

Étude du cycle de reproduction et de la diversité génétique spatio-temporelle chez le dinoflagellé toxique Alexandrium minutum

Aliou Dia

▶ **To cite this version:**

Aliou Dia. Étude du cycle de reproduction et de la diversité génétique spatio-temporelle chez le dinoflagellé toxique Alexandrium minutum. Génétique des populations [q-bio.PE]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2013. Français. NNT : 3072185 . tel-00960274

HAL Id: tel-00960274

https://theses.hal.science/tel-00960274

Submitted on 17 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Génétique des populations

École Doctorale Diversité du Vivant

Présentée par

M. Aliou Dia

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Étude du cycle de reproduction et de la diversité génétique spatio-temporelle chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum*

Soutenue le 16 Décembre 2013, devant le jury composé de :

Dr. Sophie Arnaud-Haond	Chargée de recherche, IFREMER, Sète	**Rapporteur**
Dr. Esther Garcés	Chargée de recherche, Institut de Ciències del Mar, Barcelona	**Rapporteur**
Pr. Patrick Cormier	Professeur, UPMC - Station Biologique de Roscoff	**Examinateur**
Dr. Hélène Moné	Directrice de recherche, CNRS - Université de Perpignan	**Examinatrice**
Dr. Raffaele Siano	Chargé de recherche, IFREMER, Brest	**Examinateur**
Pr. Christophe Destombe	Professeur, UPMC - Station Biologique de Roscoff	**Co-directeur de thèse**
Dr. Laure Guillou	Directrice de recherche CNRS - Station Biologique de Roscoff	**Co-directrice de thèse**

UMR 7144 Adaptation et Diversité en Milieu Marin
Station Biologique de Roscoff
29680 Roscoff

Je dédie ce travail à mon père et à mon frère Abdoulaye

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mes deux co-directeurs de thèse Christophe Destombe et Laure Guillou. Je vous remercie de m'avoir reçu en tant que doctorant et surtout de m'avoir accompagné durant ces trois années de pur bonheur. Vous avez toujours été positifs et vous trouviez à chaque fois les bons mots pour me remonter le moral dans les moments de doutes, et ces moments j'en ai eu au cours de cette thèse. Merci à Myriam Valero, non seulement de m'avoir accueilli dans l'équipe BEDIM mais surtout pour ton implication dans ce projet de thèse et ta disponibilité à chaque fois que j'avais des questions.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon Comité de thèse : Hervé Moreau, Yannis Michalakis, Thomas Broquet et Myriam Valero qui ont suivi ce travail avec un grand intérêt. Vos discussions et les conseils que vous m'avez prodigués lors de nos rendez-vous annuels m'ont permis de progresser dans mes réflexions et de me faire prendre plus de recul sur les priorités de cette thèse. Trouvez ici toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse. C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté d'évaluer mon travail. Merci à Sophie Arnaud-Haond et Esther Garcés qui ont accepté le rôle de rapporteurs, Patrick Cormier celui du Président du jury, Raffaele Siano et Hélène Moné le rôle d'examinateurs.

Je tiens à remercier Bernard Kloareg directeur de la station biologique, François Lallier, directeur de l'UMR 7144 pour leur accueil à la station et au sein de l'UMR7144. J'aimerai aussi remercier Céline Manceau grâce à qui les paperasses administratives semblent plus simples qu'elles ne le sont.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de travailler dans deux équipes qui toutes les deux ont une ambiance parfaite. Je tiens donc à remercier tout le personnel de l'équipe BEDIM ainsi que celui du groupe plancton.

Je remercie Denis Roze pour ta disponibilité, toutes les discussions que nous avons pu avoir ensemble, Camille Gervais d'avoir relu mon introduction de thèse.

Pour arriver aux données des microsatellites, le chemin était rempli d'embuches, mais c'était sans compter sur ma détermination et surtout l'expertise de Stéphane Mauger à qui je suis très reconnaissant pour son travail remarquable. La biologie moléculaire nous a permis de passer un petit séjour à l'université de Lund (Suède) avec Stéphane, cette expérience était autant enrichissante techniquement (formation AFLP) qu'humainement!

Je tiens à remercier mes voisins de bureau actuels et tous ceux qui ont été de passage depuis le début de mon séjour bedimien. Marie Rescan, Jérôme Coudret, Lucia Couceiro, Alejandro Montecinos, Marine Robuchon (future Dr dans quelques mois), Alexandre Geoffroy, Stacy Krueger, pour l'ambiance conviviale qui a toujours régné dans ce bureau, je vous dis merci. Ce bureau international où la sympathie est de mise, Marie Rescan notre geek est toujours de bonne humeur, est-ce un effet de la modélisation ou de la consommation modérée de chocolat? Affaire à suivre ! Lucia je te remercie pour tous les conseils, notamment pour les analyses des données. Grâce à toi j'ai appris quelques mots en espagnol, qui j'en suis sûr me seront utiles un

jour. Je remercie Jérôme Coudret pour tout le temps que tu as consacré à observer au microscope mes Alexandrium mais également d'avoir relu une grande partie de mon manuscrit de thèse. Je remercie aussi toute l'équipe de DIVCO et particulièrement Frédérique Viard, Claire Daguin et Charlotte (tu verras maintenant mes yeux seront moins rouges).

Il est grand temps de revenir sur le groupe plancton de la station biologique. Je remercie Daniel Vaulot, Frédérique Partensky, Laurence Garczareck, Nathalie Simon, Anne Claire Badoux, Christophe Six. Je remercie également Christian Jeanton et Dominique Marie pour aussi bien leurs disponibilités à parler sciences qu'à parler foot avec moi. Je tiens à remercier Fabienne Jalabert de m'avoir formé en microscopie et pour sa bonne humeur au quotidien; Estelle qui s'est gentiment occupée des cultures de nos microalgues, qui m'a initié à l'observation des dinoflagellés et qui a été tout le temps disponible pour me filer un coup de main. Je remercie également toutes les filles de la RCC, Roseline, Priscillia, Florence ! Je tiens à remercier aussi les nouveaux mespaulitains Mathieu le post-doc vétéran et Sarah.

Je profite également de cette occasion pour remercier tous mes stagiaires, Audrey, Bastien, qui a une qualité rare, celle d'avoir la passion des isolements de micro-algues ! Ā Gaëlle qui m'a impressionné tant sur son application dans son travail que son engouement à vouloir toujours apprendre plus de techniques (Bio-mol) et se perfectionner dans son travail je dis merci beaucoup. Ton implication dans l'acquisition des données sur la partie cycle de reproduction de cette thèse fut très importante.

Je tiens à remercier tous les doctorants que j'ai pu côtoyer durant mes trois années roscovites, Jean Baptiste, Patricia, Tristan, Rémy, Kévin, Camille, pour leurs sympathies ! Les expérimentés Dominique Bœuf et Florian Humily (expert des cyano, je ne parlerai pas de tes repiquages) avec qui j'ai partagé des cafés-croissants à 8h00 afin de bien démarrer des journées bien chargées …Euh repiquages, je vous remercie pour ce partage et tous les conseils pour ma rédaction ! Je cite Domi « Alors, tu as commencé la rédaction ? Il faut que tu commences tu verras ça prend beaucoup de temps… aller vas-y ». Florian merci de t'être porté volontaire pour relire mon manuscrit de thèse et tous tes encouragements. Justine la marseillaise qui s'est adaptée au climat breton j'espère que ta souche de Synechococcus des côtes mauritaniennes répond bien à tes attentes en terme d'adaptations à des températures très différentes de celles connues en Mauritanie. Klervi, je te souhaite plein de courage pour tes isolements complexes de bactéries.

Evidement j'ai eu la chance de côtoyer les piou-piou, Aurélien, Clio, Tangi, Jordan, Fanny, Giles, Alexandre, Brice, Ula et Mathilde merci pour toutes ces fêtes passées à la station et l'ambiance que vous avez apporté durant vos deux années à Roscoff.

J'en viens maintenant aux membres de la Dream Team et je cite : Sidney, Elise et Manon je vous dis merci pour ces moments agréables passés à Montpellier et j'espère vous voir un jour débarquer à Rosko city.

Mes trois années passées à Roscoff m'ont permis de rencontrer des gens formidables et je citerai Doriane à qui je dis mille fois merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Je remercie aussi Frédéric Lepelletier, le panda qui m'a fait traverser la France du nord au sud grâce à sa puissante AX avant de partager avec toi la joie de la rédaction de thèse ! Noan je te remercie énormément pour ton soutien au quotidien durant ma

rédaction, je ne te remercierai pas assez pour les courses, les siestes passées chez toi et j'en passe ! Delphine je te remercie d'être présente en ce moment d'impression de mon manuscrit qui sans ton aide et celui de Noan ne serait pas fine ce soir, retrouvez ici toute ma gratitude.

Je ne pourrai pas finir mes remerciements sans citer tous mes amis mauritaniens, la liste est longue et j'ai peur d'en oublier certains, Oumar Abdoulaye, Beydaré, Alassane Pounayel, Oumar Abdoul (babiraguel), Farba Elas, Hamadi Bassirou, Ama Kane, Hamadi Bâ (Sow), Thierno Hamidou Bâ, Toutou Wane, Aissata Ablaye, Adama Sow, Abdoul Diop !

Enfin, je remercie toute ma famille et plus particulièrement mes chers parents N'Diengoudy Alassane et Poullo Baba qui on fait tant de sacrifices pour que mes études se déroulent dans les meilleures conditions possibles tous les mots qui me viennent à l'esprit sont en mon sens insuffisants pour vous remercier. Un grand merci à mes oncles Taphis, Baba, Boubacar et Cheikh, mes tantes Aissata, Gaissiry Baaba, Mariam et Nabou et tous mes frères (Mamadou, Ifra, Abdoulaye, Alassane, Oumar, Elhadj, Thierno) et sœurs (Bébé, Raky et Nabouyel) ainsi qu'à tous mes cousins et cousines !

Aliou N'Diengoudy

Sommaire

RÉSUMÉ / ABSTRACT 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE 3

Dispersion du plancton 10

Importance des systèmes de reproductions dans la diversité génétique 12

Contexte général et structure du document 18

CHAPITRE 1: Étude du cycle de reproduction d'*Alexandrium minutum* 19

Introduction 21

Matériel et méthodes 26

Résultats et discussions 29

CHAPITRE 2

Spatiotemporal changes in the genetic diversity of harmful algal blooms caused by the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* 40

CHAPITRE 3

Dispersion et différenciation génétique chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* le long des côtes bretonnes 83

CHAPITRE 4

Growth rate variability and population genetic structure in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* 109

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 134

RÉFÉRENCES GÉNÉRALES 138

ANNEXES 152

“*Le rôle de l’infiniment petit dans la nature est infiniment grand.*”

Louis Pasteur

RÉSUMÉ / ABSTRACT

Résumé

Alexandrium minutum est un dinoflagellé qui est à l'origine des efflorescences toxiques observées de façon récurrente le long des côtes Bretonnes. Cette microalgue produit des toxines paralysantes qui sont parmi les plus puissantes au monde. Originaire de Méditerranée, cette espèce a progressivement envahi les côtes européennes atlantiques. Cette algue invasive a été observée en Bretagne dans les années 80, puis a atteint successivement l'Angleterre, l'Irlande et le Danemark. Aujourd'hui, elle semble durablement installée dans de nombreux estuaires bretons, produisant de façon récurrente des efflorescences toxiques, bien que dans certains sites les proliférations semblent être limitées par la présence de parasite. Dans cette étude nous nous sommes interrogés sur les processus pouvant influencer la diversité génétique des populations d'*A. minutum* et les répercussions de ces capacités d'adaptation vis à vis des facteurs biotiques et abiotiques. Nous avons en particulier, réalisé des expériences de croisement en laboratoire afin de mieux comprendre sa reproduction et de déterminer son système de reproduction. Puis nous avons utilisé des outils moléculaires afin de déterminer quelle était l'importance de la reproduction sexuée dans les populations naturelles en Bretagne (reproduction sexuée versus asexuée). Enfin, nous avons étudié la variabilité génétique des efflorescences annuelles pendant deux années consécutives dans les estuaires de la Rance et de la Penzé. Les expériences de croisement *in vitro* ont permis de mettre en évidence que la reconnaissance gamétique était un processus complexe où les fusions ne sont pas régit par un système bipolaire comme c'est généralement le cas chez de nombreux organismes. D'autre part nos résultats suggèrent que les kystes temporaires auraient une capacité de survie de plusieurs mois au froid et à l'obscurité dans les conditions de laboratoire. Grâce à l'utilisation des marqueurs microsatellites, nous avons montré que les efflorescences *d'A. minutum* présentaient une diversité génétique et génotypique très élevée et que les génotypes étaient tous différents les uns des autres au sein de ces efflorescences. Ces résultats suggèrent que la reproduction clonale n'est pas dominante au cours des évènements d'efflorescence. L'analyse génétique spatio-temporelle (entre Penzé et Rance, entre années et entre période d'efflorescence) montre des différenciations significatives aux différentes échelles. La différence spatiale indique un flux de gènes restreint entre les deux sites et cela principalement au cours des blooms. En effet, les efflorescences qui se développent généralement pendant les marées de morte-eau restent relativement isolées. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de la structure génétique des populations *A. minutum* le long des côtes Bretonnes qui révèle des flux de gènes limités entre populations. Ces résultats suggèrent que la migration est relativement restreinte entre estuaires. De plus, la différenciation génétique entre estuaires pourrait également étroitement être liée aux traits d'histoire de vie de cette espèce. En effet, le développement rapide des efflorescences dans un nouveau site colonisé, suivi par la formation d'un grand nombre de kystes de résistance qui s'accumulent au sein des estuaires pourrait constituer un système particulier présentant une forte inertie au changement (tampon génétique) et limitant, par compétition, l'arrivée de nouveaux migrants (hypothèse de monopolisation des sites (De Meester *et al.* 2002). Enfin, nos résultats suggèrent que les efflorescences toxiques observées en Rance, en Baie de Morlaix et en Rade de Brest correspondraient à des évènements d'introduction différents.

Mots clés: *Alexandrium minutum*, efflorescences, types sexuels, système de reproduction, génétique des populations, dispersion, variabilité génétique, traits d'histoire de vie, Dinoflagellé, reproduction sexuée.

Abstract

Alexandrium minutum is a dinoflagellate producing recurrent toxic blooms along the French Atlantic coast. This microalga produces PSP toxins which are among the most powerful toxins in the world. Originally from the Mediterranean, this species has gradually invaded the European Atlantic coasts. In the middle of 80's, this invasive alga was observed along the French Atlantic coast, and then successively extended its distribution to England, Ireland and Denmark. Today this toxic species persists along the Brittany coast estuaries producing recurrent toxic blooms, although in some sites blooms appear to be limited by the presence of parasites. In this study we examined the processes that may affect population genetic diversity of *A. minutum* and the effects of local adaptation to biotic and abiotic factors. We made crossing experiments in laboratory to better understand reproduction and to determine its reproductive system. Then we used molecular tools to determine the importance of sexual reproduction in natural populations (sexual versus asexual reproduction) in French Brittany. Finally, we studied the genetic variability of annual blooms for two consecutive years in Penzé and Rance estuaries. Crossing experiments helped to better understand the gamete recognition system. Gametes recognition in this species is not a bipolar system as is usually observed in numerous organisms and involves different mating types. Moreover, our results suggest that temporary cysts are able to survive several months in cold and darkness in the laboratory conditions. Using microsatellite markers, we found that blooms have a high genetic and genotypic diversity, with no repeated multilocus genotypes. These results suggest that clonal reproduction is not a dominant process during bloom period compared to sexual reproduction. The spatio-temporal genetic analyses (between Penzé and Rance, between years, and between bloom periods) showed significant differentiation at both spatial and temporal scales. The spatial differentiation indicates a restricted gene flow between the two sites and this mainly during the blooms events. Indeed, the blooms usually develop during the neap tides are relatively isolated. These results were confirmed by the study of the genetic structure of *A. minutum* along the Brittany coast that reveals limited gene flow between populations. These results suggest that migration is relatively limited between estuaries. In addition, the genetic differentiation between estuaries could also be closely linked to the life history traits. Indeed, the rapid development of blooms in a new site, followed by the formation of a large number of cysts accumulated in estuaries could be a particular system characterized by high genetic buffer and limiting arrival of immigrants by competition (Monopolization hypothesis) (De Meester *et al.* 2002). Finally, our results suggest that the toxic blooms observed in Rance, in the Morlaix Bay and Brest estuaries correspond to different introductions processes.

Keywords: *Alexandrium minutum*, bloom, mating-type, reproductive system, population genetics, dispersion, life history traits, genetic variability, Dinoflagellate, sexual reproduction

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Le monde vivant constitue un énorme réservoir de diversité dont les variations phénotypiques les plus perceptibles sont les différences de tailles, de formes et de couleurs. Ces différences sont quasiment universelles entre individus au sein des populations. Une population est un ensemble d'individus d'une même espèce qui partagent la même niche écologique et qui se reproduisent majoritairement entre eux (Odum 1983). Les variations interindividuelles sont générées par des forces évolutives diverses comme les mutations, la migration, la dérive et la sélection. Ces différentes forces jouent un rôle crucial dans la structure des populations. Par exemple, si une espèce est composée de plusieurs groupes d'individus (populations) séparés par des barrières géographiques importantes réduisant les migrations et les flux de gènes, ou par des barrières reproductives limitant l'hybridation, ces populations vont pouvoir diverger séparément au cours du temps. Les effets de dérive génétique dus à la taille des populations ainsi que la sélection pourront amener les individus de ces différentes populations à fixer des adaptations (ou des maladaptations) locales.

Les traits d'histoire de vie, qui comprennent tous les évènements de développement et de reproduction des individus d'une espèce au cours de leur vie, jouent également un rôle fondamental dans la diversité et la structure des populations. (Russell, 1986) considère que les traits d'histoire d'un organisme donné sont la conséquence évolutive de la sélection et par conséquent correspondraient à une « stratégie évolutive » ou une « solution avec succès » pour répondre à un environnement donné ou à un problème écologique particulier. Les traits d'histoire de vie tels que les cycles de vie, le développement (taux de croissance), la capacité de dispersion et la longévité des individus (durée de vie) ont une importance évolutive capitale car, en agissant sur les systèmes de reproduction, ils peuvent modifier la structure génétique d'une population et les possibilités d'adaptation locale.

Dans le cadre de cette thèse, je me focaliserai sur trois composantes principales des traits d'histoire de vie, la dispersion, les cycles de reproduction mais aussi le développement (les taux de croissance, article 2) chez le dinoflagellé planctonique *Alexandrium minutum*.

Présentation du modèle biologique

Le plancton

Au 17ème siècle, le Néerlandais Anton van Leeuwenhoek fut probablement l'un des premiers à observer des organismes minuscules, qu'il appela animalcules (Hallegraeff, 1988). L'Allemand Victor Hensen qui a organisé une des premières grandes expéditions océanographiques en 1889 utilise le terme plancton pour désigner les petits organismes marins non fixés (du grec *planktos* qui veut dire errant). Le plancton est composé d'organismes qui vivent en suspension dans l'eau de mer, les lacs, les étangs et les rivières et qui ne sont pas en mesure de nager dans le sens inverse des courants d'eau. Cette caractéristique distingue le plancton du necton, organismes capables de nager activement (poissons, céphalopodes, mammifères aquatiques etc..). Les tailles des organismes planctoniques varient entre moins d'un micron et quelques mètres (les méduses par exemple).

Selon leurs tailles, on distingue différents groupes de plancton (Fig. 1) allant des vibrio-planctons (0,02 - 0,2 µm) aux métazoo-planctons qui peuvent mesurer plus de 20 décimètres en passant par les phytoplanctons (producteurs primaires).

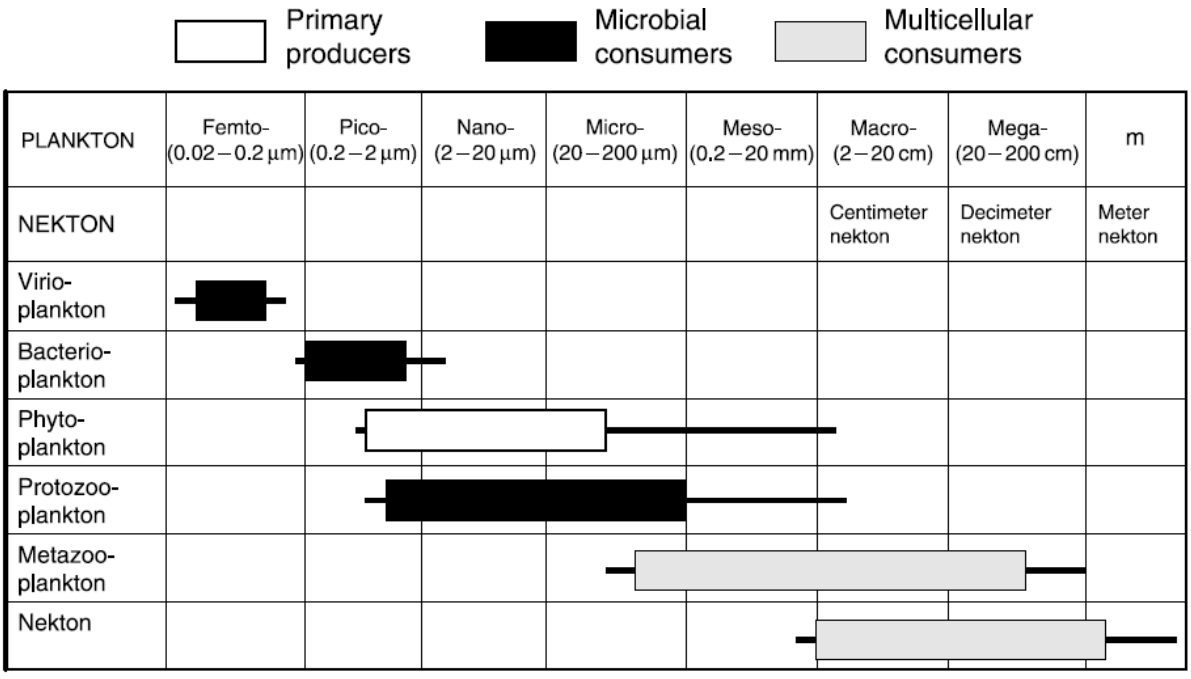


Figure 1. Les différentes taxonomies du plancton selon leur fraction de tailles en comparaison avec celles du necton. (Sherr, Sherr, 2008)

Les producteurs primaires sont les acteurs majeurs des grands équilibres biogéochimiques de la planète. En particulier, les organismes autotrophes (le phytoplancton) jouent un rôle important dans le cycle du dioxyde de carbone de l'atmosphère à la surface des océans et contribuent de manière importante à l'équilibre du climat de la planète (Falkowski) (Fig. 2).

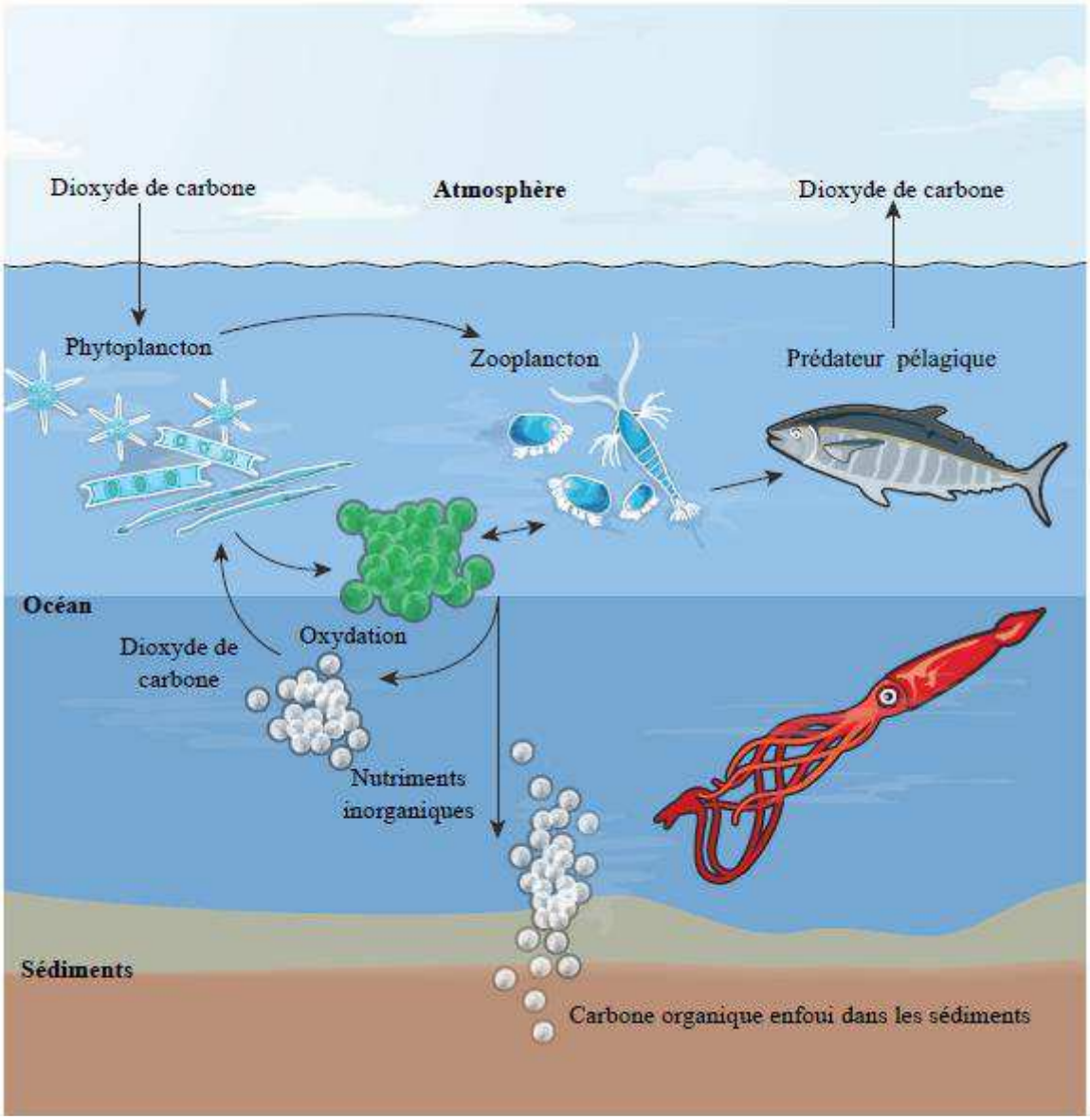


Figure 2. Le phytoplancton, une pompe biologique (modifié d'après (Falkowski): le phytoplancton est l'acteur principal de la pompe biologique. Grâce à son activité photosynthétique, il absorbe d'importantes quantités de CO_2.

Les dinoflagellés (Alveolata)

Les dinoflagellés sont des algues unicellulaires (protistes). Avec les ciliés et les apicomplexes, ils forment les trois principaux sous-groupes des alvéolés (Leander, Keeling, 2004) . Les dinoflagellés sont très divers en termes de morphologies. Leurs cellules sont protégées par une thèque formée par des plaques rigides à base de cellulose. Leurs plaques sont contenues dans des alvéoles (caractéristique du groupe des alvéolés). Leur morphologie cellulaire montre également un sillon équatorial (cingulum) qui sépare la cellule en épicone (partie supérieure) et hypocone (partie inférieure de la cellule).

Les dinoflagellés sont particulièrement diversifiés au sein du plancton marin. En tenant compte de la biodiversité des dinoflagellés vivants et fossiles, ce groupe comprend plus de 550 genres et plus 4000 espèces décrites (Fig. 3).

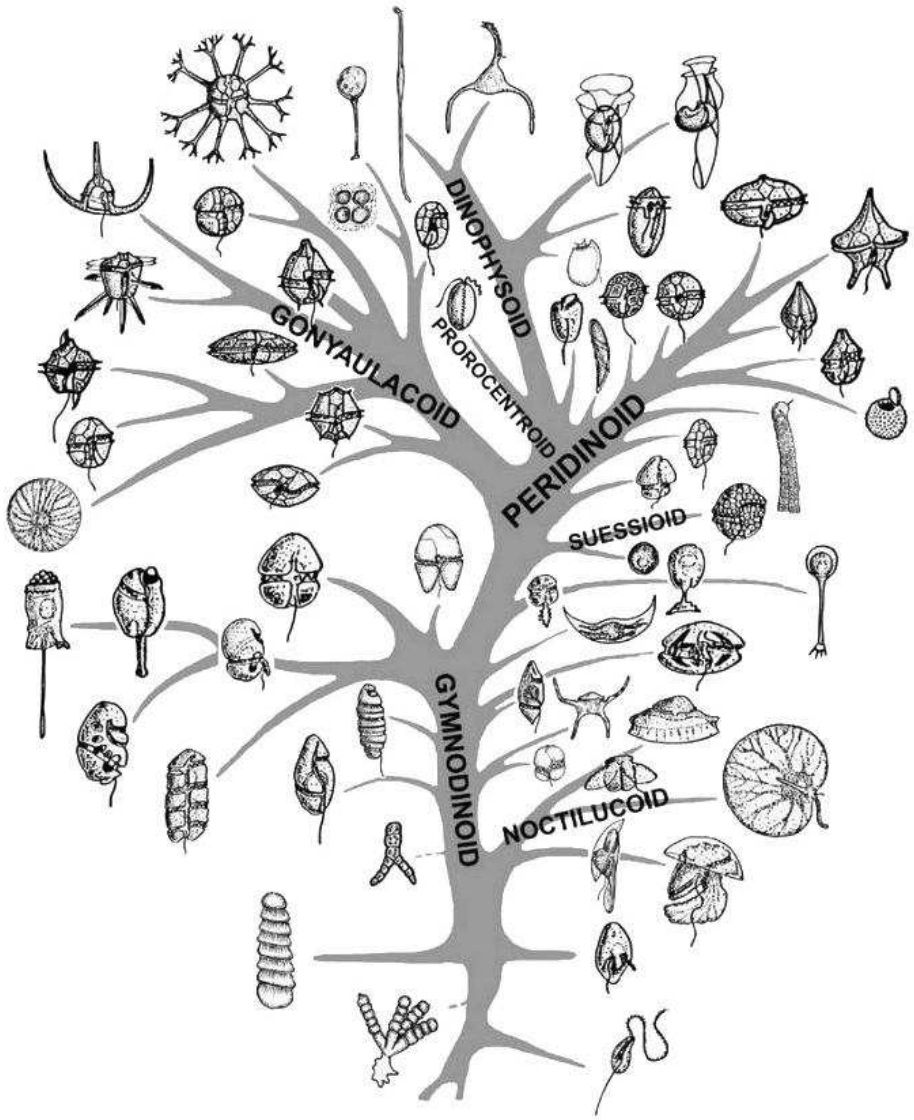


Figure 3. Diversité des dinoflagellés, seul le quart des genres actuels sont illustrés sur cet arbre.

Les dinoflagellés se caractérisent des autres organismes eucaryotes par la structure de leur appareil flagellaire mais aussi par leur noyau (appelé dinocaryon). Leurs chromosomes sont toujours condensés et sans histones, et contiennent souvent de grandes quantités d'ADN (jusqu'à 200 pg, 215000 Mb) (Hoppenrath, Leander, 2008). Au sein de ce groupe, certaines espèces peuvent être à l'origine des proliférations excessives d'algues nuisibles, que l'on appelle communément des « marées colorées ». Ces efflorescences massives peuvent être accompagnées de productions de toxines puissantes. Parmi les toxines produites par ces microalgues, celles de type PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) sont considérées comme étant parmi les plus puissantes au monde. Elles sont produites notamment par des dinoflagellés des genres *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*. Actuellement, la présence de ces toxines est retrouvée partout dans le monde (Fig. 4). Ces toxines sont thermostables (elles ne sont donc pas détruites par la chaleur), hydrophiles et stables en milieu acide. Elles agissent directement sur le système nerveux en bloquant les canaux sodium des cellules nerveuses. Il en résulte une inhibition de la transmission nerveuse. Sur le continent européen, la norme retenue pour la consommation humaine des produits contaminés par ces toxines est de 80 µg équivalent saxitoxine pour 100 g de chair. Il existe aussi d'autres types de toxines qui sont diarrhéiques (DSP, Diarrheic Shellfish Poisonning). Ces toxines sont produites par des dinoflagellés des genres *Prorocentrum* et *Dynophisis*. Ces toxines sont également thermostables et provoquent des diarrhées et des vomissements. Certaines toxines sont neurotoxiques (type NSP, Neurotoxic Schellfish Poison). La liste des toxines produites par des microalgues que nous avons citée ici n'est pas exhaustive. Le but est tout simplement de rappeler les conséquences néfastes provoquées par les efflorescences de certains groupes de plancton. En effet, dans certaines régions les toxines des microalgues représentent des menaces importantes en terme de santé publique (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2013).

Les dinoflagellés représentent environ 75 à 80% des espèces toxiques au sein du phytoplancton marin (Cembella, 2003) Dans le monde, le développement de ces espèces toxiques (ou nuisibles) est plus connu sous les termes anglais de « Harmful Algal bloom » ou HAB. Ces phénomènes ont un impact économique important sur l'exploitation des ressources marines (stocks naturels et aquaculture). La fréquence des événements d'efflorescences toxiques a fortement augmenté au cours des quatre dernières décennies (Glibert *et al.* 2010). Depuis les années 1970, les contaminations des écosystèmes aquatiques par des toxines de type PSP ont largement augmenté en nombre et en intensité (Fig. 4).

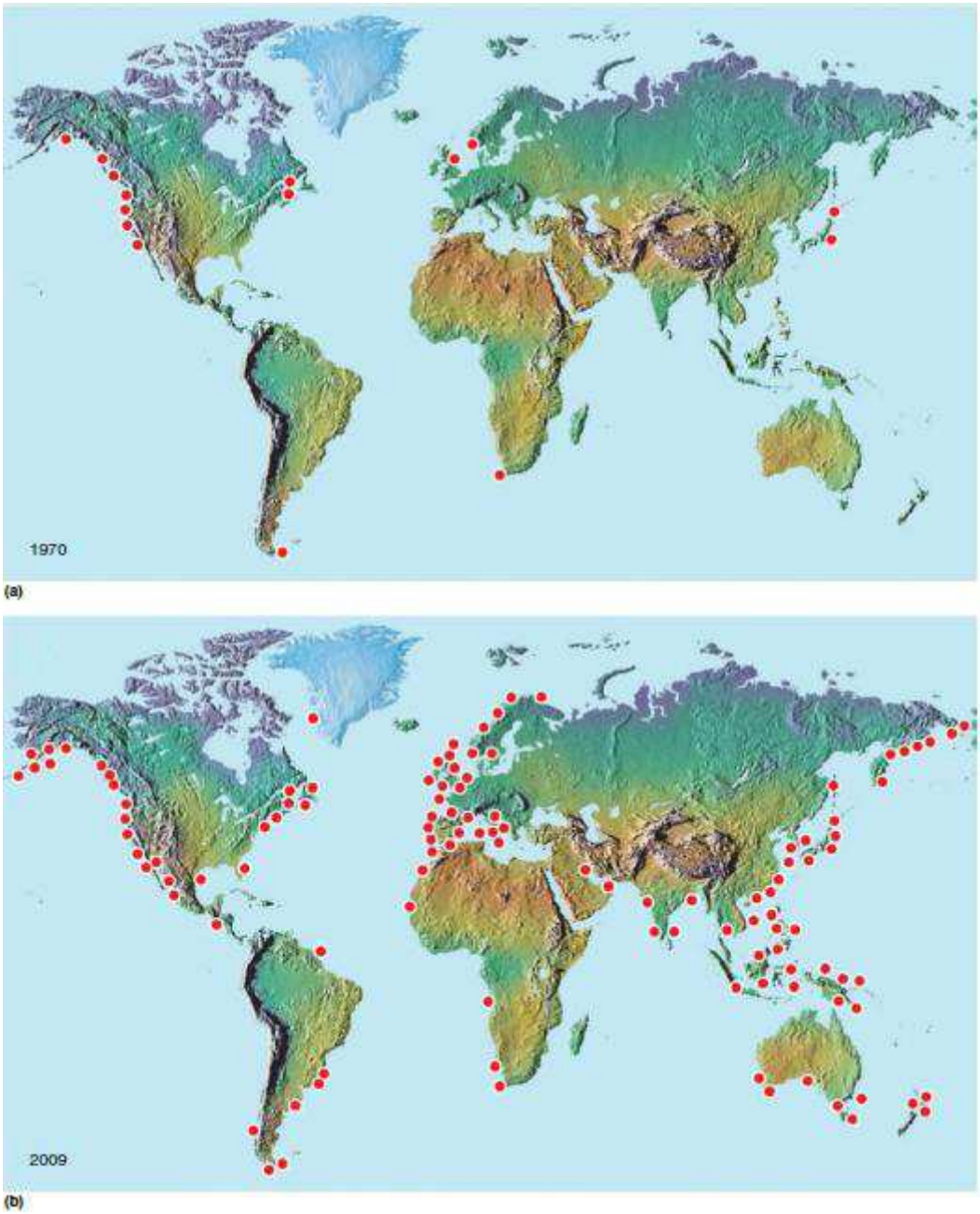


Figure 4. Répartition géographique des zones où la présence de toxines paralysantes de types PSP avait été enregistrée en (a) 1970 et (b) 2009 (Medlin, Cembella, 2013).

Les principales espèces de dinoflagellés incriminées dans les efflorescences d'algues toxiques font partie du complexe d'espèce *Alexandrium tamarense* (*A. tamarense, A. fudyense*, et *A. catenella*) et d'*A. minutum* (Cembella, 1998).

Alexandrium minutum fut observée pour la première fois en 1960 dans le port d'Alexandrie en Egypte (Halim 1960). Sa distribution est aujourd'hui est relativement globale. En France, cette espèce fut pour la première fois détectée sous la forme d'une efflorescence en 1988, en baie de Vilaine sur la façade Atlantique (Belin *et al.,* 1989; Nézan & Le Doux, 1989). Puis des efflorescences furent détectées en Manche, dans de

nombreux estuaires bretons, puis en Irlande, en Angleterre, et au Danemark (Nehring, 1998; Hansen *et al.*, 2003), et sur la côte Est de l'Espagne (Delgado *et al.*, 1990 ; Giacobbe *et al.*, 1996).

Chez *Alexandrium minutum*, une étude comparative a montré qu'au sein de cette espèce les cellules pouvaient avoir des morphologies différentes (Fig. 5). La comparaison entre une souche d'*A. minutum* isolée au Danemark avec des souches isolées au Portugal, en France et en Irlande a montré que les souches du Danemark et de la France sont différentes du morphotype typique de l'espèces *A. minutum* par l'absence d'un pore ventral. En effet, seules les souches d'Espagne et du Portugal ont montré la présence du pore ventral (Hansen *et al.*, 2003).

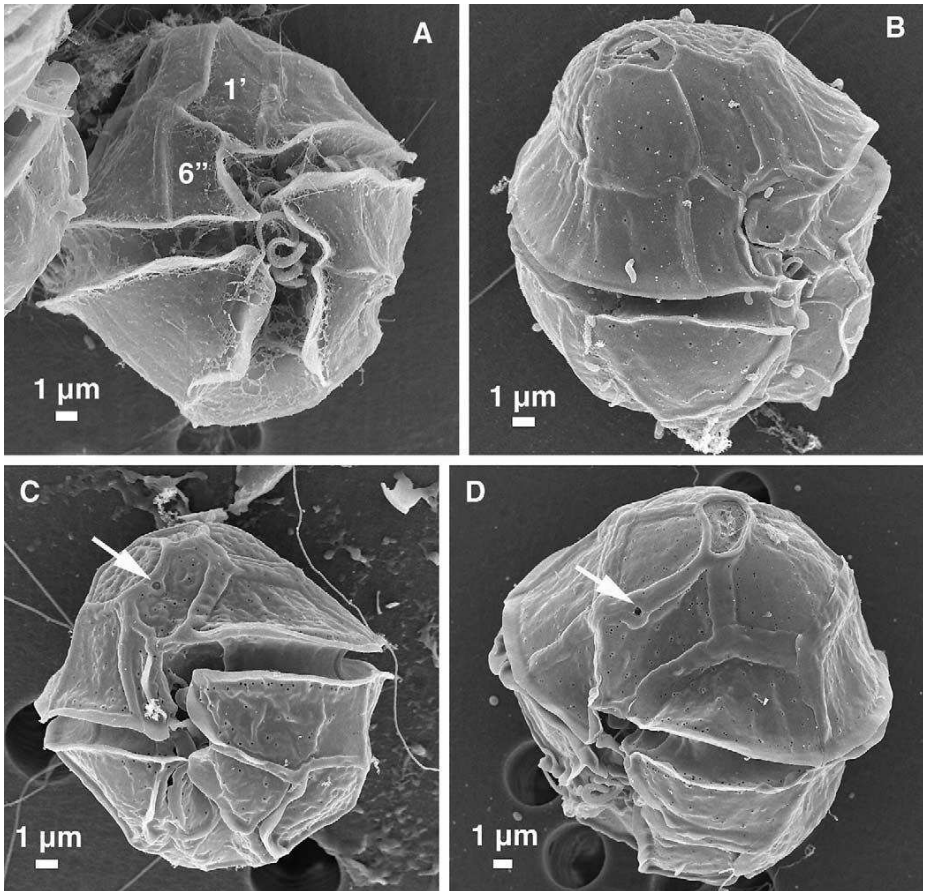


Figure 5. Photographie à partir d'un microscope électronique d'*Alexandrium minutum.* (A) une souche en provenance du Danemark, (B) une souche isolée en France (Nantes). Ces deux premières souches ne montrent pas la présence d'un pore ventral. Cependant, les souches (C) et (D) isolées respectivement en Espagne et au Portugal sont pourvues de pore ventral (les flèches indiquent ces pores).

Dispersion du plancton

En dehors de la notion '' d'espèces'', trois caractéristiques différencient les organismes unicellulaires de la plupart des organismes pluricellulaires : i) des tailles de population très importantes, ii) un temps de génération court, iii) une capacité de dispersion élevée (Dolan, 2005) Chez les microalgues, les populations sont de grandes tailles et présentent des fluctuations rapides de densité, à l'échelle de quelques jours à quelques semaines (temps de génération relativement court) (Cloern, 1991). Une grande majorité des espèces de microorganismes dont la taille est inférieure à 1 mm (y compris les protistes) a été décrite comme cosmopolite(Finlay, Fenchel, 2004). Cette caractéristique serait la conséquence d'une forte dispersion en relation avec la grande taille des populations et donc une faible probabilité d'extinction. Contrairement aux organismes macroscopiques qui présentent généralement des dispersions géographiques limitées, le phytoplancton (qui est libre) présenterait de grandes capacités de dispersion (Finlay, Fenchel, 2004). Enfin, le milieu pélagique a longtemps été considéré comme un milieu très dispersif en raison de l'absence de barrières géographiques apparentes à la dispersion. En conclusion, les espèces phytoplanctoniques ont souvent été décrites comme formant des populations uniques non structurées. Cette idée est encore aujourd'hui reprise dans de nombreuses études chez les procaryotes et les protistes (Dolan, 2005) Elle est née de l'hypothèse développée par Bass-Becking (1934) qui stipule que tout est partout, mais que l'environnement sélectionne («Everything is everywhere but environment selects»).

Cependant, la question de la connectivité entre populations reste encore aujourd'hui largement inexplorée. En effet, très peu d'informations existent sur la distance que peut parcourir une cellule phytoplanctonique (ou une efflorescence) et comment la dispersion peut être influencée par le paysage marin. Etudier ces paramètres est essentiel afin de mieux comprendre l'écologie et l'évolution de ces organismes phytoplanctoniques (Palumbi, 1994) et par là même, de mieux anticiper leur résilience face à différentes perturbations comme les changements climatiques.

De façon générale, la dispersion du phytoplancton dépend des traits d'histoire de vie et du comportement de l'espèce mais également de l'environnement. En effet, on peut penser que certaines espèces qui prolifèrent en milieu hauturier auront des patrons de dispersion plus large que les espèces côtières qui prolifèrent dans des milieux semi-confinés comme les ports ou les estuaires. Certaines espèces de phytoplancton peuvent se multiplier de façon soudaine et intense dans des habitats particuliers. Ainsi, certaines espèces seront capables de proliférer plutôt dans des milieux confinés que dans des milieux ouverts (Vila *et al.*, 2001). Il est donc indispensable de tenir compte du type d'environnement afin de mieux appréhender la dispersion de ces microalgues. Au cours de ce travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la dispersion de l'espèce *A. minutum* localisée principalement en milieux semi-confinés (estuaires, port).

Les écosystèmes estuariens

Les estuaires sont des zones géographiquement limitées qui se caractérisent par la rencontre des eaux douces (système fluvial) et des eaux marines (système maritime). Ces zones qui sont soumises aux fortes influences des marées sont très dynamiques et présentent beaucoup de turbulences, dues aux processus de circulation et de mélange des eaux. La géologie, la géographique, les marées, les vents, la salinité, le débit des rivières et les tempêtes vont donc influencer considérablement les mouvements d'eaux au sein des estuaires), on peut donc considérer que chaque estuaire est un milieu unique. Au cours de ce travail de thèse, l'échantillonnage a été majoritairement établi dans des estuaires de la côte bretonne et plus particulièrement les estuaires de la Penzé et de la Rance que nous décrirons très brièvement.

Les estuaires des côtes de Bretagne Nord constituent des milieux originaux parmi les systèmes côtiers de l'océan mondial. En effet, ils se caractérisent par une influence très marquée des marées de grande amplitude pouvant atteindre jusqu'à 10 m de marnage (Morin 2000). L'estuaire de la Penzé est de type macrotidal. En effet, bien qu'il soit relativement peu profond (profondeur inferieure à 4 m), sa topologie et la force des courants de marées permettent une intrusion massive et rapide des eaux marines à marée montante. Les caractéristiques de l'estuaire de la Penzé sont détaillées en Annexe 2.

L'estuaire de la Rance s'étend sur une longueur de 16 km avec une largeur moyenne de 2,5 km. Cet estuaire se caractérise en aval par l'existence du barrage de l'usine marémotrice qui contrôle les entrées et sorties d'eau, et en amont par une écluse (Le Châtelier) qui contrôle les entrées d'eau douce dans l'estuaire. La rivière de la Rance (80 km) qui alimente l'estuaire en eau douce a un débit faible (en moyenne 7 m^3/s). Cette rivière reçoit les eaux provenant d'un bassin de 909 km^2 utilisé essentiellement pour des activités agricoles. Alors que sur les zones géographiques aux alentours l'amplitude des marées est en moyenne de 13,5 m (à Saint-Malo par exemple), dans le bassin de rétention (22 km^2) le fonctionnement de la centrale marémotrice réduit cette amplitude des marées de l'ordre de 40%. Sur cette zone, les amplitudes des marées sont de 7 à 8 m pendant les marées de vives-eaux et de l'ordre de 2,5 m durant les marées de mortes-eaux. Une autre spécificité de cet estuaire causée par l'usine marémotrice est la modification du cycle des marées qui réduit considérablement la durée des courants de flot et de jusant. Le fonctionnement de l'estuaire de la Rance pourrait ainsi favoriser le développement des efflorescences en limitant les turbulences (Bolli *et al.* 2007). En effet, alors que sur la côte, les périodes d'étale (période d'immobilisation des masses d'eau) durent environ une quinzaine de minutes, dans cet estuaire, cette période est artificiellement prolongée de plusieurs heures au cours desquelles les courants d'eau sont faibles ou inexistants.

En résumé, les estuaires de Penzé et de la Rance sont des environnements différents qui présentent la particularité d'héberger des efflorescences de microalgues toxiques de façon récurrentes, en particulier l'espèce *Alexandrium minutum*.

Influence des milieux estuariens sur la dispersion

Les estuaires peuvent constituer des habitats discrets semi-confinés dans lesquels les populations sont plus ou moins isolées en fonction des déplacements des masses d'eau. On peut donc s'attendre à avoir des barrières de dispersion entre estuaires en fonction de la topographie des sites et/ou des conditions environnementales (Bilton *et al.*, 2002). De plus, les espèces plus spécifiques des eaux saumâtres pourraient présenter certaines difficultés à migrer en eau de mer (tolérances physiologiques). Bilton *et al.* (2002) soulignent que les environnements estuariens tendent à restreindre les flux de gènes et imposent des régimes de sélection différents qui génèrent des populations physiologiquement adaptées.

Bien qu'en général, la dispersion du plancton soit considérée comme importante, et que la différenciation génétique entre populations soit faible en raison des flux de gènes conséquents, on peut supposer que les populations d'espèces planctoniques estuariennes ont des chances d'être plus différenciées génétiquement que celles en milieu ouvert. Dans ce contexte, on pourrait s'attendre à observer des populations présentant des caractéristiques génétiques différentes entre estuaires en fonction de leurs degrés de connectivité.

Importance des systèmes de reproductions dans la diversité génétique

Les modèles biologiques utilisés en biologie évolutive dans l'étude des systèmes de reproduction sont généralement des organismes diploïdes (animaux ou plantes) (Maynard Smith 1978, Bell 1982, Stearns 1987, 1992, Roff 2001). Plus récemment, certaines macroalgues à cycle haploïde-diploïde ont été étudiées (Destombe and Oppliger 2011; Valero *et al.*, 1991). Les systèmes de reproduction ont de multiples conséquences sur la diversité génétique des populations. Ils déterminent les types de croisements qui sont impliqués dans la transmission des gènes d'une génération à une autre. Les outils de génétique des populations peuvent fournir des renseignements précieux sur le système de reproduction d'une espèce. En effet, un des objectifs majeurs de la génétique des populations est de comprendre les facteurs qui affectent les patrons de diversité génétique entre et au sein des populations. Parmi ces facteurs, les systèmes de reproduction ont un impact considérable sur la structuration de la diversité moléculaire et sur l'évolution des génomes (Charlesworth, Wright, 2001). Par exemple les espèces qui font de l'autofécondation vont présenter une réduction de la taille efficace de population (N_e) par rapport aux espèces panmictiques. Cette diminution est due à la réduction du nombre de gamètes indépendants lors de la reproduction ce qui réduit le taux de recombinaison (Nordborg, 2000). Dans ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à l'importance de la reproduction sexuée par rapport à la reproduction asexuée (clonale) chez l'espèce *A. minutum* et à son impact sur la diversité génétique des populations.

La reproduction sexuée

En biologie évolutive, l'avantage de la reproduction sexuée par rapport à la reproduction asexuée suscite encore aujourd'hui un large débat. En effet, bien que la reproduction sexuée se rencontre chez la majorité des organismes, il est difficile d'expliquer son évolution et son maintien (Maynard-Smith, 1971). La première question concerne les avantages à court terme du sexe. La plus ancienne hypothèse de l'avantage du sexe en évolution a été formulée par Weismann (1889) puis a été reprise par Morgan (1913) Fischer (1930) et Muller (1932). Selon ces auteurs, le sexe présenterait un avantage évolutif, car il augmenterait la variation génétique par recombinaison (combinaison de mutations bénéfiques) permettant ainsi aux organismes de s'adapter plus rapidement. Cependant, cette question a soulevé un véritable débat lorsque Maynard Smith (Maynard-Smith, 1971) a démontré l'existence du coût du sexe. Ainsi, pour que le sexe apporte un bénéfice net, il faudrait qu'il crée plus de combinaisons génétiques avantageuses qu'il n'en détruit. En terme de génétique des populations, cela traduit l'existence « d'associations génétiques négatives » au sein des populations : de bons allèles peuvent tendre à s'associer à de mauvais allèles. Dans ce cas le sexe peut briser ces associations et générer des génotypes qui combinent des allèles bénéfiques (Roze 2012) (Fig. 6).

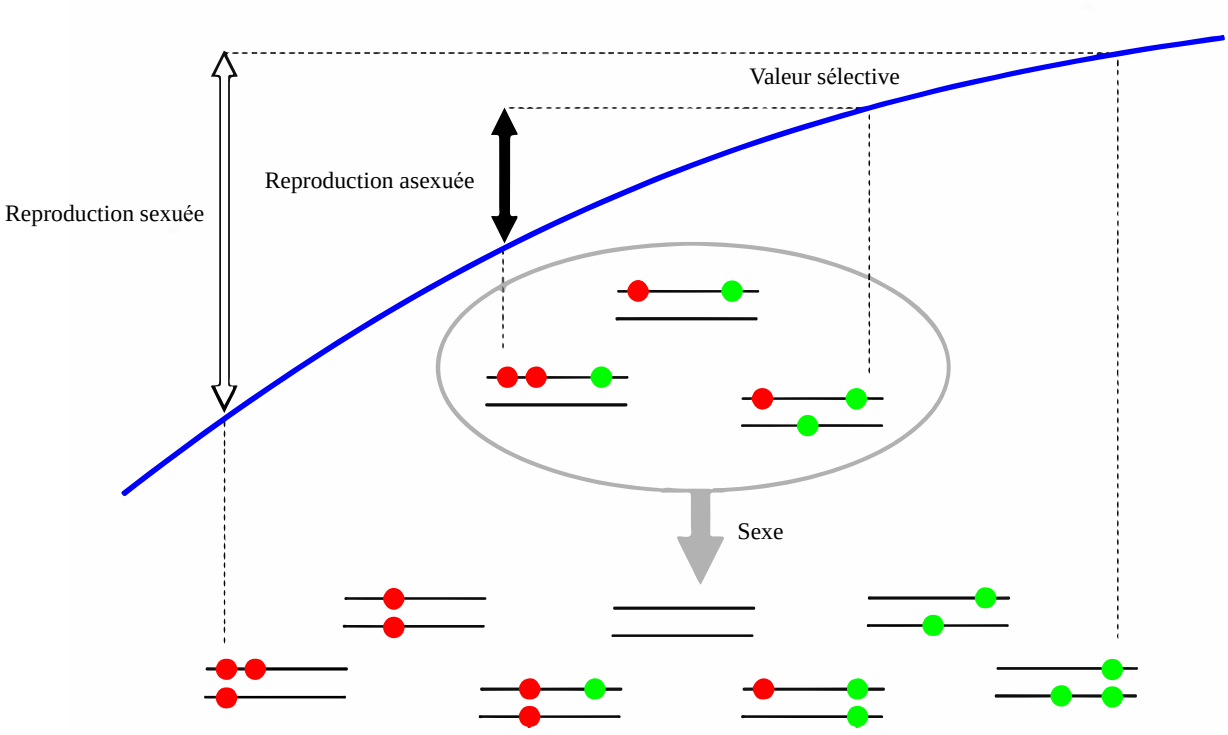


Figure 6. Interprétation génétique des effets de la sexualité sur la valeur sélective des descendants. Les différents génotypes diploïdes sont représentés par des paires de barres horizontales, sur lesquelles les points rouges et verts représentent respectivement des mutations délétères et bénéfiques. La population initiale est constituée des génotypes dans le cercle gris où la reproduction asexuée régénère les mêmes génotypes, alors que la reproduction sexuée génère de nouveaux génotypes par recombinaison et ségrégation. La population initiale abrite des associations génétiques négatives (excès de génotypes qui combinent de bons et mauvais allèles, soit sur un même locus ou sur des loci différents). Le sexe augmente la variance de la valeur sélective chez la descendance. Bien que la valeur sélective moyenne de soit plus faible chez les individus produits par la reproduction sexuée que chez ceux produits par reproduction asexuée (en raison de la tendance négative de la fonction de la valeur sélective) les meilleurs génotypes sont ceux issus de la reproduction sexuée.

Un des problèmes a donc été d'expliquer comment un système comme la reproduction sexuée qui a un coût à court terme par rapport à la reproduction asexuée a pu être sélectionné à long terme au cours de l'évolution. Pour cela il faut supposer un avantage lié à la reproduction sexuée. C'est le cas par exemple de l'espèce de puceron des céréales *Sitobion avenae* qui présente un cycle de reproduction parthénogénétique cyclique : qui se reproduit essentiellement de façon clonale pendant la bonne saison et de façon sexuée avant l'hiver (Rispe *et al.*, 1998) (Rispe & Pierre 1998). Par conséquent, les lignées qui prédominent dans l'ouest et le nord de la France (hivers doux ou modérément froids) sont de type intermédiaire (avec prédominance de reproduction asexuée) alors qu'en Roumanie (hivers plus froids) les lignées sont essentiellement sexuées (Dedryver *et al.* 2001; Papura *et al.* 2003). La reproduction sexuée chez ces organismes conduit donc à la formation de zygotes pouvant résister aux conditions rudes de l'hiver. Dans ce cas, on peut suggérer que le sexe a été sélectionné à court terme pour aider à la résistance au froid et non pas pour favoriser la recombinaison. L'exemple des pucerons pourrait être similaire à ce qui se passe chez les dinoflagellés du genre *Alexandrium*, doté de la capacité à se reproduire de façon asexuée pendant les efflorescences et sexuée quand les conditions environnementales ne sont plus favorables à leur développement (formation de kystes résistants).

Impact de la reproduction clonale sur la diversité génétique

La reproduction clonale (asexuée) est un système de reproduction au cours duquel des organismes produisent de nouveaux descendants génétiquement identiques (Richards 2003; de Meeûs, Prugnolle, *et al.* 2007b). Contrairement à la plupart des animaux et plantes, une vaste majorité de microorganismes eucaryotes se reproduit clonalement. L'effet de la reproduction clonale sur la diversité génétique a été beaucoup étudié. Comme nous venons de le voir, la reproduction clonale est caractérisée par un avantage à court terme par rapport à la reproduction sexuée car elle évite le coût du sexe et peut maintenir les combinaisons de gènes favorables (Smith, Maynard-Smith, 1978) En d'autres termes, l'avantage de l'asexualité est de pouvoir assurer le maintien de gènes coadaptés (Fisher 1930) et de réduire les conflits intra et inter génomiques (Bell, 1982). Cependant la reproduction clonale pourrait présenter un désavantage à long terme en raison de l'absence de recombinaison ne permettant pas l'évolution rapide du génome dans un environnement changeant (Williams 1975, Maynard Smith 1978). Les organismes asexués présenteraient donc un avantage majeur pour se propager rapidement. En effet, toutes choses étant égales (même fertilité, même temps de génération, etc...), si on compare une population asexuée à une population sexuée, le coût de production des mâles à chaque génération (qui ne produisent pas directement de descendant et qui correspondent généralement à la moitié des individus de la population sexuée) sera un handicap à court terme par rapport à la population asexuée chez qui tous les individus se reproduiront. La balance entre reproduction sexuée et asexuée pourrait donc dépendre de la stabilité des conditions environnementales du milieu. On peut supposer que dans des environnements stables, la clonalité serait plutôt favorisée, tandis qu'en milieu instable ou changeant, la

reproduction sexuée serait sélectionnée. Dans des populations naturelles, la principale cause de maintien de la variabilité génétique peut être induite par la complexité de l'environnement naturel (Bell 1997). Des travaux théoriques ont prédit que la diversité génétique pourrait être maintenue dans des environnements hétérogènes si la sélection favorise différents types d'individus à différentes échelles spatiales et ou temporelles (Smith, Hoekstra, 1980) Chez *Ditylum brightwellii* (diatomée), les importantes variations en termes de croissances observées entre isolats sont dues à des changements génétiques rapides (quelques semaines) (Rynearson, Virginia Armbrust, 2004). L'étude des taux de croissance d'organismes ayant la capacité de se reproduire de façon asexuée ou sexuée pourrait aider à mieux appréhender la stratégie adoptée par ces organismes face aux conditions environnementales stables et instables. *Alexandrium minutum*, grâce à son cycle combinant reproduction sexuée et asexuée serait un modèle biologique idéal pour répondre à ce genre de questions.

Les stratégies mixtes (reproduction sexuée et asexuée)

Certains organismes ont la capacité de faire à la fois de la reproduction sexuée et asexuée. Ces organismes peuvent donc bénéficier des avantages des régimes de reproduction sexuée et asexuée. La reproduction sexuée va générer de nouvelles combinaisons d'allèles tandis que la clonalité va favoriser une propagation rapide du meilleur génotype dans une population. Ce système de reproduction est caractéristique chez plusieurs agents pathogènes dont les cycles de vie complexes impliquent plus d'un hôte intermédiaire. On peut citer en exemple le protozoaire *Plasmodium falciparum*, agent parasite responsable de la malaria. Le cycle de ce parasite présente une phase diploïde (sexuée) chez le moustique et une phase de reproduction en clones haploïdes chez l'humain. Chez les organismes libres, l'alternance entre reproduction asexuée et sexuée connue sous le nom de parthénogenèse cyclique est commune chez les organismes unicellulaires, les champignons, les plantes, les rotifères, les crustacés cladocères (daphnies) et les insectes, tel que le puceron (Halkett *et al.* 2005). Beaucoup de producteurs primaires tels que le phytoplancton, les algues, les angiospermes clonaux pratiquent une reproduction partiellement asexuée (Honnay, Bossuyt, 2005). C'est le cas notamment de plusieurs organismes planctoniques (Honnay, Bossuyt, 2005) (Figueroa and Rengefors, 2006) chez qui le taux de clonalité par rapport à la reproduction sexuée dans des populations naturelles a une influence cruciale sur la démographie et la génétique. Les organismes qui se reproduisent à la fois par un régime sexué et asexué constituent des modèles très intéressants pour étudier les impacts des systèmes de reproduction sur la structure génétique (Halkett *et al.* 2005).

Approches de génétiques des populations pour déterminer le système de reproduction

Dans une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg, c'est-à-dire avec un nombre infini d'individus, panmictique, et qui n'est soumise ni à la sélection, ni à la migration, les déséquilibres de liaison sont absents et la diversité génétique est élevée. Ce sont ces paramètres qui définissent la structure génétique d'une population et donc tout écart à la panmixie aura un impact sur cette structure. À partir des analyses de structure génétique d'une population, on peut donc en déduire son régime de reproduction principal. Toutefois, le système de reproduction n'est pas le seul facteur pouvant influencer la structure génétique d'une population. D'autres paramètres évolutifs tels que la sélection, la dérive génétique et la migration peuvent également influencer la structure génétique d'une population.

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des marqueurs moléculaires de type microsatellites pour étudier les systèmes de reproduction chez *A. minutum*. Les marqueurs microsatellites permettent d'estimer le mode de reproduction majoritaire des espèces. De plus en plus de travaux chez les microalgues qui alternent entre reproduction sexuée et asexuée ont employé des marqueurs microsatellites pour déterminer le régime de reproduction majoritaire des modèles étudiés (Erdner *et al.*, 2011; Richlen *et al.*, 2012). Le principal intérêt d'utiliser des marqueurs microsatellites chez des organismes partiellement clonaux réside dans la possibilité de pouvoir comparer deux individus prélevés à des échelles spatio-temporelles différentes, et prédire s'ils ont le même génotype ou deux génotypes différents. Si le nombre de locus utilisé est suffisamment résolutif (beaucoup de locus), les microsatellites peuvent aider à déterminer avec précision le degré de clonalité des populations. Différentes approches pour tester la clonalité sont résumées dans la revue de (Halkett *et al.* 2005) avec les avantages et limites de chacune de ces approches.

Choix des marqueurs génétiques : Les microsatellites

Un marqueur génétique est une portion d'un acide nucléique (ADN) ou le produit d'une portion d'un acide nucléique (protéine) de l'organisme étudié. Afin de réaliser des inférences biologiques, la variation de la même portion de cet ADN doit être étudiée entre individus. Il est important que la portion de l'ADN ou de son produit ait la même localisation dans le génome de chaque individu (au même endroit sur le même chromosome), ce qui correspond à un locus (de Meeûs *et al.*, 2007). Un marqueur génétique peut être polymorphe (lorsque les locus sont variables entre individus), neutre (lorsque la valeur sélective des individus est la même quel que soit l'allèle présent au locus), discriminant (quand il permet de différencier des individus apparentés), codominant (lorsque tous les génotypes, homozygotes et hétérozygotes sont distinguables) et non épistatique (lorsque qu'il est indépendant de l'expression des autres marqueurs). Les marqueurs microsatellites répondent à tous ces critères et nous avons choisi d'utiliser ce type de marqueur pour l'étude de génétique des populations et des systèmes de reproduction de la microalgue toxique *Alexandrium minutum*. Les microsatellites sont des répétitions en tandem des motifs d'ADN de quelques paires de bases (1

à 6) (Kelkar *et al.*, 2010). Ils ont des taux de mutations très élevés, ce qui leur confère des caractéristiques de marqueurs polymorphes. Ils sont très abondants dans les génomes des eucaryotes. Ce sont les marqueurs les plus populaires en génétique des populations(Guichoux *et al.*, 2011). Les marqueurs microsatellites utilisés au cours de ce travail de thèse ont été développés par Nagai *et al.* (2006). Il s'agit d'un ensemble de 12 locus testés sur des échantillons d'*A. minutum* en provenance de diverses régions du globe (Nagai *et al.*, 2006) et plus récemment ces marqueurs ont été utilisés pour l'étude des populations méditerranéennes (Casabianca *et al.*, 2011).

Contexte général et structure du document

La première partie de ce travail a consisté à essayer de mieux cerner le système de reproduction sexuée chez *A. minutum* en étudiant en particulier la reconnaissance gamétique (mating type) et la formation des kystes. Il s'agissait par ailleurs de tester si au sein de cette espèce l'éloignement géographique et/ou temporel (au sein d'une efflorescence) avait un impact sur l'incompatibilité pré- et post- zygotique entre souches. Pour parvenir à cet objectif, j'ai mis en place des expériences de croisements entre souches d'origines différentes (Penzé et Rance) isolées à différentes périodes du bloom. Les résultats de ce travail sont présentés et discutés dans le premier chapitre.

Dans le second chapitre, je me suis intéressé à la variation génétique spatio-temporelle au sein et entre efflorescences toxiques de la Penzé et de la Rance entre les années 2010 et 2011. Même si certaines études s'étaient intéressées aux comparaisons spatio-temporelles des populations de phytoplancton, notre étude est la première du genre à comparer deux années consécutives et deux sites d'une même région avec des échantillonnages effectués sur les mêmes points de prélèvements au cours d'un évènement d'efflorescence. Ce travail est présenté dans le chapitre 2 sous format d'article (accepté dans *Molecular Ecology*).

Le troisième chapitre est consacré à la structure génétique des populations d'*A. minutum* le long des côtes bretonnes. En particulier, nous nous sommes intéressés aux récents développements en 2012 d'efflorescences toxiques dans la rade de Brest (Daoulas) jusqu'alors préservée des efflorescences de la microalgue et dans l'aber Wrac'h, où les efflorescences sont plus sporadiques et avaient disparu ces dernières années. Ces efflorescences exceptionnelles présentaient plus de 42 millions de cellules par litre d'eau en rade de Brest. Un des objectifs de ce chapitre était d'étudier la dispersion chez cette espèce et d'autre part d'identifier l'origine de ces nouvelles efflorescences toxiques. Ces résultats sont présentés sous forme de projet d'article en français.

Enfin, dans le quatrième chapitre, je me suis intéressé à la variabilité intraspécifique chez *A. minutum* en comparant le taux de croissance de différentes souches isolées en Penzé et en Rance à différentes périodes du bloom. En effet, le taux de croissance individuel est une des composantes de la valeur sélective des souches et par conséquent est soumis à sélection. Notre objectif était donc de vérifier si les souches qui étaient présentes à différentes périodes du bloom se caractérisaient par des stratégies de reproduction différentes. Les résultats de ce chapitre sont donnés sous forme d'un projet d'article en anglais (en préparation pour *Harmful Algae*).

CHAPITRE 1

Étude du cycle de reproduction

d'*Alexandrium minutum*

"Every student knows that homologous chromosomes usually segregate randomly during the division of the nucleus; no professor knows why".

Graham Bell 1982 (The paradox of sexuality, The Masterpiece of Nature)

Introduction

Tous les organismes vivants passent par divers stades de vie, plus ou moins différents, avant de revenir à leur état initial. Ce processus est appelé cycle de vie, en raison de son caractère cyclique ou répétitif (Bell, Koufopanou, 1991). Le cycle de vie comprend généralement des processus de reproduction sexuée et/ou asexuée.

Chez les dinoflagellés qui sont unicellulaires, le cycle de vie implique différents types de cellules : 1) les cellules végétatives biflagellées haploïdes, qui sont pélagiques ou planctoniques et qui composent les efflorescences, 2) les kystes temporaires haploïdes benthiques sans flagelle, 3) les gamètes flagellés, 4) les planozygotes quadriflagellés pélagiques formés par fusion des gamètes et 5) les kystes dormants diploïdes (hypnozygotes) benthiques dépourvus de flagelle (Dale 1983, Pfiester and Anderson1987) (Blackburn *et al.*, 1989; Figueroa & Bravo, 2005; Fritz *et al.*, 1989).

Ces différentes phases du cycle vont être responsables de l'apparition récurrente des efflorescences toxiques le long des côtes. L'initiation, le développement et le déclin des efflorescences planctoniques vont dépendre du ratio entre phases benthiques et planctoniques (Anderson 1983). Les phénomènes d'efflorescences correspondent à l'accroissement rapide du nombre de cellules végétatives dans la population. Chaque cellule se divise alors par mitose pour donner deux nouvelles cellules végétatives. La phase de déclin de l'efflorescence, qui commence généralement quand les conditions environnementales deviennent défavorables à la croissance, coïncide chez certaines espèces à la formation des kystes sexués. Cependant, Anglès et ses collaborateurs (Anglès *et al.*, 2012) ont montré que les planozygotes (issus de reproduction sexuée) se forment durant la phase exponentielle des efflorescences (10^4 cellules végétatives par litre) chez *A. tamarens.* Ce résultat suggère que la reproduction sexuée chez cette espèce ne se fait pas uniquement en phase finale des efflorescences (réponse aux conditions environnementales défavorables). Après les périodes d'efflorescences, le nombre de kyste dans les sédiments à tendance à augmenter tandis que cette tendance est à la baisse pendant les periodes de non floraison (Anglès *et al.*, 2012.).

Ces kystes benthiques enfouis dans les sédiments vont pouvoir survivre pendant plusieurs mois voire plusieurs années avant de donner de nouvelles cellules végétatives. Les kystes temporaires quant à eux, correspondent à des cellules végétatives qui perdent leurs flagelles en s'enkystant pour une courte période de temps. Ce type de kyste, qui constitue un type de réponse rapide face à des changements environnementaux abrupts biotiques ou abiotiques assure une transition rapide entre le stade benthique et le stade planctonique (Garcés 2002). Par exemple, l'enkystement temporaire chez *Scrippsiella trochoidea* a pu être provoqué

expérimentalement en culture par des effets allopathiques[1] (Fistarol *et al.*, 2004) dus à la présence de certaines microalgues toxiques comme *Alexandrium tamarense, Karenia mikimotoi* ou *Chrysochromulina sp.*. Ce type de kyste serait un moyen de défense à court terme assurant la survie de la cellule.

Le cycle sexué d'*Alexandrium minutum*

Bien que von Stosch ait mis en évidence l'existence de la reproduction sexuée chez les dinoflagellés au début des années 1970 (von Stosch, 1973) (plus précisément chez *Gymnodinium pseudopalustre* et *Woloszynskia apiculata),* le cycle sexué chez les dinoflagellés n'a été décrit seulement que chez 1% des 2500 espèces connues (Elbrächter, 2003). La reproduction sexuée d'*Alexandrium minutum* a été observée en culture par Probert *et al.* (2002) et (Figueroa *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2010). Elle comprend les 5 étapes suivantes : 1) la formation et l'appariement des gamètes 2) la fusion des gamètes, 3) la formation du planozygote mobile, 4) la formation de l'hypnozygote par enkystement et 5) la germination (planoméiocyte) (Pfiester & Anderson 1987). Il est généralement admis que la méiose se produit au cours de la germination du zygote, dans le planoméiocyte qui aboutit à la formation de deux cellules végétatives (Figueroa *et al.*, 2010), (Fig. 1). En culture, il a été montré que le planozygote d'*A. minutum* pouvait également redonner des cellules végétatives sans passer par une phase d'enkystement (Figueroa *et al.*, 2007).

La formation des gamètes

Chez les beaucoup d'organismes terrestres et aquatiques, la reproduction sexuée se traduit par la fusion de deux gamètes de taille différente (anisogamie). De façon arbitraire le petit gamète est appelé gamète mâle et le gros gamète, gamète femelle. En revanche, la reproduction impliquant des gamètes de même taille sera désignée sous le nom d'isogamie. Même si chez les espèces isogames aucune différence morphologique entre gamètes n'est détectée, ils peuvent présenter des caractéristiques (physiologiques) différentes (Hoekstra, 1987). Chez beaucoup d'espèces, ces caractéristiques sont binaires, il s'agit des types sexués (+) et (-). C'est le cas notamment chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas* qui présente des types sexuels (mt+) et (mt-). Ces types sexués expriment chacun des agglutinines flagellaires spécifiques et complémentaires pour assurer leur appariement (Adair *et al.*, 1983; Musgrave *et al.*, 1981). Le type d'appariement des gamètes est variable suivant les espèces. On parle de souches hétérothalliques quand les gamètes sont de types gamétiques différents (+ou-) et de souches homothalliques quand les gamètes ont le même type gamétique. Dans ce dernier cas, les cellules peuvent être génétiquement identiques et être issues de la même culture monoclonale.

Au cours de ces dernières années, les études des cycles de reproduction chez les espèces phytoplanctoniques ont montré que les systèmes de reconnaissance en gamètes (type sexuel) étaient très

1 Allélopathie : libération de produits chimiques par certaines espèces de micro-algues toxiques lors des compétitions interspécifiques pour inhiber la croissance d'autres espèces.

diverses parfois au sein du même groupe. Cette observation suggère que l'hétérothallisme et les mécanismes de déterminisme du sexe auraient évolués plusieurs fois et de façon indépendante au cours de l'évolution. Par exemple, les diatomées de l'ordre des Pennales montrent une tendance à l'hétérothallisme alors que les diatomées de l'ordre des Centrales qui dérivent des précédentes au cours de l'évolution sont toutes homothalliques (Kooistra *et al.*, 2007). Un continuum entre homothalisme et heterothallisme est parfois même observé chez la même espèce (par exemple chez le dinoflagellé *Gymnodinium catenatum* (Figueroa *et al.*2006). Dans certain cas, l'évolution de l'hétérothallisme vers l'homothallisme peut être relativement rapide, comme le témoigne une étude expérimentale effectuée sur la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*. En effet, Bell (2005) met en évidence des modifications de types gamétiques (mating type) en moins de 100 générations (Bell, 2005). La reconnaissance gamétique constitue donc un système de contrôle fondamental de la syngamie et sa plasticité pourrait être un mécanisme permettant d'ériger des barrières prézygotiques de reproduction à des stades précoces lors d'évènements de spéciation.

Les types gamétiques chez *Alexandrium*

La formation et la rencontre des gamètes restent encore aujourd'hui relativement mal connues chez les dinoflagellés. Différentes espèces d'*Alexandrium* ont été décrites comme isogames et hétérothalliques. Cependant, des gamètes de tailles différentes (anisogamie) ont été observée chez *A. tamarense* (Anderson, 1980; Turpin *et al.*, 1978) ainsi que des cas d'homothallisme observés chez *Alexandrium taylori* (Giacobbe, Yang, 1999). En effet, cette dernière espèce est capable de former des zygotes *in vitro* au sein de culture monoclonale (par autofécondation). Chez les dinoflagellés, plusieurs espèces ont été décrites comme hétérothalliques (auto-incompatibles), c'est le cas notamment de *Lingulodinium polyedrum* (Blackburn *et al.*, 2001; Figueroa, Bravo, 2005) ou d' *A. tamarense (*en tant que *A. excavatum).* Cependant, chez cette dernière espèce, bien que de rares cas d'homothallisme aient été observés les hypnozygotes issus de ce type de croisements se sont avérés non viables (Destombe, Cembella, 1990) Plus récemment, Figueroa et collaborateurs (2007) se sont intéressés aux systèmes de reconnaissance gamétique chez deux espèces de dinoflagellé *A. minutum* et *A. tamutum* en effectuant des croisements contrôlés. Les suivis pendant un mois de ces croisements ont montré que les souches monoclonales étaient auto-incompatibles (hétérothalliques) chez les deux espèces étudiées. Par ailleurs, comme chez *A. tamarense*, la formation de kystes sexués chez *A. minutum* et chez *A. tamutum* en culture ne peut s'expliquer par un système hétérothallique binaire. Ces observations suggèrent donc que le système de reconnaissance des gamètes est un système hétérothallique complexe faisant intervenir plus de deux types gamétiques (Destombe and Cembella 1990 ; Figueroa *et al.* 2007, Brosnahan *et al.* 2010).

Le rôle des hypnozygotes dans le maintien et la diversité des espèces

Chez *A. tamarense*, les hypnozygotes confèrent une résistance à des stress prolongés et c'est, dans certaines populations naturelles, la forme la plus fréquemment rencontrée sur de longues périodes de temps (Anderson, Wall, 1978). Paradoxalement, les efflorescences qui correspondent aux phénomènes les mieux étudiés car les plus spectaculaires et parfois dangereux pour la santé humaine, ne représentent qu'une petite partie du cycle de vie de l'espèce. Les hypnozygotes constituent donc une phase clef pour la survie de l'espèce. Cependant, la fusion des gamètes n'est pas nécessairement associée à la formation de kystes, mais elle reste obligatoire pour la survie de l'espèce en particulier dans les régions où la croissance végétative est limitée dans le temps et où la reproduction sexuée se fait en fin d'efflorescence (région où les hivers sont longs). Ces processus d'enkystement et de recombinaison sont donc intimement liés chez certaines espèces comme *A. tamarense* (Brosnahan *et. al* 2010).

Les hypnozygotes comme réservoir de variabilité génétique

La durée de vie de cette phase est variable suivant les espèces, et peut persister de quelques mois à plusieurs années (ex situ) (1999), voire même jusqu'à plusieurs décennies lorsqu'ils sont préservés naturellement dans les sédiments marins (Keafer *et al.*, 1992; McQUOID *et al.*, 2002; Mizushima, Matsuoka, 2004). D'un point de vue diversité génétique, l'accumulation de ces kystes résistants dans les sédiments est comparable aux banques de graines observées chez certaines plantes et constitue donc un important réservoir génétique. En effet, sous des conditions favorables, ces kystes pourront germer et être à l'origine de la diversité génétique observée lors des événements d'efflorescence (Lebret *et al.*, 2012) (Dia *et al.* Soumis).

Importance des kystes sexués sur le développement des efflorescences

La relation entre la présence de kystes dans le milieu et l'initiation et l'importance des efflorescences de dinoflagellés a été mis en évidence dans le milieu naturel (Anderson, Wall, 1978). Ces kystes résistants sont également susceptibles d'être dispersés de façon passive par les courants (Anglès *et al.* 2010). Erard-Le Denn (1997) suggère que chez *A. minutum*, le déplacement des masses d'eau en Baie de Morlaix (courants de marée et crues des rivières) pourrait jouer un rôle non négligeable dans la dispersion des kystes. Chez cette même espèce en Méditerranée, la diminution du nombre de kystes sexués observés dans les sédiments en milieu semi-ouvert (port d'Arenys) en dehors des périodes d'efflorescences suggère que la dispersion des kystes se fait de façon passive et continue (Anglès *et al.*) 2010. Enfin, de façon générale, le cycle de vie d'*A. minutum* et plus particulièrement la formation des kystes sexués joueraient un rôle fondamental dans la dynamique et la résilience des populations en particulier dans les milieux semi-fermés comme les ports ou les estuaires.

Il est donc primordial de mieux comprendre les différentes étapes de ce cycle de vie pour mettre en place des systèmes de surveillance efficaces et éventuellement d'essayer de circonscrire les efflorescences toxiques (Probert *et al.* 2002).

Etude des types sexués (mating types)

Si différents travaux se sont intéressés aux systèmes de reconnaissances gamétiques chez les dinoflagellés, rares sont les études qui se sont intéressées aux effets de l'identité (ou l'origine) des souches sur le succès de germination des hypnozygotes (Destombe et Cembella 1990, Brosnahan *et al.* 2010). Chez les plantes, le succès des croisements ainsi que la valeur sélective des descendants qui en sont issus peut être largement influencé par les facteurs parentaux comme par exemple les liens de parentés (ou distances génétiques inter-parentales) (pour revue voir (Charlesworth, Charlesworth, 1987). Si les individus qui se croisent sont génétiquement apparentés, la viabilité des descendants pourrait en être affectée par des effets de dépression de consanguinité (Charlesworth, Charlesworth, 1987; Johnston, 1992). Des travaux sur les variations de succès de reproduction chez l'algue rouge haplo-diploïde *Gracilaria gracilis (*comme *G. verrucosa)* ont montré que le succès d'appariement chez cette espèce était significativement influencé par l'origine géographique des individus et leur lien de parenté (Richerd *et al.*, 1993). Chez *A. tamarense*, une étude phylogéographique a montré l'existence de cinq groupes distincts au sein de l'espèce. Le groupe I est composé de souches nord et sud-américaines, de l'Ecosse, des Iles Féroé, de l'Afrique du sud et du nord de l'Asie. Le groupe II est composé seulement par des souches italiennes. Tandis que le groupe III est composé de souches d'Europe de l'Est avec quelques isolats de de la région baltique et du Japon. Le groupe IV est représenté par des souches en provenance de l'Australie, de la Nouvelle Zélande et de la mer méditerranée. Enfin le groupe V est composé par des souches de Tasmanie. (Lilly *et al.*, 2007). Des expériences de croisements inter groupes (entre le groupe I toxique et le groupe III non toxique ont mis en évidence la possibilité d'obtenir des kystes hybrides en culture. Ces résultats démontrent que les fusions de gamètes sont possibles (compatibilité pré-zygotique) entre ces différents groupes (reconnaissance gamétique) cependant les zygotes qui en sont issus ne sont pas capables de redonner des cellules végétatives viables (Brosnahan *et al.,* 2010).

Ces phénomènes d'incompatibilités post-zygotiques pourraient être liés à la différenciation génétique entre populations. En effet, des populations isolées géographiquement pourraient par dérive ou par sélection avoir divergé génétiquement, ce qui pourrait aboutir à des phénomènes d'incompatibilités pré ou post-zygotiques liés à la dépression de croisement éloigné « out-crossing depression ». De même un isolement phénotypique (au cours des efflorescences) pourrait engendrer des phénomènes similaires. Un des objectifs de ce travail a donc consisté à tester les compatibilités entre des souches d'*A. minutum* provenant de deux sites différents et échantillonnées à des périodes différentes des efflorescences.

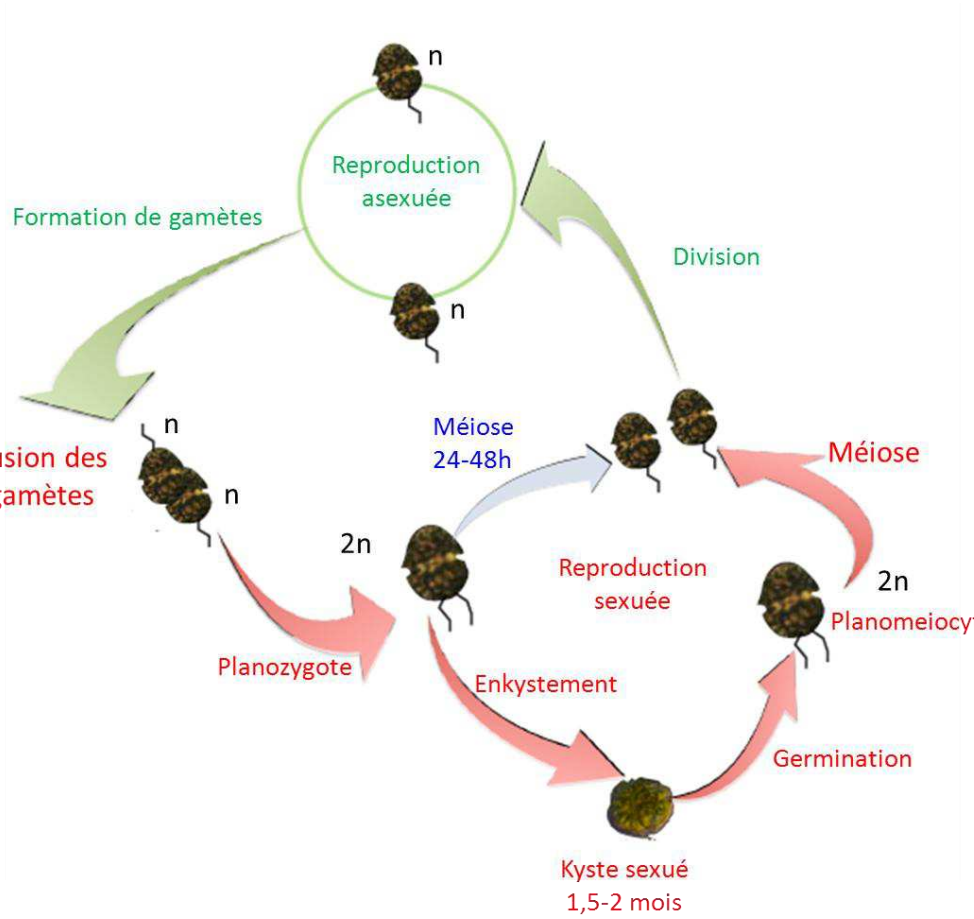


Figure 1. Cycle de reproduction d'*Alexandrium minutum* d'après Figueroa *et al.* 2007., Figueroa *et al.* 2008 et Figueroa *et al.* 2010.

Matériel et méthodes

Origine des souches d'*A. minutum* :

Au cours de cette étude nous avons effectué plusieurs tests de croisements, avec à chaque fois une douzaine de souches monoclonales par test. Les souches sélectionnées proviennent à part égale de Penzé et de Rance, et dans chaque site trois souches ont été prélevées au début (initiation) et à la fin des efflorescences (figure 3).

Préparation des croisements d'*A. minutum*

Toutes les souches de cette étude sont monoclonales et sont maintenues à une température de 19°C avec un cycle de luminosité 12h : 12h à une intensité de 70 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. Le milieu de culture utilisé est le F/2 (solution d'eau marine enrichie, Sigma) préparé en autoclavant de l'eau naturelle de l'estuaire de Penzé. Cette eau est mise à l'abri de la lumière trois mois avant toute utilisation. Des expérimentations en laboratoire suggèrent que la sexualité chez *Alexandrium* peut être induite par une limitation des ressources nutritives dans leurs milieux de culture (Anderson *et al.*, 1984; Anderson, Lindquist, 1985). Quatre semaines avant

l'expérience de croisement les souches ont été placées dans du milieu de culture F/2 dilué dix fois afin de les mettre en condition de stress (pour induire la reproduction sexuée). La cinétique de croissance a été suivie quotidiennement pour chaque souche en utilisant la cytométrie en flux (Marie *et al.*, 2001). Les cellules ont été transférées à la fin de la phase exponentielle de croissance de façon à obtenir les mêmes quantités de cellules par souche et par puits (Fig. 2.A) (Destombe, Cembella, 1990; Figueroa *et al.*, 2006). Par conséquent, pour chaque croisement on met en présence soit un nombre sensiblement égal de cellules provenant de deux souches différentes (désigné dans la suite de l'exposé comme allo-croisement) soit provenant d'une même souche (désigné comme auto-croisement). Les croisements sont faits en duplicatas dans des plaques de 24 puits stériles (CytoOne, USA Scientific, USA). Chaque puits contient un volume total de 2 ml de culture. Ces cultures sont placées dans une armoire dont la température est régulée à 19°C avec une intensité lumineuse luminosité à 70 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ à une photopériode de 12/12.

Détermination des fusions

Au bout de 48h, les puits ont été observés au microscope inversé (Olympus CKX41) à intervalle régulier (tous les deux à trois jours pendant 15 jours) afin de détecter les fusions de cellules. Nous avons considéré qu'il y avait fusion de cellules si l'appariement entre cellules avait été observé au minimum à deux dates différentes et que le nombre d'observation est au moins supérieur à 1 en moyenne par puits.

Détermination du nombre de kystes sexués :

Les kystes sexués d' *A. minutum* ont des formes plus ou moins arrondies, et sont généralement entourés de mucilage (Bolch, de Salas, 2007). Nous nous sommes basés sur cette description pour identifier la présence d'hypnozygotes dans notre expérience de croisements. Puisque les deux types de kystes (sexués et asexués) étaient difficiles à identifier morphologiquement juste après l'expérience de croisement, nous avons décidé de conserver les plaques de croisements au froid et à l'obscurité pendant plus d'un an (voir Fig. 2.B). Le nombre total de kystes (hypnozygotes) a été estimé pour chaque croisement au bout d'un an.

Germinations de kystes

Après une année à 4°C, les kystes ont été isolés par micromanipulation et placés individuellement en culture dans du milieu F/2 dans des plaques 96 puits (Cytoone). Les plaques contenant ces hypnozygotes ont été placées dans les conditions de culture suivantes : intensité de lumière de 70 microEinstein.$m^{-2}.s^{-1}$ avec une périodicité de 12 :12 (L : D) à 24°C, conditions idéales pour la germination des kystes (Anderson, 1998). Les puits ont été observés à intervalle régulier afin de détecter la germination des kystes. Enfin, la viabilité des cellules issues de la germination des kystes a été estimée au bout de un mois.

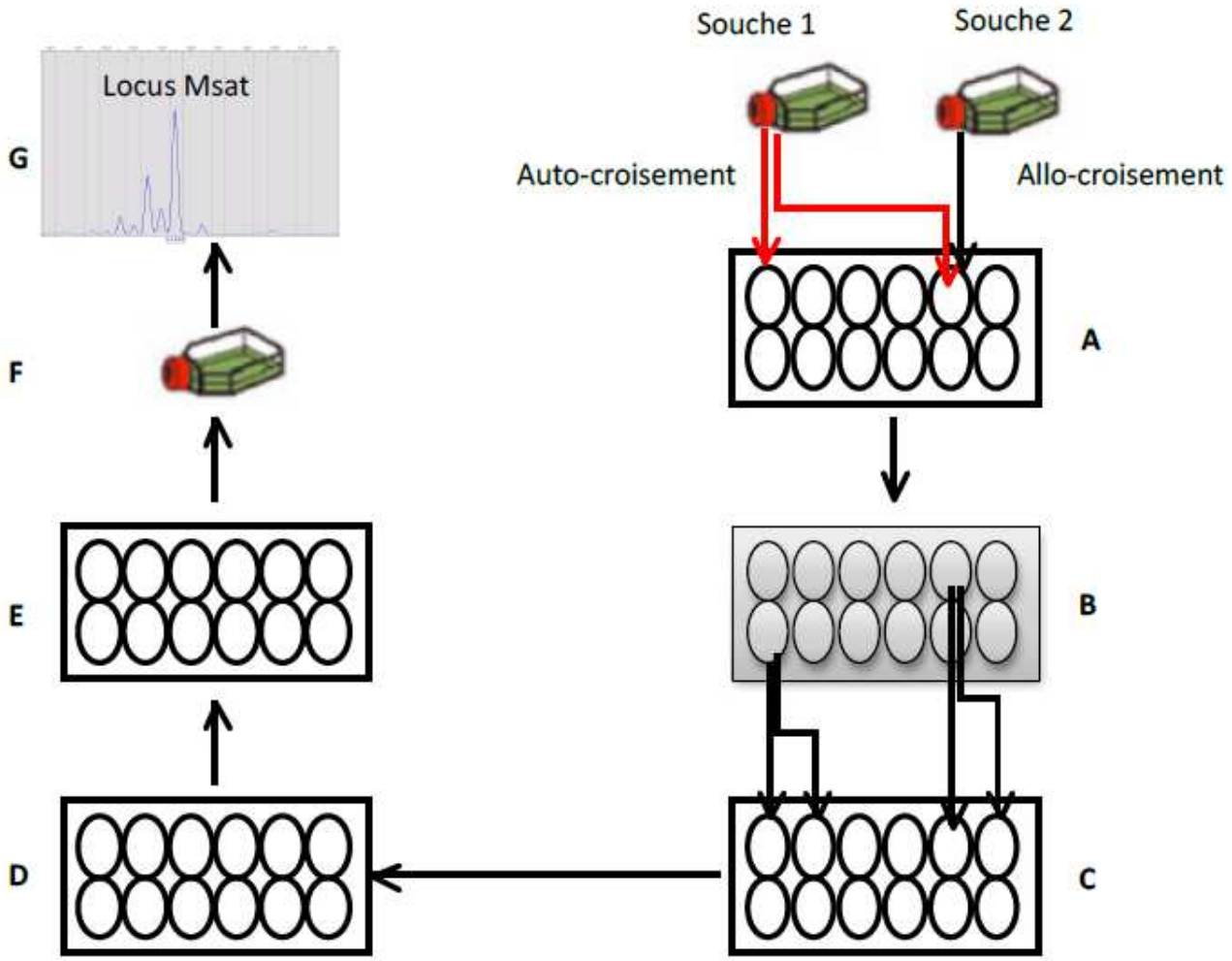


Figure 2. Procédé expérimental des tests de croisements. Les souches sélectionnées selon leurs origines géographiques et leur période d'efflorescence (début et fin d'efflorescence) sont mises en culture dans des flasques de 50 ml (milieu appauvri en nutriments). A) inoculation de deux souches différentes (104 cellules par souches) ou d'un double volume d'une même souche (auto-croisement) dans un puits. Au bout de 48 heures, les fusions sont dénombrées. B) Après 15 jours d'observations, la plaque est placée dans une armoire thermostatée à 4°C et à l'obscurité. C) Au bout d'une année, pour chaque croisement 36 kystes (si possible) sont isolés en puits individuel (1 kyste par puits) et placés dans des conditions favorables à leur germination (T° : 24°C, lumière : 70 microEinstein.m-2.s-1). D) une à deux semaine après la germination des kystes, les cellules végétatives issues des kystes sont isolées afin d'obtenir des cultures monoclonales. E) les cellules issues des isolements des kystes ayant germés sont mises en culture. F) les cultures sont transférées dans des flasques de 50 ml. Les descendants des croisements sont génotypés de même que leurs parents.

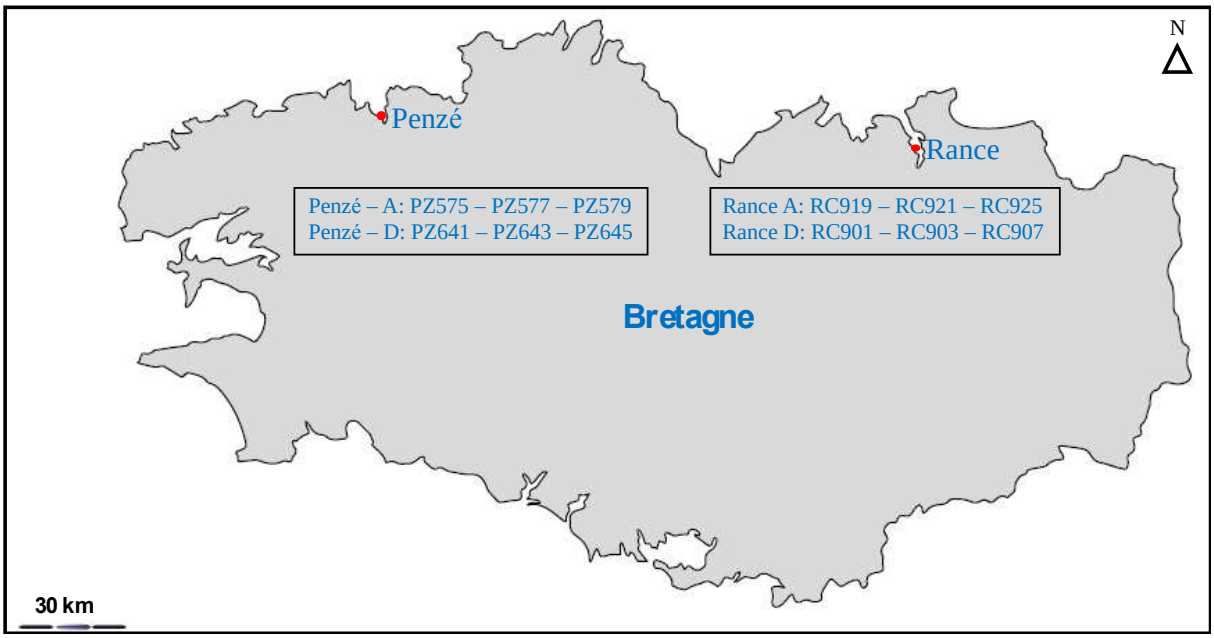


Figure 3. Localisation des estuaires de la Penzé et de la Rance et liste des souches *A. minutum* échantillonnées en 2011 et utilisées dans l'expérience de croisement. Six souches dont 3 isolées en début (A) et 3 en fin d'efflorescence (D) ont été isolées par site.

Résultats et discussions

La reconnaissance gamétique (mating types)

La reconnaissance gamétique est un élément clé de la reproduction sexuée. Au cours de nos observations, aucune différence morphologique n'a été observée entre les cellules végétatives et les gamètes. Ces résultats confirment que les gamètes ne sont pas morphologiquement différenciés chez les *Alexandrium* tout comme chez la plupart des dinoflagellés et qu'il est donc très difficile de les identifier (Kim *et al.*, 2002). Seul le comportement des cellules permet de distinguer les gamètes des cellules végétatives (voir figure 1). En effet, dans notre étude, seules les cellules qui fusionnaient par accolement de la partie antérieur ont été considérées comme des gamètes (Figueroa *et al.* 2007).

Les résultats consignés dans le tableau 1 donnent le nombre moyen de fusions observées par croisement. Ils montrent que la quasi-totalité des souches se croisent entre elles, 50 fusions obtenues sur un ensemble de 78 croisements soit 64%. Ces résultats révèlent que sur les douze souches étudiées, 6 (50%) sont homothalliques. Par conséquent, il est pratiquement impossible de savoir si les fusions observées dans les autres croisements (allocroisements) sont issues de croisements homothalliques ou hétérothalliques. Seule, l'absence de fusion dans les témoins (autocroisements) PZA579/PZA579, PZD641/PZD641, RCD901/RCD901, RCD907/RCD907, RCA919/RCA919, RCA925/RCA925 nous permet de tester les types gamétiques. Nos observations (Tableau 1) confirment qu'il existe probablement plus de deux types sexués chez *A. minutum*. En effet les mating type + et – ne suffisent pas à expliquer les résultats des croisements. Il faut donc soit considérer qu'il existe un grand nombre de types gamétiques chez cette espèce (Brosnahan *et al.* 2010). Chez

certains organismes (comme les basidiomycètes) il peut exister de deux à quelques milliers de types gamétiques (pour revue voir (Billiard *et al.*, 2010). Il suggère que le grand nombre de type gamétique chez ces espèces aurait évolué en réponse à la sélection pour augmenter la compatibilité lors de la syngamie. En effet, la sélection fréquence dépendante pourrait agir pour augmenter le nombre de types gamétiques car un nouvel allèle rare apparaissant par mutation dans une population et qui pourrait fusionner aurait directement un avantage et pourrait augmenter en fréquence.

Enfin, la figure 4 montre que les fusions se font entre les différentes souches quelle que soit leur origine géographique et leur période d'isolement. Malgré la distance géographique séparant la Penzé de la Rance (environ 150 km), les souches d'*A .minutum* de ces deux sites semblent être compatibles sexuellement (compatibilité prézygotique).

Tableau 1 : Nombre moyen de fusions observés par croisement et par puits (pendant 15 jours) entre les différentes souches de Penzé (de A575 à D645) et de Rance (A901 à D925). Les souches avec un préfixe A correspondent aux souches isolées en début de bloom et celles avec un préfixe D en fin de bloom.

Souches	PZA575	PZA577	PZA579	PZD641	PZD643	PZD645	RCD901	RCD903	RCD907	RCA919	RCA921	RCA925
PZA575	3											
PZA577	4	2,3										
PZA579	2	1,3										
PZD641	2,3											
PZD643	5,7	2,3			2,7							
PZD645	5,7	1,3		1,5	2,3	1,3						
RCD901	6,7			1,3								
RCD903	3			1,8				6,8				
RCD907	2,3					1,7		8				
RCA919	3,3			2,3	2,3	2	7,3	5				
RCA921	3,3	1,7	2	4,5	4	3,5	5	7,8	6,3	4,3	14,7	
RCA925	1,7		1,3		3,7	3,3	1,8	4	1,3		10,3	

Nos résultats sont donc en accord avec les observations réalisées sur les souches Méditerranéennes d'*A. minutum* (Figueroa *et al.* 2007) qui suggérait l'existence d'un système hétérothallique complexe chez cette espèce. Le concept d'hétérothallisme complexe est employé lorsque le nombre de types sexuel possible est supérieur à 2.

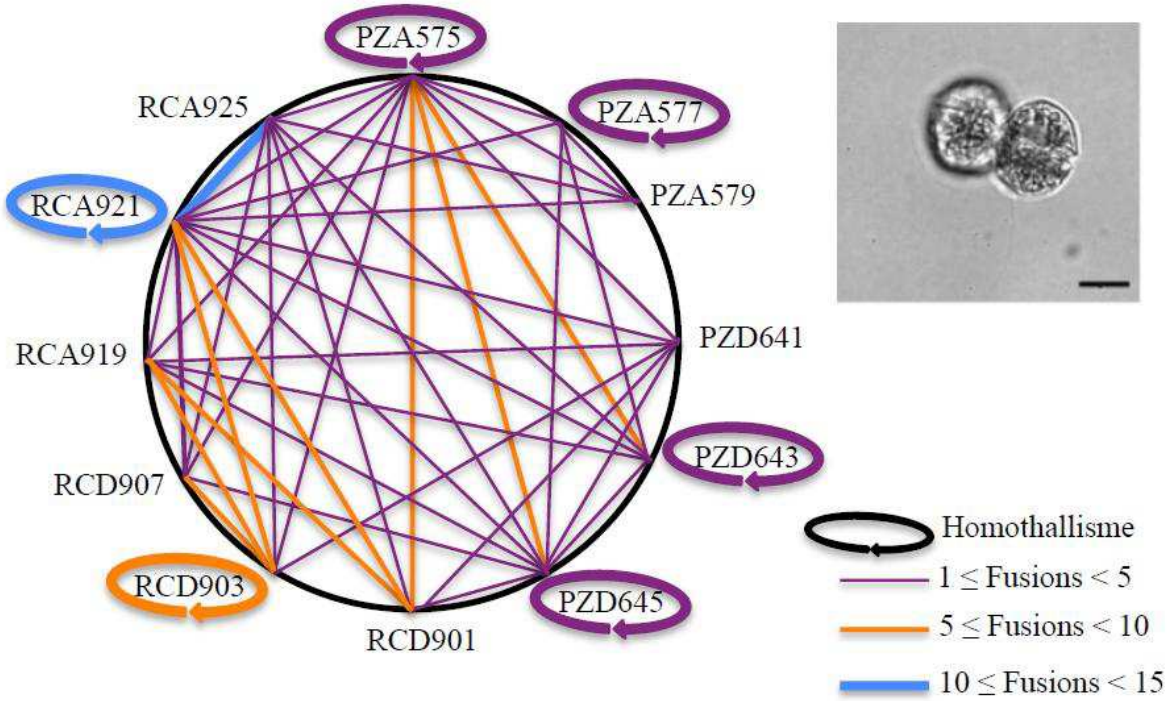


Figure 4. Fréquence d'appariement entre souches et au sein des souches observées au bout de 48 heures. Les épaisseurs de traits sont proportionnelles au nombre de fusions observées. (Photo d'un appariement de deux gamètes d'*A. minutum*).

En nous basant sur l'appariement de gamètes, il est donc tout à fait raisonnable de déduire que chez cette espèce, le système de reconnaissance gamétique qui est la première étape de la reproduction sexuée est régit non pas par deux types sexués mais par un système plus complexe.

Nombre d'hypnozygotes

Nos résultats montrent la formation de kystes dans la majorité des croisements (Tableau 2, figure 5). En effet, seuls 13% des croisements ne présentent pas de kystes. Il s'agit d'une part des 6 allo-croisements suivant: PZA575/RCA925 ; PZA577/PZD643 ; PZD641/PZD645 ; PZD645/RCD903 ; 645/907 ; 907/919 et d'autre part des 4 auto-croisements suivant : PZD641/PZD641 ; PZD643/PZD643 ; RCD907/RCD907 et RCA919/RCA919 (figure 5). Le nombre moyen de kystes observé dans les auto-croisements (x ± SD= 9,00 ± 8,718) est inférieur à celui observé en allo-croisements (x ± SD= 13,833 ± 7,291) (Anova Tableau 3). Ces résultats nous laissent supposer que les kystes observés en auto-croisement ne correspondent pas seulement à des kystes sexués mais pourraient également correspondre au moins en partie à des kystes temporaires. La distinction entre ces deux types de kystes est parfois difficile en culture et nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que ces kystes aient été mal identifiés.

Tableau 2 : Nombre de kystes observés dans les croisements

Souches	PZA575	PZA577	PZA579	PZD641	PZD643	PZD645	RCD901	RCD903	RCD907	RCA919	RCA921	RCA925
PZA575	4											
PZA577	12	16										
PZA579	24	10	11									
PZD641	18	2	22	0								
PZD643	18	0	13	3	0							
PZD645	22	15	22	0	16	22						
RCD901	22	19	21	16	18	21	15					
RCD903	15	18	15	11	5	0	23	7				
RCD907	8	13	14	7	3	0	24	5	0			
RCA919	18	17	16	9	4	21	13	10	0	0		
RCA921	5	23	15	22	22	18	23	19	11	18	24	
RCA925	0	14	9	19	23	22	16	9	14	14	14	9

Table 3 : Différence entre le nombre de kystes observés en allo et en autocroisement
Analyse de variance pour la variable nombre de kystes

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F	P
Type de croisement	1	237,2	237,2	4,20	0,044
Erreur	76	4291,2	56,5		
Total	77	4528,4			

Différentes études se sont intéressées à la formation de kystes sexués chez les espèces de dinoflagellés. Chez *Gymnodinium catenatum*, il y a 50% de chance que des hypnozygotes soient formés lors de tests d'appariement (croisement). En effet, 12 formations de kystes sexués sur un ensemble de 24 tests d'appariement ont été notées chez cette espèce (Blackburn *et al.*, 1989). Chez *A. tamiyavanichii*, l'enkystement a été observé pour 54 croisements sur un ensemble de 136 (39%) y compris les auto-croisements (Nagai *et al.*, 2003). Chez *A. tamarense,* la formation de kystes sexués a été observée dans 161 cas (34%) sur un ensemble de 465 test d'appariement (Nagai *et al.*, 2004).

Dans notre étude, les résultats obtenus montrent que la fréquence des croisements présentant des kystes est très élevée (87%), ce qui renforce l'idée qu'une partie de ces kystes correspondraient probablement

à des kystes temporaires. Ces types de kystes (sexués et temporaires) sont des formes de résistance qui sont susceptibles de jouer un rôle important dans la survie de l'espèce. Bravo et ses collaborateurs (Bravo *et al.*, 2010) ont montré que les patrons de distribution temporelle des kystes temporaires étaient similaires à ceux des cellules végétatives au cours des efflorescences.Alors que les kystes issus de la reproduction sexuée sont seulement détectés en fin d'efflorescences. En outre, d'autres études ont indiqué que les formations massives d'hypnozygotes peuvent contribuer au déclin des efflorescences de micro-algues (Matsuoka & Takeuchi 1995; Kremp & Heisaken 1999; Wang *et al.*, 2007). Il est avéré que les facteurs externes et endogènes qui régulent la formation des hypnozygotes ainsi que leur germination jouent un rôle fondamental dans les efflorescences des microalgues (Kremp *et al.*, 2012). Ainsi plusieurs travaux ce sont intéressés aux facteurs (température, nutriments, lumière) pouvant influencer l'enkystement ou la germination des kystes (Nagai *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2004).

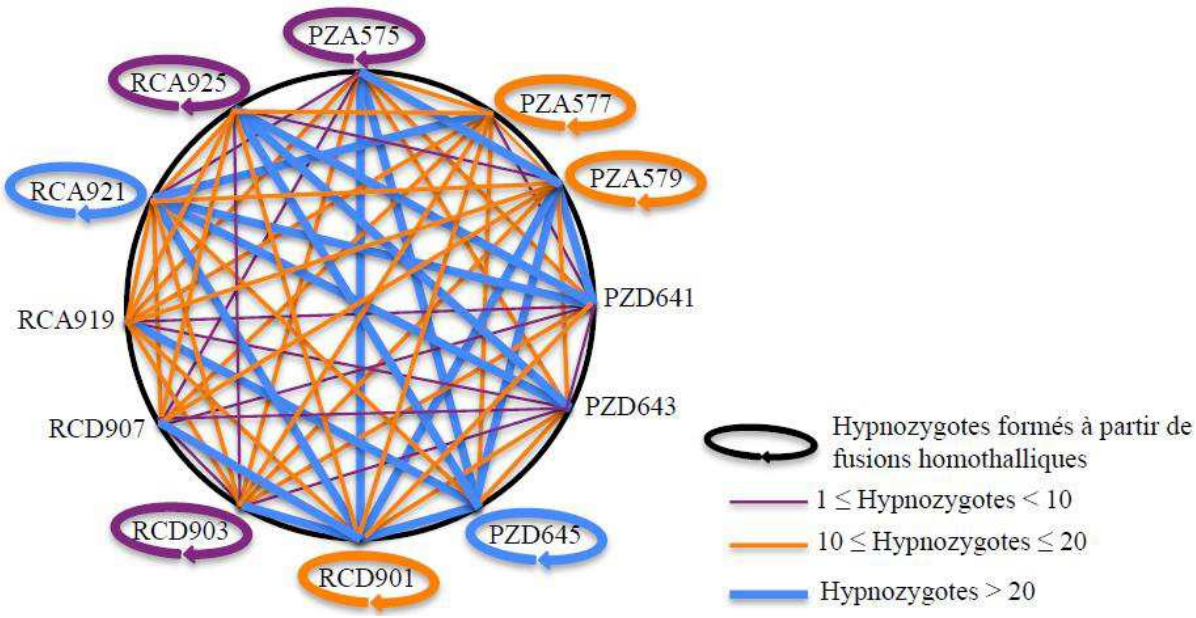


Figure 5. Nombre d'hypnozygotes observés pour chaque type de croisement.

Germination des kystes

Tableau 4 : Pourcentage de germination des hypnozygotes.

Souches	A575	577	579	641	643	645	901	903	907	919	921	925
575	0											
577	0	0										
579	0	0	4,17									
641	0	0	0	0								
643	0	0	4,17	0	0							
645	4,17	0	0	0	0	4,17						
901	0	0	0	0	0	0	4,17					
903	0	2	0	0	0	0	0	0				
907	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
919	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
921	0	0	0	25	0	12,5	8,33	0	0	0	0	
925	0	0	4,17	8,33	33,33	41,66	45,83	0	0	0	0	0

Nos résultats sur la germination indiquent que 25% des auto-croisements (soit 3/12) présentent des germinations de kystes contre seulement 15% des allo-croisements (soit 10/66). L'absence de germination de kystes dans 75% des autocroisements suggère fortement que les kystes temporaires ne sont pas capables de germer après un an. Par ailleurs, une seule germination a été observée (4% des kystes isolés) pour les 4 allocroisements suivants (575/645 ; 579/643 ; 579/925 ; 645/925) et pour les 3 autocroisements : 901/901, 579/579 645/645). Les pourcentages de germinations les plus élevés sont ceux des croisements 643/925 ; 645/925 et 901/925 avec respectivement : 33%, 42% et 46% de germination de kystes. Il est intéressant de remarquer que le succès de germination est indépendant du nombre de kystes produits. Cependant il est à noter que les croisements ayant présentés le plus de germinations avaient également un nombre important de kystes produits (la réciproque étant fausse). Enfin, les souches de fin de bloom de Rance D921 et D925 présentent le plus grand pourcentage de germination avec respectivement 11 et 32 germinations au total sur l'ensemble des croisements.

Les cas des autocroisements 579/579 et 901/901 sont intéressants, puisque la présence de kystes est détectée alors même qu'aucune fusion n'avait été observée. D'ailleurs, l'auto-croisement PZA579/PZA579 est viable. Cette constatation conforte l'hypothèse que ces kystes sont temporaires et non issus de la reproduction sexuée, mais suggère également que ces kystes temporaires sont capables de germer après un séjour d'un an à 4°C et à l'obscurité. Cette observation est particulièrement intéressante car *A. minutum* a été décrite comme invasive dans certaines régions (Nehring, 1998). Dans ce cas, la capacité des kystes temporaires à survivre pendant plusieurs mois d'hiver pourrait constituer un avantage sélectif indéniable dans la phase d'installation de cette espèce dans un nouveau site sous nos latitudes.

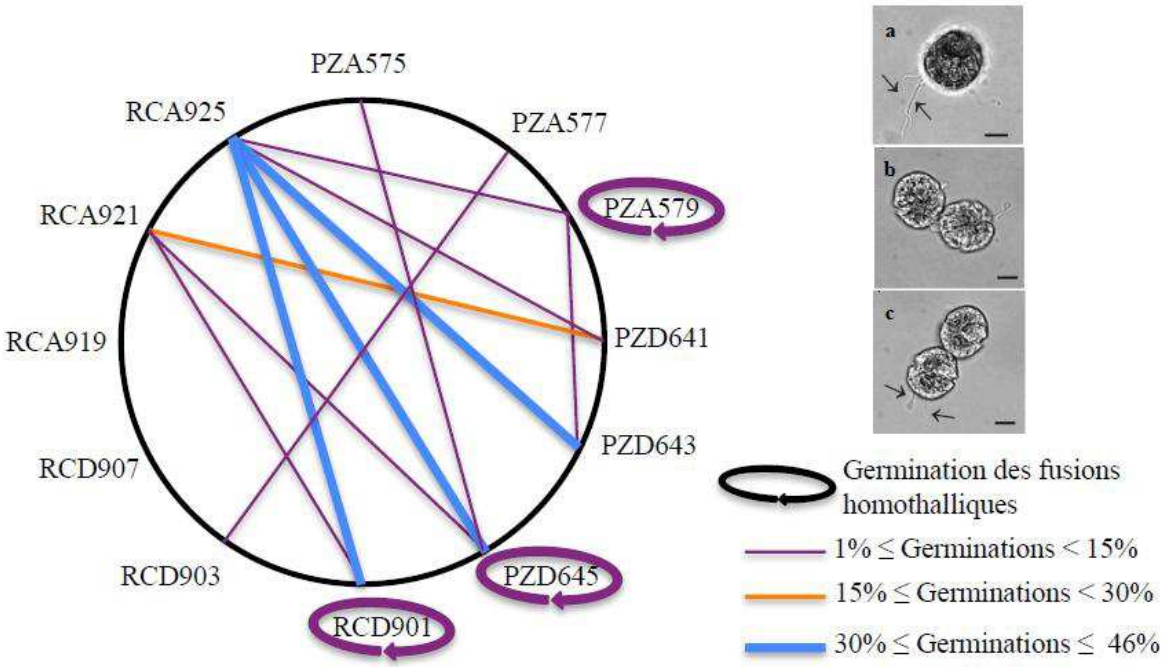


Figure 6. Taux de germination des hypnozygotes. Le pourcentage de ces germinations est obtenu en divisant le nombre de kystes ayant germé parmi 24 kystes isolés par croisement. La germination des kystes d'*A. minutum* est représentée par les images (Figueroa *et al.*, 2007) a, b et c. En a) un planomeiocyte avec ses deux flagelles longitudinaux montrés par les flèches ; en b et c deux cellules en chaines issues d'une division d'un planoméiocyte.

Viabilité des souches issues de croisement :

La viabilité de toutes les souches issues des germinations a été estimée. Parmi les hypnozygotes ayant réussi à germer, les descendants viables au minimum un mois après leur germination sont : PZA579/PZA579 ; PZA579/PZD643; PZA575/PZD645; PZA577/RCD903 ; PZA645/RCA921; PZA645/RCA925 ; RCD901/RCA925. La viabilité de ces descendants n'a aucun lien avec l'origine des souches ($P < 0,05$). Ce résultat pourrait également traduire le fait que les souches isolées sur les deux sites de Penzé et de Rance sont compatibles (absence d'isolement pré et post-zygotique)

Tableau 5 : viabilité des cellules issues de la germination des kystes. La viabilité des souches issues des croisements est indiquée par le signe +.

Souches	575	577	579	641	643	645	901	903	907	919	921	925
575												
577												
579			+									
641												
643			+									
645	+											
901												
903		+										
907												
919												
921						+						
925						+	+					

Parmi les autocroisements témoins seule la souche PZA579 a produit des kystes capables de germer et a donné une descendance viable.

Conclusion :

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude sont inattendus et relativement frustrants car nous n'avons pas réussi à séparer de façon claire les kystes sexués des kystes temporaires. Il ne nous est donc pas possible de mettre en évidence les phénomènes de reproduction sexuée. Enfin, les premiers essais d'utilisation de marqueurs moléculaires de types microsatellites que nous avons mis en place pour détecter la recombinaison au sein de nos croisements se sont révélés complétement inefficaces. En effet, les quelques souches issues des croisements que nous avons pu analyser, n'ont soit pas amplifié correctement (allèle nul) soit ont montré des tailles d'allèle inattendues. Les perspectives sont donc aujourd'hui de ré-analyser l'ADN de ces descendances en utilisant d'autres types de marqueurs plus performants (AFLP).

Références

Adair WS, Hwang C, Goodenough UW (1983) Identification and visualization of the sexual agglutinin from the mating-type plus flagellar membrane of Chlamydomonas. *Cell* **33**, 183-193.

Anderson DM (1980) Effects of temperature conditioning on development and germination of gonyaulax tamarensis (dinophyceae) hypnozygotes1. *Journal of Phycology* **16**, 166-172.

Anderson DM, Chisholm SW, and Watras CJ (1983). ''Importance of the life cycle events in the population dynamics of Gonyaulax tamarensis." *Mar. Biol*. **76**, 179–189.

Anderson DM (1998) Physiology and bloom dynamics of toxic Alexandrium species with emphasis on life cycle transitions. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, **41**, 29-48.

Anderson DM, Kulis DM, Binder BJ (1984) Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate Gonyaulax tamarensis: cyst yield in batch cultures. *Journal of Phycology* **20**, 418-425.

Anderson DM, Lindquist NL (1985) Time-course measurements of phosphorus depletion and cyst formation in the dinoflagellate Gonyaulax tamarensis Lebour. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **86**, 1-13.

Anderson DM, Wall D (1978) Potential importance of benthic cysts of gonyaulax tamarensis and G. excavata in initiating toxic dinoflagellate blooms1,2,3. *Journal of Phycology* **14**, 224-234.

Anglès S, Garcés E, Hattenrath-Lehmann TK, Gobler CJ (2012) In situ life-cycle stages of Alexandrium fundyense during bloom development in Northport Harbor (New York, USA). *Harmful Algae* **16**, 20-26.

Anglès S, Jordi A, Garcés E, Basterretxea G, Palanques A (2010) Alexandrium minutum resting cyst distribution dynamics in a confined site. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**, 210-221.

Bell G (2005) Experimental sexual selection in Chlamydomonas. *Journal of evolutionary biology* **18**, 722-734.

Bell G, Koufopanou V (1991) The Architecture of the Life Cycle in Small Organisms. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **332**, 81-89.

Billiard S, López-Villavicencio M, Devier B*, et al.* (2010) Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biological Reviews* **86**, 421-442.

Blackburn SI, Bolch CJS, Haskard KA, Hallegraeff GM (2001) Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate Gymnodinium catenatum (Dinophyceae). *Phycologia* **40**, 78-87.

Blackburn SI, Hallegraeff GM, Bolch CJ (1989) Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate Gymnodinium catenatum from tasmania, australia1. *Journal of Phycology* **25**, 577-590.

Bolch CJS, de Salas MF (2007) A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates Gymnodinium catenatum and the Alexandrium “tamarensis complex” to Australasia. *Harmful Algae* **6**, 465-485.

Bravo I, Isabel Figueroa R, Garcés E, Fraga S, Massanet A (2010) The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of Alexandrium minutum cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**, 166-174.

Brosnahan ML, Kulis DM, Solow AR*, et al.* Outbreeding lethality between toxic Group I and nontoxic Group III Alexandrium tamarense spp. isolates: Predominance of heterotypic encystment and implications for mating interactions and biogeography. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**, 175-189.

Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 237-268.

Dale B (1983) Dinoflagellate resting cysts: “Benthic plankton,”. In G. A. Fryxell [ed.], Survival strategies of the algae. *Cambridge Univ. Press* p. 69-136

Destombe C, Cembella A (1990) Mating-type determination, gametic recognition and reproductive success in Alexandrium excavatum (Gonyaulacales, Dinophyta), a toxic red-tide dinoflagellate. *Phycologia* **29**, 316-325.

Elbrächter M (2003) Dinophyte reproduction: progress and conflicts. *Journal of Phycology* **39**, 629-632.

Figueroa RI, Bravo I (2005) Sexual reproduction and two different encystment strategies of lingulodinium polyedrum (dinophyceae) in culture1. *Journal of Phycology* **41**, 370-379.

Figueroa RI, Bravo I, Garces E & Ramilo I (2006). Nuclear features and effect of nutrients on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) sexual stages. *Journal of Phycology* **42**, 67-77.

Figueroa RI, Bravo I, Garcés E (2006) Multiple routes of sexuality in alexandrium taylori (dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology* **42**, 1028-1039.

Figueroa RI, Garcés E, Bravo I (2007) Comparative study of the life cycles of Alexandrium tamutumand Alexandrium minutum (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture . *Journal of Phycology* **43**, 1039-1053.

Figueroa RI, Garcés E, Camp J (2010) Reproductive plasticity and local adaptation in the host parasite system formed by the toxic Alexandrium minutum and the dinoflagellate parasite Parvilucifera sinerae. *Harmful Algae*, 1-8.

Figueroa RI, Rengefors K, Bravo I, Bensch S From homothally to heterothally: Mating preferences and genetic variation within clones of the dinoflagellate Gymnodinium catenatum. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**, 190-198.

Fistarol GO, Legrand C, Rengefors K, Granéli E (2004) Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology* **6**, 791-798.

Fritz L, Anderson DM, Triemer RE (1989) Ultrastructural aspects of sexual reproduction in the red tide dinoflagellate gonyaulax tamarensis1. *Journal of Phycology* **25**, 95-107.

Giacobbe MG, Yang X (1999) The life history of Alexandrium taylori (Dinophyceae). *Journal of Phycology* **35**, 331-338.

Hoekstra RF (1987) The evolution of sexes. *Experientia. Supplementum* **55**, 59-91.

Johnston MO (1992) Effects of Cross and Self-Fertilization on Progeny Fitness in Lobelia cardinalis and L. siphilitica. *Evolution* **46**, 688-702.

Keafer BA, Buesseler KO, Anderson DM (1992) Burial of living dinoflagellate cysts in estuarine and nearshore sediments. *Marine Micropaleontology* **20**, 147-161.

Kim C-H, Cho H-J, Shin J-B, Moon C-H, Matsuoka K (2002) Regeneration from hyaline cysts of Cochlodinium polykrikoides (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. *Phycologia* **41**, 667-669.

Kremp AA, Godhe AA, Egardt JJ*, et al.* (2012) Intraspecific variability in the response of bloom-forming marine microalgae to changed climate conditions. *Ecology and Evolution* **2**, 1195-1207.

Lebret K, Kritzberg ES, Figueroa R, Rengefors K (2012) Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. *Environmental Microbiology* **14**, 2395-2404.

Lilly EL, Halanych KM, Anderson DM (2007) Species boundaries and global biogeography of the Alexandrium tamarense complex (Dinophyceae)1. *Journal of Phycology* **43**, 1329-1338.

Marie D, Partensky F, Vaulot D, Brussaard C (2001) Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples. In: *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc.

McQuoid mr, godhe a, nordberg k (2002) Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. *European Journal of Phycology* **37**, 191-201.

Mizushima K, Matsuoka K (2004) Vertical distribution and germination ability of Alexandrium spp. cysts (Dinophyceae) in the sediments collected from Kure Bay of the Seto Inland Sea, Japan. *Phycological Research* **52**, 408-413.

Musgrave A, Eijk E, Welscher R, Broekman R, Lens P (1981) Sexual agglutination factor from Chlamydomonas eugametos. *Planta* **153**, 362-369.

Nagai S, Itakura S, Matsuyama Y, Kotani Y (2003) Encystment under laboratory conditions of the toxic dinoflagellate Alexandrium tamiyavanichii (Dinophyceae) isolated from the Seto Inland Sea, Japan. *Phycologia* **42**, 646-653.

Nagai S, Matsuyama Y, Oh S-J (2004) Effect of nutrients and temperature on encystment of the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Plankton Biology and Ecology* **51**, 103-109.

Nehring S (1998) Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. *Archive of Fishery and Marine Research*.

Pfiester L A, Anderson D M (1987) Dinoflagellate reproduction. In Taylor, F. J. R. (ed.), The Biology of Dinoflagellates. *Blackwell Science, Oxford*, pp. 611–648.

Richerd S, Destombe C, Cuguen J, Valero M (1993) Variation of Reproductive Success in a Haplo-Diploid Red Alga, Gracilaria verrucosa: Effects of Parental Identities and Crossing Distance. *American Journal of Botany* **80**, 1379-1391.

Turpin DH, Dobell PER, Taylor FJR (1978) Sexuality and cyst formation in pacific strains of the toxic dinoflagellate gonyaulax tamarensis. *Journal of Phycology* **14**, 235-238.

Von Stosch HA (1973) Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, Gymondinium pseudopalustre Schiller and Woloszynskia apiculata sp. nov. *British Phycological Journal* **8**, 105-134.

CHAPITRE 2

SPATIOTEMPORAL CHANGES IN THE GENETIC DIVERSITY OF HARMFUL ALGAL BLOOMS CAUSED BY THE TOXIC DINOFLAGELLATE *ALEXANDRIUM MINUTUM*

SPATIOTEMPORAL CHANGES IN THE GENETIC DIVERSITY OF HARMFUL ALGAL BLOOMS CAUSED BY THE TOXIC DINOFLAGELLATE *ALEXANDRIUM MINUTUM*

A. Dia*, L. Guillou, S. Mauger, E. Bigeard, D. Marie, M. Valero, C. Destombe*

UPMC Paris VI, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.
CNRS, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.

Keywords: population genetics, bloom dynamics, resting cyst, linkage disequilibrium, sexual reproduction, clonality.

*__Corresponding authors__: Aliou Dia, Christophe Destombe

Address: Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.

Emails: adia@sb-roscoff.fr, destombe@sb-roscoff.fr

Running title: *A. minutum* spatiotemporal genetic diversity

Word count: 6968

Table count: 4

Figure count: 2

Supporting information: Dia_*et al*_suppinfo.doc; contains datasets.

Abstract

Organisms with sexual and asexual reproductive systems benefit from both types of reproduction. Sexual recombination generates new combinations of alleles whereas clonality favors the spread of the fittest genotype through the entire population. Therefore, the rate of sexual versus clonal reproduction has a major influence on the demography and genetic structure of natural populations. We addressed the effect of reproductive system on populations of the dinoflagellate *A. minutum*. More specifically, we monitored the spatiotemporal genetic diversity during and between bloom events in two estuaries separated by 150 km for two consecutive years. An analysis of population genetic patterns using microsatellite markers revealed surprisingly high genotypic and genetic diversity. Moreover, there was significant spatial and temporal genetic differentiation during and between bloom events. Our results demonstrate that (1) interannual genetic differentiation can be very high, (2) estuaries are partially isolated during bloom events, and (3) genetic diversity can change rapidly during a bloom event. This rapid genetic change may reflect selective effects that are nevertheless not strong enough to reduce allelic diversity. Thus, sexual reproduction and/or migration may regularly erase any genetic structure produced within estuaries during a bloom event.

Introduction

The demography and genetics of natural populations can vary according to the rate of sexual versus clonal reproduction. These two modes of reproduction occur simultaneously in many eukaryotes. These species can benefit both from the advantage of sexual reproduction, which lies in the genetic recombination that it generates, and from the theoretical short-term demographic advantage of clonal reproduction (Maynard-Smith 1978). The relative contribution of sexual and asexual reproduction can vary within a species depending on environmental conditions (Eckert 2001; Silvertown 2008). For example in aphids, sexual reproduction is associated with the production of resting eggs that can survive harsh conditions, whereas populations living in milder environments may reproduce asexually throughout the whole year (Rispe *et al.* 1998). Sexual reproduction thus seems required to produce a resistant form, regardless of the genetic variability generated. In the freshwater microcrustacean *Daphnia pulicaria* that practices facultative sexual reproduction (alternation between parthenogenesis and sexual reproduction) during the growing season, selection on clonal lines results in an increase in genotypic adaptation and an erosion in clonal diversity (Deng & Lynch 1996). The over-representation of certain clonal genotypes at the end of the growing season leads to greater genetic structuring and linkage disequilibrium. Similarly, most plankton species alternate between an active growing phase, during which the number of cells increases rapidly, and another phase, generally involving sexual reproduction, during which cells are in a dormant state. During the asexual reproduction phase, fitness differences among clonal lineages may cause rapid changes in genotype frequencies. In the cyclically parthenogenetic rotifer species *Brachionus plicatilis*, there is evidence that clonal selection occurs during the parthenogenetic phase (Gómez & Carvalho 2000). However, sexual reproduction as well as dormant stages may slow down the response to directional selection and may act to maintain genetic variation when selection fluctuates (Hairston *et al.* 1996). Thus, in the freshwater copepod *Diaptomus sanguineus*, the dormant cells may act as a reservoir of genotypes (similar to a seed bank) produced in past environments, but they also may interact as a part of the selection-response dynamics in the current environment (Hairston *et al.* 1996).

An extreme case of alternation of an asexual growing phase and a dormant sexual phase is exemplified by unicellular phytoplankton bloom species involved in harmful algal blooms (HABs). Compared to multicellular organisms, these unicellular organisms are characterized by a ubiquitous distribution, suggesting very large population sizes and broad dispersal abilities (Cloern 1991; Finlay & Fenchel 2004; Norris 2000). Nevertheless, dispersal of marine phytoplankton is a hotly debated issue and published results are subject to controversies. Studies on marine phytoplankton dispersal differ vastly with respect to study scale, sampling strategy (e.g. sampling few individuals per global geographic region; population samples) and the resolution of the characters or markers used (e.g. morphological markers; highly variable, microsatellite-type molecular markers). For example, using morphological criteria, Cermeno and Falkowski (2009) argue that the

biogeographical distribution of fossil diatom genera is ubiquitous and that these taxa thus have no geographic structure. However, more recent studies using microsatellite markers demonstrate that there is genetic differentiation within a single species, the toxic diatom *Pseudo-nitzschia pungens*, on a very large scale (i.e. samples from the Atlantic and Pacific Oceans) (Casteleyn *et al.* 2010). The issue of connectivity between populations remains unresolved because there is little information on the distance that a single phytoplankton cell can cover and because there are only a few studies on how the marine physical environment influences dispersal. Exploring these factors is necessary for a better understanding of the ecology and evolution of plankton organisms (Palumbi 1994). Over the past several years, more and more studies have focused on spatiotemporal differentiation in dinoflagellate populations. For example, in the Gulf of Maine, genetic differentiation was found between two subpopulations investigated during offshore blooms, corresponding to the beginning and the end of a bloom event (which lasts about 2 months), but in different geographic locations (northern and southern, separated by hundreds of km) (Erdner *et al.* 2011). Other work (Richlen *et al.* 2012) shows spatiotemporal differentiation in the estuaries of Massachusetts (Nauset Marsh system and the Gulf of Maine) at two sites, but only one site was sampled throughout the whole bloom event (from beginning to end), precluding any comparison between dates of the same bloom at different sites. Whatever their scale, these previous studies demonstrate genetic differentiation between sites and high genetic diversity within a given bloom event. This differentiation of bloom populations and their high genetic diversity leads to questions on the role of the two life-cycle phases on population dynamics and the importance of sexual reproduction relative to clonal reproduction.

The dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim 1960) is one of the main species involved in paralytic shellfish poisoning (PSP) blooms off the coasts of France. This microalga produces saxitoxins that can accumulate along the trophic food web. They produce PSP events that cause cases of human poisoning, typically by ingestion of contaminated shellfish. This species shows an alternation of asexual and sexual phases. The vegetative cell is haploid and sexual reproduction takes place when the environmental conditions become unfavorable (Figueroa *et al.* 2011). Sexual reproduction is the result of the fusion between two gametes, forming a planozygote (Probert *et al.* 2002). This stage changes into a resting cyst that sinks to the sediment (like seeds in a seed bank) (Wyatt & Jenkinson 1997). After a dormancy period of several months (Garcés *et al.* 2004; Figueroa *et al.* 2007), cysts may germinate and give rise to vegetative haploid cells that reproduce asexually in the water column.

The objective of this study was to study the effect of asexual and sexual reproduction on the population genetic structure of this toxic dinoflagellate *A. minutum* on a small scale, both in space and in time. We used microsatellite markers to analyze monoclonal cultures of *A. minutum* isolated from samples taken at two sites located along the French coast of the English Channel, separated by roughly 150 km, for two

consecutive annual bloom events and at three different periods during each bloom event. We specifically addressed the following questions: (1) To what degree are different estuaries within the same geographic region connected? (2) What role does sexual reproduction play in the dynamics of the bloom populations? (3) Finally, is there any temporal genetic structuring during bloom events?

Materials and Methods

Sampling sites and strain collection

More than 1240 strains of dinoflagellates (different species) were collected in the Penzé estuary (48°37'37.57"N, 3°57'13.17"W) and the Rance estuary (48°31'49.61"N, 1°58'21.81"W, Table 1). These two estuaries are separated by approximately 150 km (Fig. 1). *A. minutum* blooms occurred concomitantly in both ecosystems in early summer. In 2010, blooms extend from 17 May to 12 July in the Rance estuary (maximum density of 4.2 x 10^4 cells/L^{-1} observed on June 22) and from 2 June to 7 July in the Penzé estuary (maximum density of 3.7 10^5 cells/L^{-1} observed on 8 June). In 2011, blooms lasted from 11 May to 20 June in Rance (maximum density of 4.3 10^5 cells/L^{-1} observed on 27 May) and from 1 June to 8 July in Penzé (maximum density of 2.6 cells/L^{-1} 10^5 observed on 23 June).

Plankton samples were collected from these two sites during the developmental phase of the bloom (beginning), during the maintenance phase (middle) and during the decline phase (end of the bloom event) whenever possible in each of two study years (2010 and 2011). All strains were obtained by micropipetting one single cell into fresh medium; 530 of these strains survived and 265 strains of *A. minutum* were genotyped. They were maintained at 19°C with 70 µE.m^2.s^{-1} of light in a 12:12 light:dark cycle. The medium F/2 (Marine Water Enrichment Solution, Sigma) was prepared using autoclaved natural seawater from the Penzé estuary. It was collected at least 3 months prior to use and stored in the dark. Strains used in this study (see supplementary Table S1) have been deposited at the Roscoff Culture Collection (www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC).

Flow cytometry

The DNA content of each monoclonal strain was checked by flow cytometry on whole *A. minutum* cells fixed in ethanol. A 250 µL aliquot of each culture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was removed, cells were then re-suspended by vortexing in 250 µL of 70% ethanol and kept overnight at 4°C. Cells were collected by centrifugation at 3000 rpm for 10 min to remove ethanol and then resuspended in 250 µL of PBS. Triton X-100 (0.1% final), RNase A (0.01%) and Propidium Iodide (PI, 30 µg.mL^{-1}) were added. Samples were incubated at 37°C for 30 min before flow cytometry analysis, performed using a FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer equipped with a 488 nm laser and the standard filter setup. The DNA content of *A. minutum* strains was evaluated by comparison with Human Blood Cells (HBCs, 2C = 6.4 Mbp). Isolated nuclei of human blood cells were obtained by resuspending 10 µL of blood in 1 mL of NIB buffer

(Marie *et al.* 2000). Then, 10 µL of this suspension was added to 250 µL of *A. minutum* culture re-suspended in PBS buffer before staining. Then, all cultures were analyzed by flow cytometry without HBC and mean florescence of PI were compared to check for ploidy level differences.

DNA extraction, strain identification and genotyping

For DNA extraction, strains were collected during their exponential growth stage (strains listed Table 1). DNA was extracted using either the CTAB method (Lebret *et al.* 2012) or the Nucleospin 96 Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions, using 5-10 mg of dried tissue resuspended in 100 µL elution buffer.

Strains were screened using the intergenic region of ribosomal DNA (ITS1, 5.8S and ITS2). PCR mixes (14 µL in total) included 20 ng of DNA, 1X GoTaq Flexi green buffer (Promega, Madison, WI, USA), 150 µM of each dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 20 pmol of the forward primer 329F (5'-GTG AAC CTG CRG AAG GAT CA-3', complementary reverse of the eukaryote reverse primer 329-R (Moon-van der Staay *et al.* 2001), 20 pmol of the reverse primer DIR-R (5'- TAT GCT TAA AAT TCA GCA GGT-3' (Scholin & Anderson 1994), and 1.25 U GoTaq® Polymerase (Promega). Amplification was carried out in a DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following cycling conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 PCR cycles (denaturation at 95°C for 45 s, annealing at 53°C for 45 s, and extension at 72°C for 45 s), followed by a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were purified using the BigDye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for subsequent bidirectional sequencing using a capillary sequencer type ABI 3130XL (Applied Biosystems).

The strains were genotyped using the 12 microsatellite markers developed by (Nagai *et al.* 2006). Amplification of microsatellite loci was carried out in a 10 µL final volume with the following components: 20 ng DNA, 1x GoTaq® Flexi buffer (Promega), 2 mM $MgCl_2$, 150 µM each dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.8 $\mu g.\mu L^{-1}$ bovine serum albumin, 30 pmol fluorescent-labeled forward primer (FAM, VIC, NED or PET), 30 pmol reverse primer, and 0.35 U GoTaq® Polymerase (Promega). PCR amplifications were carried out in a Bio-Rad DNA Engine Peltier Thermal Cycler using the following cycling conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 10 PCR cycles (denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s) followed by 28 cycles (denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s), followed by a final extension at 72°C for 10 min. Then, 2 µL of PCR products, diluted 1:10, was added to 10 µL of loading buffer containing 0.5 µL of SM594 size standard (Mauger *et al.* 2012) and 9.5 µL of Hi-Di formamide (Applied Biosystems). The loading mix was denatured at 95°C for 3 min and run in an ABI 3130 XL capillary sequencer (Applied Biosystems) equipped with 50 cm capillaries. Genotypes were scored manually using GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems).

Genetic analyses

To increase sample size, close sampling dates were pooled (i.e. PZ10D, PZ11B and RC11D, Table 1) and ultimately only 11 samples with a minimum sample size of 15 strains were used in the genetic analysis (i.e. RC10D was excluded from the analyses; see Table 1).

Genetic diversity and multilocus genotype diversity

Because strains of *A. minutum* are haploid, the frequencies of null alleles were estimated by direct observation. After two re-amplifications, strains for which more than half of the loci did not amplify correctly were removed from the dataset. The absence of amplification at loci in other strains was considered as a null allele. Standard measures of genetic diversity (mean number of alleles per locus (Na), Nei's unbiased estimator of genetic diversity (H_s; Nei 1987), and allelic richness (Ra)) for each sampling date and site were calculated using Fstat (version 2.9.3.2; Goudet 2001). Allelic richness was estimated after randomly subsampling each sample (10,000 randomizations) to standardize the minimum sample size among populations. Test for differences among groups, Fstat (Goudet 2001) was used to test the difference between the H_s values obtained at the beginning phases (PZ11A, RC10A, RC11A) and at the end phases of bloom events (PZ10D, PZ11D, RC11D). Genclone (Arnaud-Haond *et al.* 2005) was used to test the efficiency of the microsatellite marker set to discriminate the maximum clonal diversity available in the data set and to calculate the number of distinct multilocus genotypes observed (G).

Linkage Disequilibrium

Linkage disequilibrium (LD) was assessed using a single multilocus measurement of LD that is provided by the association index $\bar{r}_d$ (Brown *et al.* 1980 modified by Agapow & Burt 2001) and was computed using MultiLocus ver 1.2. (Agapow & Burt 2001). Significance tests were based on comparisons of the observed value to those of randomized datasets generated from 1000 permutations (Burt *et al.* 1996). The global *P*-value was calculated using a generalized binomial procedure to combine independent data (Teriokhin *et al.*, 2007; De Meeûs *et al.*, 2009).

Genetic differentiation

F_{st} values were calculated between all pairs of populations using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004), their significance was assessed using 1.000 permutations and D (D_{est}; Jost, 2008) was estimated with SMOGD 1.25 (Crawford, 2010). Different levels of comparison were thus considered: among dates during a bloom event, among dates within a site, and between sites. These data were summarized and statistically tested with a principal component analysis (PCA) performed using PCA-GEN software (version 1.2; Goudet 1999). The statistical significance associated with each axis was evaluated after 10,000 randomizations.

The partitioning of genetic variation at different hierarchical levels was examined using molecular analyses of variance (AMOVA) in Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). There was only one sampling date during the 2010 bloom in Rance (Table 1); it was therefore only possible to conduct the two following analyses. First, variation was assessed on the 2011 samples by determining the variance component attributable to between-sites differentiation and to among in-bloom phases within a site. Second, variation was examined in more detail only at Penzé by determining the variance component attributable to between-years differentiation and to among in-bloom phases within years. The significance ($P < 0.05$) of the fixation indices was evaluated based on 10,000 permutations.

Results

Isolation and identification of strains

Of the 1240 isolated cells, we obtained 530 usable strains for this study (i.e. 43% success rate). The survival rate by sampling date ranged from 27% to 66%. Of these 530 monoclonal strains, 364 (66%) were assigned to *A. minutum* showing a unique haplotype corresponding to 100% similarity with a 550 bp of the rDNA sequence (covering ITS1, the 5.8S rRNA gene, and ITS2) (McCauley *et al.* 2009; Casabianca *et al.* 2011) were selected (Table 1). Indeed, this unique sequence corresponds to an *A. minutum* sequence (AM1 strain) previously published in GenBank (EU707466). The comparison of *A. minutum* DNA content shows that whole cells of *A. minutum* analyzed contain the same level of ploidy (32 Mbp, Fig. S1).

Genetic diversity

After re-amplifying strains with dubious amplification, 5 of the 12 loci (Aminu39, Aminu44, Aminu10, Aminu15 and Aminu29) developed by Nagai *et al.* (2006) were removed from the dataset. We also removed strains for which more than half of the loci did not amplify correctly. The final dataset included seven loci amplified on 265 individual strains (Table S2). For these loci, the frequency of null alleles varied from 8% for locus Aminu11 to 22% for locus Aminu20. The efficiency of the microsatellite loci to discriminate the maximum clonal diversity available in the sample is given Fig. S2. Of the 265 strains analyzed, 265 (100%) had unique seven-locus genotypes; there were therefore no repeated genotypes in any of the analyzed strains.

The PCR products of these seven microsatellite markers showed one single band, i.e. one allele. All loci were polymorphic. The genetic diversity indices are given in Table 2. The number of alleles varied among bloom populations, with some populations having twice as many alleles as other populations (cf. RC11A and RC10A, Table 2), and with sampling effort. Allele richness, corrected for sampling size, varied from 6.49 (RC11A) to 9.01 (RC11C). The per-locus and per-population numbers of alleles (N_a) ranged from 3 (locus A41) to 17 (locus A20) alleles. Whatever the sampling date during bloom events, Penzé and Rance showed high genetic diversities, with H_s values ranging from 0.79 to 0.88. These genetic diversity values did not differ

between the beginning and the end phases of a bloom event within an estuary (permutation test of comparison among groups; *P*-value=0.647).

Tests of linkage disequilibrium revealed an overall *P*-value of 0.525. Of the 11 spatio-temporal samples, only one showed significant $\bar{r}_d$ (i.e. linkage disequilibrium estimator) values. This sample from Penzé (PZ11D) had a *P*-value of 0.047, with $\bar{r}_d$ values of 0.068 (Table 3).

Genetic differentiation

The results of the PCA (Fig. 2) show a significant overall F_{st} value of 0.073. The first two PCA axes were significant and explained 44% of the variance: axis 1 accounts for 26.39% of the variance (F_{st}= 0.019, *P*=0.001) and axis 2 accounts for 17.65% of the variance (F_{st}=0.013, *P*=0.011). Axis 1 separates samples from the beginning of the 2010 bloom (PZ10A-RC10A) from the rest of the samples (Fig. 2). Axis 2 separates samples according to the sampling date during a bloom and their geographic origin. Samples from the beginning of the bloom were less genetically differentiated than samples from the end of the bloom events. These last samples formed distinct clusters according to their geographic origin (Fig. 2; cf. PZ11C, PZ11D compared to RC11D and RC11C).

Genetic differentiation between pairs of samples (F_{st}) ranged from -0.0035 (RC11A *vs*. RC11B) to 0.0770 (RC10A *vs.* PZ11C), whereas D_{est} ranged from 0.0589 (RC11B *vs*. RC11C) to 0.4695 (RC10A vs. PZ11C) (Table 3S). The lowest F_{st} values were observed for two samples from the same site in the same year at two consecutive in-bloom sampling dates, whereas the highest values were observed for samples between different sites and different years. The tests of differentiation at different spatial and temporal levels confirm the PCA results. They indicate that the early bloom samples in Penzé and Rance taken in 2010 (PZ10A and RC10A) differed significantly from all other samples (Table S3).

The first AMOVA helped gauge the importance of spatial variation with respect to phase variation within a bloom. This AMOVA could only be applied on the 2011 samples (Table 4A) and revealed that the genetic differentiation was significant between sites and among bloom phases within sites. More specifically, the percent of variation explained by the genetic differentiation during the different phases of the bloom event was three times higher (3.87%) than the genetic differentiation between the Penzé and Rance sites (1.23%, Table 4A).

The second AMOVA was used to analyze the importance of temporal variation at two hierarchical levels: interannual and intrabloom (Table 4B). This temporal AMOVA could only be applied to the Penzé estuary. The results show again that the two levels of differentiation were significant. The percent variation explained by genetic differentiation between the different in-bloom periods was weaker (4.27%, Table 4B) than that explained by genetic differentiation between 2010 and 2011 (10.01%, Table 4B).

Discussion

Clonal reproduction versus sexual reproduction

The reproductive system can play an important role in the functioning and evolution of populations by modifying their dynamics, their diversity and their population genetic structure. As in many other phytoplankton species, the dinoflagellate species *A. minutum* is characterized by high rates of clonal reproduction during the development of bloom events, followed by a period of sexual reproduction that produces resting cysts, coinciding with the maximum and the decline of cell concentrations, respectively (Garcés *et al.* 2004, Bravo *et al.* 2010). During periods of asexual division, differences in selective values between clonal lines can rapidly lead to differences in genotype frequencies. Numerical simulations show that selective sweeps can occur when rapidly growing clones become more abundant within a population (Rynearson & Armbrust 2000). During a bloom event, advantageous genotypes may increase in frequency, leading to an overall decrease in genetic diversity via genetic hitchhiking over the whole genome (Maynard-Smith *et al.* 1993). Even in the absence of selection, low clonal diversity and linkage equilibrium provide evidence that sexual reproduction occurs in a population with clonal reproduction. At the end of a bloom, the most frequent clones would thus preferentially participate in the production of the following generation via sexual reproduction. However, in rapidly growing organisms with short generation times, the huge population sizes can be considered as virtually infinite and genotypic diversity can thus be maintained during the bloom events, even if organisms primarily reproduce clonally (Bengtsson 2003).

In this study, all the analyzed clones were genetically distinct, suggesting that bloom events involve huge effective population sizes. The high genetic diversity observed here indicates that asexual reproduction does not predominate within *A. minutum* populations. It however does suggest that blooms were initiated by numerous different sexual cysts. Our results corroborate the recent observations reported for *Alexandrium fundyense* showing unique multilocus genotypic frequencies of 81% to 97% (Erdner *et al.* 2011; Richlen *et al.* 2012). Likewise, a study on *Alexandrium tamarense* has shown that the probability of sampling clones with the same genotype is practically nil due to the large population sizes of blooms (Nagai *et al.* 2007). The high genotypic diversity as well as the high gene diversity values observed in our study ($0.78 < H_s < 0.87$) are comparable to those of Mediterranean populations of the same species ($0.62 < H_s < 0.89$; Casabianca *et al.* 2011). There are reports of similar high genotypic diversity values in other phytoplankton species, such as the haptophyte (*Prymnesium parvum*) and the Raphidophyceae species (*Gonyostomum semen*) using AFLP genetic markers (Barreto *et al.* 2011; Lebret *et al.* 2012).

The continuous germination of resting cysts during the entire bloom event (Lebret *et al.* 2012), as well as the specific cohort of these cysts produced during successive annual blooms and stored in the cyst bank, may enhance genetic diversity (in terms of genotypes and genes) (Alpermann *et al.* 2009). Furthermore, we

cannot exclude the possibility that sexual reproduction maintains genetic diversity, even during a bloom event. Observations in *in vitro* cultures suggest that the zygote (planozygote) may undergo meiosis without forming a resting cyst (Figueroa *et al.* 2007), thereby producing new vegetative cells. This type of reproduction may be promoted by the presence of the parasite *Parvilucifera sinerae* (Alveolata), and short-circuiting the resting cyst stage may possibly constitute a strategy to avoid the parasite (Figueroa *et al.* 2010). Two different species belonging to genus *Parvilucifera* were detected during the 2010 and 2011 sampling cruises (Lepelletier *et al.* submitted). However, unfortunately, there have been no investigations to identify this type of reproduction.
In our study, no global multilocus linkage disequilibrium was detected, suggesting that recombination is sufficient to break down linkages between loci, confirming that *A. minutum* reproduces sexually. Only one sample taken during the late bloom period in Penzé in 2011 (PZ11D) showed significant multilocus linkage disequilibrium, as estimated using $\bar{r}_d$).

Spatiotemporal genetic structure of bloom events

The results of the microsatellite analysis clearly indicate that *A. minutum* blooms are structured both in space and in time. Our study shows that there is a temporal genetic differentiation during and between *A. minutum* blooms as well as spatial differentiation between sites. Thus, the overall genetic differentiation observed between the Rance and Penzé estuaries separated by roughly 150 km was significant. This result suggests that gene flow via tidal currents is limited in *A. minutum*, as demonstrated in *A. tamarense* (Nagai *et al.* 2007). Given the short duration of *A. minutum* bloom events (30 days on average) and that they are geographically restricted to estuaries, the gene flow between populations is likely limited. Genetic differences observed between the two estuaries late bloom samples confirm the genetic isolation between estuaries during the bloom period. However, early bloom samples showed weaker spatial differentiation (Table 4). This observation suggests that the Penzé and Rance estuaries communicate during spring tides, potentially transporting vegetative cells or cysts via the residual west-east tidal currents. During the bloom season, which preferentially occurs during neap tides, the two estuaries are likely isolated and the accumulation of bloom biomass is mainly due to a response to water flow and to constant, suitable environmental conditions (i.e. salinity temperature, irradiance and nutrient supply) (Anderson *et al.* 2012). In our study, interannual genetic differentiation was greater than intrabloom differentiation, suggesting that blooms are not only made up of newly formed cysts produced during the preceding year, but also of recruitment from migrant vegetative cells and/or from an older cyst bank (Estrada *et al.* 2010). Even if a multigenerational cyst bank gives rise to a bloom event, the germination of cysts may be influenced by environment conditions and, by chance or selection, samples become more differentiated than the more homogeneous cyst bank that produced them (McCue & Holtsford 1998). The constant germination of the cyst bank may thus lead to a decrease in the interannual F_{st}. Nevertheless, the cyst bank does not appear to contribute regularly to bloom events because the 2010 Penzé

sample PZ10D was not genetically different from the early 2011 Penzé bloom sample (PZ11A). Therefore, the 2011 early bloom sample may have been composed at least partly of cysts produced in the preceding year.

In isolated estuaries, there were significant genetic changes during a bloom event (see AMOVA, Table 4A). Although no additional signatures of selection, such as multilocus linkage disequilibrium, could be detected with the neutral markers used in this study, we believe that, in these very large populations, genetic changes may nevertheless be driven by selection (see below). These genetic changes are concordant with those reported for *A. fundyense* blooms in Massachusetts where temporal intrabloom differentiation has also been observed (Richlen *et al.* 2012). Two factors can account for this temporal differentiation. First, changes may be due to delayed germination of different cohorts of cysts buried in the sediments and/or continuous encystment by a small percentage of motile cells (Pitcher *et al.* 2007). In *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae), Lebret *et al.* (2012) suggest that continuous germination of cysts during a bloom is a key element behind rapid genetic changes. Second, these changes may be the result of local abiotic or biotic selection as suggested for the diatom *Ditylum brightwellii* (Rynearson & Armbrust 2005; Rynearson *et al.* 2006). In these large populations, the effects of natural selection may predominate over those of genetic drift on genetic structure. Thus, in *D. brightwellii*, the succession of genetically distinct populations in different environmental conditions appears to reflect a tight coupling between environment and genetics (Rynearson *et al.* 2006). Of the various abiotic factors, seasonal temperature variation is one parameter that can explain the maintenance of genetic diversity (Maynard-Smith and Hoekstra 1980; Bell 1982). Recent studies on the diatom *Asterionella formosa* have demonstrated that variation in temperature may contribute to maintaining genetic diversity in blooms (Gsell *et al.* 2012). In this species, reaction norms of clone growth studied as a function of environmental temperature reveal considerable genetic diversity within a bloom. In our study, fluctuating temperatures may explain not only the maintenance of genetic diversity, but also genetic changes during a bloom event. However, biotic factors, such as predation and/or parasitism, may also play a role in determining population structure and dynamics (Montagnes *et al.* 2008). In *A. minutum*, eukaryotic parasites such as *Parvilucifera* spp. and *Amoebophrya* spp. can regulate blooms (Chambouvet *et al.* 2008; Figueroa *et al.* 2010; Lepelletier *et al.* submitted). The impact of parasitism can be tested by analyzing the fitness of different strains and their resistance to parasites according to date and sampling site. Whatever the factors involved, our study illustrates how sexual reproduction and/or migration are likely to erase any selective effects that arise each year during the vegetative phase of a bloom event.

Acknowledgements

We are very grateful to Yannis Michalakis, Denis Roze and Carolyn Engel for constructive comments on an earlier draft and 3 anonymous reviewers who helped improve this manuscript. We warmly thank the IFREMER laboratory in Dinard (France) and especially Claude Lebec and Claire Rollet. Thanks to the Roscoff Culture Collection (RCC), Service Mer et Observation (Marine Operations Department) at the Roscoff Biological Station and all the partners in the Paralex project for their help with sampling. Sequences and microsatellite genotypes were generated by Morgan Perennou and Gwenn Tanguy at the Roscoff Biological Station (Ouest-Génopole). This project was carried out in partial fulfillment of Aliou Dia's PhD degree, supported by funds from the ANR and a PhD fellowship from the Brittany Regional Council (ARE10087: POPALEX). This work was financially supported by the Brittany Regional Council, the CNRS program EC2CO, the French ANR projects PARALEX ("The sixth extinction" ANR-2009-PEXT-01201) and CLONIX ("Programme Blanc" ANR11-BSV7-00704), the European Project MaCuMBa (FP7-KBBE-2012-6-311975) and the EC2CO project PALMITO.

References

Agapow P-M, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes,* 1, 101-102.

Alpermann TJ, Beszteri B, John U, Tillmann U, Cembella AD (2009) Implications of life-history transitions on the population genetic structure of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Molecular Ecology,* 18, 2122-2133.

Anderson, D M, Alpermann, T J, Cembella, A D, Collos, Y, Masseret, E, Montresor, M (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10-35.

Arnaud-Haond S, Belkhir K (2007) GenClone 1.0: a new program to analyse genetics data on clonal organisms. Molecular Ecology Notes, 7, 15–17.

Barreto FS, Tomas CR, McCartney MA (2011) AFLP fingerprinting shows that a single *Prymnesium parvum* harmful algal bloom consists of multiple clones. *Journal of Heredity,* 102, 747-752.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N Bonhomme F (1996-2004) *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bell G (1982) The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality Springer.

Bengtsson BO (2003) Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. *Journal of evolutionary biology,* 16, 189-199.

Bravo I, Isabel Figueroa R, Garcès E, Fraga S, Massanet A (2010) The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography,* 57, 166-174.

Brown AH, Feldman MW, Nevo E (1980) Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics,* 96, 523-536.

Burt A, Carter DA, Koenig GL (1996) Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA,* 93, 770-773

Casabianca S, Penna A, Pecchioli E, *et al.* (2011) Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Mediterranean Sea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 279, 129-138.

Casteleyn G, Leliaert F, Backeljau T, *et al.* (2010) Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 107, 12952-12957.

Cermeno P, Falkowski PG (2009) Controls on diatom biogeography in the ocean. *Science,* 325, 1539-1541.

Chambouvet A, Morin P, Marie D, Guillou L (2008) Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science,* 322, 1254-1257.

Cloern JE (1991) Tidal stirring and phytoplankton bloom dynamics in an estuary. *Journal of marine research,* 49, 203-221.

Crawford NG (2010) SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10, 556-557.

De Meeûs T, Guégan JF, Teriokhin AT (2009) MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. *BMC Bioinformatics* 10, 443.

Deng H-W, Lynch M (1996) Change of genetic architecture in response to sex. *Genetics,* 143, 203-212.

Eckert CG (2001) The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology,* 15, 501-520.

Erdner DL, Richlen M, McCauley LAR, Anderson DM (2011) Diversity and dynamics of a widespread bloom of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Plos One,* 6, e22965.

Estrada, M, Solé, J, Anglès, S, Garcés, E (2010). The role of resting cysts in *Alexandrium minutum* population

dynamics. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *57*, 308-321.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources,* 10, 564-567.

Figueroa RI, Garcés E, Bravo I (2007) Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology,* 43, 1039-1053.

Figueroa RI, Garcés E, Camp J (2010) Reproductive plasticity and local adaptation in the host parasite system formed by the toxic *Alexandrium minutum* and the dinoflagellate parasite *Parvilucifera sinerae*. *Harmful Algae*, 10, 1-8.

Figueroa RI, Vázquez JA, Massanet A, Murado MA, Bravo I (2011) Interactive effects of salinity and temperature on planozygote and cyst formation of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology,* 47, 13-24.

Finlay BJ, Fenchel Tom (2004) Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. *Protist,* 155, 237-244.

Garcés E, Bravo I, Vila M, Figueroa R. I, Maso M, Sampedro N (2004) Relationship between vegetative cells and cyst production during *Alexandrium minutum* bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). *Journal of Plankton Research,* 26, 637-645.

Gómez A, Carvalho GR (2000) Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Molecular Ecology,* 9, 203-214.

Goudet J (1999) PCA-GENE, version 1.2. http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm. (Accessed 08 April 2013).

Goudet J (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. (Accessed 08 April 2013).

Gsell AS, de Senerpont Domis LN, Przytulska-Bartosiewicz A, *et al.* (2012) Genotype-by-temperature interactions may help to maintain clonal diversity in *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology,* 48, 1197-1208.

Hairston J, N G, Kearns CM, Ellner SP (1996) Phenotypic variation in a zooplankton egg bank. *Ecology,* 77, 2382-2392.

Halim, Y (1960) *Alexandrium minutum* nov. g., nov. sp., a dinoflagellate causing red water. *Vie et Milieu,* 11, 102-105.

Jost L (2008) G(ST) and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17, 4015-4026.

Lebret K, Kritzberg ES, Figueroa R, Rengefors K (2012) Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. *Environmental Microbiology,* 14, 2395-2404.

Lepelletier F, Karpov SA, Le Panse S, Bigeard E, Skovgaard AA, Jeanthon C, Guillou L (2013) *Parvilucifera rostrata* sp. nov., a novel parasite in the phylum Perkinsozoa that infects the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Protist,* (Submitted).

Marie D, Simon N, Guillou L, Partensky F, Vaulot D (2000). DNA, RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. In: Current Protocols in Cytometry. *John Wiley & Sons,* Inc.11, 12, 1-18.

Mauger S, Couceiro L, Valero M (2012) A simple and cost-effective method to synthesize an internal size standard amenable to use with a 5-dye system. *Prime Journals*, 2, 40-46.

Maynard-Smith J (1978) The evolution of sex. Cambridge University Press, London, U.K.

Maynard-Smith J, Hoekstra R (1980). Polymorphism in a varied environment: how robust are the models? *Genetic Research,* 35, 45-57.

Maynard-Smith J, Smith N. H, O'Rourke M, and Spratt B. G (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 90, 4384-4388.

McCauley LAR, Erdner DL, Nagai S, Richlen ML, Anderson DM (2009) Biogeographic analysis of the globally distributed harmful algal bloom species *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) based on rRNA gene

sequences and microsatellite markers. *Journal of Phycology,* 45, 454-463.

McCue K, Holtsford T (1998) Seed bank influences on genetic diversity in the rare annual *Clarkia springvillensis* (Onagraceae). *American Journal of Botany,* 85, 30-30.

Montagnes D, Chambouvet A, Guillou L (2008) Responsibility of microzooplankton and parasite pressure for the demise of toxic dinoflagellate blooms. *Aquatic Microbial Ecology,* 53, 211-225.

Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaulot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature,* 409, 607-610.

Nagai S, MCcauley L, Yasuda N, *et al.* (2006) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes,* 6, 756-758.

Nagai S, Lian C, Yamaguchi S, *et al.* (2007) Microsatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in japanese coastal waters. *Journal of Phycology,* 43, 43-54.

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, USA.

Norris RD (2000) Pelagic species diversity, biogeography, and evolution. *Paleobiology,* 26, 236-258.

Palumbi SR (1994) Reproductive isolation, genetic divergence, and speciation in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 25, 547-572.

Pitcher GC, Cembella AD, Joyce LB, Larsen J, Probyn R.A, Sebastián R (2007) The dinoflagellate Alexandrium minutum in Cape Town harbour (South Africa): Bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae,* 6, 823-36.

Probert I, Lewis J, Erard-Le Denn E (2002) Morphological details of the life history of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Cryptogamie Algologie,* 23, 343-55.

Richlen ML, Erdner DL, McCauley LAR, Libera K, Anderson DM (2012) Extensive genetic diversity and rapid population differentiation during blooms of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) in an isolated salt pond on Cape Cod, MA, USA. *Ecology and Evolution,* 2, 2588-2599.

Rispe C, Pierre JS, Simon JC, Gouyon PH (1998) Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *Journal of Evolutionary Biology,* 11, 685-701.

Rynearson TA, Armbrust EV (2000) DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography,* 45, 1329-1340.

Rynearson TA, Armbrust EV (2005) Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Molecular Ecology,* 14:1631–1640.

Rynearson TA, Newton JA, Armbrust EV (2006) Spring bloom development, genetic variation, and population succession in the planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography,* 51, 1249-1261.

Scholin CA, Anderson DM (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. Rflp analysis of SSU rRNA genes. *Journal of Phycology,* 30, 744-754.

Silvertown J (2008) The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International journal of plant sciences,* 169,157-168.

Teriokhin, A.T., De Meeûs, T., Guegan, J.F. 2007. On the power of some binomial modifications of the Bonferroni multiple test. Zh. Obshch. Biol. 68, 332-340.

Wyatt T, Jenkinson IR (1997) Notes on *Alexandrium* population dynamics. *Journal of Plankton Research,* 19, 551-575.

Data accessibility

Data used in this study (supplementary Table S1) have been deposited at the Roscoff Culture Collection (www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC).

Authors' contributions

AD conceived the study, performed isolation and culture of strains, molecular data, analysis and drafted the manuscript, SM contributed to molecular analyses; EB performed isolation and culture of strains, DM performed cytometry analyses, MV participated in the design of the study, performed some statistical analysis and revised the manuscript, LG and CD coordinated the study, helped draft and revised the manuscript. All authors contributed to sample collection, read and approved the final manuscript.

Figure legends:

Figure 1: Maps of the study area showing sampling stations in the two estuaries: Penzé (PZ) and Rance (RC).
Figure 2: PCA of genetic differentiation between samples taken from the Penzé and Rance estuaries in 2010 and 2011.

Figure 1:

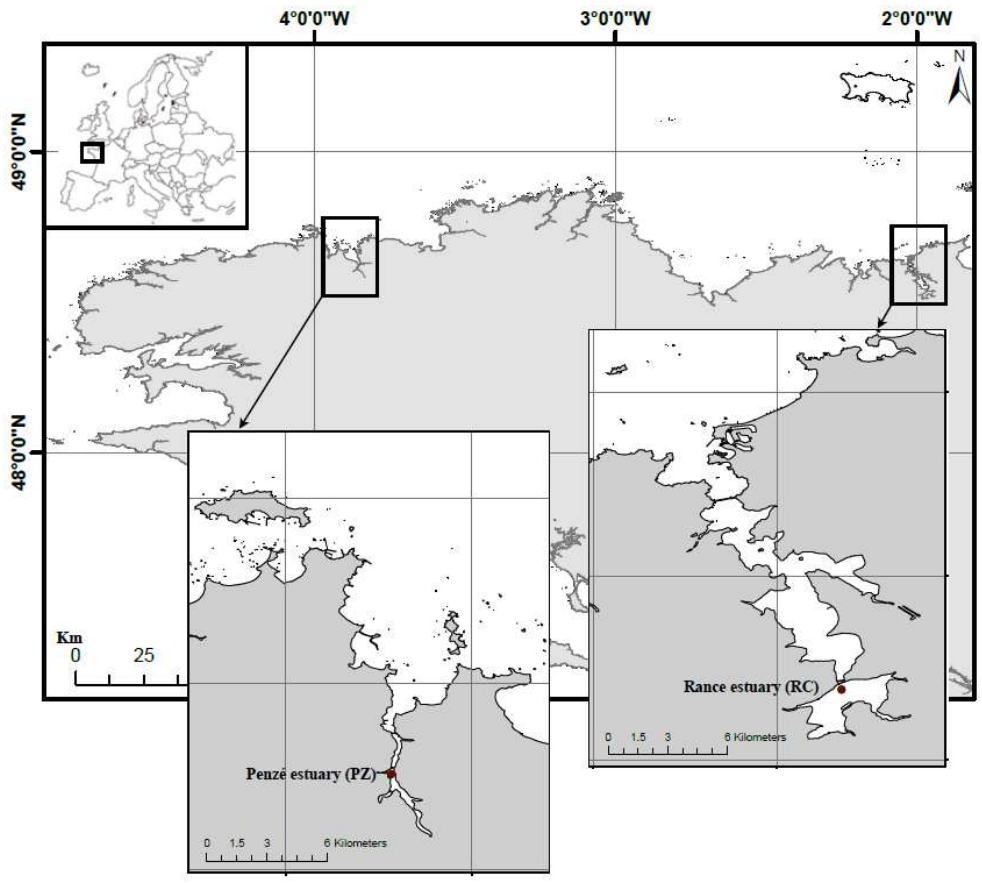


Figure 2:

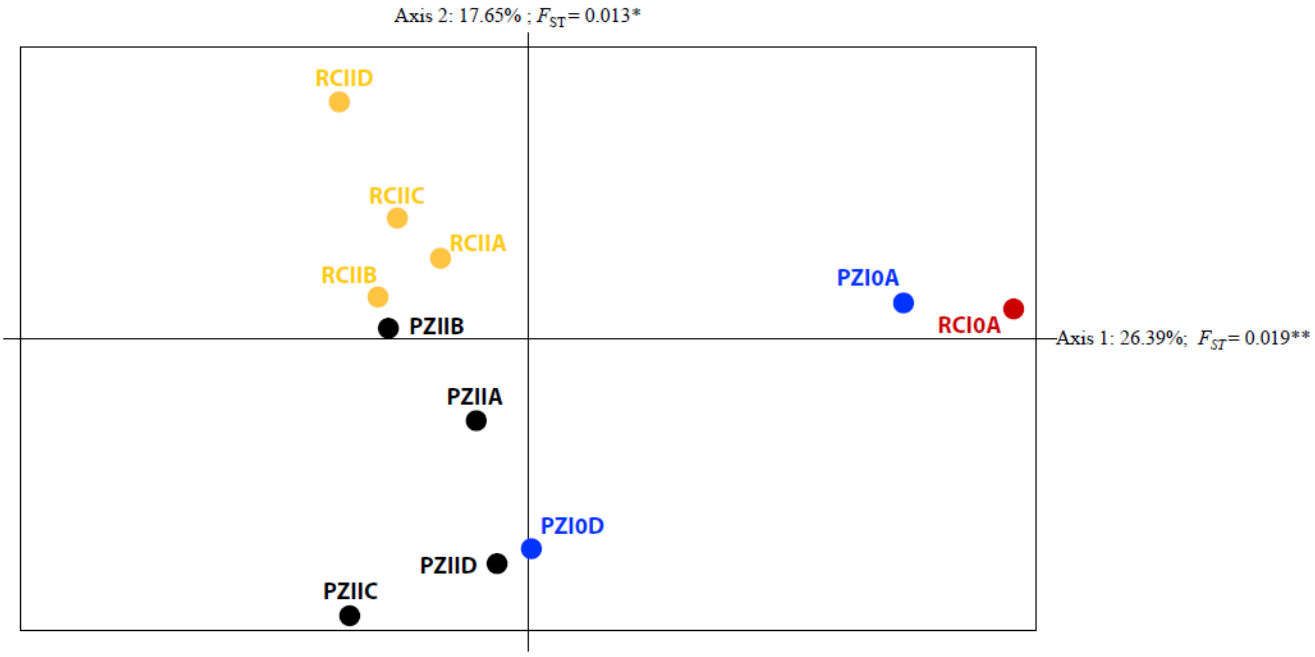

Axis 2: 17.65% ; F_{ST}= 0.013*
RCIID
RCIIC
RCIIA
RCIIB
PZIIB
PZIIA
PZIIC
PZIID
PZI0D
PZI0A
RCI0A
Axis 1: 26.39%; F_{ST}= 0.019**

Table 1: Characteristics of the spatiotemporal sampling. Sample sizes (N) are given for strains that were isolated for culturing and for the surviving strains that were genotyped. Codes for samples: PZ for Penzé, RC for Rance; 10 for 2010 and 11 for 2011; A, B, C and D indicate respectively the different periods of the blooms: the beginning, the middle 1, the middle 2 and the end of the bloom. Cells were counted in a counting chamber using an inverted microscope (Olympus CKX41).

Site/Year	Sampling date	Sample code	Cells density x 10^3 cells/L	Temperature of water (air temperature min./ max.) (°C)	Number of strains isolated	Number of surviving strains (%)	Number of *A. minutum* strains after screening	Number of strains genotyped
Penzé/2010	02 June	PZ10A	8	14.5 (8.6/22)	82	36 (43.9)	32	24
	30 June	PZ10D	102	19.0 (13.5/24.5)	29	16 (55.2)	09	09
	01 July	PZ10D	63	19.3 (12.2/25.9)	55	30 (54.5)	14	08
Penzé/2011	01 June	PZ11A	31	17.9 (2.7/18.6)	85	55 (64.7)	22	19
	15 June	PZ11B	88	18.0 (12.3/20.5)	93	46 (49.4)	24	14
	17 June	PZ11B	171	15.9 (8.4/16.3)	144	36 (25)	24	15
	22 June	PZ11C	402	16.0 (11.5/18)	119	49 (41.2)	32	24
	11 July	PZ11D	ND	17.5 (9/23.8)	195	30 (15.4)	26	18
Rance/2010	02 June	RC10A	36	16.3 (11.2/17.8)	65	43 (66.2)	43	40
Rance/2011	09 May	RC11A	13	15.4 (9.8/19.7)	45	26 (57.8)	19	15
	23 May	RC11B	168	16.8 (7.4/24.2)	96	55 (55.2)	40	25
	27 May	RC11C	288	17.0 (10.8/15.1)	96	57 (59.3)	38	25
	03 June	RC11D	66	18.5 (13/22.1)	83	22 (26.5)	17	10
	05 June	RC11D	106	18.8 (13.8/14.7)	53	29 (54.7)	24	19
				Total	1240	530 (42.7)	364	265

Table 2: Genetic diversity estimates in *A. minutum* at each of the 11 sampling sites and dates and for each of the seven microsatellite loci. *N*, number of individuals genotyped in each sample; N_a, number of alleles per locus; R_a, expected allelic richness based on the smallest sample size (10); H_s, Nei's gene diversity.

Sample (N)	PZ10 A (24)	PZ10 D (17)	PZ11 A (19)	PZ11 B (29)	PZ11 C (24)	PZ11 D (18)	RC10 A (40)	RC11 A (15)	RC11 B (25)	RC11 C (25)	RC11 D (29)
Aminu22											
N	19	15	14	26	23	16	34	12	23	21	27
N_a	4	7	4	9	6	5	9	5	7	8	8
R_a	3.74	6.58	3.85	6.62	5.05	4.60	6.36	4.96	5.63	6.33	5.97
H_s	0.57	0.84	0.57	0.73	0.75	0.68	0.76	0.74	0.63	0.62	0.68
Aminu41											
N	22	16	17	27	24	17	36	12	23	19	24
N_a	10	3	4	7	3	4	10	3	6	10	5
R_a	7.93	3.00	3.68	5.29	2.67	3.82	6.63	2.98	4.74	8.26	4.00
H_s	0.84	0.69	0.64	0.71	0.56	0.68	0.77	0.59	0.63	0.85	0.62
Aminu11											
N	22	16	17	28	22	17	33	14	23	25	28
N_a	12	9	9	12	12	11	14	10	11	14	13
R_a	10.02	8.20	8.54	9.04	9.55	9.82	9.85	9.48	9.34	10.67	10.38
H_s	0.94	0.90	0.93	0.89	0.91	0.94	0.91	0.95	0.93	0.93	0.94
Aminu20											
N	19	14	10	28	19	17	24	11	21	18	23
N_a	10	9	7	17	13	10	9	5	13	13	12
R_a	8.22	8.55	7.00	12.28	11.23	8.68	6.88	4.99	10.68	11.03	9.30
H_s	0.78	0.91	0.91	0.96	0.97	0.84	0.79	0.84	0.95	0.95	0.89
Aminu43											
N	19	16	18	24	23	14	28	14	22	19	20
N_a	13	10	13	12	13	8	15	8	14	9	10
R_a	10.92	9.17	10.90	9.84	10.05	7.63	10.90	7.70	10.96	8.00	8.99
H_s	0.95	0.93	0.94	0.93	0.92	0.89	0.93	0.91	0.94	0.89	0.93
Aminu48											
N	17	15	19	25	23	18	37	15	20	25	27
N_a	11	12	11	10	8	7	14	5	8	10	9
Ra	9.82	10.96	9.18	7.71	6.69	6.36	8.74	4.78	6.73	7.74	6.54
H_s	0.94	0.96	0.87	0.83	0.83	0.78	0.85	0.64	0.80	0.85	0.68
Aminu08											
N	22	15	17	27	23	14	28	13	23	24	28
N_a	9	10	11	13	10	11	13	11	13	15	11
R_a	7.38	9.36	9.82	9.18	8.22	10.33	9.67	10.58	9.90	11.07	7.91
H_e	0.83	0.94	0.94	0.87	0.88	0.96	0.91	0.97	0.88	0.93	0.83

Mean over loci											
N_a	**9.86**	**8.57**	**8.43**	**11.43**	**9.29**	**8.00**	**12.00**	**6.71**	**10.29**	**11.29**	**9.71**
(SE)	0.30	0.34	0.42	0.28	0.41	0.35	0.22	0.44	0.32	0.24	0.28
R_a	**8.29**	**7.97**	**7.57**	**8.56**	**7.64**	**7.32**	**8.43**	**6.49**	**8.28**	**9.01**	**7.58**
(SE)	0.29	0.32	0.38	0.27	0.40	0.34	0.21	0.43	0.31	0.21	0.29
H_s	**0.84**	**0.88**	**0.83**	**0.85**	**0.83**	**0.82**	**0.85**	**0.81**	**0.82**	**0.86**	**0.79**
(SE)	0.16	0.11	0.19	0.11	0.17	0.14	0.09	0.19	0.17	0.13	0.17

Table 3: Multilocus measurements of linkage disequilibrium using $\bar{r}_d$ (Agapow and Burt 2001).

Sample (*N*)	PZ10A (24)	PZ10D (17)	PZ11A (19)	PZ11B (29)	PZ11C (24)	PZ11D (18)	RC10A (40)	RC11A (15)	RC11B (25)	RC11C (25)	RC11D (29)
$\bar{r}d$	-0.008	0.068	-0.034	-0.017	0.037	0.005	0.003	0.027	-0.037	-0.049	0.009
P-value	0.566	0.047	0.870	0.730	0.063	0.416	0.423	0.240	0.902	0.971	0.348

Table 4: Spatial (A) and temporal (B) analyses of bloom events

A: Spatial AMOVA: Variation among bloom phases between the Penzé and Rance sites sampled in 2011 (F_{st} = 0.05. $P< 10^{-5}$)

Source of variation	df	Sum of squares	Variance component	Percentage variation (%)	*P*-value
Between the Penzé and Rance sites sampled in 2011	1	13.91	0.04	1.23	0.008
Among bloom phases within site	6	44.51	0.12	3.87	0.002
Within bloom phase	318	896.08	2.82	94.88	
Total		954.49	2.97		

B: Temporal AMOVA: Variation among bloom phases between years 2010 and 2011 at Penzé site (F_{st} = 0.14. $p< 10^{-5}$)

Source of variation	df	Sum of squares	Variance component	Percentage variation (%)	*P*-value
Between years 2010 and 2011 in Penzé	1	41.24	0. 33	10.01	$p< 10^{-5}$
Among bloom phases within year	4	33.04	0.14	4.27	$p< 10^{-5}$
Within bloom phase	226	648.12	2.86	85. 72	
Total		722.41	3.34		

SUPPORTING INFORMATION FOR:

SPATIOTEMPORAL CHANGES IN THE GENETIC DIVERSITY OF HARMFUL ALGAL BLOOMS CAUSED BY THE TOXIC DINOFLAGELLATE *ALEXANDRIUM MINUTUM*

Aliou Dia, Laure Guillou, Stéphane Mauger, Estelle Bigeard, Dominique Marie, Myriam Valero, Christophe Destombe

UPMC Paris VI, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.
CNRS, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France

Figure S1. Quantification of DNA in *Alexandrium minutum* cultures in comparison with nuclei isolated from human blood cells (HBC, 6.4 Mbp), after staining with propidium iodide in PBS buffer. HBC and *A. minutum* are discriminated on the forward scatter (X-axis, logarithmic scale), a proxy of size, versus red fluorescence (Y-axis, linear scale) dot plot (A). Quantification of DNA (X-axis, linear scale) by fluorescence in two monoclonal strains (B) and (C).

Figure S2. Resolving power of the microsatellite marker set to discriminate the maximum clonal diversity available in the data set.

Supplementary Tables (3)

Table S1. Roscoff Culture Collection (RCC) number, origin, population code and date of isolation of strains used in this study. RCC web site: www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC.

Strain number	Site	Population code	Date
RCC 3144	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3145	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3146	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3147	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3148	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3149	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3150	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3151	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3152	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3153	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3154	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3155	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3156	Penzé	PZ10A	02-June-10

RCC 3157	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3158	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3159	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3160	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3161	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3162	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3163	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3164	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3165	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3166	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3167	Penzé	PZ10A	02-June-10
RCC 3168	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3169	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3170	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3171	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3172	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3173	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3174	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3175	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3176	Penzé	PZ10D	30-June-10
RCC 3177	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3178	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3179	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3180	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3181	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3182	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3183	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3023	Penzé	PZ10D	01-July-10
RCC 3249	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3250	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3251	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3252	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3253	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3254	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3255	Penzé	PZ11A	01-June-11

RCC 3256	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3257	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3258	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3259	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3260	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3261	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3262	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3263	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3264	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3265	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3266	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3267	Penzé	PZ11A	01-June-11
RCC 3297	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3298	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3299	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3300	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3301	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3302	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3303	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3304	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3305	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3306	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3307	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3308	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3309	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3310	Penzé	PZ11B	15-June-11
RCC 3311	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3312	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3313	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3314	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3315	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3316	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3317	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3318	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3319	Penzé	PZ11B	17-June-11

RCC 3320	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3321	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3322	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3323	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3324	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3325	Penzé	PZ11B	17-June-11
RCC 3326	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3327	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3328	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3329	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3330	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3331	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3332	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3333	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3334	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3335	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3336	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3337	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3338	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3339	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3340	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3341	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3342	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3343	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3344	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3345	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3346	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3347	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3348	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3349	Penzé	PZ11C	22-June-11
RCC 3350	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3351	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3352	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3353	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3354	Penzé	PZ11D	11-July-11

RCC 3355	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3356	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3357	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3358	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3359	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3360	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3361	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3362	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3363	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3364	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3365	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3366	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3367	Penzé	PZ11D	11-July-11
RCC 3105	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3106	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3107	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3108	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3109	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3110	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3111	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3112	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3113	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3022	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3114	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3115	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3116	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3117	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3118	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3119	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3120	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3121	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3122	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3123	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3124	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3125	Rance	RC10A	02-June-10

RCC 3126	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3127	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3128	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3129	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3130	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3131	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3132	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3133	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3134	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3135	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3136	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3137	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3138	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3139	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3140	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3141	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3142	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3143	Rance	RC10A	02-June-10
RCC 3184	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3185	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3186	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3187	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3188	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3189	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3190	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3191	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3192	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3193	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3194	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3195	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3196	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3197	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3198	Rance	RC11A	09-May-11
RCC 3199	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3200	Rance	RC11B	23-May-11

RCC 3201	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3202	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3203	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3204	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3205	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3206	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3207	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3208	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3209	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3210	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3211	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3212	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3213	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3214	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3215	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3216	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3217	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3218	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3219	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3220	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3221	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3222	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3223	Rance	RC11B	23-May-11
RCC 3224	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3225	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3226	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3227	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3228	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3229	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3230	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3231	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3232	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3233	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3234	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3235	Rance	RC11C	27-May-11

RCC 3236	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3237	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3238	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3239	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3240	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3241	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3242	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3243	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3244	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3245	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3246	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3247	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3248	Rance	RC11C	27-May-11
RCC 3268	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3269	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3270	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3271	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3272	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3273	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3274	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3275	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3276	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3277	Rance	RC11D	03-June-11
RCC 3278	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3279	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3280	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3281	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3282	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3283	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3284	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3285	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3286	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3287	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3288	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3289	Rance	RC11D	05-June-11

RCC 3290	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3291	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3292	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3293	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3294	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3295	Rance	RC11D	05-June-11
RCC 3296	Rance	RC11D	05-June-11

Table S2. Microsatellite data amplified on 265 individual strains at seven loci. Population codes are given in Table 1.

Individuals	Sample codes	Aminu22	Aminu41	Aminu11	Aminu20	Aminu43	Aminu48	Aminu08
PZ374	PZ10A	199	202	255	0	201	215	185
PZ352	PZ10A	199	200	228	279	201	0	190
PZ330	PZ10A	197	164	240	248	0	0	180
PZ350	PZ10A	197	202	228	279	0	176	185
PZ344	PZ10A	197	200	228	0	215	217	185
PZ341	PZ10A	197	232	248	248	230	234	185
PZ362	PZ10A	197	200	238	279	188	0	190
PZ339	PZ10A	197	232	0	0	202	0	190
PZ351	PZ10A	197	202	236	250	197	214	190
PZ359	PZ10A	197	162	240	279	188	0	199
PZ331	PZ10A	195	202	236	0	205	240	187
PZ360	PZ10A	179	0	236	279	221	0	190
PZ353	PZ10A	0	218	0	279	220	0	185
PZ345	PZ10A	0	0	287	0	188	252	185
PZ355	PZ10A	0	232	248	279	221	176	190
PZ356	PZ10A	0	207	238	279	197	214	190
PZ340	PZ10A	0	163	248	279	188	176	197
PZ333	PZ10A	195	202	237	236	200	239	187
PZ334	PZ10A	197	200	238	253	204	239	189
PZ337	PZ10A	197	202	255	273	189	240	191
PZ338	PZ10A	199	202	239	269	0	242	0
PZ348	PZ10A	199	204	242	265	0	240	189
PZ354	PZ10A	197	206	229	267	187	238	0
PZ369	PZ10A	197	202	267	247	0	206	174
PZ482	PZ10D	201	200	244	271	197	239	179
PZ484	PZ10D	197	204	229	261	204	0	184
PZ485	PZ10D	199	204	225	263	200	231	216
PZ487	PZ10D	199	200	225	0	211	232	226
PZ488	PZ10D	199	204	225	248	200	234	216
PZ489	PZ10D	0	0	225	231	0	210	0

PZ491	PZ10D	197	204	239	261	197	248	0
PZ492	PZ10D	197	200	249	251	200	0	187
PZ493	PZ10D	168	202	240	0	187	228	220
PZ520	PZ10D	199	200	242	260	190	240	185
PZ521	PZ10D	197	200	252	262	202	242	194
PZ524	PZ10D	195	202	242	248	205	239	185
PZ514	PZ10D	195	202	258	0	197	239	190
PZ509	PZ10D	182	202	242	261	198	225	190
PZ500	PZ10D	179	202	240	261	206	218	187
PZ516	PZ10D	0	200	0	279	206	229	199
PZ522	PZ10D	199	200	240	263	187	240	216
PZ579	PZ11A	182	200	228	0	204	239	0
PZ594	PZ11A	197	202	228	248	199	234	194
PZ582	PZ11A	197	200	228	273	202	239	190
PZ591	PZ11A	197	202	237	0	194	239	187
PZ584	PZ11A	197	202	257	259	196	239	185
PZ593	PZ11A	197	200	248	0	202	237	179
PZ587	PZ11A	199	202	236	0	201	239	190
PZ589	PZ11A	199	202	259	261	209	244	185
PZ583	PZ11A	199	200	242	0	207	239	185
PZ572	PZ11A	197	200	257	261	204	256	234
PZ575	PZ11A	0	0	240	0	202	235	187
PZ577	PZ11A	0	206	0	265	171	242	186
PZ578	PZ11A	0	0	239	0	206	239	217
PZ580	PZ11A	197	202	242	253	197	236	225
PZ581	PZ11A	197	202	237	237	202	240	189
PZ586	PZ11A	0	202	259	261	208	244	189
PZ590	PZ11A	0	155	240	0	0	229	187
PZ595	PZ11A	210	200	236	265	204	234	0
PZ597	PZ11A	197	200	0	0	198	241	191
PZ689	PZ11B	197	202	239	269	0	251	179
PZ691	PZ11B	197	200	229	267	196	239	210
PZ696	PZ11B	194	202	259	259	198	239	0
PZ697	PZ11B	197	200	237	270	200	242	187
PZ701	PZ11B	195	202	239	274	196	238	189

PZ704	PZ11B	195	200	257	261	197	239	187
PZ708	PZ11B	199	200	229	261	197	239	226
PZ711	PZ11B	197	0	242	263	198	241	184
PZ712	PZ11B	0	176	242	259	204	241	197
PZ714	PZ11B	195	196	229	265	212	210	179
PZ715	PZ11B	195	202	248	253	206	218	0
PZ716	PZ11B	197	202	248	283	204	240	200
PZ719	PZ11B	197	202	239	253	204	0	187
PZ721	PZ11B	197	200	239	264	201	240	201
PZ742	PZ11B	197	200	239	262	202	240	190
PZ743	PZ11B	199	202	229	0	200	240	189
PZ749	PZ11B	212	202	237	261	204	239	187
PZ959	PZ11B	197	196	248	261	206	0	189
PZ960	PZ11B	197	200	229	265	202	246	189
PZ961	PZ11B	193	202	257	257	210	240	189
PZ962	PZ11B	195	200	223	248	0	246	187
PZ963	PZ11B	197	202	238	248	204	240	211
PZ964	PZ11B	197	232	227	271	0	240	187
PZ965	PZ11B	0	223	244	265	202	240	184
PZ966	PZ11B	197	202	248	273	0	0	198
PZ967	PZ11B	0	0	0	274	208	240	208
PZ968	PZ11B	192	202	252	269	194	248	189
PZ969	PZ11B	196	210	229	279	200	0	189
PZ970	PZ11B	200	200	229	279	0	246	189
PZ788	PZ11C	200	200	236	0	198	239	190
PZ770	PZ11C	199	200	248	258	188	240	187
PZ753	PZ11C	199	202	228	253	205	242	190
PZ761	PZ11C	197	202	257	263	201	237	201
PZ764	PZ11C	195	202	0	264	203	240	185
PZ789	PZ11C	195	200	259	0	198	242	187
PZ754	PZ11C	190	200	236	267	204	239	174
PZ757	PZ11C	195	200	237	259	191	239	189
PZ758	PZ11C	195	200	226	269	204	242	184
PZ759	PZ11C	199	202	242	263	0	0	0
PZ762	PZ11C	195	202	229	267	208	239	187

PZ766	PZ11C	199	200	242	269	202	239	187
PZ767	PZ11C	0	202	0	265	212	239	184
PZ771	PZ11C	199	202	229	0	200	239	189
PZ773	PZ11C	197	200	229	273	198	233	189
PZ775	PZ11C	195	204	229	259	197	231	192
PZ777	PZ11C	199	200	242	257	208	241	225
PZ778	PZ11C	197	202	229	261	206	241	198
PZ780	PZ11C	204	200	236	0	200	241	225
PZ781	PZ11C	195	200	228	261	208	239	189
PZ782	PZ11C	199	202	238	270	204	242	189
PZ784	PZ11C	197	200	229	0	198	256	189
PZ785	PZ11C	199	202	244	270	198	240	187
PZ787	PZ11C	199	202	239	271	204	242	184
PZ665	PZ11D	199	210	242	248	209	242	0
PZ661	PZ11D	199	202	253	248	192	239	187
PZ645	PZ11D	199	202	228	248	207	237	190
PZ648	PZ11D	197	200	228	248	197	239	0
PZ682	PZ11D	197	202	252	0	203	239	0
PZ643	PZ11D	197	202	244	270	200	239	190
PZ679	PZ11D	197	200	228	254	207	240	207
PZ660	PZ11D	183	200	248	248	0	239	227
PZ655	PZ11D	0	202	0	248	0	236	190
PZ637	PZ11D	197	200	239	248	200	229	233
PZ639	PZ11D	198	0	237	269	199	239	229
PZ640	PZ11D	199	200	255	253	200	229	211
PZ641	PZ11D	197	202	242	257	204	242	221
PZ644	PZ11D	199	200	239	269	200	239	189
PZ646	PZ11D	197	200	248	261	204	229	0
PZ647	PZ11D	207	200	242	271	0	239	187
PZ658	PZ11D	0	162	238	263	0	260	237
PZ683	PZ11D	197	210	229	274	204	240	185
RC275	RC10A	0	0	208	279	214	214	0
RC277	RC10A	195	200	229	261	202	239	192
RC280	RC10A	207	202	238	237	175	235	184
RC281	RC10A	197	200	223	0	202	241	175

RC283	RC10A	197	204	229	255	202	250	189
RC297	RC10A	197	215	249	271	202	211	213
RC304	RC10A	182	226	251	0	0	231	213
RC322	RC10A	183	199	224	259	175	0	187
RC317	RC10A	202	202	238	0	0	176	205
RC307	RC10A	197	200	238	248	0	0	0
RC321	RC10A	197	204	236	0	194	0	0
RC271	RC10A	197	200	248	279	188	176	0
RC293	RC10A	197	210	242	261	198	240	0
RC323	RC10A	197	200	0	279	180	217	180
RC301	RC10A	197	200	278	0	0	226	185
RC316	RC10A	197	202	244	0	0	214	187
RC311	RC10A	197	202	248	248	188	176	199
RC310	RC10A	197	200	0	246	188	180	205
RC315	RC10A	197	202	0	0	0	240	205
RC296	RC10A	197	200	240	248	0	214	213
RC325	RC10A	197	200	278	279	184	176	230
RC327	RC10A	195	202	240	279	221	176	0
RC295	RC10A	195	202	228	248	0	226	0
RC298	RC10A	195	200	248	0	0	240	0
RC305	RC10A	195	202	238	0	198	181	185
RC313	RC10A	195	200	248	248	0	214	205
RC308	RC10A	195	0	0	0	0	240	205
RC303	RC10A	193	200	0	0	201	181	185
RC314	RC10A	193	0	0	0	217	214	190
RC324	RC10A	193	204	238	279	188	176	205
RC328	RC10A	190	200	238	279	180	176	185
RC287	RC10A	182	200	0	265	213	176	0
RC300	RC10A	182	0	238	248	221	236	0
RC282	RC10A	182	181	248	279	0	176	199
RC302	RC10A	156	218	240	0	203	226	0
RC294	RC10A	0	202	236	248	196	214	0
RC273	RC10A	0	210	278	279	188	176	190
RC292	RC10A	0	200	223	0	201	214	197
RC320	RC10A	0	223	248	0	188	176	199

RC326	RC10A	0	210	223	0	220	176	205
RC913	RC11A	195	200	244	261	0	237	189
RC915	RC11A	193	0	229	0	200	240	221
RC922	RC11A	193	202	229	259	196	240	185
RC925	RC11A	200	200	239	259	196	231	208
RC931	RC11A	197	202	239	255	206	240	191
RC937	RC11A	197	204	248	261	201	240	189
RC938	RC11A	197	202	242	269	200	243	184
RC939	RC11A	195	200	238	261	193	240	206
RC919	RC11A	197	202	236	259	198	240	185
RC921	RC11A	0	200	253	248	203	237	187
RC926	RC11A	0	200	250	248	205	239	0
RC927	RC11A	197	200	237	0	205	239	0
RC930	RC11A	197	200	238	0	205	240	172
RC932	RC11A	199	0	0	0	203	240	213
RC934	RC11A	0	0	238	248	203	240	210
RC1003	RC11B	197	200	248	253	202	0	188
RC1013	RC11B	197	200	239	268	204	238	187
RC1014	RC11B	0	202	239	271	200	240	225
RC1016	RC11B	199	200	0	258	200	239	187
RC974	RC11B	197	202	236	0	200	240	224
RC975	RC11B	197	200	238	265	198	328	187
RC978	RC11B	199	202	229	263	201	0	0
RC979	RC11B	200	200	229	255	0	0	216
RC980	RC11B	197	200	238	253	0	240	189
RC981	RC11B	197	200	263	278	195	240	187
RC982	RC11B	195	200	245	269	200	242	187
RC983	RC11B	197	202	239	261	202	242	187
RC984	RC11B	197	200	239	261	207	0	0
RC986	RC11B	197	210	244	269	202	240	197
RC987	RC11B	199	202	240	252	198	240	184
RC988	RC11B	195	196	229	0	191	236	216
RC992	RC11B	197	200	237	259	0	240	187
RC999	RC11B	197	202	237	261	209	240	205
RC1008	RC11B	197	200	238	258	203	239	172

RC1001	RC11B	197	162	244	0	205	239	185
RC1005	RC11B	197	200	240	258	198	244	190
RC1015	RC11B	191	200	0	0	218	230	230
RC994	RC11B	188	0	248	259	194	239	230
RC991	RC11B	180	0	229	269	197	0	187
RC1011	RC11B	0	208	255	273	203	239	185
RC1019	RC11C	194	223	239	0	0	242	199
RC1020	RC11C	0	200	242	0	0	258	187
RC1021	RC11C	197	202	236	259	198	242	184
RC1022	RC11C	197	202	257	267	202	240	216
RC1024	RC11C	197	202	237	261	200	242	201
RC1026	RC11C	197	196	237	273	0	240	206
RC1028	RC11C	0	200	198	261	204	240	195
RC1032	RC11C	0	212	224	0	196	238	184
RC1034	RC11C	197	218	228	275	202	226	202
RC1040	RC11C	229	0	230	0	202	233	189
RC1042	RC11C	197	200	237	255	197	233	189
RC1043	RC11C	197	200	239	261	0	242	187
RC1044	RC11C	200	200	237	255	200	247	191
RC1047	RC11C	197	0	248	251	202	238	176
RC1049	RC11C	0	180	237	263	196	238	187
RC1050	RC11C	197	0	229	269	200	242	164
RC1055	RC11C	197	0	229	276	200	238	216
RC1059	RC11C	197	197	255	0	204	240	216
RC1061	RC11C	215	0	239	0	0	244	175
RC1062	RC11C	197	0	239	265	193	218	187
RC1035	RC11C	195	204	252	0	197	242	185
RC1036	RC11C	183	210	236	261	0	242	172
RC1056	RC11C	206	200	253	253	205	242	0
RC1039	RC11C	197	202	242	253	207	239	187
RC1060	RC11C	195	202	252	258	202	240	187
RC854	RC11D	197	202	248	0	0	242	187
RC855	RC11D	197	224	241	260	204	240	189
RC857	RC11D	197	200	237	265	0	238	194
RC858	RC11D	0	0	243	0	202	235	195

RC859	RC11D	196	0	229	267	202	0	180
RC860	RC11D	198	202	255	261	196	240	0
RC861	RC11D	197	0	255	261	196	240	190
RC863	RC11D	195	202	239	267	201	240	190
RC864	RC11D	197	202	237	285	0	240	185
RC867	RC11D	197	0	239	267	0	257	187
RC873	RC11D	197	200	257	0	0	240	187
RC874	RC11D	195	200	248	267	199	240	187
RC875	RC11D	207	202	259	261	204	240	180
RC876	RC11D	202	202	0	0	204	0	190
RC877	RC11D	197	202	251	259	191	240	187
RC878	RC11D	200	201	237	253	0	264	190
RC880	RC11D	197	202	238	238	0	242	227
RC881	RC11D	197	202	238	271	208	237	187
RC884	RC11D	195	202	257	267	204	240	187
RC885	RC11D	197	202	237	261	0	240	222
RC889	RC11D	0	204	243	261	201	228	179
RC894	RC11D	197	200	229	251	193	240	187
RC895	RC11D	196	200	239	262	193	240	187
RC897	RC11D	196	200	243	262	201	242	185
RC898	RC11D	195	200	237	261	0	240	185
RC883	RC11D	197	202	236	0	205	239	190
RC886	RC11D	197	202	236	0	199	240	190
RC887	RC11D	191	200	242	255	205	239	174
RC882	RC11D	197	0	236	255	197	239	187

Table S3: Pairwise differentiation between the 11 populations of *Alexandrium minitum*. F_{st} (θ) values are given above diagonal and Jost's D_{est} below diagonal. Significant F_{st} values (1000 permutations) are depicted in bold. *: F_{st} values that remain significant after a Bonferroni correction. Population codes are given in Table 1.

	PZ10A	PZ10D	PZ11A	PZ11B	PZ11C	PZ11D	RC10A	RC11A	RC11B	RC11C	RC11D
PZ10A		0.0396	0.0265	0.0378*	0.0639*	0.0403	0.0161	0.0577	0.0456*	0.0443*	0.0486*
PZ10D	0.3228		0.0124	0.0247	0.0170	0.0122	0.0495*	0.0281	0.0234	0.0254	0.0495*
PZ11A	0.1847	0.2007		0.0073	0.0211	0.0019	0.0536*	0.0331	0.0100	0.0104	0.0236
PZ11B	0.2748	0.2279	0.0929		0.0102	0.0234	0.0522*	0.0062	0.0008	0.0059	0.0103
PZ11C	0.3810	0.2206	0.1694	0.0576		0.0259	0.0770*	0.0401	0.0260	0.0429*	0.0534*
PZ11D	0.2135	0.2096	0.0956	0.2102	0.1968		0.0623*	0.0318	0.0197	0.0366	0.0581*
RC10A	0.1365	0.4011	0.3541	0.3287	0.4695	0.3464		0.0457	0.0544*	0.0582*	0.0763*
RC11A	0.2989	0.2938	0.2065	0.1187	0.2487	0.2071	0.2295		-0.0035	0.0259	0.0179
RC11B	0.2696	0.2414	0.1631	0.0766	0.1448	0.1700	0.3007	0.0684		-0.0011	0.0163
RC11C	0.3100	0.2402	0.1157	0.0994	0.2331	0.2323	0.3723	0.2081	0.0589		0.0169
RC11D	0.2225	0.3240	0.1177	0.1145	0.2802	0.2610	0.3815	0.1453	0.1225	0.1156	

Figure S1. Quantification of DNA in *Alexandrium minutum* cultures in comparison with nuclei isolated from human blood cells (HBC, 6.4 Mbp), after staining with propidium iodide in PBS buffer. HBC and *A. minutum* are discriminated on the forward scatter (X-axis, logarithmic scale), a proxy of size, versus red fluorescence (Y-axis, linear scale) dot plot (A). Quantification of DNA (X-axis, linear scale) by fluorescence in two monoclonal strains (B) and (C).

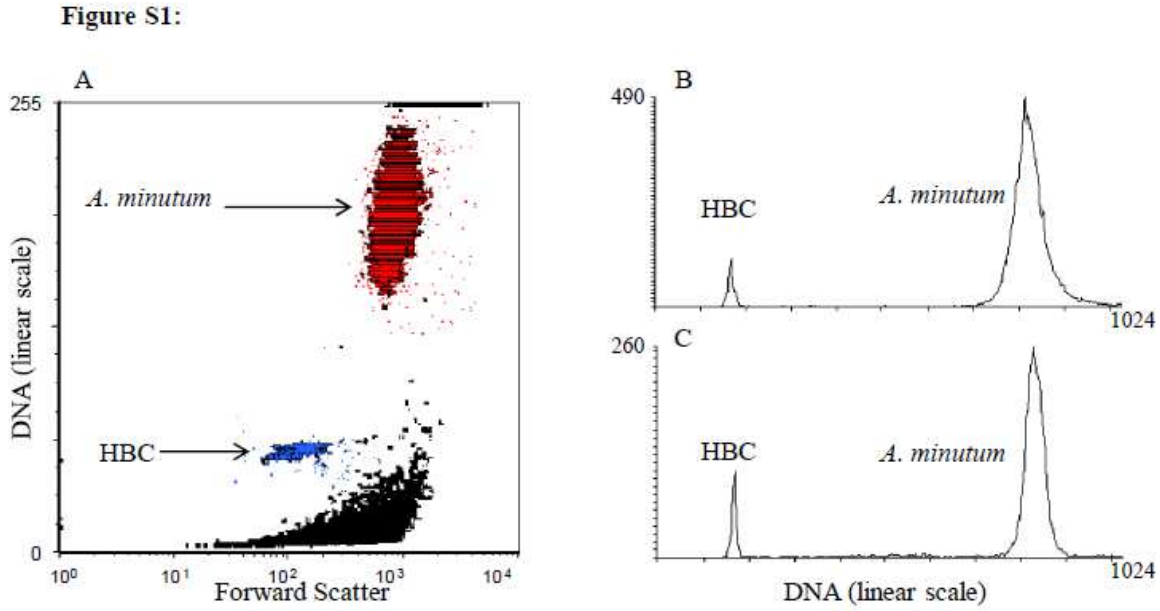
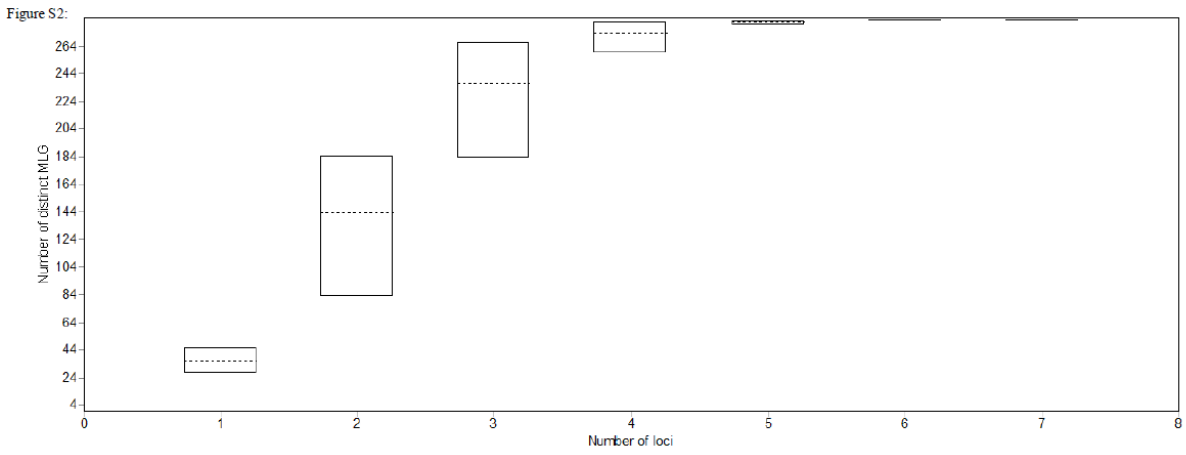


Figure S2. Resolving power of the microsatellite marker set to discriminate the maximum clonal diversity available in the data set.



CHAPITRE 3

Dispersion et différenciation génétique chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* le long des côtes bretonnes

Dispersion et différenciation génétique chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* le long des côtes bretonnes

A. Dia, L. Guillou, et C. Destombe

Projet d'article pour la revue : XXX

UPMC Paris VI, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.
CNRS, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.

Mots clefs: estuaire, dispersion, génétique des populations, introduction.

Résumé

Une majorité des dinoflagellés possède un cycle de vie complexe qui comporte une phase libre planctonique, dont la durée varie de quelques jours à plusieurs mois selon l'espèce. Cette phase planctonique a été longtemps synonyme de dispersion océanique et donc d'absence de différenciation génétique à grande échelle géographique, du fait de l'absence de barrières géographiques évidentes. Cependant, avec l'utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de structure géographique des populations d'organismes marins, ce paradigme de populations homogènes a peu à peu été remis en question. Au cours de cette étude, nous avons montré chez *Alexandrium minutum* que les populations étaient spatialement structurées et que la différentiation génétique augmentait avec la distance géographique (IBD significatif). Ces résultats suggèrent que la dispersion chez cette espèce est relativement limitée. L'importance de la banque de kystes comme forme de résistance est discutée à la lumière de l'hypothèse de monopolisation du milieu (De Meester *et al.*, 2002). Enfin, le rôle des activités anthropiques telles que l'aquaculture et les échanges commerciaux est discuté dans le cadre d'introductions multiples.

Introduction

La dispersion contribue généralement de façon significative à l'accroissement démographique des populations, aux flux géniques et à l'extension de l'aire de répartition des espèces (Lowe & Allendorf 2010). L'étude de la dispersion est donc cruciale pour mieux appréhender la biologie et l'évolution des populations naturelles. Chez le plancton marin, la dispersion dépend de la flottabilité et de la durée de vie des cellules pélagiques ainsi que des processus physiques du milieu (McManus & Woodson 2011). En effet, chez ces organismes, la dispersion dépend essentiellement de l'intensité des courants, car bien que la motilité des cellules flagellées permette les déplacements verticaux, elle ne permet pas de nager efficacement dans le sens contraire des courants (Sommer, 1996). De façon générale, comme le milieu marin est considéré comme un milieu très dispersif, sans barrière géographique marquée, les espèces planctoniques ont longtemps étaient caractérisées comme des espèces à forte dispersion montrant une absence de différenciation génétique à grande échelle géographique (Medlin *et al.*, 2000). Ces observations ont contribué à mettre en place le paradigme suivant qui considère que chez les microorganismes "everything is everywhere, but the environment selects" Bass Becking (1934). Chez ces organismes unicellulaires, la question de la connectivité entre populations reste encore aujourd'hui largement débattue car peu d'informations existent sur la distance que peut parcourir une cellule phytoplanctonique et parce que l'influence du paysage marin sur la dispersion reste encore relativement inexplorée.

Au cours de ces dernières décennies, différentes études d'estimations indirectes de la dispersion des organismes marins, basées sur les données océanographiques (Lee *et al.* 1994), sur la durée de vie larvaire, ainsi que sur la génétique des populations (Palumbi, 2001) ont été développées (pour revue voir (Levin *et al.*, 1993). En particulier, l'utilisation des outils de génétique des populations, utilisant des marqueurs hautement résolutifs, a permis de mieux appréhender les flux de gènes entre populations (Balloux, Lugon-Moulin, 2002). Ces outils qui estiment la connectivité entre populations, peuvent fournir des estimations de dispersion à diverses échelles géographiques (Hedgecock *et al.*, 2007; Koenig *et al.*, 1996; Leis, 2002; Palumbi, 2003).

L'existence de différences intra-spécifiques a été révélée chez des espèces toxiques de phytoplancton par des approches phylogéographiques (Masseret *et al.*, 2009; Medlin *et al.*, 2000). Par exemple, la diatomée *Pseudo-nitzschia pungens* montre une différenciation génétique marquée (basée sur des marqueurs de type microsatellite) entre les échantillons provenant des océans Atlantique et Pacifique (Casteleyn *et al.*, 2010). Par ailleurs, chez *A. minutum*, le même type d'approche, basée sur des marqueurs phylogéographiques (domaines divergents de la grande sous unité de l'ADN ribosomique D1 et D2), a permis de mettre en évidence l'existence de deux clades majoritaires (Lilly *et al.*, 2005): un premier clade « Pacifique » regroupant les échantillons de Nouvelle Zélande et de Taiwan et un second clade (nommé le clade global) regroupant tous les échantillons Européens et Australiens. Ces auteurs, en se basant sur la chronologie des évènements d'efflorescences,

suggèrent qu'*A. minutum* aurait été introduit en Australie à partir de l'Europe. L'existence de ces deux grands clades a été confirmée par (McCauley *et al.*, 2009) en utilisant des marqueurs microsatellites. Bien que ce type de marqueur hypervariable ne soit pas approprié pour les études biogéographiques en raison des phénomènes d'homoplasie, ces auteurs ont montré d'une part que les microsatellites n'amplifiaient pas chez les individus du clade Pacifique et d'autre part, qu'à l'exception des échantillons d'Italie et d'Espagne, les autres souches se regroupaient en fonction de leurs origines géographiques ce qui suggère que ces différents groupes sont relativement peu connectés. Enfin, chez la même espèce, récemment, l'étude de la connectivité des populations réalisée en Méditerranée a permis de mettre en évidence des différences génétiques entre populations séparées par quelques centaines de km (Casabianca *et al.*, 2011).

Depuis plus d'une trentaine années, la fréquence et de l'intensité des évènements d'efflorescences toxiques de type PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) (Hallegraeff, 1993) en particulier dues à *A. minutum* ne cessent d'augmenter au niveau mondial. L'augmentation du trafic commercial par voies maritimes (via les eaux de ballast (Hallegraeff, 1993) et le développement de l'activité aquacole (via les échanges conchylicoles internationaux) ont été invoqués pour expliquer les phénomènes d'introduction dans certaines régions. Par ailleurs, les changements environnementaux, tels que le changement climatique ou l'augmentation des nitrates dans certains estuaires pourraient expliquer la prolifération de ces algues toxiques.

En France, des premières efflorescences d'*A. minutum* ont été détectées en Bretagne, plus précisément, en Baie de Morlaix (rivière de Penzé) en juin 1988 avec une densité d'environ 80 000 cellules par litre, puis quelques mois après en août 1988 dans les abers (Aber Wrac'h et Aber Benoit) (Morin *et al.* 2000). Elle est observée en Rance en 1996 puis successivement, en Ireland, en Angleterre et au Danemark (Hansen *et al.*, 2003; Nehring, 1998). Récemment en 2012, des efflorescences importantes ont été recensées à Daoulas dans la rade de Brest avec plus de 42 millions de cellules par litre d'eau.

Les efflorescences d'*Alexandrium minutum* sont généralement observées dans les milieux confinés ou semi-confinés tels que les ports, les estuaires ou les lagunes. Ce type d'environnement, caractérisés par de faibles turbulences et des niveaux élevés en nutriments, est particulièrement favorable au développement rapide des efflorescences en permettant des taux de croissance élevés (Margalef 1978; Margalef *et al.* 1979). De plus, ces milieux relativement isolés, au moins temporairement, pourraient limiter la dispersion chez cette espèce. En Bretagne, ces efflorescences sont récurrentes dans certains estuaires comme ceux de la Rance et de la Penzé. Le cycle de vie d'*A. minutum* qui comprend deux phases : une phase pélagique et une phase benthique composée de kystes (hypnozygotes) (Figueroa *et al.*, 2011), pourrait jouer un rôle primordial dans la structuration génétique des populations. En effet, ces kystes constituant une véritable banque de graines (McQuoid *et al.*, 2002; Mizushima, Matsuoka, 2004; Ribeiro *et al.*, 2011) pourraient former un tampon

génétique capable de résister aux fluctuations et à l'effondrement des populations et assurant ainsi une certaine résilience vis-à-vis des flux de gènes venant de l'extérieure (De Meester *et al.*, 2002)

Par conséquent, deux phénomènes doivent être pris en compte pour mieux appréhender la structure génétique des populations chez *A. minutum* : la dispersion à faible distance de proche en proche (transports passifs des cellules végétatives ou kystes entre estuaires géographiquement proches) et la dispersion à longue distance (via les activités anthropiques : introduction accidentelle de kystes sexués). En dehors ces évènements d'introduction, on s'attend donc à observer un phénomène d'isolement par la distance caractérisé par une augmentation de la différenciation génétique en fonction de la distance géographique.

Dans ce contexte, la première partie de ce travail sera consacrée à l'étude de différenciations génétiques entre sites à grande échelle (de quelques dizaines à quelques milliers de km). Il s'agira de comparer des échantillons prélevés dans différents estuaires Bretons (Atlantique et Manche) aux échantillons isolés en Espagne et en Italie (Méditerranée). Dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à retracer l'origine des efflorescences récemment observées en Bretagne en utilisant des approches d'assignation de type bayésien. Enfin nous essaierons d'estimer à quelle période de l'efflorescence la dispersion est la plus importante en comparant la variation spatio-temporel des efflorescences.

Matériel et méthode

Echantillonnage

La localisation des sites étudiés est représentée dans la figure 1. Le nombre de souches monoclonales et leurs origines utilisées dans la première partie (isolement par la distance) est détaillé dans le tableau 1. Quatre souches de la mer Tyrrhénienne, deux souches de la mer Ionienne et une souche de l'Adriatique ont été regroupées sous le code Italie (IT). Les souches monoclonales utilisées dans cette étude ont été isolées par micromanipulation. La mise en culture de ces échantillons ainsi que leur maintien ont été effectués selon les protocoles décrits précédemment (Dia *et al.* soumis).

Pour compléter l'étude de la dispersion sur les côtes bretonnes, nous avons ajouté au jeu de données spatial les prélèvements spatio-temporels qui avaient été faits dans le cadre d'une étude antérieure (voir Dia *et al.* soumis). De plus, les échantillons de Paluden (Aber Wrac'h) prélevés à des dates différentes ont été considérés séparément (PA 1 et PA 2) et les sites géographiquement proches de Tinduf et Daoulas en rade de Brest, échantillonnés à des dates similaires, ont été regroupés sous le code Daoulas (DA).

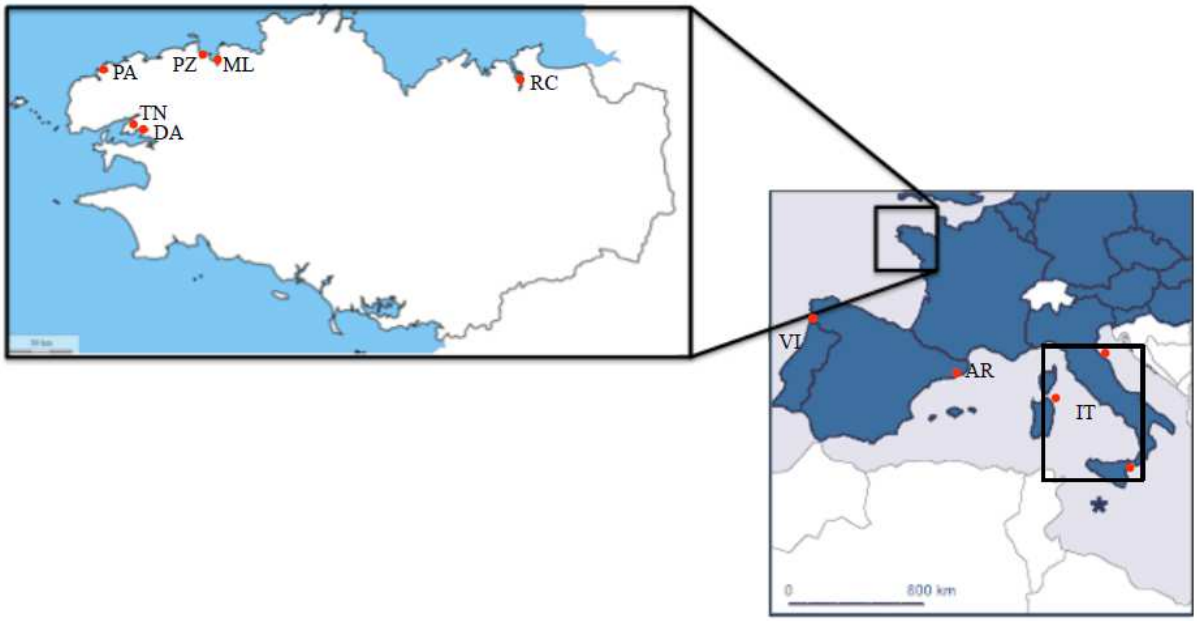


Figure 1. Cartes géographiques illustrant les sites d'échantillonnages Penzé (PZ), Morlaix (ML), Rance (RC), Daoulas (DA), Tinduff (TN), Paluden (PA), Vigo (VI), Arenys (AR) et Italie (IT)

Tableau 1. Caractéristiques spatiales et temporelles des clones analysés

Sites/années	Coordonnées géographiques	Codes	Nb de clones
Penzé/2011	48°38'50,19''N, 3°56'48,22''W	PZ	24
Morlaix/2010	48°38'12,93''N, 3°51'20,27''W	ML	10
Rance/2011	48°34'09,36''N, 1°59'38,92''W	RC	25
Daoulas/2012	48°21'29,23''N, 4°15'45,50''W	DA	8
Tinduff/2012	48°20'29,13''N, 4°21'39,21''W	TN	5
Paluden/2012	48°35'21,89''N, 4°30'58,48''W	PA	30
Vigo/2012	42°12'43''N, 08°52'29''W	VI	10
Arenys2012	41°34'32''N, 02°33'30''E	AR	10
Italie*		IT	7
	40°57'11''N, 09°39'04''E		
	37°03'04''N, 15°17'02''E		
	43°46'19''N, 13°09'24''E		

*Les échantillons regroupés sous le nom de l'Italie ne correspondent pas à un échantillonnage populationnel mais proviennent de 3 sites différents que nous avons regroupé (Mer Tyrrhénienne : 4 souches, Mer Ionienne : 2 souches et Mer Adriatique : 1 souche).

Extraction d'ADN

Pour l'extraction de l'ADN, les échantillons ont été récoltés durant leurs phases de croissances exponentielles. L'ADN a été extrait soit avec de la CTAB (Lebret *et al.*, 2012) soit avec le kit Nucleospin 96 Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) en suivant les instructions du fabricant avec 5 à 10 mg de matière biologique ré-suspendu dans 100 µL de l'élution buffer.

Les souches ont été identifiées génétiquement grâce à la région inter-génique de l'ADN ribosomique (ITS1, 5.8S et ITS2). Cette région a été amplifiée dans des mix de PCR d'un volume total de 14 µL, composé de 20 ng d'ADN, 1X GoTaq Flexi green buffer (Promega, Madison, WI, USA), 150 µM de chaque dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 20 pmol de l'amorce forward 329F (5'-GTG AAC CTG CRG AAG GAT CA-3', reverse complémentaire de l'amorce reverse des eucaryotes 329-R (Moon-van der Staay *et al.* 2001), 20 pmol de l'amorce reverse DIR-R (5'- TAT GCT TAA AAT TCA GCA GGT-3' (Scholin, Anderson, 1994), and 1.25 U GoTaq® Polymerase (Promega). Les amplifications ont été faites dans des thermocycler de type (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) avec les cycles suivant: une dénaturation initiale à 95°C durant 5 minutes suivie de 35 cycles (dénaturation à 95°C pendant 45 secondes, hybridation à 53°C pendant 45 secondes, élongation 72°C pendant 45 secondes) ; une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Par la suite, les produits PCR sont purifiés par un kit BigDye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pour être séquencés dans les deux sens avec un séquenceur à capillaire ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Genotypage

Les souches ont été génotypées avec 12 marqueurs microsatellites développés par (NAGAI *et al.*, 2006). Chacune des amplifications avec les marqueurs microsatellites est faite dans un volume total de 10 µL. Ce volume contient 20 ng d'ADN 1x GoTaq® Flexi buffer (Promega Corporation), 2 mM MgCl2, 150 µM de chaque dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 0.8 $\mu g.\mu L^{-1}$ de sérum albumine bovine, 30 pmol d'amorce forward fluorescente (FAM, VIC, NED or PET), 30 pmol d'amorce reverse, et 0.35 U de GoTaq® Polymerase (Promega Corporation). Les amplifications sont faites dans des machines BioRad DNA Engine Peltier Thermal Cycler (California, USA). Les conditions de PCR sont: une dénaturation initiale à 95°C durant 5 minutes suivie de 10cycles (dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation à 60°C pendant 30 secondes, élongation 72°C pendant 30 secondes) ; une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes), viennent sont ensuite 28 cycles PCR (dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation à 55 °C pendant 30 secondes et une extension à 72 °C pendant 30 secondes), suivis par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. 2 µL des produits PCR sont dilués au 1:10 puis dans un mix de 10 µL composé de 0.5 µL du marqueur de taille SM594 (Mauger *et al.* 2012) et de 9.5 µL de formamide Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ce mix est dénaturé à 95°C pendant 3 minutes avant d'être analysé par un séquenceur à capillaire de 50

cm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La lecture des génotypes est faite avec le logiciel GENMAPPER version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Analyse des microsatellites

Les estimations de la diversité génétique, c'est-à-dire le nombre moyen d'allèles par locus (Na), l'hétérozygotie non biaisée (He : Nei, 1987) ainsi que la richesse allélique (Ra) ont été réalisées par le logiciel Fstat (version 2.9.3.2.(Goudet, 1995)). La richesse allélique a été estimée après ré-échantillonnage au hasard (10.000 permutations pour chaque échantillon) pour la standardisation de l'estimation par le nombre minimum d'individus entre les différents échantillons.

Une analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel MINITAB 13.20 a été réalisée afin de tester la différence entre les valeurs calculées de la diversité génétique (He) des différents échantillons de cette étude (Valero et al 2011).

Différenciation génétique

Les valeurs Fst par paire (différenciations génétiques) entre tous les échantillons ont été estimées à l'aide du logiciel Arlequin (ver 3.5.1.2) (Excoffier, Lischer, 2010) avec 10 000 permutations pour la significativité des p-values. Afin de visualiser les relations entre ces échantillons, nous avons une analyse en composante principale (ACP) grâce au logiciel PCAGEN (version 1.2, (Goudet, 1999). Les tests de significativité des statistiques associées à chaque axe de cet ACP ont été calculés avec plus de 10000 permutations.

La structure génétique des échantillons a été testée par le logiciel STRUCTURE version 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Ce logiciel utilise une méthode bayésienne pour identifier le nombre de cluster le plus probable (K) qui représente des populations génétiquement différenciées avec uns probabilité d'assignation de chaque individu à chacun des clusters (K). Nous avons réalisé ce test en admettant qu'il y ait de l'admixture[2] et des corrélations des fréquences alléliques. Le nombre de cluster (K) est déterminé en estimant la probabilité des données [log Pr (X|K)] de K allant de1 à 9 avec une moyenne des 20 répétitions indépendantes. Chaque analyse a consisté en une « phase d'allumage » (Burn-in period) de 10000 chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) et une phase stationnaire de 10000 MCMC. La valeur de K la plus probable a été inférée selon les probabilités à posteriori des données avant d'utiliser le choix du critère *ΔK (EVANNO et al., 2005)*. Une moyenne est faite pour le K sélectionné à partir des 20 répétitions avec CLUMPP version 1.1.2 (Jakobsson, Rosenberg, 2007). Le graphique du résultat est effectué par DISTRUCT version 1.1 (Rosenberg, 2004).

[2] Assignation possible des individus dans plusieurs populations génétiques s'ils ont des origines d'hybridation entre individus qui appartiennent à des populations différentes

Distances génétiques

La quantification des dissemblances globales entre souches d'*A. minutum* provenant de sites différents a été faite en utilisant la distance de Nei (1972) qui permet d'estimer le temps de divergence entre deux populations. La méthode d'agrégation du Neighbor Joining (NJ) développée par Saitou et Nei (1987) a été utilisée pour construire un arbre à partir des matrices de distances calculées. L'algorithme NJ utilise la plus petite distance après pondération par l'ensemble des distances. L'analyse de la robustesse de l'arbre a été réalisée par la méthode du bootstrap (Felsenstein 1985). Cette méthode permet d'apprécier l'incertitude due à l'échantillonnage. Un tirage au hasard avec remise de k caractères parmi les k constituant les données est effectué. Un arbre est construit après chaque ré-échantillonnage, ce processus a été réitéré 1000 fois. Un arbre de consensus synthétise les 1000 arbres ainsi obtenus, permettant de visualiser leurs concordances. Dans la comparaison de plusieurs arbres présentant des topologies différentes, le programme recherche les nœuds présents dans 50 à 100 % des arbres. On considère qu'un nœud est d'autant plus stable que son pourcentage d'apparition est élevé. Dans cette étude nous n'avons conservé que les valeurs supérieures ou égales à 70%. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Phylip (Felsenstein 1985).

Description détaillée des méthodes pour étudier la structure génétique des populations

L'analyse en composante principale

Depuis des décades, les analyses multivariées sont utilisées pour extraire divers types d'informations à partir de données génétiques. Et parmi ces méthodes, l'analyse en composante principale (ACP) est habilitée à identifier des structures génétiques avec un avantage important par rapport aux méthodes bayésiennes d'un point de vue gain de temps. Toutefois l'ACP a un désavantage par rapport aux méthodes de clustering bayésiens qui permettent de déterminer le nombre de groupe génétique. L'ACP nécessite une définition à priori des clusters pour étudier la structure des populations. L'objectif d'une ACP est de résumer toute la variabilité entre individus, laquelle inclut à la fois la divergence entre groupes (structure de la variabilité génétique) et la variation entre groupe. Nous avons donc dans un premiers temps examiné les relations entre les échantillons via une ACP basée sur leurs fréquences alléliques.

Les méthodes bayésiennes

Ces méthodes consistent à supposer que les données génétiques peuvent être expliquées par des méthodes probabilistes dont les paramètres sont inconnus.(Pritchard *et al.*, 2000) a décrit un modèle de regroupement avec une méthode qui utilise des données de génotype multilocus pour assigner des individus à des populations. Ce concept assume un model dans lequel il existe un nombre K de populations (où K n'est pas prédéfini), chacun des K est caractérisé par un ensemble de fréquences alléliques à chaque locus. Chaque individu échantillonné est assigné (méthode probabiliste) à une population ou « conjointement » à deux voir

plus de populations si ses génotypes indiquent que cet individu est issu d'un métissage. Les applications de cette méthode peuvent donc démontrer la présence d'une structure de populations, l'assignement des individus aux populations. Cette méthode peut également être appliquée pour étudier des zones hybrides, identifier des migrant et un mélange d'individus. L'objectif de la méthode développée par (Pritchard *et al.*, 2000) (STRUCTURE) est d'estimer conjointement les fréquences alléliques des différentes populations et les coefficients d'appartenance des individus à ces populations. Pour ce faire, Structure utilise un algorithme à l'aide de chaines de Markov (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) pour estimer la distribution des variables (fréquences alléliques, coefficients d'appartenance).

Test de Mantel

Nous avons effectué un test de Mantel ou test d'isolement par la distance (IBD) afin de vérifier s'il existe une corrélation entre la distance génétique basée sur la formule $F_{ST}/(1-F_{ST})$ et la distance géographique (km). Les distances géographiques entre échantillons ont été mesurées sur Google Earth en passant par la distance la plus courte sur la surface d'eau continue pour chacune des mesures. Cependant, les connections entre les surfaces d'eau (mer, océan) ne reflètent pas nécessairement les distance de dispersion de par la complexité de la circulation des océans.

La réalisation du test de l'isolement par la distance a été faite avec le logiciel GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). Il s'agit d'un test non paramétrique de comparaison entre nos deux matrices de distance. La valeur d'un paramètre d'association Z, entre les deux matrices (X et Y) est calculée à partir des données réelles, puis comparée à la série de valeurs obtenues par permutations aléatoires de l'ordre des populations dans l'une des deux matrices de distance.

Z = SiSjxij*yij, où i = n° de ligne et j = n° de colonne. S'il n'y a pas de relation entre les deux matrices de distances, la valeur de Z obtenue sur les données réelles ne s'écartera pas de la distribution des Z obtenus après permutations. Dans le cas contraire, on rejette l'hypothèse nulle d'absence de corrélation.

Résultats

Diversité génétique

Sur les douze marqueurs microsatellites testés au cours de cette étude, les locus Amin39 et Amin44 ont été éliminés car nous ne détections pas de signaux sur les produits PCR (pas d'amplification). Le calcul des fréquences des allèles nuls sur les dix locus restant nous a conduit à réduire le nombre de locus étudiés. Les locus éliminés sont ceux qui montraient une fréquence d'allèles nuls supérieure à 25% : Aminu10, Aminu15, Aminu29 ont respectivement 44%, 27% et 26% d'allèles nuls. Après plusieurs tests de ré-amplifications sur les souches avec lesquelles des problèmes d'amplifications ont été rencontrées, nous avons décidé d'écarter du jeu de données, les souches pour lesquelles plus de la moitié des locus n'amplifiaient pas correctement. Donc finalement, sur les douze marqueurs microsatellites testés au cours de cette étude, sept locus ont été retenus. Il s'agit des locus A11, A48 avec respectivement 4% et 7% d'allèles nuls ; des locus A22, A41, et A08 avec 10% d'allèles nuls et enfin des locus A43 et A20 qui représentent respectivement 12% et 17% d'allèles nuls.

Comme attendu chez un organisme haploïde, les produits de PCR de ces sept marqueurs microsatellites montrent la présence d'une seule bande sur le chromatogramme, c'est-à-dire d'un seul allèle. Tous les locus sont polymorphes. Les statistiques des indices de diversité génétique sont présentées dans le Tableau 2. La diversité moyenne calculée sur l'ensemble des locus montre que le nombre d'allèles varie du simple au triple entre populations avec la valeur la plus faible et identique (3,57) trouvée chez les populations échantillonnées en Italie et à Tinduff (Aber Wrac'h), le nombre d'allèle moyen le plus élevé est de l'ordre de 15,57 (Paluden (Aber wrac'h), voir Tableau 2)). Toutefois, le nombre d'allèle estimé dépend fortement de l'effort d'échantillonnage. La richesse allélique, valeur corrigée pour être moins dépendante de la taille de l'échantillonnage, varie de 3 (Italie) à 4,76 (Paluden). Les valeurs d'He sont beaucoup plus stables et relativement fortes car comprises entre 0.73 (Italie) et 0.91 (Paluden). Les valeurs estimées de la diversité génétique (He) ne sont pas significativement différentes entre sites (Tableau 3). Les diversités calculées par locus et par populations montrent un nombre d'allèles (Na) compris entre 2 (locus Aminu48) et 17 (locus Aminu43).

Tableau 2. Estimation de la diversité génétique chez *A. minutum* en fonction des 9 sites échantillonnés et pour chaque locus microsatellite. N, nombre d'individus analysés ; Na, nombre d'allèles par locus ; Ra, richesse allélique et He, diversité génétique (Nei's)

Echantillons (N)	Penzé (24)	Rance (25)	Daoulas (8)	Paluden (30)	Morlaix (10)	Tinduff (5)	Arenys (10)	Vigo (10)	Italie (7)
Locus: A22									
N	23	21	7	26	10	4	8	10	7
Na	6	8	3	11	4	3	4	5	4

Ra	3,31	3,08	2,62	3,62	2,96	2,93	3,20	3,61	3,31
He	0,75	0,62	0,67	0,74	0,71	0,83	0,79	0,82	0,81
Locus: A41									
N	24	19	7	27	10	5	9	9	6
Na	3	10	5	15	3	5	6	6	3
Ra	2,21	4,14	3,76	4,55	2,49	4,33	4,06	3,83	2,55
He	0,56	0,85	0,86	0,89	0,64	1,00	0,89	0,83	0,60
Locus: A11									
N	22	25	8	27	10	5	10	10	7
Na	12	14	6	17	5	5	6	5	5
Ra	4,60	4,89	4,27	5,20	3,35	4,33	3,60	3,35	3,94
He	0,91	0,93	0,93	0,96	0,76	1,00	0,78	0,76	0,91
Locus: A20									
N	19	18	7	29	6	4	10	7	7
Na	13	13	6	16	4	3	7	4	2
Ra	5,14	4,97	4,39	5,08	3,32	2,93	4,32	3,31	1,99
He	0,97	0,95	0,95	0,95	0,80	0,83	0,91	0,81	0,57
Locus: A43									
N	23	19	7	26	9	3	10	10	7
Na	13	9	5	20	7	3	6	7	4
Ra	4,75	4,37	3,94	5,32	4,52	3,00	3,85	4,46	3,31
He	0,92	0,89	0,91	0,97	0,94	1,00	0,84	0,93	0,81
Locus: A48									
N	23	25	6	26	10	5	8	10	7
Na	8	10	5	16	6	2	4	6	4
Ra	3,90	4,12	4,06	4,83	3,85	2,00	3,37	4,07	3,08
He	0,83	0,85	0,93	0,92	0,84	0,60	0,82	0,89	0,71
Locus: A08									
N	23	24	6	26	10	5	8	8	6
Na	10	15	5	14	6	4	7	7	3
Ra	4,4	4,9	4,1	4,7	3,9	3,6	4,6	4,6	2,7
He	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	0,7
Mean Over all loci									
Na	9,29	11,29	5,00	15,57	5,00	3,57	5,71	5,71	3,57

	1,25	0,80	0,45	0,70	0,63	0,60	0,52	0,47	0,52
Ra	4,03	4,35	3,87	4,76	3,49	3,30	3,86	3,89	2,99
	0,50	0,32	0,30	0,26	0,36	0,47	0,26	0,26	0,36
He	0,83	0,86	0,88	0,91	0,80	0,88	0,86	0,86	0,73
	0,15	0,12	0,11	0,08	0,11	0,15	0,07	0,08	0,14

Tableau 3. Résultats de l'ANOVA, la variation entre les 9 sites a été testée pour l'indice de diversité génétique (He).

Source	DL	CM ajusté	F	P
Échantillons	8	0,01909	1,67	0,127
Erreurs	54	0,01142		
Total	62			

Différenciation génétique entre sites

Nous avons en premier lieu testé les relations entre les différents échantillons via une analyse en composante principale (ACP) de leurs fréquences alléliques (Figure 2). Cette ACP montre un F_{ST} global significatif (F_{ST} = 0.12, P<0.001). Les deux premiers axes de l'ACP sont significatifs avec l'axe 1 qui explique 20% de la variance (F_{ST} = 0.03, p=0.0088) et l'axe 2 15% de la variance (F_{ST} =0.023, p=0.034). L'axe 1 de l'ACP sépare les sites de Penzé et de Morlaix des sites de Vigo et d' Italie , tandis que l'axe 2 sépare l'Italie de Daoulas, Rance et Paluden (Figure 2).

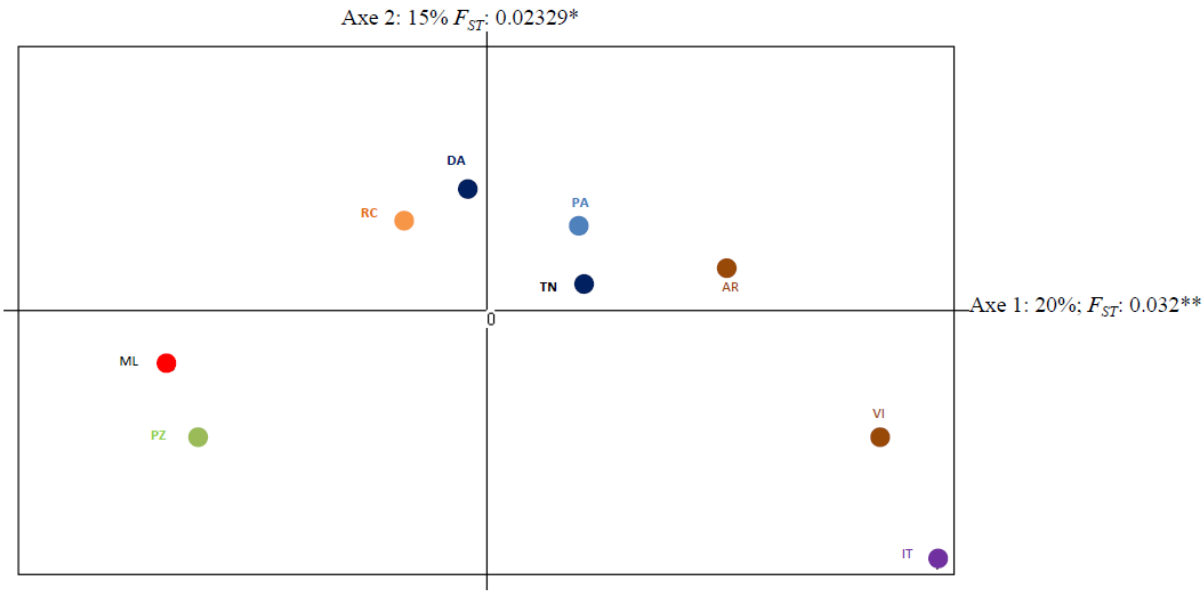


Figure 2. Analyse en composante principale (ACP) basée sur les fréquences alléliques de chacun des neufs échantillons. Les deux axes sont significatifs avec l'axe 1 qui représente 20% la variance (F_{ST} = 0,032) et l'axe 2 qui représente 15% de la variance (F_{ST} = 0,023). Penzé (PZ), Morlaix (ML), Rance (RC), Daoulas (DA), Tinduff (TN), Paluden (PA), Vigo (VI), Arenys (AR) et Italie (IT).

Les tests de comparaison des differenciations génétiques (Fst) par paire de sites révelent des valeurs de Fst comprises entre 0,029 (Paluden – Rance) et 0,25 (Italie – Morlaix). Toutes les comparaisons montrent des differences significatives. (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats du test de différenciation génétique (F_{ST}) par paire entre les différents sites. Toutes les valeurs de F_{ST} sont significatifs à (p< 0,01). Penzé (PZ), Morlaix (ML), Rance (RC), Daoulas (DA), Tinduff (TN), Paluden (PA), Vigo (VI), Arenys (AR) et Italie (IT).

	PZ	ML	RC	DA	TI	PA	VI	AR	IT
PZ									
ML	0,073								
RC	0,063	0,096							
DA	0,109	0,099	0,045						
TI	0,107	0,174	0,098	0,145					
PA	0,086	0,092	0,029	0,061	0,060				
VI	0,167	0,195	0,140	0,154	0,152	0,111			
AR	0,136	0,150	0,085	0,123	0,132	0,085	0,116		
IT	0,214	0,254	0,199	0,242	0,201	0,176	0,191	0,209	

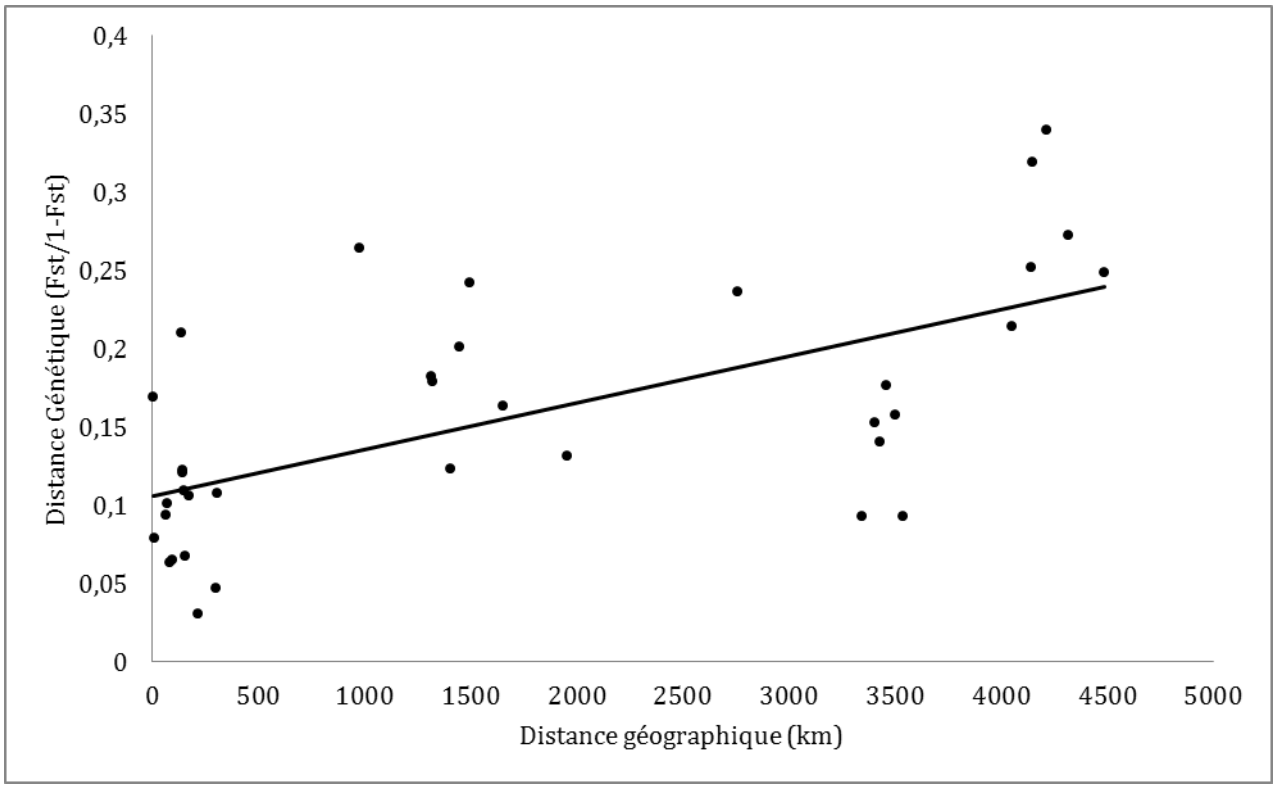


Figure 3. Isolement par la distance. Les nuages de points représentent les distances génétiques entre site (F_{ST}/(1-F_{ST})) en fonction des distances géographiques en km. Ce test montre une corrélation positive entre les distances géographiques et génétiques (test de matrice de Mantel : Z= 25403,2; r = 0.634; avec *P* = 0,016)

Test d'assignation

Le test d'assignation a été fait que sur un échantillonnage restreint ne portant que sur 6 sites. Les échantillons prélevés dans les différents estuaires en Bretagne, ont été analysés séparément avec le logiciel STRUCTURE afin d'assigner les souches isolées dans chaque site à leur population d'origine. Le critère ΔK, sépare les différentes souches isolées à partir des 6 sites bretons en deux clusters (K=2, Fig. S1). Le premier cluster est composé essentiellement par les souches échantillonnées dans la Baie de Morlaix : Penzé et Morlaix qui y sont assignés respectivement à 83.8% et 76.7%. L'échantillon de souches isolées à Paluden est clairement assigné au second cluster (assignation à 90.2%) ainsi que les souches de Tinduff (assignation à 78.3%). Quant aux échantillons isolés en Rance et dans l'estuaire de Daoulas, ils ne sont assignés au second groupe qu'à environ 50% (voir Figure 4 et Tableau 5).

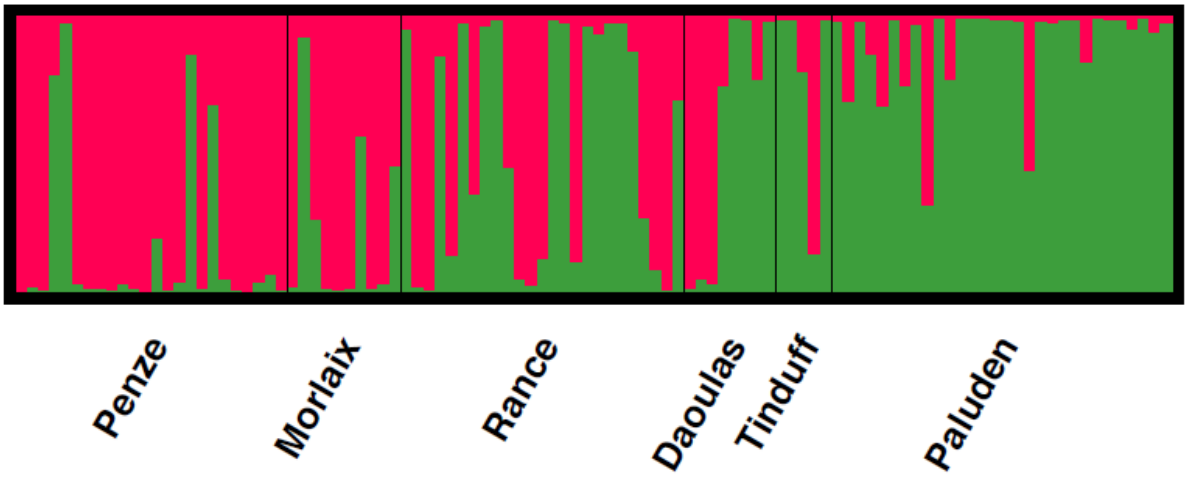


Figure 4. Structure des populations estimée par une méthode bayésienne et réalisée par le logiciel STRUCTURE. Représentation de l'assignation des souches des différents estuaires bretons aux 2 clusters génétiques k = 2 (Rouge et vert). Les sites échantillonnés sont délimités par des barres verticales noires.

Tableau 5. Assignation des échantillons de souches isolées dans les différents estuaires bretons aux groupes définis par le logiciel STRUCTURE. Coefficients d'appartenance des échantillons aux différents clusters génétiques.

		Penzé	Morlaix	Rance	Daoulas	Tinduff	Paluden (Aber Wrac'h)
Cluster (Rouge)	1	0,8378	0,7675	0,4482	0,4273	0,2172	0,0985
Cluster (vert)	2	0,1622	0,2325	0,5519	0,5727	0,7828	0,9016

Différenciation entre les estuaires bretons

L'ACP réalisée sur l'ensemble du jeu de donnés spatio-temporel dans les estuaires bretons montre que seul le premier axe est significatif et représente 22% de la variation avec un F_{ST} de 0.017. Cet axe sépare les estuaires de Daoulas et Paluden de la Baie de Morlaix (Morlaix Penzé) (Figure 5). Les échantillons temporels se regroupent en fonction de leur origine géographique, le tableau des F_{ST} montre que pour les sites de la Baie de Morlaix et de la Rance, la moyenne des F_{ST} temporels (intra site 0.049±0.018) est inférieure à celle des F_{ST} spatiaux (inter sites 0.060±0.020) (ANOVA, F=5.45, P=0.023). Enfin, les F_{ST} entre Daoulas et PA1 et PA2 ne sont pas significativement différents (Tableau 6).



Figure 5. Analyse en composante principale (ACP) basée sur les fréquences alléliques des échantillons spatio-temporelle bretons. Seul le premier axe est significatif et représente 22% de la variation avec un F_{ST} de 0.017. Les lettres A, B, C et D correspondent respectivement à un découpage arbitraire des périodes d'efflorescence en début, milieu 1, milieu 2 et fin de l'efflorescence.

Tableau 6. Caractéristiques spatiales et temporelle (dates de prélèvement) des 13 échantillons de la figure 5.

Sites/années	Dates de prélèvement	Codes	Nombre de souches analysées
Penzé/2010	30 juin	PZ10D	09
	01 juillet	PZ10D	08
Penzé/2011	01 juin	PZ11A	19
	15 juin	PZ11B	14
	17 juin	PZ11B	15
	22 juin	PZ11C	24
	11 juillet	PZ11D	18
Morlaix/2010	28 juillet	ML	10
Rance /2011	09 mai	RC11A	15
	23 mai	RC11B	25
	27 mai	RC11C	25
	03 juin	RC11D	10
	05 juin	RC11D	19
Daoulas/2012	10 juillet	DA	5
	13 juillet	DA	8
Paluden/2012	24 août	PA1	14
	31 août	PA2	16

Origines des efflorescences de la rade de Brest et de l'Aber Wrach

L'arbre de Neighbour joining a été réalisé sur l'ensemble des échantillons spatiaux et temporels. La topologie de l'arbre révèle l'existence de deux groupes (bootstrap 70%). Un groupe correspondant aux échantillons prélevés en Rance et en Penzé (RC, PZ et ML) et un autre groupe constitué des échantillons de Méditerranée, d'Espagne, de Daoulas et de l'Aber Vrach (IT, VI, AR, DA, PA). Les nœuds regroupant les échantillons d'Italie (IT), de Vigo (VI) et d'Arenys (AR) sont fortement soutenus (88.4 et 86.3%). Enfin, l'arbre montre un groupement entre la Rance et la Penzé au début de bloom 2010 (bootsrap 81.5%).

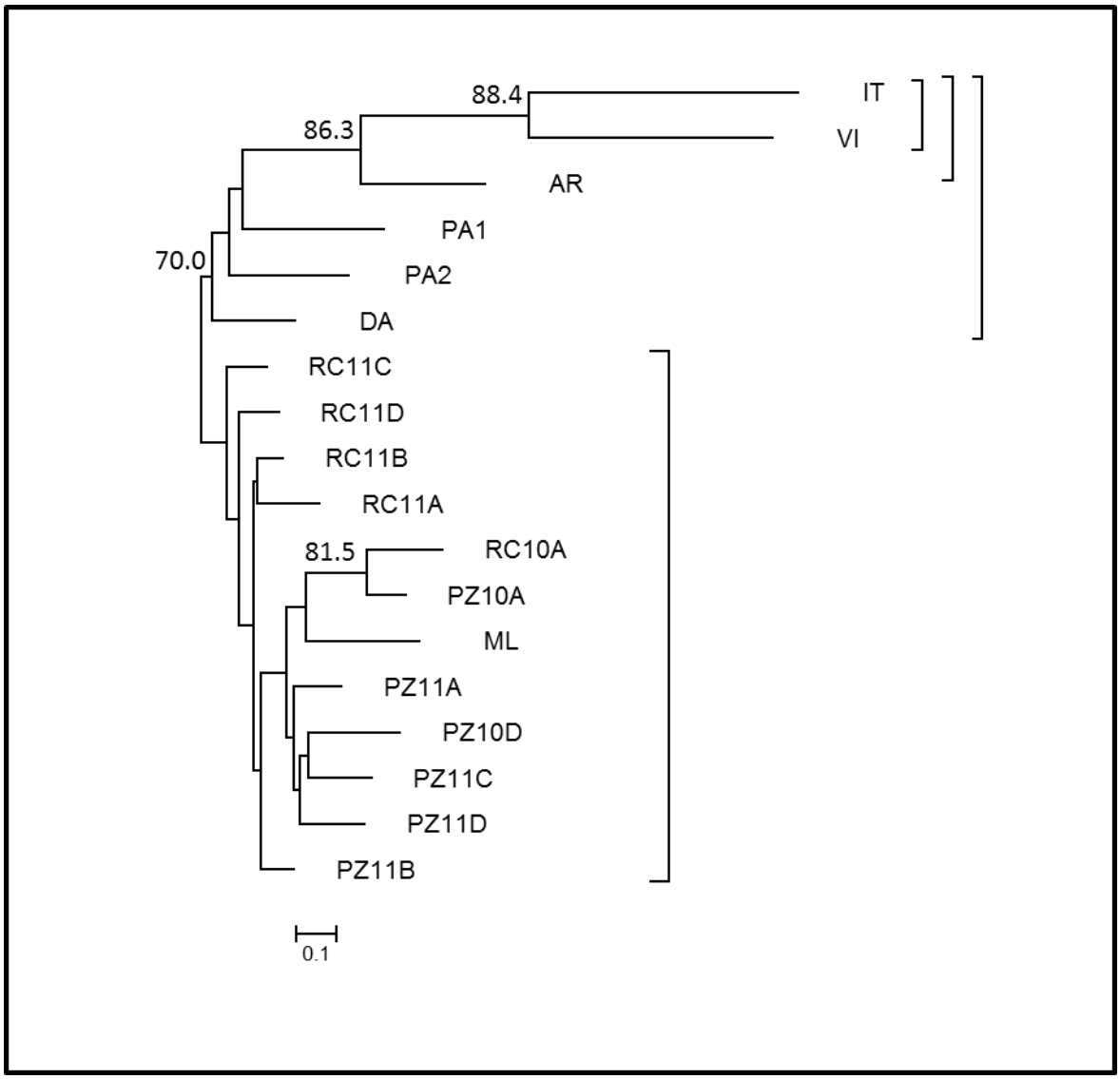


Figure 6. Arbre de distances NJ pour toutes les souches *A. minutum*. Les abréviations sont détaillées de la façon suivante : IT : Italie, VI : Vigo, AR : Arenys, PA : Paluden, DA : Daoulas, RC : Rance et PZ : Penzé. Pour les souches de Penzé (PZ) et de Rance (RC), les chiffres correspondent aux années (2010 et 2011) et les lettres A, B, C et D correspondent respectivement à un découpage arbitraire des périodes d'efflorescence en début, milieu 1, milieu 2 et fin de l'efflorescence. Les valeurs au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap en % (seules les valeurs supérieures ou égales à 70% sont figurées ici.

Tableau 7. Résultats du test de differenciation génétique (F_{ST}) par pair entre les differents echantillons de l'ACP (figure 5), échantillons spatio-temporels de la Bretagne. Les valeursde F_{ST} significatifs) sont en gras avec (*P< 0,05 et **P<0,01)

	PZ10A	PZ10D	PZ11A	PZ11B	PZ11C	PZ11D	ML	RC10A	RC11A	RC11B	RC11C	RC11D	DA	PA1	PA2
PZ10A															
PZ10D	0,053*														
PZ11A	0,027	0,043													
PZ11B	0,053**	0,057**	0,030												
PZ11C	0,070**	0,047	0,039	0,036											
PZ11D	0,045	0,040	0,014	0,045*	0,039										
ML	0,080*	0,085*	0,047	0,071*	0,071*	0,055									
RC10A	0,030	0,066**	0,062**	0,061**	0,083**	0,090**	0,071*								
RC11A	0,070**	0,070*	0,082**	0,033	0,069**	0,070*	0,090*	0,068**							
RC11B	0,060**	0,053*	0,033	0,026	0,055**	0,032	0,065*	0,054**	0,023						
RC11C	0,050**	0,055**	0,044*	0,030	0,069**	0,057**	0,094**	0,062**	0,062**	0,021					
RC11D	0,044*	0,078**	0,044*	0,029	0,076**	0,072**	0,105**	0,080**	0,035	0,030	0,044*				
DA	0,061*	0,069*	0,067*	0,054*	0,087**	0,081**	0,100*	0,066**	0,039	0,052*	0,034	0,051*			
PA1	0,064**	0,078**	0,083**	0,066**	0,118**	0,104**	0,111**	0,077**	0,091**	0,080**	0,056*	0,079**	0,048		
PA2	0,069**	0,075**	0,084**	0,064**	0,100**	0,105**	0,119**	0,077**	0,080**	0,073**	0,041	0,054*	0,042	0,043	0

Discussion

Différenciation génétique

Dans cette étude, l'utilisation des marqueurs microsatellites nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un isolement par la distance chez *A. minutum*. En effet, les populations les plus éloignées présentent les plus fortes différenciations génétiques, tandis que les populations géographiquement proches sont les moins génétiquement différenciées. De façon tout à fait intéressante, ces résultats suggèrent que la dispersion chez cet organisme est relativement limitée. Nos résultats sont en accord avec les observations réalisées sur *A. minutum* en Méditerranée (Casabianca *et al.*, 2011) qui montraient l'existence d'une structure par région (Adriatique, Ionienne, Tyrrhénien, Catalane). Ces différentes observations vont donc à l'encontre du paradigme de Bass Becking (1934) qui stipulait que les organismes marins étaient répartis de façon homogène dans les océans en raison de leur forte aptitude à la dispersion.

Notre étude confirme également les résultats obtenus chez d'autres espèces d'*Alexandrium* qui suggèrent que les flux de gènes sont limités entre populations. Nagai et ses collaborateurs (Nagai *et al.*, 2007) ont montré chez *Alexandrium tamarense* en étudiant des populations réparties le long des côtes japonaises et coréennes (séparées par quelques dizaines à quelques milliers de km) qu'il existait une corrélation positive et significative entre les distances génétiques et géographiques. Ces auteurs en concluent que cette corrélation qui traduit un isolement génétique entres populations serait due à la dispersion naturelle de cette espèce par les courants. En utilisant des marqueurs microsatellites, sur une échelle plus fine, (Rynearson, Virginia Armbrust, 2004) ont pu montrer l'existence de trois populations distinctes chez la diatomée *Ditylum brightwellii* dans deux estuaires connectés (WA, USA). Toutes ces études suggèrent que la dispersion efficace chez ces espèces phytoplanctoniques serait relativement limitée et se ferait via les courants.

Cependant, chez *A. minutum*, la dispersion peut se faire d'une part par les cellules végétatives au cours des blooms et d'autre part via les kystes sexués. En effet, ces derniers présentent une résistance accrue aux différentes conditions environnementales et pourraient être dispersés sur des grandes distances directement par les courants et les animaux. Dans notre étude, la forte structuration génétique observée sur les côtes bretonnes pourrait s'expliquer par une fenêtre de dispersion étroite des cellules végétatives. Dans cette région où les efflorescences sont limitées dans le temps (3 à 4 semaines par an), la probabilité de dispersion serait maximale quand la densité de cellules serait à son maximum mais également lorsque les coefficients des marées et le lessivage par les pluies seraient les plus importants (taux de dilution).

Cependant, pour essayer d'expliquer ces résultats, il est indispensable de prendre en compte l'ensemble de l'histoire de vie de l'espèce. *A. minutum* se caractérise d'une part par une croissance (clonale) rapide des populations (lors des efflorescences) et d'autre part par la formation de kystes (sexués) de

résistance. Ces kystes peuvent s'accumuler dans les sédiments pour constituer une banque de propagules qui par beaucoup d'aspect, est équivalent à une banque de graines chez les plantes. Dans ces conditions, on peut supposer que la structure des populations que l'on voit aujourd'hui sur les côtes bretonnes est le résultat d'effet de fondations correspondant à des introductions relativement récentes. Comme le propose (De Meester *et al.*, 2002) dans leur hypothèse sur les invertébrés marins, la colonisation d'un nouvel habitat pourrait se faire rapidement par un nombre limité de propagules. La population pourrait alors se multiplier rapidement de façon clonale (ou parthénogénétiquement) et donner via la reproduction sexuée une grande banque de kystes. Cette banque aurait un effet tampon et les nouvelles propagules venant de l'extérieur auraient un effet limité sur la composition génétique de ces populations. Par conséquent l'effet de fondation pourrait se détecter pendant assez longtemps et diminuerait que très progressivement. Enfin, (De Meester *et al.*, 2002) suggèrent que cette structuration génétique chez les organismes marins pourrait être renforcée d'une part par des effets de sélection locale qui peuvent se mettre rapidement en place dans ces populations et d'autre part par des effets d'« outcrossing » dus à une trop forte différenciation génétique (incompatibilité gamétique) entre souches avec les nouvelles souches provenant de l'extérieur.

Contrairement à la phylogénie dont le but est de retracer l'histoire évolutive des lignées et des espèces au cours du temps, la génétique des populations s'intéresse plus particulièrement à l'histoire contemporaine des populations. Dans le cas d'*Alexandrium* dans le Nord-Ouest de la France, la génétique des populations devrait donc nous permettre de retracer l'histoire récente des efflorescences. On peut s'appuyer pour cela sur les observations du réseau de surveillance du REPHY et des études ponctuelles concernant la quantification des kystes dans les sédiments. Les premiers enregistrements d'efflorescence *A. minutum* sur les côtes Bretonnes ont été faits en Baie de Morlaix en juin 1988. En 1990, l'étude des kystes dans les sédiments dans les différents estuaires bretons ne révélait la présence de kystes qu'en baie de Morlaix et en baie de Lannion (Morin *et al.* 2000). Ces observations confirment donc l'installation pérenne des populations d'*A. minutum* dans cette région dès les années 1990. On peut penser que les efflorescences qui se sont formées localement après cette date étaient issues de la germination des kystes locaux. Quelques années plus tard la progression est importante puisque une seconde cartographie sédimentaire réalisée en 1996 (Erard-Le Denn 1997) montre la présence de kystes dans 5 autres localités, dont 4 sont situées dans un rayon de 60 km autour de la Baie de Morlaix (à l'ouest : l'Aber Wrac'h, l'Aber Benoit, et à l'Est : le Trieux, et le Jaudy) et un site localisé à plus de 150 km à l'Est (la Rance). L'expansion de l'aire de répartition de cette espèce en Bretagne semble donc pouvoir être en partie expliquée par des transports passifs via les courants (déplacement d'environ 10 km par an) mais également via l'activité conchylicole très importante dans la région (introduction en Rance). Cependant, nos résultats semblent démontrer que les efflorescences actuelles de cette algue toxiques le long des côtes Bretonnes ne sont pas imputables qu'à un seul événement de fondation, originaire de la Baie de Morlaix. En particulier, les récents événements qui se sont déclarés au mois d'Août 2012 à Daoulas et dans

l'Aber Wrac'h (Paluden) sont génétiquement différents des populations observées en juin de la même année en Baie de Morlaix (Figure 6). Il pourrait donc s'agir de nouvelles introductions. Les résultats de notre étude indiquent que les souches de Daoulas et de l'Aber Wrac'h sont plus apparentées aux souches méditerranéennes et du sud de l'Europe qu'à celles de la Rance et de la Penzé. L'augmentation du trafic maritime associé au délestage des eaux de ballast ainsi que le développement de l'aquaculture de coquillages ont été considérés comme les principaux vecteurs d'introduction chez les organismes marins et plus particulièrement chez des microalgues toxiques (Smayda, 2007). Chez *A. tamarense, (Scholin et al., 1995)* Scholin et al (1995) suggèrent que les similarités génétiques (ARN ribosomal) observées entre les souches nord-américaines et japonaises ainsi qu'entre les souches d'*A. catenella* d'Australie et du Japon seraient dues aux activités humaines. De même, les ressemblances génétiques observées (AFLP) entre les populations d'*A. tamarense* d'Ecosse et des côtes japonaises du Pacific, suggèrent que cette microalgue a été introduite en Europe (Alpermann 2009). Par ailleurs, dans notre étude, l'admixture observée en Rance pourrait s'expliquer par des échanges fréquents (aquaculture, tourisme) entre les différents estuaires ou via des événements climatiques exceptionnels comme les fortes précipitations en 2010. Ces derniers auraient pu provoquer un relargage de cellules d'*A. minutum* en mer (Dia *et al.* in prep).

Notre analyse de la structure des populations d'*Alexandrium minutum* sur les côtes bretonnes montre que les souches prélevées en Penzé, Morlaix, Rance, Daoulas et Paluden se répartissent en deux groupes génétiques distincts (figure 4). Le premier groupe (en rouge) correspond essentiellement aux clones isolées en Baie de Morlaix (Penzé – Morlaix) tandis que le second groupe correspond principalement aux clones isolés dans l'Aber Wrac'h (Paluden). Les pourcentages d'assignations des souches isolées dans la Rance et dans la rade de Brest sont de l'ordre de 50%. Les résultats obtenus en Baie de Morlaix quel que soit l'année ou la saison de prélèvement soulignent que les sites de la Penzé et de Morlaix distant d'une dizaine de kilomètres sont connectés par des flux de gènes importants. Par ailleurs, bien que la baie de Morlaix soit un système côtier original fortement influencé par un régime mégatidal de marée, la migration efficace d'*A. minutum* vers les autres estuaires semble être relativement restreinte. En effet, les souches conservent des caractéristiques génétiques bien marquées sur ces deux sites quelle que soit la date d'isolement.

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que la différentiation génétique augmente avec la distance géographique (IBD significatif), ce qui suggère que la dispersion par les courants est relativement limitée chez *A. minutum*. Cependant les activités anthropiques telles que les échanges commerciaux des produits de la mer peuvent être à l'origine d'introductions multiples.

References bibliographiques

Alpermann TJ (2009) Evolutionary ecology of Alexandrium (Dinophyceae) with special emphasis on genotypic and phenotypic variation in the toxigenic species A. tamarense. vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie & Chemie) der Universität Bremen 191-pp.

Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11, 155-165.

Casabianca S, Penna A, Pecchioli E*, et al.* (2011) Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate Alexandrium minutum in the Mediterranean Sea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 129-138.

Casteleyn G, Leliaert F, Backeljau T*, et al.* (2010) Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 12952-12957.

De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K (2002) The Monopolization Hypothesis and the dispersal–gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta oecologica* 23, 121-135.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.

Figueroa RI, Vázquez JA, Massanet A, Murado MA, Bravo I (2011) Interactive effects of salinity and temperature on planozygote and cyst formation of Alexandrium minutum (dinophyceae) in culture1. *Journal of Phycology* 47, 13-24.

Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.

Goudet J (1999) [CITATION][C]. *… at http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm*.

Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase*. *Phycologia* 32, 79-99.

Hansen, Daugbjerg, Franco (2003) Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of Alexandrium minutum (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2, 19-19.

Hedgecock D, Barber PH, Edmands S (2007) Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography-Washington Dc-Oceanography Society-* 20, 70.

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.

Koenig WD, Van Vuren D, Hooge PN (1996) Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 514-517.

Lebret K, Kritzberg ES, Figueroa R, Rengefors K (2012) Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. *Environmental Microbiology* 14, 2395-2404.

Leis JM (2002) Pacific coral-reef fishes: the implications of behaviour and ecology of larvae for biodiversity and conservation, and a reassessment of the open population paradigm. *Environmental Biology of Fishes* 65, 199-208.

Levin LA, Huggett D, Myers P, Bridges T, Weaver J (1993) Rare-earth tagging methods for the study of larval dispersal by marine invertebrates. *Limnology and Oceanography* 38, 346-360.

Lilly EL, Halanych KM, Anderson Dm (2005) Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the Alexandrium minutum group. *Harmful Algae* 4, 1004-1020.

Lowe WH, Allendorf FW What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology* 19, 3038-3051.

Masseret E, Grzebyk D, Nagai S*, et al.* (2009) Unexpected Genetic Diversity among and within Populations of the Toxic Dinoflagellate Alexandrium catenella as Revealed by Nuclear Microsatellite Markers. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2037-2045.

McCauley LAR, Erdner DL, Nagai S, Richlen ML, Anderson DM (2009) Biogeographic analysis of the globally distributed harmful algal bloom species Alexandrium minutum (dinophyceae) based on rRNA gene sequences and microsatellite markers. *Journal of Phycology* 45, 454-463.

McManus M, Woodson C Plankton distribution and ocean dispersal. *The Journal of experimental biology* 215, 1008.

McQuoid MR, Godhe A, Nordberg K (2002) Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. *European Journal of Phycology* 37, 191-201.

Medlin LK, Lange M, Nothig E (2000) Genetic diversity in the marine phytoplankton: a review and a consideration of Antarctic phytoplankton. *Antarctic Science* 12, 325-333.

Medlin LK, and Cembella AD (2013) Biodiversity of Harmful Marine Algae. In: Levin S.A. (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*, second edition, Volume 1, pp. 470-484. Waltham, MA: Academic Press.

Mizushima K, Matsuoka K (2004) Vertical distribution and germination ability of Alexandrium spp. cysts (Dinophyceae) in the sediments collected from Kure Bay of the Seto Inland Sea, Japan. *Phycological Research* 52, 408-413.

Nagai S, Lian C, Yamaguchi S*, et al.* (2007) MIcrosatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense (Dinophyceae) In Japanese Coastal Waters. *Journal of Phycology* 43, 43-54.

Nagai S, Mccauley L, Yasuda N*, et al.* (2006) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes* 6, 756-758.

Nehring S (1998) Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. *Archive of Fishery and Marine Research*.

Palumbi SR (2001) The ecology of marine protected areas. *Marine community ecology* 9, 509-530.

Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13, S146-S158.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*.

Ribeiro S, Berge T, Lundholm N*, et al.* (2011) Phytoplankton growth after a century of dormancy illuminates past resilience to catastrophic darkness. *Nature Communications* 2, 311.

Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*.

Rynearson TA, Virginia Armbrust E (2004) Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom ditylum brightwellii (bacillariophyceae) 1. *Journal of Phycology* 40, 34-43.

Scholin C, Hallegraeff G, Anderson D (1995) Molecular evolution of the Alexandrium tamarense'species complex'(Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions. *Phycologia* 34, 472-485.

Scholin CA, Anderson DM (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed Alexandrium (DINOPHYCEAE). I. RFLP ANALYSIS OF SSU rRNA GENES1. *Journal of Phycology* 30, 744-754.

Smayda TJ (2007) Reflections on the ballast water dispersal—harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae* 6, 601-622.

Sommer U (1996) Plankton ecology: The past two decades of progress. *Naturwissenschaften* 83, 293-301.

CHAPITRE 4

Growth rate variability and population genetic structure in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*

Growth rate variability and population genetic structure in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*

Aliou Dia[1-2], Laure Guillou[1-2], Frédéric Lepelletier[1-2], Catharina Alves-de-Souza, Claire Labry, Marc Sourisseau, Estelle Bigeard[1-2], Dominique Marie[1-2] and Christophe Destombe[1-2].

[1] UPMC Paris VI, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.
[2] CNRS, UMR 7144, Adaptation et diversité en milieu marin, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France

Corresponding author:

Address: Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff, France.

Email: destombe@sb-roscoff.fr

Running title:

Word count:

Table counts:

Figure counts:

Supporting information

Abstract

The dinoflagellate *Alexandrium minutum* is one of the main species involved in harmful algal bloom (HAB) of the coast of France. It is assumed that biotic factors such as the parasites, grazers but also abiotic factors such as temperature, salinity and nutrient are major determinants that influence the population growth of microalgal species. Facing to these different factors, microalga must evolve to assure their maintenance (or persistence) during bloom events. We monitored in 2010 and 2011 the dynamics of blooms in two different estuaries (Penzé and Rance) and successfully isolated strains of *A. minutum* from the beginning, the middle and the end of the bloom periods. The aim of our study was to determine the fitness diversity measuring the asexual growth rates of more than 158 strains. Our results reveal a high phenotypic diversity between full-analyzed strains and a significant difference between estuaries in 2010 and 2011, and during bloom events within each estuary. The Discriminant Analysis of the Principal Components (DAPC) reveals that our samples form three clusters, with different growth patterns during bloom period (significant differentiation during bloom event). These high phenotypic and genetic diversities may explain strategy developed by *A. minutum* reproducing asexually to respond fluctuations of abiotic and biotic factors (frequent environmental changes).

Introduction

Dinoflagellates are unicellular photosynthetic algae that are able to undergo rapid increases in cell abundance reaching, in 1 to 3 weeks, concentrations of about 10^4–10^6 cell L^{-1} in suitable environmental conditions for growth (Masó and Garcés, 2006). Some of these species form harmful algal blooms (HABs) that cause severe ecological and economic damages by killing coastal fauna and reducing dramatically aquaculture and tourism activities. The increase frequency of harmful algal bloom phenomenon is one of the major problems in coastal regions at a world scales. Among the genera responsible for paralytic shellfish poisoning syndrom, the genus *Alexandrium* is certainly one of the most important in terms of severity, diversity, and distribution of bloom impacts (Anderson *et al.*, 2012). With the global climate change and human activities, a lot of species were suspected to become invasive in several pristine areas (Vila *et al.*, 2005). Along the French coast, *Alexandrium minutum* was expending after 80' along the Atlantic French coast and the English Channel, making recurrent blooms since this period.

Ecology of *Alexandrium* species has been intensely studied during bloom events and using cultures (Bravo *et al.* 2008, Anderson *et al.* 2012). In particular, blooms of *A. minutum* occur all over the world associated with nutrient-enriched, semi-enclosed and stratified coastal sites with freshwater inputs (Giacobbe *et al.*, 1996, Vila *et al.*, 2005, Bravo *et al.*, 2008). *Alexandrium* life-cycle transitions, that include sexual and clonal reproductions, play an important role in the dynamic and recurrence of blooms. The sexual reproduction results in the formation of resting cysts that, which will be burried sediment for years. Germination of cysts, that is induced by external environmental stimuli such as irradiance and water temperature (Cannon 1993), may occur continuously during the year in some geographical areas (Anglès *et al.* 2012). Contribution of cyst germination, estimated to hundreds of cells per liter (Anderson *et al.*, 1983; Crespo *et al.*, 2011), is relatively modest compared to cell densities during blooms. Indeed, bloom formations much more depend on the growth rate of populations rather than the inoculum size (Estrada *et al.* 2010, Anderson 2012).

Important environmental parameters for the growth of these species are temperature, irradiance, nutrient concentrations and salinity (Lim *et al.*, 2006, Cannon, 1996, Grzebyk *et al.* 2003, Figueroa *et al.*, 2011). Because such studies are classically conducted on a limited number of strains from different locations (but see Brand 1981), intraspecific diversity remains generally ignored or underestimated. The few studies regarding the intraspecific variation in *Alexandrium* species are focused either on genotypic or phenotypic aspects, but rarely on both (e.g., Touzet *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008; Alpermann 2009, Aguilera-Belmont., 2013). As example, Brand (1981) recorded, using more than 70 strains of *A. tamarense*, incubated under identical conditions, a high range of growth rates from 0.19 to 0.66. Aguilera-Belmonte *et al.* (2013) pointed out a

remarkable physiological variability (growth parameters and toxicity) among Chilean strains of *A. catenella* sampled at different geographical areas during a same toxic outbreak. Recently, Flores-Moya *et al.* (2012) in their experimental study on growth rate of two *A. minutum* strains under selective conditions suggested that natural selection drove the strains to different final adaptive peaks. The strong contribution of historical contingency suggests that disruptive selection could operate in *A. minutum* (Flores-Moya *et al.* 2012). Recent population genetic studies of *Alexandrium* species have demonstrated a high intraspecific genetic diversity (Masseret *et al.* 2009, Alpermann 2009, Casabianca *et al.* 2011) challenging the usually accepted concept of clonal perception of blooms.

The most general cause of the maintenance of genetic variance may be induced by the complexity of natural environments (Bell 1997). Indeed, theoretical works predict that genetic diversity may be maintained in heterogeneous environments, if selection favors different types of individual at different sites and/or time (Maynard Smith and Hoekstra 1980). Bell 1997 demonstrated in *Chlamydomonas* the importance of time-scale in evaluating the effect of environmental heterogeneity and suggested that the genetic variance of fitness was much more severely reduced in an uniform rather than in an heterogeneous environment. In the diatom *Ditylum brightwellii,* changes of genetic diversity in natural populations were considered as the result of local abiotic or biotic selections (Rynearson and Armbrust 2005; Rynearson *et al.* 2006). Thus, in *D. brightwellii*, the succession of genetically distinct populations in different environmental conditions appears to reflect a tight coupling between environment and genetic (Rynearson *et al.* 2006). In *A. tamarense*, it has been shown that vegetative cells emerged from the germination of cysts from different year classes, thus generating a high genetic diversity within a single bloom (Alpermann 2009). In parallel, two genetic subpopulations observed in *A. fundyense* during early- and late-bloom samples were considered as the result of selection (Erdner *et al.* 2011).

Recently, population genetic study in different bloom populations of *A. minutum* demonstrated that temporal genetic change (within bloom event) can be greater than spatial change (between blooms) (Dia et al; submitted). As these blooms of *A. minutum* were associated to semi-confined areas (estuaries), this rapid genetic change may reflect selective effects that are nevertheless not strong enough to reduce allelic diversity (Dia *et al.* submitted). These authors suggest that multiple processes including biotic (such as predation and/or parasitism) and abiotic factors (such as temperature and light) may explain not only the maintenance of genetic diversity, but also the genetic changes observed during a bloom event. Within a single bloom, environmental selection for differential growth rate and excystment and encystment can act to reinforce genetic population structure, favoring the strains with higher fitness.

Our primary objective was to estimate the intraspecific growth rate variation in *A. minutum* populations strains collected at different periods of blooms and from two different estuaries (Penzé and Rance, France) separated approximately by 150 km. Because strains are haploid, the average growth rate of many genetically identical individuals can be measured to determine if there is a significant difference among genotypes. Microsatellite markers were used to characterize strains and to detect genetic substructuring within and between blooms. Growth rates of monoclonal strains were then measured and compared according to (i) their geographical origin (between estuaries) (ii) their temporal origin (when possible beginning, middle and end of blooms) and (iii) their genetic assignment (bloom genetic substructuring). Based on the mean growth rates, we then calculated the theoretical increase of populations from date to date and compared the results to the observed densities. This strategy highlighted alternation of periods presenting net loss and gain of cells not explained by the intrinsic growth of populations.

Materials and methods

Sampling site and strain collection

The dynamics of blooms in the Penzé estuary (48°37'37.57"N, 3°57'13.17"W) and the Rance estuary (48°31'49.61"N, 1°58'21.81"W) were monitored during two consecutive years (2010 and 2011). Both estuaries are separated by approximately 150 km (Fig. 1). Cell concentrations were deduced from lugol-fixed cells counts by inverted microscopy after sedimentation in Utermöhl chambers (10 to 50 mL, depending on concentrations). For the Rance, counts in 2010 were estimated by the REPHY structure (Réseau de Surveillance du Phytoplankton et des Phycotoxines) using samples collected from a single site (Port Saint Hubert, REPHY procedure). In 2011, samples were collected every day during bloom (at 6 sites) using a flat boat. In the Penzé (both years), maximal densities per day were deduced from counts obtained from samples collected at 27 and 29 of salinity (for more details on the sample strategy see chapter 2). Cultures were performed in the Biological Station of Roscoff for Penzé 2010, 2011, for Rance 2010 and in the IFREMER laboratory located in Dinard for Rance 2011. The strains were grown in batch 50 mL flasks containing 30 mL of F/2 medium. In total, 158 strains isolated during beginning, middle and end of the bloom events have been used in this study (Supplementary Table 1).

DNA extraction, strain identification and genotyping

DNA was extracted using either the CTAB method (Lebret *et al.*, 2012) or the Nucleospin 96 Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions, using 5-10 mg of dried tissue resuspended in 100 µL elution buffer.

Strains were screened using the intergenic region of ribosomal DNA (ITS1, 5.8S and ITS2). PCR mixes (14 µL in total) included 20 ng of DNA, 1X GoTaq Flexi green buffer (Promega, Madison, WI, USA), 150 µM of

each dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 20 pmol of the forward primer 329F (5'-GTG AAC CTG CRG AAG GAT CA-3', complementary reverse of the eukaryote reverse primer 329-R (Moon-van der Staay *et al.* 2001), 20 pmol of the reverse primer DIR-R (5'- TAT GCT TAA AAT TCA GCA GGT-3' (Scholin and Anderson, 1994), and 1.25 U GoTaq® Polymerase (Promega). Amplification was carried out in a DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following cycling conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 PCR cycles (denaturation at 95°C for 45 s, annealing at 53°C for 45 s, and extension at 72°C for 45 s), followed by a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were purified using the BigDye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for subsequent bidirectional sequencing using a capillary sequencer type ABI 3130XL (Applied Biosystems).

The 167 strains were genotyped using the 7 microsatellite markers developed by (NAGAI *et al.*, 2006). Amplification of microsatellite loci was carried out in a 10 µL final volume with the following components: 20 ng DNA, 1x GoTaq® Flexi buffer (Promega), 2 mM $MgCl_2$, 150 µM each dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.8 $\mu g.\mu L^{-1}$ bovine serum albumin, 30 pmol fluorescent-labeled forward primer (FAM, VIC, NED or PET), 30 pmol reverse primer, and 0.35 U GoTaq® Polymerase (Promega). PCR amplifications were carried out in a Bio-Rad DNA Engine Peltier Thermal Cycler using the following cycling conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 10 PCR cycles (denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s) followed by 28 cycles (denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s), followed by a final extension at 72°C for 10 min. Then, 2 µL of PCR products, diluted 1:10, was added to 10 µL of loading buffer containing 0.5 µL of SM594 size standard (Mauger *et al.* 2012) and 9.5 µL of Hi-Di formamide (Applied Biosystems). The loading mix was denatured at 95°C for 3 min and run in an ABI 3130 XL capillary sequencer (Applied Biosystems) equipped with 50 cm capillaries. Genotypes were scored manually using GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems).

Inference of population structure

Genetic dataset were analyzed using the non-model-based multivariate approach DAPC (Discriminant Analysis of the Principal Components) implemented in the ADEGENET package (Jombart, 2008; Jombart *et al.*, 2010). The optimal number of clusters was estimated using the k-means clustering algorithm. The Bayesian Information Criterion (BIC) was calculated for k=1-11 (Fig.S1, supporting information), where k= number of populations. The number of cluster was identified as the one for which BIC showed the lowest value and after which BIC increase or decrease by the least amount. We used DAPC to assign individuals into clusters, retaining the number of principal components covering 80% of the cumulative variance.

Growth rate

Experimental approach

All cultures were acclimated in the same conditions (19°C with 70 µE.m^2.s^{-1} of white light in a 12:12 light: dark cycle). Firstly, cells were pre-adapted by successive sub-culturings through exponential growth phase F/2 medium (see Dia *et al.* submitted) and under the same irradiance. For the growth rate measurement, the cultures were initiated with 100 cells mL^{-1}. In vivo chlorophyll fluorescence of growing cultures was daily determined using Saffire^2 (Tecan, Switzerland). Growth rates of cultures were estimated from changes in *in vivo* fluorescence, measured at the same time each day (2h before the start of the dark period) (Brand *et al.* 1981). The growth rate (divisions day^{-1}) was estimated during the exponential growth phase as in Guillard (1973). The calculation of individual growth rate 'r' was assessed by using the following equation:

$$r = \frac{\ln\left(\frac{Nt}{N0}\right)}{\Delta t} = \frac{\ln Nt - \ln N0}{\Delta t}$$

Where N_0 is the fluorescence reading at the beginning of a time interval (at t_0) and N_t the fluorescence reading at the end of the period (t), generally each day. Each measure was corrected for fluorescence of blank tubes at the same time. Each strain had a minimum of two replicates.

In situ growth rates were estimated using this formula:
Net growth rate=in situ growth rate - dilution rate - mortality

In situ growth rate: included an estimation of the influence of the temperature on growth rates. We used the slope of these curves to estimate the *in situ* growth rate compared to water temperatures.

Dilution rate: Due to advection and diffusion processes, planktonic populations are exported outside the estuary and this export is strongly modulated by the cumulative effects of the tidal intensity and the river flow. This parameter, called here the dilution rate (d^{-1}), was estimated using the "e-flushing" time method (Monsen *et al.*, 2002). This index was calculated with a 3D model of the Penzé estuary forced by different ranges of river flows and tidal intensities. The passive tracer was introduced in the waters with a salinity of 27±1 and the e-flushing time (d) is the time required to lose 63% the initial concentration. The dilution rate was next estimated on a daily base according to the observed tide and river flow over 2010 and 2011.

Statistical analyses

The individual growth rates were compared using a one way ANOVA and a Student t-test in each estuary (Quinn and Keough 2002). Differences for growth rate between estuaries in 2010 and 2011, between

years within each estuary and between “period of bloom” (beginning, middle and end of bloom” within estuary were tested using a one way ANOVA. and with each estuary in 2011. General lineal models (GLMs) were used to test differences between “period of bloom” and “genetic clusters” (genetic substructuring) in 2011 separately in Penzé and Rance. All these sources of variation were treated as fixed factors except “genetic cluster” as random factor. The “strain” was used as experimental unit in these analyses and considered as a random factor.

Transformations preceded the analyses (y = log 1/(r+1) were used to meet assumptions of normality and homogeneity of variance. We used MINITAB version 13.2 (state college, PA, USA).

Results

Bloom dynamic

A. minutum blooms occurred almost concomitantly in both ecosystems during early summer (Fig. 2). In 2010, blooms extend from May 17 to July 12 in Rance (maximal density at 4.2 x 10^4 cells L^{-1} the June 22) and from June 02 to July 07 in Penzé (maximal density at 3.7 x 10^5 cells L^{-1} the June 8). Differences in maximal densities (one magnitude higher in 2011 compared to 2010) can be explained by differences in the sampling strategy employed (see material and methods). In 2011, blooms extend from May 11 to June 20 in Rance (maximal density at 4.3 x 10^5 cells L^{-1} the May 27) and from June first to July 8 in Penzé (maximal density at 2.6 x 10^5 cell L^{-1} the June 23).

Genetic analysis

Discriminant analysis of principal components (DAPC) was applied to the seven microsatellites markers. The BIC criterion (Fig.S1, supporting information) separated the 11 spatiotemporal samples into three “clusters” (Fig. 3). The eigenvalue (Fig. 3, inset) showed that the genetic structure was captured by the first two principal components.

Growth rate variation

Growth rate was measured for the 158 strains of *A. minutum*. The growth curves showed that strains grew exponentially until day 4. The individual growth rates ranged from 0.03 to 0.49 with a mean value of 0.23 (SD= 0.10). In Rance and Penzé estuaries, relative growth rates were significantly different according to strains (Rance: One way ANOVA, df: 191, F=29.97, P<0.0001, Penzé: One way ANOVA, df: 234, F=10.27, P<0.0001).

Variation of growth rates in Penzé and Rance cannot be explained by a single factor. In Penzé, no difference of growth rates was observed between 2010 and 2011 (ANOVA, df: 234, F=0.46, P=0.497) with respectively 0.226 ± 0.075 (x ± sd) and 0.219 ± 0.111 (x ± sd) whereas in Rance the mean growth rate in 2010 was lower than in 2011 (ANOVA, df: 191, F=18.89, P<0.001) with respectively 0.195 ± 0.076 (x ± sd) and 0.276 ± 0.127 (x ± sd). The differences of mean growth rate between sites in 2010 and in 2011 were significant

(2010: ANOVA df: 275, F= 14.87, P<0.001 and in 2011: ANOVA, df: 150, F= 6.07, P=0.015). the DAPC results using genotypic data and the sampling period. The general lineal models (GLMs) showed no differentiation between genetic clusters in Penzé (*F*=2.10; *P*=0.191) (Table 1A) and in Rance (*F*=1.29; *P*=0.280) (Table 1B) whereas in the two sites the factor "period" was significant (Penzé: *F*=10.70; *P*=0.005; Rance: *F*=4.80; *P*=0.043) showing that the growth rate depends on the sampling period in the bloom (Fig. 4). In Penzé 2011, whatever the genetic assignment of strains, growth rate was generally lower for strains isolated at the end of the bloom (Fig. 4) whereas in Rance, there was a significant interaction between the period of bloom and genetic clustering assignation (Table 1 B, Fig. 4). The strains assigned to cluster 3 displayed higher mean growth rate in the first part of main bloom whereas the strains assigned to cluster 2 showed highest values at the second part of the main bloom (Fig. 4).

Discrepancies between observed and theoretical increased of cell populations

To assess the natural increase of local populations, we used mean growth rates obtained on cultures per year and per ecosystem. Lowest growth rates in Penzé 2011 (June 01 and July 11), corresponding to the two most extreme dates, were not considered in this calculation. A simple linear regression (μ=0.027T-0.1029, R^2=0.746) was detected between growth rates of two local strains and temperature from 10 to 20°C (supplementary Fig. S. 2). The slope of this straight line was used to normalize mean growth rates (assessed at 19°C) according to water temperature. Theoretical loss of *A. minutum* cell caused by the combined effect of tidal and runoff was assessed using the dilution rate. Total losses, which corresponds to the sum of estimated loses per day, were estimated at 7.4 x 10^5 and 6 x 10^5 cells L^{-1} during the studied period in 2010 and 2011, respectively (Supplementary Fig. S. 3). In 2010, the most important peak occurred between the 8 and 11 of June (loss of up to 2.5 x 10^5 cells L^{-1}), and could be attributed to the conjunction of strong tidal and important rainfall. In 2011, several peaks at more than 4x10^4 cells L^{-1} occurred for several dates (Supplementary Fig. S. 3). Theoretical increase of *A. minutum* densities during two consecutive dates was then expressed by taking into account the mean temperature-normalized growth rates and dilution rates in the Penzé estuary. As no model was available for this ecosystem only the growth rate was used for the Rance. Differences between theoretical and observed densities (in red Fig. 2) could be positive (disappearance of cells) or negative (gain of cells). Periods of gain and loss alternate during the survey. Major discrepancies occur at the beginning of June 2010 in Penzé (gain of cells, negative values) and during the decline of the Rance bloom in 2010 (loss of cells, positive values). In both cases, more than 3 x 10^5 cells per liter were theoretically 'missing'.

Discussion

In this study, one phenotypic trait (growth rate) is measured using standardized culture condition and compared between and within blooms. Growth rates obtained in this study (ranging from 0.01 to 0.49 d^{-1}) are in the range of growth rates reported for strains isolated in northern Europe (ranging from 0.18 to 0.26 d^{-1} and average rate > 0.5 d^{-1} with max observed at 0.63 d^{-1} in Touzet *et al*. 07 and Gryzbeck *et al.* 2003, respectively).

In situ growth rates are believed to play a fundamental role for the bloom development. If this hypothesis is true, then intrinsic growth rates must at least sustain the observed dynamic of the bloom. Discrepancies between theoretical and observed *A. minutum* concentrations demonstrated a rapid alternation between net gain and loss of cells. Net loss of cells could be explained by parasitism (Chambouvet *et al.*, 2008; R. I. Figueroa *et al.*, 2010, Lepelletier *et al.*, 2013), predation (Montagnes *et al.*, 2008), encystment and mortality that could be induced by fluctuating abiotic factors (Anderson *et al.*, 1985). Parasites and predators are density-dependent, and their impact should be greatest at the end of the bloom. Prevalence up to 40% on *A. minutum* populations was yet reported in the Penzé estuary and both parasites and predators likely participate in the bloom decline (Chambouvet *et al.*, 2008, Montagnes *et al.*, 2008). Whilst loss of cells can be easily explained by multiple factors, the gain of cell is much complicate to understand. In particular, massive and sudden gains of cells as high as $2x10^5$ per liter were detected at the beginning of the Penzé bloom in 2010 and during the middle of the bloom in 2011. Such demographic increases, which clearly cannot be explained by the intrinsic growth of populations, may have several explanations including the local germination of cysts and the rare arrival of migrants. In 2010, no major *A. minutum* blooms occurred around the Channel (Robin Raine, pers. comm.). However, we previously demonstrated that strains isolated in the Rance and Penzé the 2 of June 2010 were not genetically differentiated, evidencing that gene flow exists between both sites (Dia *et al.* submitted). Import of cells from Rance to Penzé may be partially explained by an important rainfall (108 mm of water, http://www.infoclimat.fr, Fig. 2) observed in May 25 2010. In 2011, genetic substructuring demonstrated that populations in the Rance and Penzé were isolated, preventing the hypothesis of a massive importation of cells from the Rance estuary. An important outbreak was observed later in the Cork Harbour from June15 to July13, with max abundances observed in July 6 (average cell densities were 8.5×10^5 per liter). This was too late to explain the sudden import in 2011 in the Penzé estuary. Remaining explanation should be the local germination of cysts that could occur continuously during the bloom (Anglès *et al.* 2012).

Excystment fluxes up to 45.7% have been observed in the Mediterranean Sea (Anglès *et al.* 2012). However, excystment is generally reported as much lower rates. Alternatively, in period of blooms, excystment fluxes may combine germination of pellicle and resting cysts (Anglès *et al.* 2012). Indeed, temporary cysts may have been accumulated in the previous days, and may have synchronously germinated.

Results obtained in this study provide significant experimental support for fluctuations at the intra-specific level in *A. minutum*. This result is in agreement with recent investigations of phenotypic differentiation (growth rates and toxin production) in *Alexandrium* species combined with high intra specific and intra bloom

diversity (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2013; Campbell *et al.*, 2002 Varela *et al.* (2012). However, we cannot exclude the possibility that intra-specific variability was also influenced by the presence of bacteria, as none of cultures used was axenic. Beside local intra-specific variability, fitness clearly fluctuates according to sampling periods and years. We demonstrated that the growth rate of *A. minutum* strains significantly depended on the temporal origin of the isolate. In Penzé, strains isolated during the core middle of the bloom mainly exhibited higher growth rates than strains isolated at the very beginning and/or the very end of the bloom event during 2011. The same year, in Rance estuary, the mean higher growth rate was observed at the end of the bloom. Such variability of mean growth rates is consistent with fluctuations observed using *in situ* measurement of *A. minutum* growths assessed by dilution technique applied at different phases of blooms in the Mediterranean Sea (Garcès *et al.* 2005). The fact that observed intra-specific variability of growth rates, measured in exactly the same culture condition, is combined with non-randomly distribution in time and space, arguing in favor of a genetic determinism of this trait. Interestingly, in our study the growth rate seems to be related not only with the relative period of the bloom (beginning, middle and end), but also with the time (date). Indeed, globally in the two estuaries the growth rate was higher between the end of May and beginning of June and lower in beginning of May and beginning of July. These results suggest that abiotic factors could have a strong impact on selection indeed in 2011. End of May was characterized in both estuaries by high irradiance and high precipitation. These last factors are known to affect the population dynamics of *Alexandrium* species (Parkhill and Cembella, 1999; John and Flynn, 2000; Guisande *et al.*, 2002; Etheridge and Roesler, 2005; Laabir *et al.*, 2011).

This observation suggests that bloom is not a single, widespread, homogeneous population, but rather involves several sub-populations, each with its own genetic and physiological characteristics. The significant phenotypic diversity found in this study corroborates with recent studies of planktonic organisms showing very high genetic and genotypic diversity maintained throughout the bloom duration (Lebret *et al.*, 2012; Richlen *et al.*, 2012). The genetic changes observed in our study during bloom events are consistent with this hypothesis and could be explained by selection and/or genetic drift phenomena during the bloom (Dia *et al.* submitted). The presence of three populations (clusters) within a relatively restricted region suggests that these genetically distinct populations may play different ecological and biogeochemical roles in these estuary habitats. Variable environments have been yet hypothesized to promote the maintenance of genetic diversity within asexually reproducing species (Bell 1997). In the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii*, Rynearson and Armbrust (2004) suggested that the extent of growth-rate variation observed among isolates in the field was due to rapid genetic changes on the order of weeks. The amount and patterns of intra-specific growth rate variation are therefore crucial factors determining the ecological and micro-evolutionary fate of microalgal species and populations. Underlying genetic variation, the basis for observed phenotypic variation, is assumed to reflect the ability of a population to adapt to changing environments (Fisher 1930; Barrett and Schluter 2008). In

Rance, the three genetic sub-structures observed in natural populations showed different mean fitness characteristics according to time (significant interaction) suggesting the occurrence of a selection process. These results suggest that selection for higher growth rates occurs on these different genetic clusters at different period of the bloom. Then, the best phenotype of *A. minutum* could spread rapidly by clonal reproduction whatever the period of bloom. The continuous germination of resting cysts during the entire bloom event (Lebret *et al.* 2012, Dia *et al.* submitted), as well as the specific cohort of these cysts produced during successive annual blooms and stored in the cyst bank, may enhance genetic diversity (in terms of genotypes and genes) (Alpermann 2009). In a periodically changing environment, a higher growth rate may substantially enhance population persistence (Bürger, 1999). However, the drastic growth rates decrease at the very end of the bloom in Penzé 2011 suggests that this parameter was not always positively selected. Having active division rates may increase exposure to parasites and predations. Alternatively, highly growing clones may have been more preferentially involved in the encystment process.

Conclusions

In this study, we compared the

phenotypic differentiation (growth rate) between samples collected on two different sites at different period of bloom events. In analogous to results obtained with growth character, we used microsatellite genetic markers to form groups and from these groups, we perform comparisons of their growth. In both cases, we found high diversity between samples according to bloom period (beginning, middle or end of bloom events).

The combination of phenotypic and genotypic analyses tools can help to clarify the ecological significance of these characters in the context of the bloom dynamics. Although there is a strong need for more direct measurement of population dynamics in *A. minutum*, genetic analyses may provide a starting point for understanding the intraspecific variation.

Acknowledgement

We warmly thank the IFREMER laboratory in Dinard (France) and especially Claude Lebec and Claire Rollet. Thanks to the Roscoff Culture Collection (RCC), Service Mer et Observation (Marine Operations Department) at the Roscoff Biological Station and all the partners in the Paralex project for their help with sampling. Sequences and microsatellite genotypes were generated by Morgan Perennou and Gwenn Tanguy at the Roscoff Biological Station (Ouest-Génopole). This project was carried out in partial fulfillment of Aliou Dia's PhD degree, supported by funds from the ANR and a PhD fellowship from the Brittany Regional Council (ARE10087: POPALEX). This work was financially supported by the Brittany Regional Council, the French ANR projects PARALEX ("The sixth extinction" ANR-2009-PEXT-01201) and CLONIX, the European Project MaCuMBa (FP7-KBBE-2012-6-311975) and the EC2CO project PALMITO.

References

Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Carrillo, K.S., 2013. The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech Harmful Algae.

Alpermann, J. Tilman., 2009. evolutionary ecology of *Alexandrium* (Dinophyceae) with special emphasis on genotypic and phenotypic variation in the toxigenic species *A. tamarense*. Thesis dissertation. Bremen

Anderson DM, Chisholm SW, and Watras CJ (1983). ''Importance of the life cycle events in the population dynamics of Gonyaulax tamarensis." Mar. Biol. 76, 179–189.

Anderson, D. M., Coats, D. W. and Tyler, M. A. (1985) Encystment of the dinoflagellate *Gyrodinium uncatenatum*: temperature and nutrient effects. J. Phycol., 21, 200–206.

Anderson, DM, GJ Kulis - J.J. Sullivan, S. Hall, C. Lee. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates Alexandrium spp. Mar. Biol. 104: 511-524.

Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M., 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. Harmful Algae. 14, 10–35.

Anglès S, Jordi A, Garcés E, Basterretxea G, Palanques A (2010) Alexandrium minutum resting cyst distribution dynamics in a confined site. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57, 210-221.

Anglès S, Garcès E, Hattenrath-Lehmann TK, Gobler CJ (2012) In situ life-cycle stages of Alexandrium fundyense during bloom development in Northport Harbor (New York, USA) Harmful Algae. 16, 20–26.

Bell G (1997) Experimental evolution in Chlamydomonas. I. Short-term selection in uniform and diverse environments. Heredity 78, 490-497.

Barrett, R.D.H. & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. Trends Ecol. Evol., 23, 38–44.

Barreto, F.S., Tomas, C.R., McCartney, M.A., 2011. AFLP Fingerprinting Shows that a single *Prymnesium parvum* Harmful algal bloom consists of multiple clones. Journal of Heredity 102, 747–752.

Bolnick, D.I., Amarasekare, P., Araújo, M.S., Bürger, R., 2011. Why intraspecific trait variation matters in community ecology. Trends in Ecology & Evolution, 26, 183–192.

Brand, L. and Guillard, R. R. L. and Lynda S. Murphy (1981) A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. J. Plankton Res., 3, 193–201.

Bravo, I., Vila, M., Maso´, M., Ramilo, I., Figueroa, R.I., 2008. Alexandrium catenella and Alexandrium minutum blooms in the Mediterranean Sea: Toward the identification of ecological niches. Harmful Algae 7 (4), 515–522.

Bull, J.J., 1987. Evolution of phenotypic variance. Evolution.

Bürger, R., 1999. Evolution of genetic variability and the advantage of sex and recombination in changing environments. Genetics 153, 1055–1069.

Campbell, L., Ivy, J.M., Loret, P., Villareal, T.A., 2002. Linking population and physiological diversity in Karenia brevis from the Texas coast. Harmful Algae. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanogrphic Commission of UNESCO. 446-448.

Cannon, J.A., 1993. Germination of the toxic dinoflagellate, Alexandrium minutum, from sediments in the Port River, South Australia. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Sciences Publishers, pp. 103–107.

Cannon, J A (1996) Competition between the dinoflagellates Alexandrium minutum and Prorocentrum micans in the Port River, South Australia. In Yasumoto, T., Oshima, T. & Fukuyo, Y. [Eds.] Harmful and Toxic Algae. IOC of UNESCO, Paris, pp. 381–4.

Casabianca, S., Penna, A., Pecchioli, E., Jordi, A., Basterretxea, G., Vernesi, C., 2011. Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate Alexandrium minutum in the Mediterranean Sea.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 279, 129–138.

Chambouvet, A., Morin, P., Marie, D., Guillou, L., 2008. Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. Science 322, 1254–1257.

Cho K, Hiramatsu M, Ogawa T, Omura T, Ishimaru Y Oshima (2008) Non-toxic and toxic subclones obtained from a toxic clonal culture of Alexandrium tamarense (Dinophyceae): toxicity and molecular biological feature *Harmful Algae* 7, 740–751.

Crespo BG, Keafer BA, Ralston DK, Lind H, Farber D, Anderson DM (2011) Dynamics of Alexandrium fundyense blooms and shellfish toxicity in the Nauset Marsh System of Cape Cod (Massachusetts, USA). Harmful Algae 12, 26-38

Destombe, C., Cembella, A., 1990. Mating-type determination, gametic recognition and reproductive success in *Alexandrium excavatum* (Gonyaulacales, Dinophyta), a toxic red-tide dinoflagellate. Phycologia.

Doblin, M., Blackburn, S., Hallegraeff, G., 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros* cf. *tenuissimus* (Bacillariophyta). Journal of Plankton Research 21, 1153–1169.

Erdner, D.L., Richlen, M., McCauley, L.A.R., Anderson, D.M., 2011. Diversity and Dynamics of a Widespread Bloom of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium fundyense.* PLoS ONE 6, e22965.

Estrada, M, Solé, J, Anglès, S, Garcés, E (2010). The role of resting cysts in Alexandrium minutum population dynamics. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 57, 308-321.

Etheridge, S.M., Roesler, C., 2005. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for Alexandrium fundyense isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy Deep-Sea Research II, 52, pp. 2491–2500

Figueroa, R., Rengefors, K., 2006. Effects of parental factors and meiosis on sexual offspring of *Gymnodinium nolleri* (Dinophyceae) - Figueroa - 2006 - Journal of Phycology - Wiley Online Library. Journal of Phycology.

Figueroa, R.I., Garcés, E., Bravo, I., 2007. Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture 1. Journal of Phycology 43, 1039–1053.

Figueroa, R.I., Garcés, E., Camp, J., 2010. Reproductive plasticity and local adaptation in the host parasite system formed by the toxic *Alexandrium minutum* and the dinoflagellate parasite *Parvilucifera sinerae*. Harmful Algae 1–8.

Figueroa, R.I., Rengefors, K., 2006. Life cycle and sexuality of the freshwater raphidophyte *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae). Journal of Phycology 42, 859–871.

Figueroa RI, Vázquez JA, Massanet A, Murado MA, Bravo I (2011) Interactive effects of salinity and temperature on planozygote and cyst formation of Alexandrium minutum (Dinophyceae) in culture. Journal of Phycology, 47, 13-24.

Fisher RA (1930) The genetical theory of natural selection. Oxford: Oxford University Press.

Flores-Moya A, Rouco M, Garcia-Sanchez MJ, Garcia-Balboa C, Gonzalez R, Costas E, Lopez-Rodas V. (2012) Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum under selection of increased temperature and acidification. Ecol. Evol., 2 (6), 1251–1259.

Garcés E, Vila M, Masó M, Sampedro N , Giacobbe MG and Penna A. (2005). Taxon specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions estimated by the dilution technique. Marine Ecology Progress Series 301, 67-79.

Giacobbe, M.G., Oliva, F.D., Maimone, G., 1996. Environmental factors and seasonal occurrence of the dinoflagellate Alexandrium minutum, a PSP potential producer, in a Mediterranean lagoon. Estuarine, Coastal and Shelf Science 42 (5), 539–549.

Godhe, A., Noren, F., Kuylenstierna, M., Ekberg, C., Karlson, B., 2001. Relationship between planktonic dinoflagellate abundance, cysts recovered in sediment traps and environmental factors in the Gullmar

Fjord, Sweden. Journal of Plankton Research 23, 923–938.

Gotelli, N.J., 1995. A primer of ecology. Sinauer Associates Incorporated.

Grzebyk, D., Béchemin, C., Ward, C.J., 2003. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate Alexandrium minutum. Plankton Res 25: 1185-1199

Guillard RRL (1973) Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Stein JR (ed) Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, p 69–85.

Guisande, C., Frango´pulos, M., Maneiro, I., Vergara, A.R., Riveiro, I., 2002. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. Marine Ecology Progress Series 225, 169–176.

Hansen, Daugbjerg, Franco, 2003. Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of Alexandrium minutum (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. Harmful Algae 2, 19–19.

Hwang, D.F., Lu, Y.H., 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate Alexandrium minutum. Toxicon.

John E.H., K.J. Flynn (2000) Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. European Journal of Phycology, 35, pp. 11–23

John, U., Medlin, L.K., Groben, R., 2005. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarense* species complex. Journal of Plankton Research 27, 199–204.

Jombart, T., 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24, 1403–1405.

Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics 11, 94.

Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.-M., 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Harmful Algae 2, 29–41.

Kwon, Hyeong Kyu ; Park, Ji A ; Yang, Han-Soeb ; Oh, Seok Jin 2013 Dominance and Survival Strategy of Toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense and Alexandium catenella Under Dissolved Inorganic Nitrogen-limited Conditions; Journal of the Korean Society for Marine Environment & Energy 16:1,25-35 DOI : 10.7846/JKOSMEE.2013.16.1.25

Laabir M, Jauzein C, Genovesi B, (2011) Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate Alexandrium catenella colonizing Mediterranean Journal of plankton Research 33 (10), 1550-1563.

Lebret, K., Kritzberg, E.S., Figueroa, R., Rengefors, K., 2012. Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. Environmental Microbiology 14, 2395–2404.

Lilly, E.L., Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Institution, W.H.O., 2003. Phylogeny and biogeography of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*.

Lilly, E.L., Halanych, K.M., Anderson, D.M., 2005. Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. Harmful Algae 4, 1004–1020.

Lim, P., Leaw, C., Usup, G., Kobiyama, A., Koike, K., Ogata, T., 2006. Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: Alexandrium tamiyavanichii and Alexandrium minutum (Dinophyceae). Journal of Phycology 42, 786–799.

Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. Marine Pollution Bulletin 53, 620–630.

Masseret E, Grzebyk D, Nagai S, et al. (2009) Unexpected Genetic Diversity among and within Populations of

the Toxic Dinoflagellate Alexandrium catenella as Revealed by Nuclear Microsatellite Markers. Applied and Environmental Microbiology 75, 2037-2045.

Mauger S, Couceiro L, Valero M (2012) A simple and cost-effective method to synthesize an internal size standard amenable to use with a 5-dye system. Prime Journals, 2, 40-46.

Maynard-Smith, J. and Hoekstra, R.F. 1980. Polymorphism in a varied environment: How robust are the models? Genet. Res. Camb., 35, 45–57.

Monsen NE, Cloern JE, Lucas LV, Monismith SG (2002) A comment on the use of flushing time, residence time, and age as transport time scales. Limnol Oceanogr 47: 1545-1553

Montagnes, D., Chambouvet, A., Guillou, L., 2008. Responsibility of microzooplankton and parasite pressure for the demise of toxic dinoflagellate blooms. Aquatic Microbial

Montresor, M., Sgrosso, S., Procaccini, G., Kooistra, W., 2003. Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinopbyceae): evidence for cryptic species. Phycologia.

Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaulot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. Nature, 409, 607-610.

Nagai, S., MCcauley, L., Yasuda, N., Erdner, D.L., Kulis, D.M., Matsuyama, Y., Itakura, S., Anderson, D.M., 2006. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). Mol Ecol Notes 6, 756–758.

Nehring, S., 1998. Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. Archive of Fishery and Marine Research.

Parkhill, J.P., Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. Journal of Plankton Research.

Probert, I., Lewis, J., Erard-Le Denn, E. 2002. Morphological details of the life history of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). Cryptogam. Algol 23, 343–55.

Quinn GP, Keough MJ (2002) Cambridge University Press - 537 pages

Richlen, M.L., Erdner, D.L., McCauley, L.A.R., Libera, K., Anderson, D.M., 2012. Extensive genetic diversity and rapid population differentiation during blooms of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) in an isolated salt pond on Cape Cod, MA, USA. Ecol Evol 2, 2588–2599.

Rynearson TA, Armbrust EV (2005) Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom Ditylum brightwellii. Molecular Ecology, 14:1631–1640.

Rynearson TA, Newton JA, Armbrust EV (2006) Spring bloom development, genetic variation, and population succession in the planktonic diatom Ditylum brightwellii. Limnology and Oceanography, 51, 1249-1261.

Scholin, C.A., Anderson, D.M., 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU Rrna genes. Journal of Phycology 30, 744–754.

Souza, V., Turner, P.E., Lenski, R.E., 1997. Long term experimental evolution in *Escherichia coli*. V. Effects of recombination with immigrant genotypes on the rate of bacterial evolution. Journal of. Evolutionary Biology.10, 743–769.

Stern, R.F., Horak, A., Andrew, R.L., Coffroth, M.-A., Andersen, R.A., Küpper, F.C., Jameson, I., Hoppenrath, M., Véron, B., Kasai, F., Brand, J., James, E.R., Keeling, P.J., 2010. Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine Environments. PLoS ONE 5, e13991.

Tillmann, U., 2003. Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. J Eukaryot Microbiol 51, 156–168.

Touzet N, Francob JM, Raine R (2007) Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of Alexandrium minutum (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland Toxicon, 50,106–119.

Varela D, Paredes J, Alves-de-Souza C, Seguel M, Sfeir A, Frangópulos M (2012) Intraregional variation among

Alexandrium catenella (Dinophyceae) strains from southern Chile: Morphological, toxicological and genetic diversity. Harmful Algae, 15, pp. 8–18.

Vila, M., Giacobbe,M.G.,Maso´,M., Gangemi, E., Penna, A., Sanpedro, N., Azzaro, F., Camp, J., Galluzzi, L., 2005. A comparative study on recurrent blooms of *Alexandrium minutum* in two Mediterranean coastal areas. Harmful Algae 4 (4), 673–695

Wood, A.M., Everroad, R.C., 2005. Algal Culturing Techniques - Google Books. Algal culturing techniques.

Yamaguchi, M., Itakura, S., Uchida, T., 2001. Nutrition and growth kinetics in nitrogen-or phosphorus-limited cultures of the “novel red tide “dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). Phycologia.

Figure 1. Map of the Atlantic French coast showing location of the field site for samples collected in 2010 and 2011 at the booth Penzé and Rance estuaries.

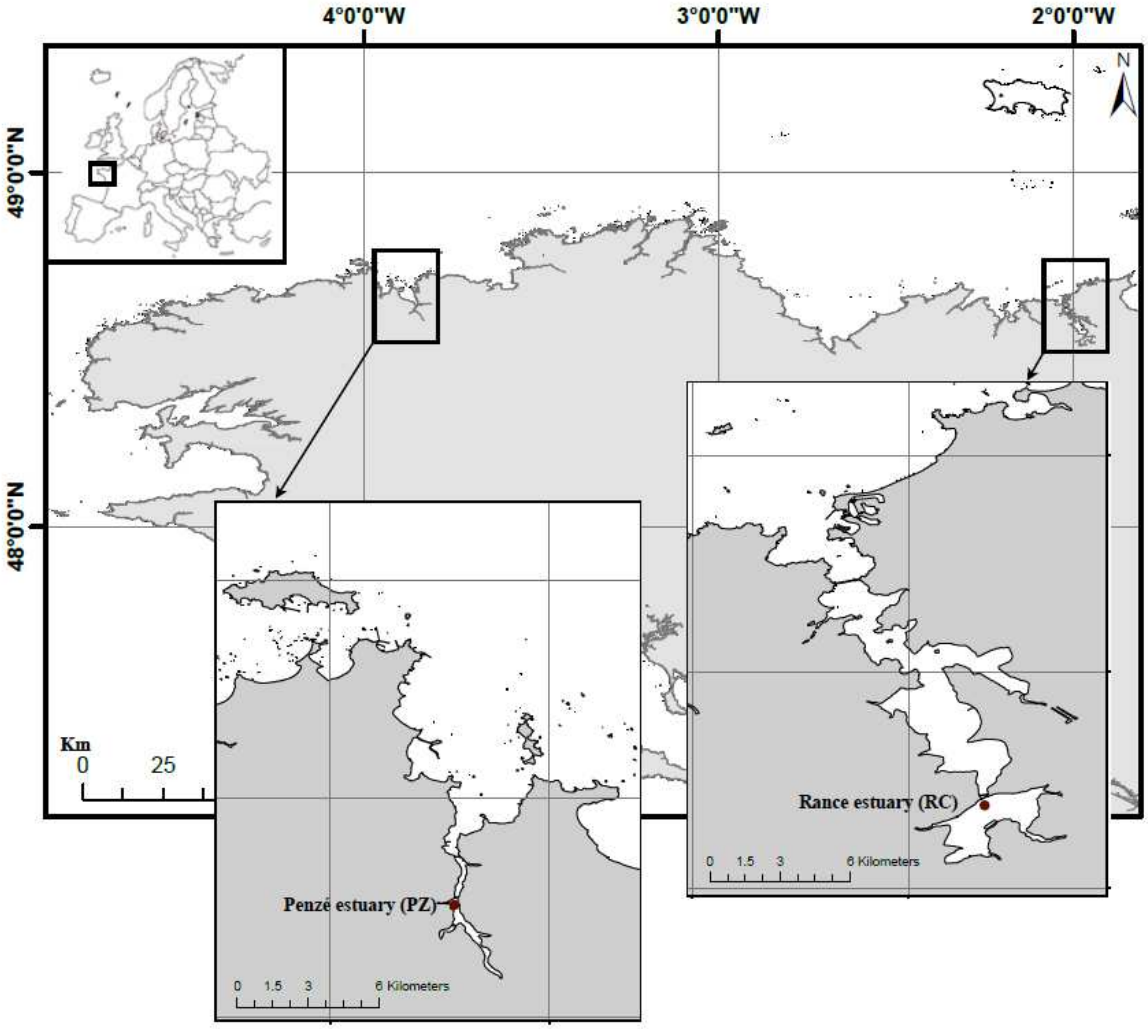


Figure 2. Bloom dynamics in Rance and Penzé estuaries in 2010 and 2011.

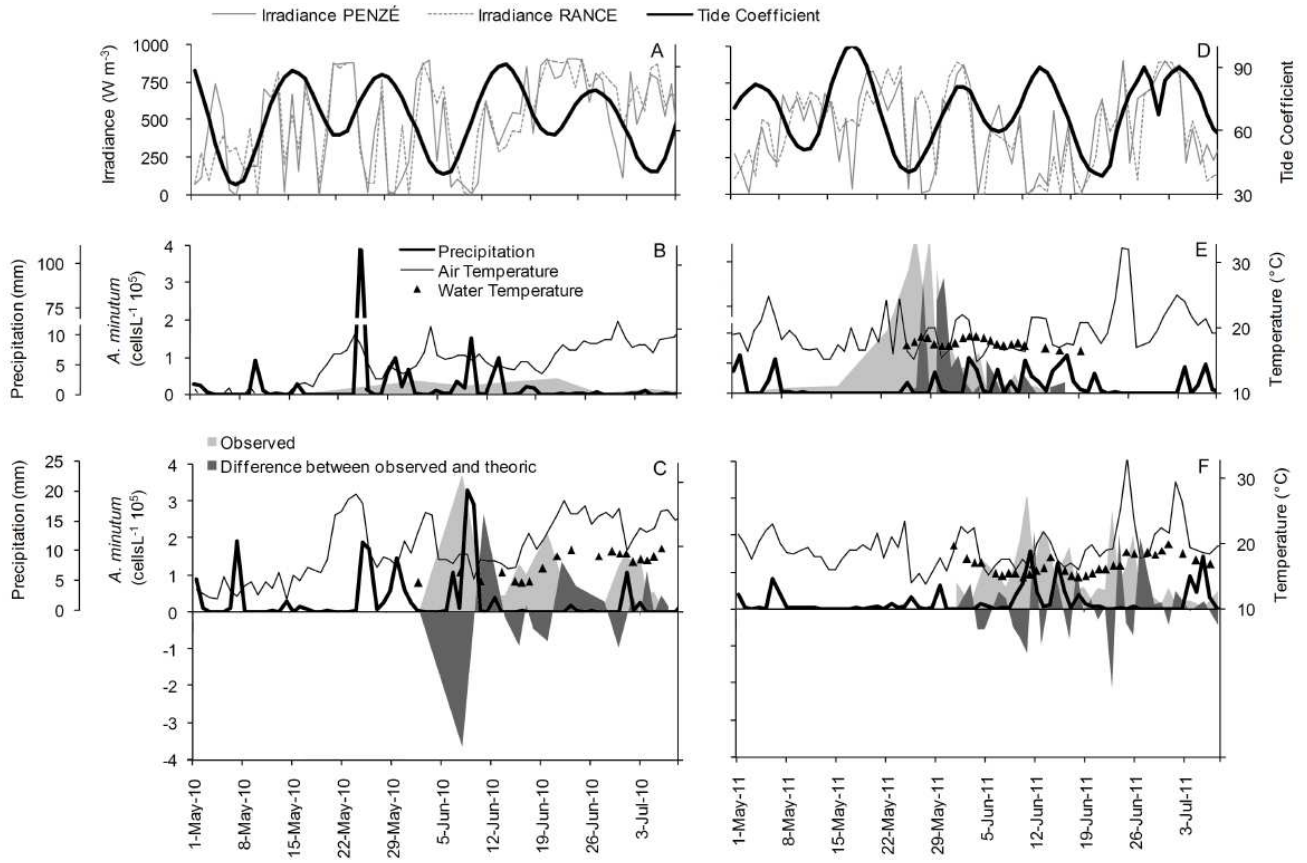


Figure 3. Scatterplots of the DAPC of the 11 spatiotemporal samples. This scatterplot shows the first two principal components (Y-axis, and x-axis, respectively). This graph represents the individuals as dots. Clusters are differentiated by colors, red, green and blue, which respectively represent cluster 1, cluster 2 and cluster 3.

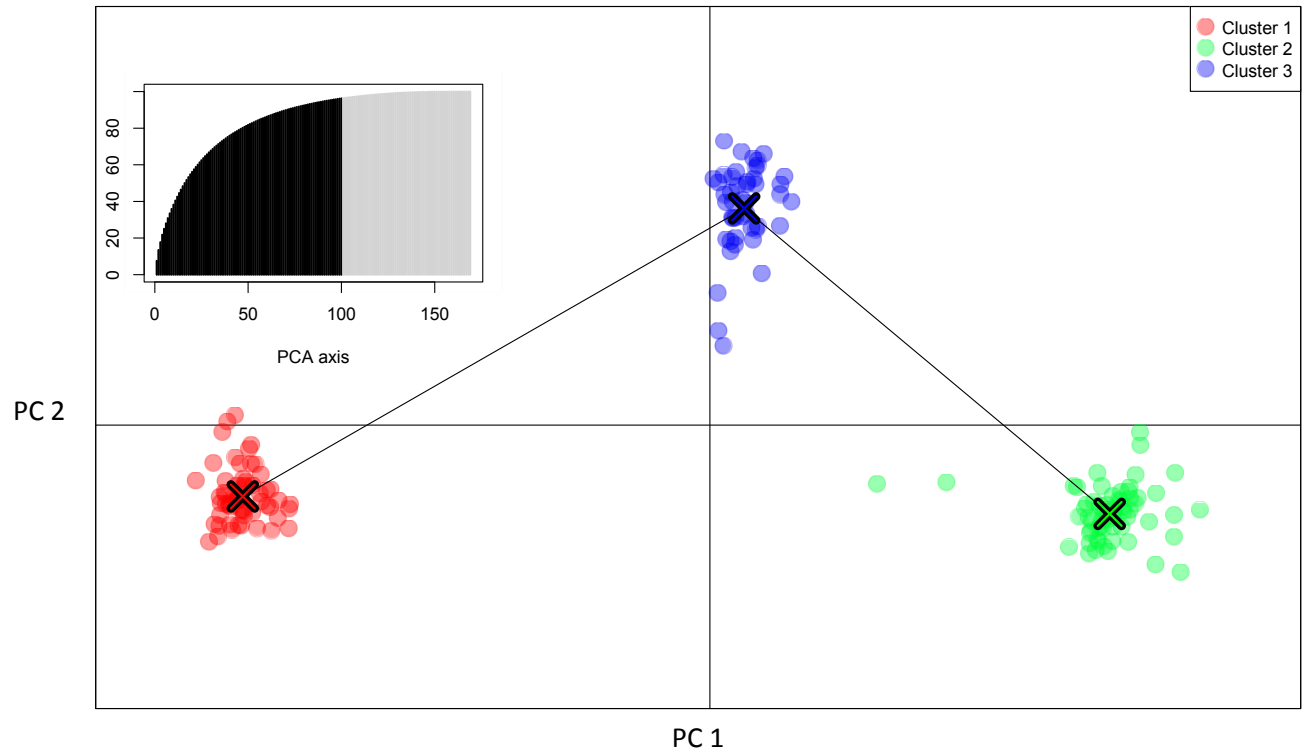


Figure 4. Growth of the three genetic clusters according to bloom chronology in the Rance and the Penzé estuaries during 2011 (A: beginning, B and C: middle and D: end of bloom). Bars represent growth rate of each cluster relative to the bloom period and time and the pie charts represent the relative frequencies of each cluster. The clusters 1, 2, and 3 were represented respectively in red, green and blue.

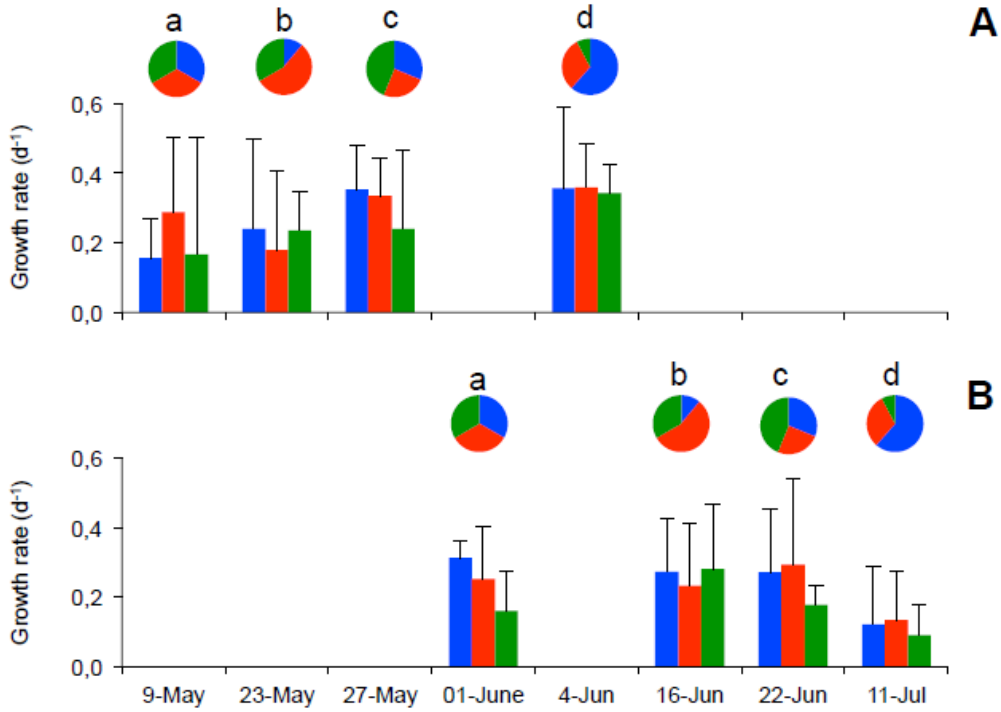


Table 1: GLM statistical results on *Alexandrium minutum* growth rate of strains sampled in the bloom of 2011 after 15 days of culture: effect genetic clusters and period of sampling (beginning, middle 1, middle 2, end of bloom).

A: Penzé

Source of variation	df	MS	F value	P value
Genetic cluster	2	0.000739	0.37	0,703
Period	3	0.021022	10.70	0.005
Cluster*period	6	0.002036	1.43	0.207
Error	130	0.001421		
Total	141			

B: Rance

Source of variation	df	MS	F value	P value
Genetic cluster	2	0.001690	0.54	0.608
Period	3	0.014731	4.80	0.043
Cluster*period	6	0.003290	2.50	0.025
Error	124	0,001314		
Total	135			

Supplementary

Table S. 1: Characteristics of the spatiotemporal sampling. This table represent the number of strains analyzed in this study for each spatiotemporal sample Codes for samples: PZ for Penzé, RC for Rance, 10 for 2010 and 11 for 2011; A, B, C and D indicate respectively the different periods of the blooms: the beginning, the middle 1, the middle 2, and the end of the bloom. Growth rate were measured by using in vivo fluorescence (Saffire^2, Tecan, Switzerland)

Site/Year	Date	Sample code	Number of *A. minutum* analyzed	Growth rate (div day^{-1})
Penzé/2010	02 June	PZ10A	19	0,226±0,06
	30 June + 01 July	PZ10D	13	0,227±0,09
Penzé/2011	01 June	PZ11A	09	0,229±0,08
	15 + 17 June	PZ11B	22	0,261±0,09
	22 June	PZ11C	12	0,276±0,12
	11 July	PZ11D	11	0,120±0,05
Rance/2010	02 June	RC10A	19	0,195±0,08
Rance/2011	09 May	RC11A	9	0,205±0,12
	23 May	RC11B	15	0,203±0,10
	27 May	RC11C	16	0,303±0,10
	03 + 05 June	RC11D	13	0,357±0,11
Total			158	

Fig. S. 1. Inference of the number of clusters. DAPC analyses estimates that the optimal predicted number of populations K for our set of genotype is three. Bayesian information criterion (BIC) is provided for different numbers of clusters (1-11). The X-axis corresponds to the number of clusters and the Y-axis corresponds to the Bayesian Information Criterion (BIC). The lowest BIC value (k = 3) indicates the optimal number of clusters (population).

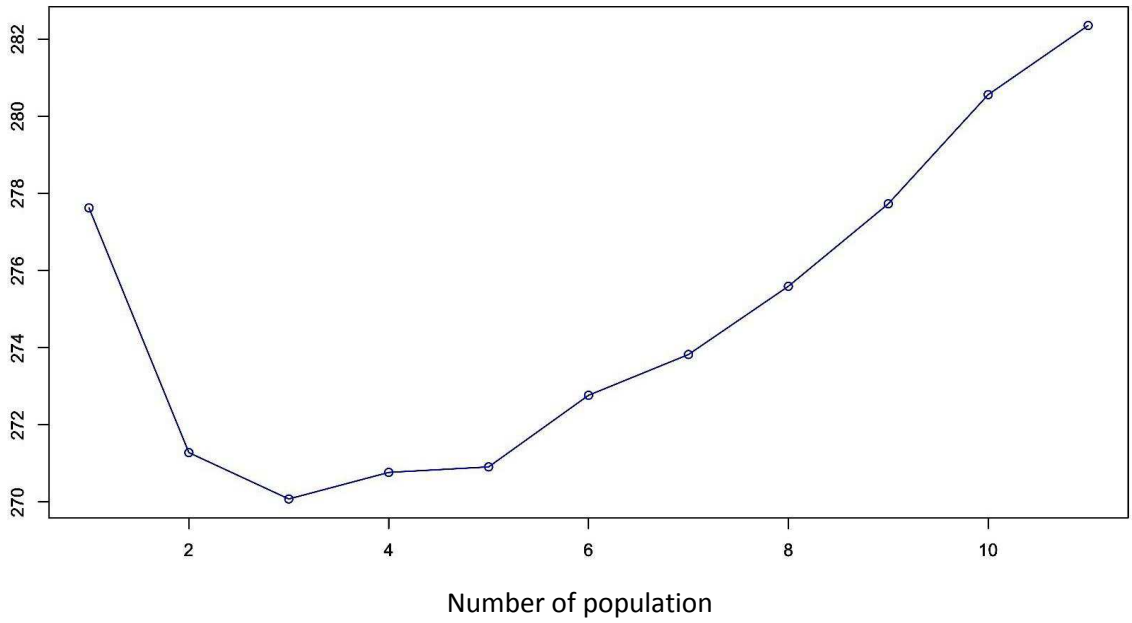


Fig. S. 2. Relationship between growth rates of strains AM131 and AM89BM (RCC749) for different temperatures.

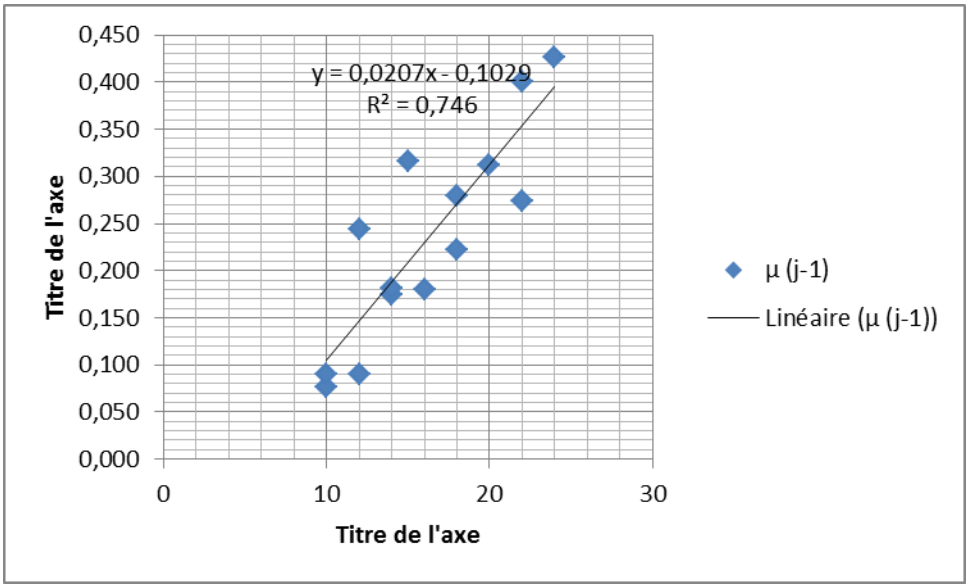
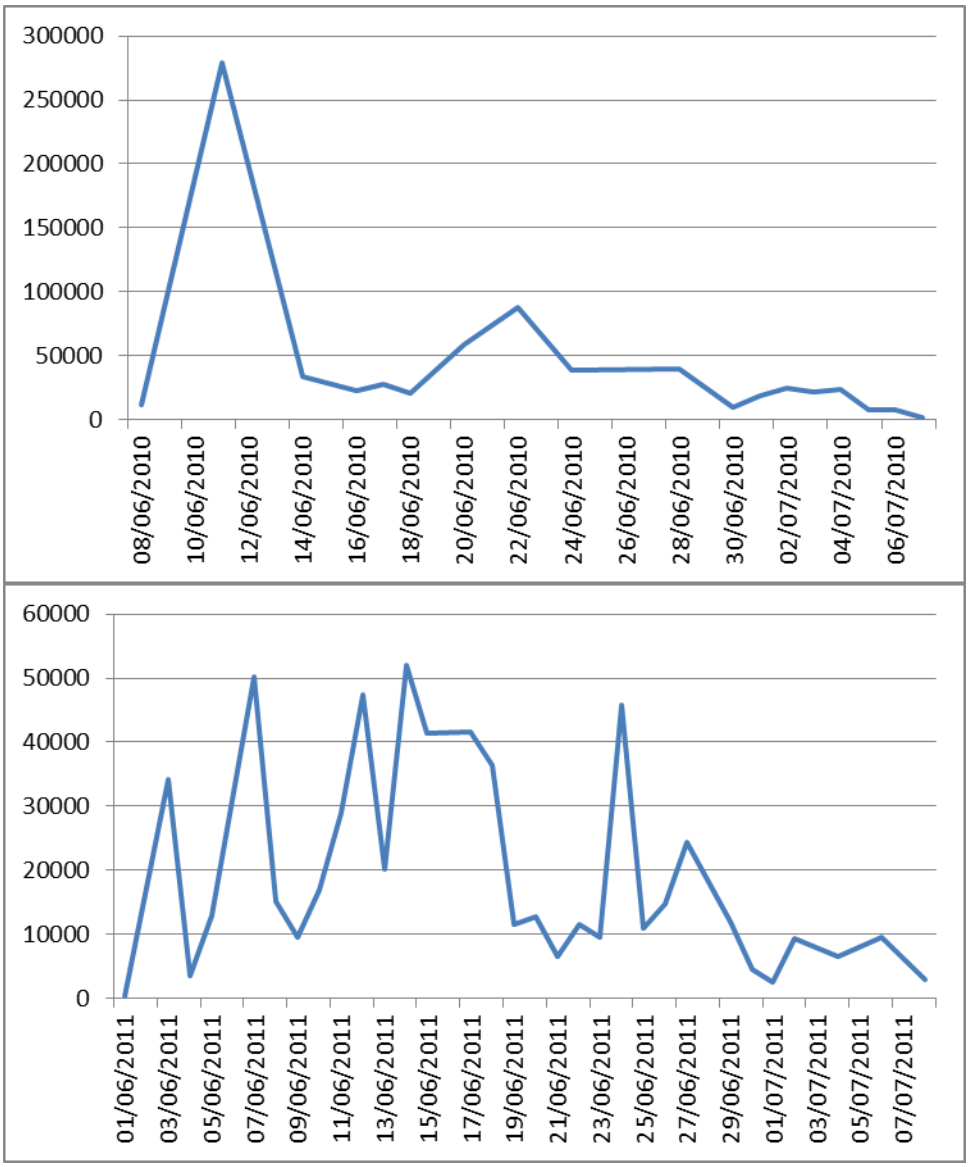


Fig. S. 3: Removal of *A. minutum* cells caused by the dilution rate in the Penzé estuary.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, les résultats présentés dans les différents chapitres ainsi qu'en annexe nous ont permis de tester plusieurs hypothèses liées aux traits d'histoire de vie des dinoflagellés. En effet, bien que la majeure partie des espèces de dinoflagellés ait été décrite comme ayant un cycle de vie haploïde, c'est-à-dire présentant une multiplication des cellules végétatives haploïdes par mitoses, il existe relativement peu d'information sur leur cycle de vie et sur l'impact de ce cycle de vie sur la structure génétique des populations. Les observations qui ont été réalisées sur un nombre limité d'espèces laissent supposer par analogie à d'autres groupes d'algues et de protistes que le cycle comprendrait une alternance de syngamie (fusion de cellules) et de méiose. Cependant, ce type de cycle n'a été décrit que chez 1% des 2500 taxons inventoriés (Elbrächter, 2003) et à ma connaissance, la méiose n'a jamais été formellement décrite. Le cycle comprend donc des cellules végétatives haploïdes planctoniques (efflorescences) et occasionnellement, des cellules enkystées (supposées diploïdes). De par leur capacité à résister à des conditions environnementales défavorables, ces kystes constituent une étape cruciale pour la survie de ces espèces. Cependant, le déroulement du cycle et son impact sur le fonctionnement et la structure génétique des populations restent mal connus (Destombe and Cembella, 1990; Figueroa *et al.*, 2007). En particulier, on peut s'interroger sur le rôle des kystes en tant que générateur de diversité et leur impact sur l'adaptation locale comme par exemple l'apparition de résistance à certains parasites (Chambouvet *et al.* 2008).

Ces observations nous amènent à nous interroger sur les processus pouvant influencer la diversité génétique des populations et leurs répercussions sur les capacités d'adaptation de cette espèce. C'est dans ce contexte que je me suis intéressé au cycle d'*Alexandrium minutum*. Dans un premier temps, je me suis intéressé au phénomène de reconnaissance gamétique. Le titre de l'article "Having sex, yes, but with whom?" (Billard *et al.* 2011) résume bien la question que nous nous sommes posé dans le chapitre 1. Nos résultats montrent clairement que chez *A. minutum* la reconnaissance gamétique constitue un processus complexe où les fusions ne sont pas régies par un système bipolaire comme c'est généralement le cas chez de nombreux organismes. En effet, même si nous avons eu certains problèmes techniques liés à l'identification des kystes sexués et des kystes temporaires dans nos cultures, nos résultats sur l'observation des fusions révèlent qu'il existe d'une part des fusions intra-clones, et que d'autre part plus de deux types gamétiques sont nécessaires pour expliquer les fusions observées. Ces observations rappellent les résultats obtenus chez certains champignons basidiomycètes qui présentent un nombre de types sexuels pouvant varier de 2 types gamétiques à un millier selon les taxons. Ces basidiomycètes peuvent également être anisogame ou isogame et les transitions entre ces différentes conditions sont fréquentes (Billiard *et al.* 2010). De façon générale, les types sexuels sont sélectionnés pour maximiser la recombinaison chez une espèce (Czaran *et al.* 2004) et par conséquent la recombinaison ne devrait pas se faire entre génotypes haploïdes différents (Nauta *et al.* 1992).

Chez *A. minutum* on peut supposer par ailleurs, que la fusion des cellules pourrait être sélectionnée non pas seulement pour générer une descendance variable génétiquement mais aussi pour produire des kystes de résistance capable de survivre face aux conditions environnementales défavorables. Cette hypothèse pourrait expliquer le fait que certaines souches puissent être homothalliques, comme nous l'avons observé dans notre expérience de croisement. En effet, nos résultats montrent que les zygotes issus de fusion intra clone peuvent germer et donner des descendances viables, contrairement à ce qui avait été observé précédemment chez *A. tamarense* (Destombe and Cembella 1990).

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les kystes temporaires sont capables de survivre *in vitro* pendant plusieurs mois au froid et à l'obscurité. Si tel est le cas dans les populations naturelles, on peut supposer que ce type de kyste pourrait jouer un rôle majeur dans la persistance, la dispersion et l'installation des efflorescences d'*A. minutum*.

Enfin, un de nos objectifs était d'étudier la méiose chez cette espèce en analysant la ségrégation méiotique. En effet, il n'existait pas jusqu'à présent d'étude sur la recombinaison génétique chez cette espèce, confirmant ou infirmant l'existence de méiose. Seule la fusion avec la formation d'un planozygote et la germination du zygote (planomeiocyte) constituaient les arguments en faveur de l'existence de reproduction sexuée chez cette espèce. C'est pourquoi, nous avons entamé ce travail avec les marqueurs microsatellites développés par Nagai *et.al* (2006), mais les résultats préliminaires que nous avons obtenus ne nous permettent pas de trancher sur l'existence ou non de recombinaison (Annexe 3). En effet, ces marqueurs, qui ont été développés à partir de populations d'*A. minutum* du Japon, ne sont peut-être pas assez spécifiques pour étudier la ségrégation méiotique car ils présentent un nombre d'allèles nuls élevé. Par ailleurs, nos premiers résultats suggèrent également que le taux de mutation pas à pas serait relativement important à la germination des kystes, ce qui serait en partie responsable de la forte diversité génétique que nous avons observée en populations naturelles. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus récemment sur la diatomée *Pseudo-nitzschia multistriata* qui montrent des taux de mutation pour certains locus microsatellites relativement élevés pendant la méiose (Tesson *et al.* 2013). Il serait donc intéressant de poursuivre le travail que nous avons commencé en génotypant les parents et les descendants que nous avons obtenus lors des croisements et en utilisant des marqueurs plus performants. Des nouveaux marqueurs microsatellites devraient être mis au point prochainement à partir de séquences des souches locales que nous avons isolées en Bretagne (Rance, Penzé, Daoulas et Aber Wrac'h). Ces nouveaux marqueurs devraient nous permettre de compléter notre étude et répondre aux questions qui restent encore non élucidées sur la stratégie de reproduction de cette espèce.

L'utilisation des outils de biologie moléculaire a permis au cours de ces dernières années, d'aborder la question de la diversité génétique des organismes planctoniques (Barreto *et al.* 2011 ; Erdner *et al.* 2011 ; Nagai *et al.* 2007 ; Richlen *et al.* 2012). Toutes ces études révèlent une diversité intra spécifique relativement importante suggérant la possibilité d'adaptation locale dans certaines populations. C'est donc dans ce contexte que je me suis intéressé à l'étude de la diversité génétique spatio-temporelle chez *A.minutum* à une échelle régionale, en comparant les deux sites que sont la Penzé et la Rance, séparés approximativement par 150 km, et à des échelles temporelles en étudiant la diversité génétique entre années (2010 et 2011) et au cours des évènements d'efflorescence.

Grâce à l'utilisation des marqueurs microsatellites, nous avons montré que les efflorescences *d'A. minutum* présentaient une diversité génétique très élevée et que les génotypes étaient tous différents les uns des autres au sein des efflorescences. Ces résultats suggèrent que la reproduction clonale n'est pas dominante au cours des évènements d'efflorescence. La diversité génétique de ces efflorescences pourrait être maintenue par des germinations de kystes sexués ou par de la reproduction sexuée sans enkystement. Le fait qu'aucun déséquilibre de liaison globale n'ait été observé dans cette étude suggère que la recombinaison est suffisante pour rompre les liaisons entre loci, confirmant ainsi l'existence de reproduction sexuée au cours des efflorescences d'*A. minutum.*

Les comparaisons spatiales (entre Penzé et Rance), et temporelles (entre années et entre périodes d'efflorescence) montrent des différenciations significatives aux deux échelles. La différence spatiale indique un flux de gènes restreint entre les deux sites et cela principalement au cours des blooms. En effet, les efflorescences qui se développent généralement pendant les marées de morte-eau restent relativement isolées au sein des estuaires ce qui pourrait expliquer que les deux sites étudiés se différencient au cours des efflorescences. Dans notre étude, nous observons une différenciation génétique interannuelle de même ordre de grandeur que la différenciation intra-efflorescence. Ceci suggère que les efflorescences peuvent se former soit à partir de kystes de l'année précédente, soit à partir de cellules végétatives migrantes issues de dispersion d'un autre site, ou encore à partir de kystes sexués provenant des différentes cohortes enfouies dans les sédiments. Il n'est pas exclu que certains paramètres biotiques, tels que la prédation et/ou le parasitisme, jouent également un rôle clé dans le maintien de cette diversité. Néanmoins, quelque soient ces facteurs, nous montrons dans ce travail comment la reproduction sexuée et/ou la migration sont susceptibles d'effacer les effets de la sélection qui surviennent tous les ans pendant les efflorescences d'*A. minutum*.

La migration des cellules végétatives ou des kystes de résistance pourrait jouer un rôle prépondérant dans le fonctionnement des populations d'*A. minutum.* Pour aborder cette question nous nous sommes intéressés à la structure génétique des populations *A. minutum* sur la côte Nord Bretonne de la Rade de Brest à la Rance. Nous avons étudié des échantillons des populations prélevés en Baie de Morlaix, en Penzé, dans

l'Aber Wrac'h, dans la rivière de Daoulas et en Rance mais aussi des échantillons provenant du sud de l'Europe (Espagne et l'Italie). De façon générale, l'analyse de la diversité génétique en fonction de l'isolement par la distance géographique montre que les flux de gènes sont limités entre populations. Ces résultats suggèrent que la migration est relativement restreinte entre estuaires et/ou que le système de colonisation des nouveaux sites (par développement rapide des efflorescences et par la formation d'un grand nombre de kystes de résistance au sein des estuaires) pourrait constituer un système génétique particulier présentant une forte inertie au changement (tampon génétique) et en particulier aux nouveaux migrants (compétition).

Par ailleurs, l'analyse génétique des différentes populations révèle que les efflorescences récentes observées en Bretagne en 2012 à Daoulas et à Aber Wrac'h sont génétiquement différentes des populations de la Baie de Morlaix et de la Rance. En revanche, ces populations sont relativement apparentées aux populations du sud de l'Europe. Ces résultats suggèrent que les efflorescences de Daoulas et de l'Aber Wrac'h pourraient avoir été introduites récemment via des activités anthropiques (aquaculture et transport maritime).

Finalement dans le dernier chapitre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la variabilité intra-spécifique en étudiant la variation du taux de croissance individuel des souches isolées. Les analyses des taux de croissances sur 158 souches d'*A. minutum* ont montré une variabilité phénotypique élevés pour ce caractère. La comparaison entre les souches Penzé et de Rance révèle des différences significatives de croissance entre ces deux sites quelle que soit l'année. Enfin, notre étude met en évidence que le taux de croissance des souches dépend de leur période d'isolement. Les souches isolées au milieu des efflorescences, c'est-à-dire au moment où les densités de cellules sont les plus importantes, présentent les taux de croissances les plus élevés tandis que les souches isolées au début des efflorescences présentent les taux les plus faibles. Ces résultats suggèrent que le taux de croissance (en tant que composante de la valeur sélective) est un caractère fortement soumis à la sélection. La variabilité observée au cours de notre étude pourrait donc peut-être résulter d'une stratégie de cycle de vie face aux différents facteurs environnementaux abiotiques (température, nutriment) et biotique (compétition intra et inter-spécifique, parasite).

L'intégration des différentes données obtenues au cours de cette thèse, nous permet aujourd'hui de mieux comprendre le scénario éco-évolutif sur les phénomènes d'efflorescence d'algues toxiques, de leur dispersion ainsi que sur les différentes stratégies mises en place au cours de l'évolution chez les dinoflagellés. Plus globalement, ce projet a permis de développer une transversalité entre des approches de génétique des populations et des approches écologiques, et de mieux comprendre la dynamique des efflorescences, ce qui devrait permettre d'améliorer la gestion durable des ressources dans le domaine marin et le développement de l'aquaculture.

RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

RÉFÉRENCES GÉNÉRALE

A

Adair WS, Hwang C, Goodenough UW (1983) Identification and visualization of the sexual agglutinin from the mating-type plus flagellar membrane of Chlamydomonas. Cell 33, 183-193.

Agapow P-M, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1, 101-102.

Aguilera-Belmonte A, Inostroza I, Carrillo KS, *et al.* (2013) The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of Alexandrium catenella (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. In: *Harmful Algae*, pp. 55-59.

Alpermann TJ (2009) Evolutionary ecology of Alexandrium (Dinophyceae) with special emphasis on genotypic and phenotypic variation in the toxigenic species A. tamarense. vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie & Chemie) der Universität Bremen 191-pp.

Alpermann TJ, Beszteri B, John U, Tillmann U, Cembella AD (2009) Implications of life-history transitions on the population genetic structure of the toxigenic marine dinoflagellate Alexandrium tamarense. *Molecular Ecology*, 18, 2122-2133.

Anderson DM, Wall D (1978) Potential importance of benthic cysts of gonyaulax tamarensis and G. excavata in initiating toxic dinoflagellate blooms1,2,3. Journal of Phycology 14, 224-234.

Anderson DM (1980) Effects of temperature conditioning on development and germination of gonyaulax tamarensis (dinophyceae) hypnozygotes1. *Journal of Phycology* 16, 166-172.

Anderson DM, Chisholm SW, and Watras CJ (1983). ''Importance of the life cycle events in the population dynamics of Gonyaulax tamarensis." *Mar. Biol*. 76, 179–189.

Anderson DM, Kulis DM, Binder BJ (1984) Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate Gonyaulax tamarensis: cyst yield in batch cultures. Journal of Phycology 20, 418-425.

Anderson DM, Lindquist NL (1985) Time-course measurements of phosphorus depletion and cyst formation in the dinoflagellate Gonyaulax tamarensis Lebour. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 86, 1-13.

Anderson, D. M., Coats, D. W. and Tyler, M. A. (1985) Encystment of the dinoflagellate Gyrodinium uncatenatum: temperature and nutrient effects. J. Phycol., 21, 200–206.

Anderson DM, Kulis GJ, Sullivan JJ, Hall S, Lee C (1990) Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates Alexandrium spp. Mar. Biol. 104, 511-524.

Anderson DM (1998) Physiology and bloom dynamics of toxic Alexandrium species with emphasis on life cycle transitions. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms, 41, 29-48.

Anderson, D M, Alpermann, T J, Cembella, A D, Collos, Y, Masseret, E, Montresor, M (2012). The globally distributed genus Alexandrium: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. Harmful Algae, 14, 10-35.

Anderson DM, Keafer BA, Kleindinst JL, et al. Alexandrium fundyense cysts in the Gulf of Maine: Long-term time series of abundance and distribution, and linkages to past and future blooms. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.

Anglès S, Jordi A, Garcés E, Basterretxea G, Palanques A (2010) Alexandrium minutum resting cyst distribution dynamics in a confined site. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57, 210-221.

Anglès S, Garcés E, Hattenrath-Lehmann TK, Gobler CJ (2012) In situ life-cycle stages of Alexandrium fundyense during bloom development in Northport Harbor (New York, USA). *Harmful Algae* 16, 20-26.

Arnaud-Haond S, Belkhir K (2007) GenClone 1.0: a new program to analyse genetics data on clonal organisms. *Molecular Ecology Note*s, 7, 15–17.

B

Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11, 155-165.

Barrett, R.D.H. & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends Ecol. Evol*., 23, 38–44.

Barreto FS, Tomas CR, McCartney MA (2011) AFLP fingerprinting shows that a single Prymnesium parvum harmful algal bloom consists of multiple clones. *Journal of Heredity*, 102, 747-752.

Baas Becking LGM (1934) Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N Bonhomme F (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bell G (1982) The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality Springer.

Bell G, Koufopanou V (1991) The Architecture of the Life Cycle in Small Organisms. Philosophical Transactions: Biological Sciences 332, 81-89.

Bell G (1997) Experimental evolution in Chlamydomonas. I. Short-term selection in uniform and diverse environments. Heredity 78, 490-497.Bengtsson BO (2003) Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. Journal of evolutionary biology, 16, 189-199.

Bell G (2005) Experimental sexual selection in Chlamydomonas. Journal of evolutionary biology 18, 722-734.

Billiard S, López-Villavicencio M, Devier B, *et al.* (2010) Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biological Reviews* 86, 421-442.

Bilton, Paula, Bishop (2002) Dispersal, Genetic Differentiation and Speciation in Estuarine Organisms. In: Estuarine, Coastal and Shelf Science, pp. 16-16.

Blackburn SI, Hallegraeff GM, Bolch CJ (1989) Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate Gymnodinium catenatum from tasmania, australia1. Journal of Phycology 25, 577-590.

Blackburn SI, Bolch CJS, Haskard KA, Hallegraeff GM (2001) Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate Gymnodinium catenatum (Dinophyceae). Phycologia 40, 78-87.

Bolch CJS, de Salas MF (2007) A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates Gymnodinium catenatum and the Alexandrium “tamarensis complex” to Australasia. Harmful Algae 6, 465-485.

Bolnick DI, Amarasekare P, Araújo MS, Bürger R (2011) Why intraspecific trait variation matters in community ecology. Trends in Ecology & Evolution, 26, 183–192.

Brand, L. and Guillard, R. R. L. and Lynda S. Murphy (1981) A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. J. Plankton Res., 3, 193–201.

Bravo, I., Vila, M., Maso´, M., Ramilo, I., Figueroa, R.I., 2008. Alexandrium catenella and Alexandrium minutum blooms in the Mediterranean Sea: Toward the identification of ecological niches. Harmful Algae 7 (4), 515–522.

Bravo I, Isabel Figueroa R, Garcès E, Fraga S, Massanet A (2010) The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of Alexandrium minutum cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 57, 166-174.

Brosnahan ML, Kulis DM, Solow AR, *et al.* Outbreeding lethality between toxic Group I and nontoxic Group III Alexandrium tamarense spp. isolates: Predominance of heterotypic encystment and implications for mating interactions and biogeography. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57, 175-189.

Brown AH, Feldman MW, Nevo E (1980) Multilocus structure of natural populations of Hordeum spontaneum. *Genetics*, 96, 523-536.

Bull JJ (1987). Evolution of phenotypic variance. *Evolution* 41, 303-315.

Burt A, Carter DA, Koenig GL (1996) Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen Coccidioides immitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 93, 770-773

Bürger R, (1999) Evolution of genetic variability and the advantage of sex and recombination in changing environments. *Genetics* 153, 1055–1069.

C

Campbell L, Ivy JM, Loret P, Villareal TA (2002). Linking population and physiological diversity in Karenia brevis from the Texas coast. Harmful Algae. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanogrphic Commission of UNESCO. 446-448.

Cannon, J.A., 1993. Germination of the toxic dinoflagellate, Alexandrium minutum, from sediments in the Port River, South Australia. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. *Elsevier Sciences Publishers*, pp. 103–107.

Cannon, J A (1996) Competition between the dinoflagellates Alexandrium minutum and Prorocentrum micans in the Port River, South Australia. In Yasumoto, T., Oshima, T. & Fukuyo, Y. [Eds.] Harmful and Toxic Algae. IOC of UNESCO, Paris, pp. 381–4.

Casabianca S, Penna A, Pecchioli E, *et al.* (2011) Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate Alexandrium minutum in the Mediterranean Sea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 129-138.

Casteleyn G, Leliaert F, Backeljau T, *et al.* (2010) Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 12952-12957.

Cembella AD (2003) Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. Phycologia.

Cermeno P, Falkowski PG (2009) Controls on diatom biogeography in the ocean. Science, 325, 1539-1541.

Chambouvet A, Morin P, Marie D, Guillou L (2008) Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science*, 322, 1254-1257.

Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 237-268.

Charlesworth D, Wright SI (2001) Breeding systems and genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 685-690.

Cho K, Hiramatsu M, Ogawa T, Omura T, Ishimaru Y Oshima (2008) Non-toxic and toxic subclones obtained from a toxic clonal culture of Alexandrium tamarense (Dinophyceae): toxicity and molecular biological feature Harmful Algae 7, 740–751.

Cloern JE (1991) Tidal stirring and phytoplankton bloom dynamics in an estuary. *Journal of marine research* 49, 203-221.

Crawford NG (2010) SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10, 556-557.

Crespo BG, Keafer BA, Ralston DK, Lind H, Farber D, Anderson DM (2011) Dynamics of Alexandrium fundyense blooms and shellfish toxicity in the Nauset Marsh System of Cape Cod (Massachusetts, USA). Harmful Algae 12, 26-38

D

Dale B (1983) Dinoflagellate resting cysts: "Benthic plankton,". In G. A. Fryxell [ed.], Survival strategies of the algae. *Cambridge Univ. Press* p. 69-136

De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K (2002) The Monopolization Hypothesis and the dispersal–gene flow paradox in aquatic organisms. Acta oecologica 23, 121-135.

De Meeûs T, McCoy KD, Prugnolle F, et al. (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". Infection, Genetics and Evolution 7, 308-332.

De Meeûs T, Guégan JF, Teriokhin AT (2009) MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. BMC Bioinformatics 10, 443.

Deng H-W, Lynch M (1996) Change of genetic architecture in response to sex. Genetics, 143, 203-212.

Destombe C, Cembella A (1990) Mating-type determination, gametic recognition and reproductive success in Alexandrium excavatum (Gonyaulacales, Dinophyta), a toxic red-tide dinoflagellate. Phycologia 29, 316-325.

Destombe C, Oppliger LV (2011) Male gametophyte fragmentation in Laminaria digitata: a life history strategy to enhance reproductive success. In: Cahiers de biologie marine.

Doblin, M., Blackburn, S., Hallegraeff, G., 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: Gymnodinium catenatum, Alexandrium minutum (Dinophyta) and Chaetoceros cf. tenuissimus (Bacillariophyta). Journal of Plankton Research 21, 1153–1169.

Dolan JR (2005) An introduction to the biogeography of aquatic microbes. In: Aquatic Microbial Ecology.

E

Eckert CG (2001) The loss of sex in clonal plants. Evolutionary Ecology, 15, 501-520.

Elbrächter M (2003) Dinophyte reproduction: progress and conflicts. Journal of Phycology 39, 629-632.

Erdner DL, Richlen M, McCauley LAR, Anderson DM (2011) Diversity and Dynamics of a Widespread Bloom of the Toxic Dinoflagellate Alexandrium fundyense. PLoS ONE 6, e22965.

Estrada, M, Solé, J, Anglès, S, Garcés, E (2010). The role of resting cysts in Alexandrium minutum population dynamics. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 57, 308-321.

Etheridge, S.M., Roesler, C., 2005. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for Alexandrium fundyense isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy Deep-Sea Research II, 52, pp. 2491–2500

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14, 2611-2620.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10, 564-567.

F

Falkowski P Ocean Science: The power of plankton. Nature 483, S17-S20.

Figueroa RI, Bravo I (2005) Sexual reproduction and two different encystment strategies of lingulodinium polyedrum (dinophyceae) in culture1. Journal of Phycology 41, 370-379.

Figueroa, R., Rengefors, K., (2006) Effects of parental factors and meiosis on sexual offspring of Gymnodinium nolleri (Dinophyceae) - Figueroa - 2006 - Journal of Phycology - Wiley Online Library. Journal of Phycology.

Figueroa, R.I., Rengefors, K., (2006) Life cycle and sexuality of the freshwater raphidophyte Gonyostomum semen (Raphidophyceae). Journal of Phycology 42, 859–871.

Figueroa RI, Bravo I, Garcés E (2006) Multiple routes of sexuality in alexandrium taylori (dinophyceae) in culture. Journal of Phycology 42, 1028-1039.

Figueroa RI, Garcés E, Bravo I (2007) Comparative study of the life cycles of Alexandrium tamutum and Alexandrium minutum (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture. Journal of Phycology, 43, 1039-1053.

Figueroa RI, Garcés E, Camp J (2010) Reproductive plasticity and local adaptation in the host parasite system formed by the toxic Alexandrium minutum and the dinoflagellate parasite Parvilucifera sinerae. Harmful Algae, 1-8.

Figueroa RI, Vázquez JA, Massanet A, Murado MA, Bravo I (2011) Interactive effects of salinity and temperature on planozygote and cyst formation of Alexandrium minutum (Dinophyceae) in culture. Journal of Phycology, 47, 13-24.

Figueroa RI, Rengefors K, Bravo I, Bensch S From homothally to heterothally: Mating preferences and genetic variation within clones of the dinoflagellate Gymnodinium catenatum. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57, 190-198.

Finlay BJ, Fenchel Tom (2004) Cosmopolitan Metapopulations of Free-Living Microbial Eukaryotes. Protist 155, 237-244.

Fisher RA (1930) The genetical theory of natural selection. Oxford: Oxford University Press.

Fistarol GO, Legrand C, Rengefors K, Granéli E (2004) Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology* 6, 791-798.

Flores-Moya A, Rouco M, Garcia-Sanchez MJ, Garcia-Balboa C, Gonzalez R, Costas E, Lopez-Rodas V. (2012) Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum under selection of increased temperature and acidification. Ecol. Evol., 2 (6), 1251–1259.

Fritz L, Anderson DM, Triemer RE (1989) Ultrastructural aspects of sexual reproduction in the red tide dinoflagellate gonyaulax tamarensis. *Journal of Phycology* 25, 95-107.

G

Garcés E, Bravo I, Vila M, Figueroa R. I, Maso M, Sampedro N (2004) Relationship between vegetative cells and cyst production during Alexandrium minutum bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). Journal of Plankton Research, 26, 637-645.

Garcés E, Vila M, Masó M, Sampedro N , Giacobbe MG and Penna A. (2005). Taxon specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions estimated by the dilution technique. Marine Ecology Progress Series 301, 67‑79.

Giacobbe MG, Yang X (1999) The life history of Alexandrium taylori (Dinophyceae). Journal of Phycology 35, 331-338.

Giacobbe, M.G., Oliva, F.D., Maimone, G., 1996. Environmental factors and seasonal occurrence of the dinoflagellate Alexandrium minutum, a PSP potential producer, in a Mediterranean lagoon. Estuarine, Coastal and Shelf Science 42 (5), 539–549.

Godhe, A., Noren, F., Kuylenstierna, M., Ekberg, C., Karlson, B., 2001. Relationship between planktonic dinoflagellate abundance, cysts recovered in sediment traps and environmental factors in the Gullmar Fjord, Sweden. Journal of Plankton Research 23, 923–938.

Gotelli, N.J., 1995. A primer of ecology. Sinauer Associates Incorporated.

Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity 86, 485-486.

Goudet J (1999) PCA-GENE, version 1.2. http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm. (Accessed 08 April 2013).

Goudet J (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. (Accessed 08 April 2013).

Grzebyk D, Béchemin C, Ward CJ (2003) Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate Alexandrium minutum. J Plankton Res 25: 1185-1199

Gsell AS, de Senerpont Domis LN, Przytulska-Bartosiewicz A, *et al.* (2012) Genotype-by-temperature interactions may help to maintain clonal diversity in Asterionella formosa (Bacillariophyceae). Journal of Phycology, 48, 1197-1208.

Guichoux E, Lagache L, Wagner S, *et al.* (2011) Current trends in microsatellite genotyping. Molecular Ecology Resources 11, 591-611.

Guillard RRL (1973) Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Stein JR (ed) Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, p 69–85.

Guisande, C., Frango´pulos, M., Maneiro, I., Vergara, A.R., Riveiro, I., 2002. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate Alexandrium minutum under phosphorus limitation. Marine Ecology Progress Series 225, 169–176.

Gómez A, Carvalho GR (2000) Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. Molecular Ecology, 9, 203-214.

H

Hairston J, N G, Kearns CM, Ellner SP (1996) Phenotypic variation in a zooplankton egg bank. Ecology, 77, 2382-2392.

Halim, Y (1960) Alexandrium minutum nov. g., nov. sp., a dinoflagellate causing red water. Vie et Milieu, 11, 102-105.

Halkett F, Simon JC, & Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends Ecol. Evol*. 20, 194–201

Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase*. Phycologia 32, 79-99.

Hansen, Daugbjerg, Franco (2003) Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of Alexandrium minutum (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2, 19-19.

Hedgecock D, Barber PH, Edmands S (2007) Genetic approaches to measuring connectivity. Oceanography-Washington Dc-Oceanography Society- 20, 70.

Hoekstra RF (1987) The evolution of sexes. Experientia. Supplementum 55, 59-91.

Honnay O, Bossuyt B (2005) Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? In: Oikos.

Hoppenrath M, Leander BS (2008) Molecular phylogeny of a new marine sand-dwelling prorocentrum species, p. tsawwassenense (dinophyceae, prorocentrales) from British Columbia, Canada. J. *Phycol.* 44, 451-66.

Hwang DF, Lu YH (2000) Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*. 38, 1491–1503.

J

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics 23, 1801-1806.

John EH, Flynn KJ (2000) Growth dynamics and toxicity of Alexandrium fundyense (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels European Journal of Phycology, 35, pp. 11–23

John, U., Medlin, L.K., Groben, R., 2005. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the Alexandrium tamarense species complex. Journal of Plankton Research 27, 199–204.

Johnston MO (1992) Effects of Cross and Self-Fertilization on Progeny Fitness in Lobelia cardinalis and L. siphilitica. Evolution 46, 688-702.

Jombart, T., 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24, 1403–1405.

Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11, 94.

Jost L (2008) G (ST) and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17, 4015-4026.

K

Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.-M., 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Harmful Algae 2, 29–41.

Keafer BA, Buesseler KO, Anderson DM (1992) Burial of living dinoflagellate cysts in estuarine and nearshore sediments. Marine Micropaleontology 20, 147-161.

Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, *et al.* (2010) What Is a Microsatellite: A Computational and Experimental Definition Based upon Repeat Mutational Behavior at A/T and GT/AC Repeats. In: *Genome Biology and Evolution*, pp. 620-635.

Kim C-H, Cho H-J, Shin J-B, Moon C-H, Matsuoka K (2002) Regeneration from hyaline cysts of Cochlodinium polykrikoides (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. Phycologia 41, 667-669.

Koenig WD, Van Vuren D, Hooge PN (1996) Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. Trends in Ecology & Evolution 11, 514-517.

Kremp AA, Godhe AA, Egardt JJ, *et al.* (2012) Intraspecific variability in the response of bloom-forming marine microalgae to changed climate conditions. Ecology and Evolution 2, 1195-1207.

Kwon, Hyeong Kyu ; Park, Ji A ; Yang, Han-Soeb ; Oh, Seok Jin (2013) Dominance and Survival Strategy of Toxic Dinoflagellate Alexandrium tamarense and Alexandium catenella Under Dissolved Inorganic Nitrogen-limited Conditions; *Journal of the Korean Society for Marine Environment & Energy* 16:1,25-35 DOI : 10.7846/JKOSMEE.2013.16.1.25

L

Laabir M, Jauzein C, Genovesi B, (2011) Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate Alexandrium catenella colonizing Mediterranean *Journal of plankton Research* 33 (10), 1550-1563.

Leander BS, Keeling PJ (2004) Early evolutionary history of dinoflagellates and apicomplexans (alveolata) as inferred from hsp90 and actin phylogenies - Leander - 2004 - Journal of Phycology - Wiley Online Library. In: J*ournal of Phycology*.

Lebret K, Kritzberg ES, Figueroa R, Rengefors K (2012) Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. Environmental Microbiology 14, 2395-2404.

Leis JM (2002) Pacific coral-reef fishes: the implications of behaviour and ecology of larvae for biodiversity and conservation, and a reassessment of the open population paradigm. Environmental Biology of Fishes 65, 199-208.

Lepelletier F, Karpov SA, Le Panse S, Bigeard E, Skovgaard AA, Jeanthon C, Guillou L (2013) Parvilucifera rostrata sp. nov., a novel parasite in the phylum Perkinsozoa that infects the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum (Dinophyceae). *Protist*, (Submitted).

Levin LA, Huggett D, Myers P, Bridges T, Weaver J (1993) Rare-earth tagging methods for the study of larval dispersal by marine invertebrates. *Limnology and Oceanography* 38, 346-360.

Lilly, E.L., Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Institution, W.H.O., 2003. Phylogeny and biogeography of the toxic dinoflagellate Alexandrium.

Lilly EL, Halanych KM, Anderson Dm (2005) Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the Alexandrium minutum group. *Harmful Algae* 4, 1004-1020.

Lilly EL, Halanych KM, Anderson DM (2007) Species boundaries and global biogeography of the Alexandrium tamarense complex (Dinophyceae)1. Journal of Phycology 43, 1329-1338.

Lim P, Leaw C, Usup G, Kobiyama A, Koike K, Ogata T (2006) Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: Alexandrium tamiyavanichii and Alexandrium minutum (Dinophyceae). Journal of Phycology 42, 786–799.

Lowe WH, Allendorf FW What can genetics tell us about population connectivity? Molecular Ecology 19, 3038-3051.

M

Marie D, Simon N, Guillou L, Partensky F, Vaulot D (2000). DNA, RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. In: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, Inc.11, 12, 1-18.

Marie D, Partensky F, Vaulot D, Brussaard C (2001) Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples. In: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, Inc.

Masseret E, Grzebyk D, Nagai S, *et al.* (2009) Unexpected Genetic Diversity among and within Populations of the Toxic Dinoflagellate Alexandrium catenella as Revealed by Nuclear Microsatellite Markers. Applied and Environmental Microbiology 75, 2037-2045.

Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. Marine Pollution Bulletin 53, 620–630.

Mauger S, Couceiro L, Valero M (2012) A simple and cost-effective method to synthesize an internal size standard amenable to use with a 5-dye system. Prime Journals, 2, 40-46.

Maynard-Smith J (1971) What use is sex? In: Journal of Theoretical Biology, pp. 319-335.

Maynard-Smith J (1978) The evolution of sex. Cambridge University Press, London, U.K.

Maynard-Smith J, Hoekstra R (1980). Polymorphism in a varied environment: how robust are the models? Genetic Research, 35, 45-57.

Maynard-Smith J, Smith N. H, O'Rourke M, and Spratt B. G (1993). How clonal are bacteria? Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 90, 4384-4388.

McCauley LAR, Erdner DL, Nagai S, Richlen ML, Anderson DM (2009) Biogeographic analysis of the globally distributed harmful algal bloom species Alexandrium minutum (Dinophyceae) based on rRNA gene sequences and microsatellite markers. Journal of Phycology, 45, 454-463.

McCue K, Holtsford T (1998) Seed bank influences on genetic diversity in the rare annual Clarkia springvillensis (Onagraceae). *American Journal of Botany*, 85, 30-30.

McManus M, Woodson C Plankton distribution and ocean dispersal. The Journal of experimental biology 215, 1008.

McQuoid MR, Godhe A, Nordberg K (2002) Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. European Journal of Phycology 37, 191-201.

Medlin LK, Lange M, Nothig E (2000) Genetic diversity in the marine phytoplankton: a review and a consideration of Antarctic phytoplankton. Antarctic Science 12, 325-333.

Medlin LK, Cembella AD (2013) Biodiversity of Harmful Marine Algae pp. 470-484. Waltham, MA: Academic Press. In: … of Biodiversity.

Mizushima K, Matsuoka K (2004) Vertical distribution and germination ability of Alexandrium spp. cysts (Dinophyceae) in the sediments collected from Kure Bay of the Seto Inland Sea, Japan. Phycological Research 52, 408-413.

Monsen NE, Cloern JE, Lucas LV, Monismith SG (2002) A comment on the use of flushing time, residence time, and age as transport time scales. Limnol Oceanogr 47: 1545-1553

Montagnes D, Chambouvet A, Guillou L (2008) Responsibility of microzooplankton and parasite pressure for the demise of toxic dinoflagellate blooms. Aquatic Microbial Ecology, 53, 211-225.

Montresor, M., Sgrosso, S., Procaccini, G., Kooistra, W., 2003. Intraspecific diversity in Scrippsiella trochoidea (Dinopbyceae): evidence for cryptic species. Phycologia.

Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaulot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. Nature, 409, 607-610.

Musgrave A, Eijk E, Welscher R, Broekman R, Lens P (1981) Sexual agglutination factor from Chlamydomonas eugametos. Planta 153, 362-369.

N

Nagai S, Itakura S, Matsuyama Y, Kotani Y (2003) Encystment under laboratory conditions of the toxic dinoflagellate Alexandrium tamiyavanichii (Dinophyceae) isolated from the Seto Inland Sea, Japan. Phycologia 42, 646-653.

Nagai S, Matsuyama Y, Oh S-J (2004) Effect of nutrients and temperature on encystment of the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. Plankton Biology and Ecology 51, 103-109.

Nagai S, MCcauley L, Yasuda N, et al. (2006) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum (Dinophyceae). Molecular Ecology Notes, 6, 756-758.

Nagai S, Lian C, Yamaguchi S, *et al.* (2007) MIcrosatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense (Dinophyceae) In Japanese Coastal Waters. Journal of Phycology 43, 43-54.

Nehring S (1998) Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. Archive of Fishery and Marine Research.

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, USA.

Nordborg MM (2000) Linkage disequilibrium, gene trees and selfing: an ancestral recombination graph with partial self-fertilization. In: Genetics, pp. 923-929.

Norris RD (2000) Pelagic species diversity, biogeography, and evolution. Paleobiology, 26, 236-258.

O

Odum E (1983) Basic ecology. W.B. Sauders, Philadephia

P

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annual Review of Ecology and Systematics, 547-572.

Palumbi SR (1994) Reproductive isolation, genetic divergence, and speciation in the sea. Annual Review of Ecology and Systematics. 25, 547-572.

Palumbi SR (2001) The ecology of marine protected areas. Marine community ecology 9, 509-530.

Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. Ecological Applications 13, S146-S158.

Parkhill, J.P., Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate Alexandrium tamarense from northeastern Canada. Journal of Plankton Research.

Pfiester L A, Anderson D M (1987) Dinoflagellate reproduction. In Taylor, F. J. R. (ed.), The Biology of Dinoflagellates. *Blackwell Science, Oxford*, pp. 611–648.

Pitcher GC, Cembella AD, Joyce LB, Larsen J, Probyn R.A, Sebastián R (2007) The dinoflagellate Alexandrium minutum in Cape Town harbour (South Africa): Bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. Harmful Algae, 6, 823-36.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics.

Probert I, Lewis J, Erard-Le Denn E (2002) Morphological details of the life history of Alexandrium minutum (Dinophyceae). Cryptogamie Algologie, 23, 343-55.

Q

Quinn GP, Keough MJ (2002) Cambridge University Press - 537 pages

R

Ribeiro S, Berge T, Lundholm N, *et al.* (2011) Phytoplankton growth after a century of dormancy illuminates past resilience to catastrophic darkness. Nature Communications 2, 311.

Richerd S, Destombe C, Cuguen J, Valero M (1993) Variation of Reproductive Success in a Haplo-Diploid Red Alga, Gracilaria verrucosa: Effects of Parental Identities and Crossing Distance. American Journal of Botany 80, 1379-1391.

Richlen ML, Erdner DL, McCauley LAR, Libera K, Anderson DM (2012) Extensive genetic diversity and rapid population differentiation during blooms of Alexandrium fundyense (Dinophyceae) in an isolated salt pond on Cape Cod, MA, USA. Ecology and Evolution, 2, 2588-2599.

Rispe C, Pierre JS, Simon JC, Gouyon PH (1998) Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. Journal of Evolutionary Biology, 11, 685-701.

Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Notes.

Roze D (2012) Disentangling the benefits of sex. In: PLoS Biol., pp. e1001321-e1001321.

Russell G (1986) Oceanography And Marine Biology - Books. In: Oceanogr Mar Biol Ann Rev.

Rynearson TA, Armbrust EV (2000) DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom Ditylum brightwellii. Limnology and Oceanography, 45, 1329-1340.

Rynearson TA, Virginia Armbrust E (2004) Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom ditylum brightwellii (bacillariophyceae) 1. Journal of Phycology 40, 34-43.

Rynearson TA, Armbrust EV (2005) Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom Ditylum brightwellii. Molecular Ecology, 14:1631–1640.

Rynearson TA, Newton JA, Armbrust EV (2006) Spring bloom development, genetic variation, and population succession in the planktonic diatom Ditylum brightwellii. Limnology and Oceanography, 51, 1249-1261.

S

Scholin CA, Anderson DM (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed Alexandrium (Dinophyceae). I. Rflp analysis of SSU rRNA genes. Journal of Phycology, 30, 744-754.

Scholin C, Hallegraeff G, Anderson D (1995) Molecular evolution of the Alexandrium tamarense'species complex'(Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions. Phycologia 34, 472-485.

Sherr E, Sherr B (2008) Understanding roles of microbes in marine pelagic food webs: a brief history. Microbial Ecology of the Oceans, Second Edition, 27-44.

Silvertown J (2008) The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. International journal of plant sciences, 169,157-168.

Smayda TJ (2007) Reflections on the ballast water dispersal—harmful algal bloom paradigm. Harmful Algae 6, 601-622.

Smith JM, Hoekstra R (1980) Polymorphism in a varied environment: how robust are the models? Genet. Res 35, 45-57.

Smith JM, Maynard-Smith J (1978) The evolution of sex Cambridge Univ Press.

Sommer U (1996) Plankton ecology: The past two decades of progress. Naturwissenschaften 83, 293-301.

Souza, V., Turner, P.E., Lenski, R.E., 1997. Long term experimental evolution in Escherichia coli. V. Effects of recombination with immigrant genotypes on the rate of bacterial evolution. Journal of. Evolutionary Biology.10, 743–769.

Stern, R.F., Horak, A., Andrew, R.L., Coffroth, M.-A., Andersen, R.A., Küpper, F.C., Jameson, I., Hoppenrath, M., Véron, B., Kasai, F., Brand, J., James, E.R., Keeling, P.J., 2010. Environmental Barcoding Reveals Massive Dinoflagellate Diversity in Marine Environments. PLoS ONE 5, e13991.

T

Teriokhin, A.T., De Meeûs, T., Guegan, J.F. 2007. On the power of some binomial modifications of the Bonferroni multiple test. Zh. Obshch. Biol. 68, 332-340.

Tillmann, U., 2003. Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. J Eukaryot Microbiol 51, 156–168.

Touzet N, Francob JM, Raine R (2007) Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of Alexandrium minutum (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland Toxicon, 50,106–119.

Turpin DH, Dobell PER, Taylor FJR (1978) Sexuality And Cyst Formation In Pacific Strains Of The Toxic Dinoflagellate Gonyaulax Tamarensis. Journal of Phycology 14, 235-238.

V

Valero M, Richerd S, Perrot V, Destombe C (1991) Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. In: Trends in Ecology & Evolution, pp. 25-29.

Varela D, Paredes J, Alves-de-Souza C, Seguel M, Sfeir A, Frangópulos M (2012) Intraregional variation among Alexandrium catenella (Dinophyceae) strains from southern Chile: Morphological, toxicological and genetic diversity. Harmful Algae, 15, pp. 8–18

Vila M, Camp J, Garcés E, Masó M, Delgado M (2001) High Resolution Spatio-temporal Detection of Potentially Harmful Dinoflagellates in Confined Waters of the NW Mediterranean. In: Journal of Plankton Research, pp. 497-514.

Vila,M., Giacobbe,M.G.,Maso´,M., Gangemi, E., Penna, A., Sanpedro, N., Azzaro, F., Camp, J., Galluzzi, L., 2005. A comparative study on recurrent blooms of Alexandrium minutum in two Mediterranean coastal areas. Harmful Algae 4 (4), 673–695

Von Stosch HA (1973) Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, Gymondinium pseudopalustre Schiller and Woloszynskia apiculata sp. nov. British Phycological Journal 8, 105-134.

W

Weismann A (1889) The significance of sexual reproduction in the theory of natural selection. In: Poulton EB, Schönland S, Shipley AE, eds. Essays upon heredity and kindred biological problems. Oxford: Clarendon. pp 251–332.

Wood, A.M., Everroad, R.C., 2005. Algal Culturing Techniques - Google Books. Algal culturing techniques.

Wyatt T, Jenkinson IR (1997) Notes on Alexandrium population dynamics. Journal of Plankton Research, 19, 551-575.

Y

Yamaguchi, M., Itakura, S., Uchida, T., 2001. Nutrition and growth kinetics in nitrogen-or phosphorus-limited cultures of the “novel red tide “dinoflagellate Heterocapsa circularisquama (Dinophyceae). *Phycologia*, 40 (3), 313-318.

ANNEXES

ANNEXE 1

Identification des échantillons à l'aide de marqueurs génétiques des échantillons

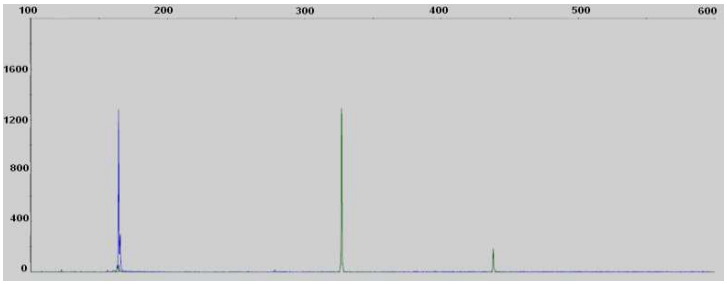
Toutes les souches qui font l'objet d'analyses au cours de ces travaux de thèse ont été génétiquement identifiées. En effet plusieurs espèces de microalgues du genre *Alexandrium* se ressemblent morphologiquement. Pendant les collectes des individus (isolement de souches monoclonales par micromanipulation) il est probable de confondre deux espèces différentes. Pour remédier à ce problème, nous avons décidé de faire des identifications génétiques de chacune des souches isolées par des méthodes de TRFLP et de séquençage des régions inter-génique de l'ADN ribosomique (ITS).

La TRFLP des séquences ITS

La TRFLP est une méthode rapide, sensible et reproductible, qui s'adresse aussi bien aux cultures qu'à des échantillons plus complexes (communautés naturelles). Elle permet d'évaluer la diversité de communautés et ne nécessite aucune information sur les séquences des génomes des organismes à identifier. Plusieurs travaux ont fait usage de cette méthode. Elle a été appliquée par exemple à l'étude des communautés complexes microbiennes dans des environnements divers tel que le sol (Derakshani *et al.,* 2001), en milieu marins (Eschenhagen *et al.*, 2003), pour la caractérisation de la flore bactérienne buccale dans la salive de patients qui souffrent de parodontite par rapport à des sujets sains (Sakamoto *et al.*, 2003). La TRFLP a aussi récemment été utilisée pour évaluer la composition des communautés du pico et nanoplancton photosynthétique dans la mer de Beaufort (Balzano *et al.*, 2011).

Cette technique consiste à extraire de l'ADN génomique est d'amplifier un gène cible. La majorité des travaux sur la TRFLP, est basée sur les séquences 16S r RNA, dans notre étude, les séquences cibles choisies est la région intergénique de l'opéron ribosomique comprise entre la petite et la grande sous unité (ITS 1, 5.8S et ITS 2). Les amplifications sont faites avec un couple d'amorces marquées (fluorescentes). Les produits des amplifications, sont soumis à une digestion par une enzyme de restriction permettant une bonne discrimination des cibles. Dans notre cas, l'analyse des profils de restriction a montré que l'enzyme Tse1 permet une bonne discrimination de l'ensemble des espèces d'*Alexandrium* connues. Cette enzyme est efficace à 65°C durant toute une nuit. Les produits de cette digestion sont génotypés et les tailles des fragments générés sont lues grâce à GeneMapper (version v4.0). Sur la figure 5, on voit clairement la distinction entre deux espèces de dinoflagellé faite grâce à la technique de la TRFLP. En complément à la TRFL, le séquençage montre qu'il n'existe aucune variabilité intraspécifique des séquences ITS chez *A. minutum.*

(a)



(b)

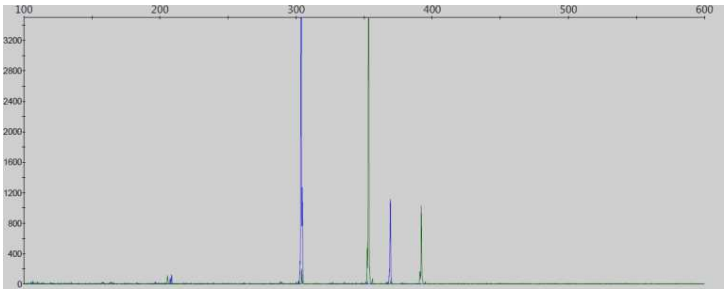


Figure 5: Tailles des fragments obtenus par TRFLP sur deux souches monoclonales de dinoflagellés. En (a) *Alexandrium minutum* pics à 163 et 326 pb et en (b) *Heterocapsa triquetra.*

ANNEXE 2

Chronicle of a marine invasion by toxic microalgae: the Penzé estuary as a case study

Chapelle Annie, Alves-de-Souza Catharina, Claire Labry, Marc Sourisseau, Charlène Guéguen, Angélique Gobet, Pascal Morin, Christian Jeanthon, Christophe Destombe, Raffaele Siano, Frédéric Lepelletier, **Aliou Dia**, Mathieu Guri, Dominique Marie, Estelle Bigeard, Verney Romaric, Guillou Laure

Introduction

Harmful Algal Blooms (HABs) result from the rapid increase and local accumulation of opportunistic and often toxic microalgae, which cause water discolorations, massive faunal deaths and even fatal toxicity in humans. Beside the fact that few microalgae have been listed among alien species in very particular cases (Olenina *et al.* 2010, http://www.nobanis.org/, http://www.corpi.ku.lt/nemo/alien_species_search.html, http://www.europe-aliens.org/) species responsible for HABs are rarely considered as invasive. This is mainly due to the currently accepted definition of what 'should be' an invasive species. An invasive species is a non-native species that is not naturally present in the native assemblage, but that has been moved beyond the limits of its normal geographic ranges by human actions (Blackburn *et al.* 2011; Pysek *et al.* 2004). This definition, widely used by ecologists working on animals and plants, is not suitable for microbiologists. First, it is often difficult to have a good definition of what is a species for microbes due to the reproduction mode and the plasticity of their genomic content. Second, while the natural geographic range of a plant or an animal is rather easy to define, this is not a simple task for microbes. Whilst often dominated by few taxa, the species richness of marine microbes in a single sample is impressive, and composed in majority by rare taxa, representing less than 1% of the total abundance (called the rare biosphere, Pedrós-Alió 2007; Sogin *et al.* 2006). This pattern is observed for both bacteria and protists. The widely accepted hypothesis considers that marine microbes have dense populations and high dispersive capacity. Consequently, their spatial distribution is broad, leading to the Baas-Becking hypothesis (1934), stating that "everything is everywhere, but the environment selects". Based on this postulate, presence of alien species is a non-sense in marine planktonic communities. However, recent molecular data indicate that distribution patterns of marine microalgae reflect historical, ecological and local conditions, and that most species are genetically structured rather than simple panmictic populations (Casabianca *et al.* 2012; Dia *et al. in Press* and *in prep*; Tahvanainen *et al.* 2012). Blooming microalgae have their own parasites, and some of them are able to control HABs (Montagnes *et al.* 2008). The enemy release hypothesis (ERH, Elton 2000; Keane and Crawley 2002), which postulates that aliens could be ecologically successful because local pests are not adapted enough to ensure their regulation, was recently suggested to occur also for toxic proliferating microalgae (Chambouvet *et al.* 2008).

In order to unify microbiologists and terrestrial ecologist's point of views, we argue that invasion processes should be studied at the population level for any kind of species, and that episodic and unprecedented harmful microalgal blooms must be seen as the result of invasive populations. Advantages to work on microbes are considerable. Coevolutionary processes occurring between aliens and local enemies, such as the long-term equilibrium, should be more rapid for microbes characterized by large population sizes and short generation times (Strayer *et al.* 2006).

Based on this statement, the aim of the present study is to provide evidences that several concepts developed on large organisms could also be applied on unicellular marine microalgae. We chose to focus on *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate) known to produce paralytic toxins (paralytic shellfish poisoning, PSP) that can be accumulated along the trophic food web. PSP events could be lethal for human in case of poisoning, typically by ingestion of contaminated shellfish. Indeed, very highly productive and previously preserved shellfish areas, such as the northern U.K., France, Ireland, and Norway, but also the coasts of Alaska, British Columbia and southern Chile, are now frequently and often persistently contaminated by PSP toxins transferred from different *Alexandrium* species.

In this study, we analyzed recurrence of *A. minutum* blooms using the longest time-series published to date (24 consecutive years) in a semi-confined ecosystem, the Penzé estuary (western part of the Channel, Brittany, France). This time-series covers different phases corresponding to lag, boom and bust periods typical for a lot of invasive species. This work describes the specific ecological niche of *A. minutum* populations, compares the evolution of several intrinsic properties (period of growth and growth rates), and analyzes the evolution of phytoplanktonic assemblages over year. This is the first long-term data/time series highlighting such characteristics in a microalga.

Material and Methods

Study area

The Penzé estuary is located along the French coast of Brittany (Finistère), in the English Channel (48°37'N; 3º56'W, Fig.. 1). The Channel is renowned for having strong tidal flows and the tidal range inside the estuary fluctuates from 1.8 to 9.2 m. Because the Penzé estuary is relatively shallow (depth lower than 4 m in most of the river, Supplementary Fig. 1), the sea penetrates deeply into the flooded valley (estimated to 6 km). This river (81 km long) flows into the Morlaix Bay. Affluents are Coat Toulzac'h, Eon and Traon rivers, for a total of 141 km^2 of catchment area. Pig and fish farming are important origins of nutrient in the river (> 100,000 individuals and 250-380 tons per year, respectively). In the Morlaix Bay, shellfish production (mainly *Crassostrea gigas*) was up to 6,900 tons per year until 2008. This production was decreasing these recent years because of unexplained massive mortalities of juveniles.

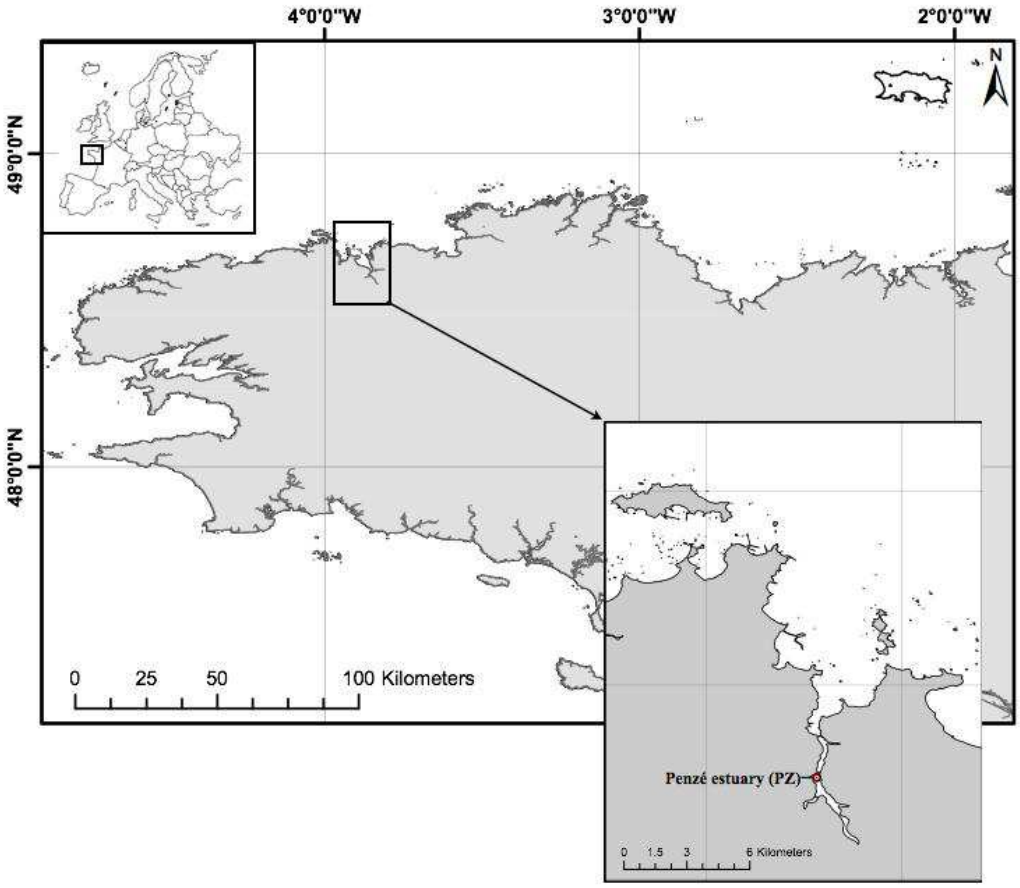


Figure 1. Map of the Penzé estuary (Western coast of the Channel, Finistère, France)

The Penzé river flow is rather modest, ranging from 0.92 to 4.4 $m^3.s^{-1}$ in June (min and max for years 2003 and 2007, respectively, Supplementary Fig. 2), the most important force being the tidal flow. This estuary is well-mixed due to its shallow depth and a strong tidal regime (macrotidal). A marked salinity gradient is thus observed across the river, but constant salinities values are reported throughout the water column (Fig. 2).

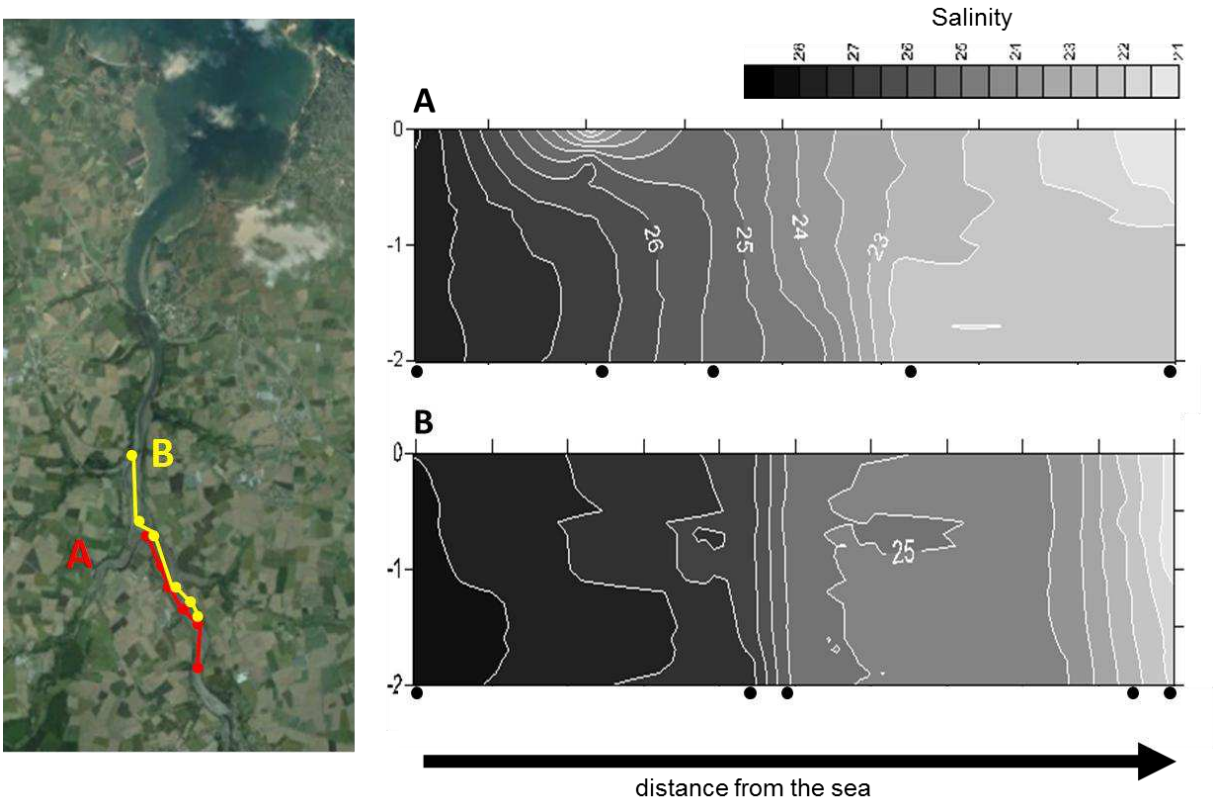


Figure 2. Salinity gradients along the water column (0 to 2 meter depth) in the Penzé estuary. The two transects (A and B) were processed two hours before high tide. (A): June 14, 2010, tidal coefficient = 91. (B): July 5, 2010, tidal coefficient = 43

Environmental data collection

The Penzé estuary was monitored from 1988 to 2012. The complete database resulted in the compilation of data obtained by 1) the REPHY ("Le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines") network created in 1984 to monitor phytoplankton and phycotoxins along French coasts and 2) in the frame of several projects coordinated by the Ifremer since 1997 (Pnoc, AELB, Interreg IIIB-ERDF Icrew 2000-2006, Interreg IIIB NEW Final 2005-2008), and by the Station Biologique of Roscoff (SBR) (GIS Génomique Marine 2004-2009, ANR Aquaparadox 2006-2010, and ANR Paralex 2010-2012, PI: L. Guillou). In total, the toxic species *A. minutum* was quantified in 1251 samples from January 1988 to October 2012 (Supplementary Fig. 3).

Samples were collected using flat bottom boats. A portable probe was used on board to measure *in situ* temperatures and salinities. The sampling strategy was refined over time.

Strategy used by the REPHY

Different water sampling stations along the estuary were sampled by the REPHY corresponding to different strategies: the "Flortot" strategy counting all microphytoplankton species, water temperature,

salinity, turbidity (NTU), Chlorophyll and nutrients and the "Florpar" strategy, counting *Alexandrium* and species that make exceptional blooms, water temperature, salinity, turbidity (NTU). The Flortot stations are sampled every 2 weeks and the Florpar every week when launched. Samples are taken in sub-surface waters. Phytoplankton cells counts of lugol-preserved samples were made in laboratory after sedimentation in 10-50 mL Utermöhl chambers (Belin and Neaud-Masson 2012). Shellfish survey is also made by weekly sampling in shellfish areas when *Alexandrium* alert is launched (>10000 cell/l) and PSP measurements on dry flesh.

The sampling strategy for **the Ifremer research project** since 1997 was different according to year, either transect along the Penze estuary until the Bay of Morlaix at ebb tide either sampling at fixed point near the "pont de la Corde" during an entire or half a tidal cycle or both. Some measurements were systematically sampled and analysed (Dissolved Inorganic Nitrogen, Phosphate, Silicate, Suspended Particulate Matter, Chlorophyll a, Pheophytin a) and some were more selectively sampled (for instance Dissolved Organic Phosphorus, particulate Carbon, Nitrogen, Phosphorus). Generally all the phytoplankton species were counted but for some only *Alexandrium minutum* was identified.

To catch host-parasite dynamics (as the SBR projects focused on parasites), the sampling collection was strengthened to every 1-3 days. Samples were collected 2 hours before high tide at a salinity of 27 (previously determined as the optimum for *Alexandrium* growth, Maguer *et al.* 2004). Surface and 1 m depth waters were collected using a 10 L container or a Niskin bottle, respectively. Samples were prefiltered on board using a 63 µm nylon mesh to remove larger organisms and debris. Transects were performed following the salinity gradient in 2005, 2009, and 2010. In 2012, samples also collected at salinity 29 as well.
Nitrate and PO_4 were measured with an autoanalyzer Technicon (Tréguer and Le Corre 1975) and NH_4 by the indophenol blue method (Koroleff 1970), with analytical precisions of ±0.1 µmol L^{-1} for NO_{3-} and ±0.02 µmol L^{-1} for the other two nutrients in the range of concentrations measured.

Phytoplankton cell counts of lugol-preserved samples were made directly on board with an inverted microscope after sedimentation in 10-50 mL Utermöhl chambers.

Meteorology data (total irradiance, pluviosity, air temperature) were provided by Météo-France (http://publitheque.meteo.fr/okapi/accueil/okapiWebPubli/index.jsp). Daily maximal air temperatures were preferred to *in situ* surface water temperature, as this parameter was strongly dependent to the sampling hour (cooler during the morning).

Statistical analyses

Beta diversity analyses

Variation in phytoplankton community structure

Pairwise distance matrices were calculated from the phytoplankton abundance dataset using the Bray-Curtis dissimilarity index (Bray and Curtis 1957). The application of a non-metric multidimensional scaling (NMDS, Gower 1966) to the distance matrix allowed to determine the variation in phytoplankton community structure. Additionally, a hierarchical agglomerative clustering has been applied on the distance matrix by using Ward's minimum variance method (Ward 1963). The contribution of each taxa to the dissimilarity between samples has been calculated using the percentage of similarity, which allows to discriminate species creating dissimilarity patterns between 2 given groups of samples (Clarke 1993).

Relationships between phytoplankton community structure and abiotic variables

Temporal distribution of phytoplankton assemblages related to abiotic variables was evaluated by a Redundancy Analysis (RDA) using CANOCO 4.5 Software (Ter Braak 1995). Data were previously transformed logarithmically [ln9x+10] and organized in a "biological" matrix that included the abundance of the most abundant phytoplanktonic species and an "explanatory" matrix including nutrients (PO_4, NO_3+NO_2, $SiOH_4$), temperature, tide coefficient, air and water temperature, irradiance, and river flow (N = 221). Monte Carlo permutation testing (500 permutations, CANOCO 4.5) was used to determine the significance of the environmental variables and the first two ordination axes.

***In situ* growth rates**

In situ growth rates were estimated using this formula:

Net growth rate = *in situ* growth rate - dilution rate - mortality

Mortality mainly results from:

1) the encystment (almost negligible compared to the other following causes),

2) natural mortality (removed from the calculation as it is considered to be constant over years), and

3) mortality caused by grazers and parasites, which is density dependent, and likely negligible during the growing period (before the maximum of densities of *A. minutum*). All together we removed the mortality from the equation.

Due to advection and diffusion processes, planktonic populations are exported outside the estuary and this export is strongly modulated by the cumulative effects of the tidal intensity and the river flow. This parameter, called here the dilution rate (d-1), was estimated using the "e-flushing" time method (Monsen *et al.* 2002). This index was calculated with a 3D model of the Penzé estuary forced by different ranges of river flows and tidal intensities. The passive tracer was introduced in the waters with a salinity of 27□1 and the e-

flushing time (d) is the time required to lose 63% the initial concentration. The dilution rate was next estimated on a daily base according to the observed tide and river flow over 2010 and 2011.

Results

Recurrence of blooms from 1988 to 2012

Monitoring of the Penzé estuary was first established in June 1988, after the occurrence of several toxic blooms in the Morlaix Bay, adjacent to the Penzé estuary (Fig. 1). In the Morlaix Bay, *A. minutum* proliferations were recorded in July 1989 (3 x 10^6 cells L^{-1}), July 1990 (4 x 10^5 cells L^{-1}), and July 1992 (1.5 x 10^6 cells L^{-1}).

In the Penzé estuary, cell densities higher than 104 cells L^{-1} occurs during early summer, from end of May to early July (Fig. 3). Maximal cell densities can be observed in June, excepted for four years (1991, 1992, 1994, and 2007).

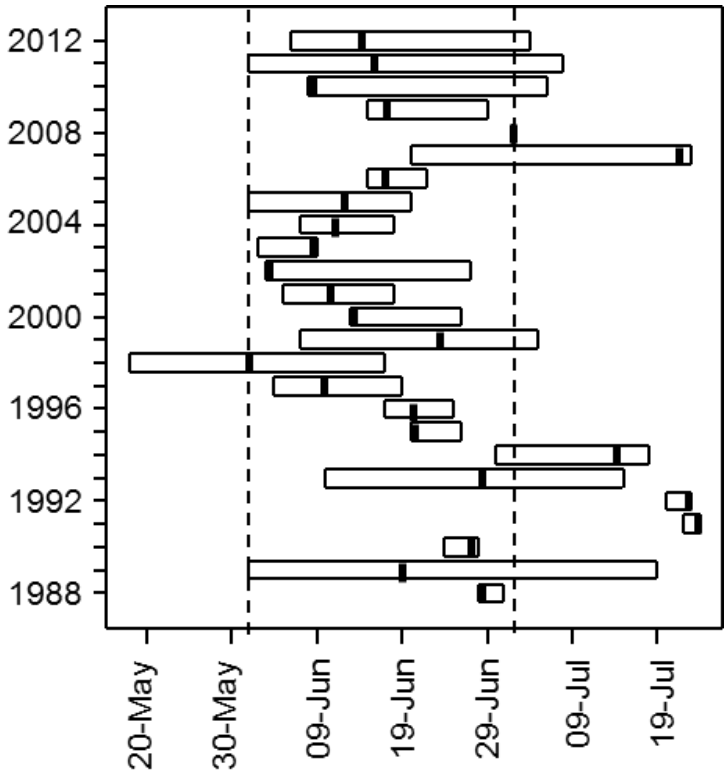


Figure 3. Temporal window for the occurrence of concentrations of *A. minutum* higher to 10^4 cells L^{-1} in the Penzé estuary. Maxima are indicated by transversal black lines

Considering maximal densities per year, a lag phase was observed from 1988 to 1992, with less than 8 x 10^4 cells L^{-1} (Fig. 3). From 1993 to 2001, concentrations higher than half million of cells were frequently detected (described as the boom phase). This threshold was never exceeded afterwards (2002-2012, described as the bust phase). The maximal and minimal densities were observed on June 13th 1997, with 4.46 x 10^7 cells L^{-1} and on 1st July 2008, with only 1.6 x 10^4 cells L^{-1}, respectively. *A. minutum* constituted > 96 % of the microplankton during outbreak in 1997 (Probert 1999). However, *A. minutum* was never observed as the

dominant species afterwards (from 1998 to 2012). *A. minutum* never exceeded 50% of total cell numbers, with the notable exception of a bloom in 2001 (13th June), where *A. minutum* accounted for up to 75% of total phytoplanktonic cells.

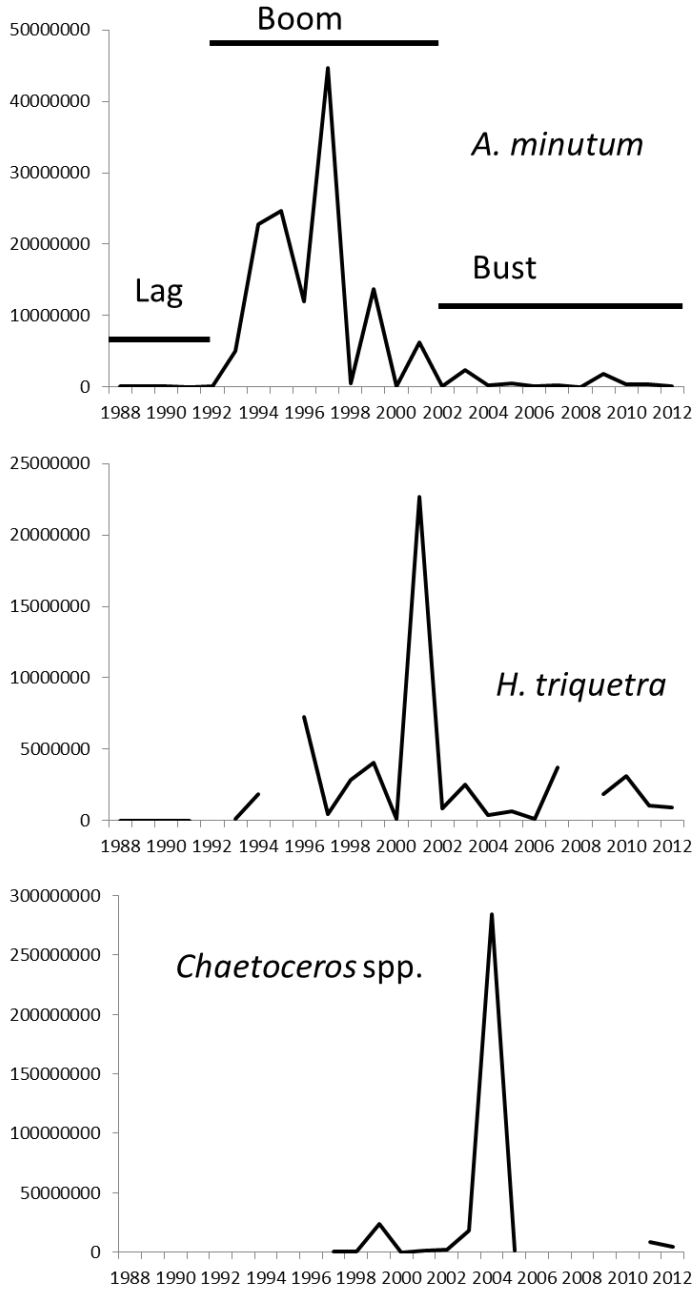


Figure 4. Early summer maximal densities (cells L^{-1}) of the dinoflagellate *A. minutum* and *H. triquetra* and the diatom *Chaetoceros* spp. from 1988 to 2012 in the Penzé estuary.

Physical and chemical constraints

During maximal abundances, *A. minutum* cell concentrations were measured along a salinity gradient during eight consecutive years (1998 to 2005, Table1). *A. minutum* concentrations were maximal along a wide range of salinities which differed each year from 19.2 in 2000 to 33.2 in 2005 (average of 26.4, Table 1).

Table 1 : Salinity ranges and *A. minutum* cell concentrations recorded along transects performed in the Penzé estuary during 1998 to 2005 outbreaks

Dates of the transects (DD/MM/YYYY)	Salinity gradient	*A. minutum* concentrations along the salinity gradient (min-max cells L^{-1})	Salinity at *A. minutum* maximum
03/06/1998	21.2 - 34.4	4×10^3 - 5.4×10^5	23.0
24/06/1999	24.4 - 34.8	1.2×10^5 - 1.4×10^7	26.0
26/06/2000	16.6 - 32.8	2×10^3 - 4.5×10^4	19.2
13/06/2001	0.87 - 34.5	0 - 5.7×10^6	27.8
18/06/2002	14.3 - 34	0 - 1.3×10^4	23.9
09/06/2003	25.9 - 33.6	1.5×10^4 - 9.5×10^5	28.6
14/06/2004	23.5 - 34.4	6×10^3 - 2.1×10^5	29.2
15/06/2005	22.4 - 34.7	4×10^2 - 4.5×10^5	33.2

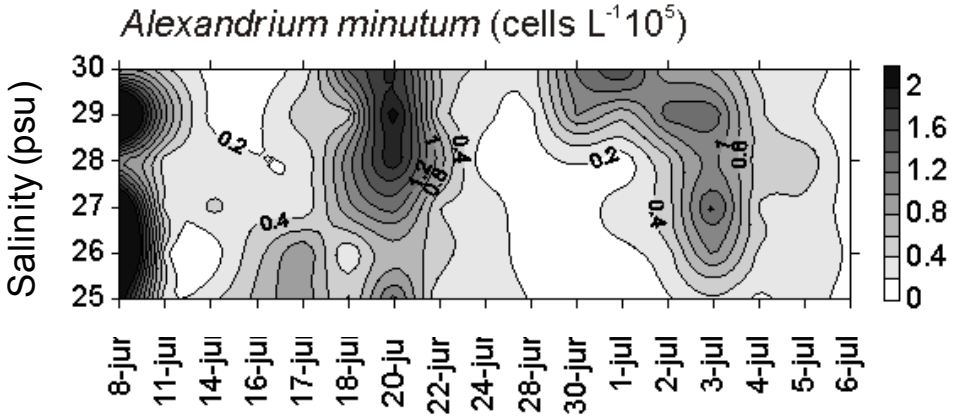


Figure 5: Densities of *A. minutum* recorded between salinity 25 to 30 during bloom of 2010 in the Penzé estuary

Spatio-temporal distribution of *A. minutum* was assessed during the 2010 bloom, using salinities as proxy (25 to 30 psu, Fig. 5). Populations were well growing from salinities of 26 to 30; without clear preference within this salinity range.

The Penzé estuary is also characterized by a marked eutrophication, with nitrate concentrations among the highest reported for the Finistère department (ECOFLUX report, Arnaud and Ragueneau 2009). The compilation of all nutrient data from the Ifremer/SBR datasets demonstrated that nutrient availabilities increase with decreasing salinities (Supplementary Fig. 4). At maximal cell densities, nitrate and nitrite concentrations were always upper than 50 µM (Fig. 6). Phosphate ranged from less than 0.1 (particularly in 2004) to more than 2 µM. Blooms always occurred at maximal air temperatures higher than 17°C and total irradiance higher than 1600 J cm^{-2} . For both latter parameters, the values are means of the 5 days preceding the events. Means of tidal intensities and river flows are variable among years during the same 5 days period. However, blooms always occurred during decreasing tidal coefficients. No correlations were observed between NO_3+NO_2 or temperature and *A. minutum* cell concentrations (Supplementary Fig. 5 and 6)

Biological constraints

Microphytoplanktonic assemblages are available since 1998. Several species having dense phytoplanktonic blooms, with more than 10^7 of cells L^{-1}, were observed within the 19-32 salinity range (Supplementary Table 1, Fig. 5). Most of them were the diatoms *Chaetoceros* spp., *Skeletonema* spp., and *Cylindrotheca closterium*. However, the dinoflagellate *H. triquetra* was also able to form dense blooms (up to 2.27 x 10^7 cells L^{-1} on June 13th 2001). Unidentified euglenophytes and *Tetraselmis*-like prasinophytes also formed such massive blooms.

Phytoplankton community patterns during *A. minutum* blooms (densities >10^5 cells L^{-1}), were visualized by NMDS analysis (Fig. 6). Samples were grouped according to year of collection. *A. minutum*, *H. triquetra* and *Chaetoceros* spp. contributed at 70% in the differentiation into 2 or 3 classes (simper analysis). Years dominated by *H. triquetra* (1998 and 2001) are clearly separated from those dominated by *Chaetoceros* spp. (1999, 2003 and 2004). *A. minutum* blooms with more than 10^5 cells L^{-1} did not seem directly linked to a specific phytoplanktonic assemblage.

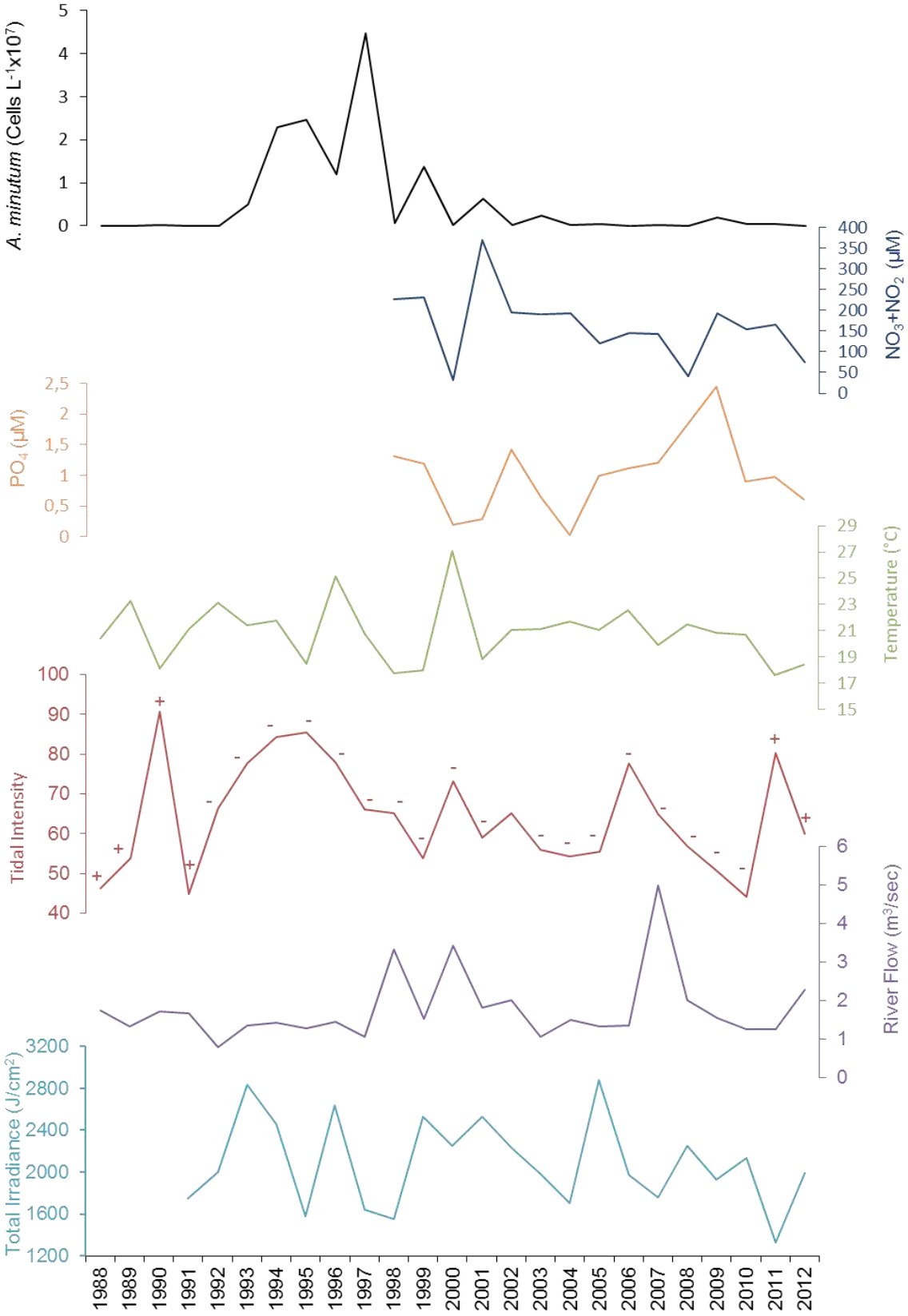


Figure 5. Physico-chemical parameters at the maximal cell abundance of *A. minutum* between 1988 to 2012. Nutrient concentrations correspond to the date of *A. minutum* maximal abundance. For other parameters, data correspond to the mean value from the previous 5 days. Tidal intensity (coefficient): + and – correspond to increasing or decreasing coefficients, respectively

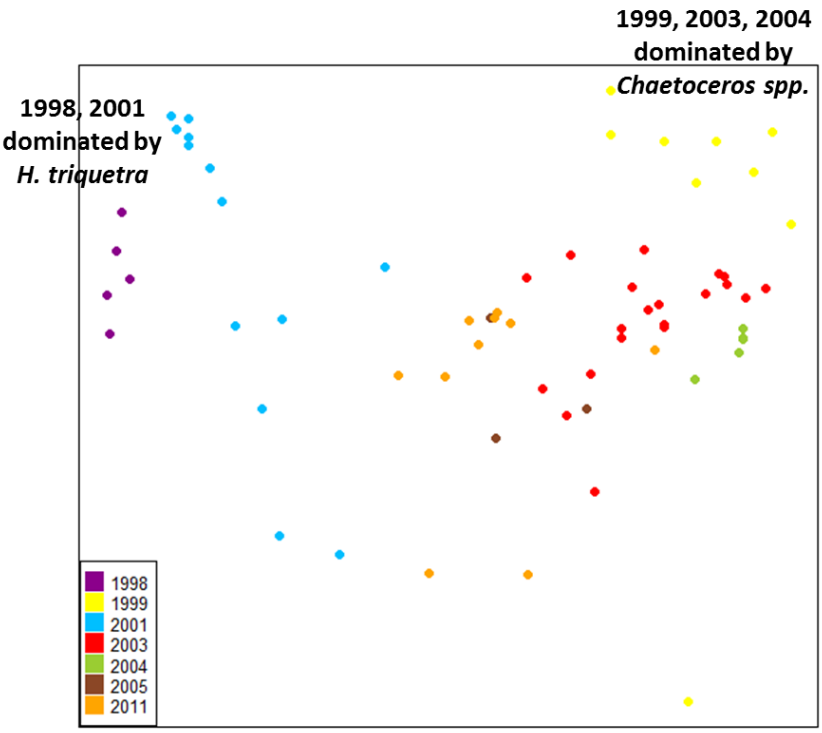


Figure 6. : Phytoplankton community patterns from 1998 to 2011. The non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination is based on a Bray-Curtis distance matrix calculated from samples having more than 100,000 Cell/L^{-1} of *A. minutum*. Samples were colored according to the year of collection. The low stress value of 10.81% indicates the goodness-of-fit of the 2 dimensional representation compared with the distance matrix.

The influence of abiotic variables on the composition of phytoplankton assemblages was assessed by a RDA (Fig. 7. Together, the eigenvalues of the first two canonical axes (0.091 and 0.057, respectively) explained 72.5% of the total variance. Species and abiotic variables showed correlation values of 0.70 and 0.57 on canonical axes 1 and 2, respectively. The compositional axis 1 was positively correlated with the riverflow (0.50) and negatively correlated with the tide coefficient (-0.32) whereas the compositional axis 2 was mainly correlated negatively with NO3+NO2 (-0.21). Both axes were statistically significant (Monte Carlo testing, $p < 0.01$) and the forward stepwise model indicated that all the environmental variables were individually significant explanatory variables ($p < 0.01$). The ordination diagram with the scores obtained indicated that *A. minutum* was positively correlated to NO3+NO2 and positively correlated to the irradiance. Most diatom species were negatively correlated to SiOH4 and positively correlated to temperature.

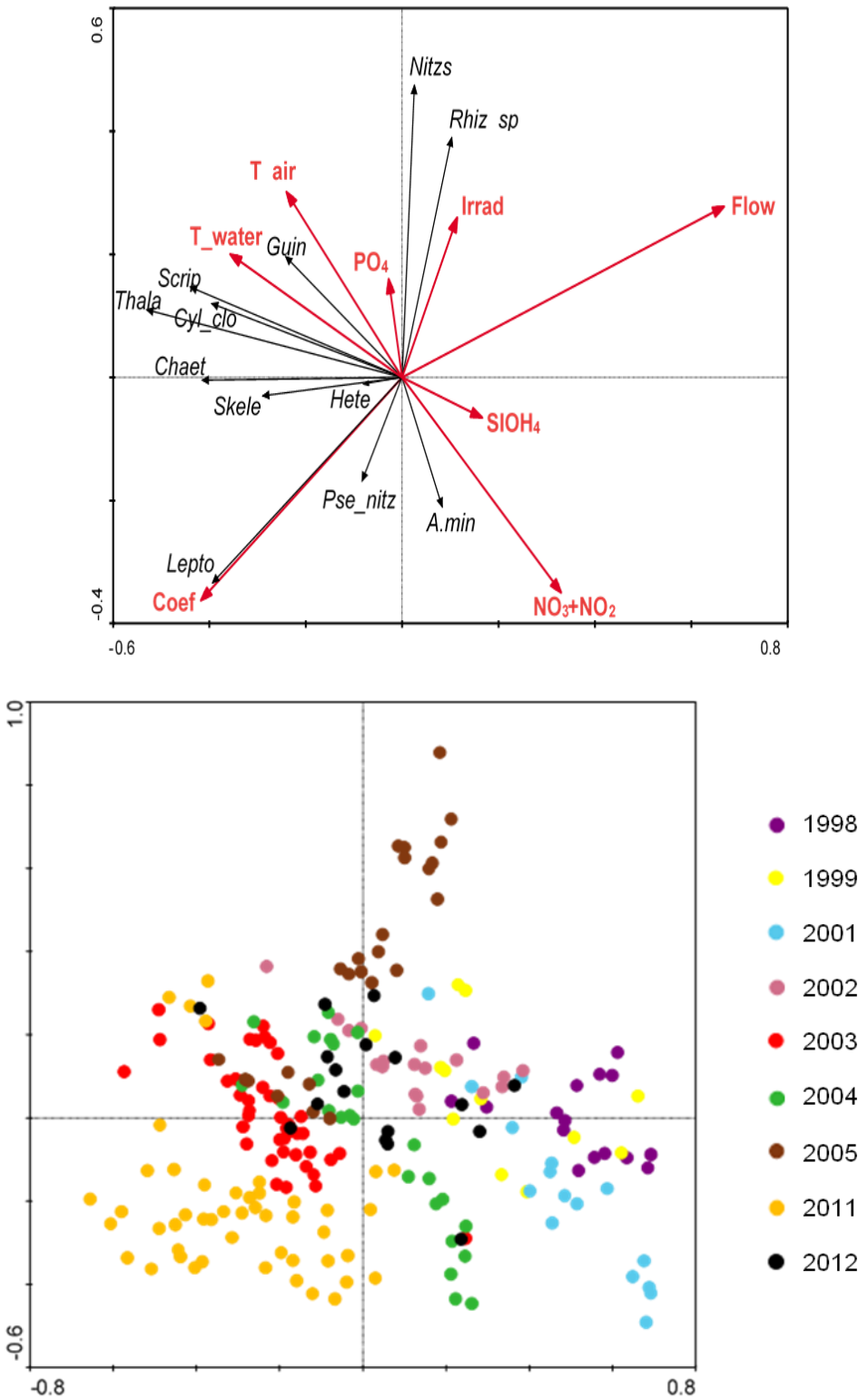


Figure 7: RDA analysis of total flora and environmental parameters from 1998 to 2012. Relationships between each abiotic variable and individual phytoplanktonic species distribution patterns indicated by angles between vectors. Collinear, opposite and orthogonal vectors, suggest positive, negative and independent species covariation patterns, respectively.

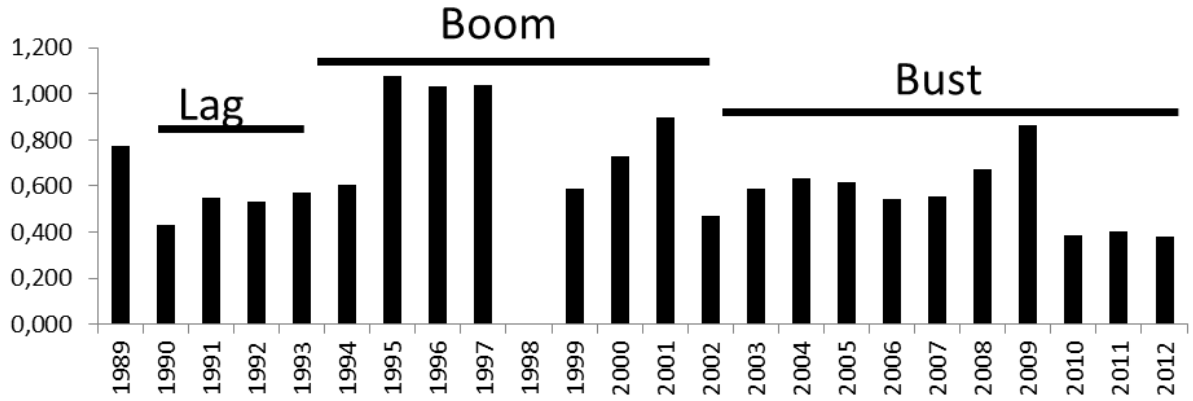


Figure 8. Growth rates (=net growth rates – dilution rates), estimated during *A. minutum* growing phases from 1989 to 2012. 1988 and 1998: missing data

Growing and declining periods correspond to positive and negative net growth. Mean growth rate during the growing period was estimated to 0.64 d^{-1} for the time-series (Fig. 8). This growing period generally lasted 2 to 3 weeks. However, trends in the slope of growing periods differed during lag, boom and bust periods (Fig. 8). Mean growth rates were similar during lag and bust stages (0.56 d^{-1}), and highest during the boom stage (0.81 d^{-1}). Years 1995-1997 showed highest growth rates (about 1 d^{-1}), whilst lowest values were observed during years 2010-2012 (less than 0.4 d^{-1}). In all cases, blooms crashed in about one week (Fig. 8).

Comparison of temporal dynamics of *A. minutum* between years is hindered by the difficulty to establish precisely the date of the exact beginning of blooms. To deal with that, we centralized per year the different time series on the maximum of cell concentrations. Days corresponding to the growth phase of the bloom were designed by negative values while the days corresponding to the decline phase were designed by positive values (Fig. 9). Regression analyses considering *A. minutum* concentrations only for the growth phase indicated that although the *A. minutum* concentrations observed during the boom period were the most elevated. Lag and early bust periods showed similar growth tendencies whilst, growth tendencies for the last bust period were slower.

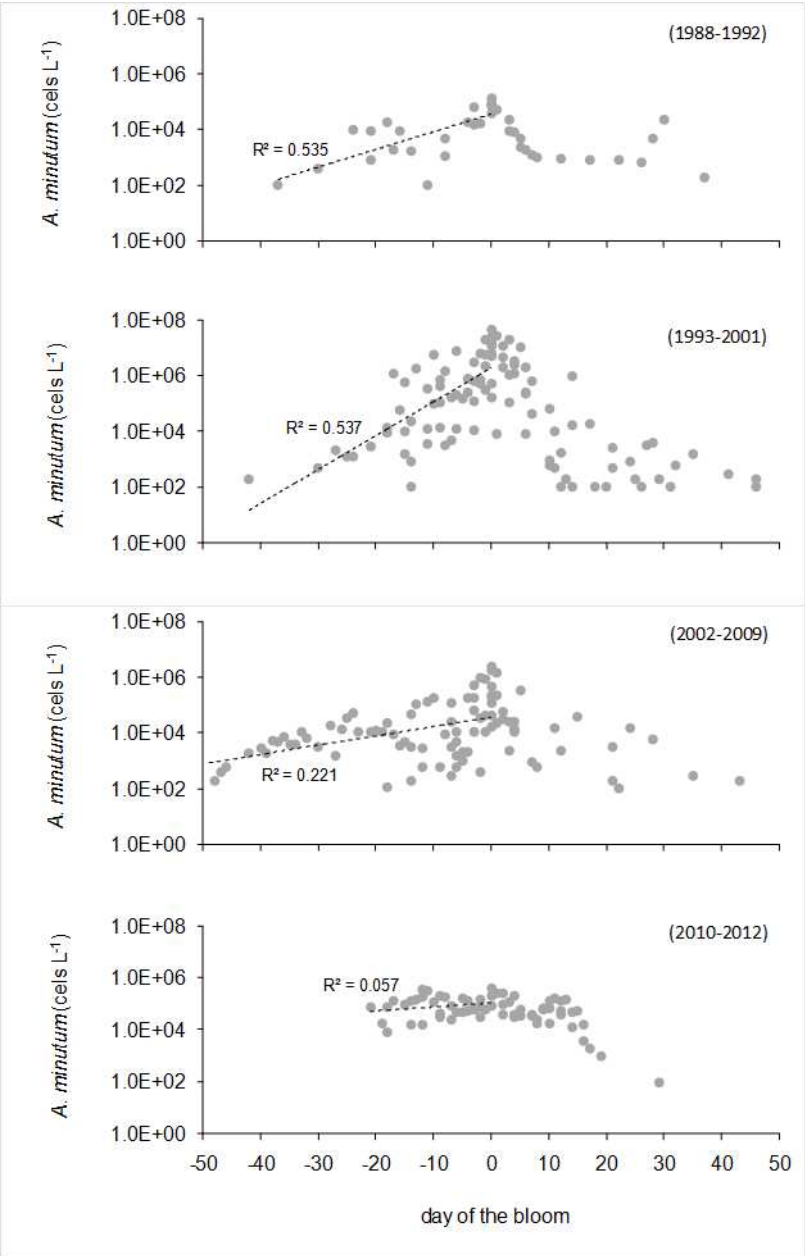


Figure 9. *In situ* net growth trends of *A. minutum* in the Penzé estuary during lag 1988-1993, boom (1994-2001), early bust (2002-2009) and late bust (2010-2012) periods. Linear regressions during the growth phase focused on the growing period (before the maximum of densities). Day 0 corresponds to the maximum of *A. minutum* densities

Discussion

A. minutum was originally described from the eutrophicated Alexandria Harbor, Egypt in the Mediterranean Sea (Halim 1960). This species was long considered to be restricted to warm waters (Hallegraeff *et al.* 1988). In particular, *A. minutum* was absent from the species list provided by Paulmier (1969), who described microphytoplankton assemblages during four consecutive years (1963-1966) in the Morlaix Bay and the Penzé estuary. *A. minutum* is rather small for a dinoflagellate (17-29 µm, Balech 1989). However, other phytoplanktonic species, as small as *A. minutum*, were remarkably well identified by Paulmier 1969, who recorded not less than 195 and 73 species of diatoms and dinoflagellates in the Penzé estuary, respectively. *A minutum* was suddenly detected in 1985 forming a toxic bloom along the French Atlantic coast (Bay of Vilaine with 6 x 10^5 cells L^{-1}). In 1987-1989, blooms of several millions of cells per liter were then detected in the Celtic Seas (Gross 1988; Nezan and Ledoux 1989). This species rapidly expanded in the North Sea (Hansen *et al.* 2003; Nehring 1998; Persson *et al.* 2000). The capacity of this dinoflagellate to produces through sexual reproduction very resistant cysts that can accumulate locally in sediments explains why this species became a recurrent problem in some locations. Geographical origin of this invasive species is unknown. European *A. minutum* strains are genetically different from those collected in New Zealand and Taiwan (Lilly *et al.* 2005) and northern European populations are clearly differentiated from those detected off the Portuguese coasts, in the Mediterranean Sea and South Africa (McCauley *et al.* 2009).

Alien invasions affect ecosystem functioning and are considered to be the second cause for the current species extinctions (Lodge 1993; Mooney and Cleland 2001; Parker *et al.* 1999; Simberloff and Rejmánek 2011; Williamson and Fitter 1996). Managing biological invasions depends on the central question of how a species becomes an invader. Three phases necessary for a successful biological invasion are introduction, establishment, and expansion (or spread) (Sakai *et al.* 2001). If introduction concerns the physical transportation of individuals to the novel habitat, establishment and expansion supposed that imported genotypes could successfully adapt and compete with local competitors, and thus find a favourable ecological niche for growth.

The preferred blooming habitat of *A. minutum* is confined to water bodies with low turbulence, high residence time and a high anthropogenic impact (Hansen *et al.* 2003; Vila *et al.* 2001). However, *A. minutum* is not observed in all ecosystems that share these characteristics. We argue that the Penzé estuary has several specific physical and chemical characteristics that play an important role in the observed recurrence and strength of blooms.

First, *A. minutum* present higher growth rates from salinities of 20 to 37 (Grzebyk *et al.* 2003). Accordingly, *A. minutum* develops well along a wide range of salinities in the Penzé estuary, with maximum

densities observed from 19.2 to 33.2. Its euryhaline character allows *A. minutum* to colonize a substantial part of the estuary during blooms, and to extend its habitat to enriched nutrient waters. At intermediate salinities from marine to fresh waters, nitrogen concentrations were never below 50 µM during blooms (this study) and a significant increase of phosphate diffusive fluxes was observed from March to June (Andrieux-Loyer *et al.* 2008). Therefore, nutrients never limited the primary production and this is confirmed by blooms recorded at more than 10 millions of cells produced by diatom and dinoflagellate, even during the *A. minutum* burst period. Second, as a characteristic of macrotidal estuaries forming clearly-marked salinity gradients, water column of the Penzé estuary is well mixed. This regime stabilizes in the upstream section *A. minutum* populations growing at lowest salinity, which have largest residence time especially during neap tides. Indeed, using microsatellite markers, a recent study demonstrated that *A. minutum* populations isolated at 27-29 were partially isolated during bloom events in 2010 and 2011 (Dia *et al.* In Press). The fact that *A. minutum* produces resting stages locally accumulated in the sediment certainly favours the retention of populations in such semi-confined ecosystems over years.

The *A. minutum* blooming period coincides with increasing temperature and phosphate pulses observed in June (Andrieux-Loyer *et al.* 2008). Irradiance is probably not as critical parameter, as growth of *A. minutum* appeared to saturate at relatively low irradiance in culture (Chang and McClean 1997). These conditions do not only favor the growth of *A. minutum*. Paulmier (1969) yet reported in the Penzé estuary a maximal phytoplanktonic abundance, mainly diatoms species, during late spring-early summer (April to July) with a maximum in June. With the notable exception of 1997, no monospecific bloom *A. minutum* was observed. Thus, it appears that this species does not exclude other competitive species, but rather is superimposed upon the existing phytoplanktonic assemblages.

Typical lag, boom and bust dynamics, a feature of an increasing number of biological invasions (Simberloff and Gibbons 2004), is described based upon maximal abundances of cells. This parameter mainly depends on *in situ* growth rates. Observed *in situ* growth rates result from 1) the natural growth of cells (i.e. vegetative reproduction), 2) cells from the germination of cysts, and 3) cells importation/transport from other locations. Contribution of cyst germination (estimated to hundreds of cells per liter, Anderson *et al.* 1983; Crespo *et al.* 2011), is relatively modest compared to bloom densities. Indeed, bloom formations much more depend on the net growth rate of populations rather than the inoculum size (Anderson *et al.* 2012; Estrada *et al.* 2010). Growth rates reported from 1995 to 1997 during the boom stage are among the highest reported for this species in cultures (about 1 d-1, Erard-Le Denn 1997; Probert 1999), and lead to the question on the importance of other processes such as cell import from another location. Blooms at more than one million of cells occurred in the Morlaix Bay, adjacent to the Penzé estuary, in 1989-1990 and 1992-1996. High growth rates reported in the Penzé estuary may be explained by the importation of cells from the Morlaix Bay in 1995

and 1996. However, this does not explain why such massive importation did not occur before 1991, and cannot explain maximal density observed in 1997.

Highest growth rates during the boom stage is compatible with the EICA (Evolution of Increased Competitive Ability) hypothesis suggesting that resources usually invest in defence are reallocated toward competitive ability, allowing invaders to grow faster and to be more fecund than in their original home (Blossey and Notzold 1995). In this context, lowest growth rates observed after 2010 may result in increasing cost of resistance, demonstrating co-evolutionary processes with their local enemies. Local parasites infecting *A. minutum* populations were reported since 2004. Prevalences up to 40% have been reported for one of them, the parasite *Amoebophrya* sp. (Syndiniales), during three consecutive years (2004-2006, Chambouvet *et al.* 2008). Interestingly, two different species of the genus *Parvilucifera* were also reported in 2010 and 2011. Differences in growth pattern may well illustrate variations of antagonist interactions with local enemies over years.

References

Anderson D, Chisholm S, Watras C (1983) Importance of life cycle events in the population dynamics of Gonyaulax tamarensis. Marine Biology **76**: 179-189

Anderson DM, Alpermann TJ, Cembella AD, Collos Y, Masseret E, Montresor M (2012) The globally distributed genus Alexandrium: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. Harmful Algae **14**: 10-35

Andrieux-Loyer F, Philippon X, Bally G, Kérouel R, Youenou A, Grand J (2008) Phosphorus dynamics and bioavailability in sediments of the Penzé Estuary (NW France): in relation to annual P-fluxes and occurrences of Alexandrium Minutum. Biogeochemistry **88**: 213-231

Arnaud F, Ragueneau O (2009) Le réseau Ecoflux. Qualité de l'eau et eutrophisation en Finistère. Rapport de fin d'année 2009, UBO et Conseil général du Finistère

Balech E (1989) Redescription of Alexandrium minutum Halim (Dinophyceae) type species of the genus Alexandrium. Phycologia **28**: 206-211

Bass Becking LGM (1934) Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).**Belin C, Neaud-Masson N** (2012) Cahier de procédures REPHY 2012-2013. Document de prescription

Blackburn TM, Pyaek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jaroaík Vc, Wilson JRU, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. Trends in ecology & evolution (Personal edition) **26**: 333-339

Blossey B, Notzold R (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. J Ecol **83**: 887-889

Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecol Monogr **27**: 325-349

Casabianca S, Penna A, Pecchioli E, Jordi A, Basterretxea G, Vernesi C (2012) Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate Alexandrium minutum in the Mediterranean Sea. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **279**: 129-138

Chambouvet A, Morin P, Marie D, Guillou L (2008) Control of Toxic Marine Dinoflagellate Blooms by Serial Parasitic Killers. Science **322**: 1254-1257

Chang FH, McClean M (1997) Growth responses of Alexandrium minutum (Dinophyceae) as a function of three different nitrogen sources and irradiance. N Z J Mar Freshw Res **31**: 1-7

Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Aust J Ecol **18**: 117-143

Crespo BG, Keafer BA, Ralston DK, Lind H, Farber D, Anderson DM (2011) Dynamics of Alexandrium fundyense blooms and shellfish toxicity in the Nauset Marsh System of Cape Cod (Massachusetts, USA). Harmful Algae **12**: 26-38

Dia A, Guillou L, Destombe C Dispersion et différenciation génétique chez le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* le long des côtes bretonnes. ***in prep.***

Dia A, Guillou L, Mauger S, Bigeard E, Marie D, Valero M, Destombe C Spatiotemporal changes in the genetic diversity of harmful algal blooms caused by the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. Mol Ecol ***in press***

Elton CS (2000) The ecology of invasions by animals and plants, University of Chicago Press

Erard-Le Denn E (1997) Alexandrium minutum. Efflorescences toxiques des eaux côtières françaises: écologie, écophysiologie: Ecologie, écophysiologie, toxicologie. Berland, B. R.Lassus, P., Editions Quae. **13:** 53-65

Estrada M, Solé J, Anglès S, Garcés E (2010) The role of resting cysts in *Alexandrium minutum* population dynamics. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography **57**: 308-321

Gower JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika **53**: 325-338

Gross J (1988) A red tide outbreak in Cork harbour, July 1987. Red Tide Newsletter **1**: 4

Grzebyk D, Béchemin C, Ward CJ, Vérité C, Codd GA, Maestrini SY (2003) Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate Alexandrium minutum. J Plankton Res **25**: 1185-1199

Halim Y (1960) Alexandrium minutum n. gen., n. sp., dinoflagelle provocant des eaux rouges. Vie Milieu **11**: 102-105

Hallegraeff GM, Steffensen DA, Wetherbee R (1988) Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. J Plankton Res **10**: 533-541

Hansen G, Daugbjerg N, Franco JM (2003) Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of Alexandrium minutum (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. Harmful Algae **2**: 317-335

Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. Trends Ecol Evol **17**: 164-170

Koroleff F (1970) Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. International Council Exploration Sea **9**: 19-22

Lilly EL, Halanych KM, Anderson DM (2005) Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. Harmful Algae **4**: 1004-1020

Lodge DM (1993) Biological invasions: Lessons for ecology. Trends Ecol Evol **8**: 133-137

McCauley LAR, Erdner DL, Nagai S, Richlen ML, Anderson DM (2009) Biogeographic analysis of the globally distributed harmful algal bloom species *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) based on rRNA gene sequences and microsatellite markers. J Phycol **45**: 454-463

Monsen NE, Cloern JE, Lucas LV, Monismith SG (2002) A comment on the use of flushing time, residence time, and age as transport time scales. Limnol Oceanogr **47**: 1545-1553

Montagnes D, Chambouvet A, Guillou L, Fenton A (2008) Responsibility of microzooplankton and parasite pressure for the demise of toxic dinoflagellate blooms. Aquat Microb Ecol **53**: 211-225

Mooney HA, Cleland E (2001) The evolutionary impact of invasive species. Proceedings of the National Academy of Sciences **98**: 5446-5451

Nehring S (1998) Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. Arch Fish Mar Res **46**: 181-194

Nezan E, Ledoux M (1989) Red tide by Alexandrium minutum in France. Red tide newsletter. Sherkin Isl. Mar. stat. **2**: 2-3

Olenina I, Wasmund N, Hajdu S, Jurgensone I, Gromisz S, Kownacka J, Toming K, Vaiciūtė D, Olenin S (2010) Assessing impacts of invasive phytoplankton: The Baltic Sea case. Mar Pollut Bull 60: 1691-1700

Parker IM, Simberloff D, Lonsdale WM, Goodell K, Wonham M, Kareiva PM, Williamson MH, Von Holle B, Moyle PB, Byers JE, Goldwasser L (1999) Impact: Toward a Framework for Understanding the Ecological Effects of Invaders. Biol Invasions 1: 3-19

Paulmier G (1969) Le microplancton des rivières de Morlaix et de la Penzé. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes **33**: 311-332

Pedrós-Alió C (2007) Dipping into the Rare Biosphere. Science **315**: 192-193

Persson A, Godhe A, Karlson B (2000) Dinoflagellate cysts in recent sediments from the west coast of Sweden. Bot Mar **43**: 69-79

Probert I (1999) Sexual reproduction and ecophysiology of the marine dinoflagellate Alexandrium minutum Halim, University of Westminster

Pysek P, Richardson DM, Rejmánek M, Webster GL, Williamson M, Kirschner J (2004) Alien plants in checklists and floras: towards better communication between taxonomists and ecologists. Taxon **53**: 131-143

Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC (2001) The population biology of invasive specie. Annu Rev Ecol Syst: 305-332

Simberloff D, Gibbons L (2004) Now you see them, now you don't!–population crashes of established introduced species. Biol Invasions **6**: 161-172

Simberloff D, Rejmánek M (2011) Encyclopedia of biological invasions. Encyclopedias of the natural world (

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences **103**: 12115-12120

Strayer DL, Eviner VT, Jeschke JM, Pace ML (2006) Understanding the long-term effects of species invasions. Trends Ecol Evol **21**: 645-651

Tahvanainen P, Alpermann TJ, Figueroa RI, John U, Hakanen P, Nagai S, Blomster J, Kremp A (2012) Patterns of Post-Glacial Genetic Differentiation in Marginal Populations of a Marine Microalga. PLoS ONE **7**: e53602

Ter Braak CJF (1995) Ordination. Data Analysis in Community and Landscape Ecology. Jongman, R. H. G., Ter Braak, C. J. F.van Tongeren, O. F. R. Cambridge, Cambridge University Press**:** 73-91

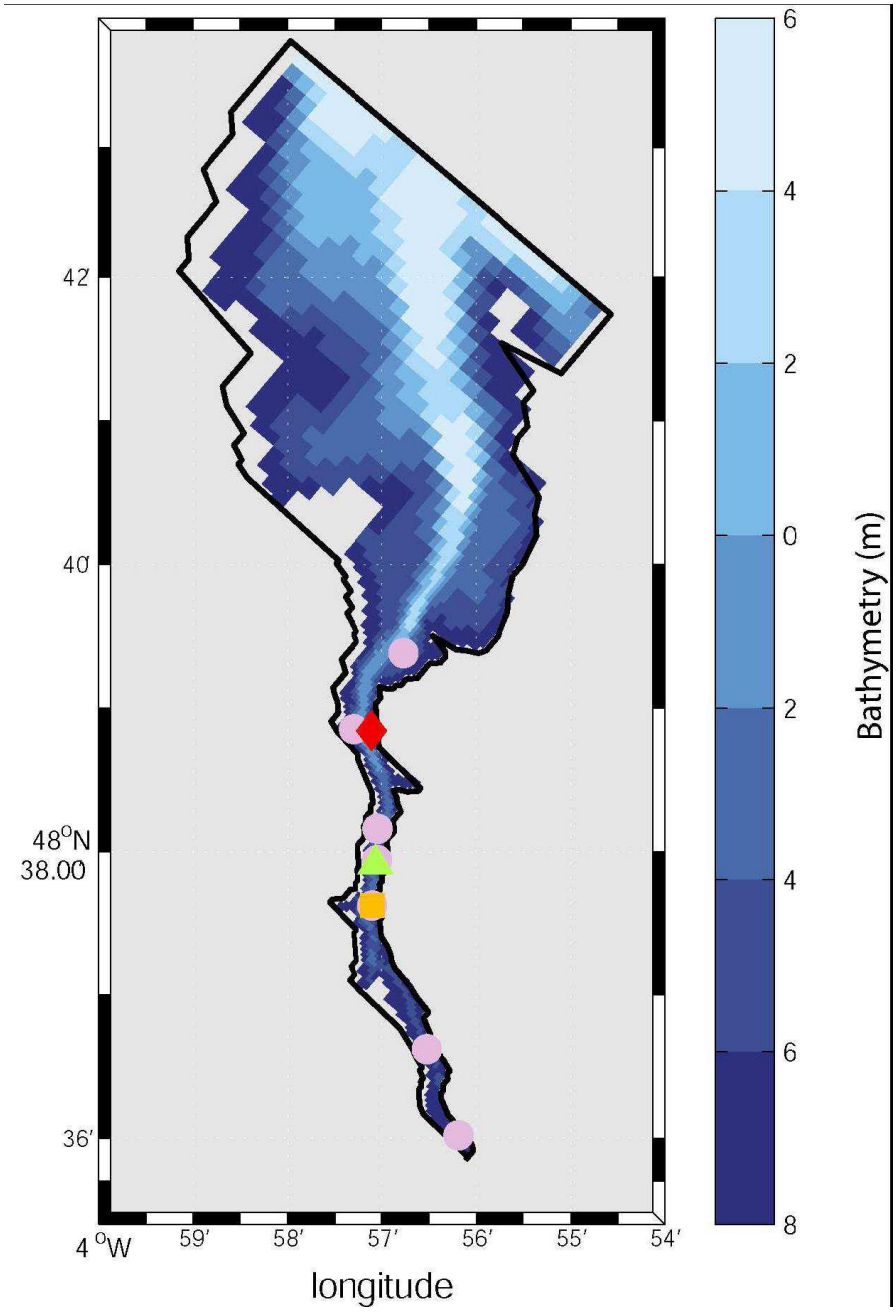
Tréguer P, Le Corre P (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'autoanalyseur II Technicon), 2eme EDdition. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

Vila M, Camp J, Garcés E, Masó M, Delgado M (2001) High Resolution Spatio-temporal Detection of Potentially Harmful Dinoflagellates in Confined Waters of the NW Mediterranean. J Plankton Res **23**: 497-514

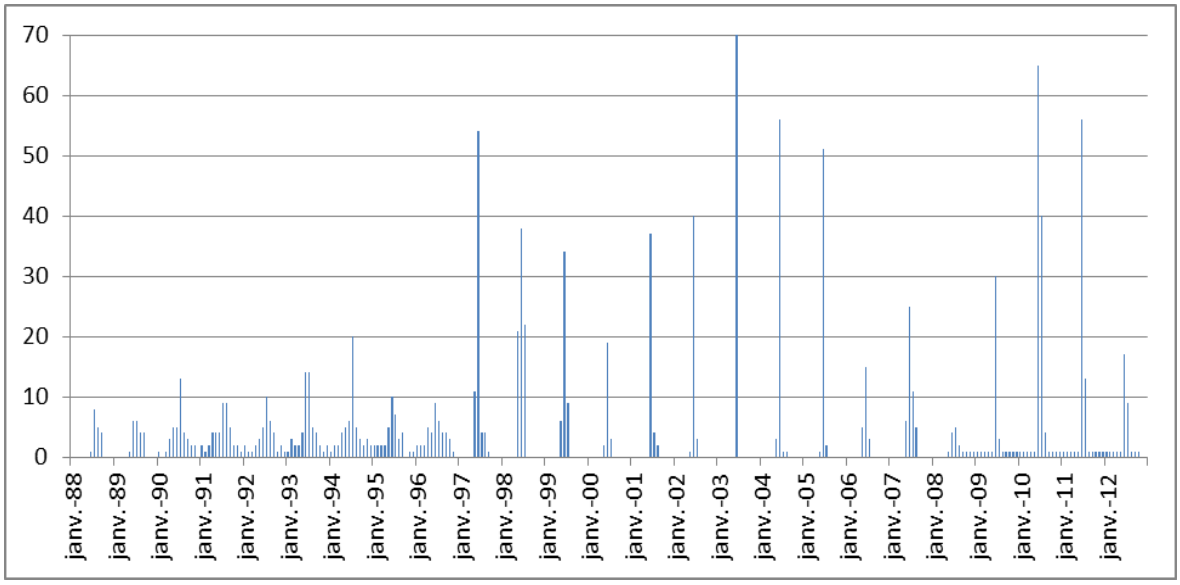
Ward JHJ (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of the American statistical association **58**: 236-244

Williamson M, Fitter A (1996) The varying success of invaders. Ecology **77**: 1661-1666

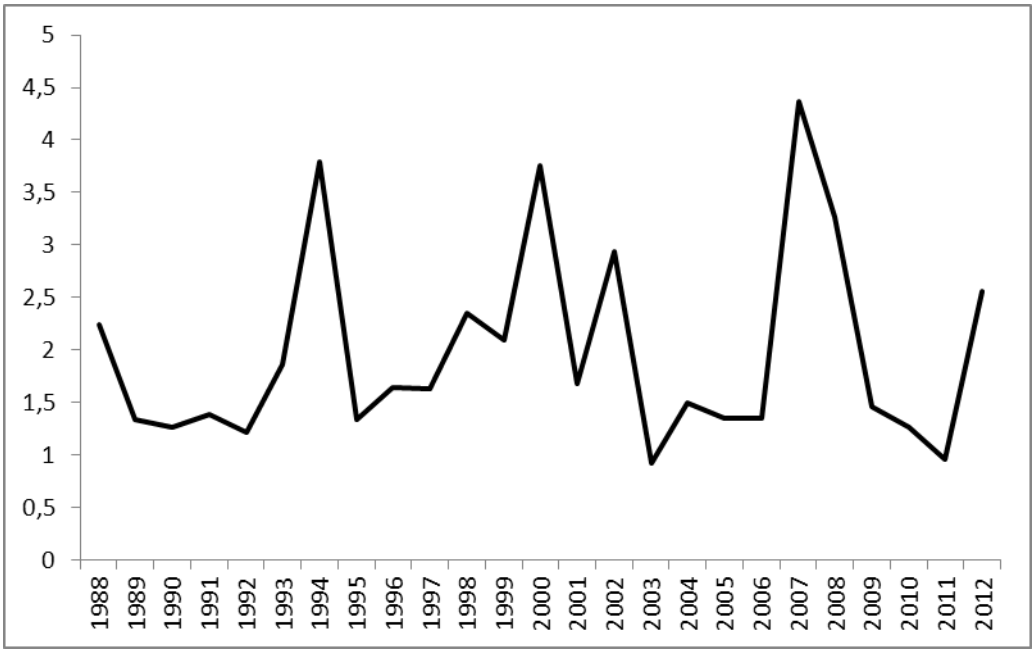
Supplementary data:



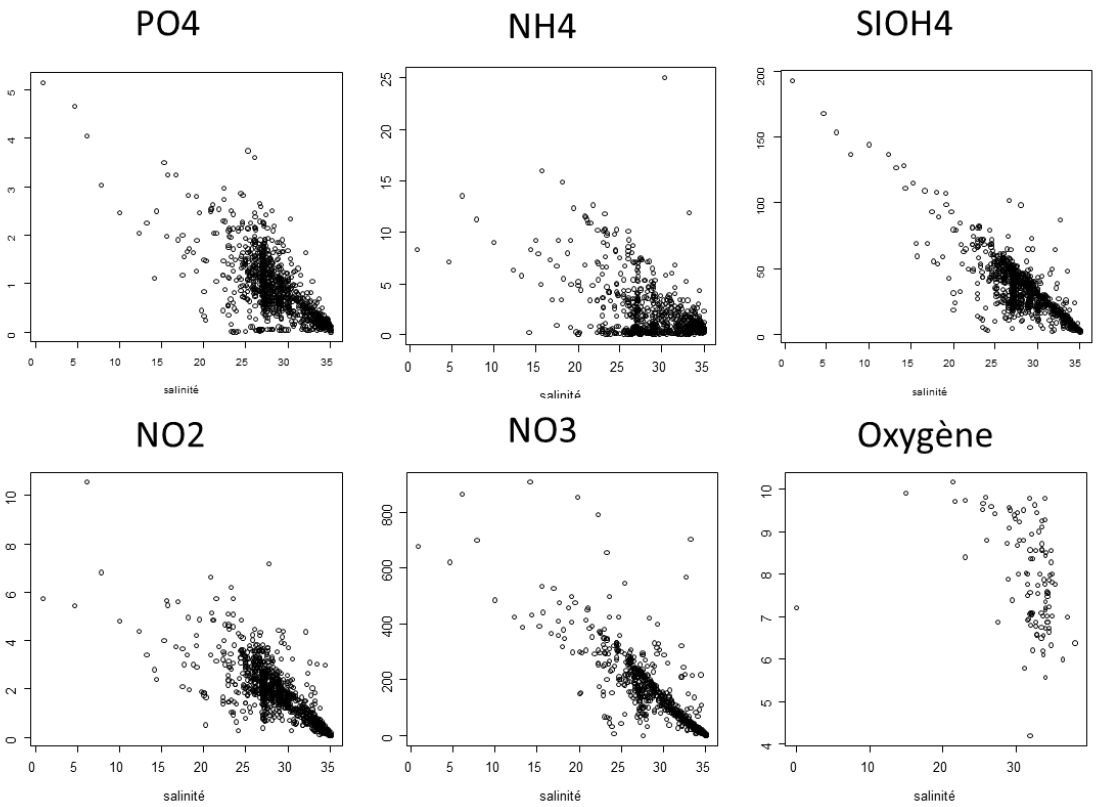
Supplementary Figure 1: Bathymetry of the Penzé estuary (in meters)



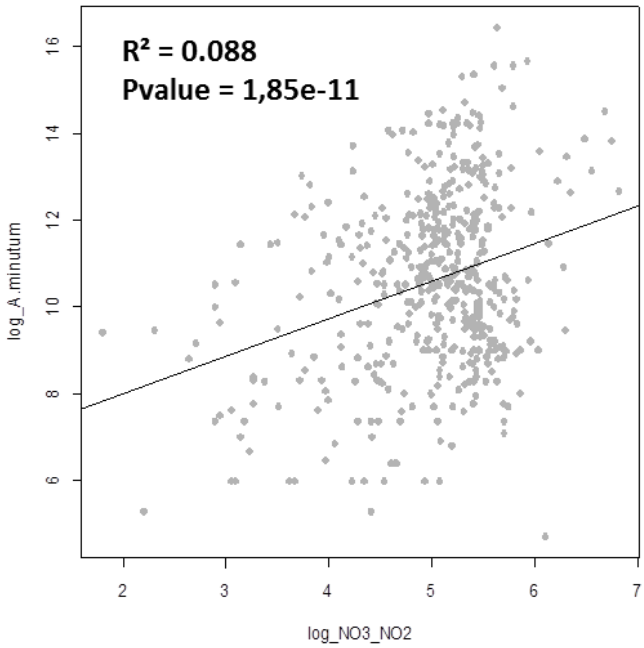
Supplementary Figure 2: Numbers of samples per month from January 1988 to October 2012 (up to 128 samples in January 2003).



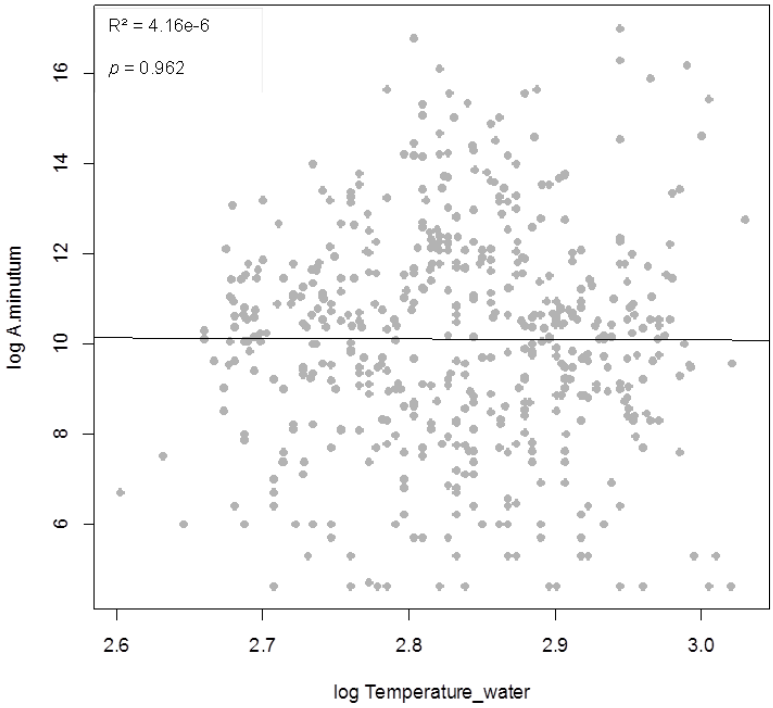
Supplementary Figure 3: Means of the river flow in the Penzé estuary in June from 1988 to 2012.



Supplementary Figure 4: Influence of the salinity gradient on the nutrient and oxygen availabilities in the Penzé river (IFREMER/SBR dataset). Nutrient concentrations in µM, salinities in psu.



Supplementary Figure 5: Relationship between nitrate+nitrite (µM) and *Alexandrium minutum* concentrations (cells.L-1) in the Penzé estuary (Ifremer/SBR Dataset, 1998-2012).



Supplementary Figure 6: Relationship between water temperature (°C) and *A. minutum* concentrations (cells.L^{-1}) in the Penzé estuary (Ifremer/SBR Dataset, 1998-2012).

Supplementary Table 1 : List of dominant and secondary phytoplanktonic species in the Penzé estuary during early summer (end of May-Middle of July) as assessed by Paulmier 1969 (period 1963-1967) and this study (1988-2012). In blue: species that can be compared between both studies.

Species name (Paulmier 1969,)	Species name (This study)
Dominant species during May-July	> Million cell per Liter
Chaetoceros teres	Chaetoceros spp. (283 M Cell/L, June 14 2004)
Chaetoceros constrictus	Alexandrium minutum (44 M Cell/L, June 13 1997)
Guinardia delicatula (syn. R. delicatula)	Heterocapsa triquetra (22,7 M Cell/L, June 13 2001)
Rhizosolenia imbricata (syn. R. shrubsolei)	Chaetoceros wighamii (21 M Cell/L, June 14 2004)
Guinardia flaccida	Skeletonema spp. (17.2 M Cell/L, June 14 2005)
Thalassiosira hyalina	Cylindrotheca closterium (14.2 M Cell/L, June 01 2002)
Thalassiosira nordenskioldii	Tetraselmis + Prasinocladus (13.8 M Cell/L, June 26 2000)
Pseudo-nitzschia seriata	Phaeodactylum tricornutum (8.5 M Cell/L, June 08 2011)
Licmophora sp.	Chaetoceros decipiens + lorenzianus (6.6 M Cell/L, June 14 2004)
Benthic diatoms	Thalassiosira levanderi+minima (4.6 M Cell/L, June 14 2004)
Secondary species	Nitzschia sp. (4 M Cell/L, June 14 1997)

Guinardia striata	Thalassiosira + Porosira spp. (4 M Cell/L, June 22 2004)
Chaetoceros curvisetus	Euglenophyceae unknown 2.8 M Cell/L, June 17 1997)
Chaetoceros eibenii	Pseudo-nitzschia sp. (2.5 M Cell/L, June 13 2001)
Chaetoceros debilis	Skeletonela costatum (1.3 M Cell/L, June 05 2003)
Chaetoceros decipiens	Guinardia delicatula (1.3 M Cell/L, June 22 1999)
Chaetoceros radicans	> 100.000 cells per liter
Chaetoceros holsaticus	Gonyaulax sp.
Chaetoceros bergonii	Heterocapsa rotundata
Chaetoceros subtilis	Karenia mikimotoi
Chaetoceros brevis	Kryptoperidinium foliaceum
Chaetoceros pseudocrinitus	Peridinium quinquecorne
Asterionella japonica	Prorocentrum sp.
Paralia culcata	Protoperidinium + Peridinium spp.
Rh. fragilissima	Protoperidinium bipes
Po. glacialis	Scrippsiella spp.
Th. decipiens	Cerataulina pelagica
Th. gravida	Centrales diatoms
Leptocylindrus danicus	Leptocylindrus danicus
Dytilum brightwelli	Navicula sp.
Cylindrotheca closterium (Syn. N. closterium)	Nitzschia longissima
Peridinium conicoides	Pennates diatoms
Peridinium oblongum	Rhizosolenia imbricata group
Peridinium subinerme	Rhizosolenia spp.
Peridinium pellucidum	Mesodinium rubrum
Gonyaulax spinifera	>10.000 cells per liter
Gonyaulax longispina	Gonyaulax spinifera
Prorocentrum micans	Peridinium spp.
Peridiniopsis ritunda	Polykrikos sp.
Diplopsalopsis orbicularis	Prorocentrum triestinum
Pyrocystis elegans	Asterionellopsis glacialis
Distephanus speculum	Cyclotella sp.
	Dactyliosen fragilissimus
	Dytilum sp.
	Grammatophora sp.

Guinardia sp.

Guinardia flaccida

Guinardia striata

Lauderia + Schroederella spp.

Leptocylindrus sp.

Leptocylindrus minimus

Lithosdesmium sp.

Melosira sp.

Paralia marina

Paralia sulcata

Plagiogramma sp.

Pseudo-nitzschia seriata group

Pseudo-nitzschia delicatissima group

Pseudo-nitzschia fraudulenta

Rhizosolenia setigera group

Thalassionema+Thalassiothrix+Lioloma spp.

Scenedesmus

Dictyocha spp.

Rare species

Akashiwo sanguinea

Alexandrium ostenfeldii

Alexandrium tamutum

Ceratium spp.

Dinophysis spp.

Gyrodinium spirale

Phalacroma rotundatum

Prorocentrum micans (+P. arcuatum+P. gibbosum)

Bacillaria sp.

Biddulphia sp.

Cerataulina sp.

Licmophora sp.

Pleurosigma + Gyrosigma sp.

Pseudo-nitzschia pungens

Stephanopyxis

ANNEXE 3

Génotypes obtenus à l'aide de douze marqueurs microsatellites à partir des souches parents et descendant des croisements.

Tableau 1 : Le tableau suivant présente les resultats de genotypage des parents et des desscendances des tests de croisement du chapitre sur le cycle de repoduction d'*A. minutum*.

Samples	A22	A41	A29	A44	A10	A11	A15	A20	A39	A43	A48	A8
P : 189-M	197	202	232	270	0	236	215	236	125 (141)	201	0	190 (214)
P : 248-M	197	218	226	0	136	248	215	248	125	201	238	216
D : 189_248_M1	0	0	215? 226?		0	0	0	273 (275)	125 (148)	201	238	0
D : 189_248b_M1	197	0	231?		0	0	0	275 (277)	125 (141)	201	238	0
D : 189_248c_M1	197	202	258		0	0	0	0	125 (145)	201	238	214
D : 189_248d_M1	197	202	258		0	248	0	275 (277)	125 (147)	201	238	214
D : 189_248e_M1	197	0	226?		0	248	0	275 (277)	125 (140)	201	238	0
P : 231-M	180	240	214 (230)	273	0	227	227?	0	148	188	238	210
P : 248-M	197	218	226	0	136	248	215	248	125	201	238	216
D : 231_248_M1	197	202	214		157?	248	0	275 (277)	125 (140-148)	201	238	0
D : 231_248b_M1	197	202	214		157?	0	0	275 (277)	125 (140-148)	201	0	215
P : 903_M1	197	210	(241) 258	292	134 (156)	244	0	259	141 (148)	206	240	216 (212-240)
P : 577_M1	199	205	(232) 251	293	0	229	0	260	141 (164)	196	242	230
D : 577_903_M1	0	0	238 (248-258)	0	143	0	0	0	148	0	0	216
D : 577_903b_M1	199	0	248	0	143	242	0	273	145	0	240	0
D : 577_903c_M1	199	0	248	0	143	223	0	248	165 (146)	0	240	232
D : 577_903d_M1	0	206	(232-238) 248	0	143	242	0	282?	164	0	240	208 (212)
D : 577_903e_M1	199	206	(232) 238 (248-258)	0	143	242	0	0	164	0	242	208 (213)
D : 577_903f_M1	0	0	238 (252)	0	143	242	0	273	140 (148)	0	240	213
D : 577_903g_M1	175?	0	248 (252)	0	143	0	0	0	164 (142)	0	0	0

D : 577_903h_M1	199	206	248 (252)	0	134 (143)	242	0	0	0	0	0	0
D : 577_903i_M1	199	0	248 (238-252)	0	143	242	0	270?	147 (166)	0	242	222 (208)
P : 579_M1	197	200	241 (245) 252	0	132	231	0	0	125 (140-147-169)	202	232	0
D : 579_579_M1	0	0	252	0	0	0	0	286	164	0	232	216
D : 579_579b_M1	0	0	238 (252)	0	143 (162)	0	0	0	0	0	0	0
D : 579_579c_M1	0	0	238 (252)	0	143	229	0	0	123 (145)	0	241	213
D : 579_579d_M1	0	0	238 (221)	0	143	229	0	0	125	202	242	0
P : 579_M1	197	200	241 (245)	0	132	231	0	0	125 (140)	203	0	0
P : 643_M1	197	202	226	276	146 (152)	244	215	248	0	200	240 (265)	173 (220)
D : 579_643_M1	0	0	223	0	161?	0	0	271 (248)	144	0	268	0
P : 645_M1	199 (175)	202	252 (241)	270	0	229	213 (215)	269 (248)	125 (141)	207	238	193
P : 921_M1	197	202	258	305 (299)	153	236	215	259	141 (125)	198	240	205 (184)
D : 645_921_M1	0	0	238 (252)									
D : 645_921_M1	197	0	248 (257)	0	147 (143)	0	0	0	125	0	0	213
D : 645_921b_M1	0	0	238 (248)	0	155	0	0	248	125	0	0	189
D : 645_921c_M1	0	0	0	0	143	0	0	0	125	169	240	0
D : 645_921d_M1	0	0	248 (238)	0	0	0	0	248	125 (141)	0	238?	0
P : 925-M	195	200	260	0	150	239	215	259	0	196	231	187
D : 645_M1	199 (175)	202	252 (241)	270	0	229	213 (215)	269 (248)	125 (141)	206	238	193
D : 645_925_M1	0	0	248 (223)	0	143	0	0	248	143 (165)	0	238	238 (222)
D : 645_925b_M1	0	0	257 (223)	288	0	0	0	248	125 (146 - 169)	206 (187)	(250) 238	0
D : 645_925c_M1	0	0	248 (223)	0	143 (147)	0	0	248	140 (164)	206	238	205

P : Parents

D : Descendant