



**HAL**  
open science

# Impact du phytoplancton sur les juvéniles de bar (*Dicentrarchus labrax*) en milieu aquacole. Approches in situ et expérimentales

Alice Delegrange

## ► To cite this version:

Alice Delegrange. Impact du phytoplancton sur les juvéniles de bar (*Dicentrarchus labrax*) en milieu aquacole. Approches in situ et expérimentales. Biodiversité et Ecologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2015. Français. NNT: . tel-01329790

**HAL Id: tel-01329790**

**<https://theses.hal.science/tel-01329790>**

Submitted on 9 Jun 2016

**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

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE**

DISCIPLINE

**GÉOLOGIE, ÉCOLOGIE, PALÉONTOLOGIE, OCÉANOLOGIE**

présentée et soutenue par

**ALICE DELEGRANGE**

LE 30 JANVIER 2015

---

**Impact du phytoplancton sur les juvéniles de bar  
(*Dicentrarchus labrax*) en milieu aquacole.  
Approches *in situ* et expérimentales**

---

Structure d'accueil:

Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR CNRS 8187. Wimereux, France



# COMPOSITION DU JURY

## RAPPORTEURS

**DR. PHILIPPE SOUDANT**

INSTITUT UNIVERSITAIRE EUROPEEN DE LA MER, FRANCE.

**DR. JOSE LUIS ZAMBONINO**

IFREMER CENTRE BRETAGNE, FRANCE

## EXAMINATEURS

**DR. HELENE HEGARET**

INSTITUT UNIVERSITAIRE EUROPEEN DE LA MER, FRANCE

**DR. EMMANUELLE ROQUE D'ORBCASTEL**

IFREMER LANGUEDOC-ROUSSILLON, FRANCE

**PR. URANIA CHRISTAKI**

UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE, FRANCE

**DR. ALAIN LEFEBVRE**

IFREMER MANCHE MER DU NORD, FRANCE

## DIRECTEUR DE THESE

**PR. RACHID AMARA**

UNIVERSTE DU LITTORAL COTE D'OPALE, FRANCE

## RESPONSABLE SCIENTIFIQUE

**DR. DOROTHEE VINCENT**

UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE, FRANCE



Cette thèse a bénéficié d'un co-financement de la Région Nord Pas-de-Calais (50%) et du Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (50%)



**RÉGION  
NORD-PAS DE CALAIS**

Syndicat Mixte  
de la Côte d'Opale  
Audomarois - Boulonnais - Calaisis - Dunkerquois - Montreuillois

Les travaux de recherche ont en partie été financés par la mise en place d'une convention de collaboration de recherche entre l'Université du Littoral Côte d'Opale et la ferme piscicole Aquanord S.A en 2012.



# REMERCIEMENTS

*En premier lieu, je souhaite remercier sincèrement les personnes qui ont permis l'existence de cette thèse, qui est devenue, au fil des trois années, ma thèse.*

Merci à Rachid Amara, mon directeur de thèse, pour votre disponibilité aux moments opportuns, pour les discussions régulières qui m'ont permis d'avancer et surtout d'avoir soutenu ce projet jusqu'à la fin.

Merci aussi à Dorothee Vincent, de m'avoir guidée tout au long de mon parcours de doctorante, au labo, sur le terrain, mais aussi pour la dernière partie non moins importante, la valorisation de ce travail, la rédaction.

*Ensuite, je remercie les personnes qui ont accepté d'évaluer ce travail.*

Messieurs Philippe Soudant et Jose-Luis Zambonino d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse

Mesdames Hélène Hégaret, Emmanuelle Roque D'Orbcastel et Urania Christaki ainsi que Monsieur Alain Lefebvre d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Merci aussi à tout le personnel d'Aquanord. Merci Annabelle et Florence pour votre soutien tout au long des deux années de travail dans la ferme Aquanord. Merci aussi à tous les éleveurs qui ont pu me donner un coup de main lors des suivis annuels ou lors des expériences, et aussi d'avoir essayé de comprendre ce que je faisais avec 'leurs' poissons !

Je souhaite remercier Christophe et Elvire, mes encadrants de stages de Master. Merci de m'avoir donné envie de suivre cette voie et de m'avoir enseigné les prémices du métier de chercheur.

*Merci à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, sans vous ça n'aurait pas été possible !*

Merci Sophie pour le soutien sur la première expérience, d'avoir été aussi motivée jusqu'au bout ! Et oui, une expérience en microcosmes sans évacuation d'eau de mer, ça en fait des litres d'eau à transporter à bout de bras !

Merci Benoit. Ton investissement et ta rigueur (ou dirais-je maniaquerie ?) lors du suivi à Aquanord ont contribué significativement à la réussite de ce travail. Merci aussi à Cassandra qui a pris le relai pour la deuxième année.



Je souhaite aussi chaleureusement remercier Julie et Manon.

Julie, tu as travaillé avec nous dès ta première année de licence, et depuis le premier jour de stage tu t'es toujours investie à fond. Merci pour ton soutien, aussi bien technique que moral. Ça fait du bien de voir des jeunes avec la motivation et la passion que tu as pour la recherche et les petites (et grosses) bêtes de la mer. Je te souhaite que tes projets aboutissent et une très belle réussite.

Manon, que d'aventures en ta compagnie ! Entre le tri des moules, la chariote du diable !, le labo, la catalepsie des biquettes et les allers retours souvent animés à Gravelines, ça tisse des liens ! Bon je sais, tu as la poudre d'escampette et ça te réussit bien ! Garde cette folie et cette originalité qui font de toi quelqu'un de spécial.

Merci Thomas R. et Vincent pour le sacré coup de main que vous m'avez donné lors des expériences et suivis à Aquanord, entre les prélèvements sur ce pont en compagnie des (euh disons... délicats) pêcheurs locaux, la récolte des moules dans le tunnel et, pendant l'expérience, le tri de ces bestioles pas toujours fraîches. Vous avez joyeusement animé (batailles de jus de moules, blagues à deux balles parfois bien grasses et j'en passe !) ces journées pendant lesquelles on a bien bossé et souvent galéré, je pense que ça a été salvateur ! Merci aussi, Vincent, pour les crabe-parties du mois de juillet !

Merci Michel d'avoir toujours été disponible et volontaire pour nous donner ton aide technique ! Entre l'installation de la salle thermo, la fabrication de structures sur mesure pour aménager les bassins expérimentaux à Aquanord et la réparation de la chariotte, tu as été indispensable !

Lucie, merci pour ton aide pour l'identification des pseudo-nitzschia ! Merci aussi et surtout pour ton soutien moral au quotidien, tes gâteaux qui déchirent et qui remontent le moral, les viennoiseries maison du matin qui donnent du courage pour la rédaction et toutes les petites attentions qui rendent la vie de thésarde plus facile au labo !

Merci aussi aux autres collègues, Séverine, David, Lucile, Régis, Laurent pour votre soutien moral, les discussions souvent animées lors des pauses café (entre les mésaventures sportives des uns, les enfants des autres et les animaux de tout le monde, il y avait toujours des choses à raconter !) parfois agrémentées par des gâteaux toujours bien appréciés par tout le monde ! Vous avez aussi contribué à la réussite de ce travail !

Dorothee, sans toi, ces trois ans n'auraient pas été les mêmes. Merci d'avoir été là tout au long de ce travail, de m'avoir guidée pour mes premiers pas de chercheur. Merci de m'avoir transmis tes connaissances et ton savoir-faire. Les discussions professionnelles et, plus souvent qu'on ne le croit, personnelles lors du café 'débrief' rituel sont devenues une institution et ont parfois (souvent ?) permis de me remettre sur les rails. Merci Dorothee d'avoir fait de ces trois ans (et un tout petit peu plus...) une expérience inoubliable malgré les hauts et les bas inévitables. Ça a été un honneur d'être 'ta' première étudiante en thèse !

*Pendant une thèse, on croise le chemin d'un grand nombre de thésards et post-doc qui vont et viennent au gré des soutenances et projets. Ainsi, j'ai eu l'occasion de rencontrer des collègues devenus des amis pour certains.*

Merci à Mik, Juliette, Antoine, Armo, Moana, Virg, Morgane, Elodie, John et Erwan pour tous les moments partagés pendant la première année ! Les soirées à l'Alcazar, les pétanques sur les remparts et les apéro-plage ont perpétué !

Merci à mes compagnons de thèse, Clément et Simon, on a commencé en même temps, partagé nos interrogations, doutes et avons essayé de nous soutenir pendant ces trois ans. Ça fait du bien de ne pas se sentir seul, le nez dans le guidon !

*J'ai aussi eu deux super-collègues de bureau !*

Merci Elodie pour nos discussions sur les approches expérimentales, l'écologie des poissons et les aléas du travail sur les animaux vivants. Ça m'a beaucoup aidée pendant nos deux années de 'colloc'.

Moana, cette année en ta compagnie a été au top ! Merci pour tous ces moments partagés et ton soutien lors de mes débuts de rédaction !

Et pour clôturer cette partie merci à F-Piste, Clex, Nat, Thomas et ma copiiiiiiiiine Tiphaine pour toutes les soirées surréalistes qui m'ont bien changé les idées pendant la dernière ligne droite !

Thomas, merci aussi pour tes conseils anglophones avisés pour la finalisation des articles !

Natacha, merci pour les après-midis de filles qu'on a passé ! Le nail-art n'a plus de secrets pour nous (euh... enfin presque...) ! Finalement, ça détend pas mal hein ?!

Et Tiphaine, merci simplement d'être là, avec tes expressions rien qu'à toi... « *C'est du même bois d'Acabi* » n'en est qu'un exemple ! J'espère qu'on partagera encore les soirées jeux du dimanche soir avec FP, le

marché et le café en terrasse du samedi matin et les soirées cochon grillé d'anthologie (*Copiiiine ! ça piiiiviiiiiiiiique !*) ! Merci aussi à toi et Cédric de vous être occupés du chat et de nous avoir permis de profiter tranquillement de nos (nécessaires) vacances !

Caroline, mon amie de toujours. Je pense qu'une vraie amie, c'est quelqu'un sur qui tu peux toujours compter malgré la distance. On a chacune notre vie, parfois très éloignées comme lors de ton année passée en nouvelle Calédonie ! Et pourtant je sais, dans un coin tout au fond de moi, que tu m'as soutenue pendant ces trois ans, et depuis toujours en fait... Sois assurée que c'est réciproque !

Il y a aussi tous mes copains musiciens : Paul et Lucie, Célestin et Claire, Virgile, Coco, Fabian et Mathilde. Vous retrouver lors de mes retours au bercail m'a réellement permis de me ressourcer au cours de ces trois ans. C'est important de savoir que vous répondez toujours présents lorsque j'ai besoin de me changer les idées !

Merci Papa et Maman d'avoir compris mes choix, de m'avoir soutenue dans mon parcours et de m'avoir guidée pour être ce que je suis aujourd'hui. Merci à ma famille pour toutes les attentions que vous me portez. Vous me donnez les solides fondations qui me permettent d'avancer.

Fabien, merci de partager ma vie. D'être là à tous les instants et de me soutenir inconditionnellement.

---

# SOMMAIRE

---



<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>3</b>
1. Le compartiment phytoplanctonique en milieu côtier .....	3
1.1. Les efflorescences phytoplanctoniques .....	3
1.2. Notion d’Harmful Algal Blooms.....	4
Toxicité des HAB .....	6
Biomasse excessive .....	10
2. Contexte aquacole en zone côtière .....	10
3. Impacts du phytoplancton et des HAB sur les poissons .....	12
3.1. Modifications de l’environnement physico-chimique.....	12
Viscosité .....	12
Acidité.....	14
3.2. Ichtyotoxicité.....	16
3.3. Effets mécaniques, altération des tissus, colmatage des branchies ...	18
4. Problématique et objectifs de la thèse.....	21
Objectifs et organisation du manuscrit .....	25
 <b>CHAPITRE I. ETUDE PRELIMINAIRE : COÏNCIDENCE ENTRE L’EFFLORESCENCE PHYTOPLANCTONIQUE PRINTANIERE ET LES MORTALITES DE BAR EN MER DU NORD .....</b>	 <b>29</b>
I.1. INTRODUCTION : SITE ATELIER ET PROBLEMATIQUES ASSOCIEES.....	31
I.2. MATERIEL ET METHODES .....	34
<i>I.2.1. Bases de données.....</i>	<i>34</i>
<i>I.2.2. Analyses numériques .....</i>	<i>34</i>
I.3. RESULTATS ET DISCUSSION .....	38
 <b>CHAPITRE II. DIVERSITE DE <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> DANS LE SUD DE LA MER DU NORD, PRODUCTION D’ACIDE DOMOÏQUE ET COMMUNAUTES PHYTOPLANCTONIQUES ASSOCIEES .....</b>	 <b>45</b>
II.1. PREAMBULE.....	47
II.2. INTRODUCTION.....	50
II.3. MATERIAL AND METHODS.....	51
<i>II.3.1. Sampling strategy.....</i>	<i>51</i>
<i>II.3.2. Phytoplankton standing stock and community composition.....</i>	<i>53</i>
<i>II.3.3. Data analyses .....</i>	<i>54</i>
II.4. RESULTS.....	54
<i>II.4.1. Hydrological conditions .....</i>	<i>54</i>
<i>II.4.2. Phytoplankton standing stock .....</i>	<i>56</i>
II.5. DISCUSSION .....	64
II.6. CONCLUSION.....	71

---

<b>CHAPITRE III. EFFETS DE <i>PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA</i> SUR LES JUVENILES DE BAR. EXPERIENCE D'EXPOSITION</b> .....	<b>73</b>
III.1. PREAMBULE .....	75
III.2. INTRODUCTION .....	78
III.3. MATERIAL AND METHODS .....	80
III.3.1. <i>Experimental settings</i> .....	80
III.3.2. <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> culture .....	81
III.3.3. <i>Seawater sampling</i> .....	82
III.3.4. <i>Fish sampling and analyses</i> .....	83
Gills and gut analyses .....	83
Fish condition and physiological performances .....	84
III.3.5. <i>Statistical analyses</i> .....	84
III.4. RESULTS .....	84
III.4.1. <i>Experimental conditions</i> .....	84
III.4.2. <i>Fish physiological performances</i> .....	85
III.4.3. <i>Fish gills, gut content, and morphological observation</i> .....	89
III.5. DISCUSSION .....	89
III.5.1. <i>Experimental conditions</i> .....	89
III.5.2. <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> effect on fish .....	90
III.6. CONCLUSION .....	95
<b>CHAPITRE IV. EFFETS DE L'EFFLORESCENCE PHYTOPLANCTONIQUE PRINTANIERE SUR LES JUVENILES DE BAR. UTILISATION DES MOULES COMME OUTIL DE MITIGATION</b> .....	<b>97</b>
IV.1. PREAMBULE .....	99
IV.2. INTRODUCTION .....	102
IV.3. MATERIALS AND METHODS .....	104
IV.3.1. <i>Experimental design</i> .....	104
IV.3.2. <i>Sampling strategy</i> .....	107
Hydrobiological parameters .....	107
Phytoplankton sampling and enumeration .....	107
Mussel filtration activity .....	108
Fish sampling .....	108
IV.3.3. <i>Data analyses</i> .....	110
IV.4. RESULTS .....	110
IV.4.1. <i>Hydrobiological context</i> .....	110
IV.4.2. <i>Mussel clearance rate and impact on phytoplankton</i> .....	115
IV.4.3. <i>Fish physiological performances</i> .....	115
IV.4.4. <i>Gills observation</i> .....	116

## Sommaire

---

IV.5. DISCUSSION .....	119
IV.5.1. 4.1 Environmental context .....	119
IV.5.2. Mussel filtration activity.....	120
IV.5.3. Water quality improvement due to mussel biofiltration .....	121
IV.5.4. Seawater quality and its effects on juvenile sea bass growth and condition .....	122
IV.1. CONCLUSION .....	126
<b>CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>127</b>
Un effet monospécifique relatif .....	139
Un effet pluri-spécifique.....	143
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>155</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>189</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>191</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>193</b>
<b>ANNEXE 3.....</b>	<b>195</b>
<b>ANNEXE 4.....</b>	<b>197</b>





---

# **Introduction générale**

---



## 1. Le compartiment phytoplanctonique en milieu côtier

### 1.1. Les efflorescences phytoplanctoniques

De par sa taille microscopique (0,4 – 200  $\mu\text{m}$ ), sa distribution cosmopolite et ses capacités photosynthétiques (Falkowski et al., 1998 ; Simon et al., 2009), le phytoplancton, regroupant les organismes unicellulaires photo-autotrophes obligatoires, est une composante essentielle des réseaux trophiques marins (Carpenter et al., 1985 ; Sherr et Sherr, 1988). Il participe en effet activement à la pompe biologique puisque, grâce à la photosynthèse, il permet le piégeage de la matière inorganique (essentiellement carbone, azote, phosphate, silice) sous forme de matière organique, son transfert vers les niveaux trophiques supérieurs et, à terme, sa sédimentation (Longhurst et Harrison, 1989). Dans des conditions environnementales favorables (e.g. lumière, température, concentrations en sels nutritifs, hydrodynamisme, turbidité), certaines espèces phytoplanctoniques sont capables de croître rapidement et d'atteindre des abondances de plusieurs millions de cellules par litre. Ce phénomène est appelé **efflorescence phytoplanctonique** (Smayda, 1997). Lors d'une efflorescence, l'augmentation de l'abondance du phytoplancton conduit à un pic dont l'amplitude est propre à chaque espèce et peut varier considérablement dans le temps et l'espace en fonction de l'environnement. Cependant, cette notion de forte biomasse/abondance implicite dans le terme efflorescence dépend aussi des variations spatio-temporelles des paramètres de l'environnement (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

Dans les zones côtières, l'évolution de la concentration des éléments essentiels au développement du phytoplancton (principalement carbone, oxygène, azote, phosphore, silice et certains métaux traces) dépend principalement des apports terrigènes conditionnés par les événements pluvieux et des des upwellings (i.e. remontée d'eaux profondes chargées en éléments nutritifs). Néanmoins, le couplage océan-atmosphère joue aussi un rôle non négligeable dans la disponibilité des éléments nutritifs

inorganiques puisque les épisodes de tempêtes hivernales engendrent de fortes turbulences permettant la rupture de la thermocline et, par conséquent, le mélange de la colonne d'eau (Parsons et Harrison, 1983 ; Cebrián et Valiela, 1999 ; Lavelle et Berhe, 2005). Ce lien turbulence – éléments nutritifs conditionne en fait les efflorescences phytoplanctoniques qui sont favorisées lorsque ces deux paramètres sont élevés. Selon Margalef (1978), les espèces phytoplanctoniques capables de former des efflorescences sont des espèces ayant une stratégie *r*, à savoir qu'elles sont petites avec un taux de division rapide. Au contraire, lorsque la turbulence et les concentrations en éléments nutritifs sont faibles la plupart du temps en relation avec la stratification de la colonne d'eau, les grandes espèces ayant un faible taux de division sont plus compétitives (stratégie *K* ; Wyatt, 2014). Par ailleurs, les rapports stoechiométriques vont aussi influencer les communautés phytoplanctoniques. En effet, la composition stoechiométrique médiane du phytoplancton est représentée par le rapport 106C : 16N : 1P : 16Si (Brzezinski, 1985 ; Redfield et al., 1963). Cela signifie que si les rapports stoechiométriques s'éloignent de ce rapport théorique, la communauté phytoplanctonique est limitée par un ou plusieurs éléments (Brzezinski, 1985 ; Redfield et al., 1963). De plus, si l'un des facteurs contrôlant la production primaire devient insuffisant, la croissance du phytoplancton est limitée (Loi du minimum de Von Liebig ; dans De Baar, 1994). Au contraire, si ces éléments sont en excès, et en l'absence de prédateurs et/ou de compétiteurs, le phytoplancton peut se développer rapidement jusqu'à former des efflorescences. Ainsi, les concentrations des éléments nutritifs, la température et la qualité et la quantité de lumière atteignant la surface subissent des variations temporelles importantes à différentes échelles (i.e. à plus ou moins long terme ; Kirk, 1994). Et, à l'échelle saisonnière ces variations conditionnent le calendrier phytoplanctonique (Bougis, 1974).

## **1.2. Notion d'Harmful Algal Blooms**

Les efflorescences phytoplanctoniques sont la plupart du temps bénéfiques pour les écosystèmes marins puisque le phytoplancton est un

producteur primaire de matière organique situé à la base des réseaux trophiques (Lagos, 1998 ; Smayda, 1997). Dans certains cas, elles peuvent néanmoins avoir des effets délétères sur les organismes marins, les écosystèmes ainsi que sur la santé humaine. Elles sont alors appelées *Harmful Algal Blooms* (HAB, i.e. efflorescences phytoplanctoniques nocives, Smayda, 1997 ; Backer et McGillicuddy Jr, 2006 ; Masó et Garcés, 2006; Anderson, 2008). Cependant, les HAB ne sont pas tous causés par des organismes phytoplanctoniques au sens strict. En effet, par extension, les HAB désignent des efflorescences d'organismes unicellulaires qu'ils soient autotrophes, mixotrophes ou hétérotrophes (Glibert et al., 2005 ; Widdicombe et al., 2010). ***Le terme HAB est donc une appellation générique permettant de qualifier des phénomènes de natures différentes en termes d'organismes responsables, de dynamique des efflorescences et de leurs impacts potentiels*** (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Glibert et al., 2005).

Les effets des HAB concernent, pour la plupart des cas recensés, les ressources marines sauvages ou aquacoles (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Landsberg, 2002). Ils peuvent notamment être responsables (i) de mortalités massives de poissons, de bivalves, (ii) de la contamination des ressources alimentaires marines par des toxines et (iii) de l'altération des écosystèmes, ces effets pouvant conduire à des pertes économiques importantes (Landsberg, 2002 ; Anderson, 2008). Par exemple, en prenant en compte les effets directs sur les ressources marines, la santé publique, l'impact sur le tourisme et la surveillance, les HAB ont représenté un coût de 895 millions de dollars américains pour les Etats Unis et l'Union Européenne en 2003 (Hoagland et Scatata, 2006).

Les principaux modes d'action des HAB peuvent être divisés en deux groupes (Boalch, 1984) :

- Le premier concerne les organismes planctoniques producteurs de toxines pouvant conduire à la contamination des ressources alimentaires et à des mortalités massives d'organismes marins soit

par accumulation des toxines le long des réseaux trophiques soit par toxicité directe (e.g. ichtyotoxicité).

- Le second groupe concerne les espèces formant des efflorescences (au sens strict), c'est-à-dire, qui sont capables d'atteindre de très fortes abondances et biomasses pouvant causer des effets sub-létaux sur les organismes par anoxie du milieu jusqu'à leur mort par asphyxie (Anderson, 2008).

Il arrive parfois que des HAB possèdent les caractéristiques de ces deux groupes (i.e. forte biomasse et toxicité).

### Toxicité des HAB

Sur les 5000 espèces phytoplanctoniques recensées, seules 300 ont été signalées responsables de HAB et 80 ont la capacité de produire des toxines, appelées **phycotoxines** (Hallegraeff, 1993 ; Granéli et Turner, 2006). La plupart des espèces toxiques appartiennent à la classe des Dinophyceae, des Bacillariophyceae (ou diatomées ; principalement du genre *Pseudo-nitzschia*) ou des Cyanophyceae (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Landsberg, 2002). Les phycotoxines sont en général véhiculées à travers les réseaux trophiques depuis les brouteurs herbivores et les filtreurs suspensivores vers les prédateurs supérieurs (e.g., oiseaux, mammifères, homme inclus ; figure 1 ; Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Landsberg, 2002 ; Bhat et al., 2006 ; Glibert et al., 2005 ; Anderson, 2008), la majorité pouvant être transmise à l'homme par contamination des ressources aquacoles notamment, et conduire à six principaux syndromes<sup>1</sup> (Tableau 1):

- Intoxication paralysante (*Paralytic Shellfish Poisoning*, PSP)
- Intoxication diarrhéique (*Diarrhetic shellfish Poisoning*, DSP)
- Intoxication neurotoxique (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*, NSP) et irritation respiratoire
- Azaspiracide (Azaspiracid Poisoning)

---

<sup>1</sup> Syndrome : Ensemble de symptômes et signes cliniques et de modifications pathologiques, toujours associés, dont les causes ou les mécanismes peuvent être différents et qui permettent d'individualiser une affection. (Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine, 2014)

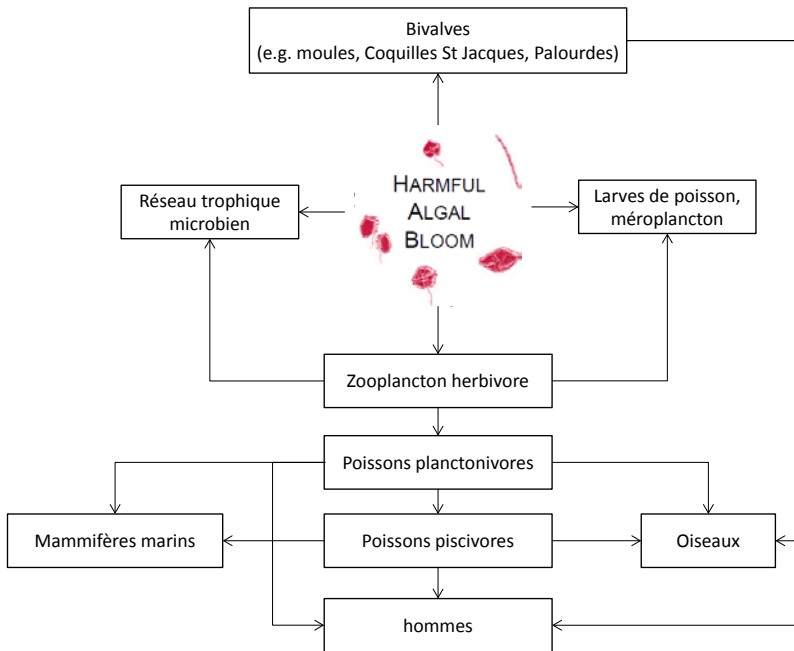
- Intoxication amnésiante (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)
- Ciguatera (Ciguatera Fish Poisoning, CFP)

Les cinq premiers syndromes sont liés à la consommation de bivalves contaminés, c'est-à-dire qui se sont nourris d'espèces phytoplanctoniques toxiques. Le dernier syndrome, CFP, est lié à la consommation de poissons récifaux contaminés par bioaccumulation de ciguatoxine le long des réseaux trophiques (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Hallegraeff, 2003 ; Bhat et al., 2006 ; Salas et al., 2011).

Certaines espèces phytoplanctoniques peuvent être nocives à de faibles concentrations, notamment dans le cas des espèces extrêmement toxiques telles que la Dinophyceae *Dinophysis* sp. Ce genre est en effet responsable d'épisodes de DSP à des abondances d'environ 100 cellules. L<sup>-1</sup> (Glibert et al., 2005 ; Masó et Garcés, 2006).

D'autres prédateurs supérieurs peuvent aussi être victimes de la bioaccumulation des phycotoxines. Par exemple, lors d'efflorescences de *Pseudo-nitzschia* sp., productrices d'acide domoïque, le transfert de la toxine *via* les poissons planctonivores (e.g., anchois, *Engraulis mordax* et sardines, *Sardina pilchardus*) vers les prédateurs supérieurs a provoqué une modification du comportement de lions de mer et d'oiseaux marins (cormorans et pélicans) ce qui a conduit à leur échouage le long des côtes californiennes voire leur mort (Work et al., 1993 ; Lefebvre et al., 1999 ; Gulland et al., 2000 ; Scholin et al., 2000).





**Figure 1. Devenir des phycotoxines dans le réseau trophique (d'après Kallee et al., 2002)**

**Tableau 1. Toxicité des *Harmful Algal Blooms* pour l'homme : syndromes, espèces responsables, toxines, vecteurs et symptômes** (d'après Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Hallegraeff, 2003 ; Bhat et al., 2006 ; Salas et al., 2011)

Syndromes	Espèces responsables	Toxines impliquées	Vecteurs vers l'Homme	Symptômes
Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)	Dinophyceae : <i>Alexandrium</i> sp. <i>Pyrodinium</i> sp. <i>Amphidinium</i> sp. <i>Cochlodinium</i> sp. Cyanophyceae : <i>Anabaena circinalis</i>	Saxitoxines et dérivés	Mollusques filtreurs (e.g. moules, huîtres, coquilles St-Jacques), Crustacés (e.g. crabes, homards)	Engourdissement, picotements, vertiges, paralysie musculaire, fièvre, arrêt respiratoire possible
Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)	Dinophyceae : <i>Dinophysis</i> sp. <i>Prorocentrum</i> sp.	Acide okadaïque, toxine <i>Dinophysis</i>	Coquille St Jacques, moules, palourdes	Nausée, vomissements, diarrhée, crampes abdominales, gastro-entérite aiguë
Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)	Dinophyceae : <i>Amphidinium</i> sp. <i>Cochlodinium</i> sp. <i>Gymnodinium</i> sp. <i>Karenia</i> sp.	Brevetoxines Spirolides Gymnodinines	Coquilles St-Jacques, moules, huîtres, palourdes	Problèmes neurologiques, céphalées, diarrhée, vertiges, nausées, étourdissements, irritation des yeux
Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	Diatomées : Pseudo-nitzschia sp.	Acide domoïque et dérivés	Palourdes, moules, huîtres, coquilles St-Jacques, crabes dormeurs	Nausée, vomissements crampes abdominales, diarrhée, perte de mémoire chronique
Azaspiracide	Dinophyceae : <i>Azadinium spinosum</i>	Azaspiracide	Moules	Cf. DSP
Ciguatera Fish Poisoning (CFP)	Dinophyceae : <i>Gambierdiscus</i> sp., <i>Ostreopsis</i> sp.	Ciguatoxine	Poissons récifaux, zone tropicale	Diarrhée, douleurs abdominales, nausées, vomissements, anomalies sensorielles, chute de la tension artérielle, ralentissement du cœur

### Biomasse excessive

Certaines efflorescences phytoplanctoniques peuvent atteindre des abondances telles qu'elles peuvent générer des conditions d'hypoxie voire d'anoxie du milieu liées à l'apport massif de matière organique et à sa dégradation (Anderson, 2008). Cela peut conduire à des mortalités massives d'organismes marins, vertébrés (e.g. poissons, mammifères) comme invertébrés<sup>2</sup>. Ce phénomène d'anoxie est accentué dans des baies enclavées où les conditions hydrodynamiques ne permettent pas un renouvellement suffisant des masses d'eau (Hallegraeff, 1992). Par exemple, en Afrique du Sud, des échouages massifs de homards (60 tonnes) et de poissons (1500 tonnes) ont été observés suite à la sénescence d'une efflorescence d'une Dinophyceae non toxique, *Ceratium balechii* (Pitcher et Probyn, 2011). Par ailleurs, certaines espèces responsables de HAB sont capables de modifier les propriétés physico-chimiques de l'eau de mer telles qu'une augmentation de la viscosité ou de l'acidité par exemple (voir § 3.1).

## **2. Contexte aquacole en zone côtière**

Depuis les années 1980, la production aquacole ne cesse d'augmenter afin de répondre à la demande alimentaire d'une population humaine toujours plus importante. En effet, un doublement de la production aquacole a été observé au cours des trente dernières années, et la production piscicole marine mondiale atteignait  $5,5 \times 10^6$  tonnes en 2012, la Norvège et la Chine étant les plus gros producteurs (source FAO<sup>3</sup>). L'aquaculture constitue une source importante de nourriture de haute qualité et peut être considérée comme un outil de gestion permettant de limiter la pression de pêche sur les stocks de poissons sauvages. En effet, ces derniers sont parfois lourdement touchés par la surpêche et la dégradation des habitats, notamment dans les zones côtières (Kalle et al., 2002). Principalement pour des raisons pratiques

---

<sup>2</sup> Le terme *invertébrés* est utilisé ici en tant que terme générique utilisé dans l'ancienne classification (Lecointre and Le Guyader, 2006)

<sup>3</sup> FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014)

(e.g. accès aux sites) les exploitations piscicoles sont généralement installées dans ces zones côtières. Cela les rend dépendantes des paramètres environnementaux et de leur variabilité qui peut être accentuée par la spécificité des sites (profondeur, hydrodynamisme).

Les zones côtières sont le lieu d'intenses activités humaines puisque plus de 16 % de la population mondiale vit sur une bande littorale d'environ 15 km, à des densités de population cinq fois plus élevées que la moyenne des zones habitées (Noin, 1999). En plus d'une urbanisation du littoral (par exemple, plus de 95 % de la côte belge en mer du Nord est le siège d'activités humaines ; Van den Steen et al., 2005), s'y associe une exploitation importante des ressources marines puisque 90 % de la pêche mondiale et la quasi-intégralité des activités aquacoles se déroulent dans les zones côtières (e.g., crevetticulture dans les mangroves, élevage de saumons dans les fjords en Atlantique Nord, conchyliculture sur l'estran ; Holligan et Reiners, 1992).

La concentration des activités humaines sur la zone littorale a aussi un impact sur les apports fluviaux. En effet, l'agriculture intensive combinée aux rejets urbains et industriels, provoque un enrichissement en éléments nutritifs des cours d'eau et donc de la zone côtière, pouvant parfois conduire à l'eutrophisation<sup>4</sup> (Lancelot et al., 1997 ; Cloern, 2001). Cependant, les zones côtières sont essentielles dans le fonctionnement des écosystèmes marins puisque, malgré leur faible surface relative (0,5 % de la surface des océans) et grâce à leur faible profondeur et aux apports terrigènes en sels nutritifs, elles concentrent jusqu'à 31 % de la production primaire océanique (Holligan et Reiners, 1992 ; Pauly et Christensen, 1995).

Ainsi, les exploitations piscicoles qui sont en interactions permanentes avec le milieu naturel sont tenues de contrôler leurs impacts sur l'environnement (e.g. effluents organiques, relargage d'éléments

---

<sup>4</sup> Eutrophisation : enrichissement d'origine anthropique des eaux en sels nutritifs aboutissant à une croissance accélérée des algues et végétaux supérieurs et produisant une perturbation indésirable des écosystèmes aquatiques et de la qualité de l'eau (OSPAR Commission, 2009).

nutritifs, envasement) et doivent composer avec l'effet de l'environnement sur la production (e.g. pollution, eutrophisation, efflorescences). En effet, la dégradation de l'environnement augmente le stress et la fréquence des pathologies dans les élevages diminuant ainsi la productivité (Read et Fernandes, 2003). Si l'effet des polluants (e.g. métaux, polluants organiques persistants) sur les poissons marins est largement étudié, l'effet des composantes naturelles du milieu le sont beaucoup moins. Dans un contexte où les HAB sont de plus en plus fréquents (Anderson, 2008), il apparaît important d'étudier l'impact des efflorescences phytoplanctoniques sur les poissons, que ce soit dans le milieu naturel ou en élevage.

### **3. Impacts du phytoplancton et des HAB sur les poissons**

#### **3.1. Modifications de l'environnement physico-chimique**

Les efflorescences phytoplanctoniques sont connues pour influencer les propriétés physico-chimiques de l'eau de mer (Jenkinson et Biddanda, 1995 ; Jenkinson et Wyatt, 1995 ; Mohamed et Mesaad, 2007 ; et références ci-après). Non seulement la production d'une forte biomasse augmente la turbidité et donc diminue l'épaisseur de la zone euphotique (Ferrante et al., 2013 ; Jenkinson et Wyatt, 1995), mais certaines espèces phytoplanctoniques, HAB sans être toxiques, peuvent modifier les propriétés rhéologiques<sup>5</sup> (Jenkinson et Biddanda, 1995) de l'eau de mer ou encore en augmenter l'acidité (Mohamed et Mesaad, 2007 ; figure 2).

#### Viscosité

La viscosité<sup>6</sup> du milieu marin dépend essentiellement de la température (relation inversement proportionnelle ; Stanley et Batten, 1969). Cependant, elle peut aussi être influencée par les composantes

---

<sup>5</sup> Propriétés rhéologiques: lois du comportement des matériaux, liant, à un instant donné, les contraintes aux déformations. Elles définissent l'élasticité, la viscosité d'un fluide et donc son écoulement (Jenkinson and Biddanda, 1995).

<sup>6</sup> Viscosité : Résistance d'un fluide au glissement d'une couche par rapport à une autre (Larousse 2014)

biologiques de l'eau de mer comme les communautés phytoplanctoniques et les composés excrétés par les organismes marins (Jenkinson et Biddanda, 1995 ; Jenkinson et Wyatt, 1995). La viscosité a une influence sur tous les processus à micro-échelle (e.g. déplacement des organismes unicellulaires et certains métazoaires à faible nombre de Reynolds, Mitchell et al., 1985 ; absorption des sels nutritifs par les cellules phytoplanctoniques, Jenkinson, 1986). Outre son évidente influence sur les relations proies-prédateurs au sein du plancton (e.g. réduction de la vitesse et modification de la trajectoire de nage des copépodes ; Seuront et Vincent, 2008), la viscosité a un impact sur les processus de respiration et d'excrétion au niveau des branchies des poissons (Jenkinson, 1989, 1993 ; Jenkinson et Biddanda, 1995 ; Couturier et al., 2007). La viscosité joue aussi un rôle important dans l'activité nataoire des larves de poissons. Ainsi, sous une taille critique, le coût métabolique lié au déplacement augmente lorsque la viscosité augmente. Cela a été observé en particulier chez le hareng, *Clupea harengus* et l'églefin, *Melanogrammus aeglefinus* (Fuiman et Batty, 1997 ; von Herbing et Keating, 2003).

Le Prymnesiophyceae *Phaeocystis globosa* a un cycle de vie polymorphique composé d'une alternance de phases libres et coloniales. En phase coloniale, les cellules sécrètent une matrice mucilagineuse d'exo-polysaccharides (Guillard et Helleburst, 1971) et ces composés conduisent à une augmentation de la viscosité de l'eau de mer pouvant atteindre 259 % en Manche Orientale (Seuront et al., 2006, 2007). L'aspect gélatineux conféré à l'eau de mer par la forme coloniale de *P. globosa* (i.e. aspect de blanc d'œuf, Schoemann et al., 2005) peut même provoquer le colmatage des filets à plancton et de pêche (Boalch, 1984). D'autres espèces phytoplanctoniques comme les diatomées des genres *Coscinodiscus*, *Thalassiosira* et *Chaetoceros* peuvent produire des exopolysaccharides et induire les mêmes effets sur les communautés pélagiques que *P. globosa* (Boalch, 1984 ; Passow, 2002 ; Fernandes et Frassão-Santos, 2011). En ce qui concerne les poissons, Jenkinson (1989, 1993) a montré, lors d'expériences d'exposition au laboratoire, que

l'augmentation de la viscosité (facteur 14) induite par la Raphidophyceae *Chattonella antiqua* conduit à la diminution du débit d'eau dans les branchies d'achigan à grande bouche (*Micropterus salmonides*) et ainsi, à la fois à une réduction de l'excrétion (principalement bicarbonate,  $\text{HCO}_3^-$  et ammonium,  $\text{NH}_4^+$ ), à une accumulation de ces produits dans les tissus et à la mort des poissons.

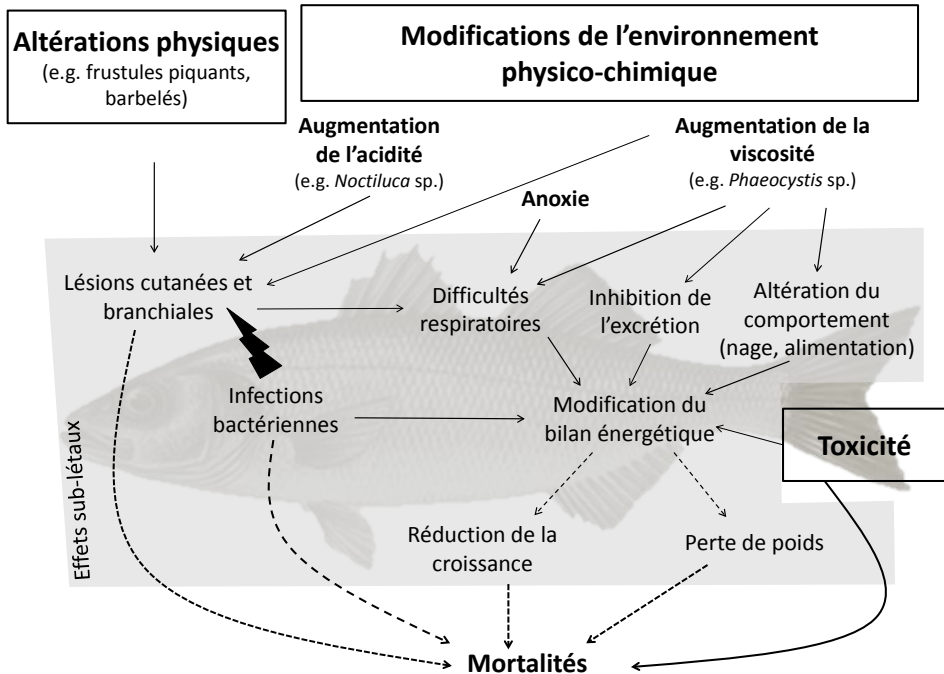
### Acidité

Certains hétérotrophes méso- et microplanctoniques peuvent aussi être responsables de l'augmentation de l'acidité du milieu. Par exemple, les noctiluques (*Noctiluca scintillans*, Dinophyceae) sont des organismes hétérotrophes capables d'atteindre de fortes abondances sous forme d'agrégats<sup>7</sup> (e.g.  $3,0 \times 10^6$  cellules.m<sup>-3</sup>, Mohamed et Mesaad, 2007 ;  $5,3 \times 10^6$  cellules.m<sup>-3</sup>, Al-Gheilani et al., 2011) pouvant non seulement mener à l'anoxie du milieu (Bhat et al., 2006 ; Smayda, 1997), mais également influencer le pH de l'eau de mer. Les agrégats de noctiluques sont généralement localisés en surface ce qui leur permet de se situer dans la zone où la production phytoplanctonique est la plus élevée (Peres et al., 1986 ; Mohamed et Mesaad, 2007). Du fait de leur hétérotrophie, leur forte abondance peut conduire localement à une augmentation de la concentration en  $\text{HCO}_3^-$  et donc à une diminution du pH (Mohamed et Mesaad, 2007). De plus, les noctiluques produisent de l'ammoniaque dans leur vacuole qui jouerait un rôle dans la digestion de leurs proies (diatomées, œufs de copépodes, autres Dinophyceae ; Mohamed et Mesaad, 2007). Une fois libéré dans l'eau de mer, le plus souvent par dégradation des cellules, l'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) s'ionise pour donner de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). La concentration en ammonium pourrait ainsi atteindre des seuils toxiques pour les organismes lors d'efflorescences très prononcées. Montani et al. (1998) ont en effet démontré que la concentration pouvait être multipliée par 16 à 25 dans les agrégats de noctiluques. Cela a été confirmé en mer Rouge (Mohamed et Mesaad, 2007) et en mer intérieure du Japon où les marées rouges causées par les noctiluques sont courantes au printemps et en été (Okaichi et Nishio,

---

<sup>7</sup> Agrégat : amas de cellules (Larousse 2014)

1976). Ainsi, des concentrations en ammoniacque proches de 680 mg  $\text{NH}_3\text{-N.L}^{-1}$  correspondent à une abondance de  $3 \times 10^6$  cellules. $\text{L}^{-1}$  (Mohamed et Mesaad, 2007 ; Okaichi et Nishio, 1976), et sont largement supérieures à la concentration létale (LC 50) pour la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*, 32 à 207 mg eqN. $\text{L}^{-1}$ , Randall et Tsui, 2002). L'augmentation de la concentration en ammonium jusqu'à des seuils toxiques, associée à la diminution du pH (i.e. augmentation de l'acidité) serait donc la cause de mortalités massives de poissons ayant lieu pendant les efflorescences de noctiluques dans diverses zones géographiques (e.g. Inde, golfe d'Oman et mer d'Arabie, mer du Japon, mer Noire ; Okaichi et Nishio, 1976 ; Smayda, 1997 ; Bhat et al., 2006 ; Mohamed et Mesaad, 2007 ; Kopuz et al., 2014).



**Figure 2. Synthèse des effets potentiels des HAB sur les poissons.** Les effets sub-létaux apparaissent dans le cadre gris.



### 3.2. Ichtyotoxicité

Si leurs effets sur l'Homme sont les plus étudiés en raison du risque de santé publique, les phycotoxines peuvent aussi affecter les organismes marins comme les vertébrés ou les invertébrés jusqu'à causer des mortalités massives (Shumway, 1990). Les espèces toxiques pour les poissons sont essentiellement représentées par les Raphidophyceae, Dinophyceae et Prymnesiophyceae (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000) et peuvent être responsables de mortalités aussi bien dans le milieu naturel qu'en élevage (Deeds et al., 2002 ; Gosselin et al., 1989 ; Tester et al., 2000). Ce fut le cas en Nouvelle Zélande, lorsqu'une efflorescence toxique de la Raphidophyceae *Heterosigma akashiwo* ( $2 \times 10^6$  cellules.L<sup>-1</sup>) a entraîné la perte de 600 tonnes de saumon quinnat (*Oncorhynchus tshawytscha*) au cours du mois de janvier 1989 (Chang et al., 1990 ; Hallegraeff, 1992).

La toxicité des Dinophyceae sur les poissons a aussi été observée à de nombreuses reprises aussi bien en élevage que dans le milieu naturel. Par exemple, dans des fjords du sud-ouest de la Norvège, une efflorescence de *Prymnesium parvum* a causé la perte de 750 tonnes de poisson dans un élevage de saumon atlantique (*Salmo salar*) et de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Kaartvedt et al., 1991). Dans le milieu naturel, sur la côte Est des Etats-Unis, une Dinophyceae non identifiée se développe uniquement en présence de poissons (e.g. tilapias, *Oreochromis* sp. ; aloses, *Brevoortia* sp.), et est responsable de mortalités massives des stocks naturels et aquacoles. Quelques heures après la mort des poissons, la Dinophyceae retourne en état de dormance sous forme de kystes (Burkholder et al., 1992).

Par ailleurs, des expériences d'exposition ont été menées au laboratoire pour tester la toxicité spécifique de certaines Dinophyceae et diatomées (genre *Pseudo-nitzschia*) sur les poissons, et étudier les modes d'action de ces espèces délétères (i.e. responsables de HAB). Il a ainsi été démontré que les Dinophyceae semblent produire des toxines responsables de mortalités importantes de poissons à différents stades de vie (Granéli et Turner, 2006). Notamment, *Protogonyaulax tamarensis* peut être responsable de taux importants de mortalité de larves de hareng

(*Clupea harengus*) et de capelan (*Mallotus villosus*) tant par exposition directe que *via* un vecteur trophique contaminé (*Brachyonus plicatilis* et *Artemia salina*, Gosselin et al., 1989).

Le transfert trophique des phycotoxines des espèces productrices vers les consommateurs secondaires a été démontré pour la première fois par White (1980) et observé de manière récurrente depuis lors (cf. figure 1 ; Turner, 2006). Notamment, des copépodes (*Acartia clausi*) et des larves de cirripèdes (nauplii de *Balanus* sp.) nourris avec une culture toxique de la Dinophyceae *Gonyaulax excavata* peuvent rester toxiques pendant 6 à 7 jours. Si cette toxicité n'a apparemment pas d'effet sur le comportement et la survie du zooplancton, elle peut être transmise aux poissons planctonivores et provoquer des mortalités massives (e.g. harengs en baie de Fundy, Canada ; lançons, *Ammodytes* sp., sur les côtes du Royaume-Uni ; White, 1981). Les Dinophyceae hétérotrophes, en particulier les noctiluques (*Noctiluca scintillans*), sont des consommateurs non négligeables de plancton (zooplancton, phytoplancton toxique ou non ; Huang et Qi, 1997 ; Quevedo et al., 1999), apparaissant ponctuellement en très forte abondance dans le milieu (cf. §2.1 ; Uhlig et Sahling, 1990). L'ingestion de taxons toxiques (e.g. *Pseudo-nitzschia* sp., *Dinophysis* sp., *Alexandrium* sp.) par les noctiluques a récemment été étudiée (Espagne, Escalera et al., 2007 ; Frangópulos et al., 2011) faisant de ce groupe un vecteur supplémentaire de toxines au sein du réseau trophique pélagique (Escalera et al., 2007). Lors des études de toxicité d'espèces phytoplanctoniques, il semble donc nécessaire d'intégrer l'ensemble des composantes du réseau trophique, à savoir (i) les espèces prédatrices directes des espèces phytoplanctoniques, mais aussi (ii) de considérer les vecteurs potentiels afin d'appréhender l'ensemble des risques pour les écosystèmes.

Enfin, en ce qui concerne les diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia*, des poissons (saumons coho, *Oncorhynchus kishtch*) exposés à des doses importantes d'acide domoïque (AD) représentatives du milieu naturel ( $2,3 \mu\text{gAD.g}^{-1}$ ) n'ont pas montré de signe ichtyotoxique lié à l'ingestion de la toxine (Lefebvre et al., 2007). Les mêmes observations

ont été faites pour des poissons planctonivores tels que l'anchois (*Engraulis mordax*, Lefebvre et al., 2001).

Dans le milieu naturel, une efflorescence de *Pseudo-nitzschia* sp. productrice de cette toxine ne causera donc pas de mortalité de poissons par toxicité. Par contre, des expériences utilisant des injections intrapéritonéales ou intra-cœlomiques d'acide domoïque ont montré qu'il a un effet excitotoxique (i.e. toxicité qui touche le système nerveux), altérant ainsi le comportement des poissons (nage en spirale, de haut en bas et en cercles) et pouvant entraîner leur mort à des doses importantes (1 à 5,6 mg AD. kg<sup>-1</sup>; Lefebvre et al., 2012). Cette modification du comportement des poissons peut les isoler d'un banc et les rendre plus vulnérables à la prédation, augmentant le risque de transfert trophique de l'acide domoïque vers les espèces de niveaux trophiques supérieurs. Dans ce contexte, si l'acide domoïque ne semble pas atteindre le système nerveux chez les poissons après ingestion, un risque toxique peut toujours être envisagé dans le milieu naturel. Ainsi, les études portant sur les interactions entre les efflorescences phytoplanctoniques toxiques et les poissons ne peuvent exclure le genre *Pseudo-nitzschia*.

### **3.3. Effets mécaniques, altération des tissus, colmatage des branchies**

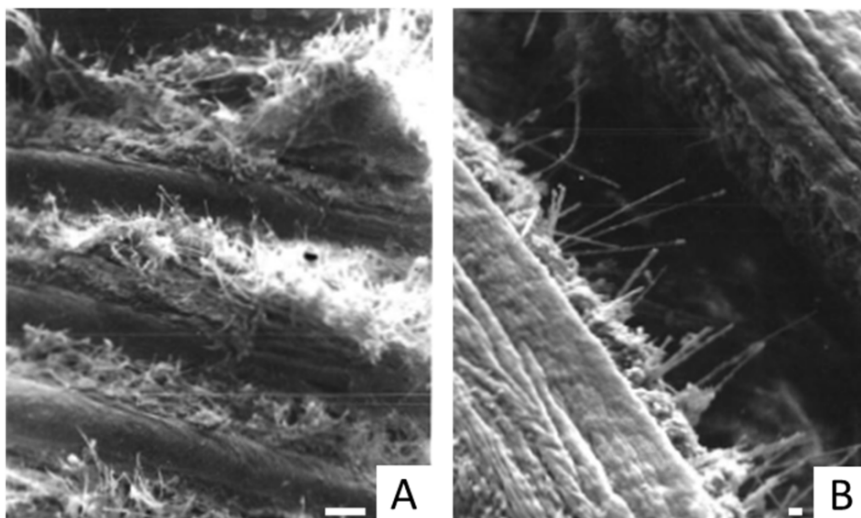
De par leur forme d'aiguille (e.g. *Pseudo-nitzschia* sp., *Rhizosolenia* sp.) ou parce que leur frustule porte des soies plus ou moins fines et silicifiées (e.g. *Chaetoceros* sp.), certaines espèces de diatomées peuvent avoir des effets délétères pour les organismes marins (Rodger et al., 2011). Les diatomées piquantes ont de nombreuses fois été associées à des mortalités massives dans les fermes piscicoles (Glibert et al., 2005). Par exemple, une efflorescence de *Chaetoceros whigami* a conduit à la perte de 44 tonnes (équivalent à 13 732 poissons) de saumon atlantique (*Salmo salar*) dans une ferme écossaise (Treasurer et al., 2003). Des mortalités massives de salmonidés ont aussi été observées en Colombie Britannique (Canada, Albright et al., 1993 ; Kent et al., 1995) ou sur la côte Est des Etats-Unis (Rensel, 1991) suite à des efflorescences de *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp. et *Thalassiosira* sp.

En réalité, plusieurs facteurs jouent sur l'intensité des dommages causés par les efflorescences phytoplanctoniques à l'aquaculture, en particulier dans les fermes ou les cages d'élevage en milieu naturel. Citons à titre d'exemples, l'espèce de poisson élevée, son état physiologique, son stade de développement, l'abondance phytoplanctonique, le temps d'exposition à l'efflorescence et l'éventuelle présence d'autres pathogènes, sources d'infections secondaires (e.g. vibriose ; Rodger et al., 2011).

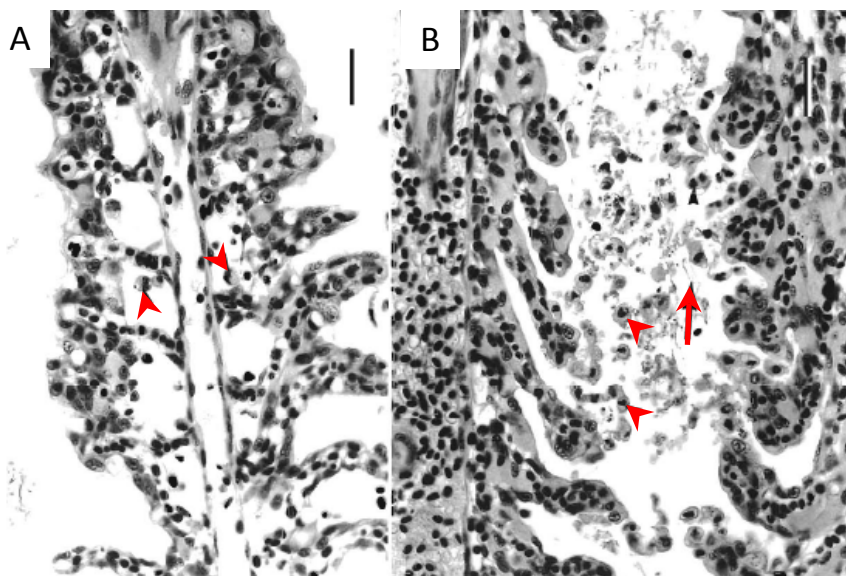
Certains effets délétères des diatomées sont directement observables à l'œil nu sur les poissons et se caractérisent par exemple par de petites hémorragies au niveau du ventre et des nageoires pectorales (Kent et al., 1995). Au niveau microscopique, les épines siliceuses des diatomées permettent aux frustules de venir se loger dans les tissus branchiaux et d'y rester fixés malgré la mort des diatomées (figure 3). Cela provoque, à terme, une abrasion des tissus et un colmatage des branchies (Bruno et al., 1989), ce dernier pouvant aussi être lié à la production de mucus par les cellules phytoplanctoniques ou par leur abondance très élevée (e.g. *Heterosigma akashiwo*, *Chrysochromulia polylepis*, Chang et al., 1990). Dans différentes études, l'analyse histologique des tissus branchiaux a montré une hyperplasie des cellules épithéliales branchiales, une hypertrophie des lamelles branchiales, la fusion des lamelles secondaires, des œdèmes et nécroses sévères ainsi que des hémorragies localisées allant jusqu'à la dégénérescence des tissus branchiaux (Figure 4 ; Chang et al., 1990 ; Yang et Albright, 1992 ; Kent et al., 1995 ; Treasurer et al., 2003).

En général, l'altération des tissus branchiaux est associée à une production excessive de mucus à la surface des lamelles branchiales (Figure 3). La production de mucus est en fait un mécanisme de protection mis en place lors de stress qu'ils soient mécaniques ou toxiques (Farrington, 1988 ; Shen et al., 2011). L'augmentation de l'épaisseur du mucus à la surface de l'épithélium branchial limite les fonctions branchiales principales que sont la respiration et l'excrétion (Farrington, 1988 ; Yang et Albright, 1992 ; Treasurer et al., 2003 ; Shen et al., 2011). Les branchies ne pouvant plus remplir leur fonction initiale,

les mortalités massives observées sont la plupart du temps dues à une asphyxie des poissons.



**Figure 3.** Branchies de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées à *Chaetoceros concavicornis* observées au microscope électronique à balayage. A. cellules de *C. concavicornis* entre les lamelles secondaires (barre d'échelle : 100  $\mu$ m), et B. Accumulation de mucus sur l'épithélium branchial (barre d'échelle : 10  $\mu$ m, d'après Yang et Albright, 1992)



**Figure 4.** Lésions branchiales associées à une efflorescence phytoplanctonique (*Thalassiosira* sp. et *Skeletonema* sp.) chez le saumon atlantique (*Salmo salar*).

Barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ . **A. Œdèmes et inflammation des branchies.** Têtes de flèche : cellules inflammatoires dans des œdèmes. **B. Nécroses de l'épithélium branchial.** Têtes de flèche : cellules épithéliales nécrosées, flèche : diatomée (d'après Kent et al., 1995). Les branchies, même si ce sont les plus exposées, ne sont cependant pas les seuls organes touchés. L'action mécanique des diatomées peut aussi atteindre le système digestif par ingestion (volontaire ou non) et entraîner une érosion de l'épithélium digestif. Des pertes d'appétit passagères ou chroniques coïncident avec l'observation de nécroses et d'hémorragies dans le foie de salmonidés exposés à des diatomées piquantes (Chang et al., 1990 ; Treasurer et al., 2003). Ces altérations du système digestif induites par les efflorescences phytoplanctoniques semblent être la raison majeure de l'inappétence dans certaines piscicultures (Treasurer et al., 2003). Ces effets sont qualifiés de sub-létaux (Anderson, 2008) dès lors qu'ils ont un effet délétère non mortel sur les individus comme l'altération du comportement ou de la croissance par exemple, et peuvent conduire à des baisses de productivité des fermes aquacoles (figure 2).

***En conclusion, une altération mécanique des tissus des poissons par une espèce phytoplanctonique piquante constitue une voie d'entrée pour d'autres pathogènes (sources d'infections microbiennes) entraînant un affaiblissement de l'état général des poissons (effet sub-létal) voire leur mortalité. Les mortalités peuvent aussi être soudaines lors d'efflorescences très marquées (abondance phytoplanctonique très élevée atteinte en très peu de temps) par anoxie du milieu ou bien par colmatage des branchies conduisant directement ou indirectement (i.e. viscosité) à l'asphyxie.***

#### **4. Problématique et objectifs de la thèse**

Le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) est la première espèce de poisson marin dont le cycle de vie a été maîtrisé totalement dans les années 1970 et donc, la première espèce de poisson marin (hors salmonidés) élevée à des fins commerciales en Europe (source FAO<sup>8</sup>).

---

<sup>8</sup> **FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, Cultured Aquatic Species Information Program, *Dicentrarchus labrax*.

Aujourd'hui, les principaux pays producteurs sont situés en mer Méditerranée (Grèce, Italie, Turquie, Espagne, Croatie, Egypte). La taille commerciale (400 – 450 g) est atteinte en 1,5 à 2 ans dans les élevages intensifs (i.e. fortes densités et nourriture entièrement apportée par l'homme) et la production mondiale atteignait environ 150 000 tonnes en 2012 (figure 5, source FAO). La France est l'un des plus gros producteurs d'alevins et exporte environ 55 % de sa production (source FAO<sup>9</sup>). Généralement, les écloseries<sup>10</sup> sont composées de bassins à terre en circuit fermé afin de contrôler la qualité de l'eau (paramètres physico-chimiques, filtration et stérilisation). La plupart des sites de grossissement<sup>11</sup> sont, quant à eux, situés dans des systèmes ouverts (i.e. bassins à terre alimentés en eau de mer naturelle et cages placées dans le milieu naturel). Cela implique que dès la sortie de l'écloserie (à partir d'environ 3 g pour les bars), les poissons sont exposés aux conditions physico-chimiques et biologiques de l'environnement et à leurs variations. Parmi ces conditions environnementales, la température est un paramètre crucial car elle conditionne la vitesse de croissance des poissons (Brett, 1979). C'est pour cela que le grossissement des bars se déroule dans des cages en pleine mer sur les côtes méditerranéennes et dans des bassins à terre sur la façade Atlantique – Manche - mer du Nord, ces derniers permettant le contrôle de la température de l'eau d'élevage (source FAO<sup>7</sup>).



<sup>9</sup> FAO, Fisheries and Aquaculture, Vue Générale du Secteur Aquacole, France. 2005.

<sup>10</sup> Écloserie : Unité de production d'alevins de poissons, regroupe l'élevage des reproducteurs, l'incubation des œufs, l'élevage larvaire et des alevins.

<sup>11</sup> Grossissement : étape de la production des poissons qui permet d'amener les alevins à une taille commercialisable

**Figure 5. Evolution mondiale de la production de bars (*Dicentrarchus labrax*) en milliers de tonnes (Source : FAO).**

Le site atelier de ce travail de recherche se situe dans les eaux côtières de la baie sud de la mer du Nord et s'intéresse plus particulièrement à une ferme d'élevage de bars localisée à terre (Gravelines, France). Dans cette ferme aquacole (précédemment Aquanord S.A., aujourd'hui Aquanord Ichtus), les poissons sont élevés dans un mélange d'eau de mer comprenant des apports naturels (mer du Nord) et des apports issus des échangeurs thermiques (i.e. circuits de refroidissement) de la centrale nucléaire (CNPE<sup>12</sup> de Gravelines). Le traitement de l'eau de mer passant par la centrale nucléaire consiste en un réchauffement de 10 °C par rapport au milieu naturel, une filtration sur un tamis d'un millimètre et une chloration de 1 % maximum par électrophorèse lorsque la température du milieu excède 10 °C afin de limiter la fixation d'épibiontes dans les canalisations (service environnement du CNPE de Gravelines). En phase de grossissement, les bars de la ferme sont donc généralement exposés aux composantes hydro-biologiques caractérisant les masses d'eau de la baie sud de la mer du Nord, et notamment à la variabilité saisonnière des communautés planctoniques (e.g. phytoplancton, zooplancton) pouvant comprendre des espèces potentiellement nocives voire toxiques (cf §2).

En Manche orientale et dans le sud de la mer du Nord, la succession des communautés phytoplanctoniques est soumise aux variations saisonnières des conditions hydrobiologiques. Elle est caractérisée par deux efflorescences au cours de l'année, au printemps et en automne, cette dernière étant de moindre importance (Joint et Pomroy, 1993 ; Reid et al., 1990). L'efflorescence printanière peut être décomposée en trois périodes en fonction des communautés présentes (e.g. Joint et Pomroy, 1993 ; Rousseau et al., 2002 ; Seuront et al., 2006 ; Schapira et al., 2008 ; Grattepanche et al., 2011a) :

---

<sup>12</sup> CNPE : Centre Nucléaire de Production d'Electricité.



(1) une communauté de fin d'hiver dominée par des diatomées fortement silicifiées (e.g. *Thalassiosira* sp., *Asterionellopsis* sp., *Paralia sulcata*)

(2) une efflorescence du Prymnésiophyceae *Phaeocystis globosa* qui domine la communauté phytoplanctonique accompagnée de diatomées comme *Chaetoceros* sp. ou *Pseudo-nitzschia* sp.

(3) une seconde efflorescence de diatomées succède à celle de *P. globosa* (fin de printemps, début d'été) et comprend des espèces peu silicifiées (*Guinardia* sp., *Rhizosolenia* sp.) capables d'utiliser les ressources nutritives restant dans le milieu et est généralement associée à de fortes abondances de Dinophyceae (Grattepanche et al., 2011a).

En baie sud de la mer du Nord, au sein de la ferme piscicole Aquanord S.A., des mortalités massives (jusqu'à 20% de la mortalité annuelle) et récurrentes de bar ont lieu au printemps depuis plus de dix ans, et semblent coïncider avec l'efflorescence phytoplanctonique printanière. Les services vétérinaires et le personnel surveillant les infestations parasitaires et les infections bactériennes (e.g. vibriose) n'ont pas trouvé de pathologie associée aux mortalités observées. Par conséquent, une implication de l'efflorescence a été suspectée.

## Objectifs et organisation du manuscrit

Le phytoplancton semblant jouer un rôle dans les mortalités saisonnières de bars, ce travail de thèse vise à **évaluer l'effet de l'efflorescence phytoplanctonique printanière sur les juvéniles de bar en conditions aquacoles et au laboratoire** en répondant aux questions suivantes :

- Une coïncidence peut-elle être mise en évidence entre l'efflorescence phytoplanctonique printanière et le pic de mortalité des bars au sein de la ferme aquacole ? si oui, quels taxons phytoplanctoniques dominent ?
- Si le pic de mortalité est lié à l'efflorescence phytoplanctonique, quels effets délétères sont en jeu pour les poissons ?
- Ces mortalités sont-elles liées à une seule espèce, toxique ou non ? ou bien est-ce une combinaison de facteurs qui est impliquée ? (e.g. un effet toxique combiné à un effet mécanique direct et/ou à la modification des propriétés physico-chimiques du milieu)
- Est-il possible d'atténuer l'impact des efflorescences phytoplanctoniques sur les poissons ?

Cette étude s'est donc articulée autour de quatre volets de recherche (figure 6) :

La première étape de cette étude a été de caractériser la coïncidence entre l'efflorescence phytoplanctonique printanière et l'augmentation des mortalités à l'échelle pluriannuelle. Le **premier chapitre (Chapitre I, page 24)** présente les résultats d'une analyse de séries temporelles (2005-2013) visant à établir une corrélation entre les données hebdomadaires de mortalité de poissons et les données d'abondance spécifique et de biomasse du phytoplancton.

Il s'est ensuite agi de caractériser les communautés phytoplanctoniques et leur succession aux abords de la ferme aquacole. Le **second chapitre (Chapitre II, page 36)** de cette thèse présente les résultats du suivi

saisonnier (année 2012) réalisé sur les communautés phytoplanctoniques de la baie sud de la mer du Nord dans le canal alimentant la ferme aquacole en eau de mer (canal d'amenée). Le genre *Pseudo-nitzschia* ayant été détecté à plusieurs reprises dans la Manche orientale et dans le sud de la mer du Nord (cf. Chapitre I., Schapira et al., 2008 ; Klein et al., 2010 ; Grattepanche et al., 2011a ; Lefebvre et al., 2011), ce chapitre étudie principalement sa diversité et sa toxicité en relation avec la succession des communautés phytoplanctoniques et les conditions physico-chimiques de l'environnement.

Delegrange A.<sup>a,b</sup>, Lefebvre A.<sup>c</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>, Courcot L.<sup>a,b</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>. ***Pseudo-nitzschia* sp. diversity in the southern North Sea, domoic acid production and associated phytoplankton communities.** En préparation pour soumission à *Harmful Algae*.

Ensuite, la question de l'effet potentiel de *Pseudo-nitzschia* sur les juvéniles de bars a été soulevée. Puisqu'il existe très peu d'études concernant l'effet de *Pseudo-nitzschia* sp. sur les poissons, et qu'aucune ne s'est intéressée aux bars (*Dicentrarchus labrax*), Le **troisième chapitre (Chapitre III, page 60)** présente les résultats d'une expérience d'exposition de juvéniles de bars à l'espèce de *Pseudo-nitzschia* dominante pendant le suivi réalisé en 2012 : *P. delicatissima*. Au cours de cette expérience, l'effet nocif potentiel (toxique et/ou mécanique) de *P. delicatissima* a été évalué d'une part, sur la condition et la croissance des poissons et d'autre part, sur l'état des branchies.

Delegrange A.<sup>a,b\*</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>, Courcot L.<sup>a,b</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>. 2015. **Testing the vulnerability of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to the Harmful Algal Bloom (HAB) species *Pseudo-nitzschia delicatissima*.** *Aquaculture* 437 : 167-174

Aucun effet délétère des espèces dominantes identifiées pendant l'efflorescence phytoplanctonique n'a pu être mis en évidence (Chapitres I et II). Les mortalités de bars observées dans la ferme aquacole pourraient donc être liées à l'effet combiné de plusieurs espèces

phytoplanctoniques présentes pendant l'efflorescence. De ce fait, l'objectif du **quatrième chapitre (Chapitre IV, page 82)** a été de tester l'effet d'une efflorescence phytoplanctonique dans son ensemble sur des juvéniles de bar, en conditions aquacoles. Pour cela, l'expérience réalisée en mésocosmes s'est inspirée des systèmes d'aquaculture intégrée (Schneider et al., 2005 ; Blancheton et al., 2009) qui cherchent à atténuer l'effet de l'aquaculture sur l'environnement. Le mode de conception a en fait été inversé en utilisant des organismes filtreurs en amont des bassins d'élevage pour diminuer l'abondance phytoplanctonique. Cette expérience est une étude de cas qui considère les organismes suspensivores comme outil de mitigation de l'impact des efflorescences phytoplanctoniques sur l'aquaculture.

Delegrange A.<sup>a,b\*</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>, Duret M.<sup>a,b</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>. **Mussels as a mitigation tool to prevent phytoplankton spring bloom noxious effects on farmed fish? A test-case experiment.** *Aquacultural Engineering* 66 : 52-61.

La synthèse de ces travaux et les perspectives de recherche sont présentés dans la dernière partie de cette thèse (**Chapitre V, page 106**).

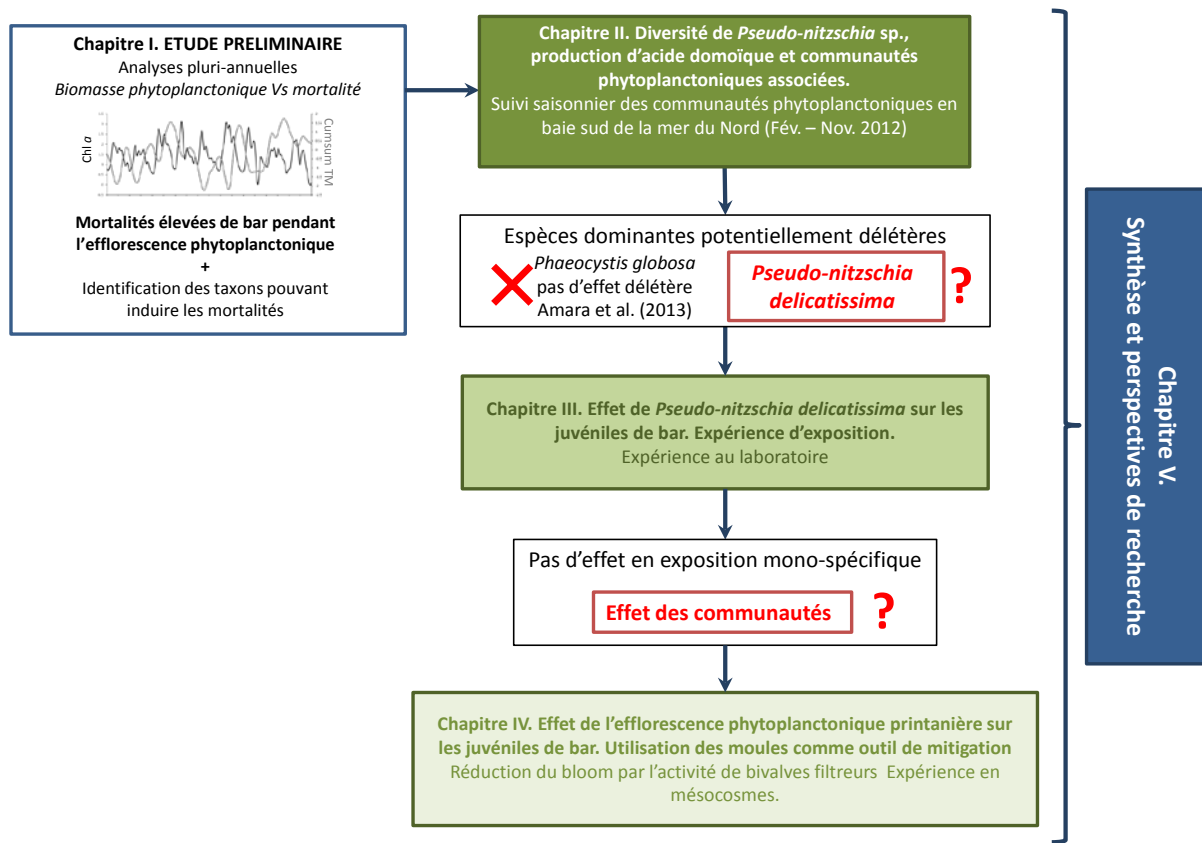


Figure 6. Schéma d'organisation des études réalisées au cours de cette thèse

---

**Chapitre I. Etude préliminaire :  
coïncidence entre l'efflorescence  
phytoplanctonique printanière et les  
mortalités de bar en mer du Nord**

---



## **I.1. Introduction : site atelier et problématiques associées**

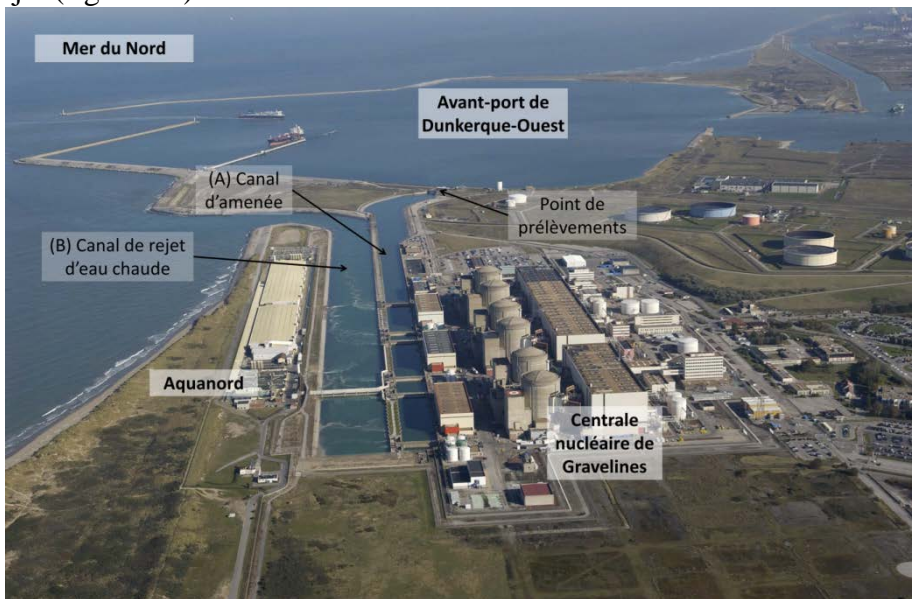
Dans la baie sud de la mer du Nord, la ferme Aquanord S.A. élève des bars (*Dicentrarchus labrax*) et des daurades (*Sparus aurata*) dans des bassins à terre du prégrossissement (juvéniles ~ 5 g) aux poissons commercialisables (~ 400 g à 1,5 kg) et produit environ 1500 tonnes de poisson par an. Puisque la température du milieu naturel n'est pas suffisante pour assurer une croissance optimale des poissons (i.e. entre 20 et 26 °C, Blancheton, 2000 ; Person-Le Ruyet et al., 2004), la ferme piscicole est alimentée par deux circuits d'eau de mer distincts (encadré 1, figure I.1) dont le mélange est contrôlé : (i) un circuit d'eau de mer provenant du canal d'amenée présentant les propriétés hydrobiologiques des eaux côtières du sud de la mer du Nord (i.e. communautés planctoniques naturelles, température, éléments nutritifs, salinité), et (ii) un circuit d'eau chaude provenant du canal de rejet dont les propriétés hydrobiologiques ont été modifiées par le traitement de la centrale (cf. encadré 1, CNPE de Gravelines). La chloration et le choc thermique (+10 °C par rapport à la température naturelle du milieu) appliqués sur les communautés phytoplanctoniques naturelles provoquent la réduction de l'abondance et de la biomasse phytoplanctonique. Selon plusieurs études, l'impact de la chloration serait plus marqué que celui de la température (Briand, 1975 ; Brook et Baker, 1972 ; Poornima et al., 2006). Dans les bassins d'élevage des bars alimentés en circuit ouvert (Figure I.1 ; taux de renouvellement = 1 h<sup>-1</sup>) se retrouvent donc les composantes planctoniques naturelles et potentiellement modifiées suivant la dynamique saisonnière caractéristique de la zone, à savoir notamment, une efflorescence phytoplanctonique printanière très marquée et des stocks plutôt stables et faibles le reste de l'année même si une efflorescence automnale de moindre ampleur peut être observée (Lefebvre et al., 2011 ; Rousseau et al., 2002 ; Schapira et al., 2008).



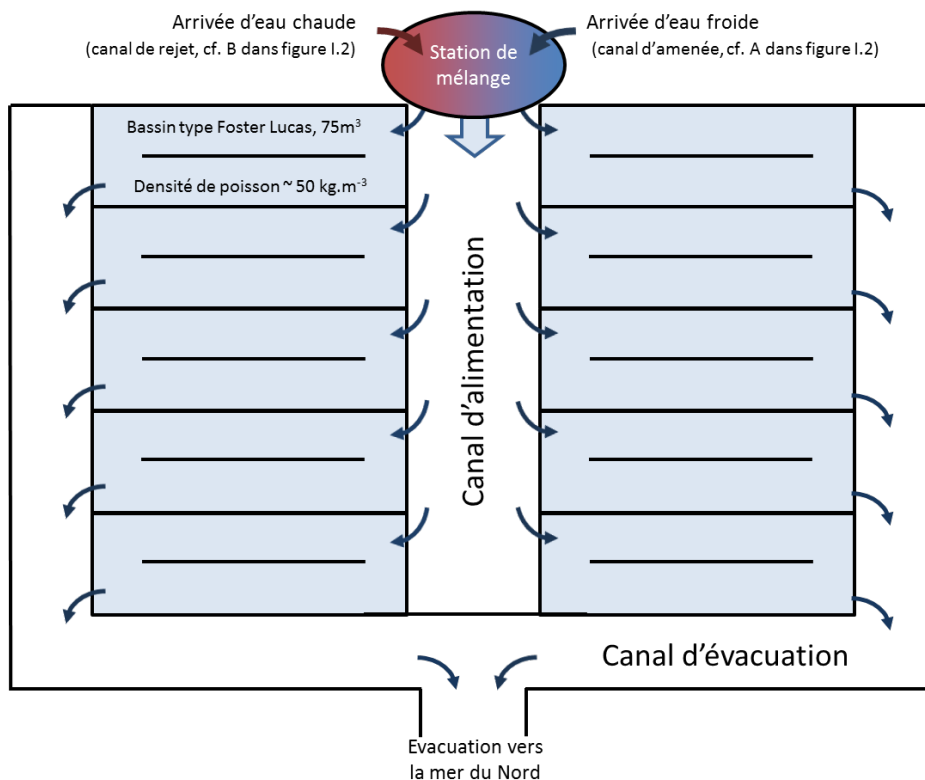
**Encadré 1 Le Centre Nucléaire de Production d'Electricité de Gravelines, Nord, France. Circuits d'eau**

Le CNPE de Gravelines utilise l'eau de mer naturelle provenant de l'avant-port de Dunkerque *via* le canal d'amenée pour refroidir ses circuits. L'eau de mer naturelle subit donc un traitement au sein du CNPE qui comprend :

- Un criblage sur tamis de 1 mm permettant d'éliminer les grosses particules,
  - Une chloration par électrophorèse (1 %) lorsque la température du milieu dépasse 10 °C afin d'éviter la fixation d'épibiontes (i.e. moules, balanes, biofilm)
  - Un réchauffement moyen de 10 °C dans les circuits de la centrale,
- Ensuite, l'eau réchauffée est évacuée vers le milieu côtier par le canal de rejet (figure I.2).



**Figure I.2 : Vue aérienne du site de Gravelines montrant Aquanord S.A., la centrale nucléaire de Gravelines et le point de prélèvements**



**Figure I.1. Schéma d'un module d'élevage utilisé à Aquanord S.A. pour le grossissement des bars.**

A Aquanord, des mortalités massives de bar sont observées depuis plus de dix ans au printemps, et touchent principalement les plus jeunes poissons de la ferme qui sont les plus sensibles (i.e. juvéniles). Cependant, les services vétérinaires n'ont pu expliquer ces mortalités par les pathologies classiques rencontrées en aquaculture (e.g. parasitisme, infections bactériennes et virales). Une implication de l'efflorescence phytoplanktonique a par conséquent été suspectée.

Afin de vérifier la coïncidence entre les mortalités de bar et l'efflorescence phytoplanktonique, une analyse pluriannuelle (2005 – 2013) a été effectuée sur les données hebdomadaires de mortalités de bar, et de biomasse phytoplanktonique (i.e. concentration en chlorophylle *a*). Cette coïncidence a aussi été analysée pour l'abondance de taxons déjà connus pour avoir des effets délétères sur les organismes marins, à savoir

*P. globosa*, *Pseudo-nitzschia* sp. , *Rhizosolenia* sp. et *Noctiluca* sp. pour cette étude (cf. Introduction).

## **I.2. Matériel et méthodes**

### **I.2.1. Bases de données**

Afin de mettre en relation les efflorescences phytoplanctoniques et les mortalités de bar à long terme, deux bases de données ont été utilisées :

- La base de données issue du suivi hydro-biologique réalisé par l'Ifremer<sup>13</sup> dans le cadre de son programme de surveillance de l'Impact des Grands Aménagements (IGA) lié à la centrale nucléaire de Gravelines. Le point de prélèvement correspondant aux données recueillies est situé dans le canal d'amenée (Figure I.1). Les données IGA utilisées sont en fait celles qui concernent le phytoplancton, à savoir, la concentration en chlorophylle *a* et les abondances phytoplanctoniques. Afin de pallier aux problèmes d'homogénéité de cette base de données, les espèces ou groupes d'espèces phytoplanctoniques identifiés (dans le cas de discriminations difficilement réalisables en microscopie optique) ont été regroupés au plus petit niveau taxonomique commun : le genre.
- La base de données d'Aquanord S.A., reportant les mortalités hebdomadaires de bar (individus. semaine<sup>-1</sup>) mesurées dans l'ensemble de la ferme piscicole.

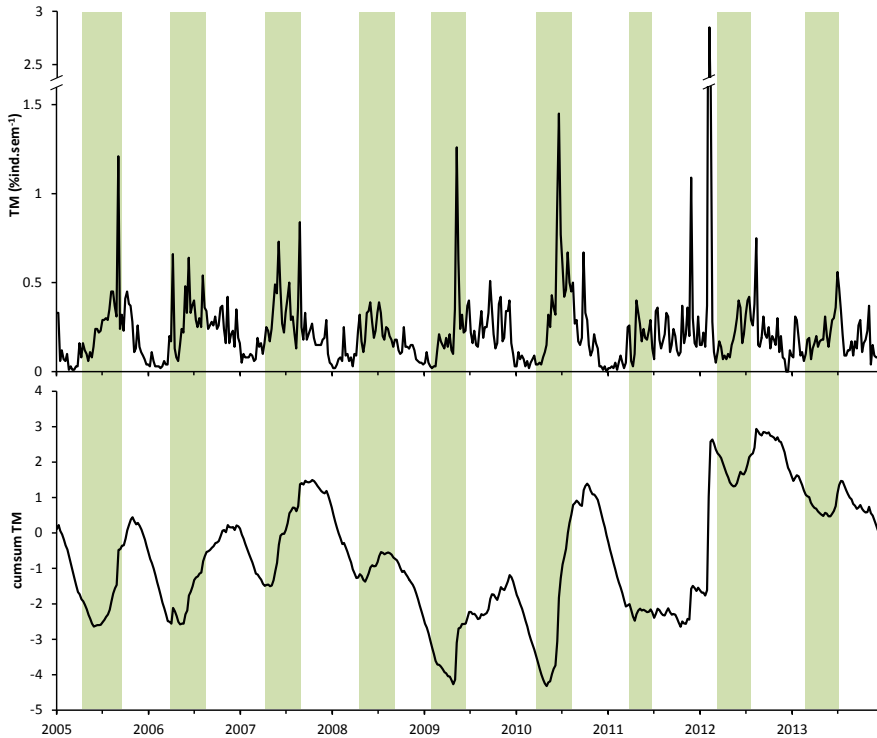
### **I.2.2. Analyses numériques**

La détection et la mise en évidence de tendances dans la série de données de mortalité ont été réalisées par la méthode des sommes cumulées des écarts à la moyenne (cumsum, Ibanez et al., 1993 ; figures I.2 et I.3). L'interprétation de la série des sommes cumulées des écarts à la moyenne se fait comme suit : la pente est négative lorsqu'une succession de données présente des valeurs inférieures à la moyenne, et positive lorsque la succession des données présente des valeurs supérieures à la moyenne.

---

<sup>13</sup> Ifremer : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Sur les graphiques obtenus, les pics et les creux correspondent à des changements d'anomalies par rapport à la moyenne de la série. L'anomalie sera positive à partir d'un creux (i.e. série de valeurs de mortalités supérieures à la moyenne), et négative à partir d'un pic (i.e. série de valeurs de mortalités inférieures à la moyenne ; figure I.2).



**Figure I.2.** Série temporelle du taux de mortalité hebdomadaire (TM, % ind.sem<sup>-1</sup>) de bars à Aquanord et de la somme cumulée des écarts à la moyenne du taux de mortalité (cumsum TM) entre 2005 et 2013. En vert figure la période de l'efflorescence phytoplanktonique printanière (basée sur la concentration en chlorophylle *a*).

Les bases de données (mortalités et phytoplancton) ont ensuite été analysées selon les étapes suivantes (Figure I.3) :

- Normalisation par transformation  $\log(x+1)$ .
- Régularisation par interpolation linéaire. Les données ne présentant pas la même régularité dans la fréquence d'échantillonnage (mortalités = données strictement hebdomadaires, phytoplancton = pas de temps compris entre 3 et 10 jours), la méthode d'interpolation utilisée permet de créer artificiellement des points d'échantillonnage hebdomadaires réguliers dont les valeurs sont estimées par régression linéaire.
- La méthode de l'*Eigen Vector Filtering* (EVF, ou filtrage des variables par les vecteurs propres, Colebrook, 1978 ; Ibanez et Etienne, 1992) consiste à réaliser une Analyse en Composantes Principales (ACP) sur la matrice d'auto-covariance de la série de données, puis à modéliser la série à partir de son estimation par le produit du premier vecteur propre et de la première composante principale. Cette estimation correspond à la fois à la première variable filtrée et à la tendance générale de la série. Elle extrait donc le mouvement lié à la plus grande variance. Le second axe de l'ACP fournit la deuxième variable filtrée (EVF2) qui contient le maximum d'informations lorsque la tendance générale a été enlevée, et ainsi de suite. L'application de cette méthode aux deux bases de données régularisées (mortalités et phytoplancton) a permis d'obtenir une première variable filtrée (EVF1) représentant la variabilité saisonnière tout en lissant la variabilité aux plus petites échelles (incluant la variabilité aléatoire). Cette méthode a donc permis de lisser les cycles saisonniers même si une variabilité interannuelle existe tant dans l'amplitude que dans la période de ces cycles (Ibanez et Etienne, 1992).

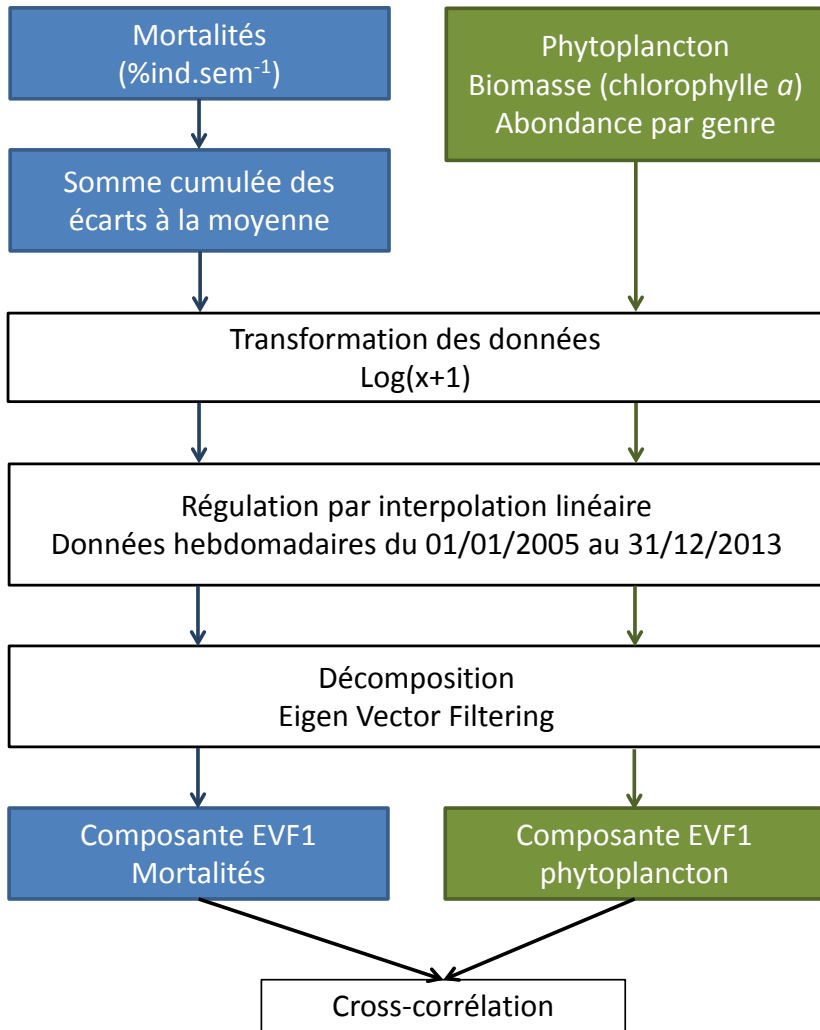


Figure I.3. Schéma récapitulatif des analyses numériques effectuées pour l'étude de la coïncidence entre mortalité de bars et phytoplancton

- Les co-variations entre les séries de données phytoplancton et de mortalités de bars ont été étudiées par corrélation croisée (ou *cross-correlation*, Legendre et Legendre, 1998). Cette méthode permet d'estimer un coefficient de corrélation de Pearson entre deux séries temporelles présentant un décalage (lag) variant de 0 à n (et -n) points. Dans notre cas, un lag de 1 correspond à un décalage d'une semaine entre les deux séries. Cette méthode a donc permis de considérer un éventuel décalage entre le pic d'abondance phytoplanctonique et l'augmentation des mortalités des bars (i.e. un temps de réponse des mortalités, Fortes et al., 2004, figure I.4).

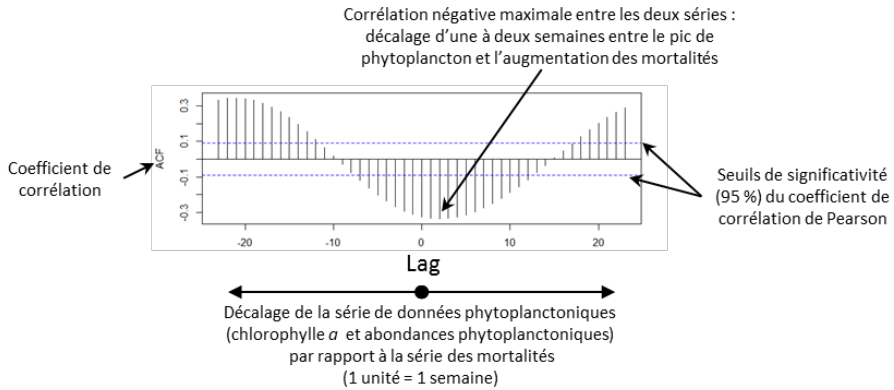


Figure I.4. Schéma d'interprétation des résultats de corrélation croisée.

### I.3. Résultats et discussion

La variabilité saisonnière de la biomasse phytoplanctonique est clairement marquée (figure I.5) et est conforme à ce qui est généralement observé dans cette partie de la mer du Nord (Joint et Pomroy, 1993 ; Rousseau et al., 2002 ; Lefebvre et al., 2011). Les mortalités de bar présentaient une variabilité saisonnière similaire. Néanmoins, une forte variabilité interannuelle est observée avec des taux de mortalités notamment plus faibles d'environ 50 % en 2012 et en 2013 par rapport à 2010 (figure I.2). Des pics de mortalité de bars peuvent aussi être observés en hiver et en été mais leur cause a pu être identifiée par les éleveurs et/ou les vétérinaires. Ainsi, le plus souvent, la mortalité

hivernale fait suite à la campagne de vaccination qui a généralement lieu au mois de janvier (e.g. en 2012). En été, les infections bactériennes telles que la vibriose sont responsables des mortalités observées. Cette dernière se manifeste par des lésions aux branchies et aux nageoires et la bactérie se détecte dans les organes internes des poissons tels que le foie (Aquanord). La vibriose est présente de manière récurrente dans la ferme aquacole, elle se développe lorsque les températures sont plus chaudes et contamine de manière aléatoire les bassins quel que soit le stade de grossissement des poissons.

Par ailleurs, l'analyse de corrélation croisée a permis de confirmer la coïncidence entre le pic de biomasse phytoplanctonique (i.e. pic de concentration en chlorophylle *a*) et les fortes mortalités de bar à Aquanord avec un décalage de deux semaines entre le pic de biomasse et l'augmentation des mortalités de bar ( $r^2 = -0,336$  ;  $p < 0,05$  ; lag = 2, tableau I.1, figure I.5).

Les genres phytoplanctoniques pour lesquels (i) aucun cycle annuel n'est visible, (ii) la cross-corrélation n'est pas significative ou (iii) la corrélation croisée est positive, c'est-à-dire que le pic d'abondance ou de biomasse phytoplanctonique ne correspond pas à une augmentation des mortalités de bar, ne sont pas présentés.

Une corrélation croisée significative avec les mortalités de poissons a pu être mise en évidence pour 12 genres phytoplanctoniques parmi lesquels sept se développent au printemps et en été (lag < 7, i.e. dans les sept semaines qui suivent le pic de mortalité, tableau I.1) et quatre sont connues pour avoir des effets délétères sur les poissons (cf. Introduction générale) : *Phaeocystis globosa*, *Pseudo-nitzschia* sp., *Rhizosolenia* sp. et *Noctiluca scintillans*. Le lag correspondant au coefficient de corrélation négatif maximal indique le décalage entre le creux de la série des sommes cumulées des mortalités (i.e. le début d'une anomalie positive) et le pic d'abondance phytoplanctonique. Néanmoins, le coefficient de corrélation devient significatif avant le moment du pic d'abondance (figure I.5). Cela illustre la coïncidence entre la présence des quatre espèces phytoplanctoniques et le moment où les mortalités de bars deviennent anormalement élevées.



**Tableau I.1 : Résultats de la corrélation croisée pour les taxons présentant une corrélation négative significative ( $p < 0,05$ ) avec la somme cumulée des écarts à la moyenne du taux de mortalité des poissons.**

Le lag correspond au décalage de la série par rapport à la série de somme cumulée des écarts à la moyenne. En gras : séries pour lesquelles les données sont présentées en figure I.7

<b>Taxon</b>	<b>Correlation maximale</b>	<b>Lag</b>
<b>Chlorophylle <i>a</i></b>	<b>-0,336</b>	<b>2</b>
<i>Nitzschia</i> sp.	-0,315	-4
<b><i>Phaeocystis</i> sp.</b>	<b>-0,298</b>	<b>-2</b>
<i>Gyrodinium</i> sp.	-0,133	0
<b><i>Pseudo-nitzschia</i> sp.</b>	<b>-0,237</b>	<b>2</b>
<b><i>Rhizosolenia</i> sp.</b>	<b>-0,455</b>	<b>4</b>
<i>Protoperidinium</i> sp.	-0,295	5
<b><i>Noctiluca</i> sp.</b>	<b>-0,189</b>	<b>7</b>
<i>Scrippsiella</i> sp.	-0,274	10
<i>Diplopsalis</i> sp.	-0,269	12
<i>Amphidinium</i> sp.	-0,256	14
<i>Prorocentrum</i> sp.	-0,333	14
<i>Polykrikos</i> sp.	-0,201	16

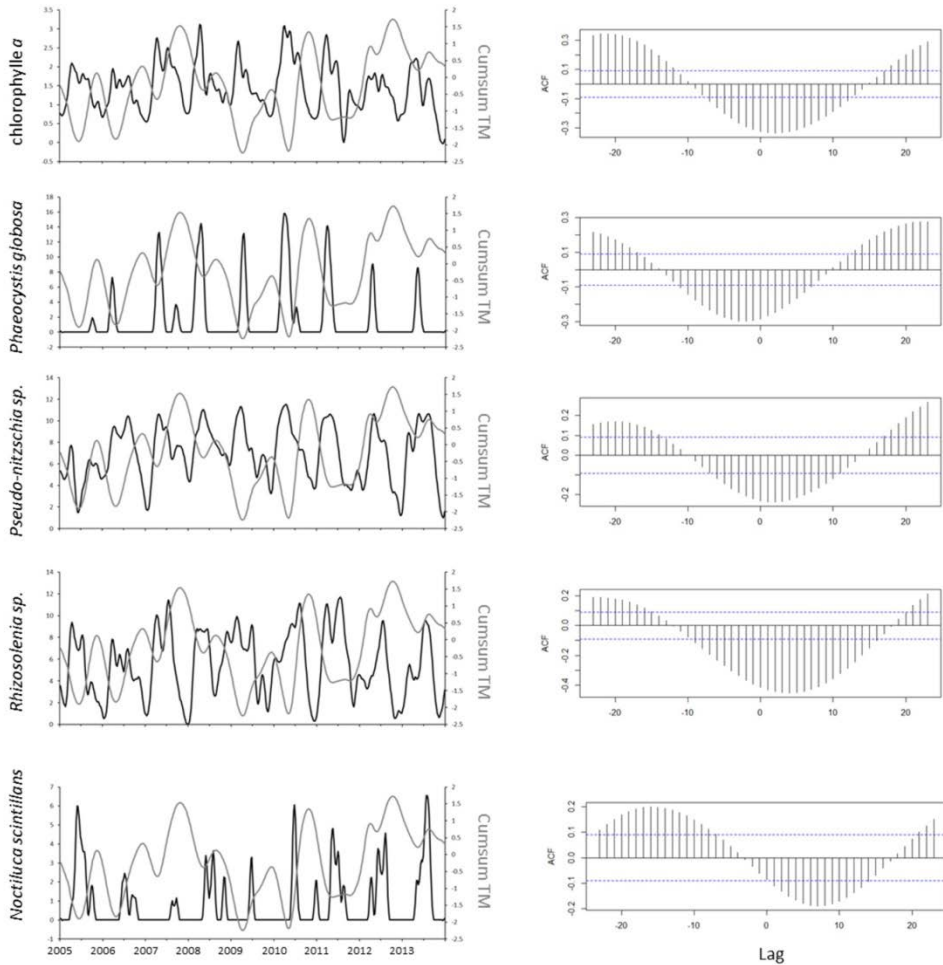
L'analyse de corrélation croisée a aussi permis de mettre en évidence que la succession des espèces phytoplanctoniques était semblable à celles observées précédemment dans la même zone d'étude (Rousseau et al., 2002 ; Seuront et al., 2006 ; Hernández-Fariñas et al., 2014).

Le pic d'abondance de la Prymnesiophyceae *Phaeocystis globosa* a lieu au début du printemps et précède de deux semaines l'augmentation des mortalités de bars (tableau I.1, figure I.5). *P. globosa*, sous sa forme coloniale, est une espèce connue pour influencer la qualité de l'eau de mer et notamment augmenter sa viscosité, conduisant à l'altération de la fonction branchiale (i.e. respiration et excrétion) voire au colmatage des branchies (cf. Introduction §3.1). Cependant, lors d'une expérience d'exposition spécifique, Amara et al. (2013) ont montré que cette espèce n'avait pas d'effet délétère sur les juvéniles de bar. De même, un suivi

pluri-annuel (2000 – 2013) des communautés de juvéniles de poissons fréquentant les zones côtières intertidales de la Manche n'a pas mis en évidence de relation entre la variabilité de l'abondance et de la composition de ces communautés et celle de l'efflorescence de *Phaeocystis globosa* malgré la forte variabilité interannuelle observée (Benazza et al., in press).

Ensuite, deux diatomées succèdent à *P. globosa*, *Pseudo-nitzschia* sp. et *Rhizosolenia* sp. qui atteignent leur pic d'abondance deux et quatre semaines après le début de l'augmentation des sommes cumulées des taux de mortalité, respectivement (tableau I.1, figure I.5). Plusieurs espèces du genre *Pseudo-nitzschia* sont capables de produire de l'acide domoïque et, de part leur forme d'aiguille, elles peuvent aussi causer des altérations physiques des organes tels que les branchies ou encore le tube digestif.

Enfin, la dernière espèce pouvant avoir un effet délétère sur les poissons est la Dinophyceae *Noctiluca scintillans*. Elle est notamment responsable d'épisodes d'hypoxie aiguë et d'acidification du milieu (cf. Introduction §3.1.).



**Figure I.5. A gauche : série temporelle de la concentration en chlorophylle a ( $\log(x+1)$ ;  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), de l'abondance de *Phaeocystis globosa*, *Pseudo-nitzschia* sp. , *Rhizosolenia* sp. et *Noctiluca scintillans* ( $\log(x+1)$ ; cellules.  $\text{L}^{-1}$ ), et évolution des sommes cumulées du taux de mortalité (TM) des bars de 2005 à 2013 à Aquanord. A droite : corrélation croisée entre la série des sommes cumulées des mortalités de poissons et les séries phytoplanctoniques. Le Lag correspond au décalage des séries en nombre de points (1 point = 1 semaine), ACF correspond au coefficient de corrélation, et les pointillés bleus représentent le seuil au-dessus duquel la corrélation est significative ( $p < 0,05$ )**

En conclusion, plusieurs espèces phytoplanctoniques présentant un risque pour les poissons se succèdent au printemps dans les eaux alimentant les bassins d'élevage de bar. A chaque espèce peuvent être associés un ou plusieurs effets délétères qui, seul ou combinés pourraient causer les mortalités importantes de poissons dans la ferme aquacole. De plus, le fait que ces espèces se succèdent et que chacune puisse être responsable d'effets délétères différents sur les poissons pourrait accentuer ce phénomène. Une étude saisonnière ciblée s'est donc avérée nécessaire pour identifier les espèces délétères en présence, leur succession et comprendre leur impact potentiel sur les poissons.



---

## Chapitre II. Diversité de *Pseudo-nitzschia* dans le sud de la mer du Nord, production d'acide domoïque et communautés phytoplanctoniques associées

---



### Article.

Delegrange A.<sup>a,b</sup>, Lefebvre A.<sup>c</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>, Courcot L.<sup>a,b</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>. ***Pseudo-nitzschia* sp. diversity in the southern North Sea, domoic acid production and associated phytoplankton communities.** En préparation pour soumission à *Harmful Algae*.

### Communication.

Delegrange A., Vincent D., Courcot L., Bonnard A., Gaine F., Amara R. **Relation between phytoplankton blooms and fish farming mortality: a case study in the Southern North Sea.** Poster, Aquaculture conference: To the Next 40 Years of sustainable Global Aquaculture. Las Palmas, Gran Canaria, Espagne. 3 – 7 Novembre 2013 (Annexe 1).



## II.1. Préambule

Les analyses préliminaires présentées dans le premier chapitre de cette thèse ont montré une coïncidence entre les mortalités de bar et l'efflorescence phytoplanctonique printanière. Elles ont par ailleurs permis d'identifier les espèces dont le pic d'abondance coïncide avec l'augmentation des mortalités de poissons (cf figure I.5, page 33). Parmi ces espèces, *Phaeocystis globosa* et *Pseudo-nitzschia* sp. sont apparues de manière systématique dans l'analyse des séries à long terme, cela signifie que leur pic d'abondance printanier coïncide avec des mortalités élevées et croissantes de bar au sein de la ferme aquacole (figure I.5). Si l'écologie de *P. globosa* a largement été étudiée en Manche orientale et en mer du Nord (e.g. Cadée et Hegeman, 1986 ; Riegman et al., 1992 ; Seuront et al., 2006 ; Rousseau et al., 2013), les informations relatives aux diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* sp. concernent leur potentielle toxicité (revue de Lelong et al., 2012 ; Lefebvre et al., 2014) et leur récurrence dans la baie sud de la mer du Nord et la Manche orientale (e.g. Rousseau et al., 2002 ; Schapira et al., 2008 ; Grattepanche et al., 2011 ; Lefebvre et al., 2011 ; Downes-Tettmar et al., 2013).

Par ailleurs, l'augmentation de l'abondance et de l'occurrence du genre *Pseudo-nitzschia* dans cette zone géographique est un fait avéré depuis les dernières décennies (Lefebvre et al., 2011 ; Hernández-Fariñas et al., 2014). En réalité, la plupart des études portant sur les communautés phytoplanctoniques dans cette région identifient les *Pseudo-nitzschia* sp. au niveau du genre ou par complexes (i.e. *P.* complexe *delicatissima*, largeur de valve < 3µm et *P.* complexe *seriata*, largeur de valve > 3µm). En effet, une identification spécifique de *Pseudo-nitzschia* sp. nécessite soit l'observation et la mesure des microstructures des valves en microscopie électronique (à balayage ou à transmission), soit d'avoir recours à des analyses génétiques (Quijano-Scheggia et al., 2008b).

La Manche orientale et la mer du Nord sont des écosystèmes essentiels car ils concentrent d'importantes activités de pêche et de conchyliculture,



mais aussi de nombreuses nurseries de poissons commerciaux. Etant donné les conséquences potentiellement toxiques de la présence de *Pseudo-nitzschia* sp. sur les organismes marins (Work et al., 1993 ; Lefebvre et al., 2012), la santé humaine (Quilliam et Wright, 1989 ; Perl et al., 1990) et les activités aquacoles (Buestel et al., 2009), il apparaît nécessaire d'approfondir les connaissances à propos de ce genre.

L'objectif de ce chapitre a été de déterminer la diversité spécifique du genre *Pseudo-nitzschia* dans la zone côtière du sud de la mer du Nord par l'étude de la micro-structure des valves des diatomées au microscope électronique à balayage (MEB), de quantifier la concentration d'acide domoïque dans le milieu ainsi que son évolution, en relation avec la succession des communautés phytoplanctoniques et les conditions hydrologiques. Pour cela, un suivi saisonnier (de février à novembre 2012, fréquence de deux semaines) a été réalisé à l'entrée du canal d'alimentation de la ferme aquacole permettant un échantillonnage des masses d'eau côtières du sud de la mer du Nord.

NB : L'échantillonnage du mésozooplancton (> 200 µm) lors de ce suivi saisonnier a permis d'acquérir de nouvelles données relatives à l'étude de la dynamique d'introduction de l'espèce invasive *Mnemiopsis leidyi* (Cténaïres) en Manche – mer du Nord. Ces données font partie intégrante d'un article publié dans *Aquatic Invasions* (E. Antajan, T. Bastian, T. Raud, J.-M. Brylinski, S. Hoffman, G. Breton, V. Cornille, A. Delegrange et D. Vincent, 2014. *The invasive ctenophore Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 along the English Channel and the North Sea French coasts: another introduction pathway, Annexe 2).

## ***Pseudo-nitzschia* sp. diversity in the southern North Sea, domoic acid production and associated phytoplankton communities.**

Delegrange A.<sup>a,b</sup>, Lefebvre A.<sup>c</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>, Courcot L.<sup>a,b</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Université du littoral Côte d'Opale (ULCO), UMR 8187, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), 32 Avenue Foch, F-62930 Wimereux, France.*

<sup>b</sup> *Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France*

<sup>c</sup> *IFREMER, LER/BL, 150 Quai Gambetta, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France.*

\* *Corresponding author at: ULCO, UMR 8187 LOG, 32 Avenue Foch, F-62930 Wimereux, France. Tel.: +33321996427. Fax.: +33321996401. E-mail address: [alice.delegrange@univ-littoral.fr](mailto:alice.delegrange@univ-littoral.fr)*

### **Abstract**

A rather low diversity of *Pseudo-nitzschia* sp. was observed during a seasonal survey (February to November 2012) along the French Coast of the Southern North Sea. Three distinct species were identified by scanning electron microscopy, namely *P. delicatissima*, *P. pungens* and *P. fraudulenta*, and their presence coincided with high Domoic Acid (DA) levels both in spring (229 pg mL<sup>-1</sup>) and autumn (102 pg mL<sup>-1</sup>). This strong seasonality was related to co-occurring phytoplankton communities (e.g. *P. globosa* bloom) and environmental parameters, particularly nutrient (DIN and Si) limitations. Paradoxically, high DA concentrations were not systematically related to high stocks of toxic *Pseudo-nitzschia* sp. leading to reconsider the alert indicators currently used in monitoring programmes.

**Keywords:** *Pseudo-nitzschia*, Southern North Sea, Domoic acid, *Phaeocystis globosa*, Harmful Algal Blooms (HAB), monitoring programme.

### **Highlights:**

- Low *Pseudo-nitzschia* diversity (three species) in the Southern North Sea
- Phytoplankton dynamics in relation to environmental parameters
- *Pseudo-nitzschia* seasonal dynamics and associated domoic acid concentration
- Domoic acid concentration not systematically related to *Pseudo-nitzschia* abundance
- Identification of potential DA producing species (*P. pungens*)

## II.2. Introduction

The cosmopolitan diatom genus *Pseudo-nitzschia* sp. comprises 37 species amongst which 14 are known to produce Domoic Acid (DA; Lelong et al., 2012), a phycotoxin responsible for Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) events in human, marine mammal and seabird populations (Hasle, 2002; Trainer et al., 2012). The first reported ASP event occurred in Prince Edward Island (Canada) in 1987 and resulted in the illness of a hundred persons, and the death of three after consumption of DA contaminated blue mussels (*Mytilus edulis*; Bates et al., 1989; Quilliam and Wright, 1989). Shellfish stocks are now systematically monitored to prevent any human ASP, and alerts indicators such as DA concentration and/or *Pseudo-nitzschia* sp. abundance monitoring appear to be efficient tools, as no human poisoning has ever been reported since then (Trainer et al., 2012). However, DA poisoning of marine mammals and seabirds feeding on DA contaminated planktivorous preys can still occur (e.g. anchovies and sardines; Lefebvre et al., 2002; Scholin et al., 2000; Sierra-Beltran et al., 1997; Stauffer et al., 2012). Given the possible public health and welfare incidences of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia* sp. worldwide, assessing its dynamic and potential DA production has generated considerable interest, particularly in coastal exploited areas. Its ability to form either mono-specific blooms in enclosed areas (e.g. Monterey Bay, California), or less dense blooms in open ecosystems (Trainer et al., 2012) makes it a common species in most temperate phytoplankton assemblages. In the Eastern English Channel-North Sea (EEC-NS) ecosystem, *Pseudo-nitzschia* sp. is in fact frequently observed year round (Hernández-Fariñas et al., 2014; Schapira et al., 2008; Seuront et al., 2006). However, existing studies limited the detection of *Pseudo-nitzschia* sp. to the genus level or to morphological features measurable by optical microscopy, *i.e.* valve width, distinguishing large species (width > 3  $\mu\text{m}$ , *Pseudo-nitzschia* complex *seriata*), from narrow ones (width < 3  $\mu\text{m}$ , *P.* complex *delicatissima*). Given the importance of shellfish farming and picking activities in this area (Lefebvre et al., 2014), the increasing trend of *Pseudo-nitzschia* abundance over the past decade has increased scientific awareness and

concern on public health (e.g. Hernández-Fariñas et al., 2014; Lefebvre et al., 2014; Lundholm et al., 2010; Parsons et al., 2002; Trainer et al., 2012). In the area, thresholds level of shellfish contamination ( $20 \mu\text{g DA g}^{-1}$  fresh weight) were not reached until 2014 when King Scallop (*Pecten maximus*) stocks off the Bay of Somme were DA contaminated, and represented the furthest north ASP alert in France (Lefebvre, pers. com.). This emphasizes the need to address *Pseudo-nitzschia* dynamics and taxonomy. To our knowledge, no study in the Southern Bight of the North Sea has so far identified *Pseudo-nitzschia* sp. to the species level nor have they estimated the associated level of produced DA. Finally, studies elucidating the nutrient and physical requirements, as well as the biotic interactions of *Pseudo-nitzschia* species at the regional scale are scarce although crucial for predicting proliferation and associated toxicity. This study thus aimed to identify *Pseudo-nitzschia* species consortium in the EEC-NS ecosystem over an annual cycle, to define their importance in the seasonal phytoplankton succession, and to estimate associated DA concentrations with regard to hydro-biological conditions prevailing in this ecosystem.

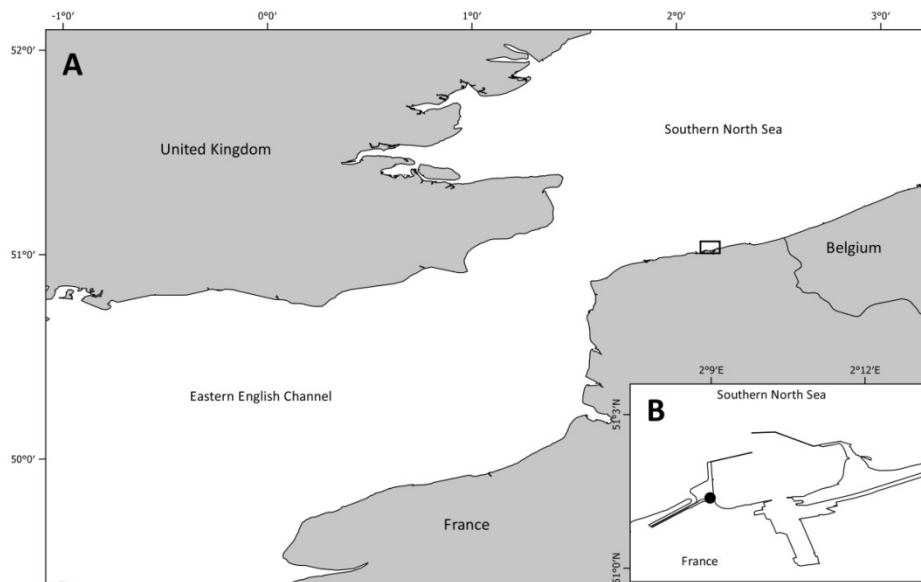
## **II.3. Material and methods**

### **II.3.1. Sampling strategy**

The sampling station (~ 10 m depth) was located along the French coast of the southern North Sea, in Dunkirk harbour (western part,  $51^{\circ}1'12''$  N,  $1^{\circ}9'0''$  E, Figure 1). The inner part of this harbour forms a small semi-enclosed embayment where semi-diurnal macrotidal tides prevail, and enable important water exchanges with coastal waters of the southern North Sea. Sampling was conducted fortnightly from the 22<sup>nd</sup> of February to the 14<sup>th</sup> of November 2012 during flood (within 2 h before high tide) to only consider neritic plankton communities although benthic communities could be re-suspended during high mixing periods.

Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and salinity were measured with an Anderaa Instruments probe at each sampling date. Seawater samples were collected at one meter depth using a Niskin bottle. For inorganic nutrients, seawater samples (frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis) were

analysed either by fluorimetry ( $\text{NH}_4^+$ ; Trilogy, Turner Designs; Holmes et al., 1999) or by the use of an autoanalyser (Alliance Integral Futura) for  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Si}(\text{OH})_4$  following standard protocols (Bendschneider and Robinson, 1952; Mullin and Riley, 1955; Murphy and Riley, 1962).



**Figure II.1. A. Location of the study area. B. Location of the sampling station (black dot) in Dunkirk harbour (Southern North Sea).**

### II.3.2. Phytoplankton standing stock and community composition

Phytoplankton biomass was assessed from chlorophyll *a* and pheopigment concentrations. Seawater samples (250 to 500 mL) were filtered on glass fibre filters (Whatman GF/F) under low vacuum and frozen at -20 °C until analysis (within 2 mo. after collection). Pigments were extracted in 90 % acetone overnight at 4 °C and chlorophyll *a*, and pheopigments concentrations were estimated following Lorenzen (1966) using a pre-calibrated (chlorophyll *a* from *Anacystis nidulans* standard, Sigma) fluorometer (Trilogy, Turner designs). For phytoplankton community analyses, 250 mL samples were preserved in the field with lugol/glutaraldehyde fixative (2 % final concentration, Verity et al., 2007) and stored at 4 °C in the dark until analysis (within 3 mo. after collection). At the laboratory, 5 to 10 mL subsamples were settled in Hydrobios counting chambers. Phytoplankton cells were identified and enumerated using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-S, magnification  $\times 200$ ,  $\times 400$ ) under phase contrast illumination. On average  $942 \pm 568$  cells per sample were identified and counted. For *Phaeocystis globosa*, total cells were enumerated without stage distinction (i.e. isolated, colonial stages).

When *Pseudo-nitzschia* sp. cells were observed by optical microscopy, Scanning Electron Microscopic (SEM) analyses were carried out for species identification. Briefly, 10 to 100 mL of homogenized preserved samples were filtered on polycarbonate filters (24 mm diam.; 0.8  $\mu\text{m}$  porosity) and rinsed with milliQ water to eliminate salts. Filters containing diatom frustules were acid cleaned (2 - 3 mL HCl 37%) in Teflon beakers overnight at room temperature and rinsed in a milliQ water bath. Acid and water bathes were filtered once again (same filter) to limit cell loss during acidification and rinsing steps. Thereafter, filters were placed on aluminium stubs with double sticky carbon tabs and air-dried during 12 h under laminar flow. Finally, dried filters were metallized under argon flow with Au/Pd during 90 s (Polaron SC 7620). Quantified measures based on literature review (e.g., valve length and

width, number of fibulae and of interstriae in 10  $\mu\text{m}$ ...) permitted to discriminate species within *Pseudo-nitzschia* complex *seriata* (width > 3  $\mu\text{m}$ ), and *P.* complex *delicatissima* (width < 3  $\mu\text{m}$ ; see Table 1). At least 50 *Pseudo-nitzschia* sp. cells per sample were identified.

Dissolved and particulate Domoic Acid (DA;  $\text{pg mL}^{-1}$ ) concentrations were measured using ASP ELISA kits (Biosense, Bergen, Norway) following the provided procedure. Briefly, total DA concentration (*i.e.*, dissolved + particulate DA) was measured from 5 mL of natural seawater samples stored at -20 °C until analysis. For dissolved DA, collected seawater samples (5 mL) were filtered on 0.2  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filters before being frozen (-20 °C). On the day of analysis, samples were thawed at 4 °C and dissolved DA samples were directly processed. For total DA samples, sonication on ice was carried out to disrupt cells and samples were filtered on 0.2  $\mu\text{m}$  cellulose acetate before the assay. Particulate DA was obtained by subtracting dissolved DA to total DA.

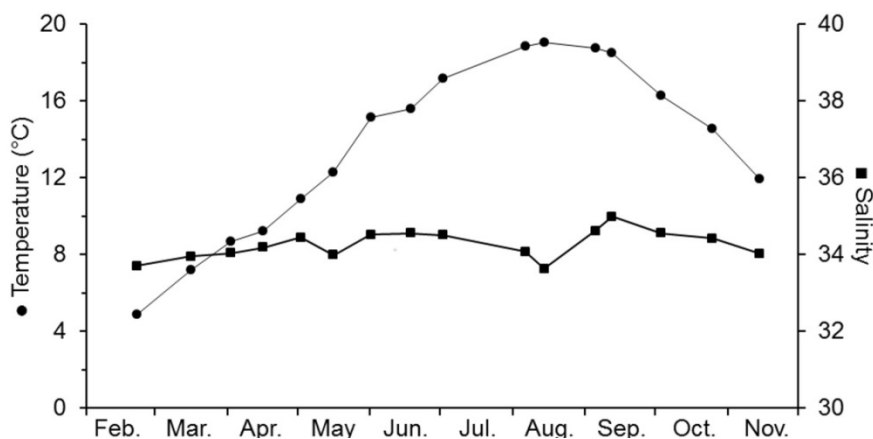
### **II.3.3. Data analyses**

The potential limitation of phytoplankton growth by nutrients availability was investigated by comparing P:N:Si ratio in our samples to the theoretical Redfield ratio (*i.e.*, P:N:Si = 1:16:16, Brzezinski, 1985; Redfield et al., 1963). A synthetic diagram of N:P ratio as a function of Si:N ratio where lines represented Redfield ratios (*i.e.*, Si:N = 1, N:P = 16 and Si:P = 16) allowed to define 6 areas of limiting conditions. A specific emphasis was given to nutrient limitation during periods of *Pseudo-nitzschia* sp. dominance.

## **II.4. Results**

### **II.4.1. Hydrological conditions**

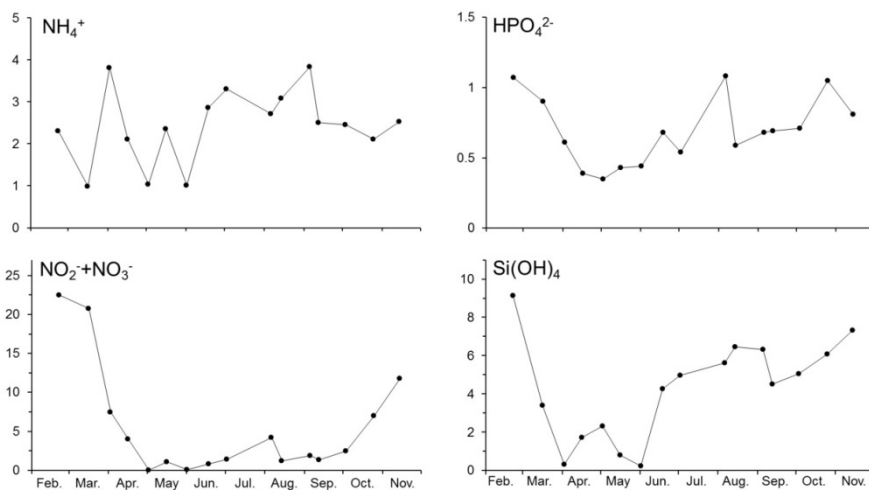
Temperature followed a typical seasonal evolution varying from 4.9 °C in February to 19.0 °C in August (Figure 2). By contrast, due to flood tide sampling, salinity remained stable averaging  $34.2 \pm 0.3$  (min: 33.4, max = 35.0).



**Figure II.2.** Time series of temperature (°C, ●) and salinity (■) during the 2012 survey.

With the exception of  $\text{NH}_4^+$ , all nutrients decreased rapidly to reach their annual minima of 0.01, 0.35 and 0.30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , respectively, in April (Figure 3). Thereafter,  $\text{HPO}_4^{2-}$  varied between 0.5 and 1.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  remained stable below 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  from April to October and increased up to 11.7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  at the end of the survey. Silicate concentrations ranged between 2.5 and 7.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  with two minimal values in April and June (*i.e.*, 0.3 and 0.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively).  $\text{NH}_4^+$  concentrations were highly variable from February to June ranging between 1.0 and 3.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Thereafter, concentrations remained relatively stable and averaged 2.0 to 4.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .





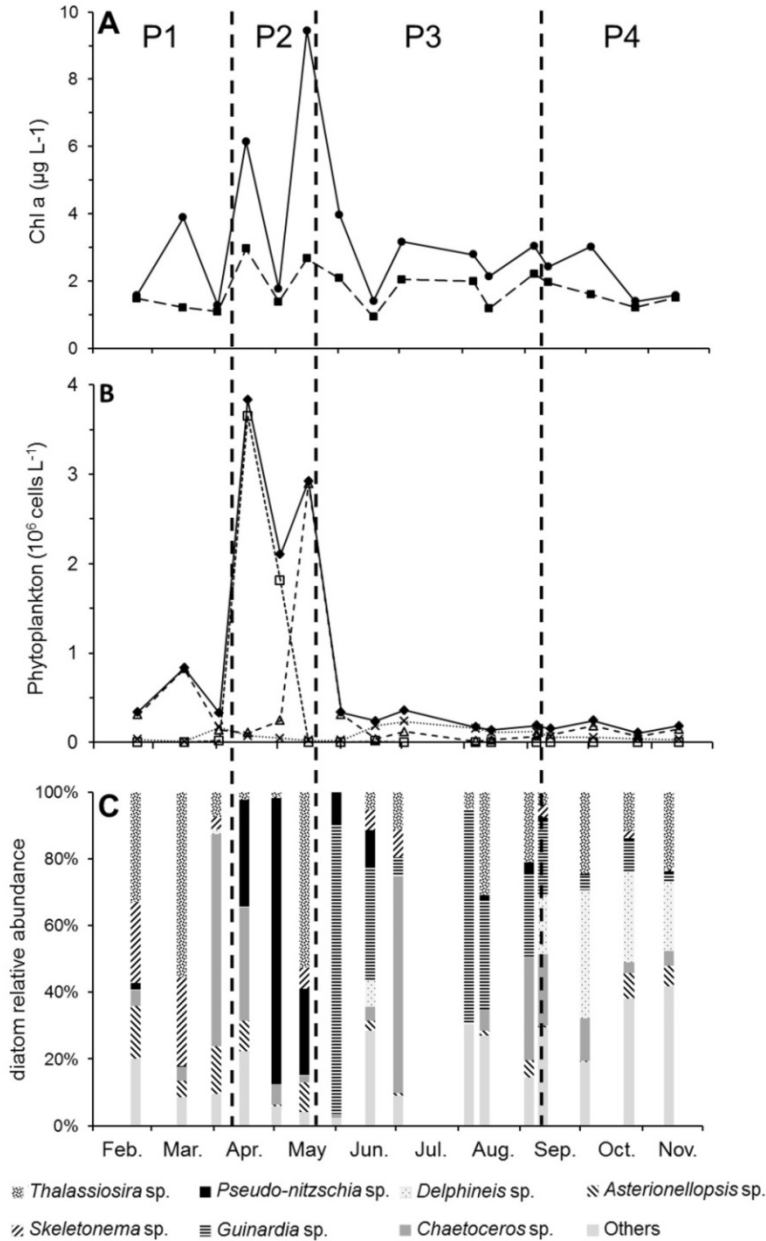
**Figure II.3.** Time series of nutrient ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Si(OH)}_4$ ) concentrations ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) during the 2012 survey.

#### II.4.2. Phytoplankton standing stock

Phytoplankton bloom started at the end of February 2012 and ended in early June and was illustrated by three successive peaks in chlorophyll *a* concentrations (from 4.0 to 9.5  $\mu\text{g chl}a \text{ L}^{-1}$ ; Figure 4A), and phytoplankton abundance (from  $8.2 \times 10^5$  to  $3.6 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$ ; Figure 4B). From July to November, chlorophyll *a* concentration ( $2.3 \pm 0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ ) along with phytoplankton abundance ( $1.9 \pm 0.7 \times 10^5 \text{ cells L}^{-1}$ ) remained relatively stable and low. Pheopigment concentrations followed the same pattern as chlorophyll *a* (Figure 4A) and represented 22 to 49 % of total pigments. Four periods could be identified based on phytoplankton community composition: Period 1 (P1, February 20 – April 5) was characterized by the dominance of small diatoms (5-20  $\mu\text{m}$  in length; *Thalassiosira* sp., *Skeletonema costatum*, *Asterionellopsis glacialis* and *Chaetoceros* sp.), either isolated or in colony, and phytoplankton peaked to  $8.2 \times 10^5 \text{ cells L}^{-1}$ . Period 2 (P2, April 5 to May 20) corresponded to the *P. globosa* bloom with abundances ranging from 1.8 to  $3.7 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$  (Figure 4B). This bloom was accompanied by high abundances of *Chaetoceros* sp. ( $8.7 \times 10^4 \text{ cells L}^{-1}$ , 64 % of the diatom community at the

beginning of P2), and *Pseudo-nitzschia* sp. ( $2.1 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup> equivalent to 86 % of the diatom community at the end of P2). Period 3 is the post-bloom period (P3, from May 20 to September 08). It was characterized by spring to summer diatoms and small Cryptophytes. Both fine walled summer diatoms such as *Guinardia* sp. (i.e., *G. delicatula*, *G. flaccida*, and *G. striata*), and highly silicified spring diatoms such as *Chaetoceros* sp. and *Thalassiosira* sp. constituted the bulk of the diatom community. Period 4 (P4, from September 08 to November 16) revealed the occurrence of intermediate sized diatoms (30 - 40 µm in length; *Delphineis* sp.) as well as diatoms in forming colonies (e.g., *Thalassiosira* sp.) which, however, remained in low number ( $1.2 \pm 0.5 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup>).

SEM allowed to acknowledge a rather low diversity of *Pseudo-nitzschia* sp. in the area with three distinct species namely *P. delicatissima* (belonging to the *P.* complex *delicatissima*), *P. fraudulenta*, and *P. pungens* (both belonging to the *P.* complex *seriata*, see Table 1, Figure 5). Although sporadic *P. pungens* observations were made, *P. delicatissima* represented 99 % of SEM identified frustules during the *P. globosa* bloom period (P2) and outnumbered other diatoms. By contrast, at the beginning of the post-bloom period (P3), contribution of *Pseudo-nitzschia* sp. to total diatoms decreased down to 10 %, and *P. pungens* markedly dominated (54 % of the SEM identified frustules) over *P. fraudulenta* and *P. delicatissima* (33 % and 13 %, respectively). In autumn (P4), all the identified *Pseudo-nitzschia* sp. frustules belonged to the *P. pungens* species (< 1000 cells L<sup>-1</sup>).



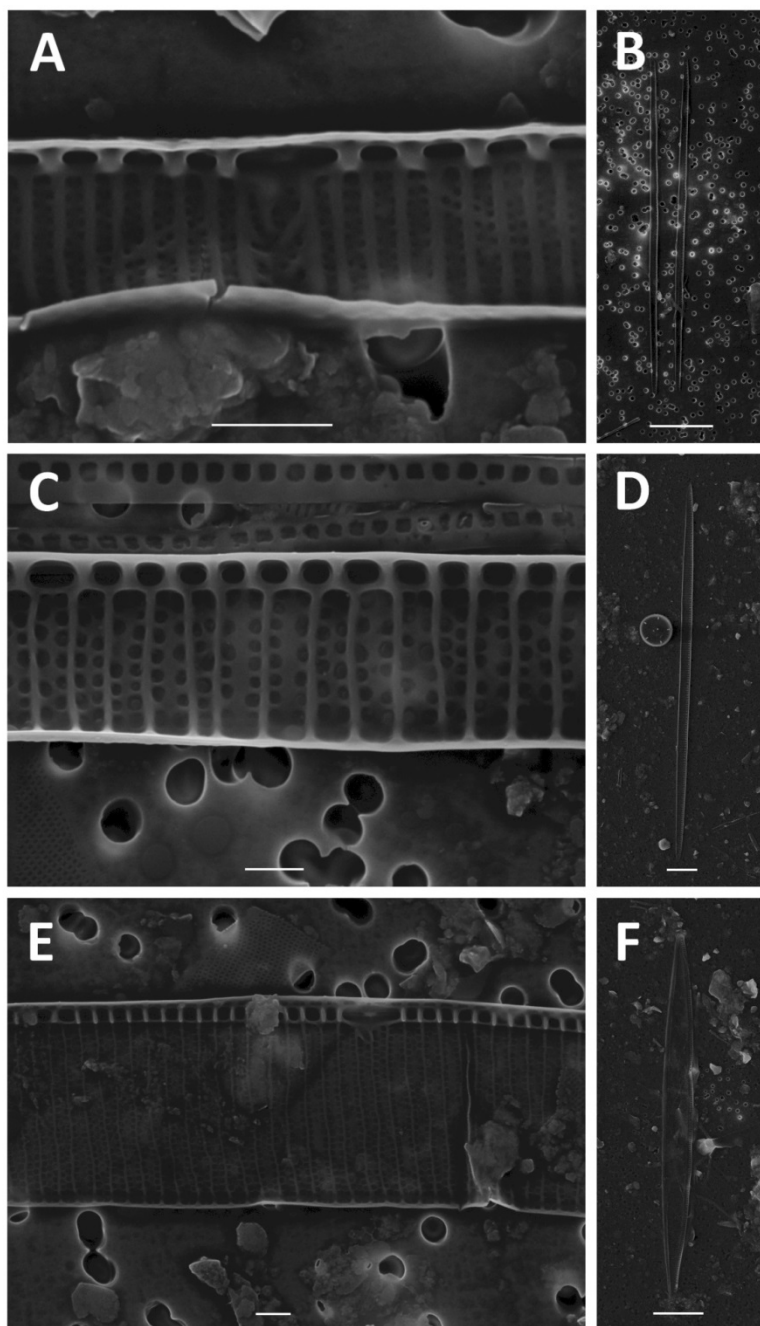
**Figure II.4.** Time series of A - Chlorophyll *a* (●) and pheopigment (■) concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), B- Abundance ( $\text{cells L}^{-1}$ ) of total phytoplankton (◆), diatoms (△), *Phaeocystis globosa* (□) and cryptophytes (×), and C – relative abundances of diatom genus (%) during the 2012 survey.

**Table II.1. Morphological characters of Pseudo-nitzschia species and comparison with literature values. (min-max).**

Species	Width ( $\mu\text{m}$ )	Length ( $\mu\text{m}$ )	Central Interspace	Fibulae ( $10 \mu\text{m}^{-1}$ )	Interstriae ( $10 \mu\text{m}^{-1}$ )	Rows of poroids	Poroids ( $1 \mu\text{m}^{-1}$ )	Reference
<i>P. delicatissima</i>	1.3-2	N/A	+	22-29	33-43	2	8-11	Amato et al., 2005
	1.7-2.8	N/A	+	20-27	24-40	2	8-14	Fehling et al., 2006
	1.1-2	40-78	+	19-25	36-40	2	10-12	Skov et al., 1999
	1.0-1.5	42-66	+	20-23	env 40	2	10-12	Hasle et al., 1996
	1.7-2.3	17-48	+	18-36	37-44	2	7.5-13.4	Kaczmarek et al., 2008
	1.3-1.6	48-49	-	22-23	36-40	2	8-9	Klein et al., 2010
	1.5-2.0	19-76	N/A	19-26	35-40	2	12	Lundholm et al., 2006
	1.3-1.6	34-46	+	24-28	41-45	2	7-11	Moschandreou and Nikolaidis, 2010
	1.0-2.4	19-78	+	19-30	33-42	2	8-12.5	Quijano-Scheggia et al., 2010
<b>1.1-1.7</b>	<b>40.7-67.1</b>	<b>+</b>	<b>18-27</b>	<b>34-44</b>	<b>2-3</b>	<b>10-18</b>	<b>This study</b>	
<i>P. fraudulenta</i>	4.3-5.1	N/A	+	20-24	22-26	2-3	5-6	Fehling et al., 2006
	4.5-10	50-119	+	12-24	18-24	2-3	5-7	Skov et al., 1999
	5-6	73-117	+	19-23	19-23	2-3	4-5	Hasle et al., 1996
	3-4.5	63-99	+	15-17	14-15	2	N/A	Hernández-Becerril, 1998
	5.1-5.6	56.8-81	-	21-22	22-24	2-3	6-7	Klein et al., 2010
	4-7	71-101	N/A	18-30	19-28	2-3	6-7	Ljubešić et al., 2011
	4.4-5.8	48-80	+	22-24	21-24	2	5-6	Moschandreou and Nikolaidis, 2010
	2.9-7.1	38.9-131.5	+	12-24	18-24	2	4-7	Quijano-Scheggia et al., 2010
	<b>5.2-6.1</b>	<b>75.0-98.8</b>	<b>+</b>	<b>19-23</b>	<b>17-23</b>	<b>2-3</b>	<b>6-7</b>	<b>This study</b>

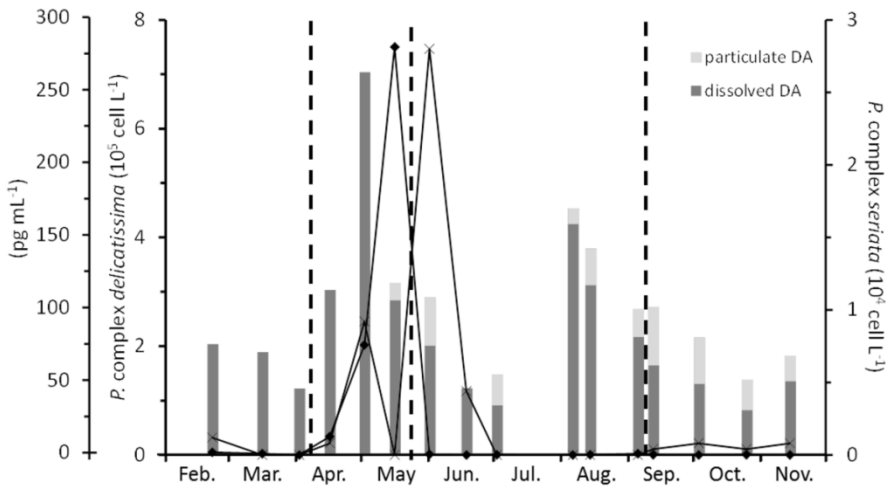
**Table II.1. Continued**

Species	Width ( $\mu\text{m}$ )	Length ( $\mu\text{m}$ )	Central Interspace	Fibulae ( $10 \mu\text{m}^{-1}$ )	Interstriae ( $10 \mu\text{m}^{-1}$ )	Rows of poroids	Poroids ( $1 \mu\text{m}^{-1}$ )	Reference
<i>P. pungens</i>	3.1	N/A	-	12	12	2	3-4	Fehling et al., 2006
	74-174	2.4-5.3	-	9-16	9-16	1-2	3-4	Skov et al., 1999
	2.9-4.5	74-142	-	9-15	9-15	2	3-4	Hasle et al., 1996
	3-4	94-109	-	10-11	10-12	2	N/A	Hernández-Becerril, 1998
	2.9-3.3	61-106	-	11-13	11-14	2-3	2-4	Klein et al., 2010
	3.9-5.7	88-105	-	10-17	8-15	2	2-4	Ljubešić et al., 2011
	2.5-3.6	77-101	-	11-13	11-13	2	2-4	Moschandreu and Nikolaidis, 2010
	2-4.8	37-156	-	9-13	9-15	2	1-5	Quijano-Scheggia et al., 2010
	4-4.5	75-130	-	9-13	N/A	2	3-4	Stonik et al., 2001
<b>2.7-4.7</b>	<b>95.9-135.5</b>	-	<b>10-15</b>	<b>10-15</b>	<b>2-3</b>	<b>2-4</b>	<b>This study</b>	



**Figure II.5.** SEM micrographs of the three identified *Pseudo-nitzschia* species. A-B: *Pseudo-nitzschia delicatissima*, C-D: *Pseudo-nitzschia pungens*, E-F: *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. Scale bars : A, C, E = 1  $\mu\text{m}$  ; B, D, F = 10  $\mu\text{m}$ .

Domoic acid was mostly present as dissolved DA throughout the survey ( $83 \pm 16 \%$ ). Total DA followed *Pseudo-nitzschia* sp. dynamics, particularly during the *P. globosa* bloom and post-bloom periods (P2 and P3, Figure 6). Total DA maxima ( $229 \text{ pg mL}^{-1}$ ) corresponded to the co-dominance of *P. complex seriata* and *P. complex delicatissima*, reaching  $10^4$  and  $10^5 \text{ cells L}^{-1}$  in early May, respectively. Thereafter, total DA decreased to 118 and  $110 \text{ pg mL}^{-1}$  at the end of P2 and beginning of P3 coinciding with the highest abundance of *P. complex delicatissima* and *P. complex seriata*, respectively. In autumn, DA concentrations remained high ( $102 \pm 39 \text{ pg mL}^{-1}$ ) despite low abundances of *P. complex seriata* (i.e., *P. pungens*). When measurable, DA cell quota only reached  $0.05 \text{ pg cell}^{-1}$ .



**Figure II.6.** Time series of *Pseudo-nitzschia complex delicatissima* (◆) and *P. complex seriata* (×) abundances ( $\text{cells L}^{-1}$ ), and particulate and dissolved domoic acid ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) during the 2012 survey.

Potential nutrient limitation during periods P1 to P4 is highlighted in Figure 7. During P1, winter phytoplankton growth (mainly diatoms) was potentially limited by phosphate. The *P. globosa* bloom period (P2) highlighted a clear transition towards DIN limitation and to a lesser extent by phosphate and silicate. The same pattern was observed for post

bloom summer (P3) and autumnal communities (P4). If *P. complex delicatissima* were present mainly during DIN limitation (i.e. period 2), *P. complex seriata* appeared to have a wider tolerance range with regard to nutrients, being present under both DIN and silicate limitations (P3-P4).

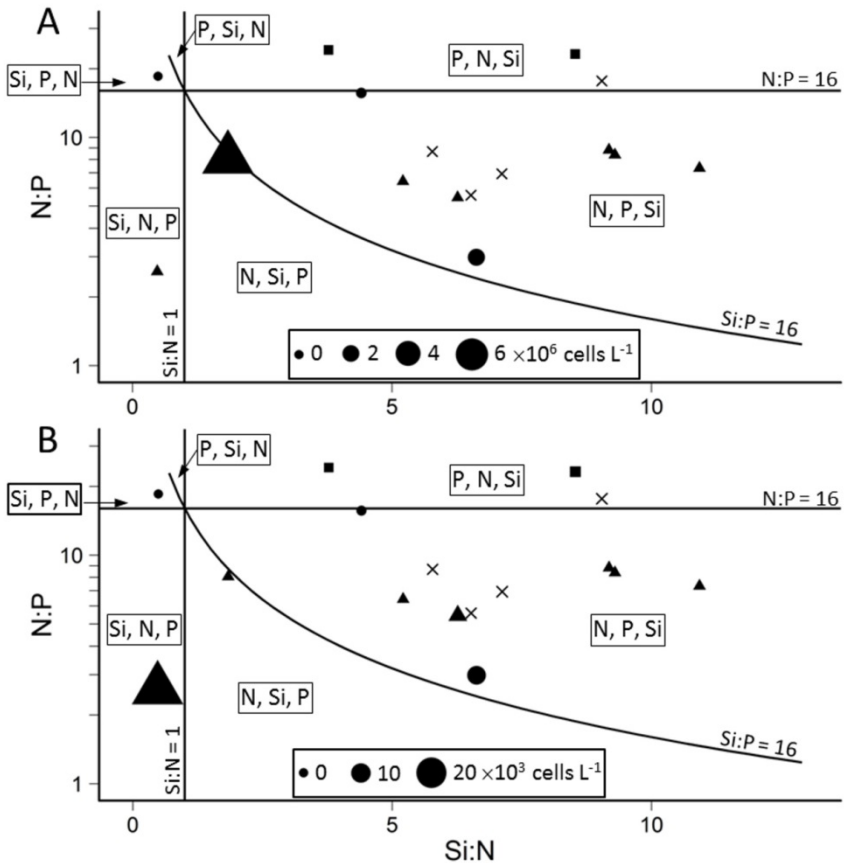


Figure II.7. Si:N:P molar ratios during the winter to spring period (P1, ■), the *Phaeocystis globosa* bloom (P2, ●), the post bloom period (P3, ▲) and the summer-autumn period (P4, ×). In each area defined by the lines representing the Redfield (1963) ratio, the limiting nutrients are reported in order of importance. Point size depends on the *Pseudo-nitzschia* complex *delicatissima* (A) or *P. complex seriata* (B) abundances.



## II.5. Discussion

The aim of this study was to assess the seasonality of coastal phytoplankton communities in the Southern Bight of the North Sea with a special emphasis on *Pseudo-nitzschia* sp. taxonomy, diversity, occurrence (*e.g.*, nutrient requirements) and associated domoic acid concentrations over a year (February to November 2012).

With regard to hydrology, temperature and salinity values recorded in 2012 (Figure 2) are consistent with previous measurements done at the seasonal scale in the inshore waters of the eastern English Channel (Schapira et al., 2008; Seuront et al., 2006; Woehrling et al., 2005) as well as in the Southern Bight of the North Sea (Lefebvre et al., 2011; Otto et al., 1990; Rousseau et al., 2002). During this survey, phytoplankton dynamics, both in biomass (illustrated by chlorophyll *a* concentration, Figure 4A) and in abundance (Figure 4B), was similar to previously reported studies in the Eastern English Channel (Breton et al., 2000; Grattepanche et al., 2011a; Napoléon et al., 2014; Schapira et al., 2008; Seuront et al., 2006) and the Southern Bight of the North Sea (Hernández-Fariñas et al., 2014; Rousseau et al., 2002; Stelfox-Widdicombe et al., 2004).

In the EEC-SNS ecosystem, SEM observations have seldom been used for the identification of *Pseudo-nitzschia* species. The main difficulty in monitoring these diatoms is in classifying them to the species level, which, in fact, relies on molecular studies (Quijano-Scheggia et al., 2010) or on ultra-structural features only visible by electron microscopy (Hasle and Syvertsen, 1997). Past optical microscopy observations might have led to misidentifications. For instance, Schapira et al. (2008), and Seuront et al. (2006) attributed observations of *P. complex delicatissima* to the species *P. pseudodelicatissima* by optical microscopy without any specific analysis of valve microstructure. Other studies restricted the identification of *Pseudo-nitzschia* species to the genus (Grattepanche et al., 2011a; Rousseau et al., 2002), or to the widely used complexes discriminated by using valve width (*i.e.*, *P. complex delicatissima*, valve width < 3  $\mu\text{m}$ , and *P. complex seriata*, valve width > 3  $\mu\text{m}$ , *e.g.*, Downes-Tettmar et al., 2013; Fehling et al., 2006). To our knowledge,

this study is the first so far that allows a clear SEM identification of *Pseudo-nitzschia* species based on morphological criteria in the Southern Bight of the North Sea. However, and although SEM permits a robust and unambiguous identification of *Pseudo-nitzschia* species, cryptic species can also be present, and are not discernible by SEM analyses suggesting the need for further investigations with genetic tools (Quijano-Scheggia et al., 2010).

The three *Pseudo-nitzschia* species identified in this study (*P. delicatissima*, *P. pungens*, and *P. fraudulenta*) are considered to be cosmopolites (see Table 2; Hasle, 2002; Lelong et al., 2012 for reviews). They are also known to have different but variable hydrological preferences depending on their inhabiting ecosystem, but also on their strains. For instance, *P. delicatissima* is a small and lightly silicified diatom which can divide at low light intensity and at early spring water temperature (~12 °C; Table 2; Fehling et al., 2006), whereas *P. pungens* and *P. fraudulenta* are commonly reported to develop in summer when days are longer and temperatures higher (12-26 °C; Table 2), though *P. pungens* seems to have a wider environmental tolerance range than *P. fraudulenta* (Klein et al., 2010). In this study, the *P. delicatissima* bloom lasted about one month ( $7.5 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup> reached on May 16) and was immediately followed by *P. pungens* and *P. fraudulenta*, which is congruent with Downes-Tettmar et al. (2013) and Klein et al. (2010) observations in the English Channel and with Fehling et al. (2006) in the Western Scottish waters. From a literature review (Table 2), no clear pattern of nutrient requirements could be highlighted with regard to *Pseudo-nitzschia* nutrient preferendum. However, in our case, the three species occurred under DIN limitations which also coincided with a clear shift in phytoplankton community composition.

The early spring diatom community, dominating during P1, largely exploited winter nutrient resources. This was illustrated by nutrient decreases at the beginning of the survey (Figure 3) and also by the dominance of highly silicified diatom species (e.g., *Thalassiosira* sp., *Asterionellopsis* sp. and *Skeletonema* sp.). This nutrient limitation from winter to spring is a general pattern observed in the English Channel and

the North Sea and generally shifts phytoplankton community towards the dominance of *P. globosa* (P2, Gentilhomme and Lizon, 1998; Lefebvre et al., 2011; Schapira et al., 2008). *P. globosa* is in fact reported to outcompete other phytoplankton taxa under DIN limiting conditions (Breton et al., 2000; Riegman et al., 1992). As suggested by several studies, *Pseudo-nitzschia* sp. are generally associated to *P. globosa* (Grattepanche et al., 2011a; Hernández-Fariñas et al., 2014; Sazhin et al., 2007; Schapira et al., 2008), rarely dominating the diatom community (Breton et al., 2011; Grattepanche et al., 2011a), but often as an accompanying species (Grattepanche et al., 2011b; Schapira et al., 2008; Seuront et al., 2006). This can be explained by the life cycle of *P. globosa* (see Rousseau et al., 2007 for a review). In fact, the transition from free-living cell to colonial stage requires solid substrates, a function that can be fulfilled by small diatoms (e.g., *Chaetoceros* sp. or *Pseudo-nitzschia* sp.), and which is consistent with the dominance of *P. delicatissima* within the diatom community during P2. The wane of the *P. globosa* bloom (P3) was therefore likely induced by this strong DIN limitation (Figure 7) and phytoplankton community shifted towards large fine-walled diatoms (e.g., *Rhizosolenia* sp., *Guinardia* sp.) along with the peak of *P. complex seriata*. Summer phytoplankton community being outnumbered by Cryptophytes is in accordance with Brunet et al. (1996), Napoléon et al. (2014), and Schapira et al. (2008). The relative stability of seawater (lower turbulence levels, see Seuront, 2005) and increasing N:P ratios up to 8.8 during P3 likely provided ideal conditions for Cryptophytes growth and was also demonstrated in the EEC-SNS ecosystem (Andersen and Nival, 1989; Brunet et al., 1996; Harris, 1986). In autumn (P4), water column mixing (Otto et al., 1990), and temperature decrease associated to strong winds generally drive phytoplankton stock to low levels, and allows tychoplanktonic species such as *Delphineis* sp. to be re-suspended in the water column (Gómez and Souissi, 2008). Compared to other studies, phytoplankton spring bloom amplitude and duration appeared to be low and short in 2012, particularly with regard to *P. globosa*. In fact, maximum chlorophyll *a* values of this study ( $9.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) remained below previous studies ( $\sim 20 \mu\text{g L}^{-1}$  in Breton et al., 2000

and Kesaulya et al., 2008;  $\sim 50 \mu\text{g L}^{-1}$  in Lefebvre et al., 2011 and Seuront et al., 2006), but compared well with those reported by Schapira et al. (2008 ;  $8.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and Napoléon et al. (2012 ;  $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Short term small *P. globosa* blooms are not rare (Lamy et al., 2006) and spring blooms of diatoms and *P. globosa* can exhibit considerable inter-annual variability (Lefebvre et al., 2011; Widdicombe et al., 2010).

Total DA concentrations measured during this study ( $229 \text{ pg mL}^{-1}$ ) were far higher than values published in the EEC-NS ecosystem (up to  $7 \text{ pg mL}^{-1}$ ; Downes-Tettmar et al., 2013; Klein et al., 2010) but remained lower than in other ecosystems such as the Monterey Bay ( $10 \times 10^3 \text{ ng L}^{-1}$ , Walz et al., 1994), the Gulf of Mexico ( $3.3 \times 10^3 \text{ pg mL}^{-1}$ , Liefer et al., 2013) or the Luanda Bay, Angola ( $1.4 \times 10^3 \text{ pg mL}^{-1}$ , Blanco et al., 2010). During P2 and P3, DA production coincided with the co-occurrence of two or three *Pseudo-nitzschia* species (i.e., *P. delicatissima* and *P. pungens* during P2 and *P. delicatissima*, *P. pungens* and *P. fraudulenta* during P3). Since these three species have been proven at least once to produce DA (Lelong et al., 2012a), the formal identification of the species responsible for the observed DA concentration cannot be addressed with certainty. Nevertheless, *P. pungens* is certainly toxic as it was the only *Pseudo-nitzschia* sp. present concomitantly to high DA concentrations in autumn. This is consistent with Downes-Tettmar et al. (2013) demonstrating *P. pungens* toxicity off Plymouth in the Western English Channel. Hence, high DA concentrations can co-occur with low *P. pungens* stocks.

**Table II.2. Environmental features of *Pseudo-nitzschia* sp. identified during the 2012 survey and literature values.**

Species	Location	Temperature °C	Salinity	DIN $\mu\text{mol L}^{-1}$	PO4 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Si $\mu\text{mol L}^{-1}$	Abundance cells $\text{L}^{-1}$	DA	Reference
<i>P. delicatissima</i>	Southern Adriatic Sea	8.79-29.91, R<0	R>0	no significant pattern			nd	nd	Caroppo et al., 2005
	western Scotland	~8°C	nd	~3 $\mu\text{M}$	~0.3 $\mu\text{M}$	~2.5 $\mu\text{M}$	1.6 $\times 10^5$	nd	Fehling et al., 2006
	Louisiana	nd	nd	no significant pattern			1 $\times 10^6$	5.5 pg cell <sup>-1</sup>	Parsons et al., 2013
	NE Spanish Coast	R>0	36.8 $\pm 1.1$ , R<0	R>0	nd	nd	17.6 $\pm 5.2 \times 10^5$	nd	Quijano-Scheggia et al., 2008
	Bay of Fundy	nd	nd	R>0	no significant correlation		nd	nd	Kaczmarska et al., 2007
	Gulf of maine	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	111-390 pg mL <sup>-1</sup>	Fernandes et al., 2014
<i>P. complex delicatissima</i>	Western English Channel	déc-15	34.9 $\pm 0.4$ , R>0	Nd	R<0	nd	2,5 $\times 10^5$	0.2-0.4 pg mL <sup>-1</sup>	Downes-Tettmar et al., 2013
	<b>Southern Bight of the North Sea</b>	<b>9-12</b>	<b>34.2<math>\pm 0.2</math></b>	<b>3.5<math>\pm 2.5</math></b> decreasing	<b>0.39<math>\pm 0.04</math></b>	<b>1.6<math>\pm 0.8</math></b>	<b>33<math>\times 10^3</math>-7.5<math>\times 10^5</math></b>	<b>92-229 pg mL<sup>-1</sup></b>	<b>This study</b>
<i>P. pungens</i>	Louisiana	nd	nd	R<0	R>0	no corr	50000	nd	Parsons et al., 2013
	NE Spanish Coast	nd	nd	no pattern	nd	nd	nd	nd	Quijano-Scheggia et al., 2008
	Gulf of Maine	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	40-1100 pg mL <sup>-1</sup>	Fernandes et al., 2014
	Bay of Fundy	nd	nd	R<0	R>0	nd	nd	nd	Kaczmarska et al., 2007
	Western English Channel	12-16	34.9 $\pm 0.4$	R<0	R<0	R<0	25000	0.2-0.4 pg mL <sup>-1</sup>	Downes-Tettmar et al., 2013
<i>P. fraudulenta</i>	California	18.5-26.5	nd	0-3	nd	2.9-35.5	5-13 10 <sup>5</sup>	detected	Gárate-Lizárraga et al., 2007
	North Western Mediterranean Sea	nd	R>0	R<0	nd	nd	nd	nd	Quijano-Scheggia et al., 2008
<i>P. complex seriata</i> including <i>P. pungens</i> , <i>P. fraudulenta</i>	Western Scotland	12-13	nd	~0.3	~0.25	~3	110000	nd	Fehling et al., 2006
	<b>Southern Bight of the North Sea</b>	<b>15.4<math>\pm 0.3</math></b>	<b>34.50<math>\pm 0.03</math></b>	<b>2.4<math>\pm 1.8</math></b> decreasing	<b>0.56<math>\pm 0.17</math></b>	<b>2.2<math>\pm 2.8</math></b> increasing	<b>9.2<math>\times 10^3</math>-2.8<math>\times 10^4</math></b>	<b>82-108 pg mL<sup>-1</sup></b>	<b>This study</b>

Min-max, mean  $\pm$  standard deviation, R<0 and R>0: negative and positive correlation with diatom abundance, respectively., nd = no data

With regard to *P. delicatissima*, isolated cells from the French coasts of the North Sea maintained in batch cultures did not produce DA (Delegrange et al., 2015). Additionally, this species is generally considered to be non-toxic and used as a control in most toxicity experiments (Lelong et al., 2014, 2012b). Spring DA concentration may therefore originate from either *P. pungens* or *P. fraudulenta*. For the latter, although potential toxicity was suspected (Downes-Tettmar et al., 2013), additional mono-specific batch cultures and tests are necessary.

A non-negligible number of ASP monitoring programs define their risk and alert thresholds on *Pseudo-nitzschia* sp. abundances (e.g., Lefebvre et al., 2014; Swan and Davidson, 2012). Seawater and shellfish sampling frequency and analyses are therefore generally increased during targeted periods in areas at risk. Domoic acid is generally measured in shellfish when *Pseudo-nitzschia* sp. complexes reach an abundance threshold defined by European Union protocols and directives ((EC) No 853/2004, 2004; (EC) No 854/2004, 2004). In this study, high DA concentrations were recorded for *Pseudo-nitzschia* sp. below the threshold alert of *P. complex delicatissima* abundance  $< 3 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup> and *P. complex seriata*  $< 1 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup>. Since the DA production does not only depend on *Pseudo-nitzschia* sp. abundance, it appears necessary to routinely measure DA concentration both in shellfish and in seawater for a thorough monitoring of ASP risks in coastal ecosystems as already done in sensitive areas (e.g., USA, Canada, Demark; Anderson et al., 2001; Jorgensen et al., 2009; van Apeldoorn et al., 1999). It will also allow to determine whether high DA concentrations in seawater are systematically associated to DA content in shellfish higher than the sanitary threshold (20 µg g<sup>-1</sup>). This study is also a supplementary contribution to early warning systems for preventing ASP events, allowing the identification of risky periods and sites with regard to toxic HAB species such as *Pseudo-nitzschia*. It highlights the need to develop efficient tools for rapid enumeration of *Pseudo-nitzschia* sp. (e.g., flow cytometry and Flowcam; Buskey and Hyatt, 2006; SEM screening of samples) in sensitive areas such as the Southern Bight of the North Sea, and to systematically identify the *Pseudo-nitzschia* sp. to the species level by

electron microscopy samples screenings (e.g. SEM) or molecular tools (e.g., Quijano-Scheggia et al., 2010).

**Acknowledgments:** We acknowledge J. Mestre, B. Gomez and T. Raud for their technical support in the field and at the laboratory. A PhD grant from the région Nord Pas-de-Calais and the Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) attributed to A. Delegrange supported this work. This work was also funded by a collaborative convention between former Aquanord S.A. and ULCO/LOG.

## II.6. Conclusion

Le suivi saisonnier effectué dans les eaux côtières de la baie sud de la mer du Nord a permis d'identifier les communautés phytoplanctoniques présentes dans les eaux d'alimentation de la ferme piscicole, mais aussi de confirmer la présence et la succession d'espèces phytoplanctoniques potentiellement délétères pour les poissons. Ainsi, notre étude a mis en évidence une faible diversité du genre *Pseudo-nitzschia* puisque trois espèces ont été identifiées au microscope électronique à balayage :

- *P. delicatissima* considérée comme non toxique en Atlantique Nord Est (Lelong et al., 2014) même si certaines études ont montré qu'elle était capable de produire de faibles quantités d'acide domoïque dans d'autres régions du monde (Trainer et al., 2012 ; Rhodes et al., 2013 ; Fernandes et al., 2014).
- *P. pungens* probablement toxique dans la baie sud de la mer du Nord comme dans la plupart des autres zones géographiques (Casteleyn et al., 2008 ; Trainer et al., 2012 ; Rhodes et al., 2013 ; Fernandes et al., 2014), puisque de fortes concentrations d'acide domoïque ont été mesurées dans le milieu lorsque *P. pungens* était la seule espèce de *Pseudo-nitzschia* présente (i.e. en automne).
- *P. fraudulenta* dont la toxicité n'a pu être montrée de manière certaine lors de cette étude car cette espèce a systématiquement été associée à *P. pungens* et *P. delicatissima*, mais démontrée par ailleurs (Trainer et al., 2012 ; Rhodes et al., 2013 ; Fernandes et al., 2014)

Concernant la dynamique saisonnière, si *P. delicatissima* semble être une espèce plus précoce dominant la communauté printanière de diatomées lors de l'efflorescence de *Phaeocystis globosa*, les deux autres (*P. pungens*, *P. fraudulenta*) montrent une préférence pour des conditions estivales et automnales correspondant à une limitation par les éléments nutritifs azotés.

En plus des *Pseudo-nitzschia* sp. productrices d'acide domoïque, d'autres espèces potentiellement délétères pour les poissons ont pu être identifiées lors de ce suivi saisonnier :



*P. globosa* qui est connue, sous sa forme coloniale, pour augmenter la viscosité de l'eau de mer (Seuront et al., 2006) pouvant conduire à l'inhibition des processus à petite échelle tels que l'activité natatoire des larves de poissons (Fuiman et Batty, 1997 ; von Herbing et Keating, 2003) ou les fonctions branchiales de respiration et d'excrétion (Jenkinson, 1989 ; Couturier et al., 2007). Enfin, en replaçant l'année 2012 dans un contexte pluriannuel, l'efflorescence de *P. globosa* observée était de moindre ampleur que la plupart des années précédentes (Widdicombe et al., 2010). Néanmoins, les abondances mesurées correspondaient à celles reportées par certaines études (Cadée et Hegeman, 2002 ; Gómez et Souissi, 2008 ; Lamy et al., 2006) et la possibilité que des efflorescences de plus grande ampleur aient lieu ne peut être écartée.

Une efflorescence de noctiluques (*Noctiluca scintillans*) a été observée lors de ce suivi (données non présentées) en association avec une acidification du milieu (chute du pH de 8,5 à 7,5) en une semaine aux alentours du 15 juin 2012. Il est connu que, lorsqu'elles atteignent des abondances élevées, les noctiluques peuvent être responsables de l'anoxie, de l'acidification du milieu et de fortes concentrations en ammonium conduisant parfois à des mortalités massives de poissons comme cela a été le cas dans le Golfe d'Oman ou dans la Mer du Japon par exemple (Montani et al., 1998 ; Mohamed et Mesaad, 2007).

Des espèces ayant un frustule en forme d'aiguilles ou comportant des spicules piquantes pouvant altérer mécaniquement les tissus des poissons, notamment les branchies et l'appareil digestif (e.g. *Chaetoceros* sp., *Pseudo-nitzschia* sp., *Thalassiosira* sp.). Parmi ces dernières, certaines présentent en plus un potentiel toxique qui mériterait d'être étudié de manière plus fine au cours d'expériences spécifiques.

---

## Chapitre III. Effets de *Pseudo-nitzschia delicatissima* sur les juvéniles de bar. Expérience d'exposition.

---



### Article.

Delegrange A.<sup>a,b\*</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>, Courcot L.<sup>a,b</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>. 2015. **Testing the vulnerability of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to the Harmful Algal Bloom (HAB) species *Pseudo-nitzschia delicatissima*.** *Aquaculture* 437, 167-174.



### III.1. Préambule

Lors du suivi saisonnier réalisé en 2012, plusieurs espèces potentiellement délétères (i.e. toxicité, modification du milieu, effet mécanique) pour les bars élevés à Aquanord ont été identifiées. Par ailleurs, la coïncidence entre l'augmentation des mortalités des poissons et l'abondance de *Phaeocystis globosa* et *Pseudo-nitzschia* sp. montrée lors de l'étude préliminaire (cf. § I.3 et figure.I.5) confirme que la présence de ces deux espèces est récurrente dans l'eau d'alimentation des bassins piscicoles comme de nombreuses études l'ont montré en Manche orientale et en mer du Nord (e.g. Seuront et al., 2006 ; Schapira et al., 2008 ; Lefebvre et al., 2011 ; Hernández-Fariñas et al., 2014). Ces espèces méritent une attention particulière au regard des interactions phytoplancton/poissons :

- *P. globosa* qui domine la communauté phytoplanctonique lors de l'efflorescence printanière et qui est responsable de fortes accumulations de matière organique (Rogers et Lockwood, 1990), de l'augmentation de la viscosité de l'eau de mer (Seuront et al., 2006) mais aussi du colmatage direct des branchies en relation avec la forte biomasse atteinte et la formation de colonies mucilagineuses (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000).
- *Pseudo-nitzschia delicatissima* qui domine la communauté de diatomées à la fin de l'efflorescence de *P. globosa*. Cette espèce peut être responsable de deux types d'effets sur les poissons : la toxicité liée à l'acide domoïque et les dommages mécaniques aux muqueuses par sa forme d'aiguille.

Dans le cas de cette étude portant sur l'impact des efflorescences phytoplanctoniques sur les bars, il semble nécessaire d'appréhender l'effet nocif potentiel de *P. globosa* et *P. delicatissima* lors d'expériences d'expositions monospécifiques en conditions contrôlées.

Ce genre d'étude a déjà été effectué pour *P. globosa* et n'a montré aucun effet délétère de cette micro-algue sur les juvéniles de bar tant par ajout de culture sénescence que de « mousse de *Phaeocystis* » prélevée dans le milieu naturel (Amara et al., 2013). En fait, cette étude s'est principalement intéressée à l'effet des particules exopolymériques transparentes (i.e. exsudats libérés lors de la dissolution des colonies de *P. globosa*) sur les poissons. Ces exopolymères sont en fait responsables d'une forte concentration en matière organique particulaire car ils favorisent la floculation<sup>14</sup> mais aussi de modifications de la viscosité du milieu (Jenkinson et Biddanda, 1995; Passow, 2002). Cependant, aucune étude n'existe concentrant l'effet de *P. delicatissima* sur les bars.

Ce second chapitre présente donc les résultats d'une expérience d'exposition de juvéniles de bar à de fortes abondances de *P. delicatissima*, réalisée en conditions contrôlées au laboratoire pendant 45 jours. Deux types d'effets délétères ont été étudiés :

- L'effet mécanique sur les branchies et le tube digestif lié à la forme d'aiguille des frustules de *P. delicatissima* et à sa forte abondance,
- Les effets sub-létaux observables comme la réduction de la croissance ou de la condition des poissons pouvant être liés, soit à l'effet toxique potentiel, soit à l'effet mécanique, soit à la combinaison de ces deux effets.

---

<sup>14</sup> Floculation. Procédé d'agglomération des particules suivie de leur sédimentation.

## Testing the vulnerability of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to the Harmful Algal Bloom (HAB) species *Pseudo-nitzschia delicatissima*

Delegrange A.<sup>a,b\*</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>, Courcot L.<sup>a,b</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, LOG UMR CNRS 8187, 32, avenue Foch, F-62930 Wimereux, France.

<sup>b</sup>Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France.

\*Corresponding author at: ULCO, LOG UMR CNRS 8187, 32, avenue Foch, F-62930 Wimereux, France. +33321996427. Fax: +33321996401. E-mail address: [alice.delegrange@univ-littoral.fr](mailto:alice.delegrange@univ-littoral.fr)

### Abstract

A 45-day exposure experiment was carried out to assess whether the harmful algal blooming *P. delicatissima* (i.e. needle shaped diatom and potential domoic acid producer) is involved in recurrent mass mortality events at a coastal fish farm in the southern North Sea. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were exposed to different concentrations of *P. delicatissima*, ranging from  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  cells L<sup>-1</sup>. Despite exposure to high concentrations of *P. delicatissima*, sea bass weight and length based growth rates ( $0.05 \pm 0.02$  g d<sup>-1</sup> and  $0.18 \pm 0.05$  mm d<sup>-1</sup>, respectively) and condition (Fulton  $K = 0.98 \pm 0.06$  mg mm<sup>-3</sup>) were not significantly reduced suggesting that fish were not affected during the 45-day exposure period. However, signs of gill mucosa irritation (i.e. mucus overproduction) were observed, showing that this diatom induced a mechanical stress, which can affect gill functions or increase susceptibility of fish to secondary infections (e.g. bacterial and viral infections, parasitism). Results are discussed with regard to consequences for wild and farmed fish, and possible synergic noxious effects when *P. delicatissima* is associated to other potentially harmful taxa during the phytoplankton spring bloom in the eastern English Channel-North Sea ecosystem.

**Keywords:** Growth, Condition, *Dicentrarchus labrax*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, exposure experiment, Harmful Algal Bloom.

### Highlights:

- 45-day exposure experiment in controlled conditions
- Juvenile sea bass exposed to increasing densities of *Pseudo-nitzschia delicatissima*
- *P. delicatissima* induced a stress response (gill irritation)
- *P. delicatissima* did not impact fish condition and growth

### III.2. Introduction

For several decades now, harmful algal blooms (HAB) have been increasingly reported as responsible for marine life (e.g. shellfish, fish, sea birds, mammals) diseases and deaths (Anderson et al., 2012). HABs can impact on wild and reared animals through four main deleterious mechanisms: (i) oxygen depletion resulting from high biomass production, particularly in sheltered bays or fjords with low water exchanges; (ii) toxins, which can be transferred to humans causing Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP), or Amnesic Shellfish Poisoning (ASP); (iii) physical damages to skin and mucous membranes, such as gill irritation or clogging due to sharp or needle-shaped diatoms; and (iv) gas-bubble traumas caused by oxygen supersaturation resulting from photosynthetic activity (Black et al., 1991; Hallegraeff, 2003; Rodger et al., 2011; Yang and Albright, 1992).

Up to 40% of 200 known HAB species have been identified as being toxic (Hallegraeff, 2003; Rodger et al., 2011). Amongst these, *Pseudo-nitzschia* is a diatom genus responsible for ASP due to domoic acid (DA) production. The first recorded ASP event occurred in 1987 on Prince Edward Island (Canada), where 104 people became nauseous after consuming blue mussels (*Mytilus edulis*), which had fed on a DA-producing *Pseudo-nitzschia* bloom (Perl et al., 1990; Quilliam and Wright, 1989). DA can also be transferred from phytoplankton to higher levels directly through consumption by planktivorous fish such as anchovies (*Engraulis mordax*) and sardines (*Sardina pilchardus*), or indirectly by zooplankton (Liefer et al., 2013; Mos, 2001). In 1991, this trophic transfer to the highest levels resulted in the substantial stranding and deaths of piscivorous seabirds and marine mammals along the California coastline (Fritz et al., 1992; Work et al., 1993). Due to its needle shape, and because blooms can reach high abundance up to  $2\text{-}13 \times 10^6$  cells  $\text{L}^{-1}$  (Anderson et al., 2006; Nezan et al., 2010; Scholin et al., 2000), *Pseudo-nitzschia* sp. can also alter marine fauna by mechanical damage. In fact, blooms of sharp or needle-shaped diatoms (e.g. *Rhizosolenia* sp., *Chaetoceros* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia longissima*) have been responsible for massive mortalities of reared

salmonid fish by gill tissue alterations, mucus overproduction, and outbreaks of gas exchanges due to gill clogging (Albright et al., 1993; Bruno et al., 1989; Kent et al., 1995; Treasurer et al., 2003). Although DA vectorization along marine food webs is well known (Liefer et al., 2013; Mos, 2001), and studies about the impact of HAB on farmed fish have generally focused on phytoplankton blooms (i.e. species assemblages), targeted studies estimating single species noxious effects (e.g. toxicity and mechanical damage) on piscivorous fish are rare and have generally focused on the sharp *Chaetoceros* genus and/or toxic dinoflagellates (G.R. Bell, 1961; BurrIDGE et al., 2010; Forbes, 1991) (G. R. Bell, 1961; BurrIDGE et al., 2010; Forbes, 1991).

In the eastern English Channel-North Sea (EEC-NS) ecosystem, *Pseudo-nitzschia* sp. is identified as the dominant diatom of the phytoplankton spring bloom (Breton et al., 2011; Hasle, 2002; Klein et al., 2010; Rousseau et al., 2002; Schapira et al., 2008; Seuront et al., 2006). Frequent high abundances along the northern coasts of France (from Normandie to Pas-de-Calais) have led to spring alerts for commercial shellfish contamination by DA (especially king scallops – *Pecten maximus*, Lefebvre et al., 2014a) and hence, consumption. Blooming of such HAB species in coastal waters of the EEC-NS ecosystem is of particular concern given these areas are important nursery grounds for commercial fish species including sea bass (*Dicentrarchus labrax*; Amara, 2004, 2003; Selleslagh, 2008), but also concentrates several aquaculture facilities (shellfish and fish farms). In fact, in one of these fish farms (Aquanord S.A., Gravelines, France) where sea bass rearing tanks are fuelled with natural coastal North Sea water, mass mortalities (reaching up to 20% annually) yearly coincide with the phytoplankton spring bloom (Aquanord S.A., pers. comm.). Preliminary analyses of dead fish revealed the presence of the harmful species *Pseudo-nitzschia delicatissima* in rearing seawater and fish gills. This species presents morphological (needle shape) and toxic features compatible with noxious effects on farmed fish. Therefore, the hypothesis of this study was that *P. delicatissima* have the potential to affect negatively fish when exposed to the spring bloom. This was tested by carrying out a laboratory exposure



experiment over 45 days. Juvenile sea bass were exposed to three distinct concentrations of *P. delicatissima*. The experiment targeted the pre-growing fish stage (i.e. fish weight about 5 g) presenting the highest mortality during the phytoplankton spring bloom. Juvenile sea bass vulnerability to phytoplankton was assessed by analysing their mortality and physiological performances.

### **III.3. Material and methods**

#### **III.3.1. Experimental settings**

In order to assess whether *P. delicatissima* have an impact on the physiological performance of sea bass, a 45-day exposure experiment was carried out in controlled conditions.

Juvenile sea bass (160 individuals) were supplied by the Gravelines Marine Hatchery (Ecloserie Marine de Gravelines, France). For 14 days, the fish were placed in two 160 L tanks (80 individuals in each) filled with filtered seawater (1.2  $\mu\text{m}$  Whatman GF/C; Table III.1), and acclimatized at 15°C in a thermoregulated room under a 12h:12h light:dark cycle.

The experimental setup consisted of 10 aquaria of 37 L (50×30×25 cm) filled with filtered seawater (1.2  $\mu\text{m}$ , Whatman GF/C) and gently aerated by a compressed air network. On the first day of the experiment ( $t_0$ ), the acclimated fish ( $5.95 \pm 0.97$  g,  $85.73 \pm 4.77$  mm) were anesthetized with 320  $\mu\text{L L}^{-1}$  2-phenoxyethanol (Maršić-Lučić et al., 2005). They were weighed (total weight,  $W$ ,  $\pm 0.01$  g), measured (total length,  $L$ ,  $\pm 0.1$  mm) and individually tagged (Visual Implant Tag, 1.2 mm × 2.7 mm, Northwest Marine Technology) to follow individual growth and physiological performances over time. After their total recovery (within 5 min), the fish were randomly distributed into the experimental tanks (15 fish per tank i.e. 2.55 g L<sup>-1</sup>). Five experimental conditions were considered in duplicate: a control (C1) containing fish in filtered seawater and three exposure conditions (tanks D1, D2, and D3), with  $1 \times 10^6$  (D1),  $2 \times 10^6$  (D2), and  $5 \times 10^6$  (D3) *P. delicatissima* cells L<sup>-1</sup>. D1 corresponded to *P. delicatissima* highest abundance detected in the

eastern English Channel and the southern North Sea (Antajan et al., 2013; Breton et al., 2011), whereas tanks D2 and D3 aimed to exacerbate the potential impacts induced by *P. delicatissima* exposure. Maintaining constant phytoplankton abundance in tanks D1 to D3 required scheduled addition of *P. delicatissima* cultures, i.e. f/2 medium (Guillard, 1975) and associated *P. delicatissima* cells and nutrients. The impact of f/2 medium addition on fish was separately tested by setting up an additional control (C2). At the beginning of the experiment, 750 mL of f/2 medium was added to the C2 tanks corresponding to the *P. delicatissima* culture volume added to D3 at the same time. During the course of the experiment, 30% of this initial volume was added every three days in order to overcome daily water renewal. Each day, tanks were gently bottom siphoned with a tube to eliminate faeces. Care was taken not to stress the fish, and seawater was renewed (10% of total tank volume) with 1.2  $\mu\text{m}$ -filtered seawater stored and aerated in the thermo-regulated room.

### III.3.2. *Pseudo-nitzschia delicatissima* culture

*P. delicatissima* strain (cell length  $\approx 45 \mu\text{m}$ ) was isolated from the seawater fuelling the sea bass fish farm (Aquanord S.A., Southern North Sea, France), and identified using SEM (Scanning Electron Microscopy, LEO 438 VP) following the criteria defined by Lundholm et al. (2006b). *P. delicatissima* cells were maintained in monospecific non-axenic conditions in f/2 medium (Guillard, 1975) at  $12.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  with a 12h:12h light:dark cycle ( $130 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Lumilux Vario FM 1W/730 blanc BE, Osram) and gently manually-agitated once a day. Before the experiment, the *P. delicatissima* culture was acclimatized at  $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 weeks under the same light conditions. In order to maintain constant abundance of *P. delicatissima* in experimental tanks (D1, D2, and D3), *in vivo* fluorescence of chlorophyll-*a* was used as a proxy of *P. delicatissima* abundance. Hence, a preliminary batch culture experiment (21 days,  $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 12h:12h light:dark cycle,  $130 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was carried out to define *P. delicatissima* growth over time, and to relate its abundance to *in vivo* fluorescence. For this batch

culture experiment, initial *P. delicatissima* density was set to  $50 \pm 5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Every day, *in vivo* chlorophyll-*a* fluorescence was measured using a Trilogy fluorometer (Turner Designs) and 6 mL of culture were sampled, fixed with lugol:glutaraldehyde (2% final concentration, Verity et al., 2007) and stored in the dark in a cold room ( $4^{\circ}\text{C}$ ) for *P. delicatissima* microscopic cells enumeration (Utermöhl method,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ). Over its growth cycle, *P. delicatissima* abundance was significantly related to *in vivo* fluorescence following the equation (Eq. 1):  $A = 27041.7 \times F$  (Eq. 1,  $n = 34$ ,  $R^2 = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ), where  $A$  is *P. delicatissima* abundance (cells  $\text{mL}^{-1}$ ), and  $F$  is the corresponding *in vivo* fluorescence (RFU). To assess whether the considered *P. delicatissima* strain produced domoic acid (particulate and dissolved), 5 mL of culture were daily sampled and frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) until analysis with ASP ELISA kits (Biosense Laboratories, Bergen, Norway).

### III.3.3. Seawater sampling

Every day before water renewal, temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinity, pH and dissolved oxygen concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) were measured in each experimental tank with multiparameter probes (Hanna, HI 9828, ECDO WP3000 Eutech instruments and CRISON, Codice 5010T). At least 30 min. after water renewal, the fish were fed with a commercial feed (1% of fresh weight, Skretting). *P. delicatissima* abundance in tanks D1 to D3 was daily adjusted using *in vivo* fluorescence (see Eq.1) and controlled every other day by microscopic enumeration. Daily microscopic observation of fresh seawater allowed to assess the development of the microbial loop components (e.g. ciliates, flagellates and bacteria), particularly in tanks D1 to D3 since microorganisms such as bacteria can modify domoic acid production of some *Pseudo-nitzschia* strains (Bates et al., 1995; Kobayashi et al., 2009; Lelong et al., 2014, 2012a). Finally, 10 mL seawater samples were collected from each tank every five days for nutrient ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , and  $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) concentrations, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before analysis (auto-analyser; Alliance Integral Futura) using standard protocols (Bendschneider and Robinson, 1952; Mullin and Riley, 1955; Murphy and Riley, 1962).

### III.3.4. Fish sampling and analyses

Five fish were sampled from each experimental tank after 15, 30, and 45 days of exposure to *P. delicatissima* ( $t_{15}$ ,  $t_{30}$  and  $t_{45}$ ). Each fish was euthanized with a 2-phenoxyethanol overdose ( $640 \mu\text{L L}^{-1}$ , Maršić-Lučić et al., 2005), identified, weighed, and measured.

#### Gills and gut analyses.

Immediately after death, gill arches were dissected. One arch was prepared for *in vivo* microscopic observation (general state and filament smears,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ). Mucus overproduction was quantitatively assessed by measuring its thickness from the external limit of the epithelium to the external extent of the mucous layer using a calibrated ocular micrometer. Two other gill arches were stored in 70% ethanol, and dehydrated in four successive ethanol baths (1h 80%, 1h 90% and twice 1h 100%). Dehydrated arches were then placed in two successive hexamethyldisilazane (HMDS) baths (1h each) before being dried under a laminar flow to allow for good conservation of gill shape and structure (Laforsch and Tollrian, 2000). Given the small size of *P. delicatissima* individual cells ( $\approx 45 \mu\text{m}$ ), dried gill arches were observed using SEM in order to detect embedded diatoms in gills and their potential alteration at a small scale. Presence of free diatoms in gill cavity, or those which may have detached from gills during SEM preparation, was assessed by filtering ( $3 \mu\text{m}$  polycarbonate filters) dehydration ethanol baths. Digestive tracts were removed immediately after fish death and stored in 70% ethanol. They were then dissected under a stereomicroscope. Gut content was re-suspended in deionized water to allow for the elimination of salt crystals (Guiselin et al., 2009) and filtered on  $3 \mu\text{m}$  polycarbonate filters. Filters (i.e. ethanol gill baths and gut contents) were then dried under a laminar flow and SEM samples (i.e. including dried gill arches) mounted on aluminium stubs with double sticky carbon tabs (Agar scientific), metalized under argon flow with Au/Pd during 90s (Polaron SC 7620), and SEM observed.

### *Fish condition and physiological performances.*

Individual weight and length based growth rates ( $GW$ ,  $\text{g d}^{-1}$  and  $GL$ ,  $\text{mm d}^{-1}$ ) were calculated following the equation  $GX = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , where  $X_0$  is individual weight ( $W_0$ ) or length ( $L_0$ ) at  $t_0$ , and  $X_t$  is individual fish weight ( $W_t$ ) or length ( $L_t$ ) at time  $t$ . The Fulton  $K$  index ( $\text{mg mm}^{-3}$ ) is a general wellbeing indicator assuming that for a given length, a heavier fish has a better condition (Froese, 2006; Schreck and Moyle, 1990). It was calculated using the equation  $K = 100 \times (W/L^3)$ , where  $W$  is the individual body weight (mg) and  $L$  is the individual total length (mm) (Nash et al., 2006; Ricker, 1975). At the end of the experiment ( $t_{45}$ ), the fish were stored at  $-80$  °C for RNA:DNA ratio analyses following Caldarone et al. (2001). RNA:DNA ratio was measured in the dorsal white muscle as an indicator of its nutritional status and growth proxy (Buckley, 1984; Chícharo and Chícharo, 2008) - fish in good condition tend to have higher RNA/DNA ratios than those in poor condition.

### **III.3.5. Statistical analyses**

Results did not match the parametric assumption of normality (Shapiro-Wilk test,  $p > 0.05$ ) and homoscedasticity (Levene's F test,  $p > 0.05$ ). Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW), and Kruskal Wallis (KW) non-parametric comparison tests were thus used to compare fish weight, length, and physiological performances between experimental conditions (C1, C2, D1, D2, and D3) at each sampling time ( $t_0$ ,  $t_{15}$ ,  $t_{30}$ , and  $t_{45}$ ). When needed, the KW test was followed by a pairwise Wilcoxon test (pW). Statistics were performed using R software packages (R Core Team, 2012).

## **III.4. Results**

### **III.4.1. Experimental conditions**

Hydrological conditions remained stable in all experimental tanks (Table III.1). The *P. delicatissima* strain used during the experiment did not produce domoic acid, and *P. delicatissima* abundances were maintained

at  $0.7 \pm 0.9$ ,  $1.8 \pm 1.4$ , and  $7.1 \pm 5.6 \times 10^6$  cells  $L^{-1}$  in tanks D1, D2, and D3, respectively (Table III.1).

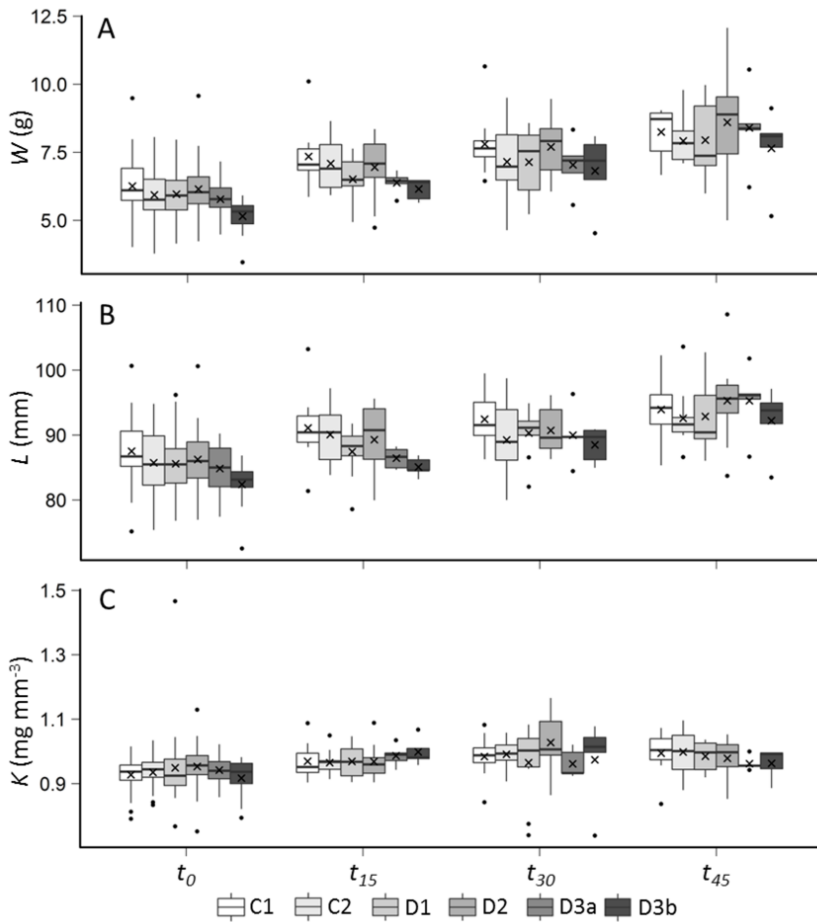
### III.4.2. Fish physiological performances

Fish initial length and weight were not significantly different between tanks (KW,  $p > 0.05$ ), except for one duplicate from condition D3 (D3b hereafter) where fish were lighter (pW,  $p < 0.05$ ) and smaller (pW,  $p < 0.05$ ) than those in all other tanks. Results from other duplicated conditions were pooled given that for each parameter no significant differences were detected (pW,  $p > 0.05$ ) at each sampling time.

No fish mortality was observed either during the 14-day acclimation or during the 45-day exposure experiment. At each sampling time ( $t_{15}$ ,  $t_{30}$ , and  $t_{45}$ ) no significant differences in fish weight and length, condition (Figure III.1), or weight and length based growth rates (KW,  $p > 0.05$ ; Figure III.2) were observed. Over the experiment, fish growth was consistent in all experimental tanks. Mean individual weight and length gains reached  $2.3 \pm 0.8$  g and  $8.3 \pm 2.4$  mm, respectively, between  $t_0$  and  $t_{45}$  (Figure III.1A; III.1B). Mean Fulton K indices were generally close to 1.0 over the experiment, ranging from  $0.94 \pm 0.07$   $mg\ mm^{-3}$  at  $t_0$  to  $0.98 \pm 0.06$   $mg\ mm^{-3}$  at  $t_{45}$  (Figure III.1C). Mean integrated growth rates in weight and length reached  $0.05 \pm 0.02$   $g\ d^{-1}$  and  $0.18 \pm 0.05$   $mm\ d^{-1}$  at  $t_{45}$ , respectively (Figure III.2). The RNA:DNA ratio varied from 2.0 to 4.7 at  $t_{45}$ , but without significant differences between experimental conditions (KW,  $p > 0.05$ , Figure III.3).

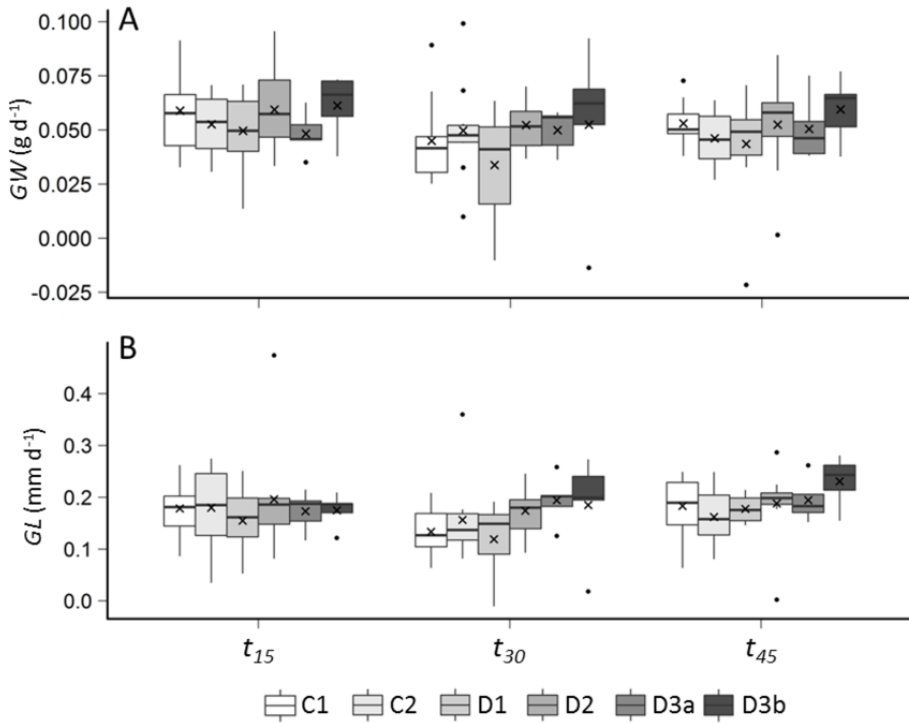
**Table III.1. Experimental conditions (mean  $\pm$  standard deviation, [min-max]) during the acclimation and the 45-day experiment: temperature (T, °C), salinity (S), dissolved oxygen concentration (O<sub>2</sub>d, mg L<sup>-1</sup>), pH, nutrient concentrations (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub>, Si(OH)<sub>4</sub>,  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) and *Pseudo-nitzschia delicatissima* abundances (A, 10<sup>6</sup> cells L<sup>-1</sup>).**

	T (°C)	S	O <sub>2</sub> d (mg L <sup>-1</sup> )	pH	NO <sub>2</sub> ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	Si(OH) <sub>4</sub> ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	A (10 <sup>6</sup> cells L <sup>-1</sup> )
<b>Acclimation</b>	14.7 $\pm$ 0.2 [14.5 ; 15.1]	32.9 $\pm$ 4.7 [31.9 ; 33.2]	8.2 $\pm$ 0.5 [7.2 ; 8.9]	7.5 $\pm$ 0.1 [7.5 ; 7.7]	- -	- -	- -	- -	- -
<b>Exposure experiment</b>	14.3 $\pm$ 0.2 [13.9 ; 14.9]	33.5 $\pm$ 0.4 [32.4 ; 34.2]	9.2 $\pm$ 0.6 [6.0 ; 10.1]	7.8 $\pm$ 0.2 [7.2 ; 8.0]	4.5 $\pm$ 7.2 [0.7 ; 36.9]	15.9 $\pm$ 8.6 [5.4 ; 37.5]	6.2 $\pm$ 3.0 [0.8 ; 14.3]	12.5 $\pm$ 3.0 [6.6 ; 19.4]	- -
<b>T1</b>	14.3 $\pm$ 0.2 [14.0 ; 14.7]	33.5 $\pm$ 0.4 [32.6 ; 34.1]	9.2 $\pm$ 0.6 [7.6 ; 10.1]	7.8 $\pm$ 0.1 [7.3 ; 8.0]	3.7 $\pm$ 5.5 [0.7 ; 16.16]	8.7 $\pm$ 3.1 [5.4 ; 13.9]	5.5 $\pm$ 1.7 [1.7 ; 7.6]	10.9 $\pm$ 3.2 [7.3 ; 16.6]	- -
<b>T2</b>	14.3 $\pm$ 0.1 [14.0 ; 14.7]	33.5 $\pm$ 0.3 [32.6 ; 34.0]	9.1 $\pm$ 0.7 [6.0 ; 10.1]	7.8 $\pm$ 0.2 [7.3 ; 8.0]	4.1 $\pm$ 6.0 [1.1 ; 16.9]	13.1 $\pm$ 7.1 [7.0 ; 25.4]	6.0 $\pm$ 3.4 [0.8 ; 10.8]	13.7 $\pm$ 2.8 [7.9 ; 17.4]	- -
<b>D1</b>	14.2 $\pm$ 0.2 [13.9 ; 14.7]	33.6 $\pm$ 0.4 [32.4 ; 34.2]	9.2 $\pm$ 0.6 [6.3 ; 10.1]	7.8 $\pm$ 0.2 [7.3 ; 8.0]	2.3 $\pm$ 2.2 [1.1 ; 7.1]	13.8 $\pm$ 5.3 [7.9 ; 23.3]	6.0 $\pm$ 3.0 [0.8 ; 10.8]	12.6 $\pm$ 3.7 [6.6 ; 19.4]	0.7 $\pm$ 0.9 [0.06 ; 4.24]
<b>D2</b>	14.3 $\pm$ 0.1 [14.02 ; 14.8]	33.5 $\pm$ 0.3 [32.6 ; 33.9]	9.1 $\pm$ 0.7 [6.5 ; 9.9]	7.8 $\pm$ 0.2 [7.2 ; 8.0]	3.3 $\pm$ 3.0 [1.2 ; 9.0]	17.9 $\pm$ 7.3 [7.8 ; 29.1]	5.8 $\pm$ 3.0 [0.8 ; 11.0]	12.6 $\pm$ 2.7 [8.9 ; 17]	1.8 $\pm$ 1.4 [0.6 ; 6.6]
<b>D3</b>	14.3 $\pm$ 0.2 [14.0 ; 14.9]	33.5 $\pm$ 0.4 [32.6 ; 34.01]	9.2 $\pm$ 0.5 [7.8 ; 9.9]	7.8 $\pm$ 0.1 [7.3 ; 8.0]	9.1 $\pm$ 13.1 [2.0 ; 36.9]	26.0 $\pm$ 8.3 [13.1 ; 37.5]	7.5 $\pm$ 4.2 [2.9 ; 14.3]	12.9 $\pm$ 2.5 [8.9 ; 17]	7.1 $\pm$ 5.6 [0.2 ; 28.1]

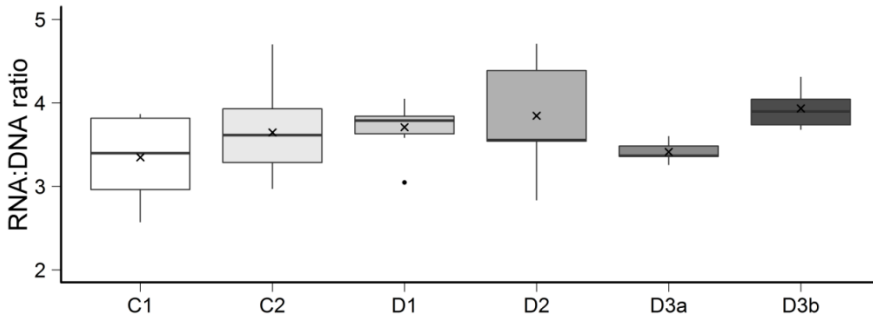


**Figure III.1.** Time series evolution of juvenile sea bass weight ( $W$ , g), length ( $L$ , mm), and condition ( $K$ ,  $\text{mg mm}^{-3}$ ) during the 45-day exposure experiment in all experimental conditions. Crosses stand for means.





**Figure III.2.** Time series evolution of weight ( $GW$ ,  $g d^{-1}$ ) and length ( $GL$ ,  $mm d^{-1}$ ) based growth rates of juvenile sea bass during the 45-day experiment in all experimental conditions. Crosses stand for means. No significant differences were detected at each sampling time between experimental conditions (KW,  $p > 0.05$ ).



**Figure III.3.** RNA:DNA ratio of juvenile sea bass at the end of the 45-day exposure experiment ( $t_{45}$ ). Crosses stand for means.

### III.4.3. Fish gills, gut content, and morphological observation

No morphological lesion or fish malformation were observed during the experiment. Gills microscopic observation recurrently revealed mucus overproduction for fish exposed to *P. delicatissima*. In fact, a 2 to 5 fold increase of mucus thickness was observed between fish reared in control tanks (C1) and those exposed to  $5 \times 10^6$  *P. delicatissima* cells  $L^{-1}$  in tanks D3. SEM observations of gill arches did not reveal the presence of *P. delicatissima* in gill epithelium. However, intact or broken *P. delicatissima* frustules were found in ethanol desiccation baths revealing the presence of diatoms in gill cavity of fish exposed to *P. delicatissima* (i.e. in D1 to D3 tanks). SEM analysis of gut contents revealed ingestion of *P. delicatissima* cells as well as the presence of two other diatoms: *Chaetoceros* sp. and *Thalassiosira* sp.

## III.5. Discussion

### III.5.1. Experimental conditions

The 45-day exposure experiment occurred in controlled conditions enabling the stability of hydrological parameters (Table III.1). Thus, if changes in fish mortality, physiological performances, and morphological features (e.g. gills, skin) were observed, they could only have been

attributed to *Pseudo-nitzschia delicatissima* exposure. Dissolved oxygen concentration, pH, and salinity were in accordance with sea bass optimal growth conditions (Blancheton, 2000; Papoutsoglou et al., 1998; Person-Le Ruyet et al., 2004). Temperature was set at 15°C over the experiment which ensured a high growth rate ( $0.3 \pm 0.1 \text{ d}^{-1}$ ) of the *P. delicatissima* strain maintained in exponential growth phase (Fehling et al., 2005; Lundholm et al., 2006b). The experimental temperature was also consistent with the temperature at which *Pseudo-nitzschia* sp. is abundant in the EEC-NS ecosystem (Antajan et al., 2013), and does not limit seabass growth (2 to 32°C, Ilestad et al., 2011). These results can therefore be extrapolated with great confidence to *in situ* conditions.

Nutrient concentrations remained stable over the experiment except at  $t_{30}$  when nitrite and nitrate concentrations increased and peaked in tanks D3 at 36.9 and 37.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. This increase in nutrient concentrations is in the same range as in tanks C2 set up for this purpose ( $[\text{NO}_2]$ : 1.1 – 16.9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and  $[\text{NO}_3]$ : 7.0 – 25.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), and can be related to the addition of algal culture medium as well as to remineralisation processes through a microbial loop development (i.e. bacteria and choanoflagellates) in the experimental tanks. Indeed, over the course of the experiment, particularly high numbers of Choanoflagellates (i.e. *Stephanoeca* sp.) were observed in tanks D1, D2, and D3 compared to the controls. Despite this apparent modification of the microbial community associated to *P. delicatissima*, no DA was produced either during the batch culture experiment or in the exposure tanks. Finally, since nitrate and nitrite concentrations remained below the 96 hour LC50 at 17°C for sea bass (i.e. 4419  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , Saroglia et al., 2009), impact on fish wellbeing and physiology was unlikely, as demonstrated by the absence of mortality.

### III.5.2. *Pseudo-nitzschia delicatissima* effect on fish

The experimental design was set up to obtain a random distribution of acclimated fish in ten trial tanks. However, a random distribution can lead to discrepancies between small samples (Springate, 2012). This may have happened during this experiment, as at  $t_0$ , D3b fish were

significantly smaller and lighter than those in all the other tanks. Given smaller fish generally have higher growth rates than larger fish reared in the same conditions, subsequent bias linked to random sampling was avoided by not pooling values for D3 duplicates. In any case, this sampling bias only impacted on one tank (D3b), and overall, this discrepancy did not spread to other sampling times ( $t_{15}$  to  $t_{45}$ ) since significant differences were no longer observed between the experimental tanks.

Fish growth rates, both in weight ( $0.05 \pm 0.02 \text{ g d}^{-1}$ ) and in length ( $0.18 \pm 0.05 \text{ mm d}^{-1}$ ) at  $t_{45}$ , were in accordance with previously published values (i.e.  $GW$ : 0.18 to  $0.55 \text{ g d}^{-1}$  and  $GL$ : 0.22 to  $0.56 \text{ mm d}^{-1}$ , Guérin-Ancey, 1973; Hatziathanasiou et al., 2002; Valente et al., 2007; Vinagre et al., 2009). Fulton  $K$  index values at  $t_{45}$  ( $0.98 \pm 0.06 \text{ mg mm}^{-3}$ ) indicated a good fish condition (i.e. closed to  $1 \text{ mg mm}^{-3}$ , Froese, 2006) and also matched literature values ( $0.88$  to  $1.17 \text{ mg mm}^{-3}$ , Kerambrun et al., 2012a, 2012b; Mourente and Bell, 2006; Vasconcelos et al., 2009). Finally, the RNA:DNA ratio at  $t_{45}$  ( $3.6 \pm 0.5$ ) indicated that metabolic activity of juvenile sea bass was consistent with values usually encountered *in situ* and in experimental conditions for this developmental stage (2.7 to 5.1) and highlighted good nutritional status and instantaneous growth (Alami-Durante et al., 2007; Kerambrun et al., 2012a, 2012c; Vasconcelos et al., 2009). Therefore, despite exacerbating fish exposure to *P. delicatissima* by using abundances 2 to 5 fold higher than *in situ* and targeting the most sensitive stage of the fish farm, condition and growth of exposed fish were not altered during the 45-day experiment. This led to the rejection of the initial hypothesis. Nevertheless, *Pseudo-nitzschia* sp. is a needle-shaped highly-silicified diatom and several sharp diatoms have been reported worldwide to cause fish mortalities both in pen reared fish (Albright et al., 1993; Corrales and Maclean, 1995; Yang and Albright, 1992) and in dedicated exposure experiments (Burrige et al., 2010; Forbes, 1991; Kent et al., 1995). For instance, physical damage to fish gills and digestive tracts were observed associated to *Chaetoceros* sp., *Rhizosolenia imbricata*, *Cylindrotheca closterium*, and *Thalassionema* sp. as well as *Pseudo-nitzschia* sp.

blooms (Bruno et al., 1989; Farrington, 1988; Kent et al., 1995; Rodger et al., 2011; Treasurer et al., 2003). These physical alterations can lead to capillary hemorrhage, dysfunctioning of gas exchanges through the gill epithelium, secondary infections, and to gills clogging through frustules embedment and mucus overproduction, causing wellbeing alteration and death through asphyxiation (Albright et al., 1993; Brusle, 1996; Hallegraeff, 2003; Kent et al., 1995; Rodger et al., 2011). Thus, total absence of deleterious effect induced by the exposition to high abundances of *P. delicatissima* can not be rejected since mucus overproduction was observed in fish maintained in tanks D3. In fact, mucus overproduction is the first defense mechanism against external attacks such as mechanical damage to mucosa (e.g. gills, Rodger et al., 2011a; Shen et al., 2011). In addition, the accumulation of mucus on gills was demonstrated to inhibit gill functions (e.g. gas exchanges) in rainbow trout exposed to the harmful diatom *Chaetoceros concavicornis* (Yang and Albright, 1992). Gills irritation due to *P. delicatissima* was obvious given the detection of numbers of frustules in gill cavity. Their presence was also consistent with their small size and suggests that abundance is a parameter to account for during the phytoplankton spring bloom to assess fish vulnerability and stress response.

*P. delicatissima* frustules were also found in the digestive tracts of fish from tanks D1 to D3, illustrating ingestion process. During the dissection of digestive tracts under the microscope, no apparent lesions (e.g. necrosis or abrasion) were observed in the stomach tissue, indicating that diatoms did not affect the digestive mucosa. However, it remains difficult to determine if diatom ingestion was active or passive i.e. given the high *P. delicatissima* abundance in experimental tanks, diatoms were ingested together with the daily food supply. Other diatom genus (*Chaetoceros* sp., and *Thalassiosira* sp.) were found in the digestive tracts of fish in all experimental tanks. Because these tanks were filled with 1.2  $\mu\text{m}$  filtered seawater, *Chaetoceros* and *Thalassiosira* could not have been provided by their daily refill. The sea bass probably ingested these diatoms during their larval development in the Gravelines marine hatchery. Phytoplankton ingestion is actually nutritionally important for larval

development because it triggers the production of digestive enzymes. In other words, ingested phytoplankton fosters the early gut flora e.g. for herring (*Clupea harengus*) or halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae (Reitan et al., 1997). In this exposure experiment, benefits due to microalgae ingestion are difficult to assess because fish exposure to *P. delicatissima* did not significantly alter metabolic activity neither nutritional status as shown from RNA:DNA ratio.

These results suggest that needle shaped diatoms could alter gill integrity, which in turn could limit gas exchange and lead to anoxia or favor secondary infections (e.g. bacterial, virus or parasites). This is of particular concern in the EEC-NS ecosystem since *Pseudo-nitzschia* sp. is generally associated with other sharp diatoms (e.g. *Chaetoceros* sp., *Rhizosolenia* sp., *Asterionellopsis glacialis*, and *Dytilum brightwellii*). Although reaching lower abundance, these diatoms have been demonstrated to cause mechanical damages to farmed fish and mortalities in other coastal areas (Bruno et al., 1989; Farrington, 1988; Rodger et al., 2011; Treasurer et al., 2003). Moreover, during the phytoplankton spring bloom in the EEC-NS, *P. delicatissima* is often associated to the *Phaeocystis globosa* bloom (prymnesiophyte). The latter is also a potential HAB forming species reported to cause anoxia, which affect wild marine fauna such as benthic invertebrates and fish in the same area (Desroy and Denis, 2004; Rogers and Lockwood, 1990). It induces the modification of seawater rheological properties (Seuront et al., 2006; Seuront and Vincent, 2008) known to alter small scale processes such as gas exchanges through gill epithelium (Jenkinson, 1989). Recently, a specific exposure experiment did not highlight any direct effect of *P. globosa* on juvenile sea bass mortality or wellbeing. On the contrary, juvenile sea bass exposed to high concentration of colonial *P. globosa* seem to have a better condition (Fulton *K*) than controls (Amara et al., 2013).

A single effect of potentially harmful species (i.e. *P. delicatissima* or *P. globosa*) is probably not responsible for fish mortalities and wellbeing alteration in the EEC-NS ecosystem, but combined effects of several species with individual noxious actions (e.g. sharp diatoms, toxic species,

and modification of seawater properties) should be investigated. Quantifying the impact of a whole phytoplankton bloom and its associated bacterial and heterotrophic communities on sea bass thus seems to be necessary for the management of phytoplankton blooms in natural and aquaculture environments. This goes through seawater quality monitoring and development of mitigation tools in fish farming areas to prevent a possible impact of highly abundant phytoplankton on finfish.

**Acknowledgments:** We acknowledge the Ecloserie Marine de Gravelines (EMG) for fish supply. S. Picot is gratefully acknowledged for her technical support during the experiment and for laboratory analyses. We thank Dr. E. Breton for providing the *P. delicatissima* strain. Dr. T. Bastian is also thanked for comments and suggestions improving the manuscript. A PhD grant from the région Nord Pas-de-Calais and the Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) attributed to A. Delegrange supported this work. This work was also funded by a collaborative convention between Aquanord S.A. and ULCO/LOG (2012). This paper was English-proofed by: [www.englisheditor.webs.com](http://www.englisheditor.webs.com).

### III.6. Conclusion

*Pseudo-nitzschia delicatissima* ne semble pas avoir d'effet délétère sur la croissance et la condition des juvéniles de bars, même à des concentrations cinq fois plus élevées que son pic d'abondance dans le milieu naturel (i.e.  $5 \times 10^6$  cells. L<sup>-1</sup>). Cependant, des effets mécaniques ont été observés sur les lamelles branchiales des poissons exposés à des concentrations élevées de *P. delicatissima*, visibles par une augmentation de l'épaisseur de mucus à la surface de l'épithélium branchial. En fait, la production excessive de mucus est la première barrière de défense contre les attaques externes comme les dommages mécaniques aux tissus (Yang et Albright, 1992 ; Rodger et al., 2011). Cela pourrait conduire à la limitation de la fonction branchiale (e.g. échanges gazeux et excrétion) et donc causer, à long terme, des effets sub-létaux tels que la réduction de la croissance. Néanmoins, puisque aucun effet délétère n'a été observé au niveau de la condition et les performances physiologiques des poissons, l'effet isolé de *P. delicatissima* sur les juvéniles de bar ne peut seul expliquer les mortalités massives observées dans la ferme aquacole pendant l'efflorescence phytoplanctonique.

L'absence d'effet mono-spécifique de *P. globosa* et de *P. delicatissima*, deux espèces phytoplanctoniques dominantes pendant l'efflorescence printanière sur les juvéniles de bar amène à la question suivante : **les effets délétères voire létaux observés chaque printemps dans la ferme piscicole ne peuvent-ils pas être le résultat d'un effet cumulé voire synergique des différentes espèces composant la communauté phytoplanctonique ?** Néanmoins, la mise en place d'expériences d'expositions de poissons à des communautés phytoplanctoniques en conditions contrôlées nécessite une logistique très lourde en amont et pendant l'expérience pour le maintien de communautés stables dans les aquariums. Une alternative aux expériences en conditions contrôlées serait d'exposer les poissons à des communautés phytoplanctoniques naturelles similaires à celles rencontrées dans la baie sud de la mer du Nord.





---

## Chapitre IV. Effets de l'efflorescence phytoplanctonique printanière sur les juvéniles de bar. Utilisation des moules comme outil de mitigation.

---



### Article.

Delegrange A.<sup>a,b\*</sup>, Vincent D.<sup>a,b</sup>, Duret M.<sup>a,b</sup>, Amara R.<sup>a,b</sup>, 2015. **The use of mussels for mitigating the noxious effects of phytoplankton spring blooms on farmed fish.** *Aquacultural Engineering* 66 : 52-61.

### Communications

Delegrange A., Vincent D., Duret M., Cornille V., Laréal M., Bonnard A., Gaine F., Amara R. **Seawater biofiltration: mussels as a tool to prevent phytoplankton blooms impact on farmed fish (*Dicentrarchus labrax*)?** Poster. Aquaculture conference: To the Next 40 Years of sustainable Global Aquaculture. Las Palmas, Gran Canaria, Espagne. 3 – 7 Novembre 2013 (Annexe 3)

Delegrange A., Vincent D., Duret M., Cornille V., Laréal M., Bonnard A., Gaine F., Amara R. **Amélioration de la croissance et de la condition de juvéniles de bars (*Dicentrarchus labrax*) grâce à la biofiltration de l'eau de mer par des moules (*Mytilus edulis*).** Présentation orale, Forum des Jeunes Océanographes. Saint Valéry sur Somme, France. 16 octobre 2013 (Annexe 4).



## IV.1. Préalable

Les communautés phytoplanctoniques du sud de la mer du Nord comportent des taxons pouvant avoir des effets délétères sur les poissons (Chapitres I et II). C'est notamment le cas des diatomées du genre *Chaetoceros*, présentes toute l'année, qui sont connues pour causer des mortalités massives de saumon dans des élevages en mer mais aussi dans des expériences d'expositions spécifiques au laboratoire (Farrington, 1988 ; Forbes, 1991 ; Yang et Albright, 1992). Si aucun effet délétère de la Prymnesiophyceae *P. globosa* n'a pu être démontré sur les juvéniles de bar en conditions contrôlées (Amara et al., 2013), cette espèce est connue pour être responsable de mortalités au sein des communautés benthiques intertidales en Manche Orientale (Spilmont et al., 2009) et une autre espèce du même genre (*P. pouchetii*) a causé des mortalités de poissons dans d'autres zones géographiques (Huang et al., 1999 ; Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000). De plus, l'expérience d'exposition de juvéniles de bar à *P. delicatissima* a laissé entrevoir un effet mécanique de cette espèce sur les branchies (Chapitre III). Puisque plusieurs espèces phytoplanctoniques potentiellement délétères sont présentes dans le milieu lors de l'efflorescence printanière en Manche orientale et au sud de la mer du Nord, un effet cumulé de ces espèces pourrait être impliqué dans les mortalités printanières inexplicables par les services vétérinaires au sein de la ferme aquacole.

Par ailleurs, il est connu que les efflorescences phytoplanctoniques impactent l'aquaculture dans de nombreux écosystèmes côtiers (e.g. Chang et al., 1990 ; Kent et al., 1995 ; BurrIDGE et al., 2010) et que très peu de solutions ont été développées afin d'atténuer leurs effets délétères dans les élevages piscicoles. A ce jour, des outils de mitigation existent. Citons à titre d'exemples l'aération ou la filtration de l'eau d'élevage, la dispersion de surfactants tels que l'argile, l'utilisation de pathogènes de phytoplancton. Toutefois, ces outils ont un effet limité dans les environnements ouverts en raison du renouvellement régulier des masses d'eau (Kim, 2006 ; Rodger et al., 2011). L'utilisation d'organismes filtreurs tels que les bivalves ou les copépodes a déjà été envisagée dans des cages en mer en Corée (Fukuyo et al., 2002). Cependant, en raison

des conditions environnementales (hydrodynamisme principalement), ils n'ont pas permis une mitigation efficace de l'efflorescence délétère (Fukuyo et al., 2002). Pourtant, le fort potentiel de filtration des organismes suspensivores est déjà utilisé en aquaculture intégrée afin de diminuer la teneur en matière organique en suspension dans les effluents d'élevages de poissons (Blancheton et al., 2009). Connaissant les avantages que présentait l'utilisation de tels organismes, il semblait donc judicieux de tester leur efficacité dans un dispositif inverse, où les bivalves seraient utilisés en amont de l'élevage de poissons afin de filtrer l'eau d'élevage et d'en diminuer la charge particulaire (phytoplancton et matières en suspension).

Ce troisième chapitre a un objectif double :

- Evaluer l'effet de l'efflorescence phytoplanctonique printanière à l'échelle des communautés sur les juvéniles de bar en conditions aquacoles,
- Mettre au point une méthode de mitigation permettant d'atténuer l'efflorescence phytoplanctonique dans les bassins d'élevage et la tester en conditions réelles. Pour cela, des moules récoltées au sein de la ferme aquacole ont été utilisées comme filtre biologique de l'eau d'élevage des juvéniles de bar.

## The use of mussels for mitigating the noxious effects of phytoplankton spring blooms on farmed fish

A. Delegrange<sup>a,b\*</sup>, D. Vincent<sup>a,b</sup>, M. Duret<sup>a,b</sup>, and R. Amara<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Université du littoral Côte d'Opale (ULCO), UMR 8187, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), 32 avenue Foch, F-62930 Wimereux, France.

<sup>b</sup> Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

\* Corresponding author at: ULCO, UMR 8187 LOG, 32 avenue Foch, F-62930 Wimereux, France. Tel.: +33321996427. Fax.: +33321996401. E-mail address: [alice.delegrange@univ-littoral.fr](mailto:alice.delegrange@univ-littoral.fr)

### Abstract:

The possibility of using the natural biofiltration power of blue mussels (*Mytilus edulis*,  $0.37 \pm 0.08$  g ind<sup>-1</sup> dry weight) to dampen the potential detrimental effect of phytoplankton blooms on juvenile farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) was tested in a fish farm during a 35-day mesocosm experiment. Mussel effective clearance rates averaged  $41.15 \pm 14.19$  m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> and led to a 6.3 to 13.1 fold reduction of the phytoplankton abundance as well as comparable decreases in chlorophyll *a* and turbidity. This improvement in seawater quality significantly enhanced fish physiological performances: weight-based growth rates were significantly higher ( $2.87 \pm 0.43$  % d<sup>-1</sup>) compared to control exposed to non-filtered (bulk) seawater ( $2.55 \pm 0.44$  % d<sup>-1</sup>). The same observation holds for the Fulton condition index and the metabolic activity (RNA:DNA ratio). For fish reared in bulk seawater, diatoms embedded in gills (*Rhizosolenia imbricata*, *Thalassiosira* sp.) and mucus overproduction indicated a stress (i.e. mechanical damages) induced by phytoplankton exposure which, in turn, may have affected fish energy balance. The use of mussels as a satisfying mitigation tool reducing phytoplankton bloom impacts is discussed with regard to phytoplankton bloom magnitude and ashore marine fish farming in coastal ecosystems.

**Keywords:** Harmful algal blooms mitigation, mussel biofiltration, fish farming, sea bass

### Highlights:

- Sea bass were exposed to natural and mussel filtrated seawater during a 35-d mesocosm experiment.
- Mussel filtration efficiently dampened phytoplankton biomass and abundance
- Higher growth rate, condition K index and RNA:DNA ratio were recorded for fish reared in biofiltered seawater.
- Gills irritation (mucus overproduction) linked to needle-shaped phytoplankton species.

## IV.2. Introduction

Harmful algal blooms (HAB) are responsible for massive fish mortalities in coastal aquaculture worldwide (Bruno et al., 1989; Brusle, 1996; Kent et al., 1995; Landsberg, 2002; Park et al., 2013; Thangaraja et al., 2007). They can also have sub-lethal effects such as appetite loss leading to a reduced fish growth (Rodger et al., 2011; Treasurer et al., 2003). In the 90s, Black et al. (1991) suggested four deleterious mechanisms to be caused by HABs: (i) physical damage to mucous membranes, (ii) asphyxiation due to oxygen depletion, (iii) gas bubble trauma resulting from photosynthesis driven oxygen hyper-saturation, and (iv) ichthyotoxicity (see review by Landsberg, 2002). Although sharp diatoms such as *Chaetoceros* sp. were proven to be nutritionally, and cost efficient in fish aquaculture and shellfish hatcheries (see review by Brown, 2002); their excessive proliferation was responsible for massive salmonid kills in fish farms located in British Columbia and Scotland by causing irritation, mucus overproduction and clogging of gills leading to oedema, necrosis, and asphyxiation (Albright et al., 1993; Bruno et al., 1989; Kent et al., 1995; Treasurer et al., 2003; Yang and Albright, 1992). Other studies suggest that changes in seawater rheological properties induced by some phytoplankton blooming species (e.g. *Phaeocystis* sp. - Kesaulya et al., 2008; Seuront and Vincent, 2008; Seuront et al., 2006) can cause fish mortalities through respiration, and excretion hindering (Jenkinson, 1989).

For several years, coinciding with the phytoplankton spring bloom, mass mortalities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) rearing stocks have regularly been observed in a southern North Sea fish farm (Aquanord S.A., Gravelines, France). These mortalities, reaching about 20% of the annual fish mortality, were not explained by classical diseases such as parasitism, bacterial or viral infections. However a deleterious effect of the phytoplankton spring bloom has been suspected since potentially noxious species such as *P. globosa*, sharp, and needle-shaped diatoms (e.g. *Chaetoceros* sp., *Rhizosolenia* sp., *Thalassiosira* sp.), and potentially toxic taxa (*Pseudo-nitzschia* sp., Lelong et al., 2012) were commonly observed in rearing seawater and fish gills.

Typical mitigation methods against HAB usually consist in modifying the rearing environment via physical means such as seawater aeration increase, water circulation modification, screen filtration, and ozone and UV radiations (Rodger et al., 2011). Chemical means have also been experimented (sodium hypochlorite, clay, and surfactants; Kim, 2006; Park et al., 2013) but they can be expensive, and detrimental to the environment (Rodger et al., 2011). Finally, the only developed biological technique tested so far is represented by micro-algae killers (e.g. bacteria from *Cytophaga*, *Alteromonas* and *Pseudoalteromonas* genus ; Fukuyo et al., 2002; Imai, 2005; Imai et al., 1993) although its application is limited to enclosed systems. The use of filter-feeding organisms (e.g. bivalves or copepods) for HAB mitigation has already been considered in Korea but, due to the natural hydrodynamism, they did not represent a satisfying solution in open aquaculture systems (e.g. fish cages; Fukuyo et al., 2002). Quantitatively, blue mussels (*Mytilus edulis*) are known to be very efficient filter feeders with high clearance rates (i.e. 1 to 7 L h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, Petersen et al., 2004), and are able to significantly reduce seston (Dame et al., 1991; Davenport et al., 2000; Riisgård et al., 2011), and phytoplankton abundance (Dame et al., 1991; Grange and Cole, 1997; Ogilvie et al., 2000; Riisgård et al., 2011; Trottet et al., 2008). In fact, up to 60 % of phytoplankton biomass can be removed from the water passing through a mussel farm (Gibbs et al., 1992; Waite, 1989). Qualitatively, mussel filtration is also reported to induce shifts in phytoplankton community composition from micro to picnanophytoplankton dominance. In facts, mussels efficiently retain (100%) particles larger than 7 µm although smaller particles (1-4 µm) can occasionally constitute a significant dietary component (Olsson et al., 1992; Prins et al., 1995; Strohmeier et al., 2012)

Given their possible noxious effects, dampening phytoplankton blooms would result in a subsequent improvement of fish condition and growth. This hypothesis was tested by using blue mussels as a screen filter of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) rearing seawater in a southern North Sea ashore fish farm during a 35-day mesocosm experiment. Mussel filtration activity was estimated, and water quality improvement



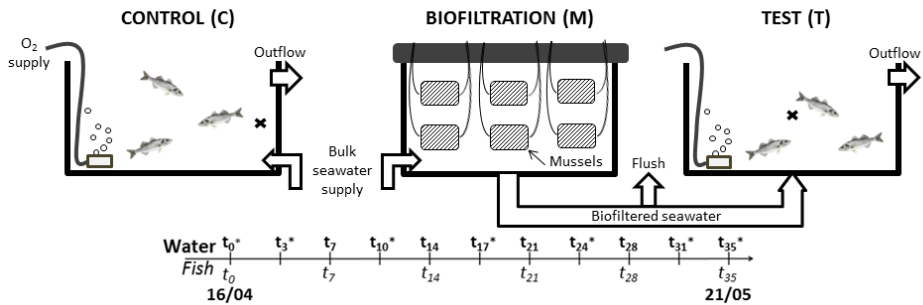
induced by this biological filtration was assessed by changes in hydrobiology, and phytoplankton components. Effects on reared juvenile sea bass physiological performances were determined, and results discussed with regard to bloom magnitude, existing mitigation tools and possible improvements of the developed experimental design.

### **IV.3. Materials and methods**

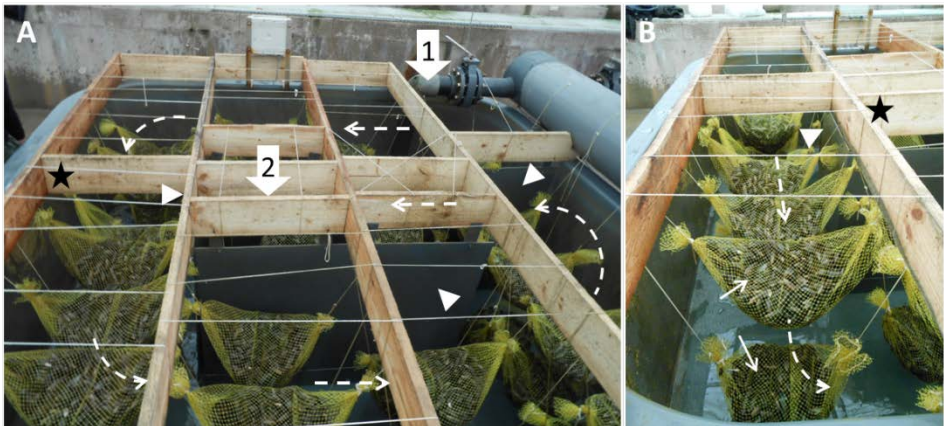
#### **IV.3.1. Experimental design**

In order to assess seawater quality improvement through mussel biofiltration, and its consequences on the growth, and the condition of juvenile sea bass, a 35-day mesocosm experiment was carried out during the 2013 phytoplankton spring bloom (April 16<sup>th</sup> – May 21<sup>st</sup>, Figure IV.1). The experimental setting consisted in three 5 m<sup>3</sup> mesocosms (95 cm height, 230 cm length, and width, Figure IV.1). The fish farm, and thus the experimental system, was supplied with bulk seawater, i.e. a mix between natural coastal North Sea water, and heated (+10 °C compared to *in situ* temperature) and chlorinated (1 %) seawater released from the Gravelines Power Plant cooling system (France). Bulk seawater therefore comprised both fresh and degraded natural plankton components. Bulk seawater was filtered by mussels in a biofiltration tank (M) before fuelling a test tank (T) containing juvenile sea bass. The third tank was used as a control (C), and contained juvenile sea bass reared in bulk seawater (i.e. not biofiltered). In all the tanks, the flow rate was set at 5 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> allowing for a total water renewal every hour, and photoperiod followed natural day: night cycle. Six weeks before the experiment, mussels were collected at the entrance of the fish farm, in the seawater fuelling system. Mussels were rinsed with bulk seawater, and acclimated in a seawater flow-through tank (5 m<sup>3</sup>; 10 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>) using plastic mesh (10 mm) bags (see supplementary materials). At  $t_0$  (beginning of the experiment), mussels were rinsed and living individuals were conditioned in 8 kg mesh bags so as to reach 300 kg mussels ( $n = \sim 31,496$ ; shell length:  $47.55 \pm 3.85$  mm, fresh weight:  $9.53 \pm 2.16$  g) in the biofiltration tank (M, 60 kg m<sup>-3</sup>), a density consistent with densities usually experimented during the depuration phase in mussel culture (Savary and

Blin, regional shellfish farming comity, North Sea – Normandie). In order to optimize water residence-time in the biofiltration tank and, and thus the mussel filtration efficiency, mesh bags were suspended one above the other and PVC walls inside the tank created a concentric water flow (Figure IV.2).



**Figure IV.1:** Experimental setting illustrating the three tanks considered in the test-case experiment: the control tank (C) containing sea bass, and filled with bulk seawater, the biofiltration tank (M) containing mussels, and the test tank (T) containing juvenile sea bass, and receiving bulk seawater previously filtered by mussels (M). Crosses stand for sampling points. Time scale represents sampling times for water (bold) and fish (italics) and stars stand for phytoplankton community analyses.



**Figure IV.2.** Pictures of the mussel tank (230 × 230 × 90 cm; 5 m<sup>3</sup>). **A.** general view, **B.** detailed view of the two layers of mussel mesh bags). Large white arrows: seawater entry (1) and output at the bottom of the tank toward the test tank (2), white arrowheads: PVC walls, dashed white arrow: seawater circulation, white arrows:

mussels in plastic mesh bags (8 kg in each), black stars: wood structure for mesh bags suspension.

Juvenile sea bass (13,000 individuals,  $4.98 \pm 0.76$  g, five month old) were supplied by the Gravelines Marine Hatchery (Eclouserie Marine de Gravelines, France). The experiment focused on the youngest stages reared at the fish farm i.e. the more sensitive stage with regard to biotic and abiotic stress (Albright et al., 1993; Rodger et al., 2011). Furthermore this stage was considered as it is the most impacted one during the wane of the phytoplankton spring bloom in the fish farm. Fish were randomly and equally distributed into C and T tanks, and acclimated for one week in bulk seawater. Fish density in C and T tanks was  $7.5 \text{ kg m}^{-3}$ , which is consistent with the density used in the fish farm at the beginning of the pre-growing stage.

Fish were hand-fed twice a day with commercial food (2-3% of fresh weight; Skretting, Mar-Perla-MP-L). At  $t_0$ , 60 fish from each tank were randomly sampled, anesthetized (clove oil,  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , Mylonas et al., 2005), measured (total length,  $\pm 0.1 \text{ mm}$ ), and weighted ( $\pm 0.01 \text{ g}$ ) to define initial fish condition.

Experimental tanks were flushed every day (10-20 % of total volume) to remove particles settled at the bottom (mostly mussels faeces/pseudo-faeces, and fish faeces). For biofiltration tanks, an additional complete flush was carried out once a week, and mussels mesh bags were thoroughly rinsed with bulk seawater before being resuspended. Each tank was aerated through the fish farm oxygen circuit in order to maintain oxygen concentration to  $8.92 \pm 4.47 \text{ mg L}^{-1}$  (~100 % saturation).

Given the logistic constraints, such as the number of available tanks, their respective volume ( $5 \text{ m}^3$ ) and consequently the large amount of organisms needed (mussels and fish), a single experiment was carried out. However, considering the innovative nature of the experimental protocol (i.e. mussels used upstream from the rearing fish tanks), and the larger number of parameters monitored (see next section) compared to

previous studies, this study should be considered as a test-case experiment for phytoplankton blooms noxious effects mitigation.

### **IV.3.2. Sampling strategy**

#### Hydrobiological parameters

Hydrobiological parameters were assessed twice a week. Sampling and measurements were always carried out before the first food supply. Hydrological parameters were measured with probes placed at the middle of the tank (50 cm depth – Figure IV.1): temperature (°C), and salinity were measured with an Aanderaa Instruments probe whereas pH, and dissolved oxygen ( $\text{mg L}^{-1}$ ) were obtained using a HANNA pH probe, and an oxymeter (Handy Polaris Oxyguard), respectively.

Seawater was sampled in C and T tanks for turbidity (EUTECH Instruments Waterproof), chlorophyll *a*, and pheopigments. Chlorophyll *a* and pheopigments were estimated by fluorimetry (Trilogy, Turner Designs) following Lorenzen (1966). Briefly, triplicate seawater samples (500 mL) collected in C and T tanks were immediately filtered on glass fiber filters (Whatman GF/F), and frozen (-20 °C) until analysis. In the laboratory, filters were extracted overnight in 90 % acetone, and fluorescence values converted to pigment concentrations (chlorophyll *a* and pheopigments,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) using a standard chlorophyll *a* solution (*Anacystis nidulans*, Sigma).

As the domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* genus has been previously observed in the study area (Antajan et al., 2013; Schapira et al., 2008), total domoic acid (i.e. dissolved and particulate) in seawater was quantified in both tanks using ASP ELISA kits (Biosense laboratories, Bergen, Norway).

#### Phytoplankton sampling and enumeration

Over the experiment, 250 mL seawater samples (50 cm depth) were collected from C and T tanks, preserved with lugol-glutaraldehyde fixative (2 % final concentration) for phytoplankton analysis, and stored in the dark in a cold room (4 °C; Figure IV.1). In the laboratory, 5 to 25 mL sub-samples were settled in Hydrobios counting chambers for 12 to

24 hours. Phytoplankton cells were identified, and enumerated using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-S, magnification  $\times 200$ ,  $\times 400$ ) under phase contrast illumination. On average  $861 \pm 426$  cells (min: 311 – max: 1896) were identified, and counted per sample. Phytoplankton taxa were pooled into five groups regarding their potential deleterious mechanical effect on fish: needle-shaped diatoms, sharp-chain-forming diatoms, chain-forming diatoms, *Phaeocystis globosa* (colonial non-motile cells and flagellated cells), and “others” i.e. diatoms with no recognized effect on fish (Table 1).

### Mussel filtration activity

At the beginning of the experiment ( $t_0$ ), 60 mussels were randomly sampled in the filtration tank. Shell length ( $L$ , mm) was measured and soft tissues dry weight ( $dW$ , g) was individually assessed after 48h drying at  $60^\circ\text{C}$ . Mussel condition index (CI,  $\text{mg cm}^{-3}$ ) was calculated following  $CI = dW/L^3$  (Riisgård et al., 2014).

Individual maximum clearance rate ( $WCR_i$ ,  $\text{L h}^{-1}$ ) was estimated by using the model developed by Riisgård et al. (2014):  $WCR_i = 6.773dW^{0.678}$ , and the population maximum clearance rate ( $WCR_{pop}$ ,  $\text{L h}^{-1}$ ) obtained from  $WCR_{pop} = WCR_i \times n$ , where  $n$  is the number of mussels in the biofiltration tank. Finally, effective clearance rate ( $ECR$ ,  $\text{L h}^{-1}$ ) was assessed following  $ECR = Fl \times (c_i - c_o)/c_i$ , where  $Fl$  is the flow rate in the mussel tank ( $5000 \text{ L h}^{-1}$ ),  $c_i$  and  $c_o$  are chlorophyll  $a$  concentration or phytoplankton abundance in the seawater inflow and outflow of the mussel tank, respectively (Cranford et al., 2011; Larsen and Riisgård, 2012).

### Fish sampling

Dead fish were counted, and removed every day before feeding, allowing daily mortality rate ( $\% \text{ d}^{-1}$ ) estimation. Once a week, before feeding, 60 juvenile sea bass from C and T tanks were randomly sampled, and anesthetized for individual measurements (total length, and weight). For gill examination, ten fish from each tank (C and T) were weekly dissected. Two gill arches per fish were prepared for *in vivo* microscopic

observation ( $\times 200$ ,  $\times 400$ ). The general state of the gills was first examined to estimate the presence of mucus, parasitism, necrosis, and embedded phytoplankton cells (presence/absence). When present, mucus overproduction was estimated by measuring mucus thickness from the external limit of the epithelium to the external extent of the mucous layer using a calibrated ocular micrometer (see Figure IV.1 for sampling times).

Specific growth rates in weight ( $GW$ , %  $d^{-1}$ ), and in length ( $GL$ , %  $d^{-1}$ ) were calculated following the equation:  $GX = 100 (\ln X_t - \ln X_0) / (t - t_0)$ , where  $X_0$  is the mean weight ( $W_0$ ) or the mean length ( $L_0$ ) at  $t_0$ , and  $X_t$  is individual fish weight ( $W_t$ ) or length ( $L_t$ ) at time  $t$ . The Fulton  $K$  index (Nash et al., 2006; Ricker, 1975) was calculated following  $K = 100 (W / L^3)$ , where  $W$  is the individual body weight (mg), and  $L$  is the total length (mm). It is an individual morphometric index considered as a general wellbeing indicator assuming that, for a given length the heavier a fish is, the better condition it has (Froese, 2006; Schreck and Moyle, 1990).

The RNA/DNA ratio is an indicator of fish nutritional status, and instantaneous growth (Buckley, 1984; Humphrey et al., 2007; Schreck and Moyle, 1990). For its estimation, ten fish from each tank (C and T) were sacrificed, and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  at the end of the experiment ( $t_{35}$ ). The RNA, and DNA analyses were based on Caldarone et al. (2001). Nucleic acid concentrations were estimated in a dorsal muscle fragment (25 mg). Samples were extracted on ice in 1 % N-laurylsarcosine Tris-EDTA buffer for 1 hour to dissociate nucleoproteins, and centrifuged (15 min,  $14000 \times g$ ). Samples were mixed with Ethidium Bromide ( $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in a dark 96-well plate for five minutes. Total fluorescence ( $F_{tot}$ ) was measured using a microplate spectrofluorometer (TECAN Infinite M200 Pro). Commercial RNase (bovine pancreas, Sigma Aldrich,  $20\text{ U mL}^{-1}$ ) was then added for 25 min to each well, and a second fluorescence measurement allowed DNA fluorescence ( $F_{DNA}$ ) estimation. RNA fluorescence ( $F_{RNA}$ ) values were then determined from  $F_{RNA} = F_{tot} - F_{DNA}$ . DNA, and RNA concentrations were derived from fluorescence values

using RNA (16S- and 23S-ribosomal from *E. coli* MRE 600, Roche), and DNA (Calf Thymus, Sigma Aldrich) standard calibration curves.

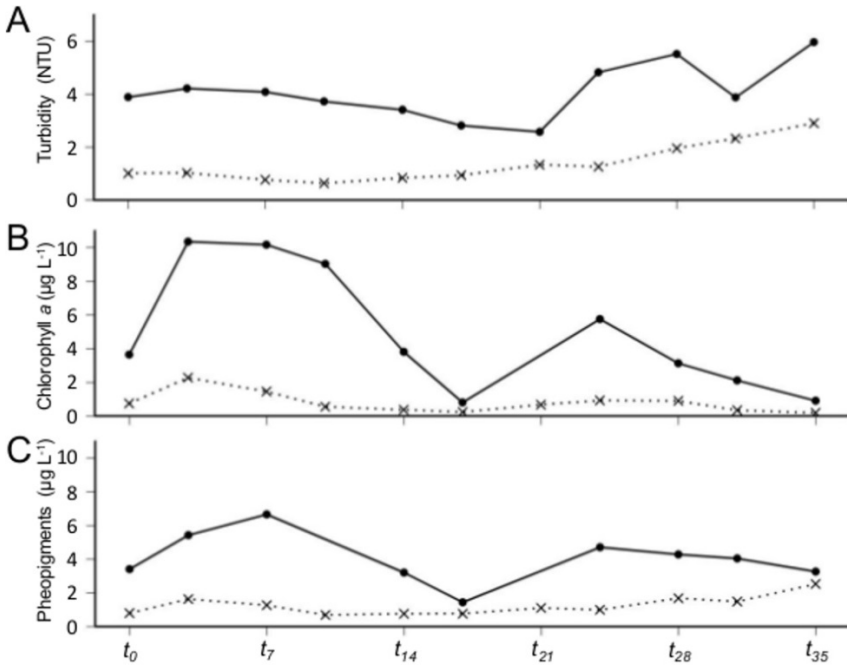
### **IV.3.3. Data analyses**

Both hydrological, and biological data did not match the parametric assumption of normality (Shapiro–Wilk test,  $p > 0.05$ ), and homoscedasticity (Levene's  $F$ -test,  $p > 0.05$ ), the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) test was thus used to compare C, and T tanks for hydrobiological, and fish parameters. Statistics were performed using R software packages (R Core Team, 2012).

## **IV.4. Results**

### **IV.4.1. Hydrobiological context**

With the exception of turbidity, hydrological parameters did not significantly differ between the control (C) and the test (T) tanks over the 35-day experiment (WMW,  $p > 0.05$ ). Water temperature increased from  $18.37 \pm 0.08$  °C at  $t_0$  to  $22.30 \pm 1.98$  °C at the end of the experiment ( $t_{35}$ ), whereas salinity ( $33.72 \pm 0.43$ ) and pH ( $7.53 \pm 0.30$ ) remained stable. Turbidity was always significantly higher in the C tank (i.e. bulk seawater) compared to the T tank (WMW,  $p < 0.001$ ). Values followed approximately the same trend as chlorophyll *a* concentration with a higher variability in the tank C at the end of the experiment (Figure IV.3A).



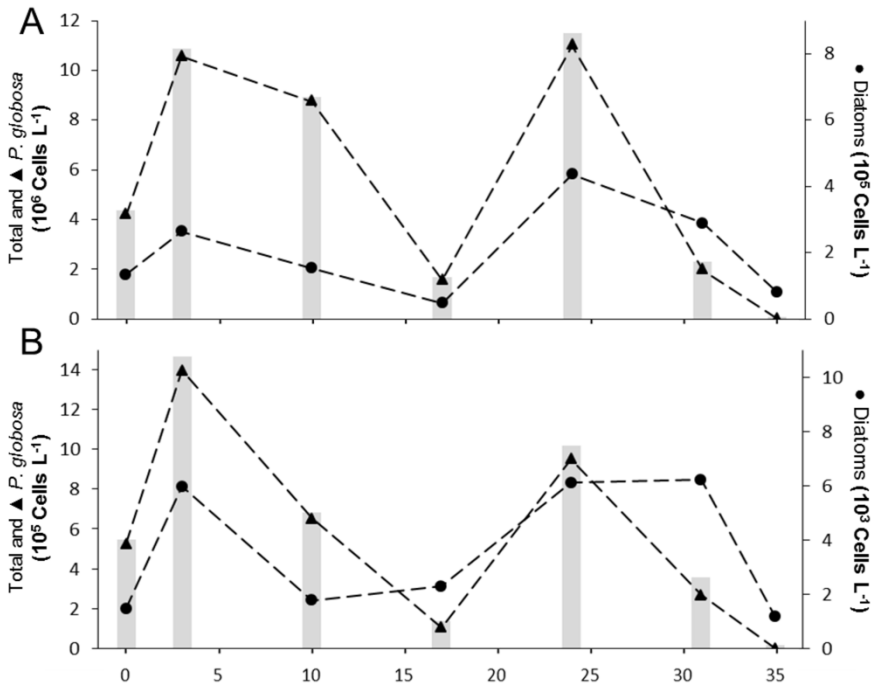
**Figure IV.3.** Time series evolution of turbidity (NTU – A), chlorophyll *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$  – B) and pheopigments ( $\mu\text{g L}^{-1}$  – C) concentrations in Control (—●—) and Test (---×---) tanks during the experiment (from  $t_0$  to  $t_{35}$ ).

During the experiment, chlorophyll *a* and pheopigments remained significantly lower in the test compared to the control (WMW,  $p < 0.001$ ) by a factor varying from 3.3 to 10.3, and from 1.3 to 5.2, respectively (Figure IV.3B, IV.3C). Thereafter, chlorophyll *a* and pheopigment concentrations followed the same trend. Hence, a first peak was observed at the beginning of the experiment ( $t_3$ ) reaching  $10.35 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$  in the tank C, and  $4.25 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$  in the tank T. A secondary peak at  $t_{24}$  with lower chlorophyll *a* concentrations reached  $5.76 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$ , and  $0.92 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$  in C, and T tanks, respectively. The contribution of pheopigments to total pigment composition markedly increased over the course of the experiment reaching 78.1 % in the control, and 93.0 % in the test at  $t_{35}$ . Overall, time-series evolution of hydrobiological parameters in the tank T was particularly stable when compared to the tank C.



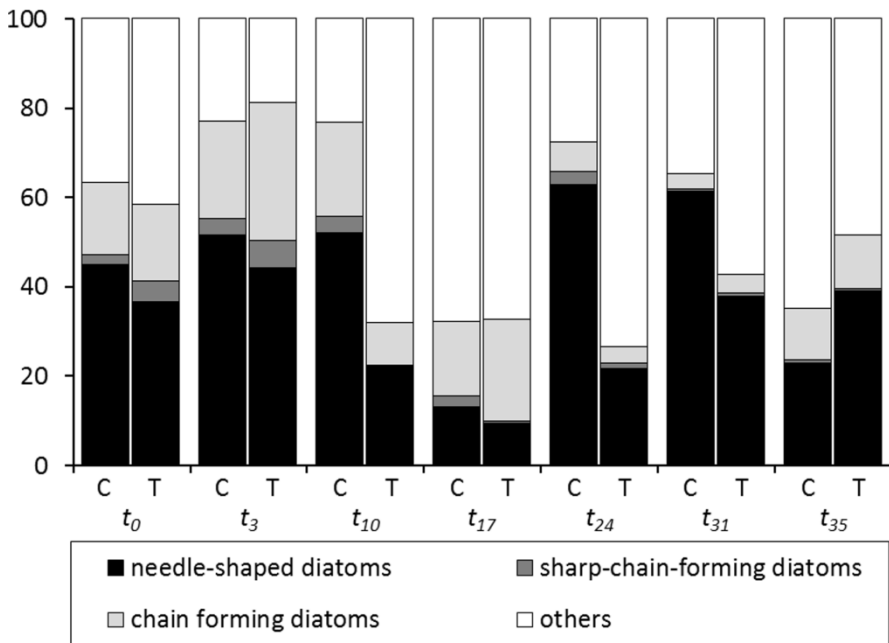
The total phytoplankton abundance was 6.3 to 13.1 times lower in the test tank compared to the control (WMW,  $p < 0.02$ ; Figure IV.4A and IV.4B).

The temporal dynamics of phytoplankton abundance matched chlorophyll *a* concentrations pattern. The first abundance peak ( $t_3$ ) coincided with the maximum chlorophyll *a*, and reached  $10.90 \times 10^6$  cells  $L^{-1}$ , and  $1.47 \times 10^6$  cells  $L^{-1}$  in C and T tanks, respectively. The second peak occurred at  $t_{24}$ , and reached  $11.50 \times 10^6$  cells  $L^{-1}$  in the tank C, and  $1.02 \times 10^6$  cells  $L^{-1}$  in the tank T. The phytoplankton community was first dominated by *Phaeocystis globosa* (prymnesiophyte) single colonial, and flagellated cells (no colonies were observed) reaching 75 to 98 % of the total phytoplankton abundance from  $t_0$  to  $t_{31}$ , whereas diatoms only represented 2 to 18 %. However, over the course of the experiment, the contribution of diatoms to total phytoplankton abundance increased up to 87% ( $t_{35}$ ) which coincided with the end of the *P. globosa* bloom.



**Figure IV.4. Phytoplankton abundance evolution in control (A) and experimental (B) tanks.** Grey bars stand for total phytoplankton abundance, ▲ for *Phaeocystis globosa* and ● for diatoms abundance. Please notice the distinct scale for phytoplankton abundances.

Phytoplankton species associated to the *P. globosa* bloom comprised needle-shaped diatoms among which *Rhizosolenia* sp., *Lennoxia flaveolata*, and congeneric species of the HAB genus *Pseudo-nitzschia* (*delicatissima* and *pungens*; Table 1 – Figure IV.5). Needle-shaped diatoms were dominant over the experiment (from 44.63 to 61.08 %) with the exception of  $t_{17}$ , and  $t_{35}$  when “Others” (mainly Cryptophytes and *Navicula* sp.) dominated. Chain-forming diatoms (*Guinardia* sp. and *Thalassionema nitzschoides*) were also present but never exceeded 22 %. Sharp-chain-forming diatoms (e.g. *Asterionellopsis glacialis*, *Thalassiosira* sp.) were the least represented group with 0.5 to 3.6 % relative abundance. Domoic acid was detected in both experimental tanks ( $51.7 \pm 6.9$  pg mL<sup>-1</sup>) but concentrations were not significantly different between C and T tanks (WMW,  $p > 0.05$ ).



**Figure IV.5.** Phytoplankton groups (excepted *P. globosa*) relative abundances (%) evolution in the tank C and the tank T.

**Table IV.1. Abundance ranges (min-max) and means [standard deviation; sd] for phytoplankton taxa identified during the mesocosm experiment**

Taxa	Control Tank (C)				Test tank (T)			
	min	max	mean	[sd]	min	max	mean	[sd]
<b>Needle-shaped diatoms</b> (10 <sup>3</sup> cells L <sup>-1</sup> )	15.6	- 298.8	125.8	[103.1]	3.2	- 32.4	14.3	[12.1]
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0	- 17.2	4.4	[5.9]	0	- 1.6	0.5	[0.5]
<i>Ditylum brightwellii</i>	0	- 1.6	0.7	[0.6]	0	- 0.2	0.03	[0.08]
<i>Lennoxia flaveolata</i>	0.6	- 44.4	14.1	[15.8]	0	- 3.2	1.2	[1.3]
<i>Nitzschia longissima</i>	0	- 18	2.6	[6.8]	0	- 2.0	0.3	[0.7]
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	9.4	- 267.6	82.3	[106.6]	0.2	- 32.2	9.0	[11.4]
<i>Rhizosolenia</i> sp.	0	- 70.4	21.8	[29.6]	0	- 13.4	3.3	[5.0]

**Sharp-chain-forming diatoms**

(10 <sup>3</sup> cells L <sup>-1</sup> )	4.0	- 24.4	9.6	[7.8]	0.6	- 6.4	2.1	[2.1]
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	0.6	- 11.2	4.5	[3.7]	0	- 3.2	0.8	[1.1]
<i>Bacteriastrum</i> sp.	0	- 0	0	[0]	0	- 0.08	0.01	[0.030]
<i>Chaetoceros</i> sp.	0	- 5.2	1.4	[2.1]	0	- 1.0	0.2	[0.4]
<i>Odontella aurita</i>	0	- 0.8	0.1	[0.3]	0	- 0	0	[0]
<i>Thalassiosira</i> sp.	0.4	- 10.0	3.6	[3.3]	0	- 2.8	1.1	[1.0]

**Table IV.1. Continued.**

Taxa	Control Tank (C)				Test tank (T)			
	min	max	mean	[sd]	min	max	mean	[sd]
<b>Chain-forming diatoms</b> (10 <sup>3</sup> cells L <sup>-1</sup> )	6.2	- 63.2	26.4	[19.3]	0.9	- 19.0	5.1	[6.3]
<i>Asterionellopsis kariana</i>	0	- 3.2	0.6	[1.2]	0	- 0.2	0.06	[0.1]
<i>Bellerochea maleus</i>	0	- 0	0	[0]	0	- 0.7	0.1	[0.3]
<i>Brockmaniella brockmanii</i>	0	- 6.4	2.4	[2.8]	0	- 0.8	0.3	[0.3]
<i>Chaetoceros tortissimus</i>	0	- 6.0	0.9	[2.3]	0	- 1.6	0.2	[0.6]
<i>Dactyosolen fragillissimus</i>	0	- 0	0	[0]	0	- 0.3	0.04	[0.1]
<i>Guinardia</i> sp.	0	- 37.2	11.1	[15.0]	0	- 8.2	1.7	[3.0]
<i>Leptocylindrus</i> sp.	0	- 15.6	4.6	[6.3]	0	- 2.4	0.6	[1.0]
<i>Paralia sulcata</i>	0	- 4.4	1.5	[1.8]	0	- 5.6	1.1	[2.1]
<i>Skeletonema marinoi</i>	0	- 6.4	1.6	[2.6]	0	- 1.2	0.2	[0.5]
<i>Thalassionema nitzschoides</i>	0.8	- 8.4	3.7	[3.0]	0	- 1.6	0.8	[0.6]
<b><i>Phaeocystis globosa</i></b> (10 <sup>6</sup> cells L <sup>-1</sup> )	0	- 11	5.4	[4.6]	0	- 1.4	0.6	[0.5]
Flagellated cells	0	- 2.7	1.3	[0.9]	0	- 0.2	0.1	[0.06]
non-motile cells	0	- 9.7	5.1	[3.8]	0	- 1.3	0.5	[0.5]

**Table IV.1. Continued**

Taxa	Control Tank (C)				Test tank (T)			
	min	-	max	mean [sd]	min	-	max	mean [sd]
<b>Others</b> ( $10^3$ cells L <sup>-1</sup> )	41.6	-	133.2	82.4 [32.6]	6.8	-	50.0	24.6 [18.2]
<i>Chlorophyceae</i>	0	-	0.2	0.03 [0.08]	0	-	0 - 0	0 [0]
<i>Cryptophyceae</i>	7.8	-	72.2	44.0 [22.0]	2.3	-	24.0	10.5 [6.8]
<i>Euglenophyceae</i>	0	-	0.8	0.1 [0.3]	0	-	0.08	0.01 [0.03]
<i>Actinoptychus</i> sp.	0	-	0.4	0.09 [0.2]	0	-	0.08	0.01 [0.03]
<i>Coscinodiscus</i> sp.	0	-	1.2	0.2 [0.4]	0	-	0.3	0.09 [0.1]
<i>Delphineis surrirella</i>	0	-	2.6	0.5 [1.0]	0	-	0	0 [0]
<i>Licmophora</i> sp.	0	-	0.4	0.09 [0.2]	0	-	0	0 [0]
<i>Navicula</i> sp.	3.4	-	63.6	27.7 [27.4]	1.2	-	40.0	12.4 [14.5]
<i>Nitzschia</i> sp.	0.4	-	22.4	4.6 [7.9]	0	-	2.4	0.9 [0.9]
<i>Pleurosigmasp</i>	0	-	9.6	4.9 [3.4]	0.1	-	2.4	0.8 [0.8]
<i>Raphoneis amphicerus</i>	0	-	0.4	0.2 [0.2]	0	-	0.08	0.01 [0.03]

#### IV.4.2. Mussel clearance rate and impact on phytoplankton

Mussel condition index ranged between 2.5 and 4.6 mg cm<sup>-1</sup>. Individual maximum clearance rate ( $WCR_i$ ) averaged  $3.44 \pm 0.50$  L h<sup>-1</sup> (min-max: 2.25-4.64) leading to a population maximum clearance rate of about  $108.26 \times 10^3$  L h<sup>-1</sup>. Effective clearance rates averaged  $41.15 \pm 14.19 \times 10^3$  L h<sup>-1</sup> and  $28.46 \pm 19.61 \times 10^3$  L h<sup>-1</sup> for total phytoplankton and chlorophyll *a*, respectively (Table 2). Mussel filtration activity induced average decreases of  $67 \pm 14\%$ ,  $88 \pm 3 \%$  and  $81 \pm 8 \%$  in turbidity, phytoplankton abundance and chlorophyll *a* concentrations, respectively. Impact on phytoplankton community composition is highlighted in figure 4. Mussel filtration induced a 3 to 4 times decrease in phytoplankton noxious species relative abundance particularly regarding needle shaped and sharp-chain-forming diatoms. This selective mussel feeding also led to an increase in the relative abundance of chain-forming diatoms and “others”.

#### IV.4.3. Fish physiological performances

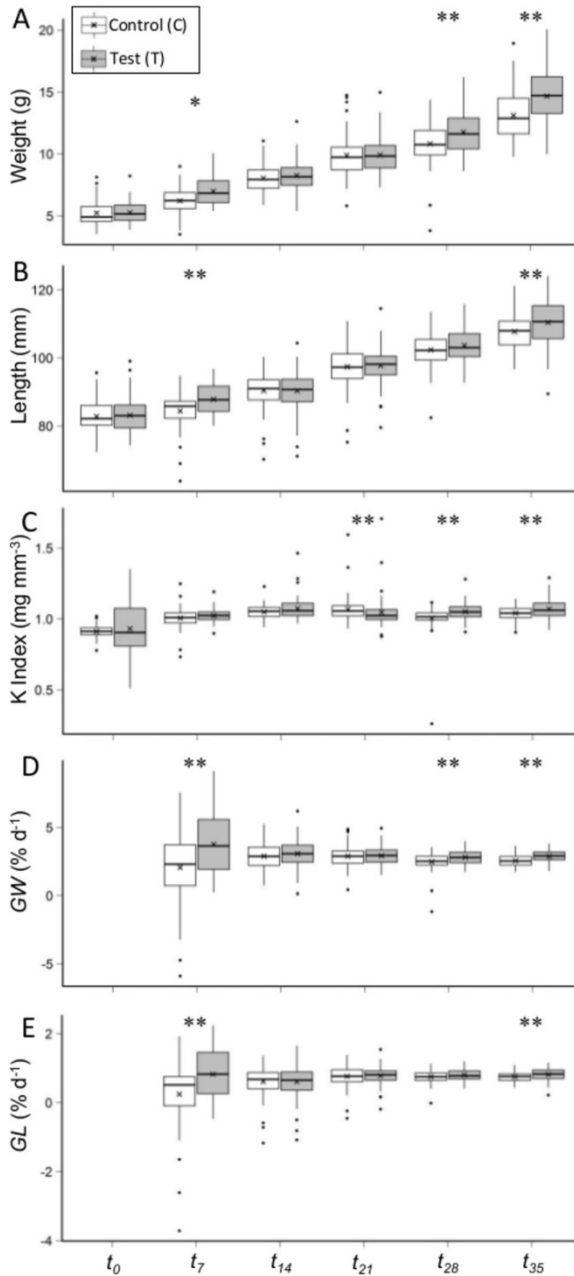
Fish mortality was low during the whole experiment (0.1 % d<sup>-1</sup>) and the mortality rate over the experiment reached 2.6 % without any difference

between the control and the test. Fish weight and length increased continuously in both tanks (C and T – Figure IV.6A, IV.6B) from  $t_0$  to  $t_{35}$ . Weight gain over the experiment was 8.0 g and 6.5 g whereas length gain reached 27.4, and 24.7 mm in T, and C tank, respectively. There was no significant difference in weight between control, and test at  $t_0$ ,  $t_{14}$ , and  $t_{21}$ , whereas at  $t_7$ ,  $t_{28}$ , and  $t_{35}$ , fish weight was significantly higher in the test than in the control, e.g.  $14.7 \pm 2.2$  g against  $13.1 \pm 2.1$  g at  $t_{35}$  (WMW,  $p < 0.01$ ). Fish total length ( $L$ ) was significantly higher in the test tank compared to the control at  $t_7$  and  $t_{35}$  (WMW,  $p < 0.01$ ) when it reached  $107.7 \pm 5.3$  mm, and  $110.4 \pm 6.6$  mm in C and T tanks, respectively (Figure IV.6B). Fish reared in the test tank i.e. receiving biofiltered seawater (mean Fulton Index  $K = 1.07 \pm 0.07$  mg mm<sup>-3</sup>) had a significantly better condition than in the control ( $1.05 \pm 0.05$  mg mm<sup>-3</sup>) at  $t_{35}$  (WMW,  $p < 0.01$ , Figure IV.6C) yet, differences were small. Specific growth rates in weight ( $GW$ ) and in length ( $GL$ ) were stable throughout the experiment (Figure IV.6D, IV.6E). Slightly higher  $GW$  values were observed in the test compared to the control at  $t_7$ ,  $t_{28}$ , and  $t_{35}$  (WMW,  $p < 0.008$ ). For instance,  $GW$  reached  $2.87 \pm 0.43$  % d<sup>-1</sup> at  $t_{35}$  in the T tank whereas it only reached  $2.55 \pm 0.44$  % d<sup>-1</sup> in the C tank (Figure IV.5D). At  $t_7$  and  $t_{35}$ , growth rate in length was significantly higher in T tank ( $t_7$ :  $0.82 \pm 0.72$  % d<sup>-1</sup>,  $t_{35}$ :  $0.81 \pm 0.17$  % d<sup>-1</sup>) compared to C tank ( $t_7$ :  $0.25 \pm 0.96$ ,  $t_{35}$ :  $0.75 \pm 0.14$  % d<sup>-1</sup>, WMW,  $p < 0.01$ , Figure IV.5E). At the end of the experiment, the mean RNA:DNA ratio was significantly higher (WMW,  $p < 0.01$ ) in the test ( $3.8 \pm 0.6$ ) compared to the control ( $3.0 \pm 0.5$ ).

#### IV.4.4. Gills observation

No morphological lesion, fish malformation, or gill necrosis were observed during the experiment. Gills microscopic observation recurrently revealed mucus overproduction for fish in both C and T tanks at the beginning of the experiment ( $t_7$ ). After 21 days of exposure to plankton components in bulk seawater, fish from the tank C showed a 2 fold increase in gills mucus thickness. The specific examination of gill

filaments smears revealed presence of diatoms : chain-forming *Paralia sulcata*, needle-shaped *Rhizosolenia imbricata* and sharp-chain-forming *Thalassiosira rotula* were observed in both C and T tanks until  $t_{14}$ . Thereafter, they were only detected in fish gills from Tank C. The very sporadic presence of trematode parasites (Gyrodactylidae) did not allow the identification of any significant pattern of infestation between C, and T tanks.



**Figure IV.6.** Time series evolution of fish weight (W, g – A), length (L, mm – B), condition (K, mg mm<sup>-3</sup> – C), specific growth rate in weight (GW, % d<sup>-1</sup> – D) and in length (GL, % d<sup>-1</sup> – E) during the 35-day experiment in the control (white box; Tank C) and in the test (grey box; Tank T) tanks. Crosses stand for means and stars for significant differences between C and T tanks (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01).

## IV.5. Discussion

### IV.5.1. 4.1 Environmental context

In order to match realistic fish rearing conditions, experimental set up in the fish farm had to compose with large volume tanks ( $5 \text{ m}^3$ ), high fish density ( $7.5 \text{ kg m}^{-3}$ ), and seawater properties (hydrology), and supply. This experiment aimed to test the use of mussels as a mitigation tool to dampen the natural phytoplankton bloom in an ashore marine fish farm. Firstly, it permitted a detailed study of phytoplankton communities succession from the maximum bloom magnitude to its senescence. Special emphasis was given to phytoplankton species which are supposedly deleterious to fish by defining a classification in distinct harmful categories (Table 1). Secondly, the goal of this test-case experiment was to estimate mussel filtration activity, its impact on seawater quality, and in turn, on fish condition and physiological performances. To our knowledge, no study has so far considered using mussels upstream from the seawater fuelling system of an ashore marine fish farm. Regarding hydrological parameters, salinity and pH values were within the range of published values in the southern North Sea coastal waters (Antajan et al., 2013; Blackford and Gilbert, 2007; Otto et al., 1990), and matched optimal ranges for sea bass (Blancheton, 2000; Papoutsoglou et al., 1998). By using power plant channeled seawater, and *in situ* (i.e. coastal North Sea) channeled seawater, temperature value in the tanks (18.2 to 22.9 °C) was always set higher to *in situ*, and thus, fitted optimal growth temperatures for juvenile sea bass (Blancheton, 2000; Person-Le Ruyet et al., 2004). Since hydrological parameters (temperature, salinity, pH, and dissolved oxygen), and feeding rates were not significantly different between control (C), and test (T) tanks, noticeable changes in fish condition or growth resulted from seawater quality changes induced by mussel filtration.

Phytoplankton spring bloom magnitude appeared to be low in 2013 ( $\leq 10 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$ ; Breton et al., 2000; Kesaulya et al., 2008; Seuront et al., 2006). However, it remains within the range of values observed at the interannual scale in the southern North Sea and confirm the existence of



“low phytoplankton year”. The observed temporal dynamics of chlorophyll *a* concentrations (two successive peaks) can be explained by the phytoplankton community composition. During this experiment, *Phaeocystis globosa* constituted the bulk of the phytoplankton community, and exhibited high temporal variability of abundance as it is often the case in spring in the area (Grattepanche et al., 2011; Rousseau et al., 2002; Seuront et al., 2006). Associated species shifted from a spring assemblage ( $t_0$  to  $t_{17}$ ) containing both chain-forming (*Guinardia* sp.), and needle-shaped diatoms (*Pseudo-nitzschia* sp., *Rhizosolenia* sp.) towards the dominance of smaller diatoms (*Navicula* sp.,  $< 10 \mu\text{m}$ ), and Cryptophytes ( $< 5 \mu\text{m}$ ; among "Others" in Figure IV.5) in May ( $t_{17}$ ). The wane of the phytoplankton bloom was illustrated by sharp decreases in both chlorophyll *a* concentration, and phytoplankton abundance from  $t_{24}$  to  $t_{35}$ . *P. globosa* degradation in favor of spring to summer diatom assemblages (*Pseudo-nitzschia* sp., *Guinardia* sp.; Rousseau et al., 2002; Schapira et al., 2008; Seuront et al., 2006) is highlighted by high pheopigment contribution to total pigments (i.e. 78 to 93 % of chlorophyll *a* + pheopigments). This 35-day mesocosm experiment therefore markedly matched *in situ* conditions integrating the typical spring to summer phytoplankton succession.

### IV.5.2. Mussel filtration activity

Mussel condition index is known to depend on their life cycle, being higher at the end of summer and in winter and lower after spring spawning (Riisgård, 2001). The relatively low condition index ( $3.43 \pm 0.45 \text{ mg cm}^{-3}$ ) of mussels in the biofiltration tank is consistent with April-May reproductive period in the southern North Sea, and remains highly comparable to low values reported in the literature (from 2.21 to 10.1  $\text{mg cm}^{-3}$ ; Petersen et al., 2004; Riisgård et al., 2014).

Effective clearance rates ( $28.46$  to  $41.14 \times 10^3 \text{ L h}^{-1}$  corresponding to  $1.00$  to  $6.55 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) were consistent with values reported on blue mussels (see review by Cranford et al., 2011; Petersen et al., 2004; Riisgård et al., 2014). They were also within the range of the theoretical values for maximum weight based clearance rates ( $WCR_{pop}$ ; Riisgård et

al. (2014). Mussel filtration activity resulted in a drastic reduction (> 80 %) of both chlorophyll *a* and phytoplankton abundance. With regard to the primary goal of the experiment, phytoplankton spring bloom was efficiently dampened. Nevertheless, mussels may have suffered food shortage during the experiment, particularly those located near the seawater outflow. Therefore, if this test case experiment provides new insights into mitigation tools for phytoplankton blooms, valorizing mussel cultures needs to go through improvements of mussel rearing conditions focusing on mussel density, amount of seston provided by the inflow, and rearing facilities (e.g. lines, mesh bags).

### **IV.5.3. Water quality improvement due to mussel biofiltration**

In this test-case experiment, mussel biofiltration was enhanced on purpose by setting up in the tank M flow channeling baffles (i.e. PVC walls) which, in turn, optimized seawater residence time. Due to this artificial device, seawater filtration was more efficient when compared to mussel farms in the field. This was visible by a decrease in chlorophyll *a* concentration by 3.3 to 10.3 which was far higher than the effects of mussel farms (factor 2 to 3) on natural phytoplankton stock in a temperate bay (Ogilvie et al., 2000). Mussel biofiltration also induced a decrease of the phytoplankton abundance by a factor 6.3 to 13.1 and an apparent change in community composition. In fact, mussel seemed to preferentially feed on large (> 30  $\mu\text{m}$  in length) species particularly needle-shaped and sharp-chain-forming diatoms. This is consistent with preferential mussel feeding on large (> 20  $\mu\text{m}$ ) particles as reported by Strohmeier et al. (2012) and Noren et al. (1999). Consequently, after suspension feeding activity, a qualitative shift of phytoplankton communities toward nano-picophytoplankton dominance is generally observed (Olsson et al., 1992; Prins et al., 1995). Although, this pattern could not be inferred from optic microscopy (cell size detection >10  $\mu\text{m}$ ). These first results clearly reveal the advantageous impact of mussel filtration significantly reducing noxious species abundances (needle-shaped and sharp-chain-forming diatoms).

#### IV.5.4. Seawater quality and its effects on juvenile sea bass growth and condition

In both tanks (C and T) fish weight gain and specific growth rates in both weight (2.59 to 2.88 % d<sup>-1</sup>), and length (0.75 to 0.81 % d<sup>-1</sup>) were highly comparable to published studies (Table 3). This confirms that experimental conditions (i.e. fish density, tanks volume, feeding rate) were optimal for juvenile sea bass in pre-growing phase during the 35-day experiment. The same observation holds for the Fulton *K* index (1.03 to 1.08 mg mm<sup>-3</sup>; Table 3) indicating a good fish condition (Froese, 2006; Nash et al., 2006).

**Table IV.2. Literature comparisons of juvenile sea bass physiological characteristics: weight (*W*, g), length (*L*, mm) growth rate in weight and length (*GW*, *GL*, % d<sup>-1</sup>), Fulton Index (*K*, mg mm<sup>-3</sup>) and RNA:DNA ratio with regard to feeding rate (FR, % biomass d<sup>-1</sup>) and rearing temperature (*T*, °C).**

<i>W</i> (g)	<i>L</i> (mm)	<i>GW</i> (% d <sup>-1</sup> )	<i>GL</i> (% d <sup>-1</sup> )	<i>K</i> (mg mm <sup>-3</sup> )	RNA:DNA	FR	<i>T</i> (°C)	Reference
5.2±1.0	79±0.5	0.7-0.8	0.22-0.26	1.14-1.14	-	ad lib.	20	Mourente and Bell, 2006
3.5	-	1.69-2.04	-	-	-	-	23.5±0.8	Paspatis et al., 2000
6.6±1.1	85.6±5.2	0.72-0.79	0.27-0.28	-	-	3%	18.9±0.22	Papoutsoglou et al., 1998
4.87±0.83	-	0.5-0.6	0.33±0.02	1.06-1.17	3.0-4.1	2%	13±0.5	Kerambrun et al., 2012
2.84±0.79	-	1.5±0.3	0.46±0.13	1.02-1.03	2.7-3.3	-	14.6-14.9	Kerambrun et al., 2012
7.02-7.98	84-88	5.19-7.5	-	-	4.34-4.95	ad lib.	15.9-25.8	Alami-Durante et al., 2007
4.76-5.23	-	1.20-2.48	-	-	-	ad lib.	20±1.4	Conides and Glamuzina, 2006
-	-	-	-	0.88±0.12	5.11±0.95	-	≈25	Vasconcelos et al., 2009
<b>4.98±0.76</b>	<b>83.0±4.9</b>	<b>2.59-2.88</b>	<b>0.75-0.81</b>	<b>1.03-1.08</b>	<b>3.0-3.8</b>	<b>2-3%</b>	<b>18.2-22.9</b>	<b>This study</b>

(ad lib. : ad libitum, - : no data, min-max, mean±standard deviation)

Interestingly juvenile sea bass reared in the tank fuelled with biofiltered seawater (i.e. tank T) had higher growth rates, and better *K* indices than those exposed to bulk seawater (Figure IV.5C-E). Although relatively low, these significant discrepancies in fish physiological performances seem to be linked to fish exposure to natural plankton components, particularly to potentially noxious phytoplankton species. Adverse effects

of phytoplankton blooms on fish farms have indeed been reported a number of time (Bruno et al., 1989; Kent et al., 1995; Rodger et al., 2011; Treasurer et al., 2003 and references therein). Among the four deleterious mechanisms suspected to be caused by HAB (Black et al., 1991), physical damages and ichthyotoxicity were likely involved in differences observed between C and T tanks, although deleterious impacts linked to oxygen could not be inferred from our study.

Domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* (i.e. *P. pungens*, Lelong et al., 2012) were observed during the experiment but their abundances remained low (Table 1). Domoic acid (DA) concentrations measured in the present experiment were higher than reported values from the Eastern English Channel (Bay of Veys, 7.1 pg mL<sup>-1</sup>; Klein et al., 2010). However they remained lower than in other natural ecosystems where they appeared to be harmful (e.g. 1401 pg DA mL<sup>-1</sup> in Angola; Blanco et al., 2010), 8000 pg DA mL<sup>-1</sup> in the Gulf of Mexico; (Macintyre et al., 2011). Since adverse effect of domoic acid oral exposure on sea bass has never been reported in the literature (Lefebvre et al., 2012), and mussel biofiltration did not affect domoic acid concentrations, it is likely that ichthyotoxic effect in our experiment was negligible.

Several marine diatoms such as those observed during this experiment (needle-shaped, sharp-chain-forming and chain-forming; Table 1) have been implied in mass mortalities in salmon fish farms worldwide (Albright et al., 1993; Corrales and Maclean, 1995; Yang and Albright, 1992) as well as during dedicated exposure experiments (Bell, 1961; Burridge et al., 2010; Forbes, 1991). For instance sharp and needle-shaped diatoms such as *Chaetoceros* sp., *Pseudo-nitzschia* sp., *Rhizosolenia imbricata*, *Nitzschia longissima*, *Cylindrotheca closterium*, *Guinardia* sp., *Pleurosigma* sp. (Bruno et al., 1989; Farrington, 1988; Rodger et al., 2011; Treasurer et al., 2003) and *Thalassionema* (Kent et al., 1995) can cause physical damages to fish gills and digestive tract, and therefore predispose fish to secondary infections with lethal pathogens (Albright et al., 1993; Brusle, 1996; Rodger et al., 2011). Excessive mucus production, as observed for the fish exposed to bulk seawater (Tank C), indicated a fish gills defense against external attacks

(mechanical or toxic damages - Shen et al., 2011). In addition, diatoms frustules were seen to be embedded in gill mucus and could therefore have clogged the gills. This can lead to a reduction of oxygen blood saturation and asphyxiation (Forbes, 1991; Rodger et al., 2011). *P. globosa* is another potentially deleterious HAB species dominating during this experiment. *P. globosa* blooms have been reported to affect benthic communities (Desroy and Denis, 2004; Rogers and Lockwood, 1990; Spilmont et al., 2009) as well as wild fauna including fish (Nguyen et al., 2012; Zingone and Enevoldsen, 2000). *P. globosa* blooms are in fact associated to the increase of seawater viscosity (Seuront et al., 2006; Seuront and Vincent, 2008), which, in turn, can affect micro-scale processes such as respiratory and excretion through the gill epithelium (Couturier et al., 2007; Jenkinson, 1989; Jenkinson et al., 2007). Regarding the high abundance of *P. globosa* colonial cells, increase in viscosity could have occurred in our control tank leading to fish welfare, and physiological performances reduction.

Energy allocation depends on fish physiological status, and environmental stress (McNamara and Buchanan, 2005), and could have been unbalanced during the present experiment. The higher RNA:DNA ratio measured in the test tank suggests a higher metabolic activity in favor of growth (Buckley, 1984; Humphrey et al., 2007). By contrast, fish exposure to bulk seawater and its associated plankton components seemed to induce defense mechanisms, and subsequent energy costs which were detrimental to somatic growth. In any case, and also we willingly acknowledge the limit of this single test-case experiment, seawater quality improvement due to mussel biofiltration permitted to enhance juvenile sea bass growth and condition in comparison to the fish reared in the tank fuelled with bulk seawater. This was attested by several measurements on replicated fish samples over the time-series experiment but also, the same tendency exhibited by several indices (i.e. condition index ( $K$ ), growth in weight, and length ( $GW$ ,  $GL$ ), and metabolic activity (RNA:DNA ratio). Further experiments are needed to confirm the observed results, particularly during higher phytoplankton blooming conditions, considering for instance higher *P. globosa* bloom and its

impact on mussel filtration efficiency. This type of innovative experimental device using mussels upstream from fish rearing tanks needs improvements concerning mussel culture valorization but remains a promising mitigation tool in ashore fish farming.

**Acknowledgements:** We acknowledge Aquanord S.A. and Ecloserie Marine de Gravelines staff for their technical support during the experiment. V. Cornille, M. Laréal and T. Raud are gratefully acknowledged for their essential help during the setting up of the experiment. We also thank C. Ringot and J. Mestre for technical support in the field and at laboratory. Pr. U. Christaki, and Dr. T. Bastian are thanked for their comments and suggestions. We gratefully acknowledge two anonymous reviewers for their relevant suggestions and comments improving the manuscript. A PhD grant from the region Nord Pas-de-Calais and the Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) attributed to A. Delegrange supported this work. This work was also funded by a collaborative convention between Aquanord S.A. and ULCO/LOG.

## IV.1. Conclusion

L'efflorescence phytoplanctonique printanière de 2013 a eu un effet délétère sur les poissons. D'une part, elle a conduit à l'altération de la croissance et de la condition des poissons, visible par la réduction des taux de croissance en poids et en taille et de l'indice de condition  $K$  de Fulton (cf. figure IV.5). D'autre part, un effet mécanique a été observé au niveau des branchies (cf page 98). En effet, la présence de diatomées dans les branchies associée à une surproduction de mucus sur l'épithélium branchial indique bien un stress mécanique induit par l'efflorescence. Ce dernier peut engendrer une réduction de la fonction branchiale et conduire à des effets sub-létaux tels que des pertes d'appétit et une réduction de la croissance voire la mort des poissons (cf. Introduction §3.3 ; Rodger et al., 2011)

Lors de cette expérience en conditions aquacoles, les moules apparaissent comme étant un bon outil de mitigation de l'efflorescence phytoplanctonique puisqu'elles permettent de diminuer l'abondance phytoplanctonique d'un facteur compris entre 6 et 13 dans l'eau d'élevage des juvéniles de bar. Cette expérience a été réalisée dans une ferme aquacole où les apports d'eau sont maîtrisés (e.g. débit, température) puisque l'élevage se déroule dans des bassins à terre. Cela a facilité la mise en place d'un bassin de filtration contenant des moules en amont d'un bassin d'élevage. L'utilisation des moules dans d'autres types d'élevage (e.g. cages en mer) nécessitera le développement de structures spécifiques pour le maintien des bivalves aux abords des cages d'élevage tout en tenant compte des prédateurs sauvages tels que les dorades par exemple. Par ailleurs, afin d'optimiser ces structures de filtration, une excellente connaissance des conditions hydrobiologiques du milieu est indispensable. Plus spécifiquement, pour l'utilisation de ce dispositif autour de cages situées en mer, une connaissance fine de l'hydrodynamisme sera nécessaire pour que la filtration du milieu d'élevage et que la dispersion des déchets soient efficaces.

---

## **Chapitre V. Discussion générale et Perspectives**

---





La plupart des études portant sur le phytoplancton en Manche orientale et dans la baie sud de la mer du Nord se sont intéressées aux contrôles des communautés soit par la ressource (« *bottom-up control* », e.g. interactions éléments nutritifs-diversité, croissance, production primaire phytoplanctonique ; Schapira et al., 2008 ; Lefebvre et al., 2011), soit par les prédateurs (« *top-down control* ») qu'il s'agisse de métazoaires (e.g. copépodes ; Bautista et al., 1992 ; Gasparini et al., 2000 ; Cottonnec et al., 2001) ou de protozoaires microplanctoniques (Grattepanche et al., 2011), mais aussi aux communautés de protistes nano-planctoniques et à la biosphère microbienne rare potentiellement pathogènes du phytoplancton ou des poissons (Christaki et al., 2014 ; Monchy et al., 2012). Cependant, peu d'études ont jusqu'à présent considéré les interactions directes entre le phytoplancton et les poissons, en particulier au regard des effets délétères pouvant être induits par le phytoplancton (e.g. toxicité, effets mécaniques, modification de l'environnement physico-chimique, cf. Introduction §3). La plupart des études initiées dans les années 1990 ont fait suite à des pertes économiques importantes dans les élevages en mer et particulièrement dans les zones touchées par de fortes mortalités liées à des effets délétères d'espèces responsables de HAB (e.g. Ecosse, Corée, Norvège, Canada, Chili, Albright et al., 1993 ; Anderson et al., 2001 ; Kallee et al., 2002 ; Treasurer et al., 2003). Ce travail contribue aux études de faisabilité relatives à l'installation d'infrastructures aquacoles ou de poles expérimentaux (e.g. Plateforme nouvelle vague<sup>15</sup>) sur le littoral du Nord Pas-de-Calais Picardie. Il constitue donc également à une contribution scientifique et appliquée à la gestion des exploitations existantes.

***L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'évaluer, pour la première fois dans la baie sud de la mer du Nord, les effets potentiellement délétères que peuvent avoir les efflorescences phytoplanctoniques sur les organismes marins, en particulier sur les poissons d'aquaculture comme le bar (*Dicentrarchus labrax*).***

---

<sup>15</sup> <http://pfinouvellesvagues.com/>

Trois grands axes de recherche ont été développés à différentes échelles temporelles et niveaux d'organisation biologiques (figure V.1) pour répondre de manière spécifique aux questions suivantes :

- **Quelles espèces phytoplanctoniques potentiellement délétères pour les poissons sont présentes en baie sud de la mer du Nord ?**

Pour répondre à cette question, plusieurs échelles temporelles d'observation ont été considérées (Figure V.1) :

- (i) Une étude pluriannuelle (2005-2013, Chapitre I) a mis en évidence des coïncidences entre les mortalités hebdomadaires des bars et l'efflorescence phytoplanctonique (biomasse et abondance). Cette étude a permis d'une part, de corrélérer les maxima de mortalités de poissons à ceux d'abondance et de biomasse phytoplanctonique, et d'autre part, d'identifier les genres récurrents dans le milieu pendant les épisodes de fortes mortalités.
- (ii) Un suivi saisonnier *in situ* de février à novembre 2012 dans les eaux côtières de la baie sud de la mer du Nord (Chapitre II) a permis d'identifier les espèces potentiellement délétères pour les poissons en considérant les dommages mécaniques et/ou toxiques qu'elles peuvent engendrer. Cette partie du travail s'est intéressée aux diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* dont la diversité a été définie *via* l'observation de la microstructure valvaire au microscope électronique à balayage (MEB). La concentration en acide domoïque associée à la présence de ces diatomées a été estimée ainsi que les conditions environnementales et biologiques (e.g. communautés phytoplanctoniques accompagnatrices) favorables à leur apparition.
- (iii) Un suivi a été effectué à l'échelle de l'efflorescence phytoplanctonique printanière en 2013 (avril – mai ; Chapitre IV). Cela a permis d'étudier, pour la première fois, de manière plus spécifique, les communautés phytoplanctoniques présentes dans les bassins d'élevage de la ferme piscicole et d'appréhender les risques mécaniques et toxiques auxquels sont exposés les bars.

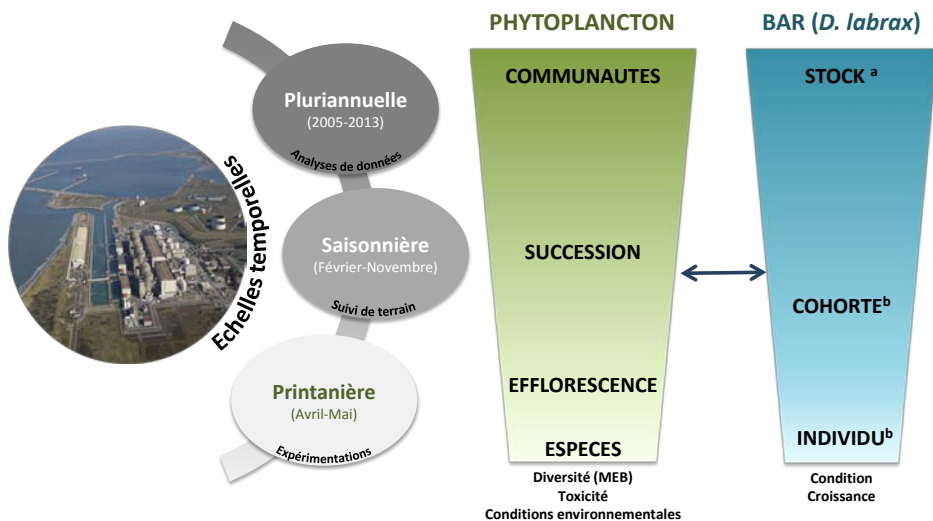


Figure V.1. Echelles temporelles, et niveaux d'organisation considérés au cours de ce travail de recherche ; <sup>a</sup> désigne l'ensemble des poissons élevés dans la ferme aquacole, du stade juvénile (~ 5 g) à la taille commerciale (450 g - 1 kg); <sup>b</sup> désigne les juvéniles.

La coïncidence de l'efflorescence phytoplanktonique et du pic d'abondance de taxons avec les fortes mortalités de bars a pu être vérifiée pour certains genres tels que *Pseudo-nitzschia*, *Phaeocystis* et *Rhizosolenia* ; l'écologie et la diversité des deux derniers étant bien connus dans l'écosystème Manche – mer du Nord (Schapira et al., 2008 ; Rousseau et al., 2007, 2013). ***Ce travail présente une contribution nouvelle à l'étude du genre Pseudo-nitzschia dans la baie sud de la mer du Nord.*** Le suivi saisonnier de 2012 a en effet permis de démontrer une faible diversité (trois espèces) de *Pseudo-nitzschia* en comparaison à d'autres zones tempérées telles que la baie des Veys (Normandie, France), les côtes catalanes (Espagne) ou le golfe du Maine (USA) où six, neuf et huit espèces ont respectivement été identifiées (Klein et al., 2010 ; Quijano-Scheggia et al., 2010 ; Fernandes et al., 2014). Les trois espèces identifiées en baie sud de la mer du Nord (*P. delicatissima*, *P. pungens* et *P. fraudulenta*) présentaient une succession particulière.

- Au printemps (avril – mai), les trois espèces étaient présentes mais *P. delicatissima* dominait la communauté de diatomées (i.e. 85%).

- En été (juin – juillet), les trois espèces étaient présentes et *P. pungens* dominait légèrement (54% des frustules identifiés par analyse MEB).
- Enfin, *P. pungens* a été la seule espèce observée en automne.

La succession des espèces de *Pseudo-nitzschia* semble reliée à une limitation en composants azotés. Etant donnée leur variabilité saisonnière, leur présence dans le milieu pourrait aussi être sous dépendance de la température et la photopériode. Les trois espèces identifiées dans ce travail sont potentiellement toxiques comme cela a été vérifié en plusieurs zones géographiques (Trainer et al., 2012 ; Rhodes et al., 2013 ; Fernandes et al., 2014). Plus particulièrement, ce travail a permis de démontrer la toxicité *P. pungens* puisqu'elle était la seule espèce présente en automne en association avec de fortes concentrations d'acide domoïque ( $102 \pm 39$  pg. mL<sup>-1</sup>). Au contraire, la non-toxicité de *P. delicatissima* suggérée par de nombreuses études (e.g. Lundholm et al., 2006 ; Kaczmarek et al., 2007 ; Lelong et al., 2014) a été confirmée en culture lors de l'expérience d'exposition (Chapitre III). Par contre, la toxicité de *P. fraudulenta* n'a pu être estimée de manière certaine. L'isolation de cette espèce dans le milieu suivie de cultures en batch permettrait d'évaluer sa potentielle toxicité dans la baie sud de la mer du Nord, mais également d'étudier son écophysiologie (e.g. facteurs limitants, taux de croissance) et donc de mieux connaître les conditions environnementales favorables à son développement.

Cette étude a montré que la concentration en acide domoïque ne dépendait pas forcément de l'abondance de *Pseudo-nitzschia* toxiques dans le milieu, à savoir que de fortes concentrations de toxines peuvent correspondre à des abondances faibles. Enfin, si elles ne sont pas présentes dans la baie sud de la mer du Nord, d'autres espèces telle que la macro-algue *Chondria armata* (Asie du sud-est) et l'espèce de diatomée benthique *Amphora coffeaeformis* (côte est du Canada) sont également capables de produire de faibles quantités d'acide domoïque (Bates, 2000 ; Zaman et al., 1997). Connaissant l'importance des eaux de ballast et du trafic maritime dans l'introduction d'espèces exotiques provenant de ces zones géographiques (Gollasch, 2006 ; Brylinski et al., 2012 ; Antajan et

al., 2014), la surveillance de l'ensemble des communautés phytoplanctoniques et de macro-algues apparaît nécessaire dans la gestion du risque d'intoxication ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*). Par ailleurs, le développement de Dinophyceae toxiques voire leur introduction dans la baie sud de la mer du Nord ne peuvent être exclus d'autant plus que des alertes PSP dues au développement d'*Alexandrium* sp. sont régulièrement déclenchées en Manche orientale<sup>16</sup>.

Le réseau de surveillance des phycotoxines (REPHY) existant en France base ses seuils nationaux d'alerte ASP sur l'abondance de *Pseudo-nitzschia* sp., la concentration en acide domoïque étant mesurée dans les coquillages<sup>17</sup> seulement lorsque ce seuil est dépassé (i.e. 100 000 cellules. L<sup>-1</sup> pour le complexe *P. seriata*, 300 000 cellules. L<sup>-1</sup> pour le complexe *P. delicatissima*). Cette étude souligne l'importance d'appliquer des dosages systématiques de la toxine au moins dans les coquillages et de tenir compte des particularités régionales de certains environnements. Si les zones à risque sont l'objet de suivi à plus haute fréquence (toutes les semaines, Lefebvre, pers. com.), le délai entre l'observation d'un HAB, les temps d'analyses (protocoles conformes à la législation européenne par HPLC-UV) et les prises de décision constituent autant de freins à la réactivité rapide nécessaire dans ce contexte. Par ailleurs, la plupart des programmes de surveillance utilisent la microscopie optique et par conséquent, ne distinguent pas les espèces de *Pseudo-nitzschia* mais les classe dans deux complexes couramment utilisés : *P.* complexe *delicatissima* qui regroupe les espèces étroites (i.e. largeur valvaire < 3µm) et *P.* complexe *seriata* regroupant les espèces larges (i.e. largeur valvaire > 3µm). Comme toutes les espèces de *Pseudo-nitzschia* au sein d'un complexe donné ne produisent pas d'acide domoïque (Lelong et al., 2012a ; Lundholm et al., 2006), optimiser les mesures de prévention passe par le développement d'outils d'identification rapides, tels que l'utilisation de PCR en temps réel (Kim et al., 2010), ou de sondes moléculaires fluorescentes spécifiques et

<sup>16</sup> Bulletins d'information et d'alerte / Surveillance des coquillages, REPHY, IFREMER.

<sup>17</sup> Seuil sanitaire d'acide domoïque dans les coquillages = 20µg DA. kg<sup>-1</sup> (Lefebvre et al., 2014)

déTECTABLES par cytométrie en flux (Wallner et al., 1993) en complément des analyses en microscopie électronique. Ces méthodes permettent également de distinguer des espèces cryptiques, à savoir des espèces distinctes mais morphologiquement semblables qui pourraient présenter des propriétés toxiques différentes (Lundholm et al., 2006 ; Quijano-Scheggia et al., 2010).

Outre l'étude ciblée de *Pseudo-nitzschia*, **ce travail a mis en évidence une grande diversité d'espèces potentiellement délétères pour les organismes marins au cours des suivis de 2012 et 2013.** Elle comprenait les diatomées des genres *Chaetoceros*, *Rhizosolenia* et *Thalassiosira* par exemple mais aussi le prymnesiophyceae *P. globosa*. Néanmoins, si *P. globosa* dominait l'efflorescence printanière au cours des deux suivis effectués, une forte variabilité interannuelle concernant les communautés de diatomées a été démontrée. Ainsi, si *Pseudo-nitzschia delicatissima* était dominante en 2012, *Rhizosolenia imbricata* caractérisait les assemblages de fin de printemps-début d'été 2013. Cette très forte variabilité interannuelle des communautés phytoplanctoniques dans la zone d'étude n'est pas surprenante et a déjà été démontrée par plusieurs études dans cette zone géographique (e.g. Widdicombe et al., 2010 ; Lefebvre et al., 2011 ; Hernández-Fariñas et al., 2014) et pourrait être causée par les forçages climatiques à grande (e.g. Oscillation Nord Atlantique, NAO) et plus petite échelle (e.g. variation des concentrations en éléments nutritifs en relation avec les événements pluvieux).

Il est donc nécessaire, et primordial, d'intégrer l'évolution interannuelle des communautés phytoplanctoniques pour mieux définir leur impact potentiel sur les poissons en pisciculture.

Cette variabilité interannuelle du phytoplancton semble s'être répercutée sur celle des mortalités de bars. Ainsi, en 2012 et 2013, le pic de mortalité printanier est peu marqué voire inexistant en association avec une efflorescence phytoplanctonique de moindre ampleur et en comparaison aux années de fortes mortalités (e.g. 2008, 2011) marquées par des efflorescences conséquentes (e.g. 2008, 35  $\mu\text{g chl } a. \text{ L}^{-1}$  ; 2010,

52  $\mu\text{g chl } a.\text{mL}^{-1}$ ). La poursuite de suivis s'avère primordiale afin de confirmer ou d'infirmer la tendance à la diminution des efflorescences phytoplanctoniques dans la baie sud de la mer du Nord démontrée par Lefebvre et al. (2011), et de vérifier la persistance de la corrélation entre les mortalités printanières de poissons dans la ferme piscicole et l'efflorescence phytoplanctonique dans les années à venir.

Lors des deux suivis effectués (en 2012 et en 2013), une efflorescence de noctiluques (*Noctiluca scintillans*) a été observée en début d'été (données non présentées). Connaissant l'impact potentiel de cette espèce sur le milieu marin et sur les poissons (hypoxie, production d'ammonium, acidification du milieu ; Bhat et al., 2006 ; Mohamed et Mesaad, 2007 ; cf. Introduction §3.1), il semble important de déterminer si cette espèce constitue un risque supplémentaire pour des poissons ayant déjà subi une exposition à l'efflorescence phytoplanctonique printanière. Dans ce contexte, des expériences d'exposition Noctiluques-poissons, telles que celles réalisées par Amara et al. (2013) et dans le Chapitre III, pourraient être envisagées.

De plus, si les conditions de développement de cette espèce de Dinophyceae semblent bien connues (Le Fèvre et Grall, 1970 ; Yung et al., 1997 ; Fock et Greve, 2002 ; Sautour et al., 2000 ; Kopuz et al., 2014), un suivi haute fréquence permettrait de mieux connaître leur dynamique de population à court terme (e.g. taux de croissance *in situ*, facteurs hydrobiologiques forçants tels que la disponibilité de la ressource ou l'hydrodynamisme). Cela permettra aussi d'évaluer les conséquences éventuelles de la récurrence d'une telle espèce sur l'écosystème côtier et l'élevage de poissons en baie sud de la mer du Nord.

Une des principales difficultés de ce travail a été d'adapter la fréquence d'échantillonnage à l'étude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques. En effet, lors des suivis saisonniers réalisés pendant cette thèse, les recherches se sont principalement intéressées au phytoplancton à une fréquence hebdomadaire (Chapitre IV) ou de deux semaines (Chapitre II). Des cultures en batch de *Pseudo-nitzschia*



*delicatissima* ont permis d'estimer leur taux de croissance en conditions optimales (i.e.  $0,3 \text{ j}^{-1}$  à  $11,0 \text{ °C}$ ), et Lelong et al. (2014) ont déterminé un taux de croissance de  $1,0 \text{ j}^{-1}$  à  $15,6 \text{ °C}$  pour cette même espèce isolée en Bretagne. Ainsi, en transposant ces résultats dans le milieu naturel, et en l'absence de compétiteurs et de prédateurs, une abondance de  $3 \times 10^5$  cellules.L<sup>-1</sup>, correspondant au seuil d'alerte pour le complexe *P. delicatissima*, pourrait être atteinte en 10 jours. Si le suivi hebdomadaire effectué par le REPHY correspond au temps d'apparition d'une efflorescence dans le milieu naturel, il ne permet pas l'anticipation de tels évènements. Un suivi effectué à une fréquence plus importante serait une première avancée pour la compréhension des mécanismes contrôlant la dynamique de croissance des espèces potentiellement responsables de HAB dans la baie sud de la mer du Nord et permettrait d'anticiper leurs impacts sur les activités aquacoles.

Les perspectives de ce travail s'inscrivent donc dans des approches de terrain à deux échelles temporelles distinctes :

- Un suivi pluriannuel des communautés phytoplanctoniques incluant l'identification spécifique de *Pseudo-nitzschia* et le dosage de l'acide domoïque, mais aussi d'autres producteurs de phycotoxines tels que les dinophyceae des genres *Prorocentrum*, *Dinophysis* et *Alexandrium* (Hallegraeff, 2003) afin d'estimer la variabilité inter-annuelle, et confirmer la tendance globale actuelle à l'augmentation de la fréquence et de la diversité des HAB (Hallegraeff, 1993 ; Glibert et al., 2005). De plus, l'intégration d'autres compartiments planctoniques (e.g. bactéries, micro- et mésozooplancton) au suivi permettra de mieux définir les conditions de production d'acide domoïque qui peuvent dépendre des communautés bactériennes en présence (Bates et al., 1995 ; Lelong et al., 2014), et d'évaluer son transfert le long du réseau trophique.
- Dans l'optique d'une gestion à long terme de l'effet des efflorescences phytoplanctoniques sur l'élevage des poissons, et plus largement sur l'aquaculture dans la baie sud de la mer du Nord, l'utilisation des outils de télédétection tels que les données

- de couleur de l'eau permettant une détection rapide et précoce des efflorescences (Alvain et al., 2005) combinée à une approche de modélisation prenant en compte l'hydrodynamisme des zones aquacoles, permettrait de mettre en relation la variabilité saisonnière des communautés phytoplanctoniques avec celle des mortalités de poissons. Si leur application reste encore limitée en zones côtières, de telles méthodes permettront d'établir la dispersion de l'efflorescence, son déplacement (vitesse, direction) et donc, pourraient être des outils de prédiction et de prévention complémentaires au suivi de terrain.
- Un suivi journalier permettrait d'avoir une connaissance plus fine de la dynamique des efflorescences car les espèces phytoplanctoniques concernées ont un taux de croissance important (e.g. temps de génération de *P. globosa* < 24 h à 12 °C ; Jahnke, 1989) et sont susceptibles d'apparaître dans le milieu très rapidement. Cela permettrait d'évaluer le délai entre le pic d'abondance phytoplanctonique et celui des mortalités de poissons, et d'adapter les mesures de prévention en conséquence, tels que l'arrêt de l'alimentation des poissons diminuant ainsi leur demande biologique en oxygène accompagné d'une oxygénation du milieu d'élevage pour éviter l'asphyxie, la mise en place de systèmes de filtration, l'isolation et/ou le déplacement des cages d'élevage lorsque cela est possible, ou bien la modification du point de pompage de l'eau de mer pour les bassins à terre (e.g. en profondeur). Néanmoins, ce type d'approches nécessite la considération d'un compromis entre le nombre d'échantillons récoltés et leurs temps et coût d'analyses en microscopies optique et électronique. La mise en place d'outils automatisés tels que le *flowcam* ou le *cytocense* (Buskey et Hyatt, 2006 ; Dubelaar et Gerritzen, 2000) constitue des approches novatrices permettant la détermination et l'énumération précises des espèces phytoplanctoniques délétères. Ces approches pourraient être combinées à l'utilisation de sondes moléculaires spécifiques et de la PCR en temps réel, dont l'utilisation s'est avérée pertinente pour

la détection de kystes de dinophyceae toxiques tels que *Cochlodinium* sp. et *Alexandrium* sp (Kim et al., 2010). Pour la mesure rapide de l'acide domoïque, les kits basés sur la méthode ELISA sont des outils très efficaces, aussi sensibles que les protocoles nationaux recommandés dans le cadre des suivis phycotoxines (Garet et al., 2010) car ils permettent la mesure des concentrations en acide domoïque en une demi-journée. Ils représentent donc une très bonne alternative aux protocoles usuels en permettant une alerte en temps réels des acteurs de l'environnement (e.g. pêcheurs à pieds, conchyliculteurs).

- **Quelle est la vulnérabilité des juvéniles de bar à ces espèce phytoplanctoniques potentiellement délétères ?**

Deux expériences d'exposition phytoplancton – juvéniles de bar ont été réalisées afin de tester les hypothèses émises lors des mesures et analyses de terrain :

- (i) *Pseudo-nitzschia delicatissima* étant l'espèce de diatomée dominante pendant l'efflorescence printanière de 2012, la vulnérabilité des bars à cette espèce potentiellement nocive d'un point de vue mécanique et/ou toxique a été testée à l'échelle individuelle au cours d'une expérience d'exposition de 45 jours (Chapitre III). Cette approche a été développée au laboratoire (conditions contrôlées) par la mise en place de cultures permettant une exposition à des concentrations ciblées et jusqu'à cinq fois plus importantes que dans le milieu naturel et, par l'utilisation de marques sous cutanées (Visual Implant Tag, 1.2 mm × 2.7 mm, Northwest Marine Technology) permettant l'identification et donc un suivi individualisé des poissons.
- (ii) L'effet d'une efflorescence phytoplanctonique (printemps 2013) sur les juvéniles de bar a été étudié à l'échelle d'une cohorte (figure V.1, Chapitre IV) au cours d'une expérience de 35 jours en mésocosmes. Cela a permis d'estimer l'effet potentiellement délétère d'une exposition plurispécifique provenant du milieu naturel en baie sud de la mer du Nord.

A chaque échelle d'analyses, les effets sur la condition des poissons (indice de Fulton) et sur leurs performances physiologiques (taux de croissance, rapports ARN:ADN, TAG:ST) ont été mesurés en parallèle des effets mécaniques sur les branchies mais aussi sur le système digestif (pour l'exposition mono-spécifique).

#### *Un effet monospécifique relatif*

L'expérience d'exposition de juvéniles de bar à *Pseudo-nitzschia delicatissima* réalisée au cours de ce travail de thèse fait suite à une expérience similaire impliquant *Phaeocystis globosa* (Amara et al., 2013). Néanmoins, l'exposition de juvéniles de bar à une culture de cette espèce et à la mousse résultant de sa dégradation n'a pas démontré d'effet négatif sur la condition ni la croissance des poissons. Au contraire, une légère augmentation de l'indice de condition et de la croissance a plutôt été observé (Amara et al., 2013). Cela suggère que les bars tirent un profit nutritionnel des polysaccharides secrétés par *P. globosa* sous sa forme coloniale, qui provoquent l'agrégation des particules et les rendent plus facilement captables par les juvéniles de poissons. Si *P. globosa*, espèce dominante et récurrente pendant l'efflorescence printanière, n'a pas d'effet délétère sur les juvéniles de poissons, la question d'un effet induit par une autre espèce phytoplanctonique abondante pendant la même période s'est posée. Ainsi, le choix de la diatomée *P. delicatissima* dans l'expérience d'exposition phytoplancton - juvénile de bar a été conditionné par sa récurrence pendant l'efflorescence printanière (Antajan et al., 2013 ; Hernández-Fariñas et al., 2014) et sa dominance au sein de la communauté de diatomées au printemps 2012.

***Si l'exposition semble entraîner un stress mécanique relatif observé via une surproduction de mucus au niveau des branchies, nos résultats indiquent très clairement que dans les conditions d'exposition de cette expérience (45 jours,  $5 \times 10^6$  cellules.  $L^{-1}$ ), *P. delicatissima* ne produit pas d'acide domoïque et n'a pas non plus d'effet délétère sur la croissance et la condition des poissons.***

Le protocole utilisé lors de cette expérience d'exposition la rend aisément reproductible quelle que soit l'espèce phytoplanctonique considérée. Le couplage comptage phytoplanctonique – fluorimétrie constitue par ailleurs un outil très rapide et efficace permettant de maintenir les concentrations phytoplanctoniques constantes dans les aquariums expérimentaux. De plus, la réplique des conditions d'exposition a permis de considérer une large gamme d'abondances phytoplanctoniques s'étalant de ce qui est généralement observé *in situ* (concentration maximale) à une abondance cinq fois supérieure. En effet, au cours de cette expérience, les poissons ont été exposés à trois abondances de *P. delicatissima* distinctes dont la plus faible ( $10^6$  cellules.  $L^{-1}$ ) est l'abondance maximale rencontrée en Manche orientale et en baie sud de la mer du Nord (Antajan et al., 2013; Breton et al., 2011). Les deux autres abondances de *P. delicatissima* testées (i.e.  $2 \times 10^6$  et  $5 \times 10^6$  cellules. $L^{-1}$ ) ont eu pour objectifs de forcer les potentiels effets délétères, mais restent néanmoins cohérentes avec celles rencontrées dans le milieu naturel, puisque des abondances de *Pseudo-nitzschia* peuvent atteindre  $6 \times 10^6$  cellules. $L^{-1}$  lors d'efflorescences mono- ou plurispécifiques (Anderson et al., 2006 ; Quijano-Scheggia et al., 2008a ; Trainer et al., 2009). De plus, le marquage des poissons a permis d'évaluer avec précision la croissance individuelle des poissons tout en tenant compte de la variabilité individuelle. Les marqueurs physiologiques tels que la croissance ou la condition des poissons représentent les caractéristiques biologiques des poissons en relation directe avec la qualité de leur habitat (Amara et al., 2007). Ainsi les paramètres mesurés au cours de cette approche expérimentale (indices de condition, rapport ARN : ADN, taux de croissance) permettent une appréciation des coûts métaboliques induits par un ou des stress (Lambert et Dutil, 1997) et ont des temps de réponse différents : la croissance intègre l'histoire de vie du poisson, l'indice de condition est un bon indicateur de l'état de santé du poisson et a un temps de réponse de l'ordre des semaines voire des mois, et le rapport ARN : ADN répond rapidement aux variations de croissance des juvéniles de poissons avec un temps de réponse de l'ordre de quelques jours voire semaines (Adams et al., 1992 ; Buckley et al., 1999 ; Rätz et

Lloret, 2003). Ces paramètres sont apparus comme étant très pertinents et robustes dans leur réponse à de nombreux stress environnementaux (Froese, 2006 ; Kerambrun et al., 2012b ; Laroche et al., 2002 ; Rätz et Lloret, 2003). Le couplage de ces différents paramètres sur une durée d'expérience de 45 jours a permis de rendre compte de stress induits par l'exposition au phytoplancton, qu'il s'agisse d'une espèce ciblée ou de communautés (cf. § effet plurispécifique).

La contrainte principale de cette expérience pourrait être représentée par le volume des aquariums utilisés lors de l'exposition (37 L). Ce choix correspond en réalité à la nécessité d'établir un compromis entre le volume d'incubation nécessaire au maintien d'un nombre suffisant de poissons pour que l'expérience soit statistiquement cohérente, et des volumes de culture algale nécessaires. Si la réponse des poissons peut être accentuée dans ce type d'expériences, l'utilisation de plus grands volumes d'incubation permettrait de se rapprocher des conditions environnementales et d'étudier un nombre plus important de poissons. La logistique de l'expérience était essentiellement liée aux volumes d'eau de mer filtrée nécessaires aux renouvellements de l'ensemble des aquariums, aux cultures algales et aux échantillonnages hydro-biologiques journaliers. A ces contraintes s'est ajoutée l'estimation de l'abondance cellulaire réelle dans les aquariums expérimentaux par comptages en microscopie optique (méthode très chronophage) en parallèle des mesures fluorimétriques journalières. Néanmoins, la cohérence de nos résultats au regard des indices de condition et de la croissance mesurés sur les poissons exposés avec d'autres études réalisées *in situ* ou au laboratoire indique que les conditions expérimentales n'étaient pas limitantes (Kerambrun et al., 2012b ; Mourente et Bell, 2006 ; Vasconcelos et al., 2009).

***Cette phase de travail est une contribution importante à l'étude des interactions entre le phytoplancton et les poissons, qui est rarement envisagée au laboratoire en conditions contrôlées.*** Afin de compléter cette étude, une expérience d'exposition à des espèces de *Pseudo-*

*nitzschia* toxiques (i.e. *P. pungens* et/ou *P. fraudulenta* identifiées lors du suivi 2012, Chapitre III) permettra de mesurer l'effet de la combinaison entre l'effet mécanique entraperçu lors de cette étude et un éventuel effet toxique de l'acide domoïque pour les poissons. Enfin, d'autres espèces pouvant avoir des effets délétères sur les poissons ont été observées lors de l'efflorescence de 2013 comme les diatomées piquantes des genres *Rhizosolenia* ou *Chateoceros*, responsables de mortalités massives de salmonidés dans des élevages d'Ecosse ou du Canada par exemple (Albright et al., 1993 ; Burridge et al., 2010 ; Treasurer et al., 2003).

Les expériences d'expositions mono-spécifiques permettent une meilleure compréhension des effets délétères des efflorescences phytoplanctoniques car elles mettent en évidence des effets individuels tels qu'une absence totale d'effet pour *P. globosa* (Amara et al., 2013) ; un stress mécanique pour *P. delicatissima* (Delegrange et al., 2015) voire la mortalité des poissons exposés pour *Chaetoceros concavicornis* (Yang et Albright, 1992). La suite logique de ces expériences d'exposition monospécifiques serait de réaliser des expositions avec des mélanges d'espèces dont les effets délétères individuels sont connus afin de savoir si ces effets sont cumulatifs lorsqu'elles sont présentes dans le milieu au même moment (e.g. *P. delicatissima* et *P. globosa*). Toutefois, la réalisation de telles expériences en conditions contrôlées nécessite une gestion des effets compétitifs entre les espèces phytoplanctoniques en plus des interactions phytoplancton-poisson étudiées. Les approches *in situ* simulées pourraient être une alternative aux expériences en conditions contrôlées. Cela implique d'exposer les poissons à des communautés naturelles en milieu fermé (par exemple des aquariums) et la prise en compte de la dynamique des communautés dans les enceintes expérimentales. Par ailleurs, la concentration des communautés phytoplanctoniques de l'eau de mer permettra d'en augmenter l'abondance pour en accentuer les effets potentiellement délétères comme cela a été fait lors de ce travail.

Ce travail (Chapitre III) a confirmé qu'un effet mono-spécifique de certaines espèces phytoplanctoniques potentiellement délétères ne peut

expliquer, à lui seul, les mortalités de bar en baie sud de la mer du Nord. Cependant, le stress induit par une exposition monospécifique suggère que l'exposition à plusieurs espèces pourrait être plus nuisible, surtout au regard de la durée de l'efflorescence et qu'il ouvrirait une voie d'entrée à d'autres pathogènes.

### Un effet pluri-spécifique

Si elle est dominée par *P. globosa*, l'efflorescence printanière est également caractérisée par un ensemble d'espèces plus ou moins délétères pour les poissons (cf. ci-dessus). Par conséquent, l'atténuation de l'efflorescence devrait conduire à une meilleure croissance et une meilleure condition des juvéniles de bar.

Cette hypothèse a été testée au cours d'une expérience se déroulant pendant l'efflorescence phytoplanctonique de 2013 (Chapitre IV). Des moules ont ainsi été utilisées comme filtre naturel de l'eau de mer pour diminuer la biomasse et l'abondance phytoplanctoniques en amont de mésocosmes ( $5 \text{ m}^3$ ) contenant des juvéniles de bar. L'expérience s'est déroulée au sein de la ferme aquacole afin de reproduire les conditions d'élevage des bars en termes de qualité et de renouvellement de l'eau, de densité de poissons (i.e.  $7$  à  $10 \text{ kg.m}^{-3}$ ), de fréquence de nourrissage et de rationnement, mais également de suivi par les éleveurs. Les effets de l'efflorescence phytoplanctonique ont ainsi pu être estimés en conditions réelles à l'échelle d'une cohorte (15 000 individus) rendant impossible le suivi individuel d'un point de vue logistique.

L'activité de filtration des bivalves (discutée ci-après) a permis une atténuation significative de l'efflorescence phytoplanctonique en termes d'abondance et de biomasse (facteur 6 à 13) sans effet sur la composition taxonomique des communautés. Cela a par ailleurs conduit à une amélioration de la condition et de la croissance des juvéniles de bar de 2 et 12 % respectivement, par rapport à des témoins ne bénéficiant pas de filtration préalable. Cela suggère que les poissons exposés à l'efflorescence phytoplanctonique avaient une condition et une croissance plus faibles par rapport aux poissons élevés dans l'eau de mer préalablement filtrée par les moules.



La présence de diatomées piquantes (*Rhizosolenia imbricata*, *Thalassiosira* sp.) dans les branchies des poissons exposés à l'efflorescence coïncidait avec une épaisseur anormale de mucus à la surface de l'épithélium branchial. Ces observations indiquent un stress mécanique causé par les communautés phytoplanctoniques présentes (Shen et al., 2011) et confirment nos premiers résultats d'exposition monospécifique. Il est donc probable que les effets délétères induits par plusieurs espèces au cours d'une efflorescence soient cumulatifs, ne permettant pas aux poissons de récupérer leur état de santé initial avant plusieurs semaines (i.e. durée de l'efflorescence en baie sud de la mer du Nord). Cela pourrait, à long terme, conduire à des effets sub-létaux (e.g. accumulation de mucus, lésions de l'épithélium branchial et inhibition des fonctions branchiales et de la croissance) voire létaux.

La mesure du rapport ARN : ADN, qui permet de rendre compte de l'activité métabolique, était plus faible chez les poissons exposés à l'efflorescence, suggérant une allocation d'énergie modifiée chez ces individus. Ainsi, il est possible que les poissons exposés aux communautés phytoplanctoniques aient alloué plus d'énergie à la défense contre le stress mécanique induit par les diatomées par rapport à leur croissance (McNamara et Buchanan, 2005). Cela peut donc conduire à la réduction du taux de croissance des poissons comme observé lors de cette expérience et, par conséquent, à la réduction du rendement de production au sein des fermes aquacoles.

***Ce travail a donc montré une vulnérabilité des juvéniles de bar à l'efflorescence phytoplanctonique printanière.*** Cette expérience mériterait d'être réalisée à nouveau afin de confirmer les premiers résultats obtenus et d'intégrer la variabilité interannuelle des communautés (en termes d'abondance et de taxonomie), et donc de considérer d'autres composantes dominantes de l'efflorescence printanière.

Ce travail de thèse a permis de mesurer un effet délétère de l'efflorescence phytoplanctonique printanière sur les bars d'élevage en baie sud de la mer du Nord. Bien que les perspectives relatives au suivi

des composantes planctoniques présentées précédemment puissent être envisagées ici, les paramètres mesurés sur les poissons seront l'objet de cette discussion :

- La réalisation de frottis branchiaux (lamelles branchiales fraîches placées entre lame et lamelle) à chaque prélèvement sur un nombre important de poissons a permis l'estimation rapide de l'état des tissus branchiaux *in vivo* au cours des deux expériences d'exposition. Néanmoins, cette méthode semi-quantitative méritera d'être complétée par une analyse histologique permettant une observation à l'échelle cellulaire des tissus et une estimation quantitative des dommages (e.g. œdèmes, nécroses, fusion des lamelles branchiales) potentiellement observés (Shen et al., 2011).
- La mise en place d'un suivi de l'état de santé des poissons au sein des structures d'élevage permettra la surveillance de leur croissance et de leur condition. Ces facteurs sont en effet des facteurs indicateurs du bien-être et du niveau de stress des poissons facilement et rapidement mesurables (Varsamos et al., 2006). A ce titre, les premiers indicateurs de stress sont les paramètres sanguins tels que l'augmentation du taux de cortisol ou d'adrénaline et ces réponses endocriniennes conduisent à des modifications physiologiques tels qu'une augmentation de la glycémie, des fréquences cardiaque et respiratoire (Martinez-Porchas et al., 2009). La mesure rigoureuse de ces deux derniers paramètres nécessite d'effectuer des expériences spécifiques dans des chambres d'incubation individuelles (Luna-Acosta et al., 2011 ; Roque D'Orbcastel et al., 2009) alimentées avec de l'eau de mer naturelle (et les communautés phytoplanctoniques associées) ou des cultures phytoplanctoniques par exemple. Enfin, il est connu qu'en conditions de stress environnemental, les poissons modifient leur comportement, en particulier leurs activités natatoire (e.g. distance parcourue, occupation de l'espace, rythme nyctéméral) et alimentaire (Bégout Anras et al., 2004; Millot et al., 2010). L'utilisation de techniques non invasives d'étude du comportement telles que la télémétrie acoustique permettra de mieux comprendre

les modifications comportementales des poissons exposés aux espèces phytoplanctoniques délétères. Ceci permettrait à terme, de proposer des indicateurs fiables aux éleveurs pour la détection de situations de stress et la mise en place d'outils de prévention et/ou de mitigation des efflorescences.

- **Est-il possible de développer des outils permettant de limiter l'impact de l'efflorescence phytoplanctonique sur les poissons d'élevage ?**

A l'heure actuelle, les interactions aquaculture-environnement représentent un enjeu majeur dans la gestion des exploitations. D'une part, les aquaculteurs doivent contrôler leurs rejets et leur impact sur l'environnement (cf. directives européennes<sup>18</sup> ; Acierno et al., 2006) et d'autre part, ils doivent aussi composer avec les effets de l'environnement sur leur production.

Comme présenté en Introduction, l'environnement, et particulièrement les efflorescences phytoplanctoniques (HAB ou non), est connu pour impacter la production aquacole par des effets létaux et/ou sub-létaux (e.g. effets toxique, mécanique, liés à la forte biomasse). Dans le contexte actuel d'augmentation des HAB, en termes de fréquences d'apparition et d'abondance (Glibert et al., 2005), le développement d'outils, de méthodes et de mesures préventives apparaît primordial.

La première méthode de mitigation utilisée dans le monde est la **prévention en amont** qui se traduit par la mise en place de programmes de surveillance (nationaux ou régionaux) et le développement de méthodes de prédiction des HAB (e.g. modélisation). Si les programmes de surveillance ne sont pas toujours efficaces par manque de personnel compétent ou de moyens (Kallee et al., 2002), ils sont apparus comme très pertinents dans certains cas, jouant leur rôle d'alerte pour la consommation de coquillages (REPHY). La modélisation

---

<sup>18</sup> Directive 2011/92/UE du parlement européen et du conseil du 13 décembre 2011 concernant l'évaluation des incidences de certains projets publics et privés sur l'environnement, Directive 2001/42/CE du Parlement et du Conseil du 27 juin 2001 relative à l'évaluation des incidences de certains plans et programmes sur l'environnement

hydrodynamique permettant d'estimer le déplacement d'efflorescences a porté ses fruits dans certaines régions aquacoles (Norvège) et a initié la mise en place précoce des procédures de mitigation sur les sites de production (Pettersson et al., 2001).

Lorsque la prédiction des HAB en amont n'est pas possible, la **mitigation d'urgence** classique comprend plusieurs **mesures applicables directement sur les sites de production** à terre et en mer. Il peut s'agir de l'arrêt du nourrissage des poissons afin de diminuer leurs besoins en oxygène et donc d'éviter leur asphyxie (Anderson et al., 2001). Cela peut être complété par une oxygénation mécanique des zones d'élevage par bullage d'air comprimé dans les cages ou bassins d'élevage. Néanmoins, si cette méthode s'avère efficace pour limiter les pertes dans les exploitations aquacoles lors d'efflorescences de moindre ampleur, lorsque les HAB sont importants, elles ne suffisent pas voire accentuent l'effet délétère causé par le HAB en ajoutant un facteur de stress supplémentaire pour les poissons. L'évitement de la zone où l'efflorescence se développe est une stratégie applicable essentiellement en mer. Dans ce cas, soit les cages d'élevage sont déplacées dans des zones saines, soit elles sont immergées sous la couche de surface touchée par le HAB (Anderson, 1994 ; Anderson et al., 2001). Le déploiement de telles mesures ne peut être que ponctuel dès lors qu'un changement des conditions physico-chimiques de l'environnement induit un stress chez les poissons et qu'une immersion prolongée pose des problèmes de flottabilité (Kallee et al., 2002).

Enfin, il existe **des moyens de contrôle direct** de l'efflorescence phytoplanctonique permettant d'éliminer les espèces délétères de la colonne d'eau. Les méthodes utilisées peuvent être chimiques, physiques ou biologiques. Les moyens chimiques (e.g. sulfate de cuivre) ont été envisagés par le passé, mais leur utilisation n'est actuellement pas satisfaisante en raison du coût important, de l'efficacité limitée et des effets inconnus des produits utilisés sur l'environnement (Kallee et al., 2002 ; Rodger et al., 2011). Les scientifiques et les aquaculteurs asiatiques (principalement au Japon et en Corée du Sud) utilisent l'argile comme agent flocculant qui accélère la sédimentation des micro-algues

délétères. Cependant, cette méthode présente une limite car elle altère l'ensemble des communautés planctoniques mais aussi les communautés benthiques (Kim, 2006 ; Kim et al., 2010 ; Park et al., 2013). Enfin, la principale méthode biologique destinée à la mitigation de l'effet des HAB sur l'aquaculture est l'utilisation d'agents pathogènes (e.g. bactéries, parasites, virus) des espèces phytoplanctoniques délétères pour les organismes élevés (e.g. bactéries des genres *Cytophaga*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* ; Fukuyo et al., 2002 ; Imai, 2005) ou de prédateurs. L'utilisation de prédateurs du phytoplancton, tels que les copépodes et les bivalves, nécessite de bien connaître leur comportement alimentaire ainsi que l'impact des espèces phytoplanctoniques responsables du HAB sur ces organismes (Fukuyo et al., 2002 ; Kalle et al., 2002).

***En résumé, le moyen de mitigation approprié dépend principalement de la nature de l'efflorescence, de sa détection, du type de ferme aquacole (espèce élevée, configuration du site : en mer ou à terre) et des particularités de l'environnement.***

Le développement de l'aquaculture intégrée ouvre de nouvelles perspectives à la mitigation puisque l'idée de combinaison de cultures commence à se généraliser (Blancheton et al., 2009). De nombreux programmes de recherche (e.g. IDREEM<sup>19</sup>, D2P4<sup>20</sup>, Genesis<sup>21</sup>) développent l'aquaculture intégrée multi-trophique mettant en jeu des communautés artificielles sur les sites de production aquacole pour limiter l'impact des effluents issus de l'élevage sur l'environnement. Ainsi, les effluents particuliers (féces, débris alimentaires) d'une aquaculture nourrie (e.g. pisciculture) sont traités par des systèmes utilisant des espèces extractrices tels que des organismes filtreurs (e.g. les bivalves). Les effluents dissous, principalement des composés azotés tels que l'urée, sont généralement traités par des cultures de macro-algues. En milieu naturel, la matière organique qui sédimente sous les cages

---

<sup>19</sup> IDREEM. Increasing Industrial Resource Efficiency in European Mariculture, 2012, Ecosse.

<sup>20</sup> D2P4. Optimizing IMTA species component stocking densities and infrastructure orientation to maximize overall system efficiency, Canada.

<sup>21</sup> GENESIS. GENERIC Sustainable Integrated Systems, Europe.

alimentent des organismes détritivores benthiques tels que les échinodermes ou des polychètes (Chopin et al., 2001 ; Neori et al., 2004 ; Troell et al., 2009).

Au sein de ces systèmes d'aquaculture intégrée, les moules sont apparues comme des espèces extractrices couramment utilisées en raison de leur fort potentiel d'épuration de la matière particulaire (MacDonald et al., 2011 ; Reid et al., 2010). Elles sont aussi capables de réduire significativement la biomasse phytoplanctonique (Dame et al., 1991 ; Grange et Cole, 1997 ; Riisgård et al., 2011). En effet, une réduction de 60 % de la biomasse phytoplanctonique peut être observée dans l'eau de mer traversant une zone mytilicole (Gibbs et al., 1992 ; Waite, 1989). Le système expérimental présenté en Chapitre IV de cette thèse est inspiré de l'aquaculture intégrée et des outils de mitigation existants. Cependant, dans cette approche expérimentale, les moules ont été utilisées en amont de bassins aquacoles afin de diminuer l'ampleur de l'efflorescence phytoplanctonique et donc ses potentiels effets délétères sur les poissons élevés.

L'utilisation des moules comme filtre de l'eau d'élevage des bars a nécessité la mise en place de bassins spécifiques (i.e. des mésocosmes de filtration) et le respect de certaines conditions (acclimatation, densité utilisée). En effet, afin de filtrer efficacement l'eau de mer, la circulation dans les bassins de filtration a été optimisée pour augmenter le temps de résidence de l'eau. L'utilisation de parois PVC a ainsi permis de mettre en place une circulation concentrique de l'eau passant ainsi au travers des moules, conditionnées et suspendues dans les mésocosmes (Figure IV.2). Les moules provenant des circuits d'alimentation de la ferme aquacole, elles étaient par conséquent déjà adaptées aux conditions hydro-biologiques des bassins d'élevage (pour rappel : eau traitée en partie par la centrale nucléaire de Gravelines, criblée sur 1 mm, réchauffée et chlorée). De plus, afin de limiter le stress lié à leur conditionnement, elles ont été acclimatées dans les bassins expérimentaux pendant deux semaines. Enfin, la densité de moules utilisée ( $60 \text{ kg. m}^{-3}$ ) a été ajustée en

fonction de celles pratiquées dans les bassins de dépuración<sup>22</sup> en mytiliculture (Le Saux et Pommepeuy, 2003).

Afin d'étudier l'effet de la filtration des bivalves sur l'élevage de bars, de nombreux paramètres ont été mesurés tant sur la qualité de l'eau que sur les poissons (performances physiologiques, indices de condition, état des branchies). L'utilisation des moules comme outil de mitigation a été efficace sur les paramètres hydro-biologiques de l'eau de mer, à savoir qu'elle a permis une réduction de la turbidité d'un facteur 5 (représentative de la matière en suspension et de la matière organique dissoute) et de l'abondance phytoplanctonique (jusqu'à un facteur 13) sans modification de la communauté. Cela a conduit à une meilleure condition et une meilleure croissance des juvéniles de bar élevés dans l'eau de mer filtrée, et donc à un meilleur rendement de production supérieur de 5,5 % comparé à un élevage sans filtration en amont.

Cette étude est une contribution au développement de nouvelles pratiques aquacoles qui visent de plus en plus à tenir compte de l'environnement et de ses interactions avec les espèces élevées. Ce type d'approche expérimentale est particulièrement important dans le contexte global de l'augmentation en fréquence et en ampleur des HAB qui, de fait, risquent d'induire des épisodes de mortalités de plus en plus massifs et fréquents dans les fermes aquacoles comme dans le milieu naturel (Anderson, 2008 ; Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000). Cette expérience constitue donc une première proposition technique pour la gestion des interactions HAB-poissons qui méritera d'être testée à l'échelle d'une production aquacole (e.g. modules de production ou exploitation complète). De plus, cette expérience constitue une contribution au développement d'une aquaculture raisonnée, utilisant peu de produits chimiques et sans impact environnemental, mis à part l'envasement lié à la sédimentation des fèces et pseudo-fèces dont l'impact sur le milieu devrait être limité en raison du fort hydrodynamisme de la zone côtière de la baie sud de la mer du Nord (Otto et al., 1990).

---

<sup>22</sup> Dépuración. Processus qui consiste à conditionner des organismes filtreurs dans des bassins d'eau saine afin de les rendre propres à la consommation.

Les limites du système développé dans cette étude concernent la nécessité d'une maintenance lourde incluant une purge journalière et une vidange hebdomadaire du bassin de filtration afin d'éviter l'accumulation de fèces et pseudo-fèces dans le fond des bassins et dans le circuit d'eau. De plus, le système de conditionnement des moules utilisé lors de cette expérience a conduit à l'accumulation de matériel particulaire dans les filets résultant en de fortes mortalités (parfois supérieures à 50%) de moules, sans incidence sur l'efficacité de filtration, au cours de l'expérience (cf. Figure IV.4). Par conséquent, il semble nécessaire de développer un système de conditionnement optimal des moules et d'aménager des bassins spécifiques afin de pérenniser de telles installations tout en assurant un hydrodynamisme suffisant pour limiter l'impact environnemental. De plus, cette expérience a été réalisée sans réplique des conditions en raison de contraintes logistiques (conditions d'élevage, quantité de moules nécessaires, la maintenance et la main d'œuvre disponible). ***Elle doit donc être considérée comme un cas d'étude devant être testé à plus grande échelle, tout en restant une première approche très novatrice applicable dans des bassins d'élevage pour l'atténuation des effets délétères de l'efflorescence phytoplanctonique sur les poissons et l'amélioration du rendement de production.***

Cette expérience a été réalisée dans des bassins dédiés de 5 m<sup>3</sup>. Pour pouvoir appliquer ce mode de mitigation de l'efflorescence à l'échelle de la ferme aquacole, il serait nécessaire de reproduire l'expérience dans des bassins plus grands ; les plus petits bassins utilisés pour la production commerciale dans la ferme considérée étant de 25 m<sup>3</sup>. Cela permettra d'une part, de tester la reproductibilité de l'expérience et d'autre part, d'estimer les coûts d'une telle installation à l'échelle de la ferme aquacole, ainsi que les bénéfices financiers potentiels à court et à long terme. De plus, la pérennisation de tels systèmes de mitigation induit la mise en place d'une double culture en raison de la nécessité de l'aménagement de bassins spécifiques qui devra être rentabilisé. Cela soulève donc le besoin de tester les installations à l'échelle d'une année au moins afin d'intégrer la variabilité saisonnière des communautés



phytoplanctoniques et de la physiologie des moules. Enfin, des analyses génétiques telles que le next-generation sequencing (NGS ; Medinger et al., 2010) permettant le séquençage et l'identification génétique des communautés de protistes et bactériennes permettront de mieux connaître l'impact de la filtration biologique sur les communautés de protistes mais aussi d'en mesurer l'incidence sur la biosphère rare incluant des parasites et pathogènes des poissons dont l'occurrence n'est pas forcément connue dans la zone d'étude.

Si un effet délétère de l'efflorescence phytoplanctonique a été démontré lors de ce travail de thèse, cette étude constitue une avancée non négligeable dans le développement d'outils efficaces de mitigation des efflorescences phytoplanctoniques et de leurs effets sur la pisciculture en zones tempérées qui devrait être testée dans d'autres environnements soumis à d'autres types d'efflorescences (e.g. Dinophyceae). Par ailleurs, l'espèce de filtreur utilisée pourra aussi être adaptée à l'environnement, la zone géographique et le type de HAB en présence.

Les outils de contrôle des efflorescences permettent la gestion des effets délétères lorsque les HAB sont déjà présents. Néanmoins, la **prévention** constitue un des meilleurs moyens de mitigation, et cela passe par une surveillance minutieuse des communautés phytoplanctoniques et des poissons impliquant non seulement les chercheurs et les collectivités, mais aussi les éleveurs présents tous les jours sur les sites aquacoles. Les méthodes de surveillance appliquées (e.g. télédétection des efflorescences, énumération et identification au microscope des espèces présentes, utilisation d'outils automatisés tels que le Flowcam ou la cytométrie) dépendront des compétences des utilisateurs et pourront nécessiter la formation du personnel aquacole pour une efficacité accrue. Une surveillance devra aussi être appliquée aux stocks de poissons par la mesure de paramètres intégrant la réponse des poissons aux stress environnementaux (indice de condition), ou des variables comportementales (activité alimentaire). Ainsi, lorsque les signes avant-coureurs du développement d'un HAB sont présents, des mesures de protection des stocks aquacoles pourront, le cas échéant, être mises en

place telles que l'immersion ponctuelle, le déplacement des cages d'élevage ou encore le passage des fermes à terre en circuit fermé.



---

## **Références bibliographiques**

---



- Acierno, R., Blancheton, J.-P., Bressani, G., Ceruti, L., Chadwick, D., Roque D'Orbecastel, E., Claricoates, J., Donaldson, G., Donaldson, G., 2006. Manual on effluent treatment in aquaculture : Science and Practice. Aquaetreat. Aquatreat.
- Adams, S.M., Crumby, W.D., Greeley, M.S., Ryon, M.G., Schilling, E.M., 1992. Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1549–1557. doi:10.1002/etc.5620111105
- Alami-Durante, H., Olive, N., Rouel, M., 2007. Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Cell Tissue Res.* 327, 553–570. doi:10.1007/s00441-006-0321-2
- Albright, L.J., Yang, C.Z., Johnson, S., 1993. Sub-lethal concentrations of the harmful diatoms, *Chaetoceros concavicornis* and *C. convolutus*, increase mortality rates of penned Pacific salmon. *Aquaculture* 117, 215–225.
- Al-Gheilani, H.M., Matuoka, K., Al-Kindi, A.Y., Amer, S., Waring, C., 2011. Fish kill incidents and harmful algal blooms in Omani waters. *J. Agric. Mar. Sci.* 16, 23–33.
- Alvain, S., Moulin, C., Dandonneau, Y., Bréon, F.M., 2005. Remote sensing of phytoplankton groups in case 1 waters from global SeaWiFS imagery. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 1989–2004. doi:10.1016/j.dsr.2005.06.015
- Amara, R., 2003. Seasonal ichthyodiversity and growth patterns of juvenile flatfish on a nursery ground in the Southern Bight of the North Sea (France). *Environ. Biol. Fishes* 67, 191–201.
- Amara, R., 2004. 0-group flatfish growth conditions on a nursery ground (Bay of Canche, Eastern English Channel). *Hydrobiologia* 518, 23–32.
- Amara, R., Filipuci, I., Vincent, D., Goulard, F., Breton, E., 2013. Do transparent exopolymeric particles (TEP) derived from *Phaeocystis globosa* bloom impact the physiological performances of European sea bass juveniles. *Aquaculture* 414–415, 149–154. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.048
- Amara, R., Méziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., Laffargue, P., 2007. Growth and condition indices measured on juvenile sole (*Solea solea* L.) to assess the quality of essential fish habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 351, 201–208. doi:10.3354/meps07154
- Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D., Montresor, M., 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (bacillariophyceae) 1: life

- cycle of *Pseudo-nitzschia delicatissima*. J. Phycol. 41, 542–556. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00080.x
- Andersen, V., Nival, P., 1989. Modeling of Phytoplankton Population-Dynamics in an Enclosed Water Column. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 69, 625–646.
- Anderson, C.R., Brzezinski, M.A., Washburn, L., Kudela, R., 2006. Circulation and environmental conditions during a toxicogenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 327, 119–133. doi:10.3354/meps327119
- Anderson, D.M., 1994. Red Tides. Sci. Am. 271, 52–58.
- Anderson, D.M., 2008. Harmful algal blooms and ocean observing systems: needs, present status and future potential, in: Fisheries for Global Welfare and Environment. Memorial Book of the 5 Th World Fisheries Congress 2008. TERRAPUB, Tokyo(Japan).
- Anderson, D.M., Andersen, P., Bricelj, V.M., Cullen, J.J., Rensel, J.E.J., 2001. Monitoring and management strategies for Harmful Algal Blooms in coastal waters (Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59 No. #201-MR-01.1). APEC, Paris.
- Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. Annu. Rev. Mar. Sci. 4, 143–76. doi:10.1146/annurev-marine-120308-081121
- Antajan, E., Bastian, T., Raud, T., Brylinski, J.-M., Hoffman, S., Breton, G., Cornille, V., Delegrange, A., Vincent, D., 2014. The invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 along the English Channel and the North Sea French coasts: Another introduction pathway in northern European waters? Aquat. Invasions 9, 167–173. doi:10.3391/ai.2014.9.2.05
- Antajan, E., Hervio-Heath, D., Lefebvre, A., Loots, C., Luczak, C., 2013. Surveillance écologique du site de production électronucléaire de Gravelines Novembre 2011–Octobre 2012 (No. LER/BL/RST/13//01). Ifremer.
- Backer, L.C., McGillicuddy Jr, D.J., 2006. Harmful algal blooms. Oceanography 19, 94.
- Bates, S.S., 2000. Domoic-Acid-Producing Diatoms: Another Genus Added! J. Phycol. 36, 978–983. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.03661.x

- Bates, S.S., Bird, C.J., de Freitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can Fish Aquat Sci* 1203–1215.
- Bates, S.S., Douglas, D.J., Doucette, G.J., Léger, C., 1995. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Nat. Toxins* 3, 428 – 435. doi:10.1002/nt.2620030605
- Bautista, B., Harris, R.P., Tranter, P.R.G., Harbour, D., 1992. In situ copepod feeding and grazing rates during a spring bloom dominated by *Phaeocystis* sp. in the English Channel. *J. Plankton Res.* 14, 691–703. doi:10.1093/plankt/14.5.691
- Bégout Anras, M.-L., Lagardère, J.P., Covès, D., 2004. Swimming activity of seabass: comparing patterns obtained in natural environment and in re-circulating tanks under high density. *J. Fish Biol.* 65, 314–315. doi:10.1111/j.0022-1112.2004.0559b.x
- Bell, G.R., 1961. Penetration of spines from a marine diatom into the gill tissue of lingcod (*Ophiodon elongatus*). *Nature* 192, 279–280.
- Benazza, A., Selleslagh, J., Breton, E., Rabhi, K., Cornille, V., Bacha, M., Lecuyer, E., Amara, R., in press. Environmental control on fish and macrocrustacean spring community structure on an intertidal sandy beach. *PLOS One* in press.
- Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A New Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite in Sea Water.
- Bhat, S.R., Devi, P., D’Sousa, L., Verlecar, X.N., Naik, C.G., 2006. Harmful Algal Blooms, in: *Multiple Dimensions of Global Environmental Change*. TERI Press, India, pp. 419–431.
- Black, E.A., Whyth, J. n. C., Bagshaw, J.W., Ginther, N.G., 1991. The effects of *Heterosigma akashiwo* on juvenile *Oncorhynchus tshawytscha* and its implications for fish culture. *J. Appl. Ichthyol.* 7, 168–175. doi:10.1111/j.1439-0426.1991.tb00523.x
- Blackford, J.C., Gilbert, F.J., 2007. pH variability and CO<sub>2</sub> induced acidification in the North Sea. *J. Mar. Syst., Contributions from Advances in Marine Ecosystem Modelling Research*, 27-29 June, 2005, Plymouth, UK AMEMR 64, 229–241. doi:10.1016/j.jmarsys.2006.03.016
- Blancheton, J.P., 2000. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquac. Eng.* 22, 17–31.



- Blancheton, J.P., Bosc, P., Hussenot, J.M.É., d' Orbcastel, E.R., Romain, D., 2009. The "new" European fish culture systems: recirculating systems, offshore cages, integrated systems. *Spec. Issue Piscic. Poisson Demain* 18, 227–234.
- Blanco, J., Livramento, F., Rangel, I.M., 2010. Amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in plankton and molluscs from Luanda Bay, Angola. *Toxicon* 55, 541–546.  
doi:10.1016/j.toxicon.2009.10.008
- Boalch, G.T., 1984. Algal blooms and their effects on fishing in the English Channel, in: Bird, C.J., Ragan, M.A. (Eds.), *Eleventh International Seaweed Symposium, Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands, pp. 449–452.
- Bolton, T.F., Havenhand, J.N., 2005. Physiological acclimation to decreased water temperature and the relative importance of water viscosity in determining the feeding performance of larvae of a serpulid polychaete. *J. Plankton Res.* 27, 875–879.  
doi:10.1093/plankt/fbi060
- Bougis, P., 1974. *Écologie du plancton marin: Le phytoplancton*. Masson.
- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., Brylinski, J.-M., 2000. Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *J. Plankton Res.* 22, 1423–1440.  
doi:10.1093/plankt/22.8.1423
- Breton, E., Courcot, L., Vallet, C., Lecuyer, E., Degros, N., Gentilhomme, V., Vincent, D., 2011. Richesse spécifique et dynamique du genre potentiellement toxique *Pseudo-nitzschia* peuplant les eaux côtières de la Manche orientale. Presented at the 30ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Boulogne sur Mer, France, p. 76.
- Brett, J.R., 1979. 10 Environmental Factors and Growth, in: W.S. Hoar, D.J.R. and J.R.B. (Ed.), *Fish Physiology, Bioenergetics and Growth*. Academic Press, pp. 599–675.
- Briand, F.-P., 1975. Effects of power-plant cooling systems on marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 33, 135–146.
- Brook, A.J., Baker, A.L., 1972. Chlorination at Power Plants: Impact on Phytoplankton Productivity. *Science* 176, 1414–1415.  
doi:10.1126/science.176.4042.1414
- Brown, M.R., 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Av. En Nutr. Acuícola VI Mem. VI Simp. Int. Nutr. Acuícola* 3, 281–292.

- Brunet, C., Brylinski, J.M., Bodineau, L., Thoumelin, G., Bentley, D., Hilde, D., 1996. Phytoplankton dynamics during the spring bloom in the south-eastern English Channel. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 43, 469–483.
- Bruno, D.W., Dear, G., Seaton, D.D., 1989. Mortality associated with phytoplankton blooms among farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Aquaculture* 78, 217–222.  
doi:10.1016/0044-8486(89)90099-9
- Brusle, J., 1996. The impact of harmful algal blooms on finfish: mortality, pathology and toxicology. IFREMER, Plouzane.
- Brylinski, J.-M., Antajan, E., Raud, T., Vincent, D., 2012. First record of the Asian copepod *Pseudodiaptomus marinus* Sato, 1913 (Copepoda: Calanoida: Pseudodiaptomidae) in the southern bight of the North Sea along the coast of France. *Aquat. Invasions* 7, 577–584.
- Brzezinski, M.A., 1985. The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *J. Phycol.* 21, 347–357. doi:10.1111/j.0022-3646.1985.00347.x
- Buckley, L., Caldarone, E., Ong, T.-L., 1999. RNA—DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes, in: Zehr, J.P., Voytek, M.A. (Eds.), *Molecular Ecology of Aquatic Communities*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 265–277.
- Buckley, L.J., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* 80, 291–298. doi:10.1007/BF00392824
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., Gouilletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820.
- Burkholder, J.M., Noga, E.J., Hobbs, C.H., Glasgow, H.B., 1992. New “phantom” dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature* 358, 407–410. doi:10.1038/358407a0
- Burridge, L.E., Martin, J.L., Lyons, M.C., LeGresley, M.M., 2010. Lethality of microalgae to farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 308, 101–105.
- Buskey, E.J., Hyatt, C.J., 2006. Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae* 5, 685–692.  
doi:10.1016/j.hal.2006.02.003
- Cadée, G.C., Hegeman, J., 1986. Seasonal and annual variation in *Phaeocystis pouchetii* (haptophyceae) in the westernmost inlet of

- the Wadden Sea during the 1973 to 1985 period. *Neth. J. Sea Res.* 20, 29–36. doi:10.1016/0077-7579(86)90058-X
- Cadée, G.C., Hegeman, J., 2002. Phytoplankton in the Marsdiep at the end of the 20th century; 30 years monitoring biomass, primary production, and Phaeocystis blooms. *J. Sea Res., Structuring Factors of Shallow Marine Coastal Communities, Part I* 48, 97–110. doi:10.1016/S1385-1101(02)00161-2
- Caldarone, E.M., Wagner, M., St. Onge-Burns, J., Buckley, L.J., 2001. Protocol and guide for estimating nucleic acid in larval fish using a fluorescence microplate reader. Northeast Fisheries Science Center Reference Document.
- Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L., Albertano, P., 2005. On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *J. Plankton Res.* 27, 763–774. doi:10.1093/plankt/fbi050
- Carpenter, S.R., Kitchell, J.F., Hodgson, J.R., 1985. Cascading Trophic Interactions and Lake Productivity. *BioScience* 35, 634–639. doi:10.2307/1309989
- Casteleyn, G., Chepurnov, V.A., Leliaert, F., Mann, D.G., Bates, S.S., Lundholm, N., Rhodes, L., Sabbe, K., Vyverman, W., 2008. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae* 7, 241–257. doi:10.1016/j.hal.2007.08.004
- Cebrián, J., Valiela, I., 1999. Seasonal patterns in phytoplankton biomass in coastal ecosystems. *J. Plankton Res.* 21, 429–444.
- Chang, F.H., Anderson, C., Boustead, N.C., 1990. First record of a *Heterosigma* (Raphidophyceae) bloom with associated mortality of cage-reared salmon in Big Glory Bay, New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 24, 461–469. doi:10.1080/00288330.1990.9516437
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., 2008. RNA:DNA Ratio and Other Nucleic Acid Derived Indices in Marine Ecology. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1453–1471. doi:10.3390/ijms9081453
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C., Neefus, C., 2001. Integrating Seaweeds into Marine Aquaculture Systems: A Key Toward Sustainability. *J. Phycol.* 37, 975–986. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x
- Christaki, U., Kormas, K.A., Genitsaris, S., Georges, C., Sime-Ngando, T., Viscogliosi, E., Monchy, S., 2014. Winter–Summer

- Succession of Unicellular Eukaryotes in a Meso-eutrophic Coastal System. *Microb. Ecol.* 67, 13–23. doi:10.1007/s00248-013-0290-4
- Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 223–253.
- Colebrook, J.M., 1978. Continuous plankton records-zooplankton and environment, northeast Atlantic and North-Sea, 1948-1975. *Oceanol. Acta* 1, 9–23.
- Conides, A.J., Glamuzina, B., 2006. Laboratory simulation of the effects of environmental salinity on acclimation, feeding and growth of wild-caught juveniles of European sea bass *Dicentrarchus labrax* and gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 256, 235–245. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.029
- Corrales, R.A., Maclean, J.L., 1995. Impacts of harmful algae on seafarming in the Asia-Pacific areas. *J. Appl. Phycol.* 7, 151–162. doi:10.1007/BF00693062
- Cotonnec, G., Brunet, C., Sautour, B., Thoumelin, G., 2001. Nutritive Value and Selection of Food Particles by Copepods During a Spring Bloom of *Phaeocystis* sp. in the English Channel, as Determined by Pigment and Fatty Acid Analyses. *J. Plankton Res.* 23, 693–703. doi:10.1093/plankt/23.7.693
- Couturier, C.S., Rouault, A., McKenzie, D., Galois, R., Robert, S., Joassard, L., Claireaux, G., 2007. Effects of water viscosity upon ventilation and metabolism of a flatfish, the common sole *Solea solea* (L.). *Mar. Biol.* 152, 803–814. doi:10.1007/s00227-007-0731-z
- Dame, R., Dankers, N., Prins, T., Jongsma, H., Smaal, A., 1991. The influence of mussel beds on nutrients in the Western Wadden Sea and Eastern Scheldt estuaries. *Estuaries* 14, 130–138. doi:10.1007/BF02689345
- Davenport, J., Smith, R.J.J.W., Packer, M., 2000. Mussels *Mytilus edulis*: Significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 198, 131–137.
- De Baar, H.J.W., 1994. von Liebig's law of the minimum and plankton ecology (1899–1991). *Prog. Oceanogr.* 33, 347–386.
- Deeds, J.R., Terlizzi, D.E., Adolf, J.E., Stoecker, D.K., Place, A.R., 2002. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae)—a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae* 1, 169–189. doi:10.1016/S1568-9883(02)00027-6

- Delegrange, A., Vincent, D., Courcot, L., Amara, R., 2015. Testing the vulnerability of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to the Harmful Algal Bloom (HAB) species *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Aquaculture* 437, 167–174.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2014.11.023
- Desroy, N., Denis, L., 2004. Influence of spring phytodetritus sedimentation on intertidal macrozoobenthos in the eastern English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 270, 41–53.  
doi:10.3354/meps270041
- Downes-Tettmar, N., Rowland, S., Widdicombe, C., Woodward, M., Llewellyn, C., 2013. Seasonal variation in *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in the Western English Channel. *Cont. Shelf Res.* 53, 40–49. doi:10.1016/j.csr.2012.10.011
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., 2000. Design and First Results of CytoBuoy: A Wireless Flow Cytometer for In Situ Analysis of Marine and Fresh Waters. *Sci. Mar.* 64.  
doi:10.3989/scimar.2000.64n2255
- Escalera, L., Pazos, Y., Morono, Á., Reguera, B., 2007. *Noctiluca scintillans* may act as a vector of toxigenic microalgae. *Harmful Algae* 6, 317–320. doi:10.1016/j.hal.2006.04.006
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200–206. doi:10.1126/science.281.5374.200
- Farrington, C.W., 1988. Mortality and pathology of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to cultures of the marine diatom *Chaetoceros convolutus* (MSc Thesis). University of Alaska - Southeast, Juneau, Alaska.
- Fehling, J., Davidson, K., Bates, S.S., 2005. Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae* 4, 763–769.  
doi:10.1016/j.hal.2004.11.002
- Fehling, J., Davidson, K., Bolch, C., Tett, P., 2006. Seasonality of *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) in western Scottish waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 323, 91–105.
- Fernandes, L.F., Frassão-Santos, E.K., 2011. Mucilaginous species of *Thalassiosira Cleve emend: hasle* (Diatomeae) in South Brazilian waters. *Acta Bot. Bras.* 25, 31–42. doi:10.1590/S0102-33062011000100006

- Fernandes, L.F., Hubbard, K.A., Richlen, M.L., Smith, J., Bates, S.S., Ehrman, J., Léger, C., Mafra, L.L., Kulis, D., Quilliam, M., Libera, K., McCauley, L., Anderson, D.M., 2014. Diversity and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Gulf of Maine, Northwestern Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 103, 139–162. doi:10.1016/j.dsr2.2013.06.022
- Ferrante, M., Conti, G.O., Fiore, M., Rapisarda, V., Ledda, C., 2013. Harmful algal blooms in the Mediterranean Sea: effects on human health. *EuroMediterranean Biomed. J.* 8, 25–34.
- Fock, H., Greve, W., 2002. Analysis and interpretation of recurrent spatio-temporal patterns in zooplankton dynamics: a case study on *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae) in the German Bight (North Sea). *Mar. Biol.* 140, 59–73. doi:10.1007/s002270100685
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and challenges. Food & Agriculture Org, Rome.
- Forbes, J.R., 1991. Pacific coast research on toxic marine algae (Canadian technical report of hydrography and ocean sciences No. 135). Institute of Ocean Sciences. Department of Fisheries and Oceans, Sidney, B.C.
- Fortes, M., Ninot, G., Delignières, D., 2004. The hierarchical structure of the physical self: An idiographic and cross-correlational analysis. *Int. J. Sport Exerc. Psychol.* 2, 119–132.
- Frangópulos, M., Spyarakos, E., Guisande, C., 2011. Ingestion and clearance rates of the red *Noctiluca scintillans* fed on the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim). *Harmful Algae* 10, 304–309. doi:10.1016/j.hal.2010.11.002
- Fritz, L., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., Beale, A.M., Work, T.M., 1992. An Outbreak of Domoic Acid Poisoning Attributed to the Pennate Diatom *Pseudonitzschia Australis*. *J. Phycol.* 28, 439–442. doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00439.x
- Froese, R., 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 241–253. doi:10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x
- Fuiman, L., Batty, R., 1997. What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. *J. Exp. Biol.* 200, 1745–1755.
- Fukuyo, Y., Imai, I., Kodama, M., Tamai, K., 2002. Red tides and other harmful algal blooms in Japan. *Harmful Algal Blooms PICES*

- Reg. North Pac. Taylor FJRM Train. VL Eds PICES Sci. Rep. 7–20.
- Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Bustillos-Guzmán, J.J., 2007. Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (June-July 2006). Harmful Algae News Intergov. Oceanogr. Comm. 33, 6–7.
- Garet, E., Gonzalez-Fernandez, A., Lago, G., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2010. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Reference Methods for the Detection of Shellfish Hydrophilic Toxins in Several Presentations of Seafood. J. Agric. Food Chem. 58, 1410–1415.
- Gasparini, S., Daro, M.H., Antajan, E., Tackx, M., Rousseau, V., Parent, J.-Y., Lancelot, C., 2000. Mesozooplankton grazing during the *Phaeocystis globosa* bloom in the southern bight of the North Sea. J. Sea Res. 43, 345–356. doi:10.1016/S1385-1101(00)00016-2
- Gentilhomme, V., Lizon, F., 1998. Seasonal cycle of nitrogen and phytoplankton biomass in a well-mixed coastal system (Eastern English Channel). Hydrobiologia 361, 191–199. doi:10.1023/A:1003134617808
- Gibbs, M.M., Pickmere, S.E., Woods, P.H., Payne, G.W., James, M.R., Hickman, R.W., Illingworth, J., 1992. Nutrient and chlorophyll a variability at six stations associated with mussel farming in Pelorus Sound, 1984–85. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 26, 197–211. doi:10.1080/00288330.1992.9516515
- Glibert, P.M., Anderson, D.M., Gentien, P., Graneli, E., Sellner, K.G., 2005. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. Oceanography 18, 136–147.
- Gollasch, S., 2006. Overview on introduced aquatic species in European navigational and adjacent waters. Helgol. Mar. Res. 60, 84–89. doi:10.1007/s10152-006-0022-y
- Gómez, F., Souissi, S., 2008. The impact of the 2003 summer heat wave and the 2005 late cold wave on the phytoplankton in the north-eastern English Channel. C. R. Biol. 331, 678–685. doi:10.1016/j.crv.2008.06.005
- Gosselin, S., Fortier, L., Gagné, J.A., 1989. Vulnerability of marine fish larvae to the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 57, 1–10.
- Granéli, E., Turner, J.T., 2006. Ecology of Harmful Algae. Springer Science & Business Media.

- Grange, K., Cole, R., 1997. Mussel farming impacts. *Aquac. Update* 19, 1–3.
- Grattepanche, J.-D., Breton, E., Brylinski, J.-M., Lecuyer, E., Christaki, U., 2011a. Succession of primary producers and micrograzers in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis globosa* blooms. *J. Plankton Res.* 33, 37–50. doi:10.1093/plankt/fbq097
- Grattepanche, J.-D., Vincent, D., Breton, E., Christaki, U., 2011b. Microzooplankton herbivory during the diatom–*Phaeocystis* spring succession in the eastern English Channel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 404, 87–97. doi:10.1016/j.jembe.2011.04.004
- Guérin-Ancey, O., 1973. Contribution to the study of growth in the young *Dicentrarchus labrax* L. from the Gulf of Marseille. *Cah. Biol. Mar.* 14, 65–77.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, pp. 29–60.
- Guillard, R.R.L., Helleburst, J.A., 1971. Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis pouchetii*. *J. Phycol.* 330–338.
- Guiselin, N., Courcot, L., Artigas, L.F., Le Jéloux, A., Brylinski, J.-M., 2009. An optimised protocol to prepare *Phaeocystis globosa* morphotypes for scanning electron microscopy observation. *J. Microbiol. Methods* 77, 119–123. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.002
- Gulland, F.M., Haulena, M., Lander, M., Lowenstine, L.J., Spraker, T., Lipscomb, T., Van Dolah, F., Doucette, G., Powell, C., Trainer, V., others, 2000. Domoic Acid Toxicity in California Sea Lions (*Zalophus Californianus*) Stranded Along the Central California Coast, May-October 1998: Report to the National Marine Fisheries Service Working Group on Unusual Marine Mammal Mortality Events. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service.
- Hallegraeff, G.M., 1992. Harmful algal blooms in the Australian region. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 186–190. doi:10.1016/0025-326X(92)90223-S
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.
- Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview, in: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella, Paris, pp. 25–49.



- Harris, G.H., 1986. Phytoplankton ecology: Structure, function and fluctuation. Chapman and Hall, New York.
- Hasle, G.R., 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia cosmopolites*? *Harmful Algae* 1, 137–146. doi:10.1016/S1568-9883(02)00014-8
- Hasle, G.R., Lange, C.B., Syvertsen, E.E., 1996. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgoländer Meeresunters.* 50, 131–175.
- Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., 1997. Marine diatoms, in: *Identifying Marine Phytoplankton*. Tomas C.R., San Diego, pp. 5–385.
- Hatziathanasiou, A., Paspatis, M., Houbart, M., Kestemont, P., Stefanakis, S., Kentouri, M., 2002. Survival, growth and feeding in early life stages of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) intensively cultured under different stocking densities. *Aquaculture* 205, 89–102. doi:10.1016/S0044-8486(01)00672-X
- Hernández-Becerril, D.U., 1998. Species of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific coasts of Mexico. *Hydrobiologia* 379, 77–84.
- Hernández-Fariñas, T., Soudant, D., Barillé, L., Belin, C., Lefebvre, A., Bacher, C., 2014. Temporal changes in the phytoplankton community along the French coast of the eastern English Channel and the southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci.* 71, 821–833. doi:10.1093/icesjms/fst192
- Hoagland, P., Scatasta, S., 2006. The Economic Effects of Harmful Algal Blooms, in: Granéli, P.D.E., Turner, P.D.J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae, Ecological Studies*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 391–402.
- Holligan, P., Reiners, W.A., 1992. Predicting the responses of the coastal zone to global change, in: *Advances in Ecological Research: The Ecological Consequences of Global Climate Change*. Academic Press, pp. 211–255.
- Holmes, Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, B.A., Peterson, B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 1801–1808.
- Huang, C.-J., Dong, Q.-X., Zheng, L., 1999. Taxonomic and ecological studies on a large scale *Phaeocystis pouchetii* bloom in the Southeast coast of China during late 1997. *Oceanol. Limnol. Sin.*
- Huang, C., Qi, Y., 1997. The abundance cycle and influence factors on red tide phenomena of *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae) in

- Dapeng Bay, the South China Sea. *J. Plankton Res.* 19, 303–318.  
doi:10.1093/plankt/19.3.303
- Humphrey, C.A., Codi King, S., Klumpp, D.W., 2007. A multibiomarker approach in barramundi (*Lates calcarifer*) to measure exposure to contaminants in estuaries of tropical North Queensland. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1569–1581.  
doi:10.1016/j.marpolbul.2007.06.004
- Ibanez, F., Etienne, M., 1992. Le filtrage des séries chronologiques par l'analyse en composantes principales de processus (ACPP). *J Rech Océan.* 16, 27–33.
- Ibanez, F., Fromentin, J.-M., Castel, J., 1993. Application de la méthode des sommes cumulées à l'analyse des séries chronologiques en océanographie. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. 3 Sci. Vie* 316, 745–748.
- Ilestad, A.-M., Haugen, T.O., Sanger, A.C., 2011. Differential Habitat Use between Adult European Seabass and North Atlantic Cod in the Inner Oslo Fjord: Influence of Abiotic Environmental Variables, in: *American Fisheries Society Symposium*.
- Imai, I., 2005. Mitigation strategies against red tides by use of algicidal bacteria: application of seedweed beds as huge source of algicidal bacteria. Presented at the Proceedings of the 1st international workshop on HABs, Northwest Pacific Region, Toyama, Japan, pp. 99–105.
- Imai, I., Ishida, Y., Hata, Y., 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.* 116, 527–532. doi:10.1007/BF00355470
- Jahnke, J., 1989. The light and temperature dependence of growth rate and elemental composition of *Phaeocystis globosa* scherffel and *P. Pouchetii* (HAR.) Lagerh. in batch cultures. *Neth. J. Sea Res.* 23, 15–21. doi:10.1016/0077-7579(89)90038-0
- Jenkinson, I.R., 1986. Oceanographic implications of non-Newtonian properties found in phytoplankton cultures. *Nature* 323, 435–437.
- Jenkinson, I.R., 1989. Increases in viscosity may kill fish in some blooms.
- Jenkinson, I.R., 1993. Viscosity and elasticity of *Gyrodinium* cf. *aureolum* and *Noctiluca scintillans* exudates in relation to mortality of fish and damping of turbulence. 757–762.
- Jenkinson, I.R., Biddanda, B.A., 1995. Bulk-phase viscoelastic properties of seawater relationship with plankton components. *J. Plankton Res.* 17, 2251–2274.

- Jenkinson, I.R., Claireaux, G., Gentien, P., 2007. Biorheological properties of intertidal organic fluff on mud flats and its modification of gill ventilation in buried sole *Solea solea*. *Mar. Biol.* 150, 471–485. doi:10.1007/s00227-006-0340-2
- Jenkinson, I.R., Wyatt, T., 1995. Does bloom phytoplankton manage the physical oceanographic environment?, in: Harmful Marine Algal Blooms, Technique et Documentation. P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou, pp. 603–608.
- Joint, I., Pomroy, A., 1993. Phytoplankton biomass and production in the southern North Sea. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 99, 169–169.
- Jorgensen, K., Anderson, P., Thorbjornsen, B.R., 2009. Review of toxic episodes and management strategies in relation to Danish mussel production, in: ICMSS09. Presented at the symposcience, Nantes, France.
- Kaartvedt, S., Johnsen, T.M., Aksnes, D.L., Lie, U., Svendsen, H., 1991. Occurrence of the Toxic Phytoflagellate *Prymnesium parvum* and Associated Fish Mortality in a Norwegian Fjord System. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 2316–2323. doi:10.1139/f91-272
- Kaczmarek, I., Martin, J.L., Ehrman, J.M., LeGresley, M.M., 2007. Pseudo-nitzschia species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. *Harmful Algae* 6, 861–874. doi:10.1016/j.hal.2007.05.001
- Kaczmarek, I., Reid, C., Martin, J.L., Moniz, M.B.J., 2008. Morphological, biological, and molecular characteristics of the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* from the Canadian Maritimes. *Botany* 86, 763–772. doi:10.1139/B08-046
- Kalée, C.U., Ebenhöf, W., Wirtz, K., 2002. Living with Harmful Algal Blooms. HAB Management for Aquaculture Farms. Oldenburg.
- Karp-Boss, L., Boss, E., Jumars, P.A., 1996. Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 34, 70–107.
- Kent, M.L., Whyte, J.N.C., LaTrace, C., 1995. Gill lesions and mortality in seawater pen-reared Atlantic salmon *Salmo salar* associated with a dense bloom of *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira species*. *Dis. Aquat. Organ.* 22, 77–77.
- Kerambrun, E., Henry, F., Courcot, L., Gevaert, F., Amara, R., 2012a. Biological responses of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a polluted harbour. *Ecol. Indic.* 19, 161–171. doi:10.1016/j.ecolind.2011.06.035
- Kerambrun, E., Le Floch, S., Sanchez, W., Thomas Guyon, H., Meziane, T., Henry, F., Amara, R., 2012b. Responses of juvenile sea bass,

- Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere* 87, 692–702.  
doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.059
- Kesaulya, I., Leterme, S.C., Mitchell, J.G., Seuront, L., 2008. The impact of turbulence and phytoplankton dynamics on foam formation, seawater viscosity and chlorophyll concentration in the eastern English Channel.
- Kim, C.-H., Park, T.-G., Lee, C., 2010. Harmful Dinoflagellates and Mitigation Strategies in Korea. *Philipp. J. Sci.* 139, 139–147.
- Kim, H.G., 2006. Mitigation and Controls of HABs, in: Granéli, P.D.E., Turner, P.D.J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*, Ecological Studies. Springer Berlin Heidelberg, pp. 327–338.
- Kirk, J.T.O., 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press.
- Klein, C., Clauquin, P., Bouchart, V., Le Roy, B., Véron, B., 2010. Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae* 9, 218–226.  
doi:10.1016/j.hal.2009.10.004
- Kobayashi, K., Takata, Y., Kodama, M., 2009. Direct contact between *Pseudo-nitzschia multiseriata* and bacteria is necessary for the diatom to produce a high level of domoic acid. *Fish. Sci.* 75, 771–776. doi:10.1007/s12562-009-0081-5
- Kopuz, U., Feyzioglu, A.M., Valente, A., 2014. An Unusual Red-Tide Event of *Noctiluca scintillans* (Macartney) in the Southeastern Black Sea. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 14, 261–268.
- Laforsch, C., Tollrian, R., 2000. A new preparation technique of daphnids for Scanning Electron Microscopy using hexamethyldisilazane. *Arch. Hydrobiol.* 149, 587–596.
- Lagos, N., 1998. Microalgal blooms A global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.* 31, 375–386.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 104–112.
- Lamy, D., Artigas, L.F., Jauzein, C., Lizon, F., Cornille, V., 2006. Coastal bacterial viability and production in the eastern English Channel: A case study during a *Phaeocystis globosa* bloom. *J. Sea Res.* 56, 227–238. doi:10.1016/j.seares.2006.04.003

- Lancelot, C., Rousseau, V., Billen, G., Eeckhout, D.V., 1997. Coastal Eutrophication of the Southern Bight of the North Sea : Assesment and Modelling, in: Özsoy, E., Mikaelyan, A. (Eds.), Sensitivity to Change: Black Sea, Baltic Sea and North Sea, NATO ASI Series. Springer Netherlands, pp. 439–453.
- Landsberg, J.H., 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Rev. Fish. Sci.* 10, 113.
- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., Moraga, D., 2002. Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2705–2712.  
doi:10.1002/etc.5620211225
- Lavelle, P., Berhe, A.A., 2005. Nutrient Cycling. *Ecosyst. Hum. Well-Curr. State Trends Find. Cond. Trends Work. Group 1*, 331.
- Lecointre, G., Le Guyader, H., 2006. Classification phylogénétique du vivant. Belin.
- Lefebvre, A., Blondel, C., Cordier, R., Duquesne, V., Hébert, P., Vérin, F., 2014. Bulletin de surveillance de la qualité du milieu marin littoral 2013. Départements du Nord, Pas-de-Calais et de la Somme. Ifremer, Boulogne sur Mer, France.
- Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., Artigas, F.L., 2011. Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992–2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* 68, 2029–2043. doi:10.1093/icesjms/fsr149
- Lefebvre, K.A., Dovel, S.L., Silver, M.W., 2001. Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Mar. Biol.* 138, 693–700.
- Lefebvre, K.A., Frame, E.R., Kendrick, P.S., 2012. Domoic acid and fish behavior: A review. *Harmful Algae* 13, 126–130.  
doi:10.1016/j.hal.2011.09.011
- Lefebvre, K.A., Noren, D.P., Schultz, I.R., Bogard, S.M., Wilson, J., Eberhart, B.-T.L., 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 81, 266–274.  
doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.009
- Lefebvre, K.A., Powell, C.L., Busman, M., Doucette, C.J., Moeller, P.D.R., Sliver, J.B., Miller, P.E., Hughes, M.P., Singaram, S., Silver, M.W., Tjeerdema, R.S., 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an

- unusual mortality event. *Nat. Toxins* 7, 85–92.  
doi:10.1002/(SICI)1522-7189(199905/06)7:3<85::AID-NT39>3.0.CO;2-Q
- Lefebvre, K.A., Silver, M.W., Coale, S.L., Tjeerdema, R.S., 2002. Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. *Mar. Biol.* 140, 625–631.
- Le Fèvre, J., Grall, J.R., 1970. On the relationships of *Noctiluca* swarming off the western coast of Brittany with hydrological features and plankton characteristics of the environment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 4, 287–306. doi:10.1016/0022-0981(70)90040-7
- Legendre, P., Legendre, L.F.J., 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier.
- Lelong, A., Hégarret, H., Soudant, P., 2014. Link between domoic acid production and cell physiology after exchange of bacterial communities between toxic *Pseudo-nitzschia multiseriata* and non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Mar. Drugs* 12, 3587–3607. doi:10.3390/md12063587
- Lelong, A., Hégarret, H., Soudant, P., Bates, S.S., 2012a. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51, 168–216. doi:10.2216/11-37.1
- Lelong, A., Jolley, D.F., Soudant, P., Hégarret, H., 2012b. Impact of copper exposure on *Pseudo-nitzschia* spp. physiology and domoic acid production. *Aquat. Toxicol.* 118-119, 37–47. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.010
- Le Saux, J.-C., Pommepuy, M., 2003. La purification des coquillages. Risques Sanit. Liés Aux Coquillages Doss. SIA-Pour FCD.
- Liefer, J.D., Robertson, A., MacIntyre, H.L., Smith, W.L., Dorsey, C.P., 2013. Characterization of a toxic *Pseudo-nitzschia* spp. bloom in the Northern Gulf of Mexico associated with domoic acid accumulation in fish. *Harmful Algae* 26, 20–32. doi:10.1016/j.hal.2013.03.002
- Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Borojević, K.K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P., Đakovac, T., 2011. Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae* 10, 713–722. doi:10.1016/j.hal.2011.06.002
- Longhurst, A.R., Harrison, G.W., 1989. The biological pump: Profiles of plankton production and consumption in the upper ocean. *Prog. Oceanogr.* 22, 47–123. doi:10.1016/0079-6611(89)90010-4

- Lorenzen, C.J., 1966. A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 13, 223–227. doi:10.1016/0011-7471(66)91102-8
- Luna-Acosta, A., Lefrançois, C., Millot, S., Chatain, B., Bégout, M.-L., 2011. Physiological response in different strains of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Swimming and aerobic metabolic capacities. *Aquaculture* 317, 162–167. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.004
- Lundholm, N., Clarke, A., Ellegaard, M., 2010. A 100-year record of changing *Pseudo-nitzschia* species in a sill-fjord in Denmark related to nitrogen loading and temperature. *Harmful Algae* 9, 449–457. doi:10.1016/j.hal.2010.03.001
- Lundholm, N., Moestrup, O., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., Miller, P., 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analysis. *J. Phycol.* 42, 464–481. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00211.x
- MacDonald, B.A., Robinson, S.M.C., Barrington, K.A., 2011. Feeding activity of mussels (*Mytilus edulis*) held in the field at an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) site (*Salmo salar*) and exposed to fish food in the laboratory. *Aquaculture* 314, 244–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.01.045
- Macintyre, H.L., Stutes, A.L., Smith, W.L., Dorsey, C.P., Abraham, A., Dickey, R.W., 2011. Environmental correlates of community composition and toxicity during a bloom of *Pseudo-nitzschia* spp. in the northern Gulf of Mexico. *J. Plankton Res.* 33, 273–295. doi:10.1093/plankt/fbq146
- Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta* 1, 493–509.
- Maršić-Lučić, J., Mladineo, I., Tudor, M., 2005. Comparative effectiveness of 2-phenoxyethanol and Propiscin as anesthetics for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquac. Int.* 13, 543–553. doi:10.1007/s10499-005-9005-2
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., Ramos-Enriquez, R., 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 4, 158–178.
- Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Mar. Pollut. Bull., The Oceans and Human Health* 53, 620–630. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.08.006

- McNamara, J.M., Buchanan, K.L., 2005. Stress, resource allocation, and mortality. *Behav. Ecol.* 16, 1008–1017.  
doi:10.1093/beheco/ari087
- Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R.V., Jost, S., Ottenwälder, B., Schlötterer, C., Boenigk, J., 2010. Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Mol. Ecol.* 19 Suppl 1, 32–40. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04478.x
- Millot, S., Péan, S., Leguay, D., Vergnet, A., Chatain, B., Bégout, M.-L., 2010. Evaluation of behavioral changes induced by a first step of domestication or selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A self-feeding approach under repeated acute stress. *Aquaculture* 306, 211–217.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2010.04.027
- Mitchell, J.G., Okubo, A., Fuhrman, J.A., 1985. Microzones surrounding phytoplankton form the basis of a stratified marine microbial ecosystem. *Nature* 316, 58–59.
- Mohamed, Z.A., Mesaad, I., 2007. First report on *Noctiluca scintillans* blooms in the Red Sea off the coasts of Saudi Arabia: consequences of eutrophication. *Oceanologia* 49.
- Monchy, S., Grattepanche, J.-D., Breton, E., Meloni, D., Sancier, G., Chabé, M., Delhaes, L., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Christaki, U., 2012. Microplanktonic Community Structure in a Coastal System Relative to a Phaeocystis Bloom Inferred from Morphological and Tag Pyrosequencing Methods. *PLoS ONE* 7, e39924. doi:10.1371/journal.pone.0039924
- Montani, null, Pithakpol, null, Tada, null, 1998. Nutrient regeneration in coastal seas by *Noctiluca scintillans*, a red tide-causing dinoflagellate. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 224–228.
- Moschandreou, K.K., Nikolaidis, G., 2010. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Greek coastal waters. *Bot. Mar.* 53.  
doi:10.1515/BOT.2010.014
- Mos, L., 2001. Domoic acid: A fascinating marine toxin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9, 79–85. doi:10.1016/S1382-6689(00)00065-X
- Mourente, G., Bell, J.G., 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comp.*



- Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 145, 389–399.  
doi:10.1016/j.cbpb.2006.08.012
- Mullin, J.B., Riley, J.P., 1955. The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Anal. Chim. Acta* 12, 162–176. doi:10.1016/S0003-2670(00)87825-3
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture* 246, 467–481.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.046
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., Claquin, P., 2014. Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 505, 49–64. doi:10.3354/meps10772
- Napoléon, C., Raimbault, V., Fiant, L., Riou, P., Lefebvre, S., Lampert, L., Claquin, P., 2012. Spatiotemporal dynamics of physicochemical and photosynthetic parameters in the central English Channel. *J. Sea Res.* 69, 43–52.  
doi:10.1016/j.seares.2012.01.005
- Nash, R.D., Valencia, A.H., Geffen, A.J., 2006. The origin of Fulton's condition factor—setting the record straight. *Fisheries* 31, 236–238.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C., 2004. Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231, 361–391.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2003.11.015
- Nezan, E., Chomerat, N., Bilien, G., Boulben, S., Duval, A., Ryckaert, M., 2010. *Pseudo-nitzschia australis* on French Atlantic coast—an unusual toxic bloom. *Harmful Algae News* 1–2.
- Nguyen, N.V., Tung, L.T., Thanh, N.C., Hoa, V.M., 2012. Red tides in Halong Bay, Vietnam caused serious loss in aquaculture., in: *Proceedings of the International Conference on Bien Dong 2012. Presented at the International conference on Bien Dong, Institute of Oceanography, Nha Trang, Vietnam*, p. 146.
- Noin, D., 1999. La population des littoraux du monde. *Inf. Géographique* 63, 65–73. doi:10.3406/ingeo.1999.2632

- Ogilvie, S.C., Ross, A.H., Schiel, D.R., 2000. Phytoplankton biomass associated with mussel farms in Beatrix Bay, New Zealand. *Aquaculture* 181, 71–80. doi:10.1016/S0044-8486(99)00219-7
- Okaichi, T., Nishio, S., 1976. Identification of ammonia as the toxic principle of red tide of *Noctiluca miliaris*. *Bull. Plankton Soc. Jpn.* 25–30.
- OSPAR Commission, 2009. Eutrophication Status of the OSPAR Maritime Area. Second OSPAR integrated report. (No. 372/2008), Eutrophication Series.
- Otto, L., Zimmerman, J.T.F., Furnes, G.K., Mork, M., Saetre, R., Becker, G., 1990. Review of the physical oceanography of the North Sea. *Neth. J. Sea Res.* 26, 161–238. doi:10.1016/0077-7579(90)90091-T
- Papoutsoglou, S.E., Tziha, G., Vrettos, X., Athanasiou, A., 1998. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.* 18, 135–144. doi:10.1016/S0144-8609(98)00027-2
- Park, T.G., Lim, W.A., Park, Y.T., Lee, C.K., Jeong, H.J., 2013. Economic impact, management and mitigation of red tides in Korea. *Harmful Algae* 30, S131–S143. doi:10.1016/j.hal.2013.10.012
- Parsons, M.L., Dortch, Q., Doucette, G.J., 2013. An assessment of Pseudo-nitzschia population dynamics and domoic acid production in coastal Louisiana. *Harmful Algae* 30, 65–77. doi:10.1016/j.hal.2013.09.001
- Parsons, M.L., Dortch, Q., Turner, R.E., 2002. Sedimentological evidence of an increase in Pseudo-nitzschia (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnol. Oceanogr.* 47, 551–558.
- Parsons, T.R., Harrison, P.J., 1983. Nutrient Cycling in Marine Ecosystems, in: Lange, P.D.O.L., Nobel, P.P.S., Osmond, P.C.B., Ziegler, P.D.H. (Eds.), *Physiological Plant Ecology IV*, *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 85–115.
- Paspatis, M., Boujard, T., Maragoudaki, D., Kentouri, M., 2000. European sea bass growth and N and P loss under different feeding practices. *Aquaculture* 184, 77–88. doi:10.1016/S0044-8486(99)00313-0

- Passow, U., 2002. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Prog. Oceanogr.* 55, 287–333. doi:10.1016/S0079-6611(02)00138-6
- Pauly, D., Christensen, V., 1995. Primary production required to sustain global fisheries. *Nature* 255–257.
- Peres, J.-M., Laborde, P., Romano, J.-C., Desouzalima, Y., 1986. A *Noctiluca scintillans* red tide on the coast of provence in June 1984. A Dynamic Interpretation, in: *Annales de l'Institut Océanographique*. Institut Océanographique Service des publications, 195 Rue Saint-Jacques, 75005 Paris, France, pp. 85–116.
- Perl, T.M., Bédard, L., Kosatsky, T., Hockin, J.C., Todd, E.C.D., Remis, R.S., 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N. Engl. J. Med.* 322, 1775–1780.
- Person-Le Ruyet, J., Mahé, K., Le Bayon, N., Le Delliou, H., 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 237, 269–280. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.04.021
- Petersen, J.K., Bougrier, S., Smaal, A.C., Garen, P., Robert, S., Larsen, J.E.N., Brummelhuis, E., 2004. Intercalibration of mussel *Mytilus edulis* clearance rate measurements. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 267, 187–194.
- Pettersson, L.H., Durand, D.D., Svendsen, E., Soiland, H., Groom, S., 2001. DeciDe for near real-time use of ocean colour data in management of harmful algae blooms - Final report (Technical report No. 200). Bergen, Norway.
- Pitcher, G.C., Probyn, T.A., 2011. Anoxia in southern Benguela during the autumn of 2009 and its linkage to a bloom of the dinoflagellate *Ceratium balechii*. *Harmful Algae* 11, 23–32. doi:10.1016/j.hal.2011.07.001
- Poornima, E.H., Rajadurai, M., Rao, V.N.R., Narasimhan, S.V., Venugopalan, V.P., 2006. Use of coastal waters as condenser coolant in electric power plants: Impact on phytoplankton and primary productivity. *J. Therm. Biol.* 31, 556–564. doi:10.1016/j.jtherbio.2006.05.009
- Quevedo, M., Gonzalez-Quiros, R., Anadon, R., 1999. Evidence of heavy predation by *Noctiluca scintillans* on *Acartia clausi* (Copepoda) eggs off the central Cantabrian coast (NW Spain). *Oceanol. Acta* 22, 127–131. doi:10.1016/S0399-1784(99)80039-5

- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K.B., De la Iglesia, P., Diogène, J., Fortuño, J.M., Camp, J., 2010. *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. *Sci. Mar.* 74, 395–410.  
doi:10.3989/scimar.2010.74n2395
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Flo, E., Fernandez-Tejedor, M., Diogène, J., Camp, J., 2008a. Bloom dynamics of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in two coastal bays (NW Mediterranean Sea). *Sci. Mar.* 72, 577–590.
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., Van Lenning, K., Flo, E., Andree, K., Fortuño, J.-M., Camp, J., 2008b. Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Sci Mar* 72, 343–359.
- Quilliam, M.A., Wright, J.L., 1989. The amnesic shellfish poisoning mystery. *Anal. Chem.* 61, 1053A–106A.  
doi:10.1021/ac00193a002
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17–23. doi:10.1016/S0025-326X(02)00227-8
- Rätz, H.-J., Lloret, J., 2003. Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. *Fish. Res.* 60, 369–380.  
doi:10.1016/S0165-7836(02)00132-7
- R Core Team, 2012. R: A language and environmet for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Read, P., Fernandes, T., 2003. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture, Management of Aquaculture Effluents* 226, 139–163. doi:10.1016/S0044-8486(03)00474-5
- Redfield, A.C., Ketchoum, B.H., Richards, F.A., 1963. The influence of organisms on composition of seawater. *The Sea* 2, 26–77.
- Reid, G.K., Liutkus, M., Bennett, A., Robinson, S.M.C., MacDonald, B., Page, F., 2010. Absorption efficiency of blue mussels (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) feeding on Atlantic salmon (*Salmo salar*) feed and fecal particulates: Implications for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 299, 165–169.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2009.12.002
- Reid, P.C., Lancelot, C., Gieskes, W.W.C., Hagmeier, E., Weichart, G., 1990. Phytoplankton of the North Sea and its dynamics: A

- review. Neth. J. Sea Res. 26, 295–331. doi:10.1016/0077-7579(90)90094-W
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Øie, G., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. Aquaculture, Proceedings of the fish and shellfish Larviculture Symposium LARVI '95 155, 207–221. doi:10.1016/S0044-8486(97)00118-X
- Rensel, J.E., 1991. Harmful effects of the diatom *Chaetoceros concavicornis* on atlantic salmon, in: Canadian Technical Report of Hydrography and Ocean Sciences. Presented at the Pacific coast research on toxic marine algae, J.R. Forbes, Canada, p. 9.
- Rhodes, L., Jiang, W., Knight, B., Adamson, J., Smith, K., Langi, V., Edgar, M., 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand: analysis of the last decade's monitoring data. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 47, 490–503. doi:10.1080/00288330.2013.803489
- Ricker, W.E., 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada.
- Riegman, R., Noordeloos, A.A.M., Cadée, G.C., 1992. Phaeocystis blooms and eutrophication of the continental coastal zones of the North Sea. Mar. Biol. 112, 479–484. doi:10.1007/BF00356293
- Riisgård, H., Larsen, P., 2010. Particle capture mechanisms in suspension-feeding invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 418, 255–293. doi:10.3354/meps08755
- Riisgård, H.U., Egede, P.P., Barreiro Saavedra, I., 2011. Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: new observations, with a minireview of current knowledge. J. Mar. Biol. 2011, 1–13. doi:10.1155/2011/312459
- Riisgård, H.U., Kittner, C., Seerup, D.F., 2003. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 284, 105–127. doi:10.1016/S0022-0981(02)00496-3
- Riisgård, H.U., Lassen, J., Kittner, C., 2006. Valve-gape response times in mussels (*Mytilus edulis*)-effects of laboratory preceding-feeding conditions and in situ tidally induced variation in phytoplankton biomass. J. Shellfish Res.
- Rodger, H.D., Henry, L., Mitchell, S.O., 2011. Non-infectious gill disorders of marine salmonid fish. Rev. Fish Biol. Fish. 21, 423–440. doi:10.1007/s11160-010-9182-6

- Rogers, S.I., Lockwood, S.J., 1990. Observations on coastal fish fauna during a spring bloom of *Phaeocystis pouchetii* in the eastern Irish Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 70, 249–253.
- Roque D’Orbcastel, E., Lemarié, G., Breuil, G., Petochi, T., Marino, G., Triplet, S., Dutto, G., Fivelstad, S., Coeurdacier, J.-L., Blancheton, J.P., 2009. Effects of rearing density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) biological performance, blood parameters and disease resistance in a flow through system. *Aquat. Living Resour.* 23, 109 – 117. doi:10.1051/alr/2009056
- Rousseau, V., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Jacobsen, A., Verity, P., Whipple, S., 2007. The life cycle of Phaeocystis: state of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry* 83, 29–47. doi:10.1007/s10533-007-9085-3
- Rousseau, V., Lantoine, F., Rodriguez, F., LeGall, F., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Lancelot, C., 2013. Characterization of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae), the blooming species in the Southern North Sea. *J. Sea Res.* 76, 105–113. doi:10.1016/j.seares.2012.07.011
- Rousseau, V., Leynaert, A., Daoud, N., Lancelot, C., 2002. Diatom succession, silicification and silicic acid availability in Belgian coastal waters (Southern North Sea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 236, 61–73.
- Salas, R., Tillmann, U., John, U., Kilcoyne, J., Burson, A., Cantwell, C., Hess, P., Jauffrais, T., Silke, J., 2011. The role of *Azadinium spinosum* (Dinophyceae) in the production of azaspiracid shellfish poisoning in mussels. *Harmful Algae* 10, 774–783. doi:10.1016/j.hal.2011.06.010
- Saroglia, M.G., Scarano, G., Tibaldi, E., 2009. Acute toxicity of nitrite to sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and european eel (*Anguilla anguilla*). *J. World Maric. Soc.* 12, 121–126. doi:10.1111/j.1749-7345.1981.tb00285.x
- Sautour, B., Artigas, L.F., Delmas, D., Herbland, A., Laborde, P., 2000. Grazing impact of micro- and mesozooplankton during a spring situation in coastal waters off the Gironde estuary. *J. Plankton Res.* 22, 531–552. doi:10.1093/plankt/22.3.531
- Sazhin, A.F., Artigas, L.F., Nejstgaard, J.C., Frischer, M.E., 2007. The colonization of two Phaeocystis species (Prymnesiophyceae) by pennate diatoms and other protists: a significant contribution to colony biomass. *Biogeochemistry* 83, 137–145. doi:10.1007/s10533-007-9086-2

- Schapira, M., Vincent, D., Gentilhomme, V., Seuront, L., 2008. Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 88, 649–662. doi:10.1017/S0025315408001306
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 32, 379–401. doi:10.1016/j.aquaeng.2004.09.001
- Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, V., Lancelot, C., 2005. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review. *J. Sea Res., Iron Resources and Oceanic Nutrients - Advancement of Global Environmental Simulations* 53, 43–66. doi:10.1016/j.seares.2004.01.008
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marin Iii, R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van Dolah, F.M., 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403, 80–84. doi:10.1038/47481
- Schreck, C.B., Moyle, P.B., 1990. *Methods for fish biology*, American Fisheries Society. ed. USA.
- Selleslagh, J., 2008. *Fonctionnement des nourriceries intertidales et estuariennes : influence de l’environnement sur la dynamique et les performances physiologiques de l’ichtyofaune*. Université du Littoral Côte d’Opale.
- Seuront, L., Lacheze, C., Doubell, M.J., Seymour, J.R., Van Dongen-Vogels, V., Newton, K., Alderkamp, A.-C., Mitchell, J.G., 2007. The influence of *Phaeocystis globosa* on microscale spatial patterns of chlorophyll a and bulk-phase seawater viscosity. *Biogeochemistry* 83, 173–188. doi:10.1007/s10533-007-9097-z
- Seuront, L., Vincent, D., 2008. Increased seawater viscosity, *Phaeocystis globosa* spring bloom and *Temora longicornis* feeding and swimming behaviours. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 363, 131–145. doi:10.3354/meps07373
- Seuront, L., Vincent, D., Mitchell, J.G., 2006. Biologically induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring bloom. *J. Mar. Syst.* 61, 118–133. doi:10.1016/j.jmarsys.2005.04.010

- Shen, M., Xu, J., Chiang, M.W.L., Au, D.W.T., 2011. Unravelling the pathway of respiratory toxicity in goldlined seabream (*Rhabdosargus sarba*) induced by the harmful alga *Chattonella marina*. *Aquat. Toxicol.* 104, 185–191.  
doi:10.1016/j.aquatox.2011.04.014
- Sherr, E., Sherr, B.F., 1988. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnol. Oceanogr.* 33, 1225–1227.
- Shumway, S.E., 1990. A Review of the Effects of Algal Blooms on Shellfish and Aquaculture. *J. World Aquac. Soc.* 21, 65–104.  
doi:10.1111/j.1749-7345.1990.tb00529.x
- Sierra-Beltran, A.P., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35, 447–453.
- Simon, N., Cras, A.-L., Foulon, E., Lemée, R., 2009. Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C. R. Biol.* 332, 159–170.  
doi:10.1016/j.crv.2008.09.009
- Skov, J., Lundholm, N., Moestrup, O., Larsen, J., 1999. LEAFLET NO 185. Potentially Toxic Phytoplankton 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/Bacillariophyceae). ICAS Identif. Leaflet. Plankton 1–23.
- Smaal, A.C., Twisk, F., 1997. Filtration and absorption of *Phaeocystis* cf. *globosa* by the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 33–46.
- Smayda, T.J., 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnol Ocean.* 1132–1136.
- Spilmont, N., Denis, L., Artigas, L.F., Caloin, F., Courcot, L., Créach, A., Desroy, N., Gevaert, F., Hacquebart, P., Hubas, C., Janquin, M.-A., Lemoine, Y., Luczak, C., Migné, A., Rauch, M., Davoult, D., 2009. Impact of the *Phaeocystis globosa* spring bloom on the intertidal benthic compartment in the eastern English Channel: a synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 55–63.  
doi:10.1016/j.marpolbul.2008.09.007
- Springate, S.D., 2012. The effect of sample size and bias on the reliability of estimates of error: a comparative study of Dahlberg's formula. *Eur. J. Orthod.* 34, 158–163.  
doi:10.1093/ejo/cjr010
- Stanley, E.M., Batten, R.C., 1969. Viscosity of sea water at moderate temperatures and pressures. *J. Geophys. Res.* 74, 3415–3420.  
doi:10.1029/JC074i013p03415



- Stauffer, B., Gellene, A., Schnetzer, A., Seubert, E., Oberg, C., Sukhatme, G., Caron, D., 2012. An oceanographic, meteorological, and biological “perfect storm” yields a massive fish kill. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 468, 231–243. doi:10.3354/meps09927
- Stelfox-Widdicombe, C.E., Archer, S.D., Burkill, P.H., Stefels, J., 2004. Microzooplankton grazing in *Phaeocystis* and diatom-dominated waters in the southern North Sea in spring. *J. Sea Res.* 51, 37–51. doi:10.1016/j.seares.2003.04.004
- Stonik, I.V., Orlova, T.Y., Shevchenko, O.G., 2001. Morphology and ecology of the species of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russ. J. Mar. Biol.* 27, 362–366.
- Swan, S.C., Davidson, K., 2012. monitoring program for the presence of toxin producing plankton in shellfish producing areas in Scotland (No. FS315019/PAU179E). Scottish Association for Marine Science, Scotland.
- Tester, P.A., Turner, J.T., Shea, D., 2000. Vectorial transport of toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium breve* through copepods to fish. *J. Plankton Res.* 22, 47–62.
- Thangaraja, M., Al-Aisry, A., Al-Kharusi, L., 2007. Harmful algal blooms and their impacts in the middle and outer ROPME sea area. *Int. J. Oceans Oceanogr.* 2, 85–98.
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G., 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14, 271–300. doi:10.1016/j.hal.2011.10.025
- Trainer, V.L., Wells, M.L., Cochlan, W.P., Trick, C.G., Bill, B.D., Baugh, K.A., Beall, B.F., Herndon, J., Lundholm, N., others, 2009. An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast. *Limnol. Oceanogr.* 54, 1461.
- Treasurer, J.W., Hannah, F., Cox, D., 2003. Impact of a phytoplankton bloom on mortalities and feeding response of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in west Scotland. *Aquaculture* 218, 103–113. doi:10.1016/S0044-8486(02)00516-1
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A.H., Fang, J.-G., 2009. Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore

- systems. *Aquaculture* 297, 1–9.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.010
- Trottet, A., Roy, S., Tamigneaux, E., Lovejoy, C., Tremblay, R., 2008. Impact of suspended mussels (*Mytilus edulis* L.) on plankton communities in a Magdalen Islands lagoon (Québec, Canada): A mesocosm approach. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 365, 103–115.  
doi:10.1016/j.jembe.2008.08.001
- Turner, J.T., 2006. Harmful Algae Interactions with Marine Planktonic Grazers, in: Granéli, P.D.E., Turner, P.D.J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*, Ecological Studies. Springer Berlin Heidelberg, pp. 259–270.
- Uhlig, G., Sahling, G., 1990. Long-term studies on *Noctiluca scintillans* in the German Bight population dynamics and red tide phenomena 1968–1988. *Neth. J. Sea Res.* 25, 101–112.  
doi:10.1016/0077-7579(90)90012-6
- Valente, L.M.P., Bandarra, N.M., Figueiredo-Silva, A.C., Cordeiro, A.R., Simões, R.M., Nunes, M.L., 2007. Influence of conjugated linoleic acid on growth, lipid composition and hepatic lipogenesis in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture, Nutrition and Feeding of Fish* This Special Issue presents a small fraction of the presentations presented at the XII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding held in Biarritz, France, May 28 to June 1, 2006. 267, 225–235.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.008
- Van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J., 1999. Amnesic shellfish poisoning: A review (RIVM report No. 388802 019). National Institute of Public Health and the Environment, Netherlands.
- Van den Steen, I., Wayens, B., Wolff, E., 2005. Evolution de l'utilisation du sol le long du littoral belge. *Belgeo* 327–347.
- Varsamos, S., Flik, G., Pepin, J.F., Bonga, S.E.W., Breuil, G., 2006. Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 83–96.  
doi:10.1016/j.fsi.2005.04.005
- Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Ruano, M., Tanner, S., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2009. Juvenile fish condition in estuarine nurseries along the Portuguese coast. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 82, 128–138. doi:10.1016/j.ecss.2009.01.002
- Verity, P.G., Whipple, S.J., Nejstgaard, J.C., Alderkamp, A.-C., 2007. Colony size, cell number, carbon and nitrogen contents of

- Phaeocystis pouchetii* from western Norway. J. Plankton Res. 29, 359–367. doi:10.1093/plankt/fbm021
- Vinagre, C., Ferreira, T., Matos, L., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2009. Latitudinal gradients in growth and spawning of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and their relationship with temperature and photoperiod. Estuar. Coast. Shelf Sci. 81, 375–380. doi:10.1016/j.ecss.2008.11.015
- Von Herbing, I.H., Keating, K., 2003. Temperature-induced changes in viscosity and its effects on swimming speed in larval haddock, in: The Big Fish Bang. Presented at the 26th Annual Larval Fish Conference, Howard I. Browman and Anne Berit Skiftesvik, Bergen, Norway.
- Waite, R.P., 1989. The nutritional biology of *Perna canaliculus* with special reference to intensive mariculture systems.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry 14, 136–143.
- Walz, P.M., Garrison, D.L., Graham, W.M., Cattey, M.A., Tjeerdema, R.S., Silver, M.W., 1994. Domoic acid-producing diatom blooms in Monterey Bay, California: 1991–1993. Nat. Toxins 2, 271–279.
- White, A.W., 1980. Recurrence of kills of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) caused by dinoflagellate toxins transferred through herbivorous zooplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 2262–2265. doi:10.1139/f80-271
- White, A.W., 1981. Marine zooplankton can accumulate and retain toxins and cause fish kills. Limnol. Oceanogr. 26, 103–109.
- Widdicombe, C.E., Eloire, D., Harbour, D., Harris, R.P., Somerfield, P.J., 2010. Long-term phytoplankton community dynamics in the Western English Channel. J. Plankton Res. 32, 643–655. doi:10.1093/plankt/fbp127
- Work, T.M., Barr, B., Beale, A.M., Quilliam, M.A., Wright, J.L., 1993. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. J. Zoo Wildl. Med. 54–62.
- Wyatt, T., 2014. Margalef's mandala and phytoplankton bloom strategies. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr., Harmful Algal Blooms in Stratified Systems 101, 32–49. doi:10.1016/j.dsr2.2012.12.006

- Yang, C.Z., Albright, L.J., 1992. Effects of the harmful diatom *Chaetoceros concavicornis* on respiration of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* 14, 105–114.
- Yung, Y.-K., Wong, C.K., Broom, M.J., Ogden, J.A., Chan, S.C.M., Leung, Y., 1997. Long-term changes in hydrography, nutrients and phytoplankton in Tolo Harbour, Hong Kong, in: Wong, Y.-S., Tam, N.F.-Y. (Eds.), *Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 107–115.
- Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y., Nishio, S., Shida, Y., Noguchi, T., 1997. Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon* 35, 205–212.  
doi:10.1016/S0041-0101(96)00123-7
- Zingone, A., Enevoldsen, H.O., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast. Manag.* 43, 725–748. doi:10.1016/S0964-5691(00)00056-9
- Zingone, A., Oksfeldt Enevoldsen, H., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast. Manag.* 43, 725–748.



---

## **ANNEXES**

---



## ANNEXE 1

Résumé soumis pour une présentation sous forme de poster à *Aquaculture conference: To the Next 40 Years of sustainable Global Aquaculture*. Las Palmas, Gran Canaria, Espagne. 3 – 7 Novembre 2013

### **Relation between phytoplankton blooms and fish farming mortality: a case study in the southern North Sea.**

A. DELEGRANGE<sup>1,2,3</sup>, D. VINCENT<sup>1,2,3</sup>, L. COURCOT<sup>1,2,3</sup>, A. BONNARD<sup>4</sup>, F. GAINE<sup>4</sup> and R. AMARA<sup>1,2,3</sup>

1 Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France ; 2 ULCO, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F-62930 Wimereux, France ; 3 CNRS UMR 8187, F-62930 Wimereux, France ; 4 AQUANORD SA

Naturally occurring phytoplankton blooms have been responsible for acute mortalities of wild and farmed fish worldwide. Direct adverse effects of phytoplankton on fish can be physical gill irritations and excess mucus production leading to hypoxia. Phytotoxins may also damage gills which can end up in osmoregulatory problems and trigger fish inappetence.

For several years mass mortalities (>20 tons over April-May) in *Dicentrarchus labrax* reared at the fish farm Aquanord (Gravelines, southern North Sea) have been recurrently recorded at the wane of the spring bloom. As mortality could not be explained by classical diseases such as parasitism or bacterial infection (e.g. vibriosis), an annual survey was carried out *in situ* and in rearing basins from March 2012 to July 2013 to characterize phytoplankton communities, their variability and potential effect on fish mortality.

Hydrological parameters (i.e. temperature, salinity) followed a classical seasonal cycle. Phytoplankton bloom occurred in April (14mg Chla L<sup>-1</sup>). It was characterized by typical species from the North Sea (*Phaeocystis globosa*) along with chain-forming diatoms (*Chaetoceros* sp., *Rhizosolenia* sp. and *Guinardia* sp.) having highly silicified spines. Gills observation (mucus production, stuck diatoms) highlighted potential mechanical damages by *Rhizosolenia imbricata* and *P. globosa* colonies. Additionally, species from the *Pseudo-nitzschia* genus were SEM identified (*P. pseudodelicatissima* and *P. pungens*) and domoic acid detected for the first time in the area at concentrations as high as 155 pg ml<sup>-1</sup> during the bloom. pH values highlighted a drastic decrease of about 1.5 units in June 2012 which could be related to a *Noctiluca scintillans* bloom. Despite the presence of potentially toxic and/or mechanically damaging species, no mortality linked to the bloom could be emphasized. Results revealed the need to develop long term monitoring of water quality supplied to the fish farming basins and to propose solution to dampen phytoplankton bloom impact on fish.



# Relation between phytoplankton blooms and fish farming mortality: a case study in the Southern North Sea.



A. Delegrange<sup>1,2,3</sup>, D. Vincent<sup>1,2,3</sup>, L. Courcot<sup>1,2,3</sup>, A. Bonnard<sup>4</sup>, F. Gaine<sup>4</sup>, R. Amara<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Univ Lille Nord de France, France, <sup>2</sup>ULCO, Université du Littoral Côte d'Opale, France, <sup>3</sup>Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences LOG, UMR CNRS 8187, France, <sup>4</sup>Aquanord S.A. France.



### INTRODUCTION

In Northern France, a fish farm rearing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is confronted to recurrent massive mortality episodes (up to 20 tons loss over April-May) coinciding with the wane of the phytoplankton spring bloom (Fig. 1).

Fig. 1: Seasonal sea bass mortality in Aquanord S.A. (% week<sup>-1</sup>) averaged over 1995–2012. The green rectangle stands for the phytoplankton spring bloom period.

As mortalities cannot be explained by classical diseases encountered in fish farms (e.g. parasitism, bacterial infections such as vibriosis), the objective of our work was to characterize whether phytoplankton communities in seawater fuelling the rearing basins over an annual cycle (February – November 2012) could impact fish health conditions due to their potential toxicity, form (needle shaped) or physiology (viscosity, acidity).

### PHYTOPLANKTON COMMUNITIES

Phytoplankton taxonomy and standing stock: twice a month, Utermöhl settling method.  
Chlorophyll a concentration: twice a week, fluorimetry.

Phytoplankton species were grouped into 6 categories according to their shape and potential phyco toxin production (i.e. *Pseudo-nitzschia* producing domoic acid - Fig. 2).

Results highlighted a *Phaeocystis globosa*/*Pseudo-nitzschia* dominated spring bloom (March to May) followed by a secondary bloom in July comprising mainly *Guinardia delicatula*.

Critical periods with regard to fish health conditions are highlighted by arrows on Fig. 2 and discussed below

Fig. 2: Chlorophyll a concentration (µg L<sup>-1</sup>) and phytoplankton groups relative abundances over the survey.

Optimal hydrological conditions (light, temperature, nutrients, hydrodynamism)

**Phytoplankton blooms**

**HARMFUL ALGAL BLOOM**  
Proliferation of some phytoplankton species

deleterious effects on marine organisms (potentially toxic, high biomass producers which can cause hypoxia, mechanical damages...)

**Mass mortalities of wild and farmed fish worldwide**

### POTENTIAL EFFECT OF PHYTOPLANKTON COMMUNITIES ON FISH HEALTH CONDITION

#### Mechanical effects and needle shaped species

Single needle shaped and spinned chain forming diatoms are detected throughout the survey (Fig. 2 & 3) peaking in May to value as high as 1.9 10<sup>6</sup> cell L<sup>-1</sup>.

Their impact on fish concern essentially skin and gills membranes that could be irritated via sticking and clogging.

Fig. 3: Abundance of spinned chain forming diatoms (pink) and single needle shaped diatoms (green).

**Spinned chain forming diatoms**

**Single needle shaped diatoms**

#### *Pseudo-nitzschia* sp. and Domoic Acid production

*Pseudo-nitzschia* sp. identification: SEM [1]  
Domoic Acid (DA) measurements: ELISA method [2]

*Pseudo-nitzschia* sp. SEM identification revealed that the dominant species was *P. delicatissima* (Fig. 4 A) peaking to 7.5 10<sup>6</sup> cell L<sup>-1</sup> in May. This diatom is not reported to produce DA [3] and was accompanied by 2 other DA producing species (Fig. 4 B-C).

In fact, DA concentration (Fig. 5) in the field ranging from 66 to 283 µg ml<sup>-1</sup> coincided with the peak of *P. fraudulenta* et *P. pungens*. This concentration is higher than those published by Downes-Letterman et al. [4]. This emphasize the need to focus on this particular species in the future and to assess its potential impact on fish during specific exposure experiments.

Fig. 4: SEM pictures of the 3 *Pseudo-nitzschia* species observed over the survey in 2012. A. *P. delicatissima*, B. *P. pungens*, C. *P. fraudulenta*

Fig. 5: Total (black) and dissolved (grey) domoic acid concentration (µg mL<sup>-1</sup>). Green triangles stands for SEM identified samples.

Clogging → **GILLS** → **BREATHING DIFFICULTIES** → **LOW HEALTH CONDITIONS** → **DEATH**

Sticking Irritation → **SKIN**

Sticking Irritation → **BREATHING DIFFICULTIES**

OSMOREGULAR PERTURBATIONS → **BREATHING DIFFICULTIES**

#### *Phaeocystis globosa* and viscosity

*Phaeocystis globosa* bloomed in April reaching concentrations as high as 4.10<sup>6</sup> Cells L<sup>-1</sup>. This concentration is highly comparable to published work in the area [5]. Although *P. globosa* is not a toxic species per se, its impact on seawater viscosity (250% excess viscosity) and marine organisms [6] has already been demonstrated.

Fish gill clogging by mucopolysaccharide secretion has been demonstrated a number of times [7] and may lead to breathing difficulties.

#### *Noctiluca scintillans* bloom and acidity increase

Between the end of June and the end of July, a bloom of the dinoflagellate *Noctiluca scintillans* was observed. It resulted in a drastic decrease of pH values of about 1.5 units (Fig. 4). Acidity increase is known to have deleterious effects on marine organisms essentially on respiratory mechanisms [8].

Fig. 6: pH evolution during the in-situ survey. The blue rectangle stands for the pH decrease linked to the *Noctiluca scintillans* bloom.

### CONCLUSIONS

Phytoplankton communities observed during year 2012 were susceptible to directly (mechanical impacts, toxicity) or indirectly (bacterial infection induced by previous irritation) impact on fish health conditions. Surprisingly, no massive mortality event was recorded this year which opened new research perspectives:

Can *Pseudo-nitzschia* sp. and domoic acid have a deleterious effect on fish?

Juvenile sea bass/ *Pseudo-nitzschia* sp. exposure experiment

Is it possible to dampen phytoplankton blooms mechanical impact on fish health?

Bio-filtration of seawater fuelling seabass rearing basins

see poster by Delegrange et al. on this specific topic

Acknowledgements: A. Delegrange PhD is funded by the Région Nord-Pas-de-Calais and Syndicat Mixte de la Côte d'Opale. This work is also funded by a collaborative research convention between the Laboratory of Oceanography and Geosciences (LOG, UMR CNRS 8187) and Aquanord S.A.



References [1] Quijón-Sánchez, I., García, S., Tarampi, E., van Langen, E. N., C. Alvarez, J.M. Pardo, J. Camp - 2008. Identification and characterization of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyta) observed along the NE Spanish coast (Cataluña, NE Mediterranean). *Scientia Marina* 72(2): 343-359 [2] D.M. Ullrich, C.H. Steffen, S.F.L. Beierlein, C. Stewart, V.L. Young, K.M. Kocum, P.E. Moore, A. Hansen, C. Hertz, E.A. Johnson, B.F. Frankenburg, G.J. Smith, A. Schmitt, J. Schmittner, J.L. Bastien, A. Ghel, F. Gosselin, D. LaBelle, D. A. Havelson, P.A. Tester - 2009. Rapid Environmental Assessment using the detection of the algal toxin domoic acid. *Journal of Shellfish Research* 27 (3): 1303 - 1310. [3] A. Laing, M. Hargrave, P. Bourdeau, L. S. Bates - 2011. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) species, domoic acid and amoxicillin resistance: re-evaluating previous paradigms. *Phycologia* 50(5). [4] Downes-Letterman, S. Research, C. Woodcock, M. Woodcock, C. University - 2012. Seasonal variation in *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in the Western English Channel. *Continental Shelf Research* 43: 40 - 49. [5] L. Secor, D. Vincent, F. G. Mitchell - 2006. Biological induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring bloom. *Journal of Marine Systems* 61: 238 - 248. [6] I. Hines van Hanberg and A. Laing - 2005. Temperature-induced changes in viscosity and its effects on swimming speed of larval seabass. Published by the Institute of Marine Research, Postbox 1870 Norderås, NS-617, Bergen. [7] J. Jørgensen, M. Christensen, E. Sønder, P. 2007. "Biochemical properties of microbial organic matter" mud flat and the modification of pH-viscosity in brackish water "blue water". *Marine Biology* vol. 150, p.141 - 148. [8] D. C. McDonald. The effects of H<sup>+</sup> upon the gills of freshwater fish. *Revue canadienne de zoologie*, 1983, 61(4): 681-389.

# ANNEXE 2



## Research Article

### The invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 along the English Channel and the North Sea French coasts: another introduction pathway in northern European waters?

Elvire Antajan<sup>1\*</sup>, Thomas Bastian<sup>2</sup>, Thomas Raud<sup>2</sup>, Jean-Michel Brylinski<sup>2</sup>, Stefan Hoffman<sup>3</sup>, Gérard Breton<sup>4</sup>, Vincent Cornille<sup>2</sup>, Alice Delegrange<sup>2</sup> and Dorothée Vincent<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IFREMER, 150 quai Gambetta, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

<sup>2</sup>Université du Littoral Côte d'Opale, ULCO, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, LOG UMR CNRS 8187, 32 av. Foch, F-62930 Wimereux, France

<sup>3</sup>Institute for Agricultural and Fisheries Research, Animal Sciences Unit – Fisheries, Ankerstraat 1, 8400 Oostende, Belgium

<sup>4</sup>Association Port Vivant, 6 rue des Réservoirs, F-76600 Le Havre, France

E-mail: Elvire.Antajan@ifremer.fr (EA), Thomas.Bastian@univ-littoral.fr (TB), Thomas.Raud@univ-littoral.fr (TR),

jean-michel.brylinski@univ-littoral.fr (JMB), Stefan.hoffman@ilvo.vlaanderen.be (SH), gerardbreton@free.fr (GB),

Vincent.Cornille@univ-littoral.fr (VC), Alice.Delegrange@univ-littoral.fr (AD), Dorothée.Vincent@univ-littoral.fr (DV)

\*Corresponding author

Received: 24 February 2014 / Accepted: 21 March 2014 / Published online: 14 April 2014

Handling editor: Demetrio Boltovskoy

#### Abstract

The presence of *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 along the French coasts of the Eastern English Channel and the North Sea (EEC-NS) was established via morphological observation and molecular evidence. The earliest records were from surveys carried out in autumn 2005 in Le Havre harbour (Bay of Seine, EEC) and coincided with the historical introduction of the species in other Northern European waters. Since 2009, the species has also been frequently observed along the French coast of the North Sea. Results indicate *M. leidyi* has established a self-sustaining population in the Bay of Seine, which may act as a source population for northern European harbours via commercial shipping.

**Key words:** ctenophore, invasive species, *Mnemiopsis leidyi*

#### Introduction

The voracious zooplanktivore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 is a lobate ctenophore native to the Atlantic coasts of North and South America (Gesamp 1997). This eurythermic and euryhaline species can tolerate a wide range of environmental conditions (Kremer 1994; Purcell et al. 2001). These features, together with its regeneration (Henry and Martindale 2000) and reproductive ability (self-fertile hermaphrodite with high fecundity and rapid growth rates), explain the success of *M. leidyi* as an invasive species (Baker and Reeve 1974; Costello et al. 2006; Jaspers et al. 2011). The establishment of *M. leidyi* had severe ecological and economic impacts in the Black Sea in the 1980's (Shiganova 1998) and in the Caspian Sea in the late 1990's (Roohi et al. 2010). Consequently, recent (since 2005)

discoveries of this species in Norwegian fjords (Oliveira 2007; Hosaia et al. 2011), the Baltic Sea (Hansson 2006; Javidpour et al. 2006; Kube et al. 2007), Danish territorial waters (Tendal et al. 2007), the German Bight (Boersma et al. 2007), the Netherlands (Faasse and Bayha 2006) and in Belgian coastal waters (Dumoulin 2007; Van Ginderdeuren et al. 2012), has alarmed the scientific community, especially as these northern European waters are amongst the world's most important fishing grounds. However, work by Hamer et al. (2011) concludes that the densities of *M. leidyi* currently observed in northern waters do not represent a threat to eggs and fish larvae, although they might compete with larval fishes for small plankton prey and it is unknown whether the species represents an immediate ecological threat. In this context, the aim of this article is to document the first records of *M. leidyi* along the French coasts



## ANNEXE 3

Résumé soumis pour une présentation sous forme de poster à *Aquaculture conference: To the Next 40 Years of sustainable Global Aquaculture*. Las Palmas, Gran Canaria, Espagne. 3 – 7 Novembre 2013.

### **Seawater biofiltration: mussels as a tool to prevent phytoplankton blooms impact on farmed fish (*Dicentrarchus labrax*) ?**

A. DELEGRANGE<sup>1,2,3</sup>, D. VINCENT<sup>1,2,3</sup>, M. DURET<sup>1,2,3</sup>, V. CORNILLE<sup>1,2,3</sup>, M. LAREAL<sup>1,2</sup>, T. RAUD<sup>1,2,3</sup>, A. BONNARD<sup>4</sup>, F. GAINE<sup>4</sup> and R. AMARA<sup>1,2,3</sup>

*1 Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France ; 2 ULCO, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F-62930 Wimereux, France ; 3 CNRS UMR 8187, F-62930 Wimereux, France ; 4 AQUANORD S.A., F-59820 Gravelines, France ; [alice.delegrange@gmail.com](mailto:alice.delegrange@gmail.com)*

Because filter-feeding bivalves such as the blue mussel (*Mytilus edulis*) are known to be efficient seawater purifiers clearing dissolved and particulate matter (e.g. phytoplankton) with rates ranging from 1 to 7 L h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, they have been used as natural filters for seawater supplying juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) farming basins.

A 45 days mesocosm experiment was carried out during the 2013 phytoplankton spring bloom (April-May) to assess whether mussel filtration dampen algal blooms impact on fish health and condition compared to controls receiving bulk seawater.

Efficient mussel filtration resulted in 2 to 5 times decrease in *in vivo* fluorescence, up to 4 times decrease in suspended matter concentrations and 5 to 10 times decrease in *Chla* concentrations. Fish receiving biofiltered seawater had a significantly higher Fulton condition index ( $1.04 \pm 0.09$ ) than those bred in control tanks ( $1.01 \pm 0.08$ ) after 35 days ( $p$ -value < 0.005). The same observation holds for integrated weight based growth rates reaching 0.38 g j<sup>-1</sup> in bio-filtered tanks compared to controls (0.33 g j<sup>-1</sup>). Fish gills in control tanks often presented phytoplankton mechanical damages which can lead to hypoxia and anoxia. In fact, stuck diatoms (*Rhizosolenia*, *Paralia sulcata*) and mucus production were often observed whereas in bio-filtered tanks no such damages were highlighted. Our results suggest that mussels could be use as a tool to increase water quality and hence production rates in fish farming, given specific cultivation modes and maintenance for both fish and mussels are used.



# Seawater bio-filtration: mussels as a tool to prevent phytoplankton blooms impact on farmed fish (*Dicentrarchus labrax*)?



A. Delegrange<sup>1,2,3</sup>, D. Vincent<sup>1,2,3</sup>, M. Duret<sup>1,2,3</sup>, V. Cornille<sup>1,2,3</sup>, M. Laréal<sup>1,2,3</sup>, A. Bonnard<sup>4</sup>, F. Gaine<sup>4</sup>, R. Amara<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille Nord de France, France, <sup>2</sup>ULCO, Université du Littoral Côte d'Opale, France, <sup>3</sup>Laboratoire d'Océanologie et de Pisciculture ULCO, UMR CNRS 8187, France, <sup>4</sup>Aquarord S.A. France, \*alice.delegrange@univ-littoral.fr



## Introduction

Under optimal hydrological conditions (e.g. light, temperature, nutrients, hydrodynamics) phytoplankton can form massive spring blooms in temperate seas [1]. Some phytoplankton blooming species (e.g. potentially toxic, high biomass producers...) can form Harmful Algal Blooms (HAB) and have deleterious effects on marine organisms (e.g. potentially toxic, high biomass producers...) and particularly on fish triggering health alterations and mortalities [2] - Fig. 1.

HABs are responsible for high mortalities in fish farms worldwide [3]. In Aquarord S.A. a fish farm in the Southern North Sea (France), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) mortalities recurrently occur in spring and coincide with the phytoplankton spring bloom (Fig. 2).

As blue mussels (*Mytilus edulis*) are known to be efficient seawater purifiers with clearance rates ranging from 1 to 7 L g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [4] they can reduce particulate matter concentrations. They can also consume high amount of phytoplankton (20,8 mg Chl a m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) [5] resulting in a reduction of phytoplankton biomass.

In order to reduce phytoplankton blooms effects on juvenile sea bass growth and condition, mussels were used as natural filters for the seawater rearing juvenile sea bass rearing basins.

The specific objectives of this study were:  
 -> To quantify the phytoplankton spring bloom reduction due to mussels bio-filtration.  
 -> To estimate whether seawater quality improvement linked to mussels bio-filtration in rearing basins had an effect on juvenile sea bass growth and condition.

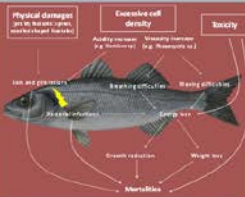


Fig. 1: Synthetic scheme of HAB potential effects on fish.

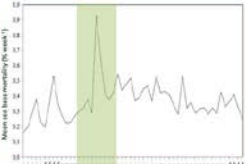
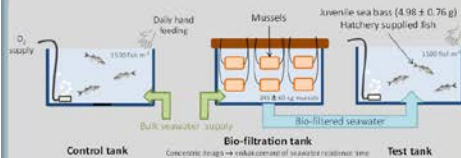


Fig. 2: Seasonal sea bass mortality in Aquarord S.A. (N/week) averaged over 1995-2012. The green rectangle stands for the phytoplankton spring bloom period.

## Materials and Methods

### EXPERIMENTAL DESIGN

- 7 days acclimation
- 35 days mesocosm (5m<sup>3</sup>) experiment



SAMPLING STRATEGY	
Control parameters	Filtration efficiency assessment
✓ Temperature (°C)	✓ Chlorophyll a concentration (µg L <sup>-1</sup> )
✓ Salinity	✓ Phaeophytin concentration (µg L <sup>-1</sup> )
✓ pH	✓ Turbidity (NTU)
✓ Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	

Time	Parameters
T0	• Mortality rate
T3	• Gills observations (mucous production, diatoms)
T7	• Weight (W in g) and length (L in mm)
T10	• Integrated weight based growth rate (g d <sup>-1</sup> )
T14	• Fulton condition index (K in g cm <sup>-3</sup> )
T17	• RNA/DNA ratio (metabolic activity)
T21	
T24	
T28	
T31	
T35	

References: [1] Rogers, L., Harris, R.P., Head, K.N., Harbour, D., 2006. North Atlantic Oscillation and Spring Bloom Phytoplankton Composition in the English Channel. J. Plankton Res., 28, 2297-2312. [2] Puigg, L., 1996. The Impact of Harmful Algal Blooms on Fish. Mortality, Pathology and Toxicology 7(1). [3] Treasure, S.W., Hankins, F., Cox, D., 2000. Impact of a Phytoplankton Bloom on Mortality and Feeding Response of Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in West Scotland. Aquaculture 181, 109-113. [4] Petersen, J.A., Bougrier, S., Smalå, A.C., Sørensen, S., Larsen, J.E.N., Bruemmelhuus, E., 2004. Interrelation of Mussel *Mytilus edulis* Clearance Rate Measurements. Mar. Technol. Prog. Ser. 267, 157-154. [5] Dame, R., Daniels, N., Piers, T., Jongsomjit, S., Smalå, A., 1993. The Influence of Mussel Beds on Numbers in the Western Wadden Sea and Eastern Scheldt Estuaries. Estuaries 16, 130-134.

Acknowledgements: A. Delegrange PhD is funded by the Region Nord-Pas-de-Calais and Syndicat Mixte de la Côte d'Opale. This work is also funded by a collaborative research convention between the Laboratory of Oceanography and Geosciences (ULCO UMR CNRS 8187) and Aquarord S.A.

## Results

### Mussels bio-filtration efficiency

- Despite a high mussels mortality rate (20 to 50%), mussels filtration efficiency resulted in:
- A 5 to 12 times decrease of chlorophyll a concentration in the test tank compared to control tank (KW, p < 0.01).
  - A significant decrease of phaeophytin and phaeopigment concentrations (µg L<sup>-1</sup>) (KW, p < 0.05 - Fig. 3 A)
  - A decrease in turbidity (KW, p < 0.01 - Fig. 3 B)

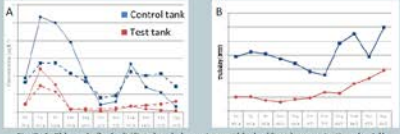


Fig. 3: A. Chlorophyll a (solid lines) and phaeopigment concentrations (µg L<sup>-1</sup>) and B. Turbidity (NTU) in control tanks (blue) and test tanks (red)

### Seawater quality improvement

### Effect of seawater quality improvement on juvenile sea bass condition and growth

During the experiment, fish mortality was low in both control and test tanks (<0.05 week<sup>-1</sup>). No differences in mortality rate were observed between the two conditions.

### No effect on mortality

After 35 days experiment fish receiving bio-filtered seawater had a significantly higher Fulton condition index (U-test, p < 0.05) and a higher integrated weight based growth rate (U-test, p < 0.01) than those reared in bulk seawater.

RNA/DNA ratio measured in fish muscles is a proxy of metabolic activity and appeared to be significantly higher in test compared to control tanks (U-test, p < 0.01).

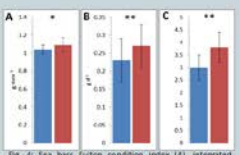


Fig. 4: Sea bass Fulton condition index (A), integrated weight based growth rate (B) and RNA/DNA ratio (C) after 35 days experiment in control (blue) and in test tanks (red). \*\* highly significant difference (p < 0.01); \* significant difference (p < 0.05).

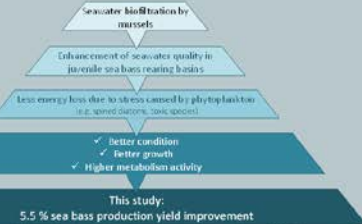
### Better condition, growth and higher metabolic activity

Microscopic observations revealed diatoms occurrence in control fish gills at T14, T28 and T35 days (Fig. 5). Moreover these observations showed excessive mucous quantities in gills rakers in both conditions at T7 and only in control tanks at T21. Mucous secretion is a defense mechanism against mechanical aggressions of spined diatoms.



Fig. 5: Example of diatoms observed in control fish gills: *Paralella sulcata* (A), *Rhizosolenia imbricatella* (B), *Pseudoisera nobilis* (C).

## Conclusions



## ANNEXE 4

Résumé soumis pour une présentation orale au Forum des Jeunes Océanographes, Union des Océanographes Français, Saint Valery sur Somme, France. 16 octobre 2013. (prix de la meilleure communication orale)

### **Amélioration de la croissance et de la condition de juvéniles de bars (*Dicentrarchus labrax*) grâce à la biofiltration de l'eau de mer par des moules (*Mytilus edulis*)**

A. Delegrange<sup>1,2,3</sup>, D. Vincent<sup>1,2,3</sup>, M. Duret<sup>1,2,3</sup>, V. Cornille<sup>1,2,3</sup>, M. Laréal<sup>1,3</sup>, T. Raud<sup>1,2,3</sup>, A. Bonnard<sup>4</sup>, F. Gaine<sup>4</sup> et R. Amara<sup>1,2,3</sup>

1 Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. 2 Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR CNRS 8187, F-62930 Wimereux, France. 3 Université du Littoral Côte d'Opale, F-62930 Wimereux. 4 Aquanord S.A., F-59820 Gravelines, France.

Des mortalités récurrentes de bars (*Dicentrarchus labrax*) pouvant atteindre 20% des mortalités annuelles sont observées à Aquanord (ferme piscicole, Gravelines, France) et coïncident avec l'efflorescence phytoplanctonique printanière en Mer du Nord. Afin de limiter l'impact de l'efflorescence phytoplanctonique sur la condition et la croissance des juvéniles de bars (*Dicentrarchus labrax*), des moules ont été utilisées comme filtre biologique en amont des bassins piscicoles au cours d'une expérience de 40 jours en mésocosmes.

La mise en place d'un tel système de filtration biologique a permis l'amélioration significative de la qualité de l'eau de mer en termes de matériel particulaire réduisant 5 à 12 fois la concentration en chlorophylle *a* et jusqu'à 4 fois la turbidité. Les poissons ont présenté une meilleure croissance ( $2,88 \pm 0,44 \text{ \%} \cdot \text{j}^{-1}$ ) lorsqu'ils étaient élevés dans de l'eau de mer filtrée que ceux ayant été élevés dans de l'eau de mer non filtrée ( $2,59 \pm 0,44 \text{ \%} \cdot \text{j}^{-1}$ ). Ces poissons avaient aussi une meilleure condition avec un indice de Fulton de  $1,08 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$  contre  $1,03 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$  et un rapport ARN/ADN plus élevé ( $3,8 \pm 0,6$  contre  $3,0 \pm 0,5$ ) indiquant un métabolisme plus performant.

Nos résultats suggèrent que les moules pourraient être utilisées comme outil permettant d'augmenter la qualité de l'eau et, par conséquent, les taux de production dans les fermes piscicoles. Il sera cependant nécessaire d'adapter les techniques d'élevage pour le maintien des moules et des poissons au sein des mêmes infrastructures.

**Enhancement of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*)  
growth and condition using seawater biofiltration by mussels  
(*Mytilus edulis*)**

**A. Delegrange**<sup>1,2,3</sup>, D. Vincent<sup>1,2,3</sup>, M. Duret<sup>1,2,3</sup>, V. Cornille<sup>1,2,3</sup>, M. Laréal<sup>1,3</sup>, T. Raud<sup>1,2,3</sup>, A. Bonnard<sup>4</sup>, F. Gaine<sup>4</sup> et R. Amara<sup>1,2,3</sup>

1 Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. 2 Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR CNRS 8187, F-62930 Wimereux, France. 3 Université du Littoral Côte d'Opale, F-62930 Wimereux. 4 Aquanord S.A., F-59820 Gravelines, France.

Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) mortalities are recurrently observed in Aquanord, a fish farm in the Southern North Sea. These mortalities coincide with the phytoplankton spring bloom and can be as high as 20% of the annual fish loss. In order to reduce the phytoplankton bloom impact on juvenile sea bass growth and condition, a 40 days mesocosm experiment (5 m<sup>3</sup>) was carried out during the 2013 spring bloom. During this experiment, mussels (*Mytilus edulis*) were used as natural filters for the seawater fuelling juvenile sea bass rearing basins.

The establishment of such a filtration system ensures a significant enhancement of water quality in terms of particulate matter resulting in a 4 and 12 times decrease in chl<sub>a</sub> concentration and turbidity, respectively. Fish receiving biofiltered seawater had a better condition with a significantly higher Fulton index (1.08±0.08 mg mm<sup>-3</sup>) than those reared in control tanks receiving bulk seawater (1.03±0.08 mg mm<sup>-3</sup>). Due to seawater mussels filtration, fish had a better weight based growth rate (2.88±0.44 % d<sup>-1</sup> against 2.59±0.44 % d<sup>-1</sup>) and a higher metabolism measured through the RNA/DNA ratio (3.8±0.6 against 3.0±0.5) than controls.

Even if the rearing technics need to be improved to efficiently maintain mussels and fish in the same rearing facilities, our results suggest that mussels could be used as tools to enhance water quality and hence production rate in temperate marine fish farms.

## Résumé

Depuis les années 1980, la production aquacole a progressé de plus de 50% afin de répondre à la demande alimentaire d'une population humaine en constante augmentation. Le développement d'installations piscicoles en zones côtières, qu'il s'agisse de fermes à terre ou de cages en mer, les soumet aux contraintes environnementales et en particulier, les expose à des phénomènes naturels difficilement contrôlables tels que les efflorescences phytoplanctoniques. En mer du Nord, des mortalités printanières massives de bars (*Dicentrarchus labrax*; > 20 tonnes en avril-mai) sont observées dans une ferme aquacole. Ces mortalités semblent coïncider avec le développement et le déclin de l'efflorescence phytoplanctonique printanière et n'ont pas pu être expliquées par des pathologies aquacoles classiques (e.g. infections virales et bactériennes, parasitisme). Dans ce contexte, des effets délétères induits par le phytoplancton ont été suspectés et étudiés par le biais de quatre volets de recherche.

La première étape de cette étude a été de caractériser la coïncidence entre l'efflorescence phytoplanctonique printanière et l'augmentation des mortalités à l'échelle pluriannuelle (2005 – 2013). Une analyse de données a permis d'établir une corrélation entre les données hebdomadaires de mortalité de poissons et les données de biomasse et d'abondance spécifique du phytoplancton. Elle a aussi conduit à l'identification de taxons potentiellement délétères de par leur toxicité potentielle (diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*), leur impact sur le milieu (viscosité et anoxie; *Phaeocystis globosa*) et/ou leur forme piquante (*Rhizosolenia*, *Pseudo-nitzschia*).

Un suivi saisonnier des communautés phytoplanctoniques conduit de Février à Novembre 2012, ainsi qu'au printemps 2013, dans l'eau d'alimentation de la ferme aquacole a permis d'identifier les espèces potentiellement délétères pour les poissons en considérant les dommages mécaniques et/ou toxiques qu'elles peuvent engendrer. Cette partie du travail s'est intéressée aux diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* dont la diversité spécifique n'avait jusqu'alors pas été étudiée en baie sud de la mer du Nord. La microscopie électronique à balayage (MEB) a permis l'identification de 3 espèces: *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* et *P. pungens*. Les concentrations en acide domoïque associées à la présence de ces diatomées démontrent sans équivoque la toxicité de *P. pungens* en automne et suggère une toxicité de *P. fraudulenta* et *P. delicatissima*. L'étude des conditions environnementales et biologiques (e.g. communautés phytoplanctoniques accompagnatrices) favorables à leur apparition met en évidence une limitation en azote et l'association entre *P. delicatissima* et *P. globosa*.

*Pseudo-nitzschia delicatissima* étant l'une des diatomées dominantes au cours du printemps 2012, son éventuelle implication dans les mortalités de juvéniles de bars a été étudiée au cours d'une expérience d'exposition de 45 jours. Une irritation des branchies illustrée par la production excessive de mucus sur



l'épithélium branchial a été observée, suggérant un stress d'exposition. Cependant, ce stress n'a pas eu d'incidence sur la condition des poissons ni sur leurs performances physiologiques. Il en ressort que les mortalités observées *in situ* seraient davantage liées à un effet de communautés plutôt qu'à une seule espèce.

Cette dernière hypothèse a été testée en utilisant le pouvoir de filtration des moules (*Mytilus edulis*, bivalves suspensivores) en amont des bassins d'élevage. L'idée était ici de vérifier si la filtration biologique de l'eau de mer permettait de limiter l'ampleur de l'efflorescence phytoplanctonique printanière et ainsi, d'améliorer la condition et les performances physiologiques des juvéniles de bar. Cette étude a démontré que les poissons élevés dans de l'eau préalablement filtrée par les moules avaient effectivement une meilleure condition (indice K) et de meilleures performances physiologiques (croissance, rapport ARN : ADN) que ceux élevés dans l'eau de mer non filtrée.

Ce travail de thèse souligne la nécessité de généraliser le suivi des communautés phytoplanctoniques dans les régions aquacoles afin d'identifier les espèces potentiellement délétères et de mieux comprendre leur dynamique. A ce titre le développement de méthodes de détection rapide d'espèces potentiellement délétères et de toxines apparaît fondamental pour une gestion optimale des exploitations aquacoles. Il démontre également l'importance de l'approche expérimentale pour tester et développer de nouveaux outils de mitigation permettant d'atténuer l'impact des efflorescences phytoplanctoniques sur l'aquaculture.

**Mots clefs:** *Dicentrarchus labrax*, Aquaculture, Efflorescence d'algues nuisibles (Harmful Algal blooms), ichtyotoxicité (Acide domoïque), expériences d'exposition, outils de mitigation

## **Abstract.**

To balance human growing food demand, aquaculture production has increase by more than 50% since the 1980s. Developed fish farms in coastal areas (e.g. inland fish farms or cages) are thus exposed to environmental constraints, particularly, to unmanageable natural events such as phytoplankton blooms. In a coastal fish farm of the North Sea, sea bass mass mortalities (*Dicentrarchus labrax*, >20 tons over April-May) often coincide with the spring bloom but cannot be explained by classical finfish diseases (e.g. bacterial and viral infections, parasitism). In this context, deleterious effects induces by phytoplankton were suspected and investigated during a four-step approach.

Firstly, studies focused on co-occurrence between phytoplankton blooms and fish mortality increase over the 2005-2013 period. Data analyses carried out allowed to correlate weekly fish mortality to phytoplankton standing stocks and taxonomy as well as to identify potential deleterious taxa with regard to their toxicity (e.g. *Pseudo-nitzschia*), their effects on seawater properties (e.g. viscosity and anoxia, *Phaeocystis globosa*) and the mechanical damages they can trigger (e.g. sharp and needle-shaped diatoms; *Rhizosolenia*, *Pseudo-nitzschia*).

Secondly, seasonal surveys carried out in seawater fuelling the fish farm from February to November 2012 and during spring 2013, allowed an acute identification of deleterious phytoplankton species considering mechanical damages and/or toxicity. Species belonging to the *Pseudo-nitzschia* genus have seldom been identified in the area and were thus specifically targeted. Scanning Electron Microscopy analyses (SEM) allowed to acknowledge a rather low diversity of *Pseudo-nitzschia* spp. as only three species (*P. delicatissima*, *P. fraudulenta* and *P. pungens*) were present in 2012 and 2013. Associated domoic acid concentrations unambiguously revealed the autumnal toxicity of *P. pungens* whereas toxicity could only be suggested during spring for both *P. fraudulenta* and *P. delicatissima*. Environmental and biological parameters (e.g. associated phytoplankton communities) measured over these surveys revealed that *Pseudo-nitzschia* sp. were present under nitrogen limiting conditions and highlighted a strong association between *P. delicatissima* and *P. globosa* bloom. Thirdly, since *P. delicatissima* was the dominant diatom during the 2012 spring bloom, its implication in juvenile sea bass mortalities was tested during a 45-day fish-diatom exposure experiment. Although *P. delicatissima* did not produce domoic acid, it seemed to affect gills integrity which was visible by mucus overproduction. Stress induced by *P. delicatissima* exposure did not affect fish condition and physiological performances. This lack of effect on juvenile sea bass when considering single species exposure suggests that fish farm mortality rather result from a combination of processes linked to the whole phytoplankton community.

This last hypothesis was tested by using mussel (*Mytilus edulis*) filtration efficiency upstream fish rearing tanks. The aim of this test case experiment was to estimate whether mussel efficiency significantly dampened the phytoplankton spring bloom and hence positively impacted on juvenile sea bass condition and physiological performances. As a result, juvenile sea bass reared in biofiltered seawater exhibited a significantly better condition (Fulton K Index) and physiological performances (growth and RNA:DNA ratio) than those reared in bulk seawater.

This work highlights the need to generalize phytoplankton monitoring in aquaculture areas in order to identify potentially deleterious species, and to understand their dynamics. Methods permitting the early detection of potentially noxious species and associated phycotoxins are necessary to reach an optimal management of aquaculture facilities. Experimental approaches and test case experiments are also crucial to develop and test mitigation tools for dampening phytoplankton blooms impact on aquaculture.

Keywords: *Dicentrarchus labrax*, aquaculture, Harmful Algal Blooms (HAB), ichthyotoxicity (domoic acid), exposure experiments, mitigation tools.