

Les Efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum*
au large de la Loire et de la Vilaine : Déterminisme et conséquences sur la
qualité des masses d'eau côtières

Projet EPICE – Rapport final

RST/LER/MPL/21.10



Photographie aérienne d'une eau colorée vertes le 11 juillet 2018 à la Pointe du Bile. Auteur : CEVA¹.

Auteurs : Schapira M.¹, Roux P.¹, André C.², Mertens K.N.², Bilien G.², Terre-Terrillon A.², Le Gac-Abernot C.², Siano R.³, Quéré J.³, Bizzozero L.¹, Bonneau, F. Bouget, J-F.¹, Cochenec-Laureau N.¹, Collin K.¹, Fortune M.¹, Gabellec R.¹, Le Merrer Y.¹, Manach S.¹, Pierre-Duplessix O.¹, Retho M.¹, Schmitt A.¹, Souchu P.¹, Stachowski-Haberkorn S.^{4,5}

¹Ifremer, ODE- UL-LER-MPL

&

²Ifremer, ODE-UL-LER-BO

³Ifremer, ODE-DYNECO-Pelagos

⁴Ifremer, RBE-BE-LEX

⁵Ifremer, RBE-BRM-LPBA

¹ CEVA : Centre d'Etude et de Valorisation des Algues

SOMMAIRE

1. PROBLEMATIQUE	1
2. OBJECTIFS	4
3. ACTION 1	5
<u>3.1. Objectifs</u>	5
<u>3.2. Mise en œuvre</u>	5
<u>3.3. Résultats</u>	5
<u>3.4. Conclusion et perspectives</u>	7
4. ACTION 2	8
<u>4.1. Objectifs</u>	8
<u>4.2. Mise en œuvre et résultats</u>	8
4.2.1. Etablissement de la signature cytométrique de <i>L. chlorophorum</i> à partir de cultures mono-spécifiques	9
4.2.2. Recherche de la signature cytométrique de <i>L. chlorophorum</i> au sein d'assemblages phytoplanctoniques naturels	12
<u>4.3. Conclusion et perspectives</u>	23
5. ACTION 3	24
<u>5.1. Objectifs</u>	24
<u>5.2. Echantillonnage</u>	24
<u>5.3. Caractérisation du sédiment</u>	25
5.3.1. Dosage de la chlorophylle <i>a</i> et des phéopigments dans le sédiment	25
5.3.2. Dosage de l'azote et du carbone organique dans le sédiment	26
<u>5.4. Recherche de kystes de <i>L. chlorophorum</i> dans le sédiment brut</u>	27
5.4.1. Extraction de l'ADN	28
5.4.2. Extraction de l'ADN intracellulaire	28
5.4.3. Extraction de l'ADN total	28
<u>5.5. Analyses PCR sur les extractions d'ADN intracellulaire et total</u>	28
5.5.1. Elaboration des amorces spécifiques de <i>L. chlorophorum</i>	29
5.5.2. Tests de spécificité des amorces spécifiques	29
5.5.3. Test de la sensibilité des amorces spécifiques	30
<u>5.6. Recherche de kystes de <i>L. chlorophorum</i> extraits du sédiment par la méthode de Bolch</u>	31
5.6.1. Observations morphologiques	31
5.6.2. Germination des kystes	32
<u>5.7. Kystes analysés en cellule unique en PCR</u>	33
<u>5.8. Recherche de kystes de <i>L. chlorophorum</i> à partir d'un mélange de cultures <i>in vitro</i> et de la culture monoclonale KL1C4</u>	33
<u>5.9. Conclusions et perspectives</u>	35
6. REFERENCES	37
ANNEXES	40

1. PROBLEMATIQUE

Les activités anthropiques sont à l'origine de pollutions en azote (N) et en phosphore (P) dans les écosystèmes aquatiques (Nixon 1995). Dans ce contexte, les écosystèmes côtiers peuvent être soumis à des phénomènes d'eutrophisation (e.g. Cloern 2001 ; de Jonge *et al.*, 2002). Parmi les effets directs majeurs de l'eutrophisation, des changements quantitatifs et qualitatifs sont observés au sein des communautés phytoplanctoniques (Smith *et al.*, 2006 ; Díaz *et al.*, 2012 ; Suikkanen *et al.*, 2013). En particulier, une intensification des efflorescences d'espèces toxiques ou nuisibles a été observée depuis plusieurs années et la multiplication de ces épisodes a été associée aux phénomènes d'eutrophisation (e.g. Paerl 1988 ; Heisler *et al.*, 2008). Les pertes économiques liées à ces efflorescences toxiques et/ou nuisibles ont été évaluées à plusieurs millions d'euros, entre 1989 et 1998, soulignant l'importance socio-économique de tels phénomènes notamment en Europe (Stolte *et al.*, 2001). Une meilleure compréhension de la phénologie et des conséquences de ces efflorescences nuisibles sur le fonctionnement de l'écosystème est donc nécessaire pour engager une réflexion sur les programmes de restauration à mettre en œuvre.

Le secteur côtier situé sous l'influence de la Loire et de la Vilaine constitue la zone littorale la plus vulnérable de la côte Atlantique vis-à-vis de l'eutrophisation. En effet, si aucune crise anoxique majeure n'a été observée depuis 1982 (Maggi *et al.*, 1982 ; Merceron, 1987 ; Chapelle *et al.*, 1994), les résultats des programmes de surveillance de la DCE² ont classé les masses d'eau de la Baie de Vilaine et la zone au large de l'estuaire de la Loire, en état « moyen » pour le paramètre phytoplancton (Bizzozero, 2017). Ces observations confirment que l'eutrophisation reste un phénomène important sur cette zone et mettent ainsi en exergue la fragilité structurelle de ce secteur vis-à-vis des apports excessifs en éléments nutritifs. Par ailleurs, Souchu *et al.* (2018) dans le cadre du projet DIETE ont mis en évidence une multiplication et une intensification des phénomènes d'eaux colorées, sur ce secteur, au cours des quarante dernières années.

Plusieurs types d'eaux colorées ont été recensés, parmi lesquels les eaux vertes liées à la prolifération massive d'un dinoflagellé, *Lepidodinium chlorophorum* (figure 1). Depuis les premières observations en 1982, plus des deux tiers des eaux colorées recensées sur la zone sont des eaux vertes à *L. chlorophorum*, et depuis 2007, de tels épisodes sont recensés pratiquement chaque année le long du littoral (Souchu *et al.*, 2018 ; Siano *et al.*, 2020).



Figure 1 : Photo aérienne d'un bloom de *L. chlorophorum* à Préfailles, le 01/08/2014 (auteur : Yves le Medec – Minyvel Environnement).

² DCE : Directive Cadre sur l'Eau

Bien que cette espèce ne soit pas toxique, ces proliférations massives, et aujourd'hui récurrentes, sont néanmoins susceptibles d'impacter durablement le fonctionnement de l'écosystème et sont incompatibles avec l'atteinte et le maintien du bon état écologique des masses d'eau côtière sur ce secteur. En effet, les efflorescences de *L. chlorophorum* se caractérisent par de très fortes biomasses (Iriarte *et al.*, 2005 ; Sourrisseau *et al.*, 2016). A ce titre, *L. chlorophorum* est une des deux seules espèces de dinoflagellés ayant atteint des abondances très élevées (i.e. $>10^6$ cellule/L) au cours de ces vingt dernières années sur le littoral français (d'après les données des réseaux de surveillance REPHY³/DCE ; Sourrisseau *et al.*, 2016). En outre, la grande majorité des eaux vertes recensées au large de la Loire et de la Vilaine, et pour lesquelles il existe des données quantitatives, présente des abondances supérieures au seuil de l'indicateur DCE de bloom pour les petites cellules (i.e. 250 000 cellules/L ; figure 2), pouvant conduire à un déclassement des masses d'eau.

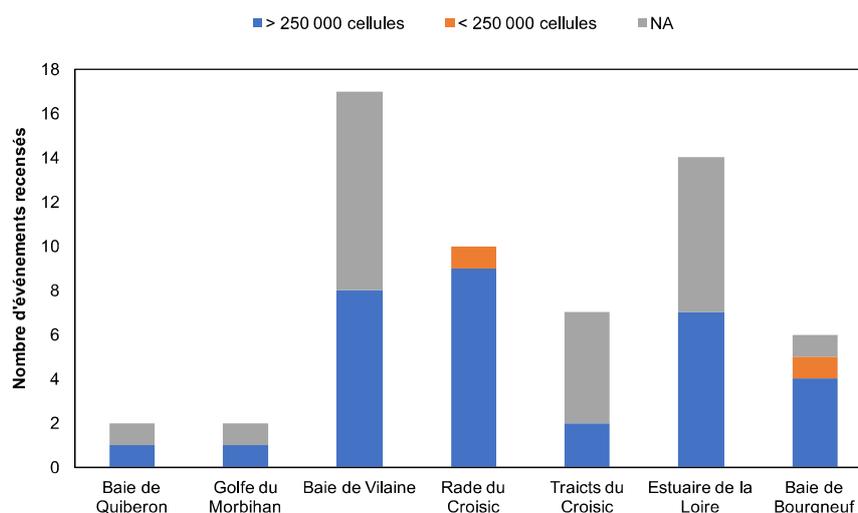


Figure 2 : Nombre d'événements d'eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* répertoriés sur les différentes zones de la côte au large de la Loire et de la Vilaine entre 1982 et 2014 d'après les données acquises dans le projet DIETE (Souchu *et al.*, 2018). En gris, sont représentés les événements pour lesquels il n'existe pas de données quantitatives (« NA ») ; en bleu les événements avec plus de 250 000 cellules/L (« > 250 000 cellules ») ; en orange, les événements avec moins de 250 000 cellules/L (« < 250 000 cellules »). Le seuil de 250 000 cellules/L correspond à l'abondance minimale à partir de laquelle l'efflorescence est considérée comme un « bloom » dans le cadre de l'indicateurs « phytoplancton » de la DCE.

Par ailleurs, les efflorescences de *L. chlorophorum* ont été associées à des **épisodes hypoxiques** plus ou moins marqués, ayant conduit dans les cas les plus extrêmes, à des mortalités importantes d'organismes marins sur le secteur (Sournia, 1992 ; Merceron, 1987) (figure 3).



Figure 3 : Poissons échoués sur les plages de la Turballe en juillet 2014.

³ REPHY : REseau d'observation et de surveillance du PHYtoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales.

Les processus de reminéralisation des fortes biomasses produites lors de ces blooms seraient à l'origine de la chute drastique des concentrations en oxygène sur la couche de fond. Si les cellules phytoplanctoniques elles-mêmes constituent une part importante de la matière organique, le matériel extracellulaire excrété par les cellules de *L. chlorophorum* pourrait également contribuer de manière significative à la quantité de matière organique présente en fin de bloom. *L. chlorophorum* compte en effet parmi les espèces connues pour produire de grande quantité d'exo-polymères en culture sous forme de TEP⁴ (Claquin *et al.*, 2008) (figure 4). Ces exo-polymères pourraient contribuer à accroître la quantité de matière organique produite lors d'un bloom, et ainsi accentuer les déplétions en oxygène à l'interface eau-sédiment.

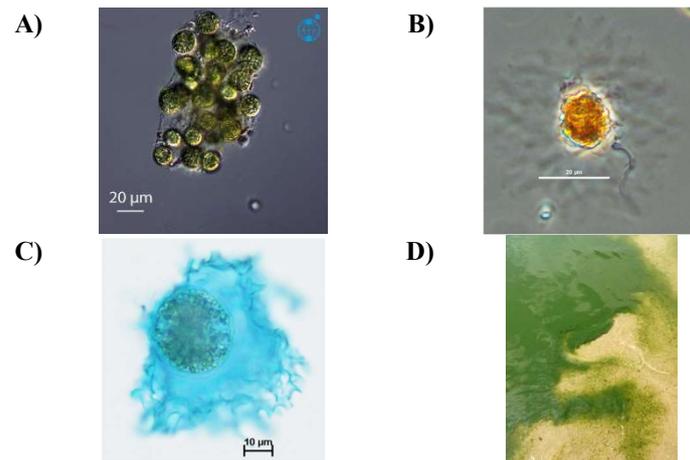


Figure 4 : Cellules de *Lepidodinium chlorophorum* ((Elbrächter et Schnepf) Gert Hansen, L. Bates and M. Salas, 2007) (A, B et C) et conséquences des proliférations massives de cette espèce sur l'estran au large de la Loire (D). A) Amas de cellule de *L. chlorophorum* (Source : <http://planktonnet>). B) Cellule de *L. chlorophorum* dans un échantillon de la Baie de Vilaine (auteur : S. Manach, Ifremer, LER/MPL), C) Cellule de *L. chlorophorum* entourée d'exo-polymères colorés au bleu Alcian (Claquin *et al.*, 2008). D) Dépôt de matière organique sur l'estran suite à une efflorescence de *L. chlorophorum*. Photo prise le 17/07/2014 sur la plage de la Turballe (auteur : Ludovic Noisette).

Si la production excessive de matière organique est prise en compte dans l'évaluation des conséquences de l'eutrophisation, le rôle des exo-polymères et des TEP au sein de ce pool de matière organique reste à approfondir (Ramaiah et Furuya, 2002). De la même manière, bien que l'intensification de la formation de « mousse marine » soit reconnue comme un effet indirect de l'eutrophisation, les conséquences de ces phénomènes sur les écosystèmes sont encore mal comprises (figure 5).

L'ensemble de ces considérations met en exergue les risques potentiels de l'intensification et de la multiplication de ces épisodes sous l'effet conjoint de la pression anthropique croissante et du changement climatique, pour l'atteinte et le maintien du bon état écologique des masses d'eau côtières situées au large de la Loire et de la Vilaine. Cependant, malgré la récurrence de ces épisodes et leur potentielle intensification dans le futur, nos connaissances relatives à l'écologie de *L. chlorophorum*, à la phénologie et au déterminisme de ces efflorescences sont à ce jour limitées (Sourisseau *et al.*, 2016).

En conséquence, il apparaît donc aujourd'hui indispensable d'une part de mieux évaluer les risques liés aux épisodes d'eaux colorées vertes au large de la Loire et de la Vilaine, et d'autre part d'améliorer nos connaissances sur la dynamique de ces efflorescences.

⁴ TEP : Transparent Exo-polymeric Particles

Ces éléments d'expertise sont primordiaux pour l'élaboration d'outils opérationnels (e.g. modèles numériques de croissance de *L. chlorophorum*) et permettraient par ailleurs de compléter l'évaluation de la qualité des masses d'eau côtières sur ce secteur. C'est dans ce cadre que s'inscrit le projet EPICE.

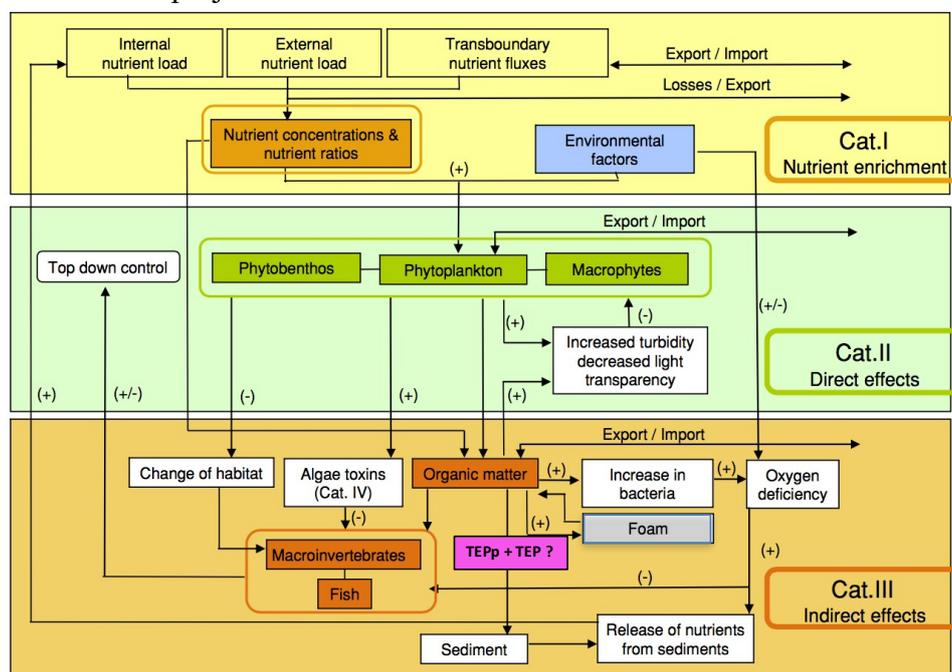


Figure 5 : Interactions entre les différents processus de l'eutrophisation d'après Claussen *et al.*, 2009. « Cat. » : catégories de processus ; « + » : intensification du processus ; « - » : limitation du processus. En rose ont été ajoutés les TEP et leurs précurseurs (TEPp) en tant que constituant du pool de matière organique. La mousse marine (« foam ») présente sur la figure originale de Claussen *et al.* (2009) a été identifiée en gris sur cette représentation.

2. OBJECTIFS

Ce projet, organisé en trois actions, avait pour objectif de mieux évaluer les risques d'eaux colorées vertes se produisant sur le secteur côtier situé au large de la Loire et de la Vilaine, en termes (i) de fréquence de ces épisodes, (ii) d'abondance et (iii) de localisation des zones à risque.

Action 1 : Amélioration du recensement des eaux vertes à *L. chlorophorum*

Action 2 : Optimisation de l'estimation des abondances de *L. chlorophorum*

Action 3 : Identification des zones à risque au large de la Loire et de la Vilaine.

Le calendrier du déroulement du projet, est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Calendrier de déroulement du projet EPICE. Un étudiant en Master 2, financé par Ifremer a été recruté en 2019 (janvier à juin) pour travailler sur l'action 3 du projet (flèche bleue).

PROJET EPICE – Phase 1	2018				2019			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Action 1 : Amélioration du recensement des eaux colorées vertes								
Action 2 : Optimisation de l'estimation des abondances de <i>L. chlorophorum</i>								
- Signature cytométrique de <i>L. chlorophorum</i> - cultures								
- Tests sur assemblages naturels - échantillonnage								
Action 3 : Identification des zones à risque								
- Echantillonnage								
- Analyses et interprétations des résultats								

3. ACTION 1

3.1. Objectifs

Un meilleur recensement des épisodes d'eaux colorées vertes au large de la Loire et de la Vilaine est aujourd'hui indispensable. En effet, ces épisodes peuvent être de courte durée et peuvent toucher une zone géographiquement restreinte. La stratégie d'échantillonnage sur des points fixes telle que celle appliquée dans le cadre des réseaux d'observation REPHY/DCE, n'est pas adaptée au recensement de l'ensemble de ces événements. La mise en place d'une stratégie d'observation complémentaire et différente de celle du RePHY, telle que celle mise en place dans le cadre du projet de sciences participatives Phenomer⁵, peut en partie répondre à cette problématique locale, comme l'a montré une étude récente portant sur les résultats acquis dans le cadre de ce projet (Siano *et al.*, 2020).

La multiplication du nombre de déclarations des eaux colorées vertes au large de la Loire et de la Vilaine est indispensable à l'amélioration de nos connaissances relatives à la fréquence (échelles saisonnière et interannuelle) et l'ampleur spatiale de ces épisodes. Ces éléments sont essentiels pour engager une réflexion sur les mesures de restauration à mettre en œuvre sur cette zone.

L'objectif l'ACTION 1 était donc de sensibiliser et mobiliser les usagers du littoral et le grand public, et de les inciter à déclarer leurs observations d'eau colorées, et en particulier les eaux colorées vertes.

3.2. Mise en œuvre

Cette action a été menée en étroite collaboration avec le projet Phenomer et les comités régionaux de la conchyliculture (CRCs) de Bretagne Sud.

Un effort de communication auprès des professionnels et des différents acteurs du littoral a été initié en 2018, afin de faire connaître le projet EPICE et ainsi les inciter à déclarer le plus tôt possible auprès de Phenomer l'observation d'une eau colorée.

Dans ce cadre, deux réunions d'information et de présentation de la problématique liée aux efflorescences de *L. chlorophorum* se sont tenues au CRC Bretagne sud (juillet 2018) et à la communauté d'agglomération de la presqu'île de Guérande (Cap Atlantique ; octobre 2018).

Des dépliants et affiches Phenomer ont également été déposés dans différentes structures sur le littoral (i.e. cales de mises à l'eau, zones portuaires, offices de tourisme...).

3.3. Résultats

En 2018, 22 observations d'eaux colorées ont été recensées via le projet Phenomer au cours du printemps et de l'été sur la zone Bretagne sud (figure 6A). Sur ces 22 observations, 11 concernaient des eaux colorées vertes (figure 6B).

Ces eaux colorées vertes ont été observées entre le 11 juillet et le 8 août 2018 sur différentes zones du littoral. Ces résultats montrent que les eaux colorées vertes peuvent être présentes pendant plus d'un mois sur différentes zones de la Baie de Vilaine, mais aussi sur la frange côtière proche de l'estuaire de la Loire. Des épisodes d'eaux colorées vertes ont également été recensés au début du mois d'août au sud de la Rochelle.

⁵ <https://www.phenomer.org>

A)

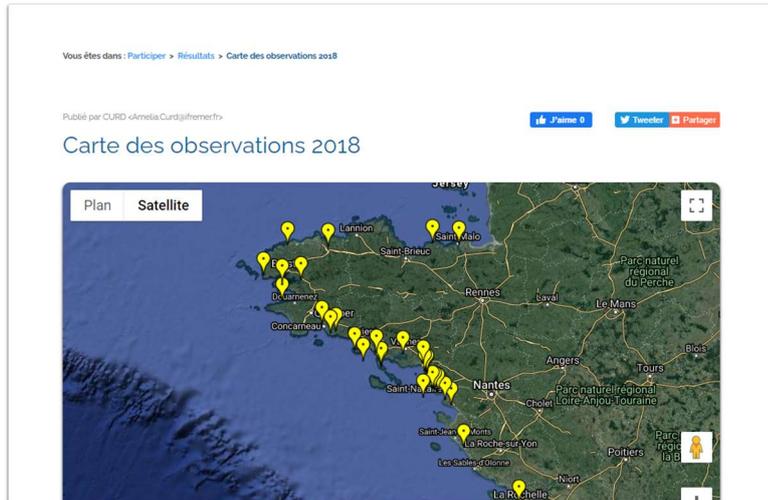


Mieux connaître le phytoplancton grâce à vos observations



Phenomer • Participer • Les scolaires et Phenomer • Mieux connaître les microalgues • Actualités

- Devenez structure-relais Phenomer!
- Je communique mon observation
- Marche à suivre
- Résultats
- Carte des observations 2020
 - Carte des observations 2019
 - Carte des observations 2018
 - Carte des observations 2017
 - Carte des observations 2016
 - Carte des observations 2015
 - Carte des observations 2014
 - Carte des observations 2013
 - Juillet 2019 - Eaux brunes à Plérin
 - Juin 2018 - Eaux rouges à Oubéron
 - Avril 2017 - Eaux colorées observées au large de la Loire et de la Vilaine
 - Juillet 2016 - Eaux vertes observées sur le littoral du Morbihan
 - Mars 2015 - Eaux brunes observées dans le Mor-Braz
 - Juillet 2013 - Eaux rouges (Morbihan et Loire Atlantique)
 - Août 2013 - Eaux brunes et mortalité de faune marine (baie de Vilaine)



B)

2018/participer/resultats/Carte-des-observations-2018

YouTube Maps

Phenomer • Participer • Les scolaires et Phenomer • Mieux connaître les microalgues • Actualités

- Devenez structure-relais Phenomer!
- Je communique mon observation
- Marche à suivre
- Résultats
- Carte des observations 2020
 - Carte des observations 2019
 - Carte des observations 2018
 - Carte des observations 2017
 - Carte des observations 2016
 - Carte des observations 2015
 - Carte des observations 2014
 - Carte des observations 2013
 - Juillet 2019 - Eaux brunes à Plérin
 - Juin 2018 - Eaux rouges à Oubéron
 - Avril 2017 - Eaux colorées observées au large de la Loire et de la Vilaine
 - Juillet 2016 - Eaux vertes observées sur le littoral du Morbihan
 - Mars 2015 - Eaux brunes observées dans le Mor-Braz
 - Juillet 2013 - Eaux rouges (Morbihan et Loire Atlantique)
 - Août 2013 - Eaux brunes et mortalité de faune marine (baie de Vilaine)
- Vos photos de blooms

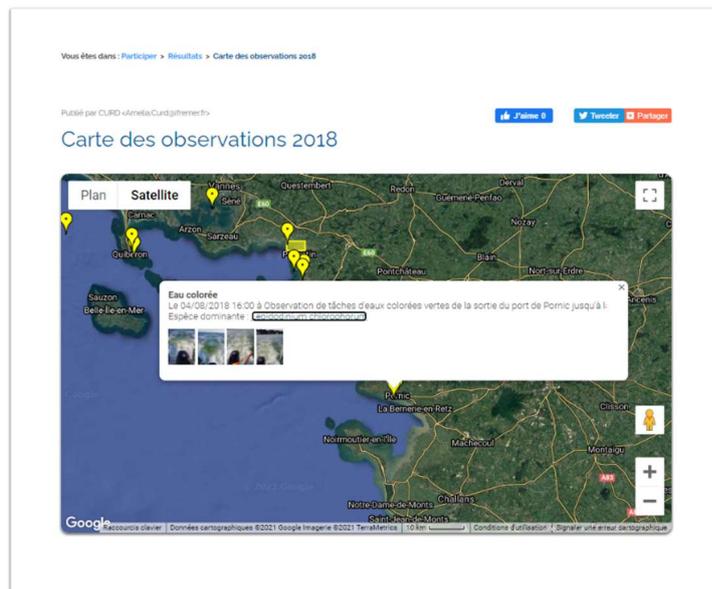


Figure 6 : Carte des observations d’eaux colorées au cours de l’année 2018 recensées par Phenomer. A) Sur l’ensemble de la zone couverte par le projet. B) Zoom sur la zone d’étude du projet EPICE.

Les dates d’observations d’eaux colorées vertes et leurs localisations sont listées dans le tableau 2. En effet, lors de l’enregistrement de leur observation sur le site Phenomer, les observateurs sont invités à renseigner un onglet visant à identifier comment ils avaient eu connaissance de ce projet de sciences participatives. Sur les 11 observations d’eaux colorées vertes, 5 sont en lien avec le déploiement d’affiches de support de communication Phenomer sur différentes structures du littoral réalisé dans le cadre du projet EPICE.

Tableau 2 : Dates et lieux de recensement des eaux colorées vertes en 2018 déclarées sur Phenomer. En vert, les recensements réalisés suite aux actions de communication menées dans le cadre du projet EPICE (source : questionnaire Phenomer).

Date	Lieu	Zone littoral
11/07/2018	Pointe du Bile	Baie de Vilaine
23/07/2018	Bôle de Merquel, Mesquer	Baie de Vilaine
25/07/2018	Pointe de Pen Bé	Baie de Vilaine
31/07/2018	Plage de Pornichet	Baie de la Baule
31/07/2018	Plage de Sainte Marguerite	Baie de la Baule
03/08/2018	Port de la Rochelle	Pertuis Breton
03/08/2018	Port de Pornic	Baie de Bourgneuf
04/08/2018	Port de Pornic	Baie de Bourgneuf
05/08/2018	Plage de Kerhilio	Côte du Morbihan
06/08/2018	Port de Pornichet	Baie de la Baule
06/08/2018	Pointe Saint Gildas	Sortie de l'estuaire de la Loire

La campagne de communication autour du projet Phenomer menée au cours du projet EPICE, nous a donc permis d'améliorer le nombre de recensements. Cette amélioration est nécessaire à une meilleure appréhension de l'ampleur spatiale et de la fréquence de ces épisodes. Dans le cadre du projet EPICE, ces recensements ont permis de réaliser 5 campagnes d'échantillonnage dans des eaux colorées vertes (cf. résultats ACTION 2).

3.4. Conclusion et perspectives

L'expérience acquise au cours du projet EPICE montre la nécessité d'une communication annuelle et régulière autour du projet Phenomer afin de collecter un maximum de recensements d'eaux colorées. La possibilité d'échantillonner, et donc de mieux comprendre ces phénomènes, repose en grande partie sur les observations recensées par Phenomer. Ce projet de sciences participatives est donc un excellent outil pour atteindre cet objectif. Par ailleurs, les données acquises dans le cadre de ce projet peuvent compléter les données issues des programmes de surveillance du milieu (DCE, REPHY...) et ainsi améliorer notre vision de l'ampleur et la fréquence de ces épisodes (Siano et al., 2020).

Cet effort de communication s'est poursuivi et intensifié en 2020 et 2021 dans le cadre du projet LepidoPen⁶ et de la thèse de Pauline Roux (2018-2022).

- Web-série « Ils vivent la mer autrement : portrait de Pauline Roux (IFREMER) ». <https://www.youtube.com/watch?v=3Srflds5Bl8>. La Solitaire du Figaro. Département Loire-Atlantique. Juillet 2021.
- Web-série « Thésiez-vous ? ». <https://www.youtube.com/watch?v=gym8e5uXR-w>. Chaîne YouTube de l'Ifremer. Juin 2021.
- Ma Thèse en 180 secondes. https://www.youtube.com/watch?v=XVl_4xkvKkQ (24 min 47). Finale Nantaise 2021. Stéréolux. Mars 2021.
- Cette micro-algue qui se cache derrière les eaux colorées vertes de Bretagne Sud. <https://theconversation.com/cette-micro-algue-qui-se-cache-derriere-les-eaux-colorees-vertes-de-bretagne-sud-149749>. The Conversation. 10 Janvier 2021.
- Loire-Atlantique : les colorations vertes de l'océan pourraient impacter la survie des coquillages. <https://france3-regions.francetvinfo.fr/pays-de-la-loire/loire-atlantique/loire-atlantique-colorations-vertes-ocean-pourraient-impacter-survie-coquillages-1854656.html>. France 3, Pays de la Loire. 17 Juillet 2020.

⁶ LepidoPen : Projet financé par la Région des Pays de la Loire (2019-2021). : <https://www.ifremer.fr/littoral/Laboratoires-Environnement-Ressources/LER-Morbihan-Pays-de-la-Loire-Nantes-Lorient/Projets>

4. ACTION 2 : Optimisation de l'estimation des abondances de *L. chlorophorum*

4.1. Objectifs

L. chlorophorum est une des deux seules espèces de dinoflagellés ayant atteint de très fortes abondances (i.e. $>10^6$ cellule/L) au cours de ces vingt dernières années sur le littoral français (Données REPHY/DCE ; Sourrisseau *et al.*, 2016). En conséquence, les blooms peuvent conduire à un déclassement des masses d'eau. Dans ce contexte, il est primordial d'avoir une quantification précise des abondances. Or, l'atténuation de leur coloration verte caractéristique et la modification de la forme des cellules, lors de la fixation des échantillons (protocoles REPHY/DCE), rendent leur identification et énumération en microscopie optique très ardue⁷ (figure 7).

Il apparaît donc nécessaire d'évaluer l'apport de l'utilisation d'une méthode complémentaire qui permettrait de palier aux limites de la microscopie optique.

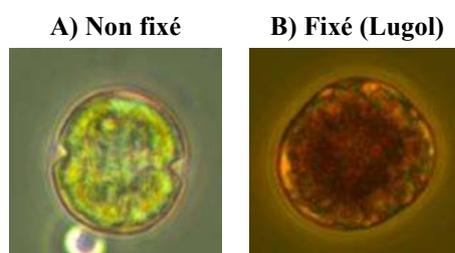


Figure 7 : Effet de la fixation (Lugol) sur la forme et la coloration d'une cellule de *L. chlorophorum*. Il s'agit de la même cellule avant (A) et après (B) fixation. Origine de l'échantillon : Le Croisic, août 2013. Photographies et observations N. Neaud-Masson (Ifremer, coordination REPHY).

Compte tenu de la spécificité en termes de contenu pigmentaire des cellules de *L. chlorophorum* (e.g. Gavalás-Olea *et al.*, 2016), l'utilisation de la cytométrie en flux peut donc être envisagée. Cet outil permet en effet de discriminer différents groupes phytoplanctoniques sur des critères morphologiques et de contenu pigmentaire des cellules (i.e. fluorescence naturelle). En outre, cette méthode présente des avantages en termes de précision de l'énumération et de temps d'analyse. Elle est aujourd'hui utilisée en routine dans certains réseaux d'observation (i.e. SOMLIT⁸) en complément des lectures de flores en microscopie optique. Dans ce contexte, l'objectif de cette action était d'évaluer l'utilisation de la cytométrie en flux, pour l'identification et l'énumération de *L. chlorophorum* en milieu naturel.

4.2. Mise en œuvre et résultats

Cette évaluation s'est déroulée en deux phases expérimentales :

- (i) la première phase, avait pour objectif de définir les caractéristiques intrinsèques des cellules de *L. chlorophorum* en cytométrie en flux à partir de cultures mono-spécifiques, et de réaliser une inter-comparaison entre les comptages en cytométrie en flux et une méthode classique de microscopie optique,
- (ii) la deuxième phase visait à rechercher cette signature cytométrique au sein d'assemblages phytoplanctoniques naturels.

Les méthodologies mises en place et les résultats obtenus au cours de ces deux phases expérimentales sont détaillées ci-après.

⁷ Retour d'expérience des observateurs du REPHY.

⁸ Service d'Observation en Milieu Littoral (CNRS)

4.2.1. Etablissement de la signature cytométrique de *L. chlorophorum* à partir de cultures mono-spécifiques et inter-comparaison entre la cytométrie en flux et la méthode classique de microscopie optique.

Une culture de *Lepidodinium chlorophorum* (RCC1489 : <http://roscoff-culture-collection.org/>) a été acquise auprès de la Collection de Culture de Roscoff (RCC⁹) à l'automne 2018. Cette souche est depuis maintenue au laboratoire de l'Ifremer à Nantes (figure 8), dans un milieu de culture de type « L1 sans silice », à 20°C sous un cycle jour/nuit 12/12h et une intensité lumineuse de 90 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Figure 8 : Cultures de *L. chlorophorum* maintenue au laboratoire Ifremer de Nantes.

Afin de définir la signature cytométrique de *L. chlorophorum*, des échantillons de 1 ml ont été collectés dans les cultures. Ces échantillons ont été conservés suivant le même protocole que celui qui sera appliqué aux échantillons collectés en milieu naturel (Marie *et al.*, 2014). Ils ont ensuite été analysés sur un cytomètre en flux¹⁰. Différents paramètres ont été enregistrés pour chaque échantillon : un paramètre relatif à la taille de la cellule FSC (Forward Scatter), sa granulosité SSC (Side Scatter) et sa fluorescence dans différentes longueurs d'onde (FL1 : 530/30nm ; FL2 : 585/40nm ; FL3 : >670 nm ; FL4 : 675/25 nm).

Ces analyses réalisées sur 15 échantillons ont permis de **définir la signature cytométrique de *L. chlorophorum*** (figure 9). Ce dinoflagellé se caractérise par un niveau de fluorescence élevé dans le vert (FL1) et dans le rouge (FL4).

Cette signature très singulière est en lien avec la composition pigmentaire des cellules de *L. chlorophorum* et pourrait permettre de l'identifier facilement au sein d'une communauté phytoplanctonique naturelle.

Une fois la signature cytométrique de *L. chlorophorum* définie, des tests ont été réalisés sur des cultures en batch¹¹, afin de tester la validité de la cytométrie en flux pour l'énumération des cellules de *L. chlorophorum*.

⁹ Station Biologique de Roscoff, CNRS – UPMC

¹⁰ BD Accuri C6™ disponible sur le centre de Nantes

¹¹ La culture en batch est une méthode de culture de micro-algues en système fermé dans lequel seules quelques générations sont autorisées à se développer avant que tous les nutriments initialement présents lors de l'ensemencement soient épuisés

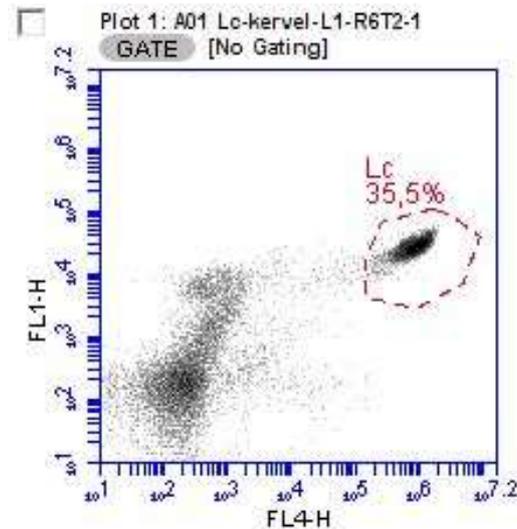


Figure 9 : Exemple de cytogramme obtenu après l’analyse d’un échantillon collecté dans les cultures de *L. chlorophorum*. La région cerclée et annotée «Lc» représente les cellules de *L. chlorophorum*. FL4-H : fluorescence à 675/25 nm (rouge). FL1-H : fluorescence à 530/30nm (vert). Le nuage de points situés sur la gauche du graphique est un bruit de fond lié à la présence de bactéries et différents débris dans le milieu de culture.

Pour cela, des échantillons récoltés au cours des différentes phases de croissance (figure 10) ont été analysés à la fois en cytométrie en flux et sous microscope optique. Ces analyses ont été répétées dans trois cultures différentes de *L. chlorophorum*.

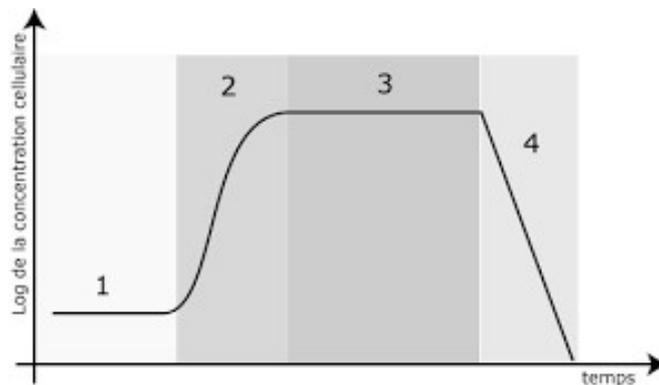


Figure 10 : Courbe de croissance théorique d’une micro-algue en batch et les différentes phases de croissance : 1) phase de latence, 2) phase de croissance exponentielle, 3) phase stationnaire et 4) phase de sénescence.

Les échantillons pour la cytométrie en flux ont été conservés suivant le protocole défini par Marie et *al.* (2014) et analysés comme décrit précédemment. Concernant les échantillons pour les comptages en microscopie optique, chaque échantillon de 1 ml a été conservé dans une solution de Lugol et le comptage a été réalisé sous microscope inversé dans une cellule de comptage de Sedgewick Rafter.

Les courbes de croissance obtenues à partir de ces deux techniques d’analyse sont présentées dans la figure 11. Pour les deux techniques de dénombrement, les cultures de *L. chlorophorum* ont été suivies pendant 18 jours. Des prélèvements ont été réalisés simultanément pour les deux techniques testées, en moyenne tous les deux jours.

La courbe de croissance observée en utilisant la microscopie optique, suit une dynamique classique pour une culture de micro-algue en batch (cf. figure 11A), et se caractérise par : (i) une phase de latence (J0 à J5/J6), (ii) une phase de croissance exponentielle (J7 à J14), (iii) une phase stationnaire (J14-J16) et (iv) une phase de sénescence à partir de J16. Par ailleurs, peu de différences sont observées entre les 3 réplicats de culture, soulignant une forte répétabilité de cette technique de dénombrement.

En revanche, les comptages réalisés en cytométrie ne permettent pas d'établir une courbe de croissance correcte (figure 11B). En effet, l'évolution des concentrations cellulaires semble chaotique et il est difficile, par cette technique, d'identifier les 4 phases de croissance classiquement observées en batch. Par ailleurs, cette méthode montre une forte variabilité entre les réplicats tout au long de la croissance de *L. chlorophorum*, mettant en évidence une faible répétabilité des comptages.

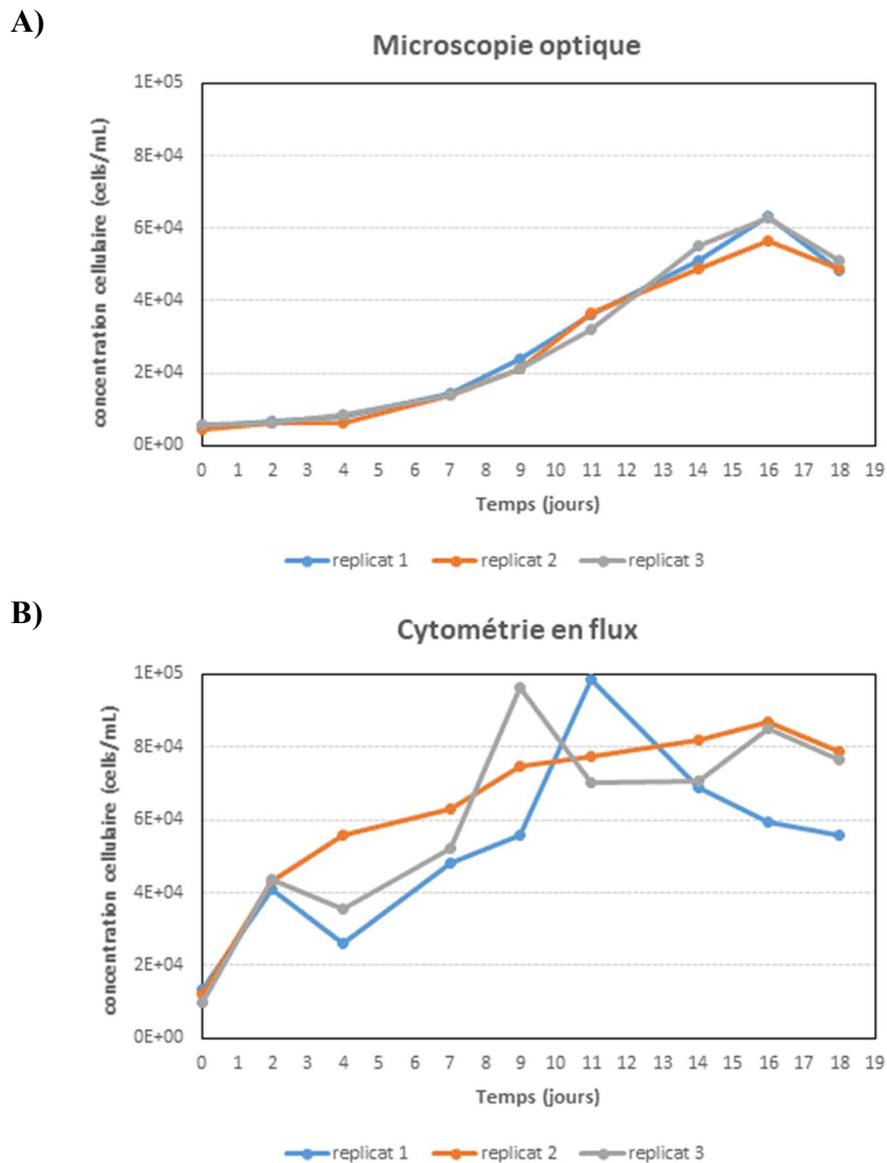


Figure 11 : Evolution de la concentration cellulaire de *L. chlorophorum* (cells/mL) au cours du temps au sein de trois cultures différentes (réplicat 1, réplicat 2, réplicat 3) mesurées par A) microscopie optique et B) cytométrie en flux.

Enfin, les dénombrements de *L. chlorophorum* par cytométrie en flux montrent une surestimation des abondances cellulaires par rapport à la microscopie optique (tableau 3). Cette surestimation n'est pas constante dans le temps, avec des surestimations beaucoup plus élevées en début de culture (128% à 581% entre J0 et J11) qu'en fin de culture (27 à 43% entre J14 et J18).

Tableau 3 : Différence moyenne en nombre de cellules entre les comptages réalisés en cytométrie en flux et ceux réalisés en microscopie optique (cyto-mo), et % de surestimation des comptages en cytométrie par rapport à la microscopie optique. Les calculs ont été réalisés sur la moyenne des réplicats.

Jours de culture	cyto-mo	% surestimation
0	6600	128
2	36280	581
4	31580	412
7	40293	288
9	53698	243
11	47068	135
14	22187	43
16	16190	27
18	20906	42

Ainsi, si cette première phase de travail menée sur des cultures mono-spécifiques de *L. chlorophorum* a permis de définir la signature cytométrique de ce dinoflagellé (figure 10), la comparaison avec la méthode classique de microscopie optique met en revanche en évidence une surestimation des comptages par la cytométrie en flux. Cette surestimation n'étant pas constante au cours des différentes phases de croissance, il est donc impossible de pouvoir appliquer un facteur de correction aux données acquises par cytométrie. Ceci pourrait en partie s'expliquer par les TEP sécrétées par *L. chlorophorum*. En effet, ces particules collantes et visqueuses pourraient entraîner une modification des flux d'échantillon à l'intérieur du cytomètre et ainsi induire un biais sur le comptage. De la même manière, la formation d'agrégats de cellules sous l'action des TEP peut aussi modifier la taille des particules. Si ces hypothèses restent à vérifier, ces résultats montrent, néanmoins, que la cytométrie en flux ne serait pas une méthode adaptée à l'énumération des cellules de *L. chlorophorum*.

4.2.2. Recherche de la signature cytométrique de *L. chlorophorum* au sein d'assemblages phytoplanctoniques naturels.

➤ **Echantillonnage dans des eaux colorées vertes.**

Des échantillons ont été récoltés de manière opportuniste lors de l'observation d'eaux colorées vertes au cours de l'été 2018, lors de 5 sorties. L'acquisition de ces échantillons reposait en grande partie sur un recensement précoce des épisodes d'eaux colorées vertes et donc sur la mise en place de l'ACTION 1 de ce projet.

• **Dynamique des eaux colorées vertes en 2018**

Les prélèvements réalisés dans le cadre des réseaux REPHY/DCE et du projet EPICE montrent des abondances de *L. chlorophorum* relativement élevées dès le 9 juillet sur plusieurs stations du secteur, avec des valeurs variant en surface entre 1 600 cell/L à « Nord Dumet » et 82 000 cell/L à « Pont Mahé » (tableau 4).

Tableau 4 : Abondances de *L. chlorophorum* (cellule/L) en surface (i.e. -1m) et dans la colonne d'eau sur différentes stations au cours des mois de juillet et août 2018. En noir : mesures réalisées dans le cadre des réseaux d'observation (REPHY/DCE). En vert : mesures réalisées dans le cadre du projet EPICE.

Stations	Prof.	Date									
		09/07	11/07	17/07	23/07	24/07	25/07	31/07	06/08	13/08	20/08
Nord Dumet (ND)	surface col. eau	1 600 350 000	1 400 11 200	1 500 --	9 000 600 000	-- --	-- --	160 000 <100	216 000 <100	-- --	9 000 <100
Ouest Loscolo (OL)	surface col. eau	14 500 --	23 000 2 600 000	1 700 1 500 000	4 800 830 000	-- --	-- --	360 000 --	78 000 --	50 000 --	34 800 --
Les Mats	surface	--	58 000	--	--	--	--	--	--	--	--
Pont Mahé	surface	82 000	275 000	5 300 000	30 000 000	--	--	780 000	440 000	14 000	424 000
Le Maresclé	surface	--	11 000	15 000 000	45 000	--	--	2 200 000	2 300 000	--	--
Kervoyal	surface	35 000	15 000	100 000	30 000	--	--	1 500 000	35 000	200 000	4 200
Plage de Pen Bé, Assérac	surface	--	--	--	--	1 970 105	--	--	--	--	--
Pointe de Pen Bé	surface	--	--	--	--	--	5 085 333	--	--	--	--
Étier – Bôle de Merquel à Mesquer	surface	--	--	--	--	--	3 268 385	--	--	--	--
Pointe er Fosse	surface	--	--	--	11 500	--	--	125 000	95 000	--	--
Embouchure de la Vilaine	surface	--	--	95 000 000	--	--	--	--	--	--	--
Estuaire de la Vilaine	surface	--	--	--	70 000 000	--	--	--	--	--	--
Basse de Loscolo	surface	--	--	--	--	--	--	20 000 000	--	--	--

Les premiers recensements d'eau colorée verte en Baie de Vilaine datent du 11 juillet 2018 : elles ont été observées à la « Pointe du Bile » lors d'un survol aérien de la zone par le CEVA. Les analyses du 11 juillet confirment la présence en grand nombre de cellules de *L. chlorophorum* en Baie de Vilaine, avec plus de 2 millions de cellules par litre en profondeur à « Ouest Loscolo » et 275 000 cell/L en surface à « Pont Mahé ». A partir du 13 juillet, des eaux colorées vertes ont été recensées en Baie de Vilaine et sur la côte de Pénestin formant de grandes nappes sur les secteurs côtiers.

« Embouchure de la Vilaine » le 17 juillet 2018



« Le Maresclé » 17 juillet 2018



« Estuaire de la Vilaine » 17 juillet 2018



« Pont Mahé » 17 juillet 2018



Figure 12 : Photographies des eaux colorées vertes le 17 juillet 2018. Auteur : Ifremer LER/MPL (M. Retho).

Le 17 juillet, les abondances de *L. chlorophorum* sont à la hausse sur différents secteurs, atteignant plus de 5 millions de cellules par litre à « Pont Mahé », 15 millions au « Maresclé » et plus de 95 millions à « l’embouchure de la Vilaine ». Des eaux colorées vertes sont alors bien visibles sur de nombreux secteurs à la côte (figure 12). En revanche, aucune eau colorée verte n’est observée en surface plus au large sur les stations « Nord Dumet » et « Ouest Loscolo » où les abondances maximales sont observées en profondeur et non à la surface.

Des eaux vertes sont à nouveau observées lors des sorties du 23 juillet sur la côte de Pénestin (figure 13). Les abondances de *L. chlorophorum* sont encore très élevées sur certains secteurs tels que « l’estuaire de la Vilaine » et « Pont Mahé », avec 70 et 30 millions de cellules respectivement (tableau 4). Lors des analyses au laboratoire, la formation d’agrégats est observée dans les échantillons de l’estuaire de la Vilaine, 3 ou 4 heures après leur prélèvement.

« Pont Mahé » le 23 juillet 2018



« Estuaire de la Vilaine » 23 juillet 2018



Figure 13 : Photographies des eaux colorées vertes le 23 juillet 2018. Auteur : Ifremer LER/MPL (M. Retho).

Ces eaux colorées vertes sont encore observées les 24 et 25 juillet dans le secteur de Pen Bé (« plage de Pen Bé à Assérac » et « Pointe de Pen Bé ») ainsi que dans les étiers à proximité de la « Bôle de Merquel » et sur la plage de Sorlock sur la Pointe de Merquel (figure 14). Les abondances de *L. chlorophorum* varient alors entre 1,9 millions à la Plage de Pen Bé et plus de 5 millions à la pointe de Pen Bé (tableau 4).

En baie de Vilaine, des eaux colorées vertes sont encore observées la première semaine d’août, notamment dans le secteur du « Maresclé », puis les concentrations en *L. chlorophorum* diminuent, mais le dinoflagellé reste présent jusqu’à fin août (tableau 4).

« Etier, Bôle de Merquel » le 25 juillet 2018



« Plage de Sorlock, Pointe de Merquel », 25 juillet 2018

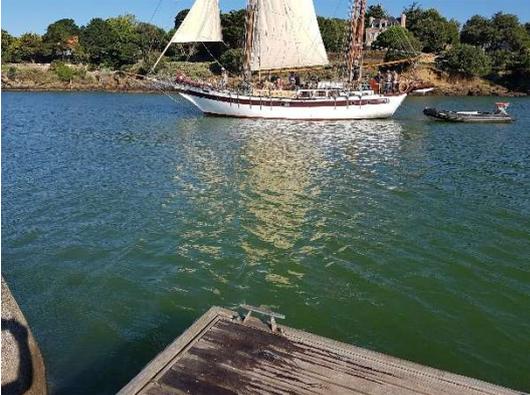


Figure 14 : Photographies des eaux colorées vertes le 25 juillet 2018. Auteur : Ifremer LER/MPL (O. Pierre-Duplessix).

Au début du mois d’août, des eaux colorées vertes ont été principalement observées à proximité de l’estuaire de la Loire, que ce soit au nord avec des recensements dans la Baie de La Baule (plage de « Bonne source », plage « Sainte Marguerite » et « Port de Pornichet ») ou au sud de l’estuaire avec des observations à proximité de la côte de la Pointe Saint Gildas à

l'entrée du port de Pornic (figure 15). Sur ces différents sites, des prélèvements et analyses ont été réalisés dans le cadre du projet EPICE et grâce aux déclarations faites sur le site Phenomer. Les abondances de *L. chlorophorum* variaient alors entre 1,3 millions de cell/L à l'entrée du Port de Pornic (le 4 août) et plus de 3 millions au large de la plage de « Bonne source » à Pornichet (le 5 août). A cette même période, des eaux vertes ont également été observées dans le port de la Rochelle (357 725 cell/L le 3 août) et sur la « Grande Plage de Chatelaillon » au sud de la Rochelle.

« Port de Gourmalon, Pornic » le 3 août 2018



« Pointe Saint Gildas » le 4 août 2018



« Port de la Rochelle » le 3 août 2018



Figure 15 : Photographies des eaux colorées vertes, début août 2018. Auteurs : Ifremer LER/MPL (O. Pierre-Duplessix et A. Schmitt).

Par la suite, aucun recensement d'eau colorée verte n'a été fait à partir de la mi-août et les abondances de *L. chlorophorum* ont chuté sur l'ensemble de la zone d'étude.

Les prélèvements réalisés au cœur des eaux colorées, dans le cadre du projet EPICE, ont permis :

- (i) De suivre l'évolution spatiale et temporelle des eaux colorées vertes au cours de l'été 2018,
- (ii) de mettre en évidence des abondances maximales de *L. chlorophorum* à mi-profondeur ou au fond,
- (iii) de prélever des échantillons frais pour l'isolement et la mise en culture de nouvelles souches de *L. chlorophorum*,
- (iv) de prélever des échantillons afin de tester la validité de la cytométrie en flux comme méthode d'identification et de comptage de *L. chlorophorum*.

- **Recherche de la signature cytométrique de *L. chlorophorum* au sein des eaux colorées vertes.**

Des échantillons ont pu être récoltés sur 8 stations localisées dans une eau colorée verte pour les analyses en cytométrie en flux. La signature cytométrique de *L. chlorophorum* définie préalablement sur les cultures mono-spécifiques (figure 9) a été observée dans chacun des échantillons récoltés au cœur de l'eau colorée verte (figure 16).

La population de *L. chlorophorum* se caractérise par de forts niveaux de fluorescence dans le vert (FL1) et dans le rouge (FL4) et est facilement identifiable parmi les autres populations phytoplanctoniques présentes au sein des communautés et visibles en cytométrie de flux.

La cytométrie en flux est donc un bon outil pour la détection de *L. chlorophorum* au sein d'assemblages phytoplanctoniques naturels.

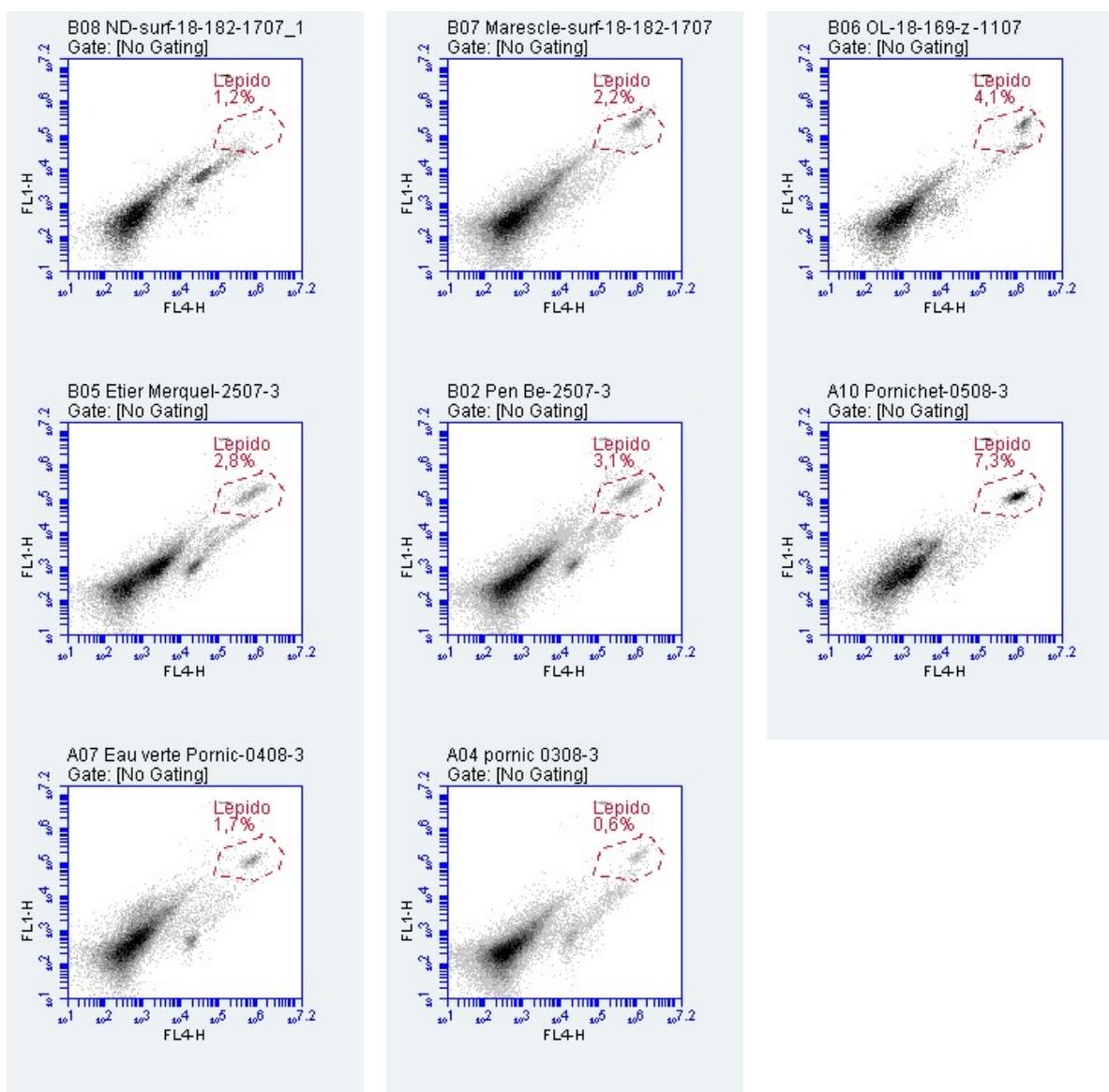


Figure 16 : Cytogramme des échantillons récoltés au sein des eaux colorées vertes échantillonnées au cours de l'année 2018. La région cerclée et annotée « Lc » représente les cellules de *L. chlorophorum*. FL4-H : fluorescence à 675/25 nm (rouge). FL1-H : fluorescence à 530/30nm (vert). Les autres amas de points représentent d'autres populations phytoplanctoniques et bactériennes présentes dans l'échantillon, ainsi que des débris.

Les abondances mesurées en cytométrie en flux sur ces différents échantillons ont été comparées aux abondances obtenues par un comptage classique en microscopie optique (figure 17). A l'instar de ce que nous avons observé précédemment sur des cultures mono-spécifiques de *L. chlorophorum*, il existe une variation importante entre les abondances obtenues par ces deux techniques de comptage qui présentent en effet des incertitudes. Au cœur d'un bloom, les abondances de *L. chlorophorum* sont très élevées et il est parfois nécessaire de diluer l'échantillon pour réaliser le comptage sous microscope. Cette dilution peut introduire une incertitude supplémentaire sur les comptages. Cependant, ces résultats acquis *in situ* rejoignent ceux obtenus précédemment sur les cultures mono-spécifiques, et soulignent la difficulté d'obtenir un dénombrement rigoureux des cellules de *L. chlorophorum* en cytométrie en flux.

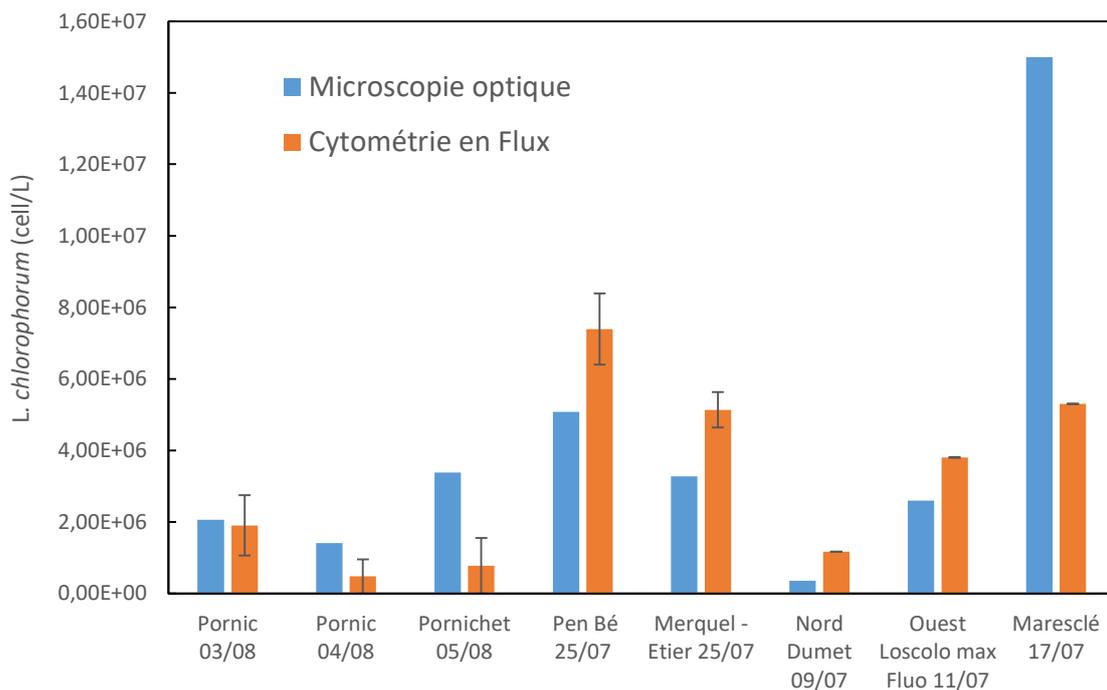


Figure 17 : Abondances cellulaires de *L. chlorophorum* obtenues par cytométrie en flux (en bleu) et par microscopie optique (orange) sur différents sites lors d'une eau colorée verte. Pornic (03/08) ; Pornic (04/08) ; Pornichet (05/08) ; Pen Bé (25/07) ; Merquel-Etier (25/07) ; Nord Dumet (09/07) ; Ouest Loscolo (11/07) ; Maresclé (17/07). Pour la cytométrie en flux, 3 échantillons ont été analysés sur chaque point. Les histogrammes représentent la moyenne et les barres d'erreur sont les écarts types. Les analyses en microscopie optique ne sont pas réalisées en triplicat.

a) Echantillonnage saisonnier

Des échantillons ont été récoltés tous les 15 jours de mars à octobre sur les stations *Basse Michaud* et *Nord-Dumet* (figure 18). Le choix de ces stations a été conditionné par la fréquence des efflorescences de *L. chlorophorum* d'une part et la quantité de données environnementales disponibles sur chacune de ces stations d'autre part. La station *Basse Michaud* est un point « observation » du réseau REPHY, et la station *Nord Dumet* accueille la bouée instrumentée haute fréquence MOLIT et est suivie une fois par mois dans le cadre de la DCE.



Figure 18 : Localisation des stations d'échantillonnage retenues pour l'action (en rouge) : *Nord Dumet* en Baie de Vilaine et *Basse Michaud*, au large de l'estuaire de la Loire. La bouée instrumentée haute fréquence MOLIT est positionnée sur la station Nord Dumet.

Le point *Basse Michaud* est échantillonné tous les 15 jours, toute l'année, dans le cadre du réseau « REPHY-Obs » par le LER/MPL à bord d'un navire de la SNSM¹². Sur ce point les échantillons du projet EPICE ont donc été récoltés au cours des sorties REPHY-Obs. En revanche, le point *Nord Dumet* n'étant échantillonné qu'une fois par mois dans le cadre de la DCE, 8 sorties bateau supplémentaires ont donc été réalisées, afin d'échantillonner à une fréquence bimensuelle sur ce point. Ces sorties supplémentaires ont été faites par le LER/MPL à bord du N.O. Mesklec (tableau 5).

¹² SNSM : Société Nationale de Sauvetage en Mer

Tableau 5 : Nombre de sorties et d'analyses (par paramètre) envisagées pour le suivi saisonnier de l'action 2 sur les stations *Basse Michaud* (REPHY-Obs) et *Nord Dumet* (DCE). En vert : sorties et analyses supplémentaires envisagées dans le cadre de la phase 1 du projet EPICE. En noir : sorties et analyses déjà financées dans le cadre des réseaux d'observation REPHY/DCE. Le nombre total de sorties et d'analyses supplémentaires réalisées dans le cadre du projet EPICE est indiqué dans la dernière ligne du tableau.

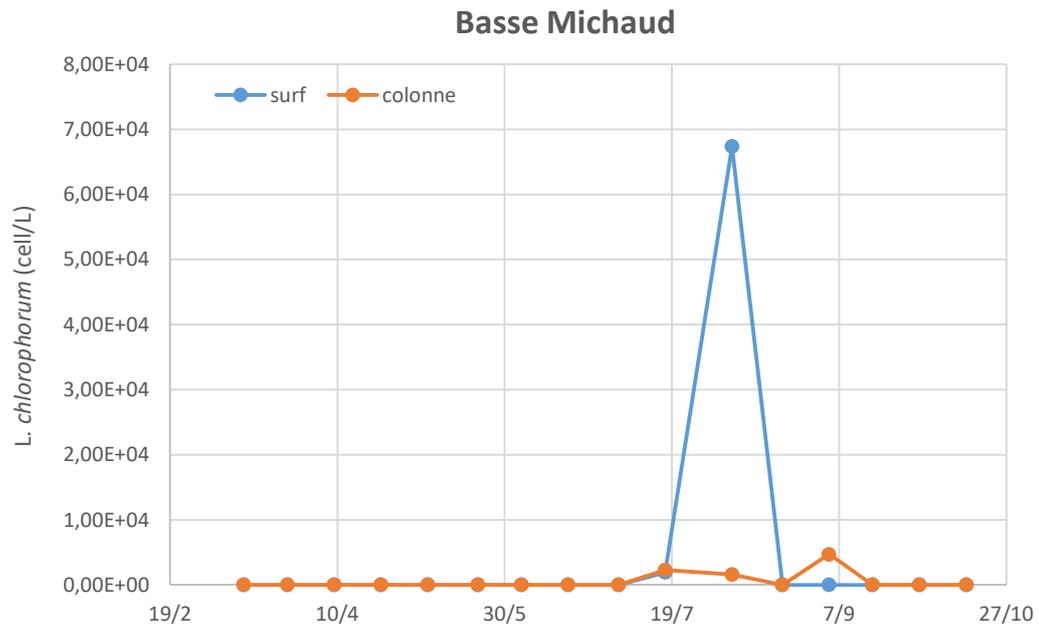
Stations	Sorties EPICE 1.0	Niveaux de prélèvements	Profils	Chla	Nutriments	Flore	Cytométrie (3 réplicats)
<i>Basse-Michaud</i>	0	<i>sub-surface</i>	16	16	16	16	16 × 3
		<i>profondeur</i>		16	16	16	16 × 3
<i>Nord Dumet</i>	8	<i>sub-surface</i>	8 + 8	8 + 8	8 + 8	16	16 × 3
		<i>profondeur</i>		16	16	16	16 × 3
Total	8		8	40	40	48	192

Lors de chaque sortie, des profils verticaux de température, salinité, oxygène dissous et fluorescence ont été réalisés à l'aide d'une sonde multi-paramètres. Des prélèvements d'eau ont été réalisés à l'aide d'une bouteille Niskin à deux niveaux : (i) sub-surface (i.e. – 1 m ; protocoles REPHY et DCE) et (ii) profondeur (i.e. maximum de fluorescence/thermocline/halocline). Sur ces deux niveaux de prélèvement, plusieurs paramètres sont mesurés : (i) les concentrations en sels nutritifs (nitrate+nitrite, ammonium, azote totale, phosphate, phosphore total et silicate), (ii) la biomasse phytoplanctonique (i.e. concentration en Chlorophylle *a*), (iii) la composition des assemblages phytoplanctoniques en microscopie optique, (iv) l'identification et l'énumération de *L. chlorophorum* par cytométrie en flux.

Dans un souci de clarté, nous avons choisi de ne présenter ici que les résultats concernant la dynamique temporelle de *L. chlorophorum* sur les deux stations d'échantillonnage et la comparaison entre la cytométrie en flux et les comptages en microscopie optique. Les autres paramètres sont présentés en annexe de ce rapport.

L'évolution des abondances de *L. chlorophorum* au cours du temps sur les deux stations, et aux deux niveaux d'échantillonnage, est présentée sur la figure 19. L'axe des abscisses présente une échelle différente entre les deux graphiques.

A)



B)

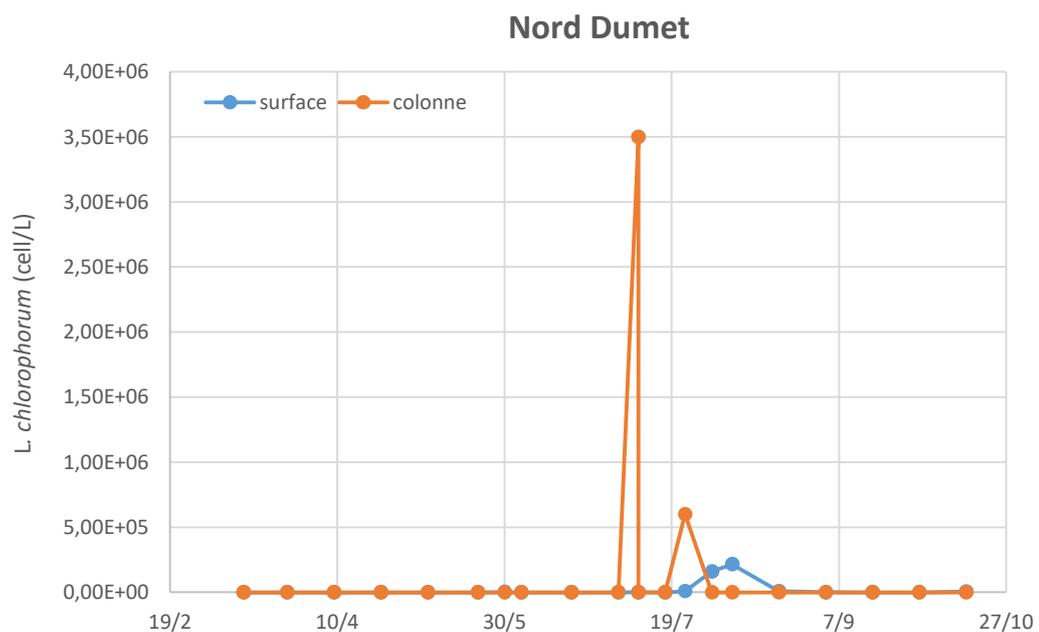


Figure 19 : Evolution temporelle des abondances de *L. chlorophorum* (cell/L) sur les deux stations, A) Basse-Michaud (BM) et B) Nord Dumet (ND) au cours de l'année 2018, en surface (bleu) et dans la colonne d'eau (orange), estimées par la méthode classique de comptage en microscopie optique. A noter, les différentes échelles de l'axe des abscisses entre les graphiques A et B.

La dynamique saisonnière de *L. chlorophorum* observée en 2018 sur les deux stations, est conforme à ce qui est généralement observé sur la zone, avec des abondances maximales observées au cours de l'été (juillet- aout). Les données acquises dans le cadre de ce projet montrent que ces abondances peuvent être plus élevées en profondeur qu'en surface. C'est le cas en particulier sur la station Nord Dumet en juillet. Ainsi, dans le cadre d'un projet portant sur la dynamique de *L. chlorophorum*, un échantillonnage à différents niveaux de la colonne

d'eau apparaît nécessaire pour avoir une vision plus complète des blooms de ce dinoflagellé. Les abondances maximales de *L. chlorophorum* ont été observées en profondeur sur la station « Ouest Loscolo » avec $3,5 \cdot 10^6$ cell/L le 9 juillet. Sur la station « Basse-Michaud » les abondances de *L. chlorophorum*, n'ont pas dépassé $6,7 \cdot 10^4$ cell/L (surface ; 6 aout).

Des échantillons (32 et 41 échantillons pour Basse-Michaud et Nord Dumet respectivement) ont été récoltés en triplicat sur l'ensemble des points d'échantillonnage pour les analyses de cytométrie en flux. Tous les échantillons ont été analysés, soit un total de 219 analyses. Les résultats de ces analyses mettent à nouveau en évidence une difficulté à énumérer les cellules de *L. chlorophorum* par cette technique.

Les cytogrammes ont été classés en trois types suivant la présence ou non de particules dans la région « Lc » définie précédemment sur les cultures, et la possibilité de définir clairement une population dans cette région, en fonction de la densité de particules présentes (Figure 20).

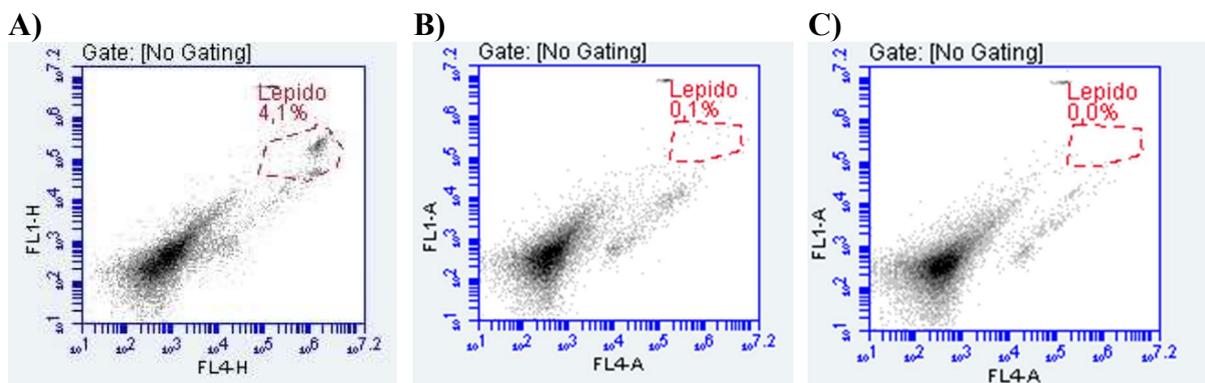


Figure 20 : Cytogrammes montrant : A) une population bien définie dans la région « Lc » (échantillon Nord Dumet surface du 31/07), B) une population mal définie (échantillon Basse-Michaud surface du 06/08) et C) absence de particule dans la région « Lc » (échantillon Basse-Michaud surface du 15/10).

Un nuage de points clairement défini, situé dans la région « Lc », n'a pu être observé que sur 12 cytogrammes correspondant à 4 dates d'échantillonnage (cf. tableau 6). Ces échantillons correspondent à des abondances de *L. chlorophorum* $> 150\,000$ cellules. Pour la majorité des échantillons, un certain nombre de particules présentaient les caractéristiques cytométriques de *L. chlorophorum* (i.e. localisation dans la région « LC » définie sur les cultures), cependant leur densité était trop faible pour définir correctement une population et réaliser un comptage représentatif (figure 20). Lorsque la densité de *L. chlorophorum* est faible (i.e. $150\,000$ cell/L) dans l'échantillon, il faudrait pouvoir analyser un volume plus important pour espérer avoir une meilleure définition de la population (seulement $100\ \mu\text{L}$ d'échantillon ont été analysés). Or, le nombre de particules (autres cellules phytoplanctoniques, bactéries, débris...) étant très important dans un échantillon naturel, le volume d'analyse avait été réduit pour limiter le bruit de fond.

Tableau 6 : Abondances de *L. chlorophorum* sur les stations Basse-Michaud (BM) et Nord Dumet (ND) estimées en microscopie optique (M.O.) sur les deux niveaux de prélèvements et aux différentes dates d'échantillonnage en 2018. Les cytogrammes des échantillons correspondant ont été classés en 3 types (3 couleurs) selon la possibilité ou non de définir clairement une population de *L. chlorophorum*. En vert foncé, sont représentés les échantillons pour lesquels une population a pu être définie (« pop bien définie ») ; en vert clair les échantillons pour lesquels des particules étaient localisées dans la région « Lc » mais représentant une population mal définie (« pop mal définie ») ; en rose les échantillons pour lesquels aucune particule n'était présente dans la région « Lc ».

A)

Stations	Date	niveau	M.O. Lepido (cell/L)
BM	13/03/2018	surface	0
BM	26/03/2018	surface	0
BM	09/04/2018	surface	0
BM	23/04/2018	surface	0
BM	07/05/2018	surface	0
BM	22/05/2018	surface	0
BM	04/06/2018	surface	0
BM	18/06/2018	surface	0
BM	03/07/2018	surface	0
BM	17/07/2018	surface	1900
BM	06/08/2018	surface	67400
BM	21/08/2018	surface	0
BM	04/09/2018	surface	0
BM	17/09/2018	surface	0
BM	01/10/2018	surface	0
BM	15/10/2018	surface	0
BM	13/03/2018	colonne	0
BM	26/03/2018	colonne	0
BM	09/04/2018	colonne	0
BM	23/04/2018	colonne	0
BM	07/05/2018	colonne	0
BM	22/05/2018	colonne	0
BM	04/06/2018	colonne	0
BM	18/06/2018	colonne	0
BM	03/07/2018	colonne	0
BM	17/07/2018	colonne	2300
BM	06/08/2018	colonne	1600
BM	21/08/2018	colonne	0
BM	04/09/2018	colonne	4700
BM	17/09/2018	colonne	0
BM	01/10/2018	colonne	0
BM	15/10/2018	colonne	0

B)

0	Stations	Date	niveau	M.O. Lepido (cell/L)	Cyto
ND	13/03/2018	surface	0		
ND	26/03/2018	surface	0		
ND	09/04/2018	surface	0		
ND	23/04/2018	surface	100		
ND	07/05/2018	surface	800		
ND	22/05/2018	surface	0		Absence
ND	30/05/2018	surface	2300		Pop bien définie
ND	04/06/2018	surface	0		Pop mal définie
ND	19/06/2018	surface	0		
ND	03/07/2018	surface	400		
ND	09/07/2018	surface	1600		
ND	17/07/2018	surface	800		
ND	23/07/2018	surface	9000		
ND	31/07/2018	surface	160000		
ND	06/08/2018	surface	216000		
ND	20/08/2018	surface	9000		
ND	03/09/2018	surface	1400		
ND	17/09/2018	surface	400		
ND	01/10/2018	surface	0		
ND	15/10/2018	surface	5600		
ND	13/03/2018	colonne	0		
ND	26/03/2018	colonne	0		
ND	09/04/2018	colonne	0		
ND	23/04/2018	colonne	0		
ND	07/05/2018	colonne	0		
ND	22/05/2018	colonne	300		
ND	30/05/2018	colonne	0		
ND	04/06/2018	colonne	0		
ND	19/06/2018	colonne	0		
ND	03/07/2018	colonne	0		
ND	09/07/2018	colonne	3500000		
ND	09/07/2018	colonne	0		
ND	17/07/2018	colonne	0		
ND	23/07/2018	colonne	600000		
ND	31/07/2018	colonne	0		
ND	06/08/2018	colonne	0		
ND	20/08/2018	colonne	0		
ND	03/09/2018	colonne	0		
ND	17/09/2018	colonne	0		
ND	01/10/2018	colonne	200		
ND	15/10/2018	colonne	0		

4.3. Conclusion et perspectives

Les tests, menés à la fois sur les échantillons de culture mono-spécifique et sur des échantillons prélevés dans le milieu naturel suggèrent que la cytométrie en flux ne serait pas une méthode adaptée à l'énumération des cellules de *L. chlorophorum*. Cependant des ajustements méthodologiques sont possibles pour tenter d'améliorer l'estimation de l'abondance. Des échantillons pour la cytométrie en flux ont donc été prélevés dans le cadre du projet LepidoPen afin de tester de nouvelles approches.

Néanmoins, dans le cadre de cette action, il a été possible de définir la signature cytométrique de *L. chlorophorum*. Cette signature a pu être retrouvée dans des échantillons naturels récoltés au cœur d'une eau colorée, et les résultats montrent que les caractéristiques pigmentaires de *L. chlorophorum* permettent de l'identifier clairement des autres populations visibles en cytométrie en flux. Ainsi, un cytomètre en flux automatique embarqué sur une bouée, telle que MOLIT, pourrait permettre une détection des blooms de *L. chlorophorum* quasi en temps réel.

Par ailleurs, au cours des différents échantillonnages menés dans le cadre de cette action 2 du projet EPICE, des échantillons frais ont pu être récoltés afin de tenter la mise en culture de souches locales de *L. chlorophorum*. Si aucune culture n'a pu être maintenue à partir des échantillons récoltés en 2018 dans le cadre d'EPICE, ces premiers essais ont permis de mettre en place une méthode adaptée et des souches locales ont pu être isolées sur la zone en 2019 et sont désormais maintenues au laboratoire.

Enfin, le suivi saisonnier a mis en évidence la nécessité de rechercher *L. chlorophorum* sur l'ensemble de la colonne d'eau. En effet, les résultats montrent des concentrations cellulaires parfois plus élevées à proximité du fond qu'en surface. Ces résultats ont donc permis de mettre en place un échantillonnage adapté dans le cadre du projet LepidoPen.

5. ACTION 3 : Identification des zones à risque au large de la Loire et de la Vilaine.

Cette action a fait l'objet du stage de Master 2 de Coralie André de l'Université de Nantes¹³.

5.1. Objectifs

Le cycle de vie de certains dinoflagellés repose sur l'alternance entre une phase planctonique et une phase benthique. Brièvement, lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, ces espèces sont capables de former des kystes de dormance qui sédimentent sur le fond. Ces kystes benthiques sont capables de germer et redonner des cellules végétatives planctoniques, capables de générer un nouveau bloom dans la colonne d'eau.

La remise en suspension du sédiment, sous l'action des courants, des tempêtes ou lors de dragage, peut donc contribuer à la génération d'un nouveau bloom. Les sites sur lesquels s'accumulent les kystes constituent donc des zones à risque.

Concernant *L. chlorophorum*, l'existence de kystes au large de la Loire et de la Vilaine a été suggérée par les observations de Sournia *et al.* en 1992 menées sur des cultures de *L. chlorophorum*. Cependant à ce jour, aucune information n'est disponible sur les zones d'accumulation des kystes de *L. chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'ACTION 3, dont l'objectif était d'étudier la répartition spatiale des kystes de *L. chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine et d'identifier des zones à risque sur lesquelles des actions de dragage peuvent avoir des conséquences sur le déclenchement des épisodes d'eaux colorées vertes sur cette zone littorale.

Répondre à cet objectif a nécessité la mise en place d'une campagne d'échantillonnage des sédiments superficiels sur différents sites répartis au large de la Loire et de la Vilaine.

5.2. Echantillonnage

Les prélèvements de sédiment ont été réalisés sur 15 stations entre le 15 janvier et le 14 février 2019 (figure 21). Les échantillonnages se sont déroulés soit en bateau (neuf opérations), soit à pied sur l'estran (huit opérations). Sur chaque station, trois répliqués de sédiments de nature vaseuse ou sableuse ont été échantillonnés dans les mêmes proportions à l'aide de seringues stériles et calibrées, sur un rayon de 50 cm dans une zone présentant des caractéristiques similaires. Les sites d'échantillonnage ont été sélectionnés sur la base de plusieurs critères :

- leur géomorphologie : les baies, ports, estuaires et zones abritées sont propices à l'accumulation de kystes et constituent des sites à risque en lien avec les différents usages sur ces zones.
- leur typologie sédimentaire : les zones vaseuses et sablo-vaseuses sont favorables à la conservation et l'accumulation de kystes.
- leur caractéristique écologique : les stations sélectionnées sur différentes zones sont fréquemment impactées par les eaux colorées vertes.
- leur accessibilité : à pied (intertidal) et à partir d'un bateau (subtidal).

La profondeur mesurée pour l'opération d'échantillonnage des neuf stations subtidales se situe entre 4 et 20 mètres.

¹³ Recherches des kystes de l'espèce nuisible *Lepidodinium chlorophorum* par approches multidisciplinaires au large de la Loire et de la Vilaine. Université Sciences et Techniques de Nantes, Master 2 Sciences de la Terre et des Planètes, Environnementparcours Ecosystèmes et Bioproduction Marine, Année Universitaire : 2018 – 2019.

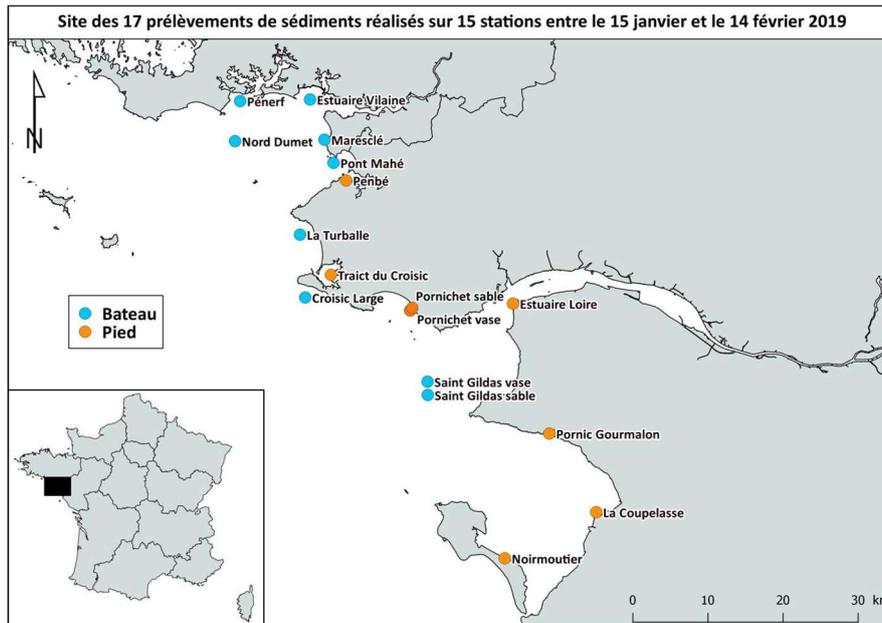


Figure 21 : Sites d'échantillonnage des sédiments superficiels.

Avant de débiter les analyses morphologiques et biomoléculaires pour rechercher les kystes présents dans les sédiments, des mesures de concentrations en chlorophylle *a* et phéopigments ont été réalisées.

5.3. Caractérisation du sédiment

5.3.1. *Dosage de la chlorophylle a et des phéopigments dans le sédiment*

Avant l'extraction, les échantillons lyophilisés ont été homogénéisés et une fraction d'environ 1 g de sédiment a été pesée. Les pigments ont été extraits selon la méthode d'Aminot et Kerouel, 2004. Les valeurs de chlorophylle *a* et phéopigments sont exprimées en $\mu\text{g} / \text{g}$ de sédiment sec ($\mu\text{g g}_{\text{dw}}^{-1}$).

Les concentrations en chlorophylle *a* (*chl**a*) et phéopigments mesurées sur chacun des sites d'échantillonnage sont présentées dans la figure 22. Les phéopigments, qui sont la forme dégradée de la chlorophylle *a*, sont majoritaires sur la plupart des stations. Les concentrations sont particulièrement élevées (i.e. $>30 \mu\text{g g}_{\text{dw}}^{-1}$) sur les points Pénerf, Nord Dumet, Estuaire de la Vilaine, Pornichet vase et Estuaire de la Loire, traduisant une matière détritique importante sur ces stations. Les stations présentant des concentrations en *chl**a* plus élevées que les concentrations en phéopigments sont majoritairement des stations échantillonnées en intertidal. Ces résultats mettent en évidence la présence de microphytobenthos sur ces stations.

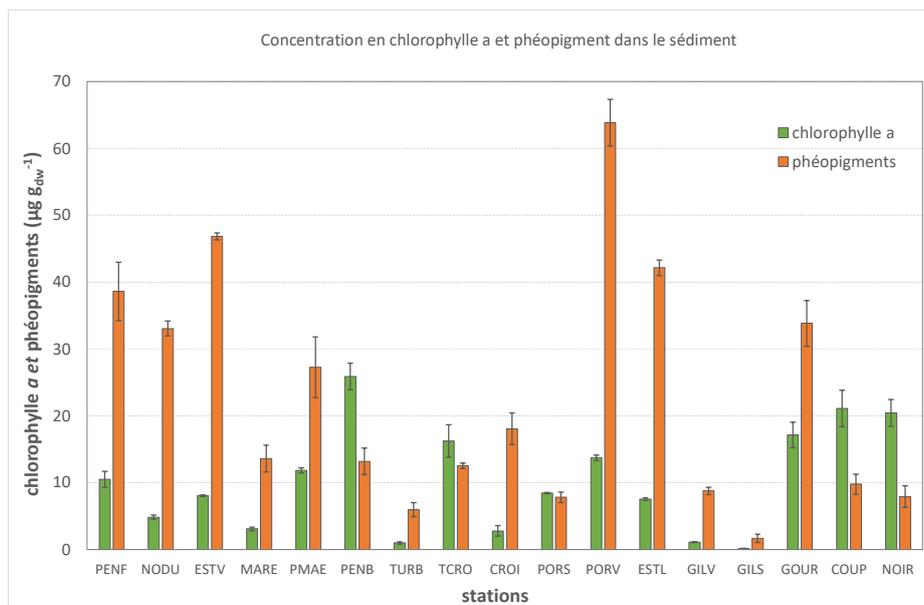


Figure 22: Concentrations en chlorophylle *a* (vert) et phéopigments (orange) sur les différentes stations d'échantillonnage (moyenne des trois réplicats). PENF : Pénerf ; NODU : Nord Dumet ; ESTV : estuaire de la Vilaine ; MARE : Maresclé ; PMAE : Pont Mahé ; PENB : Pen Bé ; TURB : Turballe ; TCRO : Traict du Croisic ; CROI : Croisic Large ; PORS : Pornichet sable ; PORV : Pornichet vase ; ESTL : Estuaire Loire ; GILV : Pointe Saint Gildas vase ; GILS : Pointe Saint Gildas sable ; GOUR : Gourmalon ; COUP : La Coupelasse ; NOIR : Noirmoutier. Les barres d'erreur représentent les écarts type.

5.3.2. *Dosage de l'azote et du carbone organique dans le sédiment*

Les analyses ont été menées sur des sous-échantillons de 1 à 2 g de sédiment pour déterminer les concentrations en azote total (NT) et carbone organique total (COT) par la méthode de combustion à haute température avec un analyseur élémentaire Carlo-Erba[®], après l'élimination de carbonate par l'acide phosphorique (Cauwet, 1975).

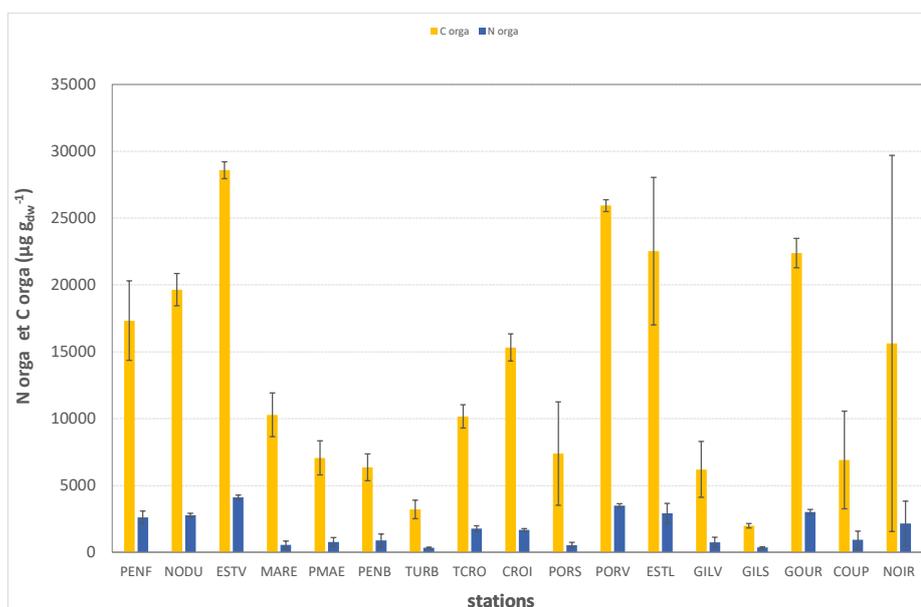


Figure 23 : Concentrations azote (N) et carbone (C) organique sur les différentes stations d'échantillonnage (moyenne des trois réplicats). PENF : Pénerf ; NODU : Nord Dumet ; ESTV : estuaire de la Vilaine ; MARE : Maresclé ; PMAE : Pont Mahé ; PENB : Pen Bé ; TURB : Turballe ; TCRO : Traict du Croisic ; CROI : Croisic Large ; PORS : Pornichet sable ; PORV : Pornichet vase ; ESTL : Estuaire Loire ; GILV : Pointe Saint Gildas vase ; GILS : Pointe Saint Gildas sable ; GOUR : Gourmalon ; COUP : La Coupelasse ; NOIR : Noirmoutier. Les barres d'erreur représentent les écarts type.

Les concentrations en carbone et azote organique mesurées sur chacun des sites d'échantillonnage sont présentées dans la figure 23. Les concentrations en carbone organique sont supérieures aux concentrations en azote organique sur l'ensemble de la zone. Les concentrations en carbone organique sont particulièrement élevées sur les points Pénerf, Nord Dumet, Estuaire de la Vilaine, Pornichet vase et Estuaire de la Loire, traduisant une matière détritique importante dans les sédiments de ces stations.

5.4. Recherche des kystes de *L. chlorophorum* dans le sédiment brut

Les observations morphologiques et les isoléments ont été réalisés sur six stations d'échantillonnage choisies selon un ordre spatial : quatre stations (Pénerf, Estuaire Vilaine, Nord Dumet et Pont Mahé) situées le plus au nord de la zone d'étude et deux stations (Pornichet vase et Pornic Gourmalon) positionnées plus au sud. Des eaux colorées vertes avaient été observées sur ces stations au cours de l'été 2018.

Les sédiments ont fait l'objet d'un tamisage à l'aide d'une maille de 125 μm afin d'éliminer les plus grosses particules, puis au moyen d'une maille de 20 μm , permettant de retenir les particules de tailles supérieures à 20 μm (figure 24).

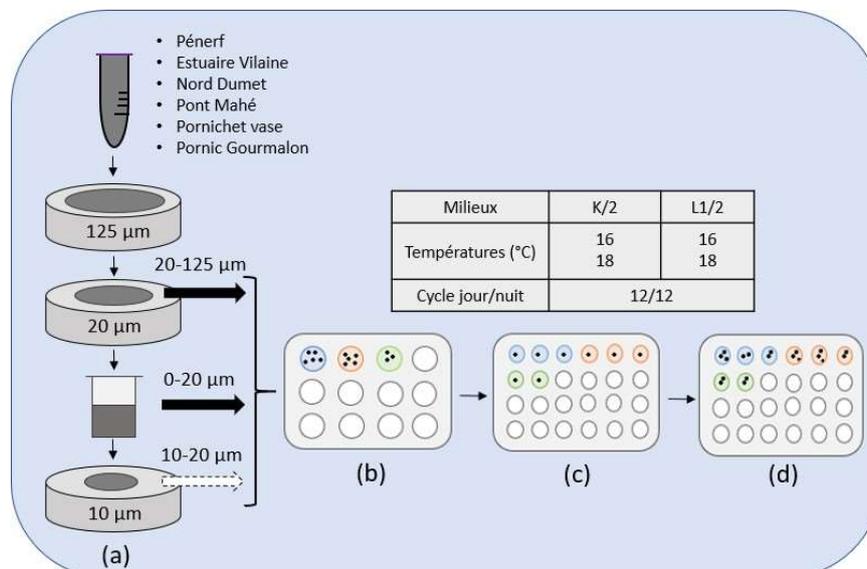


Figure 24 : Isolements des cellules végétatives dans les sédiments de six stations d'échantillonnage. (a) tamisage des sédiments, (b) répartition des sédiments dans des plaques de 12 puits, (c) isolement une à une des cellules végétatives des kystes, (d) prolifération de ces cellules.

Toutes les particules de taille inférieure à 20 μm ont été également tamisées sur un filtre en nylon d'une maille de 10 μm . Ainsi, trois catégories de tailles ont été obtenues : de 125 μm à 20 μm , de 20 à 10 μm , et < 20 μm .

Les sédiments calibrés ont été déposés dans des plaques de 12 puits contenant les milieux L1/2 ou K/2 et stockées à 16°C et à 18°C en cycle 12 :12 jour : nuit. Au total, 60 plaques de 12 puits ont ainsi été produites. Le nombre de plaques de 12 puits observées par jour est très variable dans la mesure où tout dépendait du nombre de cellules végétatives actives dont seulement certaines présentaient un réel intérêt.

À l'issue de deux semaines d'incubation, ces dites cellules ont été à nouveau réparties une à une dans 24 plaques constituées de 24 puits, soit un total de 576 isoléments. Chaque cellule isolée s'est multipliée, permettant ainsi de les observer plus facilement au microscope droit (Olympus CKX31, Tokyo Japon). Cette expérience a débuté le 4 février et s'est terminée le 29 avril 2019.

5.4.1. Extraction de l'ADN

Deux protocoles d'extraction de l'ADN environnemental à partir de sédiments ont été envisagés dans le but premièrement d'identifier la présence de kyste de *L. chlorophorum*, dont l'ADN est protégé à l'intérieur de la structure du kyste, via l'extraction de l'ADN intracellulaire et deuxièmement d'estimer l'ensemble de traces de *L. chlorophorum* dans les sédiments (cellules vivantes, kystes, cellules mortes) via l'extraction de l'ADN total.

5.4.2. Extraction de l'ADN intracellulaire

Pour accéder à l'ADN intracellulaire, un nettoyage de l'ADN extracellulaire a été utilisée par le réchauffement des sédiments, (Kim *et al.*, 2016 ; Kim *et al.*, 2017). Pour chaque échantillon, 1 g de sédiment a été placé dans un tube falcon de 15 mL, auquel 10 mL d'eau de mer filtrée à 45 µm ont été ajoutés. Puis, chacun des tubes primitifs a été subdivisé en 5 tubes microfuges de 2 mL, qui ont fait l'objet d'une centrifugation à 2000g pendant sept minutes. Après retrait du surnageant et l'ajout d'1 mL d'eau distillée, les tubes ont été placés au bain marie à 75°C pendant 10 minutes et retournés trois fois pendant l'opération. Les tubes ont été à nouveau centrifugés à 2000g pendant sept minutes. Enfin, pour deux tubes sur cinq, 0,20 g de sédiment ont été extraits avec le kit PowerSoil.

Dans un premier temps, ce protocole a été appliqué sur quatre stations : Pornichet vase, La Coupelasse, Saint Gildas vase, Pont Mahé recouvrant l'entièreté de la zone d'étude, aux fins de constater la présence ou l'absence de *L. chlorophorum*. Dans un second temps, 34 tubes de sédiment représentant les 17 stations en double exemplaire et quatre tubes de cultures témoins de *Scrippsiella* sp. ont été extraits, soit un total de 38 tubes.

En outre, la méthode de Bolch (1997) a également été réalisée sur les quatre stations précitées, afin de faire un tri conservant la matière organique. En effet, cette méthode permet de séparer les kystes des sédiments selon un gradient de densité. Les kystes ayant une densité comprise entre 1 et 1,4 mg.m⁻³, restent en suspension dans le surnageant, tandis que les sédiments plus denses, tombent dans le culot.

Une cuillerée équivalente à 1 gramme de sédiments pour les classes de taille 20-125 µm et < 20 µm, a été mélangée à de l'eau de mer dans un bécher, puis disposé dans un bac à ultrasons (1510 Branson) pendant 1 minute pour séparer les particules. Dans des tubes falcons de 15 mL, 10 mL de ce mélange sont ajoutés aux 3 mL de SPT (Sodium Polytungstate Monohydrate). Les tubes ainsi conçus, ont été centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant composé des kystes a été pipeté dans de nouveaux tubes qui ont permis l'extraction de l'ADN des kystes via la méthode de Kim et le kit PowerSoil.

5.4.3. Extraction de l'ADN total

Le kit PowerSoil Max a permis d'extraire l'ADN total à partir de 10 grammes de sédiments pour la totalité des 17 échantillons, traités par groupes de quatre.

5.5. Analyses PCR sur les extractions d'ADN intracellulaire et total

La PCR permet de dupliquer une séquence d'ADN ou d'ARN à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. Durant cette réaction, trois étapes se succèdent, avec tout d'abord la dénaturation qui permet de séparer les brins d'ADN, puis l'appariement des amorces sur les brins à une température propre à chaque couple amorces et enfin l'élongation des brins par l'action de la polymérase qui ajoute les nucléotides libres permettant ainsi d'amplifier la séquence d'ADN ciblée. Les PCR sur les échantillons sédimentaires ont été effectuées selon le mélange décrit ci-dessous (tableau 7) :

Tableau 7 : Mélange PCR pour les extractions d'ADN intracellulaire et total des sédiments.

Kit polymérase PCR Master Mix	Amorce sens	Amorce anti-sens	Echantillon	Eau
6,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	1 µL	12,5 µL

Les analyses de biologie moléculaire ont nécessité la mise en place d'amorces spécifiques à *L. chlorophorum*. En effet, à notre connaissance aucune amorce spécifique n'existait alors dans la littérature. Il a donc fallu dans un premier temps identifier de nouvelles amorces permettant d'amplifier des régions spécifiques de l'ADN ribosomal de ce dinoflagellé, et ensuite tester la sensibilité et spécificité de ces amorces.

5.5.1. Elaboration des amorces spécifiques de *L. chlorophorum*

L'ADN ribosomal est composé de régions très similaires entre les espèces comme le gène SSU et de régions plus spécifiques pour un grand nombre d'espèces tels que l'ITS et le LSU. Pour ces trois gènes, les séquences d'ADN ont été téléchargées sur le site NCBI, pour *L. chlorophorum* et le groupe le plus proche : *L. viride*, *Gymnodinium impudicum*, *Wangodinium sinense*, *Barrufeta bravensis*, *G. dorsalisulcum*, selon l'arbre phylogénétique de Luo *et al.*, (2018). Le logiciel MEGA version 5.2.1 a permis d'aligner et d'ajuster les séquences. Cet alignement a permis de définir un couple d'amorces spécifiques à l'espèce (tableau 8).

Tableau 8 : Amorces spécifiques de *L. chlorophorum* et ses caractéristiques.

Amorces spécifiques (396 pb)	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)
LEPICHLO_ITS_FW	TTTGACGTCATCATTCTATCATTCCCTTCGAT	53
LEPICHLO_ITS_RV	ACGCCCGACGTCGCGCAGCAAACAAGCTATC	63

Par la suite, les séquences d'ADN de *L. chlorophorum* (DQ499645, KJ508396 et JX262495) ont été comparées plus particulièrement avec celle de *L. viride* (AY331681), puisque ces deux espèces sont les plus proches génétiquement. Sur le gène ITS, un couple d'amorces spécifiques au genre a ainsi été désigné (tableau 9). Ces amorces ont été comparées avec toutes les séquences universelles répertoriées dans le logiciel BLAST, afin de garantir leur spécificité.

Tableau 9 : Amorces spécifiques du genre *Lepidodinium* et ses caractéristiques.

Amorces spécifiques(80 pb)	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)
LEPI_FW	CACGGGGCATGCTGCTTGCATCTCTTGCG	63,4
LEPI_RV	AGTAAGCTGGCTGTCGAAAGGA	52

5.5.2. Test de la spécificité des amorces spécifiques

Les cultures *L. chlorophorum* (Kervel KL1C4), *L. chlorophorum* (Roscoff RCC1489), *Karlodinium verificum*, *Prorocentrum lima*, *Akashiwo sanguinea*, *Scrippsiella sp.*, *Heterosigma akashiwo* et *Gymnodinium impudicum*, *Gymnodinium aureolum* et *Alexandrium minutum*, disponibles au laboratoire de Concarneau, ont servi de témoins dans les manipulations de PCR, pour la vérification de spécificité des amorces et ont été extraites au moyen du kit PowerWater. En plus des couples d'amorces spécifiques à *L. chlorophorum*, le couple DIR/D3B constitué de 1000 pb, spécifique des organismes eucaryotes, renseignant sur la présence d'ADN, a été utilisé.

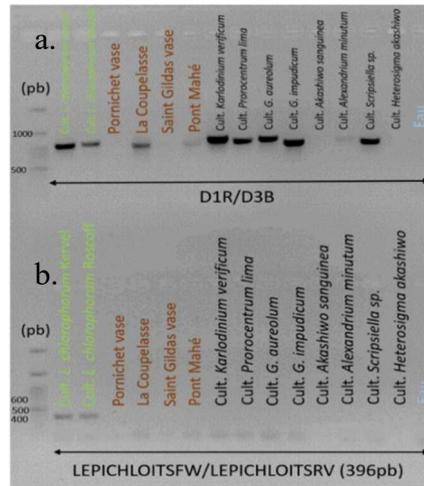


Figure 25 : Gel (a) vérifiant les extractions des 10 cultures avec le kit PowerWater et des sédiments de quatre stations avec le kit PowerSoil en D1R/D3B et (b) testant la spécificité du couple spécifique à l'espèce (396 pb) sur ces mêmes paramètres avec l'eau comme témoin négatif.

Les bandes présentes avec l'utilisation du couple d'amorces D1R/D3B (Figures 25) confirment que les cultures sont correctement extraites, excepté pour *Akashiwo sanguinea* et *Heterosigma akashiwo* qui n'ont pas émis de signal. Sur la Figure 25a, les stations Pornichet vase et Saint Gildas vase n'émettent pas de signal. Le second couple spécifique à *L. chlorophorum* (396pb) (figure 25b) montre un signal uniquement pour les deux cultures KL1C4 et RCC1489. Ainsi, nous avons vérifié la spécificité des amorces (396 pb) qui ne répondent que pour les deux cultures de *L. chlorophorum*. Les deux stations La Coupelasse et Pont Mahé ont été correctement extraites mais n'ont pas émis de signal avec le couple d'amorces spécifiques.

5.5.3. Test de la sensibilité des amorces spécifiques

Des cellules (1, 10, 100 et 1000) de la culture de *L. chlorophorum* KL1C4 ont été ajoutées dans les échantillons des stations La Coupelasse, plus sableuse, et Pont Mahé, plus vaseuse afin de vérifier la quantité d'ADN de *L. chlorophorum* nécessaire pour que les amorces répondent en PCR. L'unique cellule et les 10 cellules ont été pipetées à l'œil nu tandis que la méthode de Fuchs-Rosenthal a permis de calculer la quantité requise pour prélever 100 et 1000 cellules.

En ce qui concerne le test de sensibilité des amorces, les deux couples émettent des signaux lorsque 100 et 1000 cellules de *L. chlorophorum* sont présentes dans les sédiments sableux (La Coupelasse) et vaseux (Pont Mahé) (figure 26b). Les tubes montrant ces signaux ont été séquencés permettant d'obtenir des séquences de *L. chlorophorum*, validant ainsi le signal perçu sur le gel. En dessous de 100 cellules, aucun signal n'apparaît, témoignant que ces amorces ont une faible sensibilité dans le sédiment.

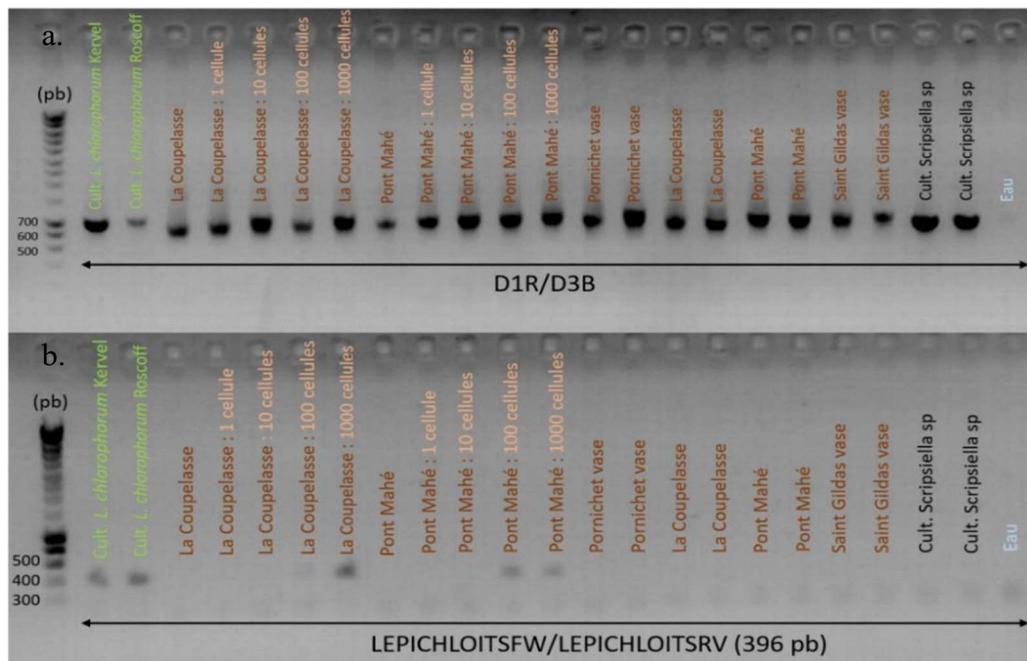


Figure 26 : Gels (a) vérifiant les extractions avec le kit PowerSoil, avec le couple D1/D3 et (b) testant la sensibilité des amorces spécifiques à l'espèce *L. chlorophorum* (396 pb) pour deux stations : La Coupelasse et Pont Mahé auxquelles ont été ajoutées 1, 10, 100 et 1000 cellules végétatives de la culture de *L. chlorophorum* KL1C4. Le couple spécifique a également été testé sur quatre stations extraites en ADN intracellulaire en doublons. Les deux cultures de *Scripsiella* sp. extraites avec le kit PowerSoil et l'eau servent de témoins.

5.6. Recherche des kystes de *L. chlorophorum* extraits du sédiment par la méthode de Bolch

La deuxième approche, décrite ci-après, consiste à extraire tous les kystes du sédiment (méthode de Bolch, 1997) et ensuite à analyser les kystes uniques extraits du sédiment.

5.6.1. Observations morphologiques

La méthode de Bolch a été mise en œuvre sur 12 tubes contenant des sédiments de trois stations à raison de quatre tubes par station (Pénerf, Estuaire Vilaine et Nord Dumet). Les kystes ont été déposés sur une lame aux fins d'examen au microscope inversé (Olympus IX70) à un grossissement variant entre les objectifs $\times 10$ et $\times 40$ et au microscope droit (Olympus BX41) à un grossissement $\times 100$, permettant de déceler plus de détails facilitant leur identification. La première étape a consisté à observer les kystes de dinoflagellés connus déjà identifiés et à les différencier intraspécifiquement et interspécifiquement.

Sur les trois classes de taille utilisées, le plus grand nombre de cellules végétatives a été observé pour la classe de taille supérieure à $20 \mu\text{m}$ (figure 27). En revanche, les classes de tailles comprises entre $0 - 20 \mu\text{m}$ et $10 - 20 \mu\text{m}$ présentent moins de cellules et ne sont pas très différentes. L'étape de filtration à $10 \mu\text{m}$ étant très longue à exécuter, seule la classe de taille de 0 à $20 \mu\text{m}$ a été retenue.

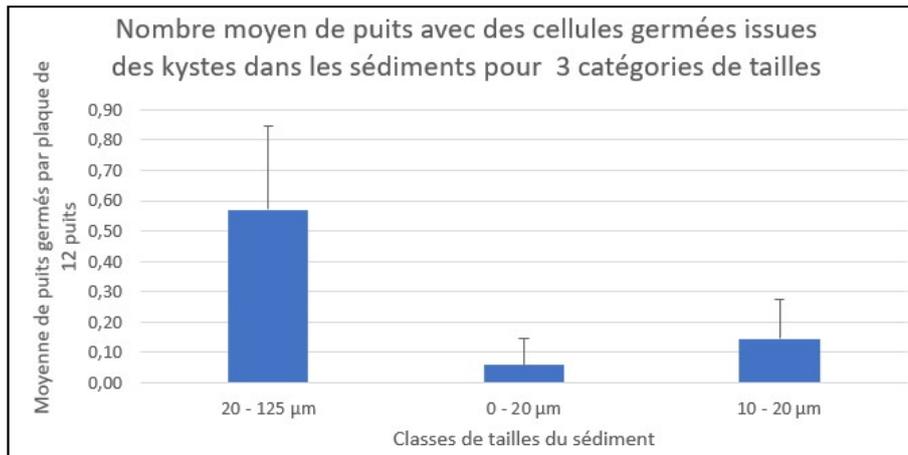


Figure 27 : Nombre moyen de puits contenant des cellules végétatives dans les plaques de 12 puits.

5.6.2. Germination des kystes

Les structures, les processus, les formes et les couleurs des différents kystes de dinoflagellés ont pu être observés au microscope (figure 28). Certains d'entre eux connus et ciblés ont germé et ont permis de constater l'archéopyle, qui est parfois un critère supplémentaire d'identification de l'espèce. Les cellules végétatives issues des kystes ont également confirmées cette reconnaissance.

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de très nombreux kystes dont la plupart avaient été identifiés auparavant (Andersen-Leitao *et al.*, 1983, Larrazabal, 1987), selon la liste ci-après : *Votadinium spinosum*, *Lingulodinium machaerophorum*, kyste de *Gymnodinium impudicum*, kyste de *Protoperidinium oblongum* complexe, kyste de diplopsalid, kyste de *Gonyaulax verior*, *Spiniferites belerius*, kyste d'*Alexandrium minutum*, kyste brun épineux, *Lejeunecysta* sp., kyste de *Polykrikos schwartzii*, kyste de *Archaeperidinium minutum*.

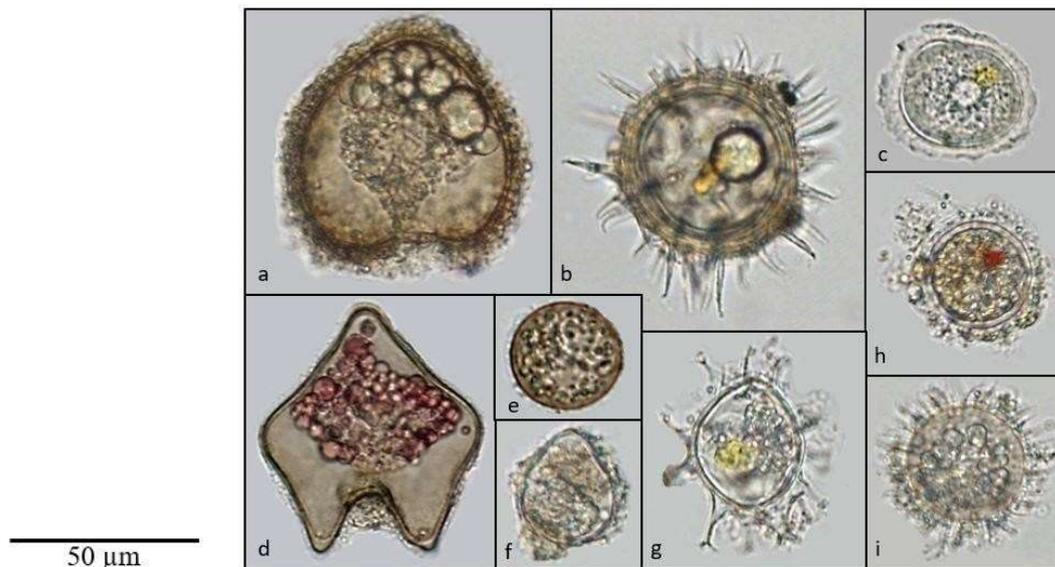


Figure 28 : Diversité des kystes communs au large des estuaires de la Loire et de la Vilaine. (a) *Votadinium spinosum*, (b) *Lingulodinium machaerophorum*, (c) Kyste de *Gymnodinium impudicum*, (d) Kyste de *Protoperidinium oblongum* complexe, (e) Kyste de diplopsalid, (f) Kyste de *Gonyaulax verior*, (g) *Spiniferites belerius*, (h) Kyste d'*Alexandrium minutum*, (i) Kyste brun épineux.

5.7. Kystes analysés en cellule unique en PCR

80 kystes isolés en cellule unique ont été analysés par PCR. Les expériences se sont concentrées tout d'abord sur les kystes (29 kystes) présentant des pigments verts similaires à ceux des cellules végétatives (figure 29).

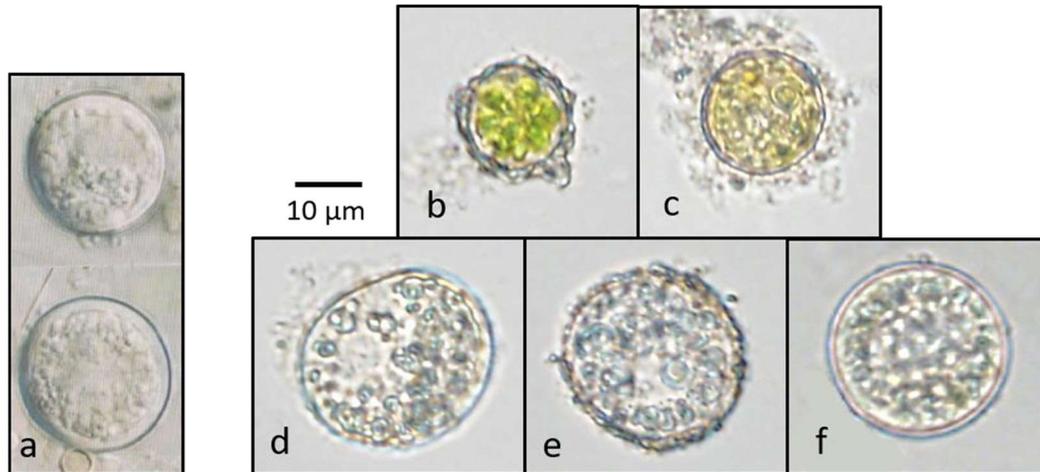


Figure 29 : Identification de kystes en cellule unique en PCR. (a) Kystes de *L. chlorophorum* Sournia et al., (1992), (b) *Poterioochromonas malhamensis*, (c) Kyste de dinoflagellé, (d) Kyste de Cercozoa, (e) Kyste de cilié, (f) Kyste brun de dinoflagellé.

Les résultats moléculaires des kystes ont permis de mettre en évidence l'espèce d'eau douce *Poterioochromonas malhamensis* (figure 29b), le kyste du dinoflagellé (figure 29c) est apparenté à l'espèce *Ensiculifera* sp., celui du *Cercozoa* (figure 29d) est proche de l'espèce *Ebria tripartita* et celui du cilié (figure 29e) a également été identifié avec une parenté égale à 91% avec l'espèce *Strombidiniopsis batos*. De plus, certains kystes (figure 29f), se rapprochent morphologiquement des kystes (Figure 29a) observés par Sournia et al., (1992) dans les échantillons.

5.8. Recherche des kystes de *L. chlorophorum* à partir du mélange des cultures *in vitro* et de la culture monoclonale KL1C4

Seules les espèces qui se reproduisent sexuellement sont capables de créer des kystes de résistance. Pour l'obtention de ces kystes, les deux souches de *L. chlorophorum*, KL1C4 et RCC1489 ont été croisées. 10 mL de chacune des souches et 10 mL du milieu L1 ont été mélangées dans une flasque placée dans une enceinte à 16°C. L'expérience a débuté le 8 avril 2019, avec des observations hebdomadaires, le premier mois. D'autres observations du premier mélange non repiqué daté du 8 avril 2019, ont été effectuées le 6 juin 2019, soit après 2 mois d'incubation. Les deux souches monoclonales ont également été observées quotidiennement la première semaine puis mensuellement. Toutes les cultures ont été repiquées à intervalles de 15 jours. A noter que la culture KL1C4 non repiquée pendant quatre mois a également fait l'objet d'une surveillance régulière.

Les deux cultures monoclonales KL1C4 et RCC1489 sont composées de cellules de *L. chlorophorum* végétatives que l'on retrouve dans la colonne d'eau (figure 30).



Figure 30 : Cellule végétative de *L. chlorophorum* observée dans la culture monoclonale KL1C4.

Des kystes temporaires de couleur verte (Figure 31a) ont été constatées régulièrement lorsque les cellules végétatives sont isolées aux fins d'observations microscopiques. L'isolement réalisé au moyen d'une micropipette, stresse les cellules qui forment alors ces kystes.

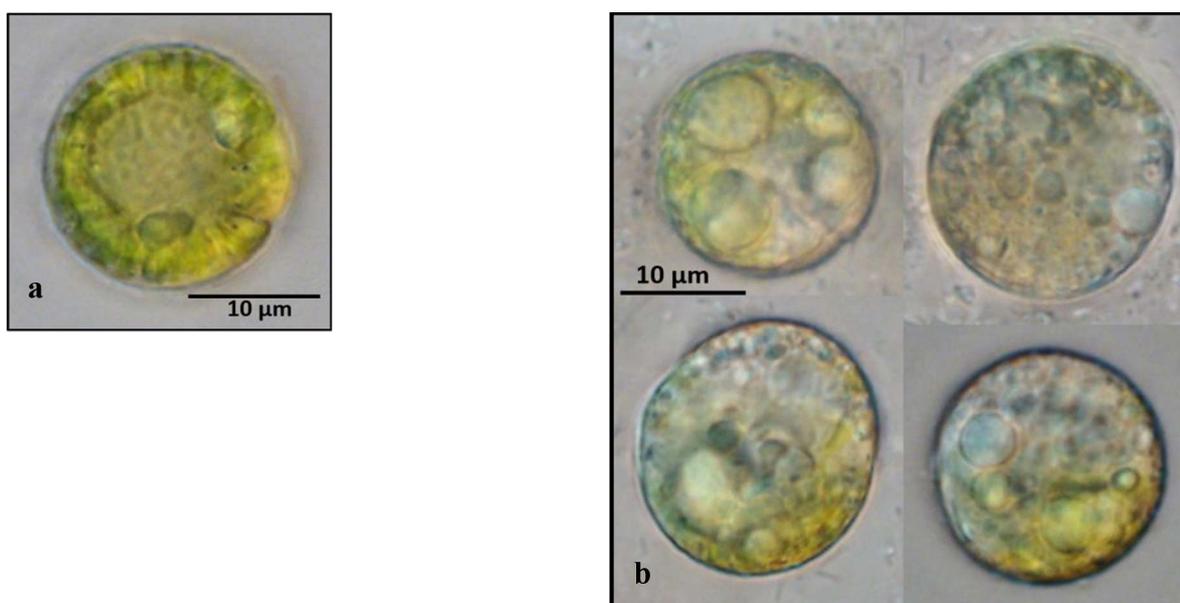


Figure 31 : (a) Kyste temporaire observé dans la culture monoclonale KL1C4 repiquée deux jours auparavant. (b) Kystes temporaires observés dans le mélange des deux cultures de *L. chlorophorum* incubé deux mois sans repiquage et dans la culture monoclonale KL1C4 incubée quatre mois sans repiquage.

Ces mêmes kystes temporaires ont été aussi aperçus dans le mélange des deux cultures incubées deux mois sans repiquage et dans la culture monoclonale KL1C4 incubée quatre mois sans repiquage. Ces kystes présentent toujours des pigments verts, qui sont néanmoins atténués par rapport aux kystes temporaires de la culture repiquée quotidiennement (figure 31b). De plus, dans le mélange des deux cultures et dans la culture monoclonale KL1C4, seuls des kystes temporaires ont été aperçus durant le premier mois d'observations.

Par ailleurs, après deux et quatre mois d'incubation respectivement, des kystes sans pigments verts, de couleur grise semblables aux photos prises par Sournia et al., (1992) ont été observés (figure 32). Ces kystes très souvent entourés de mucus, ont été isolés dans une plaque de 48 puits afin de les faire germer et vérifier ainsi s'ils sont vivants. Après une semaine d'incubation, aucune cellule végétative ne s'est formée. Enfin, dans ces cultures, aucune cellule porteuse de quatre flagelles, caractéristiques du stade sexué planozygote, n'a été mise en évidence. Cependant, une double membrane a été visualisée chez de nombreux kystes, suggérant la présence de kystes de résistance sexués.

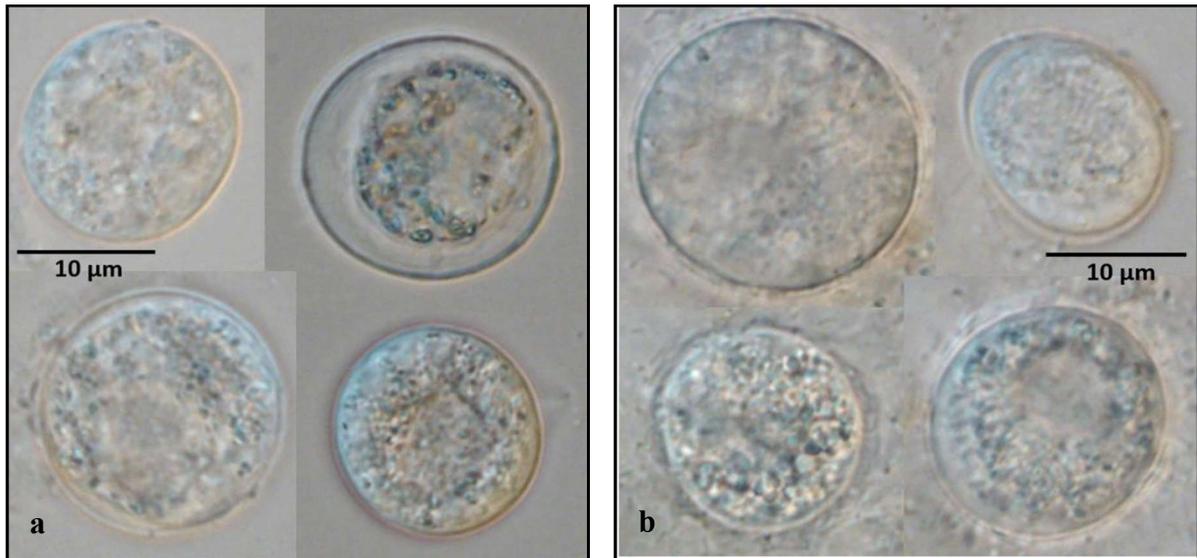


Figure 32 : (a) Kystes constatés dans la culture monoclonale KL1C4 après quatre mois d'incubation sans repiquage. (b) Kystes présents dans le mélange in vitro des deux cultures de *L. chlorophorum* après deux mois d'incubation sans repiquage.

5.9. Conclusions et perspectives

L'objectif de cette action était de vérifier la présence de kystes dans le sédiment naturel et de cartographier leur distribution spatiale sur la zone Vilaine-Loire. D'après les analyses conduites, aucun kyste de *L. chlorophorum* correspondant aux critères morphologiques identifiés par Sournia et al., (1992) n'a été identifié dans les échantillons de sédiment récoltés. Cependant, des formes de résistance ont pu être observées dans des cultures à l'instar des observations réalisées par Sournia et al. (1992). La recherche de kystes dans les sédiments a été complétée par une approche de PCR classique en amplifiant la région de l'ITS de l'ADN ribosomique et en utilisant des amorces spécifiques à l'espèce. Cette recherche visant à démontrer la présence de formes de résistance benthiques dans les sédiments échantillonnés est cependant restée infructueuse, soit par l'absence de telles formes, soit par l'inaccessibilité de l'ADN (problème d'amplification de l'ADN dans les sédiments).

Sur la base de ce constat, de nouveaux travaux ont été conduits et sont encore en cours, afin de répondre aux objectifs fixés dans le cadre de l'action 3 du projet EPICE. Ainsi de nouvelles actions ont été menées dans le cadre des projets LepidoPen¹⁴ (2019-2020) et du projet Piccolo¹⁵ (2021).

En effet de nouvelles analyses ont été réalisées au cours de l'année 2021 sur l'ADN extrait des échantillons de sédiments récoltés dans le cadre du projet EPICE. Cet ADN a été amplifié et a été envoyé pour séquençage au printemps. Les résultats devraient être disponibles à la fin de l'été. Après leur traitement en bio-informatique il sera alors possible d'avoir une description précise de la communauté de kystes présente dans le sédiment de chacune des stations échantillonnées en 2019 dans le cadre du projet EPICE, et devraient nous permettre de conclure sur la présence ou non de kystes de *L. chlorophorum* dans les sédiments superficiels au large de la Loire et de la Vilaine.

¹⁴ LepidoPen : Financement Région Pays de la Loire, 2019-2021 - <https://wwz.ifremer.fr/lermpl/Etudes/Ecosystemes-marins/LEPIDO-PEN>

¹⁵ Piccolo : Financement GDR Phycotox, 2021 - Recherche de formes de résistance de *LePIdodinium Chlorophorum* par analyse d'ADN environnemental dans la COLOnne d'eau en Bretagne sud.

Par ailleurs, il restait à vérifier si ces efflorescences régulières dans la zone Loire-Vilaine pourraient dériver d'une germination et/ou prolifération de formes de résistance temporaires de *L. chlorophorum*, non pas dans le sédiment, mais dans la colonne d'eau pendant la saison hivernale. Pour vérifier cette hypothèse, un échantillonnage a été réalisé, pendant les périodes hivernales de 2019-2020 et 2020-2021. Les échantillons ont été récoltés tous les 15 jours, de septembre à mars, sur 2 stations, « Ouest Loscolo » (au large de la Vilaine) et « Basse Michaud » (au large de la Loire) et à 3 profondeurs (i.e. surface, mi-profondeur et fond). Afin d'évaluer la présence ou l'absence d'ADN de *L. chlorophorum* dans la colonne d'eau, l'ADN environnemental a été prélevé à chaque échantillonnage sur filtres (3µm). Les analyses génétiques prévues ne permettront pas de discriminer quel type de forme de résistance *L. chlorophorum* pourrait développer (kyste ou cellule de résistance temporaire), mais il sera au moins possible de mettre en évidence la présence potentiellement rare de cette espèce pendant l'hiver et de proposer que des cellules pélagiques pourraient être l'inoculum des efflorescences printanières. A l'instar des échantillons récoltés dans le sédiment, les extractions et amplifications de l'ADN récolté sur filtre ont été réalisées au cours du printemps et envoyées en séquençage. Les résultats devraient être disponible à la fin de l'été 2021.

6. Références

- Aminot A., Kérouel, R. (2004) Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses (in French). Ifremer, Plouzané, France.
- Andersen-Leitao, M., Lassus, P., Maggy, L. B. C., Chauvin, J., & Truquet, P. (1983). Phytoplankton des zones mytilicoles de la baie de Vilaine et Intoxication par les coquillages. *Revue de Travaux de l'Institut Pêches maritimes*, 46(3), 233–266.
- Bizzozero, L. (2017). Directive cadre sur l'eau. Bassin Loire-Bretagne. Contrôle de surveillance dans les masses d'eau côtière et de transition. Actions menées par Ifremer en 2015. RST/LER/MPL/17.12.
- Bolch, C. J. S. (1997). The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia* 36 (6), 472–478.
- Cauwet G (1975) Optimisation d'une technique de dosage du carbone organique des sédiments. *Chemical Geology* 16, 59–63.
- Chapelle, A., Lazure, P. and Menesguen A. (1994). Modelling eutrophication events in a coastal ecosystem. Sensitivity analysis. *Est. Coast. Shelf Sci.* 39, 529–548.
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S. and Veron, B. (2008). Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquat. Microb. Ecol.*, 51, 1–11.
- Claussen, U., Zevenboom, W., Brockmann, U., Topcu, D., Bot, P., 2009. Assessment of the eutrophication status of transitional, coastal and marine waters within OSPAR. *Hydrobiologia* 629, 49–58.
- Cloern, J.E. (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 201, 223–253.
- De Jonge, V.N., Elliot, M. and Orive, E. (2002). Causes, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem: eutrophication. *Hydrobiologia* 475/476, 1–19.
- Díaz, R., Rabalais, N.N. and Breitburg, D.L. (2012). Agriculture's impact on aquaculture: Hypoxia and eutrophication in marine waters (No. COM/TAD/CA/ENV/EPOC(2010)16/FINAL), Water Quality and Agriculture: Meeting the Policy Challenge. Organization For Economic co-operation and development. Directorate for Trade and Agriculture.
- Gavalás-Olea, A., Álvarez, S., Riobó, P., Rodríguez, F., Garrido, J.L. and Vaz, B., 2016. 19,19'-Diacyloxy Signature: An Atypical Level of Structural Evolution in Carotenoid Pigments. *Organic Letters* 18, 4642–4645.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q. et al. (2008) Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus. *Harm. Algae* 8, 1: 3–13.
- Iriarte, J.L. (2005). Relationship between biomass and enzymatic activity of a bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) in southern Chile (41 S): a field approach. *J. Plank. Res.* 27, 159–166.
- Kim, J. H., Kim, J. H., Wang, P., Park, B. S., & Han, M. S. (2016). An improved quantitative real-time PCR assay for the enumeration of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) cysts

- using a DNA debris removal method and a cyst-based standard curve. *PloS one*, 11(1), e0145712.
- Kim, J. H., Tillmann, U., Adams, N. G., Krock, B., Stutts, W. L., Deeds, J. R., Han, M. S., & Trainer, V. L. (2017). Identification of *Azadinium* species and a new azaspiracid from *Azadinium poporum* in Puget Sound, Washington State, USA. *Harmful Algae*, 68, 152-167.
- Klouch, K. Z., Schmidt, S., Andrieux-Loyer, F., Le Gac, M., Hervio-Heath, D., Qui-Minet, Z. N., Bigéard, E., Guillou, L., & Siano, R. (2016). Historical records from dated sediment cores reveal the multidecadal dynamic of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Bay of Brest (France). *FEMS microbiology ecology*, 92(7).
- Larrazabal, M. E., (1987) Etude des kystes de dinoflagellés en Baie de Vilaine. Direction Environnement et Recherches Océaniques, rapport IFREMER, 44 pp.
- Luo, Z., Hu, Z., Tang, Y., Mertens, K. N., Leaw, C. P., Lim, P. T., Teng, S. T., Wang, L., & Gu, H. (2018). Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Wangodinium sinense* gen. et sp. nov.(Gymnodiniales, Dinophyceae) and revisiting of *Gymnodinium dorsalisulcum* and *Gymnodinium impudicum*. *Journal of Phycology*, 54(5), 744-761.
- Maggi, P., Mastouri, A. and Soulard, L. (1982). Analyse des facteurs climatiques susceptibles de jouer un rôle dans les apparitions d'eaux colorées en baie de Vilaine, durant l'année 1982 (No. DERO-85 01-MR). 33p.
- Marie, D., Rigaut-Jalabert, F. and Vaultot, D., 2014. An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples: An Improved Protocol for Flow Cytometry Analysis. *Cytometry Part A* 85, 962–968.
- Merceron, M. (1987). Mortalités de poissons en baie de Vilaine (juillet 1982). Causes, mécanismes et propositions d'actions. Rapport Ifremer.
- Nixon, S.W. (1995). Coastal marine eutrophication. A definition, social causes and future concern. *Ophelia* 41,199-219.
- Paerl, H.W. (1988). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnol. Oceanogr.* 33, 823–847.
- Ramaiah, N., Furuya, K., 2002. Seasonal variations in phytoplankton composition and transparent exopolymer particles in a eutrophicated coastal environment. *Aquat. Microb. Ecol.* 30, 69–82.
- Siano, R., Chapelle, A., Antoine, V., Michel-Guillou, E., Rigaut-Jalabert, F., Guillou, L., Hégaret, H., Leynaert, A., & Curd, A. (2020). Citizen participation in monitoring phytoplankton seawater discolorations. *Marine Policy*. 11 pp.
- Smith, V.H., Joye, S.B. and Howarth, R.W. (2006). Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 51(1, part 2), 351–355.
- Souchu, P., Cochenec-Laureau, N., Ratmaya, W., Retho, M., Andrieux, F., Le Merrer, Y., Barille, L., Barille, A.-L., Goubert, E., Plus, M., Laverman, A. (2018). Diagnostic étendu de l'eutrophisation (DIETE). Rôle des sédiments dans le cycle des nutriments et impacts sur l'eutrophisation de la baie de Vilaine (2014-2017). Rapport de fin de contrat - Agence de l'Eau Loire-Bretagne (AELB) No. RST/LER/MPL/18.04. Ifremer. 237 pp.
- Sournia, A., Belin, C., Billard, C., Catherine, M., Erard Le Denn, E., Fresnel, J., Lassus, P., Pastoureaud, A. and Soulard, R. (1992). The repetitive and expanding occurrence of a green, bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) on the coast of France. *Cryptogam. Algol.* Paris 13, 1–13.

- Sourrisseau, M., Jegou, K., Lunven, M., Quere, J., Gohein, F. and Bryere, P. (2016). Distribution and dynamics of two species of Dinophyceae producing high biomass blooms over the French Atlantic Shelf. *Harm. Algae* 53, 53–63.
- Stolte, W., Scatasta, S., Graneli, E., Weikard, H.P., Van Ierland, E. (2001). ECOHARM: The socio-economic impact of harmful algal blooms in european marine waters. Department of Biology and Environmental Science, Kalmar University, Sweden & Environmental Economics and Natural Resources Group, Wageningen University, The Netherlands.
- Suikkanen, S., Pulina, S., Engstrom Ost, J., Lehtiniemi, M., Lehtinen, S. and Brutemark, A. (2013). Climate change and eutrophication induced shifts in Northern summer plankton communities. *PLoS ONE* 8(6), e66475.

ANNEXES

➤ Structure physico-chimique de la colonne d'eau

La variabilité temporelle des paramètres physico-chimiques (température, salinité et oxygène dissous) le long de la colonne d'eau, au cours de l'année 2018 sur les deux stations d'étude est présentée sur la figure 33 ci-dessous.

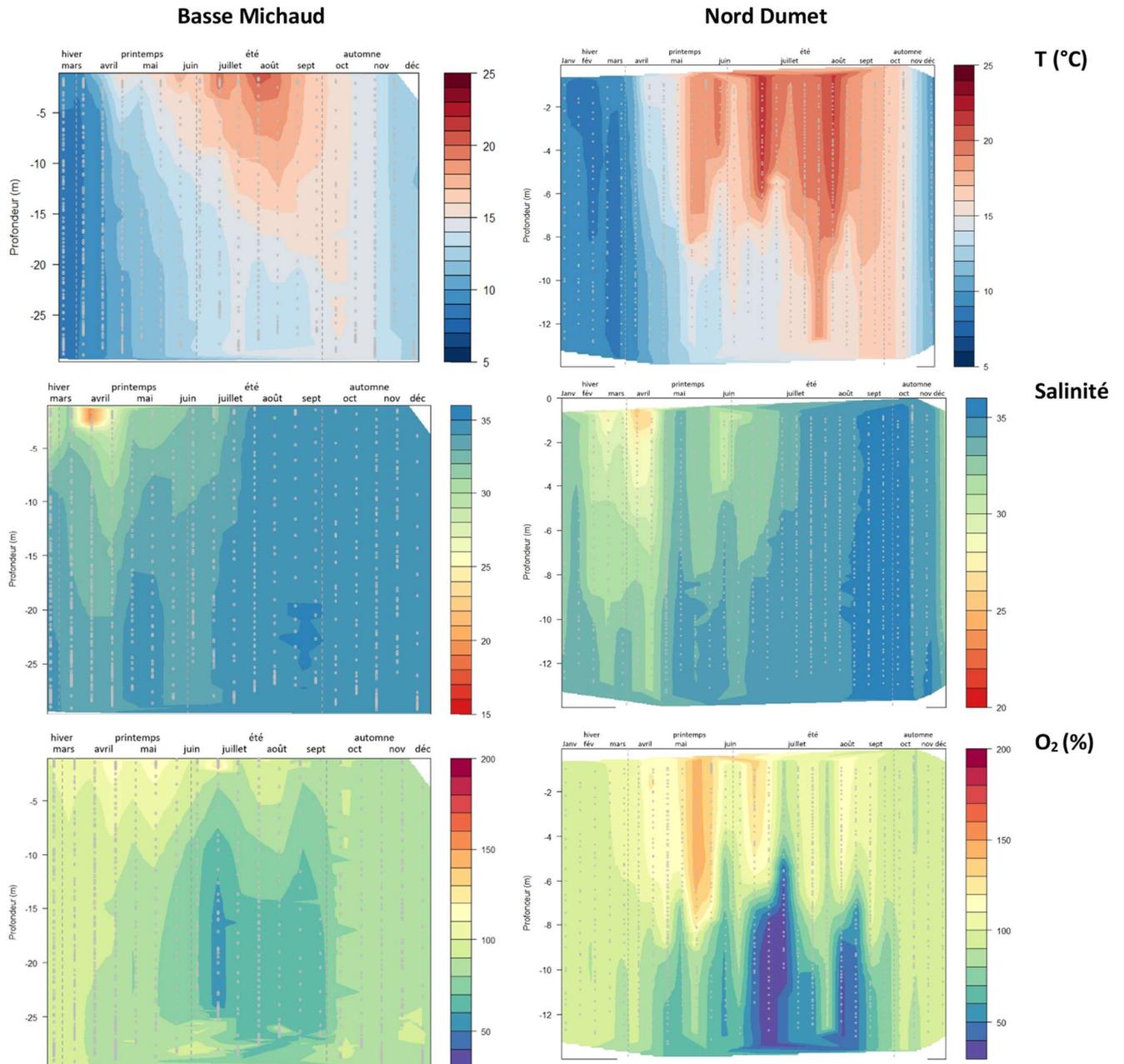


Figure 33 : Profils verticaux de température (°C), salinité et oxygène dissous (% saturation) sur les stations Basse-Michaud et Nord Dumet au cours de l'année 2018.

Sur les deux stations, les températures hivernales sont homogènes sur la colonne d'eau avec des valeurs variant de 8 à 9°C. La stabilisation de la colonne d'eau, les conditions météorologiques et la baisse des débits des fleuves ont permis à la stratification thermique de

se mettre en place à mi-profondeur au début du printemps. La station Nord Dumet présente au mois de juillet une température élevée sur l'ensemble de la colonne d'eau comprise entre 18 et 22 °C. En automne, l'ensemble de la colonne d'eau était thermiquement homogène sur les 2 stations avant un refroidissement en novembre. Concernant la salinité, une baisse marquée de la salinité de surface est observée sur les deux stations au cours du mois d'avril.

Cette chute est à mettre en relation avec de forts débits de la Loire et de la Vilaine à cette période. Une nouvelle dessalure de surface est observée au cours du mois de juin sur la station Nord Dumet, et peut-être mise en relation avec les nombreux orages reportés à cette période.

L'année 2018 est marquée par des amplitudes de variations surface/fond de saturation en oxygène plus importantes sur la station Nord Dumet que sur la station Basse-Michaud. Ainsi, des valeurs maximales d'oxygène dissous ont été observées en période printanière, traduisant une production intense de phytoplancton à cette période, avec des saturations proches de 140% en baie de Vilaine sur une profondeur de 7 m. Sur cette même station en juillet et août, on note une baisse significative de la saturation en oxygène sur une grande partie de la colonne d'eau avec des niveaux de saturation atteignant des minimas à proximité du fond (< 40%).

➤ **Nutriments**

Les données acquises au cours du projet EPICE ont permis de suivre les concentrations en nutriments à proximité du fond sur les deux stations qui ne sont pas suivies dans le cadre des réseaux de surveillance REPHY DCE (figure 34). En surface, les nutriments suivent une évolution classique au cours de l'année sur les deux stations, avec de fortes concentrations en nitrate, silicate et phosphate en hiver, suite aux apports par la Loire et la Vilaine. Ces nutriments sont ensuite consommés au printemps par le bloom phytoplanctonique. Au cours de la période estivale, on note une augmentation de l'ammonium, du phosphate et dans une moindre mesure de la silice, proximité du fond. Cette augmentation peut être mise en relation avec le recyclage des blooms phytoplanctoniques printaniers ayant sédimenté sur le fond. Cette augmentation des concentrations en nutriments à proximité du fond peut conférer un avantage compétitif à certaines espèces phytoplanctoniques capables de migrer dans la colonne d'eau qui peuvent alors accéder à cette source de nutriments.



Figure 34 : Evolution des concentrations en éléments nutritifs sur les deux stations d'étude, Nord Dumet et Basse-Michaud au cours de l'année 2018 en surface et sur la colonne d'eau.

