HAL
open science

Distribution spatiale des kystes de résistance des Dinoflagellés au niveau du sédiment superficiel de la lagune de Bizerte : cas de l'espèce invasive Alexandrium pacificum R.W. Litaker, 2014

Mouna Fartouna-Bellakhal

To cite this version:

Mouna Fartouna-Bellakhal. Distribution spatiale des kystes de résistance des Dinoflagellés au niveau du sédiment superficiel de la lagune de Bizerte : cas de l'espèce invasive Alexandrium pacificum R.W. Litaker, 2014. Sciences agricoles. Université de Franche-Comté; Université de Carthage (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016BESA2081 . tel-01680172

HAL Id: tel-01680172

https://theses.hal.science/tel-01680172v1

Submitted on 10 Jan 2018

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.

Université de Carthage
Faculté des sciences de Bizerte

Institut National des Sciences et Technologies de la Mer

Université de Franche-Comté

THESE DE DOCTORAT

En Sciences Biologiques

Présentée par

Mme Fartouna Bellakhal Mouna

Distribution spatiale des kystes de résistance des Dinoflagellés au niveau du sédiment superficiel de la lagune de Bizerte : cas de l'espèce invasive *Alexandrium pacificum* R.W. Litaker, 2014

Soutenue publiquement le 15 Novembre 2016 devant le jury composé de :

- Pr. Héchmi Missaoui (INAT, INSTM).....Président de jury
- Pr. Souad TURKI (INSTM).....Directrice de thèse
- Pr. Lotfi ALEYA (Université de Franche-Comté).....Directeur de thèse
- Pr. Daly Yahia-Kefi Ons (INAT).....Rapporteur
- Pr. Michel DENIS (Université d'Aix Marseille).....Rapporteur
- Dr. Estelle MASSERET (Université Montpellier/ IRD).....Examinatrice

A mes chers parents

A mon cher mari

En témoignage de mon amour

Et de ma gratitude…

Remerciements

Le présent travail n'aurait pu voir le jour sans la contribution précieuse de nombreuses personnes. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à ma directrice de thèse

Madame Souad TURKI, Professeur à l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), qui m'a fait confiance et m'a ouvert les portes de la recherche en me proposant un sujet aussi intéressant que passionnant. Elle a toujours su se rendre disponible pour suivre de près mes travaux. Je ne saurais la remercier suffisamment pour la pertinence de ses conseils, sa patiente et la bonté de son âme tout au long de cette thèse. Ces qualités scientifiques et humaines innombrables m'ont beaucoup apporté, elle a pu rendre l'impossible possible avec professeur Lotfi Aleya.

Je dois une reconnaissance toute particulière et exceptionnelle à **Mr Lotfi ALEYA,** Professeur, CNRS, Université de Franche-Comté, qui m'a ouvert les yeux sur la valorisation de la recherche et m'a redonné confiance en moi . Ses compétences scientifiques, ses encouragements et son appui m'ont été d'un apport inestimable. Mr vous êtes un artiste et c'est un grand honneur d'avoir travaillé avec vous.

C'est avec un profond respect que j'adresse mes remerciements à **Mr Hechmi MISSAOUI,** Professeur à à l'Institut National Agronomiques de Tunisie. Qu'il soit assuré de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

C'est avec un immense plaisir que j'adresse mes vifs remerciements à **Mme Ons Daly Yahia-Kefi**, Professeur à l'Institut National Agronomiques de Tunisie d'avoir accepté d'être mon rapporteur de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Vos suggestions, vos remarques pertinentes et vos commentaires judicieux m'ont permis d'améliorer mon travail. Je voudrai également vous remercier du fond du cœur pour m'avoir appris apprécier et comprendre le monde pertinent du phytoplancton et ce depuis 14 ans.

Je remercie vivement **Mr Michel DENIS**, Professeur à l'Université d'Aix Marseille, de m'avoir fait l'honneur d'être mon rapporteur de cette thèse.

Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements **à Mme. Estelle MASSERET**, maître de conférences à l'Université Montpellier, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je profite de l'occasion pour vous adresser ma profonde gratitude et reconnaissance envers vous. Vos conseils et apports scientifiques m'ont beaucoup apporté lors de la préparation de ma thèse.

Il m'est agréable d'exprimer toute ma reconnaissance au Professeur **Jamel KSOURI** d'avoir accepté de faire partie du comité de suivi de la thèse auprès de l'Université de Franche comté et pour ces encouragements et soutien en tant que Directeur Général de l'ISPAB.

J'adresse mes vifs remerciements à tous mes Professeurs **Mr Mohamed Salah ROMDHANE**, **Mme Amel BEN REJEB JENHANI**, et **Mr HAJ ALI** (paix à son âme) pour leurs encouragements et leurs conseils pertinents.

Mes remerciements s'adressent également à **Mr Mohamed LAABIR**, **Mr Daniel Masson**, **Mme Vera Pospelova**, **Mr Kennet Martens**, **Mr Malte Elbräechter** et **Mme Cecilia Totti**. Ils ont tous contribué sur le plan scientifique à bien mener ce travail.

Je remercie vivement tout le personnel de l'Institut Supérieur de Pêche et d'Aquaculture de Bizerte. Une pensée particulière à **Schiraz et Bassem (du fond du cœur), Aicha,**

Ahmed et Samir. Cher **M**, dommage qu'on soit arrivé à cette situation en espèrant un futur meilleur.

C'est avec un immense plaisir que je remercie chaleureusement tous mes amis pour votre aide, votre encouragement et votre soutien, une reconnaissance toute particulière à **Amel Dhi b** et Mademoiselle **Nour.**

Je ne saurais terminer sans exprimer à mes **chers parents**, mes chères **sœurettes** et **frérots (Othman, Adel et Safou)**, à ma petite et grande famille et à ma belle-famille mon affectueuse reconnaissance pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont toujours témoignés.

Un dernier mot à Mon cher mari et mes adorables enfants : « Merci d'avoir patienté » et finalement à ma très chère ange gardien et âme sœur **Afouf**, merci pour tout tu as été toujours là pour moi. Merci infiniment.

Pour tous ceux que je n'ai pas cités et qui ont participé de près ou de loin.

Les rejets des eaux de ballast dans le port de Bizerte et les fermes conchylicoles installées au niveau de la lagune de Bizerte peuvent constituer des sources potentielles ayant un impact sur l'introduction des espèces de Dinoflagellés nuisibles, en particulier celles qui sont potentiellement toxiques telles que *A. pacificum, A.pseudogonyaulax, A.minutum, A. affine* et *Polysphaeridium zoharyi*, sans pour autant négliger le rôle des courants dans la distribution des kystes. L'étude du trafic maritime sur les 7 années précédant notre prospection a révélé que 14 % de la flotte qui accoste au port de Bizerte est en provenance de la voie maritime d'origine Pacifique.

Afin d'identifier les espèces de Dinoflagellés produisant des kystes à l'origine des efflorescences potentiellement toxiques, un échantillonnage à grande échelle spatiale au niveau des sédiments superficiels a été effectué pour relever les densités des kystes en fonction des caractéristiques sédimentaires à savoir la teneur en eau, la matière organique, la granulométrie, l'abondance des formes végétatives ainsi que les facteurs environnementaux.

Cette étude a permis l'identification de 48 morphotypes de kystes de Dinoflagellés, principalement dominés par *Brigantidinium simplex, Votadinum spinosum, Alexandrium pacificum, Alexandrium pseudogonyaulax,* et *Lingulodinum machaerophorum*. La densité des kystes a varié de 1276 à 20126 kystes g^{-1} sédiment sec. Des différences significatives portant sur la distribution des kystes ont été enregistrées, ce qui nous a permis de faire la distinction de deux zones dans la lagune de Bizerte.

Un intérêt particulier a été porté au complexe *Alexandrium tamarense* dont fait partie l'espèce *A. pacificum* connue pour être à l'origine des efflorescences nuisibles (HABs). En outre, l'examen morphologique et le ribotypage des formes végétatives d'*A. pacificum* en provenance de cultures microalgales obtenues à partir de l'extraction, l'isolement des kystes de résistance en provenance du sédiment, et leur germination ont été réalisés pour l'obtention d'une culture cellulaire monospécifique ABZ1 qui se caractérise par un taux de croissance de $\mu = 0.33 j^{-1}$ et un temps de génération T=2.1j. Le profil toxinique obtenu à partir d'un extrait de culture ABZ1, en phase exponentielle a révélé la présence de N-sulfocarbamoyl toxine C1 (9.82 pg toxin $cell^{-1}$), la GTX6 (3.26 pg toxine $cell^{-1}$) et la carbamoyl toxine Neo-STX (0.38 pg toxin $cell^{-1}$), représentant 2,8% du total des toxines de cette souche.

Une corrélation entre l'abondance des kystes *d'Alexandrium pacificum* et le pourcentage en eau ainsi que la matière organique a été relevée. Par ailleurs, la fraction sédimentaire <63µm s'est avérée potentiellement favorable à l'initiation des efflorescences du dinoflagellé *Alexandrium pacificum* au niveau de la lagune de Bizerte. Une différence significative dans le schéma de la distribution des kystes a été illustrée, mettant en évidence un zonage de la lagune avec une abondance plus importante au niveau des zones conchylicoles.

Mots clefs : kystes, Dinoflagellés, espèces toxiques, eaux de ballast, conchyliculture, lagune de Bizerte.

The ballast water discharges in Bizerte harbor and shellfish aquaculture farms in Bizerte lagoon can be potentials sources with an interest in the introduction of harmful species, especially those that are potentially toxic like *A. pacificum, A. pseudogonyaulax, A.minutum, A.affine* and *Polysphaeridium zoharyi*, without neglecting the role of currents in the distribution of cysts. The study of the vessel traffics for 7 years before our prospection in Bizerte harbour have showing that the percentage of vessels coming from the Pacific road is around 14%.

In order to identify species of Dinoflagellates producing resting cysts incriminated on potentially toxic blooms, a high spatial resolution sampling of the surface sediment for the identification and counting of resistance cysts was carried out to estimate the cyst density based on sedimentary characteristics, water content, organic matter, granulometry, abundance of vegetative forms and environmental factors.

This study allowed the identification of 48 morphotypes of dinoflagellate cysts, mainly dominated by *Brigantidinium simplex, Votadinum spinosum, Alexandrium pacificum, Alexandrium pseudogonyaulax* and *Lingulodinum machaerophorum*. The density of cysts ranged from 1276 to 20126 cysts g^{-1} dry sediment. Significant differences between cyst distributions were recorded, which enabled us to distinguish two areas in the Bizerte lagoon.
Particular attention was given to the complex *Alexandrium tamarense* (HABs). In addition, morphological examination and ribotyping of vegetative cells obtained from microalgal cultures following extraction process, isolation of resistance cysts from sediment, and their germination led to the production of monospecific culture: ABZ1 characterized by a μ (growth rate) = 0.33 day^{-1} and a generation time T = 2.1 day. These reviews have confirmed the newly identified genus and species in the Mediterranean sea and mentioned specifically in the lagoon of Bizerte: *Alexandrium pacificum*. The toxin profile obtained from an extract of ABZ1 culture in exponential phase revealed the presence of N-sulfocarbamoyl toxin C1 (9.82 pg toxin $Cell^{-1}$), the GTX6 (3.26 pg toxin $Cell^{-1}$), carbamoyl and the Neo-STX toxin (0.38 pg cell $toxin^{-1}$), representing 2.8% of total toxins of this strain.

A correlation between the abundance of cysts of *Alexandrium pacificum* and water percentage well as organic matter was found. Moreover, sediment fraction <63µm proved potentially favorable to initiate *Alexandrium pacificum* blooms in Bizerte lagoon. A significant difference in

the cyst distribution diagram was shown, highlighting a zoning of the lagoon with a greater abundance in shellfish farm areas.

Keywords: cysts, Dinoflagellates, toxic species, ballast water, shellfish, lagoon of Bizerte.

Sommaire

Remerciements i
Résumé iv
Summary vi
Sommaire viii
Liste des Figures xii
Liste des tableaux xvi

Introduction Générale 2
Chapitre I. Synthèse Bibliographique 8
1. Contexte 8
2. Implication des transports maritimes via les eaux de Ballast dans l'introduction d'espèces invasives 9
2.1. Les premiers travaux sur le ballast et le transfert d'espèces dans le monde 9
2.2. Historique de la réglementation 9
2.3. Contexte juridique national 11
2.4. Rappels fondamentaux sur le ballastage 12
3. La classe des dinoflagellés 21
4. Le dinoflagellé du genre *Alexandrium* 22
4.1. Position systèmatique : 23
4.2. Biogéographie et évolution des différentes espèces du genre *Alexandrium* 27
4.3. Cycle de vie des Dinoflagellés du genre *Alexandrium* 29
4.4. Rôle des kystes dans la dynamique des populations du genre *Alexandrium* 32
4.5. Rôle des kystes dans le maintien de la structure génétique et de la diversité des populations ou « pool génétique » 33
4.6. Dynamique des efflorescences 33
4.7. Répartition géographique et introduction du genre *Alexandrium* 34
4.8. Physiologie et nutrition 34
4.9. Mixotrophie et phagotrophie 36

Chapitre II. Matériels et méthodes **39**
1. Description du site d'étude : La lagune de Bizerte 39
2. Principales caractéristiques de la lagune 40
2.1. Facteurs climatiques 40
2.2. Cadre géomorphologique et sédimentologique 42
2.3. Echanges hydriques 43
3. Sites d'échantillonnage 44
3.1. Le port de commerce Bizerte-Menzel Bourguiba 44
3.2. Les parcs conchylicoles au niveau de la lagune 45
4. Stratégie d'échantillonnage 45
4.1. Prélèvement des échantillons d'eau de mer 45
4.2. Echantillonnage du sédiment 48
4.3. Traitement du sédiment 52
5. Paramètres biotiques 57
5.1. Biomasse chlorophyllienne 57
5.2. Identification et Comptage du phytoplancton 57
6. Microscopie électronique à balayage (SEM) 58
7. Dosage des toxines paralytiques PSP : profil toxinique de l'espèce *A. pacificum* 60
8. Analyses moléculaires 61
8.1. Extraction d'ADN et PCR 61
8.2. Phylogénie 61
9. Analyses Statistiques 62
9.1. L'analyse de la Redondance : RDA 62
9.2. Le Test de Spearman 62
9.3. Les Boxplots 62
9.4. Le Modèle Additif Généralisé : GAM 62

Chapitre III. Implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces invasives dans la lagune de Bizerte (Projet d'article) **65**
1. Contexte 65
2. Principaux résultats 66
Article: Reflections on the implication of shipping in the introduction of exotic species in Bizerte lagoon 66
1. Introduction 66

2. Materials and methods 68
2.1. Study area 68
2.2. Sampling 70
2.3. Collected data of shipping traffic in Bizerte lagoon 70
3. Results 71
3.1. Shipping traffic 71
3.3. Phytoplankton and cysts found in ballast waters 74
4. Discussion 74
4.1. Zonation of dinocysts 74
4.2. Ribotyping of *A. pacificum* 74
4.3. Monitoring program 75
4.4. Applying the ‘‘emigration hypothesis’’ to exotic species 75

Chapitre IV: Cartographie des kystes de Dinoflagellées dans la lagune de Bizerte 78
1. Contexte 78
2. Les principaux résultats 79
3. Résumé 80
Article 1. Driving factors behind the distribution of dinocyst composition and abundance in surface sediments in a western Mediterranean coastal lagoon: report from a high resolution mapping study 84
1. Introduction 86
2. Materials and Methods 87
2. 1. Study area 87
2.2. Sampling 88
2. 3. Cyst processing and indentification 89
2. 4. Sediment analysis 92
2.5. Statistical analysis 92
3. Results 93
3.1. Environmental conditions 93
3.2. Currents 95
3.3. Chlorophyll a concentrations 97
3.4. Cyst composition 97
3.5. Description and abundance of dominant species 100
3.6. Dynamics of dominant cysts 106

4. Discussion 108

5. Conclusion 113

Chapitre V. Caractérisation taxonomique et phylogénétique du Dinoflagellé *Alexandrium pacificum*R.W. Litaker, 2014 (Syn. : *A. catenella*) de la lagune de Bizerte. 116

1. Contexte 116

2. Les principaux résultats 117

3. Résumé 117

Article 2 : *Alexandrium pacificum* Litaker sp. nov (G IV): Resting cyst distribution and toxin profile of vegetative cells in Bizerte Lagoon (Tunisia, Southern Mediterranean Sea) 119

Abstract 120

1. Introduction 120

2. Materials and Methods 122

2.1. Study area 122

2.2. Sampling 123

2.3. Resting cyst analyses 123

2.4. A. catenella strain ABZ1 description 125

2.5. Sediment analyses 127

2.6. Phytoplankton sampling 129

2.7. Statistical analyses 129

3. Results 130

3.1. Environmental conditions 130

3.2. Cyst morphology, abundance and spatial distribution 131

3.3. A. pacificum abundance in the water column 132

3.4. Morphological and toxinic characteristics and the ribotype of the A. pacificum strain from Bizerte Lagoon 132

4. Discussion 136

4.1. *A. pacificum* from Bizerte Lagoon 136

4.2. Spatial variation in *A. pacificum* cell density in the water column during sediment sampling 137

4.3. *A. pacificum* resting cyst distribution 138

5. Conclusion 144

Conclusion générale et perspectives 145

Références Bibliographiques 150

Liste des Figures

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

Fig. 1. Différents types de ballasts de structure en coupe d'une coque d'après AQ.I.S, 1993

Fig. 2. Section de bateau montrant le cycle de l'eau circulant dans les ballasts [1]

Fig. 3. Mesures de traitement de l'eau de ballast à bord d'un navire

Fig. 4. Relation entre les stades mobile ou forme végétative (à gauche) et enkysté (à droite) du même dinoflagellé. Cette correspondance entre processus et plaque n'est pas toujours évidente (Evitt, 1985).

Fig. 5. Tabulation Kofoidienne des plaques permettant l'identification du genre *Alexandrium*

Fig. 6. Morphologie des plaques thécales d' *A. catenella*: (A) Chaîne de cellules végétatives; (B) vue ventrale de la cellule en microscopie à épiflorescence ; (C) Observation en contraste de phase d'une vue apicale de l'Epithèque ; (D) Complexe des plaques apicales du pore ; (E) Vue ventrale d'une paire de cellules en microscopie électronique à balayage « SEM » ; (F) Vue de l' hypothèque en SEM (MacKenzie et de Sals, 2004)

Fig.7. Distribution spatiale d'*A. catenella* en méditérranée occidentale d'aprsè les trvaux respectifs de Frehi et *al.*, 2007, Turki et *al.*, 2007, Penna et *al.*, 2008, Genovesi et *al.*, 2011

Fig. 8. Cycle de vie *d'Alexandrium catenella* (Genovesi et *al.*, 2006)

Chapitre II. Matériels et Méthodes

Fig. 1. Localisation de la lagune de Bizerte,. Zones conchylicoles (10 parcs au total) ; CB : Cimenterie de Bizerte ; STIR: SociétéTunisienne des Industries de Raffinage ; El Fouledh : Usine Sidérurgique.

Fig. 2. Variations mensuelles de la température de l'air au cours de l'année 2012 [3]

Fig. 3. Variations des précipitations au cours de l'année 2012 [3]

Fig. 4. Stations de prélèvement (1-123) des différents échantillons d'eau de mer et de sédiment dans la lagune de Bizerte (6-8 juin 2012) ; CB : Cimenterie de Bizerte ; STIR: Société Tunisienne des Industries de Raffinage ; El Fouledh : Usine Sidérurgique

Fig. 5. a. Protocole d'échantillonnage d'eau de ballast en utilisant une pompe de forage à bord d'un Pétrolier ; **b**. Vidange de l'eau de ballast dans les bouteilles de prélèvement à bord d'un pétrolier

Fig. 6. a. Utilisation de la benne Van Venn ; **b.**Sédiment récupéré à l'aide de la benne.

Fig. 7. Appareil déterminant le point critique du séchage de la préparation (Critical point drayer) (à gauche) et le métalliseur permettant la métallisation par le bombardement de l'échantillon avec l'Argent (Ag) (à droite)

Fig. 8. Microscope électronique utilisé pour l'Identification du Dinoflagellé *A. pacificum* (Université Polytechnique de la Marche/Ancona, Italy)

Chapitre III. Implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces invasives dans la lagune de Bizerte.

Fig. 1. Geographic location of Bizerte lagoon with station numbers of the surface sediment samples (orange circles, maritime zone; yellow circles: inner zone).
Fig. 2. Maritime traffic calculated by the number of vessels from 2005 to 2012 in Bizerte harbour related to the geographic origins (port de provenance)

Chapitre IV. Cartographie des kystes de Dinoflagellés dans la lagune de Bizerte

Fig.1. Inventaire des kystes identifiés au niveau du sédiment superficiel de la lagune de Bizerte.

Fig.2. Geographic location of Bizerte lagoon with station numbers of the surface sediment samples (orange circles, maritime zone; yellow circles: inner zone).

Fig. 3. Boxplots depicting the spatial variations of% H_2O among stations and zones in Bizerte lagoon (MZ: Maritime Zone; IZ: Inner Zone).

Fig.4. Summer water circulation (direction and intensity) in Bizerte lagoon.

Fig. 5. Water circulation in the Bizerte lagoon deduced from observations and numerical simulations (Harzallah, 2003; Béjaoui, 2009).

Fig. 6. Boxplots depicting the spatial variations of Chlorophyll-*a* concentrations among stations and zones in Bizerte lagoon (MZ: Maritime Zone; IZ: Inner Zone).

Plate 1. Dinoflagellate cysts isolated from recent sediments in Bizerte lagoon. **1.** Cyst of *Alexandrium catenella* complex; **2.** Cyst of *Alexandrium pseudogonyaulax;* **3.** Cyst of *Alexandrium affine;* **4.** *Impagidinium* sp.*;* **5.** *Spiniferite Lazus;* **6.** *Spiniferite bulloideus;* **7.** *Spiniferite delicates;* **8.** *Lingulodinium machaerophorum;* **9.** *Polysphaeridium zoharyi;* **10.** *Brigantidinium simplex;* **11.** *Votadinium spinosum;* **12.** *Votadinium clavum;* **13.** Cyst of *Protoperidinium steidingerae;* **14.** Cyst of *Protoperidinium nudum;* **15.** *Quinquecuspis concreta;* **16.** *Islandinium miniutum;* **17.** *Selenopomphix quanta;* **18.** *Archeoperidinum minutum;* **19.** *Stellatodinum stellatum;* **20.** Cyst of *Diplopsalis lenticulata;* **21.** SRBC **22.** SRBC; **23.** *Scrippsiella ramoni;* **24.** *Scrippsiella trocoidea* complex; **25.** *Scripssiella recariat;* **26.** Cyst of *Gyrodinium resplendens;* **27.** Cyst of *Gymnodinium impudicum;* **28.** Cyst of *Polykrikos kofoidii.*

Plate 2.*"Brigantidinium simplex"* cyst ***(a)*** and its vegetative cell *"Protoperidinium conicoides"* ***(b)*** after germination test.

Fig. 7. Boxplots depicting the spatial variations of cyst dominant morphotype in Bizerte Lagoon.

Fig. 8. RDA TriPlot depicting the association between cyst dominant morphotype and sampling sites in Bizerte Lagoon. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ1 and λ2. (Blue cross refers to sampling sites).

Fig. 9. RDA TriPlot depicting the association between cyst dominant morphotype and sampling zones in Bizerte Lagoon. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ1 and λ2. (MZ: Maritime Zone; IZ: Inner Zone).

Fig. 10. RDA TriPlot depicting the association between cyst dominant morphotype and environmental factors in Bizerte Lagoon. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2.

Fig. 11. Bloom scenario for the dominant dinoflagellates at the Bizerte Lagoon.

Chapitre V. Caractérisation taxonomique et phylogénétique du Dinoflagellé *Alexandrium pacificum* R.W.Litaker, 2014 (Syn. : *A. catenella*) de la lagune de Bizerte

Fig. 1. Geographic location of Bizerte Lagoon with sampling stations.

Fig. 2.Water and organic matter contents in the surface sediment of Bizerte Lagoon.

Fig. 3. Granulometry of Bizerte Lagoon.

Fig. 4. (a) Cyst of *A. pacificum* (photonic microscopy), (b) vegetative cell of A. *pacificum*, (c) epitheca plate, characteristics of A. *pacificum*, obtained from germinating cysts (epifluorescence light microscopy, stained with fluorescent brightener). Scale bar = 10 mm, (d)–(g) Electron micrograph pictures of a vegetative cell of *A. pacificum.*

Fig. 5. *Alexandrium pacificum* cyst distribution in Bizerte Lagoon (numbers in figure g^{-1} DS)

Fig. 6. 3D plot showing the relationships between the density of *A. pacificum* cysts

and both water and organic matter. Orange map represents estimations of the GAM

(generalized additive models).

Fig. 7. 3D plot showing the relationships between the density of *A. pacificum* cysts

and sediment fractions (<63 mm and >63 mm). Orange map represents estimations

of the GAM.

Fig. 8. Spatial distribution of *A. pacificum* in sediment and water column

Fig. 9. Maximum likelihood (ML) tree based on LSU rDNA (D1–D2, 607 sites) including 64 *Alexandrium* sequences and *Goniodoma polyedricum* as outgroup. The likelihood value was found to be log lk = -4174.313. The model selected was TN93 + I + G and the parameters in the analysis were: assumed nucleotide frequencies A = 0.2637;

Liste des tableaux

I. Synthèse bibliographique

Tableau 1. Historique de la réglementation

Tableau 2. Norme de rendement du rejet des eaux de ballast d'après la BWM Convention (règle D-2) pour les organismes viables [2].

Chapitre III. Implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces

Table 1. Corresponding countries (port of origin) to subdivion areas suggested in this study

Table 2. Maritime traffic per year from 2006 to 2012 in Bizerte Harbour

Table 3. Summary of ballast sampling conducted in this work (2011-2012)

Chapitre IV. Cartographie des kystes de Dinoflagellés dans la lagune de Bizerte

Table 1. Geographic station positions and % H_2O for each sediment sample. (- : missing percentages refer to stations with rocky sediment)

Table 2. Physico-chemical parameters of water column of Bizerte lagoon.

Table 3. Taxonomic citation, biological names and harmful effects of Dinoflagellate cysts identified in the present study (A = abundant, > 10 %; C = common, 1-10 %; R = rare, 0.1-1 %; X = present occasionally; < 0.1 %).

Chapitre V. Caractérisation d'*Alexandrium pacificum*

Table 1. Physico-chemical parameters of water column in Bizerte Lagoon.

Table 2. Comparison of cyst abundances of *Alexandrium tamarense* species complex between the present study and other works.

Introduction Générale

Introduction Générale

Les proliférations des espèces nuisibles du phytoplancton, désignées par le terme générique anglo-saxon Harmful Algal blooms « HABs », sont associées à la production des toxines, et/ou peuvent être à l'origine des nuisances, restent un phénomène naturel dont le déclenchement est tributaire de plusieurs mécanismes. La récurrence de ces phénomènes à l'échelle mondiale et principalement au niveau des zones côtières est à l'ordre du jour nécessitant des explorations à plusieurs niveaux.

Les espèces impliquées dans les phénomènes HABs, représentent seulement 5% du phytoplancton ont 75% de dinoflagellés (Smayda, 1997). Ils peuvent être extrêmement toxiques conduisant à des dégâts importants pour l'aquaculture et la faune marine (Hallegraeff et *al*., 1995). Ils peuvent être également à l'origine des intoxications humaines. En effet, chaque année les HABs causent plus de 60 000 cas d'intoxications à l'échelle mondiale (Dale, 2001).

La prolifération d'organismes phytoplanctoniques, producteurs de toxines ou pouvant être la cause de nuisances prenant des formes multiples, a des conséquences sanitaires et socio-économiques pouvant se révéler dramatiques lorsqu'elles touchent des ressources commercialement exploitables. Les conséquences écologiques se traduisent souvent par une érosion de la biodiversité locale transitoire voire pérenne. Le fonctionnement de l'écosystème peut être également perturbé par des crises d'anoxie résultant des processus de dégradation des floraisons liées à de très fortes biomasses.

A partir des années 1900, les premières études biologiques portant sur l'introduction des espèces via les eaux de ballast ont permis de révéler que les transports maritimes sont des vecteurs d'introduction d'espèces non indigènes. Les premiers travaux réalisés sur l'échantillonnage des eaux de Ballast ont été effectués par Medcof (1975).

D'après Van den Bergh et *al*. (2002), les « HABs » sont générés par les microalgues introduites par les eaux de ballast et touchent particulièrement les mollusques bivalves plutôt que les poissons. Dans le même contexte, les différentes études menées sur les eaux de ballast ont montré que les navires facilitent le transfert d'organismes aquatiques à travers les frontières naturelles (Carlton, 1985 ; Gollasch, 2002 ; Gollasch et *al*., 2002). Les quantités estimées de l'ordre de 3 à 10 milliards de tonnes d'eaux de ballast sont transférées chaque année dans le monde avec des espèces appartenant à différents groupes trophiques (David et *al*., 2007). Le développement de l'aquaculture, en alternative à la pêche a contribué vraisemblablement au

nombre croissant des épisodes dystrophiques et à l'installation de nouvelles espèces. Le développement de l'aquaculture dans la zone côtière devient alors une activité à haut risque, le transfert d'organismes phytoplanctoniques potentiellement toxiques au sein des organismes filtreurs tels que les mollusques bivalves dans les écosystèmes en général peut avoir des conséquences drastiques sur les activités aquacoles, de pêche et socio-économiques. Cependant, Shumway (1990) pense que ces pertes sont très variables selon l'espèce et selon le lieu considéré, en relation avec le temps de rétention des toxines plus ou moins long. Elle fait état de pertes allant de 0,63 millions de dollars *(Crassostrea virginica, C. gigas, Ostrea edulis*) à plus de 27 millions de dollars (*Crassostrea virginica, Ptychodiscus brevis*).

Sur la rive sud de la Méditerranée, la lagune de Bizerte, reste le principal voir l'unique pôle en Tunisie développant une activité conchylicole (moules, huîtres) en plein essor à l'exception de palourdes qui existe également au Sud de la Tunisie. Toutefois, cette lagune est touchée par des crises dystrophiques des efflorescences d'algues potentiellement toxiques et une élévation persistante de la température. Parmi les espèces ayant des répercussions graves sur la production conchylicole, on cite : *Dinophysis sacculus, A. catenella, Prorocentrum minimum* et *Pseudonitzschia spp.* Ces dernières sont les principales espèces associées à la contamination des bivalves par des biotoxines de la lagune de Bizerte au cours de ces dix dernières années (Turki et El Abed 2001; Turki 2004; Turki, 2005; Turki et Balti, 2005; Turki et *al*., 2007 ; Turki et *al*., 2014; Bouchouicha et *al.*, 2012 ; Zmerli Triki et *al.*, 2015).

D'autres travaux sur les Diatomées potentiellement toxiques ont été abordés par Sahraoui et *al*., 2011; Sahraoui et *al*., 2012; Bouchouicha et *al*., 2014 ainsi que Bouchouicha et *al*., 2015. Les travux réalisés au niveau de la baie de Tunis (Nord de la Tunisie), ont permis de recensées dix espèces du genre *Alexandrium* (Daly Yahia et *al*., 2001) parmi lesquels *Alexandrium foedum, A. insuetum, A. leei, A. margalefi, A. minutum, A. pseudogonyaulax* qui ont été déjà répertoriées en Méditerranée. Dans ce même contexte deux autres espèces *A. concavum* et *A. kutnerae* citées uniquement en Atlantique a conduit à émettre deux hypothèses soit le cantonnement des espèces en question que le manque d'investigation n'a pas révélé soit l'introduction via les eaux de ballast (zone portuaire).

Dans ce même contexte, on cite les travaux sur la dynamique des efflorescences toxiques d'*Alexandrium minutum* au niveau du sud tunisien (Golfe de Gabès) sur 10 ans de suivi réalisé par Abdenadher et *al*. (2012). Cette dernière a révélé que la variabilité des facteurs environementaux infulence la dynamique et la toxicité du genre *Alexandrim minutum*.

Parmi les espèces de Dinoflagellés potentiellement toxiques, certains produisent des kystes de résistance au cours de leurs cycles de vie qui peuvent être impliqués suite à leur réviviscence à des phénomènes d'introduction d'espèces (Dale, 1983).

Environ 10% des 2000 espèces marines de dinoflagellés produisent des formes de résistance telles que les kystes ou planozygotes qui sont des cellules diploides chargées en réserves avec une mobilité réduite. Cette forme de résistance benthique subit une phase de dormance dans le sédiment avant sa germination (Dale, 2001).

Le complexe d'espèces « *Alexandrium tamarense* » regroupant 3 espèces qui présentent des correspondances morphologiques, toxiques et génétiques, est l'un des groupes de dinoflagellés marins les plus étudiés en raison de son importance écologique, toxicologique et économique. Plusieurs espèces de ce complexe produisent des saxitoxines et leurs congénères (neurotoxines puissantes) qui sont à l'origine d'intoxications paralysantes suite à la consommation des mollusques. Les conséquences écologiques des « HABs » se traduisent par une dégradation de la biodiversité causée par les mortalités massives d'organismes et le caractère mono-spécifique des proliférations présentes. Le fonctionnement de l'écosystème peut être également perturbé par des crises d'hypoxie, d'anoxie, résultant des processus de dégradation d'une forte biomasse liée aux efflorescences (Zingone et Enevoldsen 2000).

Les travaux se rapportant aux kystes de résistance des Dinoflagellés au niveau de la lagune de Bizerte sont très récents (Fertouna-Bellakhal *et al.*, 2014 ; Zmerli Triki *et al.*, 2014).

L'emplacement stratégique, d'un point de vue économique et écologique, de la lagune de Bizerte nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une éventuelle implication des transports maritimes dans l'expansion et la colonisation du complexe *Alexandrium tamarense*, Dinoflagellés invasifs incriminés dans les phénomènes « HABs » au niveau de la Méditérannée. Une approche s'est faite à deux niveaux : (i) Une approche directe par l'analyse des paramètres environnementaux et l'identification du phytoplancton au niveau de l'eau et du sédiment de ballast et (ii) une approche indirecte qui a touché les formes de résistance à savoir les dinokystes dans le sédiment superficiel de la lagune au niveau de ses différents ports et parcs conchylicoles pouvant être des zones vectrices ou réceptrices.

Afin de répondre à ces objectifs, notre démarche a consisté à déterminer la distribution des foyers potentiels de kystes dormants surtout pour l'une des espèces de Dinoflagellés qui a été à l'origine d'efflorescences nuisibles en 2007 (Turki et *al.*, 2007) : *Alexandrium catenella* et l'implication de ces derniers dans les efflorescences à l'échelle de cet écosystème.

Plusieurs questions fondamentales ont été abordées (i) La distribution et les densités des kystes dormants du complexe *Alexandrium* dans le sédiment superficiel de la lagune ainsi que les facteurs compromettant cette distribution (ii) La caractérisation de l'espèce en question appartenant au complexe *Alexandrium tamarense* (iii) Le degré d'implication des transports maritimes dans les phénomènes « HABs » (iv) Le mécanisme d'initiation des efflorescences du Dinoflagellé *Alexandrium pacificum* dans la lagune de Bizerte. En effet, les premières investigations dans le cadre de ce travail relatives à la caractérisation morphologique et taxonomique nous ont conduits à citer l'espèce en question en tant que *A. catenella*. Par la suite et grâce à la caractérisation moléculaire nous avons pu identfier l'espèce en question : *A. pacificum.*

L'objectif global de ce travail est d'aboutir à une approche biologique permettant le développement d'outils d'aide à la décision pour une sélection des sites conchylicoles dans la lagune de Bizerte.

Dans cette démarche, un premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique concernant les travaux antérieurs relatifs au rôle prépondérant des kystes de résistance dans la dynamique des efflorescences toxiques, l'implication des transports maritimes dans l'introduction des espèces invasives et l'importance du complexe *Alexandrium* à l'échelle mondiale.

Le deuxième chapitre sera abordé afin de développer les techniques d'échantillonnage et de quantification portant sur les kystes de résistance dans les sédiments superficiels d'une part, les moyens de caractérisation des formes végétatives permettant l'identification rigoureuse des espèces d'autre part. Une partie sera consacrée à l'échantillonnage d'eau et du sédiment de ballast. Finalement, la caractérisation taxonomique et phylogénétique du Dinoflagellé *A. pacificum* sera développée au moyen de la microscopie photonique, à épifluorescence et électronique ainsi que par l'utilisation des outils moléculaires pour aboutir à une identification rigoureuse de cette espèce. Par ailleurs, la majorité des espèces du genre *Alexandrium*, étant connues pour êtres associées à la production des toxines paralytiques, le profil toxinique a été analysé sur les souches obtenues en culture monoclonale dans le cas d'*A .pacificum*.

Un troisième chapitre traitera l'implication des transports dans l'introduction d'espèces invasives en se basant sur les statistiques de l'office de la marine marchande et des ports en corrélation avec les prospections effctuées dans le cadre de cette étude.

Le quatrième chapitre se rapportant au recensement et à l'identification des différents dinokystes présents dans le sédiment superficiel tout en tentant d'expliquer cette distribution en fonction des paramètres environnementaux et hydrodynamiques qui régissent cet écosystème.

Le cinquième chapitre a été consacré à la distribution de kystes de résistance des espèces du genre *Alexandrium*, du profil toxinique des cellules végétatives, des paramètres de croissance de la culture monoclonale d'*A. pacificum* et de son identification morphologique et phylogénétique.

En conclusion générale, une synthèse des principaux résultats scientifiques, nous a permis d'apporter une contribution à la connaissace des formes de résistance impliquées dans le phénomène « HABs » et leur répartition dans la lagune de Bizerte, ce qui peut être considéré comme critère de choix pour l'installation des sites conchylicoles.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

1. Contexte

Parmi les 5 000 espèces d'algues marines existantes, environ 300 sont capables de proliférer en grand nombre produisant ainsi des proliférations anarchiques dans les eaux littorales. Dans ce même contexte, on cite les efflorescences nuisibles qui constituent des évènements impliquant environ 5% des espèces marines connues, dont une majorité (75%) de Dinophycés (Smayda ,1997). 40% des espèces nuisibles sont toxiques et causent différents syndromes associés à une grande variété de troubles neurologiques ou gastriques chez l'homme suite à la consommation d'organismes contaminés (Zingone et Enevoldsen, 2000).

Certaines espèces d'algues produisent des toxines à faible abondance (quelques centaines de cellules par litre), tandis que d'autres espèces d'algues prolifèrent à des densités de l'ordre de millions de cellules par litre. La plupart des espèces nuisibles ont une distribution restreinte. Toutefois, certaines espèces nuisibles sont ubiquistes ayant une distribution mondiale (Hallegraeff et *al.*, 1995; Lindahl,1998).

Parmi les microalgues unicellulaires ou pouvant fomer des colonnies (chaînes), on trouve un vaste groupe de microrganismes eucaryotes et biflagellés : les Ddinoflagellés. La diversité de ce groupe est caractérisée par plus de 2000 espèces (marines, estuariennes et d'eau douce) (Taylor, 1987). Environ 10% des espèces de dinoflagellés forment des kystes dormants (Dale, 1983). Il s'agit de stades benthiques non mobiles, entourés d'une paroi dense et résistante (Montresor et *al.*, 1998; Blackburn et Parker, 2005). Les kystes sont capables de survivre lorsque les conditions environnementales sont défavorables, en particulier dans les régions tempérées qui sont fortement marquées par les variations saisonnières des conditions du milieu (Montresor et *al.*, 1998 ; Kremp, 2000 ; Ichimi et *al.*, 2001). L'accumulation des kystes dormants dans le sédiment constitue des « banques de kystes » ou « seed beds » (Persson et *al.*, 2000 ; Matsuoka et *al.*, 2003 ; Garcés et *al*., 2004) qui représentent les précurseurs d'ensemencement pour l'initiation des efflorescences (Anderson et Morel, 1979 ; Mc Gillicuddy et *al.*, 2003 ; Anderson et *al.*, 2005).

Ces kystes de dormance benthiques peuvent être transportés par les eaux de ballast des navires, qui utilisent l'eau de mer en tant que lest et par conséquent contribuent à la dissémination des espèces invasives.

2. Implication des transports maritimes via les eaux de Ballast dans l'introduction d'espèces invasives

2.1. Les premiers travaux sur le ballast et le transfert d'espèces dans le monde

Le volume d'eau de ballast qui circule à travers le monde chaque année à bord des navires est d'environ 10 milliards de m^3 (Paterson, 2001). Les recherches menées dans différentes parties du monde (Carlton, 1985; Williams et *al*., 1988 ; Macdonald et Davidson, 1997; Gollasch et *al*., 2000; Olenin et *al*., 2000) ont montré que les navires facilitent le transfert d'organismes aquatiques d'un milieu à un autre en particulier les organismes indésirables présents dans l'eau et le sédiment de ballast, ainsi qu'attachés sur les coques des navires (Gollasch, 2002). Il a également été confirmé que les agents pathogènes humains sont transférés avec les eaux de ballast des navires (Ruiz et *al*., 2000). Dans le rapport IMO / MEPC (1998), Carlton (2001), estime que plus de 7000 espèces transitent dans les eaux de ballast tous les jours. Ces organismes, une fois rejetés, peuvent survivre et s'installer dans le nouvel environnement provoquant des effets nuisibles sur la santé humaine, les écosystèmes avec des conséquences graves sur l'économie (Carlton, 1985; Carlton et Geller, 1993, Matej et Gollasch, 2008).

La première étude biologique qui révèle que les navires sont les vecteurs d'introduction d'espèces non indigènes a été publiée dans les années 1900 où Ostenfeld (1909) a signalé la présence de l'espèce phytoplanctonique d'Asie *Odontella (Biddulphia) sinensis* qui était à l'origine d'une prolifération anarchique en mer du Nord en 1903.

La première étude sur la stratégie d'échantillonnage des eaux de ballast a été effectuée 70 ans plus tard par Medcof (1975), suivie par plusieurs autres (Carlton, 1985; Hallegraeff et Bolch, 1991 ; David et Perkovic, 2004). En Méditerranée l'organisme de coordination est représenté par le Centre Régional d'Intervention d'Urgence contre la Pollution Marine pour la Méditerranée (REMPEC) qui inclut plusieurs pays à savoir : l'Albanie, l'Algérie, la Bosnie-Herzégovine, Chypre, la Croatie, l'Egypte, la France, la Grèce, Israël, l'Italie, le Liban, Malte, le Maroc, Monaco, la Serbie, le Monténégro, la Slovénie, l'Espagne, la République arabe Syrienne, la Tunisie et la Turquie.

2.2. Historique de la réglementation

L'intérêt porté à la préservation des écosystèmes a commencé à voir le jour depuis les années 50. En effet, les conventions propres à ce contexte sont mentionnées dans le tableau 1 :

Tableau 1. Historique de la réglementation

Date	Réglementation
1951	Convention internationale sur la protection des plantes (International Plant Protection Convention)0
1965	Convention visant à faciliter le trafic maritime international « FAL »
1969	Règlement sanitaire international et les accords sur la santé animale et végétale « IHR »).
1971/1999	La Convention de Ramsar sur les zones humides
1973/1978	Adoption d'une résolution donnant un mandat à l'Organisation Maritime Internationale « l'OMI » et l'Organisation Mondiale de la Santé « OMS » pour initier des études sur le risque d'introduction d'organismes aquatiques nocifs et pathogènes entre écosystèmes marins via les eaux de ballast et les sédiments des navires avec la création de groupe de travail sur les eaux de ballast sous la direction du Comité de Protection du Milieu Marin « CPMM ».
1973/1978	Convention internationale pour la prévention de la pollution par les navires : « MARPOL »
1974	Convention sur le commerce international des espèces menacées
1974	Convention internationale pour la sécurité de la vie humaine en mer : « SOLAS »
1979	Convention sur la conservation des espèces migratrices
1982	Convention des Nations Unies sur le droit de la mer
1992	Convention sur la diversité biologique
1994	Le Code de conduite pour les introductions et transferts d'organismes marins « ICES »
1997	Adoption par l'Organisation Maritime Internationale « OMI » de directives pour le contrôle et la gestion des eaux de ballast des navires pour réduire le transfert des organismes aquatiques nuisibles et des agents pathogènes. Lancement par l'OMI/ (Programme des Nations Unies pour le Développement « PNUD » / Fond pour l'environnement Mondial « FEM » du projet intitulé «Elimination des obstacles à la mise en œuvre efficace des mesures de contrôle et de gestion des eaux de ballast dans les pays en développement
2000/2004	Programme mondial de gestion des eaux de Ballast GloBallast OMI/FEM/PNUD (phase pilote). Protocole de Biosécurité de Cartagena.
2001	Convention internationale sur le contrôle des systèmes antisalissure sur les navires (International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships (Anti-Fouling Convention)).
2004	La Convention Ballast Water Mangement « BMW » est le diminutif communément utilisé pour faire référence à « la Convention Internationale pour le Contrôle et la Gestion des Eaux de Ballast et Sédiments des Navires» adoptée par l'Organisation Maritime Internationale « OMI » en février 2004. Cette convention n'est pas encore entrée en vigueur.
2008/2012	Programme de partenariat GloBallast II qui inclut 14 sous-régions en développement dont 13 pays Pays Partenaire Leader « PPL » de 5 régions classées en priorité absolue dont la Méditerranée. L'organisation régionale coordinatrice : Le Centre régional Méditerranéen pour l'intervention d'urgence contre la pollution marine accidentelle « REMPEC »opérant dans le cadre du Programme alimentaire mondial « PAM »/ Le Programme des Nations unies pour l'environnement « PNUE » en collaboration avec le centre d'Activités Régionales pour les Aires Spécialement Protégées « RACSPA ». Notant que la Tunisie a été subventionnée par le Fonds Mondial pour l'environnement « FEM » et participe au projet en tant que partie prenante
2014	La Tunisie n'a pas encore ratifié la BWM 2004. En effet, cette convention ne peut entrer en vigueur vu que 43 % des pays ne l'ont pas ratifiée, ce qui représente d'un point de vue régional, 9 pays de la Méditerranée. En effet, pour que cette convention soit adoptée selon l'article 18 qui stipule : la convention devrait entrer en vigueur 12 mois après la ratification par les 30 pays représentant 35 % de tonnage brut de la flotte mondiale des navires de commerce. Ce qui n'est pas le cas en 2014.

2.3. Contexte juridique national

2.3.1. Cadre juridique

La Tunisie avec son patrimoine marin considérable (45 000 km^2 de zones maritmes et plus de 1670 km de côtes) constitue un pays vecteur d'eaux de ballast en tant que pays exportateur de produits bruts et manufacturés. A cet effet, un pouvoir législatif (nouvelles lois) propre à l'environnement a été ainsi developpé depuis 1999.

2.3.2. Lois relatives à l'environnement

Loi 88-91 relative à la création de l'ANPE (Agence Nationale de protection de l'environnement

Loi 2009-49 relative aux aires marines et côtières protégées

***Code des eaux (Article 107) :**

Loi 95-72 portant création de l'APAL (Agence de Protection et d'Aménagement du Littoral)

***Droit maritime et portuaire** :

Les lois se rapportant à la gestion des eaux au niveau du port constituent une ébauche pour un éventuel contrôle des eaux de ballast. En effet, toutes les lois citées ci-joint ainsi qu'un arrêté du ministère des transports mettent l'accent principalment sur le traitement des eaux useés des navires au niveau des ports.

Loi 2009-48 portant promulgation du code des ports maritimes

Loi 95-73 telle que modifiée par la loi 2005-33 relative au domaine public maritime

Loi 2005-50 relative à la Zone économique exclusive « ZEE »

Arrêté du ministre des transports du 10 juin 1999 relatif aux informations que doit contenir l'avis d'arrivée du navire.

Arrêté du ministre des transports du 10 Août 1999 relatif à la composition et des modalités d'intervention de la commission de sécurité du port.

2.4. Rappels fondamentaux sur le ballastage

2.4.1. La technique de ballastage

Le liquide de ballast (eau de mer, eau douce et carburant) a remplacé les lests ainsi que les systèmes de pompage permettant des réglages commodes, en pleine mer comme au port. Actuellement, le tonnage d'eau de ballast peut avoisiner les 80 000 tonnes d'eau de mer pour les grands navires, en particulier les vraquiers qui passent de 40 à 50 % de leur temps de navigation sur lest (Australian Quarantine and Inspection Service « A.Q.I.S », 1993). Un cargo peut transporter jusqu'à 40 % de la charge non marchande en eau de ballast, parfois plus par mauvais temps.

D'après A.Q.I.S. (1993), la quantité d'eau de ballast transportée est tributaire du type de navire. En effet, le système de ballast permet d'assurer la stabilité du navire et de minimiser la consommation du carburant. Les grands vraquiers de 40 000 à 250 000 DWT (Dead Weight Tonnage) peuvent transporter de 15 000 à 100 000 t d'eau. Les petits vraquiers de 15 000 à 40 000 DWT transportent de 6 000 à 15 000 t d'eau.

Les méthaniers de 5 000 à 125 000 m^3 transportent de 1 000 à 50 000 t d'eau, les RoRo et les porte-conteneurs de 4 000 à 40 000 DWT transportent de 1 000 à 12 000 t d'eau. Les pétroliers de 15 000 à 110 000 DWT transportent de 4 000 à 35 000 t d'eau, les navires de passagers : très peu, des systèmes anti-roulis prenant de plus en plus le relais.

2.4.2. Les types de ballast

Ils varient en fonction de la taille et de l'emplacement suivant les types de navires de transport : vraquiers, porte-conteneurs, navires-citernes, minéraliers, chimiquiers. A cet effet, différentes catégories peuvent être citées (A.Q.I.S., 1993), (Fig.1) :

- Extrémités (poupe et proue) : ces zones sont très renforcées car elles sont soumises à de gros efforts.
- Latéraux et centraux : de un à trois mètres de large, ils hébergent très souvent des éléments de structure importants (renforts longitudinaux).
- Latéraux supérieurs : souvent de section trapézoïdale, ils participent à la rigidité de la coque et à sa liaison avec les ponts,
- Latéraux : souvent étroits et très profonds caractéristiques des porte-conteneurs.

- De fond : double fond. Ce sont les plus répandus. Ils sont souvent remplis par simple gravité (économie de pompage). C'est le cas des grands et petits vraquiers (La double coque est obligatoire pour les nouvelles constructions navales).
- Côtés de tunnel : ils sont difficilement accessibles et contiennent souvent les tuyauteries de pompage.
- Zones de cale spécialement aménagées pour accueillir des liquides (soutes). Elles peuvent servir de ballasts occasionnels. Elles sont également utilisées par exemple par les petits vraquiers, au détriment des ballasts supérieurs, quand la cargaison est de faible gravité (transport du bois).

Tous ces volumes sont construits autour des éléments de structure de la coque : cloison de renfort, poutrelles longitudinales. Ils sont donc riches en recoins et surfaces horizontales qui favorisent la décantation des eaux de ballast. Ces structures sont difficiles d'accès, par conséquent leur nettoyage et entretien contre la corrosion reste limité voir irréalisable sauf sur cale sèche.

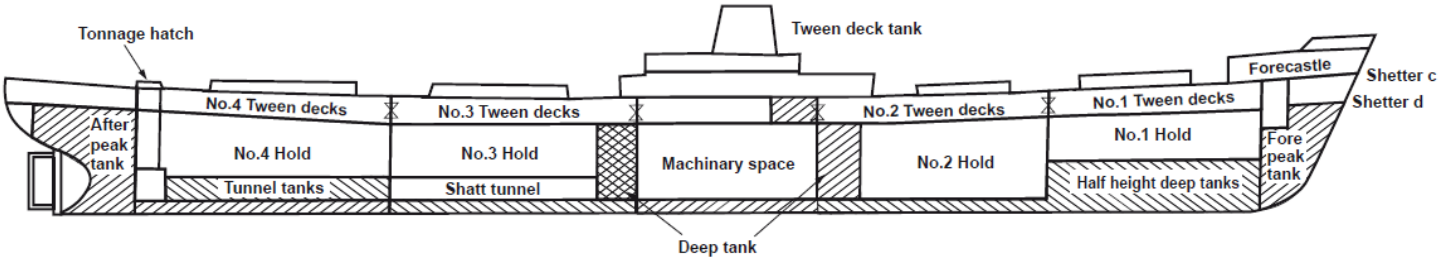


Fig.1. Différents types de ballasts de structure en coupe d'une coque d'après A.Q.I.S., 1993

2.4.3. Les systèmes de pompage

Généralement les pompes aspirantes sont logées au niveau de la salle des machines. Sur les gros navires, ils sont installés dans une structure spéciale (tunnel), leur capacité peut avoisiner les 3 500 m^3h^{-1}. Les ballasts sont généralement indépendants entre eux et ne peuvent donc être transvasés de l'un dans l'autre à l'exception de ceux des extrémités et du système d'équilibrage lors du chargement au port, ce qui ne concerne que des volumes réduits.

2.4.4. La pratique du ballastage et du déballastage

En général, les petits vraquiers pompent de l'eau dans des ports peu profonds qui sont généralement chargés en sédiments. Par contre les gros vraquiers s'alimentent dans des ports plus profonds (Rigby et *al*., 1991). Le ballastage en haute mer est possible, toutefois, un minimum de 20% d'eau du port est nécessaire pour manœuvrer. L'incovénient majeur du ballastage en haute mer revient à la durée de l'opération qui peut aller de 2 à 3 jours pour les grands vraquiers quand les conditions météorologiques sont favorables.

Les caboteurs ne le peuvent pas, les étapes étant trop courtes. Il faut dix-huit heures pour vider (ou remplir) les 12 500 t de ballast d'un transport de bois. Afin de gagner du temps, la plupart des navires commencent à déballaster avant l'arrivée au port de chargement (en général dans les zones côtières abritées).

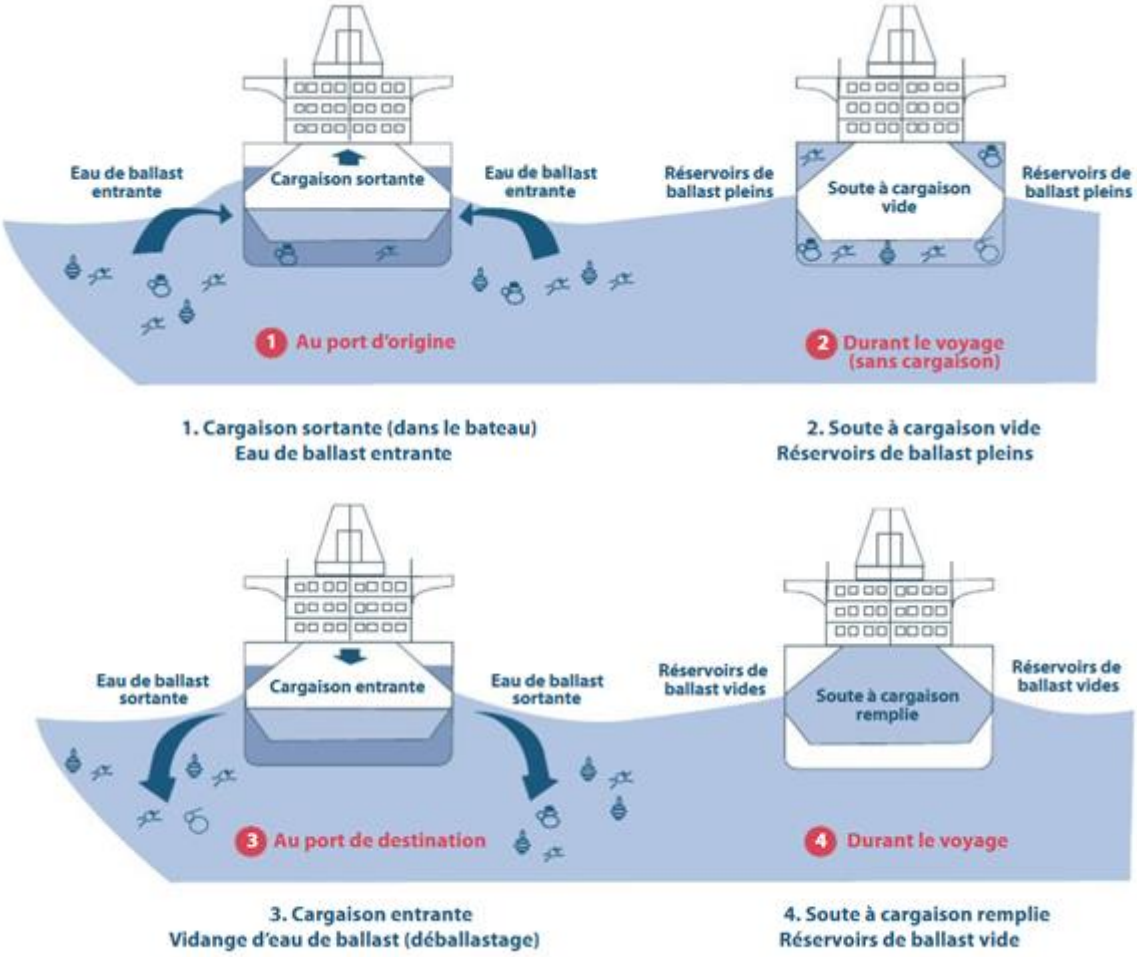


Fig.2. Section de bateau montrant le cycle de l'eau circulant dans les ballasts [1]

2.4.5. Nettoyage des ballasts

Une action nécessaire pour deux raisons : La première conserne la diminution de la charge utile, en effet, on trouve entre 5 et 10 cm d'épaisseur de sédiment, dans les ballasts de fond principalement, ce qui correspond à plusieurs centaines de tonnes inutilement transportées.

La deuxième action consiste à lutter contre la corrosion qui peut affecter la sécurité du navire.

Il est important de mettre l'accent sur la difficulté et l'incommodité de travailler dans des volumes confinés, sans lumière, avec des surfaces développées considérables et des recoins multiples avec le danger d'asphyxie.

2.4.6. Convention internationale pour le contrôle et la gestion des eaux de ballast et sédiments des navires Ballast Water Management « BWM »

Dans ce paragraphe certaines directives de la BWM seront discutées à savoir la règle D-1 portant sur « les Normes de renouvellement des eaux de ballast », relative à un renouvellement volumétrique effectif d'au moins 95% des eaux de ballast (à moins de 200 miles nautiques des côtes et dans des eaux de 200 mètres de profondeur minimum). Sur le plan pratique et pour des raisons de stabilité du navire cette condition est difficilement réalisable.

La règle D-2 "Norme de qualité des eaux de ballast" porte sur les limites de rejet en ce qui concerne les microorganismes viables présents dans l'eau. Pratiquement, si on place des filtres de différents maillages, on peut se trouver dans des conditions de colmatage (Tab. 2.)

Tableau 2. Norme de rendement du rejet des eaux de ballast d'après la BWM Convention (règle D-2) pour les organismes viables [2]

Microorganismes	**Norme OMI**
Plancton, taille > 50µm	< 10 organismes viables / m³
Plancton, taille: 10-50 µm	< 10 organismes viables / ml
Vibrio Cholarae	< 10 Unités Formant Colonie / 100 ml
Escherichia Coli	< 250 Unités Formant Clonie / 100 ml
Entérocoques Intestinaux	< 100 Unités Formant Colonie / 100 ml

Depuis 2004, les directives techniques (G1-G14 : Directives relatives au projet Globallast qui a été créé afin de mettre en œuvre des partenariats pour aider les pays en développement à réduire le transfert d'organismes aquatiques nuisibles dans les eaux de ballast des navires) ont été développées et adoptées au fil des années par le Comité de la Protection du Milieu Marin (MEPC) :

G1 : Directive relative aux installations de réception des sédiments

G2 : Directive pour l'échantillonnage des eaux de ballast

G3 : Directives sur le respect de condition équivalentes concernant la Gestion des eaux de ballast

G4 : Directives pour la gestion des eaux de ballast et l'élaboration des plans de gestion des eaux de ballast

G5 : Directives relatives aux installations de réception des eaux de ballast

G6 : Directives pour le renouvellement des eaux de ballast

G7 : Directives sur l'évaluation des risques dans le cadre de la règle A-4 de la convention BWT

G8 : Directives pour l'approbation des systèmes de gestion des eaux de ballast

G9 : Procédure d'approbation des systèmes de gestion des eaux de ballast qui utilisent des substances actives.

G10 : Directives pour l'approbation et la supervision des programmes relatifs aux prototypes de technologies de traitement des eaux de ballast.

G11 : Directives sur les normes de conception et de construction des navires qui procèdent au renouvellement des eaux de ballast

G12 : Directives en matière de conception et de construction pour faciliter le contrôle des sédiments à bord des navires

G13 : Directives sur les mesures supplémentaires concernant la gestion des eaux de ballast, y compris dans des situations d'urgence

G14 : Directives sur la désignation des zones pour le renouvellement des eaux de ballast.

Selon la directive G6 (Gollash et *al*., 2007), un navire doit entreprendre à chaque fois que c'est possible la BWE (Ballast Water Exchange) au moins 200 mn (milles nautiques) de la terre la plus proche et à des profondeurs d'au moins 200 m. Dans le cas où ces conditions ne sont pas remplies, la BWE peut être effectuée à 50 milles nautiques de la terre la plus proche et à une profondeur d'au moins 200 m. En outre, il est recommandé que le navire ne dévie pas de son itinéraire ou retarde son voyage. Dans les cas où la profondeur ou l'exigence de la distance ne peuvent pas être remplies, le port état (port d'accueil) peut désigner des zones de BWE en respectant certaines conditions :

La durée totale nécessaire à la réalisation des opérations sachant que pour les grands navires, ce genre d'opérations peut prendre 1 à 3 jours. Certaines routes maritimes ou voies de navigation ne sont pas conformes à la distance minimale de la côte et de la profondeur exigée par la convention. L'incidence sur la sécurité qui est d'une importance primordiale implique la supression de certaines manœuvres qui ne peuvent pas être entreprises sous des conditions météorologiques particulières et qui peuvent porter préjudice à la sécurité du navire.

L'hypothèse d'une dilution en haute mer et d'un taux de survie faible des organismes rejetés en mer réduisent le risque d'introduction des espèces lors de la BWE. Néanmoins, certaines études ont prouvé la persistance de certains organismes dans l'eau de ballast après la BWE (Mc Donald et Davidson, 1998 ; McCollin et *al*., 2001), et ce principalement lors des proliférations massives de microlagues en haute mer. D'autres limitations incluent l'eau de ballast impompable (en raison de la forme du ballast tank). A cet effet, un échange unique d'eau de ballast peut s'avérer inefficace pour réduire la charge des organismes en question. En effet, le règlement de la première directive (D1) de l'OMI nécessite un échange d'eau d'au moins 95% du volume d'eau de ballast par vidange et remplissage du ballast tank soit par pompage (3 fois) du volume du ballast tank (Rigby et Hallegraeff, 1994). Il convient de noter que 95% d'échange volumétrique n'est pas équivalent à 95% d'élimination d'organismes car ils ne sont pas répartis de manière homogène dans le réservoir de ballast (Murphy et Riley, 1962). Si l'échantillonnage doit démontrer la conformité avec la norme qui stipule 10 organismes < 50mm/m^3d'eau, divers aspects peuvent être identifiés ainsi le volume d'eau prélevé doit être de l'ordre de 1000 l et cela doit être fait plusieurs fois en respectant un nombre de répétitions permettant une analyse scientifique de la concentration estimée. Pour répondre à ces exigences, de nouvelles techniques d'échantillonnage ne cessent de se développer.

Pour le contexte national, la BWM (2004) n'est pas encore entrée en vigueur vu que la Tunisie n'a pas ratifié la convention.

2.4.7. Les systèmes de gestion des eaux de ballast

En juillet 2012, des données sur les différents systèmes de traitement des eaux de ballast existants (95) ont été réunies dans le cadre d'un projet (EU FP7 funded project VECTORS : the European Community's Seventh Framework Programme). Parmi, ces systèmes, 23 étaient déjà homologués tandis que d'autres étaient au stade d'essais ou en cours de processus d'approbation (David et Gollasch, 2012). Les capacités des systèmes proposés varient de 50 $m^3 h^{-1}$ à plus de 10.000 $m^3 h^{-1}$. Dans ce même contexte, 5 fabricants dans le monde proposent une capacité de 20000 m^3h^{-1} et plus. Les mesures disponibles pour le traitement des eaux de ballast peuvent être divisées en procédés physico-mécaniques et chimiques (Werschkun et *al*., 2014) (Fig. 3).

Pratiquement, tous les BWMS utilisent des procédés combinés. Dans la plus part des cas, la séparation mécanique des grosses particules (filtres/hydrocyclones) constitue la première étape du traitement. Des systèmes de filtres automatiques (auto-nettoyants) avec des maillages allant jusqu'à 40 µm sont fréquemment utilisés. D'autres mesures physiques telles que (a) les ultrasons, la cavitation, (b) le chauffage, (c) l'irradiation UV avec la combinaison des filtres haute performance sont utlisés pour le traitement de l'eau de ballast. Il existe plusieurs systèmes homologués sur le marché qui font le traitement physique conformément à la directive (D2). Bien que ces systèmes ne soient pas susceptibles de causer des nuisances chimiques sur l'homme et l'environnement, ils ont des inconvénients tels que la forte consommation énergétique et des problèmes de performance potentiels pour le traitement des eaux à turbidité élevée avec une forte teneur organique dissoute qui peuvent réduire la pénétration de l'UV et ainsi l'efficacité du traitement. Ces systèmes de traitement ont fait leur preuves, cependant, ils génèrent des sous-produits de désinfection par les produits (Desinfection By Products) : Les « DBPs » : connus pour leur propriétés dangereuses qui sont associées à des risques sanitaires potentiel graves, tels que le cancer, des problèmes de développement mentaux et reproducteurs (Werschkun et *al*., 2014). Dans ce même contexte et au cours des 30 dernières années, les efforts de recherche importants ont été fournis dans le domaine de la désinfection de l'eau potable, axés principalement sur la compréhension de la formation de DBPs et leurs effets sur la santé. Plus de 600 DBPs ont été signalés dans la littérature scientifique (Richardson, 1998 ; 2011). Cependant, moins de 100 produits seulement ont fait l'objet d'études de toxicité (Richardson et *al*., 2007).

Plus de 50 % de DBPs halogénés sont formés au cours de la chlorination de l'eau potable et plus de 50 % des DBPs sont formés au cours de l'ozonation de l'eau potable (Richardson et *al*., 2007). Une grande partie de la recherche sur les effets nocifs des DBPs a mis l'accent sur le cancer, la génotoxicité, la mutagénicité ou de la cytotoxicité (Richardson et *al*., 2007). On craint que les DBPs soient impliqués dans certains types de cancer observés dans les études animales (principalement le cancer du foie). Par conséquent, les études sur le DBPs au-delà de ceux qui sont actuellement réglementés sont nécessaires. Les DBPs bromés peuvent être plus cancérogènesque leurs analogues chlorés (Richardson et *al*., 2007). Ces méthodes favorisent la formation de sous-produits potentiellement toxiques, qui a jusqu'à présent étaient insuffisamment étudié dans les eaux marines. L'évaluation des risques liés aux systèmes de traitements des eaux de ballast dans le cadre de la convention de la « BWM » mérite un suivi plus rigoureux en ce qui concerne les DBPs au cours des opérations de routine.

Dans la préparation de ce défi futur, la communauté maritime peut bénéficier de l'expertise et l'expérience disponibles dans d'autres domaines du traitement de l'eau, de la santé publique et de la protection de l'environnement pour être mieux adaptées au traitement de l'eau de ballast.

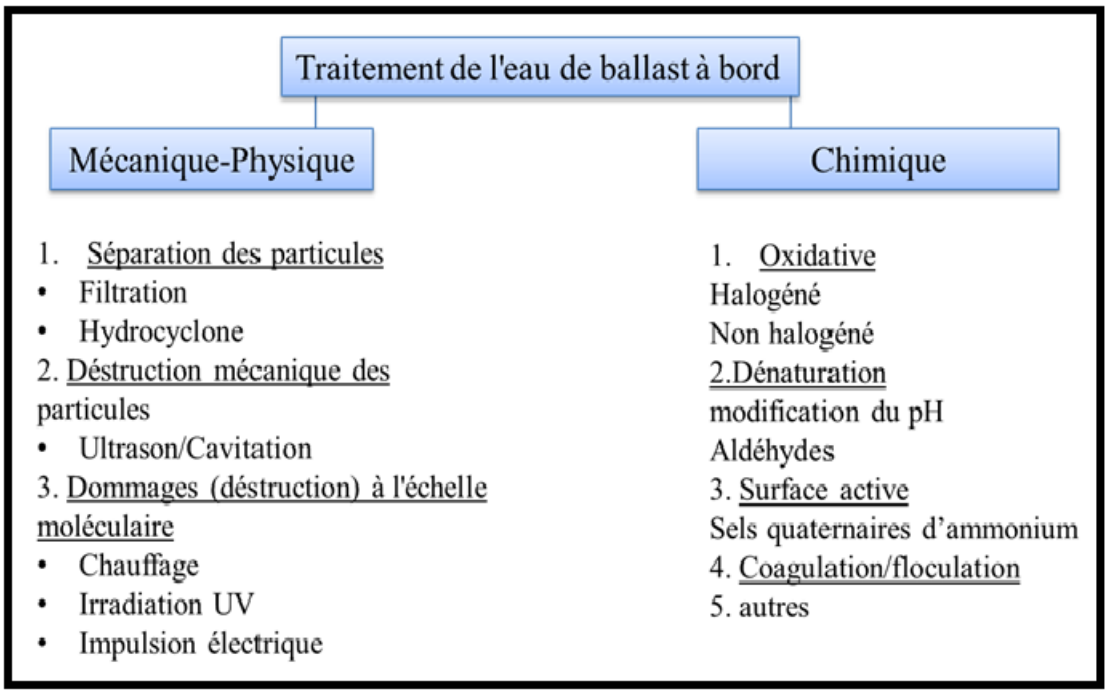


Fig. 3. Mesures de traitement de l'eau de ballast à bord d'un navire.

2.5. Les espèces introduites en Méditérrannée

Environ 925 espèces non-indigènes ont été dénombrées à ce jour en Méditerranée. Ces espèces sont représenteés au nivesau de 13 embranchements. Les mollusques constituent l'embranchement le plus important (216 espèces), suivi des poissons (127 espèces), des végétaux (124 espèces) et des crustacés (106 espèces). Une étude plus récente parle d'un total de 955 espèces exotiques connues en Méditerranée, la grande majorité d'entre elles ayant été introduites dans l'Est de la Méditerranée (718), et moins dans le bassin Ouest (328). Pour la Méditerranée centrale, on recense 267 et moins au niveau de l'Adriatique (171). Toutefois, les espèces phytoplanctoniques restent peu étudiées (Zenetos et *al.*, 2011). Cette augmentation du nombre de signalisations a été attribuée principalement à l'intensification de l'effort de la recherche (Zenetos et Polychronidis, 2010). Dans le même contexte Coll et *al*. (2010) décrivent la Méditerranée en tant que point chaud en ce qui concerne la biodiversité marine. En effet, cet écosystème héberge environ 17.000 espèces marines, dont plus de 600 (3,3%) sont introduites ou exotiques.

Il existe des voies d'introduction naturelle telles que le détroit de Gibraltar permettant l'arrivée d'espèces d'origine Atlantique Nord et Sud. Le canal de Suez notamment, constitue une voie d'introduction des espèces non-indigènes, tout en permettant la communication des eaux de la mer Rouge et de l'océan Indien avec les eaux de la Méditerranée. La troisième voie est celle des détroits du Bosphore et des Dardanelles Les détroits du Bosphore (reliant la mer Noire à la mer de Marmara) et des Dardanelles (reliant la mer de Marmara à la mer Méditerranée) constituent également des voies d'accès qui reste relativement limitées.

Les voies d'introduction anthropiques reviennent principalement au trafic maritime. En effet, les espèces non-indigènes sont transportées par l'intermédiaire des eaux de ballast lors du pompage de l'eau (organismes en suspension) ou fixées sur les coques des bateaux (fouling). L'aquaculture peut être vectrice d'espèces introduites soit intentionnellement (nouvelles filières conchylicoles), soit accidentelle.

En Tunisie, le golfe de Gabès représente une région favorable à l'installation des espèces introduites (Bradai et *al.*, 2004) par son hydrographie et l'important trafic maritime au niveau du golfe. Hattour et Ben Mustapha (2015) ont cité que le nombre d'espèces exotiques recencées au niveau du golfe s'élève à 91 espèces à part les espèces du plancton. La principale composante est d'origine indopacifique (57.1%), suivie par celle d'origine Atlantique (24.7%) en ce qui

concerne les macrophytes, les mollusques, les poissons, les crustacés et d'autres invertébrés. Parmi les taxons phytoplanctoniques inventoriés 8 espèces sont potentiellement toxiques dont 3 Diatomées et 5 Dinoflagellés. Il s'agit de *Chaeotoceros socialis* Lauder, *cf Pseudonitzschia* sp Peragallo 1897, *cf Pseudonitzschia* sp1 Peragallo 1897, *Gonyaulax polyedra* stein, *Akashiwo sanguinea* Hansen et Moestrup, *Karenia selliformis* Haywood, *Prorocenrum lima* Dodge, *Scrippsiella trochoidea* Stein.

Les premiers travaux (Zmerli-Triki et Daly Yahia-Kéfi, 2012) sur les espèces introduites par les eaux de ballast au niveau du port de Bizerte (Nord de la Tunisie) ont révélé que les taxa récoltés au niveau des réservoirs de ballast existent dans l'écosystème environnent. Toutefois, neuf espèces phytoplanctoniques potentiellement toxiques ont été recensées dans le port de Bizerte.

3. La classe des Dinoflagellés

Les Dinoflagellés appelés encore Péridiniens (Phylum des Chromophycophytes, Embranchement des Pyrrophycophytes) sont le groupe qui succède aux Diatomées dans le phytoplancton marin. Il comporte 20 ordres et plus de 1300 espèces. A la différence des Diatomées, les individus vivent libres et rarement regroupés en chaînes. Ils peuvent coloniser les eaux douces, saumâtres ou marines et peuvent être planctoniques, benthiques, épiphytiques, symbiotiques (zooxanthelles) et parasites (Hansen *et al.*, 2001). Ils sont généralement adaptés à la vie pélagique, cependant plusieurs genres présentent dans leurs cycle biologique une phase benthique (phase de repos sous forme enkystée déposée sur le fond). D'après Evitt (1985), il est possible d'établir qu'un kyste provient d'un Dinoflagellé si sa paroi est la « réflexion » directe d'une tabulation, ou si les processus de cette paroi présentent une disposition et une forme caractéristiques (Fig. 4.), ou encore si le kyste possède un archéopyle (pore de dékystement) qui correspond à une plaque ou à un groupe de plaques de la tabulation.

Les Dinoflagellés sont caractérisés par la présence de deux flagelles dissemblables : un flagelle transversal et un autre longitudinal qui sont logés dans deux sillons orthogonaux: le sulcus et le cingulum dont la jonction définit la face ventrale de ces organismes (Sournia, 1986). La plupart des Dinoflagellés ont un noyau très particulier : le dicaryon, qui se caractérise par des chromosomes toujours condensés. Les plastes ou chromatophores, comprennent la chlorophylle a et c2 associées à des carotènes β et à des xanthophylles (diadinoxanthine, dinoxanthine et peridinine). Les réserves sont présentes sous formes de lipides et d'amidon.

On distingue parmi les Dinoflagellés, les espèces à thèque et celles qui en sont dépourvues , caractérisées par la présence ou l'absence de plaques thècales. Il s'agit d'un système complexe de plaques cellulosiques dont la disposition reste l'une des caractéristiques majeure permettant la classification taxonomique.

Ce groupe de protistes inclut la plupart des espèces toxiques responsables des efflorescences, des mortalités massives et des intoxications humaines.

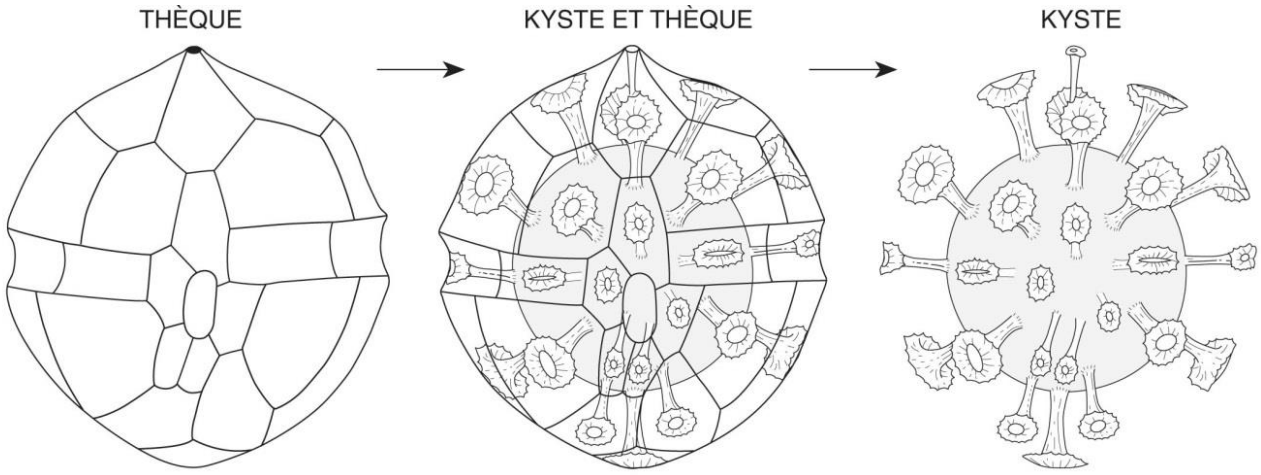


Fig. 4. Relation entre les stades mobile ou forme végétative (à gauche) et enkysté (à droite) du même dinoflagellé. Cette correspondance entre processus et plaque n'est pas toujours évidente (Evitt, 1985).

4. Le sespècesdu genre *Alexandrium*

Les espèces de Dinoflagellés du genre *Alexandrium* comptent parmi les espèces les plus étudiées sur le plan taxonomique, biogéographique, génétique, toxicologique, physiologique, écologique et la gestion de risques. Dans ce même plusieurs études et programmes de surveillance ont été développé afin de prévoir et gérer les efflorescences, les marées rouges et les risques potentiels pour la santé.

4.1. Position systématique :

Le genre *Alexandrium* est subdivisé en deux sous genres à savoir :

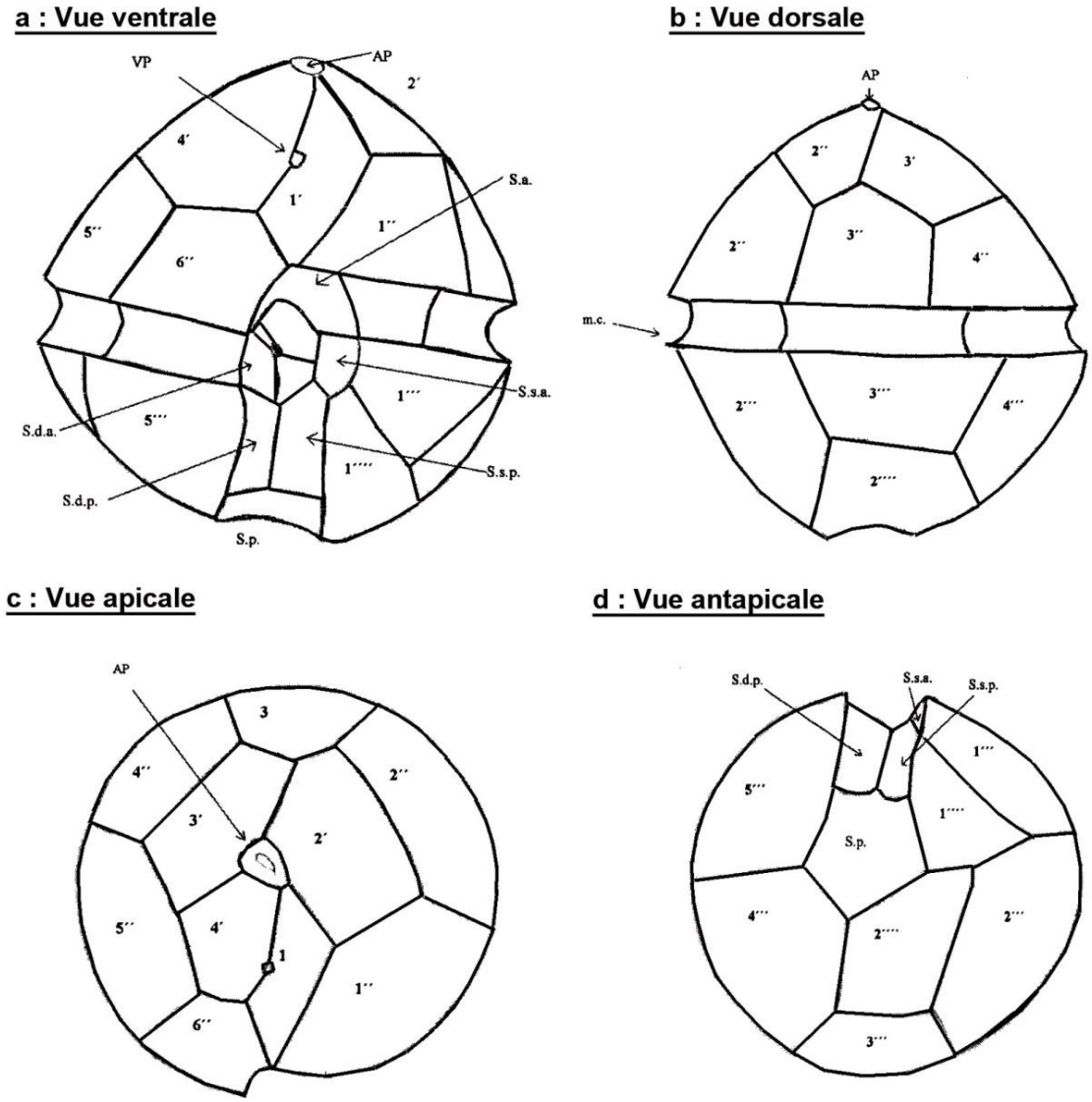
- *Alexandrium senso-stricto* avec une première plaque en connexion avec APC (le Complexe du Pore Apical).
- *Gesnerium* avec la première plaque qui n'est pas connectée au complexe APC. D'après, l'analyse phylogénétique et moléculaire effectuée principalement sur les gènes de l'ARN ribosomique chez les eucaryotes unicellulaires, Saldarriaga et *al*., (2004) ont confirmé l'appartenance d'*Alexandrium* à l'ordre des Gonyaulacales.

Le genre *Alexandrium* a été formellement décrit avec l'espèce *Alexandrium minutum* Halim (1960). Cette espèce a été à l'origine des eaux colorées au port d'Alexandrie (Egypte). Actuellement, ce genre comprend 31 espèces .Plusieurs d'entre elles ont été décrites avec des noms différents du genre tels que *Gonyaulax*, *Protogonyaulax*, *Gesmerium*, *Goniodoma* et *Pyrodinum*. D'un point de vue morphologique, l'identification se base d'une part, sur la tabulation des plaques de Kofoid, et d'autre part, sur la structure du complexe du pore apical « APC » selon la formule des plaques suivantes 4',6'', 5'', 2'''', 6 C, 9-10 S d'après les descriptions de Balech (1995) (Figs. 5 ;6). En effet, après coloration et dissection en microscopie photonique et/ou observation en microscopie électronique à balayage, on peut citer les caractères d'identification suivants : la taille, la forme, le nombre des cellules par chaîne, l'ornementation de la thèque, la position du sulcus, la forme de l'APC, les plaques sp, Sa et Ssa.

Le genre *Alexandrium* est connu par ses kystes de résistance ou resting cysts (RC) à l'exception d'*Alexandrium pseudogonyaulax* qui forme des kystes avec une paratabulation particulière, Montresor (1995) ; Matsuka et Fukyo (2003) ayant également décrit ce kyste caractérisé par une paroi lisse, ronde avec une forme ovale ou elliptique.

Formule des plaques (Tabulation de Kofoid) du genre *Alexandrium* Halim
(Balech, 1995)

adapted after Balech, 1995



Abréviations : AP= Pore Apical, VP= Pore Ventrale
S.a., S.s.p., S.d.a., S.d.p., S.p. : Plaque Sulcale

Fig. 5. Formule des plaques (tabulation de Kofoid) du genre *Alexandrium* d'après Balech, 1995)

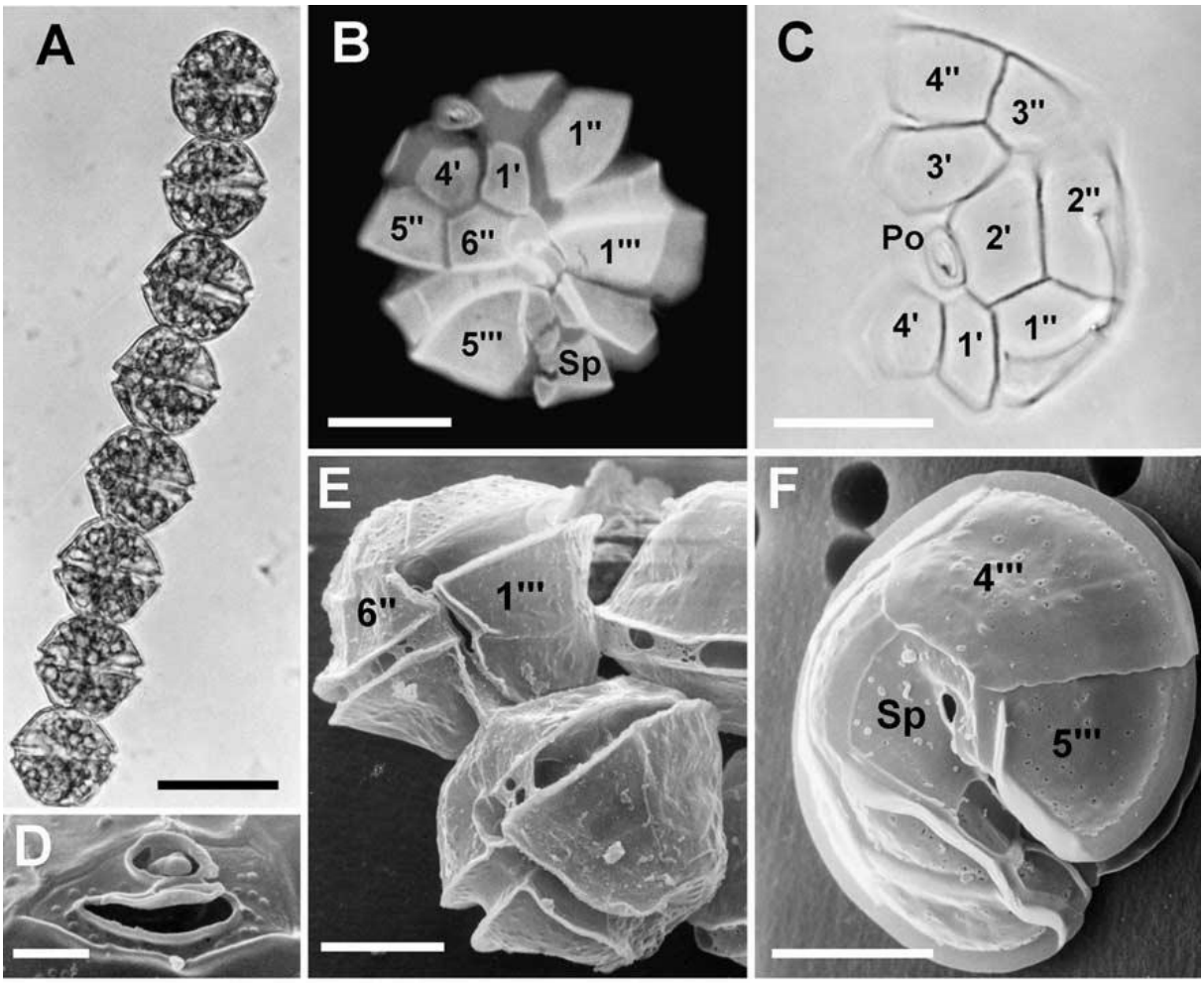


Fig. 6. Morphologie des plaques thécales d' *A. catenella* : (A) Chaîne de cellules végétative ; (B) vue ventrale de la cellule en microscopie à épiflorescence ; (C) Observation en contraste de phase d'une vue apicale de l'épithèque ; (D) Complexe des plaques apicales du pore ; (E) Vue ventrale d'une paire de cellules en microscopie électronique à balayage « SEM » ; (F) Vue de l' hypothèque en SEM d'après MacKenzie et de Salas, 2004

L'analyse séquentielle du genre *Alexandrium* est en faveur de la distinction de ce genre par rapport aux autres Gonyaulacales. En effet, la nature monophylétique du genre est sans équivoque (John et *al*., 2003 ; Saldarriaga et *al*., 2004). Seuls John et *al*. (2005) suggèrent une paraphylie avec le genre *Pyrodinum bahamense.* Toutefois, l'analyse phylogénique faite par Andersson et *al*. (2012) y compris sur la LSU rDNA séquences (Large Ribosomal Subunit « LSU ») confirme la monophylie des deux genres. Dans le même contexte, une étroite phylogénie pour les espèces suivantes a été établie : *A. tamarense, A. fundyense, A. catenella, A. affine, A. tamiyavanichii, A. cohorticula, A. tropicale* et *A. fraterculus*. Ces espèces sont

également connues pour leur potentiel toxique en raison de leur capacité à produire des toxines paralysantes des fruits de mer només PSP (Paralytic shellfish Poisonning). Les travaux d'Anderson et *al*. (1994 ; 2012) ont permis d'évoquer la notion de complexe d'espèces caractérisant un groupe de souches génétiquement distinctes mais qui partagent des caractéristiques morphologiques similaires.

Dans ce même contexte, les trois morpho-espèces suivantes *A. tamarense*, *A. catenella* et *A. fundyense* se distinguent principalement par leur capacité à former des chaînes et la présence ou l'absence de pore ventral entre les plaques apicales 1' et 4'. Vu les nombreuses similitudes morphologiques, toxiques et génétiques entre ces 3 espèces, elles ont été regroupées au sein du complexe « *A. tamarense* complex » selon Anderson et *al*. (1994) ainsi que Scholin et Anderson (1994). Cependant, 5 ribotypes ont été identifiés et nommés en fonction de l'origine géographique des souches en provenance de l'Amérique du Nord, l'Europe occidentale, l'Asie tempérée, la Tasmanie et l'Asie tropicale (Scholin et Anderson, 1994). John et *al.* (2003) ont montré l'existence d'une nouvelle espèce endémique de la Méditerranée qui est non-toxique, décrite en tant que ribotype d'*A. tamarense de l'*Asie tropicale. Toutefois, l'analyse phylogénétique n'a pas permis d'assimiler ce ribotype au complexe *tamarense* (John et *al*., 2003). Une étude récente comprenant une analyse séquentielle étendue a confirmé le regroupement des ribotypes en 5 clades phylogénétiquement distinctes comprenant les souches toxiques ou non toxiques (Lilly et *al*., 2007). Ainsi, la nomenclature relative à l'origine géographique n'est plus adaptée et a été remplacée par un système de numérotation. (Lilly et *al*., 2007). En revanche, la distinction morphologique des différents isolats correspondant aux ribotypes du complexe *A. tamarense* montre que les clades phylogénétiques ne sont pas monophylétiques. Ce manque de corrélations entre caractères morphologiques et moléculaires indique que la distinction taxonomique ne reflète pas l'évolution de ces trois espèces (*A. tamarense*, *A. catenella* et *A. fundyense*).

Les études phylogénétiques basées sur plusieurs régions de l'opéron ADNr indiquent que les séquences d'isolats morphologiquement indiscernables se divisent en 5 clades. Ces clades ont été d'abord nommés en fonction de leur répartition géographique. Mais récemment une nouvelle nomenclature a été baptisée utilisant le terme de groupes (G I-V) suite à la découverte de sympatrie parmi certains groupes. D'après le travail de John et *al*. (2014) relatif à l'étude morphologique, la distance génétique du gène (ITS/5.8S), la séquence ITS2 concernant le changement de base compensatoire, le gène de synthèse de la saxitoxine (StxA toxine), ainsi que la phylogénie de l'ADNr aboutissent à la distinction de 5 espèces cryptiques indépendantes :

Groupe I (*A. fundyense),* Groupe II (*A. mediterraneum),* Groupe III (*A. tamarense),* Groupe IV (*A. pacificum)* et Groupe V (*A. australiense).*

4. 2. Biogéographie et évolution des différentes espèces du genre *Alexandrium*

Les espèces du genre *Alexandrium* sont considérées comme des espèces cosmopolites, ayant une large répartition à l'échelle mondiale dans les écosystèmes côtiers, les zones tropicales, tempérées, subarctiques et arctiques (Taylor et *al*., 1995 ; Lilly et *al*., 2007). La diversité du genre semble la plus élevée en Méditerranée reflétant l'intérêt porté à ces espèces. A part, les études relatives aux formes végétatives, on cite les travaux sur les formes de résistance ou kystes qui ont permis d'entamer la répartition géographique des espèces en question. Les kystes relatifs au complexe *Alexandrium tamarense* se répartissent sur des zones dont l'intervalle de température varie de -0,6 à 26,8°C, avec une abondance relative élevée pour des températures comprises entre 5 et 15°C. En effet, de nombreuses espèces du complexe *tamarense* sont considérées comme caractéristiques des régions tempérées et subtropicales pullulant dans les eaux saumâtres à influence marine et à caractère oligotrophe à eutrophe (Marret et Zonneveld, 2003). Au cours des dernières décennies, une augmentation spectaculaire des évènements « HABs » a été enregistrée. L'activité anthropique principalement liée à la dissémination des eaux de ballast, le transfert des mollusques bivalves a contribué activement à l'expansion du complexe *Alexandrium tamarense* selon Bolch et de Salas (2007) et Smayda (2007).

Un exemple pertinent se rapporte au recensement d'*Alexandrium catenella* (Fig.7.) au niveau des îles Baléares et de la Catalogne en 1983 (Margalef et Estrada,1987) puis cette espèce a été citée sur les côtes françaises, italiennes, espagnoles, greques, algériennes et tunisiennes (Abadie et *al*., 1999 ; Vila et *al*., 2001 ; Luglie` et *al*., 2003 ; Frehi et*al*., 2007 ; Turki et *al*., 2007, Fertouna-Bellakhal et *al*., 2014, Zmerli-triki et *al.*, 2015).

L'émergence des techniques moléculaires par caractérisation génétique a permis la révision des populations considérées comme invasives pouvant se révéler absentes partiellement « Hidden flora » mais qui font éruption suite aux changements climatiques ou autres modifications environementales du milieu (Smayda, 2007). Ainsi, les marqueurs génétiques polymorphes tels que les microsatellites ADN ont été développés pour les espèces d'*Alexandrium du* Groupe I : *A. tamarense* North Americain clade (Nagai et *al*., 2004 ; Alpermann et *al*., 2006), et celles du Groupe IV : *A. minutum* (Nagai et *al*., 2006a), *A. catenella* temperate Asian clade (Nagai et *al*., 2006b). Dans ce même contexte, on cite le cas de l'étang de Thau (France) où l'apparition soudaine d'*A. catenella* après plusieurs décennies de non

détection au niveau du séquençage ARNr de cette espèce, a conduit à l'hypothèse d'introduction anthropique (Lilly et *al*., 2002). En revanche, Masseret et *al*. (2009) ont examiné ces mêmes souches en utilisant les marqueurs microsatellites hypervariables et n'ont pas relevé de relation détectée au moyen de l'ARNr ce qui recèle l'appartenance de ce genre à une lignée méditerranéenne distincte. Une étude récente impliquant une modélisation océanographique a montré l'existence d'une sous-structure génétique des populations d'*A. minutum* de la mer Méditerranée (Casabianca et *al*., 2012).

L'aspect attrayant de la biogéographie d'*Alexandrium* impliquant la distribution des souches toxiques appartenant à la même espèce ou à des espèces étroitement apparentées est l'absence de chevauchement à l'exception des deux cas du complexe *Alexandrium tamarense* au niveau des îles de Shetland en Ecosse (Touzet et *al*., 2010), et du port de Belfast Louth en Irlande du Nord (Brosnahan et *al*., 2010). En effet, le croisement des souches d'*Alexandrium tamarense* du groupe I avec des souches du groupe III, respectivement toxique et non toxiques, a conduit à la formation de kystes de dormance qui ont germé produisant des cellules non viables. Par conséquent, cette barrière reproductive fait que les ribotypes du groupe I et III sont des espèces différentes biologiquement ce qui a conduit à une limitation des invasions éventuelles résultant des hybridations non viables (Brosnahan et *al*., 2010).

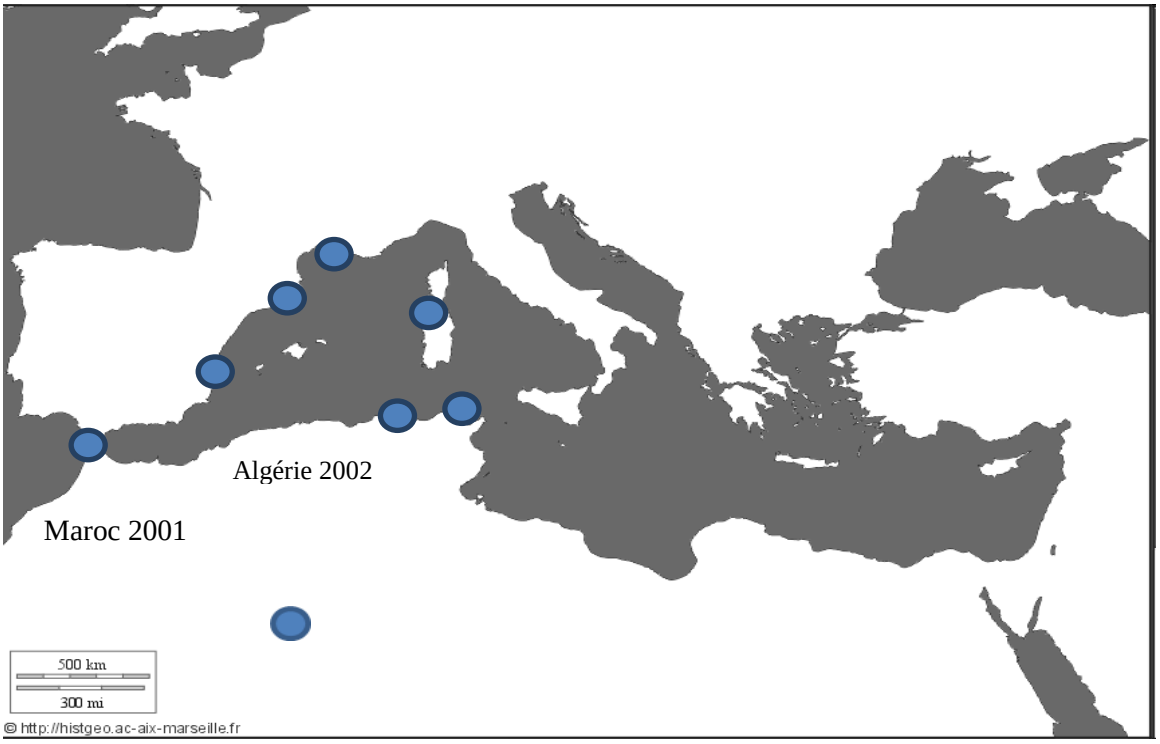


Fig.7. Distribution spatiale d'*A. catenella* en méditérranée occidentale d'après les travaux respectifs de Frehi et *al.*, 2007, Turki et *al.*, 2007, Penna et *al.*, 2008, Genovesi et *al.*, 2011.

En se basant sur certains critères de génétique moléculaire : la rDNA, la position des gènes ITS/5.8S, l'ITS2 et les gènes codant pour la synthèse des StxA (saxitoxines), une nouvelle classification a été proposée mettant en évidence 5 clades différents *A.pacificum* fait parti du IV groupe avec des similitudes morphologiques correspondant à *A. catenella* (Whedon et kofoid) Balech. Les souches d'*A. pacificum* ont été isolées à partir des eaux du Pacifique Sud (Australie, nouvelle Zélande), du Pacifique Nord (Chine, Japan, Singapore et Corée du Sud), de la Méditérranée (France, Italie et Espagne) et au niveau de l'Atlantique. *A. pacificum* doit son appelation à son origine Pacifique (Japon, Corée et Autralie).

Les analyses génétiques ont montré que la souche *A. pacificum* isolée à partir de la Méditérranée occidentale est en relation étroite avec la souche de l'Asie tempérée (Lilly et *al*., 2002; Penna et *al.*, 2005; Masseret et *al.*, 2009, 2014). A cet effet, *A. pacificum* a été reconnue en tant qu'espèce introduite (Molnar et *al*., 2008).

Concernant la toxicité d'*A. pacificum*, elle a ét considérée comme toxique à certains degrés, en effet, la souche australienne (ACP01) citée par Negri et *al*., 2003 a un profil comprenant uniquement les N-sulfocarbamoyls (C1,C2,C4 et les GTX4, GTX5 et GTX6). Par contre d'autres souches produisent d'autres saxitoxines avec leurs congénères (B1, C1, C2, GTX 1, 2, 3, 4, 5 et 6, dcGTX3, NEO et STX (John et *al*., 2014).

4.3. Cycle de vie des Dinoflagellés du genre *Alexandrium*

Le cycle biologique des espèces du genre d'*Alexandrium sp.* est caractérisé par l'alternance d'une reproduction asexuée et d'une reproduction sexuée. Le kyste de résistance (diploïde), issu de la reproduction sexuée (Anderson et *al*., 1984; Montresor, 1995; Persson et *al*., 2000) constitue le point de départ de ce cycle de vie. Sa germination est contrôlée par les conditions environnementales ou par une horloge biologique interne (Yamaguchi et *al*., 1995 ; Itakura et Yamaguchi, 2001). Elle commence avec l'émergence du protoplasme par un mouvement amiboïde à travers l'archéopyle du kyste (Fritz et *al*., 1989). Le planoméiocyte (diploïde) qui résulte de cette germination subit une mitose et donne deux cellules végétatives flagellées entourées d'une thèque de nature cellulosique. Ces cellules vont ensuite se diviser de façon asexuée, par fission binaire (Montresor, 1995). Ce mode de reproduction entraîne une croissance exponentielle de la population lorsque les conditions sont favorables, caractérisée au début de la phase stationnaire et de sénescence par la formation de cellules végétatives qui ont perdu leurs flagelles et leurs thèques, formant ainsi des kystes de division (ou gamétanges) (Fig. 8.).

Ces derniers vont subir la méiose et donner des gamètes haploïdes, qui vont fusionner pour donner une cellule diploïde et biflagellée ou planozygote. En fin de maturation, cette cellule augmente de taille, tandis que sa mobilité décroît jusqu'à une perte complète des flagelles et de la thèque (Montresor, 1995). Cette forme correspond au kyste de résistance ou hypnozygote. Ces kystes permettent de survivre aux conditions défavorables (Fritz et *al*., 1989). Ils entrent dans une période de dormance obligatoire pendant laquelle le kyste ralentit son métabolisme et consomme ses substances de réserve (Montresor et Marino, 1996). A l'issue de cette période de dormance et quand les conditions environnementales redeviennent favorables, la germination peut à nouveau se produire (Anderson et Keafer, 1987 ; Montresor et Marino, 1996 ; Anderson, 1997). Cependant, certains auteurs insistent sur le rôle de l'horloge biologique dans le phénomène de réviviscence des kystes d'*Alexandrium* (Anderson et Keafer, 1987).

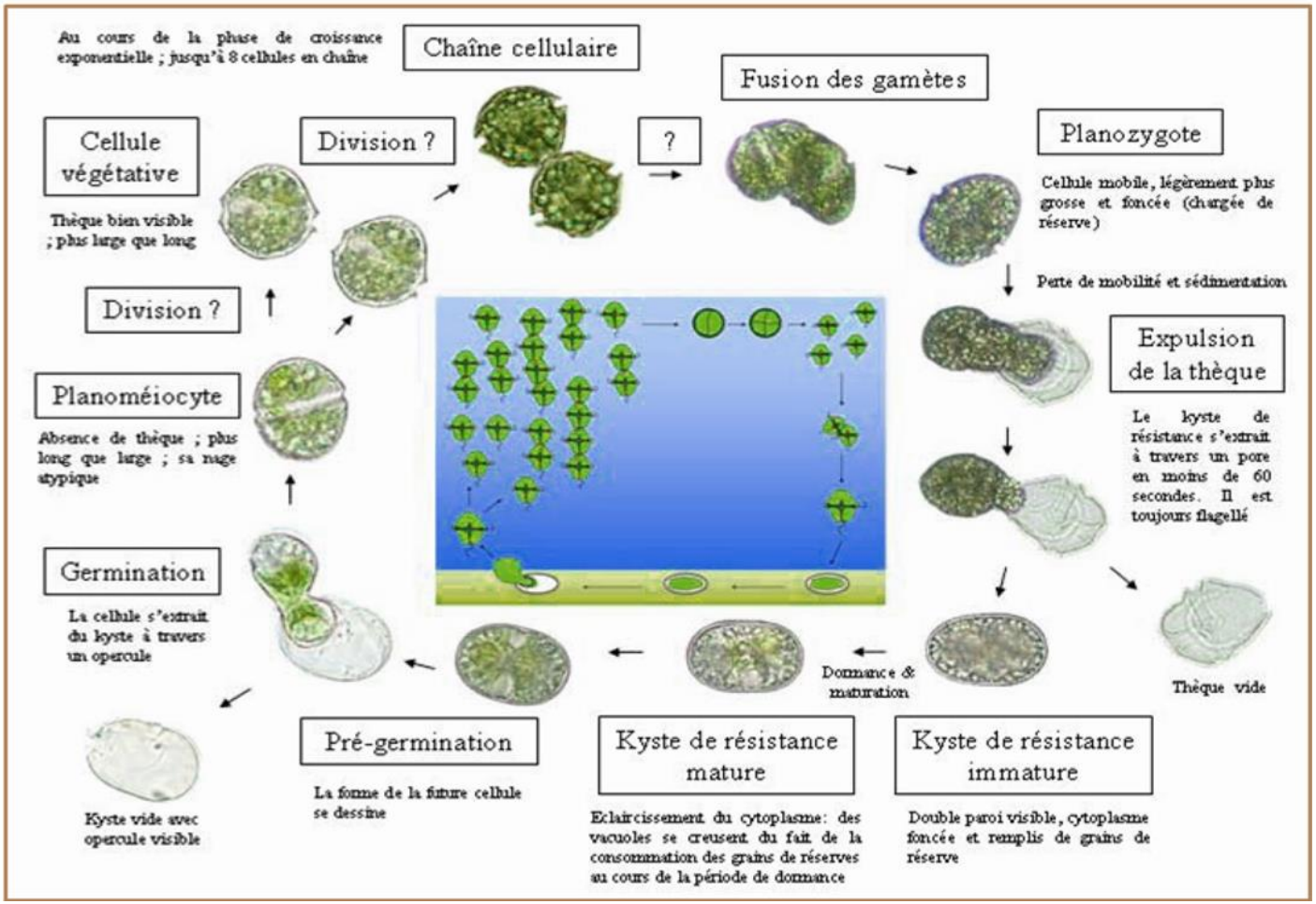


Fig.8. Cycle de vie *d'Alexandrium catenella* (Genovesi *et al*., 2006)

4.4. Rôle des kystes dans la dynamique des populations du genre *Alexandrium*

Parmi les hypothèses expliquant les proliférations massives des microalgues, on cite l'inoculation dans le milieu de cellules végétatives issues de la germination des kystes localisés dans le sédiment ou foyers de kystes només « Seed beds ». Cependant, ce scénario ne peut pas être valable pour de vastes étendues vu la dispersion des kystes et la probabilité de leur germination. Néanmoins, Genovesi et *al*. (2009) ont établi la cartographie des kystes au niveau de l'étang de Thau en localisant les foyers de kystes qui seraient à l'origine du déclenchement des proliférations massives d'*Alexandrium catenella*. Bravo et *al*. (2008) ont également relevé une situation similaire au niveau du port de Tarragona en Espagne. En examinant de plus près le cas de l'étang de Thau, on trouve que le déclenchement a débuté au niveau d'une zone de faible profondeur, telle que la Crique de l'Angle avec des germinations journalières alimentant progressivement le bloom dans le temps et l'espace.

Dans les régions tempérées, les kystes d'*Alexandrium* restent au repos pendant la saison hivernale malgré leur maturité suite à l'inhibition induite par les basses températures (Anderson et Rengefors, 2006). D'autres facteurs contrôlent la germination, tels que l'horloge interne (Anderson et Keafer, 1987) et la présence d'oxygène dissous, ainsi la germination n'est possible (Anderson et Keafer, 1987). Dans ce même contexte, nous pouvons déduire que le nombre de kystes qui contribuent au processus d'initiation des efflorescences est relativement faible par rapport au nombre total de kystes dans le sédiment. Effectivement, c'est la partie superficielle du sédiment qui est directement liée à la germination qu'on qualifie de couche oxygénée. Certaines études portant sur les flux de germination et leurs implication dans l'induction et la densité de l'inoculum ont permis de montrer que le taux de croissance et la capacité de division d'une population seraient impliqués dans l'initiation des efflorescences, et non l'abondance de kystes dans le sédiment (Ishikawa et *al*., 2007). Le cas de l'estuaire de saint Lawrence aux Etats Unis illustre bien le phénomène de dispersion des kystes, ainsi Cembella et *al*. (1998) affirment que les kystes d'*Alexandrium tamarense,* le long de la rive Nord, ont initié un bloom toxique dans les eaux adjacentes. Le cas du golfe du Maine (Etats Unis) vient appuyer l'hypothèse de l'existence de foyers de kystes régionaux, initiateurs de blooms (McGillicuddy et *al*., 2011).

4. 5. Rôle des kystes dans le maintien de la structure génétique et de la diversité des populations ou « pool génétique »

La capacité de résistance des kystes du genre *Alexandrium* pendant de longues périodes (plusieurs années) peut contribuer non seulement à l'initiation des efflorescnences durant un cycle annuel mais également au cours des années à venir. Selon un modèle conceptuel basé sur l'analyse microsatellitaire et l'Amplification Fragment Length Polymorphism « AFLP», basées sur l'analyse génétique des populations de kystes, les foyers de kystes d'*Alexandrium* montrent une similarité génétique entre les kystes et les formes végétatives planctoniques (Alpermann et *al*., 2009). La différenciation interannuelle pour une population donnée semble être le résultat d'une sélection génotypique en rapport avec les contraintes environnementales conduisant à des sous-populations génétiquement distinctes. En revanche, la diversité des sous populations est renforcée par le processus d'enkystement et la reproduction sexuée permettant le maintien du pool génétique et la préservation des kystes dans le sédiment. Ainsi, les adaptations phénotypiques suite à la germination des kystes ayant subi le changement de facteurs environnementaux exogènes ont été démontrées pour la première fois par Figueroa et *al*., (2005) par des expériences sur des cultures monoclonales d'*Alexandrium catenella*, ce qui a contribué de manière substantielle au maintien de la diversité des populations autochtones.

4.6. Dynamique des efflorescences

La complexité des blooms au niveau des zones côtières réside dans le fait du concours de plusieurs paramètres du milieu relatifs aux caractéristiques physiques, hydrodynamiques et biologiques dont la migration saisonnière et physiologiques ainsi que le mode de nutrition de l'espèce. D'après Anderson et *al*. (2002), plus les milieux deviennent moins eutrophes plus les blooms diminuent ce qui induit paradoxalement la prévalence et l'installation d'espèces incriminées dans les intoxications paralysantes (PSP) telles que *Alexandrium catenella.* En effet, cette espèce est dotée de mécanismes physiologiques luire permettant de s'adapter à la limitation d'un élément nutritif ce qui constitue une preuve suplémentaire de l'indépendance du processus de prolifération massive chez *Alexandrium catenella* vis-à-vis des concentrations en nutriments inorganiques dans le milieu. Le comportement opportuniste des espèces du genre *Alexandrium* par rapport à la limitation en nutriments, se traduit par leur adaptation physiologique à induire des blooms indépendamment des précurseurs d'eutrophisation classiques qui ne sont autre que les teneurs inorganiques des nutriments dans le milieu.

4.7. Répartition géographique et introduction du genre *Alexandrium*

A. catenella a donné lieu au premier événement toxique majeur sur 100 km le long de la côte catalane (Port de Valence) en 1994 et s'est poursuivi jusqu'en 2000 (Vila et al. 2001). Cette espèce apparaît dans le port d'Olbia (Italie), en France au niveau de l'éthang de thau Abadie et al.,1999, Lilly et al., 2002, dans la mer Tyrrhénienne durant les étés de 1999 à 2002 (Lugliè et al. 2003), au niveau de la lagune Santa Giusta (Italie) (Satta et al., 2013), pour la première fois dans les eaux tunisiennes durant l'été 1997 (Turki et al., 2007), et en 2002 dans la baie d'Annaba (Frehi et al 2007).

4.8. Physiologie et nutrition

Le modèle de croissance des populations du genre *Alexandrium* « Inorganic nutrient dose yield models » s'éloigne du modèle classique mentionné par Heisler et *al*. (2008). Ces espèces possèdent la capacité de croître aussi bien dans des milieux eutrophes (Tounsend et *al*., 2005, Spatharis et *al*., 2007), des eaux cristalines (oligotrophes) (Anderson et *al*., 2002) et des milieux marqués par une limitation en N et P (Collos et *al*., 2009). Jeong et *al*. (2004) ont démontré que 17 espèces du genre *Alexandrium* y compris l'espèce A. *catenella* sont capables de brouter des picocyanobactéries telles que celles du genre *Synechococcus* . D'après les travaux de Collos et *al*. (2007) portant sur la comparaison de la croissance et de l'absorption de l'azote, cette espèce utilise principalement l'ammonium et l'urée comme source d'azote. Toutefois, l'apport en azote d'origine particulaire, sous forme de Cyanobactéries s'avère une source importante qui fournit un supplément nutritif et qui confère aux espèces du genre *Alexandrium* un avantage écologique par rapport aux espèces autotrophes. A cet effet, les hypothèses relatives aux modifications trophiques « Disturbance hypothesis » développées par Smayda (2002) ne semblent pas perturber l'occurrence des phénomènes HABs.

4.8.1. Carbone

Les espèces du genre *Alexandrium* utilisent le carbone inorganique et produisent l'oxygène à l'instar des autotrophes. Cependant, la respiration semble être plus importante que chez les autres classes phytoplanctoniques et ceci par rapport à la photosynthèse brute et le taux de croissance (Langdon, 1987). Ce besoin considérable en énergie a été attribué au maintien du grand génome sans que la mobilité de ce genre soit affectée (Raven et Richardson, 1984). La fixation du carbone inorganique est influencée par l'absorption de l'azote dans le sens de la diminution (Collos et *al*., 2004 ; 2007), ou de son augmentation (Leong et *al*., 2010). Cependant,

la dissociation du métabolisme du couple carbone-azote a été élucidée dans les cultures avec une augmentation du rapport carbone/azote (C/N) conduisant à un épuisement de l'azote au bout de 10 à 17 jours selon les travaux de Flynn et *al*. (1996). D'autre part, les variations nycthémérales peuvent influencer le rapport C/N pour *Alexandrium tamarense* (Maclntyre et *al*., 1997) et Collos et *al*. (2006) ont signalé le même phénomène pour *Alexandrium catenella*. Cette variation est plus importante dans le cas d'un déficit d'azote.

4.8.2. Azote

De nombreuses études au laboratoire ont été consacrées à l'estimation du taux de croissance avec les différentes formes azotées à savoir l'ammonium, les nitrates et l'urée (Levasseur et *al*., 1995, Matsuda et *al*., 1999, Dyhrman et Anderson, 2003). Généralement, le taux de croissance est est fonction de la teneur en ammonium par rapport aux nitrates à l'exception d'une souche d'*Alexandrium catenella* (Dyhrman et Anderson, 2003). Collos et *al*. (2007) ont démontré que l'urée métabolisée par *Alexandium catenella*, aussi bien en culture qu'en milieu naturel, supporte la croissance de l'espèce. L'ajout de substances humiques sous forme d'extrait du sol contribue considérablement à l'amélioration du taux de croissance des espèces du genre *Alexandrium*. En effet, ces substances jouent le rôle de stimulateurs ou précurseurs de la croissance (Carlsson et *al*., 1998). A cet effet, l'ajout de substances humiques d'origine terrestre à des concentrations équimolaires pourraient remplacer les nitrates en tant que source d'azote inorganique (Doblin et *al*., 2001). L'absorption en obscurité a été citée chez l'espèce du genre *Alexandrium* surtout pour l'ammonium et l'urée. En effet, d'après Leong et *al*. (2010), le ratio d'absorption obscurité/ lumière est en étroite relation avec l'état oxydatif de l'azote. Dans le même contexte, les souches d'*Alexandrium* en provenance de l'étang de Thau sont très sensibles à l'inhibition des nitrates et de l'urée par l'ammonium contrairement aux souches espagnoles moins sensibles indiquant une éventuelle différence géographique liée aux différents régimes nutritifs (Jauzein et *al*., 2008). Les Dinoflagellés du genre *Alexandrium* sont connus par leur capacité intracellulaire à accumuler l'ammonium. Dans certains cas, l'ammonium peut représenter jusqu'à 30% de l'azote total cellulaire, comme pour la souche TLO1 dévelopée par Collos et *al*. (2006). Une autre particularité du genre *Alexandrium* réside dans leur capacité intracellulaire très élevée à accumuler la glutamine et l'arginine considérées comme précurseurs des toxines paralysantes (Andersonet *al*., 1990).

4.8.3. Le phosphore

Bien que le phosphore inorganique soit considéré comme l'initiateur naturel des efflorescences d'*Alexandrium*, le phosphore organique tel que l'adénosine triphosphate ou la guanosine diphosphate peuvent augmenter significativement le taux de croissance de certaines espèces d'*Alexandrium* (Matsuda et *al*., 1999). En milieu de culture, le phosphore inorganique peut être substitué préférentiellement par le glycérophosphate (Matsuda et *al*., 1999). Les espèces du genre *Alexandrium* sont également connues pour leur capacité à stocker le phosphore (Yamamoto et Tarutani, 1999 ; Labry et *al*., 2008).

4.8.4. Les métaux traces et vitamines

Les premières études sur les espèces du genre *Alexandrium* ont rapporté un besoin important en fer (Doucette et *al*., 1989). Des études plus récentes (He et *al*., 2010) ont montré que la limitation en fer pour *Alexandrium tamarense* peut engendrer une diminution de moitié du taux de croissance et de la teneur en chlorophylle a, ainsi qu'une diminution de l'ordre de 3 pour les protéines dans le cas d'une limitation en fer de l'ordre de 1 nM Fe. Les gammes optimales pour les métaux trace à savoir le cobalt, le cuivre, le fer, le manganèse, le molybdène, le sélénium et le zinc sont relativement similaires à celles des milieux de culture communément utilisés (F/2, K, L1), à l'exception du sélénium qui requiert un intervalle de 20 à 10 mM.

En revanche, la teneur du cuivre est réduite par rapport à celle utilisée dans le milieu F/2 pour favoriser la croissance des espèces du genre *Alexandrium fundyense* (Taroncher-Oldenburg et *al*., 1997). Daprès Siu et *al*. (1997), les besoins d'*Alexandrium catenella* en provenance de Hong Kong ne s'écartent pas de ceux exigés par d'autres groupes phytoplanctoniques. Toutefois, la souche d'*Alexandrium catenella* (mer de Chine méridionale) et *Alexandrium minutum* (Rio de Vigo, Espagne), nécessitent exclusivement la cyanobolamine (Tang et *al*., 2010).

4.9. Mixotrophie et phagotrophie

La phagotrophie est un phénomène répandu chez les espèces du genre *Alexandrium*. En effet, des bactéries et des flagellés ont été observés dans les vacuoles d'*Alexandrium* (food vacuoles) d'après Jeong et *al*. (2004). Dans le même contexte, Jeong et *al*. (2010) ont révélé que *Alexandrium catenella* est doté d'une capacité à ingérer les bactéries et les cyanobactéries

hétérotrophes contrairement à *Alexandrium tamarense* qui pourrait ingérer d'autres espèces comme les haptophytes, les cryptophytes, certaines diatomées.

A. pseudogonyaulax est unique en son genre par sa capacité très développée à sélectionner et capturer les proies et dispose d'un mucus toxique permettant d'immoboliser les proies pendant 4 h, ce qui lui confère une augmentation de son taux de croissance (Blossom et al., 2012).

Chapitre II

Matériel Et Méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

1. Description du site d'étude : La lagune de Bizerte

La lagune de Bizerte est une lagune côtière de forme elliptique, située en Tunisie septentrionale, dont les coordonnées sont comprises entre 37° 8' et 37° 14' de latitude Nord et 9° 46' et 9° 56' de longitude Est. Cet écosystème d'une superficie de 1500 ha est doté d'une double communication, d'une part avec la mer Méditerranée à travers un chenal de 7 km de longueur, 300 m de largeur et 12 m de profondeur, et d'autre part avec le lac Ichkeul par l'intermédiaire de l'oued Tinja. En hiver, un surplus d'eau douce est évacué du lac Ichkeul vers la lagune de Bizerte via l'oued Tinja, alors que durant la période sèche, cet oued permet aux eaux marines de pénétrer dans le lac Ichkeul via la lagune de Bizerte.

L'alimentation hydrique de la lagune de Bizerte s'effectue à partir de plusieurs sources à savoir le ruissellement des différents cours d'eau qui drainent le bassin versant de la lagune. Il s'agit des oueds Haima, Ben Hassine, Rharek et Guenniche ainsi que les apports à partir du lac Ichkeul à travers l'oued Tinja (Fig. 1). Le bilan annuel des échanges d'eau entre la lagune de Bizerte et le milieu marin est marqué en hiver par un surplus d'eau douce d'un volume de l'ordre de 534 (± 26) Mm^3 environ qui est évacué hors de la lagune (ANPE, 2007). Ce flux important d'eau de la lagune vers le milieu marin est accompagné d'un transfert de quantités importantes de matières en suspension et de nutriments dans le même sens. Toutefois, durant la saison estivale et du fait de la rareté des précipitations ainsi que des fortes évaporations du plan d'eau, on assiste à une incursion d'eaux marines d'un volume estimé de l'ordre de 84 (± 2,5) Mm^3, de la lagune vers le lac. En revanche, cette particularité hydrologique de la lagune est parfois perturbée par la fermeture et l'ouverture d'une écluse en amont de l'oued Tinja dont l'état actuel n'est pas fonctionnel. A titre d'exemple, les apports en eau douce sont estimés à 530 Mm^3 durant l'année 2004-2005, et de l'ordre de 492 Mm^3 au cours de l'année 2006-2007. Outre son importance sur le plan superficie, occupant la 3ème place après la lagune des bibans et la Mer Boughrara situées en Tunisie méridiidionale, la lagune de Bizerte subit une forte pression anthropique par la présence des unités industrielles, des concentrations démographiques et des activités agricoles importantes.

Fig. 1. Localisation de la lagune de Bizerte. Zones conchylicoles (10 parcs au total) ; CB : Cimenterie de Bizerte ; STIR: SociétéTunisienne des Industries de Raffinage ; El Fouledh : Usine Sidérurgique.

2. Principales caractéristiques de la lagune

2.1. Facteurs climatiques

La région de Bizerte est caractérisée par un climat méditerranéen, avec un été chaud et sec et un hiver doux et pluvieux. Les vents dominants soufflent du secteur ouest et principalement du Nord-Ouest avec une vitesse comprise entre 5 et 9 m s^{-1} et jusqu'à 15 m s^{-1}. Les vents d'Est sont moins fréquents et le Sirocco, vents du Sud-Est, secs et chauds caractérisent l'été (Hidrotecnia Portuguesa, 1995). La base des données météorologiques disponibles sur le site [3] concernant la région de Bizerte a été utilisée pour l'année 2012.

2.1.1. Température de l'air

Les variations de la température de l'air, particulièrement au mois de juin 2012 ont été relativement élevées avec un maximum de l'ordre de 39.4 °C alors que la température minimale de 13.8 °C a été enregistrée au mois de juin. La température moyenne annuelle a été de l'ordre de 19.3 °C (Fig. 2.).

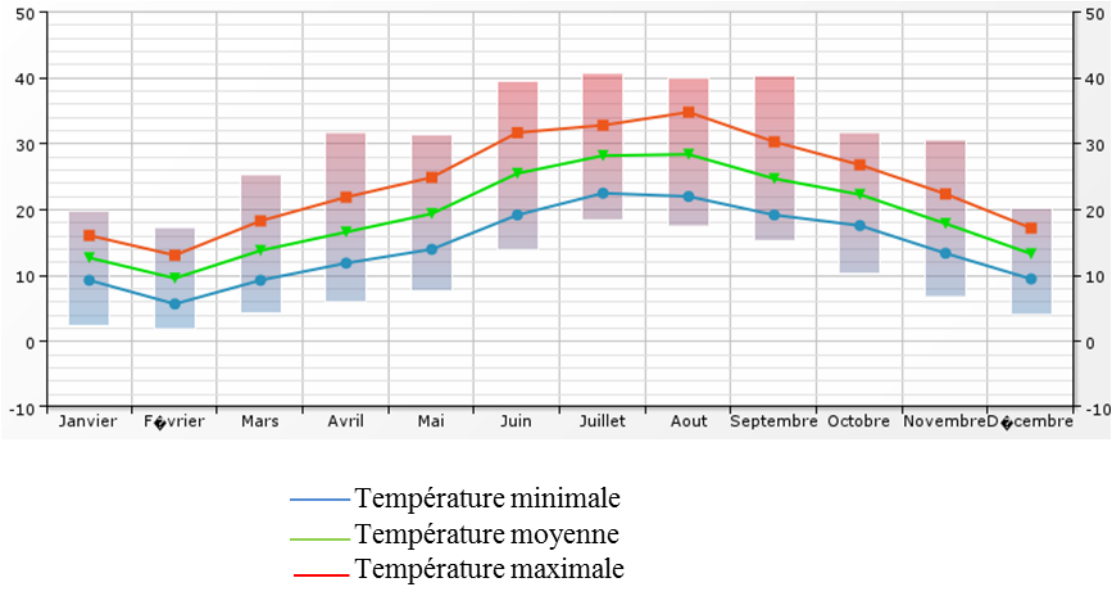


Fig. 2. Variations mensuelles de la température (°C)de l'air au cours de l'année 2012 [3]

2.1.2. Précipitations

Le cumul total des précipitations pour le mois de juin a été de l'ordre de 343.7 mm sachant qu'au cours de ce mois, il n'y a pas eu de pluviométrie. Le cumul des précipitations annuelles au niveau de la région de Bizerte pour l'année 2012 a été de 586.6 mm (Fig. 3).

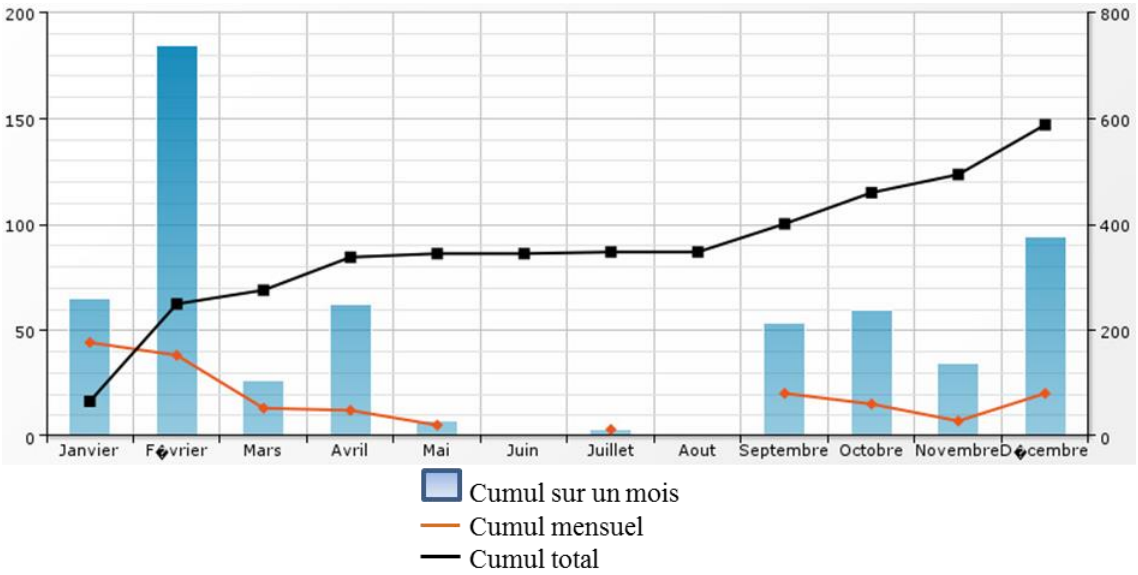


Fig. 3. Variations des précipitations (mm) au cours de l'année 2012 [3]

2.1.3. Vents

Les vents dominants au cours de la période d'étude ont été d'une part de direction NW à NNW. En effet, la région de Bizerte est caractérisée par des vents soufflant généralement du secteur ouest avec un vent dominant de direction WNW ou « Chirch ». Toutefois, la vitesse moyenne était relativement faible pendant la période d'échantillonnage de l'ordre de 20 km h^{-1}.

2.2. Cadre géomorphologique et sédimentologique

Le bassin occupé actuellement par la lagune de Bizerte serait le résultat d'un effondrement antépliocène, remanié pendant le villefranchien. Dans ce contexte, le golfe de Tunis qui était en relation directe avec la mer se serait divisé en deux zones : La Garaet El Ichkeul et la lagune de Bizerte (Soussi, 1981). Sur la base des travaux de Kamens *et al*. (1984 ; 1989), les principaux apports de sédiments de la lagune sont constitués (i) d'une boue non calcaire et de sable portés par le chenal du lac Ichkeul « Tinja » (ii) de sable provenant des organismes marins (iii) de calcaire et de la matière solide en provenance de l'érosion du sol des terres agricoles adjacentes qui serait apportés par les rivières et (iv) de limon et d'argile en provenance de la mer Méditerranée.

2.2.1. Morphostructure de la côte

La morphologie actuelle de la lagune de Bizerte résulte des différentes phases sédimentaires qui se sont succédées depuis le Miocène et qui se poursuivent de nos jours avec des intensités différentes. D'après Soussi (1981), elles se traduisent par un alluvionnement engendré par le ruissellement des divers oueds ;Tinja, Garek, Ben Hassine, Gueniche et autres, se déversant directement dans la lagune de Bizerte .

2.2.2. Morphologie des fonds

Les caractères morphologiques des fonds de la lagune de Bizerte sont déterminés à partir des cartes marines à l'échelle 1/25000 établies depuis 1954 par le service hydrographique de la Marine Nationale Française. D'après ces cartes, la profondeur moyenne de la lagune est de l'ordre de 7 m. Toutefois, certaines études avancent des profondeurs allant jusqu'à 12 m au niveau de la zone centrale et du goulet.

2.2.3. Composition des sédiments superficiels

L'analyse granulométrique effectuée par Soussi (1983), a permis de définir trois faciès sableux caractéristiques de la zone littorale, avec la fraction ≥ 63 µm, représentant plus de 50 % du sédiment. Un faciès silteux à silto-argileux caractéristique de la zone orientale de la lagune, dont la fraction comprise entre 2 et 63 µm constitue 20 à 50 % des dépôts, et le faciès argileux dont la fraction ≤ 2 µm représente plus de 50 % du dépôt, couvrant toute la zone centrale et occidentale de la lagune. Néanmoins, des faciès mixtes marquent parfois le passage d'un secteur à l'autre tels que les faciès sablo-argileux et argilo-silto-sableux.

2.3. Echanges hydriques

La lagune est alimentée par plusieurs cours d'eau. Elle est bordée au nord par des bassins versants, au sud par la vallée de la Medjerda, à l'est par un bassin versant des zones côtières de Ras El Djebel et à l'ouest par Garâat Ichkeul connectés à la lagune via l'oued Tinja, la principale source d'eau pendant les saisons pluvieuses (Kallel, 1989). Cependant, ce bilan hydrique reste mitigé : Durant l'hiver et le printemps (8 à 9 mois), le lac Ichkeul déverse ses eaux dans la lagune. Pendant l'été, l'eau de la lagune qui passe de la lagune de Bizerte vers le lac Ichkeul est marquée par une circulation inverse (Harzallah , 2003). L'aménagement du lac Ichkeul a fortement affecté cet équilibre naturel en réduisant l'intensité des échanges durant les deux saisons sans en changer le sens. Le total des apports en eau douce a chuté de 165 millions de m^3

an^{-1} à 120 m^3 an^{-1} après la construction de plusieurs barrages en amont du bassin versant du lac Ichkeul (Harzallah et *al*., 1999). Ces aménagements ont engendré des modifications profondes des caractéristiques hydrobiologiques de la lagune, en particulier sur la salinité des eaux ainsi que sur la production de ses ressources halieutiques et conchylicoles du milieu (El Bour, 1999). En revanche, ces implantations ont perturbé l'équilibre naturel de la circulation des masses d'eau de la lagune. L'équilibre hydrique reste ainsi tributaire de la gestion de l'écluse placée au niveau de l'oued Tinja et des lâchers d'eau de barrages en amont. Selon Ben Hadj (1992), le courant de marée est faible au niveau de la lagune, de l'ordre de 20 cm. La marée fait varier le niveau de l'eau d'une dizaine de centimètres dans la lagune de Bizerte avec un décalage de 2 heures environ par rapport à la marée dans la mer ouverte (Harzallah ,2002).

3. Sites d'échantillonnage

Au niveau de la lagune, toute la lagune a été échantillonnée avec un accés sur le port de commerce Bizerte-Menzel Bourguiba avec ces différents quais ainsi que les fermes conchylicoles (Fig.7).

3.1. Le port de commerce Bizerte-Menzel Bourguiba

Ce port est favorisé par sa position stratégique sur l'axe des dessertes maritimes Gibraltar à Suez, sa proximité au Sud de l'Europe et l'essor que connaît le développement des zones industrielles dans la région (Menzel Bourguiba, Menzel Jemil et Utique). Le parc d'activités économiques de Bizerte (Zone Franche) et les sites naturels, historiques et archéologiques pittoresques, le port de Bizerte-Menzel Bourguiba joue un rôle prépondérant dans le développement socio-économique de la ville de Bizerte. Ainsi, entre une position maritime stratégique et des dessertes terrestres développées, le port offre aux industriels, aux investisseurs et aux professionnels du tourisme un outil commercial indispensable pour conquérir l'Europe et le marché international. Le port de Bizerte Menzel-Bourguiba est un port polyvalent, avec un accès direct sur la mer. Le trafic moyen des marchandises généré par le port de Bizerte est d'environ 5 millions de tonnes par an [4]. En plus de ses 520 mètres linéaires de quai du canal, le port de Bizerte-Menzel Bourguiba, est constitué de 5 quais spécialisés dans le traitement des hydrocarbures (appontements pétroliers), des céréales, de l'acier, des ciments et des produits métallurgiques. Le domaine du port s'étale sur une superficie totale de 74 ha 39 a 57 ca, avec une superficie du plan d'eau de l'ordre de 161 ha et une profondeur moyenne du plan d'eau de 10 m. Le chantier naval de Menzel Bourguiba comporte avec ses quatre bassins de radoub et leurs installations et ateliers de desserte, s'étendant sur une surface de 50 ha dont près de 50 000 m^2 couverts.

3.2. Les parcs conchylicoles au niveau de la lagune

La lagune constiue le seul écosystème en Tunisie pour le développement de la conchyliculture, abritant 10 parcs conchylicoles répartis sur différentes zones en occupant une superficie totale de l'ordre de 240 ha. La production annuelle conchylicole est de l'ordre de 113 tonnes an^{-1} pendant l'année 2013, en deçà des objectifs du XIe plan de développement (2007-2011) qui a été de l'ordre de 800 tonnes de moules et d'huîtres et 300 tonnes de palourdes à l'horizon 2011.

Le secteur de la conchyliculture a connu des difficultés majeures au cours des dernières années, dues aux crises dystrophiques suite à l'élévation de la température de l'eau et les proliférations massives des microalgues nuisibles. Ainsi, le secteur a été négativement affecté par les mortalités qui surviennent en général en saison estivale. Outre les contraintes environnementales, l'ostréiculture reste tributaire de l'importation des naissains d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*). Ce secteur a également connu des importations de naissains et de juvéniles de moules (*Mytilus galloprovincialis*) en provenance de l'Espagne et de l'Europe en général. Cependant, un projet de transfert de technologies Tuniso-Coréen relatif à la production artificielle de naissains d'huîtres creuses a été réalisé dans la région de Bizerte (Fartouna Bellakhal et *al*., 2011).

4. Stratégie d'échantillonnage

4.1. Prélèvement des échantillons d'eau de mer

4.1.1. Eau de ballast

L'échantillonnage à bord des navires nécessite différentes autorisations des autorités du port (i) l'Office de la Marine Marchande et des Ports « OMMP » (ii) la Capitainerie et, (iii) la douane pour accéder aux quais. Pour le prélèvement des eaux de ballast, le droit d'accès est accordé par le capitaine du navire. Le nom du navire reste confidentiel. La période d'échantillonnage s'est limitée aux années 2011 - 2012.

Il existe différentes façons pour le prélèvement des eaux de ballast qui peut être effectué par pompage à l'aide (i) d'une pompe de forage « borehole pump » (Figs. 9 a ,9b), utilisée depuis le pont à partir d'ouvertures connectées au réservoir de ballast (ii) d'une purge sur système de pompage (iii) d'une surverse sur le pont (iv) du rejet le long de la coque (v) d'une crépine avant la pompe de ballastage et (vi) d'une descente dans le ballast (Masson, 2000).

C’est la première méthode qui a été utilisée avec un volume d’eau récupéré d’environ 5 à 10 l filtrés sur 160 µm puis sur 10 µm. Un sous-échantillon a été fixé au formol neutralisé, et/ou au lugol acide et un autre a été préservé sans conservation afin de réaliser d’éventuelles expériences de germination ou de réviviscence des formes de résistance piégées dans les sédiments. Plus d’une dizaine de prospections ont été effectuées, toutefois, uniquement 4 prélèvements sont exploitables. Outre le port de provenance, nous avons essayé de cibler les navires venant hors de la Méditerranée, cependant après vérification auprès du capitaine, on ne trouve pas forcément le même pays d’origine que mentionné au niveau du site de l’office.

Parmi les difficultés rencontrées, il faut citer l’accés au réservoir du ballast de fond qui nécessite l’intervention du mécanicien à bord. Les ballasts latéraux sont généralement inaccessibles vu les sinuosités qui ne laissent pas passer des tuyaux à faible diamètre. Il existe également des contraintes d’ordre physique le maximum d’aspiration de la pompe est de 8 m. Outre ces contraintes, il est possible d’avoir des incompatiblités concernant les systèmes électriques utilisé (110 v). Dans ce cas, il est impossible d’utiliser l’électricité à bord pour faire fonctionner les pompes de prélèvement ce qui nous a ramené à nous munir d’un transformateur électrique. Après une enquête au près du capitaine, on apprend que le navire venait de déballaster au niveau de l’aire d’attente ou au niveau du port et parfois ils peuvent avoir rempli l’eau du port dès leur arrivée. Enfin, nous avons également prélevé sur cale sèche mais avec tous les produits chimiques utilisés nous n’avons pas pu faire germer ou caractériser des espèces phytoplanctoniques.

4.1.2. Eau de la lagune

Des prélèvements verticaux sur toute la colonne d’eau ont été réalisés lors de la campagne d’échantillonnage du sédiment avec une pompe submersible à partir du bateau de l’ISPAB (Institut Supérieur de Pêche et d’Aquaculture de Bizerte) (BI-745), au niveau des 123 stations du 6 au 8 juin 2012. Ce prélèvement à l’aide de la pompe a été effectué à partir du fond de façon progressive afin d’échantillonner toute la colonne d’eau. Ensuite, le volume total de l’échantillon d’eau de mer de l’ordre de 5 litres a été filtré *in situ* sur un tamis de 160 µm, ensuite 10 µm. Des sous- échantillons de 100 ml en 3 répliquats ont été traités de manière similaire pour les échantillons des eaux de ballast.

4.1.3. Paramètres abiotiques

4.1.3.1. Mesures *in situ*

La température de l'eau T (°C), la salinité, la teneur en oxygène dissous et le pH de l'eau ont été mesurés in situ avec un multicapteur WTW 325 i.

4.1.3.2. Eléments nutritifs

Le dosage des sels nutritifs : nitrates, nitrites, orthophosphates, ammonium et silicates, a été réalisé par la méthode colorimétrique à l'aide d'un autoanalyseur de type Bran-Luebbe au laboratoire de l'INSTM la Goulette par le service « Hydrobiologie ».

4.1.3.2. 1. Dosage des orthophosphates

La méthode de Murphy et Riley (1962) a été utilisée pour le dosage des orthophosphates (PO_4^{3-}) dans les échantillons d'eau de mer. Le molybdate d'ammonium en présence d'ions phosphate forme un complexe en présence d'antimoine (III), pour former un complexe que l'on peut réduire par l'acide ascorbique. La forme réduite du complexe présente une coloration bleue ayant un maximum d'absorption à 885 nm.

4.1.3.2.2. Dosage de l'ammonium

Le principe de la méthode consiste en un dosage de l'ammonium qui réagit avec l'hypochlorite dans une solution faiblement alcaline pour former la monochloramine. Cette dernière en présence de phénol, des ions nitroprusside (catalyseur) et d'un excès d'hypochlorite forme un complexe d'indophénol bleu dont on mesure l'absorption à 630 nm (Parsons *et al.*, 1984).

4.1.3.2.3. Dosage des nitrites

La méthode de dosage est basée sur la réaction de Griess appliquée aux eaux marines par Bendschneider et Robinson (1952). Selon cette méthode colorimétrique, les ions nitrites forment un diazoïque avec le sulfanilamide en milieu acide (pH <2). Ce diazoïque donne une coloration rose en présence de N-naphtyl-éthylènediamine. Ce colorant absorbe à la longueur d'onde de 543 nm.

4.1.3.2.4. Dosage des nitrates

L'ion nitrate est la forme oxydée de l'azote en solution aqueuse, il n'est ni adsorbé ni complexé. De ce fait, il constitue un support principal de la croissance du phytoplancton. La méthode de dosage des ions nitrates est fondée sur le dosage des ions nitrites NO_2^- obtenus suite à la réduction quantitative (> à 95%) des ions nitrate NO_3^-. Cette réduction est réalisée par passage des échantillons sur une colonne de réduction du cadinum traitée par une solution de cuivre (Wood *et al.*, 1967). La mesure de l'absorption est effectuée à 543 nm. La concentration en ions nitrates est déduite par soustraction des ions nitreux totaux.

4.1.3.2.5. Dosage des silicates

A un pH de l'eau de mer de l'ordre 8.2, le silicium dissous se trouve à 95% sous la forme d'acide orthosilicique $Si(OH)_4$ et 5% en étant sous forme ionisée $SiO(OH)_3^-$. Le principe de la méthode est basé sur la formation du silico-molybdate qui par réduction à l'acide ascorbique donne une coloration bleue (FAO, 1975). L'absorption est mesurée à la longueur d'onde de 810 nm.

4.2. Echantillonnage du sédiment

4.2.1. Sédiment en provenance du ballast

La récolte du sédiment de ballast nécessite une descente soit au niveau de la cale du bâteau avec surverse de tuyau ou l'utilisation d'une pompe submersible (Fig. 5), soit sur cale sèche (Masson, 2000). Cette collecte est tributaire de la profondeur de la cale et de son ouverture. Plus d'une dizaine de bateaux ont été prospectés. Toutefois, uniquement quatre prélèvements ont pu être exploités.

4.2.2. Sédiment superficiel de la lagune

Le sédiment est collecté avec une benne Van Veen dont la surface de collecte est de l'ordre de 1000 cm² (Fig. 6.), à partir de l'embarcation de l'Institut Supérieur de Pêche et d'Aquaculture de Bizerte « ISPAB/ BI-745». Seule la surface du sédiment est collectée sachant que les kystes de résistance des microalgues se concentrent principalement dans les trois premiers centimètres de sédiment (Erard-Le Denn *et al.*, 1993). Le sédiment est placé dans des piluliers étanches de 200 g qui sont conservés par la suite à l'obscurité à 4°C (Erard-Le Denn et Boulay, 1995 ; Yamaguchi *et al.*, 1996 ; Persson *et al.*, 2000). Trois réplicats ont été réalisés et

utilisés par la suite pour l'analyse quantitative et qualitative des kystes de résistance, la matière organique, le pourcentage en eau et la granulométrie du sédiment de la lagune de Bizerte. Les prélèvements du sédiment superficiel destinés à la cartographie des kystes de résistance ont été conduits à partir des stations espacées chacune de 1km (123 stations) (Fig.4.).

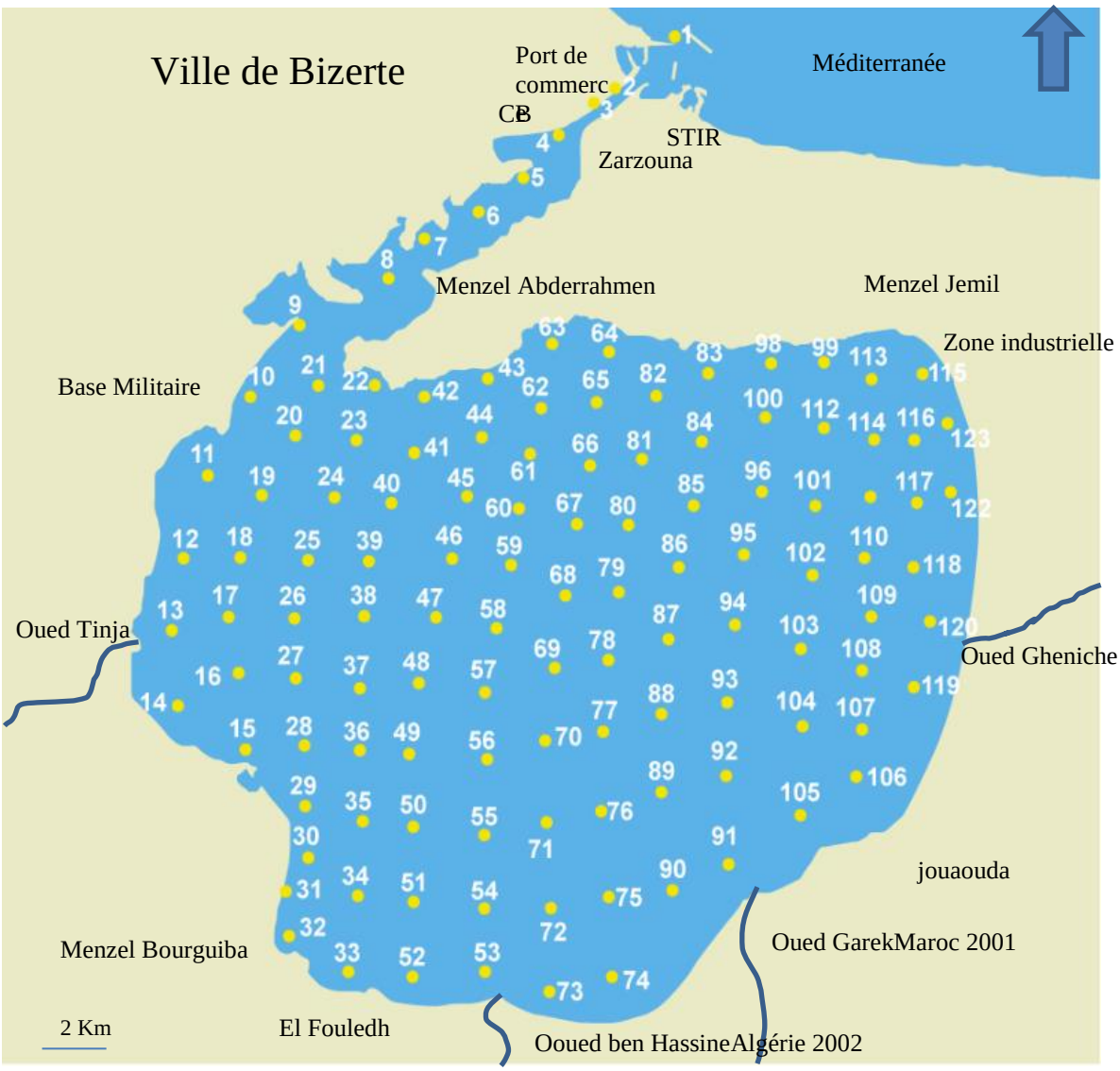


Fig. 4.. Stations de prélèvement (1-123) des différents échantillons d'eau de mer et de sédiment dans la lagune de Bizerte (6-8 juin 2012) ; CB : Cimenterie de Bizerte ; STIR: Société Tunisienne des Industries de Raffinage ; El Fouledh : Usine Sidérurgique

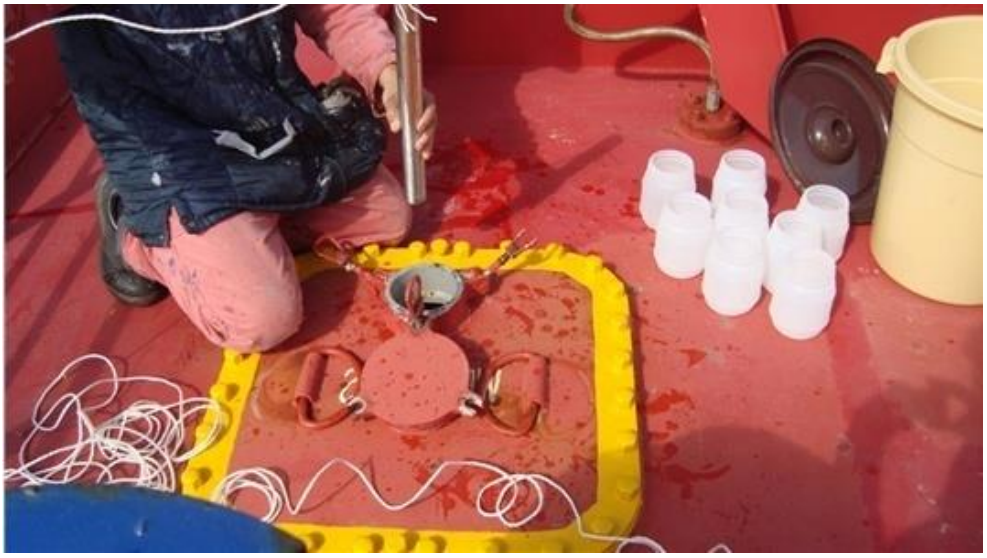


Fig. 5a. Protocole d'échantillonnage d'eau de ballast en utilisant une pompe de forage à bord d'un Pétrolier (Fartouna-Bellakhal, 2012)

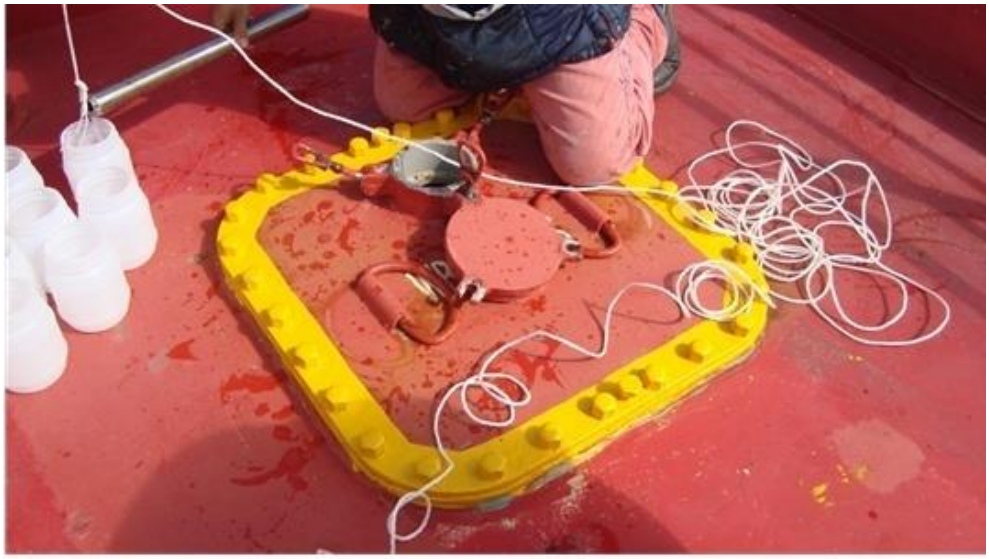


Fig. 5b. Vidange de l'eau de ballast dans les bouteilles de prélèvement à bord d'un pétrolier

(Fartouna-Bellakhal, 2012)

Fig. 6a. Utilisation de la benne Van venn (Fartouna-Bellakhal, 2012)

Fig. 6b. Sédiment récupéré à l'aide de la benne (Fartouna-Bellakhal, 2012)

4.3. Traitement du sédiment

4.3.1. Les kystes dans les sédiments de Ballast

- Extraction

Il s'agit d'une méthode rapide et sélevctive d'extraction basée sur le gradient de densité utilisant le Ludox CLX (Erard-Le Denn et Boulay, 1995). Cette méthode consiste à concentrer les kystes dans un liquide de densité proche des kystes, c'est-à-dire approximativement de l'ordre de 1,3 g cm^{-3} (Blanco, 1986). La centrifugation permet la sédimentation et la flottaison des particules dans le gradient jusqu'à isodensité. Le liquide utilisé est le Ludox HS 40, qui est un produit industriel très visqueux à base de colloïdes de silice dont la densité est de 1,37 (Yamaguchi *et al.,* 1995) . D'autres produits sont également utilisables comme le PST « Sodium polytungustate » (Bolch, 1997).

- Analyse semi quantitative (MPN)

On a également eu recours à une analyse semi-quantitative des kystes dans les sédiments de ballast utilisant la technique de dilution MPN « Most Probable Number » ou NPP « Nombre le Plus Probable » développée par Imai et *al*., (1984). Cette méthode est basée sur le dénombrement des kystes dotés de réviviscence dont les cellules végétatives sont obtenues par germination des kystes. La réviviscence se fait dans un milieu enrichi avec une température et une photopériode prédéfinies dans des incubateurs. Ce temps d'incubation nécessaire est déterminé en fonction des données bibliographiques. En effet, les paramètres contrôlés correspondent au préférendum du complexe *Alexandrium tamarense*. Cette expérience nécessite 3 tubes qui ont été utilisés avec 3 dilutions successives (10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4}), par échantillon, soit un total de 9 tubes, au niveau de chaque station. A partir d'une solution mère (dilution 10^{-1}), contenant un gramme de sédiment mis en suspension dans 10 ml de milieu de culture F/2. Les tubes contenant 9 ml de milieu et 1 ml du matériel biologique sont placés dans un incubateur à 20 ± 1°C, sous une intensité lumineuse de 100 µ $E.m^{-2}.s^{-1}$ (12 h de lumière/ 12h d'obscurité). Pour les observations des cellules, chaque préparation est fixée au formaldéhyde à 2 %, puis répartie dans 2 ou 3 cuves de sédimentation (10 ml). Au cours des observations chaque tube contenant au moins une cellule végétative d'*Alexandrium sp* ou autre espèce potentiellement toxique ou introduite est compté comme un tube positif. Au final, on obtient un nombre de kystes revivifiables par gramme de sédiment.

Le suivi des observations des échantillons a été réalisé après 5 jours, une semaine et 15 jours. Toutefois, ces différents échantillons ont été conservés pendant 6 mois afin de contrôler leur évolution. Seul le sédiment de ballast de quatre navires a été traité suivant la méthode NPP.

4.3.2. Les kystes dans le sédiment superficiel

Les aliquotes d'environ 1 à 1 ,5 g sont mis en suspension dans de l'eau de mer filtrée. Cette étape a été réalisée en 3 réplicats. La solution est soniquée durant 2 mn pour casser les agrégats particulaires et enlever le mucilage des kystes, afin de faciliter la filtration et l'observation des échantillons (Erard-Le Denn et Boulay, 1995 ; Persson *et al.,* 2000). La suspension du sédiment est ensuite filtrée successivement sur une toile de porosité de 140 µm, puis de 23 µm (Yamaguchi *et al.,* 1995 ;1996), s'agissant d'une filtration sélective afin d'optimiser l'observation et le dénombrement des kystes. A l'issue de cette étape, la soie de 20 µm, qui retient les kystes, est placée dans un tube contenant 5 ml d'eau de mer filtrée, puis soumise aux ultrasons 2 mn. La fraction du sédiment ainsi récupérée est comprise entre 20 à 140 µm. La séparation de la fraction fine du sédiment superficiel incluant les kystes se fait par la méthode de centrifugation au ludox « CLX » (Yamaguchi et *al*., 1995). Les kystes retenus dans le ludox (HS-40) seront ensuite extraits par centrifugation (30 mn à 3000 tours mn^{-1}. Enfin, l'observation et le dénombrement des kystes sont réalisés par la méthode de sédimentation (Utermöhl, 1958), au moyen des cuves de sédimentation de capacité 10 ml sous microscope photonique inversé Leica DML50.

4.3.3. Analyses granulométriques

La composition granulométrique du sédiment semble jouer un rôle dans la répartition et la densité des kystes d'*Alexandrium* spp. (Turgeon *et al.,* 1989 ; Anderson et Keafer, 1987 ; Genovesi et *al*., 2013). Les sédiments fins de type silteux ont été tamisés à travers un tamis ayant une ouverture de maille de l'ordre de 63 µm, afin de séparer la fraction grossière (diamètre > 63 µm), de la fraction fine (diamètre < 63 µm). Les échantillons de sédiment, dont la granulométrie est supérieure à 63 µm, ont été séchés à 60 ° C dans une étuve, et passés ensuite pendant 20 minutes à l'aide d'une tamiseuse de type AFNOR selon un maillage décroissant variant de 2000 µm, 1400 µm, 630 µm, 500 µm, 250 µm, 180 µm, 125 µm, 100 µm jusqu'à 63 µm. Pour la fraction sédimentaire inférieure à 63µm une micro-analyse granulométrique a été réalisée à l'aide d'un LASER granulomètre Mastersizer 2000.

Les résultats de la fraction sédimentaire, exprimés en µm et en pourcentage, ont été utilisés pour établir la cartographie granulométrique des sédiments de la lagune de Bizerte selon la norme de référence pour la classification granulométrique des sédiments ISO 14688-1.

4.3.4. Pourcentage en eau du sédiment

Afin de déterminer la teneur en eau du sédiment, l'échantillon humide d'un poids de 20 g de sédiment a été placé pendant 7 jours à 60°C dans une étuve. Le pourcentage en eau s'exprime en kystes g^{-1} de sédiment sec.

La teneur en eau du sédiment (H_20) a été déterminée selon la formule suivante :

$$\mathbf{H_2O\ (\%) = [(Ww - Wd) \times 100] / Ww}$$

Avec, Ww : Poids humide; Wd : Poids sec

Pour déterminer la teneur en matière organique des sédiments, 20 g de sédiment humide ont été homogénéisés et placés dans un four à moufle à 450 °C pendant 12 heures afin de mesurer le poids calciné (Wc).

La teneur en matière organique (MO) a été évaluée après la combustion des sédiments, exprimée en pourcentage de poids sec DS selon la formule suivante :

$$\mathbf{MO\ (\%) = [(Ww - Wc) \times 100] / Ww}$$

Avec, Ww : Poids humide ; Wc : Poids calciné

Cho et Matsuoka (2001) ont exprimé le nombre (N) des kystes de résistance (RCs) selon la formule suivante :

$$\mathbf{RCs\ (g^{-1}\ Wd) = RCs\ (g^{-1}\ Ww) / [1-(\%H_2O/100)]}$$

Avec, RCs : Nombre de kystes de résistance, Ww : Poids humide ; Wd : Poids sec

4.3.5. Isolement, germination des kystes et maintien des cultures monoclonales

Le milieu de culture des microalgues F/2 décrit par Guillard et Ryther (1962) a été utilisé avec une salinité de l'ordre de 34 ± 1. L'eau de mer en provenance de la station de pompage de l'ISPAB est successivement filtrée à travers des filtres, à sable puis à cartouche, pour passer ensuite à travers un système d'utrafiltration incorporant un filtre à argile, un filtre UV, un filtre à carbone et des microfiltres ayant une porosité de l'ordre de 0.2 µm. L'eau de mer subit une dernière fitration à l'aide d'un filtre en fibre de verre ou de type cellulosique au moyen d'un appareil de filtration classique en verre borosilicaté avant d'être stérilisée par autoclavage (121°C pendant 20 min). Les élèments minéraux du milieu de culture sont rajoutés avant l'autoclavage. Par contre, les vitamines sont ajoutées après refroidissement suite à leur passage par un filtre à seringue (0.2 µm). Le milieu de culture utilisé est privé de silice afin d'éviter le développemnt des Diatomées.

La procédure de germination des kystes a été testée selon deux méthodes :

* La première consiste à utiliser la soupe de sédiment en plaçant entre 2 à 3 g de sédiment dans une erlenmeyer contenant 100 ml d'eau de mer enrichie. En effet, on a testé 2 milieux : F/2 et une autre ESAW (Harrisson *et al.*, 1980 modifié par Price *et al.*, 1987 ; Suttle *et al.*, 1986) avec la composition suivante : 1- solution de NaNO3 (concentartion finale 549 µM), 2- solution de NaH2PO4-H2O (concentration finale 22.4 µM), 3- solution de Fer-EDTA (Na2EDTA-2H2O, 6.56 µM, FeCl3-6H2O, 6.55µM, 4- solution de métaux traces (Zinc, Cobalt, Manganèse, Molybdène, Sélénium, Nickel), et 5- une solution de vitamines (Thamine HCl (vitamine B1), Biotine (vitamine H), cyanocobalamine (vitamine B12). Ensuite, ce sédiment est dilué délicatement dans l'eau et laissé au repos pendant au moins 14 jours. Des prélèvements à l'aide d'une micropipette sont faits dans la partie superficielle du jus du sédiment afin de vérifier la germination des kystes d'*A. catenella*.

* deuxième méthode consiste à utiliser les kystes extraits par le ludox suite à différents lavages avec l'eau distillée (entre 2 et 3 lavages), puis l'eau de mer stérilisée (1 à 2 lavages). D'éventuelles actions d'exposition aux ultrasons ont été réalisées en fonction de la turbidité des échantillons.

La deuxième méthode s'est avérée plus efficace d'un point de vue pureté des cultures obtenues. En effet, l'inconvénient majeur de la première méthode est une contamination microbiologique avec la présence d'infusoires pouvant perturber les cultures qui sont

relativement axéniques. Le temps de germination est tributaire de plusieurs paramètres parmi lesquels, on cite le paramètre génétique représenté par l'origine des gamètes (Figueroa et al., 2005). Pour le complexe *A. tamarense,* la période de germination est de l'ordre de 3 semaines (Anderson, 1980), jusqu'à 12 mois (Lewis et *al.*, 1999). Toutefois, la température reste le facteur le plus important contrôlant le phénomène de réviviscence ou d'enkystement (Anderson, 1998; Itakura et Yamaguchi, 2001; Kim et *al.*, 2002). Les kystes ainsi isolés sont placés individuellement dans des puits de culture (plaques de culture constituées de 96, 48,16 et 6 puits). Ces puits sont remplis du milieu de culture F/2 (300 µl jusqu'à 3 ml), sous une irradiance de l'ordre de 100 µE m^{-2} s^{-1}, une photopériode de l'ordre de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité et une température de l'ordre de 20 ± 1°C, dans un incubateur de type Nanos NSI-240 LBA. Le suivi de la germination des kystes est réalisé quotidiennement. En effet, la germination des kystes a été faite à deux niveaux (i) d'une part, pour l'identification des correspondances kystes de résistance donnant lieu à des cellules végétatives et, (ii) d'autre part, pour le maintien des cultures monoclonales d'*A. pacificum* qui ont fait l'objet d'une caractérisation touchant les paramètres biométriques et de croissance de l'espèce, à savoir le taux de croissance et le temps de génération qui sont calculés selon les formules suivantes (Reynolds, 1984) :

$$\mathbf{r = Ln\,(Nt) - Ln\,(N0) \,/\, t_t\text{-}vt_0}$$

Avec, r ou µ : Taux de croissance (j^{-1}) ; N_t : Densité cellulaire à l'instant t ; N_0 : densité cellulaire à l'instant t_0 ; v ? et

$$\mathbf{T = Ln(2) \,/\, r}$$

Avec, T : Temps de génération ; r : Taux de croissance

4.3.6. Identification et comptage des kystes de résistance

Les dinokystes ont été identifiés sur la base des descriptions publiées par Head (1996), Zonneveld (1997a ; 1997b), Zonneveld et Jurkschat (1999), Rochon et *al*. (1999), Head et *al*. (2001), Pospelova et Head (2002), Kim et *al*. (2007) et Matsuoka et *al*. (2009). Les investigations réalisées ont porté principalement sur la classe des Dinoflagellés, ayant eu recours aux ouvrages des auteurs suivants : Schiller (1933), Drebes (1974), Lassus (1988), Dodge (1989) et Hoppenrath et *al*. (2009).

5. Paramètres biotiques

5.1. Biomasse chlorophyllienne

Le dosage de la chlorophylle a « Chl a » a été réalisé selon la méthode spectrométrique décrite par Parsons et *al*. (1984). L'absorbance des extraits a été mesurée au moyen d'un spectromètre aux deux longueurs d'onde : 750 nm et 665 nm. La concentration en Chl a, dans chaque extrait, a été calculée selon la formule suivante (Lorenzen et Jeffrey, 1980) :

$$\textbf{Chl a } (\mu g\ l^{-1}) = [26{,}7\ \{(665o - 750o) - (665a - 750)a\} \times v] / [V \times l]$$

Avec, v : volume d'acétone en ml (10 ml) ; 750o et 665o : absorbances avant acidification aux longueurs d'onde respectives 665nm et 750 nm ; V : volume d'eau filtrée en litres ; 750a et 665a : absorbances après acidification aux longueurs d'onde respectives 665 nm et 750 nm ; 1 : longueur de la cuvette du spectrophotomètre en cm.

5.2. Identification et Comptage du phytoplancton

La détermination systématique du genre *Alexandrium* (Halim) a été étudiée sur des cellules issues des kystes de résistance. Les cellules végétatives d'*Alexandrium* sp possèdent une thèque irrégulièrement arrondie, assez rigide et composée d'une épithèque et d'une hypothèque. La disposition des plaques constituant la thèque est un critère taxinomique sur lequel repose la détermination du genre *Alexandrium* (Fukuyo, 1985 ; Balech, 1995).

L'épithèque des cellules examinées est composée de plusieurs séries de plaques à savoir, la plaque du pore apical notée Po, les 4 plaques intercalaires 1' à 4' et les 6 plaques pré-cingulaires 1'' à 6''. L'hypothèque est composée de 2 séries concentriques de plaques, à savoir une série de plaques antapicales (1''',2''', 3''',4'''et 5''') entourant les plaques sulcales et une série de plaques marginales (1'''', 2''''), post-cingulaires). Entre ces deux parties de la thèque, une série de 6 plaques allongées appelées plaques du cingulum, où est logé le flagelle transversal, tandis que le flagelle longitudinal émerge des plaques sulcales situées sur la face ventrale des cellules (Figs. 5 ; 6).

L'identification des Diatomées a été réalisée en consultant les références et les ouvrages des auteurs suivants : Peragallo et Peragallo (1897-1908), Meunier (1913), Cleve Euler (1952), Paulmier (1993) et Hasle et Syversten (1995).

Pour les Dinoflagellés, on a eu recours aux ouvrages des auteurs suivants : Schiller (1933), Drebes (1974), Lassus (1988), Dodge (1989), Hasle et Syversten (1995) et Hoppenrath et *al*., (2009).

La méthode de dénombrement des espèces du phytoplancton utilisée est celle d'Utermöhl (1958). Le principe de cette méthode est basé sur la sédimentation des cellules au moyen des chambres à plancton ou cuves à sédimentation de 25 ml de capacité. Le temps de sédimentation est de l'ordre de 24 h environ. En effet, un minimum de 3h est recommandé par centimètre de hauteur de la cuve à sédimentation (UNESCO, 1995).

La densité cellulaire du phytoplancton (nombre de cellules) par unité de volume (l) se fait selon l'équation suivante :

$$\mathbf{N\ (Cellules\ L^{-1}) = n * (A_t / A_c) * (1000 / v)}$$

Avec, At : surface totale de la chambre de comptage (mm^2), Ac : surface balayée de la chambre de comptage (mm^2), V : volume de la chambre de comptage, et N : Nombre de cellules comptées.

6. Microscopie électronique à balayage (SEM)

La microscopie électronique à balayage MEB ou Scanning Electron Microscopy « SEM » est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces de la cellule. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ.

Cet équipement permet de former un pinceau quasi-parallèle, très fin (jusqu'à quelques nanomètres), d'électrons fortement accélérés par des tensions réglables de 0,1 à 30 kV, de le focaliser sur la zone à examiner et de la balayer progressivement. Des détecteurs appropriés d'électrons spécifiques (secondaires, rétrodiffusés, parfois absorbés), complétés par des détecteurs de photons, permettent de recueillir des signaux significatifs lors du balayage de la surface et d'en former diverses images significatives des différents constituants de la cellule.

Le protocole utilisé au niveau du laboratoire de Botanique Marine et d'Algologie de l'université Polytechnique de la Marche (Ancona, Italy) est relativement simple commençant par une filtration de l'échantillon de culture d'*Alexandrium* sur GF/C (1.2 µm), ensuite des bains successifs d'alcool allant de 10° jusqu'à 100°, par ordre décroissant, afin de déshydrater les échantillons en question provenant de cultures monoclonales d'*A. catenella,* l'alcool est évaporé à l'aide d'un chauffage couplé au CO^2 injecté à partir d'une bouteille de 9 m^3, ensuite l'échantillon est refroidi dans le même appareil.

La phase critique de déshydratation de la préparation est obtenue à l'aide du dispositif Critical point dryer. Le bombardement avec l'Argent (Ag) en présence d'UV se fait sur des disques adhésifs de carbone (Fig.7).

Le microscope électronique utilisé porte les références suivantes Philips Econ IV (Fig. 8.)

Fig.7. Appareil déterminant le point crittique permettant le séchage de la préparation au cours de la phase critique (Critical point dryer) (à gauche) et le métalliseur permettant la métallisation par le bombardement de l'échantillon avec l'Argent (Ag) (à droite).

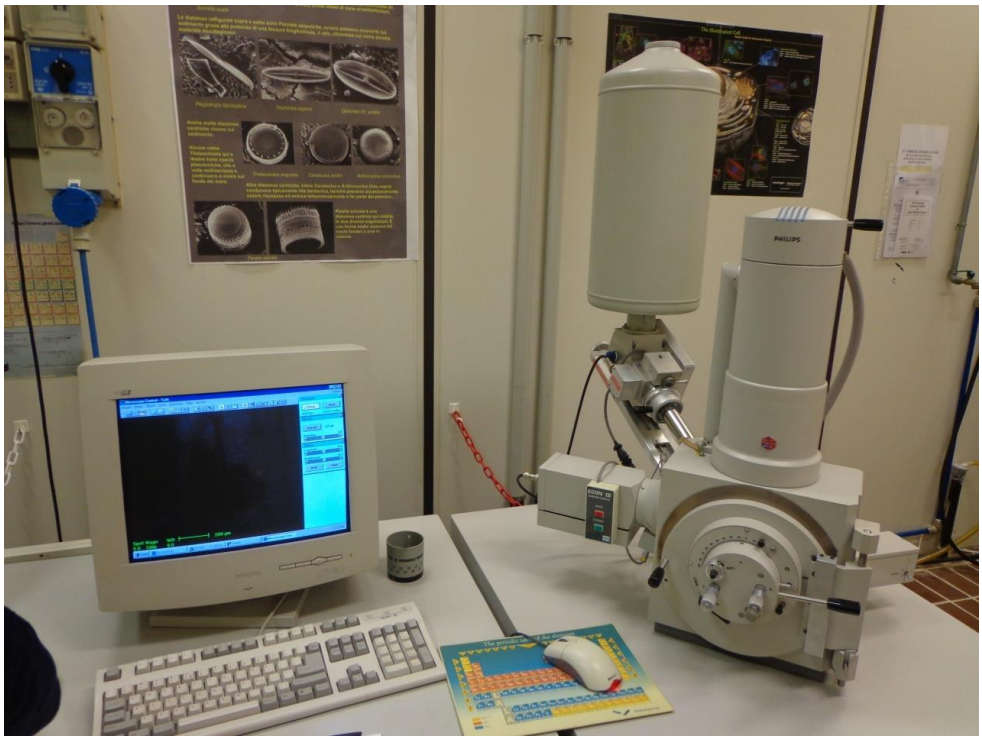


Fig. 8. Microscope électronique utilisé pour l'identification du Dinoflagellé *A. pacificum* (Université Polytechnique de la Marche (Ancona, Italy)

7. Dosage des toxines paralytiques PSP : profil toxinique de l'espèce *A. pacificum*

Pour l'analyse des toxines, un échantillon de 20 ml a été prélevé à partir des cultures monoclonales en batch d'*Alexandrium catenella* (**ABZ1)** au cours de la phase de croissance exponentielle. Les échantillons ainsi prélevés sont centrifugés (3000 rpm pendant 15 min à 4 °C) et le surnageant enlevé délicatement. Par la suite, 1 ml d'acide acétique 0,1N a été ajouté au culot restant qui est ensuite stocké à -20 °C jusqu'à l'extraction des toxines (Rhodes et *al*., 2010). Pour libérer les toxines, les échantillons sont traités aux ultrasons (sonification pendant 5 min à 17 000 rpm pendant 10 min à 4 °C) puis filtration sur membrane 0.2µm. Les analyses des toxines PSP ont été réalisées par la méthode chromatographique en phase liquide à haute performance avec un détecteur de fluorescence (LC/FLD) à l'IFREMER, Station de Biologie Marine, Concarneau (France) en utilisant la méthode d'Oshima (1995). Les toxines ont été séparées par chromatographie en phase liquide en utilisant une colonne C8 (5 µm Develosil ; 4,6 mm de diamètre x 250 mm), un flux de 0,8 ml min^{-1}. Les toxines ont été quantifiées à l'aide de standards certifiés fournis par le conseil National de la Recherche (NRC Halifax, Canada). Les toxines GTX6 et C2-toxines ont été détectées et quantifiées indirectement après hydrolyse acide (HCl 0,4 N à 97 °C pendant 5 min).

8. Analyses moléculaires

8.1. Extraction d'ADN et PCR (Réaction en chaîne par polymérase)

L'ADN génomique total a été extrait à partir de la culture monoclonale ABZ1 (le volume de culture utilisé pour l'obtention de pastilles d'ADN est de l'ordre de 40 ml) en utilisant la méthode classique au phénol-chloroforme (Sambrook et *al*., 1989), après la libération de la matière cellulaire par lyse enzymatique par la protéinase Kinase. L'extraction de l'ADN a été faite en deux étapes. Dans un premier temps au phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1), ensuite par le chloroforme : alcool isoamyique (24 : 1). En effet, au cours de ces deux étapes, le chloroforme va se lier avec les lipides et précipiter les protéines, le phénol va précipiter les protéines et les lipides et l'alcool isolamyque va jouer le rôle d'agent dispersant. Les phases aqueuse et organique ont été séparées par centrifugation. La phase aqueuse contient de l'ADN qui a été finalement récupéré sous forme solide en raison de la précipitation de l'alcool éthylique. Pour la PCR et le séquençage, les amorces d'oligonucléotides et les méthodes utilisées sont celles décrites dans Nezan et *al*. (2012). En effet, le kit utilisé pour l'amplification et le séquençage est la PCR Master Mix 1X (Promega, Madison, WI, USA) qui contient la Taq DNA polymérase, la dNTPs, le MgCl2 et les tampons nécessaires à la réaction.

8.2. Phylogénie

Pour l'analyse phylogénétique, la séquence de la souche ABZ1 a été alignée avec 63 LSU séquences en provenance d'autres espèces du genre *Alexandrium* et une séquence de *Goniodoma polyedricum* récupérées à partir de GenBank en utilisant l'alignement de séquences multiples Version programme MUSCULE 3,7 (Edgar , 2004). L'alignement a été affiné par l'œil. La matrice de données obtenue (LSU ADNr 65 séquences, 607 caractères) a été analysée par deux méthodes de reconstruction phylogénétique, avec un maximum de vraisemblance (ML), en utilisant le logiciel v.3.0 PhyML (Guindon et Gascuel , 2003) et l'inférence bayésienne (BI) en utilisant MrBayes v .3.1.2 (Ronquist et Huelsenbeck , 2003).

Le logiciel jModeltest v 0.1.1 (Posada, 2008) a été d'abord utilisé pour sélectionner le modèle le plus approprié des substitutions. Le modèle Tamura-Nei (TN93 + I + G4) a été choisi comme indiqué par les hiérarchiques rapports de vraisemblance tests (hLRTs), Akaike Information Criterion 1 (AIC1), Akaike Information Criterion 2 (AIC2) et critère d'information bayésien (BIC) des tests mis en œuvre dans jModeltest. Les valeurs de bootstrap (de soutien pour les branches d'arbres) ont été obtenues après 1000 itérations en ML. Pour l'inférence bayésienne, quatre chaînes de Markov ont été menées simultanément pour 2×10^6 générations avec

échantillonnage toutes les 100 générations. Sur les 2×10^4 arbres obtenus, le premiers 2000 ont été jetés (burn-in) et un arbre de consensus a été construit à partir des arbres restants. Les probabilités à posteriori correspondant à la fréquence à laquelle un noeud est présent dans les arbres conservés, ont été calculées en utilisant une méthode de Monte Carlo Metropolis couplée à la chaîne de Markov (MCMC).

9. Analyses Statistiques

9.1. L'analyse de la Redondance : RDA

Le principe de l'analyse de la redondance est de chercher la combinaison de variables "environnementales" qui explique le mieux la variation (ou la dispersion) de la matrice "espèces". Cette méthode consiste d'abord à régresser tour à tour chaque variable expliquée sur les variables explicatives. De ces régressions multiples sont extraites les valeurs ajustées.

9.2. Le Test de Spearman

La corrélation de Spearman est une mesure de dépendance statistique non paramétrique entre deux variables. La corrélation de Spearman est étudiée lorsque deux variables statistiques semblent corrélées sans que la relation entre les deux variables soit de type affine. Elle consiste à trouver un coefficient de corrélation, non pas entre les valeurs prises par les deux variables mais entre les rangs de ces valeurs. Elle estime à quel point la relation entre deux variables peut être décrite par une fonction monotone.

9.3. Les Boxplots

Dans les représentations graphiques de données statistiques, la boîte à moustaches (aussi appelée box plot) est un moyen rapide de figurer le profil essentiel d'une série statistique quantitative. La boîte à moustaches résume seulement quelques caractéristiques de position de la variable étudiée (médiane, quartiles, minimum, maximum ou déciles). Il s'agit de tracer un rectangle allant du premier quartile au troisième quartile et coupé par la médiane. Ce rectangle suffit pour le diagramme en boîte. On ajoute alors des segments aux extrémités menant jusqu'aux valeurs extrêmes.

9.4. Le Modèle Additif Généralisé : GAM

Les modèles additifs généralisés combinent la notion de modèles additifs avec les modèles linéaires et non linéaires pour dériver la notion de modèles additifs généralisés. En d'autres termes, le but des modèles additifs généralisés est de maximiser la qualité de la prévision

d'une variable dépendante Y en estimant les fonctions non spécifiques (non paramétriques) des variables prédictives qui sont "connectées" à la variable dépendante via une fonction de lien. La GAM peut être considérée comme une généralisation non paramétrique des régressions linéaires, et elle est de plus en plus utilisée dans l'écologie marine pour étudier les relations d'espèces avec plusieurs prédicteurs en raison de leurs relations de flexibilité, ce qui permet d'obtenir des relations non linéaires entre les covariables telles que données abiotiques et les variables liées aux espèces (Zuur et *al*., 2010).

Les analyses staistiques ont été réalisées grâce au logiciel R 2.15.0 (R Core Team development, 2012) with "Vegan" (Oksanen, 2011) and "Pgirmess" (Giraudoux, 2012) packages.

Chapitre III

Implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces invasives dans la lagune de Bizerte

Chapitre III.Implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces invasives dans la lagune de Bizerte (Projet d'article)

1. Contexte

Partant du fait que les eaux de ballast constituent un vecteur commun à l'échelle mondiale d'introduction d'espèces invasives, le cas du port de Bizerte, localisé au niveau d'une lagune côtière abritant une activité de pêche, de conchyliculture et une activité industrielle et disposant de différents quais : pétrolier, commerce général y compris le vrac, un céréalier et le chantier naval qui héberge des navires venant du monde entier pour réparation et entretien constitue un écosystème récepteur pour d'éventuelles introductions tout comme le port de Gabès en Tunisie méridionale.

Les investigations sur la provenance des navires nous a permis de mettre l'accent sur l'origine pacifique de l'espèce *Alexandrium pacificum* (syn : *A. catenella*) dans la lagune de Bizerte. Ses efflorescences ont été associées aux intoxications paralysantes des mollusques bivalves au cours de l'année 2007. Selon Fertouna et al. (2014), les kystes de résistance ont été retrouvés dans les sédiments superficiels de la lagune. Leurs germinations et le maintien des cultures monoclonales ont été à l'origine de la caractérisation phylogénétique de cette espèce introduite à l'aide des outils moléculaires. Des kystes de résistance d'autres espèces susceptibles d'induire des nuissances ont été identifiés indirectement via le sédiment superficiel comme *Polysphaeridium zoharyi (*forme végétative *: Pyrodinium bahamense*). Cette espèce unique du genre représentée par 2 variétés, *P. bahamense* var. *compressum* et *P. bahamanse* var. *bahamense* est connue pour ses propriétés de toxicité attribuée aux toxines paralytiques principalement dans les eaux côtières du Sud Est de l'Asie.

Les données du trafic maritime au cours des 5 dernières années ont été obtenues auprès des services de l'Office National de la Marine Marchande et des Ports.

Ces données nous ont conduit à mettre l'accent sur le pourcentage des navires venant de l'océan Pacifique, de l'Atlantique, de la mer du Nord, de la Méditerranée et de l'océan Indien. Nous avons également ajouté les modestes résultats émanant des différentes prospections directes des eaux de ballast. En effet, nous avons effectué une dizaine de sorties non fructueuses pour de multiples raisons à savoir le non accord du capitaine pour le prélèvement surtout avec les

céréaliers, des contraintes d'ordre techniques, problème de compatbilité des appareils électriques tels que les pompes submersibles ou la motopompe, l'impossiblité d'accéder à l'ouverture du ballast principale (Boulons rouillés) , il y a également les sinuosités des ballasts latéraux empêchant l'accès de tuyaux, même fins.

A partir des données sur le trafic maritime au niveau du port de Bizerte, l'hypothèse d'introduction d'espèces invasives peut être confirmée en partie et surtout concernant *Alexandrium pacificum* qui a été signalé en 2007 en tant qu'*Alexandrium catenella,* identifié par la suite en 2015 comme espèce en provenance du Pacifique.

2. Principaux résultats

Les principaux résultats qui émannent de cette ébauche d'article sont :

- Importance du trafic maritime intra-Méditérranée (52%) qui peut constituer un vecteur potentiel de la dissémination d'espèces ou de formes de résistance non indigènes.
- 14 % de la flotte qui accoste dans le port de Bizerte est en provenance du pacifique (7 années d'études)
- La confirmation de la présence de formes végétatives viables ou enkystées dans les eaux de ballast.

Article: Reflections on the implication of shipping in the introduction of exotic species in the Bizerte lagoon

1. Introduction

Over the past two decades, ships' ballast water was recognized as one of the major vectors for the introduction of harmful aquatic organisms and pathogens into the aquatic environment and the introduction of invasive species was pointed out as one of the four biggest threats to the marine environment.

Ballast water studies conducted in different parts of the world revealed that ships facilitate the transfer of aquatic organisms across natural boundaries (Carlton, 1985; Williams et al., 1988). Research conducted in different parts of the world have shown that unwanted organisms are present in ballast waters and related sediments, as well as attached on ship's hulls (Carlton, 1985; Williams et *al*., 1988; Macdonald and Davidson, 1997; Gollasch et *al*., 2000; Olenin et *al*.,2000;

Gollasch, 2002 ; Coutts et *al*., 2003). It was also confirmed that human pathogens are transferred with ship ballast waters (Ruiz et al., 2000). The volume of ballast water yearly carried around the world amounts to about 10 billions m^3 (Paterson, 2001).

Carlton (2001) estimated that over 7000 species transit in ballast water daily. These organisms, when discharged, can survive and proliferate in the new environment and generate various harms to human health, ecosystems or economy (Carlton, 1985; Carlton and Geller, 1993; Gollasch, 1998; Matej et al., 2007).

The planetary scale of the HABs phenomenon suggests a common ecological drivers which are operative. There is, as yet, no general theory adequate to explain the global HABs phenomenon. Among the global trends, the mechanisms potentially underlying the HABs phenomenon are (i) an increasing nutrient enrichment of global coastal waters and epicontinental seas; (ii) a global warming and associated climatic perturbations and (iii)a global dispersal and redistribution of bloom species in ballast waters.

Anthropic dispersal and redistribution of HABs species in ballast waters and shellfish stock transplantation are disseminating seeds and facilitating their geographic expansion (Smayda, 2007). Another factor that some ecologists cited as the “hidden flora” attributer to the resisting cysts like some Dinoflagellates, can contribute also to ballast water dispersal.

The eruption of blooms of rare and novel harmful species beyond their recognized geographic ranges, and blooms of previously undescribed species are common features of the global increase in harmful algal blooms (HABs).

The first study about the ballast water sampling was carried out 70 years later by Medcof (1975), followed by several others (e.g. Carlton, 1985; Williams et al., 1988; Hallegraeff and Bolch, 1991; Locke et al., 1991; Gollasch, 1998; Lucas et al., 1999; David and Perkovic,2004). Various studies have reported large numbers and densities of species in ballast water samples (Gollasch et al., 2007).

Toxic Dinoflagellate species could be accidentally introduced when their cysts are discharged with the ballast tank sediments or waters. These species, which can affect the marketing of fish and shellfish, are a serious threat to public health and aquaculture farms.

The survey of various ship ballast waters conducted in La Rochelle harbour, (an important harbor on the French atlantic coast especially for cereals provided a ballast volume discharge of 920,000 m3 $year^{-1}$ in the harbor (Masson et al., 2013) close to the largest European oyster (25,000 tons $year^{-1}$) farming region located a few miles south, and close to a mussel zone (10,000 tons $year^{-1}$) on the north. The survey identified alarming number of potentially toxic genera *Dinophysis* and *Phalacoroma* with several species of *Dinophysis* namely *sacculus*, *acuminata*,

caudata, *acuta* with abundances of 204,443 cells L^{-1} (Passages: Spain) and 102,770 $cellsl^{-1}$ (la Coruña: Spain). If based on the dispersion model proposed by Masson *et al*. (2013), the number of *Dinophysis* cells that can be introduced to the Marennes-Oléron area is about $2*10^8$ cells m^{-3}, up to $2*10^9$ cells m^{-3}. This exhaustive approach highlights the risk of ballast water discharging in aquaculture zones.

Investigations conducted in Bizerte lagoon (Zmerli-Triki and Kefi Daly-Yahia, 2012) revealed the presence of toxic phytoplankton species and in the Golf of Gabès (2009-2010) which is characterized to be to be a favorable area for the installation of introduced species (Bradai et *al*., 2004). Hattour and Ben Mustapha (2015) cited that the number of exotic species in the Gulf is about 91 species besides species of plankton. The main component is from the Indo-Pacific region (57.1%), followed by that Atlantic origin (24.7%) composed of macrophytes, mollusks, fish, crustaceans and other invertebrates. The inventoried phytoplankton taxa 8 species are potentially toxic including 3 diatoms and dinoflagellates 5. Tt's *Chaeotoceros Socialis* Lauder, cf *Pseudonitzschia sp* Peragallo 1897 sp1 cf *Pseudonitzschia Peragallo* 1897 *Gonyaulax polyedra* stein, *akashiwo sanguinea* Hansen and Moestrup, *Karenia selliformis* Haywood, *Prorocenrum lima* Dodge, *Scrippsiella trochoidea* Stein.

In this context, we aimed to explore ballast water vectoring Dinoflagellates resting stages and introduced phytoplankton species in a South Mediterranean lagoon, Bizerte lagoon (Tunisia), which supports heavy maritime traffic maritime and is therefore highly exposed to receiving invasive species.

2.1. Study area

Bizerte Lagoon is a semi-enclosed area located in northern Tunisia (37° 8'- 37° 14'N; 9° 46'- 9° 56' E) (Fig. 1). Connected to the Mediterranean Sea through a 6 km-long channel, and to Ichkeul Lake to the west through the 5 km-long Tinja River. It has a surface area of 130 km^2 and a mean depth of 8 m. Bizerte Lagoon is one of the most important aquaculture areas in Tunisia, recognized for its shellfish production: mussels (*Mytilus galloprovincialis*), clams (*Ruditapes decussates*) and oysters (*Crassostrea gigas*). However, over the last ten years the lagoon's annual production of mussels and oysters did not exceeded 200 tons $year^{-1}$ and in 2011 (169 T) and 2012 (115 T). Shellfish has suffered from severe seasonal losses of bivalves, one of the incriminated factors being Harmful Algal Blooms (HABs) (Turki, 2004; Turki et al., 2007, 2014).

The Bizerte lagoon is under permanent stress from many human activities such as naval and commercial shipping harbours and the lagoon shores have been used as open-air waste-dumping sites. There is also an increasing industrial activity (i.e. cement factory, steel mill, tyre factories). The Lagoon and the city of Bizerte, with its multipurpose harbour, are directly connected to the Mediterranean Sea via a narrow channel 12 m deep. In addition to 520 linear meters of standard docks and port facilities, the city is equipped with an international harbour composed of 5 docks specialized in the handling of hydrocarbons, cereals, steel, cement and metallurgical products.

Fig. 1 Geographic location of Bizerte lagoon with station numbers of the surface sediment samples (orange circles, maritime zone; yellow circles: inner zone).

2.2. Sampling

2.2.2. Sampling of ballast waters

Sampling ballast waters on ships required various authorizations from the authorities of OMMP harbour, the captaincy and customs to the dock access and for the granted ballast sampling is refer to the shipmaster because there is no laws that requires him to do this control procedure . Vessel name remains confidential.

The sampling was generally carried in the engine room by pumping the ballast water on the ballast tank or by opening the checking valve of the motor ballast pump (David and Percovic, 2004). Ten litres for phytoplankton identification were taken as aliquot from 50L of water sample onboard and filtered onto 160 µm mesh size net and later in the laboratory onto 10 µm mesh size net. These volumes were used for taxonomic identification and possible germinations of resting forms.

After recording *in situ* seawater temperature, salinity, pH, dissolved oxygen concentration and water origin if known samples were conserved at 4 °C in a black thermal container. The sedimentation method was used for phytoplankton and cysts identification (Utermöhl, 1958; Yamaguchi et al., 1995)**.** the density-gradient method (Erard-Le-Denn and Boulay, 1995) were used for cysts separation.

Others sub samples were esed for germination-dilution technique (MPN method (Imai et al., 1984)). According to this method, the sediment fraction passing the sieve (140 µm) was suspended in 10 ml filtered seawater. One ml of this suspension was

added to five replicate tubes containing 9 ml f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962). After two 10th serial dilutions with the same medium, these tubes were incubated at 20 ± 2° C under 100 µE m-2 s-1 and 12/12 h light: dark cycle.

2.3. Collected data of shipping traffic in Bizerte lagoon

Data of shipping traffic, crossing the Bizerte lagoon from 2006 to 2012, were collected from the Office of Merchant Navy and Ports. We regrouped the different countries as follow by respecting the origin port (Table 1a,b). Table 1 shows the correspondence between the official data from the office of shipping and ports that mention either the countries or the ports of origin. Therefore, a choice has been made to achieve 5 main areas of origin of ballast water by similarity to 5 groups of the complex *A. tamarense* (G I-V), which were first named according to their geographical distribution presumed. In this context, there has been a long standing discordance between morphological classifications of *A. tamarense* complex species and of molecular phylogeny groups (Genovesi et *al.* 2011, Lilly et *al*,. 2007 and John et *al.*, 2014).

Table 1. Corresponding countries (origin port) into subdivion areas suggested in this study

Countries	Origin port
Germany	North Sea
Antigua and Barbuda	North Atlantic
Bahamas	North Atlantic
Bulgaria	Eastern Mediterranean Sea
Belgium	North Sea
Barbados	North Atlantic
Bolivia	South Pacific
Belize	NorthAtlantic
Cayman	NorthAtlantic
Cambodia	Indian Pacific N +
Cyprus	Eastern Mediterranean
Comores	Indian Ocean
North korea	North Pacific
South Korea	Pacific N
Croatia	Mediterranean sea
China	Pacific
Denmark	North Sea
Egypt	Eastern Mediterranean
Spain	West Mediterranean
United States of America	North Atlantic
Spain	West Mediterranean
France	Mediterranean
Georgia	Eastern Mediterranean
Greece	Eastern Mediterranean
Hamburg	North Sea
Honduras	Pacific Atlantic Center
Hong Kong	Pacific Atlantic Center
Marshall Islands	NorthPacific
Bermuda Islands	North Atlantic
Cook Islands	NorthPacific
Italy	Mediterranean
India	Indian
Iran	Western Mediterranean

Countries	Origin port
Jamaica	Atlantic Center
Lebanon	Mediterranean East
Liberia	South Atlantic
Lithuania	North Sea
Luxembourg	Mediterranean F (Fluvial)
Malta	Mediterranean
Moldova	Eastern Mediterranean
Mongolia	Pacific-Indian
Norway	North Atlantic
PAKISTAN	Indian
Panama (including	Pacific -Atlantique Center
Netherlands (	North Sea
Poland	North Sea
Philippines	Pacific North
Portugal	Atlantic Center
Dominican	Atlantic Center
Romania	Eastern Mediterranean
United Kingdom	N Atlantic
Russia	Artic Pacific
Saint Vincent and	Atlantic Center
Sierra Leone	South Atlantic
Singapore	Indian
Slovakia	Western Mediterranean
Swiss	Mediterranean sea
Sweden	NorthAtlantic
Syria	Eastern Mediterranean
Thailand	Indian Pacific Center
Tunisia	Mediterranean
Turkey	Eastern Mediterranean
Togo	South Atlantic
Ukraine	Eastern Mediterranean
Vanuatu	South Pacific

3. Results

3.1. Shipping traffic

According to the collected data (from 2006 to 2012) of the Office of Merchant Navy and Ports, the lagoon was exposed to heavy shipping traffic from the different Basins of Mediterranean Sea, Pacific, Atlantic and others (Table 3). For instance, in 6 years, the lagoon was exposed to 3801 ships from the Mediterranean Sea (maximum of 420 ships in 2011) and to 546 ships from the Pacific Sea (maximum of 88 ships in 2006).

Tale 2. Maritime traffic per year from 2006 to 2012 in Bizerte Harbour

Original Oceans & Seas	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Artic-Pacific	7	6	7	1	-	-	1
Atlantice C	28	27	19	24	20	18	58
Atlantic N	95	21	61	39	65	48	33
Atlantic S	43	29	33	36	33	14	14
Unknown	3	2	1	1	5	5	-
Indien	15	24	17	13	15	4	6
Indien C-Pacific C	1	1	1	-	1	-	-
Mediterranean Sea	216	131	125	122	84	298	260
Mediterranean E	100	86	102	74	55	105	99
Mediterranean F	-	-	5	2	1	-	-
Mediterranean W	1	1	3	3	7	17	59
North Sea	63	33	39	62	41	24	39
Pacific	3	-	-	1	43	-	-
Pacific -Atlantic C	54	40	52	49	43	-	-
Pacific C-Atlantic C	1	1	-	-	-	-	-
Pacific N	25	21	21	11	24	2	21
Pacific N+ Indien	5	2	2	2	2	-	-
Pacific S	-	-	-	4	3	-	-
Pacific-Indien	-	1	-	-	-	-	-

The contribution of each Sea was as follow (Fig. 2),

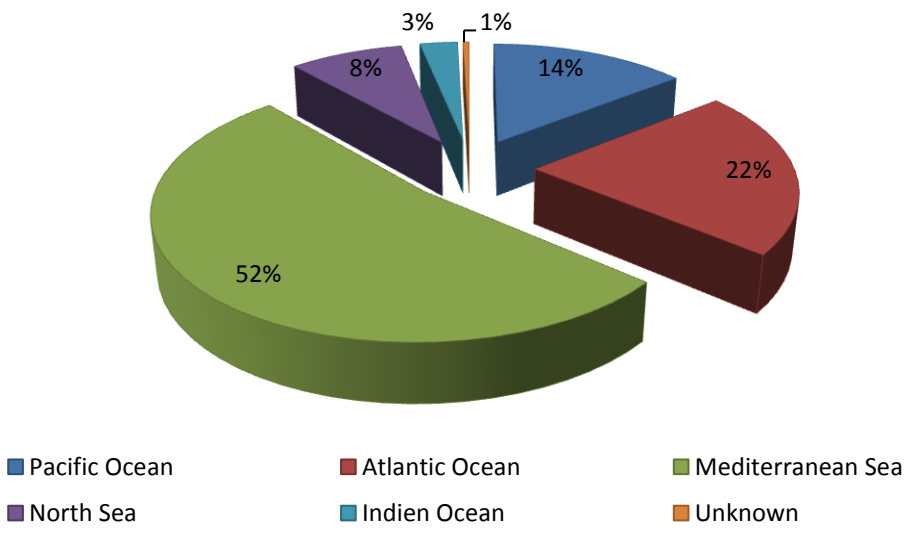


Fig.2. Maritime traffic calculated by the number of vessels from 2005 to 2012 in Bizerte harbour related to the ship registration country

Table 3. Summary of ballast sampling (2011-2012)

Ship Type	Coming from	Sampling date	T°C / S‰/ O_2mg l^{-1} / pH	Phytoplankton et Abandunces (%)	Cysts observation and abandunce (%)
Ferry (passenger ship)	Mediterranean Sea (Marseille)	1/12/2011 (Naval harbor)	18.8/ 33.5/ 0.22/ 7.58	**Diatoms**: *Lyrella sp.(6), Navicula septentrionalis (27), Anaulus creticus (6), Entomoneis (6), Pleurosigma formosum (3), Amphora (3), Chaetoceros spp.(30)* **Dinoflagellates** : *Polykrikos (25),*	Cysts of *Scripsiella* (35), RBC (50), NI not identified(10), Amoeba morphotype (5) (this type can be related to *Pfiesteria piscicida* but we did not succeed this morphotype germination)
cargo-ship	Mediterranean sea (Slovenia)	27/03/2012	18.4/ 31.7/ 5.68/ 8.21	**Diatoms :** *Chaetoceros sp.(6), Gyrosigma sp.(9), Coscinodiscus(13)* **Dinoflagellates** : *Peridinum(8), Oxytoxum(13), Ceratium furca (12), Protoperidinum leonis(18), Gymnodinium sp.(11), Protoperidinum divergens (6) Gymnodinium minimum (4)*	
Tanker (15m depth tank	Mediterranean east sea (Greece)	25/02/2012	15.4/ 32.6/ 4.42/8.07	**Diatoms**: *Bellerochea sp.(30)* **Dinoflagellates**: *Ceratium fusus (70)*	RBC (50), cyst of *Diplopsalis (35)*, NI (15) (not identified)
Tanker	Mediterran-ean east sea (Turkey)	18/04/2012		**Diatoms** : *Nitschia sp.(6), Cylindrotheca sp (3)., cocconeis (2) sp.,Nitzschia seriata (1), Dictyocha* (2) **Dinoflagellates**: *Ceratium furca (13), Ceratium fusus (13.6), Ceratium tripos (13.4), Prorocentrum minimum (12), Prorocentrum micans (10), Dinophysis acuminate (12), Protoperidinium claudicans (12),*	Cyst of *Scripsiella sp. (78)*, cyts of *Gymnodinium catenatum* (cf) (22)

3.2. Phytoplankton and cysts found in ballast waters

The absence of results of MPN method suggested the non-viability of cysts from ballast water sampled in this study. The most important groups of phytoplankton were represented in the ballast water (Tab 3.) but no *A. tamarense* complex was detected. Cysts morphtophypes were also present with dominance of Cysts of *Scripsiella* and RBC.

4. Discussion

4.1. Zonation of dinocysts

According to our previous work (Fertouna Bellakhal et *al*. 2014), The spatial distribution of Dinoflagellate cyst abundance in Bizerte lagoon was uneven. This horizontal distribution of cysts shows a tendency towards decreasing abundance, from the inner (IZ) to the outer (MZ) lagoon. The IZ area thus appears to provide more suitable conditions for the development of Dinoflagellates and retention of their cysts. Statistical analyses confirm this zonation and even grouped a set of species for each area. The first group consisted of *A. pacificum*, *L. machaerophorum*, SRBC and RBC cysts in the MZ area. The second group involves the remaining cysts close to the IZ zone.

The constant presence of both SRBC and A. catenella cysts at MZ (75.6 % and 65.9 % respectively) and especially at the channel stations (from station 1 to station 10) may be indicative of the external origin of these species.

The highest concentration of *L. machaerophorum* cysts was recorded in the vicinity of stations near the mouth of the Tinja River (maximal abundance = 82.42 cysts g-1 DS at station 25), which may also suggest the non-indigenous origin of this cyst which is the Tinja River.

4.2. Ribotyping of *A. pacificum*

According to our previous work (Fertouna et *al*., 2015) the morphological examination and ribotyping of cells from a culture called ABZ1 obtained from a cyst isolated in lagoon sediment confirmed that *A. pacificum* was exogenous, belonging to the same clade of temperate Asian strains.

4.3. Monitoring program

Furthermore, the monitoring program in Bizerte Lagoon already tracks the abundance of *Alexandrium spp*. in the water column (Turki, 2004; Turki et *al*., 2014), but not the motile cells of *P. zoharyi*, yet our results indicate the presence of the cysts in the study area which highlights the external origin of this species.

4.4. Applying the ‘‘emigration hypothesis’’ to exotic species

The first biological study that suspected shipping as a vector of non-native species introductions was published in the early 1900s where Ostenfeld (1908) reported the Asian phytoplankton species *Odontella (Biddulphia) sinensis* after amass occurrence in the North Sea in 1903. Carlton (1985), Williams et al. (1988), Macdonald and Davidson (1997), Gollasch et *al*. (2000) and Olenin et al. (2000) have shown that unwanted organisms show evidence of ballast water and related sediments, and also were observed on ship hulls (Gollasch et *al*., 2002; Coutts et *al*., 2003). According to ‘‘emigration hypotheses’’ (Smayda, 2002, 2007), new waters are seeded and geographic range expansion is facilitated, resulting in anthropogenic dispersal, redistribution of HAB species and transplantation of shellfish stock.

In our case, analysis of ballast waters didn’t show any species considered as exotic (such as *A. pacificum* and *P. zoharyi*) probably because these species were previously introduced by ballast waters. Indeed and according to statistical and molecular analyses, both *A. pacificum* and *P. zoharyi* seem to have an external origin. *Alexandrium catenella*, renamed *A. pacificum* by John et al. (2014), is particularly noxious for shellfish aquaculture. Before 1983, *A. pacificum* was not observed in the Mediterranean Sea. It was listed as a rare species by Margalef and Estrada (1987). The first blooms reported in the Mediterranean coasts occurred in 1994 in Valencia Harbor (Spain) and then blooms have been reported from 1996 to 2000 along the Catalan coast (Vila et *al*., 2001). In the last few decades, expansion of this species has been reported from all over the Mediterranean coasts, i) in confined water bodies such as the Thau Lagoon (France) (Abadie et *al*., 1999; Lilly et *al*., 2002), Bizerte Lagoon (Tunisia) (Turki et *al*., 2007), Santa Giusta lagoon (Italy) (Satta et *al*., 2013), ii) in many international harbours, Valencia, Barcelona and Tarragona harbours (Spain) (Vila et *al*., 2001), both Tunis North Lake and Tunis Channel (Tunisia) (Turki and Balti, 2005), Olbia harbor (Italy) (Lugliè et *al*., 2003) and Annaba Bay (Algeria) (Frehi et al., 2007). Genetic analysis showed that *A. pacificum* strains isolated from

several locations from the Western Mediterranean Sea were closely related to the *A. pacificum* strains blooming in temperate Asian coastal waters (Lilly et *al*., 2002; Penna et *al*., 2005, Masseret et *al*., 2009, 2014). Thus, *A. pacificum* was recognized as an alien species introduced by human activities (Molnar et *al*., 2008) able to spread because of its capability to produce resting cysts (Wyatt and Jenkinson, 1997).

In Tunisia, *A. pacificum* was first observed in 1997 during the monitoring program in the navigation channel crossing the Tunis lake was the main production area of the clam *Tapes decussatus*. Nine years after this observation, *A. pacificum* cells were observed in the Bizerte lagoon and in 2007, a first bloom occurred in the Southern part of the lagoon which is the main place of oysters and mussels farming in Tunisia. Because resting cyst morphologies of *A. pacificum* and *A. tamarense* are similar, identification of *Alexandrium pacificum/tamarense*-like cysts isolated from the Bizerte sediment sampled in June 2010 was performed using single-cyst PCR. Only *A. pacificum* ribotype was recorded in this sediment (Masseret et *al*., 2014). Thus, in this study, numerated cysts can be considered as *A. pacificum* cysts. Morphological study and ribotyping of the monoclonal culture ABZ1, issued from cysts isolated from Bizerte lagoon sediment indicated that cells belong to *A. pacificum*.
P. zoharyi, was an important cause of seafood toxicity and is considered more harmful than any other Paralytic Shellfish toxin producer (Usup et *al*., 2012). This species is typical of tropical and subtropical environments (Marret and Zonneveld, 2003; Limoges et *al*., 2013) with few reports on its presence in coastal sediments from the Eastern Mediterranean Sea (Guinta et *al*., 2006; Sangiorgi et *al*., 2006; Kholeif et *al*., 2010).

According to the potential origin of these cysts (pacific and tropical environments for *A. pacificum* and *P. zoharyi* respectively) and according to the origin of the upcoming ships to Bizerte lagoon, we could hypothesise the implication of shipping in the introduction of these exotic species into the Bizerte lagoon.

Chapitre IV

Cartographie des kystes de Dinoflagellés dans la lagune de Bizerte

Chapitre IV: Cartographie des kystes de Dinoflagellées dans la lagune de Bizerte

1. Contexte

La préservation des kystes dans le sédiment peut être utilisée comme source d'information sur les paramètres environnementaux, la qualité de l'eau dans le passé et le présent (Bolch and Hallegraeff, 1990 ; Matsuoka, 1992; Pospelova et *al*., 2008 ; Zonneveld et *al*., 2009). La proportion de kystes de Dinoflagellés hétérotrophes comme les *Polykrikacea* et les *Diplopsalidacea* en particulier, tend à augmenter avec l'enrichissement du milieu en nutriments.

L'étude des kystes relatifs aux algues nuisibles permet de signaler la présence des espèces toxiques (HAB) non précédemment rapportées au niveau de certaines zones sensibles (Matsuoka et *al*., 2003 ; Pospelova et *al*., 2005). Cette approche concernant les espèces à potentiel toxique constitue un moyen pertinent, utile et prédictif surtout pour les zones aquacoles à grands enjeux économiques.

Les travaux sur les espèces phytoplanctoniques introduites particulièrement les Dinoflagellés au niveau de la Méditerranée septentrionale sont relativement récents (Montresor et *al*., 1994 ; Vila et *al*., 2001 ; Abadie et *al*., 1999 ; Lilly et *al*., 2002 ; Satta et *al*., 2010 et 2013). Au niveau méridional, ils n'existent qu'en Tunisie (Fertouna-Bellakhal *et al.*, 2014; Zmerli Triki *et al.*, 2014).

La valorisation des zones côtières et lagunaires, par l'aquaculture et le commerce des différentes ressources halieutiques répond aux défis démographiques, palie aux limitattions des stocks halieutiques et génère des ressources économiques. Cette valorisation, semble à terme gravement menacée par l'expansion des espèces invasives telles que les microalgues toxiques qui peuvent être véhiculées par les eaux et sédiment de ballast.

Le cycle de vie de certains dinoflagellés est caractérisé par l'alternance d'une phase haploïde pélagique et une phase diploïde benthique. Le kyste dormant est issu de la reproduction sexuée. Sa paroi externe résistante lui assure une protection plus au moins longue lorsque les conditions du milieu sont défavorables au cours de la période de dormance. Le temps de survie des kystes varie de quelques semaines à plusieurs années. L'accumulation des kystes dormants dans le sédiment ou «banque de kystes» est une source d'ensemencement pour l'initiation des

proliférations anarchiques des populations microalgales induisant les efflorescences planctoniques nuisibles dans les eaux côtières.

La cartographie des différents kystes de résistance présents dans le sédiment superficiel de la lagune de Bizerte constitue une prospection d'une importance capitale étant donné que c'est la première fois que leur identification et leur distribution au sein de cet écosystème ont été faites. La caractérisation phylogénétique des souches constitue en second lieu une ébauche portant sur l'hypothèse de possibles introductions antérieures des micro-organismes, notamment par les eaux de ballast, ayant conduit à l'expansion de certaines espèces nuisibles. En effet, la lagune de Bizerte est dotée d'un port de commerce d'une grande importance sur le plan national avec ses différents quais, occupant ainsi la 2ème place en Tunisie. Cette approche renforce notre hypothèse d'implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces invasives. Des planches illustrant certains morphotypes décrits dans la lagune de Bizerte sont présentées au début de ce chapitre (Planches 1, 2, 3). Dans le cadre de ce travail, la nomenclature paléologique a été adoptée pour la désignation des morphotypes avec un tableau de correspondance entre les noms paléologiques et biologiques (Tab. 3., Cha.p IV). Toutefois, il est à signaler certaines corfimations de formes végétatives suite aux travaux très récents de Zmerli-Triki et *al*., 2015, en ce qui concerne *Impagidinum* sp (planche 2 (b) qui correspond à *Alexandrium pseudogonyaulax*.

2. Les principaux résultats

Les investigations menées au niveau du sédiment superficiel de la lagune dans une approche de mise en évidence de foyers potentiels d'espèces invasives introduites, ont permis d'obtenir les résultas suivants :

- La distribution des kystes des Dinoflagellés à haute résolution avec 123 stations de prélèvement dans les sédiments de surface de la lagune de Bizerte
- La richesse des morphotypes recensés avec la présence d'espèces non indigènes
- La dominance des Dinoflagellés Protoperidinioides et Gonyaulacoides
- L'accumulation des dinokystes dans la partie interne de la lagune
- Le rôle déterminant de l'hydrodynamisme dans la distribution des kystes dans la lagune de Bizerte.

3. Résumé

La composition spécifique et l'abondance des kystes de résistance de dinoflagellés en relation avec les facteurs environnementaux, ont été étudiées à partir du sédiment superficiel au niveau de 123 stations dans la lagune de Bizerte. Quarante huit morphotypes de kystes de dinoflagellées ont été identifiés (Planches 1.2 et 3), principalement dominés par *Brigantidinium simplex*, *Votadinum spinosum*, *Alexandrium pacificum*, *Alexandrium pseudogonyaulax*, et *Lingulodinum machaerophorum*. La densité des kystes a varié de 1276 à 20126 kystes g^{-1} sédiment sec. Des différences significatives dans le schéma de distribution des kystes ont été enregistrées, ce qui nous a permis de distinguer deux zones ; ainsi la zone intérieure de la lagune présente une abondance de kystes supérieure à la zone sous influence maritime. L'analyse des variables environnementales (analyse de la redondance) a montré deux associations de dinokystes par rapport aux stations de prélévement.

Les rejets d'eau de ballast et la conchyliculture peuvent être incriminés en tant que sources potentielles d'introduction d'espèces, en particulier celles potentiellement toxiques tels que *A. pacificum* et *Polysphaeridium zoharyi*, sans négliger le rôle des courants dans la distribution des kystes. La cartographie des kystes peut être utilisée comme indicateur de foyers potentiels de futures efflorescences d'espèces toxiques dans cet écosystème.

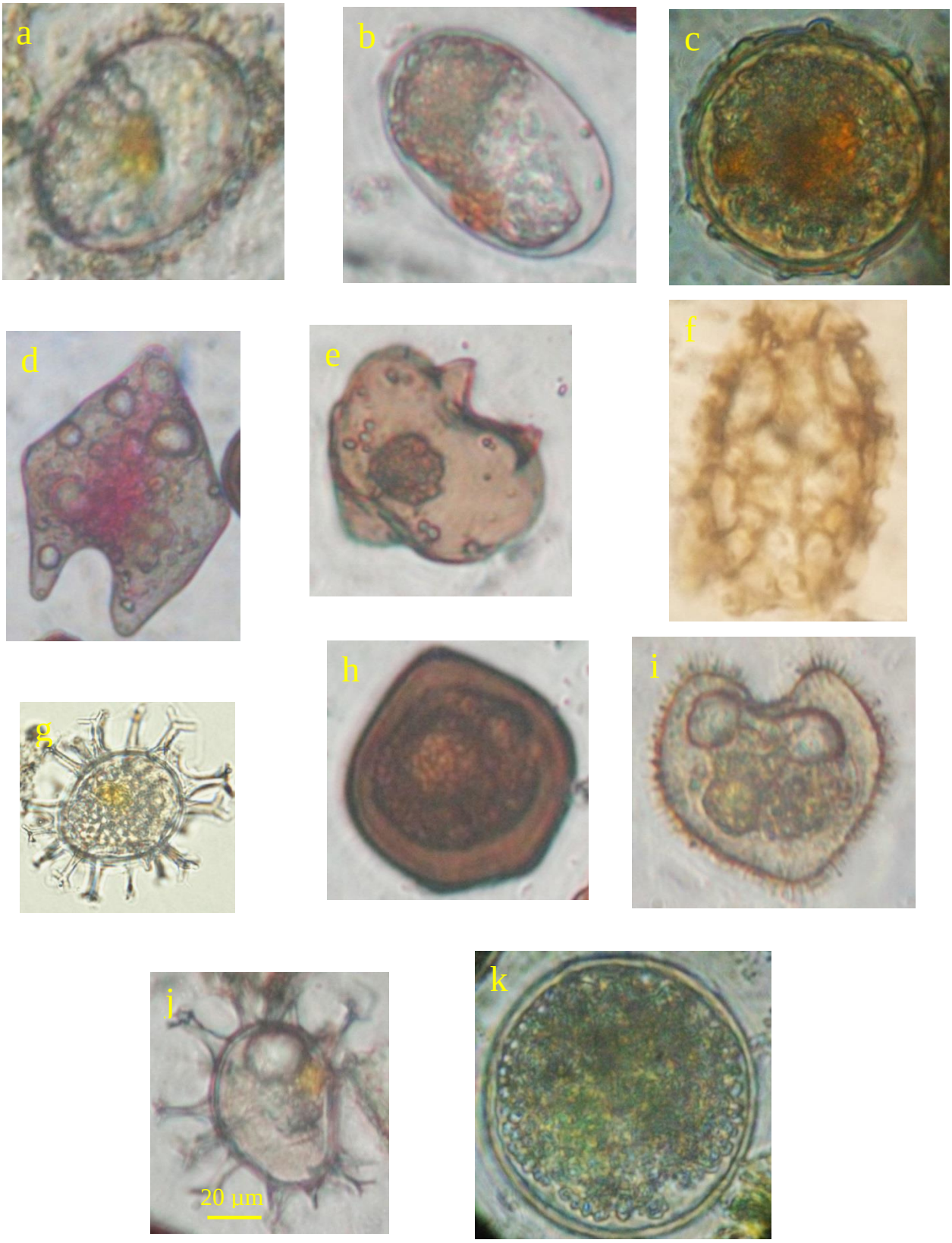


Planche 1

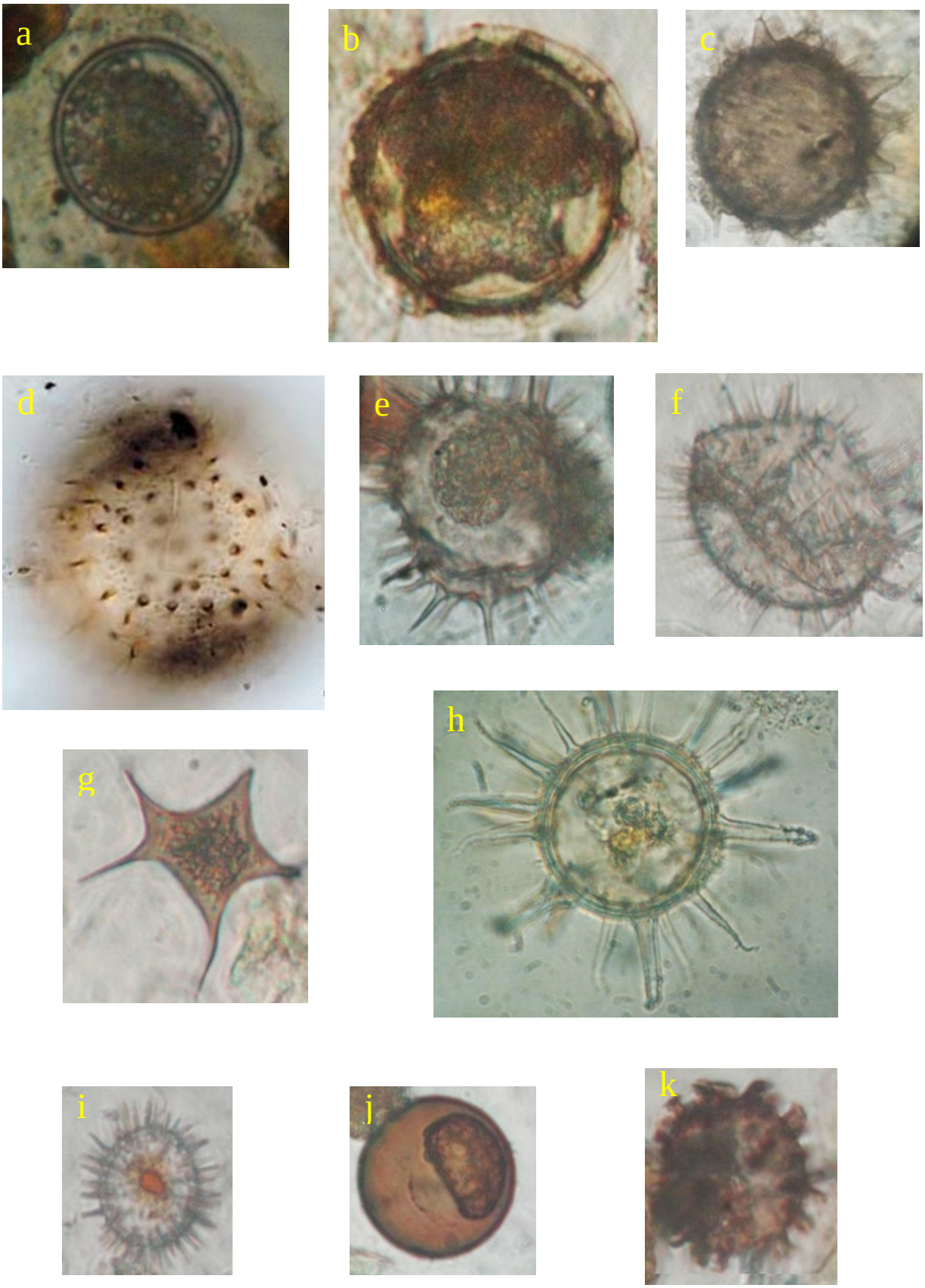


Planche 2

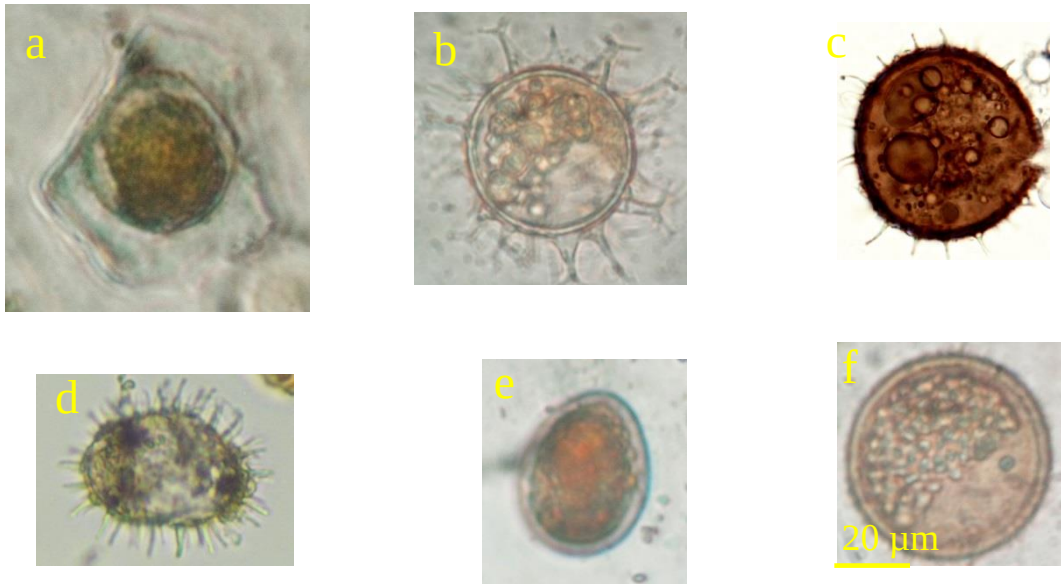


Planche 3

Fig.1. Planches des différents kystes identifiés au niveau du sédiment superficiel de la lagune de Bizerte.

Planche 1

a. et b. Cyst of *Alexandrium catenella* complex
b. Cyst of *Alexandrium pseudogonyaulax*
c. Cyst of *Protoperidinium steidingerae*
d. *Quinquecuspis concreta*
e. Cyst of *Polykrikos kofoidii*
f. *Spiniferites bulloideus*
g. *Votadinium clavum*
h. *Votadinium spinosum*
i. *Spiniferite Lazus*
j. *Brigantidinium simplex*

Planche 2

a. Cyst of *Alexandrium affine*
b. *Impagidinium* sp
c. *Archeoperidinum minutum* sense Wall and Dale
d. *Islandinium miniutum*
e. Cyst of *Protoperidinium nudum*
f. *Selenopomphix quanta*
g. *Stellatodinum stellatum*
h. *Lingulodinium machaerophorum*
i. *Scripssiella precaria*
j. Cyst of *Diplopsalis lenticulata*
k. Cyst of *Gyrodinium resplendens*

Planche 3

a. Cyst of *Gymnodinium impudicum*
b. *Spiniferite delicatus*
c. SRBC
d. *Scrippsiella ramoni*
e. *Scrippsiella trocoidea* complex
f. SRBC

Article 1. Driving factors behind the distribution of dinocyst composition and abundance in surface sediments in a western Mediterranean coastal lagoon: report from a high resolution mapping study

Article publié dans le journal 'Marine pollution bulletin' (IF = 2.99)

Marine Pollution Bulletin 84 (2014) 347–362

Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Driving factors behind the distribution of dinocyst composition and abundance in surface sediments in a western Mediterranean coastal lagoon: Report from a high resolution mapping study

Mouna Fertouna-Bellakhal [a,b,c], Amel Dhib [b,c], Béchir Béjaoui [d], Souad Turki [c], Lotfi Aleya [b,*]

[a] Institut Supérieur de Pêche et d'Aquaculture de Bizerte, Unité de recherche: Exploitation des Milieux Aquatiques, Errimel, B.P.15. 7080 Bizerte, Tunisia
[b] Université de Franche-Comté, Laboratoire de Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, France
[c] Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), Centre la Goulette, Tunisia
[d] Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), Salammbô 2025, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 17 May 2014

Keywords:
Dinocysts
Mapping
Enviromental factors
Hydrodynamics
Bizerte Lagoon

ABSTRACT

Species composition and abundance of dinocysts in relation to environmental factors were studied at 123 stations of surface sediment in Bizerte Lagoon. Forty-eight dinocyst types were identified, mainly dominated by *Brigantidinium simplex*, *Votadinum spinosum*, *Alexandrium pseudogonyaulax*, *Alexandrium catenella*, and *Lingulodinum machaerophorum* along with many round brown cysts and spiny round brown cysts. Cysts ranged from 1276 to 20126 cysts g^{-1} dry weight sediment. Significant differences in cyst distribution pattern were recorded among the zones, with a higher cyst abundance occurring in the lagoon's inner areas. Redundancy analyses showed two distinct associations of dinocysts according to location and environmental variables. Ballast water discharges are potential introducers of non-indigenous species, especially harmful ones such as *A. catenella* and *Polysphaeridium zoharyi*, with currents playing a pivotal role in cyst distribution. Findings concerning harmful cyst species indicate potential seedbeds for initiation of future blooms and outbreaks of potentially toxic species in the lagoon.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abstract

Species composition and abundance of dinocysts in relation to environmental factors were studied at 123 stations of surface sediment in the Bizerte Lagoon. Forty eight dinocyst types were identified, mainly dominated by *Brigantidinium simplex*, *Votadinum spinosum*, *Alexandrium pseudogonyaulax*, *Alexandrium catenella*, and *Lingulodinum machaerophorum* along with many round brown cysts and spiny round brown cysts. Cyst abundance ranged from 1276 to 20126 cysts g^{-1} dry weight sediment. Significant differences in cyst distribution pattern were recorded among zones, with the higher cyst abundance occurring in the inner parts of the lagoon. Redundancy analyses showed two distinct associations of dinocysts according to locations and environmental variables. Ballast water discharges are potential introducers of non-indigenous species, especially the harmful ones namely *A. catenella* and *P. zoharyi*, and currents play a pivotal role in cyst distribution. Findings concerning harmful cyst species indicate potential seedbeds for initiation of future blooms and outbreaks of potentially toxic species in Bizerte Lagoon.

Keywords: dinocysts; mapping; enviromental factors; hydrodynamics; Bizerte Lagoon.

1. Introduction

Bizerte Lagoon remains the only valuable region of bivalve mollusc production in developing Tunisia. However, over the last 10 years it has suffered from intensive blooms of harmful microalgae, mainly dinoflagellates (Turki, 2004; Sakka et al., 2007; Sahraoui et al., 2009; Turki et al., 2014, generating massive bivalve mortality. Therefore several technico-administrative entities involving managers, politicians and scientists have provided a weekly assessment of the lagoon's environmental conditions (e.g. oxygen, temperature, ciliates, phytoplankton…) (Sakkha et al., 2006, Smida et al., 2012; Turki et al., 2014 in order to develop remedial action when bivalve molluscs and fish health were thought to be endangered. Currently 81 species, out of 2,500 known modern dinoflagellate species are recognized as harmful, causing water discoloration, intoxication to aquatic fauna and have been known to cause outbreaks of harmful algal blooms (HABs) (IOC). Approximately ~ 200 modern marine dinoflagellate species can produce organic walled and calcareous cysts as part of sexual or asexual life cycle (Head, 1996). Thus cysts deposited in the sediments gives information about their planktonic counterparts as well as acts as 'seed bed' for the bloom initiation (Dale, 1983). In some toxic dinoflagellate species (e.g. *Alexandrium*), cyst contains more toxin than its vegetative counterpart (Oshima et al., 1992). Similarly transfer of resting stages of the toxic dinoflagellates can contaminate previously unaffected coastal regions. We therefore hypothesised that Bizerte Lagoon with its complex habitats could provide a physical environment suitable to support a diverse dinocyst community. Indeed, the lagoon is comprised of two zones, a maritime zone (MZ) in the northern and western areas, including the various docks of Bizerte harbour and the navigation channel, and an inner zone (IZ) in the central and eastern areas which includes four oyster and mussel farms. In the MZ, dinocyst distribution is expected to be under the influence of growing international marine navigation which may introduce non-indigenous dinoflagellates and especially cysts via ballast water, while the IZ, located in a heavily populated area and subjected to environmental pollution from sewage, industrial and agricultural run-off and other human activities. It is therefore of interest to explore how cysts spatially are distributed under these specific conditions and how this translates into terms of cyst richness. Thus, the relationship between dinocysts and environmental conditions has been well documented world wide (Zonneveld 1997; Zonneveld et al. 2000; Marret and Zonneveld 2003; Radi and de Vernal 2004; Radi et al., 2007; Shin et al., 2007; Pospelova et al., 2008). In particular, paleo-environmental studies and ecological studies of eutrophicated or industrial areas are increasingly being undertaken using dinoflagellate cysts (Sætre et al. 1997; Dale et al. 1999; Matsuoka 1999; Pospelova et al. 2002, 2005; Matsuoka et al. 2003; Dale 2009). While many dinoflagellates can

be extremely toxic and have been known to cause outbreaks of harmful algal blooms (HABs) in coastal waters around the world (Hallegraeff, 1993; Cymbella, 1998, Anderson et al., 2012; Feki et al., 2013), the toxicity of dinocysts may be even greater than that of the vegetative cells. For instance, *Alexandrium* cysts contain PSP toxin levels several-fold higher than those in motile cells (Oshima et al., 1992), and in Bizerte Lagoon, many species of the genus *Alexandrium* generate the most harmful algal blooms there (Turki et al., 2014), causing paralytic shellfish poisoning that is a threat to human health (Taylor et al., 1995, Anderson et al., 2012, Abdennadher et al., 2012). Unfortunately, no photographic studies of dinocysts in Bizerte Lagoon have been undertaken to produce a cyst bank which could serve as a record of past blooms or as a tool to predict future blooms, nor has there been any study of cyst distribution in relation to environmental factors.

In the Mediterranean Sea, the composition of dinoflagellate resting cyst assemblages in recent sediments has been examined in only a few studies (Rubino et al., 2000, 2002; Giannakourou et al., 2005; Zonneveld et al., 2009; Satta et al., 2013). As far as we know, no study of dinocysts in sediments along the North African coast have yet been undertaken.

In this context, dinocysts were studied in Bizerte Lagoon in relation to both environmental factors and hydrodynamic conditions. The purpose of this paper is to: (1) give detailed descriptions and illustrations of cysts and also to seek the presence of non-indigenous morphotypes possibly introduced by ship ballasts since maritime navigation is the greatest dissemination vector for exotic species (Ruiz and Carlton, 2003), (2) provide information on the distribution and abundance of dinocysts, (3) assess the seed beds of potential risks areas and (4) identify potential factors driving cyst distribution.

Our intent was also to provide through this study the first high resolution mapping of cysts in the Bizerte Lagoon, so as to help aquaculture farm managers and to serve as a first basis for future studies of dinoflagellate dynamics in the lagoon.

2. Materials and Methods

2. 1. Study area

Bizerte Lagoon is a semi-enclosed area located in the northern Tunisia (37º 8’- 37º 14’ N; 9º 46’- 9º 56’ E) (Fig. 2). It is connected to the Mediterranean Sea through a 6 km-long channel, and to Ichkeul Lake to the west through the 5 km-long Tinja River. It has a surface area of 130 km^2 and a mean depth of 8 m. The lagoon receives freshwater input (20 10^6 m^3 yr^{-1}) from several

surrounding rivers and from Lake Ichkeul. The lagoon is under stress from a number of human activities such as naval and commercial shipping harbours and the lagoon shores have also been used as open-air waste-dumping sites. There is also increasing industrial activity (cement factory, steel mill, tyre factories, etc.), as well as naval and commercial shipping harbours.

During the summer, the surface sediments of the northern and eastern sectors of Bizerte Lagoon exhibit a facies range of silty-sandy-muddy to sandy-silty-muddy (fraction > 63 µm represents 80-90 % of the total). The percentage of fine fraction increase in sediments in the area of the river mouths (the Tinja for example) exhibits a facies of muddy-silty-sandy (fine fraction represents 64 % of the total). The western and central sectors of the lagoon exhibit a muddy-silty to muddy facies throughout the year, with the fine fraction representing up to 98 % of the total (Ben Garali et al., 2008).

2.2. Sampling

Sampling was carried out in June 2012 at 123 stations, 1 km equidistant (Fig. 2, Table 1). As indicated in the introduction, the stations are grouped into two zones: i) a Maritime Zone (MZ) in the northern and western areas comprised stations 1 to 40, including the navigation channel and the various docks of Bizerte Harbour, and ii) an Inner Zone (IZ) in the central and eastern areas, composed of stations 41 to 123 and including four oyster and mussel farms. In the MZ, dinocyst distribution is expected to be under the influence of growing international maritim navigation which may introduce non-indigenous dinoflagellates and especially cysts via ballast water, while the IZ, located in a heavily populated area, is subjected to environmental pollution from sewage, industrial and agricultural run-off and other human activities. Sediment was collected from the top 3 cm with a Van Veen Grab Sampler (Yamaguchi et al., 1995) and the water column was sampled by means of a submersible pump. Temperature, salinity and pH were measured with a WTW 25i multiparameter probe. Sediment samples were placed in dark plastic containers, hermetically sealed to prevent any germination and stored in the dark at 4°C. In the laboratory, nutrients (ammonium, nitrite, nitrate, phosphate and silicate) were analysed with a BRAN and LUEBBE type 3 autoanalyser and concentrations were determined by using a UV–visible (JENWAY 6705) spectrometer (APHA, 1992). Water samples (1L) for chlorophyll *a* analysis were filtered by vacuum filtration onto Whatman GF/F glass fibre filters (pore size: 0.45 µm) which were immediately stored at -20 °C.Chlorophyll *a* analyses were performed by HPLC according to Pinckney et al. (2001).

To identify the impact of hydrodynamics on cyst distribution, current measurements were achieved in parallel by deploying two current-meters: an Argonaut (MD-1500 Khz) and an ADCP (Acoustic Doppler Current Profiler; 500 khz). The Argonaut was deployed at 4 m depth, at opposite of Menzel Abderrahmen Harbour, so as to estimate the average current speed in the layer 0-2 m. The ADCP was deployed at 10 m depth in the eastern sector near the mussel aquaculture station STL. Measurements were taken in 4 cells of 2 m each.

Through these current measurements, we sought to better understand the circulation in the inner part of the lagoon and its potential impact on cyst diversity. Furthermore, a comparison between our current measurements and simulations showeds that the model satisfactorily reproduced our current measurements (Bejaoui, 2009; MeHSIP-PPIF, 2011). More details concerning model equations, current measurements and validation are available elsewhere (INSTM, 2002; Harzallah, 2003; Béjaoui et al., 2008).

2. 3. Cyst processing and indentification

Dinocysts were separated from the sediment fraction according to a gradient density method using Ludox CLX as described by Genovesi et *al*. (2007) modified from Erard-Le Denn and Boulay (1995) and Yamaguchi et al. (1995).We checked only the surface sediment and empty cysts were not considered. Subsamples (1 g) were suspended in 20 ml of sucrose 24 % and sonicated for 3 min at 100 Hz in a Wiseclean DAIHAN sonicator. The sonicated suspension was sieved through 120 µm and 20 µm mesh sieves. The slurry remaining on the 20 µm mesh sieve was washed with sucrose solution and placed in a 50 ml Falcon tube for sonification (3 min at 100 Hz). It was processed for cyst concentration and separated from the sediment using 20 ml of Ludox CLX (density 1.3 g cm^{-3}). The tube was centrifuged for 30 min at 3000 rpm at 16°C. Dinocysts were concentrated in the upper fraction. This unstable phase containing dinocysts was extracted and sieved through a 20 µm mesh nylon membrane. The resulting sample was rinsed with distilled water and collected with 5 ml of filtered seawater and sonicated. One aliquot of the final sample was counted in a sedimentation chamber with an inverted microscope (Leica DMl 50).

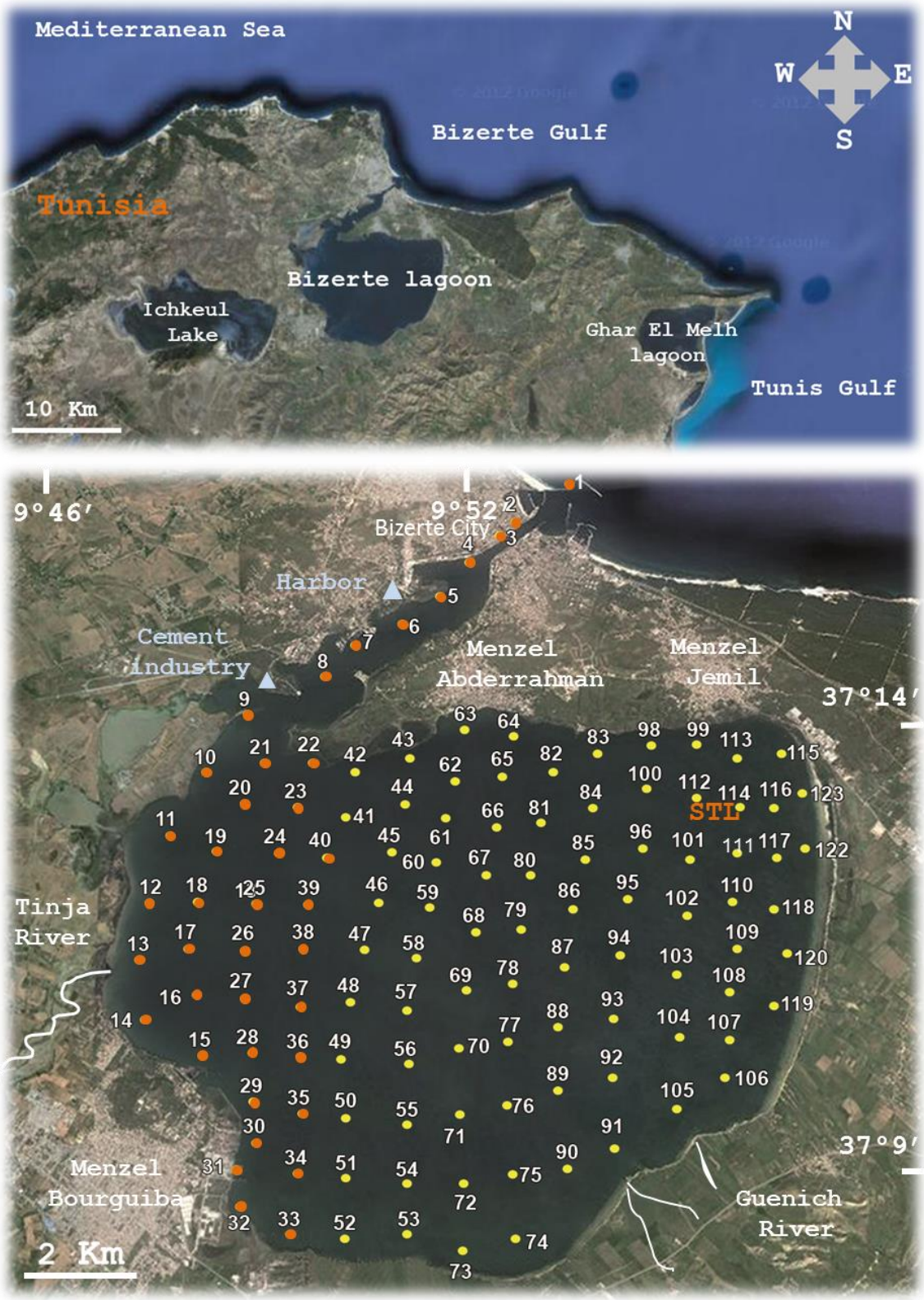


Fig.2. Geographic location of Bizerte lagoon with station numbers of the surface sediment samples (orange circles, maritime zone; yellow circles: inner zone).

Table 1. Geographic station positions and % H_2O for each sediment sample (- : **missing percentages refer to stations with rocky sediment**).

Stations	Latitude	Longitude	% H_2O	Stations	Latitude	Longitude	% H_2O
1	37°16'30.46"N	9°53'18.91"E	41.00	**50**	37° 9'34.30"N	9°49'53.68"E	50.90
2	37°16'13.89"N	9°52'50.08"E	20.10	**51**	37° 8'58.48"N	9°49'51.68"E	51.90
3	37°15'54.62"N	9°52'17.89"E	65.80	**52**	37° 8'22.67"N	9°49'49.68"E	44.50
4	37°15'36.14"N	9°51'51.69"E	53.50	**53**	37° 8'22.69"N	9°50'35.63"E	48.80
5	37°15'12.15"N	9°51'26.51"E	29.50	**54**	37° 8'52.81"N	9°50'36.63"E	-
6	37°14'53.66"N	9°50'54.50"E	46.60	**55**	37° 9'27.00"N	9°50'38.64"E	40.80
7	37°14'41.07"N	9°50'15.53"E	47.70	**56**	37°10'2.01"N	9°50'41.68"E	29.80
8	37°14'18.88"N	9°49'50.01"E	36.50	**57**	37°10'36.22"N	9°50'43.70"E	30.20
9	37°13'55.62"N	9°48'46.91"E	60.30	**58**	37°11'7.17"N	9°50'51.84"E	36.80
10	37°13'17.19"N	9°48'14.07"E	62.10	**59**	37°11'38.93"N	9°51'3.06"E	56.70
11	37°12'36.56"N	9°47'45.32"E	54.40	**60**	37°12'8.25"N	9°51'11.20"E	52.90
12	37°11'53.00"N	9°47'29.84"E	53.40	**61**	37°12'36.74"N	9°51'20.37"E	60.30
13	37°11'16.24"N	9°47'22.52"E	55.20	**62**	37°13'1.99"N	9°51'29.55"E	60.30
14	37°10'38.95"N	9°47'27.24"E	47.00	**63**	37°13'36.17"N	9°51'39.73"E	55.60
15	37°10'15.53"N	9°48'9.92"E	53.20	**64**	37°13'30.48"N	9°52'16.54"E	46.80
16	37°10'52.32"N	9°48'4.73"E	52.80	**65**	37°13'2.82"N	9°52'6.36"E	60.30
17	37°11'22.59"N	9°47'58.68"E	56.90	**66**	37°12'29.44"N	9°51'58.22"E	67.00
18	37°11'52.02"N	9°48'6.41"E	54.60	**67**	37°11'58.50"N	9°51'48.02"E	63.20
19	37°12'23.78"N	9°48'22.90"E	53.70	**68**	37°11'21.85"N	9°51'38.85"E	52.80
20	37°12'54.76"N	9°48'43.27"E	56.60	**69**	37°10'45.20"N	9°51'27.64"E	51.70
21	37°13'21.43"N	9°49'0.25"E	37.00	**70**	37°10'10.99"N	9°51'20.51"E	55.90
22	37°13'21.46"N	9°49'38.08"E	63.40	**71**	37° 9'29.47"N	9°51'17.47"E	52.90
23	37°12'50.15"N	9°49'26.06"E	-	**72**	37° 8'52.02"N	9°51'17.49"E	53.30
24	37°12'20.72"N	9°49'9.56"E	65.10	**73**	37° 8'10.51"N	9°51'13.43"E	33.10
25	37°11'48.96"N	9°48'51.12"E	63.60	**74**	37° 8'18.42"N	9°51'52.38"E	30.20
26	37°11'19.53"N	9°48'41.45"E	56.90	**75**	37° 8'54.11"N	9°51'53.24"E	33.80
27	37°10'50.11"N	9°48'42.47"E	53.50	**76**	37° 9'34.02"N	9°51'52.35"E	36.70
28	37°10'15.27"N	9°48'46.40"E	56.30	**77**	37°10'13.23"N	9°51'55.86"E	62.90
29	37° 9'46.12"N	9°48'46.09"E	54.50	**78**	37°10'48.95"N	9°52'2.00"E	54.80
30	37° 9'20.75"N	9°48'48.77"E	57.70	**79**	37°11'22.56"N	9°52'11.68"E	33.90
31	37° 9'6.60"N	9°48'34.16"E	49.00	**80**	37°11'56.88"N	9°52'21.35"E	30.40
32	37° 8'45.53"N	9°48'36.09"E	56.50	**81**	37°12'30.49"N	9°52'33.66"E	65.80
33	37° 8'28.86"N	9°49'12.64"E	55.60	**82**	37°13'5.49"N	9°52'46.85"E	36.50
34	37° 9'1.38"N	9°49'18.36"E	56.10	**83**	37°13'14.59"N	9°53'22.03"E	48.80
35	37° 9'36.37"N	9°49'22.75"E	55.60	**84**	37°12'37.53"N	9°53'15.34"E	56.90
36	37°10'10.10"N	9°49'20.94"E	53.40	**85**	37°12'4.57"N	9°53'4.99"E	56.60
37	37°10'41.90"N	9°49'23.35"E	66.20	**86**	37°11'33.36"N	9°52'52.43"E	40.10
38	37°11'17.94"N	9°49'26.45"E	53.80	**87**	37°10'56.86"N	9°52'42.83"E	65.80
39	37°11'46.20"N	9°49'32.06"E	56.80	**88**	37°10'20.48"N	9°52'33.86"E	63.20
40	37°12'15.52"N	9°49'45.32"E	58.30	**89**	37° 9'42.20"N	9°52'30.69"E	54.30
41	37°12'42.39"N	9°50'1.64"E	59.60	**90**	37° 8'55.21"N	9°52'33.96"E	54.80
42	37°13'11.71"N	9°50'12.86"E	64.40	**91**	37° 9'4.47"N	9°53'8.31"E	56.70
43	37°13'19.88"N	9°50'52.73"E	55.60	**92**	37° 9'45.03"N	9°53'11.01"E	30.80
44	37°12'48.12"N	9°50'48.67"E	57.70	**93**	37°10'22.94"N	9°53'16.06"E	29.80
45	37°12'17.18"N	9°50'36.43"E	58.30	**94**	37°11'2.01"N	9°53'25.43"E	26.80
46	37°11'45.42"N	9°50'25.22"E	55.60	**95**	37°11'37.06"N	9°53'35.52"E	54.80
47	37°11'14.47"N	9°50'11.97"E	57.70	**96**	37°12'10.38"N	9°53'49.95"E	63.20
48	37°10'42.70"N	9°50'1.78"E	47.80	**97**	37°12'46.62"N	9°53'55.68"E	52.80
49	37°10'8.50"N	9°49'52.62"E	39.80	**98**	37°13'17.59"N	9°54'5.82" E	44.40

99	37°13'17.59"N	9°54'39.72"E	53.40	**112**	37°12'33.51"N	9°55'8.40"E	46.10
100	37°12'37.95"N	9°54'34.67"E	60.80	**113**	37°13'5.43"N	9°55'11.56"E	48.80
101	37°12'0.09"N	9°54'25.87"E	60.30	**114**	37°13'22.15"N	9°55'25.00"E	33.80
102	37°11'23.45"N	9°54'18.19"E	59.80	**115**	37°13'7.76"N	9°55'46.35"E	31.70
103	37°10'48.21"N	9°54'12.17"E	53.90	**116**	37°12'31.22"N	9°55'35.96"E	60.70
104	37°10'9.05"N	9°54'3.98"E	45.80	**117**	37°11'58.60"N	9°55'32.12"E	61.50
105	37° 9'28.15"N	9°53'57.42"E	40.80	**118**	37°11'24.23"N	9°55'26.65"E	52.10
106	37° 9'43.75"N	9°54'34.14"E	36.50	**119**	37°10'26.33"N	9°55'17.38"E	28.00
107	37°10'6.76"N	9°54'40.62"E	29.00	**120**	37°10'57.41"N	9°55'32.17"E	28.00
108	37°10'32.94"N	9°54'45.10"E	42.10	**121**	37°11'30.69"N	9°55'46.33"E	31.00
109	37°11'0.70"N	9°54'53.58"E	51.30	**122**	37°12'3.73"N	9°55'56.36"E	24.50
110	37°11'30.06"N	9°54'55.08"E	55.50	**123**	37°12'41.01"N	9°56'0.43"E	27.80
111	37°12'1.31"N	9°55'2.39"E	60.90				

To identify cysts, morphotypes were germinated in f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962). Water salinity was adjusted to 34, temperature 20 ± 2°C, photon irradiance 100 µmol photons m^{-2} s^{-1} under a 12/12 light / dark cycle.

Dinocysts were identified based on published descriptions and thecal equivalents are taken from Head (1996), Zonneveld (1997a,b), Zonneveld and Jurkschat (1999), Rochon et al. (1999), Head et al. (2001), Pospelova and Head (2002), Kim et al. (2007) and Matsuoka et al. (2009). Cyst richness was calculated and the level of cyst community structure was assessed with the Shannon-Weaver H′ diversity index (1949).

2. 4. Sediment analysis

To calculate the sediment water content, subsamples of 20 g were oven dried at 60°C for 7 days. Water content was then calculated using the following formula (Cho and Matsuoka, 2001):

Water % = [(Ww-Wd)*100] / Ww

Ww = wet weight; Wd = dry weight

As suggested by Cho and Matsuoka (2001), dinocysts were expressed as:

Cysts g^{-1} dry sediment (DS) = cysts g^{-1} wet sediment (WS) / [1-(water content/100)].

2.5. Statistical analysis

We used one-way variance analysis (ANOVA) to assess the variability of parameters among stations and zones. Redundancy analysis (RDA) was performed to define the structuring effects of sampling station and zones, along with environmental conditions on cyst abundances. To prevent any disproportionate influence of rare species in the subsequent analysis, the only species considered were the dominant morphotype cysts. Cyst abundances were normalised prior

to analysis. Statistical analysis was produced by R 2.15.0 (R Core Team development, 2012) with “Vegan” (Oksanen, 2011) and “Pgirmess” (Giraudoux, 2012) packages.

3. Results

3.1. Environmental conditions

The physico-chemical characteristics of the water column are summarised in Table 2. The highest temperature (30.5 °C) was recorded at stations 97 and 98, while the lowest (21 °C) at station 2. Temperature varied significantly from station to station (ANOVA, $F = 92.42$, $p < 0.001$) and between the two zones MZ and IZ (ANOVA, $F = 17.154$, $p < 0.001$). Water salinity varied from 33.4 at station 2 to 25.7 at station 97, varying significantly according to station (ANOVA, $F = 49.82$, $p < 0.001$) and zone (ANOVA, $F = 11.85$, $p < 0.001$). The pH was close at all stations (8.16-8.69). Nutrient concentration did not differ significantly between stations and zones. Total phosphorus (T-P) concentration was high (1.2-3.32 µM). Orthophosphate concentration was lower (0.02–0.16 µM), representing only 4.48 % of total phosphorus. Total nitrogen (T-N) concentration showed a regular trend (mean ± s.d = 13.44 ± 1.1µM). Nitrogen appeared equally between its dissolved organic form (51.68 %) and its dissolved inorganic form (DIN: NO_2^- + NO_3^- + NH_4^+) representing 48.31 % of the total. Ammonium concentration accounted for 58.38 % of total DIN followed by nitrate 40.1 % and nitrite 1.51 %. DIN values were higher (3.03–10.75 µM). DIN/DIP ratio was high at all stations (mean ± s.d = 74.9 ± 29.37) and greater than the Redfield ratio (16) with a maximum of 186.61 at station 40. Silicate concentration ranged from 2.01 µM at station 52 to 7.73 µM at station 46.

Table 2. Physico-chemical parameters of Bizerte lagoon water column

Physico-chemical parameters	Minimum	Maximum	Mean ±SD
Temperature (°C)	21	30.5	26.15 ± 2
Salinity	25.7	33.4	29.65 ± 1.58
pH	8.16	8.69	8.27± 0.1
NO_2^-(µM)	0.04	0.18	0.1 ± 0.03
NO_3^-(µM)	1.12	4.37	2.61 ± 0.77
$NH4^+$ (µM)	1.84	6.21	3.79 ± 1.02
T-N (µM)	10.56	15.88	13.44 ± 1.09
PO_4^{3-} (µM)	0.03	0.17	0.09 ± 0.03
T- P (µM)	1.21	3.32	2.11 ± 0.4
Si OH_2 (µM)	2.02	7.73	4.56 ± 1.32
T-N/T-P	4.10	10.48	6.59 ± 1.34

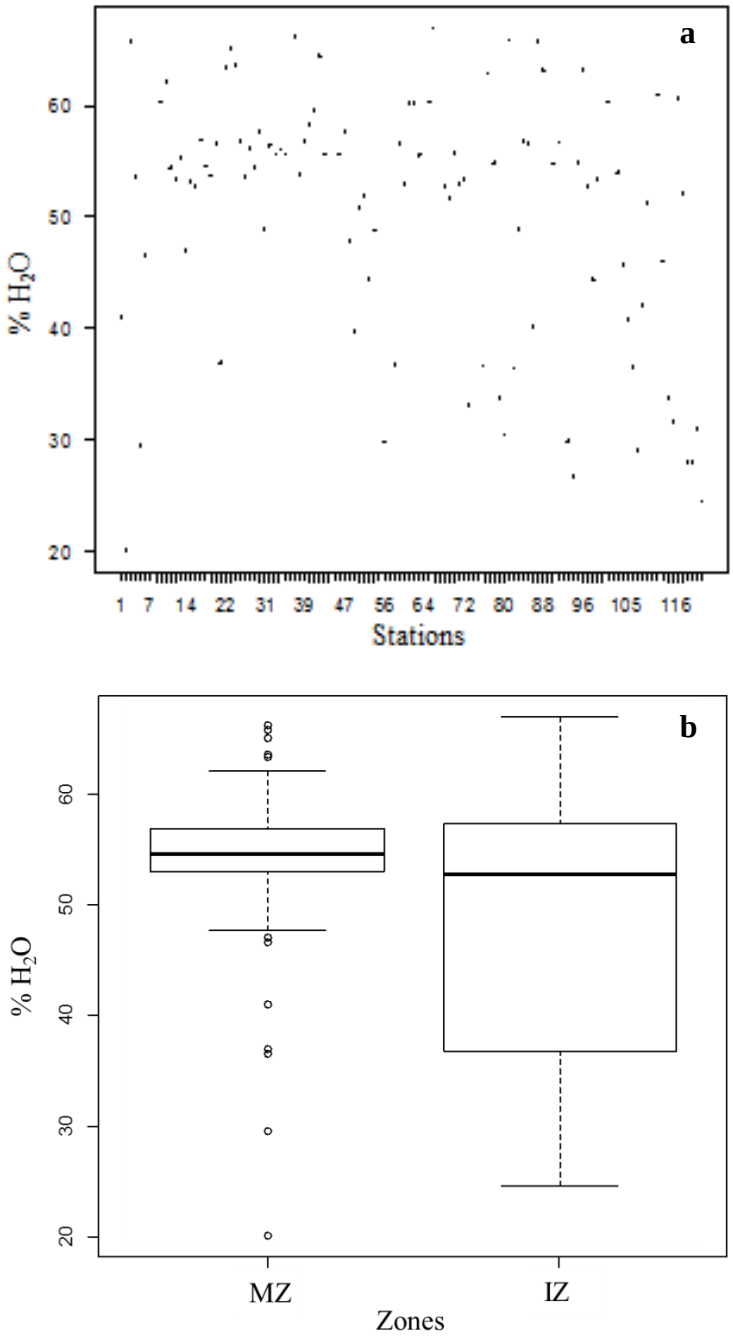


Fig. 3. Boxplots depicting the spatial variations of% H_2O among stations and zones in Bizerte lagoon (MZ: Maritime Zone; IZ: Inner Zone).

The % H_2O of sediment samples was heterogeneous (mean ± s.d = 49.94 ± 11.32) and peaked with a maximum of 67 at station 65 (Table 1), varying significantly from station to station (ANOVA, F = 7.34, p = 0.007) (Fig. 3a) and between the two zones (ANOVA, F = 4.55, p = 0.03) (Fig. 3b).The occurrence of high % H_2O in "MZ" area was related to the muddy facies of the western sector of the lagoon and the presence of a river mouth (Oued tinja). As well, the occurrence of high % H_2O in "IZ" area may be ascribed to the muddy facies of the central sector of the lagoon and the presence of some rivers. The low % H_2O in the two areas was related to the silty-sandy facies of the north part of the lagoon.

3.2. Currents

Figure 3 presents the surface and bottom currents in summer obtained as averaged over June, July and August and based on model simulations. Moreover, according to our previous work (Béjaoui et al., 2008; Béjaoui, 2009), the water circulation pattern in summer and winter were similar, with high intensity in winter upon wind forcing. We note that the prevailing wind during the summer was from a north-western sector, which justifies the similar current structures for both summer and winter (National Institute of Meteorology, Tunisia). Model simulations showed that the strongest currents were located on the northern, southern and western edges of the lagoon and in the inlet, were they are tide-induced. The current intensity reached almost 1 m s^{-1} under the bridge of Bizerte (INSTM, 2000). In the inner part of the lagoon the currents declined considerably, particularly in the eastern and central sectors as the circulation became essentially influenced by wind.

According to model simulations (Harzallah, 2003; Béjaoui et al., 2008; Béjaoui, 2009) and our current measurements, the water circulation pattern in Bizerte Lagoon can be described as follows: surface waters subjected to wind shear in the north-western sector, which is the prevalent situation in the Bizerte region, moving towards the south-eastern sector; reaching the eastern sector where water mass drops to the bottom and the flow direction was reversed to the north-west through the lagoon centre, eventually leaving the lagoon (Fig. 4b, Fig. 5). Model simulation analysis has shown that current intensity through the inlet and western sector of the lagoon was greater than within the inlet and towards the lagoon's centre and the eastern sectors where water dynamics were relatively low. Hence, the renewal of waters in these latter areas was greater than in the former sectors, which confirms our lagoon subdivision into MZ and IZ zones.

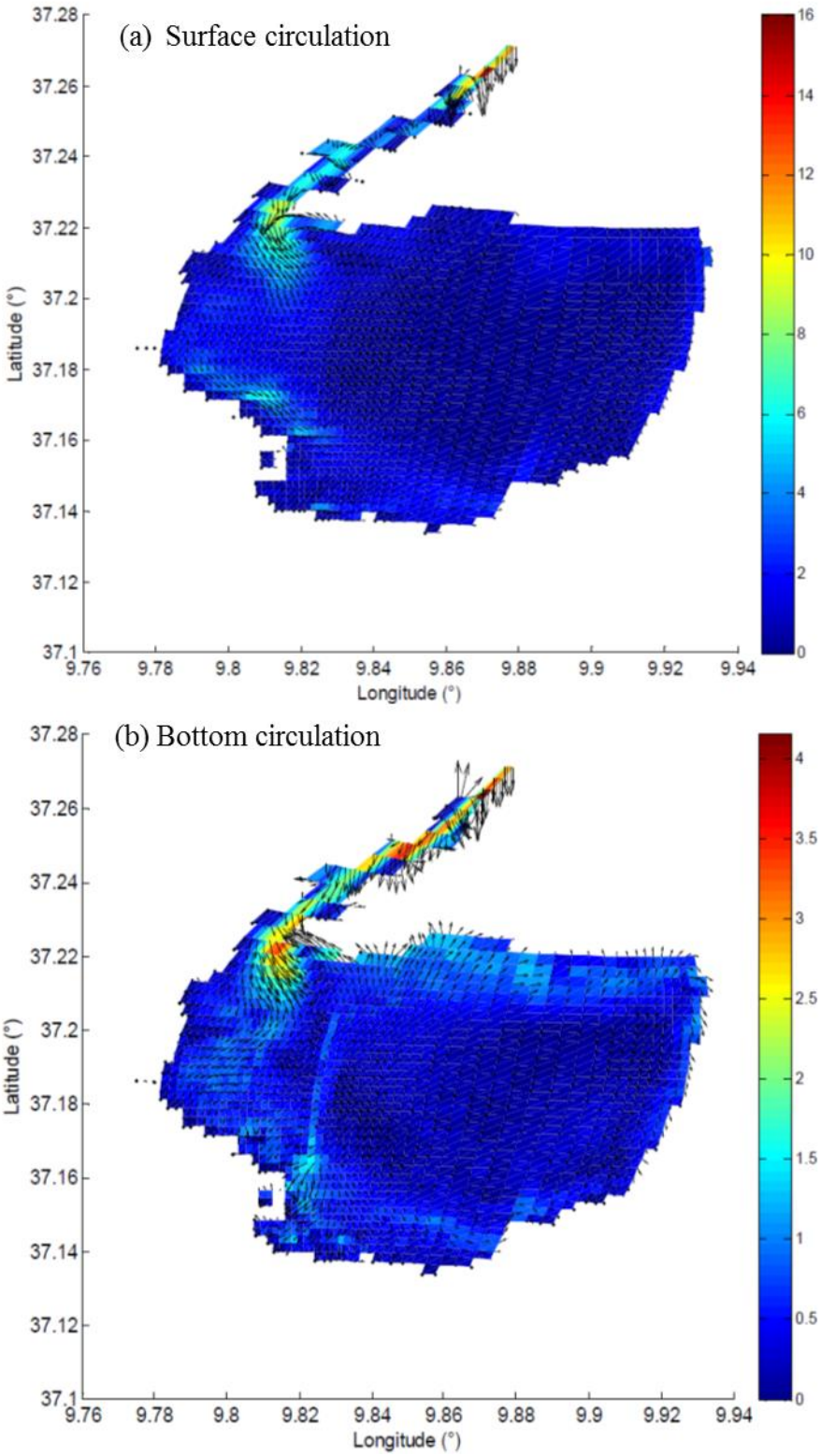


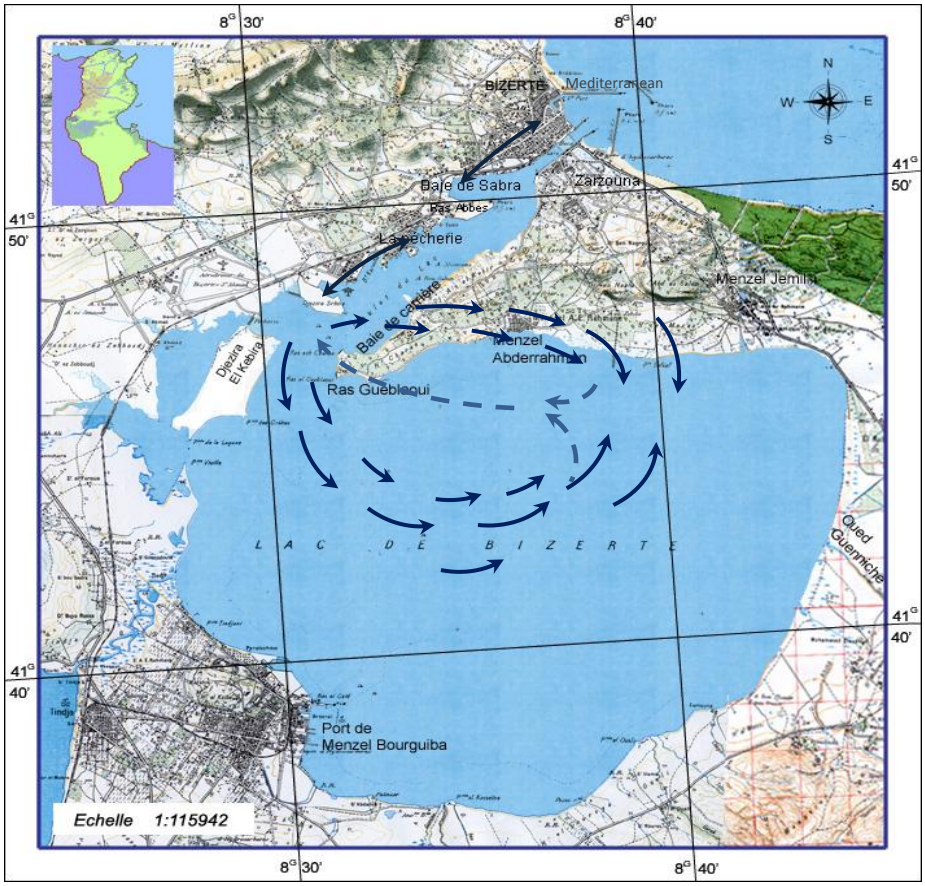
Fig.4. Summer circulation of waters (direction and intensity) in Bizerte lagoon. (The size of the arrows express the current speed (m s^{-1}))

3.3. Chlorophyll *a* concentrations

Chlorophyll *a* concentration ranged from 0.66 at station 65 to 5.98 mg m^{-3} at station 14 and varied significantly according to station (ANOVA, F = 8.7419, p = 0.003) (Fig. 6a) and zone (ANOVA, F = 6.22, p = 0.01) (Fig. 6b). These concentrations were more enhanced in the maritime zone (mean ± s.d = 2.7 ± 0.75 mg m^{-3}) than in the inner part of the lagoon (mean ± s.d = 2.29 ± 0.94 mg m^{-3}).

3.4. Cyst composition

At least 48 morphotypes were identified in the surface sediment of Bizerte Lagoon spread over 4 orders namely Gonyaulacales (20 species), Peridiniales (20 species), Gymnodiniales (3 species) and Thoracosphaerales (5 species). The highest cyst density (20126 cysts g^{-1} DS) was recorded at station 84, the lowest (1276 cysts g^{-1} DS) at station 5 opposite of the Bizerte cement factory. Six morphotypes related to potentially noxious/toxic species were detected in surface sediment, namely *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella complex*, *Alexandrium pseudogonyaulax*, *Polysphaeridium zoharyi*, *Lingulodinium polyedrum* and *Operculodinum centrocarpum* (Table 3). The cyst assemblage was largely dominated by *Brigantidinium simplex* (43.24 %), round brown cysts (RBC) (21.46 %), *Votadinum spinosum* (9.34 %), *A. pseudogonyaulax* (7.07 %), spiny round brown cysts (SRBC)(4.46 %), *A. catenella* (3.06 %), and *Lingulodinum machaerophorum* (1.29 %). Mean cyst species richness was 9 ± 3 varying from 3 morphotypes at station 5 to 18 at station 55. Cyst diversity estimated by the Shannon weaver diversity index varied from 0.48 to 2.47 bits $cell^{-1}$ (mean ± s.d = 1.69 ± 0.36 bits $cell^{-1}$). Neither species richness nor Shannon index differed significantly between sampling sites and zones. The higher and the lower diversity were detected in the inner parts of the lagoon at stations 67 and 82 respectively.



→ : Surface circulation - → : Reverse current

Fig.5. Water circulation in the Bizerte lagoon deduced from observations and numerical simulations (Harzallah, 2003; Béjaoui, 2009).

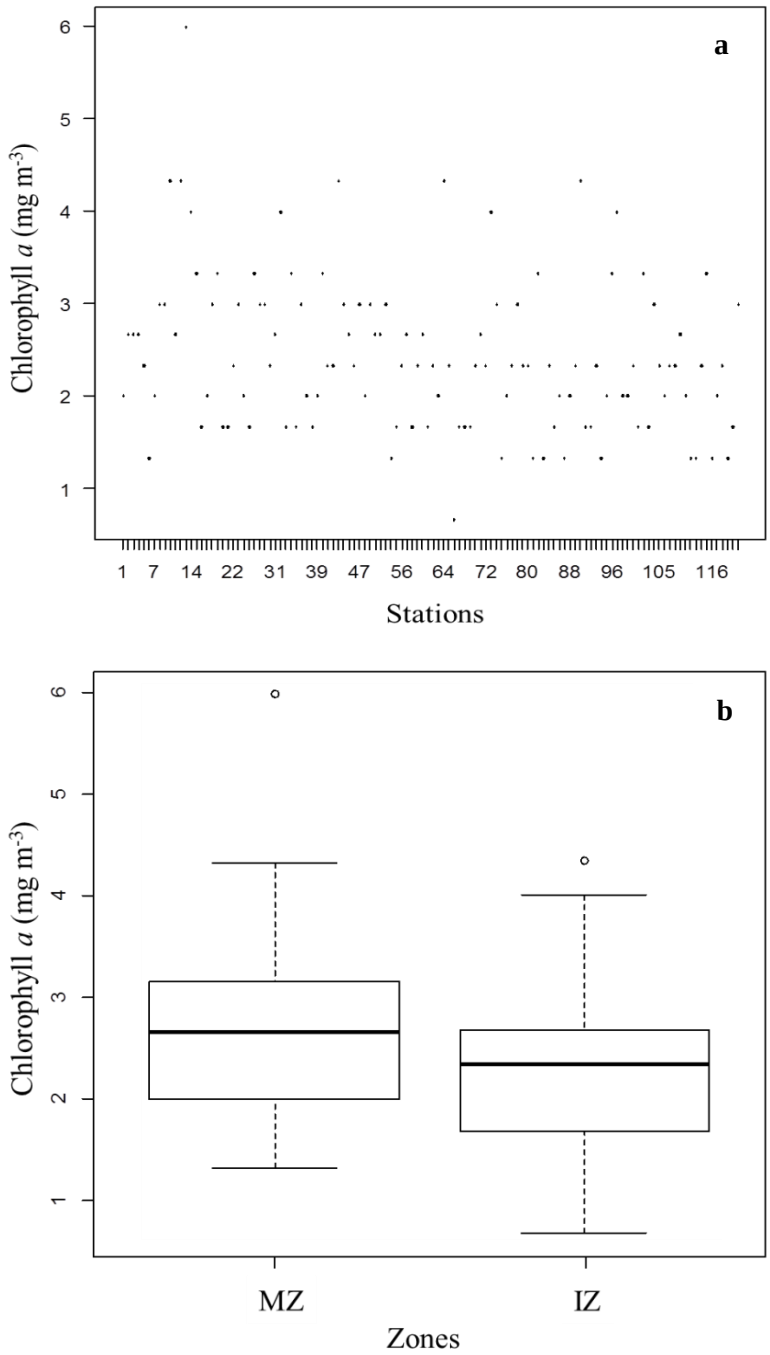


Fig.6. Boxplots depicting the spatial variations ofChlorophyll-*a* concentrations among stations and zones in Bizerte lagoon (MZ: Maritime Zone; IZ: Inner Zone).

3.5. Description and abundance of dominant species

3.5.1. Brigantedinium simplex (cyst of Protoperidinium conicoides)

These cysts are brown, spherical in shape, 44-48 µm in diameter, often dorsoventrally depressed and with a smooth surface (Plate 1).They successfully germinate into vegetative cells of *P. conicoides* (Plate 2) and are widespread in the lagoon's sediments.The highest density was observed at station 84 with 18145.17 cysts g^{-1} DS. *B. simplex* densities were substantial (3.88 10^3- 4.02 cysts g^{-1} DS) in the north-eastern part of the lagoon and were absent from 14 stations (Fig. 6a).

3.5.2. Round brown cysts (RBC)

RBC comprised a very diverse group of Peridiniales which included many morphotypes and was only absent from 8 stations. We distinguished between germinated cysts of *Diplopsalis lenticulata* and vegetative cells in water samples (Plate 1). The highest density of RBC was detected at station 116 with 5.49 10^3 cysts g^{-1} DS (Fig. 6b).

3.5.3.Votadinium spinosum (cyst of Protoperidinium claudicans)

Cysts were brownish, heart-shaped, 48-52 µm in length and spiny, dorsoventrally depressed and included numerous lipid granules. The archeopyle, when visible was subapical in position and truncated the apex (Plate 1). The highest density of *V. spinosum* was found at station 116 with 2.29 10^3 cysts g^{-1} DS (Fig. 6c). Cysts did not germinate into vegetative stages.

3.5.4.Alexandrium catenella complex

The "*Alexandrium tamarense*" complex consisted of cysts of *Alexandrium acatenella,Alexandrium catenella*, *Alexandrium fundyense* and *Alexandrium tamarense*. Cysts were ellipsoidal, 43-56 µm in length and 32-42 µm in width. The wall was transparent, thick, covered with a mucoid layer that includes lipid granules and red body (Plate 1).Cysts were present in 90 sediment samples. The highest cyst abundance was recorded at station 66 with 375 cysts g^{-1} DS (Fig. 6d).During incubation, a major portion of isolated cysts successfully germinated into vegetative cells typical of *A. catenella*.

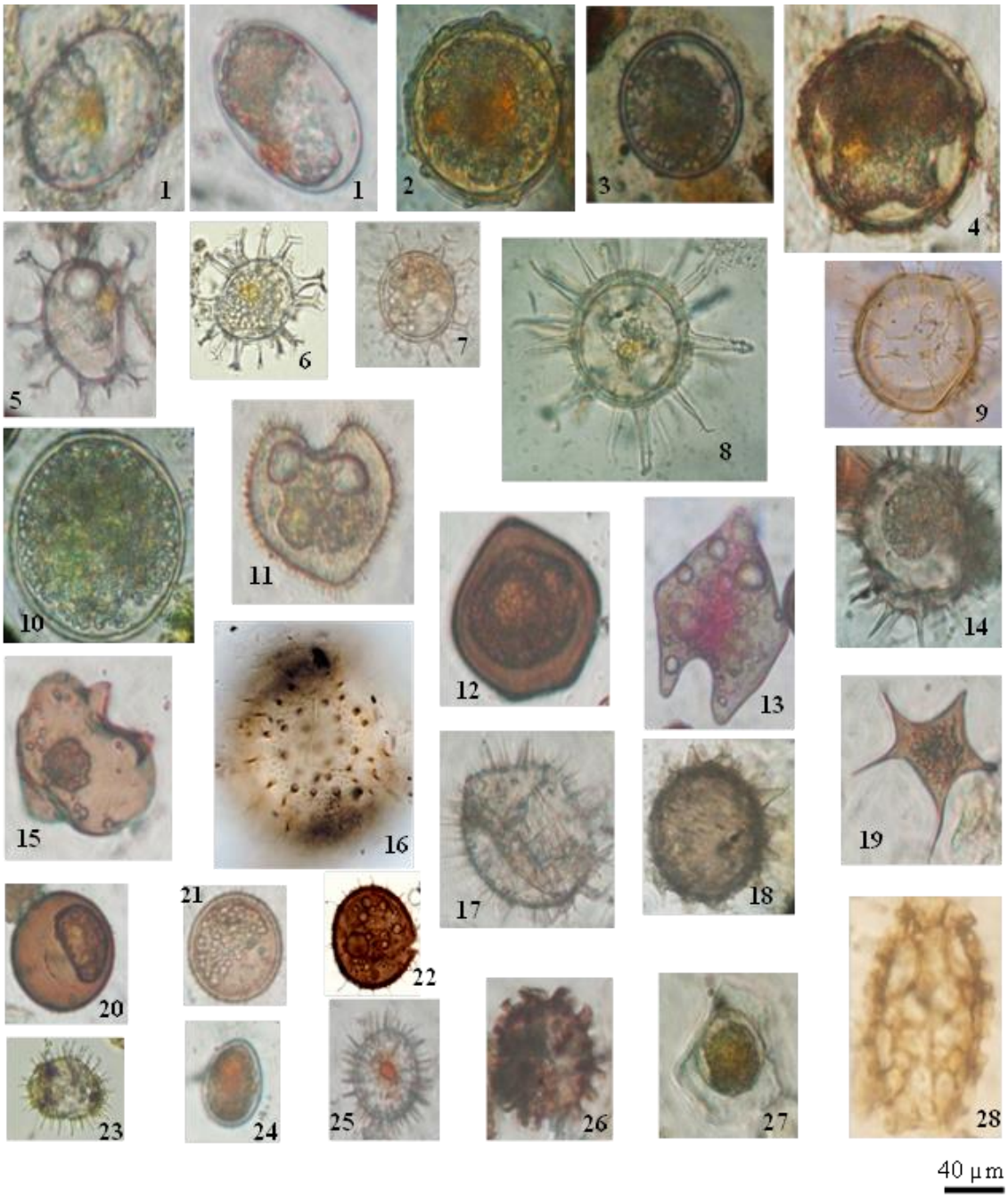


Plate 1. Dinoflagellate cysts isolated from recent sediments in Bizerte lagoon. **1.** Cyst of *Alexandrium catenella* complex; **2.** Cyst of *Alexandrium pseudogonyaulax;* **3.** Cyst of *Alexandrium affine;* **4.** *Impagidinium* sp.*;* **5.** *Spiniferite Lazus;* **6.** *Spiniferite bulloideus;* **7.** *Spiniferite delicates;* **8.** *Lingulodinium machaerophorum;* **9.** *Polysphaeridium zoharyi;* **10.** *Brigantidinium simplex;* **11.** *Votadinium spinosum;* **12.** *Votadinium clavum;* **13.** Cyst of *Protoperidinium steidingerae;* **14.** Cyst of *Protoperidinium nudum;* **15.** *Quinquecuspis concreta;* **16.** *Islandinium miniutum;* **17.** *Selenopomphix quanta;* **18.** *Archeoperidinum minutum;* **19.** *Stellatodinum stellatum;* **20.** Cyst of *Diplopsalis lenticulata;* **21.** SRBC **22.** SRBC; **23.** *Scrippsiella ramoni;* **24.** *Scrippsiella trocoidea* complex; **25.** *Scripssiella precariat;* **26.** Cyst of *Gyrodinium resplendens;* **27.** Cyst of *Gymnodinium impudicum;* **28.** Cyst of *Polykrikos kofoidii.*

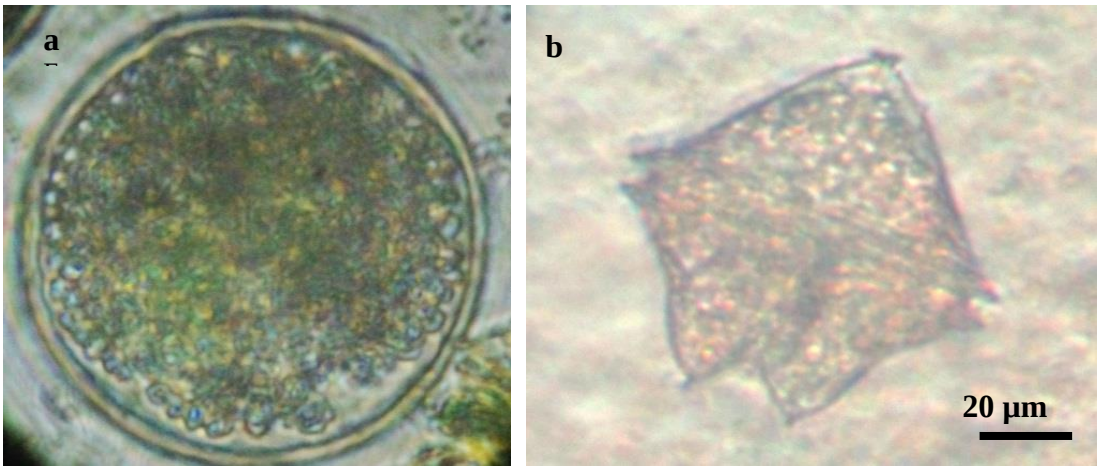


Plate 2."*Brigantidinium simplex"* cyst (**a**) and its vegetative cell "*Protoperidinium conicoides*" (**b**) after germination test.

3.5.5. Alexandrium pseudogonyaulax

These were spherical with a diameter of 48-50 µm and full of lipid granules. A red body with small crests was always present. Germination experiments confirmed the theca name *A. pseudogonyaulax* (Plate 1) .*A. pseudogonyaulax* cysts were observed at 66 stations and their abundance ranged from 2.22 10^{3} cysts g^{-1} DS (at station 116) to one cysts g^{-1} DS (at station 8) (Fig. 6e).

3.5.6. Lingulodinum machaerophorum

Lingulodinium cysts were spherical, striated at the base and with grana on the distal ends. Most showed fully developed processes (Plate 1). Absent at 43 stations, their densities reached a maximum of 82 cysts g^{-1} DS at station 25 (Fig. 6f).

3.5.7. Spiny Round Brown Cysts (SRBC)

To identify this group, only the cyst wall ornamentation and the process type were considered as determining features since the archeaopyle style is not well known for several species and rarely observed (Plate 1). The SRBC included several taxa: *Protoperidinum* spp., *Archeoperidinium* spp., *Echnidinium* spp., *Islandinium* spp., *Votadinium* spp., *Quinquecuspis* spp., and *Selenopemphix* spp. (Table 3). Absent from 31 stations, their highest density was detected at station 84 with 313 cysts g^{-1} DS (Fig. 7g).

Table 3. Taxonomic citation, biological names and harmful effects of dinoflagellate cysts identified in the present study (A = abundant, > 10 %; C = common, 1-10 %; R = rare, 0.1-1 %; X = present occasionally; < 0.1 %).

Order	Paleontological names	Biological names	Toxicity	Abundance (%)
Gonyaulacales	Cysts of *Alexandrium catenella* complex(Bravo et al., 2006)	*Alexandrium catenella* complex	Paralytic shellfish poisoning	3.06
	Cysts of *Alexandrium affine* (Hallegraeff and Bolch, 1991)	*Alexandrium affine*		1.28
	Cysts of *Alexandrium minutum* (Bravo et al., 2006)	*Alexandrium minutum*	Paralytic shellfish poisoning	0.01
	Cysts of *Alexandrium pseudogonyaulax* (Bravo et al., 2006)	*Alexandrium pseudogonyaulax*	High biomass proliferation	7.07
	Polysphaeridium zoharyi (Rossignol, 1964)	*Pyrodinium bahamense*	Paralytic shellfish poisoning	0.005
	Achomosphaera callosa (Matsuoka, 1983)	*Gonyaulax* sp.		0.003
	Cysts of *Gonyaulax baltica* (Ellegaard et al., 2002)	*Gonyaulax baltica*		0.03
	Impagidinium sphaericum (Wall, 1967)	*Gonyaulax* sp.		0.004
	Impagidinium sp.	*Gonyaulax* sp.		4.65
	Spiniferites belerius (Reid, 1974)	*Gonyaulax scrippsae*		0.02
	Spiniferites bentorii (Rossignol, 1964) Wall and Dale, 1970	*Gonyaulax* sp.		0.03
	Spiniferites bulloideus (Reid, 1974)	*Gonyaulax baltica*		0.27
	Spiniferites delicatus (Reid,1974)	*Gonyaulax* sp.		0.33
	Spiniferites lazus (Rochon et al., 1999)	*Gonyaulax* sp.		0.39
	Spiniferites membranaceus (Rossignol, 1964)	*Gonyaulax membranacea*		0.003
	Spiniferites mirabilis	*Gonyaulax spinifera* complex		0.18
	Spiniferites ramosus (Ehrenberg, 1838) Mantell, 1854	*Gonyaulax spinifera* complex		0.16
	Spiniferites spp.	*Gonyaulax* spp.		0.21
	Lingulodinium machaerophorum (Mertens et al., 2009)	*Lingulodinium polyedrum*	Yessotoxin producer	1.29
Peridiniales	*Operculodinum centrocarpum* (Wall and Dale, 1966)	*Protoceratium reticulatum*	Yessotoxin producer	0.005
	Echinidinium delicatum (Radi et al., 2007)	unknown		0.007
	Echnidinum granulatum (Radi et al., 2012)	unknown		0.006
	Archeoperidinum minutum (Wall and Dale, 1968)	unknown		0.12
	Islandinium minutum (Head et al., 2001)	*Protoperidnium* sp.		0.01
	Quinquecuspis concreta (Price and Pospelova , 2011)	*Protoperidinium leonis*		0.03
	Selenopemphix quanta (Bradford, 1975) Matsuoka, 1985	*Protoperidinium conicum*		0.001

Order	Paleontological names	Biological names	Toxicity	Abundance (%)
Peridiniales	*Echnidinum transparantum* (Zomneveld, 1997)	unknown		0.03
	Echinidinium sleipnerensis (Head and Riding, 2004)	unknown		0.003
	Echnidinium spp.	unknown		0.008
	Votadinum clavum (Reid, 1977)	*Protoperidinium oblongum*		0.65
	Votadinium spinosum	*Protoperidinium claudicans*		9.34
	Peridinium ponticum (Wall et al., 1973)	*Peridinium ponticum*		0.003
	Cysts of *Protoperidinium steidingerae* (Gribble et al., 2009)	*Protoperidinium*		0.41
	Brigantidinium simplex (Wall 1965 Lentin and Williams 1993)	*Protoperidinium conicoides*		43.24
	Stellatodinum quanta (Bradford, 1975; Matsuoka, 1985	*Protoperidinium compressum*		0.01
	Stellatodinum stellatum (Harland, 1977)	*Protoperidinium stellatum*		0.05
	Cysts of *Protoperidinium nudum* (Meunier, 1919)	*Protoperidinium nudum*		3.59
	Cysts of *Diplopsalis lenticulata* Wall and Dale (1968)	*Diplopsalis lenticulata*		21.46
Gymnodiniales	Cysts of *Gyrodinium resplendens* (Hulburt, 1957)	*Gyrodinium resplendens*		0.2
	Cysts of *Polykrikos kofoidii* (Matsuoka et al., 2009)	*Polykrikos kofoidii*		0.01
	Cysts of *Polykrikos hartmannii* (Matsuoka, 1990)	*Polykrikos hartmannii*		0.1
Thoracosphae-rales	Cysts of *Scrippssiella* sp.	*Scrippssiella* sp.		0.79
	Cysts of *Scrippsiella trochoidea* complex	*Scrippsiella trochoidea*		0.33
	Cysts of *Scrippsiella precaria* (Montresor and Zingone, 1988)	*Scrippsiella precaria*		0.12
	Cysts of *Scrippsiella ramonii* (Montresor, 1995)	*Scrippsiella ramonii*		0.48
	Cysts of *Scrippsiella trifida* (Head, 1996)	*Scrippsiella trifida*		0.008

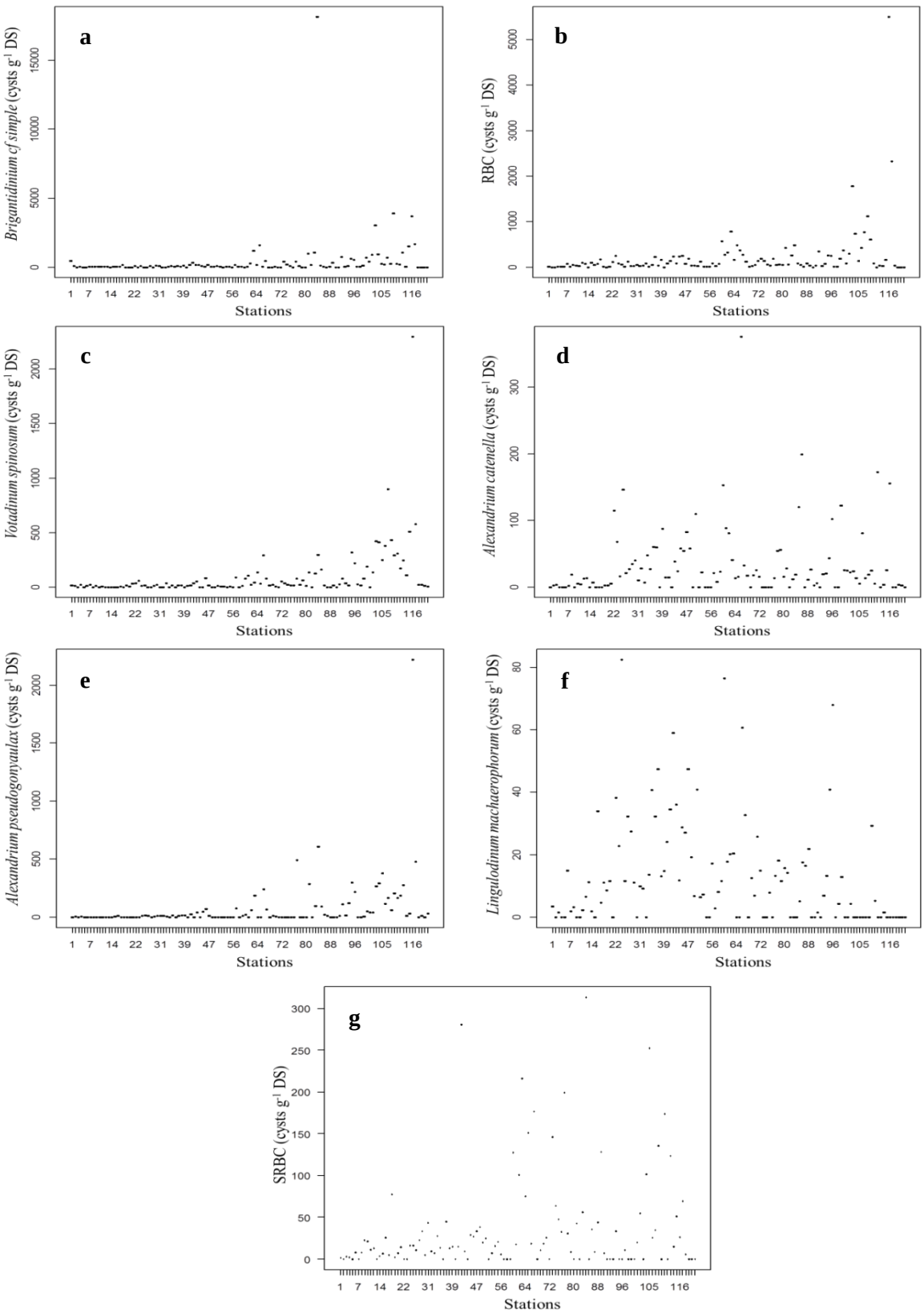


Fig.7. Boxplots depicting the spatial variations of cyst dominant morphotypes in Bizerte Lagoon.

3.6. Dynamics of dominant cysts

No significant difference in cyst abundance was found among sampling sites (RDA, F = 0.27, p = 0; Fig. 8), though a significant change was seen according to sampling zone (RDA, F = 4.49, p < 0.001; Fig. 9). The inner parts of the lagoon (IZ) had a positive RDA axis 1 score indicative of a close relationship with *V. spinosum*, *B. simplex* and *A. pseudogonyaulax*. In contrast, the Maritime zone (MZ) had a negative RDA axis 1 score and was thus associated with SRBC, RBC, *L. machaerophorum* and *A. catenella* development.

The only environmental variables governing cyst distribution were temperature (RDA, F = 6.84, p < 0.001), % H_2O (RDA, F = 3.51, p = 0.003) and chlorophyll *a* (RDA, F = 2.85, p = 0.01) (Fig. 10). No significant correlation was found between cysts and remaining abiotic factors. Only the RDA axis 1 supported a significant effect on cyst variability (p < 0.05) (Fig. 10). Along the RDA axis 1, SRBC, RBC, *A. catenella* and *L. machaerophorum* had negative scores and were thus associated with high % H_2O and low temperature values. *B. simplex* had a positive RDA axis 1 and a negative RDA axis 2, indicative of a close relationship with high temperature and low % H_2O values.Along RDA axis 1, *V. spinosum* and *A. pseudogonyaulax* stood out with positive scores and were thus associated with high temperature and low chlorophyll *a* values.

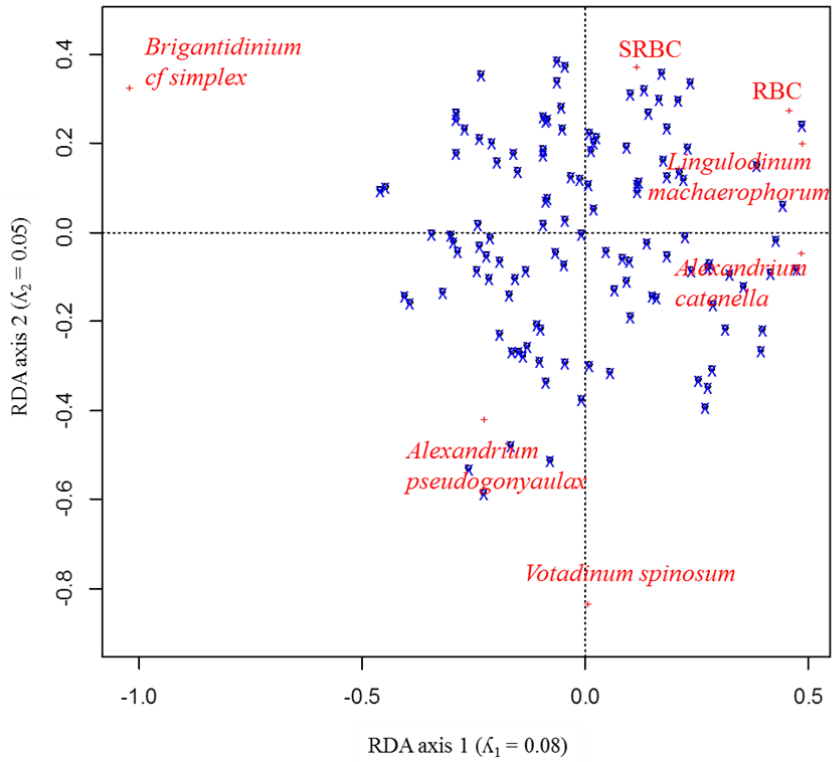


Fig.8. RDA TriPlot depicting the association between cyst dominant morphotype and sampling sites in Bizerte Lagoon. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2. (Blue crosses refer to sampling sites).

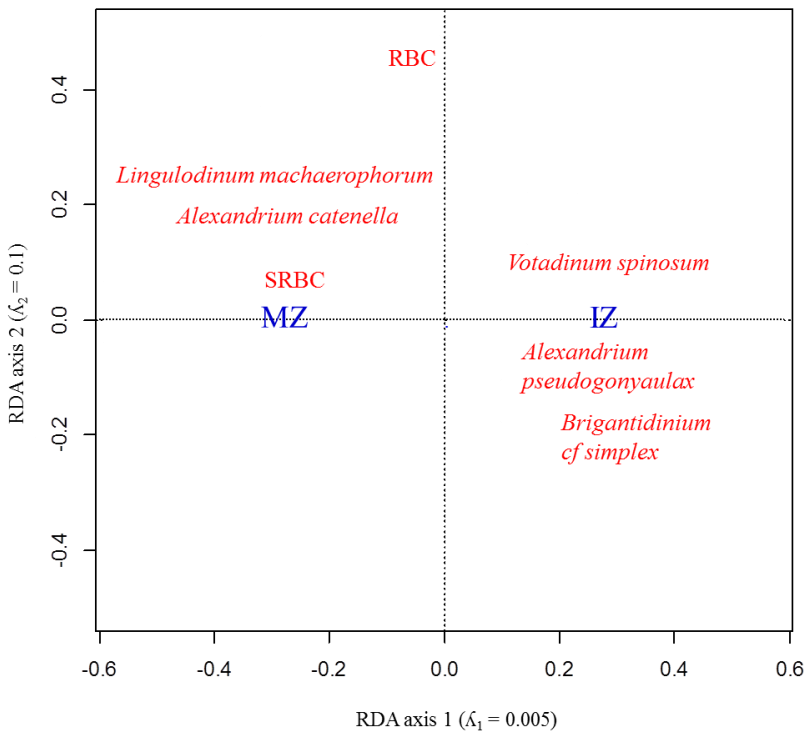


Fig.9. RDA TriPlot depicting the association between cyst dominant morphotype and sampling zones in Bizerte Lagoon. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2. (MZ: Maritime Zone; IZ: Inner Zone).

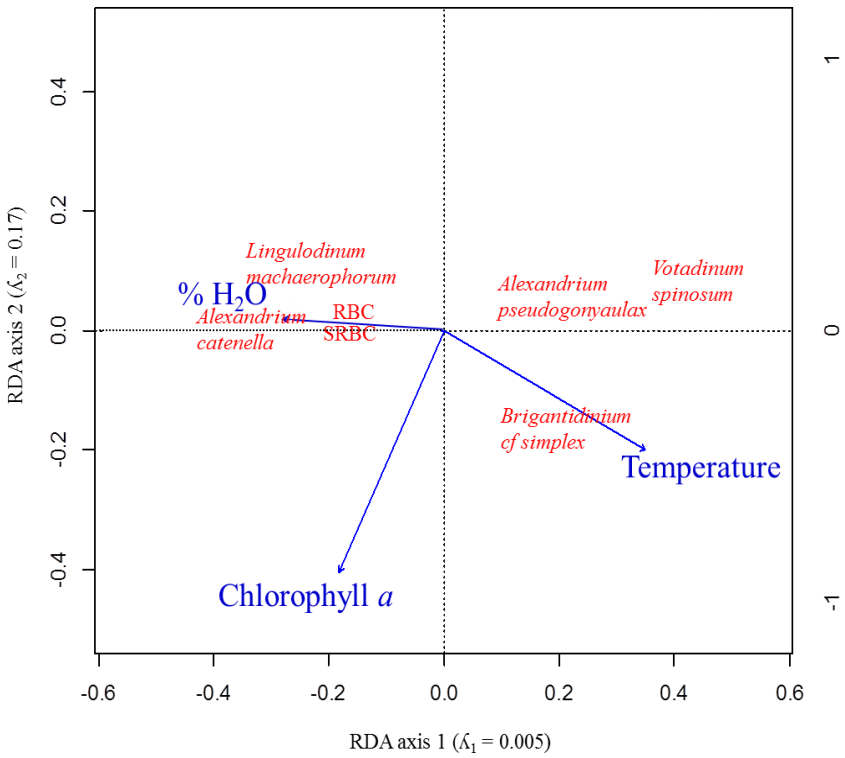


Fig.10. RDA TriPlot depicting the association between cyst dominant morphotype and environmental factors in Bizerte Lagoon. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2.

4. Discussion

Results of the present study reveal the richness of the cyst bank of the Bizerte Lagoon. Dinocyst abundance in surface sediments reached more than 2 10^4 cysts g^{-1} DS and was of the same order of magnitude as in other Mediterranean areas (Giannakourou et al., 2005; Elshanawany et al., 2010; Satta et al., 2010) and temperate zones (Pospelova et al., 2005, 2008; Radi et al., 2007; Harland et al., 2006), but higher than in tropical zones (Lirdwitayaprasit 1998; Azanza et al., 2004; Kawamura 2004; Narale et al., 2013). Indeed, the tropics have high temperature and seawaters less dense and nutrient-poor (Parsons and Harrison, 1983) which can therefore harbour the greatest diversity of dinoflagellates (Taylor, 1987), most of which being non-cyst formers. The high abundance of dinocysts recorded in Bizerte Lagoon may result from the high dinoflagellate proliferation always detected in the surface waters (Turki, 2004; Smida et al., 2012), with diatoms that proliferate in summer providing optimal food for heterotrophic dinoflagellates (Sahraoui et al., 2009; Turki et al., 2014). The number of species observed in the present survey was high (48) and can be explained by the high spatial resolution of our sampling (123 sations), with, generally, 3-18 cyst types being observed in each sediment sample.

Among the dinocysts, the Peridinioides, namely the genera *Brigantedinium, Quinquecuspis, Selenopemphix, Stelladinium, Islandinium* and *Votadinium* (53.75 %) and the gonyaulacoids, namely *Alexandrium, Lingulodinium, Operculodinium, Achomosphaera, Impagidinium* and *Spiniferites* (18.97 %) were the most abundant. Dominance by these groups was usually been recorded in eutrophic waters as reported in many studies (Matsuoka et *al*.,1999; Matsuoka et al. 2003; Pospelova and Head, 2002; Wang et al., 2004). *B. simplex* cysts were the most prevalent and most widely distributed morphotype in the lagoon. They comprised 43.24 % of the total population, suggesting a steady arrival into the study area. High concentrations of *Brigantedinium* spp. were traditionally related to eutrophic conditions and variations in its relative and absolute abundance were often used to reconstruct past primary productivity, changes and the trophic state of upper waters (Marret and Zonneveld, 2003; Reichart and Brinkhuis, 2003; Radi et al., 2007; Dale, 2008). *L. machaerophorum*, the seventh most abundant morphotype in this study, is also often used as a proxy for eutrophication (Dale et al. 1999; Harland et al. 2004). The use of dinocysts as indicators of eutrophication has been well documented (Dale et al. 1999; Matsuoka et *al*.,1999; Matsuoka et al. 2003; Pospelova and Head, 2002; 2005). Many cysts of SRBC and RBC groups recorded in this study contained unknown motile cells (Table 3). Represented only by resting stages, their vegetative stages was not previously observed in plankton, which confirms the importance of undertaking research on cyst

banks. Use of the Ludox technique and no acid treatment for cyst identification, allowed us to observe the presence of many morphotypes belonging to the calcareous group, namely *Scrippssiella* sp., *Scrippsiella trochoidea* complex, *Scrippsiella precaria, Scrippsiella ramonii* and *Scrippsiella trifida*.

Of the harmful species detected in Bizerte Lagoon, the genus *Alexandrium* was the most represented (4 species) (Table 3). In surface sediment *A. catenella* complex and *A. pseudogonyaulax* were the most abundant morphotype (10.13 %). In the water column, *Alexandirum* spp. was the most abundant and most well-established species and apparently the causative organism of PSP (Turki, 2004; Smida et al., 2012). This genus is widespread in the Mediterranean Sea (Penna et al., 2008; Abdennadher et al., 2012), and is considered as the most important PSP toxin-producing dinoflagellate (Taylor et al., 1995). Among other potentially harmful species cysts found, *L. machaerophorum* (1.28 %), *O. centrocarpum* (0.005 %) and *P. zoharyi* (0.005 %)were present in surface sediment. The first two cysts are common in the Mediterranean sediments (Montresor et al., 1998; Rubino et al., 2010; Giannakourou et al., 2005; Elshanawany et al., 2010; Satta et al., 2010) and are known to cause toxic blooms, mainly in the northern Adriatic Sea (Pistocchi et al., 2012). *P. zoharyi* is typical of tropical and subtropical environments (Marret and Zonneveld, 2003; Limoges et al., 2013) with few reports on its presence in coastal sediments from the eastern Mediterranean basin (Guinta et al., 2006; Sangiorgi et al., 2006; Kholeif et al., 2010). Motile affinity of *P. zoharyi*, *Pyrodinium bahamense* is an important cause of seafood toxicity in the Southeast Asian region and consideredmore harmful than any other Paralytic Shellfish toxin producer (Usup et al., 2012). We convined that this non-indigenous cyst was brought to the lagoon via ship ballast. Will this tropical cyst one day encounter favourable conditions, i.e. a sufficiently high temperature, less dense and nutrient-poor waters characteristic of tropical zones enabling it to flourish and succeed the existing cysts?

The monitoring programme in the Bizerte Lagoon already tracks the abundance of *Alexandrium* spp. in the water column (Turki, 2004; Turki et al., 2014), but up to now, there is no reports are available on the occurrence of *Lingulodinium polyedrum*, *Protoceratium reticulatum* and *P. bahamense*. Our results indicate the presence of these cysts in the study area which, again, highlights the importance of undertaking research on cyst distribution.

The spatial distribution of dinocyst abundance in the studied area was uneven. In the MZ (stations 1 to 40), the concentration of dinocysts varied from 12 to 562 cysts g^{-1} DS (211cysts g^{-1} DS on average) while in the IZ (stations 41-123) it ranged from 18 to 2.01 10^4 cysts g^{-1} DS (1.39 10^3 cysts g^{-1} DS on average). This spatial distribution of cysts shows a tendency towards decreasing abundance, from the inner (IZ) to the outer (MZ) lagoon. The IZ area thus appears to provide more suitable conditions for dinocyst retention and deposition. Results of redundancy analysis confirm this zonation and even grouped a set of species for each area. The first group consisted of *V. spinosum*, *B. simplex* and *A. pseudogonyaulax* cysts which were abundant in the IZ. The second group involves SRBC, RBC, *L. machaerophorum* and *A. catenella* cysts in the MZ area. The two distinct associations of dinocysts can probably be explained:

- Firstly, by the different affinity of cysts to the environmental factors of the site. Indeed, *V. spinosum*, *B. simplex* and *A. pseudogonyaulax* seem to correlate with high temperature whereas SRBC, RBC, *L. machaerophorum* and *A. catenella* cysts were associated with low temperature and high % H_2O values. *V. spinosum* and *A. pseudogonyaulax* appear related to low chlorophyll *a* concentrations. Marret and Zonneveld (2003) have identified sea surface temperature along with phosphate and nitrate concentrations as the most important environmental variables that can be associated with the distribution patterns observed in 835 samples from 11 regions of the world. Indeed, according to Marret and Zonneveld (2003), some cysts have the highest abundance in cold regions and it is the case of cysts *L. machaerophorum* and *A. catenella*. Some other cysts are restricted to 'warmer' environments like cysts *V. spinosum*,*B. simplex* and *A. pseudogonyaulax*. Despite the short period of sampling in our study, the significant difference of surface temperature between stations and zones seemed to contribute to cysts distribution. The absence of correlation between any of the studied species and nutrients may be explained by the absence of significant variations in nutrient concentration, whatever stations or zones, likely due to the very small floods that may supply nutrients to the lagoon during the summer dry season.

The correlation of some morphotypes with high or low % H_2O may be ascribed to the different nature of sediments in the study area. Indeed, muddy sediment was characterised by a high percentage of water which is favourable to the majority of cysts (Dale, 1983; Marcus, 1989) and this is the case of SRBC, *L. machaerophorum* and *A. catenella* cysts which were concentrated in the muddy areas of the lagoon. In contrast, sandy sediment had a low % H_2O which is favourable to *Brigantidinium* taxa (Kawamura, 2004).

The correlation of the cysts, formed by phototrophic species, with low chlorophyll *a* concentrations was normal (Holzwarth et al., 2007) and may explain our results for the autotrophic *A. pseudogonyaulax,* but not for the heterotrophic *V. spinosum.* The encystement of the former in connection with low chlorophyll *a* may be ascribed to food availability for the motile cells "*P. claudicans*" known for their preference for diatom prey (Naustvoll, 2000; Kjaeret et al., 2000).

- A second explanation for the two distinct associations of dinocysts may come via the hydrodynamic characteristics of the both areas. In the confined bay, water currents can control the horizontal distribution and abundance of cyst (Matsuoka and Fukuyo, 1995; Joyce et al., 2005). Previous studies have clearly demonstrated that an umbilical zone has been formed in IZ area which is likely an area favorable for deposition of suspended matters (Frisoni, 1986; Ben Garali, 2008). Indeed, current measurements from this study indicate that the MZ area was characterized by fast moving waters which diminish the potential of the cyst deposition. Cysts are thus moved passively to reach the IZ area where water movement is slow and they could sink to the sediment as reported elsewhere (Matsuoka and Fukuyo, 1995). The current in central and eastern sectors being slower than on the western side of the lagoon, dinocysts can accumulate in the IZ area and exhibit a high abundance in this region. The influence of current pattern was clear in case of SRBC and *A. catenella* cysts which, according to RDA analysis, were found close to the MZ area but were abundant in the IZ at some adjacent MZ stations (Fig. 8). It is noteworthy that *A. catenella* blooms have frequently been recorded at shellfish farms in the Bizerte Lagoon (Smida et al., 2012; Turki et al., 2014), which could be the source of the cysts supply into this area through water currents.

The presence of both SRBC and *A. catenella* cysts at MZ (75.6 % and 65.9 % respectively) and especially at the channel stations (from station 1 to station 10) may be indicative of the external origin of these species which could arrive with maritime traffic via ballast water. Ballast water discharges have historically been a major means of introducing non-indigenous species into marine, estuarine and freshwater ecosystems (Hallegraeff and Bolch, 1991; Ruiz et al., 2000; Cordell et al., 2008; Molnar et al., 2008; Dibacco et al., 2011).

The highest *L. machaerophorum* concentration was recorded in the vicinity of stations near the Tinja River mouth (82cysts g^{-1} DS at station 25), which may also suggest the non-indigenous origin of such a cyst. Indeed, *L. machaerophorum* is often observed in high and sometimes

overwhelming concentrations in regions influenced by fluvial inputs (Lewis and Hallett, 1997; Dale et al., 1999; de Vernal et al., 2001; Dale et al., 2002; Pospelova et al., 2004; Wang et al., 2004; Giannakourou et al., 2005; Pospelova et al., 2005). Therefore, from a strictly palaeoceanographic point of view, *L. machaerophorum* may be a useful key species in reconstructing past variations in river outflow (Zonneveld et al., 2009), like the one of the Tinja River the MZ of this study.

Most of the RBC cysts showed a random distribution in the Bizerte Lagoon; they were found at most of the sampled stations (>90 %) and seemed typical of the study area.

Bloom scenario for the dominant dinoflagellates at the Bizerte Lagoon

On the basis of the current modelling and the cyst distribution pattern observed in this study, a schematic synthetic scenario of bloom development from resting cysts in the Bizerte Lagoon can be proposed (Fig. 11). (1) Strong north-west winds blow over the lagoon, resulting in surface and bottom currents. (2) Currents provoke turbulent re-suspension of dinocysts from maritime zone sediment and transfer them to the lagoon inner parts. Dominant cyst morphotypes from the, *A. catenella*, *P. zoharyi* and SRBC cysts may have originated from theballast water discharges while high abundance of *L. machaerophorum* could originate from the Tinja River. The majority of cysts settled in the IZ where the current intensity was low. The presence of some cysts in the MZ, though typically found in the IZ zone, may be ascribed to the weak reserve current. (3) Under non-optimal growth conditions, cells proliferate slowly near the sediment surface and form bottom cell clusters awaiting conditions more favourable for development. In the present study, the encystment depended on a different range of temperature and chlorophyll *a* in the water column suggesting opposite conditions favourable to excystment. (4) As hydrological conditions become optimal for growth, upward migration and rapid cell proliferation lead to a bloom formation. For the toxic dinoflagellate "*A. catenella*", this scenario more likely develops at the Bizerte Lagoon in autumn (Smida et al., 2012) and winter (Turki et al., 2014). According to Smida et al. (2012), temperature (16°C), salinity (37.5) and eutrophic conditions (high ammonium concentrations) were the main conditions for bloom development of *Alexandrium* spp. near the shellfish farms of Bizerte Lagoon.

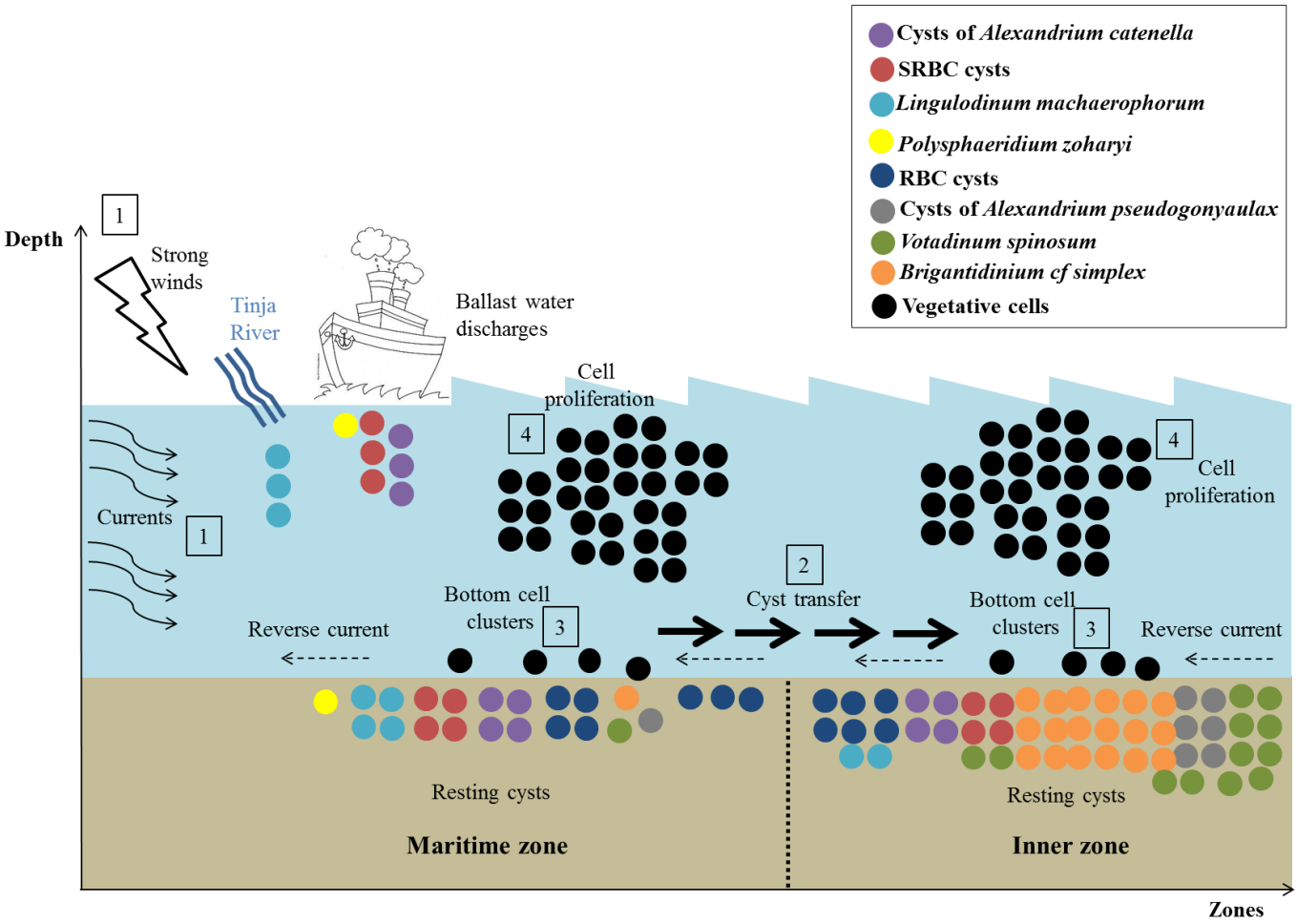


Fig.11. Bloom scenario for the dominant dinoflagellates at the Bizerte Lagoon.

5. Conclusion

This study highlighted the dominance of *B. simplex*, *V. spinosum*, *A. catenella*, *A. pseudogonyaulax* and *L. machaerophorum*, indicative of lagoon eutrophication and detected the cyst seedbed location of the potentially harmful species, therefore the potential areas for bloom initiation. It also highlights the determining role of current action in cyst distribution and the potential role of ballast water discharges as introducers of non-indigenous harmful species like *A. catenella* and *P. zoharyi*.

The discovery of cysts of harmful species stresses the need for continuous monitoring of coastal waters and shellfish areas, looking for potential development at the study site of new toxic threats like Yessotoxin, never reported previously in Bizerte Lagoon. Likewise it is advisable that monitoring programmes should also include cyst community studies, for early warning of

HABs and also as an important precautionary management policy to prevent economic losses on aquaculture farms and harm to human health.

Finally, our findings show the existence of the current high risk generated by ballast water discharge. Ballast water treatment must thus be implemented on all arriving vessels so as to reduce the level of non-indigenous and potentially invasive species in this harbour.

Acknowledgments. This study was conducted by Mouna Fertouna-Belakhal as a part of her PhD research (co-directed at the University of Franche-Comté, CNRS 6249, Besançon, France, at theInstitut Supérieur de Pêche et d'Aquaculture de Bizerte and the Institut National des Sciences et Technologie de la Mer de la Goulette).

Chapitre V

Caractérisation taxonomique et phylogénétique du Dinoflagellé Alexandrium pacificum R.W. Litaker 2014 (Syn. : A. catenella) de la lagune de Bizerte

Chapitre V. Caractérisation taxonomique et phylogénétique duDinoflagellé Alexandrium pacificumR.W. Litaker, 2014 (Syn. : A. catenella)de la lagune de Bizerte

1. Contexte

Les microalgues attribuées au complexe *Alexandrium tamarense* ont été définies par Balech (1985) comme un groupe d'espèces comprenant 3 espèces de dinoflagellés morphologiquement très proches: *A. tamarense, A. catenella* et *A. fundyense*. Ces espèces ont été initialement réparties en différents clades selon leur ribotype associé à leur région océanique d'origine.

A. catenella producteur de toxines paralysantes a donné lieu au premier événement toxique majeur le long de la côte catalane, sur 100 km,en 1998 et 1999 (Vila *et al*., 2001). Cette espèce apparaît dans le port d'Olbia sur la mer Tyrrhénienne durant les étés 1999 à 2002 (Lugliè *et al*., 2003b), dans la lagune de Santa Giusta (Lugliè, communication personnelle), et pour la première fois dans les eaux tunisiennes durant l'été 1997 (Turki *et al*., 2007), et en 2002 dans la baie d'Annaba (Frehi *et al*, 2007). John *et al*. (2003) définissent pour la première fois la phylogénie du clade méditerranéen (ME) à partir de souches d'*A. tamarense* isolées dans le Golfe de Naples en Italie, en Méditerranée alors que Penna *et al*. (2008) ont relevé que des souches appartenant au clade Ouest Européen (WE) en mer Tyrrhénienne en 2002. Finalement, John *et al*. (2014)présentent une révision des clades classés du groupe I au groupe V, en mettant en évidence une sympatrie au sein des groupes basée sur certains emplacement de gènes à savoir, ITS/5.8S et ITS2 ainsi que le gène codant pour la toxine StxA et la phylogénie de l'ADNr.

La présence des kystes de résistance attribués au complexe *A. tamarense* dans le sédiment superficiel de la lagune de Bizerte (voir le chapitre précédent), et compte tenu de son classement (5ème groupe), ayant uneabondance relative de l'ordre de 3.06 %, la caractérisation phylogénétique et l'identification spécifique de ce Dinoflagellé s'avèrent indispensables. En effet, les investigations menées nous ont permis de confirmer la souche en question qui est d'origine Pacifique (John *et al*., 2015).

2. Les principaux résultats

Dans le cadre de ce travail nous avons pu valoriser d'importants résultats pour un écosystème fragile abritant des activités diverses et importantes sur le plan écologique et socio-économique.

- La cartographie des kystes d' *A. pacificum* au niveau de la lagune de Bizerte
- L'origine exogène de la souche (Phylogénie)
- L'identification des toxines paralysantes produites par la souche
- La caractérisation d'une relation entre abondance des kystes d'*A. pacificum* et la granulométrie des sédiments de la lagune de Bizerte

3. Résumé

Un échantillonnage dans la lagune de Bizerte a été effectué sur 123 stations de prélévements de kystes de résistance *d'Alexandrium pacificum.* Au cours de cette étude la détermination des caractéristiques sédimentaires à savoir la teneur en eau, la MO, la granulométrie, l'abondance des formes végétatives du Dinoflagellé *A. pacificum* ainsi que les facteurs environnementaux ont été réalisés pour comprendre l'origine de l'introduction de cette souche dans la lagune de Bizerte.

De plus, l'examen morphologique et le ribotypage des formes végétatives en provenance de cultures microalgales obtenues à partir de l'extraction, l'isolement des kystes de résistance du sédiment superficiel et leur germination ont été réalisés en vue de l'obtention d'une culture cellulaire monospécifique ABZ1 (A pour désigner *Alexandrium* et BZ pour faire référence à la lagune Bizerte). Ces examens ont permis de confirmer le genre et l'espèce en question : *Alexandrium pacificum* qui est nouvellement mentionnée en Méditerranée ; le profil toxinique obtenu à partir d'un extrait de la culture de la souche ABZ1, en phase exponentielle a révélé la présence de N-sulfocarbamoyl toxine C1 : N-sulfocarbamoyl toxine (9.82 pg toxineCell^{-1}), la GTX6 (3.26 pg toxine Cell^{-1}) et la carbamoyl toxine Neo-STX (0.38 pgtoxinCell^{-1}) ; représentant 2,8% du total des toxines de cette souche.

Une corrélation entre l'abondance des kystes *d'Alexandrium pacificum* et le pourcentage en eau ainsi que la matière organique a été ainsi révélée dans le sédiment de la lagune de Bizerte.

Par ailleurs, la fraction sédimentaire < 63µm s'est avérée potentiellement favorable ou propice au maintient des kystes de résistance qui pourraient être à l'origine de l'initiation des efflorescences d'*Alexandrium pacificum* au niveau de la lagune de Bizerte. En effet, les fractions

sédimentaires < 63µm sont localisées principalement sur les berges de la lagune et aux alentours du port et de la zone urbaine de Menzel Abderrhamen. Une différence significative portant sur un schéma de la distribution des kystes a été illustrée en mettant en évidence un zonage de la lagune avec une abondance plus importante au niveau des zones intérnes. Enfin, aucune corrélation particulière n'a été relevée concernant la distribution des kystes par rapport à celle de la concentration des formes végétatives présentes durant la même période de prélèvement.

Mots clés : *Alexandrium pacificum* Litakersp. Nov (*Alexandrium catenella*-group IV (Whedon&Kofoid), Balech), Kystes, Cellules végétatives, Ribotype, Profil toxinique, Analyse granulométrique, Cartographie.

Article 2. *Alexandrium pacificum* Litaker sp. nov (G IV): Resting cyst distribution and toxin profile of vegetative cells in Bizerte Lagoon (Tunisia, Southern Mediterranean Sea)

Article publié dans le journal 'HarmfulAlgae' (IF = 3.34)

Harmful Algae 48 (2015) 69–82

Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/hal

Alexandrium pacificum Litaker sp. nov (Group IV): Resting cyst distribution and toxin profile of vegetative cells in Bizerte Lagoon (Tunisia, Southern Mediterranean Sea)

Mouna Fertouna-Bellakhal [a,b,c,d], Amel Dhib [a,c], Afef Fathalli [b], Meher Bellakhal [b], Nicolas Chomérat [e], Estelle Masseret [f], Mohamed Laabir [f], Souad Turki [c], Lotfi Aleya [a,*]

[a] Université de Bourgogne Franche-Comté, Laboratoire de Chrono-Environnement, UMR CNRS, 6249 Besançon, France
[b] Institut Supérieur de Pêche et d'Aquaculture de Bizerte, Unité de recherche, Exploitation des Milieux Aquatiques, Errimel, B.P.15, 7080 Bizerte, Tunisie
[c] Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), Laboratoire Milieu Marin, Centre la Goulette, La Goulette, Tunisie
[d] Faculty of Sciences of Bizerte, FSB, Zarzouna, 7021 Bizerte, Tunisie
[e] IFREMER—Station de Biologie Marine, Place de la Croix, 29900 Concarneau, France
[f] UMR MARBEC 9190 IRD-Ifremer-UM-CNRS, Université de Montpellier, cc93, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 November 2014
Received in revised form 15 July 2015
Accepted 22 July 2015
Available online

Keywords:
Alexandrium pacificum Litaker sp. nov (*Alexandrium catenella*-group IV (Whedon & Kofoid), Balech)
Cysts
Vegetative cells
Ribotype
Toxin profile
Mapping

ABSTRACT

A high spatial resolution sampling of *Alexandrium pacificum* cysts, along with sediment characteristics (% H_2O, % organic matter (OM), granulometry), vegetative cell abundance and environmental factors were investigated at 123 study stations in Bizerte Lagoon (Tunisia). Morphological examination and ribotyping of cells obtained from a culture called ABZ1 obtained from a cyst isolated in lagoon sediment confirmed that the species was *A. pacificum*. The toxin profile from the ABZ1 culture harvested during exponential growth phase was simple and composed of the *N*-sulfocarbamoyl toxins C1 (9.82 pg toxin cell^{-1}), the GTX6 (3.26 pg toxin cell^{-1}) and the carbamoyl toxin Neo-STX (0.38 pg toxin cell^{-1}). The latter represented only 2.8% of the total toxins in this strain.

High abundance of *A. pacificum* cysts correlated with enhanced percentages of water and organic matter in the sediment. In addition, sediment fractions of less than 63 μm were examined as a favorable potential seedbed for initiation of future blooms and outbreaks of *A. pacificum* in the lagoon. A significant difference in the cyst distribution pattern was recorded among the lagoon's different zones, with the higher cyst abundance occurring in the inner waters. Also, no correlation due to the specific hydrodynamics of the lagoon was observed in the spatial distribution of *A. pacificum* cysts and vegetative cells.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abstract

A high spatial resolution sampling of*Alexandriumpacificum*cysts, along with sediment characteristics (% H_2O, % organic matter (OM), granulometry), vegetative cell abundance and environmental factors were investigated at 123 stations in Bizerte Lagoon (Tunisia). Morphological examination and ribotyping of cells obtained from a culture called ABZ1 obtained from a cyst isolated in lagoon sediment confirmed that *A. pacificum*was exogenous, belonging to the same clade of temperate Asian strains. The toxin profile from the ABZ1 culture harvested during exponential growth phase was simple and composed of the N-sulfocarbamoyl toxins C1 (9.82 pg toxin $cell^{-1}$), the GTX6 (3.26 pg toxin $cell^{-1}$) and the carbamoyl toxin Neo-STX (0.38 pg toxin $cell^{-1}$).The latter represented only 2.8 % of the total toxins in this strain.

High abundance of *A. pacificum*cysts correlated with enhanced percentages of water and organic matter in the sediment. In addition, sediment fractions of less than 63 µm were examined as a favorable potential seedbed for initiation of future blooms and outbreaks of *A. pacificum* in the lagoon. A significant difference in the cyst distribution pattern was recorded among the lagoon different zones, with the higher cyst abundance occurring in the inner waters. Also, no correlation due to the specific hydrodynamics of the lagoon was observed in the spatial distribution of *A. pacificum* cysts and vegetative cells.

Keywords: *Alexandrium pacificum*; cysts; vegetative cells; ribotype; toxin profile; granulometric study; mapping.

1. Introduction

Mediterranean coastal waters have been colonized by a number exotic species (Gomez, 2006; Galil, 2008), with unwanted organisms observed on ship hulls (Gollasch, 2002; Coutts et al., 2003). Numerous authors have shown evidence of ballast water and related sediments in species samples (Carlton, 1985; Williams et al., 1988; MacDonald and Davidson, 1997; Gollasch et al., 2000; Olenin et al., 2000). Twelve billion tons of ballast waters are transported yearly throughout the world (IMO/MEPC, 1998), with an estimated 7000 species or more transiting daily (Carlton and Geller, 1993). When discharged, these organisms may survive and settle in the new environment, potentially causing serious harm (Carlton, 1985; Gollasch et al., 2000, 2002).

According to “emigration hypotheses” (Smayda, 2002, 2007), new waters are seeded and geographic range expansion is facilitated, resulting in anthropogenic dispersal, redistribution of HAB species and transplantation of shellfish stock. Among exogenous phytoplankton species, the dinoflagellate PSP toxin producer *Alexandriumcatenella*, renamed *A. pacificum* by John et al. (2014), is especially noxious for shellfish aquaculture. Before 1983, *A. pacificum*was not observed in the Mediterranean Sea and had been listed as a rare species by Margalef and Estrada (1987). The first blooms in the Mediterranean occurred in Valencia Harbour (Spain) in 1994, followed by other blooms reported along the coast of Catalonia from 1996 to 2000 (Vila et al., 2001). In the last few decades, this species has been reported in the waters and harbours of many Mediterranean countries: i) in confined water bodies such as the Thau Lagoon (France) (Abadie et al., 1999; Lilly et al., 2002), Bizerte Lagoon (northern Tunisia) (Turki et al., 2007), Santa Giusta Lagoon (Italy) (Satta et al., 2013) and ii) in harbours such as Valencia, Barcelona and Tarragona (Spain) (Vila et al., 2001), both Tunis North Lake and Tunis Channel (Tunisia) (Turki and Balti, 2005), Olbia(Italy) (Lugliè et al., 2003) and Annaba Bay (Algeria) (Frehi et al., 2007).

Genetic analysis has shown that *A. pacificum*strains isolated from several Western Mediterranean locations were closely related to the *A. pacificum* strains blooming in temperate Asian coastal waters (Lilly et al., 2002; Penna et al., 2005; Masseret et al., 2009, 2014). *A. catenella* has been recognized as an alien species introduced by human activities (Molnar et al., 2008), able to spread due to its capacity to produce resting cysts (Wyatt and Jenkinson, 1997).

Bizerte Lagoon and the port city of Bizerte, with its multipurpose harbor, are directly connected to the Mediterranean Sea via a narrow channel 12 m deep. In addition to 520 linear meters of standard docks and port facilities, the city is equipped with an international harbour composed of 5 docks specialized in the handling of hydrocarbons, cereals, steel, cement and metallurgical products. Bizerte Lagoon is also one of the most important aquaculture areas in Tunisia, recognized for its shellfish producing activities (mussels “*Mytilus galloprovincialis*”, clams “*Ruditapes decussates*” and oysters “*Crassostreagigas*”). However, over the last ten years the lagoon annual production has not exceeded 200 tons per year. Aquaculture in the lagoon has suffered from severe seasonal losses of bivalves, one of the incriminated factors being Harmful Algal Blooms (HABs) reaching 488000 cells l^{-1} (Turki, 2004; Turki et al., 2007, 2014).

Given the above-mentioned conditions and context, a thorough mapping of dinoflagellate cysts in the surface sediments of an intensive shellfish cultivation area thus appears essential if we are to gain a better understanding of bloom dynamics and occurrence. The development of toxic *Alexandrium* blooms has often been shown to be linked with the presence of accumulation zones of resting cysts in sediments or seedbeds (Garcés et al., 2004; Anderson et al., 2005; Bravo et al., 2006; Gracia et al., 2013). Mapping the dinoflagellate cysts in the Bizerte Lagoon sediment may therefore provide essential information on the presence or absence of the rare or short-lived motile stages of cyst-producing dinoflagellates and their dispersal (Anderson, 1995).

The objective of this study was therefore to provide a basis for understanding the distribution of the toxic *A. pacificum* cyst beds in Bizerte Lagoon in relation with the economic activities of the watershed and with the sediment properties. The morphological description, the ribotype, the toxin profile and the growth rate of a single *A. pacificum*strain isolated from Bizerte sediment were determined in order to compare it with strains isolated from elsewhere around the Mediterranean Sea. This information may allow us to predict future toxic events and to propose measures to mitigate them, and thus to help sustain aquaculture activities in Bizerte Lagoon.

2. Materials and Methods

2.1. Study area

Bizerte Lagoon is a semi-enclosed area located in northern Tunisia (37° 8'- 37° 14' N; 9° 46'- 9° 56' E) (Fig. 1). Connected to the sea via a 6 km-long channel to the east, and to Lake Ichkeul through the 5 km-long "OuedTinja" to the west, the lagoon has a surface area of 130 km^2 and a mean depth of 8 m. It receives freshwater input (20 Mm^3 yr^{-1}) both from Lake Ichkeul and from several surrounding rivers. Located in a heavily populated area, it is subjected to environmental pollution from sewage as well as industrial and agricultural run-off and other human activities.

Water circulation in the lagoon can be outlined as follows: surface waters are driven by the wind to the southeastern sector mainly along the north and south coasts. Once surface waters have reached the southeastern sector, the surface current sinks and is redirected to the northwestern sector to eventually leave the lagoon. An important feature of the lagoon's water flow is the emergence of three rotating flow areas: one in the north, a second located in the south and a smaller third one located in the west (Béjaoui et al., 2008; Fertouna-Bellakhal et al., 2014).

2.2. Sampling

Sampling was carried out in June 2012 at 123 stations spaced 1 km apart (Fig. 1). Surface sediment was collected with a Van Veen Grab Sampler (Yamaguchi et al., 1995) and water column with a submersible pump. Temperature, salinity, pH and O_2were measured with a WTW 25i multiparameter probe. The top 3 cm of sediment samples were placed in hermetically closed dark plastic containers and stored in the dark at 4 °C to avoid germination**.** In the laboratory, nutrients (ammonium, nitrite, nitrate, phosphate and silicate) were analyzed with a BRAN and LUEBBE type 3 autoanalyzer and concentrations were determined colorimetrically using a UV–visible (JENWAY 6705) spectrophotometer (APHA, 1992). Water samples for chlorophyll *a* analysis were filtered by vacuum filtration onto Whatman GF/F glass fiber filters (pore size: 0.45 µm) which were immediately stored at -20 °C. Chlorophyll *a* analyses were performed by HPLC according to Pinckney et al. (2001).

2.3. Resting cyst analyses

For quantification, *A. pacificum* -like resting cysts were separated from the sediment fraction according to a gradient density method using Ludox CLX as described in Genovesi et al. (2007). Only the surface of the sediment was examined and empty cysts were not considered. Subsamples (1 g) were suspended in 20 ml of sucrose 24 % and sonicated for 3 min at 100 Hz in a Wiseclean DAIHAN sonicator. The sonicated suspension was filtered through sieves of 120 and 20 µm mesh. The slurry remaining in the 20 µm mesh sieve was washed with sucrose solution and placed in a 50 ml Falcon tube for further sonification (3 min at 100 Hz). It was then processed for cyst concentration and separated from the sediment using 20 ml of Ludox CLX (density 1.3 g cm^{-3}). The tube was centrifuged for 30 min at 3000 rpm at 16 °C. Resting cysts were concentrated in the upper fraction. This unstable phase containing resting cysts was extracted and sieved through a 20 µm nylon membrane. The resulting sample was rinsed with seawater, collected with 5 ml of filtered seawater and then sonicated (for 5 min). The aliquots of the final sample were counted in a sedimentation chamber with a photonic inverted microscope with phase contrast (Leica DMl 50). The cyst nomenclature is according to Balech (1985), Head (1996) and Bravo et al. (2006). It is also known that the cysts of the *Alexandrium tamarense* and *A. pacificum* are morphologically indistinguishable (Fukuyo, 1985).

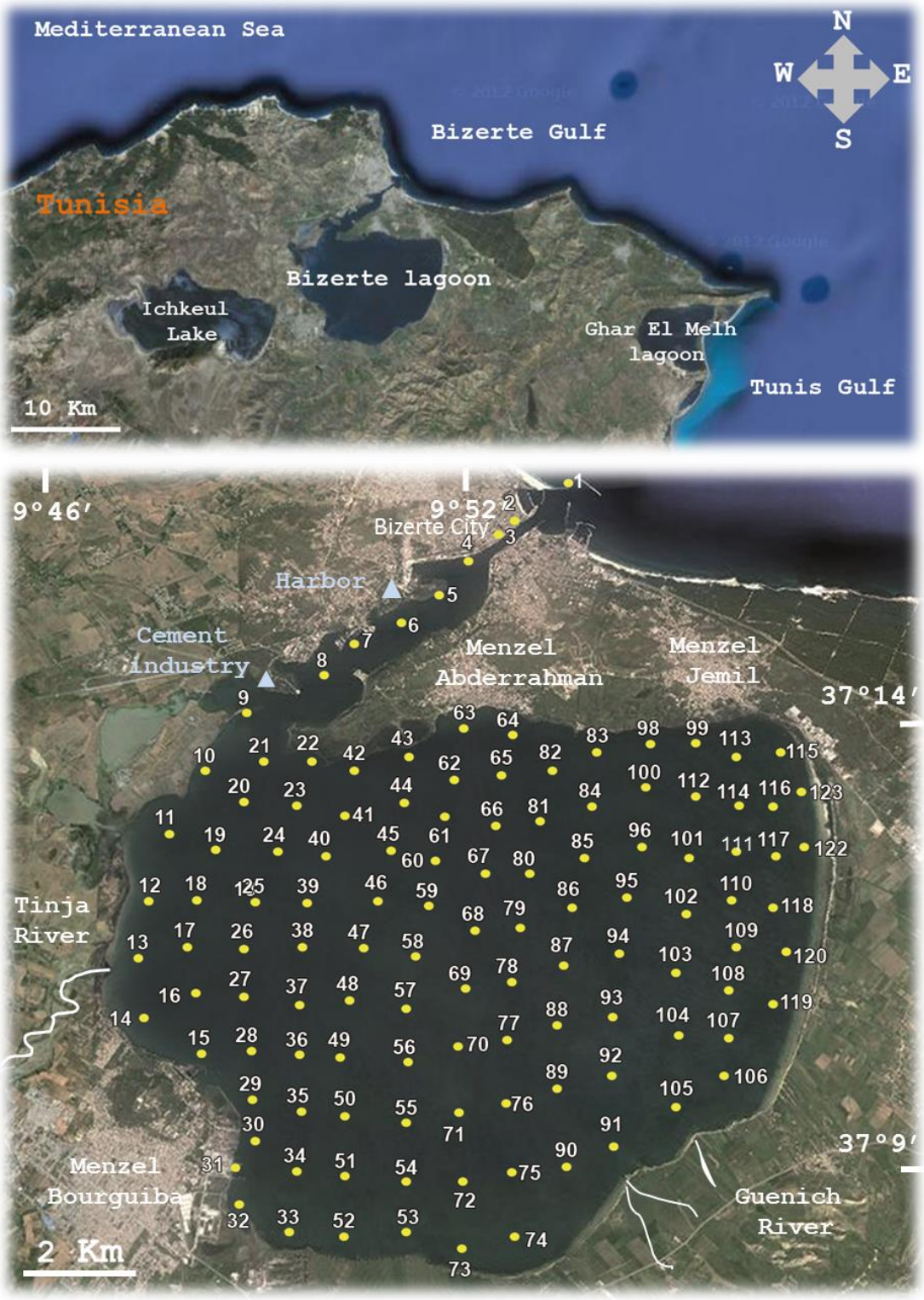


Fig. 1. Geographic location of Bizerte Lagoon with sampling stations.

2.4. *A. catenella* strain ABZ1 description

The ABZ1 monoclonal culture was initially grown in the University of Montpellier (France) from a single cyst isolated from sediment collected in June 2010 in the FMB shellfish farming area (37°9'16,20N-9°54'9,15E) in the southern part of Bizerte Lagoon according to the protocol described by Genovesi et al. (2009). The culture was cultivated in Enriched Natural Sea Water (ESNW) medium (Harrison et al., 1980) in triplicate, at 20 ± 1 °C. The growth cycle was studied at 12:12 light/dark cycle and 100 µmol photons m^{-2} s^{-1} light intensity.

2.4.1. Growth rate calculation

Monitoring of cell density was conducted daily by enumeration under an inverted microscope using a counting chamber after preservation with formalin (4 %). In all culture experiments, the specific growth rate (µ) for the exponential phase was expressed as day^{-1} and calculated using the following equation: $\mu = Ln (Nt/No)/t$;

Nt = cell density at time t; N0 = starting cell density ; t = time. The doubling T time was also calculated with the following formula:

$T = Ln(2)/\mu$ (T = day) (Reynolds, 1984).

2.4.2. Morphology

For scanning electron microscope (SEM) observations, specimens from the ABZ1 monoclonal culture were fixed with 4% formaldehyde and 1% Lugol, mounted on 0.45 µm filters, dehydrated in a distilled water/ethanol series (10°, 30°, 50°, 75°, 80°, 90°, 95° and 100°). The filters were critical point dried and coated with gold before examination with a Philips XL20 SEM. Epifluorescence microscopy is an effective method used to enhance detection and identification of certain organisms (Fritz and Triemer, 1985; Elbrächter, 1994). For observation of the thecal plates, cells were stained with 100 ng ml^{-1} of calcofluor white (Taylor et al., 2003) and observed under a Leica microscope using epifluorescence (excitation: 345 nm; emission: 455 nm). Morphological characterization was based on the shape and size of cells and the shape of specific plates such as the apical plate (Po) and its pore complex (APC), the first apical and sulcal posterior plates (Sp) (Balech, 1995) and the absence of a ventral pore between the plates 1’ and 4’.

2.4.3. Imaging flow cytometry

The FlowCAM, an imaging flow cytometer developed by Fluid Imaging Technologies, captures digital images of particles in a fluid stream, using laser light detection enabling the measurement of many cell parameters such as length, width, equivalent spherical diameter and fluorescence (Sieracki et al., 1998). The length and width of more than 100 cells of the *A. pacificum* strain ABZ1 were determined in the exponential phase of growth using a digital flow cytometer (FlowCAM, Fluid Imaging Technologies, Yarmouth, ME, USA) and 10X magnification level.

2.4.4. Toxin analysis

Batch cultures of the *A. pacificum*strain ABZ1 were harvested during their exponential growth phase. Cultures were centrifuged at 3000 g for 8 min at 4 °C, the culture medium discarded and the pellet resuspended in 1 ml of 0.1 N acetic acid. Samples were then frozen at -20 °C until analysis. To release toxins, samples were sonicated for 5 min in a water bath three times and then centrifuged at 17 000 g for 10 min at 4 °C. The supernatants were used for the subsequent LC/FD PSP toxin analyses, which were performed using the method of Oshima (1995). Toxins were separated by reverse chromatography using a C8 column (5 µm Develosil, 4.6 mm i.d. × 250 mm) with a flow rate of 0.8 ml min^{-1}. Toxins were quantified using certified standards provided by CNRC (Halifax, Canada). GTX6 and C2-toxins were detected and quantified indirectly after acid hydrolysis (HCL 0.4 N at 97 °C for 5 min). LD (S/N = 3) and LQ (S/N = 9) for PSP toxins.

2.4.5. Ribotyping

DNA extraction and PCR

Total genomic DNA was extracted from the monoclonal culture ABZ1 (centrifuge pellets of 40 ml of culture) using the classical phenol-chloroform method (Sambrook et al., 1989). After liberation of cellular material by enzymatic lysis through proteinase K digestion, the DNA was separated from protein by phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction and then removed by extraction with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The aqueous and organic phases were separated by centrifugation. The aqueous phase contained the DNA which was ultimately recovered in solid form as a result of precipitation of ethyl alcohol. For PCR and sequencing, the oligonucleotide primers and methods used are those described in Nézan et al. (2012).

Phylogeny

For phylogenetic analysis, the sequence of the ABZ1 strain was aligned together with 63 LSU sequences of other*Alexandrium* species and one sequence of *Goniodomapolyedricum* (as outgroup) retrieved from GenBank using the multiple sequence alignment program MUSCLE version 3.7 (Edgar, 2004). Alignment was refined by eye. The data matrix obtained (LSU rDNA 65 sequences, 607 characters) was analyzed with two methods of phylogenetic reconstruction: maximum likelihood (ML), using PhyML v.3.0 software (Guindon and Gascuel, 2003) and Bayesian inference (BI) using MrBayes v.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The software jModeltest v 0.1.1 (Posada, 2008) was first used to select the most suitable model of substitutions. The Tamura-Nei model (TN93+I+G_4) was chosen as indicated by the Hierarchical Likelihood Ratio Tests (hLRTs), Akaike Information Criterion 1 (AIC1), Akaike Information Criterion 2 (AIC2) and Bayesian Information Criterion (BIC) tests implemented in jModeltest. Bootstrap values (support for branches) of trees were obtained after 1000 iterations in ML. For Bayesian inference, four Markov chains were run simultaneously for 2×10^6 generations with sampling every 100 generations. On the 2×10^4 trees obtained, the first 2000 were discarded (burn-in) and a consensus tree was constructed from the remaining trees. The posterior probabilities, corresponding to the frequency with which a node is present in preserved trees, were calculated using a coupled Monte Carlo Metropolis approach – Markov Chain (MCMC).

2.5. Sediment analyses

2.5.1. Water content (% H_2O)

For each station, triplicate sediment samples were mixed to create a single sample. Water content was calculated after drying a subsample of 20 g at 60 °C for 7 days. Water content was calculated with the following formula:

Water % = [(Ww-Wd)*100]/Ww (Ww = wet weight, Wd = dry weight)

As suggested by Cho and Matsuoka (2001), the Resting cysts were expressed as: cysts.g^{-1} dry sediment = cysts.g^{-1} wet sediment /[1-(water content/100)].

2.5.2. Organic matter content (% OM)

Organic matter (OM) content was assessed after combustion of the dried sediments at 450 °C for 12 h; it was expressed as a percentage of DS (dry sediment) and was calculated using the following formula: OM % = [(Ww -Wc) × 100] / Ww.

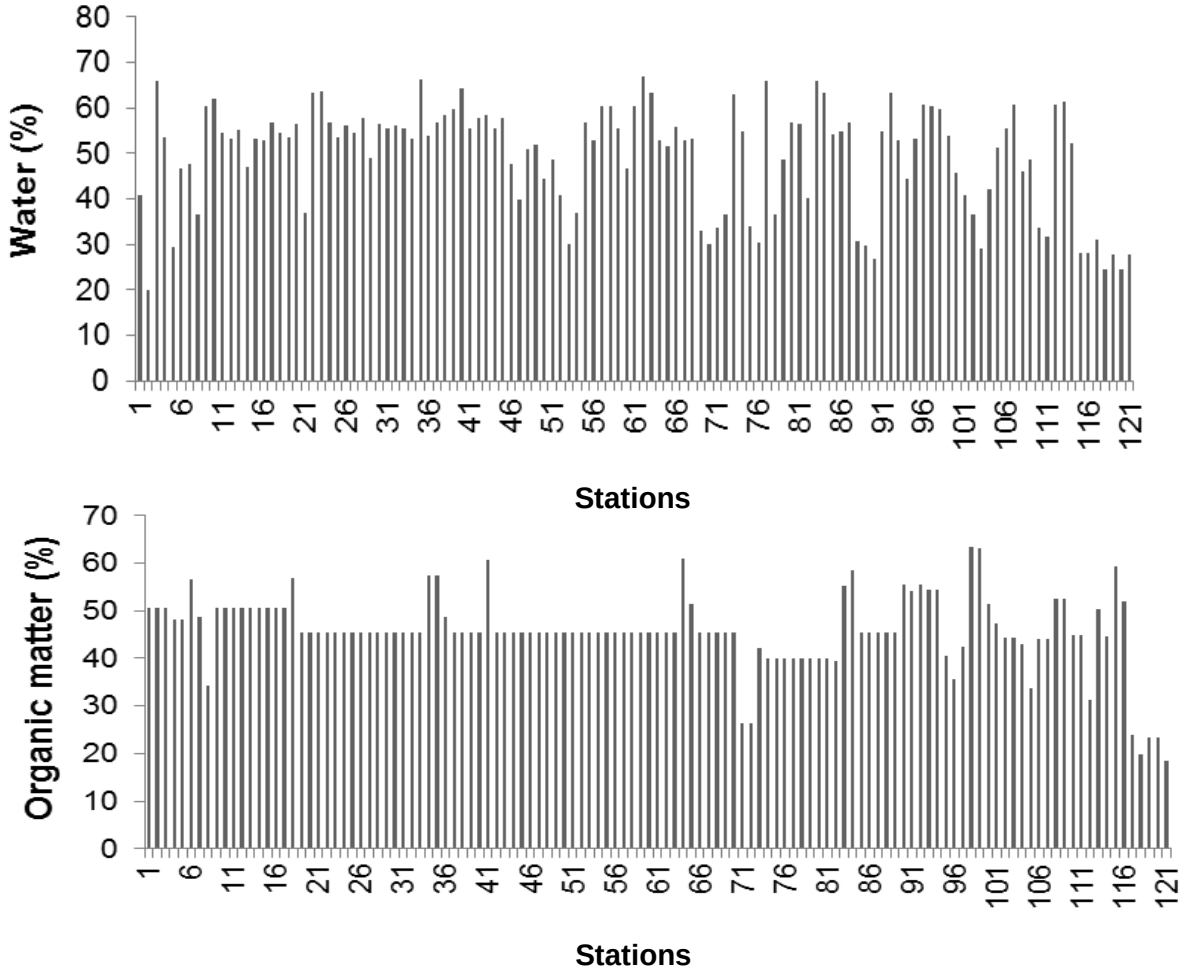


Fig. 2. Water and organic matter contents in the surface sediment of Bizerte Lagoon.

2.5.3. Granulometry

The fine-silty sediments were wet sieved through a mesh of 63 µM to separate coarse (diameter > 63 µm) from fine fraction (diameter < 63 µm). Sediment samples with a particle size greater than 63 µm were dried at 60 °C and then filtered through a series of sieves of the AFNOR type for 20 minutes, with mesh size varying from 2000 to 63 µm (2000, 1400, 630, 500, 250, 180,

125, 100 and 63 µm). Micro-granulometric analyses for sediment fraction of less than 63 µm were conducted using a Mastersizer 2000 type LASER granulometer. The results of fraction size (in µm and percentage) were provided to establish granulometric mapping of the lagoon. For sediment granulometric classification, we referred to ISO 14 688-1.

2.6. Phytoplankton sampling

Five liters collected from the water column were filtered through 10 µm mesh size. Subsamples of 100 ml of phytoplankton communities were counted under an inverted microscope after fixation with Formalin (4 %) and Lugol iodine solution (1 %) using the Utermöhl (1958) method. Cell concentration (cells l^{-1}) was calculated with the following formula: C = N*CF/V.

N = Number of cells counted for the species under study; V = Volume of sample concentrated on the filter (mL); the conversion factor (CF) = Ba/Bc; Ba = Area of filter (mm^2); Bc = Area of the part of filter counted (mm^2). Conversion factors must be calculated for each filtering unit and microscope as well as for each combination of sub-sampling area and magnification (IOC/UNESCO, 2010).

2.7. Statistical analyses

Potential relationships between variables were tested by Spearman's correlation coefficient. Redundancy analysis (RDA) was performed to define the structuring effects of sampling sites and seasons on the abundance of *A. pacificum* cysts. *A. pacificum* abundances were normalized prior to analysis. The relationship between total abundance of *A. catenella* cysts and sediment features was assessed using generalized additive models (GAM; Wood, 2006). GAMs may be considered as a non-parametric generalization of linear regressions and are increasingly used in marine ecology. The model validation was assessed according to Züur et al. (2010). Statistical analysis and graphic display were produced using R 2.15.0 (R Development Core Team, 2012) with the R packages of ''Pgirmess'' (Giraudoux, 2012) and "mgcv" (Wood, 2006).

3. Results

3.1. Environmental conditions

3.1.1. Water column

The physicochemical characteristics of the water column are summarized in Table 1. The highest temperature (30.5 °C) was recorded at stations 97 and 98, while the lowest (21 °C) at Station 2. The pH was comparable at all stations (8.16-8.69). Total phosphorus (T-P) concentrations were high (1.2–3.32 µM). Orthophosphate concentrations were lower (0.02–0.16 µM), representing only 4 % of total phosphorus. Total nitrogen (T-N) concentrations were homogenous (mean ± s.d = 13.44 ± 1.1). Nitrogen appeared equally between its dissolved organic form (52 %) and its dissolved inorganic form (DIN: NO_2^- + NO_3^- + NH_4^+) representing 48 % of the total. Ammonium concentrations accounted for 58 % of total DIN followed by nitrate 40 % and nitrite 2 %. DIN values were higher (3.03–10.75 µM). DIN/DIP ratio was high at all stations (mean ± s.d = 74.9 ± 29.37) and greater than the Redfield ratio (16) with a maximum of 186.61 at station 40 suggesting potential P limitation in Bizerte Lagoon. Silicate concentrations ranged from 2.01 µM (S52) to 7.73 µM (S46).

Table 1. Physico-chemical parameters of water column in Bizerte Lagoon.

Physico-chemical variables	Minimum	Maximum	Mean ± SD
Temperature (°C)	21	30.5	26.15 ± 2
Salinity	25.7	33.4	29.65 ± 1.58
pH	8.16	8.69	8.27± 0.1
NO_2^-(µM)	0.04	0.18	0.1 ± 0.03
NO_3^-(µM)	1.12	4.37	2.61 ± 0.77
$NH4^+$ (µM)	1.84	6.21	3.79 ± 1.02
T-N (µM)	10.56	15.88	13.44 ± 1.09
PO_4^{3-} (µM)	0.03	0.17	0.09 ± 0.03
T- P (µM)	1.21	3.32	2.11 ± 0.4
Si OH_2 (µM)	2.02	7.73	4.56 ± 1.32
T-N/T-P	4.10	10.48	6.59 ± 1.34

3.1.2. Sediment characteristics

Water percentages of sediment samples were heterogeneous (mean ± s.d = 49.94 ± 11.32) and peaked with a maximum of 67 % at station 65. Seventy-six sediment samples had a water percentage above 50 (Fig. 2). The highest percentages of OM were distributed in the inner part

of the lagoon with a maximum of 63.54 % at station 100 (Fig. 2). Five sediment fractions could be identified, namely total silt (36.90 %) > sand (36.09 %) > total clay (29.89 %) > total fine silt (17.92 %) > coarse silt (16.34 %). Sandy areas are situated at the lagoon entrance, opposite of the fishing harbour and also in the lagoon northeastern part (Fig. 3).

3.2. Cyst morphology, abundance and spatial distribution

The elongated ellipsoidal cyst had rounded ends, 40- 43 ± 0.4 µm long and 29-30 ± 0.4 µm wide. The smooth wall was thick and covered by a mucoid layer containing detrital particles. The cyst contained numerous clear starch and lipid granules and one or two bright yellow-brown pigmented bodies (Fig. 4a). Average cyst densities of the *A. pacificum* complex ranged from none to 375.75 cysts g^{-1} DS. Cysts were absent from 31 stations. The highest densities were mainly located in the lagoon's northeastern area. The cyst density distribution map of *A. pacificum* shows four areas of relatively high density (Fig. 5), the first corresponding to the Menzel Abderahmen fishing harbour and urban zone. The second is located in the west-central part of the lagoon and includes the navigation channel and the wider navigable area. The third is located on the lagoon's eastern side at the convergence point of the different currents. The fourth area lies in the lagoon's southwestern part.

Bizerte Harbour, with its five respective international docks, presented the following values: 0 cysts g^{-1} DS in the channel near the Zarzouna hydrocarbon dock, 2.5 cysts g^{-1} DS (station 2) at the commercial dock, 40.19 cyst g^{-1} DS (station 30) in the MenzelBourguiba shipyards, 2.5 cysts g^{-1} in the navigation channel and 13.39 cysts g^{-1} DS at the mouth of the Tinja River. After a Spearman test, a significant positive correlation was observed between the density of *A. pacificum* cysts, % H_2O ($r = 0.3$, $p = 0.001$) and the majority of sediment fractions ranging from 0 to 63 µm ($p < 0.05$ for each sediment fraction). In addition, a significant negative correlation was observed between cyst and the sediment fraction superior to 63 µm ($r = - 0.35$, $p = 0$). GAM analyses (Figs. 6 and 7) indicated % H_2O, % OM and sediment fractions (< 63 µm and > 63µm) to be the main driving environmental covariates governing the density of *A. catenella* cysts. Indeed, these cysts had a significant linear relationship with % H_2O and a significant nonlinear relationship with % OM, as revealed by the values of the effective degrees of freedom ($p < 0.05$; Fig. 6). These two environmental covariates together accounted for 15.51 % of the deviance in variability in the density of *A. pacificum* cysts. The 3D plot illustrating these relationships (Fig. 6) highlights the positive effect of both % H_2O and % OM on cyst density. Our GAM predicted a maximum of two *A. pacificum* cyst densities when water percentage was above 30 % and when OM percentage was above 50 %. The second GAM showed significant linear relationships of *A. pacificum* cysts and sediment fractions < 63 and > 63 µm, as revealed by the values of the

effective degrees of freedom ($p < 0.01$; Fig. 7). These two environmental covariates together accounted for 13.18 % of the deviance in cyst density variability. The 3D plot illustrating these relationships (Fig. 7) highlights the positive effect of sediment fraction < 63 µm and the negative effect of sediment fraction > 63 µm on cyst density. Our GAM predicted an increase in *A. pacificum* cyst density when the percentage of sediment fraction (< 63µm) was above 20 % and a drop when the percentage of sediment fraction > 63 was above 40 %.

3.3. *A. pacificum* abundance in the water column

During the survey, the presence of *A. pacificum* vegetative cells in the water column ranged from no cell to 4600 cells l^{-1} (mean ± s.d = 592 ± 835 cells l^{-1}) (Fig. 8).The highest abundances were recorded in the inner parts of the lagoon at stations 52, 74, 109 and 117. According to the Spearman test, no significant correlation was observed between the vegetative cell concentrations of *A. pacificum*and any of the physicochemical parameters monitored in the water column. Also, no significant correlation was found between the *A. pacificum* cells in the water column and cyst concentrations in the sediment.

3.4. Morphological and toxinic characteristics and the ribotype of the *A. pacificum* strain from Bizerte Lagoon

The examined vegetative cells appeared either single or in small chains of 2, 4 or 8 cells.The cells were globular, slightly wider than long and antero-posteriorly compressed (Fig.4b) with a rounded apex and a slightly concave antapex. The epitheca and hypotheca were equal in length. Plate formula Po (apical pore plate), 4’ (apicals), 6’’ (precingular), 6c (cingular), 8s (sulcal), 5’’’ (postcingular), 2’’’’ (antapical) refer to *A. pacificum*(former *A. catenella/A. tamarense)* (Fukuyo, 1985) (Fig. 4d-g). For the studied strain ABZ1, all cells observed (> 30 individuals) by SEM (Fig. 4f) or by epifluorescence microscopy after a calcofluor staining (Fig. 4c) clearly showed the absence of the ventral pore on the suture between the first (1’) and fourth (4’) plates.

Using the Flow-Cam, the length (27.67 ± 1.65 µM) and width (25.31 ± 1.64 µM) of a large number of *A. pacificum* cells (n>30) were determined during the exponential growth phase of the ABZ1 strain culture. For the ABZ1 culture grown with ENSW medium, a temperature of 20 °C and an irradiance of 100 µmol m^{-2} s^{-1}, the growth rate was 0.33 d^{-1} and doubling time 2.1 d.

The paralytic shellfish toxins were determined by Liquid Chromatography/Fluorescence Detection (LC/FD), allowing separation of the carbamoyl toxins (STX, NeoSTX, GTX1, GTX2, GTX3 & GTX4), *N*-sulfocarbamoyl toxins (C1, C2, C3, C4, B1 = GTX5 & B2 = GTX6) and decarbamoyl toxins (dc-STX, dc-GTX2 & dc-GTX3). The toxin profile of the Tunisian strain

ABZ1 from a culture harvested during exponential growth phase included only the following toxins C1 (9.82 pg toxin cell^{-1}), GTX6 (3.26 pg toxin cell^{-1}) and Neo-STX (0.38 pg toxin cell^{-1}). A sequence of 1396 base pairs was obtained from the strain ABZ1, comprising the ITS1 region, 5.8S gene, ITS2 region and partial LSU rDNA (D1-D3), and was deposited in Genbank with the accession number KR349269. The phylogenetic analysis based on the D1-D2 area of LSU rDNA was consistent with the results of John et al. (2014) and a similar topology of the tree was observed for the species previously grouped within the "*tamarense*" complex and then separated (Fig. 9). In this analysis, the sequence of the ABZ1 strain clustered with high support with a batch of sequences from Thau Lagoon (France), Japan and the Australian strain ACPP01 identified as *A. pacificum*, previously named *Alexandriumcatenella* group IV(Fig.9).

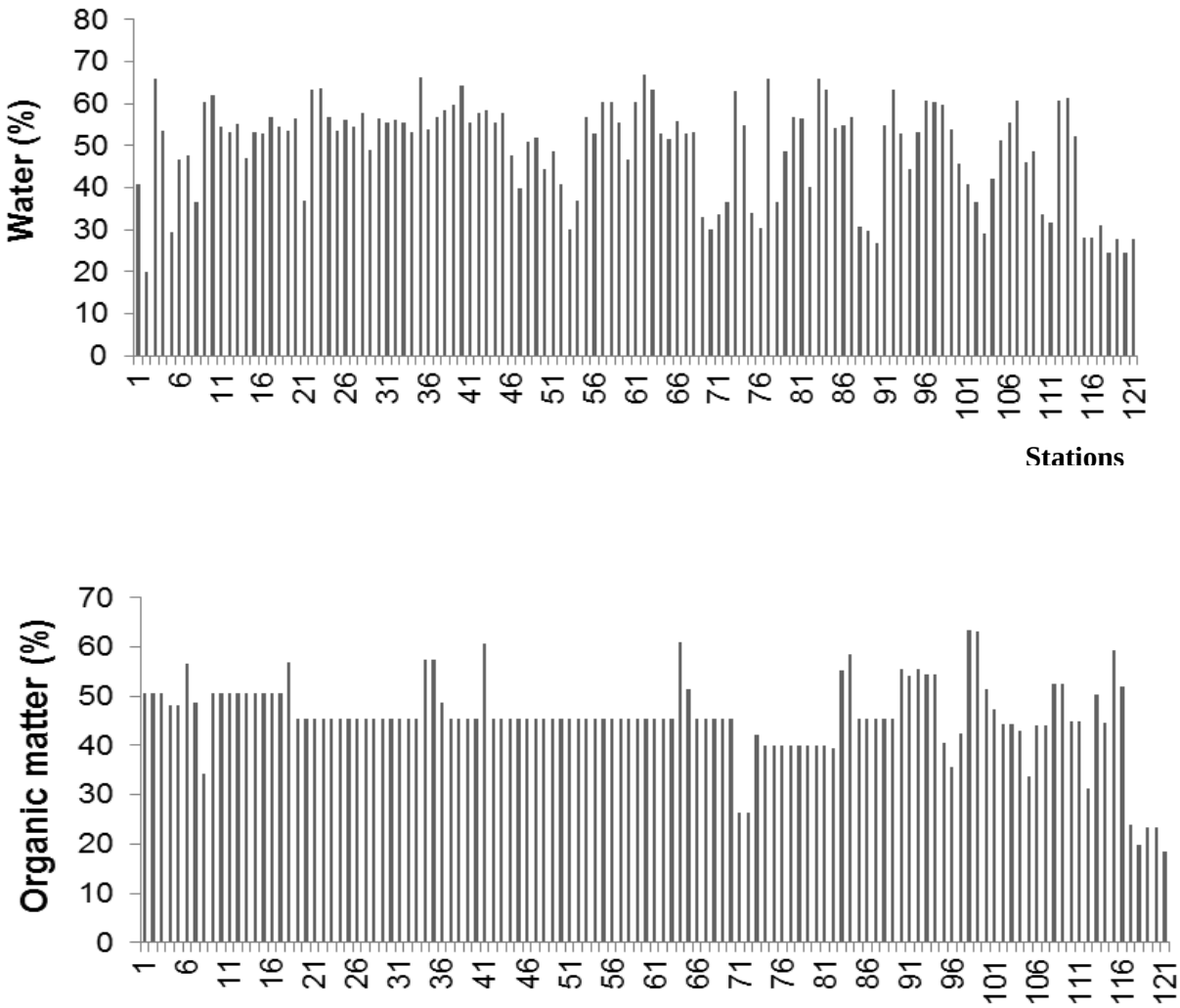


Fig. 2. Water and organic matter contents in the surface sediment of Bizerte Lagoon.

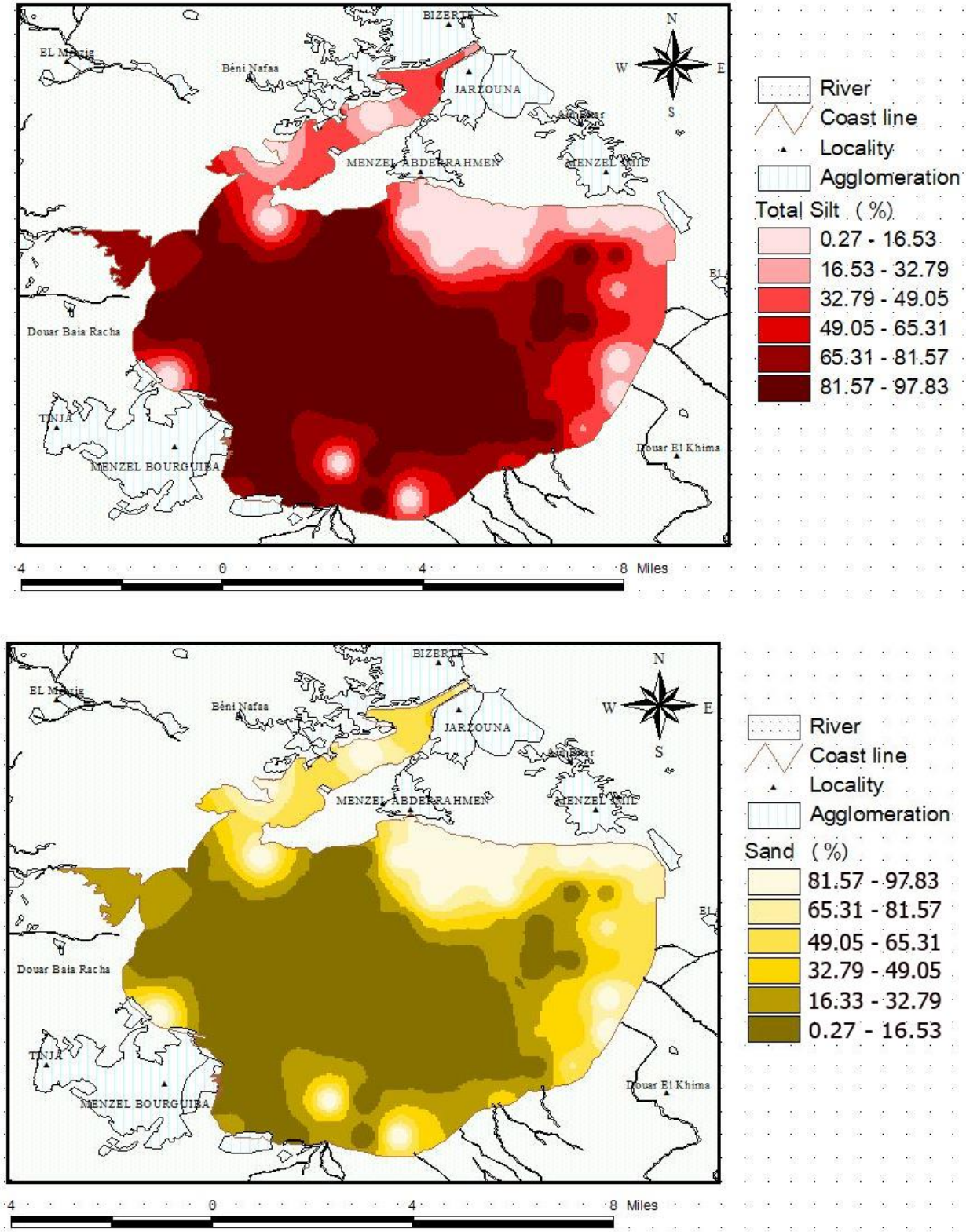


Fig. 3. Granulometry of Bizerte Lagoon.

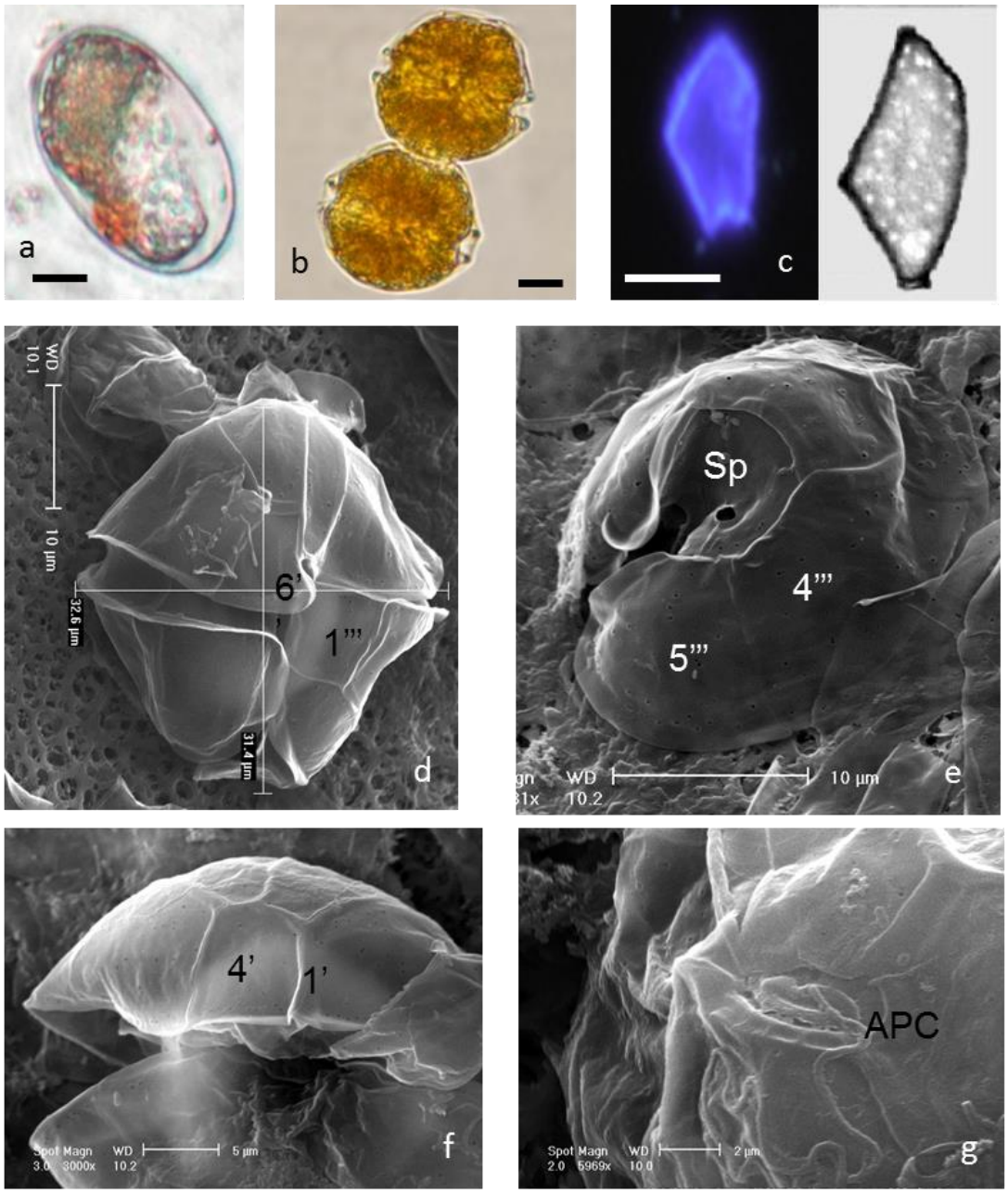


Fig. 4. (a) Cyst of *A. pacificum* (photonic microscopy), (b) vegetative cell of A. *pacificum*, (c) epitheca plate, characteristics of A. *pacificum*, obtained from germinating cysts (epifluorescence light microscopy, stained with fluorescent brightener). Scale bar = 10 µm, (d)–(g) Electron micrograph pictures of a vegetative cell of *A. pacificum*

4. Discussion

4.1. *A. pacificum* from Bizerte Lagoon

A. pacificum was first observed in Tunisia in 1997 during the monitoring program conducted in the navigation channel that passes through the Lake of Tunis. This area between the sea and the interior port city, the site of both shellfish production and heavy ship traffic, was also the main production zone for the clam *Tapes decussatus*. Nine years after this observation, *A. pacificum* cells were observed in Bizerte Lagoon, the first bloom occurring in 2007 in the southern part of the lagoon, the country main site of oyster and mussel farming. Since the resting cyst morphology of *A. catenella/*pacificum and *A. tamarense* is similar, identification of *Alexandriumcatenella/tamarense*-like cysts isolated from the Bizerte sediment sampled in June 2010 was performed using single-cyst PCR. Only the *A. catenella/pacificum* ribotype was recorded in this sediment (Masseret et al., 2014). Thus, in this study, numerous cysts may be considered as *A. pacificum*. Morphological study and ribotyping of the monoclonal culture ABZ1, issued from cysts isolated from Bizerte Lagoon sediment indicated that the cells belong to *A. pacificum*. The toxin profile of the Tunisian strain ABZ1 was not diversified. It was characterized by the dominance of GTX6 and C1 representing 97.2 %, whereas Neo-STX was a minor toxin (2.8 %). Comparatively, the presence of Neo-STX has been observed only in small amounts in two Asian strains of *A. pacificum* one developing in Hong Kong (Siu et al., 1997) and the other in Japan (Sekiguchi et al., 2001). Two strains of *A. catenella* isolated in 1998 from Thau Lagoon in the Mediterranean (ATTL01 and ATTL02) showed a dominance of C1,2 and GTX1,4,5, a profile similar to that of several Japanese *A. catenella* strains (Lilly et al., 2002).

Another strain ACT03 from Thau Lagoon, isolated in 2003, was characterized by the dominance of C2, C4, GTX4 and GTX5 (Laabir et al., 2013). In contrast, *A. catenella* from the southern coast of Chile showed a dominance of C1,2 or GTX1,4 depending on the strain (Varela et al., 2006). Significant intra and inter-specific variations in toxin profile were observed among *Alexandrium* populations in different ecosystems under different environmental conditions (Alperman et al., 2010; Anderson et al., 2012; Laabir et al., 2013).

4.2. Spatial variation in *A. pacificum* cell density in the water column during sediment sampling

In the present study, *A. pacificum* cell abundance in the water column was relatively low (≤ 5000 cells l^{-1}). Autumnal blooms of *A. pacificum* have been observed in both Bizerte Lagoon (Turki et al., 2004, 2014; Smida et al., 2012) and in other ecosystems (Vershinin et al., 2006; Anderson et al., 2012; Laania et al., 2013). Smida et al. (2012) suggested that the proliferation of *Alexandrium* in Bizerte Lagoon may be related to the heavy October-November winds which may cause a rapid suspension of sediment containing *Alexandrium* cysts and thus trigger their germination. However, Laanaia et al. (2013) observed that periods of high winds may break bloom initiation and dynamics. Though no spatial coincidence was observed in our study between *A. pacificum* cysts and vegetative cells, the large cyst seedbeds at some stations appeared to give rise to a proliferation of vegetative cells, not precisely at these stations but nearby (Fig. 8). This delay in proliferation noted at different stations may be related principally to the current dynamics which possibly drive *A. pacificum* dispersal in the water column. Indeed, discrete cyst seedbeds leading to large-scale regional blooms have been reported by Cembella et *al*. (1988) arguing that *A. Fundyense* cysts along the northern shore of the St. Lawrence estuary initiate the toxic blooms which cause PSP both on the south shore and further downstream. On the northeastern coast of Britain, *A. tamarense* cyst accumulations in the Firth of Forth have also been linked to toxic blooms in the adjacent coastal waters (Lewis et al., 1999). Evidence for the existence of a regional seedbed has also been found in studies in the Gulf of Maine where a strong correlation between the abundance of *A. fundyense* cysts and the size of subsequent blooms has been documented (McGillicuddy et al., 2011). A similar link between cyst accumulations in lagoons, harbors, or other such sites has been found in the Mediterranean Sea and has been responsible for localized blooms of *A. catenella* in Thau Lagoon (Genovesi et al., 2009) and Tarragona Harbor (Bravo et al., 2008) (Table 2).

Concerning the role of physicochemical parameters in the distribution of *A. catenella* in the water column, the absence of correlation with any of the monitored parameters was mainly related to the short sampling period. Thus no significant variation in abiotic parameters among stations was observed.

Table 2. Comparison of cyst abundances of *Alexandriumtamarense* species complex between the present study and other works.

Reported cysts species	Cystdensity	References	Sea Area
*Alexandrium*spp.: *A. catenella* + *A. tamarense*	93-8137 cysts cm^{-3} ws 8-4454 cysts cm^{-3} ws	Yamaguchi et al. (2002)	Tokuyama Bay Hiroshima Bay Japan
EllipsoidalAlexandrium: *A .catenella* + *A. tamarense*	16-23 cysts cm^{-3}ws	Lee and Matsuoka (1994)	Koreastrait Korea
EllipsoidalAlexandrium: *A. catenella* + *A. tamarense*	5-24 cysts cm^{-3}ws	Kobayashi and Yuki (1991)	MatoyaBay Japan
EllipsoidalAlexandrium: *A. catenella* + *A. tamarense*	0-21 cysts cm^{-3} ws	Ishikawa and Taniguchi (2000)	OhnagawaBay Japan
EllipsoidalAlexandrium: *catenella* + *A. tamarense*	3788 cysts g^{-1}DS	Hyun-ji and Matsuoka (2001)	Yellow sea Korea-China
A. catenella	21 632 cysts cm^{-3}ws	TanabeBay Takeuchi (1994)	Japan
A. tamarense	835 cysts cm^{-3}	Natsuike et al. (2013)	EasternBeringSea Japan
A. tamarense	10,600 cysts cm^{-3}	Natsuike et al. (2013)	ChukchiSea Japan
A. tamarense	1500 cysts cm^{-3}	Turgeon et al. (1990)	St. Lawrence Estuary, Canada
A. catenella	600 cysts cm^{-3}ws	Anderson et al. (2005)	Gulf of Maine USA
A. catenella	6000–8000 cysts cm^{-3} ws	Martin and Wildish (1994)	east of Grand Manan Island in the Bay of Fundy, Canada-USA
A. catenella	0-12,000 cysts cm^{-3}ws	Horner et al. (2011)	Quartermaster Harbor, USA
A. catenella	4.310^{3}cysts cm^{3}ws	Bravo et al. (2008)	Tarragona Harbor Spain
A. catenella	2.710^{2}cysts cm^{-3}ws	Bravo et al. (2008)	Barcelona Harbor Spain
A. catenella	20-440 cysts g^{-1}DS	Genovesi et al. (2013)	Thau Lagoon France
Alexandrium sp.	2-404 cysts g^{-1}DS	Lewis et al. (1995)	NE of Britain UK

4.3. *A. pacificum* resting cyst distribution

According to statistical analyses, the high cyst abundance of *A. pacificum* was related to the lagoon's muddy facies (all fractions < 63µm) and high values of % H_2O and % OM. The positive correlation between cyst abundance and muddy sediment, characterized by a high percentage of water, is in accordance with other studies. In fact, the hypothesis that dinoflagellate resting cysts behave like fine particles has been proposed previously by Dale (1983), with several earlier studies providing supporting evidence. Accumulations of *A. catenella* or *A. tamarense* resting cysts have been reported in sediments containing a high proportion of silt-clay particles with sizes < 63 µm (Yamaguchi et al., 1996; Gayoso, 2001; Joyce et al., 2005; White and Lewis, 1982; Anderson et al., 2005; Anglès et al., 2010; Horner et al., 2011). Genovesi et al. (2013) reported a significant linkage between cyst abundance and sediment structure; indeed, the cysts were preferentially preserved in sediments containing relatively high proportions of 20–50 µm particles. In addition, the mapping of toxic dinoflagellate cysts in marine sediments of the Seto Inland Sea (Japan) has revealed a relationship between cyst abundance and the mud content of sediment samples whose percentage of particles is less than 63 µm (Yamaguchi et al., 2002). Associations of a high density of *A. pacificum* cysts and elevated organic matter may be related to the eutrophic conditions of sediment. In fact, the sediment operates as a receptacle which concentrates all events occurring in both the water column and the sediment composition and thus the importance of OM in sediment may be related to eutrophication through agricultural, industrial and urban discharge (Zaaboub et *al.*, 2014). The use of dinocysts such as the *Alexandrium* genus as indicators of eutrophication has been well documented (Dale et *al.*, 1999; Matsuoka, 1999; Matsuoka et *al*., 2003; Pospelova et *al*., 2002; 2005). In this study, the highest concentrations of *A. pacificum* resting cysts were detected in the Menzel Abderrahman and Menzel Jemil fishing ports, where a bottom current carries solid suspended material (Fertouna-Bellakhal et al., 2014), and also in the shellfish farming areas. Despite the close relationship observed between sediment characteristics (% H_20, % OM, sediment fractions) and the spatial distribution of *A. pacificum* cysts, these parameters explainabout only 30 % of this variation. Other factors could be involved, principally related to the current dynamics. Indeed, the currents cited in one of our previous studies (Fertouna-Bellakhal et al., 2014), recorded at the same time as those in which we sampled *A. pacificum* playa pivotal role in the transfer and accumulation of dinoflagellate cysts in the inner parts of Bizerte Lagoon.

Figure 5 shows the above-mentioned four areas of relatively high density of *A. pacificum*cysts: (i) the Menzel Abderahmen fishing harbour and urban zone, (ii) the northwestern periphery of the lagoon, (iii) the lagoon west central part, the navigation channel and wider navigable area, and (iv) the lagoon southwestern part.

Based on the studies of currents conducted by Béjaoui et al. (2008) and Fertouna-Bellakhal et al. (2014), the integrated wind velocity above the water column, generated by a prevailing northwest wind (dominant in the Bizerte region), was used to identify the four previously cited zones. The currents in these zones converge and neutralize each other, which in turn results in bottom cyst accumulations that become potential seedbeds of germination.

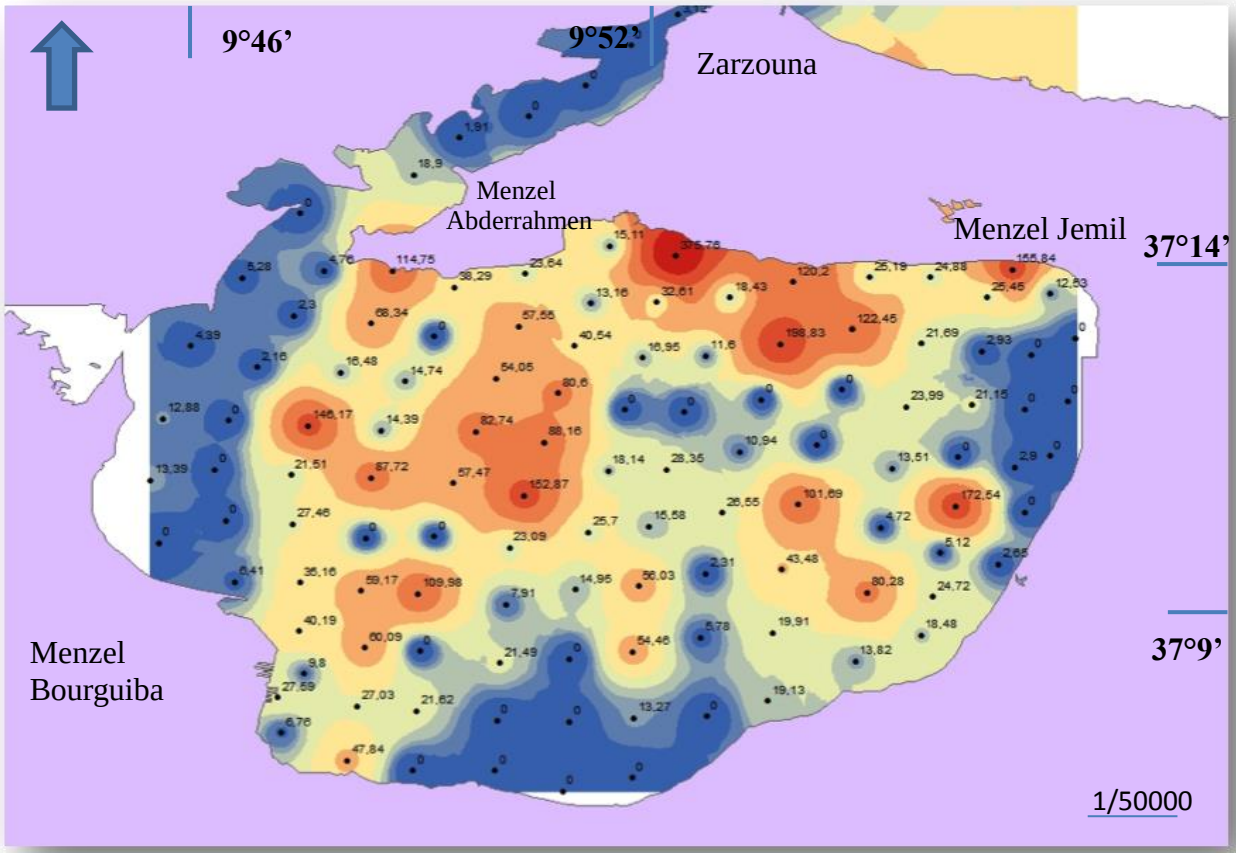


Fig. 5. *Alexandrium pacificum* cyst distribution in Bizerte Lagoon (numbers in figure g^{-1} DS).

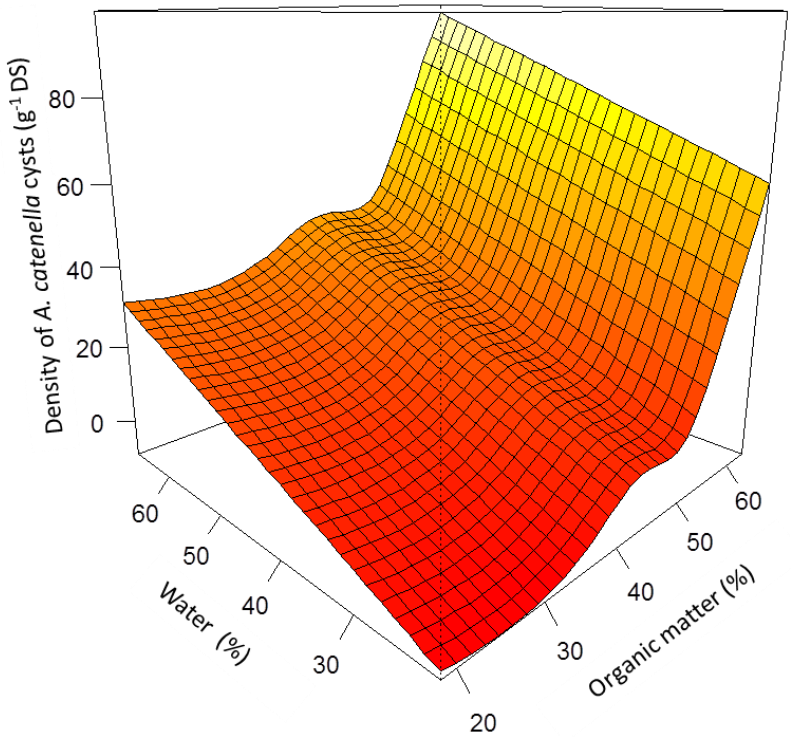


Fig. 6. 3D plot showing the relationships between the density of A. pacificum cysts and both water and organic matter. Orange map represents estimations of the GAM (generalized additive models).

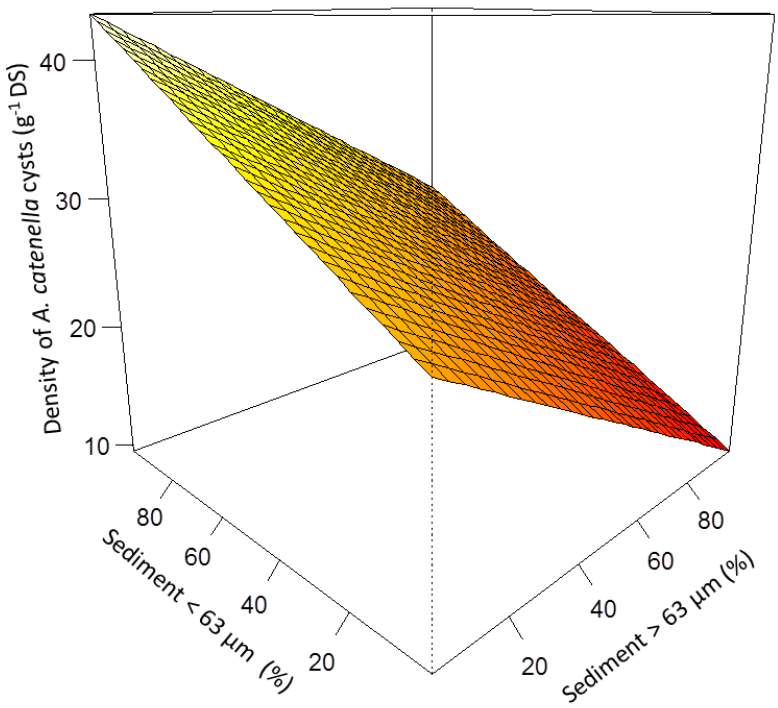


Fig. 7. 3D plot showing the relationships between the density of A. pacificum cysts and sediment fractions (<63 µm and >63 µm). Orange map represents estimations of the GAM.

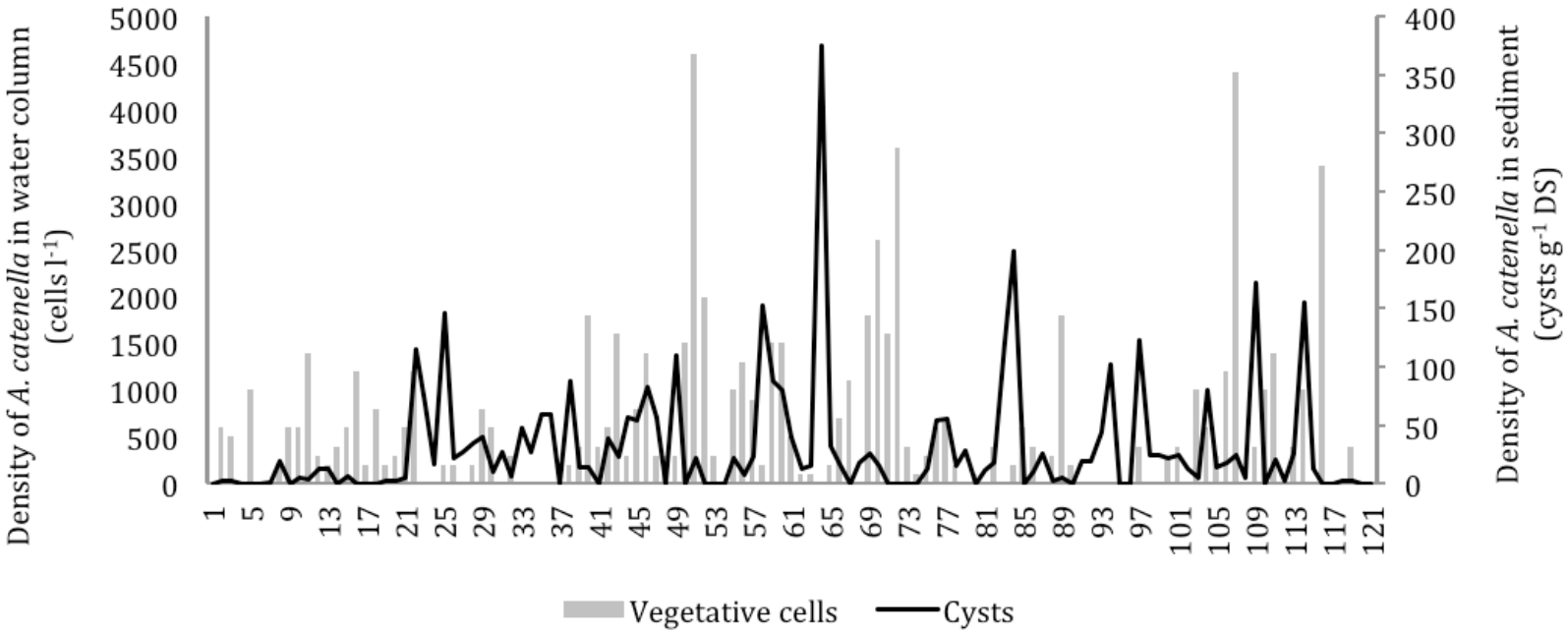


Fig. 8. Spatial distribution of *A. pacificum* in sediment and water column

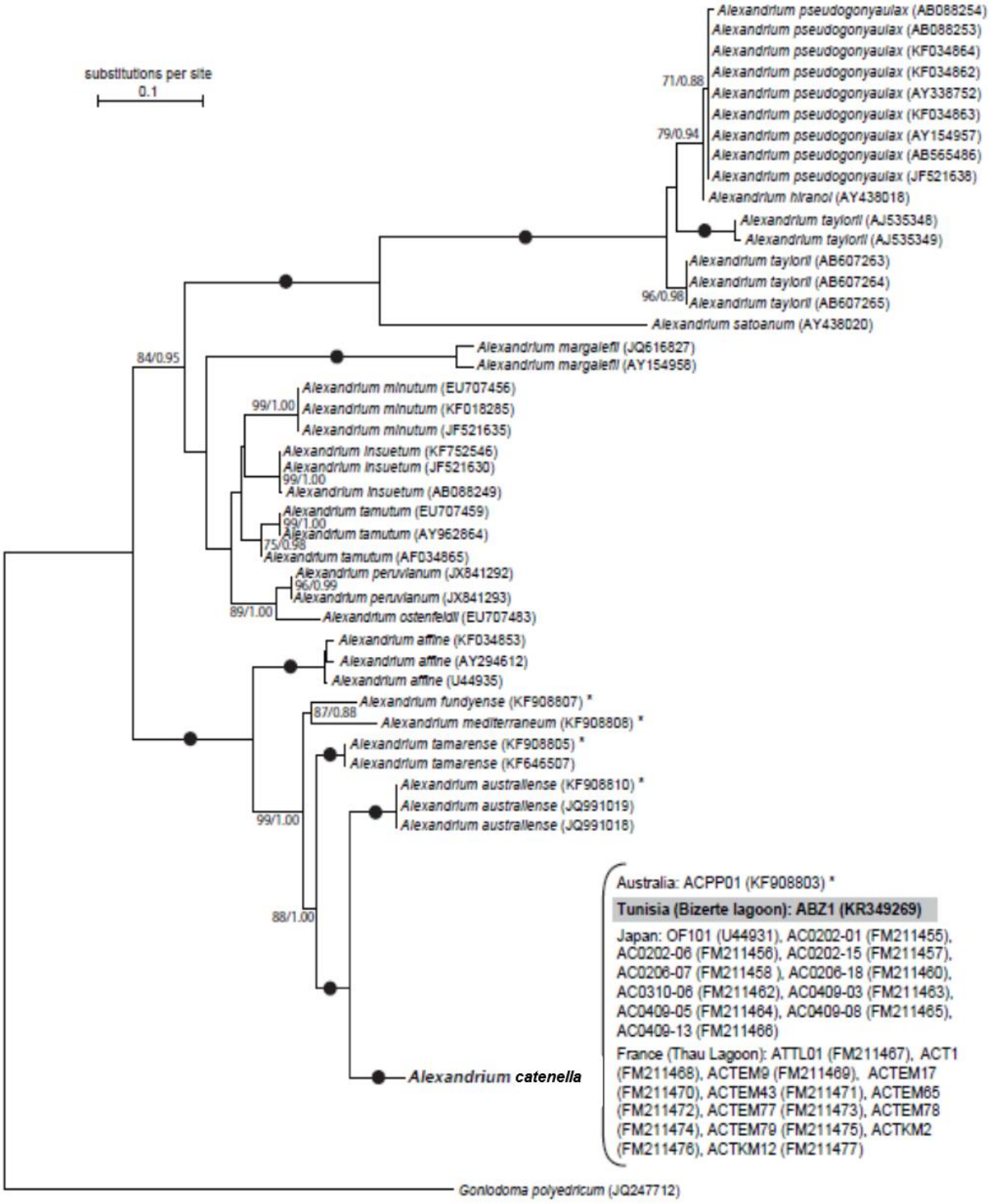


Fig. 9. Maximum likelihood (ML) tree based on LSU rDNA (D1–D2, 607 sites) including 64 *Alexandrium* sequences and *Goniodoma polyedricum* as outgroup. The likelihood

value was found to be log lk = -4174.313. The model selected was TN93 + I + G and the parameters in the analysis were: assumed nucleotide frequencies A = 0.2637;

C = 0.1553; G = 0.2516; T = 0.3295; transition/transversion ratio for purines = 2.925; transition/transversion ratio for pyrimidines = 5.714; proportion of invariant

sites = 0.113; gamma shape parameter = 0.882. Bootstrap values (1000 pseudoreplicates) > 65 in ML and posterior probabilities >0.90 in BI are shown at nodes. Black dots

indicate full support. Sequences (in bold) OR (denoted with an asterisk) are those corresponding to the reference strains for the species formerly grouped within the ‘‘tamarense’’ complex and recently described by John et *al.* (2014). The sequence in bold and highlighted in grey was obtained in the present study.

5. Conclusion

Alexandrium pacificum cysts in Bizerte Lagoon are concentrated in the inner and most eutrophic parts of the lagoon such as harbours and shellfish farms, mainly distributed according to sediment characteristics and closely related to lagoon hydrodynamics, as the relatively stable early summer currents promote the settling of cysts while the relatively strong winter currents promote their dispersal within the water column. The mapping of HAB resting cysts, especially of *A. pacificum*, may be of help in site selection in cases of future aquaculture farm implantation. Surveys of HAB resting cysts could be introduced as a new practice in coastal management for the sustainable development of shellfish aquaculture and fisheries. In addition, greater scrutiny and control over shellfish seeding practices and ballast water discharge in Tunisia would be advisable in the future.

Acknowledgments. This study was conducted by Mouna Fertouna-Bellakhal as a part of her PhD research, co-directed at the University of Bourgogne Franche-Comté, the French National Center for Scientific Research (CNRS 6249), Besançon, France, and at the Tunisian National Institute of Sciences and Sea Technologies (INSTM), la Goulette, Tunisia. Sampling, isolation and cultivation of the ABZ1 *A. catenella* strain studied were supported by grants from the French National *Programme Ecosphère Continentale et Côtière* - EC2CO and from the *Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité* - INVALEX project (AAPIN-2009-036). We thank Dr. Yves Collos and all the members of the UMR CNRS 5119, Montpellier 2 University for their help and kindness. We also thank all the members of the Faculty of Sciences of Bizerte, the High Institute of Fisheries and Aquaculture of Bizerte and the CNRS 6249 Laboratory of Chrono-Environment, Besançon.

We express our appreciation to the editor, Dr. Sandra E. Shumway, and to the anonymous reviewers for helping to improve our paper.

Conclusion Générale

Et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Notre hypothèse de départ impliquant les transports maritimes dans l'introduction d'espèces invasives a pu être confirmée en partie. En effet, les premières investigations sur l'évolution du trafic maritimes sur les sept années précèdent notre travail ont révélé que 14 % de la flotte qui accoste au port de Bizerte est en provenance du Pacifique. Le vecteur potentiel étant l'eau de ballast qui peut contenir soit des formes végétatives soit des formes enkystées d'espèces de Dinoflagellés principalement du genre *Alexandrium*. Dans le même contexte, une approche indirecte sur le milieu récepteur, la lagune de Bizerte nous a permis de relever les conditions hydrobiologiques de cet écosystème :

1. La circulation de l'eau dans la lagune suit un mouvement rotatoire simulant une spirale. En effet, les vents dominants NW déplacent les masses d'eau en agissant à la surface vers le secteur SE, pour plonger au fond avec une inversion au centre de la lagune. Par la suite, les masses d'eaux atteignent le secteur NW où elles peuvent quitter la lagune vers le large. En outre, le renouvellement de l'eau au niveau de la lagune est disparate vu la différence d'intensité du courant permettant ainsi le zonage et laissant apparaître une zone à influence maritime ou externe (ZM) et une zone interne (ZI).
2. Les analyses physico-chimiques nous révèlent que la température présente des fluctuations importantes en relation avec la distribution des kystes entre les stations permettant ainsi l'identification de deux zones.
3. La salinité varie de 33 ,4 à 25,7 pour les deux zones (MZ et ZI). La teneur en nutriments est relativement homogène (pas de différence significative entre les stations et les zones).
4. Le rapport de Redfield est supérieur à 16 avec un maximum de 186.61. Le pourcentage en eau dans le sédiment est hétérogène avec des variations significatives entre les stations.
5. Les teneurs moyennes en chlorophylle a ont varié de 2.29 ± 0.94 mg m^{-3} au niveau des zones Marines (MZ), à (2.7 ± 0.75 mg m^{-3}) au niveau des zones Intérieures (ZI).
6. L'identification et le comptage des dinokystes nous a permis de recenser 48 morphotypes répartis selon 4 ordres : Les Gonyaulacales (20 espèces), les Peridiniales (20 espèces), les Gymnodiniales (3 espèces) et les Thoracosphaerales (5 espèces). La

densité des kystes la plus élevée a été de l'ordre de 20126 kystes g^{-1} DS alors que la plus faible est de l'ordre de 1276 kystes g^{-1} DS. Six morphotypes à potentiel toxique ont été révélés respectivement selon leur abondance relative : *Alexandrium minutum, Alexandrium pacificum, Alexandrium pseudogonyaulax, Polysphaeridium zoharyi, Lingulodinium polyedrum* et *Operculodinum centrocarpum*.

7. La composition des 5 principaux morphotypes est dominée respectivement par *Brigantidinium simplex* (43.24 %), les kystes ronds bruns « RBC » (21.46 %), *Votadinum spinosum* (9.34 %), *A. pseudogonyaulax* (7.07 %), les kystes ronds bruns épineux « SRBC » (4.46 %), *A. catenella* (3.06 %), and *Lingulodinum polyedrum* (1.29 %). L'indice de Shanon Weaver est de l'ordre de 1.69 ± 0.36 bits $Cellule^{-1}$. En moyenne, 3 à 18 kystes g^{-1} sédiment sec ont été observés par échantillon. Par ailleurs, l'abondance maximale des kystes dans la lagune de Bizerte est similaire à celles citées au niveau du bassin méditerranéen et au niveau des zones tempérées. Le groupe le plus abondant est celui des Peridiniales (53.75 %), suivi par les Gonyaulacales (18.97 %). La dominance de ces deux groupes est synonyme d'une eutrophisation des eaux.
8. La révélation de kystes d'espèces nocives et responsables des HABs souligne la nécessité d'une surveillance des zones à risque incluant les zones portuaires, vue l'éventuelle implication des transports maritimes dans l'introduction d'espèces via les eaux de Ballast. Parmi les espèces potentiellement nuisibles détectées dans la lagune de Bizerte, les espèces de Dinoflagellés du genre *Alexandrium* dont les stades de développement sont représentés sous forme de kystes dans le sédiment, et de cellules végétatives au niveau du phytoplancton doivent être impérativement l'objet d'une surveillance compte tenu de leurs implications dans la production des toxines paralytiques. La présence de kystes d'espèces introduites dans la lagune de Bizerte attribués à *P. zoharyi* correspondant à la forme végétative du Dinoflagellé *Pyrodinium bahamense* a été relevée pour la première fois. La détection et le suivi de cette espèce dans la lagune de Bizerte seraient nécessaires vu son profil très toxique associé également à la production de toxines paralytiques.
9. Les plus fortes concentrations de *Lingulodinium machaerophorum*, correspondant à la forme végétative du Dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*, ont été enregistrées dans le voisinage des stations autour de l'embouchure de l'oued Tinja (82 kystes g^{-1} sédiment sec). Dans ce même contexte, l'étude bibliographique relative à ce morphotype suggère l'origine non indigène de ce kyste et sa contribution en tant qu'indicateur de régions influencées par les apports fluviaux.

Dans la deuxième partie de l'approche indirecte touchant notamment le sédiment superficiel de la lagune, une caractérisation plus approfondie du genre *Alexandrium* a été réalisée confirmant une nouvelle signalisation de l'espèce : *A. pacificum.*

1. L'examen morphologique en microscopie photonique et électronique ainsi que le ribotypage à partir d'une culture ABZ1 obtenue à partir de la germination des kystes dormants ont confirmé la présence de l'espèce *Alexandrium pacificum* et son appartenance au Clade IV. A cela, s'ajoute le profil toxinique fait à partir de la culture de la souche correspondante ABZ1 en phase exponentielle révélant la présence de N-sulfocarbamoyl toxins C1 (9.82 pg toxines cellule^{-1}), de GTX6 (3.26 pg toxines cellules^{-1}) et de carbamoyl toxin Neo-STX (0.38 pg toxines cellule^{-1}). Cette dernière ne représente que 2.8% des toxines totales. Les expériences menées au laboratoire sur les cultures ABZ1 nous ont permis de déterminer le taux de croissance d'*A. pacificum* qui est égal à 0.33 j^{-1} avec un temps de génération de l'ordre de 2,1 j.
2. Les densités maximales des kystes dormants *d'A. pacificum* sont de l'ordre de 375.75 kystes g^{-1} sédiment sec. Ses densités ont été localisées dans la partie NE de la lagune correspondant à la zone du port de pêche et de la zone urbaine de Menzel Abderrahmen. La deuxième zone est celle située au centre ouest incluant le canal de navigation et la zone navigable. La troisième se trouve du côté oriental au point des différentes convergences des courants et enfin la quatrième zone réside dans la partie SW de la lagune de Bizerte.
3. Les pourcentages les plus élevés en matière organique ont été localisés au niveau de la partie intérieure de la lagune avec un maximum de 63.54%. L'étude granulométrique nous a permis d'identifier 5 fractions sédimentaires : limon total (36.90%) > sable (36.09%) > argile (29.89%) > limon silt (17.92%) > limon grossier (16.34%). La densité la plus importante des kystes d'*Alexandrium pacificum* était concentrée au niveau des parties intérieures de la lagune abritant les fermes conchylicoles. Parmi les facteurs influençant la répartition des kystes d'*Alexandrium pacificum*, on cite la nature granulométrique du sédiment et l'hydrodynamisme au niveau de la lagune de Bizerte. Ainsi, le substrat préférentiel des foyers ou de banques de kystes est le faciès vaseux < 63µm avec un pourcentage important d'eau.

Les perspectives à ce travail seraient donc focalisées sur le traitement des eaux de ballast dans une optique de gestion durable des pratiques portuaires visant la protection de la biodiversité d'une part, et la santé d'autre part. Ainsi dans le contexte de la lagune de Bizerte abritant à la fois

la pêche, la conchyliculture, l'agriculture, l'industrie, les zones portuaires mixtes (commerce, construction navale et zones militaires), un examen annuel de la qualité physico-chimique et biologique du sédiment superficiel nous permet de contribuer à élaborer de bonnes pratiques environnementales aussi bien pour les zones navigables que les concessions conchylicoles, portuaires et autres. La ratification par la Tunisie de la convention BWM et la mise au point d'une méthode rapide de contrôle d'eau et de sédiment de ballast doivent faire partie des prérogatives et des priorités à valoriser pour le devenir de la lagune de Bizerte. Ce contrôle doit inclure les bactéries, les kystes de résistance, les formes végétatives, les poissons, les crustacés, les macrophytes et les invertébés marins.A long terme, et en s'inspirant du cas des quais pétroliers, il devrait être envisagé une installation de bassins de dimensions appropriés, équipés de filtres spéciaux, de systèmes de neutralisation (UV), et/ ou également de traitements chimiques pouvant ainsi contrôler la dispersion des organismes introduits ou pathogènes dans les écosystèmes côtiers.

Parmi les outils prédictifs, la modélisation de l'évolution des foyers de kystes d'espèces potentiellement toxiques dans le temps et l'espace s'avère indispensable à élucider dans la lagune de Bizerte.

Concernant l'espèce *Alexandrium pacificum*, il est nécessaire de faire plus d'investigations dans la lagune de Bizerte, in situ et in vitro, en traitant en profondeur la dynamique de germination des formes de résistance et leur expansion. Une caractérisation moléculaire des gènes codant pour la STX et la GTX ainsi que des biotests sont indispensables afin de pouvoir confirmer le degré de toxicité de cette espèce. Enfin, la caractérisation génétique de la toxicité doit être élucidée sur les kystes des Dinoflagellés qui pourrait constituer une source directe de l'accumulation des toxines paralytiques chez les organismes benthiques filtreurs.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abadie E., Amzil Z., Belin C., Comps M.A., Alziere-Papayanni P., Lassus P., Le Bec C., arcaillou-LeBaut C., Nezan E., Poggi R., 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Episode de Novembre à Décembre 1998. *Ifremer, Montpelliers*, 48p.

- Abdenadher M. , Hamza A. , Fekih W. , Hannachi I. , Zouari Bellaaj A. , Bradai M N. , Aleya L., 2012. Factors determining the dynamics of toxic blooms of *Alexandrium minutum* during a 10-year study along the shallow southwestern Mediterranean coasts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 106,102-111.
- Alpermann T.J., John U., Medlin L.K., Edwards K.J., Hayes P.K., Evans K.M., 2006. Six new microsatellite markers for the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 1057–1059.
- Anderson D.M., 1980. Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *Journal. Phycologia.* 16, 166-172.
- Anderson D.M., 1997. Bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species in the northeastern US. *Limnol. Oceanogr*. 42, 1009–1022.
- Anderson D.M., 1998. Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions. In: Anderson D.M., Cembella A.D., Hallegraeff G.M. (Eds.), *The Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer, pp. 29-48.
- Anderson D.M., Keafer B.A., 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature*, 325 (6105) : 616-617.
- Anderson D.M., Morel F.M.M., 1979. The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypnocysts. *Estuarine and Coastal Marine Science* 8, 279–293.
- Anderson D.M., Kulis D.M., Binder B.J., 1984. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*, cyst yield in batch cultures. *J. Phycol*. 20, 418–425.
- Anderson D.M., Kulis D.M., Sullivan J.J., Hall S., Lee C., 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp*. *Mar. Biol*. 104, 511–524.

- Anderson D.M., Kulis D.M., Doucette G.J., Gallagher J.C., Balech E., 1994. Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. *Mar. Biol*. 120, 467–478.
- Anderson D.M., Stock C.A., Keafer B.A., Bronzino A.C., Mc Gillicuddy D.J., KellerM.D., Thompson B., Matrai P.A., Martin J., 2005. *Alexandrium fundyense* cyst dynamics in the Gulf of Maine. *Deep Sea Res. II: Top. Stud. Oceanogr.* 52, 2522–2542.
- Anderson D.M., Alpermann T.J., Cembella A.D., Collos Y., Masseret E., Montresor M., 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14, 10–35.
- A.Q.I.S., 1993. Australian Quarantine and Inspection Service. Shipping ballast water trials on the bulk carrier M.V. "Iron Whyalla" AQIS. *Ballst Water Resherch Series*, report2, 123pp.

B

- Balech E., 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, *Ireland*, pp. 150.
- Ben Hadj S., 1992. Contribution à l'étude paléogéographique des palourdes (*Ruditapes decussatus*). *Mémoire de thèse Doctorat, fac. Sci. Nantes. France*. 200 pp.
- Bendschneider K., Robinson R.J., 1952. A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. *J.Marine.Reserch*. 11: 87-96.
- Blackburn S., Parker N., 2005. Microalgal life cycles: encystment and excystment. In: Andersen R.A. (Ed.), Algal culturing techniques. Elsevier *Academic press Phycological Society of America*, pp. 399-417.
- Blanco J., 1986. Separacion de quistes de dinoflagelados en gradiante de densidad. *Oceanogr*.3, 181-184.
- Blossom E. Hannah, Niels Daugbjreg, Perjuel Hansen, 2012. Toxic mucus traps: A novel mechanism that mediates prey uptake in the mixotrophic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonaulax*. *Harmful Algae* 17: 40-54.
- Bolch C.J.S., 1997. The use of polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia* 37, 472–478.
- Bolch C.J.S., de Salas M.F., 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium* ''*tamarensis* complex'' to Australasia. *Harmful Algae* 6, 465–485.

- Bolch C.J.S., Hallegraeff G.M., 1990. Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from Tasmania, Australia. *Botnica Marine*. 33, 173–192.
- Bouchouicha Smida D., Sahraoui I., Hadj M.H., Sakka H.A., 2012. Dynamique saisonniere du genre *Alexandrium* (dinoflagellé potentiellement toxique) dans la lagune de Bizerte (Nord de la Tunisie) et contrôle par les facteurs abiotiques environnants. *Cahier.R. Biol*. 335, 406–416.
- Bouchouicha Smida D., Lundholm N., Kooistra W.H.C.F., Sahraoui I., Ruggiero M.V., Kotaki Y., Ellegaard M., Lambert C., Hadj Mabrouk H., Sakka Hlaili A., 2014. Morphology and molecular phylogeny of *Nitzschia bizertensis* sp. nov.-A new domoic acid-producer. *Harmful Algae* 32, 49-63.
- Bouchouicha-Smida D., Lundholm N. , Sahraoui I. , Lambert C., Hadj Mabrouk H. , Sakka Hlaili A., 2015. Detection of domoic acid in *Mytilus galloprovincialis* and *Ostrea edulis* linked to the presence of *Nitzschia bizertensis* in Bizerte Lagoon (SW Mediterranean). Estuarine, *Coastal and Shelf Science* 165, 270-278.
- Bradai M.N., Quignard J.P., Bouain A., Jarboui O., Ouannes-Gorbel A., Ben Abdallah L., Zaouali J., et Ben salem S., 2004. Ichtyofaune autochtone et exotique des côtes tunisiennes : Recensements et biogéographie. *Cybium*, 28 (4) : 315-328.
- Brosnahan M.L., Kulis D.M., Solow A.R., Erdner D.L., Percy L., Lewis J., Anderson D.M., 2010. Outbreeding lethality between toxic Group I and non toxic Group III, *Alexandrium tamarense spp*. isolates: Predominance of heterotypic encystment and implications formating interactions and biogeography. *Deep-Sea Res*. Pt. II 57, 175–189.

C

- Carlsson P., Edling H., Béchemin C., 1998. Interactions between a marine dinoflagellate (*Alexandrium catenella*) and a bacterial community utilizing riverine humic substances. *Aquat. Microb. Ecol*. 16, 65–80.
- Carlton J.T., 1985. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev*. 23,313–317.
- Carlton J.T., 2001. Introduced Species in US Coastal Waters: Environmental Impacts and Management priorities. Pew Oceans Commission, Arlington.
- Carlton J.T., Geller J.B., 1993. Ecological roulette - the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261 (5117), 78-82.

- Casabianca S., Penna A., Pecchioli E., Jordi A., Basterretxea G., Vernesi C., 2012. Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Mediterranean Sea. *Proc. R. Soc. B.* 279,129-138.
- Cho H.J., Matsuoka K., 2001. Distribution of dinoflagellate cysts in surface sediments from the Yellow sea and East China Sea. *Mar. Micropaleo*. 42, 103–123.
- Coll M., Piroddi C., Steenbeek J., Kaschner K., Ben Rais Lasram F., Aguzzi J., Ballesteros E., Bianchi C. N., Corbera J., Dailianis T., Danovaro R., Estrada M., Froglia C., Galil B. S., Gasol J. M., Gertwagen R., Gil J., Guilhaumon F., Kesner-Reyes K., Kitsos M-S., Koukouras A., Lampadariou N., Laxamana E., de la Cuadra C. M. L., Lotze H. K., Martin D., Mouillot D., Oro D., Raicevich S., Rius-Barile J., Saiz-Salinas J. I., Vicente C., Somot S., Templado J., Turon X., Vafidis D., Villanueva R., Voultsiadou E., 2010. The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PLoS ONE*, 5 (8), 1-36.
- Collos Y., Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi Philippe, Souchu P., 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau Lagoon, southern France. *Journal of Phycology* 40 (1), 96-103.
- Collos Y., Lespilette M., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A., 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci*. 28, 313–318.
- Collos Y., Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A., Souchu P., 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, Southern France. *Harmful Algae* 6, 781–789.

𝒟

- Dale B., 1983. Dinoflagellate resting cysts: ‘‘benthic plankton’’. In: Fryxell, G.A. (Ed.), Survival Strategies of the Algae. *Camb. Univ. Press*, pp. 69 – 136.
- Dale B., 2001. The sedimentary record of dinoflagellate cysts: looking back into the future of phytoplankton blooms. *Scientia Marina* 65, 257–272.
- Dale B., 2008. Eutrophication signals in the sedimentary record of dinoflagellate cysts in coastal waters. J. Sea Res. 61, 1–11.
- Dale B., Thorsen T.A., Fjellsa A., 1999. Dinoflagellate cysts as indicators of cultural eutrophication in the Oslojord, Norway. Estuar. Coast. Shelf Sci. 48, 371–382.

- Dale B., Dale A.L., Jansen J.H.F., 2002. Dinoflagellate cysts as environmental indicators in surface sediments from the Congo deep-sea fan and adjacent regions. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 185, 309–338.
- Daly Yahia-Kefi, O., Nezan, E., Daly Yahia, M.N., 2001. Sur la présence du genre *Alexandrium* Halim (Dinoflagelles) dans la baie de Tunis (Tunisie). *Oceanologica Acta* 24, 17-25.
- David M., Gollasch S., 2012. Review of treatment processes and systems for ballast water management. Summary report, prepared for FP7-Project Vectors of Change in Oceans and Seas Marine Life, Impact on Economic Sectors (VECTORS). Project Number 266445. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK. 59 pp.
- David M., Perkovic M., 2004. Ballast Water Sampling as a Critical Component of Biological Invasions Risk Management, *Marine Pollution Bulletin* 49, 313–318.
- David M., Gollasch S., Cabrini M., Perkovic M., Bosnjak D., Virgilio D., 2007. Results from the first ballast water sampling study in the Mediterranean Sea –the Port of Koper study. *Marine Pollution Bulletin* 54, 53–65.
- Doblin M., Legrand C., Carlsson P., Hummert C., Granéli E., Hallegraeff G., 2001. Uptake of humic substances by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. In: Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J., Lewis R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms* 2000. UNESCO, Paris, pp. 336–339.
- Dodge J.D., 1989. Some revisions of the family Gonyaulacaceae (Dinophyceae) based on a scanning electron microscope study. *Botanica Marina* 32, 275-298.
- Doucette G.J., Cembella A.D., Boyer G.L., 1989. Cyst formation in the red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae): effects of iron stress. *J.Phycol*. 25, 721–731.
- Drebes G., 1974. Marine phytoplankton (Diatomeen, Peridinien). *Georg Thieme Verlag-Stuttgart* . 186 p.
- Dyhrman S.T., Anderson D.M., 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr*. 48, 647–655.

Æ

- Edgar R.C., 2004. Muscle: a multiple sequence alignement method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinf*. 5, 113.
- El Bour M., 1999. Les études d'aménagement. *Rev.Inst.Natio.Sc.Techn.me*.107-98-87.

- Elbrächter M., 1994. Green autofluorescence—a new taxonomic feature for living dinoflagellate cysts and vegetative cells. Rev. Palaeobot. Palynol. 84, 101– 105.
- Erard-Le Denn E., Boulay V., 1995. Resting cysts of *Alexandrium minutum* in marine sediments : quantification by three methods. : 725-730 pp., in “Harmful Marine Algal Blooms”, ed. By Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C.; *Lavoisier Publish., Fra.* : 878 p.
- Erard-Le Denn E., Desbruyeres E., Olu K., 1993. Alexandrium minutum: resting cyst distribution in the sediments collected along the Brittany coast, France. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton in the Sea. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 109–114.

F

- FAO, 1975. Manual of methods in aquatic environment research; part 1 – methods for detection, measurement and monitoring of water pollution, FAO *Fisheries Technocal Paper*.
- Fartouna Bellakhal M**,** Young Beak H, Chalghaf M., et Bellakhal M., 2011. Phytoplankton culture for the hatchery of oyster Crassostrea Gigas needs. Workshop project of cooperation between Tunisia and South Korea,(Tunisie 2011).
- Figueroa R.I., Bravo I., Garcés E., 2005. Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia* 44(6), 24-36.
- Flynn K., Jones K.J., Flynn K.J., 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting batch culture. *Mar.Biol.* 126, 9–18.
- Frehi H., Couté A., Mascarell G., Perrette-Gallet C., Ayada M., Kara M.H., 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d’Annaba (Algérie). *C.R. Biol*. 330, 615–628.
- Fritz L., Triemer R.E., 1985. A rapid simple technique using calcofluor White M2R for the study of dinoflagellate thecal plates. J. Phycol. 21, 662–664.
- Fritz L., Anderson D.M., Triemer R., 1989. Ultrastructural Aspects of Sexual reproduction in the red tide dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Phycologia* 25, 95-107.

G

- Garcés E. Bravo I., Vila M., Figueroa R. I., Maso M., Sampedro N., 2004. Relationship between vegetative cells and cyst production during *Alexandrium minutum* bloom in Arenys de Mar harbor (NW Mediterranean). *Journal of Plankton Research* 26(6),637–645.
- Genovesi B., Laabir M., Vaquer A., 2006. The benthic resting cyst: a key actor in harmful dinoflagellate blooms—a review. Vie Milieu, *Life and Environment* 56, 327–337.
- Genovesi B., Mouillot D., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A., 2007. Towards an optimal sampling strategy for Alexandrium catenella (Dinophyceae) benthic resting cysts. Harmful Algae 6, 837–848
- Genovesi B., Laabir M., Masseret E., Collos Y., Vaquer A., Grzebyk D., 2009. Dormancy and germination features in resting cysts of Alexandrium tamarense species complex (Dinophyceae) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). Journal of Plankton Research 31, 1209–1224.
- Genovesi B., Shin-Grzebyk M.-S., Grzebyk D., Laabir M., Gagnaire P.-A., Vaquer A., Pastoureaud A., Lasserre B., Collos Y., Berrebi P., Masseret E., 2011. Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the Alexan-drium tamarense complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. Journal of Plankton Research 33, 405–414.
- Genovesi B., Mouillot D., Laugier T., Fiandrino A., Laabir M., Vaquer A., Grzebyk D., 2013. Influences of sedimentation and hydrodynamics on the spatial distribution of *Alexandrium catenella/tamarense* resting cysts in a shellfish farming lagoon impacted by toxic blooms. *Harmful Algae* 25,15-25.
- Giraudoux P., 2012. Pgirmess: Data Analysis in Ecology. R package version 1.5.3.
- Gollasch S., 1998. The Asian decapod Hemigrapsus penicillatus (de Haan, 1835) (Grapsidae, Decapoda) introduced in European waters: Status quo and future perspective. Helgoland Marine Research 52(3), 359-366.
- Gollasch S., 2002. The importance of ship hull fouling as a vector of species introductions into the North Sea. Biofouling 18, 105–121.
- Gollasch S., Lenz J., Dammer M., Andres H.-G., 2000. Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from the Indian Ocean to the North Sea. *Journal of Plankton Research* 22, 923–937.

- Gollasch S., Macdonald E., Belson S., Botnen H., Christensen J., Hamer J., Houvenaghel G., Jelmert A., Lucas I., Masson D., McCollin T., Olenin S., Persson A., Wallentinus I., Wetsteyn B., Wittling T., 2002, Life in Ballast Tanks, In: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S. (Eds.), Invasive Aquatic Species of Europe: D*istribution, Impacts and Management, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, pp. 217–231.
- Gollasch S., David M., Voigt M., Dragsund E., Hewitt C., and Fukuyo Y. 2007. Critical review of the IMO international convention on the management of ships' ballast water and sediments. *Harmful Algae* 6(4), 585–600.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Denotula confervacea* (cleve) Gran. *Canadian J. Microbiol*. 8, 229-239.
- Guindon S., Gascuel O., 2003. A simple fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likehood. *Syst. Biol*. 52, 696–704.

$\mathcal{H}$

- Hallegraeff G. M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 32 (2), 79-99.
- Hallegraeff G.M., Bolch C.J., 1991. Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Mar. Poll. Bull*. 22, 27–30.
- Hallegraeff G. M., McCausland M. J. & Brown R. K. 1995. Early warning of toxic inoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* in southern Tasmanian waters. *J. Plankton Res*. 7,1163–76.
- Hansen G., Turquet J., Quod J-P., Ten-Hage L., Lugomela C., Kyewalyanga M., Hurbungs M., Wawiye P., Ogongo B., Tunje S., Rakotoarinjanahary H., 2001. Potencially Harmful Microalgae of the Western Indien Ocean-a guide based on a preliminary suvey. *IOC Manuals and Guides No. 41*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001. 108p.
- Harrison P.J., Waters R.E., Taylor F.J.R., 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol*. 16, 28–35.
- Harzallah A., 2002. État actuel et évolution de l'exploitation halieutique et aquacole des lagunes - Cas de la lagune de Bizerte. *bull.Inst.Nat.Sci.Tech. Mer de Salammbô (INSTM)*, 128 p.
- Harzallah A., 2003. Transport de polluants dans la lagune de Bizerte simulé par un modèle de circulation de l'eau. *bull.Inst.Nat.Sci.Tech. Mer de Salammbô (INSTM)*, 30, pp. 121-133.

- Harzallah A., Maatoug K., Zaafrane S.,1999. Hydrobiologie, *bull.Inst.Nat.Sci.Tech. Mer de Salammbô (INSTM)*. 46-59.
- Hattour, A., et Ben Mustapha, K., 2015 - Le golfe de Gabés: Espèces des Eaux de Ballast, Patrimoniales et Introduites: Synthèse des Campagnes 2009 et 2010 et Actualisation. Publication de l'Inst. Natn. Sci. Techno. Mer, 360 p.
- He H., Chen F., Li, H., Xiang W., Li, Y., Jiang Y., 2010. Effect of iron on growth, biochemical composition and paralytic shellfish poisoning toxins production of *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 9, 98–104.
- Head M.J., 1996. Modern dinoflagellate cysts and their biological affinities. In: Jansonius, J., McGregor D.C. (Eds.), *Palynology: Principles and Applications*, vol.3. AASP Foundation, Salt Lake City, UT, pp. 1197–1248.
- Head M.J., Harland R., Matthiessen J., 2001. Cold marine indicators of the late quaternary: the new dinoflagellate cyst genus *Islandinium* and related morphotypes. *J. Quat. Sci*. 16, 621–636.
- Hidrotecnica Portuguesa, 1995. Étude générale pour la protection du littoral tunisien contre l'érosion marine, Ministère de l'Equipement et de l'Habitat.
- Hoppenrath M., Elbrächter M. and Drebes G., 2009. Marine Phytoplankton. Selected phytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. 2009. Scientific Books. ISBN 978-3-510-61392-2. 264p.

I

- Ichimi K., Yamasaki M., Okumura Y., Suzuki T., 2001. The growth and cyst formation of a toxic dinoflagellate, *Alexandrim tamarense*, at low water temperature in northeastern Japan. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 261, 17-29.
- Imai I., Itoh K., Anraku M., 1984. Extinction dilution method for enumeration of dormant cells of red tide organisms in marine sediment. *Bull. Plankt; Soc. Jap*. 31, 123-124.
- IOC/UNESCO, 2010. Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis (109 p.).
- Itakura S., Yamaguchi M., 2001. Germination characteristics of naturally occurring cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Hiroshima Bay, Inland Sea of Japan. *Phycologia* 40, 263–267.

J

- Jauzein C., Loureiro S., Garcés E., Collos Y., 2008. Interactions between ammonium and urea uptake by 5 strains of *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *Aquat. Microb. Ecol*. 53, 271–280.
- Jeong H.J., Yoo Y.D., Kim J.S., Kim T.H., Kim J.H., Kang N.S., Yih W.H., 2004. Mixotrophy in the phototrophic harmful alga *Cochlodinium polykrikoides* (dinophycean): prey species, the effects of prey concentration, and grazing impact. *J. Eukaryot. Microbiol*. 51, 563–569.
- Jeong H.J., Yoo Y.D., Kim J.S., Seong K.A., Kang N.S., Kim T.H., 2010. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Sci. J*. 45, 65–91.
- John U., Fensome R.A., Medlin L.K., 2003. The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* ‘‘species complex’’ (Dinophyceae*). Mol. Biol. Evol*. 20, 1015–1027.
- John U., Medlin L.K., Groben R., 2005. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarense* species complex. *J. Plankton Res*. 27, 199–204.
- John U., Litaker W.R., Montresor M., Murray S., Brosnahan M.L., Anderson D.M., 2014. Formal revision of the Alexandrium tamarense species complex (Dino-phyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molec-ular-based (rDNA) classification. Protist 165, 779–804.

K

- Kallel M.R., 1989. Hydrologie du lac de Bizerte. *Rapp. Int. DGRE. Tunis*, 41 p.
- Kamens J., Pilkey O., Whalting P., 1984. Etude sédimentologique des lacs de Bizerte et de Tunis. Notes Serv. Géo. N. ° 49, *Off. Nat. Min*. 5-25.
- Kamens J., Pilkey O., Heron D., Harbridge W., KEER F. ET Thornton S., 1989. The sedimentology of three Tunisian lagoon. *Marine. Geology*, Vol. 88, Amesterdam, 285-301.
- Kim Y.O., Park M.H., Han M.S., 2002. Role of cyst germination in the bloom initiation of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Masan Bay, Korea. *Aquat. Microb. Ecol.* 29, 279-286.
- Kim C.J., Kim H.G., Kim C.H., Oh H.M., 2007. Life cycle of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters. *Harmful Algae* 6, 104–111.

- Kremp A., 2000. Distribution, dynamics and in situ seeding potential of Scrippsiella hangoei (Dinophyceae) cyst populations from the Baltic Sea. *J. Plankton Res*. 22(11), 2155-2169.

L

- Labry C., Erard-Le Denn E., Chapelle A., Fauchot J., Youenou A., Crassous M.P., Le Grand J., Lorgeoux B., 2008. Competition for phosphorus between two dinoflagellates: a toxic Alexandrium minutum and a non-toxic Heterocapsa triquetra. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 358, 124–135.
- Langdon C., 1987. On the causes of interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. I. A comparative study of the growth irradiance relationship of three marine phytoplankton species: *Skeletonema costatum*, *Olisthodiscus luteus* and *Gonyaulax tamarensis*. *J. Plankton Res*. 9, 459–482.
- Lassus P., 1988. Plancton toxique et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes. *IFREMER*. 111p.
- Leong S.C.Y., Maekawa M., Taguchi S., 2010. Carbon and nitrogen acquisition by the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and supply modes. *Harmful Algae* 9, 48–58.
- Levasseur M., Gamache T., St.-Pierre I., Michaud S., 1995. Does the cost of NO3 reduction affect the production of harmful compounds by *Alexandrium excavatum*. In: Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd., Paris, pp. 463–468.
- Lewis J., Hallett R., 1997. Lingulodinium polyedrum (Gonyaulax polyedra) a blooming dinoflagellate. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 35, 97–161.
- Lewis J., Higman W., Kuenstner S., 1995. Occurrence of Alexandrium sp. cysts in sediments from the North East coast of Britain. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoiser aScience Publishers, Paris, pp. 175–180.
- Lewis J., Harris A.S.D., Jones K.J., Edmonds R.L., 1999. Long term survival of marine planktonic diatoms and dinoflagellates in stored sediment samples. *Journal. Plankton Reserch.* 21(2), 343-354.
- Lilly E.L., Kulis D.M., Gentien P., Anderson D.M., 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res*. 24, 443–452.

- Lilly E.L., Halanych K.M., Anderson D.M., 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). *J. Phycol*. 43, 1329–1338.
- Lindahl K., 1998. Family process variables and children's disruptive behavior problems. *Journal of Family Psychology* 12, 420–436.
- Lorenzen C.J., Jefferey S.W., 1980. Determination of chlorophyll in sea water. UNESCO. *Tech. Pap. Mar. Sci*. 35-20.
- Luglie A., Giacobbe M.G., Sannio A., Fiocca F., Sechi N., 2003. First record of the dinoflagellate Alexandrium catenella (Whedon & Kofoid) Balech (Dinophyta), a potential producer of paralytic shellfish poisoning, in Italian waters (Sardinia, Tyrrhenian Sea). *Bocconea* 16, 1045–1052.

M

- Macdonald E., Davidson R. 1997. Ballast Water Project, *Final Report. FRS Marine Laboratory*, Aberdeen, UK. p. 83.
- MacIntyre J.G., Cullen J.J., Cembella A.D., 1997. Vertical migration, nutrition, and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 148, 201–216.
- MacKenzie L, de Salas M., Adamson, J., Beuzenberg, V., 2004. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae* 3(1): 71-92.
- Margalef R., Estrada M., 1987. Synoptic distribution of summer microplankton (algae and protozoa) across the principal front in the Western Mediterranean. *Invest. Pesq*. 51, 121–140.
- Marret F., Zonneveld K.A.F., 2003. Atlas of modern organic-walled dinoflagellate cyst distribution. *Rev. Palaeobot. Palynol*. 125, 1–200.
- Masseret E., Grzebyk D., Nagai S., Genovesi B., Lasserre B., Laabir M., Collos Y., Vaquer Berrebi P., 2009. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers. *Appl. Environ. Microbiol*. 75, 2037–2045.
- Masseret E., Turki S., Frehi H., Laabir M., Hadjadji I., Balti N., Pessey X., Faivre N., Rieuvilleneuve F., Abadie E., Cecchi P., Berrebi P., 2014. Alexandrium catenella (group IV), an invasive dinoflagellate from Asia on the Maghrebian coasts (Mediterranean Sea): description of cyst beds using a single-cell ribotyping method. Oral com.In: Ninth Symposium IOC-WESTPAC, 22–25 Avril 2014, Nha Trang, Vietnam

- Masson D., Courtois O., Masson N., Guesdon S., Rocher G., 2000. Ballast water research in France current status communication, ICES Annual Science Conference, Bruges, 27-30 sept 2000, p196 .
- Masson D., Thomas G., Genauzeau S., Le Moine O., Derrien A., 2013. Merchant ships discharging unwanted marine species in close proximity of a French aquaculture area: Risks involved. Marine Pollution Bulletin 77 (1-2), 315–319.
- Matej D., Gollasch S., 2008. EU shipping in the dawn of managing the ballast water issue, *Marine Pollution Bulletin* 56, 1966-1972.
- Matej D., Gollasch S. Cabrini M. Perkovic M. Bosnjak D., Virgilio D., 2007. Results from the first ballast water sampling study in the Mediterranean Sea – the Port of Koper study. Marine Pollution Bulletin 54, 53–65.
- Matsuda A., Nishijima T., Fukami K., 1999. Effects of nitrogenous and phosphorus nutrients on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakk*. 65, 847–855.
- Matsuoka K., 1992. Species diversity of modern dinoflagellate cysts in surface sediments around the Japanese Islands. In: Head, M.J., Wrenn, J.H. (Eds.), Neogeneand Quaternary Dinoflagellate Cysts and Acritarchs. A.A.S.P. Foundation, Dallas, TX, pp. 33–53.
- Matsuoka K., 1999. Eutrophication process recorded in dinoflagellate cyst assemblages a case of Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan. Sci. Total Environ. 231, 17–35.
- Matsuoka, K., Fukuyo, Y., 1995. Taxonomy of cysts. In: Hallegraeff, G., et al. (Ed.),Manual of Harmful Microalgae. IOC Manual and Guide Book, No. 33.
- Matsuoka K., Joyce L.B., Kotani Y., Matsuyama Y., 2003. Modern dinoflagellate cysts in hypertrophic coastal waters of Tokyo Bay, Japan. J. *Plankton Res*. 25, 1461–1470.
- Matsuoka K., Kawami H., Nagai S., Iwataki M., Takayama H., 2009. Reexamination of cyst-motile relationships of *Polykrikos kofoidii* Chatton and *Polykrikos schwartzii* Butschli (Gymnodiniales, Dinophyceae). *Rev. Palaeobot. Palynol*. 154, 79–90
- Mc Gillicuddy D.J., Signell R.P., Stock C.A., Keafer B.A., Keller M.D., Hetland R.D., Anderson D.M., 2003. A mechanism for offshore initiation of harmful algal blooms in the coastal Gulf of Maine. *Journal of Plankton Research* 25 (9), 1131–1138.
- McCollin T., Macdonald E.M., Dunn J., Hall C., Ware S., 2001. Investigations into ballast water exchange in European regional seas. In: *International Conference on Marine Bioinvasions*, New Orleans, April 9–11, pp. 94–95.

- McGillicuddy D. J. Jr., Townsend D. W.,He R., Keafer B. A., Kleindinst J. L., Li Y., Manning J. P., Mountain D. G., Thomas M. A., Andersona D. M., 2011. Suppression of the 2010 Alexandrium fundyense bloom by changes in physical, biological, and chemical properties of the Gulf of Maine. Limnol. Oceanogr., 56(6), 2411–2426
- Medcof bJ.C., 1975. Living marine animals in a ship's ballast water. *Proc. Nat. Shellfish Ass*. 65, 54–55.
- Montresor M., 1995. The life history of *Alexandrium pseudogonyaulax* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* 34, 444–448.
- Montresor M., Marino D., 1996. Modulating effect of cold-dark storage on excystment in *Alexandrium pseudogonyaulax* (Dinophyceae). *Marine. Biologie* 127, 55–60.
- Montresor M., Montesarchio E., Zingone A., Marino J., 1994. Calcareous dinoflagellate cysts in marine sediments of the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Review of Palaeobotany and Palynology* 84 , 45-56.
- Montresor M., Zingone A. Sarno D., 1998. Dinoflagellate cyst production at a coastal Mediterranean site. *J. Plankton Res*. 20:2291–312.
- Murphy J., Riley J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta* 27, 31-36.

N

- Nagai S., Matsuyama Y., Oh S.J., Itakura S., 2004. Effect of nutrients and temperature on encystment of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Plankton Biol. Ecol*. 51, 103–109.
- Nagai S., McCauley L., Yasuda N., Erdner D.L., Kulis D.M., Matsuyama, Y., Itakura S., Anderson D.M., 2006a. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Mol. Ecol. Notes* 6, 756–758.
- Nagai S., Sekino M., Matsuyama Y., Itakura S., 2006b. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Mol. Ecol. Notes* 6, 120–122.

O

- Oksanen J., Blanchet G., Kindt R., Legendre P., O'Hara R., Simpson G., Solymos P., Stevens H., Wagner H., 2011. Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-11.
- Olenin S., Gollasch S., Jonušas S., Rimkute I., 2000. En-Route investigations of plankton in ballast water on a ship's voyage from the baltic sea to the open atlantic coast of Europe. *Int. Rev. Hydrobiol*. 85(5–6), 577–596.
- Oshima Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins, *J. AOAC Int*. 78, 528–532.
- Oshima Y., Bolch C.J., Hallegraeff G.M., 1992. Toxin composition of resting cysts of Alexandrium tamarense (Dinophyceae). Toxicon 20, 1539–1544
- Ostenfeld C.H., 1909. Immigration of a plankton diatom into a quite new area within recent years; *Biddulphia sinensis* in the North Sea waters. *Int. Revue gesamten Hydrobiol*. 2, 362–374.

P

- Parsons T.R., Harrison P.J., 1983. Nutrient cycling in marine ecosystems. In: Richards B., Charley J.L. (Eds.), Physiological Plant Ecology IV. Ecosystems and Processes. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 85–115.
- Parsons E.R., Takahashi M., Hargrave B., 1984. Biological oceanographic processes. *Pergamon Press. Oxford.* 3rd. 330 pp.
- Paterson D., 2001. An international and Australian agenda for minimizing the spread of harmful algal blooms via ships ballast water. In: Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J., Lewis R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms* 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 465–469.
- Persson A., Godhe A., Karlson B., 2000. Dinoflagellate cysts in recent sediments from the West Coast of Sweden. *Bot. Mar*. 43, 69-79.
- Posada D., 2008. J-Model test: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Pospelova V., Head M.J., 2002. *Islandinium brevispinosum sp*. nov. (Dinoflagellata), a new species of organic-walled dinoflagellate cyst from modern estuarine sediments of New England (USA). *J. Phycol.* 38, 593–601.
- Pospelova V., Chmura G.L., Boothman W.S., Latimer J.S., 2002. Dinoflagellate cyst records and human disturbance in two neighboring estuaries, New Bedford Harbour and Apponagansett Bay, Massachusetts (USA). Sci. Total Environ. 298, 81‑102.

- Pospelova V., Chmura G.L., Walker H.A., 2004. Environmental factors influencing the spatial distribution of dinoflagellate cyst assemblages in shallow lagoons of southern New England (USA). Rev. Palaeobot. Palynol. 128, 7–34.
- Pospelova V., Chmura G.L., Boothman W., Latimer J.S., 2005. Spatial distribution of modern dinoflagellate cysts in polluted estuarine sediments from Buzzards Bay (Massachusetts, USA) embayments. *Marine Ecological Progrogress Series* 292, 23–40.
- Pospelova V., de Vernal A., Pedersen T.F., 2008. Distribution of dinoflagellate cysts insurface sediments from the northeastern Pacific Ocean (43–25°N) in relation to sea-surface temperature, productivity and coastal upwelling. *Marine Micropaleontologie* 68 (1–2), 21–48.
- Price N.M., Thompson P.A., Harrisson P.J., 1987. Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol*. 23, 1-9.

R

- Raven J.R., Richardson K., 1984. Dinoflagellate flagella: a cost-benefit analysis. *New Phytol*. 98, 259–276.
- Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., van Ginkel R., Holland P., Munday R., 2010. Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9, 384–389.
- Richardson S.D., 1998. Drinking water disinfection by-products. In: Meyers, R.A. (Ed.), *The Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*, vol. 3. John Wiley & Sons, New York, pp. 1398–1421.
- Richardson S.D., 2011. Disinfection by-products: formation and occurrence of drinking water. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, vol. 2. Burlington, MA, pp. 110–136.
- Richardson S.D., Plewa M.J., Wagner E.D., Schoeny R., Demarini D.M., 2007. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection byproducts in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research* 636 (1-3), 178-242.
- Rigby G.R., Hallegraeff G.M., 1994. The transfer and control of harmful marine organisms in shipping ballast water: behaviour of marine plankton and ballast water exchange on the MV ‘‘Iron Whyalla’’. *J. Mar. Environ. Eng*. 1, 91–110.

- Rigby G.R., Steverson I.G., Hallegraeff G.M., 1991. Environmental problems and the treatment options associated with international exchange of shipping ballast waters. *Proceedings Chemeca, Developing Export Technology Conference, Newcastle*, 18-20 September 1991, pp. 221-230.
- Rochon A., de Vernal A., Turon J.L., Matthiessen J., Head M.J., 1999. Distribution of recent dinoflagellate cysts in surface sediments from the North Atlantic Ocean and adjacent seas in relation to sea-surface parameters. *Am. Assoc. Stratigraphic Palynologists Found., Contribut*. Series 35, 1–152.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Ruiz G.M., Carlton J.T. (Eds.), 2003. Invasive Species: Vectors and Management Strategies. Island Press, Washington, DC.
- Ruiz G.M., Rawlings T.K., Dobbs F.C., Drake L.A., Mullady T., Huq, A., Colwell R.R., 2000. Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408(6808), 49–50.

S

- Sahraoui I., Sakka Hlaili A., Hadj Mabrouk H., Leger C., Bates S., 2009. Blooms Of The Diatom /Gentjs *Pseudo-Nitzschia* H. Peragallo In Bizerte Lagoon (Tunisia, Sw Mediterranean). Diatom Research, 24 (1), 175-190.
- Sahraoui I., Bates S.S., Bouchouicha D., Hadj Mabrouk H., Sakka Hlaili A., 2011. Toxic and potentially toxic *Pseudo-nitzschia* populations in Bizerte Lagoon (Tunisia, SW Mediterranean) during 2006-2007, and first report of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia brasiliana* Lundholm. Hasle, G., Fryxell A. *Diatom Res.* 26, 293-303.
- Sahraoui I. Sahraoui B. Grami S.S. Bates D. Bouchouicha M.A. Chikaoui H., Hadj Mabrouk H., Sakka Hlaili A., 2012. Response of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations and domoic acid to environmental conditions in a eutrophied, SW Mediterranean coastal lagoon (Tunisia) Estuar. *Coast. Shelf. Sci*. 102–103, 95–104.
- Saldarriaga J.F., Taylor F., Cavalier-Smith T., Menden-Deuer S., Keeling P., 2004. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates. *Eur. J. Protistol*.40, 85–111.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*, NY.1626 pp.

- Satta, C.T., Anglès, S., Garces, E., Lugliè, A., Padedda, B.M., Sechi, N., 2010. Dinoflagellate cysts in recent sediments from two semi-enclosed areas of the Western Mediterranean Sea subject to high human impact. *Deep-Sea Reserch*. II 57,256–267.
- Satta, C.T., Angle, S., Luglie, A., Guillen, J., Sechi, N., Camp, J., Garcé, E., 2013. Studies on dinoflagellate cyst assemblages in two estuarine Mediterranean bays: A useful tool for the discovery and mapping of harmful algal species. *Harmful Algae* 24, 65–79.
- Schiller J., 1933. Dinoflagellatae (Peridineae) in monogrphischer Behandlung. Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutscland, Osterreich und Scheiz Eds. 1:
- Scholin C.A., Anderson D.M., 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU rDNA genes. *J. Phycol*. 30, 744–754.
- Shumway S.E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal of world Aquaculture society* 21(2), 65-104.
- Siu G., Young M., Chan D., 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352, 117–140.
- Smayda T.J., 1997. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to hytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography* 42, 1137–1153.
- Smayda T.J., 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *J. Oceanogr*. 58, 281–294.
- Smayda T.J., 2007. Reflections on the ballast water dispersal–harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae* 6, 601–622.
- Sournia A., 1986**.** Atlas du phytoplancton marin. Vol. I : Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées. Edition C.N.R.S, Paris. 220p.
- Soussi N., 1981. Mécanismes de la sédimentation et évolution paléogéographique de la lagune de Bizerte (Tunisie) durant le quaternaire récent. Thèse de doctorat 3ème cycle, Université Paul Sabtier, Toulouse, 229p.
- Soussi N., 1983. Répartition des résidus d'hydrocarbures dans les sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie septentrionale). *Arch. Inst. Past*., Tunis, 60, 21-28.
- Suttle C.A., Price N.M., Harrisson P.J., Thompson P.A., 1986. Polymerization of silica in acidic solutions : a note of caution to phycologists. *J. Phycol*. 22, 234-237.

T

- Tang Y.Z., Koch F., Gobler C.J., 2010. Most harmful algal bloom species are vitamin B-1 and B-12 auxotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20756–20761.
- Taroncher-Oldenburg G., Kulis D.M., Anderson D.M., 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr*. 42, 1178–1188.
- Taylor F.J.R., 1987. General group characteristics; special features of interest; short history of dinoflagellate study. In: Taylor, F.J.R. (Ed.), *the biology of Dinoflagellates*. Blackwell, 1- 23 pp.
- Taylor F.J.R., Fukuyo Y., Larsen J., 1995. Taxonomy of harmful dinoflagellates. In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris, pp. 283–317.
- Taylor F.J.R., Fukuyo Y., Larsen J., Hallegraeff G.M., 2003. Taxonomy of harmful marine dinoflagellates. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. second ed.p. 11.
- Touzet N., Davidson K., Pete R., Flanagan K., McCoy G.R., Amzil Z., Maher M., Chapelle A., Raine R., 2010. Co-occurrence of the West European (Gr.III) and North American (Gr.I) ribotypes of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Shetland, Scotland. *Protist* 161, 370–384.
- Turgeon A., Cembella D., Theriault J.C., Beland L., 1989. Spatial distribution of resting cysts of *Alexandrium sp*. in sediments of the lower St Lauren Estuary and Gaspé Coast (eastern Canada), *Toxic Marine phytoplankton*, 238-243.
- Turki S., 2004. Suivi des microalgues planctoniques toxiques dans les zones de production, d'élevage des mollusques bivalves et d'exploitation des oursins du nord de la Tunisie. *Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer*. 31, 83–96.
- Turki S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis. *Cahiers de Biologie marine* 46, 29-34.
- Turki S., El Abed A., 2001. On the presence of potentially toxic algae in the lagoons of Tunisia. *Harmful Algae News*, 22: 10.
- Turki S., Balti, N., 2005. Detection of toxic *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech in clam production zone of North Lake and Channel, Tunisia. *Harmful Algal News* 28, 1-3.
- Turki S., Balti N., Ben Jannet H., 2007. First bloom of dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Bizerte Lagoon (northern Tunisia). *Harmful Algal News* 35, p 7-9.

- Turki S., Dhib A., Fertouna-Bellakhala M., Frossard V., Baltia N., Kharrat R., Aleya L., 2014. Harmful algal blooms (HABs) associated with phycotoxins in shellfish: What can be learned from five years of monitoring in Bizerte Lagoon (Southern Mediterranean Sea)? *Ecol. Eng*., 67, 39–47.

U

- UNESCO, 1995. Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds). IOC Manuals and Guides No. 33. 546 p.
- Utermöhl H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton- ethodik. *Mitt int. Verein. theor. angew. Lim-nol*. 9,1-38.

V

- van den Bergh J.C.J.M., Nunes A.L.D., Dotinga H.M., Kooistra W.H.C.M., Vrieling W.F., Peperzak L., 2002. Exotic harmful algae in marine ecosystems: an integrated biological–economic–legal analysis of impacts and policies. *Mar. Policy* 26, 59–74.
- Vila M., Garcès E., Maso M., Camp J., 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 222, 73–83.

W

- Werschkun B., Sommer Y., Banerji S., 2014. Disinfection by-products in ballast water treatment: An evaluation of regulatory data. *Water research* 4 6, 4884 - 4901.
- Williams R.J., Griffiths F.B., Vanderwal E.J., Kelly, J., 1988. Cargo vessel ballast water as a vector for the transport of non-indigenous marine species. *Estuar. Coast. Shelf Sci*. 26, 409–420.
- Wood E.D., Armstrong F.A.J., Richards F.A., 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium-cpooer reduction ti nitrite. *J. Mar. Biol*. Ass. U.K. 47, 23-31.
- Wood S. N., 2006. Generalized additive models: an introduction. New York: CRC.

Y

- Yamaguchi M., Itakura S., Imai I., Ishida Y., 1995. A rapid and precise technique for enumeration of resting cysts of *Alexandrium sp*. (Dinophyceae) in natural sediments. Phycologia 34 (3), 207-214.
- Yamaguchi M., Itakura S., Nagasaki K., Imai I., 1996. Distribution and Abundance of Resting Cysts of the Toxic Dinoflagellates Alexandrium tamarense and A. catenella in sediments of the eastern Seto Inland Sea, Japan. In: Yasumoto T., Oshima Y., Fukuyo Y. (Eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Com- mission of UNESCO, Laboratory of Bioorganic Chemistry, Tohoku University, Japan, pp. 177–180.
- Yamaguchi M., Itakura S., Nagasaki K., Kotani,Y., 2002. Distribution and abun-dance of resting cysts of the toxic Alexandrium spp. (Dinophyceae) in sediments of the western Seto Inland Sea, Japan. Fish. Sci. 68, 1012–1019.
- Yamamoto T., Tarutani K., 1999. Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Phycol. Res*. 47, 27–32.

Z

- Zenetos A.; Polychronidis L., 2010. Feasibility study in setting up a regional mechanism for collecting, compiling and circulating information on invasive non-indigenous species in the Mediterranean. N° 85 */RAC/SPA* 2010, 86 pp.
- Zenetos A., Gofas S., Verlaque M., Cinar M.E., Garci'a Raso J.E., Bianchi C.N., Morri C., Azzurro E., Bilecenoglu M., Froglia C., Siokou I., Violanti D., Sfriso A., San Mart N. G., Giangrande A., Kata An T., Ballesteros E., Ramos-Espla A., Mastrototaro F., Oca A. O., Zingone A., Gambi M.C. & Streftaris N. 2010. Alien species in the Mediterranean Sea by 2010. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part I. Spatial distribution. *Mediterranean Marine Science* 11, 381-493.
- Zingone A., Enevoldsen H.O., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast. Manage*. 43, 725–748.
- Zmerli Triki H., Kefi Daly-Yahia O., 2012. Have non-indigenous planktonic species been introduced *via* ballast waters in two North African ports (La Goulette and Bizerte , Tunisia). *Vie et milieu - life and environment* 62, 1-9.

- Zmerli Triki H., Kefi Daly-Yahia O., Malouche D., Komiha Y., Deidun A., Brahim M., Laabir M., 2014. Distribution of resting cysts of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax* in recently deposited sediment within Bizerte Lagoon (Mediterranean coast, Tunisia). *Marine. Pollution. Bulletin.* 84, 172-181.
- Zmerli Triki H., Ben Amor O., Deidun A., Kefi Daly-Yahia O., 2015 Investigating the possible influence of different environmental factors on the *Alexandrium catenella/tamarense* resting cyst distribution and HAB occurrence within Bizerte lagoon (Mediterranean coast of Tunisia). *Marine Life* 18, 43-53.
- Zonneveld K.A.F., 1997a. Dinoflagellate cyst distribution in surface sediments of the Arabian Sea (Northwestern Indian Ocean) in relation to temperature and salinity gradients in the upper water column. *Deep-Sea Res II* 44, 1411–1443.
- Zonneveld K.A.F., 1997b. New species of organic walled dinoflagellate cysts from modern sediments of the Arabian Sea (Indian Ocean). *Rev. Palaeobot. Palynol*. 97, 319–337.
- Zonneveld K.A.F., Jurkschat T., 1999. *Bitectatodinium spongium* from modern sediments and sediment trap samples of the Arabian Sea (northwestern Indian Ocean): taxonomy and ecological affinity. *Rev. Palaeobot. Palynol*. 106, 153–169.
- Zonneveld k. A.F., Brune A., Willems H., 2000. Spatial distribution of calcareous dinoflagellate cysts in surface sediments of the Atlantic Ocean between 13°N and 36°S. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 111 (3), 197-223.
- Zonneveld, K.A.F., Chen, L., Möbius, J., Mahmoud, M.S., 2009. Environmental significance of dinoflagellate cysts from the proximal part of the Po-river discharge plume (off Southern Italy, Eastern Mediterranean). *Journal of Sea Reserch*, 62, 189–213.
- Züur, A., Ieno, E., Walker, N., Saveliev, A., Smith, G., 2010. Mixed effects models and extensions in ecology with R. *Statistics for Biology and Health*. 549p.

Références Electroniques :

[1] http://globallast.imo.org/

[2] http://www.ballast-water-treatment.com/fr/reglementation/237-2#sthash.Glx6ZBrZ.dpuf

[3] http://www.infoclimat.fr/climatologie/annee/2012/bizerte/valeurs/60714.html

[4] www.ommp.tn