars show the standard deviation. Strains are grouped following ANOVA and Tukey's multiple comparison test.....	119

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Différents impacts des HAB et exemples d'organismes responsables (Zingone et Enevoldsen, 2000).....	5
---	---

Chapitre 2

Tableau 1. Positionnement, profondeur et nature du fond des stations étudiées de la Baie d'Annaba.....	25
---	----

Chapitre 3

Tableau 1a. Répartition qualitative et quantitatives des Diatomées et des Dinoflagellé dans la station 2.....	53
Tableau 1b. Répartition qualitative et quantitatives des Diatomées et des Dinoflagellé dans la station 1.....	55
Tableau 2. Valeurs de l'indice de diversité et de l'indice d'équitabilité dans la baie d'Annaba	59
Tableau 3. Contribution des variables aux deux premiers axes de l'ACP.....	60

Chapitre 4

Tableau 1. The detection limits (DL) and quantification limit (QL) of detected toxins.....	117
---	-----

Chapitre 6

Tableau 1. Diversité des concentrations, compositions des toxines et degrés de toxicité chez les souches <i>d'A.catenella</i> isolées de différentes régions du monde.....	153
Tableau 2. Diversité des taux de croissances entre les souches <i>d'A.catenella</i> et <i>A.tamarense</i> isolées de différentes régions du monde.....	

Chapitre 1
Introduction

Généralités

Les microalgues sont à l'origine de 45 % de la production primaire sur terre (Field et *al.*, 1998), et jouent un rôle important dans la régulation de la concentration du CO₂ atmosphérique en le séquestrant et en le transportant vers les eaux profondes. Le phytoplancton a des représentants eucaryotes et procaryotes dans l'arbre du vivant. Moins de 5000 espèces de phytoplancton marin ont été formellement décrites à la fin des années 80 (Sournia et *al.*, 1991 ; Simon et *al.*, 2009) et seulement 80 espèces toxiques et environ 200 espèces nuisibles pour l'homme et la faune aquatique (Sournia, 1995).

I. Les efflorescences algales nuisibles

1. Notion de HAB (Harmful Algal Bloom)

Certains groupes de phytoplancton causent des problèmes lors de leur développement, dus à la quantité très élevée de biomasse produite en peu de temps. Ce phénomène est appelé « bloom » ou efflorescence (Figures 1 et 2), et altère la dynamique des chaînes trophiques pouvant conduire à l'anoxie, provoquant ainsi la mort des organismes aérobies comme les poissons. (Glibert, 2005). Lors des blooms, la prolifération du phytoplancton dépend d'une combinaison de mécanismes biologiques, chimiques et physiques ainsi que des interactions entre les microalgues et les autres composants de la chaîne trophique. (Zingone et Enevoldsen, 2000).

Certaines espèces sont toxiques produisant des variétés de biotoxines qui peuvent être accumulées par des organismes filtreurs tels que les mollusques. Cela représente un grand risque pour la santé publique qui peut conduire à la mort par intoxication (Maso et Garcés, 2006). Environ 2000 cas d'intoxications sont enregistrés par an (Hallegraeff, 1995). Le terme HAB ne s'applique pas uniquement aux algues mais également aux cyanobactéries (Sellner, 1997), et aussi à certains protistes brouteurs (Lassus, 1988).

Les conséquences sanitaires et socio-économiques des HABs se révèlent dramatiques lorsqu'elles touchent des ressources commercialement exploitables. Les conséquences écologiques des HABs se traduisent par une érosion de la biodiversité, en raison des mortalités massives d'organismes (Zingone et Enevoldsen, 2000 ; Glibert et *al.*, 2006)



Figure 1 : Bloom de *Karenia brevis* à San Diego, Californie, USA (2005). Photo : Scripps Institution Of Oceanography Pier, La Jolla California.



Figure 2 : Bloom de *Microcystis aeruginosa* à St. Petersburg, Floride, USA. Photo : GIS USE in public health and health care.

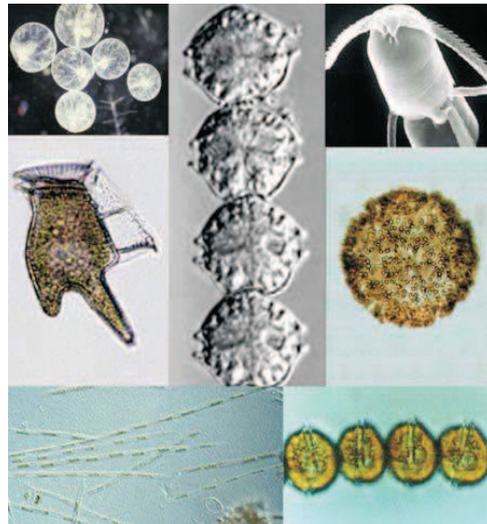


Figure 3 : Groupe d'organismes impliqués dans les HAB (Glibert et *al.*, 2005)

2. Les groupes d'organismes impliqués

Il existe 5 catégories de microalgues impliquées dans les blooms toxiques et nuisibles (Figure 3, Tableau 1).

- Les Haptophytes nuisibles : ce groupe comprend principalement des organismes unicellulaires phototrophes, à l'heure actuelle, environ 60 espèces de *Chrysochromulina*, dix de *Prymnesium* et neuf de *Phaeocystis* ont été décrits, exemples d'espèces de ce groupe impliqué dans le phénomène des HAB *Prymnesium*

calathiferum, *Chrysochromulina* *Polylepis*, *Phaeocystis globosa*, *P. pouchetii* (Moestrup et Thomsen, 2003).

- Les Diatomées toxiques : environ 20 espèces de diatomées sont productrices de toxines et appartiennent principalement au genre *Pseudo-nitzschia* (Hasle et Fryxell 1995)
- Les Rhaphidophytes nuisibles : Les espèces marines des Raphidophyceae appartiennent aux genres *Chattonella*, *Fibrocapsa*, *Heterosigma*, *Haramonas*, *Olisthodiscus* et *Oltmannsia*. Les trois premiers genres sont toxiques pour les poissons. Ce sont des organismes unicellulaires, flagellés nus (Fukuyo, 2004 et Hiroishi et al.,2005).
- Les Dinoflagellés toxiques : Les Dinoflagellés forment un groupe de phytoplancton unicellulaire eucaryote, possédant deux flagelles, avec des espèces toxiques : *Alexandrium catenella*, *Gymnodinium catenatum*, *Dinophysis caudata* (Taylor et al.,1995).
- Les Cyanobactéries toxiques : dans les systèmes d'eau douce les Cyanobactéries causent des problèmes de santé publique importantes en raison de toxines libérées, comme par des espèces *Anabaena circinalis*, *Lyngbya majuscula* (Landsberg et al.,2005, Zingone et Enevoldsen, 2000)

Tableau 1 : Différents impacts des HAB et exemples d'organismes responsables (Zingone et Enevoldsen, 2000).

Effets	Exemples d'organismes responsables	
Santé humaine		
Paralytic shellfish poisoning (PSP)	Dinoflagellés	<i>Alexandrium spp.</i> , <i>Pyrodinium bahamense var. compressum</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i>
	Cyanobactérie	<i>Anabaena circinalis</i>
Diarrhetic shellfish poisoning (PSP)	Dinoflagellés	<i>Dinophysis spp.</i> , <i>Prorocentrum spp.</i>
Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)	Dinoflagellés	<i>Gymnodinium breve</i>
Amnesic shellfish poisoning (NSP)	Diatomées	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>
Ciguatera fish poisoning (CFP)	Dinoflagellés	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
problèmes d'Allergies respiratoireet d'irritation épidermique	Dinoflagellés	<i>Gymnodinium breve</i> , <i>Pfiesteria piscicida</i>
	Cyanobactérie	<i>Nodularia spumigena</i>
Hépatotoxicité	Cyanobactérie	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Nodularia spumigena</i>
Ressources marines naturelles et cultivées		
Effets hémolytique, hépatotoxique, osmorégulateur	Dinoflagellés	<i>Gymnodinium spp.</i> , <i>Cochlodinium polykrikoides</i> , <i>Pfiesteria piscicida</i> , <i>Gonyaulax spp.</i>
	Raphidophytes	<i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Fibrocapsa japonica</i>
	Prymnesiophytes	<i>Chrysochromulina spp.</i> , <i>Prymnesium spp.</i>
	Pelagophytes	<i>Aureococcus anophagefferens</i>
	Cyanobactérie	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Les dommages mécaniques	Diatomées	<i>Chaetoceros spp.</i>
	Prymnesiophytes	<i>Prymnesium spp.</i>
	Diantomées	<i>Thalassiosira spp.</i>
Tourisme et activités		
Production de mousses, des mucilages, décoloration, odeurs répulsives	Dinoflagellés	<i>Noctiluca scintillans</i>
	Prymnesiophytes	<i>Phaeocystis spp.</i>
	Diatomée	<i>Cylindrotheca closterium</i>
	Pelagophytes	<i>Aureococcus anophagefferens</i>
	Cyanobactérie	<i>Nodularia spumigena</i>
Ecosystème Marin		
Anoxie, Hypoxie	Dinoflagellés	<i>Noctiluca scintillans</i> , <i>Heterocapsa triquetra</i>
	Diatomées	<i>Skeletonema costatum</i>
	Prymnesiophytes	<i>Phaeocystis spp.</i>
Effet négatif sur le comportement alimentaire, la réduction de la transparence de l'eau	Pelagophytes	<i>Aureococcus anophagefferens</i> , <i>aureoumbra lagunensis</i>
Toxicité pour la faune marine sauvage	Dinoflagellés	<i>Gymnodinium breve.</i> <i>Alexandrium spp</i>
	Diatomées	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>

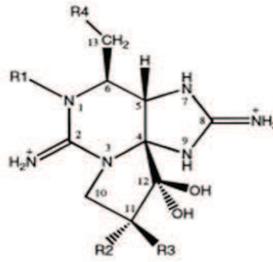
3. Les impacts des HAB

3.1 Impacts sanitaires des toxines

Dans les eaux côtières présentant des HABs, les mollusques peuvent accumuler des variétés de biotoxines, représentant ainsi un grand risque pour la santé publique. Ces toxines dans certains cas peuvent être mortelles pour les êtres humains (Landsberg 2002). En 1987, l'empoisonnement par une toxine paralysante (PSP) suite à l'ingestion de mollusques contaminés par le dinoflagellé *Pyrodinium bahamense var compressum* a entraîné l'hospitalisation de 187 individus avec 26 cas mortels à Champerico, au Guatemala (Rosales-Loessener et al.,1989). A l'île-du-Prince-Édouard, au Canada, en 1987, l'acide domoïque (DA) produit par le bloom de *Pseudo-nitzschia* a causé des intoxications amnésiantes par les mollusques (ASP) après consommation de moules bleues toxiques *Mytilus edulis* avec 3 décès, 19 hospitalisations, et plus de 100 personnes souffrant de divers degrés de troubles gastro-intestinaux et neurologiques (Perl et al.,1990). Les événements de PSP associées aux blooms de *P. bahamense var. compressum* sont devenus un enjeu important de santé humaine en Asie du Sud-Est, où, plus de 100 intoxications mortelles ont eu lieu aux Philippines depuis 1980 (Babaran et al.,1998). En Floride, Backer et al.,(2003) rapportent le cas d'une centaine de personnes qui ont présenté des gênes respiratoires après avoir été en contact avec des aérosols contaminés par des brévétotoxines. Les cellules de *Karenia brevis* productrices de brévétotoxines ne possèdent pas de thèque et se lysent facilement produisant ainsi les toxines sous forme d'aérosols pouvant alors être facilement inhalées (Backer et al.,2003).

Les types de toxines produites par les HAB et les syndromes associés sont les suivants :

- La saxitoxine et le « PSP » Paralytic Shellfish Poisoning
- La saxitoxine (STX) (Figure. 4) est une neurotoxine produite par certains genres de dinoflagellés comme *Alexandrium*, *Gymnodinium* ou *Pyrodinium*. Chez les êtres humains cette toxine est responsable du syndrome PSP qui est une intoxication pouvant causer la mort par paralysie des muscles respiratoires. La saxitoxine provoque la paralysie en ayant une forte affinité avec un site du canal sodique, inhibant ainsi l'ouverture du canal ce qui bloque la transmission nerveuse. Elle est impliquée dans plus de 2000 cas d'intoxications humaines par an, la dose létale étant de 1 à 4 mg de toxine. Sachant qu'un mollusque contaminé peut contenir 100 mg de STX, l'intoxication est donc très rapide (Zingone et Enevoldsen, 2000).



R1	R2	R3	R4: -OCONH ₂	R4: -OCONHSO ₃	R4: -OH	R4: -H
H	H	H	STX	GTX5	dcSTX	doSTX
OH	H	H	NeoSTX	GTX6	dcneoSTX	-
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX1	C3	dcGTX1	-
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX2	C1	dcGTX2	doGTX2
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX3	C2	dcGTX3	doGTX3
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX4	C4	dcGTX4	-

STX: saxitoxin; GTX: gonyautoxin; dc: decarbamoyl; do: deoxydecarbamoyl

Figure 4 : Structure commune des phycotoxines paralysantes (Laabir et *al.*, 2013)

- L'acide okadaïque et le « DSP » Diarrhetic Shellfish Poisoning

L'acide okadaïque ou dinophysistoxine est responsable d'empoisonnement diarrhéique. Les symptômes associés sont des nausées, des vomissements et la diarrhée. Les genres responsables sont *Dinophysis* et *Prorocentrum*. L'acide okadaïque est un composé fortement cancérigène dont l'exposition répétée peut provoquer l'apparition de tumeurs à long terme (Landsberg et al 2005).

- La brevétoxine et le « NSP » Neurotoxic Shellfish Poisoning

La brevétoxine (PBTxs) est une neurotoxine ayant aussi une fonction hémolytique. Elle est produite par *Karenia brevis*, ou encore par le raphidophyte *Chattonella verruculosa*. Cette toxine provoque des vertiges, des douleurs abdominales ainsi que la dilatation des paupières et la diarrhée. (Landsberg et al 2005).

- Acide domoïque et le syndrome « ASP » Amnesic Shellfish Poisoning

L'acide domoïque est produit par la diatomée *Pseudo-nitzschia* et conduit à une perte permanente de la mémoire à court terme, ainsi qu'à l'altération des fonctions rénales chez les personnes âgées (Landsberg et *al.*, 2005).

3.2 : Impacts des toxines sur les écosystèmes aquatiques

Les HABs perturbent l'équilibre trophodynamique des écosystèmes aquatiques et causent la mortalité ou l'affaiblissement physiologique des animaux marins par de nombreux mécanismes. (Glibert et *al.*, 2005). Parfois des filaments de branchies des poissons et de

crustacés sont mortellement endommagés par certaines structures cellulaires de microalgues, causant ainsi des difficultés respiratoires, des hémorragies, ou des infections bactériennes (Zingone et Enevoldsen 2000). Les sécrétions de polymères extracellulaires d'espèces toxiques peuvent provoquer la mort de différentes manières, en formant par exemple, une barrière gélatineuse, réduisant ainsi la couche mucoïde, en entraînant le colmatage des branchies, ou encore en provoquant la défaillance du système osmorégulateur (Smayda et al.,1997).

L'augmentation de la biomasse algale à des niveaux très élevés conduit généralement à l'anoxie de l'écosystème et à l'asphyxie des organismes aérobies (Figures 5 et 6) (Glibert et al.,2005). La production des toxines par les HABs peut conduire non seulement à la mort des poissons mais peut aussi à celles des oiseaux et des mammifères marins tels que les dauphins, les baleines et otaries (Glibert et al.,2005). Certaines espèces de Raphidophytes telle que *Chattonella marina* produisent de l'oxygène pouvant être toxique car leur concentration peuvent être 100 fois plus élevés que la plupart des autres microalgues. (Liu et al.,2007). Les espèces du genre *Phaeocystis* produisent du diméthyl sulfide « DMS » qui participe à l'acidité des eaux de pluies (Baumann et al.,1994).



Figure 5 : Mérrou géant retrouvé mort sur la côte suite à un bloom de *Karenia brevis* en Floride en 2006. Photo : site de standeyo.com



Figure 6 : Mortalité massive de poissons suite à un bloom de *Cochlodinium polykrikoides* sur la côte iranienne du golfe Persique . Photo : Regional Aquaculture Information System (RAIS)

3.3 Impacts des toxines sur l'économie

Les HABs conduisent à de très grandes pertes économiques principalement dans le secteur de l'aquaculture (Navaro et al.,2006). Sur une période de 18 ans, les pertes mondiales au niveau de l'aquaculture se sont élevées à 100 millions \$ (US) jusqu'en 1989 (Smayda et al.,1997). Au Texas, le coût des soins hospitaliers pour les individus intoxiqués, la diminution du tourisme à cause de la détérioration de la qualité des eaux, et les pertes dans le secteur de

l'aquaculture sont estimés à 6 millions \$ (US) en 2003 (Glibert et *al.*,2005). En Floride, les blooms récurrents de *Gymnodinium breve* qui forme des marées brunes, causent des pertes de 20 millions \$ par épisode. En 1988, un bloom de *Chrysochromulina* dans les eaux côtières norvégiennes a été responsable de 10 millions d'Euro de pertes (Edwards et *al.*,2006). En 2005, le bloom d'*Alexandrium fundyense* a provoqué des pertes aquacoles de 18 millions de dollars au Massachusetts (USA) (Jin et *al.*,2008). Sur les côtes languedociennes, la direction des Affaires maritimes de l'Hérault a pris la décision d'une fermeture immédiate de la pêche, du ramassage et de l'expédition de tous les coquillages issus de la lagune de Thau suite au bloom d'*Alexandrium catenella* en 1998 (Abadie et *al.*,1999).

4. Principales causes de l'expansion géographique et temporelle des HABs

Les invasions biologiques s'accroissent et présentent un caractère irréversible qui en fait un des problèmes environnementaux majeurs de ce siècle, dont une des conséquences se traduit par l'homogénéisation à l'échelle globale des écosystèmes (Boudouresque 1999). Seules 16% des écorégions marines seraient exemptes d'espèces invasives (Molnar et *al.*,2008). Les HABs connaissent une expansion inquiétante. Depuis 1970, 5 fois plus de zones sont touchées par des HABs de type PSP (Figure 7) (Glibert et *al.*,2005).

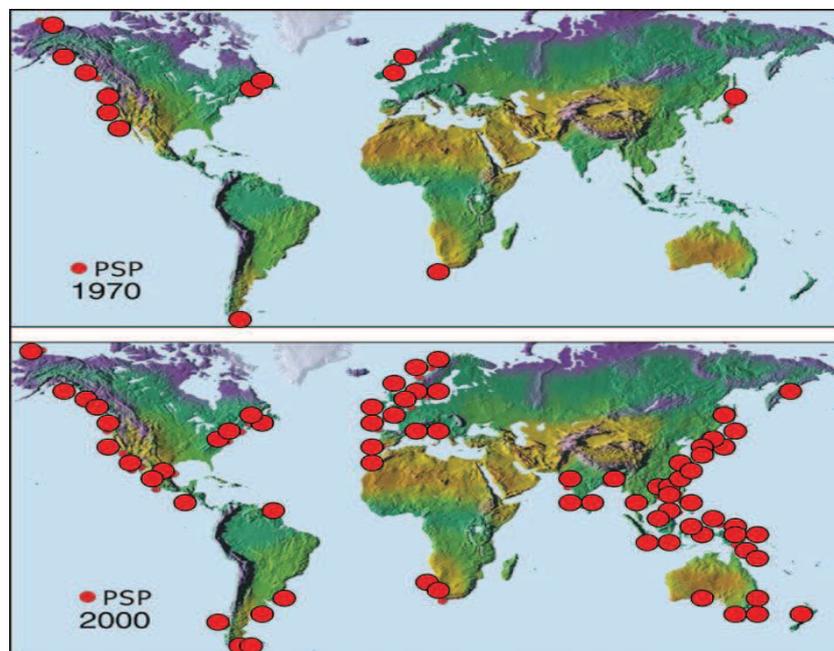


Figure 7 : Expansion mondiale des événements toxiques de type PSP enregistrés entre 1970 et 2000 (Glibert et *al.*, 2005)

L'expansion globale géographique et temporelle des HABs peut être expliquée par plusieurs facteurs. Par exemple, l'activité humaine à travers l'excès de pollution des eaux, dû au rejet d'éléments nutritifs provenant des pratiques aquacoles, agricoles et d'élevages intensifs, à la pêche excessive et aux déchargements des eaux de ballast. Les changements climatiques peuvent participer aussi à l'expansion des HABs. Cette expansion peut être considérée comme un phénomène naturel en rapport avec des propriétés physiologiques des microalgues. Un autre facteur pouvant expliquer cette prolifération est le développement actuel de nouvelles techniques analytiques des laboratoires permettant de détecter plus de HAB (Gilbert et *al.*, 2005).

4.1. Facteurs anthropiques

4.1.1. L'eutrophisation

L'eutrophisation est considérée comme l'un des facteurs les plus importants dans le changement des habitats naturels et l'expansion globale géographique et temporelle des HABs. (Glibert et *al.*, 2005). L'eutrophisation qui est un processus et non pas un état écologique, est définie comme étant l'enrichissement des eaux par les nutriments, spécialement les composés azotés et phosphorés causant ainsi l'accélération de la croissance du phytoplancton (Figure 7) (Smayda et *al.*, 2008). Le rejet croissant des eaux usées, des eaux de ruissellement provenant de l'agriculture, l'utilisation des fertilisants chimiques depuis les années 50, ont favorisé le phénomène d'eutrophisation. L'azote qui est fortement utilisé en agriculture est plus impliqué dans l'enrichissement des eaux que le phosphore, ce dernier étant souvent limitant pour la production primaire dans les eaux côtières (Glibert et *al.*, 2005). Par exemple, l'augmentation de l'utilisation de fertilisants azotés en Chine entre 1970 et 2000 (plus de 20 millions de tonnes d'azote par an) correspond à l'augmentation de la fréquence des événements de blooms toxiques (Figure 8) (Heisler et *al.*, 2008).

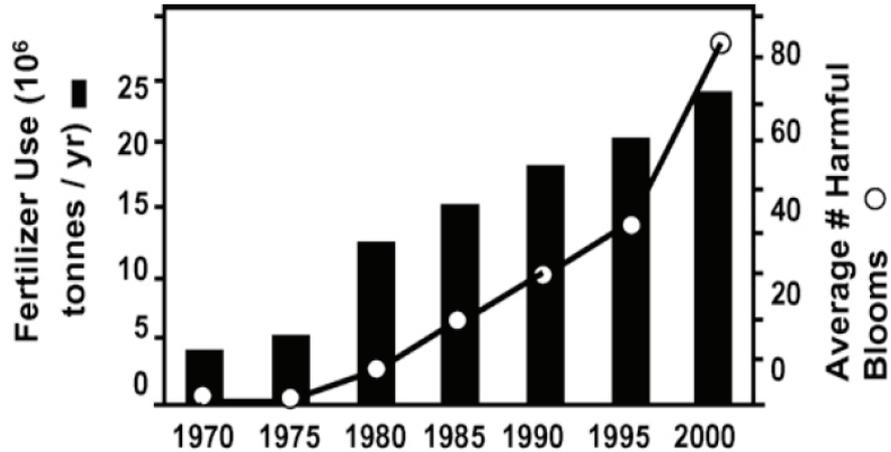


Figure 8 : Tendence à long terme de l'utilisation d'engrais azoté et évolution du nombre de proliférations formant des marées rouges dans les eaux côtières de Chine entre 1970 et 2000 (Heisler et *al.*,2008).

L'eutrophisation des eaux affecte le cycle de l'azote, du phosphore ainsi que les vitesses de production primaire, le flux d'énergie et l'écologie chimique de l'écosystème à travers la restructuration des assemblages de phytoplancton et en favorisant la prolifération d'espèces nuisibles, conduisant ainsi à l'émergence du phénomène de HAB et des marées colorées (Heisler et *al.*,2008). Un des mécanismes par lequel l'eutrophisation accentue les HABs est le changement du rapport N:P ou N:Si. (Glibert et *al.*,2005). Par exemple, dans les eaux côtières allemandes, l'augmentation du ratio N:P coïncide avec la diminution des diatomées et la prolifération du bloom de *Phaeocystis*, une espèce fortement invasive (Haisler et *al.*,2008).

4.1.2 Les changements climatiques

Les changements climatiques influencent directement la physiologie des HABs en accélérant leurs vitesses de reproduction et leur croissance, à travers l'augmentation de la température et l'installation de conditions de stratifications des eaux. Les régions de l'Atlantique nord, spécialement les eaux côtières norvégiennes, sont particulièrement sensibles aux changements climatiques. Des données climatiques enregistrées dans la mer du Nord ont montré que l'augmentation de la température de surface de la mer « SST » (plus 5°) coïncide avec l'apparition de marées rouges (Edwards et *al.*,2006).

La prolifération des blooms de Dinoflagellés est fortement associée au bouleversement des conditions hydrodynamiques océaniques dans les eaux côtières norvégiennes ; en effet, depuis la fin des années 80, cette région est fortement influencée par l'oscillation North Atlantic Oscillation « NAO », qui entraîne l'afflux des ressources océaniques. Ainsi les

oscillations du NAO et le réchauffement climatique gouvernent les fluctuations des HAB d'un stade exceptionnel à celui de tendance décadaire à long terme, conduisant à l'apparition de nouveaux régimes de successions phytoplanctoniques avec des blooms de dinoflagellés plus fréquents et plus précoces qu'auparavant (Edwards et *al.*, 2006).

4.1.3 Facteurs physiologiques internes liés aux HABs

Les espèces phytoplanctoniques responsables de HABs ont des stratégies morphologiques et physiologiques adaptatives qui améliorent leur survie et leur prolifération (Glibert et *al.*, 2005). Par exemple le désavantage écologique qui constitue la faible affinité avec les nutriments est contourné par des stratégies adaptatives comme les tendances mixotrophiques, la production de molécules allélopathiques, l'augmentation de la compétition interspécifique, l'amélioration des mécanismes de défense contre les prédateurs, la migration verticale, l'agrégation physique ou encore la détoxification des métaux (Smayda et *al.*, 1997).

II. Les Dinoflagellés et le genre *Alexandrium*

1. Les Dinoflagellés

Les Dinoflagellés constituent un groupe de phytoplancton unicellulaire eucaryote, possédant des flagelles. Les espèces les plus toxiques font partie de ce groupe. Les toxines produites par ces organismes provoquent chez l'être humain différents syndromes tels que le PSP, DSP, NSP et ASP. (Zingone et Enevoldsen 2000). Les conditions oligotrophes de la mer Méditerranée favorisent la prolifération des dinoflagellés qui sont des organismes typiques des eaux pauvres en nutriments (Maso et Garcés 2006). Les Dinoflagellés préfèrent les formes réduites de d'azote et ont de faibles affinités pour les nutriments. Pour contourner ces inconvénients, les dinoflagellés ont adopté des stratégies nutritionnelles alternatives comme la mixotrophie et l'hétérotrophie qui leur permettent d'être dominant dans un environnement où les nutriments inorganiques ne seront pas en quantité et qualité suffisantes pour satisfaire leurs besoins nutritionnels. (Maso et Garcés 2006).

2. Le genre *Alexandrium*

Le genre *Alexandrium spp* comporte environ 31 espèces, dont 9 sont responsables de PSP (Anderson et *al.*, 2012). Hormis les régions polaires, les autres régions se caractérisent par une majorité de blooms toxiques d'*Alexandrium spp*, généralement causés par les espèces *A. catenella*, *A. tamarense*, *A. fundyense*, ces trois dernières forment le complexe « *Alexandrium*

tamarensis ». La présence de ce complexe a été signalé dans les Hémisphères nord et sud, en Amérique du sud et du nord, en Afrique du sud, en Australie, en Inde, dans toute l'Asie particulièrement au Japon et enfin en Méditerranée (Lilly et al.,2007).

Il existe 5 clades géographiques principaux nommés d'après l'origine de la majorité des souches appartenant à une espèce donnée: le groupe I (clade Amérique du nord), le groupe II (clade méditerranéen), le groupe III (Europe de l'ouest), le groupe IV (Asie tempérée), le groupe V (Tasmanie) (Lilly et al.,2007). Certaines espèces du complexe *A. tamarensis* sont productrices actives de saxitoxines (Lilly et al.,2007).

3. Le genre *Alexandrium* en Méditerranée

Le pourtour méditerranéen est largement concerné par l'expansion des espèces phytoplanctoniques invasives responsables d'efflorescences nuisibles (Penna et al, 2005 ; Molnar et al., 2008). C'est le cas de l'espèce toxique *A. catenella* dont la distribution s'étend dans des sites fortement anthropisés (Penna et al.,2005). En Méditerranée, il répond à l'ensemble des critères définissant une espèce invasive : cosmopolitisme, population nouvelle, discontinuité géographique et large spectre écologique.

4. Les efflorescences d'*Alexandrium catenella/tamarensis* dans l'étang de Thau, France

La lagune de Thau, zone conchylicole majeure du sud de la France, est seule en France à être confrontée régulièrement à des proliférations d'*A.catenella/tamarensis*. La première efflorescence toxique s'est produite en 1998 (Abadie et al.,1999) Depuis, ces efflorescences apparaissent chaque année au printemps et/ou en automne avec des degrés variables d'intensité et de toxicité (Genovesi et al.,2011). Les souches isolées de 1998 à 2007 présentent une signature ribotypique similaire à celle du groupe IV (clade Asie Tempérée) identique à celle de souches isolées au Japon. Masseret et al (2009) ont montré pour la première fois grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites qu'à l'intérieur de ce groupe existaient trois lignées distinctes, une Française et deux asiatiques. La caractérisation du ribotype de 368 cultures monoclonales isolées en 2007 a mis en évidence pour la première fois de façon formelle la co-existence dans l'Etang de Thau des deux espèces *A. catenella* (groupe IV) et *A. tamarensis* du groupe III (clade Ouest Européen) (Genovesi et al.,2011).

5. Les efflorescences d'*Alexandrium* dans la baie d'Annaba, Algérie

Sur la côte méditerranéenne sud occidentale, plusieurs études ont été réalisées sur le phytoplancton marin toxique, en particulier au Maroc (Benouna et *al.*, 2000 et 2002) et en Tunisie (Turki et al 2007). Le genre *Alexandrium* forme régulièrement des blooms dans la baie d'Annaba (Figure 10) en Algérie (Frehi et *al.*, 2007) mais l'origine des espèces demeure encore inconnue.

6. Cycle de vie d'*Alexandrium* (Figure 9)

Les cellules végétatives mobiles sont haploïdes (phase 1). Dans des conditions spécifiques, généralement liées au stress, certaines cellules végétatives peuvent se transformer en kystes immobiles temporaires (phase 2) qui peuvent rapidement revenir au stade mobile quand les conditions s'améliorent. La phase sexuelle commence par la formation de gamètes (phase 3), dont la fusion (phase 4) forme un planozygote diploïde (phase 5). Selon les conditions environnementales, le planozygote peut se transformer en un kyste dormant (hypnozygote) (phase 6) ou, pour certaines espèces, peut subir une méiose et produire une cellule végétative (phase 1). Les kystes peuvent passer une période variable dans le sédiment et lors de la germination libérer une cellule mobile appelée planoméioocyte (phase 7) qui se divise à son tour pour produire des cellules végétatives (phase 1) (Figure. 9).

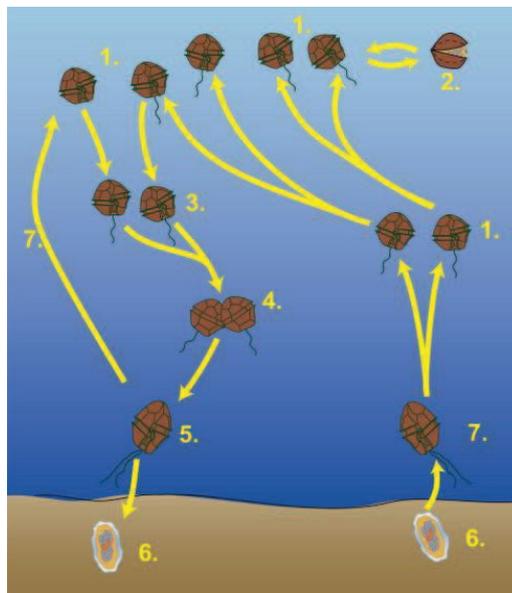


Figure 9 : Cycle de vie d'*Alexandrium catenella* (Anderson et al 2012)

III. Objectifs et organisation de la thèse

Actuellement, il est reconnu qu'au sein d'une même espèce existe une diversité génétique considérable (Glibert et *al.*,2005). Morphologiquement toutes les cellules peuvent apparaître similaires, mais les différences génétiques et la sélection environnementale agissent sur leurs différences et sélectionnent un génotype parmi d'autres (Gilbert et *al.*,2005). La recherche sur le phytoplancton se base généralement sur des mesures de paramètres comme la concentration en chlorophylle *a* ou l'assimilation du carbone minéral d'une espèce en culture. Cependant ces mesures globales masquent la variabilité qui peut exister entre les souches biologiques au sein de cette même espèce. Par conséquent, les paramètres physiologiques d'une seule culture monoclonale ont souvent été extrapolés à tous les autres représentants de l'espèce afin de pouvoir identifier des différences interspécifiques sans estimer la magnitude de la variabilité intra-spécifique (Tillmann et *al.*,2009). L'existence de variations intra-espèce et intra-populationnelle est un concept important pour l'interprétation écologique des interactions entre les espèces comme la compétition, l'allélopathie, la prédation ainsi que les dynamiques des populations. Des travaux récents se sont intéressés à cet aspect de diversité intraspécifique au sein des communautés phytoplanctonique afin de comprendre le succès et la pérennité des efflorescences toxiques (Varela et *al.*,2012, Alpermann et *al.*,2010, Aguilera-Belmonte et *al.*,2011). Les résultats de ces études laissent présager d'une importante capacité d'adaptation au service des processus d'invasion.

L'objectif général de cette recherche est **d'améliorer nos connaissances sur les causes d'introduction et les facteurs favorisant l'établissement et la récurrence des blooms d'*Alexandrium catenella*** à travers la comparaison des blooms de cette espèce sur deux sites contrastés au niveau trophique : la lagune de Thau caractérisée par un degré d'oligotrophie et la baie d'Annaba, nettement plus eutrophe. **Le rôle joué par la diversité intraspécifique** sera également abordé pour comprendre **la dynamique des efflorescences au sein du complexe d'*Alexandrium catenella/tamarensis***. Ces deux zones sont confrontées saisonnièrement à des proliférations du dinoflagellé côtier toxique *Alexandrium catenella/tamarensis*.

L'ensemble de la méthodologie utilisée tout au long de la thèse sera décrit dans le chapitre 2 « Matériels et méthodes ».

Dans le chapitre 3, les caractéristiques physicochimiques de la lagune de Thau et de la baie d'Annaba seront décrites dans le but de comprendre le développement d'*A. catenella* dans les deux écosystèmes, en examinant particulièrement la place d'*Alexandrium* au sein des communautés phytoplanctoniques. Pour cela la description des conditions environnementale (hydrologie, courantologie, état trophique) des deux sites études sera également présentée. Un cycle annuel réalisé en 2010-2011 sur le site d'Annaba permettra de répondre à ces objectifs. La comparaison des caractéristiques avec celles de Thau se fera à partir des données de suivi de terrain avec les mêmes paramètres réalisé la même année par Ifremer Palavas. Les réponses attendues sont celles autour (1) du statut trophique des stations d'échantillonnage au niveau de la baie d'Annaba et de la lagune de Thau, (2) du degré de perturbation des deux écosystèmes étudiés, (3) de la structure des assemblages phytoplanctoniques, (4) de la fréquence et l'abondance d'*Alexandrium* dans les deux sites, et (5) de l'origine du bloom d'*Alexandrium* associée aux caractéristiques environnementales permettant l'apparition du bloom.

La grande originalité du travail de thèse peut se définir par la **première caractérisation de l'espèce *Alexandrium catenella* à Annaba** avec des études morphologiques, génétiques, physiologiques et toxiniques, qui sera décrite dans le chapitre 4. La diversité intra spécifique au sein des souches d'*Alexandrium catenella* isolées sera abordée par un certain nombre de paramètres : taux de croissance, phase de latence, contenu toxinique, profils génétiques. Les réponses attendues sont celles particulièrement autour (1) de l'espèce d'*Alexandrium* présente dans la baie d'Annaba morphologiquement et génétiquement, (2) de la présence conjuguée (ou non) du complexe d'*Alexandrium catenella/ tamarense* à Annaba, comme déjà décrit dans la lagune de Thau, (3) du degré de variabilité des souches d'*Alexandrium* d'Annaba en terme de diversité intraspécifique.

Le chapitre 5 sera consacré exclusivement à **la variabilité intraspécifique de certaines caractéristiques physiologiques de *A. tamarense*** à partir de clones isolés de la lagune de Thau. A partir de plusieurs cultures monoclonales isolées le même jour au cours du bloom de mai 2007 au niveau de la crique de l'Angle dans la lagune de Thau, les analyses permettront de mieux comprendre la dynamique et les processus de colonisation de ce complexe d'espèces considérées comme invasives. Les réponses attendues seront celles autour de l'expression de cette variabilité (taux de croissance..) et de l'avantage écologique pouvant se dégager de cette

variabilité. Des expériences de croissance d'*A. tamarensis* de Thau ont été réalisées afin de mieux comprendre la dynamique de cette espèce à Thau, par rapport aux taux de croissance d'*A. catenella*. De ces expériences, les résultats attendus sont ceux autour (1) du type de variation de croissance chez *Alexandrium tamarensis*, (2) de la relation entre concentration en nitrates et croissance chez cette espèce, et (3) des avantages écologiques ou non d'une telle croissance vis à vis d'*A. catenella*.

Le chapitre 6 abordera l'**étude comparative entre la dynamique, présence, variabilité intraspécifique chez *Alexandrium catenella* de Thau et *A. catenella* d'Annaba**. Ce chapitre vise également à émettre des hypothèses concernant la dispersion ou l'introduction d'*Alexandrium* basée sur les résultats de la thèse et aidera à la compréhension du déterminisme des efflorescences observées sur les côtes méditerranéennes.

Enfin, le chapitre 7 (**conclusions et perspectives**) s'applique à discuter des résultats majeurs de ces travaux de doctorat et à exposer les perspectives envisagées suite à ces travaux de recherche.

Références bibliographiques

- ABADIE E., AMZIL Z., BELIN C., COMPS M.A., ELZIERE-PAPAYANNI P., LASSUS P., LEBEC C., MARCAILLOU-LE BAUT C., NEZAN E., POGGI R. 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*: Episode de novembre à décembre 1998. *Ifremer*, Plouzane, France, p. 44 .
- AGUILERA-BELMONTE A., INOSTROZA I., FRANCO J., RIOBO P., GOMEZ P. 2011. The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae* 12: 105–112.
- ALPERMANN T.J., TILLMANN U., BESZTERI B., CEMBELLA A.D., JOHN U. 2010. Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 46: 18–32.
- ANDERSON D.M., HARRISON P. 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16: 89–97.
- BABARAN R., ESPINOSA R. & ABALOS T. 1998. Initiating and triggering mechanisms causing harmful algal blooms. *Journal of Shellfish Research* 17: 1623–1626.
- BACKER L.C., FLEMING L.E., ROWAN A., CHENG Y.S., BENSON J., PIERCE R.H., ZAIAS J., BEAN J., BOSSART G. D., JOHNSTON D., QUIMBO R. & BADEN D.G. 2003. Recreational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events. *Harmful Algae* 2 : 19–28.
- BAUMANN M. E. M., BRANDINI F. P. & STAUBES R. 1994. The influence of light and temperature on carbon-specific DMS release by cultures of *Phaeocystis antarctica* and three Antarctic diatoms. *Marine Chemistry*. 45: 129–36.
- BENNOUNA A., ASSOBBHEI O., BERLAND B., EL ATTAR J. 2000. Étude des populations ; phytoplanctoniques de la lagune de Oualidia (Maroc) ; dinoflagellés potentiellement toxiques, *Marine Life* 10: 3-18.
- BENNOUNA A., BERLAND B., EL ATTAR J., ASSOBBHEI O. 2002. Eau colorée à *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge, dans une zone aquacole du littoral du Doukkala (Atlantique marocain). *Oceanologica Acta* 25 : 159–170.
- BOUDOURESQUE C.F. 1999. Introduced species in the Mediterranean: routes, kinetics and consequences. In: *Proceedings of the Workshop on Invasive Caulerpa in the Mediterranean*, pp. 51–72. UNEP, Athens.
- COLLOS Y., LESPILETTE M., VAQUER A., LAABIR M. & PASTOUREAUD A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *The African Journal of Marine Science* 28: 313-318.

- DOUCETTE G. J., MCGOVERN E. R. & BABINCHAK J. A. 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *Journal of Phycology*. 35: 1447-1454.
- EDWARDS M., JOHNS D.G., LETERME S.C., VENDSENE.S, RICHARDSON A.J. 2006. Regional climate change and harmful algal blooms in the northeast Atlantic. *Limnology & Oceanography*. 51(2): 820–829.
- FIELD C. B., BEHRENFELD M. J., RANDERSON J. T. & FALKOWSKI P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281 (5374): 237-240.
- FREHI H., COUTE A., MASCARELL G., PERRETTE-GALLET C., AYADA M., KARA M.H. 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie). *Comptes Rendus biologiques* 330: 615–628.
- FUKUYO Y. 2004. Morphology of red-tide organisms and their taxonomic difficulty. In: *Red tides* (Ed. By T. OKAICHI), pp 67–84. TerraPub/Kluwer, Tokyo.
- GENOVESI B., SHIN-GRZEBYK M.S., GRZEBYK D., LAABIR M., GAGNAIRE P.A., VAQUER A., PASTOUREAUD A., LASSERRE B., COLLOS Y., BERREBI P., MASSERET E. 2011. Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of *the Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *Journal of Plankton Research* 33: 405–414.
- GLIBERT P.M, ANDERSON D.M., GENTIEN P., GRANALI E., SELLNER K.G. 2005. The Global Complex Phenomena of Harmful algal Blooms. *Oceanography* 18: 136-147.
- GLIBERT P.M., HARRISON J., HEIL C., SEITZINGER S., 2006. Escalating worldwide use of urea—a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry* 77: 441–463.
- GLIBERT P.M., SEITZINGER S., HEIL C.A., PARROW M.W., CODISPOTI L.A., BURKHOLDER J.M., KELLY V. 2005. The role of eutrophication in the Global proliferation of Harmful algal Blooms. *Oceanography* 18: 198-209.
- HALLEGRAEFF G.M. 1995. Harmful algal blooms: a global overview. In: *Manual on harmful marine microalgae*. (Ed. by G.M. HALLEGRAEFF, D.M. ANDERSON, A.D. CEMBELLA), pp. 1-22. UNESCO, Paris.
- HASLE G.R. & FRYXELL G.A. 1995. Taxonomy of Diatoms. In: *Manual on Harmful Marine microalga*. (Ed. By G.M. HALLEGRAEFF, D.M. ANDERSON, A.D. CEMBELLA), pp 339-364. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Paris.
- HEISLER J., GLIBERT P.M., BURKHOLDER J.M., ANDERSON D.M., COCHLAN W., DENNISON W.C., DORTCH Q., GOBLER C.J., HEIL C.A., HUMPHRIES E., LEWITUS A., MAGNIEN R., MARSHALL H.G., SELLNER K., STOCKWELL D.A., STOECKER D.K., SUDDLESON M. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*. 8: 3-13.

- HIROISHI S., OKADA H., IMAI I., YOSHIDA.T. 2005. High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harmful Algae* 4: 783–787.
- ILLOUL H., MASO M., FIGUEROA R.I., VAN LENNING K. 2004. Detection of toxic *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) in Algerian waters (SW Mediterranean Sea), *Harmful Algae News* 29: 10-12.
- JIN D., THUNBERG E., HOAGLAND P. 2008. Economic impact of the 2005 red tide event on 660 commercial shellfish fisheries in New England. *Ocean & Coastal Management*. 51: 420-429.
- LAABIR M., COLLOS Y., MASSERET E., GRZEBYK D., ABADIE E., SAVAR V., SIBAT M., AMZIL Z. 2013. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs* 11:1583-1601.
- LANDSBERG J.H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*. 10: 113–390.
- LANDSBERG J., DOLAH F.V., DOUCETTE G. 2005. Marine and Estuarine Harmful Algal Blooms. In: *Impacts on Human and Animal Health in Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. (Ed. by Belkin & Colwell), pp 165-215. Springer, New York.
- LASSUS P. 1988. Plancton toxique et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes. *Ifremer*, Plouzane, France, p.111.
- LILLY E.L., HALANYCH K.M., ANDERSON D.M. 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 43: 1329-1338.
- LIU W., AU D.W.T., ANDERSON D.M., LAM P.K.S., WU R.S.S. 2007. Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 346: 76–86.
- MASO M. & GARCÉS E. 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*. 53: 620-630.
- MASSERET E., GRZEBYK D., NAGAI S., GENOVESI B., LASSERRE B., LAABIR M., COLLOS Y., VAQUER A. & BERREBI P. 2009. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 2037–2045.
- MOESTRUP O. & H.A. THOMSEN. 1995. Taxonomy of Toxic Haptophytes. In: *Manual on Harmful Marine microalga*. (Ed. By G.M. HALLEGRAEFF, D.M. ANDERSON, A.D. CEMBELLA), pp 319-338. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris.
- MOESTRUP O. & THOMSEN H.A. 2003 Taxonomy of toxic haptophytes (prymnesiophytes). In: *Manual on harmful marine microalgae*. (Ed. by G.M. HALLEGRAEFF, D.M. ANDERSON, A.D. CEMBELLA), pp 433–463. UNESCO, Paris.

- MOLNAR J.L., GAMBOA R.L., REVENGA C., SPALDING M.D. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6: 485–492.
- NAVARRO J. M., MUNOZ M. G. & CONTRERAS A. M. 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5 (6): 762-769.
- OUNISSI M., FREHI H. 1999. Variabilité du microplancton et des Tintinnida (protozoaires ciliés) d'un secteur eutrophe du golfe d'Annaba (Méditerranée sud-occidentale). *Cahier de Biologie Marine*. 40: 141-153.
- PENNA A., GARCE'S E., VILA M., GIACOBBE M.G., FRAG S., LUGLIE A., BRAVO I., BERTOZZINI E., VERNESI C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Marine Biology* 148: 13–23.
- PERL T.M., BEDARD L., KOSATSKY T., HOCKIN J.C., TODD E.C.D. & REMIS R.S. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine* 322 (25) : 1775–1780.
- RAIMBAULT P., BESSE MG., LOCHET F., NGUYEN T. 1990. Méthode d'analyse des sels nutritifs, variabilité à moyenne échelle du Bassin Algérien, observations hydrologiques, biologiques et chimiques. *Ifremer* 11: 12–69 .
- ROSALES-LOESSENER F., DE PORRAS E. & DIX M. 1989. Toxic shellfish poisoning in Guatemala. In: *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology* (Ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON & T. NEMOTO, pp. 113–117. Elsevier, New York.
- SELLNER K.G. 1997. Physiology, ecology, and toxic properties of marine cyanobacteria blooms. *Limnology & Oceanography* 42 : 1089–1104.
- SIMON N., CRAS A.L., FOULON E., LEMÉE R. 2009. Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes rendus Biologies*. 332: 159–170 .
- SIU G. K. Y., YOUNG M. L. C. & CHAN D. K. O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiology* 352: 117-140.
- SMAYDA T. J. 1997. Harmful algal Blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology & Oceanography* 42: 1137-1153.
- SMAYDA T. J. 1996. Dinoflagellate bloom cycles: what is the role of cellular growth rate and bacteria? In: *Harmful and toxic algal blooms*. (Ed. by T. YASUMOTO, Y. OSHIMA, Y. FUKUYO), pp. 331-334. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- SMAYDA T.J. 2008. Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae* 8: 140–151.

- SOURNIA A. 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In: *Harmful marine algal blooms*. (Ed. by P. LASSUS, G. ARZUL, E. ERARD, P. GENTIEN, C. MARCAILLOU), pp. 103-12. Lavoisier, Paris.
- SOURNIA A., CHRETIENNOT-DINET M. J. & RICARD M. 1991. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? *Journal of Plankton Research* 13 (5): 1093-1099.
- TAYLOR F.G.R., FUKUO Y., LARSEN J. 1995. Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. In: *Manual on Harmful Marine microalga*. (Ed. By G.M. HALLEGRAEFF, D.M. ANDERSON, A.D. CEMBELLA), pp 283-317. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Paris.
- TILLMANN U., ALPERMANN T.L., DA PURIFICAÇÃO R.C., KROCK B. & CEMBELLA A. 2009. Intra-population clonal variability in allelochemical potency of toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 8: 759-769.
- TURKI S., BALTI N., BEN JANET H. 2007. First bloom of dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Bizerte lagoon (northern Tunisia). *Harmful Algae News* 35: 7–9.
- URIBE P. & ESPEJO R.T. 2003. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 659-662.
- VARELA D., PAREDES J., ALVES-DE-SOUZA C., SEGUEL M., SFEIR A., FRANGOPULOS M. 2012. Intraregional variation among *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) strains from southern Chile: Morphological, toxicological and genetic diversity. *Harmful Algae* 15: 8–18.
- WANG X., LI Z., SU J., TIAN Y., NING X., HONG H. & ZHENG T. 2010. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere. *Biological Control* 52: 123-130.
- WANG X., ZHOU L.H., ZHENG T.L. & NING X.R. 2007. Lysis of *Alexandrium tamarense* mediated by bacteria in its phycosphere. *Acta Ecologica Sinica* 27: 2864–2871.
- ZINGONE A. & ENEVOLDSEN H.O. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management* 43: 725-748.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

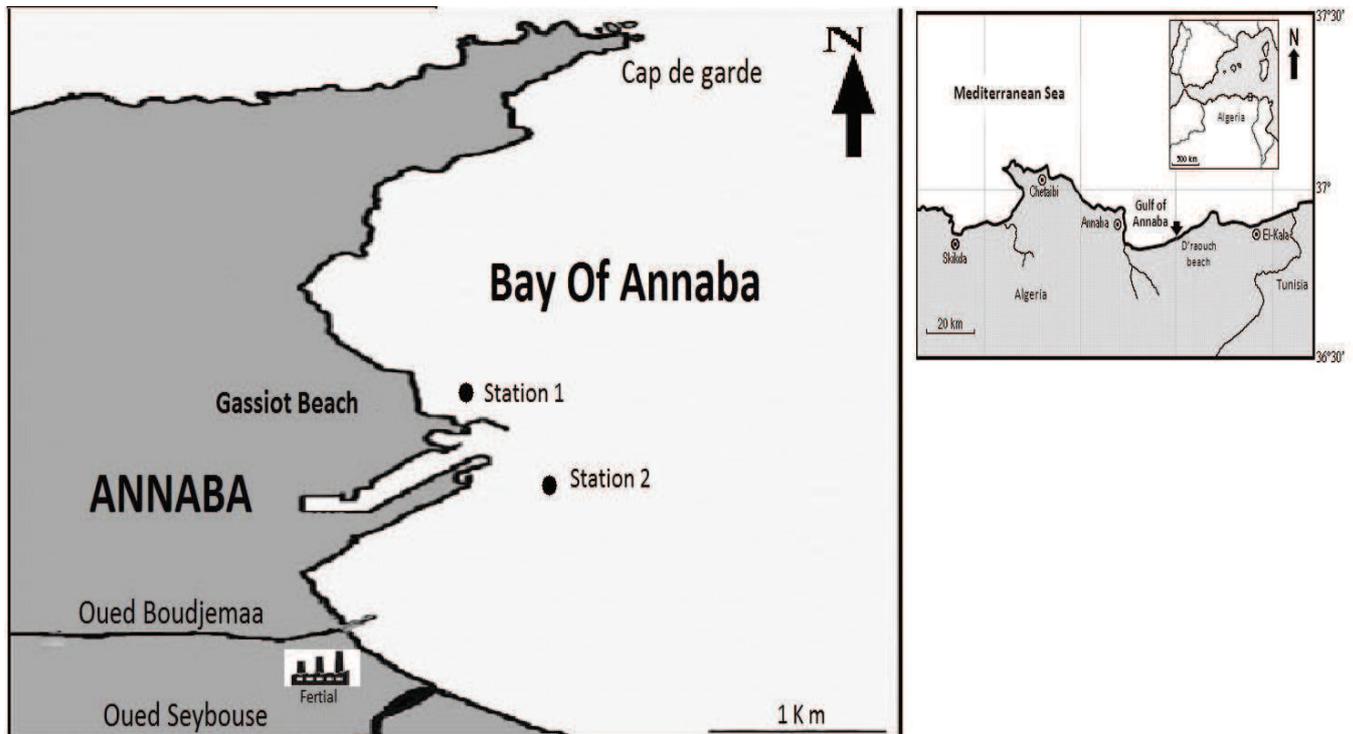
Etude des blooms d'*Alexandrium catenella* dans la baie d'Annaba

1. Echantillonnage

Un suivi de 13 mois, de janvier 2010 jusqu'à février 2011 a été réalisé aux 2 sites de la baie d'Annaba (Figure 1), les prélèvements ont été effectués avec un rythme semi mensuel.

Figure 1: localisation des stations en baie d'Annaba

2



. Choix et caractéristiques des stations

Tenant compte des caractéristiques physiques du milieu, citées plus haut, et des données physico-chimiques, et données publiées antérieurement sur les dinoflagellés par FREHI et *al.*, en 2007, deux stations susceptibles de contenir des kystes d'*Alexandrium* ont été choisies.

- La première station située derrière le port et en face de la plage Gassiot (Annaba), est abritée des vents dominants (Nord-Ouest) et reçoit des rejets urbains.
- La deuxième station située en face du port et soumise aux influences des apports continentaux (Oueds Seybouse, et Boudjemaa, qui reçoit les eaux usées

d'origine industrielle, ainsi que les eaux des agglomérations urbaines qui ne subissent qu'un traitement sommaire au niveau de la station de Sidi Brahim) d'une part et des effluents industriels d'autre part.

Les prélèvements sont effectués au niveau de 2 stations où FREHI et *al.*, (2007) ont observé un bloom d'*Alexandrium catenella*. Les caractéristiques des deux stations d'échantillonnages sont exposées dans le tableau 1.

Tableau 1. Positionnement, profondeur et nature du fond des stations étudiées de la Baie d'Annaba.

Stations		1	2
localisation (position GPS)	N	36°54.073'N,	36°53.976'N,
	E	007°46.929'E	007°47.111'E
Profondeur		- 5 m	- 13 m
Nature du fond		sableux	Vaseux

3. Prélèvement et conservation des échantillons

3.1. Paramètres physico-chimiques

A chaque station, les prélèvements d'eau pour l'analyse des éléments nutritifs (azote et phosphore), et des paramètres biologiques (pigments chlorophylliens), sont effectués en surface à l'aide d'un seau. Deux échantillons sont préalablement filtrés sur un filet à plancton de 63 µm de vide de maille :

- Le premier échantillon, de 100 ml, destiné au dosage de l'ammonium (NH_4^+), et conservé dans des flacons en verre brun. Il est fixé par l'addition de 3 ml d'une solution d'hypochlorite de sodium et de 3 ml de phénol (Koroleff 1969).
- Le deuxième échantillon, de 500 ml est destiné au dosage des ions (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^-) flacon en verre, l'échantillon est conservé à l'abri de la lumière dans une glacière, puis congelé à - 20° C et à l'obscurité jusqu'au dosage.

3.2. Prélèvement du phytoplancton

Pour l'étude qualitative du phytoplancton d'Annaba, on a appliqué des traits horizontaux dans les eaux de surface à raison d'un volume de 30 L d'eau filtrés par un filet à

plancton de 20 μm (vide de maille).

Pour l'étude quantitative et lors des proliférations, un volume d'eau de surface (40 litres) est prélevé à l'aide d'un seau, puis filtré sur un filet à plancton de 20 μm de vide de maille. L'échantillon est remis en suspension dans un volume de 100 ml, puis le comptage est effectué sur des volumes de 1 ou 5 ml selon la concentration de l'échantillon.

L'objectif est de se limiter aux tailles supérieures à 20 μm , en raison de la dominance des formes microplanctoniques, notamment dans les milieux eutrophes (Raimbault et *al*, 1988). Les échantillons ont été immédiatement transférés et conservés dans des flacons en verre contenant du formaldéhyde à 5%, afin de bloquer la division du phytoplancton.

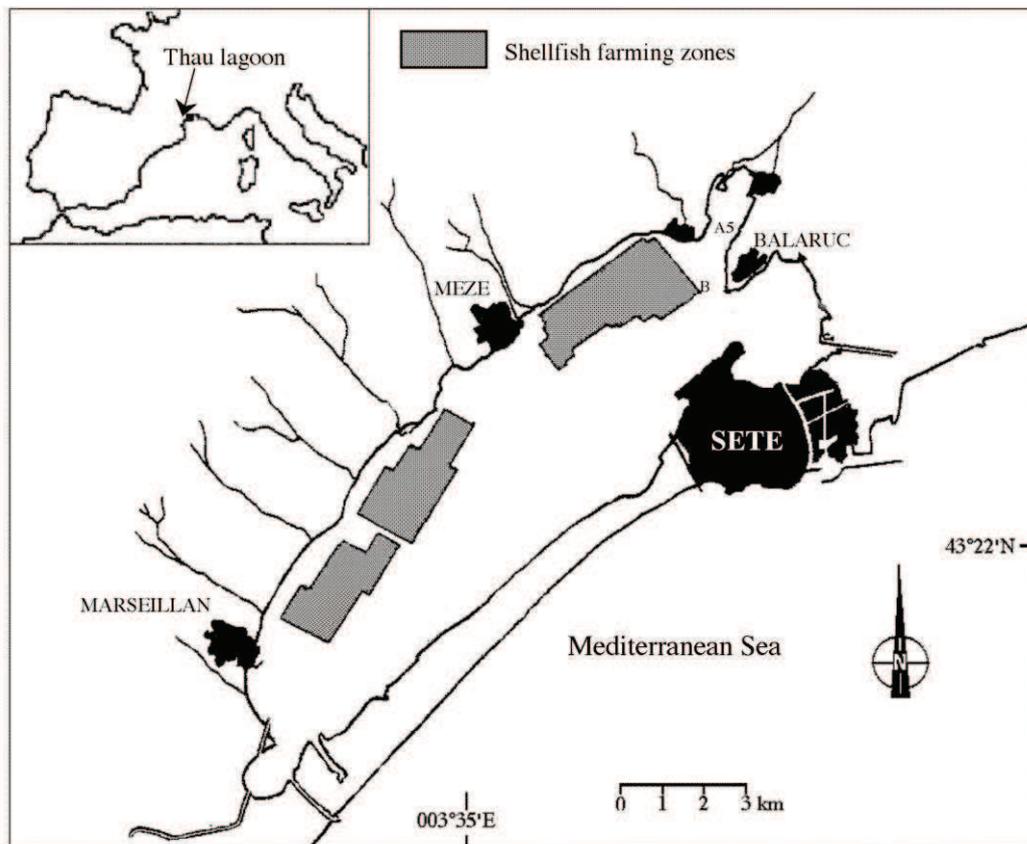


Figure 2 : localisation de la station B dans la lagune de Thau

A Thau, au moins un litre d'eau est prélevé en surface à la station B (Figure 2), à un rythme semi-mensuel. Pour l'analyse quantitative, 100 ml sont fixés avec 0,2 à 0,4 ml de Lugol. Une cellule de sédimentation est remplie avec l'échantillon selon Utermohl (1958). Les cellules de phytoplancton supérieures à 10 μm sont comptées par microscopie optique.

3.3. Méthodes de mesures

3.3.1. Facteurs hydrologiques

Une sonde multiparamètres type WTW 197i, d'une précision de 0.01 mg.L⁻¹ pour l'oxygène, 0,1 C° pour la température et 0,1 PSU pour la salinité, a été utilisé pour mesurer ces variables.

3.3.2. Paramètres chimiques

3.3.2.1. Phosphate

Le phosphate minéral dissous dans l'eau de mer est essentiellement sous forme d'orthophosphates (HPO₄²⁻ et PO₄³⁻).

La méthode utilisée pour le dosage des orthophosphates a été mise au point par Murphy et Riley (1962). Les ions orthophosphates sont susceptibles de réagir avec le molybdate d'ammonium en milieu acide pour former un complexe jaune, le phosphomolybdate d'ammonium. La réduction de ce complexe, génère une coloration bleue. L'utilisation de l'acide ascorbique comme agent réducteur donne les résultats les plus reproductibles et il a l'avantage de pouvoir être utilisé dans un réactif unique : molybdate d'ammonium, acide ascorbique, acide sulfurique et antimonyl tartrate de potassium. L'antimoine fourni par l'antimonyl réduit le temps de développement de la coloration de 24 h à quelques minutes, est mesurée à 880 nm au spectrophotomètre JENWAY-6310

3.3.2.2. Nitrate et nitrite

- A. Selon la méthode de WOOD et *al.*, (1967), le nitrate est réduit (dans une proposition de 98% d'après les auteurs) en nitrite qui est à son tour déterminé colorimétriquement (longueur d'onde de 540 nm) après diazotation avec la sulfanilamide et copulation avec le naphthyl-éthylène diamine suivant la technique de Bendschneider et Robinson (1952). Le réducteur est une colonne réductrice remplie de cadmium granulé dont la taille est comprise entre 0.25 et 0.35 mm, selon le protocole de préparation de la colonne de cadmium. Le débit de l'échantillon est de 0.80 ml.mn⁻¹.
- B. Selon Collos et *al.*, (1999) (Méthode de mesure par UV), Les mesures des concentrations de nitrate sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi U3000. Après filtration d'un échantillon de 6 ml de culture sur 0,2 µm (Acrodisc Pall Gelman Ref. 4192), le dosage se fait par spectrométrie d'absorption à 220 nm. Cette méthode est basée sur l'absorption des radiations ultraviolettes par les ions nitrate

(Collos et *al.*, 1999). La concentration en nitrate est estimée en référence à une droite d'étalonnage établie avec l'eau de base du milieu de culture ; l'eau AW. Cette droite est associée à une équation permettant de calculer la concentration en nitrate à partir des valeurs mesurées de l'absorption $\mu\text{mol NO}_3 \text{ (N/l)} = (A_{1\text{cm}}^{220\text{nm}} * 281) - 24$.

3.3.2.3. L'ammonium NH_4^+

Le dosage est basé sur la réaction de Berthelot (1859). En milieu basique, les ions ammonium sont transformés totalement en ammoniac. L'ammoniac dissous réagit avec les ions hypochlorite ClO^- pour former les monochloramine. Ce composé réagit avec les ions phénolate et en milieu oxydant, forme du bleu d'indophénol, de couleur bleue, que l'on peut doser par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 630 nm Selon la méthode de Koroleff (1969).

3.3.3. Les pigments

La chlorophylle a est mesurée par spectrophotométrie (Lorenzen, 1967) à Annaba, et par fluorimétrie (Holm-Hansen et *al.*, 1965) ou spectrofluorométrie (Neveux et Lantoine 1993) à Thau sur des extraits acétoniques à 90%.

3.3.4 Analyse qualitative et identification du phytoplancton

Dans un premier temps les échantillons destinés à la détermination des espèces ont été analysés comme suit. Après sédimentation des espèces phytoplanctoniques formolées (5%) au fond du flacon, une goutte d'eau est prélevée au fond à l'aide d'une pipette après homogénéisation. Cette goutte est déposée entre lame et lamelle puis observée au microscope inversé aux objectifs 40 et 100. Suivant la morphologie des Dinoflagellés observés, la détermination des espèces a été faite au laboratoire de Bioressources Marines (LBM) de l'Université Badji Mokhtar Annaba à partir des travaux de FREHI (2007; dans ce présent travail, on s'est limité à l'identification de deux principaux groupes phytoplanctoniques : Les diatomées et les dinoflagellés ;

L'étude quantitative a été faite selon la méthode de sédimentation d'Utermöhl (1958). Pour la numération cellulaire, des chambres de sédimentation de 500 et 1000 μl ont été utilisées ; après un temps de sédimentation de 16 à 24 heures, on a procédé sous microscope, au grossissement $\times 10$, à un dénombrement des cellules réparties sur la toute la surface de la cuve. Ce dénombrement n'a concerné que les échantillons où on a noté la présence d'*Alexandrium catenella*

3.3.5. Indices écologiques

- A. L'**abondance** : elle est exprimée en nombre de cellules phytoplanctonique par unité de volume (ind.L⁻¹).
- B. La **dominance** (D) est déterminée comme suit : $D (\%) = n/N \cdot 100$
n : nombre d'individus d'un groupe considéré ; N : nombre total d'individus dans l'échantillon.
- C. **Indice de diversité** : plusieurs indices de diversité sont utilisés et permettent de donner une expression quantitative de la structure des communautés étudiées. Dans ce présent travail, nous avons utilisé l'indice de Shannon et l'indice d'équitabilité de Piélou. Ces indices considèrent à la fois l'abondance et la richesse spécifique.

Indice de Shannon-Wiener :

L'indice de Shannon-Wiener est le plus couramment utilisé et est recommandé par différents auteurs (Gray et *al.*, 1992). Il est donné par la formule suivante :

$$H' = - \sum P_i \times \log_2 P_i = \sum ((n_i/N) \times \log_2 (n_i/N))$$

Où :

P_i = abondance relative de l'espèce : $P_i = (n_i/N)$

n_i = nombre d'individus d'une espèce dans l'échantillon;

N = nombre total d'individus de toutes les espèces dans l'échantillon.

L'indice de Shannon permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces. Ainsi, une communauté dominée par une seule espèce aura une valeur de coefficient moindre qu'une communauté dont toutes les espèces ont des abondances comparables. La valeur de l'indice varie de 0 (une seule espèce, ou bien une espèce dominant très largement toutes les autres) à $\log_2 S$ (S = nombre total d'espèces) lorsque toutes les espèces ont une même abondance.

Indice d'équitabilité de Piélou :

Cet indice d'équitabilité permet de mesurer la répartition des individus au sein des espèces, indépendamment de la richesse spécifique. Sa valeur varie de 0 (dominance d'une des espèces) à 1 (équirépartition des individus dans les espèces). (Blondel et *al.*, 1979).

$$E' = H' / H'_{\max} \quad H'_{\max} = \log_2 S \quad (S = \text{nombre total d'espèces}).$$

II. Obtention du matériel biologique de la baie d'Annaba

1. Echantillonnage

Afin de répondre à l'un des objectifs qui est la création d'une bibliothèque de souches et pour obtenir le matériel biologique nécessaire à toute l'étude d'*Alexandrium* d'Annaba et de sa biodiversité physiologique sur le site d'étude Algérien, on a eu recours à la germination des kystes présents dans le sédiment du golfe d'Annaba.

Le genre *Alexandrium* étant connu pour être très sensible à la turbulence, il est très risqué et presque impossible de retrouver des cellules végétatives vivantes après transfert via les moyens de transport habituels (bateaux, avion). De plus l'établissement d'un bloom d'*Alexandrium* n'est pas garanti tous les ans.

Les prélèvements sont effectués au niveau des 2 stations où la campagne d'échantillonnage décrite précédemment est réalisée, à l'aide d'une benne de type Eckman sur les dix premiers centimètres du fond. Trois coups de bennes ont été réalisés à chaque station, correspondant aux 3 angles d'un triangle d'un mètre de côté. La benne est mise à l'eau verticalement avec les mâchoires ouvertes, un messenger (masse métallique) est utilisé pour la fermeture des mâchoires. Un phénomène de lessivage a été observé sur les rebords de la benne lors de la remontée. Les échantillons sont déposés dans des boîtes hermétiques en plastique et conservés au froid à 4°C.

2. Protocole d'obtention de cultures monoclonale d'*Alexandrium* à partir du sédiment récolté

Les 6 échantillons du sédiment récoltés à partir des 2 stations ont été mis en culture en triplicata. Un contrôle quotidien durant 1 mois a été réalisé afin de détecter les échantillons qui contiennent une forte concentration en kystes d'*Alexandrium*. Une fois l'échantillon concentré déterminé, une mise en culture dans 4 erlens est réalisée par semaine et incubé durant 4 jours.

2.1 Milieu de culture utilisé

Afin de faire germer les kystes potentiels qui seraient présents dans le sédiment et d'obtenir notre matériel biologique, des essais de culture ont été réalisés pour mettre en place un protocole standard qui permettra l'obtention de cultures monoclonales d'*Alexandrium*.

Le milieu de culture utilisé est l'eau de la lagune de Thau filtrée sur 0,2 µm, autoclavée et enrichie avec des solutions nutritives (ESNW), ainsi qu'une solution de germanium à 10% afin d'éviter le développement des diatomées.

2.2 Mise en culture

- Peser 3 g de sédiment dans des erlens de 200 ml afin d'obtenir une surface d'échange assez importante pour la germination des kystes. Ajouter 90 ml du milieu ESNW et 10 ml de solution de germanium.
- Bien mélanger le sédiment dans le milieu de culture, et incuber à $20\pm 1^\circ\text{C}$ durant 6 jours. L'aération est assurée par simple diffusion à travers un léger dévissage des bouchons, sans agitation (les cellules d'*Alexandrium* sont négativement affectées par la turbulence). L'éclairage est assuré par une rampe de 5 tubes fluorescents dont l'émission lumineuse se situe dans une gamme d'onde de 400 à 700nm. L'intensité lumineuse délivrée par ce dispositif est de $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (12h de lumière et 12h d'obscurité).

2.3 Isolement

- Au bout du 4^{ème} jour de culture, agiter légèrement l'erien contenant le sédiment, pour que les cellules remontent en surface, laisser sédimenter de nouveau durant 1h, puis prélever le jus de sédiment sur les bords de l'erien là où il peut y avoir des concentrations de cellules d'*Alexandrium* qui forment des voiles sur les surfaces du côté éclairé.
- Préparer une plaque de 48 puits à partir de ces prélèvements à raison de 300 μl de jus de sédiment par puits. Cette étape nous sert à récolter toutes les cellules mobiles, à ce stade on utilise de gros volumes (300 μl) pour maximiser les chances d'avoir le plus de cellules possible d'*Alexandrium* à partir du jus de sédiment.
- Repérer chaque puits (plaque 48 puits) contenant des cellules d'*Alexandrium*.

2.4 Repiquage

Pour les besoins de l'isolation, les cellules végétatives, issues de différentes germinations, sont repiquées régulièrement afin d'éliminer les organismes, tels que les diatomées et les cryptophytes qui constituent un facteur limitant la croissance d'*Alexandrium sp.*

- Passage pluriclonal aux plaques 96 puits

Le contenu des puits qui contiennent des cellules d'*Alexandrium* et qui proviennent de la plaque 48 est transféré dans 10 puits de la plaque 96 contenant chacun 100 μl de milieu de culture à raison de 30 μl de jus de sédiment par puits. Cette dilution permet de séparer les

cellules d'*Alexandrium* des autres dinoflagellés et donc d'avoir des puits uniquement avec des cultures de l'espèce visée. Les souches dans le jus de sédiment étant souvent sous forme de cellule unique et en mauvais état, on aura tendance à concentrer plus d'une cellule dans un puits pour avoir dans un premier temps des cultures pluriclones qui une fois isolées en phase exponentielle pourront survivre au choc du transfert de la cellule unique et se multiplier afin d'avoir des cultures monoclonales. Trois jours après le transfert des cellules d'*Alexandrium* dans les plaques 96, on observe leur état et leur concentration, puis on ajoute 100 µl de milieu de culture dans chaque puits.

- Passage pluriclonal aux plaques 48 puits

Après 4 jours de culture dans les plaques 96 puits, 100 µl de culture sont prélevés dans chaque puits, puis transférés dans des puits des plaques 48 contenant chacun 500 µl de milieu de culture. Pour conserver le stock de culture, 100 µl de milieu de culture sont rajoutés aux 96 puits.

- Obtention des cultures monoclonales

On procède à une vérification de la densité et de l'état des cellules d'*Alexandrium* dans les plaques 48 puits contenant les cultures pluriclones.

On dilue 30 à 100 µl de cultures pluriclones présentes dans la plaques 48 puits dans 4,5 ml de milieu de culture dans une boîte de pétri stérile. A l'aide d'une pipette pasteur à bout incliné et équipée d'un tuyau en plastique d'un diamètre de 0,5 cm, on procède à l'isolement des cellules en chaînes une à une puis elles sont inoculées dans les puits de la plaque de 96. Après 3 jours, les cellules d'*Alexandrium* transférées sont observées et leur état et concentrations vérifiés. On rajoute 100 µl de milieu de culture dans chaque puits. Cette étape constitue la première formation de cultures monoclonales.

- Passage monoclonal aux plaques 48 puits

Après 7 à 10 jours de culture dans les plaques 96 puits, les cultures d'*Alexandrium* sont assez concentrées pour être transférées vers un volume plus grands. Pour cela 100 µl de culture de chaque puits sont prélevés et transférés dans des plaques à 48 puits contenant chacun 400 µl de milieu de culture. Un entretien et un contrôle régulier des cultures ont été effectués.

- Passage aux erlens

Après 5 à 7 jours de culture dans les plaques 48 puits, transférer 300 µl de culture dans des erlens (flacon de culture de 50 ml) contenant 10 ml de milieu de culture. Tous les 4 jours on vérifie la densité cellulaire dans les erlens et en fonction du nombre des cellules on ajoute 10

ml de milieu de culture. Dans le cas où la densité cellulaire reste faible, on ajoute encore 300µl d'inoculum (enrichissement) à partir de la plaque 48 puits. On répète l'opération jusqu'à l'obtention d'une culture dense de 40 ml. L'opération prend en tout 3 semaines environ.

III. Caractérisation des souches d'Annaba

1. Caractérisation morphologique

Un marquage au calcofluor (1%) a été réalisé sur 11 souches monoclonales différentes d'*Alexandrium* obtenues à partir de la germination de kystes présents dans le sédiment de la baie d'Annaba. Le calcofluor marque les plaques thécales des micro-algues (Frtiz et Triemer, 1985), ce qui permet de déterminer leur morphologie, après observations au microscope à épifluorescence, et donc de différencier les souches entre elles. En effet, les souches d'*Alexandrium tamarense* se caractérisent par la présence d'un pore ventral entre les plaques intercalaires 1' et 4' alors que les souches d'*Alexandrium catenella* ne sont pas dotées de pore ventral., (Anderson et al., 2012)

2. Caractérisation génétique

2.1 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN de 11 cultures monoclonales d'*Alexandrium* obtenues à partir du sédiment d'Annaba a été réalisée par la méthode classique d'extraction au phénol-chloroforme (Sambrook et al., 1989). Après libération du matériel cellulaire par lyse enzymatique par la protéinase K, l'ADN est séparé des protéines par extraction au phénol. Celui-ci est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme qui est non miscible dans l'eau. La séparation des phases aqueuse et organique est faite par centrifugation. La phase aqueuse contient l'ADN qui est finalement récupéré sous forme solide suite à sa précipitation par l'alcool éthylique.

2.2 Détermination du ribotype par amplification par PCR pour le séquençage

Afin de séquencer l'ADN de 11 souches d'*Alexandrium* obtenues, on a utilisé deux amorces spécifiques de l'ADNr codant l'ARNr 28S de la grande sous-unité du ribosome d'*Alexandrium*, décrites par Scholin et al., (1994) et nommées D1R et D2C.

On prépare 50µl de milieu réactionnel en ajoutant successivement 5µl de tampon 10X (10 représente le facteur de dilution d'utilisation du tampon et X l'unité de concentration souhaitée), 5µl de dNTPs (0,2 mM) (désoxyriboNucléotide Tri Phosphate), 2,5µl de MgCl₂,

2µl d'amorces D1R (0,5µM), 2µl d'amorces D2C (0,5µM), 31,9µl d'H₂O, 0,6µl de l'enzyme thermostable Taq polymérase (M1661, Promega, Madison, Wisconsin, USA) et 1µl d'extrait d'ADN.

Le milieu réactionnel est placé dans un thermocycleur qui permet une automatisation des différentes étapes de la PCR. Une première étape (5 min, 95°C) dénature l'ADN. Ensuite, 30 cycles successifs comprenant chacun 3 phases consécutives ont lieu. Tout d'abord une phase (1 min, 95°C) finalise la dénaturation de l'ADN par la chaleur. Puis une phase (1,5min, 45°C) correspond à l'hybridation des simples brins avec les deux amorces spécifiques. Ces deux amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 700 paires de base (pb) chez le genre *Alexandrium*. D1R présente la séquence 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3' (Amorce forward). D2C correspond à la séquence 5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA-3' (amorce reverse). La troisième phase (1 min, 72°C) est l'extension du nouveau brin par une ADN polymérase : la Taq polymérase à partir des amorces. Enfin une dernière étape (5 min, 72°C) consiste à finaliser la phase d'extension afin d'obtenir des fragments d'ADN doubles brins complets.

2.3 Séquençage et traitement

Les produits de la PCR D1 D2 des 11 souches ont été envoyés et séquencés au laboratoire GenoScreen (Lille, France), en utilisant le séquenceur génétique ABI 3730XL. L'alignement et le traitement des séquences se fait avec le logiciel MEGA.

3. Dosage des toxines

26 cultures monoclonales denses en phase exponentielle sont centrifugées dans des tubes Falcon à 3000 tr/min à 4°C durant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est transvasé dans des tubes de 2 ml. 1 ml d'acide acétique 0,5N est ajouté dans chaque tube et conservé à - 80°C. Les échantillons sont ensuite envoyés dans la carboglace au laboratoire de Phycotoxines, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines (EMP/PHYC), IFREMER à Nantes. Dans ce laboratoire le profil toxinique des souches est déterminé par Chromatographie Liquide couplée à un détecteur de fluorescence (CL/FLD) et/ou à un Spectromètre de Masse en tandem (CL-SM/SM).

IV Calibration et Suivi croissance

1. Milieu de culture et ensemencement

- Composition du milieu de culture

L'eau de mer artificielle ESAW correspond au milieu décrit par Andersen et *al.*, (2005). Nous avons choisi ce milieu artificiel afin de minimiser les molécules organiques azotées qui

peuvent être utilisées par *A. catenella*, et ainsi obtenir une meilleure reproductibilité de croissance et pour éviter les biais pouvant être liés à la variabilité de l'eau naturelle (Karentz, 1983). Ce milieu est préparé à partir de la base AW (Artificial Water) autoclavée dont la salinité est ajustée à 38‰. Pour chaque litre d'eau artificielle on ajoute les éléments nutritifs suivants :

- 1 ml de NaNO₃ (source d'azote) (concentration finale de 500 μM)
- 1 ml de Na₂HPO₄ (source de phosphore)
- 1 ml de Vitamines
- 1 ml d'oligo-élément
- 1 ml d'ETDA Fer

Ces solutions d'éléments nutritifs sont filtrées à 0,2 μm avant de les ajouter au milieu.

- Ensemencement des cultures

L'ensemble des inoculations effectuées lors de cette expérience, sont réalisées en milieu stérile sous hotte à flux laminaire. Toutes les cultures utilisées sont monospécifiques mais non axéniques. Le volume de l'inoculum choisi pour le repiquage permet d'obtenir une densité cellulaire de départ de l'ordre de 200 cellules par ml.

2. Conditions de cultures

- Mode de culture

C'est la « culture batch » c'est-à-dire que les sels nutritifs sont apportés en totalité au temps t_0 sans être renouvelés par la suite.

- Agitation

Il a été montré que le taux de croissance d'*Alexandrium* est affecté par la turbulence à petite échelle (Hu et al., 2006). Comme les cellules s'accumulent en surface, une agitation modérée est pratiquée avant l'échantillonnage.

- Aération

Elle est réalisée par simple dévissage des bouchons des flacons.

- Eclairage et température

Les cultures sont disposées dans une salle climatisée. L'éclairage artificiel est assuré par des tubes à diodes électroluminescentes permettant d'avoir une gamme d'onde de 400 à 700 nm. L'intensité lumineuse incidente délivrée par ce dispositif est de 100 μE.m⁻².s⁻¹. La photopériode appliquée aux cultures est constituée d'une phase éclairée de 12 h (8h00 à 20h00). La température de l'enceinte de culture est régulée à 20 + ou - 1°C.

3. Calcul des taux de croissances

Le taux de croissance est estimé à partir de régressions linéaires entre le temps et le log naturel des biomasses (densités cellulaires ou concentrations en chlorophylle ou FIV). Dans un tableur, les données brutes de biomasse transformées en log naturel sont portées en ordonnées et le temps porté en abscisse. Les points qui ne sont pas alignés (phase de latence et phase stationnaire) sont rejetés visuellement. L'équation de la droite de régression est calculée à partir de tous les points, les points non alignés sont supprimés un par un, en optimisant le coefficient de détermination et en gardant au moins 3 points.

La pente de la régression donne le taux de croissance μ en unité de temps⁻¹

Equation: $\mu = \ln (Cf/Co)/\Delta t$

Avec Cf = biomasse finale, Co = biomasse initiale et Δt = intervalle de temps (Guillard, 1973).

4. Dénombrement cellulaire

Les dinoflagellés étant mobiles, il faut les fixer pour pouvoir les compter. Pour cela on homogénéise les cultures en les remuant doucement, puis on prélève 2 ml (en conditions stériles sous hotte à flux laminaire) que l'on met dans un tube à essai avec 2 gouttes de formol. Ceci permet de les fixer et de conserver les formes en chaînes. Les cellules algales sont dénombrées sur une cellule de Nageotte. Le milieu liquide contenant les cellules est placé entre la cellule et la lamelle. Chaque comptage est effectué en triplicata pour garantir un résultat le plus fiable possible.

Cependant cette méthode est longue. Du fait de la grande quantité d'échantillons, et de la petite taille des dinoflagellés, la croissance des algues cibles a été suivie par mesure de la fluorescence avec un spectrofluorimètre. Ce dernier est préalablement étalonné par mesure de la fluorescence de cultures à concentration connue des algues cibles. Ainsi le comptage avec la Nageotte va servir à l'établissement des courbes d'étalonnages et à déterminer les volumes initiaux d'inoculation des cultures à suivre.

5. Etablissement des courbes d'étalonnages

Deux séries de six dilutions sont réalisées dans du milieu ESAW pour chacune des souches étudiées. La fluorescence de chaque dilution est mesurée avec le spectrofluorimètre. On obtient des valeurs de coefficient de détermination R^2 et une équation pour chacune des droites de régressions correspondant aux courbes d'étalonnages. L'équation de la droite qui a

la plus grande valeur de R^2 est prise en considération. Cette équation est utilisée pour trouver le nombre de cellules correspondant à la fluorescence mesurée pour chacune des souches.

6. Mesure de la fluorescence in vivo FIV

La mesure de fluorescence *in vivo* (FIV) se fait avec 6 ml de culture à l'aide d'un spectrofluorimètre LS50B Perkin Elmer. On mesure une fluorescence de la chlorophylle totale excitée à une longueur d'onde de 470 nm, qui émet un signal à 680 nm. Les mesures de fluorescence sont effectuées 3 fois par semaine pour leur épargner les contraintes possibles liées à l'agitation au moment des prélèvements.

La méthode décrite précédemment est fiable pour l'estimation de la FIV, mais afin de gagner du temps et surtout du volume de culture utilisé lors de l'analyse, on a procédé à des mesures de FIV au spectrofluorimètre LS50B Perkin Elmer en parallèle à des mesures de FIV au lecteur de plaque (multi puits) Tecan Infinite M 200 sur les mêmes échantillons. Cet appareil permet la mesure de fluorescence, de bioluminescence et d'absorbance sur des échantillons liquides dans des plaques contenant 6 à 384 puits.

La mesure de FIV sur cet appareil est réalisée avec les mêmes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission que le spectrofluorimètre LS50B Perkin Elmer, une mesure dure 10 minutes et consomme 900 μ l pour un échantillon en triplicata.

Les résultats obtenus montrent une corrélation positive très significative entre les mesures effectuées sur les 2 appareils.

Les mesures de fluorescence ont donc été effectuées au Tecan, et 3 fois par semaine pour épargner aux cultures les contraintes possibles liées à l'agitation au moment des prélèvements.

V. Traitement statistique

- 1. Outils pour analyse de la diversité intra-spécifique : Le taux de croissance et la phase de latence des souches d'*A.catenella/tamarensis* ont été comparées par une analyse de variance ANOVA et de tests de comparaisons multiples de Tukey.**

Références bibliographiques

- AMINOT A. & CHAUSSEPIED M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest, pp. 395.
- ANDERSEN R.A., BERGES J.A., HARRISON P.J. & WATANABE M.M., 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal culturing Techniques*. (Ed. by R.A. Andersen), pp. 429-538. Elsevier Academic Press, Burlington.
- ANDERSON D.M., HARRISON P., 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16: 89–97.
- BENDSCHNEIDER K., ROBINSON R. J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research* 11: 87–96.
- BENZECRI J.P., 1984. L'analyse des données. Tomes I et II *Dunod* – Paris.
- BERTHELOT M., 1859. Réaction du phénol avec le chlorure du chaux. *Journal of Applied Chemistry* 1(284) p. 1859.
- BLONDEL J., 1979. Biogéographie et écologie. *Masson*, Paris, p. 173.
- COLLOS Y., MORNET F., SCIANDRA A., WASER N., LARSON A. & HARRISON P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar levels of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* 11:189-194.
- FREHI H., COUTE A., MASCARELL G., PERRETTE-GALLET C., AYADA M., KARA M.H., 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie). *Comptes rendus biologies* 330: 615–628.
- FRTIZ L., TRIEMER E.J., 1985. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *Journal of Phycology* 21: 662–664 .
- GRAY C.A., OTWAY N.M., LAURENSEN F.A., MISKLEWICZ A.G., PETHERBRIDAE R.L. 1992. Distribution and abundance of marine fish larvae in relation to effluent plumes from sewage outfalls and depth of water. *Marine Biology*. 113: 549-559.
- GUILLARD R. R. L. 1973. Division rates. In: *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. (Ed. by J. R. STEIN), pp. 289-311. Cambridge University Press, London, UK.
- HU H., SHI Y. & CONG W. 2006. Improvement in growth and toxin production of *Alexandrium tamarense* by two-step culture method. *Journal of Applied Phycology* 18:119-126.
- KARENTZ D. 1983. Patterns of DNA synthesis and cell division in marine dinoflagellates. *Journal of Protozoology* 30: 581-588.

- KOROLEFF F. 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *International Council for the Exploration of the Sea* 9: 19-22
- MYRPHY J. & RILEY J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- RAIMBAULT P., RODIER M., TAUPIER-LETAGE I. 1988. Size fraction of phytoplankton in the Ligurian Sea and the Algerian Basin (Mediterranean sea : Size fraction versus total concentrations. *Marine Microbial Food Webs* 3: 1-7.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular Cloning* (Ed. by N.Ford, C. Nolan, M. Ferguson, Cold), pp 9.1-9.62 .Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHOLIN C.A., ANDERSON D.M. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU rDNA genes. *Journal of Phycology* 30: 744–754.
- UTERMOHL M. 1985. Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen internationale Vereinigung fur theoretische und angewandte. Mitteilungen. Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1–38.
- WOOD E.D., ARMSTRONG F.A.J., RICHARD F.A. 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium copper-reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 47: 23–31.

Chapitre 3

***Etude annuelle des blooms
d'Alexandrium catenella dans
la baie d'Annaba en Algérie et
la lagune de Thau en France.***

I. Introduction

En Algérie, la majorité des rejets se situe sur le littoral, long d'environ 1200 Km. La quasi-totalité des activités socio-économiques est concentrée également sur la frange côtière. Elles sont liées aux grandes agglomérations urbaines et aux pôles industriels. Les multiples rejets qui découlent d'une telle concentration humaine et industrielle sur la côte, ont comme point de convergence le milieu marin, plus particulièrement les environnements côtiers, qui subissent ainsi des perturbations de plus en plus importantes.

Les récents développements urbains, agricoles et industriels n'ont fait qu'augmenter et aggraver les phénomènes de pollution et d'eutrophisation marine. Les conséquences de cette situation commencent à apparaître avec acuité dans certaines régions côtières algériennes.

Le golfe d'Annaba (Figure 1) n'échappe pas aujourd'hui à cette situation, car il reçoit les apports continentaux provenant des oueds Seybouse et Boujemâa principalement et les rejets urbains et industriels sans traitement préalable d'une ville fortement industrialisée et urbanisée.

Le golfe d'Annaba, a fait l'objet de travaux portant sur le système pélagique. Une première étude concerne la structure et le fonctionnement du système phytoplanctonique dans un écosystème côtier (Frehi, 1995). La composition et l'abondance du zooplancton ont également été étudiées par Ounissi et *al.*, (1998). Khelifi et *al.*, (2006) ont précisé les apports et le transport des sels minéraux et organiques dissous par les estuaires du Mafrag et de l'oued Seybouse au proche littoral du golfe d'Annaba.

Très peu d'études ont concerné le phytoplancton des eaux algériennes. Les premiers sont Frehi et *al.*, (2007) qui ont signalé la présence d'*Alexandrium catenella* dans la baie d'Annaba.

Afin de mieux comprendre les déterminismes environnementaux qui ont influencé l'apparition et l'établissement des blooms de cette espèce à Annaba, nous avons effectué un suivi bi mensuel *in situ* au cours de l'année 2010-2011 pour déterminer les caractéristiques physicochimiques (température, salinité, sels nutritifs) de la colonne d'eau et les mettre en relation avec les densités cellulaires phytoplanctoniques et notamment celles d'*Alexandrium*.

Dans ce chapitre nous allons donc tout d'abord décrire les conditions environnementales et l'état trophique de la baie d'Annaba pour ensuite relier les paramètres physicochimiques mesurés aux paramètres biologiques afin de déterminer quelles sont les conditions qui favorisent l'établissement et la récurrence des blooms d'*Alexandrium catenella* dans la baie d'Annaba.

Ce travail s'inscrit également dans une problématique plus générale qui concerne la compréhension du fonctionnement écologique de la baie d'Annaba en rapport avec la diversité phytoplanctonique.

II. Milieu

1. Description hydrologique de la baie d'Annaba

1.1 Situation géographique

Le golfe d'Annaba, situé à l'extrême Est algérien est limité par 2 caps, le cap Rosa à l'Est (36°38' N ; 8°15'E) et le cap de Garde à l'ouest (36°38' N ; 7°16'E). Le golfe est sujet à d'importants phénomènes océanographiques : passage au large du courant atlantique modifié et intrusion d'eau du large à partir de l'entrée du golfe. Il reçoit également des apports d'eau douce continentale qui sont aussi à l'origine d'apports importants de polluants chimiques.

1.2 Bathymétrie

La profondeur maximale du golfe d'Annaba est de 50 m. Les isobathes 5, 10, 20 et 30 m sont assez éloignés les uns des autres au sud de la Baie pour ensuite être plus rapprochés vers le nord au niveau du cap de Garde. En effet, le plateau continental est très étroit et accidenté surtout au voisinage des deux caps (Gruvel, 1926). Il est nettement restreint (4,5 milles) au nord du cap de Garde puis s'élargit dans le golfe (14.5 milles) (Vaissiere et *al.*, 1963). La profondeur de la zone étudiée varie globalement de -3 à -13 m.

1.3 Hydrodynamisme

La connaissance des caractéristiques hydrodynamiques est d'une importance primordiale car elles ont une influence significative sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques, des masses d'eau.

1.3.1 Courants

Les travaux de Millot, (1985) montrent que la circulation des eaux d'origine atlantique entre le détroit de Gibraltar et le détroit de Sicile, présente des caractéristiques différentes selon qu'on se trouve au large des côtes marocaines, algériennes ou tunisiennes.

Allain, (1960) identifie sur les côtes algériennes un courant principal qui débute de la côte oranaise pour atteindre les côtes algéroises. Les travaux de Lacombe et *al.*, (1982) sur l'aspect

physique des eaux méditerranéennes montrent que la vitesse du courant atlantique circulant dans cette mer est de 0.5 à 0.7 ms⁻¹ le long des côtes algériennes, appelé « courant algérien ». Il est initialement structuré en une veine qui coule vers l'Est, puis devient plus large et se détache de la côte (Benzohra, 1993).

L'étude faite par l'administration des ponts et chaussées en 1959 et 1960 sur la courantologie du golfe d'Annaba montre l'existence d'un courant général dirigé vers l'est pouvant atteindre 1 à 2.5 nœuds passant à quelque milles au large, et un courant de 0,5 à 1,5 nœuds circulant à proximité de la côte de la face sud-est du cap de Garde en direction de l'embouchure de l'oued Mafragh.

1.3.2 Houles

D'après l'étude faite par le laboratoire central d'hydraulique de France (1973), les houles du golfe d'Annaba proviennent du large et sont d'origine nord-ouest et est-nord-est.

Les différentes directions des houles que reçoit le golfe sont :

- Deux directions du large, nord-est et est-nord avec une amplitude de 1,2 à 6 mètres (fréquence 30% de l'année).
- Deux directions ouest et ouest-nord avec une amplitude de 1 à 5 mètres (fréquence 50% de l'année).
- Des houles de 1 à 2 m d'amplitude qui proviennent de différentes directions (fréquence 20%).

2. Hydro-climatologie

2.1. Pluviométrie

La région d'Annaba a un régime pluviométrique caractérisé par deux saisons : une sèche (période d'étéage), l'autre humide (période de crue).

- La première dure environ cinq mois, du mois de mai jusqu'au mois de septembre, et représente 25 % de la pluviométrie moyenne annuelle.
- La seconde dure environ sept mois, du mois d'octobre jusqu'au mois d'avril, et représente 75 % de la pluviométrie moyenne annuelle (Djabri, 1995).

2.2. Apport d'eaux douces

Le littoral est souvent une zone d'interface entre les eaux douces et les eaux salées. L'eau douce apportée dans la zone littorale par les oueds et les rejets d'eaux usées, transportée, à l'état dissous ou sous forme de particules solides, des substances multiples (Lacaze, 1993). Ces apports terrigènes généralement riches en matières organiques et minérales, provoquent alors des modifications écologiques dans les zones marines qui en sont le réceptacle et peuvent être à l'origine de l'accumulation de divers polluants (Leveau, 1985).

Les principaux oueds qui déversent dans la Baie d'Annaba sont, de l'est vers l'ouest :

- l'Oued Seybouse, considéré comme le deuxième fleuve d'Algérie, et dont l'aire de drainage est estimée à 5900 km³, avec un débit variable selon les années, entre 13,4 m³.s⁻¹ en 1984 (Chouikhi, 1993) et 8,2 m³.s⁻¹ en 1996 (Alleg, 1996).

- l'Oued Boudjemâa qui reçoit des eaux usées d'origines industrielles, ainsi que les eaux d'agglomérations urbaines.

- l'Oued Kouba qui se déverse par temps de crue sur la plage Rizi Amor (Annaba). Les eaux usées provenant des cités résidentielles sont collectées dans la station de pompage située à l'est de la plage. Cette station exclue les rejets des complexes touristiques ainsi que les eaux usées des agglomérations urbaines.

- La Baie d'Annaba reçoit également les eaux usées urbaines qui ne subissent qu'un traitement sommaire au niveau de la station de Sidi Brahim. Les autres stations sont destinées à la collecte des eaux usées, et sont réparties dans toute la ville.

III. Résultats

1. Les paramètres physiques

1.1. La température

Globalement l'évolution spatio-temporelle de la température des eaux superficielles est directement liée à celle de l'air, selon un rythme saisonnier (Heral et *al.*, 1983 ; Frontier, 1993). Ce facteur qui joue un rôle majeur dans les variations de densité et de viscosité de l'eau, influence le comportement et la répartition du plancton.

Les relevés mensuels de la température de surface, nous permettent de déterminer quatre saisons hydrologiques, conformément aux valeurs habituelles retrouvées en Méditerranée : l'hiver (décembre- février) avec T= 14-16 °C, le printemps (mars – mai) avec T= 17-22,6 °C, l'été chaud (juin - août) avec des valeurs qui varient entre 22 ,1°C en juin et un maximum de 30,2°C

enregistré au mois d'août, et l'automne (septembre – novembre) où la température fluctue considérablement entre 17,6°C en novembre et 28,1°C en septembre, avec une amplitude d'environ 10°C.

On distingue une légère différence entre les stations 1 et 2, celle située au nord-ouest de la baie (station 1) indique des températures oscillant entre 14,7 et 27,5 C° avec une moyenne de 20,2. Cette zone est la plus néritique, moins profonde et plus éloigné des influences continentale (figure 2).

La station 2 située au sud-est de la baie avec des températures qui varient entre 14,8°C (hiver) et 30,2 C° (été) et une moyenne de 21,3 C° (figure2). Ces valeurs sont légèrement plus élevées par rapport à la station 1. Cette différence est probablement due aux arrivées des eaux chaudes utilisées dans le refroidissement des circuits du complexe industriel des fertilisants d'Algérie (FERTIAL) d'une part et celles de la centrale électrique, directement rejetées en mer.

Nous observons donc une décroissance thermique de la zone sud est (station 2) vers le nord-ouest (station 1) de la baie. Cette décroissance côte-large s'explique par le fait que la progression des masses d'eaux, plus chaudes de la station 2 vers le large est limitée par les courants pénétrant dans le sens nord-ouest vers le sud-est.

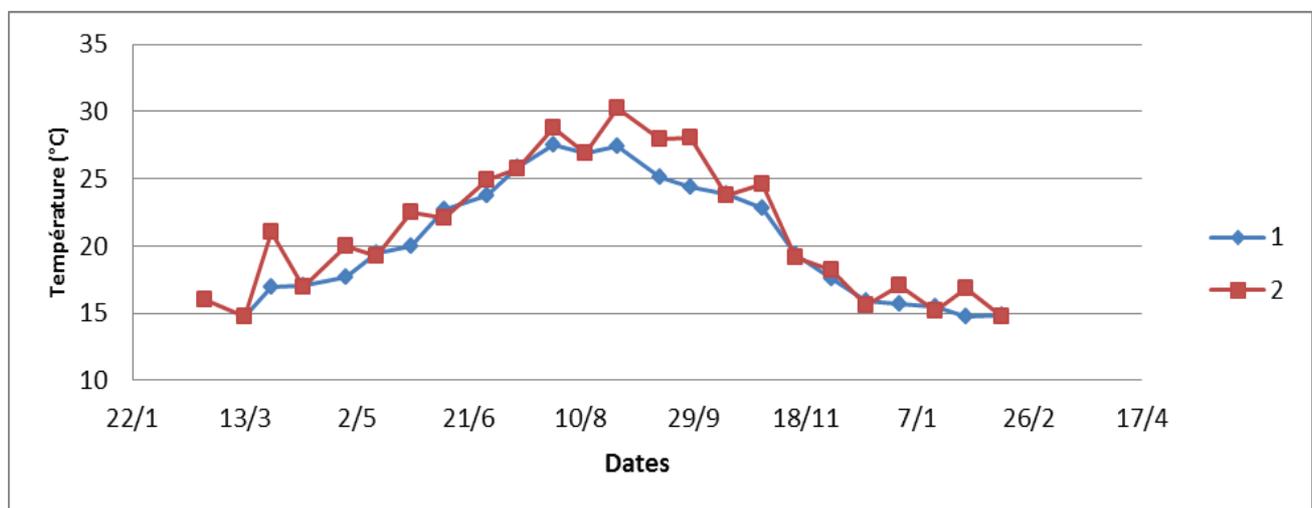


Figure 2. Variations temporelles de la température des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.

1.2. La salinité

La salinité moyenne mesurée dans la Baie d'Annaba durant l'année 2010 est de 36,5 PSU. Elle baisse sensiblement au moment des crues (saison humide) au mois de septembre et novembre à 34,2 PSU. En revanche, la période sèche (saison d'été) est caractérisée par des salinités plus élevées qui atteignent leur maximum en août (37,5 PSU).

Les prélèvements bimensuels permettent de dresser des profils de surface (figure 3). Comme pour la température on remarque une différence entre les deux stations.

La station 1 est caractérisée par une salinité plus ou moins stable entre 36,1 PSU au mois de septembre 2010 et 37,5 PSU au mois d'août 2010 avec une moyenne annuelle de 36,7 PSU. La station 2 présente plus de variations des valeurs de salinité par rapport à la station 1. Les valeurs enregistrées varient entre 34,6 PSU au mois de septembre et novembre 2010, qui correspondent à des périodes de crues, avec une arrivée importante d'eau douce pendant cette période, alors qu'elles atteignent 37,4 PSU au mois d'août 2010 (saison estivale) avec une moyenne de 36,5 PSU (Figure3).

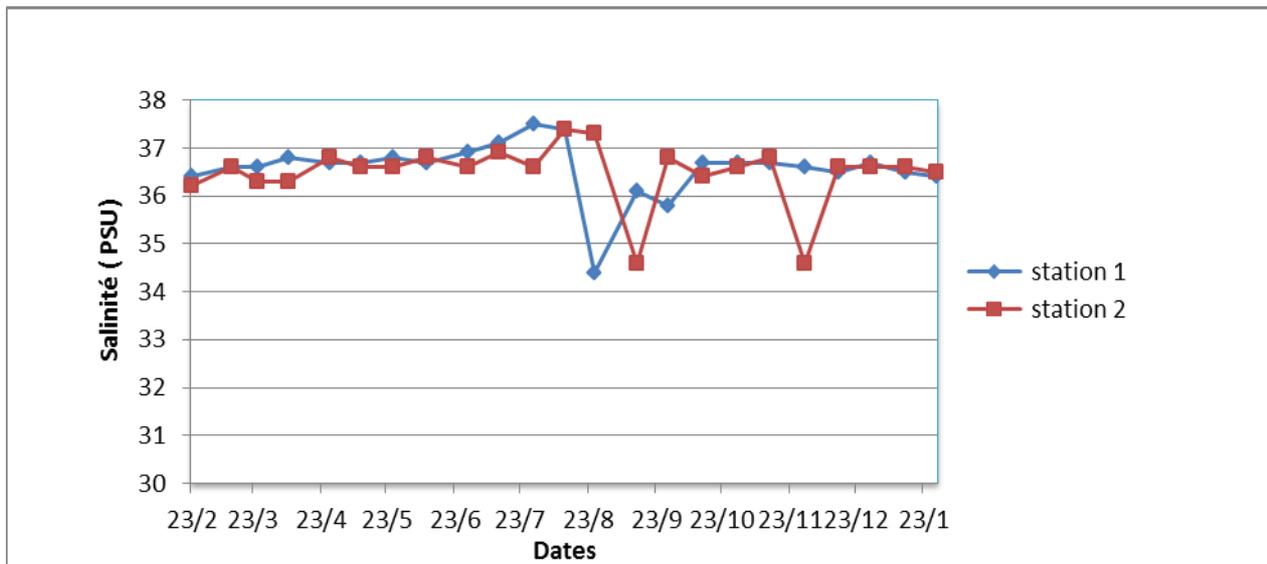


Figure 3. Variation temporelle de la salinité des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.

1.3. L'oxygène dissous

La figure 4 montre les variations des concentrations de l'oxygène dissous dans l'eau durant l'année 2010-2011. Pour la station 1 la concentration de l'oxygène dissous varie entre 10,6 mg/L au mois de février 2011 et 5,4 mg/L au mois d'août 2010 avec une moyenne de 8,1 mg/L. Les

teneurs en oxygène dissous de la station 2 sont globalement plus basses que celles de la station 1 avec un maximum de 10,6 mg/L au mois de février 2011 et un minimum de 5,1 mg/L au mois d'août 2010 avec une moyenne de 7,0 mg/L (Figure4).

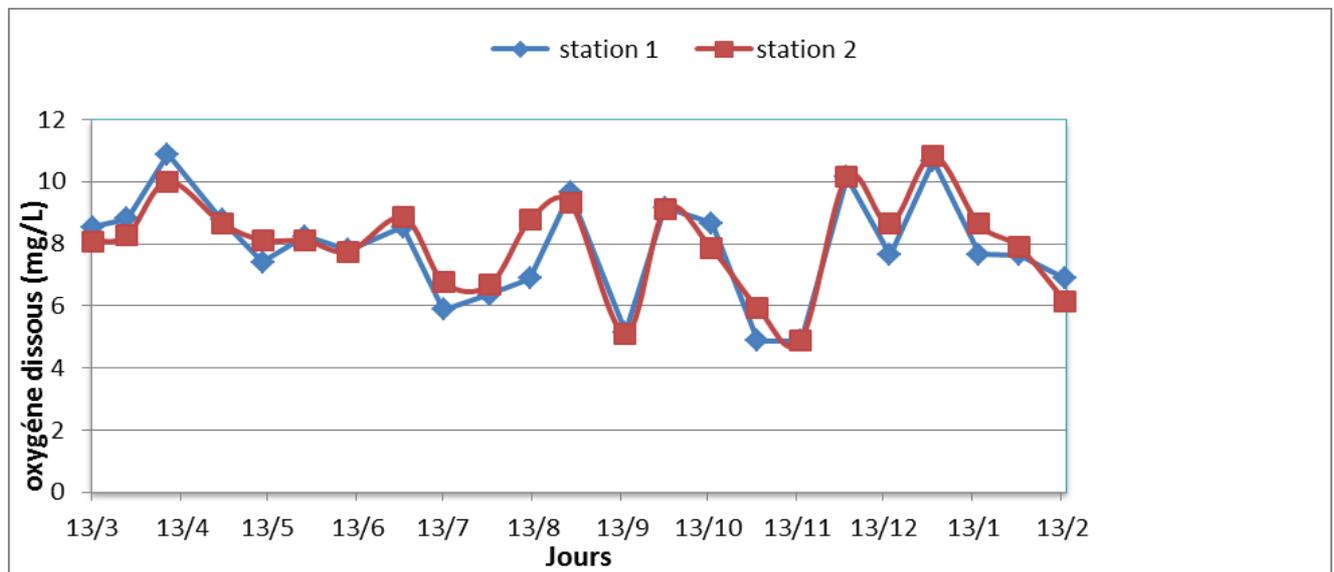


Figure 4. Variation temporelles de de l'oxygène dissous des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.

2 Paramètres chimiques

2.1. L'ammonium (NH₄)

Selon la figure 5, au niveau de la station 1, les concentrations en ammonium varient entre 0 µM (valeur indétectable) et 6,05 µM. On constate l'existence de 2 pics distincts et accentués l'un en mars 2010 avec la plus forte concentration 6,05 µM et l'autre en fin novembre 2010 de 2,45 µM, avec une moyenne annuelle de 0,63 µM. Pour la station 2, l'évolution de l'ammonium montre des concentrations beaucoup plus élevés que la station 1 avec plusieurs pics au cours de l'année (Figure5). Ces concentrations varient entre 0 µM et 98,6 µM (en septembre 2010) avec une moyenne annuelle de 19 µM.

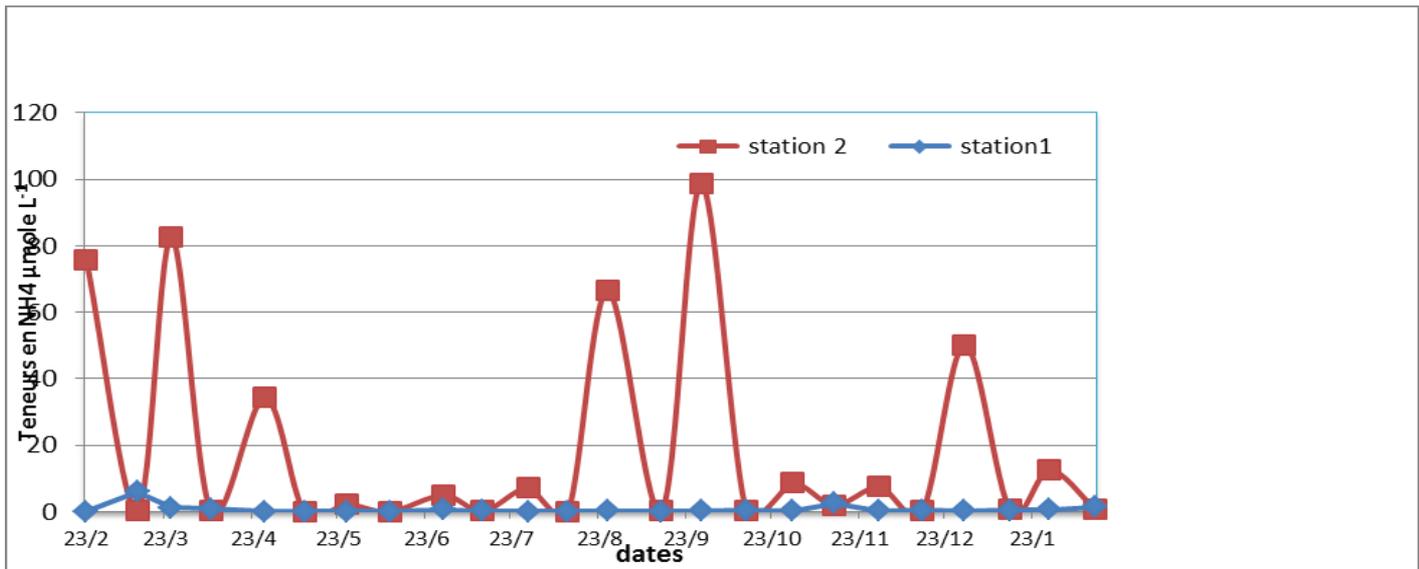


Figure 5. Variations temporelles des teneurs en ammonium des eaux des stations 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.

2.2 les nitrates (NO₃)

L'évolution des teneurs en nitrate dissous (Figure6) au niveau des deux stations montre des valeurs très proches. Elle présente une augmentation en période printanière. Les concentrations dans la station 1 présentent des valeurs entre 0 µM et 5,86 µM, la valeur la plus forte étant observée au mois d'avril, avec une moyenne annuelle de 0,52 µM. Les teneurs en nitrate de la station 2 varient entre 0 µM et 5,84 µM, la plus forte valeur étant observée le 8 avril 2010 avec une moyenne annuelle de 0,50 µM.

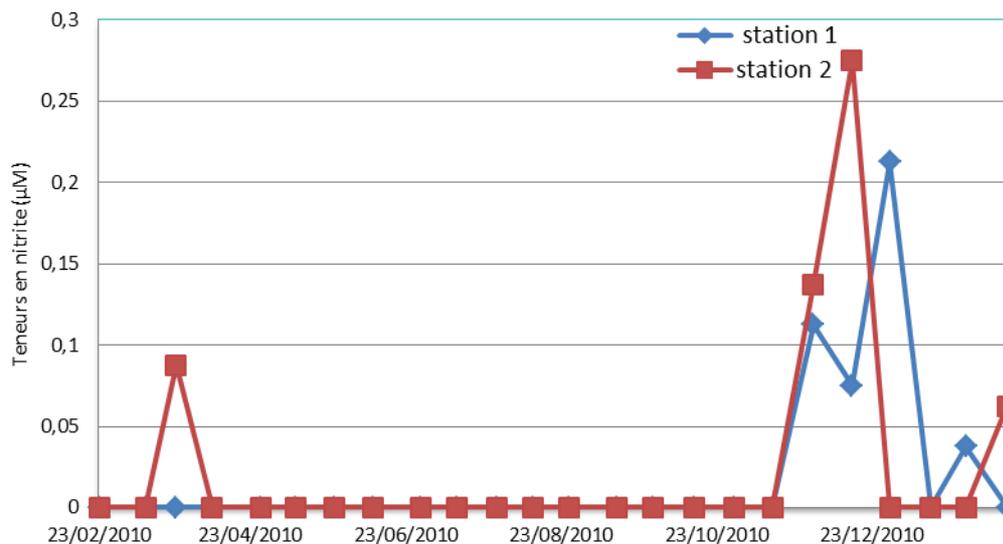


Figure 7. Variation temporelles des teneurs en nitrites des eaux de la station 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.

2.4. Les Phosphates (PO_4^-)

Les teneurs en orthophosphates dans la baie d'Annaba (Figure8) varient entre 0 et 0,80 μM . Dans la station 1, les orthophosphates ne sont pas détectables, alors que les valeurs dans la station 2 sont parfois plus élevées : entre 0 μM et 0,80 μM avec une moyenne de 0,06 μM .

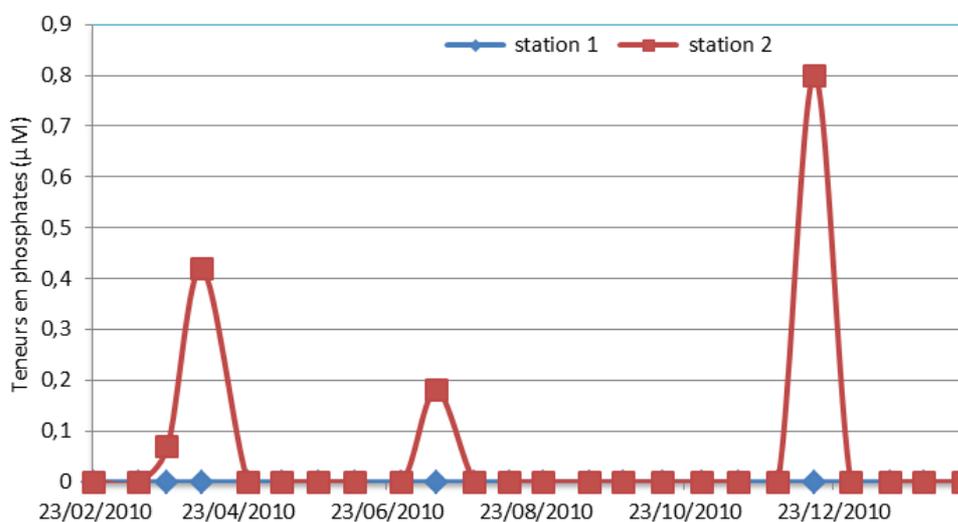


Figure 8. Variation temporelles des teneurs en phosphore des eaux de la station 1 et 2 de la baie d'Annaba entre 2010 et 2011.

3. Variables biologiques

3.1. Etudes qualitative et quantitative du phytoplancton

L'inventaire taxonomique général du phytoplancton établi entre 2010 et 2011 montre l'existence de 77 unités systématiques. Il ne concerne que les taxa récoltés avec un filet à plancton de 20 μm de vide de maille et sur les échantillons qui contiennent des cellules d'*Alexandrium catenella*. Les dinoflagellés dominent avec 41 espèces tandis que les diatomées ne dépassent pas les 36 espèces.

Parmi les dinoflagellés, l'ordre des péridiniales domine avec 18 espèces dont 12 représentées par le genre *Ceratium* et 6 par le genre *Protopreridinium*. L'ordre qui domine au sein des diatomées est celui des centrales avec le genre *Chaetoceros* représenté par 3 espèces.

Dans la baie d'Annaba, ces deux groupes phytoplanctoniques montrent une répartition qualitative et quantitative différentes (tableaux 1a et 1b). En effet, dans la station 1 les diatomées dominent avec 82 % alors que les dinoflagellés ne représentent que 18% du nombre total d'espèces observées dans cette station. Tandis que dans la station 2, nous avons enregistré une nette dominance des dinoflagellés avec 97 % alors que les diatomées ne représentent que 3% du nombre total d'espèces observées à cette station.

L'analyse quantitative du phytoplancton total fait ressortir une différence entre les deux sites : la station 1 présente une moyenne de $2 \times 10^5 \text{ cell.L}^{-1}$ tandis que la station 2 est caractérisée par une plus forte densité avec une moyenne annuelle de $2,83 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$.

L'étude spatiotemporelle des peuplements phytoplanctoniques de la station 1 (Figure 9) montre l'existence d'un pic printanier caractérisé par une prolifération de *Scrippsiella trochoidea*, *Podolampas bipes*, *Lingulodinium polyedrum* et *Alexandrium catenella* avec une densité moyenne de $7,7 \times 10^5 \text{ cell.L}^{-1}$ au mois de mai ; un autre pic moins important a été observé au mois d'avril avec une moyenne de $5,4 \times 10^4 \text{ cell.L}^{-1}$, et qui coïncide avec une poussée de *Noctiluca scintillans*.

Tableau 1a : répartition qualitative et quantitatives des Diatomées et des Dinoflagellé dans la station 2.

Dinoflagellés	13/03/10	25/03/10	08/04/10	27/04/10	11/05/10	25/05/10	10/06/10	29/06/10	14/10/10	29/01/11
<i>Alexandrium catenella</i>	6000	280000		49000	4700	1400000		75000		39000
<i>Ceratium tripos</i>	2000				67000			670		
<i>Ceratium candelabrum</i>	2000				7300	8700				
<i>Ceratium concilians</i>					1300					
<i>Ceratium contortum</i>	2700				19000	1300	95000			
<i>Ceratium extensum</i>					670					
<i>Ceratium furca</i>		100000		1300	8700	2700		670		
<i>Ceratium fusus</i>	2000				9300			670		
<i>Ceratium massiliense</i>					120000	670	1300000		3300	
<i>Ceratium pentagonum</i>	4700									
<i>Ceratium symmetricum</i>	670									
<i>Ceratium tripos</i>							23000			
<i>Ceratocorys gouretii</i>					2700		7300			
<i>Ceratocorys horrida</i>		670			2700		11000			
<i>Dinophysis fortii</i>		1300				39000		1300		
<i>Gymnodinium catenatum</i>						17000				13000
<i>Lingulodinium polyhedra</i>		5300		110000		1300		4700		
<i>Noctiluca scintillans</i>	8700	1300	1200000	24000						
<i>Ornithocercus magnificus</i>					1300	670				
<i>Oxyphysis oxytoxoides</i>						15000				
<i>Protoperidinium grani</i>				37000						
<i>Protoperidinium pallidum</i>				2000						
<i>Podolampas bipes</i>		1300				13000		670		
<i>Proocentrum micans</i>		4700				39000		9300		
<i>Proocentrum scutellum</i>				51000						
<i>Proocentrum triestinum</i>						670				
<i>Protoceratium reticulatum</i>						1300				
<i>Protoperidinium diabolus</i>	1300			3300		15000		6700		
<i>Protoperidinium divergens</i>	230000				6000		120000		21000	1300
<i>Protoperidinium oceanicum</i>						1300				
<i>Protoperidinium ovatum</i>						6700				
<i>Protoperidinium oviforme</i>						6700				
<i>Protoperidinium sphaerium</i>								3300		
<i>Pyrophacus horologium</i>							9300			
<i>Scrippsiella trochoidea</i>		11000		70000	2000	21000		7300		1300

<i>Actinocyclus sp</i>			6700							
<i>Amphora angusta</i>	14000									
<i>Asterionella notata</i>				3300						
<i>Cerataulina pelagica</i>		33000			20000000					41000
<i>Chaetoceros boralis</i>		2700								
<i>Chaetoceros sp</i>										1300
<i>Chaetoceros lauderi</i>		2700								
<i>Caloneis westii</i>			670							
<i>Ditylum brightwellii</i>			670							
<i>Odontella sp</i>		670								
<i>Pseudosolenia calcar-avis</i>			1300							
<i>Thalassionema sp</i>								17000		
<i>Thalassionema frauenfeldii</i>					5000000					
<i>Rhizosolenia sp</i>					4700					
<i>Rhizosolenia acuminata</i>			8700							

Tableau 1b : répartition qualitative et quantitatives des Diatomées et des Dinoflagellé dans la station 1.

	13/3/10	25/3/10	8/4/10	11/5/10	26/5/10	10/6/10	30/10/10
<i>Alexandrium catenella</i>	23000	35000	37000	37000	110000	62000	40000
<i>Ceratium tripos</i>			0			2000	
<i>Ceratium concilians</i>						670	
<i>Ceratium furca</i>			2000	1300	1300	1300	
<i>Ceratium fusus</i>					670		
<i>Ceratium massiliense</i>					1300	5300	3300
<i>Ceratium sphaericum</i>						1300	
<i>Ceratium trichoceros</i>						1300	
<i>Dinophysis doryphora</i>						670	
<i>Dinophysis fortii</i>				3300	2000	4000	
<i>Gonyaulax alaskensis</i>	670	1300					
<i>Gonyaulax diegensis</i>	1300				15000		
<i>Gonyaulax pacifica</i>							5300
<i>Gymnodinium catenatum</i>	6700	6000					
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	2700		4700	110000		2700	670
<i>Noctiluca scintillans</i>		1300	55000				
<i>Oxyphysis oxytoxoides</i>				2700	670		
<i>Oxytoxum milanesi</i>						670	
<i>Podolampas bipes</i>			670	200000	6000	4000	
<i>Prorocentrum micans</i>		2000	5300	73000	2000	2000	33000
<i>Prorocentrum scutellum</i>							
<i>Prorocentrum triestinum</i>			670		24000	6000	
<i>Protoperdinium divergens</i>			2000				
<i>Protoperdinium oviforme</i>						670	
<i>Protoperdinium diabolus</i>			670	2000	2000	670	
<i>Protoperdinium divergens</i>	2000						
<i>Protoperdinium oviforme</i>							2000
<i>Scrippsiella trochoidea</i>			2700	930000	6700	11000	5300
<i>Amphora costata</i>	670						
<i>Asterionella notata</i>	670						
<i>Bellerochea malleus</i>		23000					
<i>Cerataulina pelagica</i>					77000	670	
<i>Chaetoceros sp</i>							3300
<i>Coscinodiscus radiatus</i>							5300
<i>Cyclotella comta</i>			14000				2700

<i>Cyclotella stylonum</i>						2000	
<i>Eucampia sp</i>						670	
<i>Frustulia rhomboides</i>		670					
<i>Grammatophora serpentina</i>						4700	
<i>Hemiaulus hauckii</i>							2000
<i>Hemidiscus ovalis</i>						670	
<i>Lyrella lyra</i>		670					
<i>Nitzschia punctata</i>						670	
<i>Odontella reticulata</i>							670
<i>Pleurosigma sp</i>		670				670	
<i>Rhizosolenia acuminata</i>							
<i>Surirella fastuosa</i>		670					
<i>Surirella lata</i>		670					
<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	2000						
<i>Thalassiothrix sp</i>					17000		

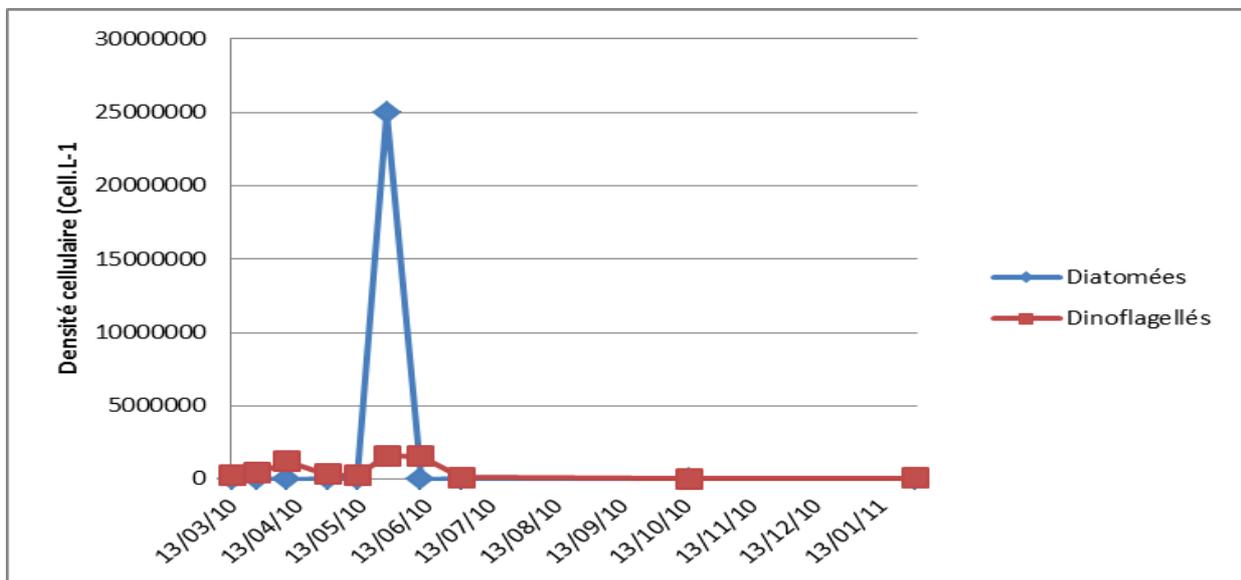


Figure 9. Evolution spatiotemporelle des peuplements phytoplanctoniques de la station 1

Selon la figure 10, nous observons durant l'année 2010 au niveau de la station 2, la présence de 2 pics printaniers. Le premier est dû à une floraison de *Prorocentrum micans* au mois d'avril

avec $3,2 \times 10^6$ cell.L⁻¹ et qui représente plus de 83% des abondances cellulaires. Le second est observé au mois de mai avec $1,2 \times 10^6$ cell.L⁻¹. Ces fortes valeurs sont dues à une prolifération de deux espèces *Cerataulina pelagica* et *Thalassionema frauenfeldii* qui représentent respectivement 74% et 19% de la densité cellulaire totale du mois de mai.

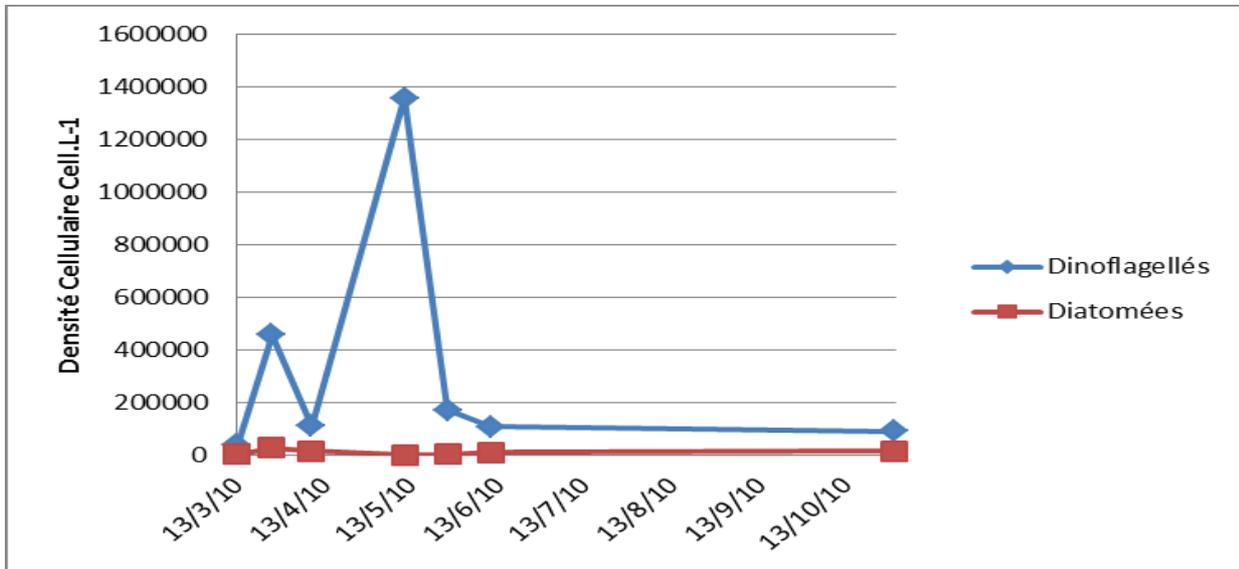


Figure 10. Evolution spatiotemporelle des peuplements phytoplanctoniques de la station 2

Concernant *Alexandrium catenella*, nous pouvons dire que cette espèce est bien présente dans la station 2 de mars à juin, et avec des densités plus importantes et qui varient entre $4,9 \times 10^4$ cell L⁻¹ au mois d'avril et $6,8 \times 10^5$ cell L⁻¹ en mai. La station 1 présente des densités qui varient entre $3,5 \times 10^4$ cell.L⁻¹ en avril 2010 et $7,2 \times 10^4$ cell.L⁻¹ en mai. On a pu observer sa présence aux mêmes périodes que dans la station 2, sauf qu'elle a été trouvée plus abondante dans la station 1 au mois d'octobre 2010 (Figure11).

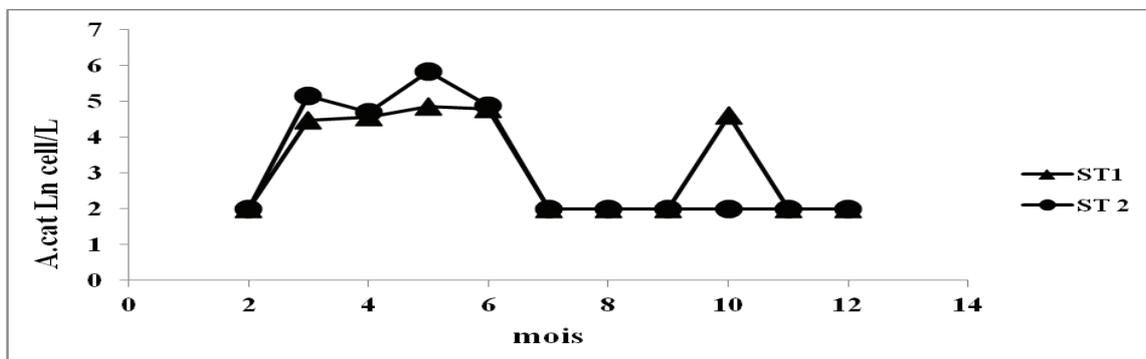


Figure 11. Evolution spatiotemporelles des concentrations d'*A. catenella* dans la baie d'Annaba.

3.2. Indice de diversité (Shannon H')

L'indice de diversité spécifique (Shannon, 1948) des populations phytoplanctoniques de la baie d'Annaba (Figure 12) varie entre 0 et 2,11 bits.cell⁻¹. Il est particulièrement faible et même proche de 0, lorsque les populations phytoplanctoniques présentent un développement monospécifique : c'est le cas de la floraison de *Noctiluca scintillans* au mois d'avril 2010 dont la diversité spécifique varie entre 0 et 0,55 et l'indice d'Equitabilité (E) varie entre 0% et 18%.

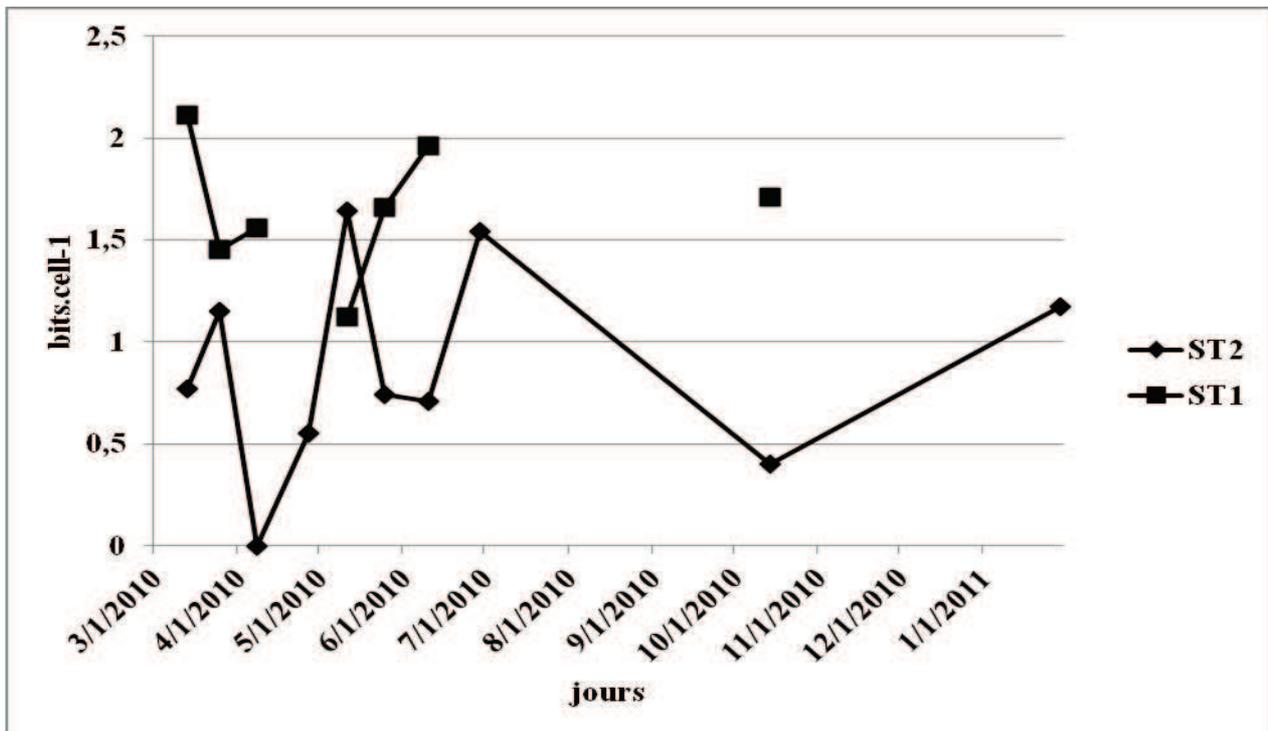


Figure 12. Evolution temporelle de l'indice de Shannon H' dans les deux stations d'études.

Cependant on observe une diversité spécifique plus élevée dans la station 1 avec un indice qui varie entre 1,12 au mois de mai et 2,11 en mars. Dans la station 2 elle est relativement plus faible où on enregistre des valeurs de l'indice de Shannon (H') situé entre 0 et 2,11 avec une moyenne annuelle de 0,86 (Tab.2)

Les plus faibles valeurs de la diversité spécifique sont enregistrées au mois d'avril dans la station 2 (0 et 0,55) et les plus fortes sont observées au mois de mars dans la station 1 (entre 1,45 et 2,11).

Les indices d'Equitabilité (E) observés sont plus élevés à la station 1 (entre 48% et 92%) en comparaison avec la station 2 (entre 0% et 65%).

On observe également une plus grande homogénéité dans la distribution des effectifs dans la station 1. Les communautés phytoplanctoniques de la station 2 se caractérisent par des floraisons monospécifiques plus fréquentes, comme celle de *Protoperdinium divergens* au mois d'octobre, qui domine à plus de 86% du phytoplancton total., Egalement, on a enregistré un bloom à *Noctiluca scintillans* au mois d'avril qui représente 100% des effectifs du phytoplancton total au mois d'octobre, ce qui explique la diminution de la diversité spécifique pendant cette période.

Tableau 2 : Valeurs de l'indice de diversité et de l'indice d'équitabilité dans la baie d'Annaba.

Dates	H' indice de Shannon		E indice d'Equitabilité	
	ST2	ST1	ST2	ST1
13/03/2010	0,77	2,11	0,3	0,92
25/03/2010	1,15	1,45	0,44	0,56
08/04/2010	0	1,56	0	0,63
27/04/2010	0,55	/	0,18	/
11/05/2010	1,64	1,12	0,6	0,48
25/05/2010	0,74	1,66	0,24	0,61
10/06/2010	0,71	1,96	0,34	0,61
29/06/2010	1,54	/	0,6	/
14/10/2010	0,4	1,71	0,58	0,69
29/01/2011	1,17	/	0,65	/

4. Analyse statistique des données

Une analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée au traitement des tableaux de données contenant les variables mesurées (variables physico-chimiques et abondances d'*Alexandrium*) en colonne aux différents temps de prélèvement (en ligne).

Le plan de projection axe 1–axe 2 de l'ACP (Figure 13) restitue 50,67% de l'information totale dont 33,43 % associé au premier axe et 17,24 % au second.

Les contributions des différentes variables aux deux premiers axes de l'ACP sont résumées dans le tableau 3.

Biplot (axes F1 et F2 : 50,68 %)

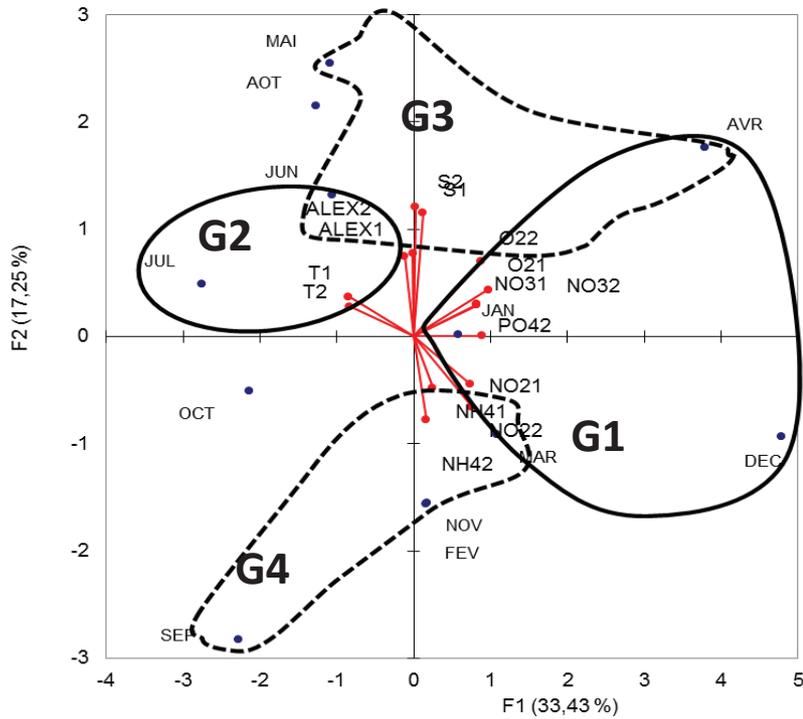


Figure 13. Représentation graphique du plan de projection F1-F2 de l'analyse de correspondance principale, réalisée sur la matrice de données formée des observations des variables physico-chimiques et des abondances d'*Alexandrium*. Les indices 1 et 2 associés aux abréviations des variables correspondent respectivement aux stations 1 et 2.

Tableau 3: Contribution des variables aux deux premiers axes de l'ACP.

Contribution Axe 1 (33,43%)				Contribution Axe 2 (17,24%)			
Variables		Observations		Variables		Observations	
Température (1)	10,981	AVR	23,913	Salinité 1	20,540	AVR	10,049
Température (2)	10,690	JUL	12,563	Salinité 2	22,600	MAI	20,962
Oxygène dissous (1)	14,451	DEC	38,144	Ammonium (2)	9,291	AOT	14,856
Oxygène dissous (2)	11,922	SEP	8,608	<i>Alexandrium</i> 2	9,329	SEP	25,796
Nitrite (1)	8,250	OCT	7,649	<i>Alexandrium</i> (1)	8,593		
Nitrite (2)	8,684			Oxygène dissous (2)	7,553		
Nitrate (1)	10,442			Nitrite (2)	6,542		
Nitrate (2)	10,453						
Phosphate (2)	12,33						
Total	85,86	Total	90,85	Total	84,43	Total	71,64

Le premier axe est expliqué notamment par les variables suivantes : la température dans les stations 1 et 2 respectivement (10,98 et 10,69%), l'oxygène dissous (14,45 et 11,92 %), la teneur en nitrite NO_2^- (8,25 pour ST1 et 8,6 % pour ST2), et nitrate NO_3^- (10,44 et 10,45% pour ST1 et ST2), qui totalisent 85,86 % de l'inertie totale.

Cet axe est également déterminé par les mois (observations) : avril (23,91%), juillet (10,56%) et septembre (8,60 %), octobre (7,64%) et décembre (38,14%), totalisant ainsi 91 % de l'information totale.

Selon l'axe horizontal (F1), on constate deux groupes d'observations: le premier (G1) situé dans la partie positive de l'axe F1, est formé par les mois d'avril et de décembre auxquels sont reliés les éléments minéraux dissous (NO_2^- , NO_3^- , PO_4) et l'oxygène dissous.

Dans la partie négative de cet axe, s'individualise le groupe (G2) constitué par le mois de juillet associé aux variables *Alexandrium* et température qui sont corrélées entre-elles.

Le deuxième axe est expliqué par les variables suivantes: les abondances cellulaires d'*Alexandrium* (8,59 et 9,32% dans les stations 1 et 2, respectivement), la salinité (20,54 et 22,60 % dans les stations 1 et 2, respectivement). De plus, à cet axe sont principalement associés les mois suivants: septembre (25,79 %), mai (20,96 %), août (14,85%) et avril (10,04 %).

L'étude de l'axe 2 vertical permet de distinguer une ségrégation de deux ensembles : le premier groupe (G3) situé dans la partie positive, est constitué des mois de la période printanière (avril et mai) auxquels sont reliés les blooms d'*Alexandrium* dans les deux sites d'étude, associés à la salinité et dans une moindre mesure l'oxygène dissous en particulier dans la station 2. Tandis que le second groupe (G4) situé dans la partie négative de l'axe 2 est constitué des mois automnaux (septembre et novembre) auxquels sont reliés les teneurs en ammonium et en nitrites.

En résumé, l'analyse factorielle associée positivement à la période de bloom d'*Alexandrium* des variables physico-chimiques (température, salinité et oxygène dissous) qui joueraient donc un rôle important dans l'apparition de cette espèce. A l'opposé, une corrélation négative est détectée entre les concentrations en ammonium et les abondances cellulaires d'*Alexandrium*.

IV. Discussion

1. Environnement physico-chimique

Les rejets industriels, en particulier l'eau de mer utilisée comme fluide caloporteur pour le refroidissement des installations industrielles côtières (complexe FERTIAL et centrale électrique), modifie la structure thermique du milieu récepteur. L'évolution annuelle de la température dans des deux stations, (la station 2 plus proche de la zone de rejet des effluents que la station 1) et selon le test t, montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux stations. En effet, la température des eaux superficielles de la baie d'Annaba, décroît au fur et à mesure qu'on s'éloigne des effluents, avec une valeur moyenne qui dépasse 22°C à la station 2 et de 21,2°C à la station 1. Ces valeurs confirment l'influence des eaux de refroidissement sur le réchauffement des eaux superficielles du secteur côtier.

Plusieurs études ont montré que la température et la salinité exercent un effet important sur la dynamique et la structure des communautés de dinoflagellés (Schallenberg et al., 2003; Khemakhem et al 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013 ; Dhib et al., 2013). La température affecte de nombreux processus physiologiques dinoflagellés, comme le taux de division, la photosynthèse, la production de toxines et la respiration (Cembella 1998; Nagasoe et al., 2006; Fu et al., 2008; Xu et al 2010). Elle influe fortement sur la dynamique des efflorescences algales nuisibles de façon générale, en régulant le taux de germination des kystes et la croissance végétative (Genovesi et al., 2009). Dans la baie d'Annaba, on observe les abondances maximales des cellules d'*Alexandrium catenella* dans la colonne d'eau quand les températures sont comprises entre 20°C et 22°C. Ces résultats sont proches de ceux de (Laabir et al., 2011) (entre 24 et 28°C) pour *Alexandrium catenella* dans la lagune de Thau, ainsi que de ceux obtenus dans le port de Tarragone où les températures varient entre 21°C et 22°C (Garce's et al., 2005) et sur les côtes catalanes en Espagne (Bravo et al., 2008) où *A. catenella* a proliféré entre 21°C et 24°C. On observe aussi la présence de cellules d'*Alexandrium catenella* en mars à des températures de 14°C en plus faible concentration. Les observations de Laabir et al., (2011) suggèrent que *A. catenella* en Méditerranée présente des écotypes adaptés à des températures élevées en comparaison avec d'autres régions du monde.

La salinité influence la croissance et la production des toxines chez les microalgues (Giacobbe et al., 1996). Nos résultats montrent que dans la baie d'Annaba la salinité varie entre 34,6 PSU et 37,5 PSU. Ces résultats sont proches de ceux antérieurement obtenus par Frehi,

(1995) dans la baie d'Annaba ou il a noté que la salinité varie entre 34,0 PSU et 37,4 PSU. Ces valeurs sont aussi proches de celles enregistrées par Benzohra (1993) dans le bassin algérien et qui varient entre 36,5 PSU et 38,0 PSU. La station 2 présente de plus fortes variations de la salinité par rapport à la station 1 : les plus faibles valeurs sont enregistrées à la station 2 pendant les périodes de crues, car elle est plus proche de l'embouchure des oueds Seybouse et Boujemaâ. L'influence de la salinité sur la croissance et la production de toxine chez différentes espèces d'*Alexandrium* a été largement étudiée (Anderson et al., 1990 ; Chang et al., 1997; Cembella, 1998; Grzebyk et al., 2003, Laabir et al., 2011). De nombreux travaux ont montré que plusieurs espèces d'*Alexandrium* sont euryhalines. Cependant, les gammes de salinité tolérées varient d'une espèce à une autre (Prakash, 1967 ; Watras et al., 1982 ; Cembella & Therriault, 1989 ; Cannon 1993 ; Hamasaki et al., 1998, Parkhill & Cembella, 1999 et Hwang & Lu, 2000). Dans notre étude nous observons la présence d'*Alexandrium catenella* dans la colonne d'eau pour des salinités comprises entre 36 et 37 PSU. Ces valeurs sont proches des gammes de salinité observées dans la littérature. Par exemple la souche AM89BM d'*A. minutum* est capable de croître dans un milieu qui présente une salinité comprise entre 12 et 37 PSU avec un taux de croissance maximal à des salinités supérieures à 20 PSU (Grzebyk et al., 2003). La souche d'*Alexandrium catenella* provenant de l'étang de Thau (ACT03) peut croître aussi bien à des valeurs de salinités inférieures à 10 PSU qu'à des valeurs supérieures à 40 PSU, le taux de croissance maximal étant enregistré entre 35 et 40 PSU (Laabir et al., 2011). La salinité affecte non seulement le taux de croissance mais également la taille des cellules qui augmente avec la diminution de la salinité afin de s'adapter aux conditions ambiantes (Mayfield et Gates, 2007). Elle a également une action sur la concentration en toxine, par exemple, on retrouve les toxines paralysantes PST chez *Alexandrium minutum* en faible quantité (< 10 fmol PST cell⁻¹) à des fortes salinités (entre 30 et 37 PSU), mais leur concentration augmente quand la salinité est plus faible, avec des valeurs maximales de 50 fmol PST cell⁻¹ enregistrées à des salinités de 15 PSU (Grzebyk et al., 2003).

La solubilité de l'oxygène dans l'eau est inversement corrélée à la température et à la salinité (Barthelemy et Goubier, 1991). La teneur en oxygène dissous dans l'eau dépend des processus physiques, chimiques et biologiques. Certains facteurs contrôlent la solubilité et la biodisponibilité de l'oxygène dans l'eau de mer, tels que la salinité, la température, l'échange atmosphérique, la pression, les courants, les remontées d'eau froide, les marées, et les processus biologiques tels que la respiration et la photosynthèse (Davis, 1975).

Dans un échantillon d'eau de mer en équilibre avec l'air et présentant une salinité de 35 PSU à 10 °C, la teneur en oxygène dissous (TOD) de l'eau de mer serait de 8,6 mg L⁻¹ (Davis, 1975). Pour les eaux marines et estuariennes, la TOD minimale recommandée est de 8,0 mg L⁻¹ (Recommandations canadiennes pour la qualité de l'Environnement. 1999). Dans la baie d'Annaba la concentration en oxygène varie entre 5,1 mgL⁻¹ au mois d'août et 10,66 mg L⁻¹ au mois de décembre. Les faibles valeurs de l'été sont dues à la forte salinité et fortes températures ainsi qu'à la consommation d'oxygène par les microorganismes durant la période de floraison printanière. Dès que la température diminue on observe une augmentation progressive de la concentration d'oxygène dans l'eau. Les valeurs d'oxygènes obtenues dans la station 1 sont en moyenne plus élevées que celles de la station 2. Cette situation est due à un bon brassage de la masse d'eau, puisque la station 1 est située dans une zone plus exposée et moins profonde, alors que la station 2 présente une plus faible circulation des eaux avec une forte concentration de matières organiques (Frehi et *al.*, 2007) provenant des déversements des eaux usées, industrielles. On a pu enregistrer pendant les périodes d'apparition d'*Alexandrium catenella*, des teneurs en oxygène qui varient entre 6,53 mg.L⁻¹ en juin et 9,54 mg.L⁻¹ en février.

2. Les nutriments inorganiques dissous

L'enrichissement les eaux côtières en nutriments est un problème croissant. L'azote (N) d'origine anthropique est particulièrement préoccupant, puisque il contrôle le plus souvent la production primaire. Son excès conduit à l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques (Boesch et *al.*, 2001 et Conley et *al.*, 2009) qui conduit à son tour à des proliférations d'algues toxiques, l'hypoxie voire l'anoxie, la mort de la faune et la dégradation des habitats benthiques (Tomas et *al.*, 2007). L'azote nitrique est la forme la plus stable en milieu aérobie et atteint 65% du stock total d'azote organique et inorganique dissous de l'océan mondial (Aminot, 1985). Parmi les facteurs environnementaux contrôlant le développement du phytoplancton marin, les nutriments azotés se sont révélés être crucial pour l'établissement des blooms toxiques dans les eaux côtières (Anderson et *al.*, 2002). La nature de la source d'azote peut également influencer sur le développement de certains groupes taxonomiques, les nitrates favorisent le développement des diatomées (Malone 1982 ; Boynton et *al.*, 1983) et l'ammonium favoriserait plutôt les blooms de flagellés (Collos et *al.*, 2004). Dans les zones côtières, les concentrations hivernales sont de l'ordre de 5 à 10 µM. Dans les estuaires, ces valeurs augmentent jusqu'à plusieurs centaines de micromoles par litre (Aminot, 1985). Dans la baie d'Annaba, les concentrations de nitrate sont

faibles et varie entre 0 et 5,84 μM avec une moyenne annuelle de 0,5 μM . Les pics observés en avril de 5,8 μM aux stations 1 et 2 peuvent s'expliquer par des apports d'origine continentale en période de crue. Les valeurs obtenues sont proches de celles de Frehi et *al.*, en 2007 (0,09 et 10,23 μM) dans la même zone d'étude. Ces valeurs sont comparables à celle relevées dans le golfe de Fos (Marseille) par Blanc et Leveau en 1970 évoluant entre 0,7 et 29,3 μM . Les côtes algériennes recèlent des teneurs remarquablement faibles de l'ordre de 0,24 à 1,61 μM en surface et 0,32 à 3,22 μM en profondeur (Bernard, 1952). De même Samson-Kechacha (1981) et Gaumer (1981) notent une fourchette de 0 à 3,2 μM enregistrée dans la baie d'Alger. Raimbault (1990) mentionne dans le bassin algérien une variation plus importante de l'ordre de 0 à 9,02 μM due à l'accentuation des activités anthropiques. Dans la partie nord orientale de la méditerranée, en particulier dans le golfe de Thessaloniki (mer Egée), Gotsis-Skretas et Friligos (1990) trouvent des concentrations qui oscillent entre 0,07 et 4,51 μM . Les valeurs en méditerranée occidentale varient généralement entre 1 et 4 μM (Karydis et Kitsiou 2012). Plusieurs études ont montré qu'*Alexandrium catenella* est capable d'utiliser différentes sources d'azote pour sa croissance, tel que l'ammonium, les nitrates et l'azote organique (Siu et *al.*, 1997, Matsuda et *al.*, 1999, Collos et *al.*, 2004). Les études au laboratoire et sur le terrain ont révélé que les souches d'*A. catenella* préfèrent la consommation de l'ammonium que celles des nitrates, leurs taux de croissance étant supérieurs avec l'ammonium qu'avec les nitrates comme source d'azote (Dyhrman et Anderson, 2003, Collos et *al.*, 2004, Jauzein et *al.*, 2008). Les systèmes d'absorption des nitrates d'*A. catenella* et *A. minutum* se sont avérés très sensibles à l'inhibition par ammonium (Collos et *al.*, 2004, Maguer et *al.*, 2007). Les cellules d'*A. catenella* accumulent de grandes quantités d'azote avant de commencer à se diviser et effectuent donc un stockage en réponse immédiate à un apport de nutriments plutôt qu'une croissance (Collos 1986). Il a été démontré qu'*A. catenella* peut absorber suffisamment d'azote en 2 h pour satisfaire ses besoins de croissance sur plus de 24 h (Collos et *al.*, 2004). Une telle stratégie présente un avantage écologique lorsque la fréquence des apports en éléments nutritifs est plus faible que le taux de division cellulaire (Collos 1986).

L'oxydation de l'ammonium (NH_4^+) en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-) s'effectue par le biais de l'action bactérienne en milieu aérobie (Bougis, 1974). Les nitrites sont souvent utilisés comme inhibiteurs de la corrosion dans les eaux de refroidissement de procédés industriels ; l'industrie alimentaire utilise les nitrites comme conservateurs (Aminot, 1985). En général les ions nitrites sont une forme minoritaire dans les eaux océaniques. Leurs concentrations sont

extrêmement basses et en eaux côtière elles sont de l'ordre de 0,5 à 1 μM en hiver et peuvent chuter à moins 0,01 μM en été. Dans les estuaires ces valeurs ne dépassent pas 5 μM (Aminot, 1985). Les nitrites s'oxydent facilement en nitrate, et sont rarement détectés dans les eaux de surface (Aminot, 1985). Dans les eaux riches en matières organiques où la dégradation bactérienne est active, la réduction des ions nitrates peut entraîner une augmentation importante de l'azote nitreux (Bougis, 1974). La présence de grandes quantités de nitrite indique la présence de déchets organiques en décomposition dans les eaux (Aminot, 1985).

Dans la présente étude, on a constaté que les teneurs en nitrite sont très faibles et oscillent entre 0 et 0,13 μM avec une moyenne annuelle de 0,01 μM et 0,02 μM , respectivement dans les stations 1 et 2. Ces valeurs restent comparables à celles obtenues par Frehi en 2007 : cet auteur a enregistré des concentrations qui varient entre 0 et 0,8 μM dans la même zone. L'évolution mensuelle des concentrations en nitrite est inversement proportionnelle à celle des nitrates. Ceci peut s'expliquer par une oxydation de ces ions en nitrate, le processus d'assimilation des nitrites par le phytoplancton ne dépassant pas 1% (Ronner et *al.*, 1983).

L'ion ammonium (NH_4^+), est la forme dominante de l'azote inorganique dissous dans la baie d'Annaba, où il représente près de 82% de l'azote minéral (Frehi et *al.*, 2007). Il constitue l'élément le plus avantageux énergétiquement pour le phytoplancton (Bougis, 1974). De nombreux auteurs ont confirmé que l'ammonium est utilisé préférentiellement par rapport au nitrates par le microphytoplancton (Bougis 1974 ; Heral et *al.*, 1983). Les travaux de Ronner et *al.*, (1983) indiquent que 50% à 90% de la production primaire dans la mer d'Ecosse est basé sur l'assimilation de l'ammonium, ce dernier provient naturellement de l'excrétion des déchets azotés du métabolisme des zooplanctons et des poissons (ammoniotéliques) ainsi que de la décomposition bactérienne des composée azotés (Bougis, 1974). Dans les eaux côtières non polluées les teneurs sont généralement inférieurs à 1 μM . Dans les estuaires ces concentration atteignent plusieurs dizaines voire plusieurs centaines de micromoles par litre (Aminot et Chaussepied, 1983). L'ammonium peut également provenir d'effluents urbains plus ou moins épurés, de rejets industriels et agricoles. Sa présence dans les eaux de surface est généralement un indicateur de pollution domestique. (Aminot, 1985). De fortes concentrations d'azote se trouvent généralement dans les zones de rejet comme les baies (Matsuoka, 1999).

Dans cette étude, on a observé une différence marquée des teneurs en ammonium entre la station 1 et 2, contrairement aux autres éléments dont les concentrations sont assez proches dans les deux stations. Les teneurs en ammonium sont nettement plus faibles dans la station 1 que dans la

station 2. Les plus fortes concentrations (6,05 μM) ont été enregistrées au mois de mars et novembre. Elles correspondent aux saisons printanière et automnale, périodes de minéralisation de la matière organique par la forte activité bactérienne qui se produisent après les blooms phytoplanctoniques observés durant ces périodes. Les valeurs mesurées dans la baie d'Annaba sont proches de celles observées généralement en méditerranée (Aminot et Chaussepied, 1983). Des valeurs comparables ont été également observées dans l'estuaire de la New River, en Caroline du Nord où la moyenne annuelle est de 7 μM (Altman et Paerl., 2012).

La répartition mensuelle des ions ammonium dans la station 2 montre une variation qui se traduit par des pics ponctuels, avec des concentrations qui peuvent atteindre les 98,6 μM au mois de septembre. Ces valeurs anormalement élevées sont d'origine industrielle, Frehi et *al.*, (2007) ayant également enregistré en 2002 des valeurs très élevées de 272 μM dans la zone de déversement des eaux de refroidissements. Les apports continentaux lors des périodes de fortes crues transportent des quantités importantes d'éléments nutritifs vers la partie sud-est de la baie d'Annaba où se situe la station 2. Des concentrations similaires ont été relevées dans différentes régions de la méditerranée orientale et nord orientale (Berland et *al.*, 1981; Lerat et *al.*, 1985 ; Gostis-Skretas et Friligos 1990).

L'altération de la nature et de la concentration des éléments nutritifs peut conduire à des conditions nutritives qui peuvent encourager la croissance des espèces produisant des efflorescences algales nuisibles par rapport à d'autres espèces de microalgues. Beaucoup de travaux ont montré la relation directe entre la charge en éléments nutritifs et l'abondance de HAB (Cloern 2001; Anderson et *al.*, 2002; Sellner et *al.*, 2003 ; Glibert et *al.*, 2005).

Le taux d'assimilation des substrats marqués en N^{15} indique que la production de phytoplancton dans la mer d'Ecosse subsiste essentiellement sur l'ammonium (85%), avec des taux d'incorporation plus faibles pour les nitrates (14%) et le nitrite (1%). (Ronner et *al.*, 1983)

Les formes réduites de l'azote sont utilisées préférentiellement par les dinoflagellés plutôt que par les diatomées (Malone et *al.*, 1983). Ces formes sont principalement l'ammonium et l'urée. Les dinoflagellés utilisent également les formes oxydées tels que le nitrate. Cependant, ces différentes formes d'azote doivent être transformées en ammonium avant leur incorporation dans les acides aminés et la synthèse des macromolécules d'azote telle que les protéines et les acides nucléiques. L'assimilation directe d'ammonium constitue donc un processus plus parcimonieux en énergie pour les cellules puisqu'il est directement incorporé dans les acides aminés (Collos et Slawyk, 1980; Wheeler, 1983).

A. catenella est capable d'utiliser plusieurs sources d'azote (N) pour sa croissance végétative dans les cultures en laboratoire (Anderson 2003 ; Collos et al., 2004) ou lors de la formation des blooms dans le milieu naturel (Collos et al., 2004, 2007). L'ammonium semble être la principale source d'azote pour la croissance pendant les périodes d'efflorescence, contribuant de 30% à 100% aux besoins de cette espèce en azote (Collos et al., 2007).

Leong et al., (2004) ont testé l'influence de trois sources d'azote qui sont : l'ammonium, les nitrates et urée sur la concentration en toxine chez *A. tamarense*. Les résultats ont indiqué que l'ammonium induit la plus forte concentration de toxine intracellulaire, suivie de l'urée et des nitrates. Par conséquent, les populations naturelles d'*Alexandrium* utilisant préférentiellement l'ammonium sont susceptibles d'être plus toxiques que celles qui utilisent les nitrates ou l'urée (Leong et al., 2004).

Siu et al., (1997) ont démontré que les concentrations d'ammonium optimales pour favoriser la croissance d'*A. catenella* se situent entre 25 et 200 μM . Lors du suivi réalisé sur le golfe d'Annaba, les concentrations d'ammonium observées à la station 2 apparaissent comme favorables pour la croissance d'*A. catenella*. Cela peut expliquer au moins en partie les blooms récurrents d'*A. catenella* à cette station par rapport à l'autre station. On peut donc faire l'hypothèse que la station 2 est à l'origine des efflorescences d'*A. catenella*, et que les cellules sont ensuite transportées jusqu'à la station 1 par le vent et les courants.

Le phosphore est présent dans l'eau à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre car, à la différence de l'azote, il est très peu abondant dans la nature et fortement retenu par les sols (Barroin 1990).

Les sédiments fins agissent comme accumulateurs de phosphore dans les conditions oxydantes. Toutefois, ils peuvent brusquement relarguer des quantités importantes de phosphore minérale si le milieu devient réducteur. Les teneurs en orthophosphate (PO_4^{3-}) sont assez faibles dans les estuaires et les zones côtières non polluées. Des concentrations très élevées constituent un signe d'enrichissement d'origines agricoles et domestiques qui se traduit souvent par une eutrophisation du milieu (Aminot et Chaussepied 1983).

Dans les eaux fortement turbides les concentrations en phosphates dissous décroissent plus rapidement et dépendent de la concentration et de la nature des particules remises en suspension. Cette décroissance est liée à des processus d'adsorption du phosphore sur le sédiment (Guillaud et Aminot, 1990).

Les teneurs en phosphate dans la baie d'Annaba sont très faibles, (entre 0 et 0,8 μM) ces valeurs sont comparable à celles enregistrées dans la baie de Tunis (0,08 à 0,6 μM) (Souissi et *al.*, 2000) et également à celles de la lagune de Thau en France (0,03 à 1 μM) (Collos et *al.*, 2009). On retrouve ces gammes de valeurs généralement dans le milieu océanique et les zones côtières non polluées (entre 0 et 1 μM) (Aminot, 1985), ainsi que dans la méditerranée occidentale (0,05 et 0,20) Karydis et *al.*, 2012). Les teneurs moyennes en phosphore proposées par l'OCDE 1996 pour les 5 catégories de statut trophique (ultra-oligotrophie, oligotrophe, mesotrophie, eutrophie, hyper-eutrophie), sont respectivement : 0-4, 4-10, 10-35, 35-100, plus de 100 μM . Selon ce classement les eaux de la baie d'Annaba pourraient être définies comme des eaux ultra-oligotrophes.

Généralement, le phosphore inorganique est considéré comme la principale source de phosphore utilisée par *Alexandrium*, cependant le phosphore organique tel que l'adénosine triphosphate (ATP) ou la guanosine diphosphate (GDP) peut augmenter significativement le taux de croissance de certaines espèces d'*Alexandrium* (Matsuda et al 1999). Le glycerophosphate est aussi utilisé comme une source de phosphate inorganique préférentielle dans le milieu de culture (Prakash, 1967). Les composés phosphorés organiques de faible poids moléculaire, comme les phosphomonoesters, sont hydrolysés en phosphate inorganique avant d'être utilisé pour la croissance (Gagnon et *al.*, 2005). L'absorption du phosphore inorganique par *Alexandrium* a été caractérisé dans quelques études (Yamamoto et Tarutani, 1999 ; Ou et *al.*, 2008). La constante de demi-saturation du phosphore varie entre 0,01 à 2,6 mM pour *A. catenella* (Jauzein et *al.*, 2010). Certain travaux ont démontré que la diminution du phosphore au-delà d'un certain seuil procure un avantage compétitif à certaines espèces toxiques et spécialement *A. catenella* (Collos et *al.*, 2009 ; Jauzien et *al.*, 2010). Dans la lagune de Thau, la diminution des concentrations de phosphore durant les trois dernières décennies due à la mise en place de stations d'épuration des eaux usées dans les années 1970 (La Jeunesse et Elliott, 2004) a conduit à l'apparition simultanée de picocyanobactéries et d'*A. catenella* (Collos et *al.*, 2009). La domination périodique de cette espèce à Thau peut s'expliquer par ses capacités compétitives d'assimilation (PO_4^{3-}) à faibles concentrations et par ses capacités à utiliser les sources de phosphore organique dissous (DOP). D'après Jauzein et *al.*, (2010), durant les blooms d'*A. catenella* et lorsque les concentrations en PO_4^{3-} sont inférieures à 0,4 μM , les cellules synthétisent de la phosphatase alcaline (AP) (Oh et *al.*, 2002; Ou et *al.*, 2006). Cette enzyme hydrolyse des liaisons ester entre PO_4^{3-} et les composés organiques dissous, ce qui rend le PO_4^{3-} disponible pour l'assimilation

cellulaire (Perry, 1972). Dans de telles conditions environnementales, *A. catenella* a un avantage compétitif par l'utilisation de DOP lorsque la phosphatase alcaline est induite. Aussi, le bloom d'*Alexandrium* peut être favorisé par des sources de phosphore organique dissous (Jauzein et al., 2010) tel que les picocyanobactéries. Une hypothèse similaire a été proposée par Ou et al., (2008) pour *A. catenella* dans les eaux côtières de la Chine. Dans notre étude, les valeurs de phosphate comparables à celles observées dans la lagune de Thau peuvent favoriser les blooms d'*A. catenella* dans la baie d'Annaba.

La diminution des concentrations de phosphore dans les cultures expérimentales provoque une augmentation de la toxicité totale chez *Alexandrium catenella* (Hall, 1982; Anderson et al., 1990 ; Siu et al., 1997), atteignant des niveaux 3 à 4 fois supérieure à celle observée dans les contrôles (Boyer et al., 1987.). Ces forte teneurs en toxine peuvent-être induites par la synthèse de l'arginine, précurseur de la biosynthèse de toxines paralysantes (PSP) (Anderson et al., 1990 ; Siu et al., 1997).

3. Phytoplancton et *A. catenella*

Les populations phytoplanctoniques, de par leurs interactions avec le milieu environnant, constituent un élément de premier ordre dans la connaissance des perturbations engendrées au niveau des écosystèmes côtiers par les eaux d'origine continentale, vectrice de divers facteurs de pollution. Se développant au sein d'une masse d'eau où elles flottent, les cellules algales subissent toutes les conséquences des modifications des caractéristiques de leur milieu. Les répercussions concernent non seulement le métabolisme et la physiologie de ces cellules photoautotrophes mais également la diversité spécifique, la structure et la dynamique des populations et des communautés (Glibert & Burkholder, 2006).

Dans ce présent travail, l'étude qualitative du phytoplancton de la baie d'Annaba, nous a permis de recenser 77 taxa. Cette richesse taxinomique, reste faible par rapport aux travaux de Frehi qui a pu recenser 134 espèces en 1995, et 154 espèces de dinoflagellés en 2007. Comparativement, Marion et al., (1985), dans la baie de Bourgneuf, n'ont pu recenser que 47 espèces de diatomées, tandis que Kim & Travers (1985) dans le golfe de Fos ont déterminé 125 taxons, dont 85 diatomées, 9 dinoflagellés et 18 Chlorophycées. Blanc & Leveau (1970) dans un milieu eutrophe n'ont trouvé que 12 genres représentés par 20 espèces dont 19 diatomées et 1 dinoflagellé. Enfin, Neveux et al., (1975) n'ont pu recenser que 22 espèces de Diatomées.

La baie d'Annaba est peuplée plus par les dinoflagellés que les diatomées, représentées respectivement par 41 et 36 espèces. L'abondance relative de ces deux groupes, diffère d'une station à l'autre : on a observé une dominance des diatomées par rapport aux dinoflagellés dans la station 1 et l'inverse dans la station 2. Geurmazi et *al.*, (2010) dans le golfe de Gabès en Tunisie constatent que les diatomées représentent 71% des abondances phytoplanctoniques alors que les dinoflagellés n'en représentent que 27%. Les diatomées forment aussi le groupe dominant du phytoplancton suivi des dinoflagellés dans les eaux de la mangrove Pichavaram de la côte sud-est de l'Inde (Rajkumar et *al.*, 2009). La dominance des dinoflagellés telle qu'observée à la station 2, a déjà été signalée dans la lagune de Nador au (Maroc) où ce groupe représente 51% du phytoplancton total.

Cette différence dans la dominance des groupes phytoplanctonique peut être dû à l'influence de la concentration en éléments nutritifs dans les deux stations. En effet, la différence majeure entre les deux stations concerne les concentrations très élevées d'ammonium dans la station 2 par rapport à la station 1. Il est reconnu que les teneurs élevées en ammonium par rapport aux nitrates favorisent le développement des dinoflagellés en préférant les formes réduites d'azote alors que les nitrates favorisent plus la croissance des diatomées (Malone et *al.*, 1982 ; Boynton et *al.*, 1983 ; Collos et *al.*, 2004).

Nos analyses ont permis également de caractériser au moins 14 espèces de dinophycées soit impliquées dans des efflorescences nuisibles avec des fortes concentrations, soit toxiques soit les deux à la fois. Plusieurs efflorescences ont été observées durant les années 2010-2011, les plus importantes en période printanière. Les espèces concernées sont : *Alexandrium catenella*, *Prorocentrum micans*, *Ceratium massiliense*, *Prorocentrum micans*. Parmi celles-ci, seules les efflorescences à *Alexandrium catenella* peuvent être toxiques (Hadjadji et *al.*, 2013). D'autres espèces de dinoflagellés potentiellement toxiques ont été recensées tels que *Dinophysis caudata*, *D.fortii*, *Lingulidinium polydrum* et *Gymnodinium catenatum*. Cependant, elles ne contribuent pas à des efflorescences phytoplanctonique conséquentes. Les 2 espèces *Prorocentrum micans* et *Prorocentrum triestinum* ont été associées à des efflorescences mais ne sont pas connues comme toxiques. Pour les diatomées, on a observé la présence du genre *Pseudonitzschia sp*, qui regroupe certaines espèces potentiellement toxiques, comme *Pseudonitzschia pungens forme multiseriis* dont l'efflorescence a été signalée par Ounissi et Frehi en 1998. On a enregistré également les poussées de *Cerataulina pelagica*, associées avec *Chaetoceros sp*, *Rhizosolenia sp*.

A l'énoncé des espèces rencontrées dans la baie d'Annaba, il paraît difficile de considérer ces communautés comme caractéristiques d'une aire polluée ou perturbée. Il semble en fait que certaines espèces se développent mieux en zone polluée. C'est le cas des diatomées *Odentella sp*, *Thalassionema sp*, rencontrées uniquement dans la zone polluée et pendant la période estivale. En effet, Benon et al., (1977) signalent que dans les eaux polluées, les populations phytoplanctoniques sont extrêmement peu diversifiées et très clairsemées, seuls quelques Dinoflagellés et Cyanophycées sont dénombrés. En considérant les évaluations quantitatives des différentes composantes des communautés phytoplanctoniques, on peut relever des abondances moyennes plus faibles à la station 1 ($2,00 \times 10^5 \text{ cell.L}^{-1}$) qu'à la station 2 ($2,83 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$). Cette différence est probablement due au caractère plus eutrophe de la station 2 soumise à des pressions anthropiques. Ce type d'effectif a déjà été observés dans d'autres milieux eutrophes comme le Golfe de Fos : 10^7 cell.L^{-1} , ou la rade de Marseille : 10^6 cell.L^{-1} (Arfi et Leveau, 1983). Cette même situation est observée dans l'étang de Berre $3,4-23 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$ (Blanc et Leveau 1970) dans le bassin de l'Arc $10^6-10^7 \text{ cell.L}^{-1}$ (Kim et Travers 1985), et selon la saison dans le Golfe de Fos : en été : $65 \times 10^4 \text{ cell.L}^{-1}$, et au printemps : $70 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$ pendant la poussée de *Thalassiothrix frauenfeldi* et *Nitzschia spp* (Kim et Travers, 1988). Travers (1962) a trouvé également dans le Golfe de Marseille des abondances variant entre $1,9-5 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$, tandis que $2,4 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$ sont estimées au niveau du débouché du Nil (Halim, 1960). Enfin dans la baie d'Alger Samson-Kechacha (1981) et Gaumer (1981) trouvent $2,2-2,8 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$.

On remarque des populations moins structurées avec un indice de diversité et une richesse spécifique plus faible à la station 2 par rapport à la station 1. Cette faible diversité observée dans la station 2 caractérisée par de nombreuses floraisons monospécifiques durant l'année peut être due aux concentrations très importante en ammonium qui procure un avantage compétitif à certaines espèces tel que *Alexandrium catenella* et favorise l'établissement et le maintien de leur dominance (Collos et al., 2007). Ces teneurs sont également susceptibles d'entraîner une certaine inhibition du processus d'absorption des nitrates.

L'espèce *Alexandrium catenella* a été signalée pour la première fois dans les eaux algériennes en 2002 par Frehi et al., (2007) (avec une densité de $117 \times 10^3 \text{ cellules L}^{-1}$). Cette espèce est connue pour être toxique (Gavin et al., 1997). Lors de notre étude, ce taxon a provoqué une efflorescence de $1,3 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$ à la station 2 au mois de mai 2010 qui s'est étendu à la station 1 avec $1 \times 10^5 \text{ cell.L}^{-1}$ observée à la même période. Ces abondances ont dépassé les concentrations des seuils d'alerte ($10^4 \text{ cellules L}^{-1}$) fixées par l'Ifremer (Ifremer 2006). Des concentrations

comparables ont été enregistrées en France dans la lagune de Thau 15×10^6 cellules L^{-1} (Collos et al., 2009), ainsi qu'en Espagne dans le port de Tarragone où les concentrations sont supérieures à 10^5 cellules L^{-1} (Bravo et al., 2008).

Différentes hypothèses sont possibles pour expliquer l'apparition de cette efflorescence et son maintien dans la baie d'Annaba.

La première concerne la présence de kystes benthiques enfouis dans le sédiment et constituant une banque qui alimente les efflorescences d'*A. catenella* et qui permet ainsi la récurrence et leur maintien dans la baie d'Annaba. Cette hypothèse a été vérifiée lors de ce travail de thèse où nous avons pu obtenir des cultures monoclonales à partir de culture de sédiment riches en kyste d'*Alexandrium*.

L'hydrodynamisme de la baie peut aussi favoriser l'établissement de bloom d'*Alexandrium catenella* puisque elle constitue une région peu profonde et relativement fermée (Anderson & Keafer 1985). Protégée du vent, cet écosystème présente aussi une certaine stabilité de la colonne d'eau favorable à la croissance d'*Alexandrium* (Sullivan et al., 2003; Collos et al., 2004; Bolli et al., 2007). Selon la courantologie de la baie d'Annaba, la station 2 peut présenter une plus forte stabilité de sa colonne d'eau ce qui peut favoriser l'existence d'une banque de kyste. Le fond vaseux (station 2) favorise également la rétention de kyste d'*Alexandrium* (Genovesi et al., 2010).

Les concentrations élevées d'ammonium sont optimales à la station 2 pour le développement d'*Alexandrium catenella* (Siu et al., 2007), et enfin la situation de la station 2 en face du port commercial de la baie d'Annaba pourrait être à l'origine de l'apparition d'*A. catenella* à travers le transport des eaux de ballast susceptibles de transporter des kystes et des cellules végétative de plusieurs espèces invasives et exotiques (Smayda et al., 2007).

4. Description des blooms d'*A. catenella* dans l'étang de Thau

Nous reprenons ici, à des fins de comparaison avec les résultats du site d'Annaba, les principales caractéristiques de la lagune de Thau et des communautés phytoplanctoniques identifiées, notamment celles concernant les populations d'*Alexandrium*. Ces informations sont issues de la littérature dédiée à ces sujets.

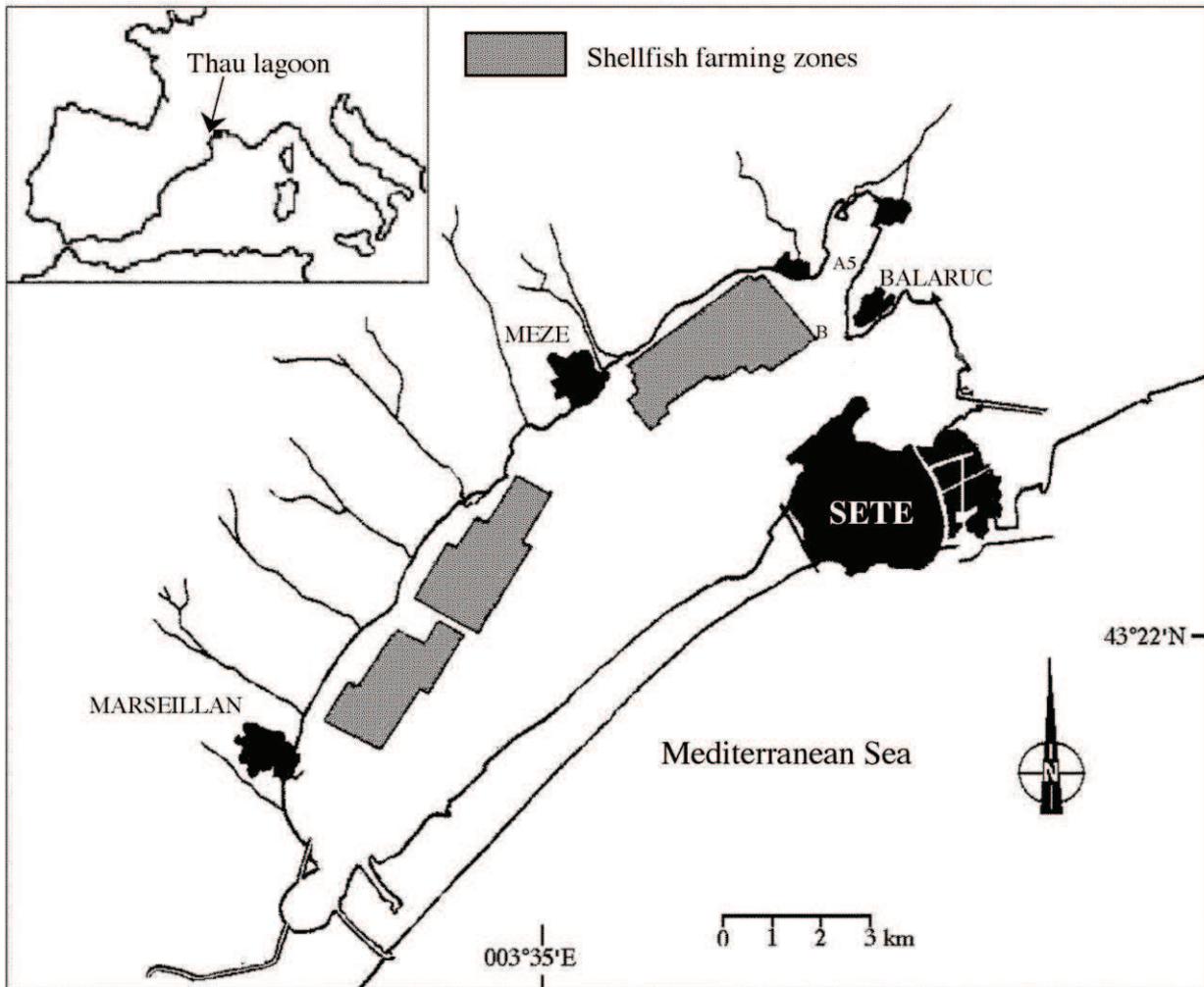


Figure 14. Lagune de Thau et station B d'échantillonnage

4.1. Caractéristiques géographiques, hydrodynamiques et nutritives de l'étang de Thau

L'étang de Thau (Figure 14), situé dans le département de l'Hérault, à environ 30 km au sud-ouest de Montpellier, est une lagune de 7500 ha qui s'étend sur 19.5 km de long et 4.5 km, de large. Les profondeurs moyenne et maximale sont respectivement de 5 m et 11 m. Son bassin versant s'étend sur 15 communes, pour une surface de 285 km². Ce secteur du Languedoc-Roussillon est peu industrialisé et n'est pas sujet à l'agriculture intensive.

C'est la plus grande et la plus profonde lagune du littoral du Languedoc-Roussillon. Dans les années soixante-dix, la lagune était fortement eutrophisée, mais d'importants aménagements (stations d'épuration, raccordements des populations aux réseaux d'assainissements) ont permis de diminuer les apports en phosphore.

L'étang de Thau est une lagune séparée de la mer Méditerranée par un cordon de sable littoral appelé lido. Elle reçoit des apports d'eau douce provenant du canal du Midi et du canal du Rhône à Sète, mais également de deux principaux cours d'eau la Vène et le Pallas. Les débits de ces cours d'eau sont régis par le climat méditerranéen littoral, caractérisé par des précipitations irrégulières et souvent automnales ; les débits moyens mesurés sont donc faibles et des crues soudaines et fortes peuvent être générées pendant la saison automnale. Les apports d'eau marine sont issus des relations avec la Méditerranée par les canaux de Sète au nord-est, et par les graus de Pisse-Saunes et du Quinzième au sud-ouest. Les échanges avec la mer sont estimés à 800 Mm³/an.

La création de la Station Méditerranéennes de l'Environnement Littoral de Sète, en 1895 a permis de mener les premières études sur la flore et la faune de l'étang. La lecture de ces différents ouvrages montre que cette lagune a semble-t-il peu évolué d'un point de vue morphologique. Par contre la mise en place de structures ostréicoles a fondamentalement modifié ses caractéristiques physico-chimiques. Les températures varient en général entre 5,6 et 25,6 °C , la salinité entre 29,5 et 38,7 PSU. Les concentrations des nitrates dans la lagune de Thau sont généralement de l'ordre de 11,2 µM. Les nitrites présentent des concentrations plus faibles de l'ordre de 0,8 µM et les concentrations en ammonium atteignent 10,2 µM. Le phosphate minéral dissous ne dépasse pas les 1,6 µM et enfin les silicates oscillent entre 0,8 et 26,7 µM (Souchu et *al.*, 2001).

Le bassin versant de Thau est largement constitué par des terres agricoles qui sont aux deux tiers occupées par la viticulture. Il représente la principale source d'apports nouveaux, les échanges avec la mer étant de faible importance. En ce qui concerne l'azote, les apports les plus importants ont lieu à l'automne, lorsque les pluies sont les plus prononcées et induisent un lessivage des sols. Les apports en phosphore sont plus prononcés en période estivale, où la population passe de 60000 à 80000 habitants.

L'étang de Thau est le lieu de plusieurs activités économiques : la pêche, les activités sportives aquatiques (voile) mais surtout la production d'huîtres et de moules. En effet il existe environ 600 établissements conchylicoles dont l'activité représente 9% de la production nationale. La conchyliculture est un des moteurs économiques de la région Languedoc-Roussillon.

On observe sur la période entre 1972 et 2006 une augmentation des températures (0,045°C/an), principalement marquée au printemps, et une diminution marquée des concentrations en

phosphate (90% au cours de la période 1970-1995 d'après Souchu et *al.*, 1998) avec des concentrations actuelles inférieures à 1 μM et indétectables en hiver ($<0.03 \mu\text{M}$). L'Étang de Thau est ainsi devenu l'une des lagunes les moins eutrophes de la côte méditerranéenne (Collos et *al.*, 2009).

4.2. Le phytoplancton à Thau

La première description du phytoplancton à l'étang de Thau a été réalisée par Pavillard en 1905. Les diatomées sont le groupe dominant du phytoplancton à Thau (Hénard, 1978). Parmi les espèces de diatomées présentes, l'espèce *Skeletonema costatum* est typique de la période hivernale. Pendant le reste de l'année, on observe d'autres espèces appartenant aux genres *Chaetoceros* et *Nitzschia*. D'autres groupes de microalgues peuvent être à l'origine d'efflorescence, tels les flagellés nanoplanctoniques. Les dinoflagellés sont également présents mais leurs abondances sont en général moins élevées que celles des diatomées (Jarry et *al.*, 1990).

Parmi les diatomées centriques, on observe *Rhizosolenia setigera*, *Chaetoceros lacinosus*, *Nitzschia pungens* et *Thalassionema nitzschoïdes*. On recense également *Nitzschia closterium*. Des cryptophycées sont associées à ce groupe ainsi que les euglénophycées et les cyanophycées. L'étang est principalement peuplé par des espèces euryhalines pouvant supporter des conditions de dessalure (Jarry et *al.*, 1990). Les dinoflagellés identifiés sont *Alexandrium catenella/tamarense*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis sacculus*, *Proto-peridinium quinquecorne*, *Proto-peridinium bipes*. Le fort renouvellement d'eaux marines rapproche la lagune des conditions de l'oligotrophie méditerranéenne. Ce sont généralement les apports du bassin versant en sels nutritifs et en matières organiques qui fertilisent les milieux lagunaires (Dufour, 1984; Frisoni, 1987), assurant un apport élevé d'éléments nutritifs. Dans la lagune de Thau, Jarry et *al.*, (1990) ont observé une chute de la richesse et de la diversité spécifique accompagnées d'une augmentation de l'abondance relative des dinoflagellés. Ce phénomène apparaît généralement dans les lagunes méditerranéennes lorsque l'influence des eaux marines diminue (Frisoni, 1984). Les principales espèces de phytoplanctons présentes dans la lagune de Thau sont : *Alexandrium catenella/tamarense*, *Cylindrotheca closterium*, *Dactyliosolen fragilissimus*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis sacculus*, *Guinardia striata*, *Gyrodinium spirale*, *Heterocapsa triquetra*, *Leptocylindrus danicus*, *Leptocylindrus minimus*, *Nitzschia longissima*, *Peridinium*

quinquecorne, *Protoperdinium bipes*, *Rhizosolenia pungens/setigera*, *Synechococcus spp.*
Thalassionema nitzschioides.

4.3. *Alexandrium catenella* à Thau

En 1995 une prolifération d'*Alexandrium catenella* non toxique s'est produite dans la lagune de Thau (10^4 cellules L^{-1}) (Lilly et al., 2002).

La première efflorescence toxique s'est produite en 1998. Au cours de cet épisode, les moules ont présenté une contamination de 850 μg équivalent saxitoxines pour 100 g de chair entraînant la fermeture des zones de pêche et d'élevage (Masselin et al., 2002). Depuis, des efflorescences apparaissent chaque année au printemps et/ou en automne avec des degrés variables d'intensité et de toxicité. Les souches isolées de 1998 à 2007 présentent une signature ribotypique (TA) identique à celle de souches isolées au Japon. Masseret et al., (2009) ont montré pour la première fois, grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites, qu'à l'intérieur de ce clade TA il existait trois lignées distinctes, une Française et deux asiatiques. La caractérisation du ribotype de 368 cultures monoclonales isolées en 2007 a mis en évidence pour la première fois de façon formelle la co-existence dans l'Etang de Thau des deux espèces *A. catenella* (TA) et *A. tamarense* du clade Ouest Européen (WE) (Genovesi et al., 2008). Cette description de la diversité a été réalisée à partir de cellules végétatives prélevées dans les populations planctoniques.

L'espèce est principalement observée en automne et au printemps lorsque les températures sont comprises entre 10 et 22° C. Au printemps 2003, *Alexandrium* a été observé en avril au niveau de la Crique de l'Angle, avec 1 000 cell L^{-1} . Plusieurs petites apparitions ($< 10\ 000$ cell L^{-1}) ont été observées au mois de mai et les plus fortes abondances ($> 20\ 000$ cell L^{-1}) ont été enregistrées au mois de juin avec un maximum de 155 000 cell L^{-1} . (Genovesi-Giunti, 2006).

A l'automne 2003, *Alexandrium* était présent dans la Crique de l'Angle avec des concentrations maximales (5 à 6×10^6 cell L^{-1}) dès le début octobre. Les premières contaminations ont été observées dans les huîtres de Bouzigues. Avec la baisse de température, les concentrations d'*Alexandrium* ont chuté début octobre. Ensuite, *Alexandrium* est resté présent à de faibles abondances dans la Crique de l'Angle jusqu'à la fin de l'année 2003. Les observations confirment que la Crique de l'Angle est bien un point de départ important des efflorescences d'*Alexandrium* (Genovesi-Giunti, 2006). La densité des kystes de résistance au niveau du sédiment a été estimée à une valeur moyenne faible (moins de 20 kystes par gramme de sédiment sec) ce qui suggère une invasion récente de cette espèce (Genovesi-Giunti, 2006).

5. Analyse comparative des efflorescences d'*Alexandrium catenella/tamarense* en baie d'Annaba (Algérie) et dans l'étang de Thau

Cette analyse comparative fait l'objet du manuscrit qui est inséré ci-après. Elle s'appuie sur les données recueillies sur le terrain dans le cadre de cette thèse et sur les données disponibles dans la littérature.

Contexte de l'étude

L'un des premiers objectifs de cette thèse était de déterminer les facteurs environnementaux ainsi que les facteurs physiologiques internes d'*Alexandrium catenella* qui ont permis l'établissement et la récurrence de cette espèce au niveau de nos deux sites d'études.

L'intérêt de notre travail se situe dans la comparaison entre deux écosystèmes variables au niveau trophique : l'un relativement eutrophe (Annaba, Frehi et *al.*, 2007) et l'autre relativement oligotrophe (Thau, Collos et *al.*, 2009) mais qui ont la particularité d'héberger des blooms récurrents de l'espèce d'*Alexandrium catenella*. Dans ce travail nous avons retracé l'historique des blooms de cette espèce dans la baie d'Annaba en Algérie et dans la lagune de Thau en France à travers l'étude des conditions environnementales physicochimiques et des abondances cellulaires d'*Alexandrium catenella*. Nous nous sommes particulièrement intéressés dans cette investigation à 3 années sur une période de 18 ans, la première année étant la période avant l'apparition des blooms, tandis que les 2 années suivantes représentent la période de la récurrence des blooms.

A comparative analysis of *Alexandrium catenella/tamarense* blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France) over 18 years.



Ecology/Écologie

A comparative analysis of *Alexandrium catenella/tamarense* blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France); phosphorus limitation as a trigger



Analyse comparative des efflorescences d'Alexandrium catenella/tamarense en baie d'Annaba (Algérie) et dans l'étang de Thau (France) : limitation en phosphore comme élément déclencheur

Imene Hadjadji^{a,b}, Hocine Frehi^b, Lembarek Ayada^b, Eric Abadie^c, Yves Collos^{a,*}

^a UMR 5119, UM2-CNRS-IRD, Écologie des systèmes marins côtiers, université Montpellier 2, 34095 Montpellier cedex 5, France

^b Laboratoire « bioressources marines », université Badji-Mokhtar-Annaba, BP 12, El-Hadjar, 23000 Annaba, Algeria

^c Ifremer, laboratoire Environnement Ressources Languedoc-Roussillon, BP 171, 34203 Sète, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2013

Accepted after revision 20 November 2013

Available online 4 February 2014

Keywords:

Alexandrium catenella/tamarense

Blooms

Algeria

France

Mediterranean

Mots clés :

Alexandrium catenella/tamarense

Efflorescences

Algérie

France

Méditerranée

ABSTRACT

Environmental conditions ultimately leading to blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella/tamarense* were investigated at two Mediterranean sites (Annaba Bay, Algeria and Thau lagoon, France). Three years were examined in details: 1992 (a pre-*Alexandrium* period), 2002 (a year with the first bloom in Annaba) and 2010 (a year with a major bloom in Annaba). Most conditions were similar, but ammonium concentrations were much higher in Annaba (up to 100 μM) than in Thau (up to 10 μM). First records of *A. catenella/tamarense* were in 1995 for Thau and 2002 for Annaba, and coincided with soluble reactive phosphorus (SRP) decreasing below a concentration of about 1 μM . No other environmental variable could be related to those blooms. Thus, it is likely that the large reductions in SRP at both sites led to phosphorus limitation of a certain number of phytoplankton species and favored the development of *A. catenella/tamarense*.

© 2013 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

R É S U M É

Les conditions du milieu amenant à des efflorescences du dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella/tamarense* ont été suivies sur deux sites méditerranéens (la baie d'Annaba, Algérie et l'étang de Thau, France). Trois années ont été examinées en détail : 1992 (période pre-*Alexandrium*), 2002 (première efflorescence à Annaba) et 2010 (efflorescence majeure à Annaba). La plupart des conditions étaient comparables, sauf pour l'ammonium, avec des concentrations bien plus fortes à Annaba (jusqu'à 100 μM) qu'à Thau (jusqu'à 10 μM). Les premières observations d'*A. catenella/tamarense* ont été réalisées en 1995 à Thau et 2002 à Annaba, et ont coïncidé avec le passage des concentrations en phosphore réactif dissous (PRD) sous la barre des 1 μM . Aucune autre variable du milieu n'a pu être reliée à l'apparition de ces efflorescences. Il est donc probable que les fortes diminutions en PRD aux deux sites aient entraîné une limitation par le phosphore d'un certain nombre d'espèces phytoplanctoniques et favorisé le développement d'*A. catenella/tamarense*.

© 2013 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Corresponding author.

E-mail address: yves.collos@univ-montp2.fr (Y. Collos).

1. Introduction

The genus *Alexandrium* belongs to one of the most important genera of harmful algal blooms (HABs) producing Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins [1]. *Alexandrium* species have a worldwide distribution, being present in coastal zones, continental shelf waters, in temperate as well as tropical areas [2]. The species *A. catenella*, *A. tamarensis* and *A. fundyense* are the most toxic of the genus *Alexandrium*. Together, these species make up the *A. tamarensis* complex [1,3]. Such species are often observed around the Mediterranean region [2]. In the northern part, *A. catenella* has first been reported in the Balearic islands in 1983 [4], and later on the French [5], Spanish [6] and Italian [7] coasts. In the southern part, *Alexandrium* species have been reported in Morocco [8–11], Tunisia [12,13], and Algeria [14].

A. catenella blooms in inorganic nutrient rich [6,15] and nutrient poor [16,17] waters. This is from the viewpoint of inorganic nutrients. The *A. tamarensis* complex has been classified as a « frontal zone taxon » or « mixing-drift » group [18], and therefore characteristic of areas that are unstable and intermediate between high and low inorganic nutrients. Very little is known generally about dissolved organic nutrients at those sites. It is therefore difficult to find recurrent patterns of bloom development for this mixotrophic species in relation with trophic conditions. Comparative studies of HABs ecosystems have been recognized as a way to deal with such difficulties and could “reveal fundamental processes governing population development” [19].

In this study, we compare *A. catenella/tamarensis* dynamics in two contrasted sites in the Mediterranean. The first one is the relatively eutrophic [14] Bay of Annaba (Algeria) and the second is the Thau lagoon (France) that has recently gone through a period of oligotrophication [20]. We try to relate those blooms to environmental factors in those two coastal sites on both sides of the Mediterranean Sea, and deduce possible causes of their recent development and recurring presence. We study 3 different years over an 18-year period, one being “pre-*Alexandrium*”, one coinciding with the first *A. catenella* bloom in Annaba and the last one with a very large *A. catenella* bloom in Annaba. As the Thau lagoon blooms were connected with oligotrophication, we selected a period over which the same phenomenon appeared to take place in Annaba.

2. Material and methods

2.1. Study sites

The Bay of Annaba is located in the eastern part of Algeria (Fig. 1), between Cape Rosa (36°38'N, 8°15'E) and Cape de Garde (36°38'N, 7°16'E), with a maximal depth of 50 m. The main temporary rivers (oueds) are Oued Seybouse (second river in Algeria), Oued Boudjemâa carrying urban and industrial effluents, and Oued Kouba carrying sewage waters. *A. catenella* has bloomed periodically since 2002 in this bay [14].

The Thau lagoon is a shallow marine lagoon located on the French Mediterranean coast (43°24'N, 3°36'E) covering 75 km² (Fig. 2). The mean depth is about 4 m, with a

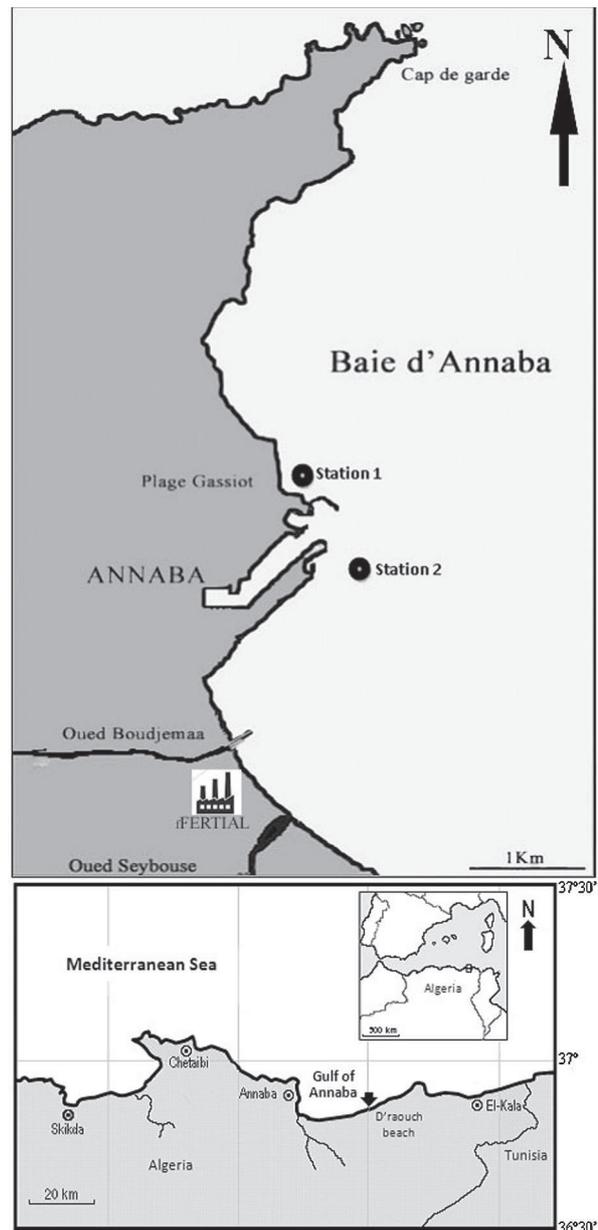


Fig. 1. Station positions in Annaba Bay, Algeria.

maximum of 10 m. The lagoon is connected to the sea by 3 narrow channels. Three oyster farming areas are located along the northwestern shore. The lagoon represents 10% of French annual oyster production and is the main oyster production center on the Mediterranean. Since 1998, it has experienced recurrent blooms of *A. catenella* that periodically threaten economic activities [20].

2.2. Sampling

2.2.1. Sampling stations for Annaba Bay

Station 1 (36°54.073'N, 7°46.929'E) has a depth of 5 m and is sheltered from dominant (NW) winds, with a rocky/sandy bottom.

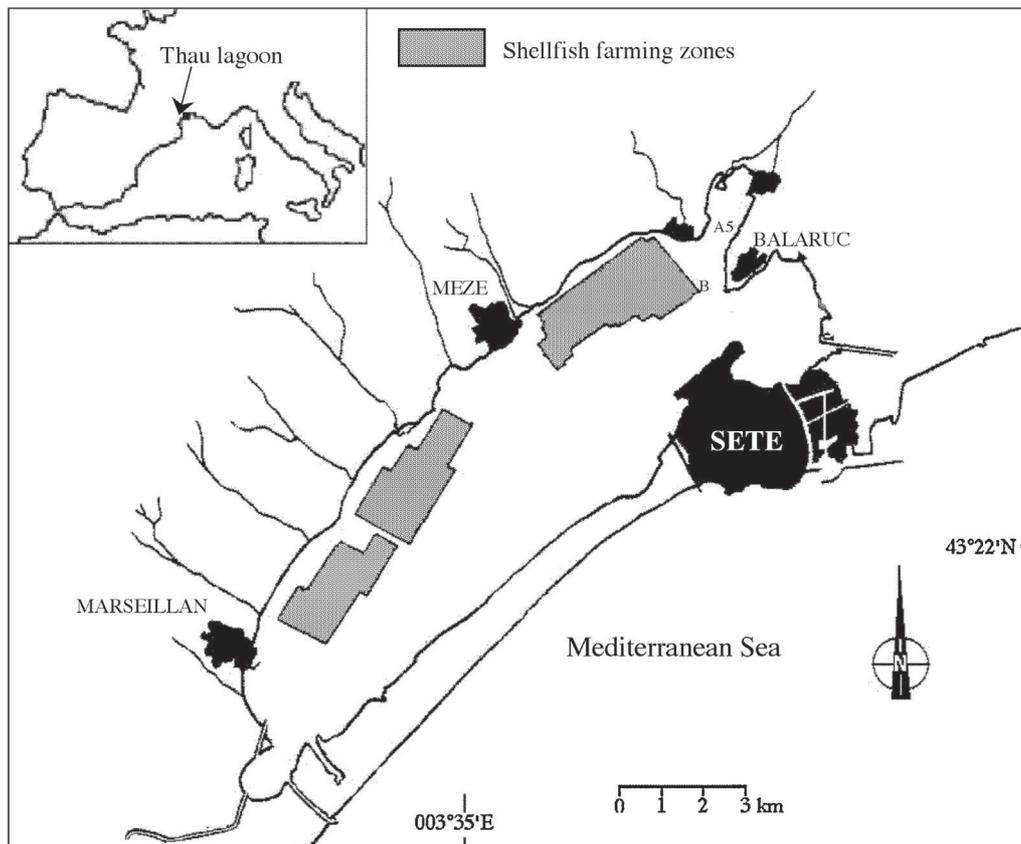


Fig. 2. Station positions in Thau lagoon, France.

Station 2 ($36^{\circ}53.976'N$, $7^{\circ}47.111'E$) is deeper (13 m) than station 1 and is located in front of the commercial harbor. It is subject to major land influence through input from Oued Seybouse and Oued Boudjema and is considered eutrophic relative to station 1. Bottom sediments are silty. The sampling frequency was twice a month.

2.2.2. Sampling stations for Thau lagoon

Station B ($43^{\circ}26.070'N$, $3^{\circ}39.920'E$) is located at one of the deepest part of the lagoon (8 m).

Station A5 ($43^{\circ}26.916'N$, $3^{\circ}40.300'E$) is located in the Angle Creek and is shallower (2 m) and more sheltered than Station B. The sampling frequency varied from 1 to 8 samples per month for physical variables. For chemical and biological variables, sampling was carried out at least twice a month at station B.

2.3. Physical variables

In Annaba, surface temperature and salinity were measured with a WTW 191 multiparameter probe (precision $0.1^{\circ}C$ for temperature and 0.05 for salinity).

For Thau, the Ifremer observation network provided records of surface water temperature and salinity (monthly means).

2.4. Nutrients

At both sites, samples for ammonium determination were immediately fixed and measured at the laboratory [21]. Samples for the other nutrients were kept in the cold and dark, then frozen at $-20^{\circ}C$ until analysis. Nitrate [22], nitrite [23] and soluble reactive phosphorus (SRP) [24] were measured after thawing at room temperature. Detection limits were 0.05, 0.01, 0.05 and $0.02 \mu M$ for nitrate, nitrite, ammonium and SRP respectively.

2.5. Biological variables

2.5.1. Chlorophyll

In Annaba, chlorophyll a was measured by spectrophotometry [25]. In Thau lagoon, Chlorophyll a was estimated from 90% acetone extracts and fluorimetry [26] or spectrofluorometry [27].

2.5.2. Microphytoplankton

In Annaba, for the qualitative survey of phytoplankton, horizontal net tows were carried out at 50 cm below the surface, with a $20 \mu m$ mesh size net. During *Alexandrium* blooms and for the quantitative study, bucket sampling was used, and 40 l were filtered on a $20 \mu m$ mesh size net.

Samples were then resuspended in a 100 ml volume, then subsamples of 1 or 5 ml were used depending on the cell density. Samples were immediately fixed with buffered formaldehyde (5% final concentration). Identification was by electron microscopy in 2002 [14] and by optical microscopy in 2010, using morphological criteria. Both 2 cell and 4 cell chains were observed.

In Thau lagoon, at least one liter of seawater was taken with a sampling bottle. Additions of 0.2 to 0.4 ml Lugol's solution per 100 ml was carried out for quantitative analysis. A counting chamber was filled with 10 ml of fixed sample for sedimentation [28].

Phytoplankton cells greater than 10 μm equivalent cell diameter were counted by optical microscopy.

2.6. Statistical analyses

Variables were compared by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by ranks and Dunn's multiple comparison tests.

3. Results

In 1992, *A. catenella/tamarensis* had not yet been recorded either in Thau lagoon [5] or in Algeria [14].

3.1. *Alexandrium catenella/tamarensis* blooms

A. catenella was first observed in Annaba in March 2002 and in Thau in July 1995. Temporal changes of cell densities during 2002 are shown for station 2 in Annaba and stations A5 and B at Thau (Fig. 3). Highest monthly mean cell densities (117000 cells L^{-1}) in Annaba were recorded in March with a secondary peak in December (200 cells L^{-1}). In Thau, monthly mean cell densities were generally higher at A5 (maximum of 66,700 cells L^{-1} in May) than at station B (maximum of 5400 cells L^{-1} also in May), with a secondary peak in August (9600 cells L^{-1}).

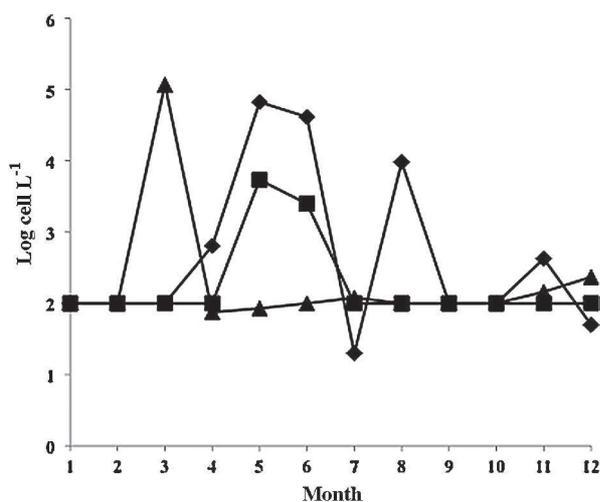


Fig. 3. Changes in monthly mean *Alexandrium catenella/tamarensis* cell densities during 2002. Diamonds: Thau station A5; squares: Thau station B; triangles: Annaba station 2. Detection limits: 100 cells L^{-1} .

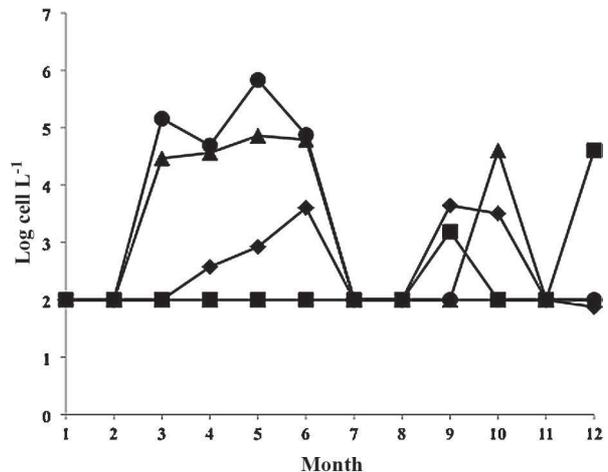


Fig. 4. Changes in monthly mean *Alexandrium catenella/tamarensis* cell densities during 2010. Diamonds: Thau station A5; Squares: Thau station B; triangles: Annaba station 2; circles: Annaba station 1. Detection limits: 100 cells L^{-1} .

In 2010, 2 stations were sampled in Annaba (Fig. 4) with higher cell densities at Station 2 (up to 681000 cells L^{-1} in May). At station 1, monthly mean cell densities never exceeded 73,000 cells L^{-1} (also in May). For individual dates, a record peak of 1.38×10^6 cells L^{-1} was recorded in May 2010 at the surface of station 2. This was the highest cell density ever recorded so far in Annaba.

In Thau, during the same year, no bloom developed in the spring, but cell densities reached a maximum of 4400 cells L^{-1} in September at station A5 and 1500 cells L^{-1} also in September at station B.

In 2002, there appeared to be no synchrony in blooms between sites (Fig. 3), but in 2010, there was a bimodal distribution at both sites, with maxima in May–June and September–October (Fig. 4).

3.2. Environmental factors

Table 1 summarizes the ranges of physical and chemical variables at both sites. Sea surface temperatures were higher in Annaba than in Thau. The range of salinities was larger in Thau than in Annaba, with maximal values being greater in Thau lagoon. Maximal nitrate, ammonium and SRP concentrations were observed in Annaba, and were sometimes greater than in Thau by an order of magnitude, such as for ammonium. Concerning phytoplankton biomass, the range of Chl a values was about the same.

Table 2 summarizes the changes in environmental parameters occurring over an 18-year period. The year 1992 can be considered as a “pre-*Alexandrium*” period for both sites. No significant changes in either annual mean SST, salinity (not shown) or ammonium occurred over this period at either site. In Annaba, the most spectacular changes were due to nitrate concentrations that decreased by a factor of 50 (significant difference with $p < 0.001$) and specifically SRP concentrations that decreased by a factor of 250 (significant difference with $p < 0.001$), from a mean annual value of 17.4 μM in 1992 to 0.07 μM in 2010. In

Table 1

General physical and chemical features at both sites. Range of values (monthly means) over several years (1992, 2002 and 2010 for Annaba; 1992 to 2010 for Thau).

Site	SST (°C)	S	NO ₃ (μM)	NH ₄ (μM)	SRP (μM)	Chl a (μg/liter)
Annaba	14.1–28.6	35.3–38.1	U-65	U-110	U-43	0.8–32.8
Thau	5.0–25.6	29.5–39.2	U-20	U-10	U-10	0.3–37.4

S: salinity; SRP: soluble reactive phosphorus; SST: sea surface temperature; U: undetectable; Chl a: Chlorophyll a.

Table 2

Changes in environmental factors at two coastal sites North and South of the Mediterranean for 3 selected years over an 18-year period. Seasonal distributions are available at http://www.st.nmfs.noaa.gov/nauplius/media/time-series/site__mediterranean-thau-lagoon-phy/copepodite/index.html for Thau and in [34] and [14] for Annaba respectively in 1992 and 2002.

Year	SST (°C)			Nitrate (μM)			Ammonium (μM)			Soluble reactive P (μM)			Chlorophyll a (μg/liter)		
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
<i>Annaba</i>															
1992	21.6	4.7	8	25.8	20.5	8	49.9	37.7	8	17.4	14	8	10.3	9.5	6
2002	19.5	4.1	12	1.9	3.0	12	11.6	15.3	12	1.2	1.8	12	9.0	11.3	11
2010	20.7	4.8	11	0.5	0.9	12	23.6	24.3	11	0.07	0.13	11	2.4	1.4	11
<i>Thau</i>															
1992	18.4	7.1	12	0.5	0.5	11	1.4	3.1	10	1.2	1.2	10	1.5	0.6	9
2002	15.9	5.6	12	0.2	0.3	3	1.1	0.7	10	0.5	0.2	10	3.0	1.5	12
2010	15.1	6.9	12	0.2	0.1	3	0.7	0.6	3	0.2	0.1	3	2.2	1.1	11

NA: not available; P: phosphorus; SD: standard deviation; SST: sea surface temperature.

Thau, the most dramatic decrease in SRP occurred between 1972 and 1992 (from about 10 to 1 μM in summer and from 3 μM to undetectable levels in winter). Between 1992 and 2010, the decrease was significant ($p < 0.05$).

4. Discussion

Although nitrate decreased dramatically between 1992 and 2010 in Annaba, nitrogen limitation is unlikely because ammonium levels remained high (Table 2). The decrease in SRP was due to the discontinuation of phosphogypsum outputs from a local fertilizer plant in Annaba (M. Retima, pers. com.), and from implementation of sewage treatment plants in Thau [29]. Concerning *A. catenella* ability to use low SRP levels, laboratory studies show that the half-saturation constant for SRP uptake was variable in cultures, depending on the growth rate, but could reach values as low as 0.03 μM for strain ACT03 and 0.01 μM for strain TL01 [30]. This indicates that *A. catenella* could be a very strong competitor at the low SRP concentrations recently observed in Annaba Bay. An alternative to its periodic dominance is dissolved organic phosphorus use. Alkaline phosphatase activity was induced in *A. catenella* at SRP levels between 0.4 and 1 μM [30] that are intermediate values between those observed in 2002 and 2010 in Annaba Bay.

Thus it seems very likely that the appearance of blooms of *A. catenella* in Annaba Bay is due to SRP reaching very low levels where other members of the phytoplankton community cannot compete for the acquisition of this limiting resource.

This situation is similar to that experienced in Thau lagoon [20] where SRP reached undetectable winter levels in 1992–1993 and *A. catenella* was first reported in 1995.

A parallel can also be made with the Seto Inland Sea (Japan) where SRP decreased from 0.7 to 0.2 μM between 1978 and 1984 [31]. *A. catenella* vegetative cells were first reported in this area in 1982 [32], so that *A. catenella* probably started to bloom when SRP reached levels between 0.7 and 0.2 μM. In the Gulf of Olbia (Sardinia, Italy), the first *A. catenella* bloom was reported in 1999 [33] under conditions of SRP below 1 μM that were lower than observed in 1992–1993, a situation also similar to the results presented here.

5. Conclusions

This inter-site comparison between the Northern and Southern coasts of the Mediterranean has revealed that one of the causes of the development of *A. catenella/tamarensis* is the onset of inorganic phosphorus limitation in both environments that allowed this organism to develop periodically and produce recurrent blooms. No other environmental variable could be related to the emergence of this organism. Such an explanation is an alternative to the general concept that eutrophication leads to harmful algal blooms and may require a revision of coastal water management policies.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

We wish to thank the anonymous referee and Ian Jenkinson for useful comments.

References

- [1] D.M. Anderson, T.J. Alpermann, A.D. Cembella, Y. Collos, E. Masseret, M. Montresor, The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health, *Harm. Algae* 14 (2012) 10–35.
- [2] E.L. Lilly, K.M. Halanych, D.M. Anderson, Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae), *J. Phycol.* 43 (2007) 1329–1338.
- [3] E. Balech, The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the tamarensis group, in: D.M. Anderson, A.W. White, D.G. Baden (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 33–38.
- [4] R. Margalef, M. Estrada, Synoptic distribution of summer microplankton (Algae and protozoa) across the principal front in the Western Mediterranean, *Invest. Pesqueria* 51 (1987) 121–140.
- [5] E. Abadie, Z. Amzil, C. Belin, M.A. Comps, P. Elziere, P. Papayanni, C. Lassus, C. Le Bec, Marcaillou, E. Le Baut, R. Nezan, Poggi, Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense* : épisode de novembre à décembre 1998, *Ifremer, Plouzané, France*, 1999, p. 44.
- [6] M. Vila, E. Garcés, M. Maso, J. Camp, Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 222 (2001) 73–83.
- [7] A. Lugliè, M.G. Giacobbe, A. Sannio, F. Fiocca, N. Sechi, First record of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Whedon et Kofoid) Balech (Dinophyta), a potential producer of Paralytic Shellfish Poisoning, in Italian waters (Sardinia, Tyrrhenian Sea), *Boccone* 16 (2) (2003) 1045–1051.
- [8] L. Tahri-Joutei, M. Maghraoui, R. Boutaib, Toxic phytoplankton and phycotoxins in the Mediterranean coast of Morocco from 1994 to 2000, in: A. Villalba, B. Reguera, J.L. Romalde, R. Beiras (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety*, Xunta de Galicia and COI of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, 2003, pp. 187–195.
- [9] A. Bennouna, O. Assobhei, B. Berland, J. El Attar, Étude des populations phytoplanktoniques de la lagune de Oualidia (Maroc) ; dinoflagellés potentiellement nuisibles, *Mar. Life* 10 (2000) 3–18.
- [10] A. Bennouna, B. Berland, J. El Attar, O. Assobhei, Eau colorée à Lingulodinium polyedrum (Stein) Dodge, dans une zone aquacole du littoral du Doukkala (Atlantique marocain), *Oceanol. Acta* 25 (2002) 159–170.
- [11] M. Daoudi, L. Serve, N. Rharbi, F. El Madani, F. Vouvé, Phytoplankton distribution in the Nador lagoon (Morocco) and possible risks for harmful algal blooms, *Transit. Water. Bull.* 6 (2012) 4–19.
- [12] S. Turki, N. Balti, First bloom of dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Bizerte Lagoon (northern Tunisia), *Harm. Algae News* 35 (2008) 8–9.
- [13] D.B. Smida, I. Sahraoui, H.H. Mabrouk, A.S. Hlaili, Dynamique saisonnière du genre *Alexandrium* (dinoflagellé potentiellement toxique) dans la lagune de Bizerte (Nord de la Tunisie) et contrôle par les facteurs abiotiques environnants, *C. R. Biologies* 335 (2012) 406–416.
- [14] H. Frehi, A. Couté, G. Mascarell, C. Perrette-Gallet, M. Ayada, M.H. Kara, Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie), *C. R. Biologies* 330 (2007) 615–628.
- [15] E. Garcés, M. Vila, M. Maso, N. Sampedro, M.G. Giacobbe, A. Penna, Taxon specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 301 (2005) 67–79.
- [16] T. Takeuchi, Y. Yoshida, Relationship between the blooms of *Alexandrium catenella* and the water quality or meteorological factors, *Nippon Suisan Gakkaishi* 65 (1999) 826–832.
- [17] A. Lugliè, M.G. Giacobbe, F. Fiocca, A. Sannio, N. Sechi, The geographical distribution of *Alexandrium catenella* is extending to Italy! First evidences from the Tyrrhenian Sea, in: K.A. Steidinger, J.H. Landsberg, C.R. Tomas, G.A. Vargo (Eds.), *Harmful Algae 2002*, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, St. Petersburg, FL, USA, 2004, pp. 329–331.
- [18] T.J. Smayda, C.S. Reynolds, Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms, *J. Plankton Res.* 23 (2001) 447–461.
- [19] D.M. Anderson, G.C. Pitcher, M. Estrada, The comparative “systems” approach to HAB Research, *Oceanography* 18 (2005) 148–157.
- [20] Y. Collos, B. Béatrice, C. Jauzein, E. Abadie, T. Laugier, J. Lautier, A. Pastoureaud, P. Souchu, A. Vaquer, Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France, *J. Sea Res.* 61 (2009) 68–75.
- [21] F. Koroleff, Determination of nutrients, in: K. Grasshoff (Ed.), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1976, pp. 117–182.
- [22] E.D. Wood, F.A.J. Armstrong, F.A. Richard, Determination of nitrate in sea water by cadmium copper-reduction to nitrite, *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 47 (1967) 23–31.
- [23] K. Bendschneider, R.J. Robinson, A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater, *J. Mar. Res.* 11 (1952) 87–96.
- [24] J. Murphy, J.P. Riley, A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Anal. Chim. Acta* 27 (1962) 31–36.
- [25] C.J. Lorenzen, Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations, *Limnol. Oceanogr.* 12 (1967) 343–346.
- [26] O. Holm-Hansen, C.J. Lorenzen, R.W. Holmes, J.D.H. Strickland, Fluorometric determination of chlorophyll, *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 30 (1965) 3–15.
- [27] J. Neveux, F. Lantoiné, Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique, *Deep Sea Res.* 40 (1993) 1747–1765.
- [28] H. Utermöhl, Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik, *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9 (1958) 1–38.
- [29] I. La Jeunesse, M. Elliott, Anthropogenic regulation of the phosphorus balance in the Thau catchment-coastal lagoon system (Mediterranean Sea, France) over 24 years, *Poll. Bull.* 48 (2004) 679–687.
- [30] C. Jauzein, C. Labry, A. Youenou, J. Quéré, D. Delmas, Y. Collos, Growth and phosphorus uptake by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in response to phosphate limitation, *J. Phycol.* 46 (2010) 926–936.
- [31] I. Imai, M. Yamaguchi, Y. Hori, Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan, *Plankton Benthos Res.* 1 (2006) 71–84.
- [32] M. Yamaguchi, S. Itakura, K. Nagasaki, Y. Kotani, Distribution and abundance of resting cysts of the toxic *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in sediments of the western Seto Inland Sea, Japan, *Fish. Sci.* 68 (2002) 1012–1019.
- [33] A. Lugliè, M.G. Giacobbe, A. Sannio, F. Fiocca, N. Sechi, First record of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech (Dinophyta), a potential producer of paralytic shellfish poisoning, in Italian waters (Sardinia, Tyrrhenian Sea), *Boccone* 12 (2003) 1045–1051.
- [34] M. Ounissi, H. Fréhi, Variabilité du microplancton et des Tintinnida (protozoaires ciliés) d'un secteur eutrophe du golfe d'Annaba (Méditerranée sud-occidentale), *Cah. Biol.* 40 (1999) 141–153.

Conclusion

La comparaison des paramètres physicochimiques (température, salinité, nitrate, chlorophylle *a*) entre les deux sites d'études situés aux rives opposées de la Méditerranée indique que sur une période de 18 ans, le changement commun majeur qui coïncide avec l'apparition d'*Alexandrium catenella* est la forte diminution des concentrations en phosphore réactif dissous (en dessous de 1 $\mu\text{mol/l}$). Ce phénomène est dû principalement à l'arrêt de production du phosphogypse de l'usine d'engrais « Asmidal » à Annaba. Au niveau de la lagune de Thau le phénomène d'oligotrophisation a été signalé par Collos et *al.*, (2009), la diminution des concentrations semble être due à l'installation de stations d'épuration au niveau de la lagune (La Jeunesse et Elliott 2004). Nos résultats indiquent la possibilité de l'implication de la limitation des concentrations de phosphore réactif dissous dans la favorisation du développement des efflorescences aux niveaux des deux localités étudiées. Cette favorisation peut se manifester sous forme de limitation de croissance des autres organismes présents dans la colonne d'eau ce qui avantage le développement d'*Alexandrium catenella*.

Références bibliographiques

- ALLAIN C. 1960. Topographie, dynamique et courant généraux dans le bassin occidental de la Méditerranée. *Revue des Travaux de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes* 24 (1): 121-145.
- AMINOT A. & CHAUSSEPIED M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest, p 395.
- AMINOT A., KEROUEL R., & MAUVAIS J. 1985. Les éléments nutritifs en baie de Seine. In *La Baie de Seine. Colloque National du CNRS, 24-26 avril 1985*.
- AMINOT A. & GUILLAUD J. F. 1990. Apports en Matière organique et en sels nutritifs par les stations d'épuration. *La Mer et Les Rejets Urbain. Bendor*, 13-15.
- ANDERSON D. M., KULIS D. M., SULLIVAN J. J. & HALL S. 1990. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* 28: 885-893.
- ANDERSON D. M., KULIS D. M., SULLIVAN J. J., HALL S. & LEE C. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine Biology* 104: 511-524.
- ANDERSON D.M., KEAFER B.A 1985. Dinoflagellate cyst dynamics in coastal and estuarine waters. In: *Toxic dinoflagellates. Proceedings, Third International Conference on Toxic Dinoflagellates*. (Ed. by D.A Anderson, A.W White, D.G Baden), p 219-224 Elsevier, New York.
- ANDERSON D.M., GLIBERT P.M., & BURKHOLDER J.M. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25(4):704-726.
- ANDERSON J.T., HOOD R.R., ZHANG X. 2003. Quantification of *Pfiesteria piscicida* growth and encystment parameters using a numerical model. *Marine Ecology Progress Series*. 246: 105-113.
- ARFI R. & LEVEAU M. 1983. Impact d'une perturbation détritique et polluante sur la structure et le fonctionnement des populations phytoplanctoniques. *Océans* 9(8) : 653-675.
- BARROIN G. 1991. Estimation de la dynamique du phosphore à partir de la relation phosphore-oxygène en zone profonde. *Rapports. Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Lemman contre la Pollution*. Compagne 1990, 51-56.

- BARTHELEMY D. & GOUBIER M. 1991. Study of the daily fluctuations of dissolved oxygen in fish ponds by the moving-average method. Relation with temperature and solar radiations. *Revue des Sciences de l'Eau* 4 (3) : 393-414.
- BENON P., BLANC F., BOURGADE B., DAVID P., KANTIN R., LEVEAU M., ROMANO J.C. & SAUTRIOT D. 1977. Impact de la pollution sur un écosystème méditerranéen côtier. Relations entre la composition spécifique des populations phytoplanctoniques et les taux de pigments et de nucléotides adényliques (ATP, ADP, AMP). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 62(5): 631-648.
- BENZOHRA M. 1993. Les structures hydrologiques le long des côtes algériennes. IFREMER . B . P . 330 , 83507 , La Seyne /mer , France .
- BERNARD F .1952 . Eaux atlantiques et méditerranéennes au large de l'Algérie. Hydrologie, sels nutritifs et phytoplancton en 1950 . *Annales de l'Institut océanographique* 27: 1-48 .
- BLANC F. & LEVEAU M. 1970. Effets de l'eutrophie et de la dessalure sur les populations phytoplanctoniques. *Marine Biology* 5: 283-293.
- BOESCH D. F., BRINSFIELD R. B. & MAGNIEN R. E. 2001. Chesapeake Bay eutrophication. *Journal of Environmental Quality* 30(2): 303-320.
- BOLLI L., LLAVERIA G., GARCÉS E., GUADAYOL Ò., VAN LENNING K., PETERS F. & BERDALET E. 2007. Modulation of ecdysal cyst and toxin dynamics of two *Alexandrium* (Dinophyceae) species under small-scale turbulence. *Biogeosciences*, 4(4): 559-567.
- BOUGIS P ., 1974 . Ecologie du plancton marin . Tome I : Le phytoplancton . Ed . Masson et Cie, p 196.
- BOYER G. L., SULLIVAN J. J. ANDERSON R. J. HARRISON P. J. & TAYLOR F. J. R. , 1987. Effects of nutrient limitation on toxic production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Marine Biology* 96: 123–128.
- BOYNTON W. R., HALL C. A., FALKOWSKI P. G., KEEFE C. W., & KEMP W. M. 1983. Phytoplankton productivity in aquatic ecosystems. In: *Physiological Plant Ecology IV*. (Ed. by O.L. LANGE, P.S. NOBEL, C.B. OSMOND, H. ZIEGLER), pp 305-327. Springer, Berlin Heidelberg.

- BRAVO I., VILA M., MASO M., RAMILO I., FIGUEROA R.I. 2008. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae* 7: 515–522.
- CANNON J. A. 1993. Growth in culture of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* from the Port River, South Australia. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. (Ed. by T. J. Smayda & Y. Shimizu), pp. 741–745. Elsevier Science, Amsterdam.
- CEMBELLA A. D. & THERRIAULT J. C. 1989. Population dynamics and toxin composition of *Protogonyaulax tamarensis* from the St. Lawrence estuary. In: *Red Tides—Biology, Environmental Science and Toxicology*. (Ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON & T. NEMOTO), pp. 81–85. Elsevier Science, New York.
- CEMBELLA A. 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. (Ed. by D.M. ANDERSON, A.D. CEMBELLA, G.M. HALLEGRAEFF). *Springer-Verlag, Heidelberg NATO-Advanced Study Institute Series* 41: 381-404.
- CHANG F. H. & MCCLEAN M. 1997. Growth responses of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) as a function of three different nitrogen sources and irradiance. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research* 31: 1–7.
- CHOUIKHI A. IZDAR E. & MENIOUI M. 1993. Circulation des eaux et pollution des côtes méditerranéennes des pays du Maghreb. INOC, p 307
- CLOERN J.E. 2001. Our emerging conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series*. 210: 223-253.
- COLLOS Y. & SLAWYK G. 1980. Nitrogen uptake and assimilation by marine phytoplankton. In: *Primary productivity in the sea* pp. 195-211. (Ed. by P.G. FALKOWSKI), pp 195–211. Plenum Press, New York
- COLLOS Y. 1986. Time-lag algal growth dynamics: biological constraints on primary production in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series* 33:193–206.
- COLLOS Y., GAGNE C., LAABIR M., VAQUER A. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology*. 40: 96-103.
- COLLOS Y., VAQUER A., LAABIR M., ABADIE E., LAUGIER T., PASTOUREAUD A. & SOUCHU P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae* 6: 781-9.

- COLLOS Y., BÉATRICE B., JAUZEIN C., ABADIE E., LAUGIER T., LAUTIER J., PASTOUREAUD A., SOUCHU P., VAQUER A. 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal of Sea Research* 61: 68-75.
- CONLEY D. J., PAERL H. W., HOWARTH R. W., BOESCH D. F., SEITZINGER S. P., HAVENS K. E., LANCELOT C. & LIKENS G. E. 2009. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* 323(5917): 1014-1015.
- DAVIS J. C. 1975. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 32(12): 2295-2332.
- DHIB A., FROSSARD V., TURKI S., & ALEYA L. 2013. Dynamics of harmful dinoflagellates driven by temperature and salinity in a northeastern Mediterranean lagoon. *Environmental monitoring and assessment* 185(4): 3369-3382.
- DJABRI L. 1995 . Mécanismes de la pollution et vulnérabilité des eaux de la Seybouse (origines géologiques , industrielles , agricoles et urbains) . Thèse de Doctorat , Université d'Annaba, p 261 .
- DUFOUR P. 1984. La biomasse végétale des lagunes côtières: exemple de la lagune Ebrié (Côte d'Ivoire). *Revue hydrobiologie tropicale*. 17 (3) : 207-233.
- DYHRMAN, S. T. & ANDERSON, D. M. 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnology & Oceanography*. 48: 647-555.
- FREHI H. 1995 . Etude de la structure et du fonctionnement du système phytoplanctonique dans un écosystème marin côtier : eutrophisation de la Baie d'Annaba . *Thèse de Magister , Université d'Annaba , Algérie* , p 160.
- FRISONI G., GUELORGET O. & PERTHUISOT J.P. 1984. -Diagnose écologique appliquée à la mise en valeur biologique des lagunes côtières méditerranéennes : approche méthodologique. *FAO Studies and reviews* 61: 39-95.
- FRISONI G. F. 1987. L'influence du bassin versant sur le fonctionnement des lagunes méditerranéennes—Concept d'eutrophisation et de confinement—Exemple d'application: l'étang de Sanga Giulia (Corse). *Bulletin d'Ecologie* 18(2): 169-175.
- FRONTIER S. & RICHO-VIALE D. 1993. Ecosystèmes, Structure, Fonctionnement, Evolution .collection d'écologie , Masson, Paris. p, 392.

- FU F.X., ZHANG Y., WARNER M.E., FENG Y., SUN J., HUTCHINS D.A. 2008. A comparison of future increased CO₂ and temperature effects on sympatric *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7: 76–90.
- GAGNON R., LEVASSEUR M., WEISE A. M., FAUCHOT J., CAMPBELL P. G., WEISSENBOECK B. J., MERZOUK A., GOSSELIN M. & VIGNEAULT B. 2005. Growth stimulation of *Alexandrium tamarense* (dinophyceae) by humic substances from the manicouagan river (eastern canada) *Journal of phycology* 41(3): 489-497.
- GARCES, E., VILA, M., MASO, M., SAMPEDRO R., GIACOBBE M.G., PENNA A. 2005. Taxon-specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions. *Marine Ecology-Progress Series*.301: 67–79.
- GAUMER G. 1981. Evolution annuelle des communautés micro planctoniques de la Baie d'Alger. Variations de la composition spécifique liées à la nature du facteur nutritionnel limitant la biomasse algale. Thèse du 3^{ème} cycle, Univ. Paris VI, p 91.
- GAVIN K., SIU Y., YOUNG M.L.C., CHAN D.K.O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352: 117–140.
- GENOVESI B., LAABIR M. & VAQUER A. 2006. The benthic resting cyst: A key actor in harmful dinoflagellate blooms-A review. *Vie et milieu*, 56(4) : 327-337.
- GENOVESI B., LAABIR M., MASSERET E., COLLOS Y., VAQUER A., GRZEBYK D. 2009. Dormancy and germination patterns in resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). *Journal of Plankton Research*. 31: 1209-1224.
- GENOVESI B., SHIN-GRZEBYK M.S., GRZEBYK D., LAABIR M., GAGNAIRE P.A., VAQUER A., PASTOUREAUD A., LASSERRE B., COLLOS Y., BERREBI P., MASSERET E. 2011. Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *Journal of Plankton Research* 33: 405-414
- GIACOBBE M. G., OLIVA F. D. & MAIMONE G. 1996. Environmental factors and seasonal occurrence of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP potential producer, in a Mediterranean lagoon. *Estuarine coastal and shelf science*. 42: 539–549.
- GLIBERT P.M., SEITZINGER S., HEIL C.A., PARROW M.W., CODISPOTI L.A., BURKHOLDER J.M., KELLY V. 2005. The role of eutrophication in the Global proliferation of Harmful algal Blooms. *Oceanography* 18: 198-209.

- GLIBERT P.M., BURKHOLDER J.M. 2006. The complex relationships between increasing fertilization of the Earth, coastal eutrophication, and HAB proliferation. In: *The Ecology of Harmful Algae*. (Ed. by E. GRANALI, J. TURNER), pp. 341–354. Springer-Verlag, New York.
- GOTSIS-SKRETAS, O. & N. FRIGILOS. 1990. Contribution to eutrophication and phytoplankton ecology in the Thermaikos Gulf. *Thalassographica* 13: 1–12
- GRUVEL A. 1926. Les pêches maritimes en Algérie. *Société d'Ed. Challanel*. p 162.
- GRZEBYK D., BECHEMIN C., WARD C. J., VERITE C., CODD G.A., MAESTRINI S.Y. 2003. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Journal of Plankton Research*. 25: 1185–1199.
- HALIM Y. 1960. *Alexandrium minutum* nov. gen. nov. sp., dinoflagellate provocant des eaux rouges. *Vie et Milieu* 11: 102–105.
- HAMASAKI K., HORIE M. & TAGUCHI S. 1998. Growth and toxicity of *Alexandrium tamarense* isolated from Hiroshima Bay during blooms in 1992–1995. In: *Harmful Algae*. (Ed. by B. REGUERA, J. BLANCO, M. L. FERNANDEZ & T. WYATT), pp. 341–342. Xunta de Galicia, Vigo, IOC UNESCO, Paris.
- HENARD O. 1978. Production primaire d'une lagune Méditerranéenne: l'étang de Thau (Hérault). Année 1976. Thèse Doct. Ing., Université de Montpellier, p.85.
- HERAL M., RAZET D., DESLOUS-PZOLI J. M., BERTHONNE J.P & GARNIER J. 1983. Caractéristiques saisonnières de l'hydrobiologie du complexe estuarien de marennes-orléons (France) . *Travaux de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes*. 46 (2) .
- HWANG D. F. & LU Y. H. 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38: 1491–1503.
- IFREMER, Phytoplancton et phycotoxines. Bilan des connaissances générales. La surveillance dans le bassin d'Arcachon, 2006.
- JARRY V. 1990. Étude pluridisciplinaire en écologie lagunaire (étang de Thau, France): stratégie d'échantillonnage et organisation spatiale du phytoplancton. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, France, pp 174.

- JAUZEIN C., COLLOS Y., GARCES E., VILA M., MASO M. 2008. A. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *Journal of Phycology* 44 : 1136–1145.
- JAUZEIN C., LABRY C., YOUENOU A., QUERE J., DELMAS D., COLLOS Y. 2010. Growth and phosphorus uptake by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in response to phosphate limitation. *Journal of Phycology* 46: 926–936.
- KARYDIS M. & KITSIOU D. 2012. Eutrophication and environmental policy in the Mediterranean Sea: a review. *Environmental monitoring and assessment* 184(8): 4931-4984.
- KHELIFI-TOUHAMI M., OUNISSI M., SAKER I., HARIDI A., DJORBI S. & ABDENOUR C. 2006. - The hydrology of the Mafrag estuary (Algeria): Transport of inorganic nitrogen and phosphorus to the adjacent coast. *Journal of food agriculture environnement.* 4(2): 340-346.
- KHEMAKHEM H., ELLOUMI J., MOUSSA M., ALEYA L., & AYADI H. 2010. The concept of ecological succession applied to phytoplankton over four consecutive years in five ponds featuring a salinity gradient. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 88(1): 33-44.
- KIM K., & TRAVERS M. 1985. Evolution de la composition spécifique du phytoplancton de l'étang de Berre (France). *Rapport de la commission internationale pour l'exploration scientifique de la mer méditerranée* 29(4): 97-99.
- KIM K.T. & TRAVERS M. 1988. Importance comparée des divers groupes taxonomiques dans les inventaires du phytoplancton de l'étang semi-estuarien de Berre et des milieux voisins marins et dulçaquicoles. *Marine Nature.* 1(1) : 99-101.
- KOBBI-REBAI R., ANNABI-TRABELSI N., KHEMAKHEM H., AYADI H. & ALEYA L. 2013. Impacts of restoration of an uncontrolled phosphogypsum dumpsite on the seasonal distribution of abiotic variables, phytoplankton, copepods, and ciliates in a man-made solar saltern. *Environmental monitoring and assessment.* 185(3): 2139-2155.
- LA JEUNESSE I. & ELLIOTT M. 2004. Anthropogenic regulation of the phosphorus balance in the Thau catchment-coastal lagoon system (Mediterranean Sea, France) over 24 years. *Marine Pollution Bulletin.* 48: 679-87.
- LAABIR M., JAUZEIN C., GENOVESI B., MASSERET E., GRZEBYK D., CECCHI P., VAQUER A., PERRIN Y., COLLOS Y. 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate

- Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33: 1550-1563.
- LACAZE J.C. 1993. La dégradation de l'environnement côtier . Conséquences écologiques . Collection sciences de l'environnement . Masson, Paris, p 149
- LACOMBE H. & RICHEZ C. 1982. The regime of strait of Gibraltar. In: *hydrodynamics of semi-Enclosed seas*. (Ed. by J . C .J . Nihoul) , pp13-74. Elsevier. Amsterdam.
- LEONG S.C.Y. & TAGUCHI S. 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia* 515: 215-224.
- LERAT Y ., BOUCHER G. & LECORRE P . 1985. Echange à l'interface eau- sédiment dans un secteur côtier à forte bio déposition (parc Ostréicole) . cas de l'ammonium et des nitrates . *Cahiers de Biologie Marine* 26: 393-408 .
- LEVEAU M. 1985. Devenir de la matière organique en azote littorale . *coll. fr-japon océanographie Marseille* 5 : 5 – 12 .
- LILLY E.L., KULIS D.M., GENTIEN P., ANDERSON D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: Evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research* 24: 443-452.
- MAGUER J.F., L'HELGUEN S., MADEC C., LABRY C. & LE CORRE, P. 2007. Nitrogen uptake and assimilation kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): effect of N-limited growth rate on nitrate and ammonium interactions. *Journal of Phycology* 43: 295-303.
- MALONE T. C. 1982. Phytoplankton photosynthesis and carbon-specific growth: light-saturated rates in a nutrient-rich environment. *Limnology and Oceanography*. 27(2): 226-235
- MALONE, T. C., FALKOWSKI, P. G., HOPKINS, T. S., ROWE, G. T. & WHITLEDGE, T. E. 1983. Mesoscale response of diatom populations to a wind event in the plume of the Hudson River. *Deep-Sea Research* 30:149-70.
- MARION A. (1985). Phytoplancton de la baie de Bourgneuf. Fertilité des eaux néritiques. Thèse Doct. Spécialité, Université Nantes, p156.
- MASSELIN P., AMZIL Z., ABADIE E., NEZAN E., LE BEC C., CARRERAS A., CHIANTELLA C., TRUQUET P. 2001. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in autumn 1998: *Alexandrium* "tamarense complex" (Dinophyceae) as causative agent. In: *Harmful Algal blooms 2000*. (Ed. by G.M.

Hallegraeff, S.I Blackburn, C.J. Bolch, R.J. Lewis), pp 26–29. Proceedings of IXth international conference Harmful Algal Blooms, UNESCO, Paris.

- MASSERET E., GRZEBYK D., NAGAI S., GENOVESI B., LASSERRE B., LAABIR M., COLLOS Y., VAQUER A. & BERREBI P. 2009. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers. *Applied and environmental microbiology* 75: 2037-2045.
- MATSUDA A., NISHIJIMA T. & FUKAMI K. 1999. Effects of nitrogenous and phosphorus nutrients on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 65: 847–55.
- MATSUOKA K. 1999. Eutrophication process recorded in dinoflagellate cyst assemblages a case of Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan. *Science of the Total Environment* 231(1): 17-35.
- MAYFIELD A. B. AND GATES R. D. 2007. Osmoregulation in anthozoan–dinoflagellate symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147: 1–10.
- MILOT C. 1985. Some features of the Algerian Current . *Journal of Geophysical Research*. 90 C4: 7269-7176.
- NAGASOE S., KIM D. I., SHIMASAKI Y., OSHIMA Y., YAMAGUCHI M., & HONJO T. 2006. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Harmful algae* 5(1): 20-25.
- NEVEUX J., FIALA M., JACQUES G., & PANOUSE, M. 1975. Phytoplankton et matériel particulaire à Banyuls-sur-Mer (golfe du Lion) 1973. *Vie et Milieu* 25: 85-98.
- OH S.J., YAMAMOTO T., KATAOKA Y., MATSUDA O., MATSUYAMA Y., KOTANI Y. 2002. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates. *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fisheries Science*. 68: 416-424.
- OU L., WANG D., HUANG B., HONG H., QI Y., LU S. 2008. Comparative study of phosphorus strategies of three typical harmful algae in Chinese coastal waters. *Journal of Plankton Research* 30: 1007-1017.
- OUNISSI M., FREHI H. & KHELIFI-TOUHAMI M. 1998 . Composition et abondance du zooplancton en situation d'eutrophisation dans un secteur côtier du Golfe d'Annaba (Algérie) *Annales de l'Institut océanographique*, 74 (1): 13- 28 .

- PARKHILL J.P. & CEMBELLA A. D. 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *Journal of Plankton Research*. 21, 939–955.
- PAVILLARD J. 1905. Recherche sur la flore pélagique (phytoplancton) de l'étang de Thau. Thèse. Faculté des sciences, Paris.
- PERRY M.J. 1976. Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific. *Limnology and Oceanography*. 21: 88-107.
- PRAKASH A. 1967. Growth and toxicity of a marine dinoflagellate, *Gonyaulax tamarensis*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 24: 1589–1606.
- RAIMBAULT P., SLAWYK G., COSTE B., & FRY J. 1990. Feasibility of using an automated colorimetric procedure for the determination of seawater nitrate in the 0 to 100 nM range: examples from field and culture. *Marine Biology*. 104(2): 347-351.
- RAJKUMAR M., P. PERUMAL, V. ASHOK PRABU, N. VENGADESH PERUMAL AND K. THILLAI RAJASEKAR. 2009. Phytoplankton diversity in Pichavaram mangrove waters from south-east coast of India. *Journal of Environmental Biology*. 30: 489-498
- RONNER U., SORENSSON F. & HOLM-HANSEN O. 1983. Nitrogen assimilation by phytoplankton in the Scotia Sea. *Polar Biology* 2(3): 137-147.
- SAMSON-KECHACHA F. L. 1981. Variations saisonnières des matières nutritives de la Baie d'Alger : Recherche des facteurs contrôlant le développement du phytoplancton . Thèse du 3^{ème} cycle . USTHB , Alger , p 98 .
- SELLNER K.G., DOUCETTE G.J., KIRKPATRICK G.J., 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 3: 383-406
- SHANNON C.E., 1948. A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal, the Best Technical Journal Science*. 27: 379-423
- SILVER M. W. & ALLDREDGE A. L. 1981: Bathypelagic marine snow: deep-sea algal and detrital community. *Journal of Marine Research*. 39: 501-530.
- SIU G., YOUNG M., CHAN D.K.O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352:117-140.

- SMAYDA T. J. 2007. Reflections on the ballast water dispersal-harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae* 6(4): 601-622.
- SOUCHU P., GASC A., COLLOS Y., VAQUER A., TOURNIER H., BIBENT B. & DESLOUS-PAOLI J. M. 1998. Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Marine Ecology-Progress Series* 164: 135-146.
- SOUCHU P., COLLOS Y., LANDREIN S., DESLOUS-PAOLI J. M. & BIBENT B. 2001. Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 218: 141-152.
- SOUISSI S., YAHIA-KEFI O. D., & YAHIA M. D. 2000. Spatial characterization of nutrient dynamics in the Bay of Tunis (south-western Mediterranean) using multivariate analyses: consequences for phyto-and zooplankton distribution. *Journal of Plankton Research*. 22(11) 2039-2059.
- SULLIVAN J. M., SWIFT E., DONAGHAY P. L., & RINES J. E. 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae* 2(3): 183-199.
- THOMAS G. & ECKMANN R. 2007. The influence of eutrophication and population biomass on common whitefish (*Coregonus lavaretus*) growth-the Lake Constance example revisited. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64(3): 402-410.
- TRAVERS A. & TRAVERS M. 1962. Recherches sur le phytoplancton du Golfe de Marseille. *Travaux de la Station Marine d'Endoume* 26: 7-139.
- VAISSIERE R. & FREDJ G. 1963. Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie . *Bulletin de l'Institut océanographique de Monaco*. 60 (1272) p 83.
- WASSIM G., ZAHER D., JANNET E., ABDERRAHMEN B., & HABIB A. 2010. Spatial and Vertical Distribution of Phytoplankton During a Winter Cruise in the South of the Kerkennah Islands in the Gulf of Gabes, Tunisia. *Journal of Life Sciences* 4(7) : 22-29.
- WATRAS C. J., CHISHOLM S. W. & ANDERSON D. M. 1982. Regulation of growth in an estuarine clone of *Gonyaulax tamarens* Lebour: salinity-dependent temperature responses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 62: 25–37.
- WHEELER P. A. 1983. Phytoplankton nitrogen metabolism. *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, New York, 309-346.

- XU J., HO A.Y.T., HE L., YIN K., HUNG C., CHOI N., LAM P.K.S., WUD R., ANDERSON, D.M., HARRISON P. 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16: 89–97.
- YAMAMOTO T., TARUTANI K. 1999. Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Phycological Research*. 47: 27-32.

Chapitre 4

*description d'A. catenella
d'Annaba et diversité
intraspécifique.*

Manuscrit B

“Characterization of *Alexandrium catenella* blooming in the Gulf of Annaba (Algeria, Mediterranean sea): morphology, toxin profiles and intraspecific variations”

En préparation

Contexte de l'étude

Depuis les années 1980, il y a eu une augmentation de la fréquence et de l'intensité des proliférations d'algues en mer Méditerranée. Ces événements sont caractérisés par la prolifération de divers dinoflagellés, en particulier du genre *Alexandrium*, comprenant diverses espèces toxiques et non toxiques (Garcés et *al.*, 2000, Vila et *al.*, 2001). Les blooms d'*A. catenella* ont été détectés dans les eaux côtières hispaniques, française, tunisienne et italiennes (Penna et *al.*, 2005). Jusqu'à présent, peu d'études ont été menées sur le phytoplancton toxique dans les systèmes côtiers algériens. La prolifération d'*Alexandrium* a été signalée dans la baie d'Annaba en Algérie en 2002 (Frehi et *al.*, 2007). Cette étude vise à décrire plusieurs souches d'*A. catenella* issues de la germination de kystes isolés du sédiment de la baie d'Annaba du point de vue morphologique, génétique, toxinique et physiologique. Nous allons également nous intéresser à la diversité de croissance entre ces différentes souches.

Références bibliographiques

- ABADIE E., AMZIL Z., BELIN C., COMPS M.A, ELZIERE-PAPAYANNI P, LASSUS P., LE BEC C., MARCAILLOU-LE BAUT C., NEZAN E., POGGI R. 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*: Episode de novembre à décembre 1998. *Ifremer*, Plouzane, France, p. 44
- AGUILERA-BELMONTE A., INOSTROZA I., FRANCO J., RIOBO P., GOMEZ P. 2011. The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae* 12:105–112
- ALPERMANN T.J., TILLMANN U., BESZTERI B., CEMBELLA A.D., JOHN U. 2010. Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 46: 18–32
- ANDERSON D.M., ALPERMANN T. J., CEMBELLA A.D., COLLOS Y., MASSERET E., MONTRESOR M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14: 10–35.
- BALECH E. 1985. The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *tamarensis* group. In: *Toxic Dinoflagellates* (Ed. by D.M. ANDERSON, A.W. WHITE, D.G. BADEN), pp. 33–38. Elsevier, Amsterdam.
- BALECH E. 1995. *The Genus Alexandrium Halim (Dinoflagellata)*. Sherkin Island Marine Station, Cork, Ireland, 151 pp.
- BENAVIDES H., PRADO L., DIAZ S., CARRETO J.J. 1995. An exceptional bloom *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In: *Harmful Marine Algal Blooms* (Ed. by P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou), pp. 113–119. Lavoisier Science Publishers, Paris.
- BENNOUNA A., ASSOBHEI O., BERLAND B., EL ATTAR J. 2000. Étude des populations ; phytoplanctoniques de la lagune de Oualidia (Maroc) ; dinoflagellés potentiellement nuisibles. *Marine life* 10 : 3-18.
- CALBET A., BERTOS M., FUENTES-GRÜNEWALD C., ALACID E., FIGUEROA R., RENOM B., GARCÉS E. 2011. Intraspecific variability in *Karlodinium veneticum*: Growth rates, mixotrophy, and lipid composition. *Harmful Algae* 10: 654-667.
- CHANG F.H., ANDERSON D.M., KULIS D.M., TILL D.G. 1997. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon* 35: 395–409.
- CHO H. J. & MATSUOKA K. 2001. Distribution of dinoflagellate cysts in surface sediment from the Yellow Sea and East China Sea. *Marine Micropaleontology* 42: 103–123.
- COLLOS Y., GAGNE C., LAABIR M., VAQUER A. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology*. 40 :96–103.

- FAUCHOT J., LEVASSEUR M., ROY S. 2005. Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Marine Ecology Progress Series* 296: 241–50
- FREHI H., COUTE A., MASCARELL G., PERRETTE-GALLET C., AYADA M., KARA M.H. 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie). *Comptes rendus biologie* 330: 615–628.
- FUKUYO Y. 1985. Morphology of *Protogonyaulax tamarensis* (Lebour) and *Protogonyaulax catenella* (Whedon & Kofoid) Taylor from Japanese coastal waters. *Bulletin of Marine Science* 37: 533–534.
- GLIBERT P.M, ANDERSON D.M., GENTIEN P., GRANALI E., SELNER K.G. 2005. The Global Complex Phenomena of Harmful algal Blooms. *Oceanography* 18: 136-147
- GÓMEZ F. 2003. Checklist of Mediterranean Free-living Dinoflagellates. *Botanica Marina* 46: 215-242.
- GUILLARD R.R.L. 1973. Division rates. In: *Handbook of phycollogical methods: culture methods and growth measurements*. (Ed. J.R. by Stein), pp. 289-311. Cambridge University Press.
- GRUVEL A. 1926. *Les pêches maritimes en Algérie*. (Ed. by Société d'éditions Géographiques, Maritimes et coloniales), pp. 40-41 Paris.
- HADJADJI I., MASSERET E., PLISSON B., LAABIR M., CECCHI P., COLLOS Y. 2012. Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarense*: implications for biological invasions and maintenance. *Cahiers De Biologie Marine* 53: 357-363.
- HALL T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98
- HALLEGRAEFF G.M., BOLCH C.J.S., BLACKBURN S.I., OSHIMA, Y. 1991. Species of toxigenic dinoflagellates genus *Alexandrium* in southeast Australia waters. *Botanica Marina* 34:575–587
- HARRISON P.J., WATERS R.E., TAYLOR F.J.R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16 :28–35.
- LAABIR M., JAUZEIN C., GENOVESI B., MASSERET E., GRZEBYK D., CECCHI P., VAQUER A., PERRIN Y., COLLOS Y. 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33: 1550-1563
- LAABIR M., COLLOS Y., MASSERET E., GRZEBYK D., ABADIE E., SAVAR V, SIBAT M, AMZIL Z. 2013. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs* 11:1583-1601.

- LAKEMAN M.B., DASSOW V.P., ROSE A.C. 2009. The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae* 8: 746–758
- LI T.S., YU R.C., Zhou M.J. 2011. Short-term effects of different nitrogen substrates on growth and toxin production of dinoflagellate *Alexandrium catenella* Balech (strain ACDH). *Harmful Algae* 12: 46–54.
- LILLY E.L., KULIS D.M., GENTIEN P., ANDERSON D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: Evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research* 24:443–452.
- LILLY E.L., HALANYCH K.M., ANDERSON D.M. 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarensense* complex (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 43:1329-1338.
- LUGLIÈ A., GIACOBBE M.G., SANNIO A., FIOCCA F, SECHI N. 2003 First record of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech (Dinophyta), a potential producer of paralytic shellfish poisoning, in Italian waters (Sardinia, Tyrrhenian Sea). *Boccone*, 16:1045–1052
- MACKENZIE L., DE SALAS M., ADAMSON J., BEUZENBERG V. 2004. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae* 3:71–92.
- MARGALEF R., ESTRADA M. 1987. Synoptic distribution of summer microplankton (Algae and protozoa) across the principal front in the Western Mediterranean. *Investigación Pesquera* 51:121–140.
- MASSELIN P., AMZIL Z., ABADIE E., NEZAN E., LE BEC C., CHIANTELLA C., TRUQUET P. 2000. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1998: *Alexandrium tamarensense* complex (Dinophyceae) as causative agent. In: *Harmful Algal Blooms*. (Ed. by G.M Hallegraeff, S.I Blackburn, C.J Bolch, R.J Lewis), pp. 407-410. JOC-UNESCO.
- MASSERET E., ENQUEBECQ M., LAABIR M., GENOVESI B., VAQUER A., AVARRE JC. 2010. A simple and innovative method for species identification of phytoplankton cells on minute quantities of DNA. *Environmental Microbiology Reports*. 2: 715–719.
- MOLNAR J. L., GAMBOA R. L., REVENGA C. & Mark D.S. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6: 485–492.
- NAVARRO J. M., MUN˜OZ M. G. AND CONTRERAS, A. M. 2006 Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5:762–769.
- OSHIMA Y. 1995. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides*. (Ed. by G.M Hallegraeff, D.M Anderson, A.D., Cembella). pp. 81–94. UNESCO.

- PENNA A., GARCE'S E., VILA M., GIACOBBE M.G., FRAG S., LUGLIE A., BRAVO I., BERTOZZINI E., VERNESI C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Marine Biology* 148: 13–23.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular Cloning* (Ed. by N.Ford, C. Nolan, M. Ferguson, Cold), pp 9.1-9.62. Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHOLIN C.A., ANDERSON D.M. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU rDNA genes. *Journal of Phycology*. 30:744–754.
- SEKIGUCHI K., INOBUCHI N., KIKUCHI T., KAGA Y. & 5 others. 1996. Comparison of bloom patterns of *Alexandrium tamarense* between two bays in Iwate prefecture, northern Japan, in association with the toxicity of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. In: *Harmful and toxic algal blooms* (Ed. By T.Yasumoto, Y. Oshima, Y. Fukuyo), pp 223–226. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- Smayda T.J. 2007. Reflections on the ballast water dispersal-harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae* 6: 601-622.
- SIU G., YOUNG M., CHAN D.K.O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352:117–140.
- TERRIAULT J.C., PAINCHAUD J., LEVASSEUR M., 1985. Factors controlling the occurrence of *Protogonyaulax tamarensis* and shellfish toxicity in the St. Lawrence Estuary: freshwater runoff and the stability of the water column. In: *Toxic Dinoflagellates* (Ed. by D.M. Anderson, A.W White, D.G. Baden), pp. 141–146. Elsevier Science, New York.
- THESSSEN A.E., BOWERS H.A., STOECKER D.K. 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources *Harmful Algae* 8:92-810.
- TILLMANN U., ALPERMANN T.L., DA PURIFICAÇÃO R.C., KROCK B. & CEMBELLA A. 2009. Intra-population clonal variability in allelochemical potency of toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 8: 759-769.
- TOUZET N., FRANCO J.M., RAINER., 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7:782–797.
- TURKI S., BALTI N., BEN JANET H. 2007. First bloom of dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Bizerte lagoon (northern Tunisia). *Harmful Algae News* 35:7–9.
- URIBE P., ESPEJO R.T., 2003. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 659–662.
- VAISSIERE R., FREDJ G. 1963. Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie. *Bulletin de l'Institut Océanographique*. 60:83

- VARELA D., PAREDES J., ALVES-DE-SOUZA C., SEGUEL M., SFEIR A., FRANGOPULOS M. 2012. Intraregional variation among *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) strains from southern Chile: Morphological, toxicological and genetic diversity. *Harmful Algae* 15: 8–18.
- VILA M., GARCES E., MASO M., CAMP J. 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Marine Ecology Progress Series* 222: 73–83.
- XU J., HO A.Y.T., HE L., YIN K., HUNG C., CHOI N., LAM P.K.S., WUD R., ANDERSON, D.M., HARRISON P. 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16: 89–97
- WANG D.Z., HSIEH D.P.H. 2005 Dynamics of C2 toxin and chlorophyll a formation in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* during large scale cultivation. *Toxicon* 39:1533–1536.
- WANG D.Z., ZHANG S.G., GU H.F., CHAN L.L., HONG H.S. 2006. Paralytic shellfish toxin profiles and toxin variability of the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) isolated from the Southeast China Sea. *Toxicon*, 48: 138–151.

Figure legends

Fig. 1. Sampling stations in Annaba bay

Fig. 2. Toxin content (fmol/cell) of twenty six strains toxic *Alexandrium* isolates from sediment of station 2 at Annaba Bay

Fig. 3. Toxin composition (fmol/cell %) of twenty six strains toxic *Alexandrium* isolates from sediment of station 2 at Annaba Bay

Fig. 4. *Alexandrium catenella* Growth rates (day⁻¹) of different strains on ESAW culture medium. Error bars show the standard deviation. Strains are grouped following ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

An-strain: unicellular cultures obtained by cultivation of sediment

Annaba-strain: cultures obtained from single isolated cysts from the sediment

Fig. 5. *Alexandrium catenella* lag phase (days) of different strains on ESAW culture medium. Error bars show the standard deviation. Strains are grouped following ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

An-strain: unicellular cultures obtained by cultivation of sediment

Annaba-strain: cultures obtained from single isolated cysts from the sediment

Tab. 1. The detection limits (DL) and quantification limit (QL) of detected toxins

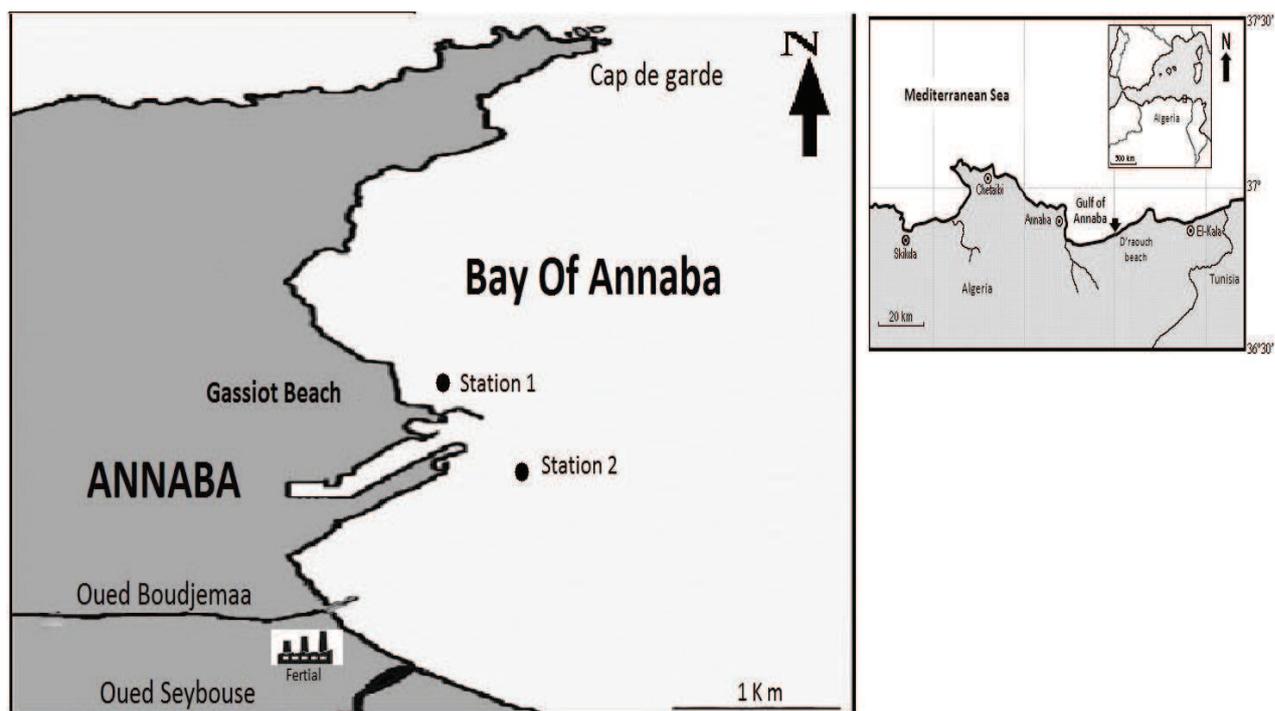


Fig. 1

Toxins	LD (μmolL)	LQ (μmolL)
GTX4	0.030	0.090
GTX1	0.035	0.105
GTX3	0.010	0.030
GTX2	0.015	0.045
dc-GTX3	0.003	0.009
dc-GTX2	0.012	0.036
GTX5	0.040	0.120
NéoSTX	0.030	0.090
dc-STX	0.018	0.054
STX	0.020	0.060

Tabl. 1

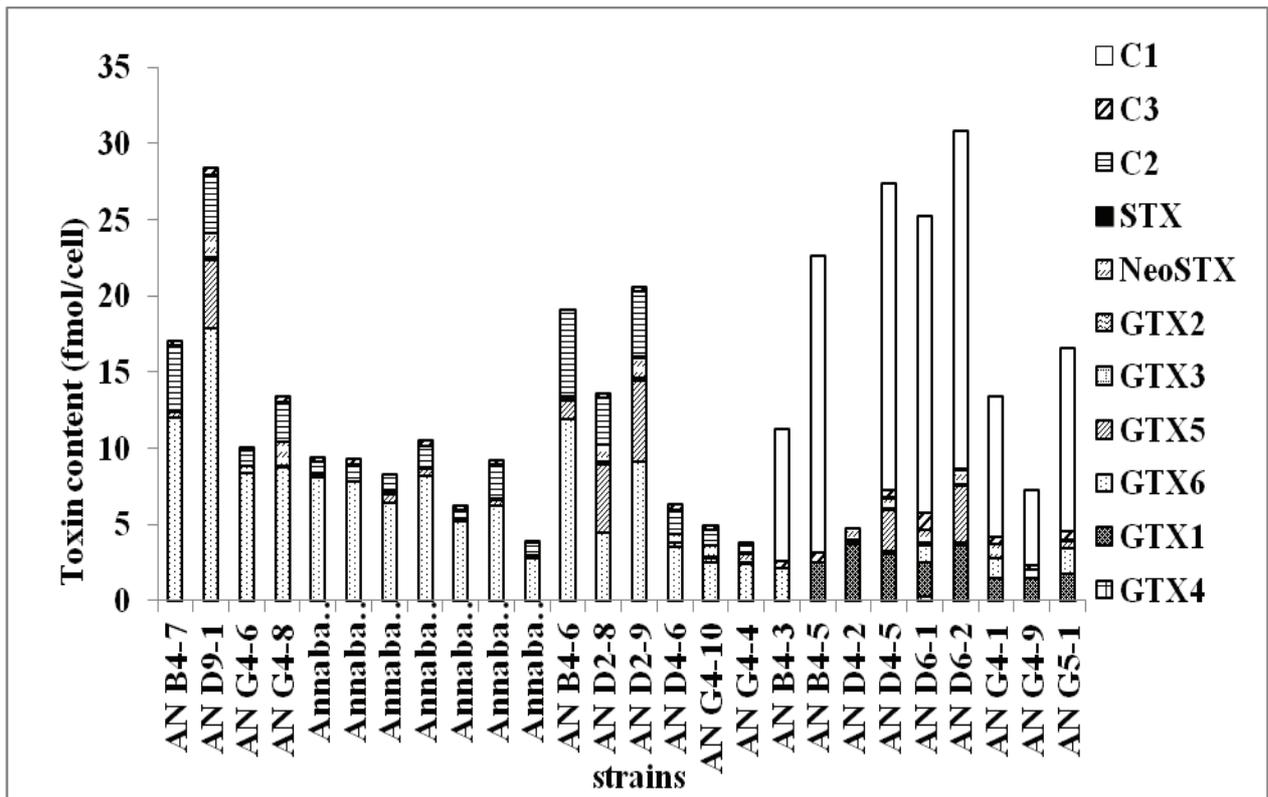


Fig. 2

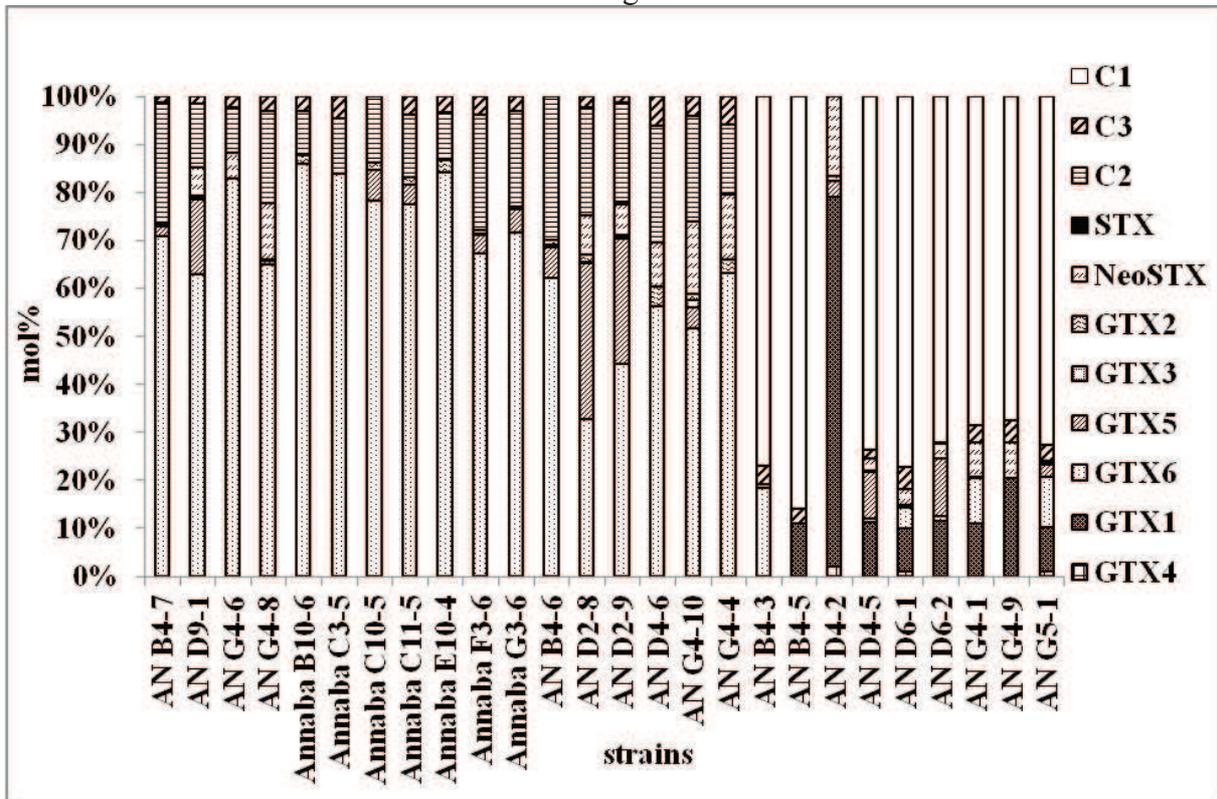


Fig. 3

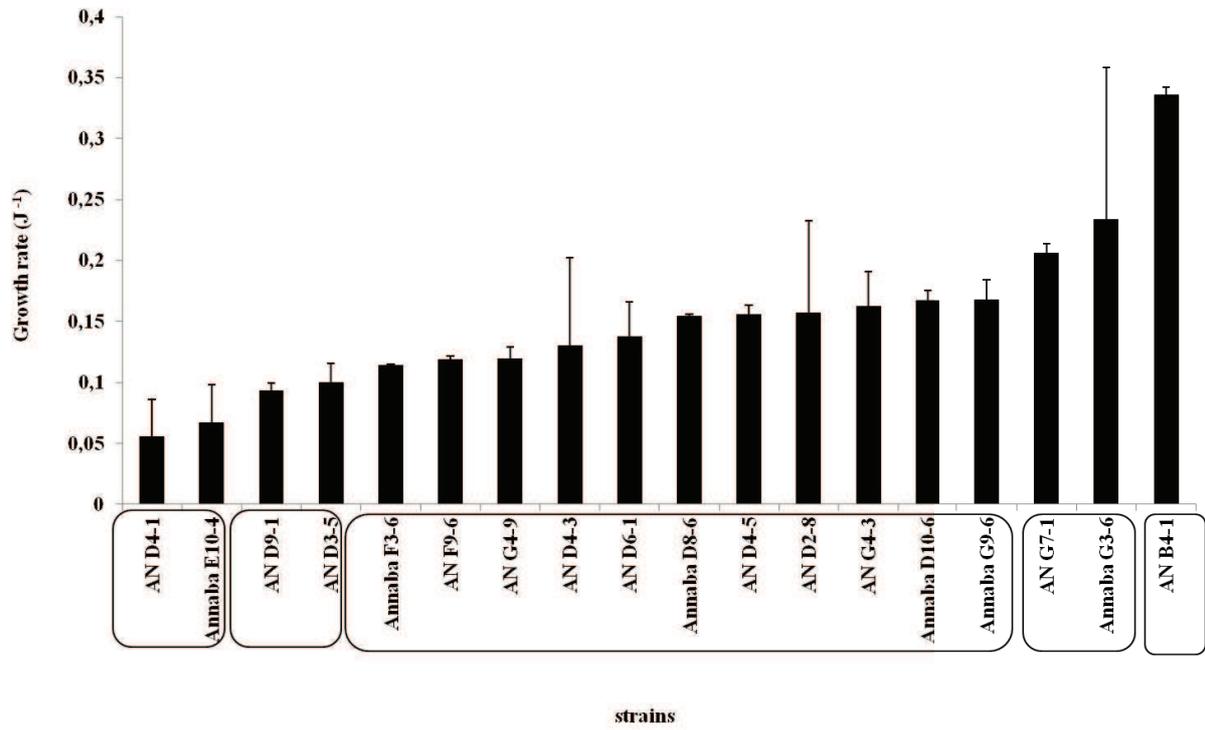


Fig. 4

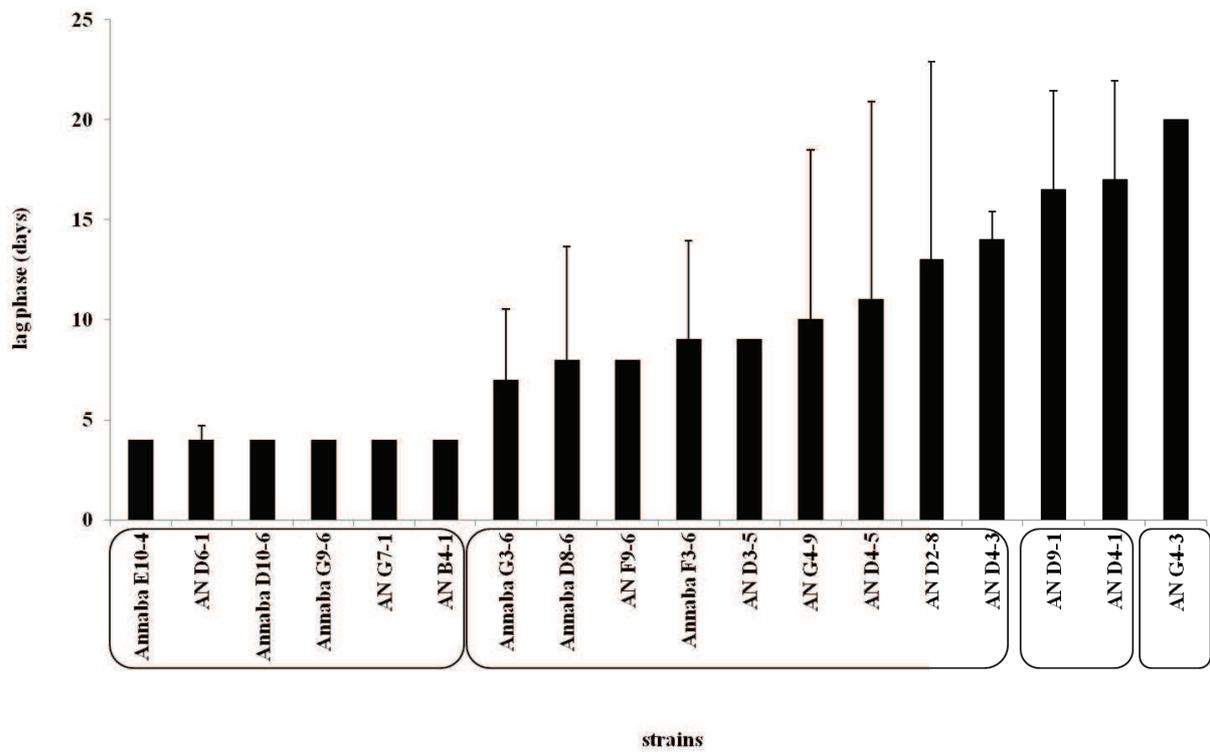


Fig. 5

Conclusion

Lors de cette étude, nous avons pour la première fois obtenu des souches monoclonales d'*A. catenella* présent dans la baie d'Annaba. Les résultats des analyses morphologiques ont révélé que les souches d'*Alexandrium* présentes dans les banques de kystes appartiennent bien à l'espèce *A. catenella*. Le ribotypage a confirmé l'analyse morphologique. Il a révélé que ces souches ont une potentielle origine asiatique, elles appartiennent au groupe IV (clade Asie tempérée) comme les autres souches d'*A. catenella* isolées en Méditerranée (Penna et al., 2005, 2008), ce qui indique que cette espèce a été probablement introduite *via* les eaux de ballast, car il n'y a pas d'activité de conchyliculture dans la baie d'Annaba. Le profil toxinique de 26 souches d'*A. catenella* analysées a révélé une forte diversité dans la composition, la concentration et le degré de toxicité des souches. La composition toxinique de la plupart des souches se caractérise par la prédominance de la toxine GTX6 (jusqu'à 96%), les souches restantes se caractérisant par la présence de la toxine GTX4 comme toxine dominante, l'ordre du reste des toxines était le suivant C2, GTX5, C1, C3, GTX2, GTX3, Les toxines Neo STX, STX étaient absentes ou présentes en très faibles quantités. Les concentrations de toxines ont varié entre 2,01 et 28,37 fmol /cellule, le degré de toxicité totale par souche s'est situé entre 0,06 et 1,83 pg STX équivalent / cellule. Lors de ce travail, les tests statistiques nous ont permis de détecter une variabilité significative des taux de croissance et des phases de latence entre les souches étudiées, ce qui indique la présence d'un large réservoir génétique permettant l'adaptation à différentes conditions environnementales.

Chapitre 5

*description Alexandrium
tamarense de Thau*

Manuscrit C : Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarense*: implications for biological invasions and maintenance

paru dans Cahiers de Biologie Marine

contexte de l'étude

L'existence de variations intra-espèce et intra-populationnelle est un concept important pour l'interprétation écologique des interactions entre les espèces telles que la compétition, l'allélopathie et la prédation (Tillmann et al. 2009). Morphologiquement toutes les cellules peuvent apparaître similaires, mais les différences génétiques et la sélection environnementale agissent sur leurs différences et sélectionnent un génotype parmi d'autres (Gilbert et al 2005). La variabilité intra-populationnelle au sein des espèces d'*Alexandrium* a été observée dans certaines études portant sur des mesures physiologiques (Costas 1990, Tillmann et al. 2009). Lors de ce travail, nous allons essayer d'apprécier la variabilité intra-spécifique au sein de 23 souches monoclonales d'*A. tamarense* isolées à partir d'un seul échantillon d'eau prélevé lors d'un bloom au niveau de la crique de l'Angle sur la lagune de Thau. Durant cette étude, les paramètres physiologiques testés sont le taux de croissance, la durée de la phase de latence et la forme des courbes de croissance dans 3 milieux de culture différents par leur teneur en matière organique.



Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarense*: implications for biological invasions and maintenance

Imene HADJADJI¹, Estelle MASSERET^{1*}, Benoit PLISSON¹, Mohamed LAABIR¹, Philippe CECCHI²
and Yves COLLOS¹

(¹) *Ecologie des Systèmes Marins côtiers, UMR 5119, UM2, CNRS, IRD, Ifremer, UM1, Université Montpellier 2, CC 093, 34095 Montpellier Cedex 5, France*

*Corresponding author: Fax : 33 4 67 14 37 19. E-mail: estelle.masseret@univ-montp2.fr

(²) *IRD UMR G-eau, 361 rue Jean François Breton, BP 5095, 34196 Montpellier, France*

Abstract: The study of the intraspecific variability is a crucial step for understanding the successful establishment and maintenance of invasive species. *Alexandrium tamarense* strains isolated in spring 2007 from a single bloom in Thau lagoon have been grown on three different media (ESNW based on natural seawater, and the artificial media, ESAW, ESAW+HA). A large diversity in the ability of strains to grow on these media was found. Irrespective of medium composition, growth curves followed three models: (1) a classical shape, (2) a population crash followed in some cases (3) by growth recovery. Some strains were able to show significant growth in an environment completely artificial (ESAW). ANOVA indicated a significant difference between groups in growth rates allowing the distinction of contrasted categories among the strains studied in ESNW medium. These statistical tests also indicated the presence of distinct groups among the strains grown in the ESAW as well as for those on ESAW+HA medium. Lag phases were extremely variable between strains in all environments, suggesting a high variability of adaptation to the environment. The results revealed that wide fitness variations were exhibited by diverse conspecific *A. tamarense* individuals co-existing during a bloom.

Résumé : *Variations clonales des paramètres physiologiques chez Alexandrium tamarense : implications pour les invasions biologiques et leur maintien.* L'étude de la variabilité intraspécifique est une étape cruciale pour la compréhension du succès d'établissement et du maintien des espèces invasives. Des souches d'*Alexandrium tamarense* isolées au printemps 2007 à partir d'un même bloom dans l'étang de Thau ont été cultivées sur trois milieux de culture différents (ESNW élaboré à partir d'eau de mer naturelle, et les milieux artificiels ESAW, ESAW+HA.). Une grande diversité dans la capacité des souches à croître sur ces différents milieux a été constatée. Indépendamment de la composition du milieu, les courbes de croissance suivent trois modèles: (1) une forme classique, (2) un effondrement de la population suivie dans certains cas (3) par une reprise de croissance. Certaines souches étaient capables d'afficher une croissance importante dans un milieu totalement artificiel (ESAW). L'ANOVA indique une différence significative entre les groupes pour les taux de croissance permettant la distinction de groupes parmi les souches étudiées pour le milieu ESNW. Ces tests statistiques indiquent également la présence de groupes distincts parmi les souches cultivées dans l'ESAW ainsi que pour celles sur milieu l'ESAW+HA. Les phases de latence ont été extrêmement variables entre les souches dans tous les milieux, ce qui suggère

une grande variabilité d'adaptation au milieu. Globalement, ces résultats ont montré l'existence de larges variations de la fitness intraspécifique chez les individus d'*A. tamarense* composant une efflorescence.

Abbreviations: ESNW, enriched seawater natural water; ESAW, enriched seawater artificial water; ESAW+HA, enriched seawater artificial water+Humic Acid.

Keywords: *Alexandrium tamarense* • Intraspecific variability • Fitness • Growth rate • Lag phase • Humic acid

Introduction

Harmful algal blooms (HABs) of the *Alexandrium* genus are extensively distributed around the world (Anderson et al., 2012). They occur widely in near-shore environments. The actual world-wide distribution of many species belonging to this genus has been interpreted as the result of the human-mediated activities such as shellfish farming and ballast waters introduction (Hallegraeff, 1993; Bolch & De Salas, 2007). According to Carlton's definition (1987) of biological invasions, *Alexandrium tamarense* (Group III, Western European clade) (Scholin et al., 1994; Lilly et al., 2007) can be considered as an introduced species in the Mediterranean Sea. According to Smayda & Reynolds (2001), *A. tamarense* is a "frontal zone/upwelling relaxation/coastal current bloom taxa" (types IV-VI). Its capabilities of dispersal across vast distances followed by a settlement in coastal waters could ensue from the variability of the introduced genetic pool. Moreover, its particular life cycle with an haploid-planktonic and a diploid-benthic stage allows *Alexandrium* to adapt to a wide range of climatic and ecological conditions. Thus, the recombination events during the sexual phase and the associated ecological conditions lead to phenotypic trait variations within conspecific individuals.

Intra-population clonal variabilities of *Alexandrium* species have been observed in several autecological studies related to physiological measurements and species interactions (Brand, 1981; Costas, 1990; Jauzein et al., 2008a & b; Tillmann et al., 2009). According to these studies, each clone can be considered as a specialist conspecific. Thus, a bloom can be considered as an assemblage of numerous specialist conspecifics with their own individual fitness. The duration of the bloom and the seed bank linked to the reproduction success will be connected to the fitness of each clone. *A. tamarense* was first observed in the French Mediterranean Thau lagoon in 1995 (Abadie et al., 1999). Nevertheless, recurrent proliferations of *A. catenella* were recorded almost every year since 1998. Finally, the coexistence of the two species, *A. tamarense*

and *A. catenella*, was clearly established in seawater in 2007 and in the sediment collected in 2004 (Genovesi et al., 2011). The aim of this study was to analyze different fitness components of 23 clonal strains isolated from a single water sample collected during a *A. tamarense* bloom in order to appreciate its intra-specific variability. These characteristics will help us to understand its invasive capabilities and its maintenance in a Mediterranean lagoon. The demographic parameters tested were the growth rate, the duration of the lag phase and the shape of growth curves in a variety of culture media.

Material and Methods

Study site

The Thau lagoon is a shallow marine lagoon located on the French Mediterranean coast (43°24'N-3°36'E) covering 75 km². It has a mean depth of 4 m, with a maximum depth of 10 m. The lagoon is connected to the sea by 3 narrow channels. Three oyster farming zones are located along the northwestern shore. The salinity is influenced by water exchanges, evaporation and runoff and it is comprised between 27 and 40. The concentration of dissolved organic phosphorus varies from 0.13 to 1.27 μM, the dissolved organic carbon from 170 to 870 μM and the dissolved organic nitrogen from 12 to 44 μM (unpublished data).

Isolation of *Alexandrium tamarense* strains

Our study investigated 23 monoclonal cultures of *Alexandrium tamarense*. These strains came from a single sample collected in the water column of the Thau lagoon during the bloom of May 2007. Single cells were isolated from swimming vegetative *A. tamarense* cells with a sharpened Pasteur pipette. Stock cultures of these 23 strains were maintained on ESNW (natural seawater enriched with nutrients at ESAW medium level; Collos et al., 2011).

Culture conditions

For our study on intraspecific variability, we chose 3 culture media of varying complexity. The culture media used were ESNW (Enriched Seawater Natural Water), ESAW (Enriched Seawater Artificial Water, Andersen et al., 2005) and ESAW+HA (Humic Acids). ESNW was prepared from natural Thau lagoon seawater of salinity 35. ESAW medium was used to minimize organic matter and to obtain better reproducibility of growth in order to avoid bias related to the variability of the Thau water quality. It was prepared from AW base (Artificial Water) autoclaved with salinity adjusted to 38. A humic acid (Fluka 53680) was added at a final concentration of 100 mg.l⁻¹. Previous acclimation with the 3 media was performed for each clone. This was a prerequisite for an accurate study of the demographic parameters within clones (Brand, 1981). All inoculations are performed under sterile laminar flow hood. All cultures used were monospecific but not axenic. Stock cultures were maintained at 20 ± 1°C and 100 μmol photons.m⁻².s⁻¹ in a 12:12 light:dark cycle. Growth was followed in two replicates for at least 25 days in 200 ml of medium in 250 ml polystyrene vials. Sampling was done every fourth up to every other day in order to minimize detrimental effects of stirring as this species is very sensitive to shaking (Collos et al., 2004). *In vivo* fluorescence (IVF) was measured spectrofluorometrically LS50B Perkin Elmer (single measurement on each of the two replicate cultures) and calibrated against cell counts. Growth rate was estimated from linear regressions of natural log of IVF values vs. time (Guillard, 1973). When several growth phases occurred, i.e. crashes followed by recoveries, only growth rates from the first growth phase were reported. Twenty three strains were examined in total. Growth rate and lag phase of the strains were compared by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests.

Results

Variability in growth capacity of strains on different culture media

Among the twenty three strains studied only twelve strains were grown on artificial seawater ESAW medium. The second medium tested was ESAW+HA. It has been used to assess the stimulating effect of humic substances on the remaining eleven strains that did not grow on ESAW. Humic acid results from the biochemical transformation of animal and plant tissues in soil or sediment. The enrichment of lakes and rivers with natural extracts of soil containing humic substances is known to stimulate the growth of dinoflagellate (Prakash & Rashid, 1968). Six strains were grown on ESAW+HA medium. The last five strains among

the eleven tested did not grow on the previous media (ESAW and ESAW+HA) but grew well on the Thau enriched water (ESNW).

The variability in the ability of strains to grow on these three different culture media is shown in Table 1.

The diversity in growth curve forms

Growth curves obtained for each culture on ESAW showed great variability in their shapes allowing the differentiation of three different groups. Because of the large number of growth curves resulting from our experiments, we have only presented here a typical curve for each of the three groups obtained. The first group corresponded to strains exhibiting conventional curves with a lag phase, an exponential phase and a stationary one, followed by a phase of senescence (Fig. 1A). The second group corresponded to strains characterized by a sudden drop in cell density after the exponential phase (Fig. 1B). The last group was associated to strains with a stationary phase followed by renewed growth (Fig. 1C).

Table 1. *Alexandrium tamarense*. Capacity for growth of studied strains on different culture media. + Positive growth, - No growth.

Tableau 1. *Alexandrium tamarense*. Capacité de croissance des souches étudiées sur les différents milieux de cultures. + Croissance positive, - Pas de croissance.

Strains name	Strains that grow only on ESNW	Strains growing on ESAW	Strains growing on ESAW+HA
A3-3	+	-	-
A7-2	-	+	-
B2-1	-	+	-
B8-2	-	-	+
B9-3	-	+	-
B11-2	-	+	-
C4-3	+	-	-
C5-3	-	+	-
C11-3	-	+	-
C12-1	-	-	+
D1-2	-	-	+
D2-3	-	+	-
D3-1	-	+	-
E1-3	-	-	+
G5-3	-	+	-
G10-3	-	+	-
G11-3	+	-	-
G12-3	+	-	-
H2-1	-	-	+
H4-2	-	+	-
H9-1	-	-	+
H11-2	-	+	-
H12-3	+	-	-

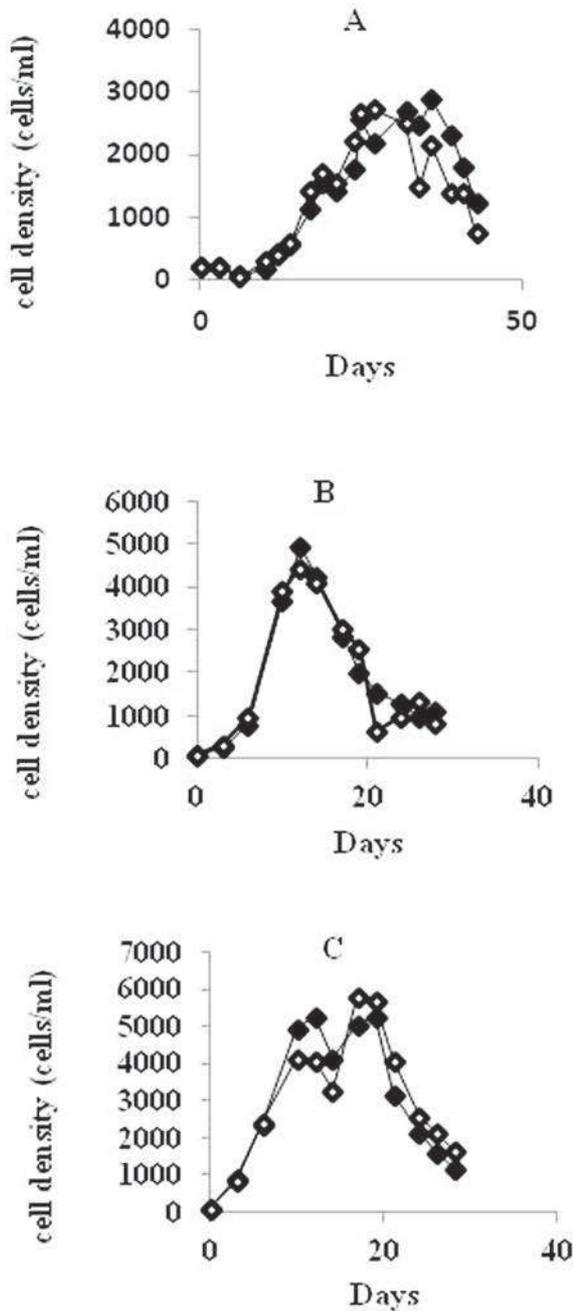


Figure 1. *Alexandrium tamarense*. Growth curves on ESAW medium. Strain C5-3 (A) is representative for the first group, D3-1 (B) for the second group, B2-1 (C) for the third group. Duplicate cultures. Filled diamonds for duplicate one ; empty diamonds for duplicate two. Error bars show the standard deviation.

Figure 1. *Alexandrium tamarense*. Courbes de croissance sur le milieu ESAW. La souche C5-3 (A) représente le premier groupe, D3-1 (B) le second groupe, B2-1 (C) le troisième groupe. Cultures en duplicata. Losanges pleins pour le premier duplicata ; losange vide pour le deuxième duplicata. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

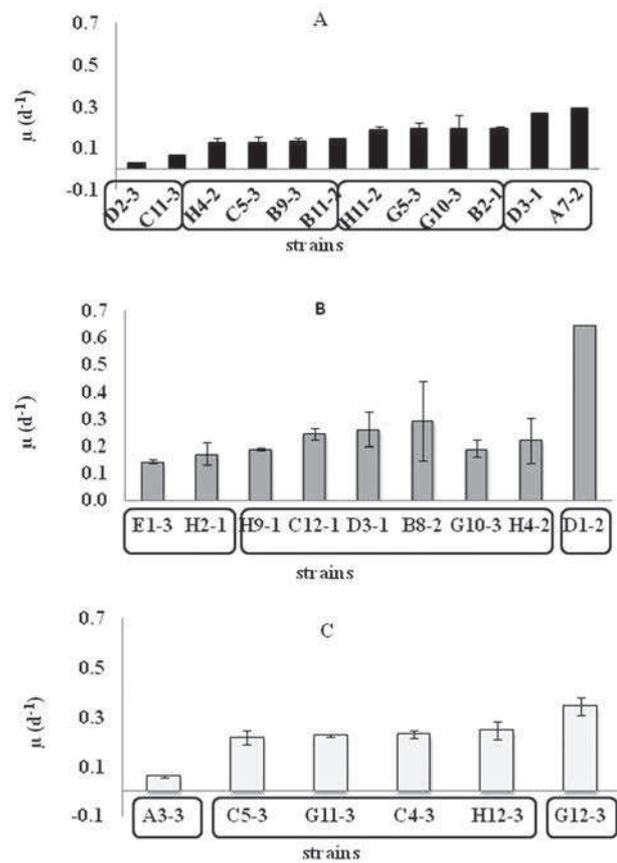


Figure 2. *Alexandrium tamarense*. Growth rates (day^{-1}) of different strains on ESAW (A), ESAW+HA (B), ESNW (C) culture medium. Error bars show the standard deviation. Strains are grouped following ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 2. *Alexandrium tamarense*. Taux de croissance ($jour^{-1}$) des différentes souches sur les milieux ESAW (A), ESAW+HA (B), ESNW (C). Les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les souches sont regroupées suivant l'ANOVA et le test de comparaison multiple Tukey.

Growth rates

In ESAW medium, there was some variability in growth rates (0.02 to $0.28 d^{-1}$ or 0.03 to $0.40 d^{-1}$) between the different strains (Fig. 2A). The error estimated from the variability of the slope of the regression lines between IVF and cell densities ranged between 1.3 and 3.1%. Our values are similar to growth rates of *A. tamarense* on artificial media published so far and ranging from 0.14 to $0.36 d^{-1}$ (Prakash & Rashid, 1968; Gagnon et al., 2005; He et al., 2010). One way ANOVA indicated a significant ($p < 0.001$) difference between groups for growth rates. Tukey's multiple comparison tests allowed distinguishing four groups. The same test indicated a significant ($p = 0.0011$)

difference between strains cultivated on ESAW+HA and allowed the distinction of three groups (Fig. 2B). Growth rates ranged from 0.14 to 0.65 d⁻¹ and were similar to values published in the literature using artificial media supplemented with humic acids (Prakash & Rashid, 1968; Gagnon et al., 2005) and allowed to distinguish three groups (Fig. 2B). Growth rates on ESNW medium ranged from 0.06 to 0.34 d⁻¹ and were significantly ($p < 0.001$) different; this allowed us to identify three strain categories (Fig. 2C).

Lag phases

We observed variability in the duration of lag phase in ESAW medium (2 to 23 days, Fig. 3A). ANOVA indicated a significant ($p < 0.001$) difference between strains and enabling us to distinguish three groups of strains growing on ESAW+HA, the duration of lag phase on this medium varied between 3 and 14 days (Fig. 3B). The same statistical analysis also indicated the presence of four groups of strains that were significantly ($p < 0.001$) different. The duration of lag phase of strains growing on ESNW medium was between 4 and 11 days (Fig. 3C). The strains with the shortest lag phases (Fig. 3A) were characterized by the highest growth rate (Fig. 2A) in ESAW medium. This can be explained by a variety of adaptive capacities between the strains facing the nutrient shock when inoculated in a new environment.

Discussion

The variability demonstrated in the ability of strains to grow on these three different culture media clearly reveal the diversity of the degree of auxotrophy relative to organic matter in the culture medium. The species *Alexandrium tamarens* is known to be mixotrophic (able to use both organic and inorganic compounds as carbon sources: Burkholder et al., 2008). This ability may be due to nutritional intraspecific diversity which is reflected in the presence of phototrophic strains that are able to grow on artificial medium. Another group of strains which requires a minimum contribution of organic matter are those growing on ESAW+HA medium. The last five strains that are auxotrophic for organic matter are unable to grow on medium containing solely an inorganic or an organic carbon source such as humic acid. The complementarity of these three types of nutritional functions characterizes the mixotrophy requirements of this species.

Regarding the shapes of growth curves, the culture of our first group of strains shows a typical sigmoid type growth curve corresponding to a single cell population dividing by binary fission. In the growth pattern observed in strains of second category the rapid increase in cell

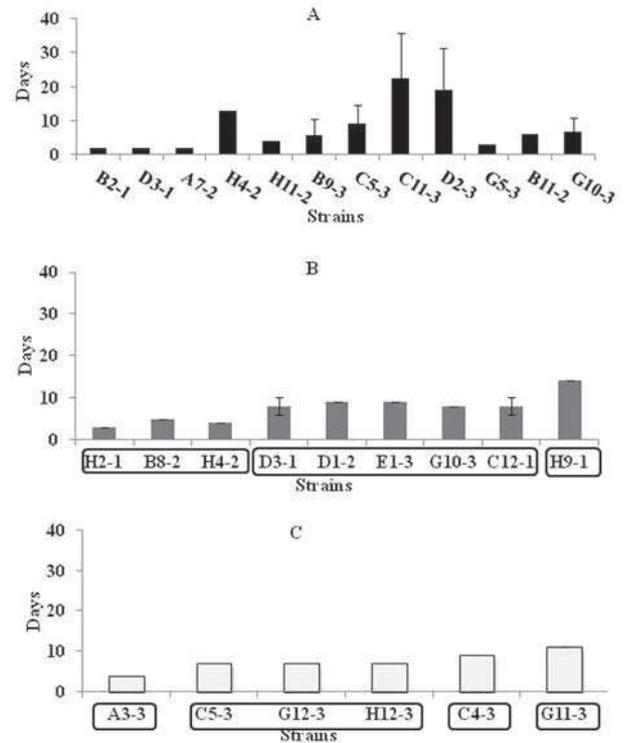


Figure 3. *Alexandrium tamarens*. Lag phases (days) of different strains on ESAW (A), ESAW+HA (B), ESNW (C) culture medium. Error bars show the standard deviation. In figure 3C, they are undistinguishable from the histogram tops. Strains are grouped following ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 3. *Alexandrium tamarens*. Phases de latence (jours) des différentes souches sur les milieux ESAW (A), ESAW+HA (B), ESNW (C). Les barres d'erreur indiquent l'écart type SD. Pour la figure 3 C, elles se confondent avec le haut des histogrammes. Les souches sont regroupées suivant l'ANOVA et le test de comparaison multiple Tukey.

density could lead to accumulation of toxic products. Thus, autocatalytic effect and microbial infection could cause these population crashes following the exponential phase (Fogg, 1971). The third group of strains shows a growth curve differentiated from the classical model, because there is an initiation of a new exponential phase after the stationary phase. This may be due to the assimilation of dissolved organic matter such as proteins and amino acids released by dead cells, allowing the strain to remain in the culture medium relatively longer than the strains belonging to the first two groups. This decline phase might be also considered as a selective event (Lakeman et al., 2009). The metabolites released by dead cells and/or biotransformed by the accompanying bacterial flora can be toxic compounds for the microalgae. Only few genotypes will be

able to adapt their metabolism to these new trophic conditions.

The range of values obtained for the growth rates in our study is mentioned in other studies of *A. tamarense* growing on enriched natural seawater. Brand (1981) found growth rates ranging from 0.13 to 0.46 d⁻¹, Karentz (1983) from 0.13 to 0.35 d⁻¹, Costas (1990) from 0.10 to 0.76 d⁻¹ and Tillmann et al. (2009) from 0.28 to 0.46 d⁻¹. The relatively higher values of growth rates obtained by these authors are possibly due to the use of culture media prepared with natural seawater. However, it is unknown how much of this variability is due to the natural seawater composition. Karentz (1983) has shown that the growth rate of strain MGT-23 was significantly different between two different batches of natural seawater collected one year apart. Strains grown in ESAW and ESAW + HA present morphological aberrations and distortions. The lowest growth rates are those of strains grown on artificial seawater. This behavior clearly indicates that the strains growing only on ESNW and ESAW + HA are auxotrophic. A nutrient essential for *A. tamarense* is not present in artificial water unlike that in medium based on Thau natural seawater.

During the lag phase, algal cells try to adapt to a sterile synthetic medium, and it is possible that only some strains of *A. tamarense* are able to acquire the ability to acclimate relatively rapidly in ESAW medium, so a prolonged lag phase may mask selective events (Lakeman et al., 2009). When the strains are cultured in a new sterile medium, the conditions are generally different from those in the original medium, and often these organisms do not acclimate quickly (Ferrier et al., 2002). In addition, even if the inoculum of algae contained bacteria, they are certainly very few and initially diluted. Many studies have shown that bacteria stimulate the growth of algal cultures via the regeneration of inorganic nutrients and the secretion of organic nutrients, cofactors, vitamins, photochromic, oligosaccharides necessary for algal growth (Ferrier et al., 2002). Statistical analysis (one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test) distinguished three groups for the seven strains grown in ESAW+HA (Fig. 3B) and four groups for six strains grown in ESNW (Fig. 3C), so intraspecific variability and adaptability in the medium is real in *A. tamarense*. But, there was no overall influence of medium on the lag phase.

Our results reveal that wide fitness variations are exhibited by diverse conspecific *A. tamarense* individuals co-existing during a bloom. They display variations in demographic parameters such as nutritive requirements, growth, lag phase, maximal cellular density reached. These phenotypic traits are ecologically essential because they will drive the bloom dynamics, its persistence and finally the renewal of the cysts banks. Considered as a disturbance-

tolerant ruderal (R) species by Smayda & Reynolds (2001), the fitness variability showed that both r- and K-selected conspecific individuals co-occur in a same population and individual selective events drive its dynamics. These observations are supported by the model proposed by Alpermann et al. (2009) who explained that the existence of genetically differentiated subgroups within *A. tamarense* planktonic populations is relied upon the germination of cohorts of cysts of different year classes derived from clonal lineages favoured by local adaptation. A scenario of the bloom dynamics for *A. tamarense* in Thau lagoon may be proposed from these observations.

In Thau lagoon, *Alexandrium* blooms are now thought to be fuelled either by dissolved organic matter (DOM) from various origins (diatoms, macroalgae, zooplankton) or particulate organic matter from *Synechococcus* (Collos et al., 2009). Here, we address the topic of growth on dissolved compound only, excluding phagotrophy. Given the low levels of limiting nutrients such as ammonium or nitrate during blooms (Collos et al., 2007), it is likely that, during the early stages of bloom development, those strains that grow on organic N will be favoured over those that do not. At bloom peak, the abundance of zooplankton (Collos et al., 2004) is likely to provide DOM but also ammonium by excretion, so that auxotrophs may be favoured at that stage. During bloom termination, DOM provided by lysed or grazed cells will provide DOM so that heterotrophs will benefit from that supply and possibly outcompete bacteria for their utilization (Collos et al., 2011). In any case, the diversity of nutritional strategies will ensure survival of the species in the ever changing nutrient conditions during which *Alexandrium* blooms take place.

Acknowledgements

We thank the Ifremer staff (LER/LR-Sète) for its helpful collaboration. This work was supported by grants from the French National Programme Ecosphère Continentale et Côtière - EC2CO and from the "Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité - INVALEX project" (AAP-IN-2009-036).

References

- Abadie E., Amzil Z., Belin C., Comps M.-A., Elzière-Papayanni P., Lassus P., Le Bec C., Marcaillou-Le Baut C., Nézan E. & Poggi R. 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*: épisode de novembre à décembre 1998. *Rapport Ifremer*, Plouzané (France). 44 pp.
- Alpermann T.J., Beszteri B., John U., Tillmann U. & Cembella A.D. 2009. Implications of life-history transitions on the population genetic structure of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Molecular Ecology*, **18**: 2122-2133.

- Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J. & Watanabe M.M. 2005.** Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal culturing Techniques*, (R.A. Andersen ed), pp. 429-538. Elsevier Academic Press: Burlington.
- Anderson D.M., Alpermann T.J., Cembella A.D., Collos Y., Masseret E. & Montresor M. 2012.** The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, **14**: 10-35.
- Bolch C.J.S. & De Salas M.F. 2007.** A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium tamarensis* complex to Australasia. *Harmful Algae*, **6**: 465-485.
- Brand L.E. 1981.** Genetic variability in reproduction rates in marine phytoplankton populations. *Evolution*, **35**: 1117-1127.
- Burkholder M.J., Patricia M.G. & Hayley M.S. 2008.** Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, **8**: 77-93.
- Carlton J.T. 1987.** Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean. *Bulletin of Marine Science*, **41**: 452-465.
- Collos Y., Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P. & Vaquer A. 2009.** Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal of Sea Research*, **61**: 68-75
- Collos Y., Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P. & Souchu P. 2004.** Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology*, **40**: 96-103.
- Collos Y., Hadjadj I., Plisson B., Cecchi P., Laabir M., Bechemin C. & Masseret E. 2011.** Phased oscillations in cell numbers and nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarensis* (dinophyceae). *Journal of Phycology*, **47**: 1057-1062.
- Collos Y., Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A. & Souchu P. 2007.** Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, Southern France. *Harmful Algae*, **6**: 781-789.
- Costas C.E. 1990.** Genetic variability in growth rates of marine dinoflagellates. *Genetica*, **83**: 99-102.
- Ferrier M., Martin J.L. & Rooney-Varga J.N. 2002.** Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. *Journal of Applied Microbiology*, **92**: 706-716.
- Fogg G.E. 1971.** *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*, 3rd ed. University of Wisconsin Press: Madison. 269 pp.
- Gagnon R., Lévasseur M., Weise A.M., Fauchot J., Campbell, P.G.C., Weissenbach, B.J., Merzouk, A. & Gosselin M. 2005.** Growth stimulation of *Alexandrium tamarensis* (dinophyceae) by humic substances from the Manicouagan river (Eastern Canada). *Journal of Phycology*, **41**: 489-497.
- Genovesi B., Shin-Grzebyk M.S., Grzebyk D., Laabir M., Gagnaire P.A., Vaquer A., Pastoureaud A., Lasserre B., Collos Y., Berrebi P. & Masseret E. 2011.** Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the *Alexandrium tamarensis* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *Journal of Plankton Research*, **33**: 405-414.
- Guillard R.R.L. 1973.** Division rates. In: *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements* (J.R. Stein ed), pp. 289-311. Cambridge University Press: Cambridge.
- Hallegraeff G.M. 1993.** A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, **32**: 79-99.
- He H., Chen F., Li H., Xiang W., Li Y. & Jiang Y. 2010.** Effect of iron on growth, biochemical composition and paralytic shellfish poisoning toxins production of *Alexandrium tamarensis*. *Harmful Algae*, **9**: 98-104.
- Jauzein C., Collos Y., Garcés E., Vila M. & Maso M. 2008a.** Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *Journal of Phycology*, **44**: 1136-1145.
- Jauzein C., Loureiro S., Garcés E. & Collos Y. 2008b.** Interactions between ammonium and urea uptake by 5 strains of *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *Aquatic Microbial Ecology*, **53**: 271-280.
- Karentz D. 1983.** Patterns of DNA synthesis and cell division in marine dinoflagellates. *Journal of Protozoology*, **30**: 581-588.
- Lakeman M.B., von Dassow P. & Cattolico R.A. 2009.** The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae*, **8**: 746-758.
- Lilly E.L., Halanych K.M. & Anderson D.M. 2007.** Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarensis* complex (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, **43**: 1329-1338.
- Prakash A. & Rashid M.A. 1968.** Influence of humic substances on growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology & Oceanography*, **13**: 598-606.
- Scholin C.A. & Anderson D.M. 1994.** Identification of group-specific and strain-specific genetic-markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). 1. RFLP analysis of SSU ribosomal-RNA genes. *Journal of Phycology*, **30**: 744-754.
- Smayda T.J. & Reynolds C.S. 2001.** Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *Journal of Plankton Research*, **23**: 447-461.
- Tillmann U., Alpermann T.L., Da Purificação R.C., Krock B. & Cembella A. 2009.** Intra-population clonal variability in allelochemical potency of toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis*. *Harmful Algae*, **8**: 759-769.

Conclusion

Les résultats de ce présent travail nous ont révélé une diversité spécifique considérable au sein des 23 souches d'*A. tamarense* qui a concerné tous les paramètres physiologiques testés. Les tests statistiques indiquent l'existence de groupes significativement différents pour les taux de croissance et les phases de latences, on observe également différents modèles de courbes de croissance et une variabilité des souches dans leur capacité de croître sur les 3 différents milieux de culture. Ainsi sur les 23 souches testées seulement 12 ont pu croître sur ESAW, parmi les 11 souches restantes seulement 6 ont pu croître sur milieu ESAW+AH et les 5 dernières souches étaient incapable de croître sur les deux milieux de culture précédents mais uniquement sur milieu ESNW. Cette diversité de croissance sur différents milieux reflète un degré de diversité auxotrophique relatif à la concentration de matières organiques dans le milieu de culture, *Alexandrium tamarense* est une espèce connue pour être mixotrophe. Cette diversité intraspécifique nutritionnelle ajoutée à la variabilité de croissance participe probablement à la survie de l'espèce dans l'évolution constante des conditions alimentaires dans l'écosystème et assure ainsi le succès d'établissement et de maintien des blooms *Alexandrium tamarense* dans les nouvelles zones colonisées.

Manuscript D: Phased oscillations in cell numbers and nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarense* (dinophyceae)

Paru dans Journal of Phycology

Contexte de l'étude

L'interaction des bactéries avec les algues unicellulaires eucaryotes a longtemps été connu comme jouant un rôle important dans la biologie et l'écologie de ces organismes (Doucette 1995). Par exemple, les associations bactériennes avec des espèces de HAB ont été documentées à des niveaux allant du sub-cellulaire (Silva, 1982) à celle de populations entières en floraison (Romalde et al. 1990). En outre, les relations entre ces organismes peuvent être bénéfiques (Nishijima et Hata, 1989), ou nuisibles (Trick et al. 1984), ou même les deux au cours d'un bloom (Fukami et al. 1991). Collos et al. 2006 ont observé une variabilité des courbes de croissance chez les souches ACT03 et TL01 d'*A.catenella* ainsi que des phases de décroissance, suivies de reprise ou non d'une nouvelle phase exponentielle. Le renouvellement de la phase de croissance chez ces algues en milieu non axénique est inhabituel car certain études soupçonnent que les bactéries participent au déclin des blooms de phytoplancton (Smayda 1996). Afin de mieux comprendre la dynamique d'un tel comportement, nous avons mesuré simultanément l'évolution de la biomasse algale d'*A. tamarense* et la concentration des nitrates dans le milieu de culture au cours des différentes phases de croissance.

PHASED OSCILLATIONS IN CELL NUMBERS AND NITRATE IN BATCH CULTURES OF *ALEXANDRIUM TAMARENSE* (DINOPHYCEAE)¹

Yves Collos,² Imene Hadjadji, Benoit Plisson, Philippe Cecchi,³ Mohamed Laabir

Université Montpellier 2, Ecologie des Systèmes Marins Côtiers, UMR 5119 CNRS, IRD, CC093, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Christian Bechemin

Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais, BP 7 - 17137 L'Houmeau, France

and Estelle Masseret

Université Montpellier 2, Ecologie des Systèmes Marins Côtiers, UMR 5119 CNRS, IRD, CC093, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Alexandrium tamarense (M. Lebour) Balech strains isolated in spring 2007 from a single bloom in Thau lagoon have been grown in nonaxenic artificial media. For three strains showing large oscillations in biomass (crashes followed by recoveries) on a scale of several days, a significant relationship was observed between changes in cell densities (as in vivo fluorescence) and changes in nitrate concentrations. Increases in cell densities were accompanied by decreases in nitrate, while decreases in cell densities corresponded to increases in nitrate, presumably due to nitrification. Net increases in nitrate could reach up to $15 \mu\text{mol N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ indicating a very active nitrifying archaeal/bacterial population. However, following population crashes, algal cells can recover and attain biomass levels similar to those reached during the first growth phase. This finding indicates that those archaea/bacteria do not compete for nutrients or do not hamper algal growth under those conditions. In contrast to diatoms, dinoflagellates such as *A. tamarense* do not excrete/exude dissolved organic matter, thus preventing excessive bacterial growth. This mechanism could help explain the recovery of this species in the presence of bacteria.

Key index words: *Alexandrium tamarense*; archaea; bacteria; decay; growth; nitrate; nitrification; oscillations

Abbreviations: DOC, dissolved organic carbon; DON, dissolved organic nitrogen; IVF, in vivo fluorescence; TN, total nitrogen

Oscillations in phytoplankton biomass are known to occur over a daily timescale either in bulk measurements of chl *a* (Glooschenko et al. 1972, Collos et al. 1989) or in terms of cell numbers (Nelson and Brand 1979, Siu et al. 1997) and are also sometimes related to parallel changes in dissolved organic carbon (DOC; Burney et al. 1982) or dissolved inorganic nitrogen (Collos et al. 1992). Such patterns indicate intense exchanges of material between the particulate and the dissolved phase on an hourly timescale. On a longer time scale (d), decreases in microalgal biomass can be related to net increases in nitrate (Jacques et al. 1976, Collos et al. 1988) that indicate nitrification of organic compounds resulting from cell degradation. During batch growth of *A. catenella/tamarense*, a large variability in growth curves was observed (Collos et al. 2006), with stationary phases sometimes followed by renewed growth or not, as well as population crashes, sometimes also followed by recovery or not. The recovery of such algae in nonaxenic medium was particularly surprising as bacteria are expected to take over in such situations for phytoplankton in general (Smayda 1996, Doucette et al. 1999, Uribe and Espejo 2003) and *A. tamarense* in particular (Su et al. 2007, Wang et al. 2007, 2010). Bacteria are also thought to terminate dinoflagellate blooms in situ (Smayda 1996 and references therein). To better understand the dynamics of such behavior, we measured simultaneously algal biomass of *A. tamarense* and nitrate concentrations in the medium during growth, degradation, and eventual recovery of cells.

MATERIALS AND METHODS

Several strains of *A. tamarense* were isolated in May 2007 in the Thau lagoon (Crique de l'Angle), southern France. Stock cultures were maintained on ESNW (natural seawater enriched with nutrients at ESAW medium level; Harrison et al. 1980, Andersen et al. 2005) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and $100 \mu\text{mol}$

¹Received 19 July 2010. Accepted 14 January 2011.

²Author for correspondence: e-mail yves.collos@univ-montp2.fr.

³Present address: IRD UMR G-eau, 361, rue J. F. Breton, B. P. 5095, 34196 Montpellier, Cedex 5, France.

photons \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ in a 12:12 light:dark (L:D) cycle. Strains were then transferred to totally artificial seawater ESAW medium (initial nitrate concentration: 549 μ M), and their growth was followed in three replicates for at least 25 d in 200 mL of medium in 250 mL polystyrene vials. Those experiments were done on batch cultures under the same experimental conditions as the stock cultures. Sampling was done every fourth day up to every other day to minimize detrimental effects of stirring as this species is very sensitive to agitation (Hu et al. 2006). In vivo fluorescence (IVF) was measured on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, Buckinghamshire, UK) LS50B spectrofluorometer (single measurement on each of three replicate cultures) and calibrated against cell counts by Nageotte (Brand GmbH, Wertheim, Germany) hemocytometer. Growth rate was estimated from linear regressions of natural log of IVF values versus time (Guillard 1973). Points that were not aligned were visually rejected. When several growth phases occurred (i.e., crashes followed by recoveries), only growth rates from the first growth phase were reported. Nitrate was followed by ultraviolet spectrophotometry (Collos et al. 1999) after filtration on 0.2 μ m Pall Corp. (Ann Arbor, MI, USA) Acrodisc HT Tuffryn membranes. Nitrite was measured following Bendschneider and Robinson (1952).

Twenty strains were examined in total. Eight did not grow on ESAW medium. Among the remaining 12 strains, none showed classical growth curves, but we focused here on those (A7-2, B9-3, H11-2) that showed the most irregular growth curves.

The amounts of DOC and total nitrogen (TN) were simultaneously measured in water samples by high temperature catalytic oxidation method using the TOC-V Shimadzu instrument connected in series with the TNM-1 unit from Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan). After acidification to eliminate the inorganic carbon, sparge gas was bubbled through the sample to eliminate the inorganic carbon component. Then, the sample was injected into the combustion tube, which was filled with an oxidation catalyst heated to 680°C. The sample was burned in the combustion tube. As a result, TN decomposed to nitrogen monoxide, and the DOC of the samples was simultaneously oxidized to form carbon dioxide (CO₂). Combustion products were conducted by the carrier gas to a dehumidifier and through a halogen scrubber to remove halogens. Finally, combustion products were delivered to the cell of nondispersive infrared (NDIR) gas analyzer where CO₂ was detected, and to the chemiluminescence gas analyzer for nitrogen monoxide detection.

Each detection signal generated a peak, which can be compared with a standard signal from calibrations curves. Two calibration curves were generated separately using eight points. One calibration curve was prepared with potassium hydrogen phthalate for the DOC, and a second was prepared with potassium nitrate for nitrogen calibration. Analyses for standards or samples were made in triplicates. Dissolved organic nitrogen (DON) was obtained by subtracting nitrate, nitrite, and ammonium from TN values. Filtration on 0.2 μ m Pall Corp. Acrodisc HT Tuffryn membranes did not contribute any nitrogen (either organic or inorganic) to the medium but did contribute some organic carbon (92 μ M in 10 mL filtrates, with coefficient of variation [CV] of 5% from triplicate measurements).

RESULTS

Changes in cell densities and nitrate concentrations are shown for three strains (Figs. 1, 2, and 3). Growth rates were 0.18, 0.13, and 0.29 d⁻¹ respectively for strains H11-2, B9-3, and A7-2, with lag phases of 4, 6, and 2 d, respectively. *A. tamarensis* growth, depicted here as increases in cell numbers, was reflected in decreases in nitrate concentrations.

The decreases in cell densities were not always simultaneous in replicate cultures for a particular strain (Figs. 1 and 2), as there was sometimes a 2 d offset in such trends (days 12 and 14 for strain H11-2, Fig. 1). A particularly striking feature was that decreases in cell densities were often paralleled by increase in nitrate concentrations. For example, nitrate could increase by as much as 30 μ M over the sampling interval during decreases in cell densities of strain B9-3 (days 11–13 in Fig. 2) or strain H11-2 (days 26–28 in Fig. 1).

The same data were then presented as changes in IVF between two consecutive samplings as a function of changes in nitrate for the three strains (Figs. 4, 5, and 6). In each case, there was a significant relationship between both variables. Cell growth is illustrated by increases in IVF (positive values), which are paralleled by net decreases in nitrate (negative values of Δ NO₃). Cell degradation is shown by decreases in IVF (negative values), also accompanied by net increases in nitrate (positive values of Δ NO₃). Most of the data points lie in the growth/nitrate consumption part, but several points illustrate extensive biomass degradation and net increases in nitrate that can be up to 30 μ M over the 2 d sampling interval (Figs. 4 and 5).

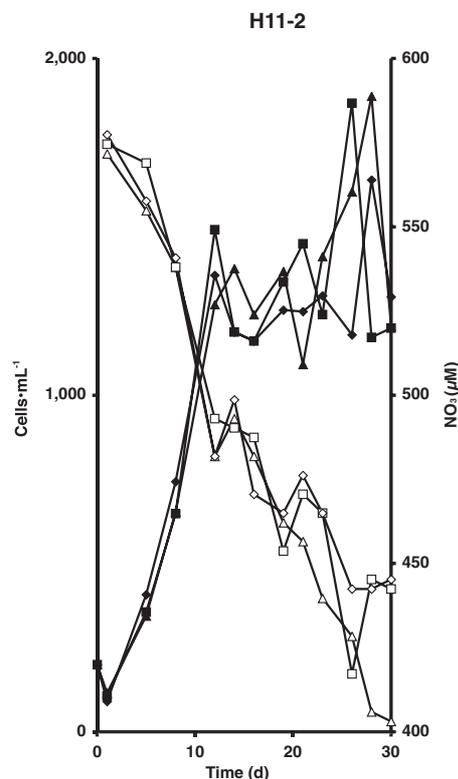


FIG. 1. Growth curves for three replicate cultures of *Alexandrium tamarensis* strain H11-2 as measured by cell numbers converted from in vivo fluorescence (filled symbols) and nitrate concentrations (open symbols).

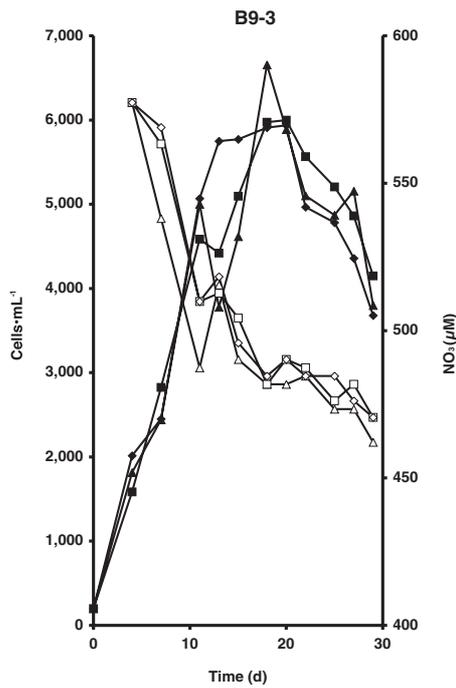


FIG. 2. Growth curves for three replicate cultures of *Alexandrium tamarensis* strain B9-3 as measured by cell numbers converted from in vivo fluorescence (filled symbols) and nitrate concentrations (open symbols).

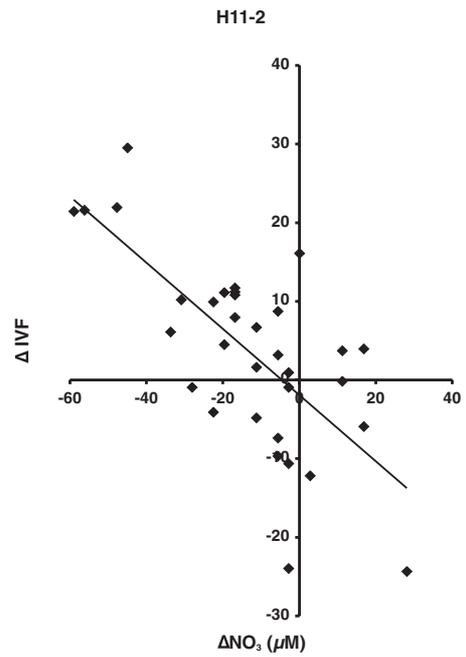


FIG. 4. Changes in in vivo fluorescence (IVF) as a function of changes in nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarensis* strain H11-2. Positive values indicate cell growth or nitrate production. Negative values indicate cell degradation or nitrate consumption. $Y = -0.42x - 1.9$, $r^2 = 0.492$, $n = 33$, $P < 0.01$.

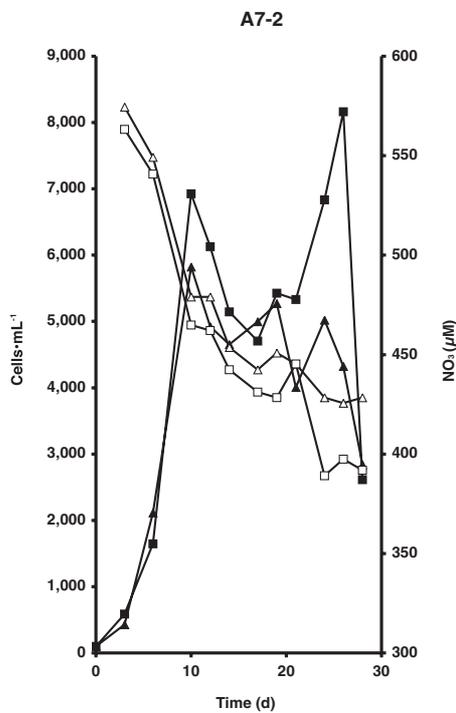


FIG. 3. Growth curves for two replicate cultures of *Alexandrium tamarensis* strain A7-2 as measured by cell numbers converted from in vivo fluorescence (filled symbols) and nitrate concentrations (open symbols).

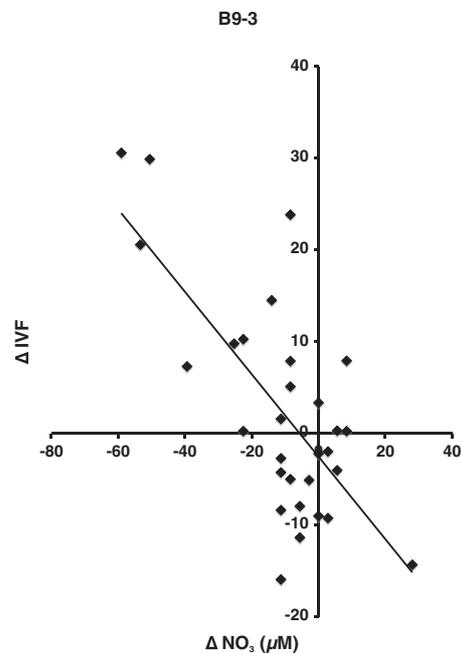


FIG. 5. Changes in in vivo fluorescence (IVF) as a function of changes in nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarensis* strain B9-3. Positive values indicate cell growth or nitrate production. Negative values indicate cell degradation or nitrate consumption. $Y = -0.45x - 2.5$, $r^2 = 0.505$, $n = 30$, $P < 0.01$.

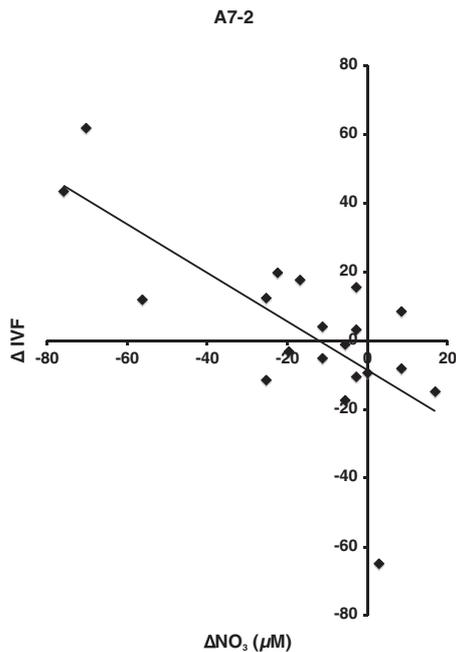


FIG. 6. Changes in in vivo fluorescence (IVF) as a function of changes in nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarense* strain A7-2. Positive values indicate cell growth or nitrate production. Negative values indicate cell degradation or nitrate consumption. $Y = -0.71x - 8.6$, $r^2 = 0.499$, $n = 20$, $P < 0.01$.

The slopes of the regressions shown in Figures 4, 5, and 6 are similar for strains B9-3 and H11-2 but are different from that of strain A7-2, indicating that the stoichiometry between both processes may differ between strains.

A repeat growth experiment was done with strain B9-3 including growth nitrite measurements. Nitrite increased regularly from $\sim 0.5 \mu\text{M}$ to $\sim 4.5 \mu\text{M}$ when cell densities reached the first low point, then decreased slightly as cell densities increased again.

DISCUSSION

In cases where we observed population crashes, an increase in nitrate was observed simultaneously (Figs. 1 and 2). The precision of the method ($\pm 1 \mu\text{M}$) used herein for nitrate determinations is not as high as the more classical colorimetric method (Wood et al. 1967), but it is high enough to show significant increases in nitrate over 2 d intervals. This increase could be due to two different reasons. It could either come from internal nitrate that is released upon cell lysis or from archaeal/bacterial nitrification. For example, in the case of strain B9-3 (days 11–13 in Fig. 2), changes in IVF correspond to a decrease in cell density of $\sim 1,200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, observed over a 2 d period, in parallel to an increase in nitrate of $\sim 29 \mu\text{M}$.

From internal nitrate values published by Thoresen et al. (1982) on this species, a value of $\sim 0.6 \mu\text{M}$ is obtained if this nitrate is directly released in the

medium. This value represents only $\sim 2\%$ of the observed increase in nitrate. Therefore, nitrification is most probably at the origin of such increases ($5\text{--}10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) that have also been observed in the natural environment during incubations (Jacques et al. 1976, Collos et al. 1988, Ward 2008).

From values of *A. tamarense* N cell content published by Leong and Taguchi (2004), and decreases in cell densities, assuming full transformation of cell N into nitrate, values of $34\text{--}53 \mu\text{M}$ for increases in nitrate are estimated over 2 d. This level is sufficient to account for the increase in nitrate of $29 \mu\text{M}$ measured over the same period and also shows that all cell N is probably not fully transformed into nitrate during such degradation phases.

The variations in nitrite followed during strain B9-3 growth are difficult to interpret in as much as they could originate from two different processes: not only ammonium oxidation by nitrifiers, but also nitrite excretion during nitrate assimilation by the alga. Flynn and Flynn (1998) have shown evidence for such a phenomenon in the related species *Alexandrium minutum*.

Nitrifiers can be either autotrophs or heterotrophs (Ward 2008). In our case, nitrification occurred only during degradation phases of *A. tamarense*. This species is not known to excrete dissolved organic matter during growth (Chen and Wangersky 1996a), but following stationary phase, cell decline can lead to an increase in DOC of $\sim 130 \mu\text{M}$ in the study of Chen and Wangersky (1996a). This level would be equivalent to $\sim 20 \mu\text{M}$ DON when converted to N by the Redfield ratio. So probably, this input of DON stimulated heterotrophic nitrifiers (no bacterial cell counts are available) and led to the observed increase in nitrate. Such large increases (up to $15 \mu\text{mol N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) are in the upper range of nitrification rates in marine environments (Ward 2008). Nitrite did not accumulate and ammonium was not measured here, but Collos et al. (1988) did not observe any accumulation of such intermediate compounds during extensive degradation ($10 \mu\text{g chl } a \cdot \text{L}^{-1}$) of a natural bloom over a similar timescale.

The parallel changes (increase and decrease) in both phytoplankton cells and nitrate have already been observed in natural populations of phytoplankton dominated by the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Collos et al. 1992) and indicate intense exchanges of material between particulate and dissolved phases over the daily timescale. The important nitrification observed during phases of cell degradation implies a large and active archaeal/bacterial population. However, this possibility does not keep the *A. tamarense* population from recovering and going into a second growth phase. At this stage, nitrate is still $\sim 500 \mu\text{M}$, so nitrogen cannot be limiting. Possibly, DON/DOC becomes limiting for bacteria (Thingstad et al. 2007). In our ESAW medium, DOC was $\sim 250 \mu\text{M}$, similar to that measured in the

natural seawater used by Chen and Wangersky (1996a,b), and DON was near 20 μM .

In semicontinuous cultures, Loureiro et al. (2009) showed that *A. catenella* is able to use DON/DOC for growth and keeps those compounds at low levels (DON <3 μM and DOC <190 μM) during exponential growth. Moreover, bacteria and viruses were also kept at low levels under such conditions (<0.5 $\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ and <5 $\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively).

For *A. catenella*, Uribe and Espejo (2003) reported no effect of bacteria on growth ($0.2 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$ for both treatments). The only difference was observed at the level of the stationary phase, where bacteria led to a population crash, but the bacteria population did not benefit from the crash (no increase in bacterial cell numbers). In the same study, however, figure 1 in Uribe and Espejo (2003) shows that such crashes (from $\sim 1,000$ to 100 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ in 10 d) could be followed by recovery (from 100 to 1,000 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ in 15 d). This is similar in amplitude and timescale to our own results.

For *A. minutum*, similar or even larger decreases in cell densities (up to 4,000 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ over 2 d) were reported by Davidson et al. (1999), but these do not seem to be due to bacteria as the cultures were axenic. Those crashes were not due to N limitation either, because they took place between 2 and 6 d (depending on irradiance) following nitrate exhaustion from the medium. The recoveries, which sometimes led to higher biomass levels than during the first growth phase, took place in absence of nitrate, so *A. minutum* must have relied upon organic nitrogen released from lysed cells during the previous crash.

Concerning *A. tamarensis*, neither Cole et al. (1975) nor Hold et al. (2001) reported an influence of bacteria on its growth rate (called *Gonyaulax tamarensis* at the time): 0.32 d^{-1} for axenic conditions versus 0.34 with bacteria in the former study and 0.14 d^{-1} in the latter. Except at high concentrations of added bacteria, no effect was detected by Zheng et al. (2005) on *A. tamarensis* growth. They observed decreases in control cultures of 2,000 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ in 2 d immediately followed by increases of 3,000 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ in two more days near the stationary phase. Again, this is similar or even greater in amplitude and timescale than our own results on the same species. The only way to obtain definitive cell lysis of *A. tamarensis* was to add an organic medium to stimulate bacterial growth (Wang et al. 2010).

Among the many causes (autocatalytic effects, microbial infection, nutrient limitation, self-shading) leading to the stationary phase or cell density declines in cultures of phytoplankton (Fogg 1971, Smayda 1996), only the first two seem to be significant herein. Still, the reasons behind those population crashes are not clear, because autocatalytic effects or microbial infection would have to be reversible to explain the observed patterns.

All those different lines of evidence indicate that *A. tamarensis* is able to recover in the presence of bacteria by keeping a low level of dissolved organic matter in cultures. According to Kamjunke and Tittel (2009), mixotrophic algae recycle organic exudates from near the cell surface and therefore show very low exudation rates that do not lead to bacterial growth. This finding is consistent with observations by Chen and Wangersky (1996a) who showed that in contrast to diatoms, dinoflagellates such as *A. tamarensis* do not excrete dissolved organic matter. This mechanism could help explain the recovery of this species in the presence of bacteria.

This study was financed by CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) EC2CO program and Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) ALTOX program. We thank Elise Hatay for help with figures.

- Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. & Watanabe, M. M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In Andersen, R. A. [Ed.] *Algal Culturing Techniques*. Elsevier, Amsterdam, pp. 429–538.
- Bendschneider, K. & Robinson, R. J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *J. Mar. Res.* 11:87–96.
- Burney, C. M., Davis, P. G., Johnson, K. M. & Sieburth, J. McN. 1982. Diel relationships of microbial trophic groups and *in situ* dissolved carbohydrate dynamics in the Caribbean Sea. *Mar. Biol.* 67:311–22.
- Chen, W. & Wangersky, P. J. 1996a. Production of dissolved organic carbon in phytoplankton cultures as measured by high-temperature catalytic oxidation and ultraviolet photo-oxidation methods. *J. Plankton Res.* 18:1201–11.
- Chen, W. & Wangersky, P. J. 1996b. Rates of microbial degradation of dissolved organic carbon from phytoplankton cultures. *J. Plankton Res.* 18:521–33.
- Cole, E. J., Yentsch, C. M., Yentsch, C. S. & Salvaggio, M. 1975. Some of the growth characteristics of *Gonyaulax tamarensis* isolated from the Gulf of Maine. *Environ. Lett.* 9:153–66.
- Collos, Y., Descolas-Gros, C., Fontugne, M., Mortain-Bertrand, A., Chrétiennot-Dinet, M. J. & Frikha, M. G. 1992. Carbon and nitrogen dynamics during growth and degradation of phytoplankton under natural surface irradiance. *Mar. Biol.* 112:491–6.
- Collos, Y., Lespeltet, M., Vaquer, A., Laabir, M. & Pastoureaud, A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* 28:313–8.
- Collos, Y., Linley, E. A. S., Frikha, M. G. & Ravail, B. 1988. Phytoplankton death and nitrification at low temperatures. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 27:341–7.
- Collos, Y., Maestrini, S. Y. & Robert, J.-M. 1989. Nocturnal synthesis and diurnal degradation of phytoplankton biomass in surface waters. *Mar. Biol.* 101:457–62.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A. & Harrison, P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar levels of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* 11:189–94.
- Davidson, K., Wood, G., John, E. H. & Flynn, K. J. 1999. An investigation of non-steady-state algal growth. I. An experimental model ecosystem. *J. Plankton Res.* 21:811–37.
- Doucette, G. J., McGovern, E. R. & Babinchak, J. A. 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J. Phycol.* 35:1447–54.
- Flynn, K. J. & Flynn, K. 1998. Release of nitrite by marine dinoflagellates: development of a mathematical simulation. *Mar. Biol.* 130:455–70.
- Fogg, G. E. 1971. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*, 3rd ed. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 269 pp.

- Glooschenko, W. A., Curl Jr., H. & Small, L. F. 1972. Diel periodicity of chlorophyll a concentrations in Oregon coastal waters. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 29:1253–9.
- Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. In Stein, J. R. [Ed.] *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, London, pp. 289–311.
- Harrison, P. J., Waters, R. E. & Taylor, F. J. R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16:28–35.
- Hold, G. L., Smith, E. A., Birkbeck, T. H. & Gallacher, S. 2001. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:223–34.
- Hu, H., Shi, Y. & Cong, W. 2006. Improvement in growth and toxin production of *Alexandrium tamarense* by two-step culture method. *J. Appl. Phycol.* 18:119–26.
- Jacques, G., Fiala, M., Neveux, J. & Panouse, M. 1976. Fertilisation de communautés phytoplanctoniques. II. Cas d'un milieu eutrophe: upwelling des côtes du Sahara espagnol. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 24:165–75.
- Kamjunke, N. & Tittel, J. 2009. Mixotrophic algae constrain the loss of organic carbon by exudation. *J. Phycol.* 45:807–11.
- Leong, S. C. Y. & Taguchi, S. 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia* 515:215–24.
- Loureiro, S., Garcés, E., Collos, Y., Vaqué, D. & Camp, J. 2009. Effect of marine autotrophic dissolved organic matter (DOM) on *Alexandrium catenella* in semi-continuous cultures. *J. Plankton Res.* 31:1363–72.
- Nelson, D. M. & Brand, L. E. 1979. Cell periodicity in 13 species of marine phytoplankton on a light:dark cycle. *J. Phycol.* 15:67–75.
- Siu, G. K. Y., Young, M. L. C. & Chan, D. K. O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352:117–40.
- Smayda, T. J. 1996. Dinoflagellate bloom cycles: what is the role of cellular growth rate and bacteria? In Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. [Eds.] *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 331–4.
- Su, J. Q., Yang, X. R., Zheng, T. L., Tian, Y., Jiao, N. Z., Cai, L. Z., Hong, H. S. 2007. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 6:799–810.
- Thingstad, T. F., Havskum, H., Zweifel, U. L., Berdalet, E., Sala, M. M., Peters, F., Alcaraz, M., et al. 2007. Ability of a “minimum” microbial food web model to reproduce response patterns observed in mesocosms manipulated with N and P, glucose, and Si. *J. Mar. Syst.* 64:15–34.
- Thoresen, S. S., Dortch, Q. & Ahmed, S. I. 1982. Comparison of methods for extracting intracellular pools of inorganic nitrogen from phytoplankton. *J. Plankton Res.* 4:695–704.
- Uribe, P. & Espejo, R. T. 2003. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Appl. Env. Microbiol.* 69:659–62.
- Wang, X., Li, Z., Su, J., Tian, Y., Ning, X., Hong, H. & Zheng, T. 2010. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere. *Biol. Control* 52: 123–30.
- Wang, X., Zhou, L. H., Zheng, T. L. & Ning, X. R. 2007. Lysis of *Alexandrium tamarense* mediated by bacteria in its phycosphere. *Acta Ecol. Sin.* 27:2864–71.
- Ward, B. B. 2008. Nitrification in marine systems. In Capone, D. G., Bronk, D. A., Mulholland, M. R. & Carpenter, E. J. [Eds.] *Nitrogen in the Marine Environment*. Elsevier, Amsterdam, pp. 199–248.
- Wood, E. D., Armstrong, F. A. J. & Richard, F. A. 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium copper-reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 47:23–31.
- Zheng, T. L., Su, J. Q., Maskaoui, K., Yu, Z. M., Hu, J. S. & Hong, H. S. 2005. Microbial modulation in the biomass and toxin production of a red-tide causing alga. *Mar. Pollut. Bull.* 51:1018–25.

Conclusion

Lors de notre analyse nous avons remarqué que pour certaines souches dont les courbes présentaient des oscillations de croissance, les phases de synthèse de biomasse étaient accompagnées d'une consommation de nitrate, et les phases de dégradation étaient accompagnées d'une production de nitrate. Cette augmentation de concentration de nitrate observée lors des phases de dégradation des cellules d'*A. tamarense* peut être le résultat d'une nitrification bactérienne active. La population d'*A. tamarense* présente souvent des renouvellements de croissance après les phases de dégradation (déclin). Cela indique que les bactéries présentes dans le milieu de culture n'entravent pas le renouvellement de la croissance de cette algue et ne sont pas en compétition pour les ressources nutritives. Les algues utilisent les nutriments reminéralisés par les bactéries adhérentes aux cellules algales et ces dernières facilitent l'établissement d'un nombre réduit de microniches pour les bactéries ce qui conduit à une relation symbiotique entre les cellules algales et les bactéries.

Chapitre 6

Discussion générale

Nous discutons dans ce chapitre de l'ensemble des résultats obtenus pendant cette thèse. Puisque des discussions spécifiques ont été présentées dans chaque chapitre de la thèse, l'objectif de cette Discussion Générale est de résumer ces résultats en faisant une synthèse. Nous allons aborder point par point les différents résultats que la thèse pour ensuite réunir ces différentes pièces du puzzle et faire une conclusion qui répond aux questions posées au début de notre travail.

Caractéristiques biologique et physicochimique des sites de floraisons

Pour les sites d'études, nous avons choisi de focaliser nos travaux sur la description du site d'Annaba au regard du peu de données disponibles (Frehi et *al.*, 2007) sur les conditions physiques, les sels nutritifs, le phytoplancton et spécialement les blooms d'*A.catenella* dans la baie d'Annaba. Pour la lagune de Thau, il existe beaucoup plus de données et plusieurs d'études ont décrit les blooms d'*Alexandrium* dans cette lagune (Abadie et *al.*, 1999, Lilly et *al.*, 2001, Collos et al 2004, 2007, 2009, Jauzein et al 2008, 2010, Laabir et al 2007, 2011, 2013, Genovesi, 2009, 2010). Parmi les objectifs majeurs de ce travail était la description des blooms d'*Alexandrium* en relation avec les conditions environnementales à Annaba pour ensuite les comparer aux données bibliographiques disponibles sur les blooms d'*Alexandrium catenella/tamarensis* ceci afin de comprendre les déterminismes environnementaux, physiologiques et génétiques qui ont permis l'apparition et la pérennité des efflorescences.

Les résultats de la partie terrain de la thèse apportent des informations précieuses sur de nombreux points concernant les blooms d'*Alexandrium* à Annaba. Le suivi bi mensuel réalisé durant l'année 2010-2011 a permis de détecter la présence de cellules d'*Alexandrium* à différentes concentrations et à différentes période de l'année, en général au printemps et en automne. Nous avons détecté un bloom de cette espèce en mai 2010 à nos deux stations d'échantillonnages d'une ampleur de $1\,358\,000\text{ cell.l}^{-1}$ à la station 2 (en face du port) et de $108\,000\text{ cell.l}^{-1}$ à la station 1. En général les concentrations d'*Alexandrium* sont plus importantes à la station 2. Les analyses physicochimiques révèlent que la station 2 est plus eutrophe que la station 1, les concentrations en ammonium y atteignant jusqu'à $98,6\ \mu\text{M}$ (en septembre 2010), alors qu'à la station 1 elles ne dépassent pas les $6\ \mu\text{M}$. Ces teneurs anormalement élevées sont probablement d'origine industrielle, et proviennent des eaux de refroidissement de l'usine d'engrais ASMIDAL qui sont directement rejetées dans l'oued Sybouse. Frehi et *al.*, (2007) ont également enregistré des valeurs très élevées de $272\ \mu\text{M}$

dans la zone de déversement de ces eaux de refroidissements en 2002. Ce point de rejet se trouve à environ 2,5 km de la station 2 et à environ 4 km de la station 1.

Les tests statistiques ont également révélé une corrélation négative entre les teneurs d'ammonium et la concentration de cellules d'*Alexandrium* dans la colonne d'eau, ceci indique probablement une consommation de l' NH_4^+ par ces dernières.

Les concentrations en ammonium dans la station 2 sont optimales pour favoriser la croissance d'*Alexandrium catenella* (Siu et al., 1997). Les teneurs très faibles enregistrées en phosphore (inférieurs à $1\mu\text{M}$ aux deux stations durant l'année) peuvent favoriser également la dominance de cette espèce parmi la communauté phytoplanctonique (Collos et al., 2009). Nous avons également noté un indice de diversité (Shannon) et une richesse spécifique plus faible à la station 2 par rapport à la station 1. Cette faible diversité observée à la station 2 est caractérisée par de nombreuses floraisons monospécifiques. Cette même station présente une domination des dinoflagellés par rapport aux diatomées. On détecte la présence de certaines espèces toxiques telles que *Dinophysis caudata*, *D. fortii*, *Lingulidinium polyedrum*, *Proto-peridinium* sp, *Gymnodinium catenatum*. Cependant seule l'espèce *Alexandrium catenella* est à l'origine de blooms conséquents dans la baie, les autres espèces toxiques étant présentes à de faibles densités dans la colonne d'eau.

L'ensemble de ces résultats et particulièrement les concentrations en ammonium et l'abondance relative d'*A. catenella* aux deux stations durant l'année nous permet de supposer que le point d'origine du bloom se situe à la station 2 et que la station 1 représente juste une advection du bloom.

L'état trophique de la lagune de Thau est différent de celui d'Annaba, étant l'une des plus oligotrophe du pourtour méditerranéen (Souchu et al., 2010) grâce à la présence de stations d'épuration, où les concentrations en ammonium ne dépassent pas $10\mu\text{M}$ (dix fois plus faibles qu'à Annaba) ; les concentrations en nitrate sont deux fois plus élevées que celles d'Annaba avec $11\mu\text{M}$ en moyenne, les températures sont moins élevées que celles de la baie d'Annaba avec une moyenne de 15C° durant l'année 2010 contre $20,7$ la même année à Annaba), la salinité est plus élevée que dans les eaux d'Annaba (maxima jusqu'à $38,7$ PSU contre $37,4$). Les espèces phytoplanctoniques présentes dans la lagune de Thau sont différentes de celles d'Annaba, à part une ou deux espèces. Le seul point commun entre nos deux sites

est la concentration en phosphore avec des valeurs actuelles très faibles ne dépassant pas 1 μM pour l'année 2010.

Chronologie des événements toxiques et évolution des états trophiques des sites d'études

Nous voulions aller plus loin dans notre enquête sur l'origine et les causes du développement des blooms d'*Alexandrium catenella* dans nos deux écosystèmes différents.

Pour cela nous avons établi un historique de l'évolution physicochimique des sites d'études en rapport avec les événements toxiques depuis leur apparition, cette analyse est exposée dans le manuscrit A « A comparative analysis of *Alexandrium catenella/tamarensis* blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France) ».

Nous avons examiné trois années différentes sur une période de 18 ans, l'une étant «pré-*Alexandrium* » (1992) et les deux autres avec des blooms récurrents d'*Alexandrium catenella/tamarensis* (2002, 2010).

Le résultat majeur de cette analyse a révélé que l'apparition d'*Alexandrium* a coïncidé avec des diminutions drastiques de la concentration en phosphore réactif dissous à Annaba et à Thau.

L'année 1992 peut être considérée comme une période «pré-*Alexandrium* » pour les deux sites. Les changements dans les paramètres environnementaux survenant sur une période de 18 ans indiquent qu'aucun changement significatif n'a été détecté durant cette période, ni en température annuelle moyenne ni en salinité ou en ammonium au niveau de chacun des sites. A Annaba, le changement le plus spectaculaire est dû à la baisse des concentrations de phosphore qui ont diminué d'un facteur de 250, allant d'une valeur annuelle moyenne de 17,4 μM en 1992 à 0,07 μM en 2010. À Thau, la baisse la plus importante du phosphore s'est produite entre 1972 et 1992 (de 10 à 1 μM en été et de 3 μM à des niveaux indétectables en hiver) (Souchu et al., 1998)

Jauzein et al., (2010) indique que *A. catenella* pourrait être un concurrent très fort aux faibles concentrations de phosphore réactif dissous, La source de phosphate alternative dans ce cas est le phosphore organique dissous. L'activité phosphatase alcaline est induite chez *A. catenella* à des niveaux de phosphore réactif dissous situés entre 0,4 et 1 μM (Jauzein et al.,

2010). Ces concentrations sont des valeurs intermédiaires entre celles observées en 2002 et 2010 dans la baie d'Annaba (*Alexandrium catenella* a été détectée en 2002)

Ainsi, il semble très probable que l'apparition des efflorescences de *A. catenella* à Annaba est due à la diminution des concentrations du phosphore réactif dissous atteignant des niveaux très faibles, où d'autres membres de la communauté phytoplanctonique sont incapables de concurrencer pour l'acquisition de cette ressource limitante.

Cette situation est similaire à celle vécue dans la lagune de Thau (Collos et al., 2009), où le phosphore réactif dissous a atteint des niveaux indétectables l'hiver en 1992-1993 (*A. catenella* a été signalée pour la première fois en 1995, huit ans après le début du suivi du phytoplancton).

Matériel biologique utilisé pour la comparaison

Souches d'Alexandrium catenella de la baie d'Annaba

Pour les souches d'*A. catenella*, nous n'avions que très peu d'informations bibliographiques (Frehi et al., 2007), les seules données disponibles concernaient la formation d'un bloom en 2002 dans la baie d'Annaba. Nous n'avions également pas un stock de cultures disponible afin de nous permettre de faire une étude comparative.

De ce fait et afin de répondre à l'un de nos premiers objectifs qui est la création d'une bibliothèque de souches et pour obtenir le matériel biologique nécessaire aux études écophysiologicals et de la biodiversité d'*Alexandrium* sur le site d'étude Algérien, des cultures monoclonales ont été obtenues à partir de la germination de kystes présents dans le sédiment échantillonné dans le golfe d'Annaba.

Le genre *Alexandrium* étant connu pour être très sensible à la turbulence (Hu et al., 2006), nous avons évité de transporter des cellules végétatives vivantes via les moyens habituels (bateaux, avion). De plus, nous n'étions pas certains de l'établissement proche d'un bloom d'*Alexandrium* dans la baie.

Les prélèvements du sédiment ont été effectués au niveau des deux stations où Fréhi et al (2007) avaient observé un bloom d'*Alexandrium catenella* en 2002 et dont le sédiment est susceptible de contenir des kystes d'*Alexandrium*.

Lors de notre étude un protocole efficace d'obtention de culture monoclonale a été mis en place et optimisé au fur et mesure des essais de culture. Au cours de ces essais nous avons découvert que seule la station 2 renfermait des kystes d'*Alexandrium catenella* (150 kystes par gramme de sédiment). Cette station est caractérisée par un fond vaseux qui peut favoriser l'établissement de banques de kystes dans les premiers centimètres du sédiment (Erard-Le Denn et *al.*, 1993).

Grace à notre protocole nous avons pu isoler et cultiver pour **la première fois 30 souches monoclonales** d'*Alexandrium catenella* provenant de la baie d'Annaba. Ce protocole est détaillé dans le chapitre 2 de la thèse (matériel et méthode).

Les difficultés qui se sont présentées pour faire germer les kystes et pour cultiver les cellules qui germent lors des différentes étapes de cultures sont nombreuses :

- Contaminations par des Cyanobactéries et/ou des petits flagellés qui se multiplient rapidement et génèrent des quantités de biomasse largement supérieures à celles d'*Alexandrium*.

- L'état et la forme des cellules nouvellement germées qui n'ont pas la forme typique d'une cellule *Alexandrium*,

- D'autres dinoflagellés tels que *Prorocentrum*, *Scrippsiella*, *Gymnodinium*, *Lingulodinium* ont été mis en évidence lors des expérimentations de germination.

- Nombre très faible de cellules trouvées dans les premières étapes d'isolement

- Viabilité réduite et déformation des certaines cellules qui posent problèmes lors de leurs transfert vers de plus grands volumes.

Souches d'Alexandrium catenella de Thau

Pour notre comparaison nous avons utilisé des informations publiées sur les souches d'*A.catenella* isolées dans la lagune de Thau (Abadie et al 1999, Lilly et al 2002, Laabir et al 2007,2012, 2013, Genovesi et al 2008, 2010, Masseret et al 2009, 2010, Collos et al 2004,2007, 2009, Jauzein 2008, 2010)

Souches d'Alexandrium tamarense de Thau

Pour notre étude sur la diversité intraspécifique et la croissance d'*Alexandrium tamarense* (manuscrit C, « Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarense* :

implications for biological invasions and maintenance » et manuscrit D « Phased oscillations in cell numbers and nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarense* (dinophyceae) », nous avons étudié 20 souches monoclonales d'*A. tamarense* qui ont été isolées à partir de prélèvements dans la colonne d'eau lors de la floraison printanière de mai 2007 dans la crique de l'Angle de la lagune de Thau et qui ont été par la suite maintenues au laboratoire.

Comparaison Morphologique des souches

Une fois les cultures d'*A. catenella* d'Annaba obtenues, nous avons procédé à leur caractérisation morphologique, génétique, et toxinique (manuscrit B « Characterization of *Alexandrium catenella* blooming in the Gulf of Annaba (Algeria, Mediterranean sea): morphology, toxin profiles and intraspecific variations »).

En ce qui concerne l'identification morphologique de l'espèce, les souches obtenues à partir du sédiment de la station 2 d'Annaba appartiennent à l'espèce *Alexandrium catenella*. Nous n'avons pas détecté la présence de cellules d'*Alexandrium tamarense* lors de notre analyse.

A Thau la première analyse morphologique a été réalisée par Abadie et *al.*, (1999) suite aux événements toxiques de novembre et décembre 1998. L'identification génétique a été réalisée par Lilly et *al.*, (2002) sur deux souches de ce même événement toxique, et Genovesi et *al.*, (2008) ont mis en évidence la présence conjuguée des deux espèces *A. catenella* et *A. tamarense* dans la lagune de Thau.

Comparaison génétique

Bien que l'identification morphologique des souches ait montré qu'elles appartiennent à l'espèce *Alexandrium catenella*, cette caractérisation n'est pas fiable tant qu'elle n'a pas été confirmée par une analyse génétique formelle (Balech, 1995). Le marqueur ribosomal (ADNr) permet de délimiter la position phylogénétique de cette espèce dans le genre *Alexandrium* ainsi que dans la détermination de la relation entre les isolats *A. catenella* provenant de différentes zones géographiques (Penna et *al.*, 2005).

Afin de confirmer l'identification morphologique, nous avons réalisé le ribotypage de 11 souches. Les résultats de l'analyse de la séquence comprenant les régions ITS1-5.8S rRNA-ITS2 et D1/D2 28S de l'opéron ribosomal des souches d'Annaba ont révélé que les cultures d'*Alexandrium* obtenues à partir du sédiment de la station 2 (en face du port) appartiennent à

l'espèce *Alexandrium catenella* du group IV (clade Asie tempérée). Ceci constitue une information supplémentaire à l'étude de Frehi et *al.*, (2007).

Au niveau de la lagune de Thau, Lilly et *al.*, (2002) ont caractérisé les deux souches ATTL01 et ATTL02, isolées lors du bloom de 1998, comme appartenant au clade Asie tempérée dénommé depuis groupe IV (Lilly et al 2007). Guillou et *al.*, (2002) ont confirmé l'appartenance de la souche ATTL01 au clade Asie tempérée. Lilly et al (2002) ont suggéré également que *Alexandrium catenella* pourrait avoir été introduit à partir des eaux japonaises ou australiennes via les eaux de ballast de navires accostant dans le port international de Sète (France). De plus, Laabir et *al.*, (2007) ont montré que les cellules d'*A. catenella* de Thau étaient capables de survivre à la digestion par l'huître creuse *Crassostrea gigas* d'Asie-Pacifique, introduite dans la lagune de Thau au cours de la période 1970-1980 afin de remplacer l'huître plate *Ostrea edulis*.

Le ribotypage de 23 souches isolées lors du bloom d'octobre-novembre 2004 a montré que *A. catenella* était le seul taxon présent lors de cette épisode toxique. (Masseret et *al.*, 2009). Par la suite la caractérisation du ribotype de 368 cultures monoclonales isolées au printemps et à l'automne 2007 a mis en évidence la co-existence dans des deux espèces cryptiques, *A. catenella* (groupe IV-clade AT) et *A. tamarense* du groupe III précédemment nommé clade Ouest Européen (WE) (Genovesi et *al.*, 2011). Ainsi les souches d'*A. catenella* de Thau et de la baie d'Annaba appartiennent au même clade et pourraient avoir une origine asiatique commune. Des études basées sur des marqueurs microsatellites pourront apporter plus de renseignements aux types de lignées auxquelles pourraient appartenir les souches colonisant le port d'Annaba.

L'introduction d'*A. catenella* dans les eaux méditerranéennes en provenance du Japon due à l'activité humaine (transport maritime) est soulignée par de nombreux travaux se basant sur le ribotypage des souches (Lilly et *al.*, 2002, Penna et al 2005, 2008) et l'utilisation de marqueurs microsatellites (Masseret et *al.*, 2009). Avant le premier événement toxique étendu, qui s'est déroulé sur 100 km le long de la côte catalane en 1998 et 1999 (Vila et *al.*, 2001), la présence d'*Alexandrium catenella* en Méditerranée avait seulement été reportée une seule fois dans la mer entre les Baléares et la Catalogne en 1983 (Margalef & Estrada 1987).

La plupart des sites où cette espèce a été détectée sont proches de ports internationaux. Annaba accueillant un port international, et il est possible que les eaux de ballast de bateaux provenant des ports comme Barcelone, Valence, Malte, Marseille (information de l'entreprise portuaire d'Annaba) soient à l'origine de l'apport de kystes ou de cellules végétatives de cette espèce dans les eaux de la baie. Ces individus auraient alors trouvé des conditions favorables à leur développement et à leur maintien dans la station 2 où la nature du sédiment, les conditions hydrodynamiques ainsi que les concentrations en éléments nutritifs présentent des caractéristiques avantageuses à *A. catenella*. Cela a certainement facilité la mise en place et la récurrence des blooms, alimentés par une banque de kystes considérable (150 kystes / g) qui nous permet de supposer que *A. catenella* a été introduit dans cette zone avant la première observation (Frehi et al., 2007).

Comparaison toxinique

La comparaison du profil toxinique des souches d'*Alexandrium catenella* d'Annaba et de Thau a été faite à partir de la composition et de la concentration en toxines de 26 souches isolées du sédiment de la baie d'Annaba (Voir chapitre IV, manuscrit B figure 2). Les analyses de toxines de ces souches révèlent une grande diversité dans le profil et la concentration en toxines des souches. Le profil toxinique de 20 souches parmi les 26 se caractérise par la prédominance de la toxine GTX6 (jusqu'à 96%). Hallegraef et al., (1991) ont observé que la principale toxine chez *A. catenella* d'Australie était GTX6 (30-57 mol%). La dominance des toxines N-sulfo-carbamoyl (GTX5-6) a été rapportée dans de nombreuses autres études sur souche d'*A. catenella* à partir de différents endroits : Chine (Xu et al., 2012; Li et al., 2011), Japon (Sekiguchi et al., 1996), Chili (Varela et al., 2012), et Nouvelle-Zélande (Mackenzie et al 2004). Les 6 autres souches d'Annaba se distinguent par la présence de GTX4 comme toxine majeure. Cela a été observé chez les souches d'*A. catenella* en provenance de Hong Kong (Siu et al., 2010) ainsi que pour *A. catenella* du sud du Chili (Aguilera-Belmonte et al., 2011). Les saxitoxine et néo-saxitoxines étaient présentes en très faible quantité.

La concentration en toxines des souches d'Annaba a varié entre 2,01 et 28,37 fmol cell⁻¹ (0,78 et 11,3 pg cell⁻¹ avec moyenne de 6,08 pg cell⁻¹). Ces valeurs ne sont pas différentes de celles observées pour d'autres espèces d'*Alexandrium* (Mackenzie et al 2004; Li et al 2011; Aguilera Belmonte et al 2011). La toxicité totale des souches se situait entre 0,06 et 1,83 pg STX equiv

cell⁻¹. Ce degré de toxicité a également été observé chez les souches d'*A. catenella* de Nouvelle-Zélande : 1.3 à 6.6 pg STX equiv cell⁻¹ (Mackenzie et al., 2004) Ces niveaux de toxicité sont relativement faibles par rapport à ceux observés pour d'autres souches *A. catenella* causant des blooms au Chili : 63,65 pg STX equiv cell⁻¹ (Varela et al 2012) et *A. catenella* du canal de Beagle en Argentine : 325 pg STX equiv cell⁻¹ (Benavides et al, 1995).

Pour la lagune de Thau, les premières études toxiques ont été réalisées par Lilly et al., (2002), en même temps que l'identification génétique. Depuis d'autres études ont décrit la toxicité d'*A. catenella* de Thau (Laabir et al 2007, 2012, 2013). La composition en toxines des souches ATTL01, ATTL02 (Lilly et al., 2002), ACT00 (Laabir et al., 2012), ACT03 (Laabir et al., 2007) est assez similaire et caractérisé par la domination des toxines C2, GTX6 et GTX4. Cependant, la saxitoxine et la NEO saxitoxine étaient absentes ou au niveau de traces. Ce profil toxinique est très proche de celui des souches d'*Alexandrium catenella* du Japon (Lilly et al 2002) et également de celui des souches d'Annaba décrit précédemment.

On retrouve d'autres points similaires dans le profil toxinique entre les souches d'Annaba et celle de Thau, tels que la concentration de toxine par cellule qui peut atteindre les 4.5 pg cell⁻¹ chez *A.catenella* de Thau (Laabir et al., 2012) ainsi que dans la toxicité avec des valeurs qui peuvent atteindre les 0,04 pg STX equiv / cellule (Lilly et al 2002).

Comparaison paramètres de croissance

Alexandrium catenella

Le taux de croissance est un facteur déterminant dans le succès des blooms, ce paramètre physiologique pouvant varier entre les souches (Tillmann et al., 2009, Hadjadji et al., 2012). Le taux de croissance de 18 souches d'*A.catenella* d'Annaba (manuscrit B) varie entre 0.05 à 0.33 J⁻¹. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles d'autres souches *A. catenella* de Thau. À titre d'exemple, Laabir et al., (2011) ont constaté un taux de 0,40 et 1,0 J⁻¹ pour la souche ACT03 d'*A. catenella* de la lagune de Thau ; Aguilera-Belmonte et al., (2011) ont enregistré un taux de croissance allant de 0,42 à 0,73 J⁻¹ pour *A. catenella* du Chili. Cependant cette différence peut être due à la variabilité des milieux de cultures utilisés dans ces différentes expériences. Par exemple le taux de croissance d'*A.catenella* de Thau dans l'étude de Laabir et al., (2011) a été mesuré pour une souche cultivée dans l'eau de Thau enrichie. Par contre, le taux de croissance d'*A.catenella* d'Annaba a été mesuré pour des souches cultivées dans l'eau de Mer artificielle (ESAW) après acclimatation progressive à partir de l'eau de Thau enrichie (ESNW) où elles ont été conservées depuis leur obtention. Dans le manuscrit (C) nous avons démontré qu'il peut exister une variabilité considérable dans les taux de croissance et phase de latence entre différentes souches cultivées dans un même milieu de cultures ou entre des souches de la même espèce cultivées dans des milieux différents. Les souches cultivées dans le milieu de culture ESAW ont présenté des taux de croissance faibles les cellules ont présenté des déformations par rapport à celles cultivées dans le milieu ESNW. Cette différence peut être due à l'absence de matières organiques dans le milieu ESAW qui favorisent la croissance des souches d'*Alexandrium* mixotrophes (Hadjadji et al., 2012).

Alexandrium tamarense

Pour *A.tamarense* la mesure des taux de croissance ainsi que la consommation de nitrate de 23 souches différentes a été réalisée, ces travaux sont détaillés dans le manuscrit C « Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarense*: implications for biological

invasions and maintenance » et manuscrit D « Phased oscillations in cell numbers and nitrate in batch cultures of *Alexandrium tamarense* (dinophyceae) ».

La gamme de valeurs obtenues pour les taux de croissances des souches cultivées dans l'eau de mer artificielle (ESAW) dans notre étude varie entre 0.02 et 0.28 J⁻¹ et correspondent aux valeurs mentionnées dans d'autres études sur *A. tamarense* cultivé sur eau de mer naturelle enrichie (ESNW)., Costas (1990) de 0,10 à 0,76 J⁻¹ et Tillmann et al., (2009) de 0,28 à 0,46 J⁻¹. Au cours de notre étude nous avons déterminé pour certaines souches une relation linéaire significative entre l'évolution de la fluorescence *in vivo* (FIV) (qui représente l'augmentation ou diminution de la biomasse algale) et les changements de concentrations des nitrates mesurée au cours du suivi. Cette relation comportait 2 phases, la première est représentée par une proportionnalité durant laquelle l'évolution positive de la fluorescence est accompagnée d'une consommation des nitrates. La 2^{ème} phase est caractérisée par une proportionnalité au cours de laquelle la fluorescence diminue tandis que la concentration des nitrates augmente. Dans les courbes de croissance obtenue, les phases de décroissance, suivies de reprise ou non de la croissance, ont déjà fait l'objet d'observations sur les souches d'*A. catenella* de Thau ACT03 et TL01 (Collos et al., 2006). Néanmoins, les variations opposées entre estimateurs de biomasse (fluorescence *in vivo* : FIV) et concentrations en nitrate apportent une information supplémentaire sur la dynamique du système et donnent une cohérence interne au phénomène.

Les phases de synthèse de biomasse étaient accompagnées d'une consommation de nitrate, et les phases de dégradation étaient accompagnées d'une production de nitrate.

L'importante nitrification observée lors des phases de dégradation des cellules d'*A. tamarense* (correspondant à la diminution de fluorescence) implique une population bactérienne importante et active. Malgré cela, la population d'*A. tamarense* récupère souvent (augmentation de biomasse) mieux après les phases de déclin ; ceci semble indiquer que les bactéries présentes en quantité dans le milieu de culture n'entravent pas une deuxième phase de croissance éventuelle de cette algue et ne sont pas en compétition pour les ressources limitantes. De nombreuses études ont abordé l'utilisation algale de l'azote reminéralisé par les bactéries, et suggèrent que les catégories de microorganismes capables de reminéraliser les nutriments dans un environnement aérobie comprennent en majorité des bactéries adhérentes aux cellules algales. Dans ce cas la reminéralisation est facilitée par l'établissement d'un

nombre réduit de microniches résultant d'une relation symbiotique entre les cellules algales et les bactéries (Doucette 1995).

Variabilité intraspécifique

L'étude de la variabilité intraspécifique est une étape cruciale pour la compréhension du succès d'établissement et du maintien des espèces invasives, pour cela et durant les différentes étapes de la thèse nous avons veillé à étudier la variabilité intra spécifique pour *A. catenella/tamarensis* ; ces investigations font l'objet du manuscrit B pour *A. catenella* et du manuscrit C pour *A. tamarensis*.

Variabilité toxinique

Pour *A. catenella* d'Annaba nous avons mis en évidence une grande diversité dans le profil toxinique entre différentes souches, dans leur taux de croissance ainsi que leurs durées de phase de latence.

Les souches appartenant à la même espèce apparaissant morphologiquement identiques peuvent avoir différents profils des toxines (tableau.1). Cela a été observé chez les espèces du complexe *A. tamarensis* (Touzet et al 2008; Alpermann et al 2010; Aguilera Belmonte et al 2011; Varela et al., 2012). Les analyses de toxines des souches *A. catenella* provenant de la baie d'Annaba révèlent une grande diversité dans les types de toxines et leur concentration pour chaque souche. Les valeurs de concentration de toxines des 26 souches testées ont varié d'un facteur de 10 (entre 2,01 et 28,37 fmol cell⁻¹). Plusieurs études ont montré que la teneur en toxine varie selon les conditions environnementales et la phase de croissance (Anderson et al., 2012 Laabir et al., 2013). Dans une moindre mesure, l'évolution de certains facteurs abiotiques peut influencer sur la composition des toxines telles que l'azote minéral connu pour influencer le type de toxine produit par les cellules d'*A. tamarensis* dans les eaux du sud de la Chine (Wang et al., 2005). En moyenne, avec des faibles quantités d'azote minéral dissous, les cellules ont tendance à produire des toxines de type C1 et C2 tandis que dans les environnements pauvres en phosphore réactif dissous, les toxines GTX2 et GTX3 dominent (Wang et al., 2005). Il a également été démontré que l'abondance et la diversité des bactéries associées aux cellules d'*Alexandrium* pourraient jouer un rôle dans la diversité des profils des toxines chez les souches isolées à partir du même emplacement géographique (Uribe et al.,

2003). La teneur en toxine peut varier en fonction des conditions environnementales, mais pas le profil toxinique qui est plus stable et peut être différent entre les souches et les espèces (2006 Wang et *al.*). Les toxines peuvent augmenter la survie d'*Alexandrium* envers les prédateurs (Touzet et *al.*, 2008). Les changements des conditions environnementales exercent une pression de sélection et peuvent sélectionner des phénotypes parmi les populations efflorescentes, ce qui conduit à l'alimentation des banques de kystes avec des phénotypes différents. Ce phénomène peut expliquer la variabilité élevée des profils toxiniques observé pour nos 26 souches.

Tableau 1. Diversité des concentrations, compositions des toxines et degrés de toxicité chez les souches *d'A.catenella* isolées de différentes régions du monde.

Zone d'étude	Concentration toxinique (fmol/cell)	dominance toxines	Toxicité totale (pg STX equiv / cellule)	Références
Nouvelle-Zélande	25.3–309.9	C1 +C2 = C3 +C4> GTX4> GTX1 > neoSTX	1.3–6.6, 0.4–7.3	Mackenzie et <i>al.</i> , 2004
Annaba-Algérie	2.01 et 28.37	GTX6, GTX4 >C2>GTX5>C1>C3>GTX2=GTX3>Neo STX>STX	0.06-1.83	cette étude
Thau, France	2.9–50.3	GX5 > C2 > C4 > GTX4 > GTX3 ≈ C1 ≈ C3	-	Laabir et <i>al.</i> , 2013
Thau, France	-	C1,2 > GTX1,4 > GTX2,3	0.05–0.44	Lilly et <i>al.</i> , 2002
Japon	34.5	C2 >NeoSTX	-	Sekiguchi et <i>al.</i> , 2001
Hong Kong, Chine	-	GTX4 > GTX3 > GTX1 > GTX6 > Neo STX, Cx	-	Siu et <i>al.</i> , 1997
Chine	-	C1,2 (80%–90%) and GTX1,4 (5%– 15%)	-	Xu et <i>al.</i> , 2012
Mer de l'Est, Chine	4–14	C1,2 > GTX1,3,4,5,6	-	Li et <i>al.</i> , 2011
Sud du Chili	41.4–295.5	C2>GTX3> GTX4	20-63	Varela et <i>al.</i> , 2012
Sud du Chili	-	GTX1,4 > GTX2,3	8.5 - 96.9	Aguilera-Belmonte et <i>al.</i> , 2011

Variabilité des paramètres de croissances

Alexandrium catenella

Les souches d'*A. catenella* d'Annaba cultivées sur le milieu d'eau de mer artificielle (ESAW) ont montré une grande variabilité des taux de croissance (0,05 à 0,33 J⁻¹). Le test statistique ANOVA indique une différence significative ($p < 0,001$) entre les groupes de souches pour les taux de croissance. Le test de comparaisons multiples de Tukey nous permet de distinguer cinq groupes parmi les 18 souches testées. Certaines études ont révélé une importante variabilité intraspécifique dans les taux de croissance chez les souches d'*Alexandrium* tableau. 2, tels que les travaux d'Aguilera-Belmonte et *al.*, (2013), où le taux de croissance des souches *A. catenella* du sud du Chili a varié entre 0,25 J⁻¹ et 0,73 J⁻¹. Figueroa et *al.*, (2005) a également montré une variabilité importante des taux de croissance de la souche *A. Catenella* en culture (entre 0,01 J⁻¹ et 0,45 J⁻¹). Tillmann et *al.*, (2009) a mis en évidence une même variabilité des taux de croissance chez plusieurs souches d'*Alexandrium* isolés de la côte est de l'Ecosse.

Tableau 2 : Diversité des taux de croissances entre les souches d'*A.catenella* et *A.tamarensis* isolées de différentes régions du monde

Espèces	Zone d'étude	Taux de croissance J-1	Référence
<i>A.catenella</i>	Espagne	0.01- 0.45	Figuroa et <i>al.</i> , 2005
<i>A.catenella</i>	Hong Kong, chine	0.59	Xu et <i>al.</i> , 2012
<i>A.catenella</i>	La mer de l'Est, Chine	0.02-0.43	Li et <i>al.</i> , 2011
<i>A.catenella</i>	France	0.40-1.0	Laabir et <i>al.</i> , 2011
<i>A.catenella</i>	Algérie	0.05 - 0.33	Cette étude
<i>A.catenella</i>	Chili	0.25-0.73	Aguilera-Belmonte et <i>al.</i> , 2013
<i>A.tamarensis</i>	Ecosse	0.28-0.46	Tillmann et <i>al.</i> , 2009
<i>A.tamarensis</i>	Espagne	0.10 -0.76	Costas 1990
<i>A.tamarensis</i>	Espagne	0-0.17	Laurion et Roy 2009

Nous avons observé une grande variabilité de la phase de latence entre les souches. Le test ANOVA nous a permis d'identifier quatre groupes de souches qui possèdent de façon significative ($p < 0,001$) différents temps de latence (entre 4 et 20 jours). Pour d'autres souches de la même espèce dans le monde, le temps de latence variait entre 0 et 6 jours pour *A. catenella* du sud du Chili (Navarro et al., 2006). La variabilité dans la capacité des souches à s'adapter au milieu (ESAW) peut expliquer la variabilité observée dans la durée du temps de latence, les souches étant auparavant conservées dans le milieu de culture à base d'eau de mer naturelle (ESNW) depuis leur obtention à partir du sédiment et transféré par la suite au milieu ESAW. Lors de nos expériences seulement 12 souches parmi 23 testées ont survécu à se transférer, ce qui supporte l'hypothèse de la variabilité d'adaptation parmi les souches qui peut refléter une variabilité dans leurs besoins nutritionnels.

Alexandrium tamarense

Des souches d'*Alexandrium tamarense* isolées au printemps 2007 à partir d'un même bloom dans la lagune de Thau ont été cultivées sur trois milieux de culture différents : ESNW élaboré à partir d'eau de mer naturelle et les milieux artificiels ESAW, ainsi que le milieu ESAW+AH constitué d'eau de mer enrichie plus acide humique. Une grande diversité dans la capacité des souches à croître sur ces différents milieux a été constatée. Les tests statistiques ANOVA et Tukey nous ont révélé une diversité significative des taux de croissance et phases de latence parmi les souches cultivées dans chacun des milieux de cultures séparément. Parmi les 23 souches étudiées, 12 souches seulement se sont développées sur un milieu d'eau de mer artificiel ESAW. Le second milieu testé a été ESAW + AH (Acide Humique). Nous avons utilisé l'acide humique pour évaluer l'effet stimulant des substances humiques sur les 11 souches restantes des 23 qui n'ont pas pu croître sur ESAW. Uniquement 6 souches ont pu se développer sur ESAW + AH. Les cinq dernières souches parmi les onze testées ne poussent pas sur les milieux de cultures précédents mais uniquement sur ESNW. La variabilité démontrée dans la capacité des souches à se développer sur ces trois milieux de culture différents laisse clairement apparaître un degré de diversité auxotrophique relatif à la concentration de matières organiques dans le milieu de culture. *Alexandrium tamarense* est une espèce connue pour être mixotrophe (capable d'utiliser des composés organiques et inorganiques en tant que sources de carbone (Burkholder et al., 2008)). Cette variabilité dans la préférence de croissance peut être due à la diversité intraspécifique nutritionnelle qui se traduit par la présence de souches phototrophes qui sont capables de croître sur un milieu

complètement artificiel. Un deuxième groupe de souches peut nécessiter une contribution minimale de matière organique, ces souches sont celles qui poussent sur ESAW+AH. Les cinq dernières souches sont auxotrophes pour la matière organique et sont incapables de croître sur un milieu contenant uniquement une source de carbone minéral ou une seule source organique tel que l'acide humique. La complémentarité de ces trois types de fonctions nutritionnelles caractérise les exigences mixotrophiques de cette espèce. L'analyse statistique ANOVA suivie par le test de Tukey a distingué trois groupes de souches avec différentes phases de latence pour les souches cultivées dans ESAW + AH et quatre groupes de souches pour celles cultivées sur ESNW. Au cours de la phase de latence, les cellules algales tentent de s'adapter à un milieu synthétique stérile, et il est possible que seules certaines souches de *A. tamarense* sont capables d'acquérir la capacité de s'acclimater assez rapidement en milieu ESAW, donc une longue phase de latence peut masquer un événement sélectif (Lakeman et al., 2009). Lorsque les souches sont cultivées dans un nouveau milieu stérile, les conditions sont généralement différentes de celles de leur milieu de culture d'origine et souvent, ces organismes ne réussissent pas à s'acclimater rapidement ou du tout (Ferrier et al., 2002). En plus, même si l'inoculum d'algues dans le nouveau milieu de culture contient des bactéries, elles sont certainement très rares et initialement diluées. De nombreuses études ont montré que les bactéries stimulent la croissance des cultures d'algues via la régénération des nutriments inorganiques et la sécrétion de substances nutritives organiques, des cofacteurs, des vitamines, les oligosaccharides nécessaires à la croissance des algues (Ferrier et al., 2002)

Nos résultats révèlent que des grandes variations du succès reproducteur (fitness) sont présentées par divers congénères d'*A. tamarense* qui co- existent au cours des blooms. Ils affichent des variations de paramètres démographiques tels que les exigences nutritives, croissance, phase de latence. Ces traits phénotypiques sont écologiquement essentiels, car ils modulent la dynamique de la floraison, sa persistance ainsi que le renouvellement des banques de kystes. La diversité des stratégies nutritionnelles assurera la survie de l'espèce dans l'évolution constante des conditions alimentaires dans l'écosystème où la prolifération d'*Alexandrium* a lieu. Ces résultats ont montré l'existence de larges variations de la fitness intraspécifique chez les individus d'*A. tamarense*.

Références bibliographiques

- ABADIE E., AMZIL Z., BELIN C., COMPS M.A, ELZIERE-PAPAYANNI P., LASSUS P., LE BEC C., MARCAILLOU-LE BAUT C., NEZAN E., POGGI R. 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*: Episode de novembre à décembre 1998. *Ifremer*, Plouzane, France, p. 44.
- AGUILERA-BELMONTE A., INOSTROZA I., FRANCO J., RIOBO P., GOMEZ P. 2011. The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae* 12: 105-112
- AGUILERA-BELMONTE A., INOSTROZA I., SAEZ-CARRILLO K., FRANCO J.M., RIOBO P., GOMEZ P.I. 2013. The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. *Harmful Algae* 23: 55–59.
- ALPERMANN T.J., TILLMANN U., BESZTERI B., CEMBELLA A.D., JOHN U. 2010. Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 46: 18-32.
- ANDERSON D.M., ALPERMANN T.J., CEMBELLA A.D., COLLOS Y., MASSERET E., MONTRESOR M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14: 10–35.
- BALECH E. 1995. The Genus *Alexandrium* Halim (*Dinoflagellata*). Sherkin Island Marine Station, Cork, Ireland, 151 pp.
- BENAVIDES H., PRADO L., DIAZ S., CARRETO J.J. 1995. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In: Harmful Marine Algal Blooms. (Ed. by P. LASSUS, G. ARZUL, E. ERARD, P. GENTIEN, C. MARCAILLOU), pp. 113-119. Lavoisier Science Publishers, Paris.
- BRAND L.E. 1981. Genetic variability in reproduction rates in marine phytoplankton populations. *Evolution* 35: 1117–1127
- BURKHOLDER J.M, GLIBERT P.M, SKELTON H.M. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*. 8: 77-93
- COLLOS Y., BÉATRICE B., JAUZEIN C., ABADIE E., LAUGIER T., LAUTIER J., PASTOUREAUD A., SOUCHU P., VAQUER. 2009. A. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal of Sea Research* 61: 68-75.

- COLLOS Y., DOHLER G., BIERMANN I. 1992. Production of dissolved organic nitrogen during uptake of nitrate by *Synedra planctonica*: implications for estimating new production in the oceans. *Journal of Plankton Research* 14: 1025-1029
- COLLOS Y., GAGNE C., LAABIR M., VAQUER A. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology*. 40: 96-103.
- COLLOS Y., LESPILETTE M., VAQUER A., LAABIR M. & PASTOUREAUD A. 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *The African Journal of Marine Science* 28: 313-318.
- COLLOS Y., VAQUER A., LAABIR M., ABADIE E., LAUGIER T., PASTOUREAUD A. & SOUCHU P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae* 6: 781-9.
- COSTAS C.E. 1990. Genetic variability in growth rates of marine dinoflagellates. *Genetica* 83: 99-102.
- DOUCETTE G.J. 1995. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Natural Toxins* 3: 65-74.
- ERARD-LE DENN E., DESBRUYERES E., OLU K. 1993. *Alexandrium minutum*: resting cyst distribution in the sediments collected along the Brittany coast, France. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. (Ed. BY T.J. SMAYDA, Y. SHIMIZU), pp. 109-114. Elsevier, Amsterdam.
- FAUCHOT J., LEVASSEUR M., ROY S. 2005. Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Marine Ecology Progress Series* 296: 241–50
- FERRIE M., MARTIN J.L., ROONEY-VARGA J.N. 2002. Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. *Journal of Applied Microbiology* 92: 706-716
- FIGUEROA R.I., BRAVO I. & GARCE'S E. 2005. Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia* 44: 658–670.
- FOGG G.E. 1971. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology, 3rd ed. *University of Wisconsin Press*, Madison, 269 pp.
- FREHI H., COUTE A., MASCARELL G., PERRETTE-GALLET C., AYADA M., KARA M.H. 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie). *Comptes rendus biologies* 330: 615–628.
- GENOVESI B., LAABIR M., MASSERET E., COLLOS Y., VAQUER A., GRZEBYK D. 2009. Dormancy and germination patterns in resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon

(Thau, southern France). *Journal of Plankton Research*. 31: 1209-1224.

- GENOVESI B., SHIN-GRZEBYK M.S., GRZEBYK D., LAABIR M., GAGNAIRE P.A., VAQUER A., PASTOUREAUD A., LASSERRE B., COLLOS Y., BERREBI P., MASSERET E. 2011. Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the *Alexandrium tamarens* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *Journal of Plankton Research* 33: 405-414
- GUILLOU L., NEZAN E., CUEFF V., ERARD-LE-DENN E., CAMBON-BONAVITA M.A., GENTIEN P. & BARBIER G. 2002. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts. *Protist* 153: 223-238.
- HADJADJI I., MASSERET E., PLISSON B., LAABIR M., CECCHI P., COLLOS Y. 2012. Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarens*: implications for biological invasions and maintenance. *Cahiers De Biologie Marine* 53: 357-363.
- HALLEGRAEFF G.M., BOLCH C.J.S., BLACKBURN S.I., OSHIMA, Y. 1991. Species of toxigenic dinoflagellates genus *Alexandrium* in southeast Australia waters. *Botanica Marina* 34: 575-587.
- HU H., SHI Y. & CONG W. 2006. Improvement in growth and toxin production of *Alexandrium tamarens* by two-step culture method. *Journal of Applied Phycology* 18:119-126.
- JAUZEIN C., COLLOS Y., GARCES E., VILA M., MASO M. 2008. A. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *Journal of Phycology* 44 : 1136–1145.
- JAUZEIN C., LABRY C., YOUENOU A., QUERE J., DELMAS D., COLLOS Y. 2010. Growth and phosphorus uptake by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in response to phosphate limitation. *Journal of Phycology* 46: 926–936.
- KARENTZ D. 1983. Patterns of DNA synthesis and cell division in marine dinoflagellates. *Journal of Protozoology* 30: 581-588
- LAABIR M., AMZIL Z., LASSUS P., MASSERET E., TAPILATU Y., DE VARGAS R., GRZEBYK D. 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 20: 51-57.
- LAABIR M., JAUZEIN C., GENOVESI B., MASSERET E., GRZEBYK D., CECCHI P., VAQUER A., PERRIN Y., COLLOS Y. 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33: 1550-1563.

- LAABIR M., BARRÉ N., FRANCO J., BRUNET C., MASSERET E. & COLLOS Y. 2012. Morphological, biochemical and growth characteristics of *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech, a toxic dinoflagellate expanding in Mediterranean waters. *Cahiers de Biologie Marine* 53: 365-372
- LAABIR M., COLLOS Y., MASSERET E., GRZEBYK D., ABADIE E., SAVAR V., SIBAT M., AMZIL Z. 2013. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs* 11:1583-1601.
- LAKEMAN M.B., DASSOW V.P., ROSE A.C. 2009. The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae* 8: 746–758
- LEONG S.C.Y. & TAGUCHI S. 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia* 515: 215-224.
- LI T.S., YU R.C., Zhou M.J. 2011. Short-term effects of different nitrogen substrates on growth and toxin production of dinoflagellate *Alexandrium catenella* Balech (strain ACDH). *Harmful Algae* 12: 46-54.
- LILLY E.L., KULIS D.M., GENTIEN P., ANDERSON D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: Evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research* 24: 443–452.
- MACKENZIE L., DE SALAS M., ADAMSON J., BEUZENBERG V. 2004. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae* 3: 71-92.
- MARGALEF R. & ESTRADA M. 1987. Synoptic distribution of summer microplankton (Algae and Protozoa) across the principal front in the Western Mediterranean. *Investigacion Pesquera*. 51: 121–140.
- MASSERET E., ENQUEBECQ M., LAABIR M., GENOVESI B., VAQUER A., AVARRE JC. 2010. A simple and innovative method for species identification of phytoplankton cells on minute quantities of DNA. *Environmental Microbiology Reports*. 2: 715-719.
- MASSERET E., GRZEBYK D., NAGAI S., GENOVESI B., LASSERRE B., LAABIR M., COLLOS Y., VAQUER A. & BERREBI P. 2009. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers. *Applied and environmental microbiology* 75: 2037-2045.
- NAVARRO J.M., MUNˆOZ M. G. & CONTRERAS, A. M. 2006 Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5: 762–769.

- PENNA A., GARCE'S E., VILA M., GIACOBBE M.G., FRAG S., LUGLIE A., BRAVO I., BERTOZZINI E., VERNESI C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Marine Biology* 148: 13-23.
- PENNA A. & GALLUZZI L. 2008. PCR techniques as diagnostic tools for the identification and enumeration of toxic marine phytoplankton species. In : *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. (Ed. by V. EVANGELISTA, L. BARSANTI, A.M FRASSANITO, V. PASSARELLI, P. GUALTIERI), pp. 261-283. NATO Book, Springer, Netherlands..
- PRAKASH A., RASHID M.A. 1968. Influence of humic substances on growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limonol. Oceanogr.* 13: 598-606
- SCHOLIN C.A., ANDERSON D.M. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU rDNA genes. *Journal of Phycology* 30: 744-754.
- SCHOLIN C.A., ANDERSON D.M. 1996. LSU rDNA-based RFLP Assays for discriminating species and strains of *Alexandrium* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 32 : 1022-1035.
- SEKIGUCHI K., INOBUCHI N., KIKUCHI T., KAGA Y., SATO M., SATO K., SATO S., OGATA T., KODAMA M. 1996. Comparison of bloom patterns of *Alexandrium tamarense* between two bays in Iwate prefecture, northern Japan, in association with the toxicity of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. In: *Harmful and toxic algal blooms* (Ed. By T. YASUMOTO, Y. OSHIMA, Y. FUKUYO), pp 223-226. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- SIU G., YOUNG M., CHAN D.K.O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352: 117-140.
- SOUCHU P., GASC A., COLLOS Y., VAQUER A., TOURNIER H., BIBENT B. & DESLOUS-PAOLI J. M. 1998. Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Marine Ecology-Progress Series* 164 : 135-146.
- SOUCHU P., BEC B., SMITH V. H., LAUGIER T., FIANDRINO A., BENAÛ L., ORSONI V. & VAQUER A. 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67(4): 743-753.
- THORESEN S.S., DORTCH Q., AHMED S.I., 1982. Comparisons of methods for extracting intracellular pools of inorganic nitrogen from marine phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 4: 495-704.
- TILLMANN U., ALPERMANN T.L., DA PURIFICAÇÃO R.C., KROCK B. & CEMBELLA A. 2009. Intra-population clonal variability in allelochemical potency of toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 8: 759-769.

- TOUZET N., FRANCO J.M., RAINER., 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7: 782-797.
- URIBE P., ESPEJO R.T., 2003. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 659–662.
- VARELA D., PAREDES J., ALVES-DE-SOUZA C., SEGUEL M., SFEIR A., FRANGOPULOS M. 2012. Intraregional variation among *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) strains from southern Chile: Morphological, toxicological and genetic diversity. *Harmful Algae* 15: 8-18.
- VILA M., GARCES E., MASO M., CAMP J., 2001 Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Marine Ecology Progress Series* 222: 73-83.
- WANG D.Z., HSIEH D.P.H. 2005. Dynamics of C2 toxin and chlorophyll a formation in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* during large scale cultivation. *Toxicon* 39: 1533–1536.
- WANG D.Z., ZHANG S.G., GU H.F., CHAN L.L., HONG H.S. 2006. Paralytic shellfish toxin profiles and toxin variability of the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) isolated from the Southeast China Sea. *Toxicon*, 48: 138–151.
- XU J., HO A.Y.T., HE L., YIN K., HUNG C., CHOI N., LAM P.K.S., WUD R., ANDERSON, D.M., HARRISON P. 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16: 89-97

Chapitre 7

Conclusions et perspectives

Le mot de la fin

Jusqu'aux années 1970, les espèces appartenant au complexe *A. tamarense* étaient connues seulement en l'Europe, en Amérique du Nord et au Japon (Hallegraeff 1993). Au cours des années 2000, ces espèces avaient déjà été documentées dans les hémisphères Nord et Sud, ajoutant l'Amérique du Sud, l'Afrique du Sud, l'Australie, les îles du Pacifique, l'Inde, toute l'Asie et la Méditerranée à l'aire de répartition connue (Hallegraeff 1993, Abadie et al., 1999, Vila et al., 2001). Parallèlement à cette expansion biogéographique importante, la fréquence des efflorescences toxiques d'*Alexandrium* et les événements de PSP ont également fortement augmenté (Anderson 1989, Hallegraeff 1993, Glibert et al., 2005). Depuis les années 1980, on constate une augmentation de la fréquence et de l'intensité des proliférations d'algues toxiques en Méditerranée. Ces événements sont caractérisés par la prolifération de divers dinoflagellés, en particulier du genre *Alexandrium*, comprenant diverses espèces toxiques et non toxiques (Garcés et al., 2000, Vila et al, 2001, Penna et al., 2005).

Notre étude nous permet de constater la capacité d'adaptation élevée des souches d'*Alexandrium catenella*. En effet, cette espèce est capable de provoquer des efflorescences importantes et récurrentes dans deux écosystèmes avec des profils trophiques distincts et des conditions environnementales différentes. Notre travail a démontré que malgré les différentes caractéristiques biologiques chimiques et physiques entre les deux sites d'études, les souches d'*A. catenella* des deux rives de la Méditerranée sont très proches de point de vue morphologique, toxinique et génétique. Nos analyses révèlent qu'*A. catenella* d'Annaba appartient au groupe IV du clade Asie tempérée. Elle rejoint donc les autres *A. catenella* de la Méditerranée qui appartiennent à ce même groupe (Penna et al., 2005).

Les travaux de Lilly et al (2002) et Penna et al (2005) ont proposé des hypothèses d'introduction de ce dinoflagellé en Méditerranée. Parmi ces hypothèses figurent l'inoculation des eaux par des mollusques contaminés ou encore via le transport des eaux de ballasts d'une région contaminée vers une autre. *A. catenella* a en effet été détectée dans des zones aquacoles et conchylicoles tel que le port de Valencia (Penna et al., 2005) ou la lagune de Thau. Cependant il n'existe pas d'activité aquacole dans la baie d'Annaba, ce qui rend l'hypothèse de l'introduction de cette espèce de l'Asie vers la Méditerranée via le transport des eaux de ballast plus probable. De plus, il apparaît que la plupart des blooms

d'*Alexandrium catenella* en Méditerranée sont localisés dans les ports : Barcelone, Tarragone, Valencia et Olbia (Penna et al., 2005) ou proches d'un port telle que la situation à Thau (Lilly et al., 2002) et à la station 2 de la baie d'Annaba. Les eaux de ballast sont connues pour transporter des kystes viables d'espèces de phytoplancton (Hallegraeff 1998). D'après l'entreprise portuaire d'Annaba, des échanges commerciaux ont lieu entre le port d'Annaba et le port Valence où *A. catenella* a été détectée pour la première fois en 1994 (Penna et al., 2005) ; il existe donc une possibilité que la contamination c'est réalisé a travers le transfert des eaux de ballast entre ces deux localités

Si l'ensemencement s'est produit de cette manière, quelles sont les raisons qui ont permis l'apparition et l'établissement des blooms d'*A. catenella/tamarense* à Thau et à Annaba ?

D'après les résultats des suivis de terrain dans la baie d'Annaba, et à partir des données de l'Ifremer sur la lagune de Thau, il y a peu d'espèces phytoplanctoniques en commun entre les deux sites à part *Alexandrium catenella* qui s'avère être la seule espèce toxique qui provoque des blooms récurrents dans les deux sites. Les paramètres physicochimiques sont différents entre les deux écosystèmes, cependant le principal paramètre environnemental en commun corrélé à l'émergence d'*A. catenella* est la diminution importante des concentrations en phosphore réactif dissous entre les sites aux cours de ces dernières décennies. Cette particularité peut procurer un avantage compétitif pour *A. catenella*. De plus des études ont révélé que les niveaux de toxicité augmentent chez cette espèce lorsque les concentrations en phosphore sont très faibles (Siu et al., 1997)

Un autre point qui peut favoriser le développement des souches d'*A. catenella* de la baie d'Annaba est la présence de concentrations très élevées d'ammonium, qui est la source d'azote préférentielle d'*A. catenella* (Jauzein et al., 2008 ; Collos et al., 2007). Les valeurs d' NH_4 de la baie d'Annaba sont connues pour être optimales pour le développement de cette espèce (Siu et al., 1997). Les analyses statistiques ont révélé une corrélation négative significative entre les concentrations d'ammonium et celle d'*A. catenella* dans la baie, ce qui signifie qu'il y a probablement consommation de cet élément par *A. catenella*.

Un dernier point très important qui explique certainement le succès des blooms et la pérennité des efflorescences d'*A. catenella/tamarense* à Thau et à Annaba est la grande variabilité intra spécifique observée entre les souches des deux espèces à différents niveaux nutritionnels, toxiques, physiologiques.

La variation intraspécifique peut être parfois plus prononcée que la variation interspécifique. La littérature scientifique actuelle considère que les études sur les interactions écologiques entre les populations sont discutables quand elles sont basées sur une ou peu de souches. La variabilité intraspécifique est très répandue chez les algues unicellulaires, et probablement est d'une importance fondamentale pour la survie de l'espèce et de l'évolution (Burkholder et al .2009). Tillmann et al (2009) ont souligné l'importance écologique potentielle de la plasticité des réponses d'*A. tamarense* aux changement des conditions environnementales, et soulignent que : « Les dinoflagellés haploïdes doivent présenter des phénotypes pour la sélection et le test de succès reproducteur sans l'atténuation du risque potentiel de mutation récessive ».

Le maintien de l'existence de génotypes différents au sein d'une population est ainsi très important pour la survie de l'espèce puisque avec des besoins nutritionnels différents, une croissance différente ou une toxicité plus au moins importante, les conditions permettront toujours que certains phénotypes survivent à ces pressions de sélections et assurent la survie d'*Alexandrium*, la pérennité des blooms et sa propagation dans différents écosystèmes.

Résumé

Parmi les genres responsables des efflorescences algales nuisibles, le genre *Alexandrium* est certainement l'un des plus importants en termes de diversité, de distribution et d'importance d'impacts. Lors de cette thèse nous avons essayé de comprendre les causes d'introduction et les facteurs favorisant l'établissement et la récurrence des blooms d'*Alexandrium catenella/tamarensis* à travers la comparaison des efflorescences de ce complexe sur deux sites contrastés au niveau trophique : la lagune de Thau en France et la baie d'Annaba en Algérie. Afin de mieux comprendre les déterminismes environnementaux favorisant ce phénomène, une étude comparative a été réalisée à partir des données recueillies sur le terrain durant un suivi bi mensuel *in situ* au cours de l'année 2010-2011 et sur les données disponibles dans la littérature. La comparaison des paramètres physicochimiques entre les deux sites d'études indique que sur une période de 18 ans, le changement commun majeur qui coïncide avec l'apparition d'*Alexandrium catenella* est la forte diminution des concentrations en phosphore réactif dissous, ce qui peut induire une limitation de croissance des autres organismes et favoriser ainsi le développement de cette espèce. Au cours de ce travail nous avons développé un protocole d'établissement de cultures monoclonales à partir du sédiment, grâce au quel nous avons obtenu pour la première fois une trentaine de souches d'*Alexandrium* de la baie d'Annaba. Les analyses morphologiques et le ribotypage effectués sur ces souches ont révélé qu'il s'agit d'*Alexandrium catenella* du groupe IV (clade Asie tempérée). L'analyse toxinique a révélé que les concentrations et la composition en toxine de ces souches sont assez proches de celle d'*A. catenella* de Thau. Lors de cette thèse nous sommes également intéressés au rôle que peut jouer la diversité intraspécifique dans la dynamique des efflorescences au sein du complexe d'*Alexandrium catenella/tamarensis*. Des comparaisons des taux de croissance, de phases de latence, des capacités de croissance sur différents milieux de culture sur plusieurs souches d'*Alexandrium tamarensis* de Thau ont révélé une grande diversité intraspécifique des paramètres testés. Le profil toxinique et la croissance de nombreuses souches d'*Alexandrium catenella* de la baie d'Annaba ont révélé également une variabilité considérable. Les résultats de notre étude laissent supposer que la diversité intraspécifique joue un rôle fondamental avec certaines conditions environnementales dans la survie aux pressions de sélections et assurent la pérennité des blooms d'*Alexandrium* et leur propagation dans différents écosystèmes.

Mots clés: diversité, écophysiologie, génétique, efflorescences toxiques, *Alexandrium*

Abstract

Among the genera responsible for harmful algal blooms, the genus *Alexandrium* is certainly one of the most important in terms of diversity, distribution and significance of impacts. In this thesis we tried to understand the introduction and factors favoring the establishment and recurrence of *Alexandrium catenella* / *tamarense* blooms by comparing these events in two contrasting trophic sites : Thau lagoon in France and the Bay of Annaba in Algeria. To better understand the environmental determinism promoting this phenomenon, a comparative study was conducted using data collected in the field during a monthly parallel monitoring during the 2010-2011 year and the data available in the literature. Comparison of physicochemical parameters between the two study sites indicates that over a period of 18 years, the major common change that coincides with the appearance of *Alexandrium catenella* is the sharp decrease in concentrations of dissolved reactive phosphorus, which can limit growth of other organisms and thus promote the development of this species. In this work we developed a protocol for the establishment of monoclonal cultures from sediments by which we got for the first time thirty *Alexandrium* strains from Annaba bay. Morphological analysis and ribotyping performed on these strains showed that it is *Alexandrium catenella* group IV (temperate Asia clade). The analysis revealed that toxin concentrations and toxin composition of these strains are quite similar to that of *A. catenella* from Thau. In this thesis we also looked at the role that intraspecific diversity can play in the dynamics of blooms within the complex *Alexandrium catenella* / *tamarense*. Comparisons of growth rates, lag phases, capacity for growth on different culture media investigated among several strains of *Alexandrium tamarense* of Thau, revealed a high intraspecific diversity of parameters tested. The toxin profile and the growth of many strains of *Alexandrium catenella* from Annaba bay also showed considerable variability. The results of our study suggest that intraspecific diversity plays a key role along with certain environmental conditions for the survival against selection pressures and allows the sustainability of *Alexandrium* blooms and their propagation within different ecosystems.

Key words: diversity, ecophysiology, toxic blooms, *Alexandrium*