



HAL
open science

Contribution à l'étude des microalgues épiphytes dans les eaux côtières du golfe de Tunis: Cas des espèces du genre *Ostreopsis* Schmidt, J. (1901).

Mohamed Amine Hachani

► To cite this version:

Mohamed Amine Hachani. Contribution à l'étude des microalgues épiphytes dans les eaux côtières du golfe de Tunis: Cas des espèces du genre *Ostreopsis* Schmidt, J. (1901).. Ecologie, Environnement. Université Bourgogne Franche-Comté; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), 2019. Français. NNT: 2019UBFCD042 . tel-02548513

HAL Id: tel-02548513

<https://theses.hal.science/tel-02548513>

Submitted on 20 Apr 2020

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.



Institut National des Sciences et Technologies
de la Mer

**THÈSE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LA MER**

**Ecole doctorale n° 554
Environnements-Santé**

Doctorat en Biologie des organismes

Présentée par

Mohamed Amine HACHANI

**Contribution à l'étude des microalgues épiphytes
dans les eaux côtières du golfe de Tunis : Cas des
espèces du genre *Ostreopsis* Schmidt, J. (1901)**

**Soutenue publiquement à la Faculté des Sciences de Tunis le 15 novembre 2019 devant
le jury composé de :**

Pr. Sabiha TLIG ZOUARI (Faculté des Sciences de Tunis)

Pr. Souad TURKI (INSTM)

Pr. Lotfi ALEYA (Université de Bourgogne Franche-Comté)

Pr. Ons KéFI-DALY YAHIA (INAT)

Pr. Michel DENIS (Aix-Marseille Université)

Dr. Estelle MASSERET (Université Montpellier/ IRD)

Présidente de jury

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Je dédie ce travail

A mes parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien sans faille et leurs sacrifices.

A mon frère et ma sœur pour leur présence, affection et leurs précieux encouragements

A la petite princesse et les trois AVENGERS

"yippee ki yay"

Bruce Willis aka John McClane

Die Hard

Remerciements

Etta James disait "At Last" et oui finalement après un bon bout de temps j'arrive à la conclusion de cette aventure et me voilà enfin en passe d'être Docteur. L'aboutissement de ce travail est loin d'être un effort solitaire, je le dois à plusieurs personnes qui m'ont accompagné et soutenu le long de ces années de thèse et que je voudrais remercier.

Ma thèse se déroulant en cotutelle, je voudrais tout d'abord remercier le Pr. Fethi AMDOUNI, Doyen de la Faculté des Sciences de Tunis et le Pr. Jacques BAHY président de l'Université Bourgogne Franche-Comté, qui m'ont admis au sein de leurs établissements respectifs. Je tiens également à remercier Pr. Hechmi MISSAOUI, Directeur Général de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de m'avoir ouvert les portes de l'INSTM et ainsi réaliser mes travaux de recherche. Merci aux Professeurs Cherif SAMMARI et Ali HARZALLAH, les chefs successifs du laboratoire *Milieu Marin* de l'INSTM de m'avoir accueilli dans leur équipe.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Mme Ons KEFI-DALY YAHYA, Professeur à l'Institut Agronomique de Tunis, et Mr Michel DENIS, Professeur à Aix-Marseille Université, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Vos suggestions, vos remarques pertinentes et vos commentaires judicieux m'ont été très utiles. Je remercie également Mme Estelle MASSERET, Maître de conférences à l'Université de Montpellier, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens aussi à exprimer mon profond respect à Mme Sabiha TLIQ-ZOUERI, Professeur à la Faculté des sciences de Tunis, pour m'avoir fait l'honneur d'être la présidente du jury de ma thèse.

Ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance vont à mes deux directeurs de thèse Mme Souad TURKI, Professeur à l'INSTM. que je voudrais remercier chaleureusement de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, de m'avoir proposé cette thèse et m'avoir fait découvrir le monde du phytoplancton. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en m'intégrant dans le projet M3-HABs. Merci pour l'attention avec laquelle vous avez suivi ce travail ainsi que pour la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve. Je vous en suis infiniment reconnaissant pour votre patience, vos encouragements et les conseils très

bénéfiques que vous m'avez prodigués tout au long de ces années de thèse, j'espère que j'ai été digne de cette confiance.

Mr Lotfi ALEYA, Professeur à l'Université de Franche Comté pour avoir accepté d'encadrer ce travail et pour la pertinence de vos conseils en particulier dans la rédaction des articles scientifiques et la rigueur scientifique dont vous avez toujours fait preuve et qui m'a permis de progresser et de mener à bien ce travail. Merci pour vos encouragements, vos multiples conseils et pour le temps que vous m'avez consacré.

Je tiens à rendre hommage à Monsieur Aslam Sami DJELLOULI, Maître assistant à la Faculté des Sciences de Tunis, que je considère comme mon mentor, grâce à lui j'ai une grande passion pour la recherche scientifique et la biologie Marine, j'ai été honoré de faire mes premiers pas dans ce domaine à ses côtés durant mon master.

J'exprime ma gratitude à toute l'équipe du laboratoire *Milieu Marin/Plancton* particulièrement à Mme Noura BALTI technicienne du laboratoire pour m'avoir apportée son aide dans l'identification des espèces du phytoplancton, Mr Fourrat AKROUT ingénieur au Laboratoire *Milieu Marin/Hydrologie* à l'INSTM pour les analyses des sels nutritifs. Je remercie aussi Dr. Afef FATHALLI pour ces précieux conseils, Dr. Amel DHIB pour son aide, ses encouragements et sa bonne humeur et Dr. Boutheina ZIADI pour son amitié et d'avoir facilité mon intégration au laboratoire. Je voudrais exprimer aussi toute ma reconnaissance aux chauffeurs de l'INSTM pour leur gentillesse et leurs patience lors des nombreux déplacements sur terrain.

J'exprime ma sincère amitié à Mouna ABAAB et Dr. Imen ZAGHMOURI, membres de l'équipe tunisienne du projet M3-HABs pour leur énorme aide sur terrain et au laboratoire, je n'oublierai jamais les bons moments que nous avons partagés, une mention spéciale au séjour à Rome que nous avons passé ensemble!! Je me souviendrai toujours des discussions que j'ai eu avec toi Mouna durant les longues sessions de comptage et Imen merci d'avoir été là tout simplement. "En effet" je te remercie pour ton soutien et tes encouragements surtout dans les moments les plus difficiles!!

Je tiens également à remercier Pr. Rodolphe Lemée, Dr. Cécile Jauzien et Sophie Marro pour leur accueil chaleureux et les bons moments partagés durant mes deux stages de formation au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV) à l'Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-mer (France).

Je voudrais remercier "My Friends Of Misery" Slayem, IN, Hamad, Sandoul, Hech et bien sûr les frères Souissi Boh et Haythem sans oublier Skou, Farhoud, yassinov, Riwi, maryouma et khawla pour leurs présence et encouragements sans faille.

Mes derniers remerciements vont à ma famille ; mes parents, ma sœur et mon frère à qui je dédie cette thèse. Merci de m'avoir toujours soutenue dans tout ce que j'ai pu entreprendre. Merci pour votre amour et votre présence. Une pensée pour Skan, Lalyous, Hadhoud et ma chère Kanzouza qui ont eu leur importance, sans le savoir, dans la réalisation de cette thèse. Merci à toute ma famille, mes oncles et tantes, avec une pensée particulière à mon oncle Med Ali qui m'a toujours soutenu.

J'espère n'oublier personne. Merci à vous tous, qui avez joué un rôle essentiel dans cette aventure et d'avoir supporté un gros rôleur comme moi!!

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée en cotutelle internationale entre l'Université de Tunis El Manar et l'Université de Bourgogne Franche-Comté au sein du Laboratoire Milieu Marin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM) centre la Goulette et du laboratoire Chrono-Environnement de Besançon.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le cadre du projet **M3-HABs** : Risk Monitoring, Modeling and Mitigation of Benthic Harmful Algal Blooms along Mediterranean coasts, financé par le programme de l'Union européenne ENPI-CBC Med (2014-2016).

Résumé

Le golfe de Tunis, subissant une forte pression anthropique, constitue un terrain propice aux efflorescences des dinoflagellés benthiques nuisibles (BHABs). Un suivi saisonnier de la distribution spatio-temporelle des microalgues épiphytes et planctoniques couplée à des facteurs environnementaux a été étudiée durant une année à partir d'octobre 2013 à octobre 2014 au niveau de 6 stations du golfe de Tunis. Les assemblages de microalgues nuisibles ont été dominés par trois dinoflagellés épiphytes toxiques : *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* et *Coolia monotis* qui ayant été observés à la fois sur des macrophytes et dans la colonne d'eau. La prolifération d'*Ostreopsis* sp. en lieu principalement en été alors que les efflorescences de *P. lima* et *C. monotis* ont été signalées au printemps. Une analyse morphométrique des cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* a permis de mettre en évidence une grande variabilité de la taille des cellules en fonction des différentes stations de prélèvement du golfe de Tunis. Le rapport dorso-ventral sur le diamètre antéro-postérieur (DV/AP) varie également selon la station de prélèvement. Un suivi hebdomadaire de la distribution spatio-temporelle des cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* épiphytes et planctoniques, couplée à des facteurs environnementaux a été étudiée durant les saisons estivales 2015 et 2016 au niveau de 5 stations de prélèvement du golfe de Tunis. Les efflorescences ont été principalement détectées entre les mois de juillet et d'août. Les concentrations d'*Ostreopsis* cf. *ovata* estimées ont été les plus élevées ($9,91 \times 10^5$ cell. g⁻¹ MF sur macroalgue et $5,11 \times 10^5$ cell. dm⁻³ dans la colonne d'eau) par rapport aux données déjà recensées sur les côtes Tunisiennes. Les pics d'*Ostreopsis* cf. *ovata* ont été observés lorsque la salinité et la température de l'eau ont atteint des valeurs élevées, et des concentrations faibles en nitrites, nitrates, azote total et silicates. Une variation spatiale est observée le long du littoral du golfe de Tunis, suggérant que certaines stations seraient plus propices au développement d'*Ostreopsis* cf. *ovata* que d'autres. Les méthodes de comptage alternatives MOL et OPR d'*Ostreopsis* cf. *ovata*, mises en place lors du projet M3-HABs et testées dans la présente étude, sont en bon accord avec les résultats du comptage manuel. Un modèle prédictif du type Quantile Random Forests a été utilisé et a pu décrire l'abondance d'*Ostreopsis* cf. *ovata* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes en réponse à 10 variables météorologiques employées dans ce modèle.

Mots clés : BHABs, Golfe de Tunis, Microalgues, Epiphytes, Planctoniques, Facteurs environnementaux, *Ostreopsis*, Analyse morphométrique, Modèle prédictif.

Abstract

The Gulf of Tunis, under high anthropogenic pressure, is a favorable terrain for harmful benthic dinoflagellate blooms (BHABs). Seasonal monitoring of the spatial and temporal distribution of epiphytic and planktonic microalgae coupled with environmental factors was studied for one year from October 2013 to October 2014 at 6 stations in the Gulf of Tunis. Harmful microalgae assemblages were dominated by three toxic epiphytic dinoflagellates: *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*. They were observed both in macrophytes and in the water column. The proliferation of *Ostreopsis* sp. is widespread in summer and blooms of *P. lima* and *C. monotis* were mainly recorded in spring. The morphometric analysis of *Ostreopsis* cells revealed a large variability in cell size at the different sampling stations of the Gulf. The dorso-ventral to antero-posterior diameter (DV/AP) ratio also varies from station to another. A weekly monitoring of the spatial and temporal distribution of *Ostreopsis* cf. *ovata* epiphytic and planktonic coupled with environmental factors was studied during 2015 and 2016 summer seasons at 5 stations in the Gulf of Tunis. The blooms were mainly detected between July and August. The concentrations of *Ostreopsis* cf. *ovata* measured are the highest ever recorded on the Tunisian coasts ($9,91 \times 10^5$ cell. g⁻¹ MF on macroalgae ; $5,11 \times 10^5$ cell. dm⁻³ in the water column). *Ostreopsis* cf. *ovata* peaks were observed when salinity and water temperature reached their high values, and when nitrites, nitrates, total nitrogen and silicates concentrations were low. Spatial variation is observed along the Gulf coast, suggesting that some sampling stations appear more favorable to the development of *Ostreopsis* cf. *ovata* than others. The alternative counting approaches MOL and OPR of *Ostreopsis* cf. *ovata*, implemented during the M3-HABs project and tested in this study, are in good agreement with the manual counting results. A predictive model of Quantile Random Forests type was used and could describe the abundance of *Ostreopsis* cf. *ovata* in the water column and macrophytes in response to 10 meteorological variables used within this model.

Keywords : BHABs, Gulf of Tunis, Epiphytic, planktonic, microalgae, Environmental factors, *Ostreopsis*, Morphometric analysis, Predictive model.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre 1. Etat des connaissances sur les efflorescences microalgales nuisibles (HABs)	8
1 Les efflorescences des microalgues nuisibles	8
1.1 La distribution mondiale des HABs	10
1.2 Impacts des HABs	14
1.3 Facteurs régulateurs des efflorescences des HABs	19
1.3.1 Les parasites, virus et bactéries	19
1.3.2 La compétition entre les microorganismes du phytoplancton	21
1.3.3 La prédation.....	21
2 Les Dinoflagellés	23
2.1 Les caractéristiques morphologiques	24
2.2 La reproduction	27
2.3 La répartition des Dinoflagellés	29
3 Les espèces du G. <i>Ostreopsis</i>	30
3.1 La répartition géographique	33
3.2 L'identification des espèces du G. <i>Ostreopsis</i>	37
3.2.1 La morphologie	37
3.2.2 Les critères taxonomiques	38
3.2.3 L'analyse moléculaire	39
3.3 Le profil toxinique des espèces du G. <i>Ostreopsis</i>	42
3.3.1 L'impact sanitaire	43
3.3.2 L'impact écologique	44
3.4 Ecologie des espèces du G. <i>Ostreopsis</i>	44
3.4.1 La température de l'eau	45
3.4.2 La luminosité	49
3.4.3 La salinité	49
3.4.4 Les nutriments	50
3.4.5 L'hydrodynamisme du littoral.....	52
3.4.6 La nature du substrat	52
3.5 La dynamique des efflorescences des espèces du G. <i>Ostreopsis</i>	53

Chapitre 2. Matériel et méthodes du travail..... 56

1 Caractéristiques du site d'étude : Le golfe de Tunis 56

1.1	La situation géographique	56
1.2	La morphologie côtière.....	57
1.3	Le réseau hydrographique	57
1.4	Les caractéristiques océanographiques.....	58
1.4.1	La Marée.....	58
1.4.2	La courantologie.....	58
1.5	Caractéristiques climatiques	59
1.5.1	La température de l'air	59
1.5.2	Les vents.....	60
1.5.3	La pluviométrie	61
1.6	Les pressions anthropiques.....	62
1.6.1	Les activités agricoles.....	63
1.6.2	Les activités industrielles	63
1.6.3	L'urbanisation	63
1.6.4	Les activités portuaires	64
1.6.5	Les activités touristiques	65

2 Méthodes de travail 65

2.1	Suivi saisonnier des espèces de microalgues épiphytes dans le golfe de Tunis (octobre 2013- octobre 2014).....	65
2.1.1	Localisation des stations de prélèvement	65
2.1.2	Stratégie d'échantillonnage des microalgues épiphytes dans le golfe de Tunis	67
2.2	Suivi estival du Dinoflagellé <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> dans le golfe de Tunis (2015 et 2016)....	68
2.2.1	Identification des espèces du Genre <i>Ostreopsis</i>	70
2.3	Dénombrement des microalgues	71
2.3.1	Méthode de comptage des microalgues au microscope inversé	71
2.3.2	Méthode de comptage automatique (OPR) et moléculaire (MOL)	72
2.4	Mesure des paramètres abiotiques.....	75
2.5	Estimation de la biomasse chlorophyllienne	76

3 Modèle prévisionnel des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *ovata* du golfe de Tunis..... 76

3.1	Acquisition des données pour la modélisation	77
3.1.1	Données recueillies sur les concentrations d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	77
3.1.2	Acquisition des variables pour la modélisation.....	77

3.2	Construction du modèle prédictif	78
3.3	Validation du modèle : Sensibilité et taux de faux positifs	79
4	Les analyses statistiques	80
4.1.1	Analyse de variance (ANOVA).....	80
4.1.2	Analyse de la redondance (ARD).....	80
4.1.3	Modèles additifs généralisés (GAM).....	81
Chapitre 3. Suivi saisonnier des microalgues épiphytes du golfe de Tunis .94		
1 Distribution saisonnière des microalgues épiphytes et dans la colonne d'eau du golfe de Tunis		94
1.1	Les conditions environnementales des eaux littorales du golfe de Tunis.....	94
1.2	Le phytoplancton des eaux côtières du golfe de Tunis.....	97
1.3	Occurrence des espèces de microalgues épiphytes du golfe de Tunis.....	99
1.4	Interactions entre les conditions du milieu et l'abondance des espèces de Dinoflagellés épiphytes : <i>P. lima</i> , <i>C. monotis</i> et <i>Ostreopsis</i> sp. des eaux côtières du golfe de Tunis	105
1.5	Scénario des événements des efflorescences associées aux microalgues épiphytes du golfe de Tunis.....	109
1.6	Discussion	117
Chapitre 4. Efflorescences d'<i>O. cf. ovata</i> du golfe de Tunis		138
1 Identification des espèces du Genre <i>Ostreopsis</i> du golfe de Tunis.....		138
1.1	Caractères d'identification morphologique.....	138
1.1.1	Description des cellules.....	138
1.1.2	L'étude morphométrique.....	142
1.2	Discussion	145
2 Variations spatio-temporelles de l'abondance d'<i>Ostropsis cf. ovata</i> dans le golfe de Tunis		150
2.1	Variations spatio-temporelles de l'abondance des cellules d' <i>Ostropsis cf. ovata</i>	150
2.1.1	Variations spatio-temporelles de l'abondance des cellules d' <i>Ostropsis cf. ovata</i> en 2015.....	150
2.1.2	Variations spatio-temporelles de l'abondance des cellules d' <i>Ostropsis cf. ovata</i> en 2016.....	151
2.2	Interactions entre l'abondance des populations d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> et les conditions du milieu du golfe de Tunis.....	156
2.2.1	La température de l'eau et la salinité	157
2.2.2	Les teneurs en azote total	158
2.3	Interactions entre <i>Ostreopsis cf. ovata</i> et les espèces de Dinoflagellés épiphytes : <i>P. lima</i> , <i>C. monotis</i> du golfe de Tunis	158

2.4	Déterminisme des proliférations d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> dans la station de Salammbô	159
2.4.1	Evolution temporelle des proliférations d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	159
2.4.2	Méthode de comptage automatique (OPR) et moléculaire (MOL)	164
2.4.3	Interactions entre l'abondance des populations d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> et les paramètres environnementaux	165
2.5	Discussion	169
3	Modèle prévisionnel des efflorescences d'<i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> du golfe de Tunis.....	186
3.1	Modèle prédictif	186
3.2	Validation du modèle : Sensibilité et taux de faux positifs	190
3.3	Discussion	191
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	195
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	200

Liste des Figures

Figure 1 : (a) Marée rouge à Leigh, près du Cap Rodney, Nouvelle Zélande © Miriam Godfrey (b) Bioluminescence du Dinoflagellé <i>Lingulodinium polyedrum</i> (source : http://cimt.ucsc.edu).....	9
Figure 2 : Mousse de <i>Phaeocystis globosa</i> , Caroline du Sud (photo © Lee Coursey).....	9
Figure 3 : Répartition mondiale des évènements du type DSP (Reguera <i>et al.</i> , 2014).	11
Figure 4 : Épisodes des efflorescences phytoplanctoniques enregistrés le long des côtes méditerranéennes (a) avant 1980, (b) en 2015 (Cecchi <i>et al.</i> , 2016).....	12
Figure 5 : (a) Mortalités massives de poissons suite à une efflorescence de <i>Karenia brevis</i> dans le golfe du Mexique (photo prise par Brazosports) ; (b) Mortalités massives du thon rouge en Australie méridionale, associées aux efflorescences de <i>Chattonella marina</i> (Dorantes-Aranda <i>et al.</i> , 2013).	17
Figure 6 : Schéma du comportement discriminatoire chez certains Copépodes vis à vis de leurs proies (Présent travail).	22
Figure 7 : Morphologie d'une cellule de Dinoflagellé à thèque (d'après Fensome <i>et al.</i> , 1999).	25
Figure 8 : Arrangements flagellaires chez les Dinoflagellés. (a) Arrangement dinokonté (cas des <i>Prorocentrum</i>), (b) Arrangement desmokonté (cas des <i>Gymnodinium</i>). (Taylor, 2006, modifié d'après Taylor, 1989).	25
Figure 9 : Exemple d'un Dinoflagellé nu, <i>Gymnodinium mikimotoi</i> : (a) vue ventrale montrant un sillon apical, (b) vue dorsale montrant les plastes à pyrénolide, (c) vue ventrale montrant le noyau de forme elliptique (Source 2001 : http://www.marbot.gu.se).....	26
Figure 10 : Exemples de Dinoflagellés à thèque (clichés SEM) : (a) <i>Alexandrium tamarense</i> , (b) <i>Gonyaulax polyedra</i> , (c) <i>Ceratium cf. horridum</i> , (d) <i>Dinophysis cf. caudata</i> , (e) <i>Prorocentrum micans</i> , (f) <i>Protoperidinium</i> sp. (Quéguiner, 2013).	26
Figure 11 : Principe de numérotation des plaques celluloses (tabulation) chez les Dinoflagellés cuirassés selon Faust <i>et al.</i> , (1996), (a) modifié d'après Fukuyo (1981), (b) selon Besada (1982) (cas d' <i>Ostreopsis</i>).....	27
Figure 12 : Schéma du cycle biologique des Dinoflagellés montrant l'alternance entre la multiplication végétative, la reproduction sexuée et l'enkystement (Présent travail).	28
Figure 13 : Les modèles de plaques des cellules du G. <i>Ostreopsis</i> (a) modifié d'après Hoppenrath <i>et al.</i> , (2014), (b) <i>Ostreopsis rhodesae</i> (Verma <i>et al.</i> , 2016), épithèque (E), hypothèque (H).....	31
Figure 14 : Réseau du mucilage associé aux cellules d' <i>Ostreopsis ovata</i> : (a) Les cellules attachées à un réseau complexe de minuscules filaments, avec ancrage du côté ventral (flèches), (b) Abondance de polysaccharides acides autour des cellules, (c) Cellule pourvue d'un long filament du côté ventral, (d) Cellule observée par microscopie électronique à balayage, (e) Cellules fixées au glutaraldéhyde colorées avec Alcian Blue 8GX, (f) Trichocystes d'une cellule (d'après Honsell <i>et al.</i> , 2013).	32
Figure 15 : Distribution mondiale des espèces du G. <i>Ostreopsis</i> (Rhodes, 2011).	33
Figure 16 : Distribution des espèces du G. <i>Ostreopsis</i> en Méditerranée.....	34
Figure 17 : Distribution des espèces du G. <i>Ostreopsis</i> le long des côtes Tunisiennes.	36
Figure 18 : Tabulation d'une cellule d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> ; (a) vue apicale, (b) vue antapicale au moyen de la Microscopie par épifluorescence. (d'après Monti <i>et al.</i> , 2007).	37
Figure 19 : Arbre phylogénétique à probabilité maximale du G. <i>Ostreopsis</i> sur la base des séquences du gène ribosomique ITS-5.8S. <i>Coolia monotis</i> VGO783 identifié comme exogroupe d'après Accoroni <i>et al.</i> , (2016).	40
Figure 20 : Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance du G. <i>Ostreopsis</i> déduit des séquences du gène ribosomique LSU. <i>Coolia canariensis</i> VGO786 identifié comme exogroupe d'après Accoroni <i>et al.</i> , (2016).	41

Figure 21 : Structure de la palytoxine (Ciminiello <i>et al.</i> , 2010).....	42
Figure 22 : Kystes d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> observés à partir de cultures. (a) Cellule végétative produisant un kyste à paroi mince observé au moyen de la microscopie par épifluorescence, (b, e, d) Kyste à paroi mince sous microscope optique, (c) Kyste à paroi mince montrant le protoplaste en division, (f, g) Kystes à double paroi, (h) Kystes à double paroi incorporés dans le mucus (Accoroni <i>et al.</i> , 2014).....	46
Figure 23 : Diagramme conceptuel de l'effet du rapport N:P et de la température de l'eau sur les efflorescences d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (modifié d'après Accoroni <i>et al.</i> , 2015).	51
Figure 24 : Schéma récapitulatif du couplage benthique-pélagique avec présence d'agrégats mucilagineux d' <i>Ostreopsis</i> (modifié d'après Mangialajo <i>et al.</i> , 2011).	54
Figure 25 : Interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques et la biomasse des espèces du G. <i>Ostreopsis</i>	55
Figure 26 : Situation géographique du golfe de Tunis.	56
Figure 27 : Courants induits par les vents dans le golfe de Tunis. (a) de direction Est, (b) de direction Nord-Ouest (d'après Brahim <i>et al.</i> , 2007).	59
Figure 28 : Températures moyennes de l'air (golfe de Tunis de 2013 - 2016 ; INM, 2018).	60
Figure 29 : Rose des vents au large du golfe de Tunis (d'après Brahim <i>et al.</i> , 2007).	61
Figure 30 : Valeurs mensuelles de la pluviométrie (golfe de Tunis de 2013 - 2016 ; INM, 2018).....	62
Figure 31 : Localisation des stations de prélèvement pour le suivi saisonnier des espèces de microalgues épiphytes du golfe de Tunis (octobre 2013-octobre 2014).	67
Figure 32 : Localisation des stations de prélèvement pour le suivi estival d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> dans le golfe de Tunis (Étés 2015 et 2016).....	70
Figure 33 : Mensurations effectuées sur les cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> du golfe de Tunis. (a) DV/W; (b) DV/AP avec (DV) diamètre dorso-ventral, (W) le diamètre transversal, (AP) diamètre antéro-postérieur (modifié d'après Accoroni <i>et al.</i> , 2012).....	71
Figure 34 : Dispositif utilisé pour le comptage automatique (OPR) des cellules d' <i>O. cf. ovata</i>	73
Figure 35 : Localisation des stations de prélèvement le long du golfe de Tunis.....	77
Figure 36 : Variation de l'abondance des Dinoflagellés épiphytes (<i>Ostreopsis sp.</i> , <i>P. lima</i> et <i>C. monotis</i>) en fonction de la nature du substrat (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).....	100
Figure 37 : Variation de l'abondance d' <i>Ostreopsis sp.</i> , <i>Prorocentrum lima</i> et <i>Coolia monotis</i> en fonction des espèces de macrophytes. Macrophytes : <i>Cystoseria sp.</i> (C. sp), <i>Cymodocea nodosa</i> (C.N), <i>Gracilaria gracilis</i> (G.G), <i>Posidonia oceanica</i> (P.O), <i>Dictyota dichotoma</i> (D.D), <i>Mesophyllum expansum</i> (M.E), <i>Corallina elongata</i> (C.E), <i>Enteromorpha intestinalis</i> (E.I), <i>Laurencia sp.</i> (L. sp), <i>Dictyopteris polypodioides</i> (D.P), <i>Padina pavonica</i> (P.P), <i>Jania rubens</i> (J.R), <i>Codium fragile</i> (C.F), <i>Sargassum vulgare</i> (S.V). (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).	101
Figure 38 : Tendances temporelle de l'abondance d' <i>Ostreopsis sp.</i> , <i>Prorocentrum lima</i> et <i>Coolia monotis</i> dans la colonne d'eau et sur les macrophytes (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).....	89
Figure 39 : Variation de l'abondance des Dinoflagellés épiphytes (<i>O. sp.</i> , <i>P. lima</i> et <i>C. monotis</i>) en fonction de l'heure d'échantillonnage (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).....	105
Figure 40 : Association entre les principales espèces de Dinoflagellés épiphytes et les stations de prélèvements. Les valeurs propres des deux premiers axes sont indiquées par λ_1 et λ_2 (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).	106
Figure 41 : Tendances des Dinoflagellés épiphytes en fonction des saisons. Les valeurs propres des deux premiers axes sont indiquées par λ_1 et λ_2 (golfe de Tunis octobre 2013 à octobre 2014).	107

Figure 42 : Interactions entre les facteurs abiotiques et les Dinoflagellés épiphytes (a) La profondeur de la station de prélèvement, (b) Les facteurs physico-chimiques. Les valeurs propres des deux premiers axes sont indiquées par λ_1 et λ_2 (golfe de Tunis octobre 2013 à octobre 2014).....	108
Figure 43 : Scénario des évènements associés aux efflorescences des microalgues épiphytes du golfe de Tunis. (a, b, c) <i>Ostreopsis</i> sp., (d, e, f) <i>Prorocentrum lima</i> , (g, h, i) <i>Coolia monotis</i> (Macrophytes collectés : <i>Cymodocea nodosa</i> (C.N), <i>Padina pavonica</i> (P.P), <i>Dictyota dichotoma</i> (D.D), <i>Jania rubens</i> (J.R)).....	111
Figure 44a : Description des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> des stations de prélèvements, (a1, a2, a3) Salammbô, (b1, b2, b3) Cap Zebib (en vue apicale, antapicale, vue latérale), (golfe de Tunis, juillet 2015 et juillet 2016).	140
Figure 44b : Description des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> des stations de prélèvements, (c1, c2, c3) Sidi Daoud, (d1, d2, d3) Sidi Ali el Mekki, (e1, e2, e3) Sidi Rais (en vue apicale, antapicale, vue latérale), (golfe de Tunis, juillet 2015 et juillet 2016).....	141
Figure 45 : Mensurations des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> du golfe de Tunis. (a) Diamètre dorso-ventral (DV), (b) Transdiamètre (W), Diamètre antéro-postérieur (AP), le rapport (DV/W), le rapport (DV/AP), (juillet 2015 et juillet 2016).	143
Figure 46 : Abondance des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> épiphytes et planctoniques (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).....	152
Figure 47 : Variations annuelles de l'abondance totale d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> , (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).....	153
Figure 48 : Variations mensuelles de l'abondance totale d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> , (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).....	154
Figure 49 : Variation spatiale de l'abondance d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> , (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).....	155
Figure 50 : Variations de l'abondance d' <i>O.</i> cf. <i>ovata</i> (cell. g ⁻¹ MF) golfe de Tunis en fonction de : (a) Nature du substrat, (b) Groupes de macrophytes et (c) Espèces de macrophytes. Macrophytes : <i>Dictyopteris polypodioides</i> (D.P), <i>Dictyota dichotoma</i> (D.D), <i>Cymodocea nodosa</i> (C.N), <i>Padina pavonica</i> (P.P), <i>Cystoseria</i> sp. (C. sp), <i>Jania rubens</i> (J.R), <i>Gelidium</i> sp.(G. sp), <i>Enteromorpha intestinalis</i> (E.I), <i>Posidonia oceanica</i> (P.O), (étés 2015 et 2016).	156
Figure 51 : Relation entre l'abondance d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> et la température de l'eau et la salinité, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).	157
Figure 52 : Relation entre l'abondance d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> et la teneur en azote total, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).	158
Figure 53 : Abondance des espèces de microalgues épiphytes <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> , <i>Coolia monotis</i> et <i>Prorocentrum lima</i> (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).	159
Figure 54 : Abondance d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> épiphytes et planctoniques dans la station de Salammbô, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).	161
Figure 55 : Variations annuelles de l'abondance d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> (Salammbô, saisons estivales 2015 et 2016).....	162
Figure 56 : Variations mensuelles de l'abondance d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> (Salammbô, saisons estivales 2015 et 2016).....	163
Figure 57 : Variations de l'abondance d' <i>O.</i> cf. <i>ovata</i> (cell. g ⁻¹ MF) en fonction des espèces de macrophytes. <i>Corallina elongata</i> (C.E), <i>Cymodocea nodosa</i> (C.N), <i>Cystoseria</i> sp. (C. sp), <i>Dictyota dichotoma</i> (D.D), <i>Enteromorpha intestinalis</i> (E.I), <i>Gelidium</i> sp.(G. sp), <i>Gracilaria gracilis</i> (G.G), <i>Padina pavonica</i> (P.P), <i>Sargassum vulgare</i> (S.V), <i>Ulva rigida</i> (U.R).....	163
Figure 58 : Comparaison des méthodes de comptage automatiques et du comptage manuel pour les microalgues. (a) épiphytes, (b). planctoniques. Les points bleus et les points verts représentent la	

numération optique [OPR] et la numération par qPCR moléculaire [MOL] respectivement. La ligne en pointillé représente la bissectrice. (Salammbô, été 2015).	164
Figure 60 : Abondance des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> en fonction de la teneur en chlorophylle <i>a</i> (Station de Salammbô, étés 2015 et 2016).	168
Figure 61 : Prédiction de la concentration des cellules d' <i>O. cf. ovata</i> à partir de la pondération de chaque variable utilisée dans le modèle "Quantile Random Forests".(a) dans la colonne d'eau, (b) sur les macrophytes (golfe de Tunis, 2013-2016).	187
Figure 62 : Précision des prévisions dans la colonne d'eau. (a) Concentrations moyennes des cellules d' <i>O. cf. ovata</i> estimées par rapport aux valeurs réelles. (b) Résidus des concentrations moyennes estimées par rapport aux valeurs réelles. (golfe de Tunis, 2013-2016).	188
Figure 63 : Précision des prévisions sur les macrophytes. (a) Concentrations moyennes des cellules d' <i>O. cf. ovata</i> estimées par rapport aux valeurs réelles. (b) Résidus des concentrations moyennes estimées par rapport aux valeurs réelles. (golfe de Tunis, 2013-2016).	189

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des principales phycotoxines associées aux microalgues toxiques (Diatomées, Cyanobactéries et Dinoflagellés) (Anderson <i>et al.</i> , 2017).	16
Tableau 2 : Conditions du milieu lors des proliférations des espèces du G. <i>Ostreopsis</i> dans des zones tempérées.....	48
Tableau 3 : Répartition des proportions de la charge des rejets des eaux urbaines drainées dans le golfe de Tunis (MEDD, 2009).	64
Tableau 4 : Répartition des proportions de la charge des rejets des déchets solides drainée dans le golfe de Tunis (MEDD, 2009).	64
Tableau 5 : Coordonnées géographiques et caractéristiques des stations de prélèvements du golfe de Tunis (octobre 2013- octobre 2014).	66
Tableau 6 : Coordonnées géographiques et caractéristiques des stations de prélèvements du golfe de Tunis (Saisons estivales 2015 et 2016).	69
Tableau 7 : Paramètres météorologiques et variables abiotiques enregistrés pour chaque saison dans le golfe de Tunis. (www.wunderground.com et www.worldweatheronline.com).	96
Tableau 8 : Concentrations moyennes (cell. dm ⁻³) des espèces de microalgues dominantes dans la colonne d'eau (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014). (*) Taxons strictement benthiques.	98
Tableau 9 : Concentrations moyennes (cell. g ⁻¹ MF) des principales espèces de microalgues épiphytes sur les macrophytes (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014). (*) Taxons strictement planctoniques.....	103
Tableau 10 : Inventaire des macrophytes. (r) Thalles ramifiés, (nr) Thalles non ramifiés, (f) Feuilles X: présence dans la station (SD) Sid Daoud, (SR) Sidi Rais, (K) Korbous, (SM) Sid Ali el Mekki, (G) Gamarth, (S) Salammbô (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).....	104
Tableau 11 : Corrélations enregistrées entre les paramètres météorologiques et l'abondance des espèces de microalgues (<i>Ostriopsis</i> sp., <i>P. lima</i> et <i>C. monotis</i>) présentes sur les macrophytes et dans la colonne d'eau.	109
Tableau 12 : Inventaire des microalgues planctoniques et épiphytes potentiellement toxiques du golfe de Tunis (octobre 2013 à octobre 2014), (Min) Concentrations minimales, (Max) Concentrations maximales, (DSP) Diarrheic Shellfish Poisoning, (HA) Hypoxie/Anoxie, (PSP) Paralytic Shellfish Poisoning, (ASP) Amnesic Shellfish Poisoning, (PLTX) Palytoxine, (Y) Yessotoxine, (E) Efflorescence, (P) Planctoniques, (E) Epiphytes.....	112
Tableau 13a : Abondance des espèces d' <i>Ostreopsis</i> détectées dans le golfe de Tunis depuis 2001. cell. dm ⁻³ (colonne d'eau) et cell. g ⁻¹ MF (cellules épiphytes). (-) Aucune donnée disponible.	121
Tableau 13b : Abondance de l'espèce <i>Prorocentrum lima</i> détectée dans le golfe de Tunis depuis 2001. cell. dm ⁻³ (colonne d'eau) et cell. g ⁻¹ MF (cellules épiphytes). (-) Aucune donnée disponible.....	122
Tableau 13c : Abondance de l'espèce <i>Coolia monotis</i> détectée dans le golfe de Tunis depuis 2001. cell. dm ⁻³ (colonne d'eau) et cell. g ⁻¹ MF (cellules épiphytes). (-) Aucune donnée disponible.....	123
Tableau 14 : Mensurations effectuées sur les plaques thécales des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> du golfe de Tunis, (1') Plaque de l'épithèque, (Po) Pore apical, (1p) Plaque de l'hypothèque et cingulum, (S) Salammbô, (SD) Sidi Daoud, (SR) Sidi Rais, (SM) Sidi Ali el Mekki, (CZ) Cap Zebib. (juillet 2015 et juillet 2016) (n=1206).....	139
Tableau 15 : Caractéristiques morphométriques des cellules d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> au niveau des stations de prélèvement (DV) Diamètre dorso-ventral, (W) Transdiamètre (AP) Diamètre antéro-postérieur (golfe de Tunis, juillet 2015 et juillet 2016) (n=1206).	144

Tableau 16 : Comparaison des mensurations des cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> du golfe de Tunis par rapport aux données recueillies dans d'autres régions..	148
Tableau 17 : Analyses statistiques, R ² , le coefficient de corrélation de Pearson ρ , (RMS) erreur quadratique moyenne des valeurs estimées par rapport aux valeurs réelles des concentrations en log10 d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> dans la colonne d'eau et sur les macrophytes	190
Tableau 18 : Sensibilité du modèle prévisionnel et taux de faux positifs pour les prédictions générées par rapport aux données enregistrés dans le golfe de Tunis.	191

LISTE DES ABREVIATIONS

AD : Acide domoïque
ANOVA : Analyse de variance
AO : Acide Okadaïque
AP : Diamètre antéro-postérieur
ARD : Analyse de la redondance
ASP : Amnesic Shellfish Poisoning
ATX-a : Anatoxine-a
AZP : AZaspiracid shellfish Poisoning
BHABs : Benthic Harmful Algae Blooms
BMAA : β -methylamino alanine
BTX-2 : Brèvètoxine-2
CFP : Ciguatera Fish Poisoning
Chl *a* : Chlorophylle *a*
DE : Dinoflagellés épiphytes
DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning
DV: Diamètre dorso-ventral
DV/AP : Rapport dorso-ventral/ antéro-postérieur
DV/W : Rapport dorso-ventral/ trans-diamètre
E : Epiphytes
EQM : Erreur Quadratique Moyenne
FE: Efflorescence
GAM : Modèles Additifs Généralisés
GYM : Gymnodimine
HA : Hypoxie/Anoxie
HABs : Harmful Algae Blooms
Max : maximum
MCTX : Mascarenotoxine
MC : Microcystine-LR
Min : minimum
MOL : Méthode de comptage moléculaire
 NH_4^+ : Ammonium
NOD : Nodularine
 NO_2^- : Nitrites
 NO_3^- : Nitrates
NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning
NT : Azote total
OPR: Méthode de reconnaissance optique
OST-D : Ostreosine-D
OVTXs : Ovatoxines
P : Planctoniques

PLTX : Palytoxine
PnTXs : Pinnatoxines
Po : Pore apical
 PO_4^{3-} : Orthophosphates
PSP : Paralytic Shellfish Poisoning
PT : Phosphore total
QRF: Quantile Random Forests
STX : Saxitoxine
 $\text{Si}(\text{OH})_4$: Silicates
TRX : Trichotoxines
W : trans-diamètre
Y : Yessotoxines
Ip : Plaque de l'hypothèque
I' : Plaque de l'épithèque

Introduction générale

Introduction générale

Le phytoplancton est considéré comme l'un des éléments les plus importants dans les écosystèmes marins, de différentes manières (i) producteur d'oxygène (Sekerci et Petrovskii, 2015), (ii) participant de façon constante à la production primaire nette globale qui constitue la principale source de nutrition pour toutes les formes de vie hétérotrophes dans la plupart des écosystèmes aquatiques (Field *et al.*, 1998), (iii) maillon central des réseaux trophiques (Stock *et al.*, 2017) et du cycle du carbone (Siegel *et al.*, 2014).

Ces microalgues peuvent atteindre des abondances élevées pendant les périodes de leur croissance optimale. De telles proliférations massives sont connues sous le nom d'efflorescences ou « Harmful Algal Blooms » (HABs). Certaines espèces de ces microalgues sont capables de produire des composés nocifs ou toxiques qui causent divers effets néfastes sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème. Ces substances peuvent endommager les écosystèmes, perturber le réseau trophique, causer la mortalité de nombreux organismes marins et présenter un risque important pour la santé humaine suite à la consommation de produits de la mer contaminés, ou dans le cas d'une exposition directe à l'eau ou aux aérosols contenant ces composés toxiques (Caron *et al.*, 2009).

Il est de plus en plus évident que les épisodes de prolifération d'algues nuisibles augmentent à l'échelle locale, régionale et mondiale depuis quelques décennies (Smayda, 1990 ; Hallegraeff, 1993 ; 2003, Anderson *et al.*, 2002 ; Glibert *et al.*, 2005a). Cette augmentation pourrait être due en grande partie à la dispersion mondiale d'espèces d'algues toxiques par le biais du transport maritime (Hallegraeff et Bolch, 1992 ; Burkholder *et al.*, 2007), à l'impact croissant des activités anthropiques sur les écosystèmes côtiers (Smayda, 1990 ; Anderson *et al.*, 2002 ; Glibert *et al.*, 2005b ; 2006 ; Howard *et al.*, 2007, Cochlan *et al.*, 2008 ; Kudela *et al.*, 2008) , et à l'amélioration de la détection des épisodes d'efflorescence. En effet, au cours des dernières décennies, les capacités de recherche et de gestion des HABs ont évolué de manière remarquable, alors qu'autrefois il n'y avait que des études limitées (Anderson *et al.*, 2012).

De nouvelles méthodes et technologies ont modifié la façon dont les HABs peuvent être surveillées et gérées (Scholin *et al.*, 2009 ; Campbell *et al.*, 2010 ; Anderson *et al.*, 2012). De nombreux programmes de surveillance nationaux et internationaux (IOC-HAB, GEOHAB,

ECO HAB, EURO HAB, REPHY, REBIO) ont été mis en place. L'objectif global de ces programmes de surveillance est de favoriser la gestion efficace et la recherche scientifique sur les proliférations d'algues nuisibles afin de comprendre leurs causes, prévoir leurs occurrences et atténuer leurs effets. Cet objectif global englobe 3 volets majeurs: éducatif, scientifique et opérationnel. Le volet éducatif peut être séparé en deux branches (i) les réseaux d'information (ii) la formation et le renforcement des capacités. L'élément scientifique peut être divisé en 3 domaines (j) écologie et océanographie (jj) taxonomie et génétique (jjj) et toxicologie et chimie des toxines. Les objectifs des programmes de surveillance portent principalement sur les risques associés à la santé publique et la surveillance de l'environnement littoral par la protection des ressources.

Tous ces programmes de surveillance répondent à des exigences réglementaires, notamment les contrôles officiels des zones de production de mollusques bivalves (REMI : Réseau de contrôle microbiologique des zones de production de coquillages), mais également à des questions scientifiques et à des préoccupations sanitaires et socio-économiques.

Parmi les HABs figurent les proliférations des Dinoflagellés benthiques "BHABs" (Benthic Harmful Algal Blooms) particulièrement celles des Dinoflagellés du genre *Ostreopsis*, qui depuis 1995 (Usami *et al.*, 1995) sont connus pour produire des toxines, de la famille des palytoxines. Le long des côtes méditerranéennes européennes, les efflorescences d'*Ostreopsis* ont été signalées auparavant en Espagne, en France, en Italie, en Croatie et en Grèce (Vila *et al.*, 2001a ; Aligizaki *et al.*, 2009 ; Ignatiades et Gotsis-Skretas, 2010 ; Cohu *et al.*, 2011 ; GEOHAB, 2012 ; Blanfuné *et al.*, 2015 ; Accoroni et Totti, 2016). La présence d'*Ostreopsis* a également été signalée récemment dans d'autres pays du sud de la méditerranéens tels que la Tunisie, l'Égypte et le Liban (Turki, 2005 ; Turki *et al.*, 2006 ; Iloul *et al.*, 2012 ; Ismael et Halim, 2012 ; Abboud-Abi Saab *et al.* 2013 ; Turki *et al.*, 2014).

La large répartition d'*Ostreopsis* dans les zones tempérées (Rhodes, 2010) a contribué à l'apparition de programmes favorisant une plus grande connaissance du phénomène lié aux efflorescences de ces microalgues.

La Conférence Internationale sur le Développement des microalgues du G. *Ostreopsis* (International Conference on *Ostreopsis* Development - ICOD) qui s'est tenue à Villefranche-sur-Mer, en avril 2013, avait pour objectif de regrouper les connaissances sur les aspects

écologiques, chimiques et toxicologiques des espèces du *G. Ostreopsis*, ainsi que les différentes méthodes de gestion écologique, économique et sanitaire.

Cette conférence a été l'événement déclencheur du montage du projet M3-HABs (Risk Monitoring, Modeling and Mitigation of Benthic Harmful Algal Blooms along Mediterranean coasts) qui a eu pour principaux objectifs l'optimisation et la standardisation des méthodes de prélèvement et de comptage des microalgues benthiques toxiques du *G. Ostreopsis*, l'étude des facteurs environnementaux régulant leur croissance, la modélisation de leur développement et enfin l'optimisation de la communication liée à la gestion de ce risque.

Dans le cadre de ce projet, plusieurs études ont été publiées concernant :

- L'optimisation des méthodes communes de prélèvement, de traitement et de comptage des microalgues du *G. Ostreopsis* dans l'eau de mer. Cette étude contribue à définir les stratégies les plus appropriées pour la surveillance et l'atténuation des efflorescences d'*Ostreopsis* dans les eaux côtières, en redéfinissant les étapes les plus efficaces pour la collecte et la fixation des échantillons et en caractérisant le volume optimal nécessaire pour un comptage fiable des cellules planctoniques (Jauzein *et al.*, 2018).
- Le développement de deux méthodes innovantes pour le dénombrement automatisé des concentrations d'*Ostreopsis* spp. dans l'eau de mer. Ces deux méthodes concernent une Reverse Transcriptase PCR (RT-qPCR) basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques aux espèces d'*Ostreopsis* et un dispositif opto-électronique mettant en œuvre des algorithmes de reconnaissance automatique. En plus de leur capacité à discriminer les différentes espèces du *G. Ostreopsis*, ces deux approches automatiques ont démontré leur efficacité et fournissent, par conséquent, un outil précieux, surtout en termes de coût et de temps, pour l'établissement de larges stratégies de surveillance de ces microalgues (Vassalli *et al.*, 2018).
- Le montage et le développement d'un nouveau protocole d'échantillonnage non destructif des HABs, appelé Intégrateur de Dinoflagellés Benthiques (BEDI). Cette nouvelle méthode, ayant pour but de quantifier les proliférations d'*Ostreopsis* de manière simple et fiable, entre dans le cadre de l'optimisation de la méthodologie commune d'échantillonnage (Mangialajo *et al.*, 2017).
- L'amélioration de la technique classique de prélèvement des macrophytes en utilisant des substrats artificiels faits d'écrans en fibre de verre lors des épisodes de

prolifération d'*Ostreopsis*. Cette nouvelle installation moins destructive et standardisée, a montré des résultats efficaces et comparables avec ceux de la méthode classique (Jauzein *et al.*, 2016).

- Les effets des proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata* sur les différents stades du cycle de vie de la méduse commune *Aurelia* sp. Cette étude a montré que le stade éphyra était plus vulnérable que le stade polype face aux toxines libérées lors des épisodes d'efflorescence (Giussani *et al.*, 2016).
- Le développement d'une méthodologie de modélisation qui a pu décrire avec précision l'abondance d'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau en réponse aux variables météorologiques du milieu. Ce modèle bénéficie d'une grande flexibilité dans les prévisions générées, le rendant ainsi utilisable comme outil de prédiction des concentrations d'*Ostreopsis* par les agences environnementales et de la santé publique (Asnaghi *et al.*, 2017).
- Le développement d'un nouveau système de comptage appelé OvMeter. Il s'agit d'un système opto-électronique innovant, automatisé et peu coûteux qui est capable d'accélérer le processus de comptage et de surveillance et par conséquent, permet l'alerte précoce des proliférations d'algues nuisibles. En plus du comptage, ce logiciel permet la reconnaissance automatique des cellules d'*Ostreopsis* et le calcul, en temps réel, de la concentration finale des microalgues (Sbrana *et al.*, 2017).
- L'évaluation de la toxicité des microalgues du G. *Ostreopsis* sur des cellules de mammifères. Dans ce travail, des réseaux neuronaux couplés, *in vitro*, avec un système à base de microélectrodes (MEA) ont été utilisés comme biocapteurs sensibles face à l'effet toxique des cultures d'*Ostreopsis cf. ovata* (Alloisio *et al.*, 2016).
- La description d'une nouvelle espèce : *Ostreopsis fattorussoi*, isolée durant le projet au niveau des côtes libanaises et chypriotes (Méditerranée orientale). L'identification de cette nouvelle espèce s'est faite sur la base des caractéristiques moléculaires et ultrastructurales des échantillons naturels et de culture de cette microalgue. Son écologie ainsi que son profil toxinique ont été analysés à partir des échantillons prélevés le long des côtes du Liban (Accoroni *et al.*, 2016).

Ce travail de thèse s'inscrit ainsi dans un large contexte ayant pour objectif le développement d'une stratégie commune à l'échelle de la Méditerranée portant sur la détection des microalgues du G. *Ostreopsis* et aux risques associés à la prolifération de ces Dinoflagellés benthiques toxiques dans les eaux côtières du golfe de Tunis. Dans cet écosystème, la plupart des études portant sur la distribution spatiale et temporelle des communautés du phytoplancton, parmi lesquelles les Dinoflagellés benthiques nuisibles ont été réalisées au niveau d'une zone géographique restreinte dans les eaux côtières peu profondes du golfe de Tunis (Daly Yahia-Kéfi *et al.*, 2001; Turki, 2005; Aissaoui *et al.*, 2012, 2014 ; Ben Gharbia *et al.*, 2016), ou des lagunes avoisinantes (Romdhane *et al.*, 1998 ; Sakka *et al.*, 2006 ; Sahraoui *et al.*, 2009 ; Armi *et al.*, 2011 ; Smida *et al.*, 2012 ; Fertouna-Bellakhal *et al.*, 2014 ; Turki *et al.*, 2006, 2014 ; Dhib *et al.*, 2015 ; Ben Gharbia *et al.*, 2017 ; Triki *et al.*, 2017).

L'objectif de ce mémoire de thèse porte sur l'identification et le déterminisme des efflorescences associées au développement des espèces du G. *Ostreopsis* dans les eaux côtières du golfe de Tunis, en se focalisant sur :

- l'évaluation de la qualité des eaux côtières du golfe de Tunis dans les sites balnéaires en fonction de la variabilité des teneurs en sels nutritifs, de la biomasse chlorophyllienne et la détection d'espèces bio-indicatrices,
- l'identification et l'estimation des variations saisonnières de l'abondance des Dinoflagellés épiphytes du G. *Ostreopsis* dans les eaux côtières du golfe de Tunis, à partir des prélèvements de différentes espèces de macroalgues brunes et rouges ainsi que les magnoliophytes représentées par les espèces *Posidonia oceanica* et *Cymodocea nodosa*,
- l'étude des interactions entre les facteurs environnementaux et la nature du substrat sur le développement des populations microalgales épiphytes des espèces du G. *Ostreopsis* dans les eaux côtières du golfe de Tunis et,
- le développement d'un modèle de prédiction des épisodes d'efflorescence d'*Ostreopsis* dans les eaux côtières du golfe de Tunis.

Ce mémoire de thèse s'articule en quatre chapitres répartis comme suit :

CHAPITRE I. Etat des connaissances sur les proliférations microalgales du genre *Ostreopsis*

Ce chapitre se focalise sur divers rappels bibliographiques concernant :

- une présentation des efflorescences des microalgues nuisibles (HABs) portant sur leur description, leur apparition, leur distribution dans le monde, leurs impacts environnementaux, sanitaires et socio-économiques et les facteurs régulateurs de leur efflorescences.
- un bref rappel de la classe des Dinoflagellés incluant les aspects morphologiques des cellules, le cycle de vie, le mode de nutrition et la distribution des différentes espèces.
- une synthèse sur les microalgues du G. *Ostreopsis* qui met en évidence la description des différentes espèces, leurs répartitions géographiques, les différentes méthodes d'identification, les aspects bio-écologiques, leurs profils toxiques et l'impact de ces espèces sur la santé humaine et sur les autres organismes.

CHAPITRE II. Matériel et méthodes de travail

Ce chapitre présente l'ensemble des méthodes et protocoles expérimentaux utilisés au cours des différentes activités effectuées.

CHAPITRE III. Suivi saisonnier des microalgues du golfe de Tunis.

Les principaux résultats portent sur un suivi spatio-temporel saisonnier des microalgues au niveau de 6 stations de prélèvement du golfe de Tunis, au cours de la période allant d'octobre 2013 jusqu'au octobre 2014.

CHAPITRE IV. Identification et suivi des efflorescences estivales d'*O. cf. ovata* du golfe de Tunis.

Dans ce chapitre, les principaux résultats portent sur :

- une identification des espèces du genre *Ostreopsis* des eaux côtières du golfe de Tunis.
- un suivi spatio-temporel durant les saisons estivales des cellules d'*Ostreopsis* au cours des années 2015 et 2016,
- l'utilisation des données portant sur la présence des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* sur les macrophytes et dans la colonne d'eau de mer au niveau de 7 stations de prélèvement du golfe de Tunis, recueillies dans la présente étude durant la période allant de 2013 à 2015. Les échantillons ont été collectés pendant les saisons estivales et automnales, du mois de juin jusqu'au mois de novembre dans le but de développer un modèle de

prédiction des épisodes à efflorescences microalgales dans les eaux côtières du golfe de Tunis.

Chapitre 1

Etat des connaissances sur les efflorescences microalgales nuisibles (HABs)

Chapitre 1. Etat des connaissances sur les efflorescences microalgales nuisibles (HABs)

1 Les efflorescences des microalgues nuisibles

Les efflorescences microalgales nuisibles (HABs) constituent un problème majeur dans les écosystèmes marins, saumâtres et d'eau douce à l'échelle mondiale (Hallegraeff, 1993). Les proliférations de ces microalgues se produisent de manière naturelle dans certaines régions fertiles (comme les prairies nord-américaines), et certains récits historiques évoquent que l'apparition de ces efflorescences remonte à au moins deux millénaires (Carmichael, 2008). Cependant, la dégradation incessante de l'environnement au cours du siècle dernier, a considérablement augmenté l'intensité et l'étendue géographique de ces événements dans les grands et les petits lacs, les réservoirs, les rivières, les étangs et les mers (Paerl et Paul 2011 ; Kling *et al.*, 2011 ; Jakobsen *et al.*, 2012 ; Teen *et al.*, 2012 ; Zohary *et al.*, 2012 ; Lundgren *et al.*, 2015 ; Sanseverino *et al.*, 2016).

Les HABs sont symptomatiques du déséquilibre des écosystèmes, souvent engendré par de nombreux changements environnementaux (activités anthropiques, changement climatique, etc.), et sont typiquement plus sévères et plus fréquents dans les eaux eutrophes et mésoeutrophes, mais peuvent également se produire occasionnellement dans les écosystèmes moins "productifs" (Nicholls *et al.*, 1982 ; Watson *et al.*, 1999 ; Søndergaard *et al.*, 2007 ; Noges *et al.*, 2010 ; Carey *et al.*, 2012 ; Francis *et al.*, 2014 ; Kudela *et al.*, 2015).

Les épisodes d'efflorescence de microalgues nuisibles sont causés par des proliférations phytoplanctoniques appartenant principalement aux groupes de Diatomées et surtout de Dinoflagellés, des protistes unicellulaires autotrophes, hétérotrophes ou mixotrophes (Sournia, 1995 ; Hallegraeff *et al.*, 2004).

Du fait de leur grande visibilité, les efflorescences de certaines microalgues peuvent se manifester de façons différentes :

- l'apparition de marées de différentes couleurs, le plus souvent rouges, vertes ou brunes. L'apparition de ces couleurs est principalement due aux pigments chlorophylliens que contiennent les microalgues. Les principales espèces impliquées

dans les marées rouges sont des espèces de Dinoflagellés du genre *Alexandrium* (Delgado *et al.*, 1990 ; Horner *et al.*, 1997 ; Townsend *et al.*, 2001), *G. Dinophysis* (Horner *et al.*, 1997), *Noctiluca scintillans* (Uhlir et Sahling, 1990 ; Huang et Qi, 1997) et *G. Prorocentrum* (Grzebyk *et al.*, 1997 ; Horner *et al.*, 1997), et les Diatomées du G. *Pseudo-nitzschia* (Horner *et al.*, 1997) (Figure 1).

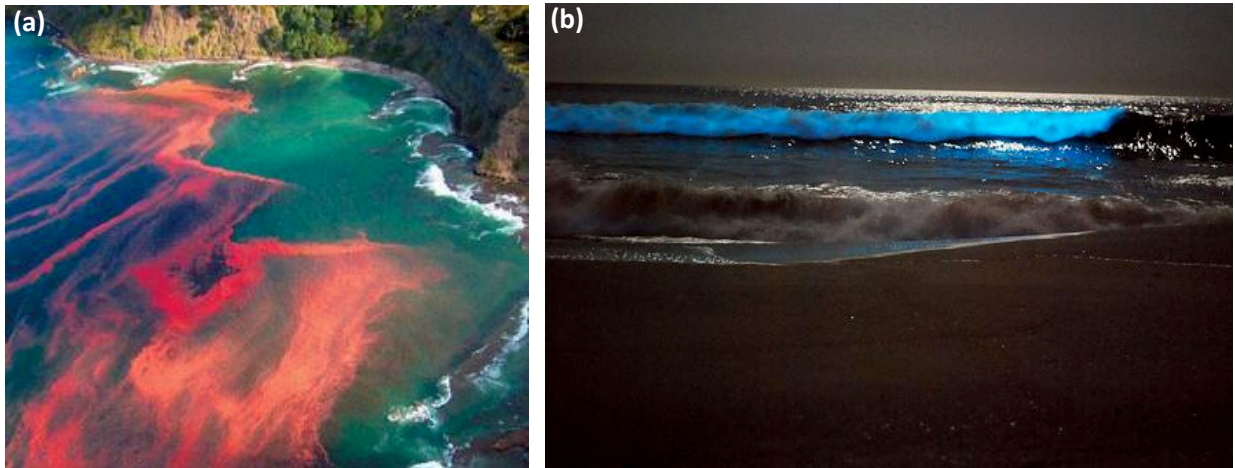


Figure 1 : (a) Marée rouge à Leigh, près du Cap Rodney, Nouvelle Zélande © Miriam Godfrey (b) Bioluminescence du Dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum* (source : <http://cimt.ucsc.edu>).

- l'apparition de dépôts mousseux abondants sur le littoral, provoqués par les espèces du *G. Phaeocystis* (Figure 2).



Figure 2 : Mousse de *Phaeocystis globosa*, Caroline du Sud (photo © Lee Coursey).

- de nombreuses espèces ne produisent pas ou peu de pigments et leurs efflorescences sont plus difficilement détectables, mais peuvent se traduire par des mortalités massives d'organismes dans le milieu.

Lors des proliférations microalgales, on distingue deux types d'organismes: ceux qui ne produisent pas de toxines mais qui ont un effet néfaste sur l'environnement ou sur les organismes marins par leur concentration massive qui peut atteindre plus de 50 000 cellules ml⁻¹ d'eau de mer (Scoging, 1998), et les organismes producteurs de toxines qui peuvent être nocifs même à de faibles concentrations. Ces derniers sont moins nombreux, parmi les 70 espèces ayant été recensées, 90 % sont des flagellés, et plus particulièrement des Dinoflagellés (Smayda, 1997 ; Hallegraeff *et al.*, 2004). Malgré leur importance, ces deux types d'organisme ne représentent qu'une petite fraction (144 espèces) des milliers d'espèces d'algues des écosystèmes marins (Moestrup *et al.*, 2018).

1.1 La distribution mondiale des HABs

Les proliférations des microalgues nuisibles est un phénomène naturel qui semble avoir augmenté en fréquence, en intensité et en étendue géographique depuis les dernières décennies (Hallegraeff, 1995 ; Glibert *et al.*, 2005 ; Reguera *et al.*, 2014 ; Anderson *et al.*, 2017) (Figure 3). Etant donné l'origine, l'amplitude des épisodes de HABs et les conséquences, les espèces de microalgues impliquées dans ces événements sont considérées comme invasives (Zenetos *et al.*, 2005 ; Streftaris et Zenetos, 2006 ; Zenetos *et al.*, 2009 ; Olenina *et al.*, 2010 ; Hallegraeff, 2014). Pratiquement, tous les environnements côtiers sont touchés par les HABs nocifs ou toxiques (Anderson, 1995 ; Van Dolah, 2000 ; Sellner *et al.*, 2003 ; Glibert *et al.*, 2005a ; Maso et Garces, 2006 ; Penna *et al.*, 2007 ; Ignatiades et Gotsis-Skretas, 2010 ; Reguera *et al.*, 2014) (Figure 3). L'expansion des événements des HABs est due à plusieurs facteurs anthropiques tels que le changement climatique qui semble être fortement responsable de l'augmentation des bio-invasions de certaines espèces de microalgues à l'échelle mondiale (Glibert *et al.*, 2005b ; Edwards *et al.*, 2006 ; Occhipinti-Ambrogi et Savini, 2003 ; Occhipinti-Ambrogi, 2007 ; Ricciardi, 2007 ; Hallegraeff, 2010). Les conséquences climatiques de ces changements ont probablement favorisé l'expansion géographique et l'accroissement des fréquences des HABs (Glibert *et al.*, 2005a ; Edwards *et al.*, 2006 ; Hallegraeff, 2010 ; Anderson *et al.*, 2012 ; Glibert *et al.*, 2018). L'eutrophisation côtière causée par l'enrichissement en nutriments suite aux activités agricoles et industrielles

constitue également un facteur principal de l'apparition de ces efflorescences (Zingone et Enevoldsen, 2000 ; GEOHAB, 2006 ; Anderson, 2009 ; Glibert *et al.*, 2018). La dispersion via les eaux de ballast faciliterait la dissémination des microalgues sous la forme de kystes ou de simples cellules (Hallegraeff, 1998 ; Maso *et al.*, 2003 ; Drake *et al.*, 2005 ; 2007 ; Maso et Garces, 2006 ; Burkholder *et al.*, 2007 ; Gollasch, 2007 ; Fertouna-Bellakhal *et al.*, 2014).

Les espèces responsables des HABs comprennent des représentants de la plupart des principaux groupes taxonomiques (Hallegraeff, 1993). Malgré cette diversité, un grand nombre d'espèces à l'origine des HABs répondent à des stimuli environnementaux similaires (tels que les nutriments, la lumière, la température, etc...) et ont tendance à employer des stratégies de croissance et de défense similaires pour leur permettre de maximiser leurs croissances et de minimiser les pertes (Glibert *et al.*, 2018).

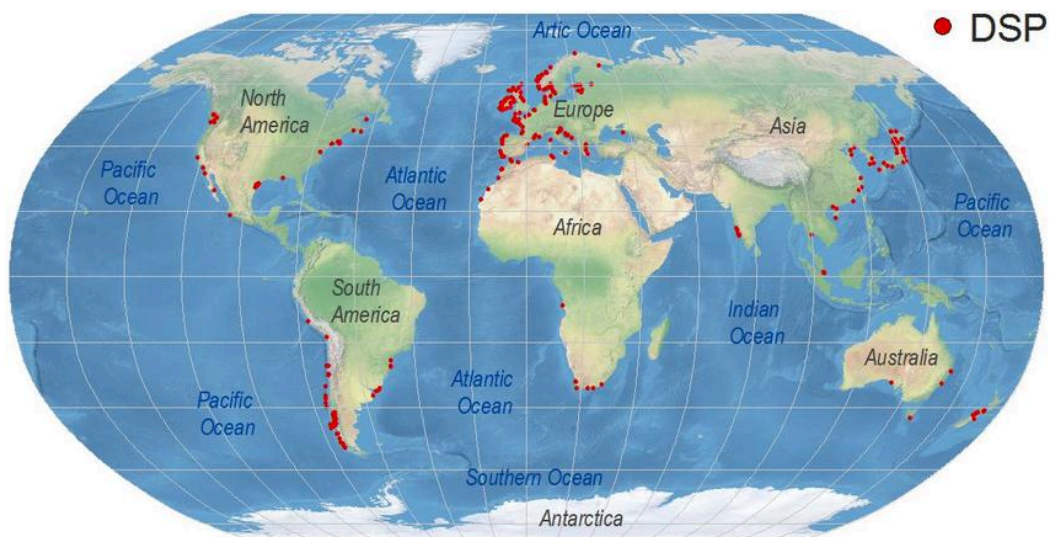


Figure 3 : Répartition mondiale des évènements du type DSP (Reguera *et al.*, 2014).

En Méditerranée, les épisodes d'efflorescences phytoplanctoniques sont de plus en plus fréquents (Cecchi *et al.*, 2016) (Figure 4). Le Dinoflagellé nuisible *Gymnodinium catenatum*, cause des syndromes de PSP, a été abondant en Méditerranée. Jusqu'à lors confiné en Mer d'Alboran (Sud de l'Espagne), il a été observé au Maroc (Tahri-Joutei *et al.*, 2003), puis porté par les courants vers les côtes italiennes (Alvarez-Salgado *et al.*, 2003 ; Gómez 2003 ; Amorim *et al.*, 2014). Les espèces du genre *Asterodinium* originaire de l'Océan Indien, ont été signalées en Mer Ligure et en Mer Tyrrhénienne en Méditerranée Nord Occidentale

(Gómez et Claustre 2003). Les espèces du genre *Dinophysis* connues pour provoquer des cas de DSP, ont été signalées dans plusieurs côtes méditerranéennes (Reguera *et al.*, 2014) : En Espagne (Velo-Suárez *et al.*, 2009 ; Moita *et al.*, 2016), sur les côtes méditerranéennes du Maroc (Tahri-Joutei *et al.*, 2003 ; Elgarch *et al.*, 2008), les côtes Françaises (Amzil *et al.*, 2007), sur les côtes tyrrhéniennes de Sicile, en Italie (Giacobbe *et al.*, 2000), en mer Adriatique (France et Mozetic, 2006 ; Pavela-Vrancic *et al.*, 2002) et les eaux grecques (Prassopoulou *et al.*, 2009 ; Louppis *et al.*, 2010).

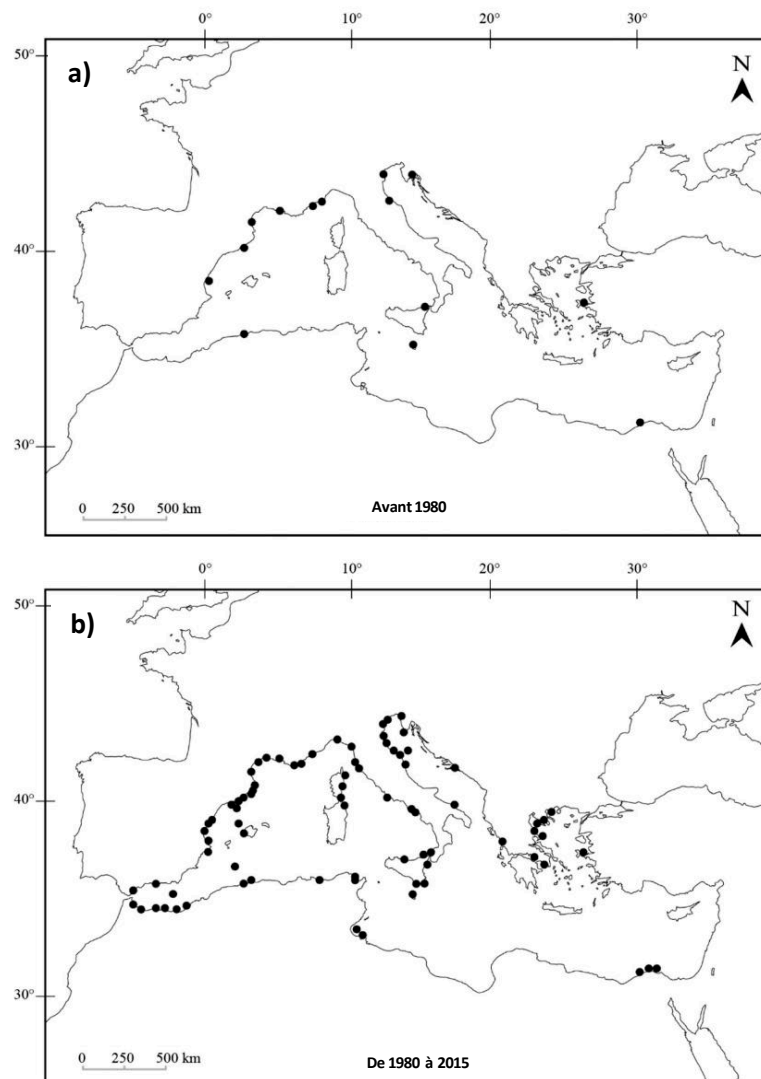


Figure 4 : Épisodes des efflorescences phytoplanctoniques enregistrés le long des côtes méditerranéennes (a) avant 1980, (b) en 2015 (Cecchi *et al.*, 2016).

Dans les écosystèmes côtiers, une attention particulière a été portée sur les efflorescences des microalgues benthiques nuisibles (Benthic Harmful Algal Blooms connus BHABs), dont la

distribution a été étendue au cours de cette dernière décennie, des mers tropicales-subtropicales jusqu'aux mers tempérées telle que la Méditerranée (Tognetto *et al.*, 1995 ; Vila *et al.*, 2001a, 2001b ; Ismael et Halim, 2006 ; Monti *et al.*, 2007 ; Aligizaki *et al.*, 2008 ; Mangialajo *et al.*, 2008 ; Glibert *et al.*, 2018). Des cas de Ciguatera Fish Poisoning (CFP) causés par les toxines produites par les Dinoflagellés benthiques du genre *Gambierdiscus* d'origine subtropicale ont été signalés en Méditerranée (Fraga et Rodríguez 2014 ; Fraga *et al.*, 2011 ; 2016).

Les côtes tunisiennes subissent aussi la prolifération massive des microalgues nuisibles. Le genre *Alexandrium* a été répertorié dans plusieurs régions, comme la baie de Tunis (Daly Yahia, 1998 ; 2001 ; 2005), le lac de Tunis (Armi *et al.*, 2011), dans la lagune de Bizerte (Turki, 2004, Bouchouicha *et al.*, 2012 ; Armi *et al.*, 2012 ; Fertouna-Bellakhal *et al.*, 2014, 2015 ; Turki *et al.*, 2014) et dans la lagune de Ghar El Melh (Dhib *et al.*, 2013). Dans le golfe de Gabès plusieurs espèces d'*Alexandrium* ont été aussi observées (Hamza, 2003 ; Dammak-Zouari, 2011), notamment *Alexandrium minutum* qui est la plus virulente (Abdennadher *et al.*, 2012). Les efflorescences d'*Alexandrium* ont souvent coïncidé avec des mortalités massives de poissons (Romdhane *et al.*, 1998). Les espèces du genre *Dinophysis* ont été observées, dans le lac de Tunis, le canal de Tunis et la lagune de Bizerte (Turki, 2004 ; Kacem *et al.*, 2009 ; Armi *et al.*, 2008, 2011, 2012 ; Turki *et al.*, 2014), la lagune de Ghar El Melh (Ramdani *et al.*, 2004 ; Dhib *et al.*, 2015), les ports puniques de Carthage (Aissaoui *et al.*, 2014) et aussi sur les côtes sud, dans le golfe de Gabès, (Hamza, 2003 ; Drira, 2009 ; Hannechi, 2010 ; Dammak –Zouari, 2011 ; Feki *et al.*, 2013).

Les efflorescences des microalgues benthiques nuisibles ont été également signalées au niveau des eaux côtières tunisiennes (Turki, 2005 ; Mabrouk *et al.*, 2011 ; Ben Brahim *et al.*, 2013). Les espèces de l'ordre des Prorocentrales sont responsables des efflorescences potentiellement toxiques sur les côtes Tunisiennes (Hamza, 2003 ; Turki, 2004 ; Armi *et al.*, 2012 ; Dhib *et al.*, 2013, 2015, 2016). L'espèce *Coolia monotis* a été aussi relevée sur les côtes Nord de la Tunisie (Turki, 2005, Armi *et al.*, 2010, 2012 ; Dhib *et al.*, 2013) et dans le golfe de Gabès (Hamza, 2003 ; Feki *et al.*, 2008).

En plus des Dinoflagellés, certaines Diatomées nuisibles ont été identifiées, telles que, les espèces de *Pseudo-nitzschia*, apparues fréquemment dans le Nord de la Tunisie, dans la lagune de Bizerte, à l'origine des efflorescences (Sahraoui *et al.*, 2009 ; Sahraoui *et al.*, 2012),

ainsi que des cyanobactéries telles que *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp. (Dhib *et al.*, 2015).

1.2 Impacts des HABs

La conscience publique et la préoccupation à l'égard des HABs n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies, et le terme «proliférations nuisibles» est souvent utilisé aussi bien au sein de la communauté scientifique que dans les médias. En fait, cette nomination est utilisée dans un sens général pour décrire un développement visible d'algues planctoniques ou benthiques.

L'expansion accrue de ces épisodes d'efflorescence s'est manifestée par l'implantation de programmes de surveillance des eaux côtières, par le développement rapide et le déploiement de nouvelles méthodes de détection de nouvelles espèces, des toxines produites appelées phycotoxines et les tests de toxicité (Sellner *et al.*, 2003).

Bien que le terme HABs soit le plus souvent utilisé en référence à des efflorescences potentiellement dangereuses pour les êtres humains ou ayant des effets toxiques sur d'autres êtres vivants ou organismes (Davidson *et al.*, 2011), les HABs ont d'autres effets graves. Ils influent sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème, l'approvisionnement en eau potable et en eau d'irrigation, les activités récréatives, le tourisme, la pêche et les industries agricoles et énergétiques (Smayda, 1997a ; 1997b ; Belin *et al.*, 2013 ; Watson et Molot, 2013 ; Delegrange, 2015 ; Watson *et al.*, 2015).

L'impact des efflorescences de microalgues nuisibles se reflète par des répercussions environnementales, sanitaires et socio-économiques parfois graves (Anderson, 1995 ; Smayda, 1997b ; Al-Ghelani *et al.*, 2005 ; Zingone et Wyatt, 2005).

- **Les impacts sanitaires**

Les biotoxines marines ou phycotoxines produites par les microalgues ont d'importantes conséquences sur la santé humaine. Ces toxines peuvent constituer un risque sanitaire en cas d'ingestion, d'inhalation ou par contact direct. On compte environ 200 espèces de phytoplancton potentiellement dangereuses dont 80 appartenant aux Dinoflagellés qui produisent des toxines (Scoging, 1998 ; Zingone et Enevoldsen, 2000 ; Maso et Garces, 2006).

En s'accumulant dans les produits de la mer, essentiellement dans les fruits de mer ou les poissons contaminés, les phycotoxines sont véhiculées dans la chaîne alimentaire en provoquant des intoxications plus ou moins graves chez le consommateur.

Les groupes de phycotoxines à l'origine de ces intoxications sont soumis actuellement à une réglementation et donc à une surveillance obligatoire. En effet, dès que la teneur en toxines réglementées dépasse le seuil de sécurité sanitaire officiel, l'administration procède à la fermeture des zones de production des mollusques bivalves affectées par l'abondance des microalgues toxiques. D'une manière générale, les intoxications alimentaires recensées se manifestent principalement par 6 types de syndromes (Scoging, 1998 ; Van Dolah, 2000 ; Maso et Garces, 2006) :

De type amnésique (Amnesic Shellfish Poisoning : ASP), diarrhéique (Diarrhetic Shellfish Poisoning : DSP), neurotoxique (Neurotoxic Shellfish Poisoning NSP), paralytique (Paralytic Shellfish Poisoning : PSP), l'empoisonnement à l'azaspiracide (AZaspiracid shellfish Poisoning : AZP), et ciguatérique (Ciguatera Fish Poisoning : CFP) (Hallegreaff, 2003 ; FAO, 2004 ; Nascimento *et al.*, 2005 ; Skinner *et al.*, 2011 ; Ferrante *et al.*, 2013 ; Grattan *et al.*, 2016) (Tableau 1).

D'autres classes de toxines peuvent également être répertoriées, sur la base de leurs symptômes, notamment les toxines du groupe palytoxines, secrétées par les espèces du genre *Ostreopsis* et responsables des intoxications neurologiques, mais aussi des toxines ne présentant pas de cas d'intoxications avérées, comme les yessotoxines produites par *Prorocentrum reticulatum*.

Les phycotoxines représentent également une menace pour la santé humaine due à l'inhalation des HABs transportées par les aérosols, provoquant ainsi des problèmes respiratoires ou par contact direct qui conduit à une irritation de la peau. Durant d'importantes efflorescences survenues dans le golfe du Mexique (en Floride et au Texas), plusieurs intoxications respiratoires ont été rapportées suite à l'inhalation d'aérosols contenant les brevéttoxines et/ou des cellules de *K. brevis* (Backer *et al.*, 2003 ; Cheng *et al.*, 2005 ; Fleming *et al.*, 2005a ; 2005b ; Kirkpatrick *et al.*, 2004 ; 2006 ; Fleming *et al.*, 2007). Les symptômes de détresse respiratoire observés seraient induits par une réaction de type allergique (Abraham *et al.*, 2005) (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des principales phycotoxines associées aux microalgues toxiques (Diatomées, Cyanobactéries et Dinoflagellés) (Anderson *et al.*, 2017).

Intoxication /syndrome	Groupe de toxines	Espèces productrices	Formule	Manifestations cliniques
ASP	Acide domoïque (AD)	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	Gastro-entérite, manifestations neurologiques conduisant dans les cas graves à l'amnésie, au coma et à la mort
PSP	Saxitoxine (STX)	<i>Alexandrium catenella</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i>	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	Paresthésies aiguës et autres manifestations neurologiques; peut progresser jusqu'à paralysie respiratoire et mort
DSP	Acide okadaïque (AO)	<i>Dinophysis</i> spp. <i>Prorocentrum lima</i> .	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	Gastro-entérite aiguë
ATX-a	Anatoxine-a	<i>Anabaena circinalis</i>	C ₁₀ H ₁₅ NO	Effets neurotoxiques chez les animaux de laboratoire
AZP	Azaspiracide-1 (AZA-1)	<i>Azadinium spinosum</i>	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₂	Effets neurotoxiques avec lésions sévères de l'intestin, de la rate et des tissus hépatiques chez les animaux de laboratoire
BMAA	β-méthylamino alanine	<i>Chaetoceros</i> spp.	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	Impliqué dans la sclérose latérale amyotrophique
NSP	Brèvétexine-2 (BTX-2)	<i>Karenia brevis</i> <i>Chattonella</i> spp.	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₄	Symptômes gastro-intestinaux et neurologiques; irritation respiratoire et oculaire via les aérosols
CFP	Ciguatoxine-P (P-CTX-1)	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	C ₆₀ H ₈₆ O ₁₉	Gastro-entérite aiguë, paresthésies et autres symptômes neurologiques
GYM	Gymnodimine	<i>Karenia selliformis</i> <i>Alexandrium peruvianum</i>	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄	Toxines à action rapide Symptômes neurologiques
MC	Microcystine-LR	<i>Microcystis aeruginosa</i>	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Gastro-entérite aiguë avec lésions sévères des tissus hépatiques chez l'homme
NOD	Nodularine	<i>Nodularia spumigena</i>	C ₄₁ H ₆₀ N ₈ O ₁₀	Gastro-entérite aiguë avec lésions sévères des tissus hépatiques chez l'homme
PLTXs	Palytoxines	<i>Palythoa</i> spp. <i>Ostreopsis</i> spp.	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	Symptômes gastro-intestinaux et neurologiques; irritation respiratoire et oculaire
PnTXs	Pinnatoxines	<i>Vulcanodinium rugosum</i>	C ₄₂ H ₆₃ NO ₇	Toxines à action rapide Symptômes neurologiques
TRX	Trichotoxine	<i>Trichodesmium</i> sp.	C ₂₀ H ₂₇ ClO	Effets neurotoxiques

- **Les impacts environnementaux**

Outre l'impact dû à l'apparition d'une anoxie, suite à une biomasse élevée, les phycotoxines produites par certaines HABs sont responsables de la dégradation des écosystèmes en causant des mortalités massives chez les invertébrés comme les mollusques filtreurs ou brouteurs (moules, huîtres, palourdes, etc.) (Rolton *et al.*, 2014 ; Berdalet *et al.*, 2016) et les gastéropodes, les crustacés et les oursins (Tiffany et Heyl, 1978 ; Forster, 1979 ; Noe-Nygaard *et al.*, 1987 ; Sasikumar *et al.*, 1989 ; Davidson *et al.*, 2011 ; Rolland *et al.*, 2014), qui peuvent accumuler les toxines dans leurs organes digestifs et représentent des vecteurs de toxicité pour leurs prédateurs (Anderson, 1995 ; Scoging, 1998 ; Van Dolah, 2000 ; Silva *et al.*, 2013).

Dans les échelons supérieurs, de nombreux épisodes de mortalité massive ont déjà été enregistrés, notamment :

- L'impact sur les poissons est particulièrement remarquable aboutissant dans certains cas à la quasi disparition des branchies (Lundgren *et al.*, 2015), et provoquant aussi des mortalités. En effet des cas de mortalité de poissons suite à des nécroses importantes sont associés à des efflorescences de *Karenia brevis* et de *Pfiesteria piscida* (Van Dolah, 2000 ; Dorantes-Aranda *et al.*, 2013 ; Moestrup *et al.*, 2014) (Figure 5).

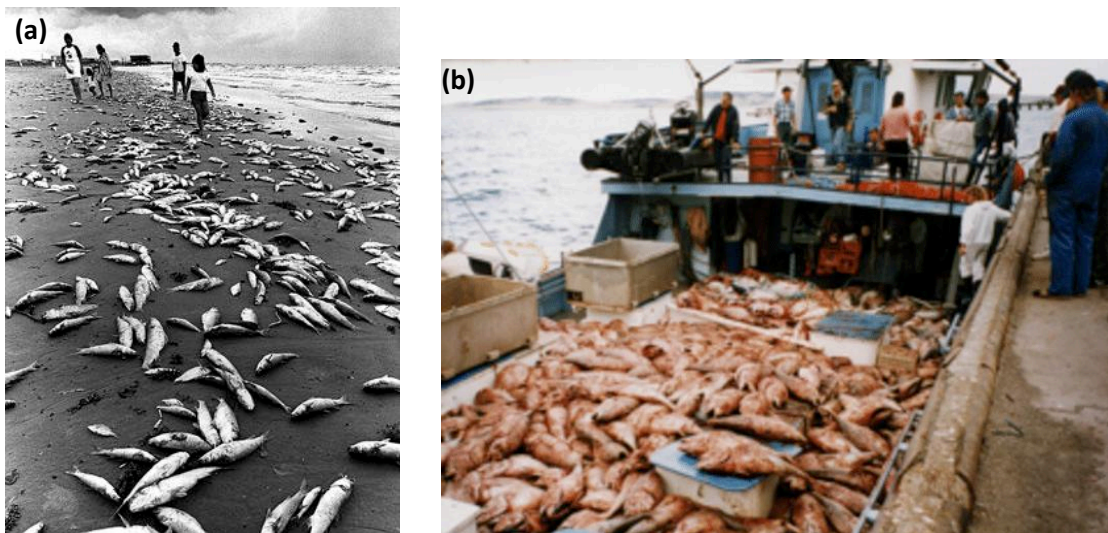


Figure 5 : (a) Mortalités massives de poissons suite à une efflorescence de *Karenia brevis* dans le golfe du Mexique (photo prise par Brazosports) ; (b) Mortalités massives du thon rouge en Australie méridionale, associées aux efflorescences de *Chattonella marina* (Dorantes-Aranda *et al.*, 2013).

- Des mortalités de mammifères marins qui ont été intoxiqués par l'absorption de poissons contaminés (Fire *et al.*, 2015). Anderson et White (1989) ont rapporté que de nombreux mammifères marins comme les baleines (baleine à bosse, rorqual, etc.), les dauphins (globicéphale, grand dauphin, dauphin commun, dauphin de Risso, marsouin, etc.) et les phoques sont susceptibles d'être intoxiqués suite à l'ingestion de certains poissons de type maquereau qui sont de bons vecteurs des phycotoxines (Saxitoxine, Brévéttoxine). Ils ont également noté que les saxitoxines et les brevetoxines produites respectivement par les Dinoflagellés *Alexandrium* spp. et *Karenia brevis* sont suspectées d'avoir causé la mort de baleines à bosses et de dauphins dans le Massachussetts et dans le New Jersey. *K. brevis* a également été responsable de plusieurs événements de mortalités en Floride qui ont touché des dauphins, des poissons, des lamantins ou encore des invertébrés (Trainer et Baden, 1999; NOAA report, 2004 ; Al Ghelani *et al.*, 2005 ; Gaydos, 2006).

Des cas de mortalités d'oiseaux marins suite à l'ingestion de proies contaminées par les toxines de certaines espèces de Dinoflagellés (*K. brevis*, *Dinophysis* spp., *Gonyaulax* spp., *Alexandrium tamarense*) et des Diatomées *Pseudo-nitzschia* spp ont été rapportés par Shumway *et al.*, 2003. Des mortalités massives de pélicans ont également été observées sur la côte Ouest du Mexique, suite à une accumulation d'acide domoïque le long de la chaîne alimentaire (Sierra Beltran *et al.*, 1997).

- **Les impacts socio-économiques**

Les conséquences économiques sont en lien direct avec les impacts sanitaires et environnementaux des HABs, bien que l'impact économique de ces efflorescences reste assez difficile à évaluer. Cela est dû essentiellement à la nature épisodique et imprévisible des occurrences de HABs, leurs vaste distribution géographique et la grande variabilité des effets engendrés (Berdalet *et al.*, 2016).

Aux Etats-Unis, le coût annuel total induit par les HABs a été estimé à 49 millions de dollars pour la période 1987-1992 (Anderson *et al.*, 2000).

La pêche et l'aquaculture font partie des secteurs touchés par les événements HABs. D'une part les interdictions de vente suite à un évènement de toxicité de coquillages et de poissons, conduisent à une période de suspension de l'activité commerciale, et d'autre part, les mortalités massives de poissons et de fruits de mer d'élevage engendrent d'énormes pertes de

plusieurs dizaines de millions de dollars par épisode d'efflorescence (Smayda, 1997b ; Anderson *et al.*, 2000 ; Scatasta *et al.*, 2004 ; HARRNESS, 2005 ; Delegrange, 2015 ; Sanseverino *et al.*, 2016). La pêche commerciale est aussi fortement impactée, d'une part par la diminution des stocks de poissons sauvages (mortalités massives durant certaines efflorescences), et d'autre part par les nuisances causées par les efflorescences (interdiction de pêche, filets abîmés par les masses gélatineuses, etc.) (Sanseverino *et al.*, 2016).

Le tourisme côtier et maritime subit aussi l'impact des événements HABs. Sachant que ce secteur dépend d'une bonne qualité de l'eau de mer, les effets induits par les épisodes d'efflorescence de HABs tels que la coloration des eaux, l'accumulation des poissons morts sur les plages, la production de mauvaises odeurs, la fermeture des plages et l'interdiction de la baignade diminuent la fréquence des visites dans ces zones et influencent toutes les activités commerciales liées aux visiteurs. Ces impacts se traduisent par des pertes de revenus et d'emplois. Les intoxications alimentaires ou respiratoires semblent également affecter le secteur du tourisme, même si les pertes sont difficiles à estimer (Anderson *et al.*, 2000 ; Scatasta *et al.*, 2004 ; HARRNESS, 2005 ; Sanseverino *et al.*, 2016).

1.3 Facteurs régulateurs des efflorescences des HABs

1.3.1 Les parasites, virus et bactéries

Les microorganismes (bactéries, parasites et virus) forment des interactions avec les microalgues pouvant ainsi avoir un impact sur les efflorescences algales nuisibles. Les interactions entre microalgues et bactéries font partie des photosymbioses. Les bactéries peuvent avoir une action algicide conduisant à une inhibition voire une lyse cellulaire, ce caractère pathogène ou pouvoir algicide des bactéries vis-à-vis des microalgues a été mis en évidence, notamment dans des études portant sur les efflorescences phytoplanctoniques (Lovejoy *et al.*, 1998 ; Cho, 2012 ; Guan *et al.*, 2014 ; Lei *et al.*, 2015 ; Lu *et al.*, 2016 ; Su *et al.*, 2016 ; Crenn *et al.*, 2018). Ces bactéries algicides augmentent parfois en abondance parallèlement au déclin des efflorescences microalgales, ce qui suggère qu'elles peuvent affecter la dynamique de leur prolifération (Mayali et Azam, 2004). Les bactéries peuvent aussi stimuler la croissance algale (Ferrier *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2008 ; Amin *et al.*, 2015), influencer sur la production des toxines (Hold *et al.*, 2001 ; Martins *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2015) ou encore jouer un rôle dans la formation de kystes ainsi que leur survie après la

germination (Adachi *et al.*, 2003 ; Bolch *et al.*, 2011). Cependant, la relation bactéries-microalgues peut varier selon les paramètres biotiques et abiotiques du milieu (Faust et Raes, 2012). En effet, il a été observé que les bactéries *Pseudomonas* sp. pouvaient produire un composé algicide contre les dinoflagellés *Alexandrium tamarense* et *A. catenella*, dans le cas où le milieu était riche en nutriments, passant du commensalisme (en milieu oligotrophe) à du parasitisme (en milieu eutrophe) (Amaro *et al.*, 2005 ; Su *et al.*, 2007).

Les virus sont des agents infectieux sans métabolisme propre, incapables de se répliquer seuls. Ils ont besoin d'infecter un hôte biologique pour se multiplier et pérenniser leur matériel génétique. Les virus représentent un facteur important de mortalité chez la communauté phytoplanctonique (Suttle, 2005, 2006 ; Demory *et al.*, 2017). En effet, dans des conditions d'efflorescence, les hôtes sont à la fois abondants et ont un taux de croissance élevé, favorisant ainsi la propagation des virus ce qui entraîne l'effondrement de la population hôte (Brussaard *et al.*, 2004). Dans ces conditions, environ 10 à 50% d'hôtes peuvent être infectés en fin d'un épisode d'efflorescence microalgale (Bratbak *et al.*, 1993, 1996 ; Nagasaki *et al.*, 1994). Jacquet *et al.*, (2002) ont démontré que les virus peuvent entraîner de 7 à 100% de la mortalité totale chez *Emiliana huxleyi* et dans certains cas la mortalité causée par les virus peut atteindre ou dépasser le broutage par le zooplancton (Baudoux *et al.*, 2006).

L'éventuel rôle régulateur des microorganismes représenté par les parasites, bactéries et virus sur les efflorescences d'*Ostreopsis* est de plus en plus reconnu chez les espèces planctoniques (Norén *et al.*, 1999 ; Figueroa *et al.*, 2008) et affecte également les espèces benthiques (Hoppenrath et Leander, 2008). En effet, les espèces du G. *Ostreopsis* peuvent héberger une variété d'une flore bactérienne symbiotique, de virus et/ou de parasites. Selon plusieurs études, la croissance d'*Ostreopsis* semble nécessiter la présence de bactéries symbiotiques. Les images ont révélé la présence de bactéries des Genres *Pseudomonas/Alteromonas* sur la surface externe et dans la matrice intercellulaire d'*Ostreopsis* (Ashton *et al.*, 2003). Les bactéries peuvent aussi avoir une action algicide sur les cellules d'*Ostreopsis* (Sakata, 2000). Hoppenrath et Leander (2008) ont montré que les espèces de *Perkinsids*, parasites intracellulaires des Dinoflagellés peuvent affecter les espèces benthiques. Ils ont un stade zoïde qui peut infecter les cellules de Dinoflagellés où ils se multiplient pour former un sporange sphérique libérant de nombreux nouveaux zooïdes. Les zooïdes parasitaires sont abondants lorsqu'il y a une prolifération d'une espèce sensible et ils peuvent affecter la concentration et même causer la fin d'une efflorescence.

1.3.2 La compétition entre les microorganismes du phytoplancton

Les Dinoflagellés ont généralement une croissance lente avec une capacité d'absorption maximale faible pour les nutriments inorganiques dissous (Smayda, 1997a), ce qui fait d'eux des compétiteurs inférieurs dans les cas où les nutriments ne sont pas abondants.

Pour s'imposer dans la communauté phytoplanctonique, ils doivent être favorisés par des facteurs environnementaux et/ou posséder des adaptations pour compenser ce manque de concurrence. La formation de l'efflorescence et la dominance d'un Dinoflagellé peuvent dépendre de la taille de la population et de l'abondance relative des microalgues qui coexistent dans le milieu, puisque leur croissance peut être stimulée par les nutriments et l'irradiance. En plus, les espèces du phytoplancton peuvent s'exclure les unes les autres de manière plus directe, pour des ressources limitées. L'inhibition des compétiteurs par la libération de certains composés chimiques, plus connue sous le terme d'allélopathie, peut être importante dans les populations planctoniques (Legrand *et al.*, 2003). Il a été supposé que l'allélopathie joue un rôle dans la succession des espèces (Keating, 1977), la formation des proliférations d'algues nuisibles (Smayda, 1997a), ainsi que l'établissement d'espèces envahissantes (Figueredo *et al.*, 2007).

De plus, il a été rapporté que des composés produits par certaines espèces de Dinoflagellé entraînent une perte de motilité chez les cellules des compétiteurs. Un simple contact cellulaire avec le Dinoflagellé *Heterocapsa* sp. était nécessaire pour une perte de motilité des compétiteurs (Uchida *et al.*, 1995), alors que les filtrats dépourvus de cellules du Dinoflagellé toxique *Alexandrium* spp. ont été à l'origine d'une perte de la motilité chez le Dinoflagellé hétérotrophe *Oxyrrhis marina* (Tillmann et John, 2002).

1.3.3 La prédation

Les petits herbivores benthiques (également appelés mesograzers) peuvent jouer un rôle important dans la régulation des proliférations des Dinoflagellés benthiques. Ils peuvent accumuler des toxines pour ensuite les transférer à leurs propres prédateurs. Les stades juvéniles de plusieurs espèces de poisson dépendent presque entièrement du régime alimentaire d'un mesograzer (Stoner, 1979), ce qui augmente la probabilité de propagation des toxines dans le réseau trophique (Sotka *et al.*, 2009). Cependant, plusieurs herbivores peuvent

être affectés par les toxines et les mortalités de masse des herbivores sont souvent associées à des proliférations de Dinoflagellés. Par ailleurs, toute pression induite par la pêche ou l'aquaculture sur les prédateurs de microalgues peut perturber et induire une modification dans la chaîne trophique et affecter indirectement le développement des microalgues (Glibert *et al.*, 2005 ; Granéli et Turner, 2006).

Plusieurs espèces de microalgues peuvent également produire des métabolites allélopathiques pouvant inhiber la prédation (Ianora *et al.*, 2011), ce qui fait que certains brouteurs discriminent leurs proies: par exemple, certains Copépodes peuvent sélectionner des espèces de microalgues plutôt que d'autres de taille et de disponibilité égales. Ce comportement de rejet peut conduire à des proliférations monospécifiques, ce phénomène est schématisé dans la Figure 6. Notons que l'impact des substances allélopathiques libérées par les microalgues peut être sévère induisant une détresse physique et même la mort du prédateur (Ianora *et al.*, 2011). Dans les systèmes benthiques, les macro-herbivores (comme les oursins, les poissons) peuvent jouer un rôle crucial dans la régulation des proliférations, car ils broutent les macroalgues et peuvent ensuite éliminer et/ou détruire l'habitat préféré des microalgues d'*Ostreopsis*, réduisant ainsi leurs efflorescences (Huntley *et al.*, 1986 ; Fraga *et al.*, 2012).

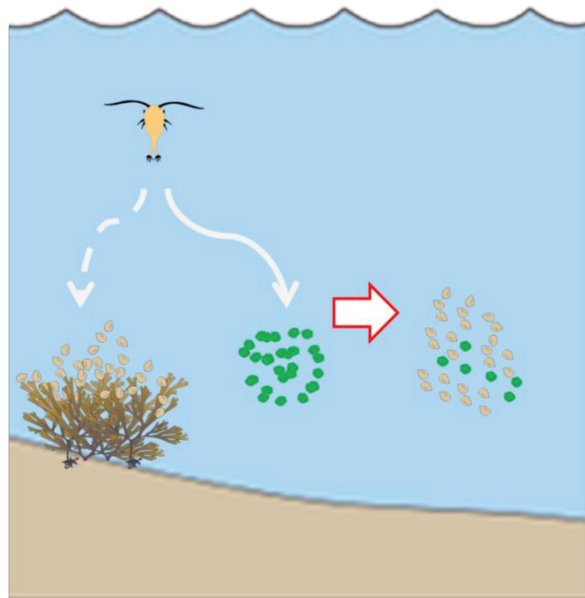


Figure 6 : Schéma du comportement discriminatoire chez certains Copépodes vis à vis de leurs proies (Présent travail).

2 Les Dinoflagellés

Avec 3501 espèces recensées (Guiry et Guiry, 2018), la classe des Dinophyceae représente le deuxième groupe du phytoplancton après les Diatomées. Ces microalgues appartenant au groupe des Alvéolés sont pour la plupart unicellulaires bien que certaines espèces peuvent former des colonies ou des pseudo-colonies (López-García et Moreira, 2008). Souvent pélagiques (Burkholder *et al.*, 2006 ; Taylor *et al.*, 2008 ; Gomez, 2012), certaines espèces sont benthiques et peuvent se développer sur une grande variété de substrats et sont ainsi considérées comme organismes épiphytes. Ils sont majoritairement marins (Foissner et Hawksworth, 2009 ; Gomez, 2012), mais sont aussi présents dans les écosystèmes dulcicoles et saumâtres.

La revue de Sherr et Sherr (2007) met en relief l'importance des Dinoflagellés hétérotrophes comme composante du microzooplancton et brouteurs efficaces des Diatomées. Les Dinoflagellés sont, en effet, parfois dépourvus de pigments photosynthétiques et sont alors hétérotrophes, capables d'utiliser toute forme de matière organique, incluant de la matière particulaire même vivante. Ces Dinoflagellés hétérotrophes peuvent parfois être parasites, comme les individus du G. *Blastodinium* connus pour se développer dans le tractus digestif des Copépodes. Pour les Dinoflagellés hétérotrophes libres, la nutrition s'appuie à la fois sur l'osmotrophie (utilisation de matières organiques dissoutes) et la phagotrophie (ingestion de proies). Dans ce dernier cas, les mécanismes de capture de proies varient considérablement d'une espèce à l'autre. Plusieurs espèces de Dinoflagellés nus utilisent la phagocytose ; dans ce cas, les cellules présentent alors un cytostome formé par invagination de la membrane plasmique et sont capables de se déformer de manière impressionnante pour consommer des proies beaucoup plus grosses que leur taille. Les espèces des G. *Gyrodinium*, *Noctiluca* sont ainsi capables d'engloutir des chaînes entières de Diatomées, des œufs de Copépodes entiers et même d'autres Dinoflagellés.

Les Dinoflagellés à thèque ne peuvent pas augmenter leur volume de la même manière que les Dinoflagellés nus et sont donc incapables d'ingérer directement de grosses proies. Ces Dinoflagellés ont développé des pseudopodes ; ils étendent un voile d'alimentation pseudopodial, le pallium, avec lequel ils entourent des portions de chaînes de Diatomées ou d'autres proies de grande taille. Les enzymes digestives sont sécrétées par le pallium, et la

digestion extracellulaire peut alors avoir lieu. Lorsque celle-ci est achevée, le voile se rétracte (Gaines et Elbrächter, 1987 ; Park *et al.*, 2006, 2014). Quel qu'en soit le mécanisme, l'hétérotrophie peut être temporaire ou permanente. Certains Dinoflagellés sont par ailleurs capables de se nourrir simultanément par autotrophie et par hétérotrophie, un mode de nutrition connu sous le terme de mixotrophie (Stoecker *et al.*, 2006 ; Burkholder *et al.*, 2008 ; Taylor *et al.*, 2008 ; Gomèz, 2012).

Les Dinoflagellés disposent aussi de différents modes nutritionnels, environ la moitié des espèces sont hétérotrophes, l'autre étant photosynthétiques ou mixotrophes alliant la phototrophie et la phagotrophie.

2.1 Les caractéristiques morphologiques

Les Dinoflagellés ont une taille qui varie entre 3 et 500 μm avec une moyenne de 45 μm de longueur (Burkholder *et al.*, 2006). Les Dinoflagellés sont caractérisés par la présence de deux flagelles, logés dans le sulcus et le cingulum, de nature protéique, capables de mouvements (Figure 7). Ces deux flagelles sont disposés à angle droit à l'intérieur des deux sillons ; ils ont des structures et des rôles différents (Sournia, 1986 ; Lassus, 1988), leur permettant ainsi de se déplacer en mouvement rotatoire. Le premier flagelle est situé dans un sillon longitudinal, le sulcus, qui passe, sur l'un des côtés de la cellule, entre les plaques thécales du centre vers la partie postérieure (antapex) ; lorsqu'il bat d'avant en arrière, ce flagelle propulse le Dinoflagellé vers la direction opposée, c'est-à-dire vers l'avant. L'autre flagelle est aplati en forme de ruban et se trouve placé dans le sillon transversal, le cingulum, qui entoure la cellule et la divise en deux parties (une partie antérieure l'épithèque et une partie postérieure l'hypothèque), ce flagelle permet au Dinoflagellé de tourner et de manœuvrer, assurant également le mouvement vers l'avant, Cet arrangement des flagelles s'appelle dinokonté (Burkholder *et al.*, 2006) (Figure 8).

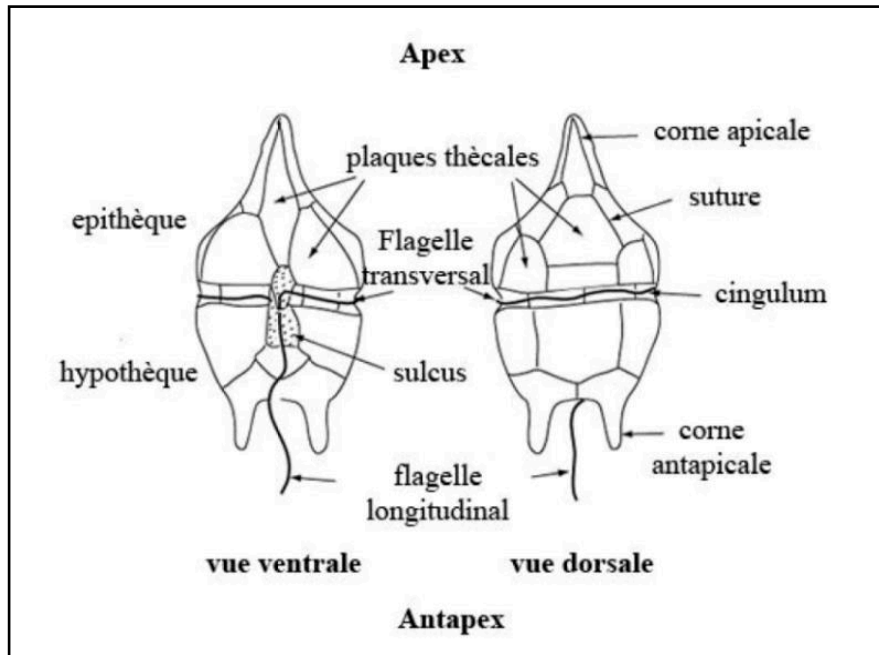


Figure 7 : Morphologie d'une cellule de Dinoflagellé à thèque (d'après Fensome *et al.*, 1999).

Néanmoins chez quelques espèces appartenant à l'ordre des Prorocentrales, le cingulum et le sulcus sont absents et les deux flagelles sont insérés antérieurement, cet arrangement des flagelles s'appelle desmokonté (Taylor, 1989) (Figure 8). Les Dinoflagellés sont entourés d'une structure complexe : l'amphiesma, formée d'une membrane interne et d'une membrane externe entre lesquelles est disposée une série de vésicules aplaties.

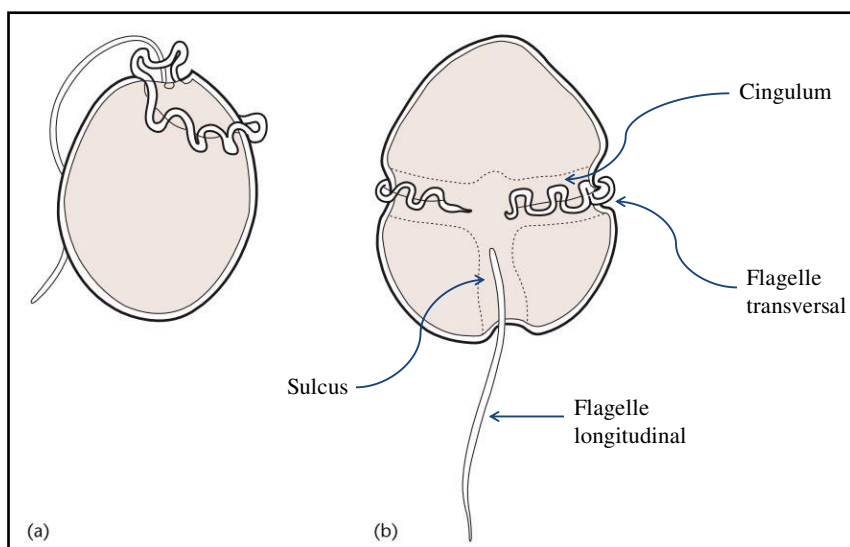


Figure 8 : Arrangements flagellaires chez les Dinoflagellés. (a) Arrangement dinokonté (cas des *Prorocentrum*), (b) Arrangement desmokonté (cas des *Gymnodinium*). (Taylor, 2006, modifié d'après Taylor, 1989).

Morphologiquement, il existe deux types de Dinoflagellés : les Dinoflagellés nus à parois fragile ou sans thèque (Figure 9) et ceux couverts de plaques celluloses formant les thèques (Seguin *et al.*, 1997) (Figure 10).

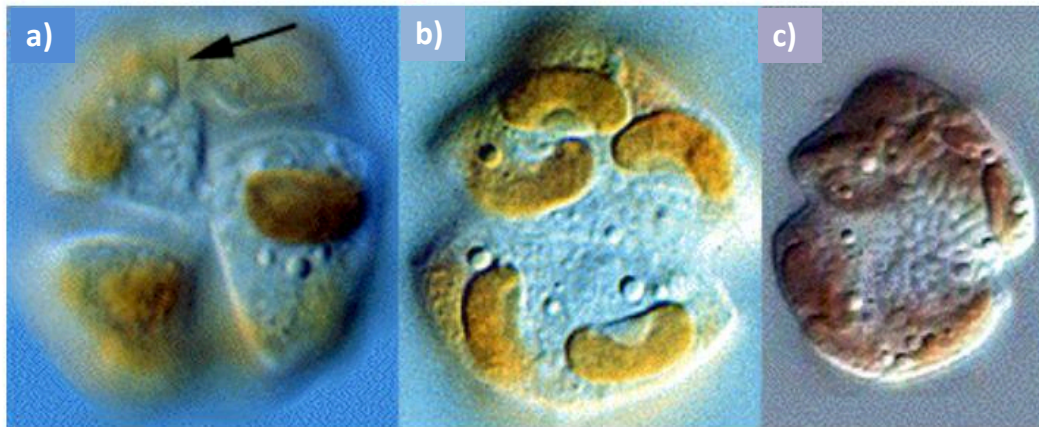


Figure 9 : Exemple d'un Dinoflagellé nu, *Gymnodinium mikimotoi* : (a) vue ventrale montrant un sillon apical, (b) vue dorsale montrant les plastides à pyrénioïde, (c) vue ventrale montrant le noyau de forme elliptique (Source 2001 : <http://www.marbot.gu.se>).

Chez les Dinoflagellés cuirassés, les vésicules contiennent les plaques de cellulose formant la thèque. Cette thèque peut manquer en permanence chez les Dinoflagellés nus tandis que, chez certaines espèces, la thèque disparaît selon certaines conditions environnementales.

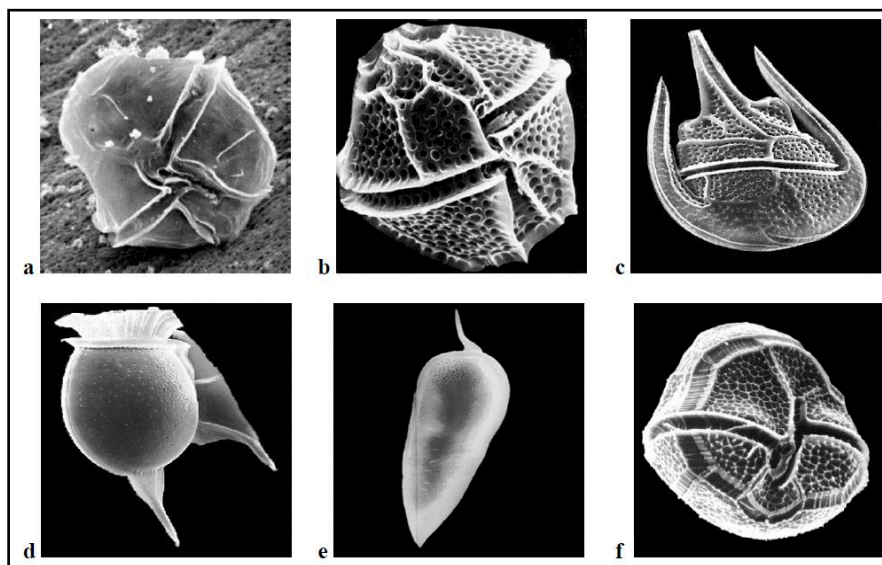


Figure 10 : Exemples de Dinoflagellés à thèque (clichés SEM) : (a) *Alexandrium tamarense*, (b) *Gonyaulax polyedra*, (c) *Ceratium* cf. *horridum*, (d) *Dinophysis* cf. *caudata*, (e) *Prorocentrum micans*, (f) *Proto-peridinium* sp. (Quéguiner, 2013).

Les Dinoflagellés armés possèdent deux ensembles de plaques composés de deux à 100 unités. Les bords des plaques se superposent et peuvent s'écarter, permettant ainsi l'expansion de la cellule. Les plaques sont agencées en formes variées, sphériques comme chez les Péridiniales ou encore allongées en forme de cornes chez les Cératiales. Chez les Dinoflagellés armés, le dénombrement et l'arrangement des ces plaques thécales est déterminant dans l'identification et la classification des espèces de Dinoflagellés grâce notamment à leur différentes formes, tailles, ornements et morphologies. La numérotation des thèques se fait à partir de la plaque la plus ventrale, dans le sens contraire des aiguilles d'une montre, de gauche à droite en suivant le flagelle transversal (Hasle et Syversten, 1997) (Figure 11).

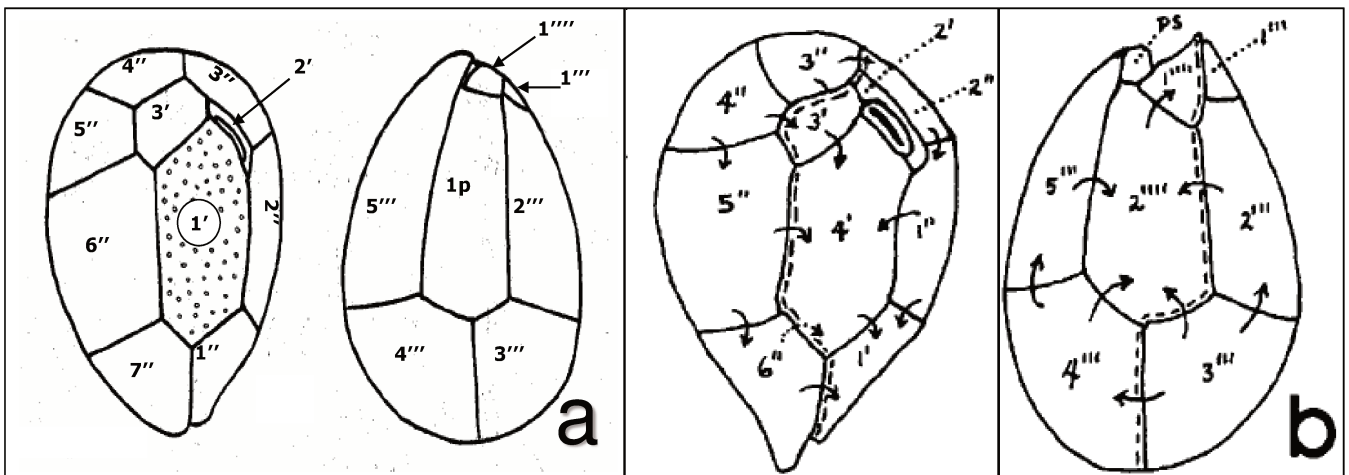


Figure 11 : Principe de numérotation des plaques cellulosesiques (tabulation) chez les Dinoflagellés cuirassés selon Faust *et al.*, (1996), (a) modifié d'après Fukuyo (1981), (b) selon Besada (1982) (cas d'*Ostreopsis*).

2.2 La reproduction

La majeure partie du cycle de vie des Dinoflagellés se passe au stade haploïde, se sont des espèces haplobiontiques (Litaker *et al.*, 2002 ; Figueroa *et al.*, 2006). Ils se reproduisent selon une alternance des deux modes, asexué et sexué. La reproduction asexuée ou par voie végétative, est la plus fréquente, se produit suite à une fission binaire ou mitose donnant deux cellules filles identiques à la cellule mère. Au cours de ce processus les plaques parentales thécales tombent (ecdysis) et chaque cellule fille va ensuite synthétiser de nouvelles plaques. En cas de stress, qui peut être dû à différents facteurs comme un changement des températures

de l'eau ou une carence en nutriments (Doucette *et al.*, 1989 ; Grzebyk et Berland, 1996), ces cellules se transforment en kystes temporaires appelés kystes ecdysals (Uchida, 1991; Fistarol *et al.*, 2004), avec une durée de vie relativement courte de 3 à 13 jours dans le cas de *Scrippsiella trochoidea* (Wang *et al.*, 2007). Lors du retour des conditions favorables telles que des apports d'eaux riches en éléments nutritifs, une température de l'eau et un ensoleillement élevés, ces kystes germent, sont remis en suspension et retournent à une multiplication végétative active fréquente lors de périodes de prolifération expliquant ainsi la formation des eaux colorées notamment dans les eaux côtières (Kim *et al.*, 2002 ; Anderson et Rengefors, 2006), le cycle est schématisé dans la figure 12.

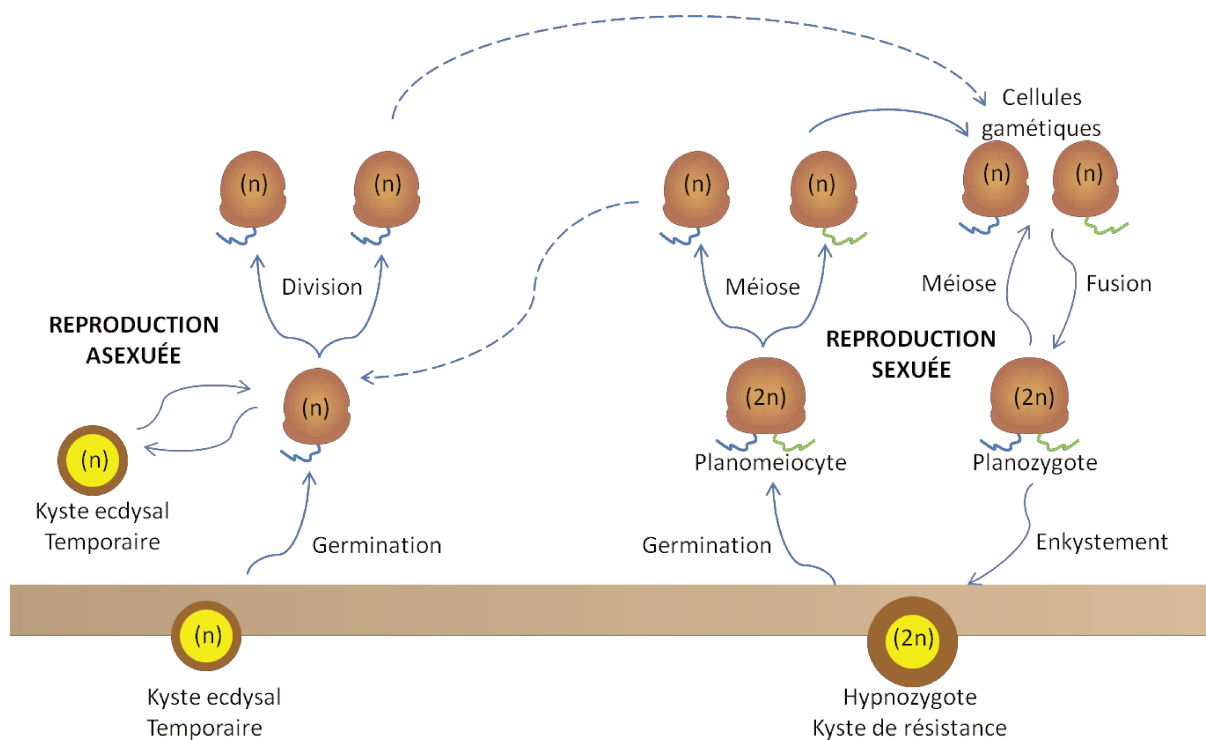


Figure 12 : Schéma du cycle biologique des Dinoflagellés montrant l'alternance entre la multiplication végétative, la reproduction sexuée et l'enkystement (Présent travail).

La reproduction sexuée se produit par la fusion d'isogamètes formés par simple division d'une cellule végétative pour donner un planozygote diploïde mobile (Von Stosch, 1973 ; Pfiester et Anderson, 1987 ; Parrow *et al.*, 2002). Chez la plupart des Dinoflagellés, le planozygote perd sa mobilité et passe à un stade benthique de kyste permanent ou hypnozygote résistant aux conditions défavorables et va subir une période de dormance de quelques jours à plusieurs années (Anderson *et al.*, 1984 ; Pfiester et Anderson, 1987 ; Hallegraeff *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2002 ; Anderson et Rengefors, 2006 ; Lee, 2007). A la fin

de la période de dormance, l'hypnozygote germe et produit un planomeiocyte qui se divise par une méiose. Cette méiose se produit apparemment dans le kyste, juste avant le désenkystement. Il est à noter que les kystes ont des parois plus épaisses que les cellules végétatives. Certains kystes, y compris des hypnozygotes à courte période de dormance, présentent une tabulation similaire à celle des cellules végétatives. Cependant, chez certaines espèces, notamment celles formant des hypnozygotes à longue période de dormance, la tabulation des kystes est totalement différente de celle des cellules végétatives. Il est toutefois important à signaler que chez quelques espèces de dinoflagellés, le planozygote peut produire directement des cellules végétatives sans passer par le stade hypnozygote (Figuerola *et al.*, 2010) (Figure 12).

2.3 La répartition des Dinoflagellés

Les espèces de Dinoflagellés potentiellement toxiques sont présentes dans tous les écosystèmes aquatiques, ayant une large répartition mondiale (Smayda, 2002). Leur expansion est principalement due à leur formidable capacité d'adaptation aux différents écosystèmes selon des conditions environnementales variées, grâce notamment à leur mobilité, la diversité des modes de nutrition et les différents stades de leur cycle de vie qui leurs permettent de résister aux conditions défavorables (Gómez, 2012). Cependant, il en résulte dans certains cas une prolifération excessive de ces derniers provoquant ainsi des répercussions environnementales et sanitaires nocives. Les côtes méditerranéennes n'échappent pas à cette tendance. En effet, les épisodes de prolifération massive des Dinoflagellés sont signalés de plus en plus fréquemment. L'une des espèces les plus signalées durant les dernières décennies est *Alexandrium minutum* producteur de toxines de type PSP et responsable d'importants dégâts notamment économiques (Ignatiades *et al.*, 2007 ; Van Lenning *et al.*, 2007 ; Garcés et Camp, 2012).

Bien que la grande majorité des efflorescences nocives soit due au développement des Dinoflagellés, seuls 10 % d'entre eux produisent des toxines (Smayda et Reynolds, 2003 ; Burkholder *et al.*, 2006). La teneur de ces toxines varie en fonction des facteurs environnementaux et nutritionnels, et les réponses physiologiques à ces facteurs sont généralement intra-spécifiques (Burkholder *et al.*, 2001).

3 Les espèces du G. *Ostreopsis*

Les espèces de Dinoflagellés du G. *Ostreopsis* Schmidt (1901) appartiennent à la classe des Dinophyceae, l'ordre des Gonyaulacales et la famille des Ostreopsidaceae (Guiry et Guiry, 2018). Des espèces du G. *Ostreopsis* ont été signalées depuis longtemps et ont été associées au Dinoflagellé toxique benthique *Gambierdiscus toxicus* responsable des épisodes à Ciguatera dans les zones tropicales endémiques (Ballantine *et al.*, 1985 ; Carlson et Tindall, 1985, Bomber et Aikman, 1989 ; Accoroni et Totti, 2016). Par conséquent, on pensait incorrectement que ces espèces étaient associées au syndrome de Ciguatera (Tosteson, 1995). En effet, certaines espèces d'*Ostreopsis* sont toxiques, mais leurs toxines (appartenant pour la plupart au groupe des palytoxines) ne sont pas celles impliquées dans la Ciguatera. Faust (2009) a rapporté que les espèces de Dinoflagellés benthiques du G. *Coolia*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, ont été signalées dans les zones endémiques du phénomène Ciguatera associées à *Gambierdiscus toxicus*. Cependant, les données de cette étude ont suggéré qu'à des températures élevées de l'eau (29 à 32°C), l'abondance des espèces d'*Ostreopsis* et de *Gambierdiscus* a augmenté, alors que celle de *Prorocentrum* a diminué. A cause de cette tendance, on a longtemps pensé que les espèces du genre *Ostreopsis* étaient associées aux cas d'intoxication par CFP (Ciguatera Fish Poisoning).

Le genre regroupe actuellement 11 espèces, dont deux espèces découvertes récemment ; *Ostreopsis rhodesae* sur les côtes australiennes (Verma *et al.*, 2016) et *Ostreopsis fattorussoi* sur les côtes libanaises et chypriotes (Accoroni *et al.*, 2016). Originaire des régions tropicales (Ballantine *et al.*, 1988 ; Morton *et al.*, 1992; Grezbyk *et al.*, 1994; Faust *et al.*, 1996), les espèces du G. *Ostreopsis* ont connu une expansion géographique importante. Actuellement, les espèces appartenant à ce genre prolifèrent dans les régions tempérées, notamment sur les côtes du pourtour méditerranéen (Maso *et al.*, 2003; Vila et Maso, 2005; Maso et Garcès, 2006 ; Miraglia *et al.*, 2009). Elles sont, de ce fait, considérées comme invasives (Zenetos *et al.*, 2005 ; Streftaris et Zenetos, 2006 ; Ignatiades et Gotsis-Skretas, 2010). Les espèces du G. *Ostreopsis* sont : *Ostreopsis* cf. *ovata*, *O.* cf. *siamensis*, *O. lenticularis*, *O. heptagona*, *O. mascarenensis*, *O. labens*, *O. marina*, *O. belizeana*, *O. caribbeana*, *O. rhodesae*, *O. fattorussoi* (Figure 13) sont principalement benthiques et se développent sur plusieurs substrats abiotiques et biotiques grâce notamment à leur mucus qui est constitué de filaments de polysaccharides. Ce mucilage leur permet de s'accrocher sur ces derniers, ceci n'empêche

pas leur existence dans la colonne d'eau (Mangialajo *et al.*, 2011 ; Honsell *et al.*, 2013) (Figure 14).

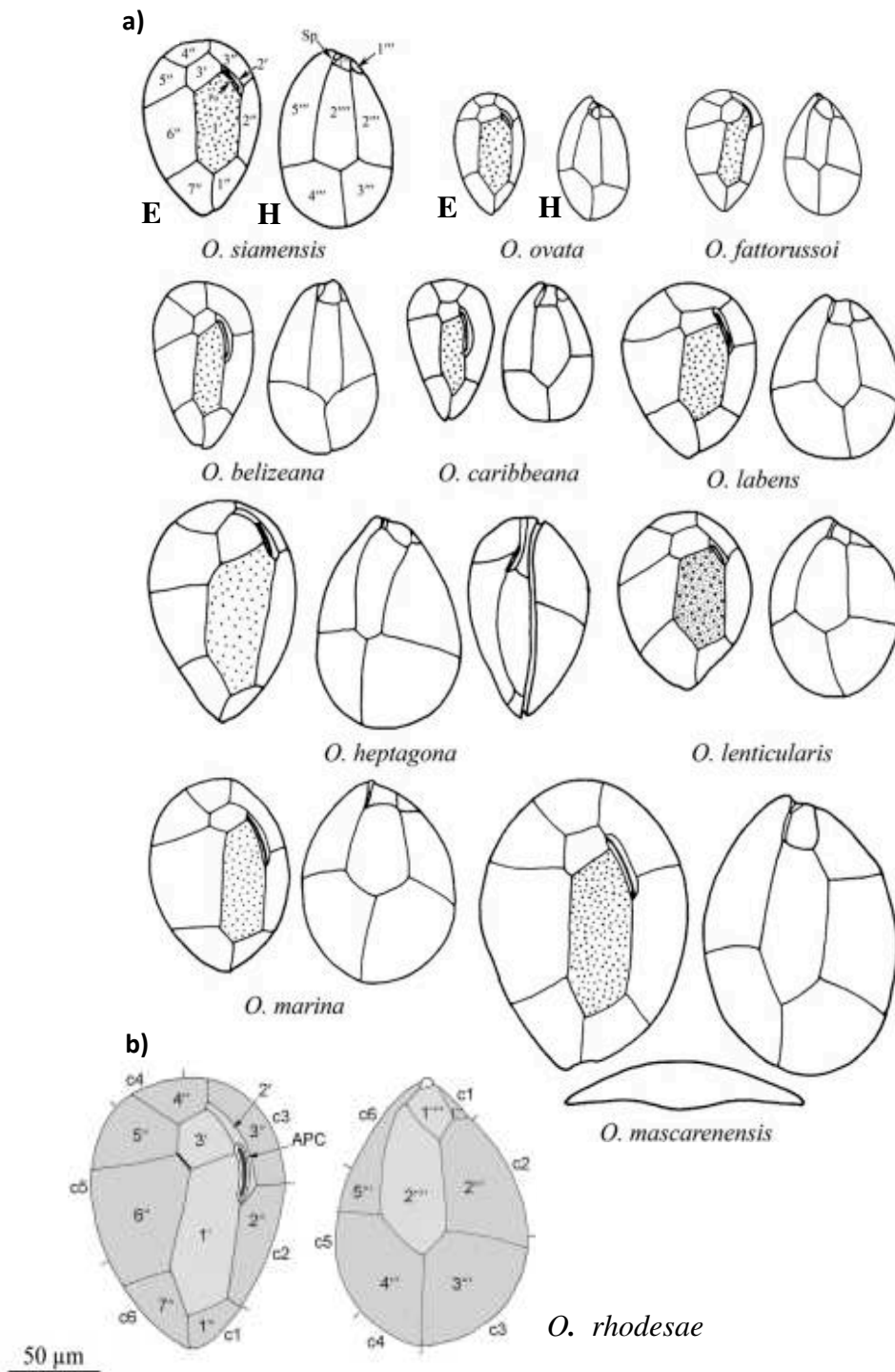


Figure 13 : Les modèles de plaques des cellules du G. *Ostreopsis* (a) modifié d'après Hoppenrath *et al.*, (2014), (b) *Ostreopsis rhodesae* (Verma *et al.*, 2016), épithèque (E), hypothèque (H).

Considérées comme potentiellement toxiques, les espèces du G. *Ostreopsis* produisent des phycotoxines de type palytoxine (PLTX) et ses analogues (PLTX-like) qui comptent parmi les toxines les plus virulentes dans le milieu marin (Taniyama *et al.*, 2003 ; Ciminiello *et al.*, 2010).

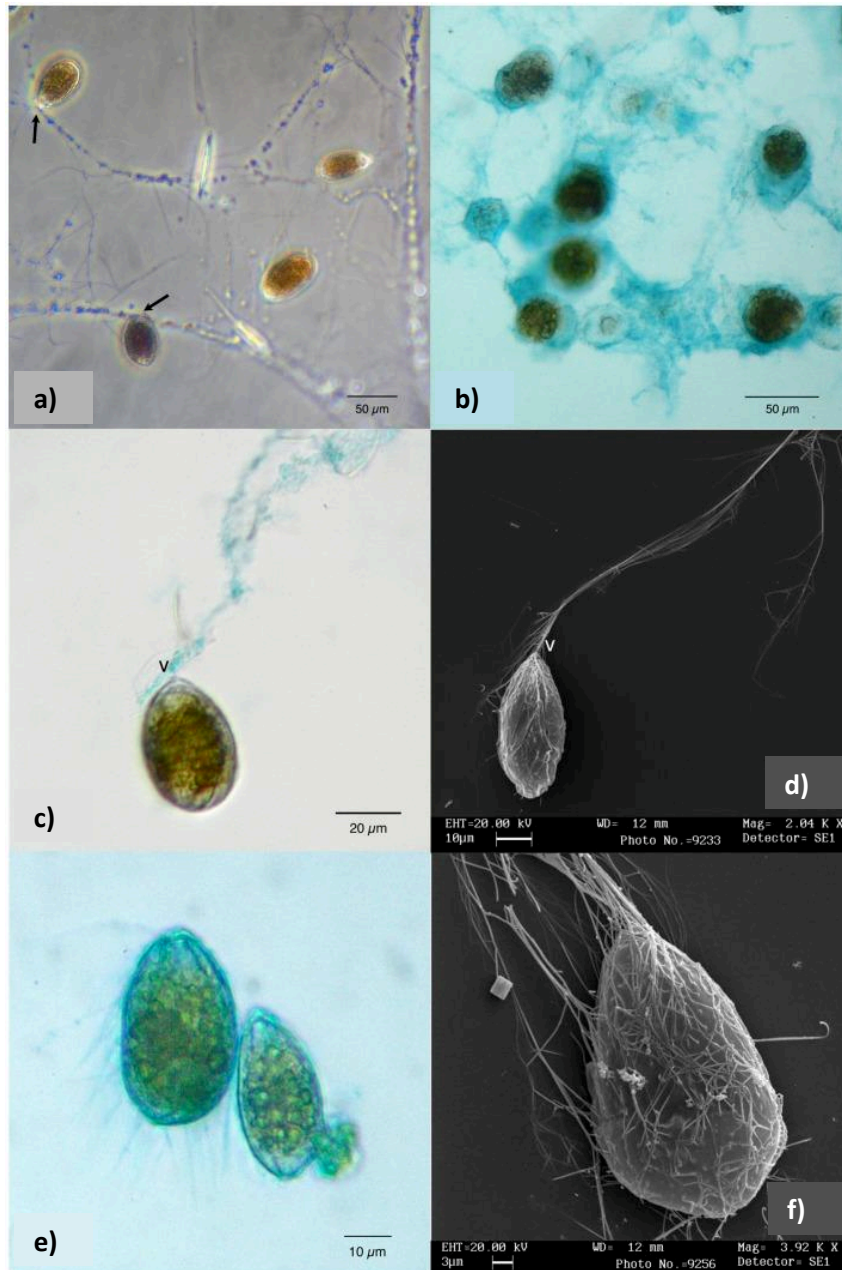


Figure 14 : Réseau du mucilage associé aux cellules d'*Ostreopsis ovata* : (a) Les cellules attachées à un réseau complexe de minuscules filaments, avec ancrage du côté ventral (flèches), (b) Abondance de polysaccharides acides autour des cellules, (c) Cellule pourvue d'un long filament du côté ventral, (d) Cellule observée par microscopie électronique à balayage, (e) Cellules fixées au glutaraldéhyde colorées avec Alcian Blue 8GX, (f) Trichocystes d'une cellule (d'après Honsell *et al.*, 2013).

3.1 La répartition géographique

Les espèces du *G. Ostreopsis* sont d'origine tropicale et subtropicale (Ballantine *et al.*, 1988 ; Morton *et al.*, 1992 ; Grzebyk *et al.*, 1994 ; Faust, 1995 ; Parsons et Preskitt, 2007). Elles sont généralement observées à des latitudes comprises entre 28°N et 20°S (Faust *et al.*, 1996). Cependant, depuis les dernières décennies, la zone colonisée par ces espèces semble s'être élargie et a atteint des latitudes comprises entre 45°N et 45°S (Rhodes, 2011). Ainsi des proliférations d'*Ostreopsis* sont de plus en plus signalées dans les zones tempérées: en Méditerranée (Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Congestri *et al.*, 2006 ; Mangialajo *et al.*, 2011), en Nouvelle Zélande (Chang *et al.*, 2000 ; Rhodes *et al.*, 2000 ; Shears et Ross, 2009), en Australie (Pearce *et al.*, 2001 ; Rhodes, 2011 ; Verma *et al.*, 2016), sur les côtes japonaises (Sato *et al.*, 2011 ; Selina *et al.*, 2014), au Brésil (Nascimento *et al.*, 2012) et en Russie (Selina et Orlova, 2010) (Figure 15).



Figure 15 : Distribution mondiale des espèces du *G. Ostreopsis* (Rhodes, 2011).

En Méditerranée, trois espèces du genre *Ostreopsis* ont été identifiées : *O. siamensis*, *O. ovata* et *O. fattorussoi*. L'espèce *O. ovata* est la plus répandue le long des côtes méditerranéennes. Souvent confondue avec *O. siamensis*, elle a été observée pour la première fois dans la baie de Villefranche-Sur-Mer en 1972 (Taylor, 1979). Plus tard, elle a été signalée sur les côtes italiennes dans la mer Tyrrhénienne en 1994 (Tognetto *et al.*, 1995) et depuis, sa présence a été confirmée au niveau de la majorité des rives Méditerranéennes : en Toscane (Sansoni *et al.*, 2003), dans la mer des Baléares (Penna *et al.*, 2005), dans la mer Ligure (Ciminiello *et al.*, 2006 ; Mangialajo *et al.*, 2008), dans la mer Adriatique (Monti *et al.*, 2007 ; Battochi *et al.*, 2010), dans la mer Egée (Aligizaki et Nikolaidis, 2006), le long des côtes catalanes (Battochi *et al.*, 2010 ; Vila *et al.*, 2016), et le long des côtes méditerranéennes françaises (Blanfuné *et al.*, 2015), en passant par les côtes tunisiennes (Turki, 2005 ; Turki *et al.*, 2006 ; Mabrouk *et al.*, 2014 ; Ben Brahim *et al.*, 2015 ; Ben Gharbia *et al.*, 2016 ; Abdennadher *et al.*, 2017). A l'instar d' *O. ovata*, *O. siamensis* a été observée pour la première fois en 1979 sur la côte libanaise (Abboud-Abi Saab, 1989 ; Abboud-Abi Saab *et al.*, 2013). Elle a été ensuite signalée en Grèce (Aligizaki et Nikolaidis, 2006), en Sicile (Penna *et al.*, 2005, Gangemi *et al.*, 2006, Amorim *et al.*, 2011), et les côtes méditerranéennes ibériques (Vila *et al.*, 2001 ; Penna *et al.*, 2005). Récemment, *O. fattorussoi* a été détectée sur les côtes libanaises et chypriotes (Accoroni *et al.*, 2016). A ces trois espèces, s'ajoute *Ostreopsis sp.* qui a été signalée le long les côtes algériennes (Touahria et Seridji, 2011 ; Illoul *et al.*, 2012) et égyptiennes (Ismael et Halim, 2012) mais dont l'identification n'est pas encore précisée (Figure 16).



Figure 16 : Distribution des espèces du G. *Ostreopsis* en Méditerranée.

Concernant les eaux tunisiennes deux espèces du G. *Ostreopsis* ont été signalées. Au Nord du pays, des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *siamensis* ont été observées au niveau de plusieurs localités. Depuis 1995, un programme de suivi national a été en opération dans les zones de production de mollusques bivalves, où *O. cf. siamensis* a été décrite au niveau du lac Bizerte et Canal de Tunis (Turki et El Abed, 2001). En octobre 2000, les épiphytes *Prorocentrum lima* et *O. siamensis* ont représenté 86.4 % des Dinoflagellés du golfe de Tunis (Turki, 2005 ; Turki *et al.*, 2006 ; Aissaoui *et al.*, 2014). *O. ovata* a été signalée au niveau de la Baie de Bizerte par Ben Gharbia *et al.*, 2016.

Au centre du pays, les travaux réalisés le long des côtes d'el Mahdia et Chebba ont signalé de fortes abondances d'*O. ovata* et d'*O. siamensis* sur les feuilles de *Posidonia oceanica* et dans la colonne d'eau (Mabrouk *et al.*, 2012 ; Mabrouk *et al.*, 2014 ; Moncer *et al.*, 2017).

Les côtes Sud de la Tunisie sont fortement impactées par les phénomènes de proliférations d'*O. ovata*. L'étude de la distribution d'*O. ovata* réalisée durant 16 ans (1997-2012) dans la colonne d'eau des zones destinées à la collecte des palourdes au Sud de la Tunisie, démontre la présence annuelle d'*O. ovata* notamment le long du golfe de Gabès, aussi bien au niveau du port de Sfax (7×10^3 cellules L⁻¹), le long des côtes de l'île de Djerba (8.8×10^3 cellules L⁻¹) (Abdennadher *et al.*, 2017), ainsi que sur les côtes de l'archipel de Kerkennah (86.67 cellules L⁻¹) (Ben Brahim *et al.*, 2015 ; Feki *et al.*, 2016) (Figure 17).

La répartition spatiale croissante des espèces du G. *Ostreopsis* dans les eaux tempérées, notamment sur les côtes Méditerranéennes, semble être la conséquence de plusieurs phénomènes principalement anthropiques, tels que l'eutrophisation des eaux côtières (Maso et Garcés, 2006), la construction des aménagements portuaires (Vila *et al.*, 2001a ; Vila et Maso, 2005), le transport des kystes dormants ou des cellules dans les eaux de ballast et les changements climatiques globaux (Maso et Garcés, 2006; Miraglia *et al.*, 2009).

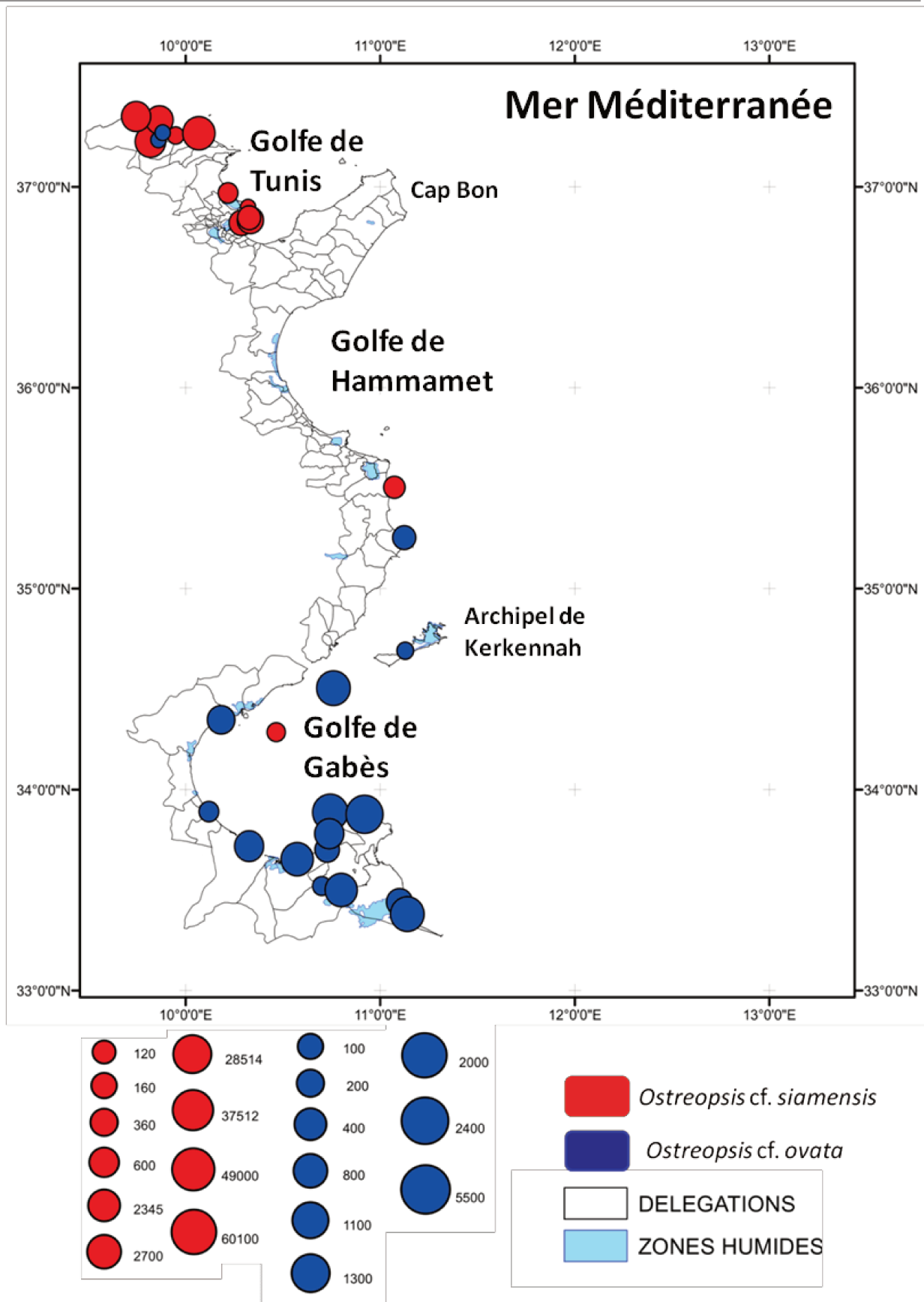


Figure 17 : Distribution des espèces du G. *Ostreopsis* le long des côtes Tunisiennes.

3.2 L'identification des espèces du G. *Ostreopsis*

3.2.1 La morphologie

Les microalgues du G. *Ostreopsis* sont unicellulaires, biflagellées et de forme ovoïde (Fukuyo, 1981). Elles sont couvertes de plaques cellulosesiques formant les thèques, dont la taille et la forme varient selon les espèces. Les cellules d'*Ostreopsis* spp. sont assez larges, en forme de gouttes et aplaties, avec une longueur ou diamètre dorso-ventral (DV) compris entre 27 μm et 195 μm et une largeur (W) variant de 25 à 138 μm . Elles possèdent des pores qui sont représentés par des fentes longues, courbées ou droites. Ces pores sont des ouvertures ou des canaux dans les parois cellulaires qui peuvent être impliqués dans l'extrusion de trichocystes ou de mucocystes, ou dans d'autres processus actifs (Honsell *et al.*, 2013). La cellule d'*Ostreopsis* est composée d'une épithèque et d'une hypothèque de taille égale. Par contre, l'organisation et la forme des plaques thécales de ces dernières diffèrent. L'épithèque est composée de 9 plaques et abrite le pore apical, qui est une fente incurvée dont la longueur varie de 6,9 à 27 μm selon l'espèce (Faust *et al.*, 1996 ; Penna *et al.*, 2005). L'hypothèque est composée de huit plaques. Le cingulum fin, profond avec des bords lisses est composé de six plaques (Faust *et al.*, 1996). Le sulcus, très petit, est encastré et est caché dans le cingulum. Les cellules possèdent de nombreux chloroplastes marron-dorés, excepté sur le bec ventral qui est transparent, leur permettant de réaliser leur fonction photosynthétique (Faust *et al.*, 1996) (Figure 18).

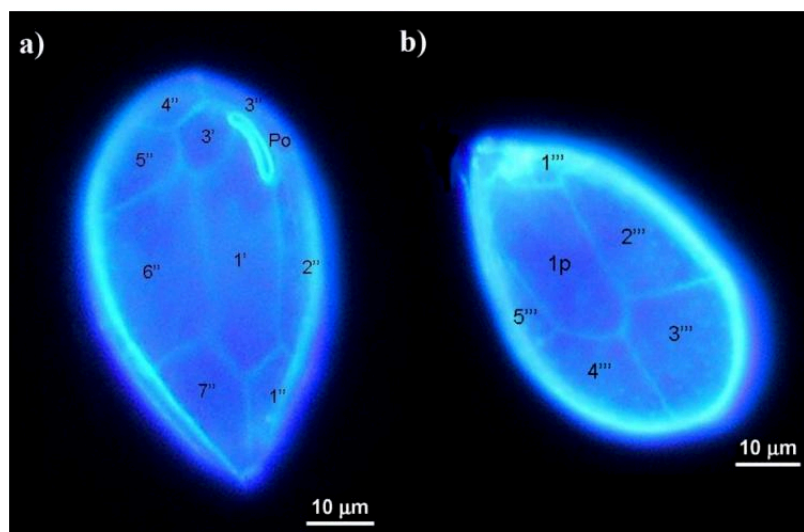


Figure 18 : Tabulation d'une cellule d'*Ostreopsis* cf. *ovata* ; (a) vue apicale, (b) vue antapicale au moyen de la Microscopie par épifluorescence. (d'après Monti *et al.*, 2007).

3.2.2 Les critères taxonomiques

En **Méditerranée**, seules trois espèces ont été répertoriées jusqu'à présent, *O. cf. ovata*, *O. cf. siamensis* et *O. fattorussoi* (Vila *et al.*, 2001 ; Penna *et al.*, 2005, 2010, 2012 ; Battocchi *et al.*, 2010 ; Totti *et al.*, 2010 ; Mangialajo *et al.*, 2011 ; Perini *et al.*, 2011, Mabrouk *et al.*, 2012 ; Accoroni *et al.*, 2016). L'identification précise de ces espèces du G. *Ostreopsis* dans des échantillons prélevés dans le milieu naturel reste sur le terrain est souvent problématique.

L'identification des espèces d'*Ostreopsis* est basée, entre autres, sur l'aspect morphologique, principalement leurs taille et forme, ainsi que le nombre, la disposition et la morphologie des plaques thèques (tabulation) (Steidinger et Tangen, 1997 ; Penna *et al.*, 2005). Les caractères taxonomiques les plus appropriés pour discriminer les différentes espèces sont la comparaison du rapport des diamètres dorso-ventraux et antéro-postérieurs (DV/AP) ainsi que le rapport dorso-ventral et trans-diamètre (DV/W) (Penna *et al.*, 2005 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Selina et Orlova, 2010 ; Parsons *et al.*, 2012). Si le rapport DV/AP <2, l'espèce serait *O. cf. ovata*, alors que si DV/AP >4, l'espèce correspondrait à *O. cf. siamensis*.

Cependant, compte tenu de l'ambiguïté dans la définition des caractéristiques morphologiques dans la grande majorité des cas, cette méthode est insuffisante (Accoroni *et al.*, 2012b ; David *et al.*, 2012) et la taxonomie du genre *Ostreopsis* reste mal définie (Rhodes *et al.*, 2000 ; Vila *et al.*, 2001b ; Penna *et al.*, 2005 ; Totti *et al.*, 2010, Sato *et al.*, 2011, Accoroni *et al.*, 2012). C'est ce qui a amené de nombreux chercheurs à réviser la description des espèces du G. *Ostreopsis* en séquençant les régions ITS et de l'ADNr 5.8S, et en utilisant ces données en combinaison avec les données morphométriques. Leaw *et al.* (2001) ont isolé plusieurs souches d'*Ostreopsis* des eaux littorales de Malaisie et ont montré que *O. cf. ovata* a été séparée en deux groupes géographiques génétiquement distincts : un groupe provenant du détroit de Malacca et un groupe provenant de la mer de Chine méridionale. Les analyses ont montré des différences morphologiques mineures entre les souches. Les séquences 5.8S et ITS de ces souches Malaisiennes diffèrent de celles des souches méditerranéennes (Penna *et al.*, 2005), suggérant une variabilité génétique par rapport à la distribution géographique au sein de l'espèce. Les résultats de cette étude confortent l'idée de réaliser des études moléculaires, pour trancher sur l'identification de ces espèces.

3.2.3 L'analyse moléculaire

La taxonomie des espèces du G. *Ostreopsis* nécessite une révision majeure en raison de la forte variabilité de la morphologie de l'espèce et de l'absence de caractérisation génétique (Berdalet *et al.*, 2017).

L'étude taxonomique basée sur cette caractérisation génétique des espèces du genre *Ostreopsis* est assez récente, la première étude qui a permis d'avoir une description valide a été réalisée sur des souches Malaisiennes définies comme *O. ovata* et *O. lenticularis* (Pin *et al.*, 2001). Depuis, plusieurs études phylogénétiques ont fourni un nombre croissant de clades moléculaires, appelés aussi groupes monophylétiques correspondant à un groupe d'organismes comprenant un représentant particulier et tous ses descendants qui ont un ancêtre commun, du genre *Ostreopsis* (Battocchi, 2009 ; Laza-Martinez *et al.* 2011 ; Sato *et al.*, 2011 ; David *et al.*, 2012 ; Nascimento *et al.*, 2012 ; Penna *et al.*, 2005 ; 2010 ; 2012). Selon ces études, les espèces du G. *Ostreopsis* pourraient être groupées en 6 principaux clades (Figures 19, 20) : *O. cf. siamensis* (clades de l'Atlantique, du Pacifique et de la Méditerranée), *O. cf. lenticularis* et *O. cf. labens* (dans la région Indo-Pacifique), *O. cf. ovata* (clades de l'Atlantique, du Pacifique et de la Méditerranée), 2 espèces *Ostreopsis* sp. indéfinies (clades de Méditerranée et de l'Atlantique) (Penna *et al.*, 2014), et *O. fattorussoi*, souches récemment isolées de Chypre et de la côte du Liban (Accoroni *et al.*, 2016), sans oublier *O. rhodesae*, souches isolées sur la côte Nord-Est de l'Australie (Verma *et al.*, 2016).

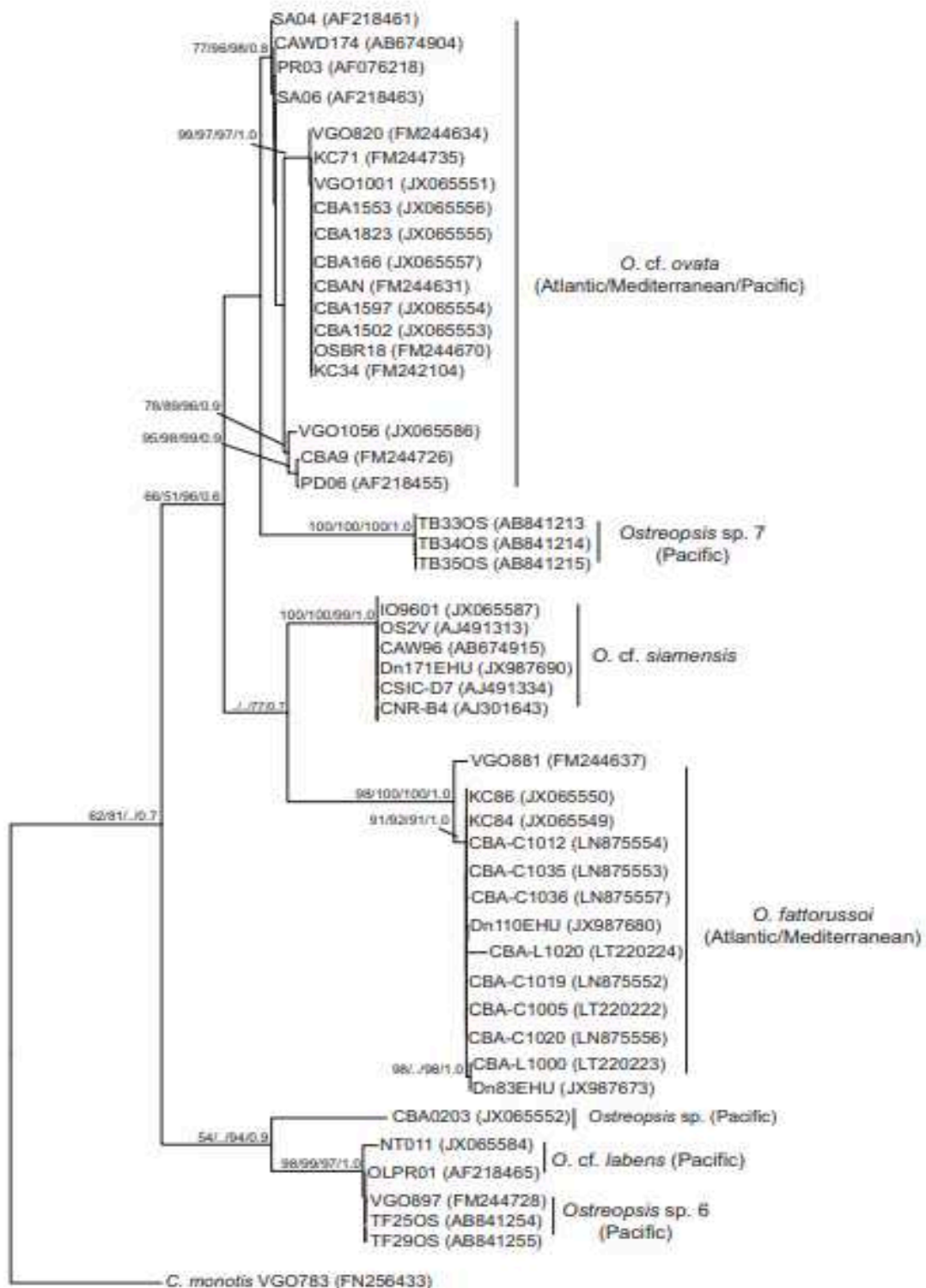


Figure 19 : Arbre phylogénétique à probabilité maximale du G. *Ostreopsis* sur la base des séquences du gène ribosomique ITS-5.8S. *Coolia monotis* VGO783 identifié comme exogroupe d'après Accoroni *et al.*, (2016).

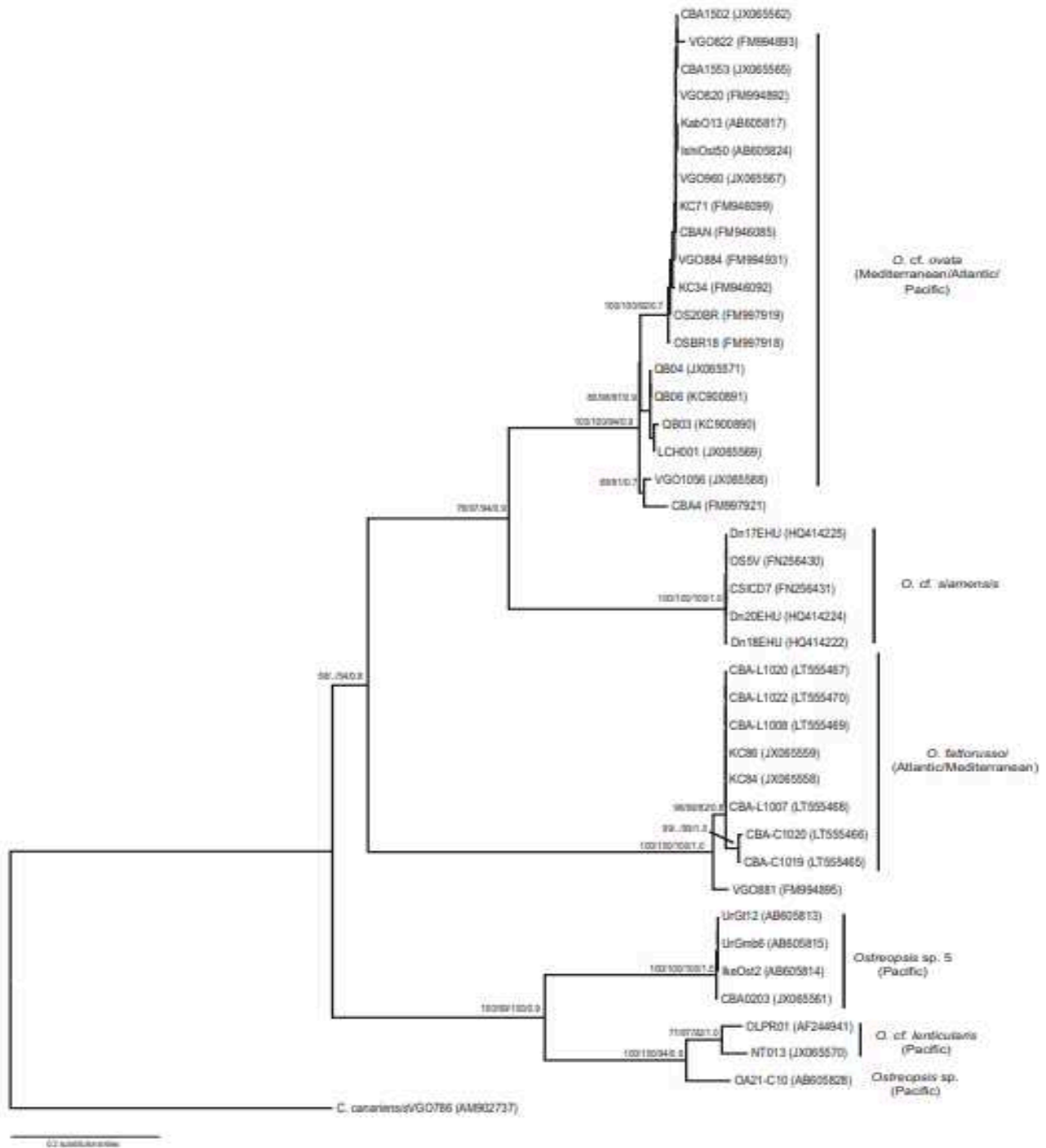


Figure 20 : Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance du G. *Ostreopsis* déduit des séquences du gène ribosomique LSU. *Coolia canariensis* VGO786 identifié comme exogroupe d'après Accoroni *et al.*, (2016).

Par ailleurs, la majorité des études se concentrent sur l'espèce *O. cf. ovata*, dominante sur les côtes Méditerranéennes (Ben Gharbia *et al.*, 2016, Abdennadher *et al.*, 2017). Grâce à leur grande diversité intra-spécifique, il a été suggéré que cette espèce pourrait être un complexe d'espèces (Penna *et al.*, 2010). A l'instar de la Méditerranée, la même diversité a été également confirmée pour la souche *O. cf. ovata* du Pacifique (Kang *et al.*, 2013 ; Tawong *et al.*, 2014) ainsi que celle présente dans les eaux japonaises (Sato *et al.*, 2011).

3.3 Le profil toxinique des espèces du *G. Ostreopsis*

Les espèces du *G. Ostreopsis* sont productrices des palytoxines (PLTX), faisant partie des toxines les plus virulentes en milieu marin, même à de faibles concentrations (Taniyama *et al.*, 2003 ; Ciminiello *et al.*, 2010 ; Munday, 2011). Son mode d'action consiste à cibler la pompe Na^+/K^+ -ATPase, entraînant un dysfonctionnement dans le transport ionique intracellulaire (Artigas et Gadsby, 2003, 2004). La palytoxine est une molécule à structure complexe, polyhydroxylée, ayant des propriétés amphiphiles et présente un poids moléculaire de 2680 Da et dont la formule brute est $\text{C}_{129}\text{H}_{223}\text{N}_3\text{O}_{54}$ (Moore et Bartolini, 1981) (Figure 21).

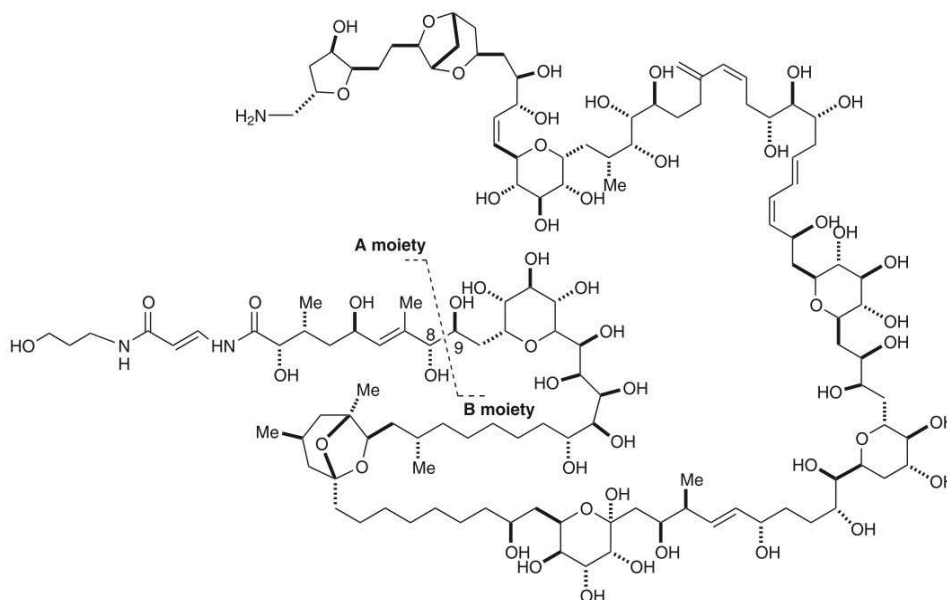


Figure 21 : Structure de la palytoxine (Ciminiello *et al.*, 2010).

La palytoxine (PLTX) et ses analogues ont été détectés chez plusieurs espèces du G. *Ostreopsis* parmi lesquelles *O. siamensis*, *O. mascarenensis*, *O. heptagona*, *O. lenticularis*, *O. cf. ovata* et *O. fattorussoi* (Nakajima *et al.*, 1981 ; Norris *et al.*, 1985 ; Yasumoto *et al.*, 1987 ; Holmes *et al.*, 1988 ; Mercado *et al.*, 1994 ; Meunier *et al.*, 1997 ; Lenoir *et al.*, 2004 ; Ciminiello *et al.*, 2006 ; Guerrini *et al.*, 2010 ; Accoroni *et al.*, 2011 ; Scalco *et al.*, 2012 ; Uchida *et al.*, 2013 ; García-Altres *et al.*, 2014 ; Brissard *et al.*, 2015 ; Tartaglione *et al.*, 2016). L'Ostreosine-D (OST-D) est le premier analogue isolé à partir de cultures de *O. siamensis* (Usami *et al.*, 1995 ; Ukena *et al.*, 2001). S'en suit la Mascarenotoxine (MCTX), isolée de *O. mascarenensis* (Lenoir *et al.*, 2004) et l'Ovatoxine (OVTX) qui a été extraite à partir des souches d'*O. cf. ovata* (Ciminiello *et al.*, 2008, 2010, 2012 ; Rossi *et al.*, 2010) et qui compte différents analogues, OVTX a, b, c, d, e, f, g et h, IsobPLTX et MCTX-a et c (Rossi *et al.*, 2010 ; Scalco *et al.*, 2012 ; García-Altres *et al.*, 2014 ; Brissard *et al.*, 2015). Récemment, 4 nouveaux analogues toxiques OVTX (i, j₁, j₂ et k) ont été isolés de la souche d'*O. fattorussoi* de Chypre (Tartaglione *et al.*, 2016). Par ailleurs, il est important de préciser que les facteurs environnementaux tels que la température de l'eau, la salinité, la lumière et les nutriments ainsi que les caractéristiques des souches, à savoir le site de prélèvement, la phase de croissance et l'âge de la souche semblent affecter la teneur en toxines dans les cultures des espèces du G. *Ostreopsis* (Guerrini *et al.*, 2010 ; Ciminiello *et al.*, 2012 ; Pezzolesi *et al.*, 2012 ; Scalco *et al.*, 2012 ; Vanucci *et al.*, 2012).

3.3.1 L'impact sanitaire

Les efflorescences d'*Ostreopsis* ont souvent été associées à des effets nocifs sur la santé humaine (Gallitelli *et al.*, 2005) et à la mortalité d'organismes marins benthiques (Simoni *et al.*, 2003 ; Shears et Ross, 2009, 2010), en raison de la production des palytoxines.

Les épisodes de prolifération d'*O. cf. ovata* sont généralement associés à l'apparition de symptômes chez les utilisateurs de la mer, tels que des irritations cutanées, des yeux et du nez, de la fièvre, de la toux sèche et dans les cas les plus extrêmes une détresse respiratoire aiguë (Àlvarez *et al.* 2005 ; Durando *et al.* 2007 ; Ciminiello *et al.*, 2008 ; Tichadou *et al.* 2010 ; Vila *et al.*, 2016). La cause de cette intoxication est liée à l'inhalation des cellules d'*Ostreopsis* transportées suite à un coup de vent par les aérosols (Casabianca *et al.*, 2013 ; Ciminiello *et al.*, 2014 ; Vila *et al.*, 2016). Néanmoins, la plupart de ces symptômes

disparaissent en s'éloignant de la zone de prolifération et l'hospitalisation est rarement nécessaire.

Comme les autres toxines pouvant s'accumuler chez les poissons ou les mollusques bivalves, la palytoxine peut être aussi la cause d'intoxication alimentaire de l'homme suite à la consommation d'organismes contaminés par la PLTX (Aligizaki *et al.*, 2008 ; Amzil *et al.*, 2012 ; Biré *et al.*, 2015) et peut même entraîner la mort (Alcala *et al.*, 1988 ; Onuma *et al.*, 1999). Les symptômes rapportés par des consommateurs ayant mangé des produits contaminés, se manifestent en général par des malaises gastro-intestinaux, des diarrhées, des nausées, des vomissements, des ataxies ou pathologie neuromusculaire caractérisée par un manque de coordination fine des mouvements volontaires, des vertiges, l'engourdissement des extrémités, des convulsions et des bradycardies.

3.3.2 L'impact écologique

A l'instar des séquelles sanitaires, l'impact écologique des efflorescences d'*Ostreopsis* se reflète par des mortalités en masse d'invertébrés comme les crustacés, les bivalves, les gastéropodes et les échinodermes (Simoni *et al.*, 2003 ; Vale et Ares, 2007 ; Mattos Nascimento *et al.*, 2008 ; Shears et Ross, 2009 ; 2010 ; Totti *et al.*, 2010). Ces effets toxicologiques surviennent soit directement de l'organisme producteur de la toxine vers le prédateur, soit indirectement via des organismes qui accumulent cette toxine dans leur tissu et représentent ainsi des vecteurs de toxicité pour leurs prédateurs.

L'impact est particulièrement visible sur l'oursin avec notamment des pertes d'épines, l'altération de son exosquelette suivie par la mort (Rhodes *et al.*, 2002, 2010 ; Shears et Ross, 2009), mais aussi un impact sur sa reproduction, affectant aussi sa descendance, par l'apparition de malformations et de problèmes du développement qui durent même plusieurs mois après la fin des efflorescences d'*Ostreopsis* (Migliaccio *et al.*, 2016).

3.4 Ecologie des espèces du G. *Ostreopsis*

L'expansion mondiale des espèces du genre *Ostreopsis* a suscité l'intérêt des scientifiques. Plusieurs études ont été menées afin de déterminer le potentiel rôle de l'interaction des facteurs environnementaux qui régissent la dynamique de ces populations. En effet, le

déclenchement d'une efflorescence d'*Ostreopsis* résulte de la synergie de facteurs biologiques, climatiques et physico-chimiques parmi lesquels la température de l'eau, la luminosité, la salinité, l'hydrodynamisme, les nutriments et la nature des substrats qui sont les paramètres abiotiques déterminants (Vila *et al.*, 2001b ; Simoni *et al.*, 2003 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Cohu *et al.*, 2013 ; Blanfuné *et al.*, 2015).

3.4.1 La température de l'eau

La température de l'eau semble être un facteur déterminant dans les proliférations des espèces du G. *Ostreopsis*, qui sont généralement signalées pendant les saisons chaudes (Vila *et al.*, 2001a ; 2001b ; Simoni *et al.*, 2003 ; Turki, 2005 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Totti *et al.*, 2010 ; Mangialajo *et al.*; 2011 ; Cohu *et al.*, 2011 ; Accoroni et Totti, 2016 ; Berdalet *et al.*, 2017). De nombreux auteurs ont suggéré que les espèces du G. *Ostreopsis* avaient besoin de températures de l'eau relativement élevées pour proliférer, insinuant que le réchauffement planétaire aurait pu influencer l'expansion de ces microalgues dans les zones tempérées telles que la Méditerranée (Hallegraeff, 2010 ; Granéli *et al.*, 2011). Les données de la littérature montrent que le rôle de la température de l'eau n'est pas le même dans toutes les régions côtières du monde (Accoroni et Totti, 2016) (Tableau 2).

Bien que les concentrations maximales d'*Ostreopsis* ne coïncident pas toujours avec les températures de l'eau les plus élevées dans toutes les zones, un seuil de température semble important dans l'apparition des efflorescences. La croissance d'*Ostreopsis* se déclenche dans une gamme de température comprise entre 18 et 30°C, sachant que ses meilleures performances ont été enregistrées entre 22 et 26 °C. Une étude menée le long de la Riviera del Conero (mer du Nord de l'Adriatique) a montré que, bien que le pic d'abondance a eu lieu à la fin de l'été, à des températures de l'eau comprises entre 18,8 à 24°C, le déclenchement des proliférations a toujours été enregistré à une température de l'eau plus élevée, de l'ordre de 25 à 28,6°C, suggérant ainsi que la population microalgale doit atteindre son développement optimal en fonction d'un seuil de la température de l'eau relativement stable, ce qui serait probablement en relation avec la germination des kystes qui se produit généralement autour de 25°C (Accoroni *et al.*, 2014). En effet, ces auteurs ont indiqué que les efflorescences peuvent persister même à des valeurs de la température de l'eau beaucoup plus basses, de l'ordre de 14,4 à 17,5°C. Il semblerait qu'une fois les kystes d'*Ostreopsis* aient germé, les formes végétatives proliféreraient activement même si les valeurs de la température de l'eau

diminuent. Selon leur morphotype, les kystes observés dans les cultures se différencient en 2 types (Figure 22) : des kystes à paroi simple et des kystes à double paroi. Les kystes à paroi mince sont des cellules non motiles enfermées dans une fine pellicule (paroi à une seule couche) suivant la définition de Bravo *et al.* (2010). Les kystes à double paroi, également observés dans les échantillons de sédiments naturels, sont semblables aux précédents, mais possèdent une paroi plus épaisse. Dans certains cas, un contour de cingulum sur la surface de la paroi est visible, et des fragments de l'ancienne thèque y sont fréquemment observés (Accoroni *et al.*, 2014).

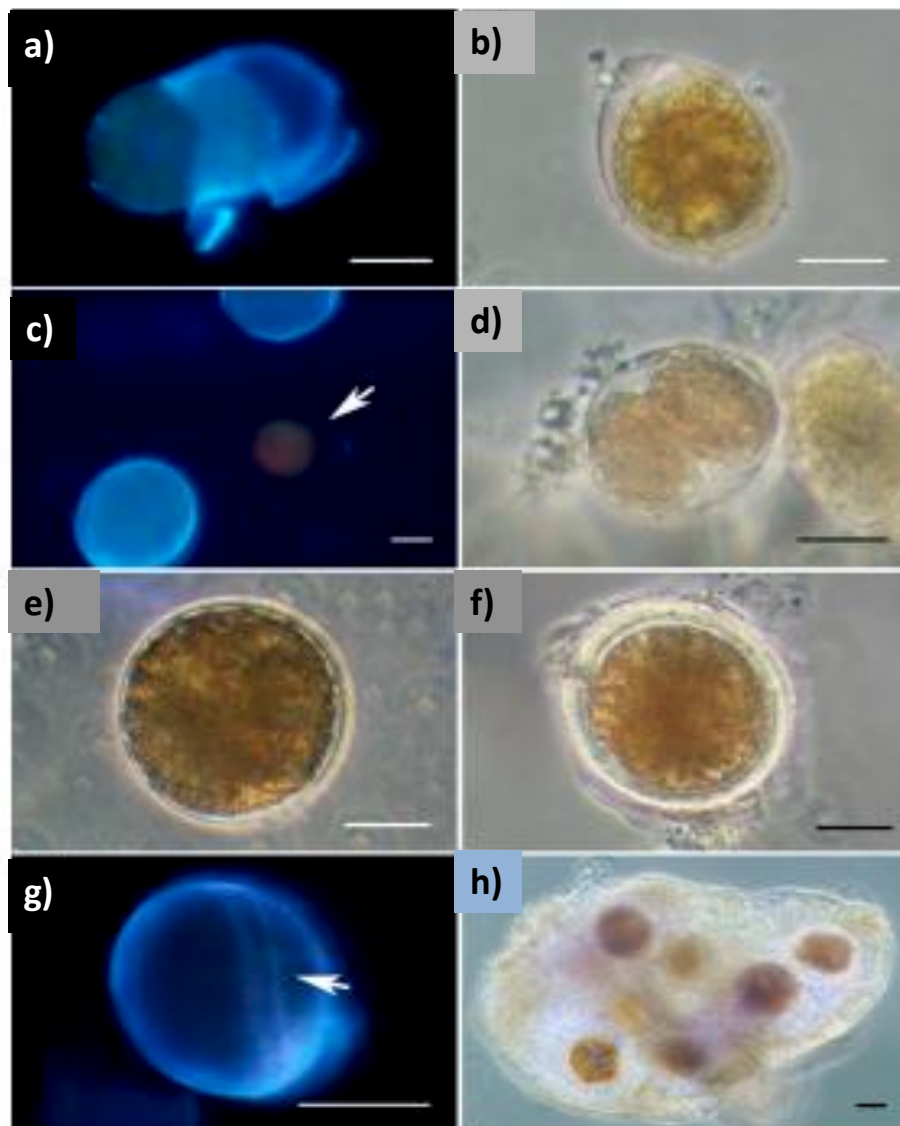


Figure 22 : Kystes d'*Ostreopsis* cf. *ovata* observés à partir de cultures. (a) Cellule végétative produisant un kyste à paroi mince observé au moyen de la microscopie par épifluorescence, (b, e, d) Kyste à paroi mince sous microscope optique, (c) Kyste à paroi mince montrant le protoplaste en division, (f, g) Kystes à double paroi, (h) Kystes à double paroi incorporés dans le mucus (Accoroni *et al.*, 2014).

Toutes ces études montrent que les espèces d'*Ostreopsis* sont capables de former des efflorescences très denses qui se déclenchent sur une large gamme de températures de l'eau en fonction des zones géographiques (Monti *et al.*, 2007 ; Totti *et al.*, 2010 ; Accoroni *et al.*, 2011 ; Ungaro *et al.*, 2005 ; Ciminiello *et al.*, 2006 ; Gangemi *et al.*, 2006 ; Ingarao et Pagliani, 2009 ; Tognetto *et al.*, 1995). Cette large tolérance à différentes températures pourrait favoriser son expansion géographique (Tableau 2).

Tableau 2 : Conditions du milieu lors des proliférations des espèces du G. *Ostreopsis* dans des zones tempérées.

Zone	Espèce(s)	Substrats échantillonnés	Période l'efflorescence	Intervalle de la température de l'eau (°C)	Concentrations maximales	Référence(s)
Méditerranée (Adriatique Nord)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Macroalgues, invertébrés, roches, colonne d'eau	Septembre-Octobre	16.8 - 27.9	1.2x10 ⁶ cellules g ⁻¹ MF (poids frais)	Accoroni <i>et al.</i> , 2015
Méditerranée (Adriatique Sud)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Colonne d'eau	Août	26.4-27.1	-	Ungaro <i>et al.</i> , 2005
Méditerranée (Mer tyrrhénienne)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Colonne d'eau	Août-début Octobre	24.5 - 28	1.13 x 10 ⁶ cells g ⁻¹ MF (poids frais)	Tognetto <i>et al.</i> , 1995
Méditerranée (Mer Ligure)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Macroalgues, colonne d'eau	Juillet-Août	22.6 - 30	2541x10 ³ cellules g ⁻¹ MF (poids frais)	Mangialajo <i>et al.</i> , 2008
Méditerranée (Golfe de Lion)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Macroalgues, colonne d'eau	Juillet-Août	19.2 - 21.5	1.5x10 ⁶ cells g ⁻¹ MF (poids frais)	Mangialajo <i>et al.</i> , 2011, Cohu <i>et al.</i> , 2011
Méditerranée (Mer catalane)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i> <i>Ostreopsis cf. siamensis</i>	Macroalgues, sédiments mous, colonne d'eau	Fin Mars-Octobre	18 - 28.3	1x10 ⁵ cellules L ⁻¹	Vila <i>et al.</i> , 2008
Méditerranée (Mer Egée)	<i>Ostreopsis cf. ovata</i> <i>Ostreopsis cf. siamensis</i>	Macroalgues, sédiments mous, colonne d'eau, angiospermes	Mai-Début Novembre	13.9 - 29.7	0.6x10 ³ cellules L ⁻¹	Spatharis <i>et al.</i> , 2009
Méditerranée (Golfe de Tunis)	<i>Ostreopsis cf. siamensis</i>	Angiospermes	Août-Octobre	20 - 27	2 - 4x10 ⁵ cellules.g ⁻¹ MF	Turki, 2005
Nouvelle Zélande	<i>Ostreopsis cf. ovata</i> <i>Ostreopsis cf. siamensis</i> <i>Ostreopsis lenticularis</i>	Macroalgues, colonne d'eau	Fin Février-Avril	17.8 - 22.1	1.4 × 10 ⁶ cells g ⁻¹ MF	Shears et Ross, 2009
Mer du Japon	<i>Ostreopsis cf. ovata</i> <i>Ostreopsis cf. siamensis</i>	Macroalgues	Août-Octobre	9 - 25	52 × 10 ³ cellules g ⁻¹ MF	Selina <i>et al.</i> , 2014

3.4.2 La luminosité

Les espèces du G. *Ostreopsis* se développent préférentiellement dans les eaux côtières peu profondes où l'intensité lumineuse est forte. Leurs abondances diminuent généralement de 0,5 à 3 mètres de profondeur, pour devenir à presque nulles au-delà de 50 m (Faust *et al.*, 1996 ; Faust, 1999 ; Totti *et al.*, 2010 ; Cohu et Lemée, 2012). *Ostreopsis* semble avoir différentes stratégies d'acclimatation en fonction d'un gradient environnemental variant entre des conditions de température (basse et élevée) et des conditions de luminosité. Cette espèce semble mieux proliférer dans des conditions du début d'été et d'automne lorsque les cellules peuvent s'acclimater efficacement aux changements de la lumière. La croissance a été maximale à une photopériode de 12 h de jour, alors qu'elle était limitée par la densité du flux de photons à courte durée de jour (9h). La photosaturation se produit plutôt lorsque les conditions d'éclairement sont les plus élevées ($1800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fraga *et al.*, 2012). L'intensité lumineuse montre une corrélation positive avec la prolifération d'*Ostreopsis* qui est soupçonnée même d'être impliquée dans la production de toxines (Monti et Cecchin 2012 ; Scalco *et al.*, 2012).

3.4.3 La salinité

Des résultats contrastés ont été rapportés sur l'effet de la salinité et le développement des efflorescences d'*Ostreopsis*. Certaines études prouvent que la salinité présente un effet sur la croissance et la toxicité des cellules d'*Ostreopsis* (Grzebyk et Sechet 2003 ; Pistocchi *et al.*, 2011). En effet, il a été montré que les espèces d'*Ostreopsis* présentes dans certaines zones géographiques (Nouvelle Zélande, Italie) semblent être tolérantes à un gradient de salinité entre 26 et 40 (Pezzolesi *et al.*, 2012). Bien que *Ostreopsis* cf. *ovata* prolifère sur le pourtour Méditerranéen à de fortes valeurs de salinité comprise entre 36 et 40 (Berdalet *et al.*, 2012 ; Accoroni et Totti, 2016 ; Berdalet *et al.*, 2017), celles de la mer de Chine méridionale et de la mer de Thaïlande étudiées dans des conditions expérimentales, présentaient des conditions de croissance semi-optimales à des valeurs faibles (24-30) et intermédiaires (28,7-35), respectivement (Tawong *et al.*, 2015). Par contre, d'autres études ont montré une corrélation négative entre la croissance d'*Ostreopsis* cf. *ovata* et la salinité au niveau des côtes hawaïennes (Parsons et Preskitt, 2007).

Les espèces *O. cf. heptagona* et *O. cf. siamensis* prolifèrent à des salinités comprises entre 28 à 34 le long des côtes des îles Keys en Floride (Morton *et al.*, 1992 ; Rhodes *et al.*, 2000).

Le contraste entre les différents résultats vis à vis de l'effet de la salinité sur la croissance des espèces du G. *Ostreopsis* montre un comportement et une réponse spécifique à chaque souche (Accorni et Totti, 2016).

3.4.4 Les nutriments

La présence de nutriments dans le milieu est un facteur essentiel pour la prolifération microalgale (Pistocchi *et al.*, 2011 ; Glibert *et al.*, 2014). Des études récentes ont fourni des preuves de plus en plus nombreuses confirmant un lien entre l'enrichissement en éléments nutritifs des eaux côtières (eutrophisation anthropique) et les événements d'algues nuisibles (Glibert et Burkholder, 2006 ; Glibert *et al.*, 2010). Cependant, il existe très peu d'informations sur les relations entre la disponibilité des nutriments et l'apparition des populations des espèces du G. *Ostreopsis*. En effet, ces espèces sont présentes à la fois dans des milieux eutrophes (Heisler *et al.*, 2008 ; Hallegraeff, 2010) et oligotrophes (Tindall et Morton, 1998). Certains travaux ont même démontré l'absence de toute corrélation entre eux (Delgado *et al.*, 2006 ; Shears et Ross, 2009) ou une corrélation limitée (Vila *et al.*, 2001 ; Cohu., 2011). Néanmoins, Accoroni *et al.*, 2015 ont relevé une action synergique de la température optimale de l'eau (> 25°C) et des nutriments, en particulier les apports de phosphate dans le milieu (> 0.2 µM), sur les efflorescences associées à *Ostreopsis cf. ovata* provoquant le déclenchement de la germination des kystes et la prolifération des cellules, qui sera maintenue grâce à l'assimilation de cet élément (Figure 23).

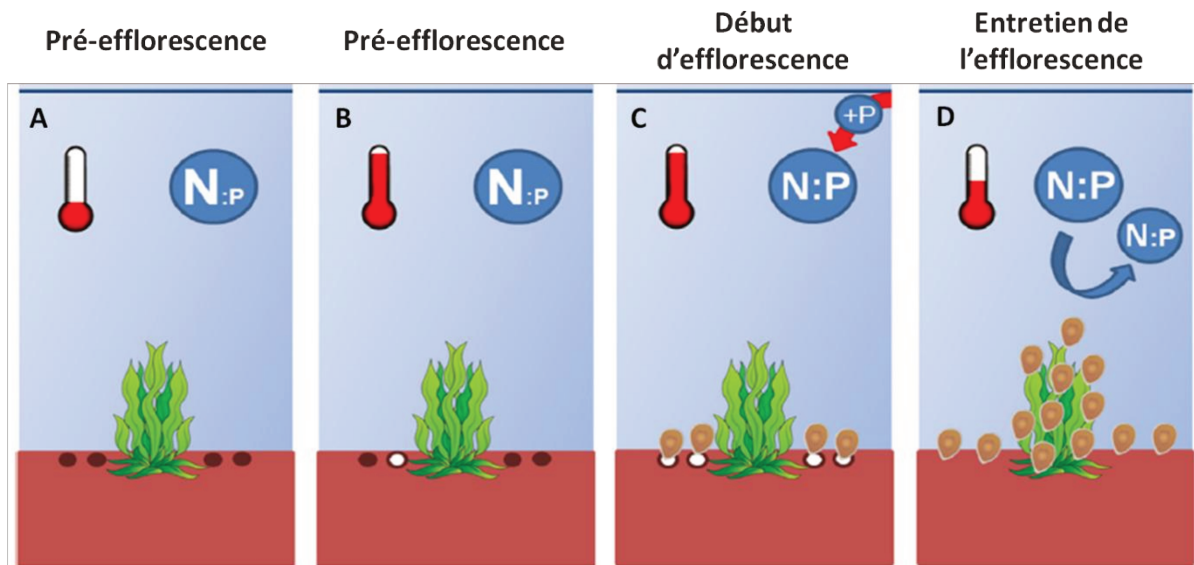


Figure 23 : Diagramme conceptuel de l'effet du rapport N:P et de la température de l'eau sur les efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* (modifié d'après Accoroni *et al.*, 2015).

Les conditions typiques d'une pré-efflorescence (Figure 23, A), montrant une température basse ($< 25^{\circ}\text{C}$) et un rapport N:P très élevé (139.2 ± 40.8). Le début de l'efflorescence (Figure 23, B) représente des conditions environnementales caractérisées par une température optimale de l'eau ($> 25^{\circ}\text{C}$) pour la germination des kystes, avec un rapport élevé de N:P (139.2 ± 40.8) ne permettant pas le déclenchement de la prolifération. Le début de l'efflorescence (Figure 23, C) se produit à $T > 25^{\circ}\text{C}$ et à un rapport N:P d'environ 24 équilibré par une injection, *in vitro*, l'eau riche en P, permettant à la fois la germination des kystes et la prolifération des cellules. Les conditions environnementales optimales (Figure 23, D) pour le maintien de l'efflorescence sont caractérisées par une température de l'eau non limitante, puisque le pic d'abondance se produit, même après une baisse de la température autour de 20°C avec une légère augmentation du rapport N:P accompagnée d'une diminution générale des teneurs en N et P sur la croissance d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les données fournies par cette étude suggèrent que les efflorescences sont déclenchés suite à une combinaison de conditions hydrodynamiques calmes, d'une température de l'eau optimale et des teneurs en nutriments favorables. Cet effet synergique pourrait expliquer à la fois la saisonnalité et les variabilités interannuelles des efflorescences d'*Ostreopsis*.

De plus, des études expérimentales menées sur plusieurs souches d'*O. cf. ovata* ont montré que l'épuisement des phosphates a été proportionnellement plus rapide que celui de l'azote, mettant en évidence la forte demande en phosphate de cette espèce (Asnaghi *et al.*, 2012 ; Vanucci *et al.*, 2012 ; Pezolesi *et al.*, 2014).

3.4.5 L'hydrodynamisme du littoral

L'hydrodynamisme des écosystèmes côtiers a souvent été considéré comme l'un des facteurs majeurs agissant sur les efflorescences d'*Ostreopsis*, mettant en évidence une préférence de ces espèces pour les sites abrités par rapport aux sites exposés (Barone, 2007 ; Shears et Ross, 2009 ; Totti *et al.*, 2010, Mabrouk *et al.*, 2011). De plus, l'abondance des Dinoflagellés benthiques est fortement affectée par l'action des vagues, puisqu'ils ne sont que faiblement attachés au substrat et peuvent être facilement détachés et remis en suspension dans la colonne d'eau. En effet, plusieurs études attestent que les proliférations d'*Ostreopsis* sont plus importantes dans les zones abritées que dans les zones exposées (Carlson et Tindall, 1985 ; Taylor *et al.*, 1985 ; Tindall et Morton, 1998 ; Chang *et al.*, 2000 ; Barone, 2007 ; Shears et Ross, 2009 ; Totti *et al.*, 2010 ; Richlen et Lobel, 2011 ; Mabrouk *et al.*, 2012 ; Accoroni et Totti, 2016). De plus, un fort hydrodynamisme peut induire une diminution de la température de l'eau qui ne semble pas être favorable à leur développement (Lemée *et al.*, 2010). Néanmoins, d'autres études ont montré une préférence d'*Ostreopsis* pour les eaux turbulentes (Vila *et al.*, 2001b ; Parsons et Preskitt, 2007 ; Kibler *et al.*, 2008 ; Richlen et Lobel, 2011).

3.4.6 La nature du substrat

Les espèces d'*Ostreopsis* sont épiphytes c'est-à-dire qu'elles prolifèrent sur un substrat, qui peut être soit un substrat biotique (macroalgues ou phanérogames) (Fukuyo, 1981 ; Norris *et al.*, 1985 ; Turki, 2005 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006, Turki *et al.*, 2006 ; Battocchi *et al.*, 2010 ; Totti *et al.*, 2010 ; Mabrouk *et al.*, 2012), soit un substrat abiotique (rochers ou coquilles de mollusques) (Bottalico *et al.*, 2002 ; Masò *et al.*, 2003 ; Sansoni *et al.*, 2003 ; Simoni *et al.*, 2003) et même sur des substrats artificiels (Tester *et al.*, 2014 ; Jauzein *et al.*, 2016). A cet effet, les espèces d'*Ostreopsis* produisent un mucus constitué de filaments et de substances mucilagineuses qui leur permettent de s'accrocher au substrat. Les organites internes liés à la production et à l'extrusion de mucus sont les trichocystes et les mucocystes

(Honsell *et al.*, 2013 ; Escalera *et al.*, 2014). Par ailleurs, la préférence de ces microalgues à un substrat par rapport à un autre reste à confirmer. Certaines études montrent que la concentration des cellules d'*Ostreopsis* diffère selon les espèces de macrophytes, avec une préférence pour les macroalgues rouges et brunes par rapport aux vertes et aux phanérogames marins (Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Monti *et al.*, 2007 ; Parson et Preskitt, 2007).

Totti *et al.* (2010) ont démontré que la densité des cellules d'*Ostreopsis* est plus importante sur des substrats abiotiques que sur les macroalgues. De plus, l'étude suggère que contrairement aux substrats abiotiques, les substrats biotiques pourraient produire des substances allélopathiques qui entraveraient la prolifération des cellules d'*Ostreopsis* (Totti *et al.* 2010 ; Laabir *et al.*, 2013 ; Blanfuné *et al.*, 2015 ; Accoroni et Totti, 2016 ; Ben Gharbia *et al.*, 2017). En effet, les substrats biotiques, notamment les macrophytes ont la capacité de libérer des substances allélopathiques qui agissent en tant qu'inhibiteurs naturels de la prolifération des microalgues. Les propriétés inhibitrices des macrophytes sont dues à l'action de molécules bioactives principalement des métabolites secondaires qui pourraient être libérés soit activement par exsudation du tissu vivant intact ou passivement par lessivage, à travers les plaies de feuilles ou de pousses en décomposition (Gross, 1999). Néanmoins, Ben Gharbia *et al.*, (2017) ont montré que selon les associations Dinoflagellés / macrophytes, l'effet algicide sur les microalgues varie en fonction de la tolérance de chaque espèce, avec une mention spéciale pour les Dinoflagellés benthiques qui semblent plus résistants que les espèces planctoniques face aux substances allélopathiques.

3.5 La dynamique des efflorescences des espèces du G. *Ostreopsis*

La dynamique des proliférations d'*Ostreopsis* a été schématisée dans la Figure (24) et elle montre des cellules d'*Ostreopsis* attachées au substrat par des fils de mucus qui forment un biofilm autour des cellules et dont la taille augmente au fur et à mesure que les cellules se multiplient.

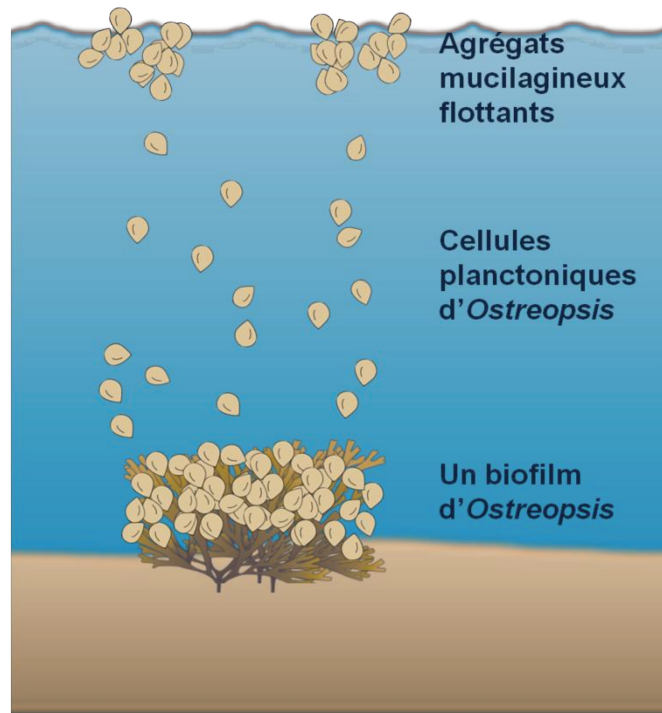


Figure 24 : Schéma récapitulatif du couplage benthique-pélagique avec présence d'agrégats mucilagineux d'*Ostreopsis* (modifié d'après Mangialajo *et al.*, 2011).

Les espèces du G. *Ostreopsis* sont benthiques dont le stock de cellules se trouve dans un biofilm couvrant les communautés macroalgales. La production de mucus par les cellules d'*Ostreopsis* est plus élevée lorsque les irradiations sont plus fortes (Heil *et al.*, 1998) et peut former des bulles de gaz à partir de la photosynthèse. Tous ces facteurs permettent aux cellules d'*Ostreopsis* de se détacher du substrat et de former des agrégats flottants qui peuvent être dispersés par les vents (Shears et Ross, 2009). Dans certains cas, le mucus se forme en haut de la colonne d'eau, où les cellules planctoniques forment des agrégats (Fraga *et al.*, 2012).

Les cellules d'*Ostreopsis*, n'étant pas bien attachées au substrat, peuvent être facilement remises en suspension par l'action de l'hydrodynamisme ou par le piétinement des personnes fréquentant la plage. De plus, l'action des courants, peut disperser ces cellules et par conséquent, disperser la prolifération.

Les cellules d'*Ostreopsis* peuvent également se détacher activement du substrat et se déplacer activement grâce à leurs flagelles. Il est vrai que chaque paramètre (biotique ou abiotique) peut avoir à lui seul un effet qui pourrait conditionner l'apparition ou le maintien des efflorescences d'*Ostreopsis*.

D'une manière générale, ce sont les interactions et la synergie entre les différents compartiments de l'écosystème côtier qui définissent l'apparition et le déclenchement des efflorescences et leur intensité. L'évaluation de la contribution des principaux facteurs écologiques affectant la dynamique d'*Ostreopsis*. est par conséquent nécessaire pour avoir une vision plus globale sur sa prolifération (Figure 25).

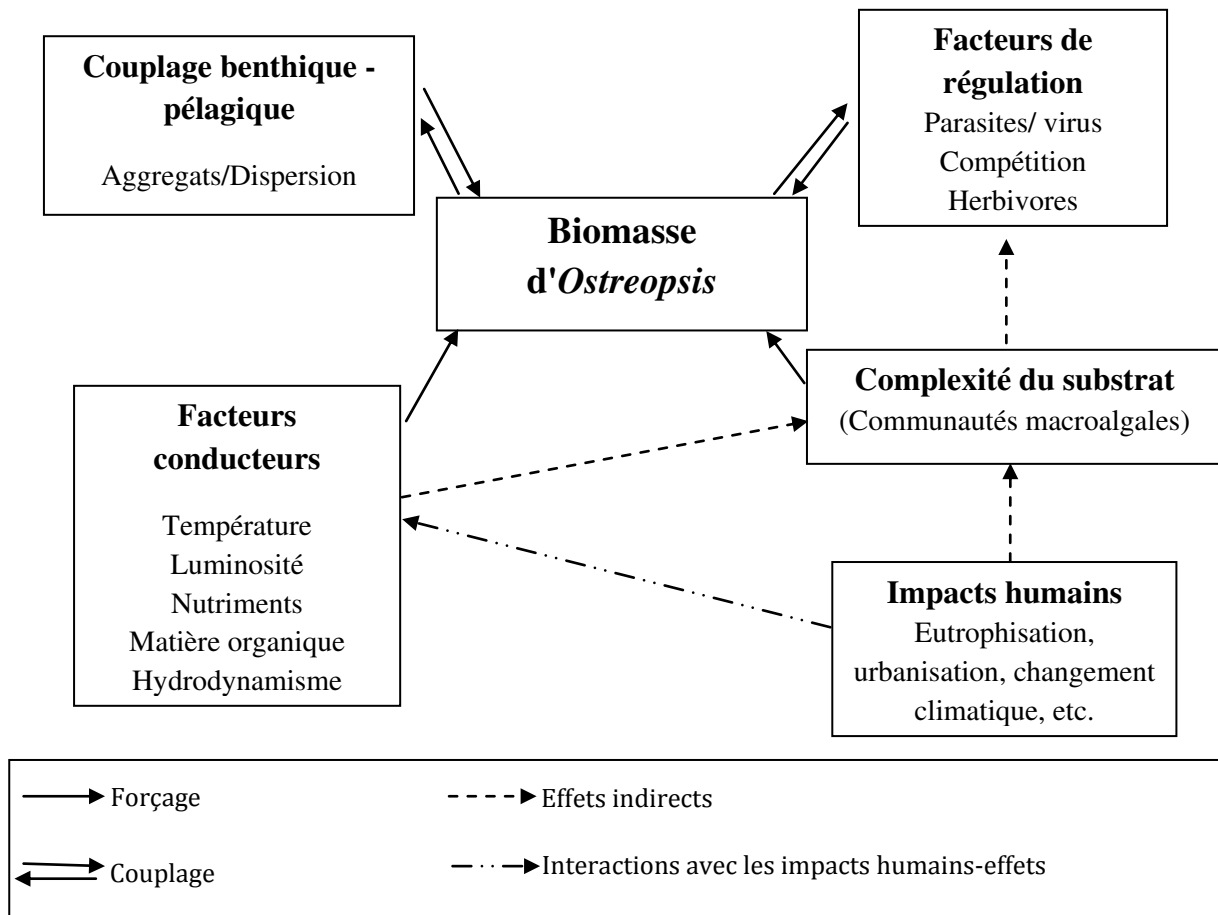


Figure 25 : Interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques et la biomasse des espèces du *G. Ostreopsis*.

Chapitre 2

Matériel et méthodes de travail

Chapitre 2. Matériel et méthodes du travail

1 Caractéristiques du site d'étude : Le golfe de Tunis

1.1 La situation géographique

Le golfe de Tunis se situe dans le Nord-Est de la Tunisie entre les deux parallèles $37^{\circ}15'$ et $36^{\circ}47,76'N$ et les deux méridiens $10^{\circ}53,60'$ et $10^{\circ}15,77'E$ et s'étend sur une ligne littorale d'environ 230 km, reliant le Cap Sidi Ali El Mekki au Cap Sidi Daoud. Il est constitué d'une Baie et d'un grand golfe subjacent l'un à l'autre. La baie communément appelée « le petit golfe » est une partie du golfe qui est relativement abritée. Elle est limitée par la zone côtière allant de Cap Carthage à Ras El Fartas (point situé à quelques kilomètres au nord de Korbous), occupant une surface totale de 350 km^2 (Figure 26).

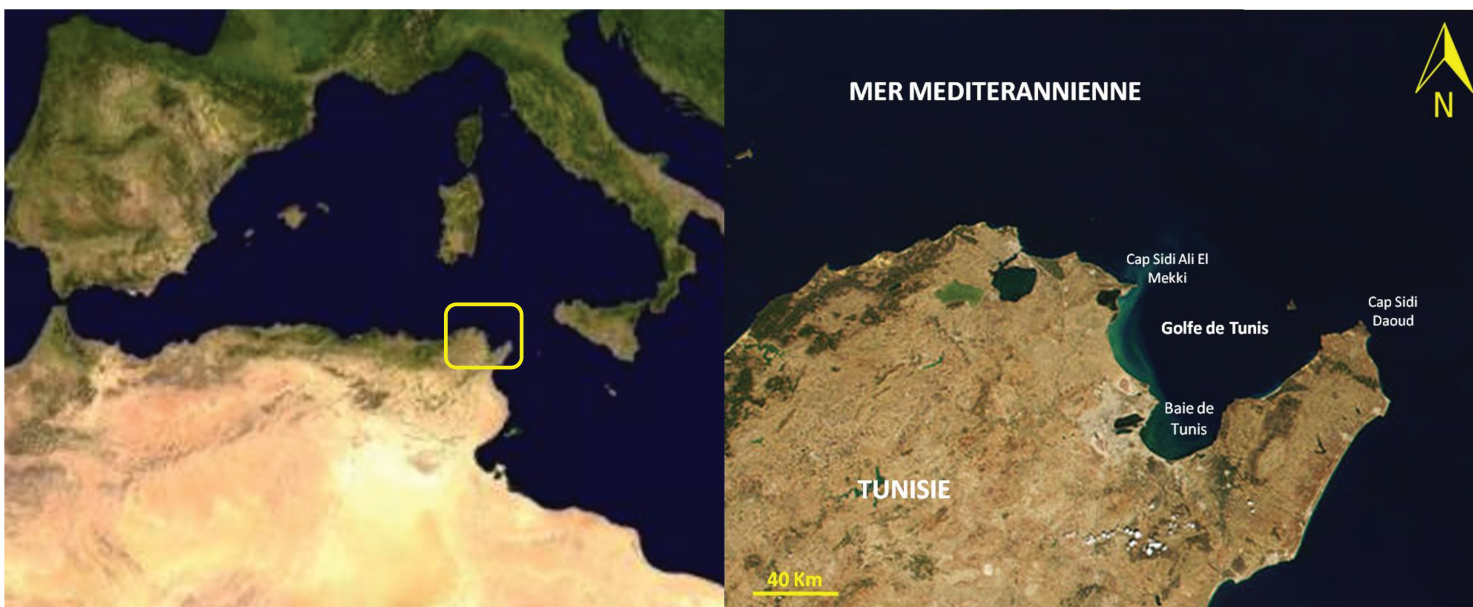


Figure 26 : Situation géographique du golfe de Tunis.

1.2 La morphologie côtière

La morphologie côtière du golfe de Tunis est variée, avec une prédominance des plages sableuses. Le golfe présente deux grandes parties qui s'organisent selon l'exposition aux vents dominants ainsi que de la topographie des terrains avoisinants :

- Une partie s'étendant du Cap Sidi Ali El Mekki jusqu'à Sidi Rais, située à la partie Ouest du golfe de Tunis, caractérisée par une côte de nature alluviale marquée par des plages de sable et des lagunes. Les falaises et les côtes rocheuses n'occupent qu'une place limitée, du côté de Ghar El Melh et de Gammarth-Sidi Bou Saïd. Cette côte jouit, grâce à son orientation, d'une certaine protection contre les vents dominants de secteur Nord-Ouest.
- Une partie s'étendant de Korbous jusqu'au Cap Sidi Daoud (la partie côtière Nord du Cap Bon) située à la partie Est du golfe, est caractérisée par une côte de nature rocheuse marquée par de nombreuses falaises. Le rivage est souvent bordé par des reliefs accidentés, d'origine argilo-gréseuse. C'est une côte largement ouverte aux vents de secteur Nord-Ouest.

1.3 Le réseau hydrographique

Le golfe de Tunis est sous l'influence des apports directs d'un réseau hydrographique ramifié, caractérisé par quatre principaux écoulements : les oueds Medjerda, Méliane et El Bey et le Canal El Khlij qui constituent les principaux réceptacles de la charge polluante et par conséquent, les principaux affluents de la pollution du golfe. Sans oublier les apports indirects issus des lagunes et des sebkhas, soit un total de 6100 hectares de lagunes et de 4247 hectares de sebkhas communicantes au golfe de Tunis par des passes pérennes ou temporaires et concentrées essentiellement au niveau de la partie Ouest du golfe. Les échanges avec les lagunes sont régis par le niveau de la marée. Quant aux sebkhas, il existe deux régimes de fonctionnement, d'une part le régime hydrographique conditionné par la marée et d'autre part, le régime hydrologique conditionné temporairement par les crues (MEDD, 2009).

1.4 Les caractéristiques océanographiques

1.4.1 La Marée

La marée dominante sur les côtes du golfe de Tunis est de type semi-diurne d'une période d'environ 12 heures, avec deux pleines mers et deux basses mers par jour et sa vitesse est faible dans la quasi-totalité du golfe, mis à part dans les endroits très proches des communications avec les lagunes (Ben Charrada *et al.*, 1997). La marée est généralement mesurée sur les côtes tunisiennes par rapport au Zéro Hydrographique (ZH) ou par rapport au Zéro du Nivellement Général de la Tunisie (NGT) (sachant que le 0 m NGT = +0,41 m ZH dans le golfe de Tunis). D'après la Direction générale des services aériens et maritimes (DGSAM, 2005), le niveau moyen journalier a varié de +4 cm NGT à +20.3 cm NGT avec un niveau moyen de +13.6 cm NGT sur une période d'observations de trois mois dans le port de La Goulette situé dans la baie de Tunis.

1.4.2 La courantologie

Les courants marins sont parmi les principaux facteurs océanographiques qui influencent directement le transport et la dilution d'un polluant quelconque rejeté dans une zone côtière et interviennent également dans le transport et le dépôt des sédiments. Ils jouent de ce fait un rôle prépondérant dans la détermination de l'évolution des écosystèmes.

Deux types de courant peuvent jouer un rôle plus ou moins important dans la dynamique des eaux côtières :

- Les courants dus au vent : Les courants dans le golfe sont principalement contrôlés par le vent dus à l'entraînement des masses d'eau sous la poussée des vents. Cependant, ils ne dépendent pas uniquement de l'intensité et de la direction du vent mais aussi, de sa durée ainsi que de la morphologie de la zone côtière. Les simulations réalisées à l'aide de modèles par Brahim *et al.* (2007) montrent que :
 - Les vents Nord-Ouest, les plus fréquents au golfe de Tunis, génèrent des courants de dérive littoraux. La direction de ces courants est du Nord vers le Sud du côté Ouest du golfe, et de direction Sud-Ouest vers le Nord-Est du côté Est du golfe.

- Les vents d'Est, les plus fréquents en été, génèrent des courants de dérive littoraux de direction inverse par rapport au vent de Nord-Ouest. En effet, la direction des courants, dans ce cas, est du Nord-Est, vers le Sud-Ouest du côté Est du golfe, et de direction Sud, vers le Nord du côté Ouest du golfe de Tunis (Figure 27).

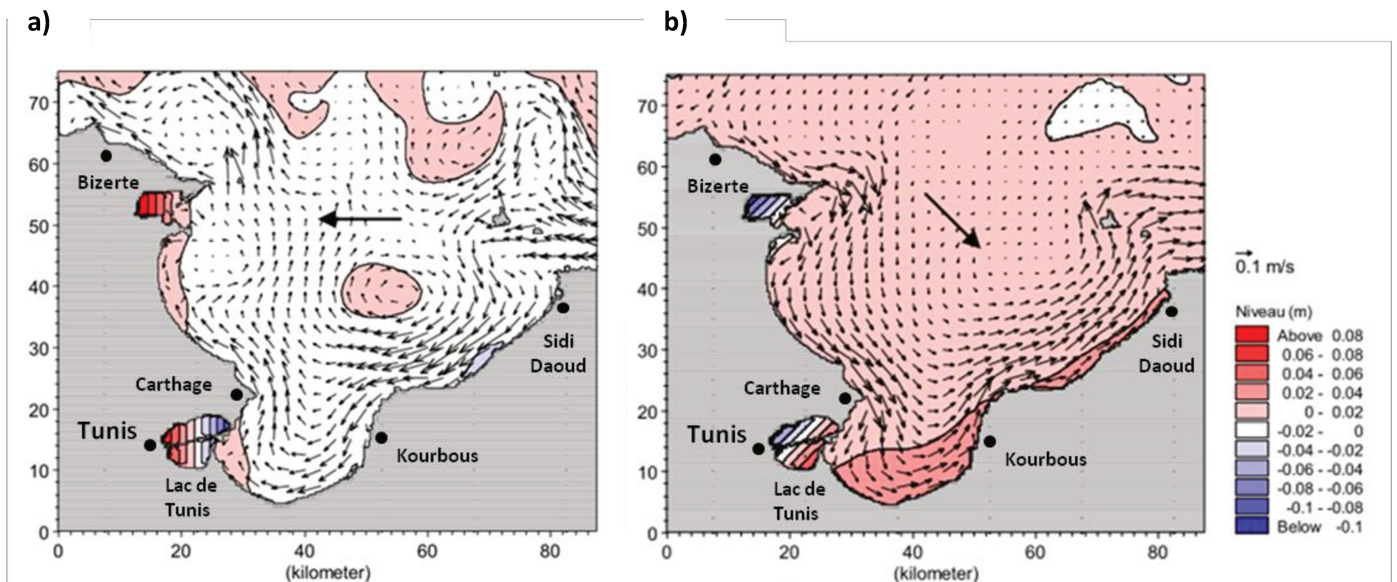


Figure 27 : Courants induits par les vents dans le golfe de Tunis. (a) de direction Est, (b) de direction Nord-Ouest (d'après Brahim *et al.*, 2007).

- Les courants de houle sont à l'origine de transports longitudinaux des sables littoraux (MEDD, 2009). Ce courant littoral de houle est produit par l'incidence oblique de la houle qui provoque un courant résultant dans le sens de propagation des vagues. Ils dépendent de la direction de la houle et de son incidence à la côte. Dans le golfe de Tunis, la majorité des houles sont de direction Ouest-Nord-Ouest et Sud-Est.

1.5 Caractéristiques climatiques

1.5.1 La température de l'air

Le golfe de Tunis est considéré parmi les zones tempérées. Les températures varient au cours des saisons, avec une moyenne annuelle de 18.5°C sur la période allant de 1950 à 1997. D'après les données de l'INM (2018), l'écart maximal de la température moyenne entre le

mois le plus chaud juillet (29°C) et le mois le plus froid février (11°C) est de 18°C. (Figure 28).

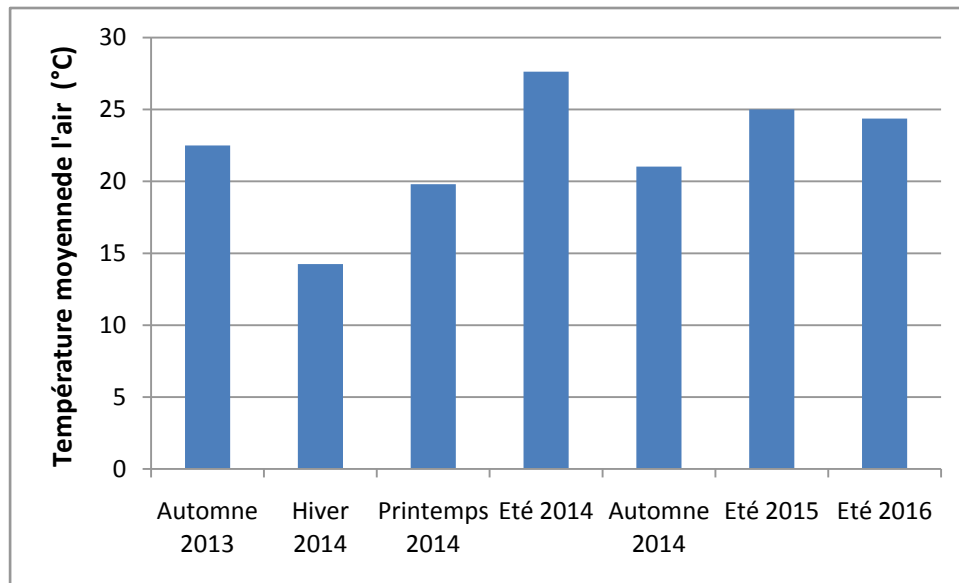


Figure 28 : Températures moyennes de l'air (golfe de Tunis de 2013 - 2016 ; INM, 2018).

1.5.2 Les vents

Le vent est un facteur qui agit directement sur l'hydrodynamisme, le transport et la dispersion du phytoplancton en mer. Il y a deux types de vent remarquables dans le golfe de Tunis, les vents dominants du secteur Ouest et Nord-Ouest qui sont les plus forts (11-16 et 17-28 nœuds) (Brahim *et al*, 2007), et les vents du secteur Sud-Est, moins forts et moins fréquents soufflant durant la saison estivale (Figure 29).

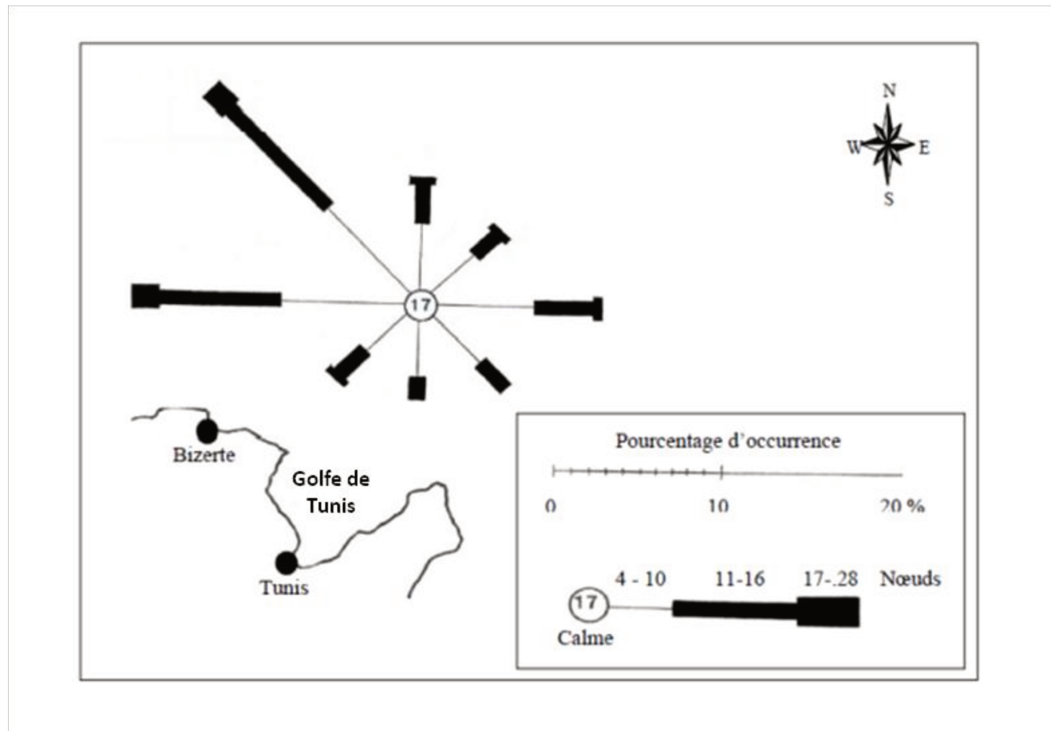


Figure 29 : Rose des vents au large du golfe de Tunis (d'après Brahim *et al*, 2007).

1.5.3 La pluviométrie

Le golfe de Tunis est caractérisé par un climat subhumide et semi-aride à nuance maritime. L'extrême Nord du Cap Bon présente une pluviométrie plus importante que du côté Sud du golfe. En effet, la pluviométrie diminue de Korbus jusqu'à la baie de Tunis et augmente légèrement du côté nord de Sidi Ali El Mekki. Le golfe est situé entre les deux isohyètes 400 et 500 mm, avec une pluviométrie moyenne interannuelle à l'échelle du golfe d'environ 450 mm par an (MEDD, 2009). D'après les valeurs de la pluviométrie mensuelle calculée pendant une période de 50 ans d'observation à la station de Tunis-Carthage, le nombre de jours de précipitation est en moyenne de 95 jours par an. Les pluies mensuelles présentent une variabilité plus accentuée, elles sont enregistrées généralement entre les mois d'octobre et de mars (d'après les données de l'INM, 2018) (Figure 30).

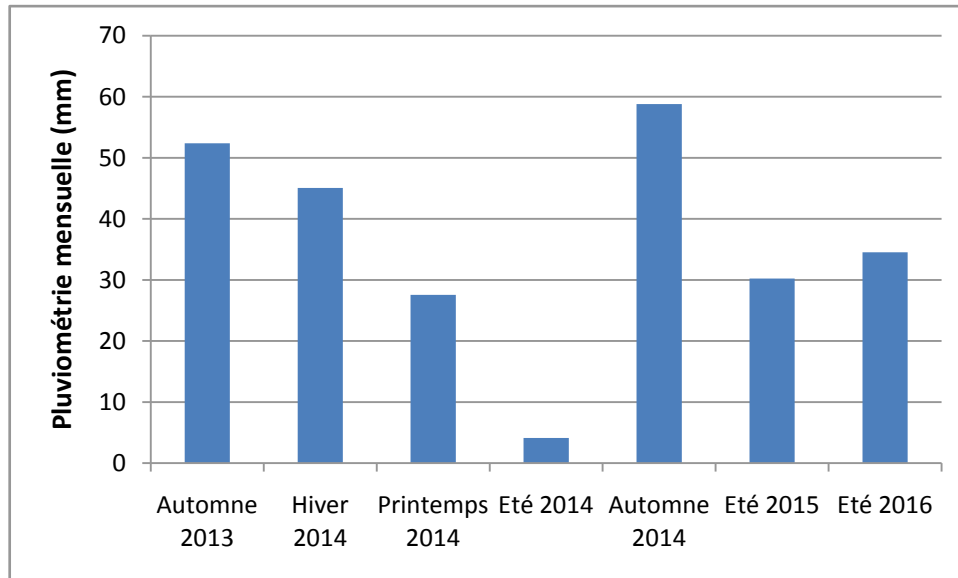


Figure 30 : Valeurs mensuelles de la pluviométrie (golfe de Tunis de 2013 - 2016 ; INM, 2018).

Des données météorologiques supplémentaires (Température de l'Air, vitesse du vent et pluviométrie) ont été extraites de sites Web spécialisés dans la prévision météorologique (www.wunderground.com et www.worldweatheronline.com).

Les données météorologiques pour l'établissement du modèle de prévision ont été obtenues à partir de modèles marins globaux. La température de l'air, la pression atmosphérique et la pluviométrie ont été obtenues du modèle de MEDITERRANEAN SEA PHYSICS REANALYSIS, et les données sur les vents du modèle GLOBAL OCEAN WIND OBSERVATIONS CLIMATOLOGY. Ces derniers font partie des produits Copernicus marins de l'UE (<http://www.copernicus.eu>).

1.6 Les pressions anthropiques

Considérée comme la zone la plus peuplée du territoire Tunisien avec 70,1 % de la population totale (APAL, 2016), la ligne littorale tunisienne (1566 Km) subit une forte pression anthropique, notamment le golfe de Tunis avec une population estimée à 3 795 700 habitants (INS, 2017). Cette pression se traduit principalement par l'action directe de l'expansion des activités agricoles, industrielles, urbaines, portuaires ainsi que l'accroissement saisonnier lié aux activités touristiques.

1.6.1 Les activités agricoles

Les activités agricoles dans le bassin versant du golfe de Tunis sont développées grâce à l'abondance de ces ressources en eau, favorisant ainsi le développement de l'agriculture intensive qui constitue une source de déséquilibre environnemental majeur. L'impact des activités agricoles se reflète essentiellement par l'apport d'engrais et de pesticides massivement utilisés notamment dans les zones irriguées qui couvrent 29 % de la superficie du bassin versant du golfe de Tunis (MEDD, 2009). Les excédants non assimilés par les plantes sont drainés vers les différents exutoires à savoir O. Medjerda et O. El Bey qui reçoivent des quantités importantes d'engrais et pesticides.

1.6.2 Les activités industrielles

Les activités industrielles induisent un déséquilibre écologique par la production de déchets solides, gazeux et liquides. Les zones industrielles couvrent une surface de 2060 ha du bassin versant du golfe de Tunis soit 78,34% des établissements industriels concentrés spécialement près de la baie de Tunis (MEDD, 2009). A cause des 2507 établissements industriels exerçant dans différents secteurs d'activité (pétroliers, métallurgie, chimique, textiles, agro-alimentaire, etc.), le bassin versant du golfe de Tunis reçoit un total de $30196 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$, qui sont drainés en mer par son réseau hydrographique.

1.6.3 L'urbanisation

Le premier constat que nous pouvons faire est que la partie Ouest du golfe, à savoir la capitale et ses environs situés sur les rives de la baie de Tunis présentent un degré d'urbanisation supérieur au reste du bassin versant du golfe de Tunis. Cette urbanisation se matérialise par d'importants rejets urbains, à savoir les rejets des eaux usées et des déchets solides.

Concernant les rejets des eaux usées, les stations d'épuration dans le bassin versant du golfe de Tunis drainent une charge des eaux usées de $251\,240 \text{ m}^3 \text{ J}^{-1}$ (MEDD, 2009) qui est répartie sur les principaux exutoires du golfe. Le Canal Khlij supporte la charge la plus importante de rejet des eaux urbaines avec 61,37 % (Tableau 3). Ces eaux sont finalement évacuées directement dans le milieu marin dans la zone de Raoued.

Tableau 3 : Répartition des proportions de la charge des rejets des eaux urbaines drainées dans le golfe de Tunis (MEDD, 2009).

Exutoires	Débit ($\text{m}^3 \text{j}^{-1}$)	%
Oued Medjerda	27 414	10,73
Canal El Khlij	156 839	61,37
Oued Méliane	56 070	22,00
Oued El Bey	15 219	6,00
Total	255 542	100

En plus de l'impact des eaux usées, les déchets solides riches en matière organique et en éléments traces jouent aussi un rôle non négligeable dans la pollution du golfe de Tunis. En effet, l'évacuation des déchets solides de tous genres s'effectue vers des décharges qui sont généralement anarchiques et non contrôlées et sont souvent situées sur les berges des oueds, lacs et sebkha facilitant ainsi leur diffusion dans les eaux des exutoires (MEDD, 2009). Le tableau suivant (Tableau 4) illustre la répartition de la charge polluante par exutoire. L'oued Medjerda et le canal El Khlij reçoivent les charges polluantes les plus élevées provenant des décharges et des sites pollués (MEDD, 2009).

Tableau 4 : Répartition des proportions de la charge des rejets des déchets solides drainée dans le golfe de Tunis (MEDD, 2009).

Exutoires	Volume total Déchets $\text{m}^3 \text{an}^{-1}$	%
Oued Medjerda	105 714,29	46
Canal El Khlij	102 500,00	45
Oued Méliane	18 700,00	8
Oued El Bey	2 700,00	1
Total	229 614,29	100

1.6.4 Les activités portuaires

Le golfe de Tunis est caractérisé par la présence de 03 types d'infrastructures portuaires : les ports de pêche qui sont en majorité destinés à la pêche côtière, un port de plaisance situé sur le flanc Sud de Cap Carthage et les ports de commerce qui génèrent les impacts les plus importants par leurs rejets hydriques, à savoir les rejets d'eaux sanitaires, les rejets provenant des zones d'entretien des bateaux et les eaux de ballast (MEDD, 2009).

1.6.5 Les activités touristiques

Le tourisme balnéaire national constitue une principale activité estivale sur les côtes tunisiennes. Les zones touristiques couvrent une superficie totale de 330 hectares de l'environnement littoral du golfe de Tunis. Ces zones sont dotées des réseaux d'assainissement qui collectent toutes les eaux usées vers le réseau de l'ONAS. Elles sont ensuite déviées vers les stations d'épuration Côtière Nord et Soliman II. Cependant, le drainage des eaux pluviales de cette zone touristique n'est pas encore bien établi et représente un problème durant la saison des pluies (MEDD, 2009).

2 Méthodes de travail

2.1 Suivi saisonnier des espèces de microalgues épiphytes dans le golfe de Tunis (octobre 2013-octobre 2014)

2.1.1 Localisation des stations de prélèvement

En vue de réaliser une première investigation des eaux côtières du golfe de Tunis, un échantillonnage saisonnier allant du mois d'octobre 2013 jusqu'au mois d'octobre 2014 a été effectué au niveau de 06 stations du golfe de Tunis : Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR), Korbous (K), Salammbô (S), Gammarth (G) et Sidi Ali el Mekki (SM). Ces stations ont été préalablement choisis selon les critères suivant (i) le type de substrat, (ii) l'exposition et (iii) la couverture végétale (Tableau 5, Figure 31)

Tableau 5 : Coordonnées géographiques et caractéristiques des stations de prélèvements du golfe de Tunis (octobre 2013- octobre 2014).

Stations	Coordonnées GPS		Substrat	Exposition	Dates d'échantillonnage	Profondeur
	Longitude	Latitude				
Sidi Daoud (SD)	37° 2'16.24"	10°54'14.48"	Rocheux	Exposé		0.5 ; 1 ; 3
Sidi Rais (SR)	36°46'13.18"	10°32'55.99"	Matte	Abrité	16 Octobre 2013 25 Février 2014 05 Juin 2014 08 Août 2014 10 Octobre 2014	
Korbous (K)	36°52'53.86"	10°39'56.89"	Rocheux	Abrité		
Sidi Ali el Mekki (SM)	37°10'31.31"	10°15'55.90"	Sableux	Abrité		
Gammarth (G)	36°53'50.59"	10°19'15.42"	Sableux	Exposé	15 Octobre 2013 24 Février 2014 06 Juin 2014 07 Août 2014 09 Octobre 2014	
Salammbô (S)	36°50'11.17"	10°19'33.73"	Sableux	Abrité		

Chaque site a été échantillonné une fois par saison (automne 2013, hiver 2014, printemps 2014, été 2014 et automne 2014). Les échantillons ont été collectés en triplicat, choisis au hasard, à environ 10 m de distance les uns des autres et à trois profondeurs de 0,5 m ; 1 et 3 m (Tableau 5).

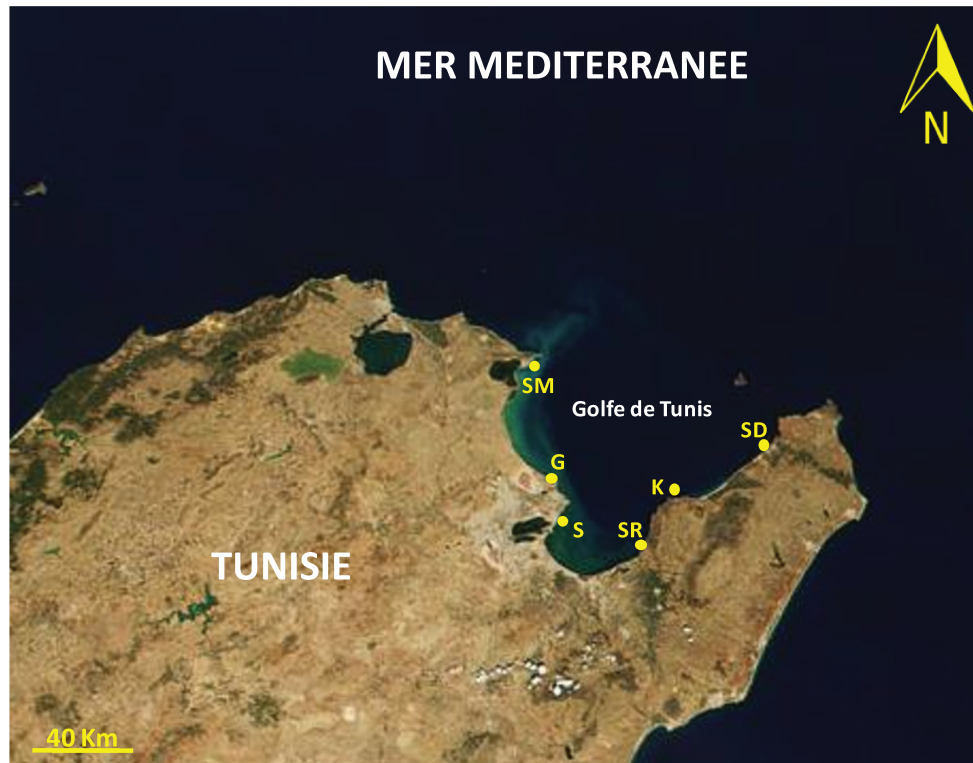


Figure 31 : Localisation des stations de prélèvement pour le suivi saisonnier des espèces de microalgues épiphytes du golfe de Tunis (octobre 2013-octobre 2014).

2.1.2 Stratégie d'échantillonnage des microalgues épiphytes dans le golfe de Tunis

2.1.2.1 Prélèvement des échantillons d'eau de mer

Les échantillons d'eau de mer ont été prélevés pour déterminer les concentrations de dinoflagellés présents dans la colonne d'eau. Ces échantillons ont été collectés en premier, afin d'éviter une surestimation due à la remise en suspension induite des cellules. Ces échantillons ont été recueillis dans un flacon en plastique de 500 ml, à environ 20 cm au dessus des macrophytes.

2.1.2.2 Prélèvement des échantillons des microalgues épiphytes à partir des macrophytes

Les échantillons de macrophytes, sont ensuite collectés en plaçant soigneusement chaque macroalgue ou herbier dans des sacs en plastique avec l'eau de mer environnante, évitant autant que possible toute perte pour déterminer l'abondance des Dinoflagellés et les Diatomées épiphytes. Nous avons effectué la collecte des macroalgues les plus représentatives du site d'échantillonnage, ainsi que les magnoliophytes dominées par les espèces *Posidonia oceanica* et *Cymodocea nodosa*. En effet, selon leur cycle de croissance et les perturbations environnementales, certaines espèces de macrophytes étaient absentes au niveau de certains sites ou à certaines profondeurs, et particulièrement durant la saison hivernale, et n'ont pas pu être récoltées. Lors du transport, les échantillons ont été conservés dans des boîtes en plastique rigide dans des conditions ambiantes et ont été traités immédiatement une fois au laboratoire.

2.1.2.3 Séparation des microalgues épiphytes à partir des macroalphytes du golfe de Tunis

Une fois dans le laboratoire, la première étape consiste à ajouter du lugol acide (1%) dans le but de faciliter la séparation des composantes benthique et épiphyte. Ensuite, les échantillons de macroalgues ont été secoués vigoureusement et filtrés à travers un tamis à maillage de 500 μm pour séparer les microalgues épiphytes des macrophytes. Les macrophytes ont par la suite été rincées deux fois avec 100 ml d'eau de mer filtrée par un filtre de 0,2 μm pour récupérer le maximum de microalgues. A la fin de cette étape, les macrophytes ont été pesées pour avoir leurs poids frais avec une balance de précision (ADAM HCB 123 120 \pm 0,001 g).

2.2 Suivi estival du Dinoflagellé *Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis (2015 et 2016)

Dans le cadre du projet M3HABs, un protocole commun optimisé portant sur les procédures d'échantillonnage, de conservation et de comptage des cellules d'*Ostreopsis* a été défini pour les pays partenaires de la Méditerranée, afin d'optimiser tout programme de surveillance et pour générer des bases de données fiables pour la modélisation des efflorescences

d'*Ostreopsis*. Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser ces nouvelles techniques de prélèvement pour le suivi des espèces du G. *Ostreopsis* et leur dénombrement dans les eaux côtières du golfe de Tunis (Jauzien *et al.*, 2018 ; Vassalli *et al.*, 2018).

Suite à la localisation des sites et de la période d'apparition des microalgues du G. *Ostreopsis*, nous avons réalisé durant la saison estivale un suivi de ces populations pendant deux années successives (2015 et 2016) au niveau de 5 stations : Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR), Sidi Ali el Mekki (SM), Cap Zebib (CZ) et Salammbô (S) La plupart des stations sont caractérisés par un substrat rocheux à l'exception de Sidi Rais caractérisé par un récif barrière de *Posidonia oceanica* (Hachani *et al.*, 2016). Les stations de Sidi Daoud et Cap Zebib sont exposés aux vents dominants, elles ont été choisies afin de mettre en évidence un éventuel impact de l'exposition à un fort hydrodynamisme sur la prolifération des microalgues du G. *Ostreopsis*. La station de Salammbô présentait tous les critères préférentiels pour le développement des microalgues du G. *Ostreopsis* nous l'avons donc considérée comme la station de référence (Tableau 6, Figure 32).

Tableau 6 : Coordonnées géographiques et caractéristiques des stations de prélèvements du golfe de Tunis (Saisons estivales 2015 et 2016).

Stations	Coordonnées GPS		Substrat	Exposition	Période d'échantillonnage	
	Longitude	Latitude			2015	2016
Sidi Daoud (SD)	37° 2'16.24"	10°54'14.48"	Rocheux	Exposé	11 juin au 23 septembre	14 juin au 29 septembre
Sidi Rais (SR)	36°46'13.18"	10°32'55.99"	Matte	Abrité	11 juin au 23 septembre	14 juin au 29 septembre
Cap Zebib (CZ)	37°15'48.21"	10° 4'3.89"	Rocheux	Exposé	11 juin au 23 septembre	14 juin au 29 septembre
Sidi Ali el Mekki (SM)	37°10'31.31"	10°15'55.90"	Rocheux	Abrité	11 juin au 23 septembre	14 juin au 29 septembre
Salammbô (S)	36°50'35.05"	10°19'36.90"	Rocheux	Abrité	02 juillet au 03 novembre	15 juin au 18 novembre

L'échantillonnage a été effectué durant les saisons estivale et automnale, du 11 juin 2015 au 23 septembre 2015 pour la plupart des stations à l'exception de Salammbô qui à duré jusqu'au 3 novembre 2015, et du 14 juin au 29 septembre 2016 et jusqu'au 18 novembre 2016 pour la station de Salammbô considéré comme la station de référence dans la présente étude (Tableau 6).



Figure 32 : Localisation des stations de prélèvement pour le suivi estival d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis (Etés 2015 et 2016).

Suite à l'optimisation, la technique d'échantillonnage a bénéficié de quelques changements, trois répliques de 250 ml d'eau de mer (à environ 3 cm de profondeur) et 3 répliques de macroalgues (5-10 g chacun) ont été soigneusement recueillis dans une bouteille en plastique de 500 ml avec l'eau de mer environnante. Une fois par semaine chaque site a été échantillonné le matin 08h00-10h00 afin de garder un temps d'échantillonnage similaire pour éviter les fluctuations potentielles entre les composantes benthiques et planctoniques. Les échantillons ont été collectés en triplicat choisis au hasard à environ 10 m de distance les uns des autres et à une profondeur de 0,5 m.

2.2.1 Identification des espèces du Genre *Ostreopsis*

Nous avons essayé d'identifier les espèces du G. *Ostreopsis*, à partir de la disposition et de la morphologie des thèques, qui est difficile à mettre en évidence au moyen du microscope optique. L'identification d'*Ostreopsis cf. ovata* est basée sur la morphologie et les dimensions de la plaque thécale (Steidinger et Tangen, 1997), pour lesquelles l'analyse morphométrique a été réalisée après coloration au fluorochrome (Calcofluor) observée au microscope inversé à

épifluorescence de marque Leica modèle DM IL LED Fluo. Les cellules ont été mesurées au grossissement 400 x en utilisant le logiciel Leica LAS, version 4.2.0.

Nous avons utilisé cette méthode sur les souches d'*Ostreopsis* en provenance des 5 stations d'échantillonnage du golfe de Tunis. Un total de 1206 cellules a été soumis à des mesures concernant (i) le diamètre dorso-ventral (DV) et le trans-diamètre (W); et (ii) le diamètre antéro-postérieur (AP) qui a été mesuré pour 874 cellules, ceci en utilisant une aiguille pour les faire retourner. Les ratios DV/AP, DV/W et AP/W ont ainsi été calculés (Figure 33).

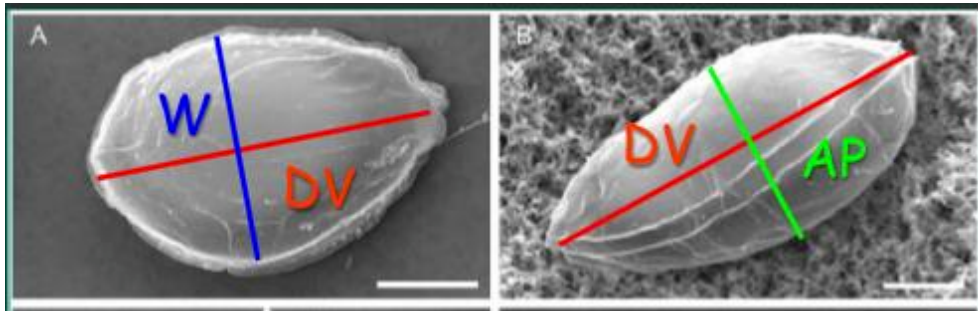


Figure 33 : Mensurations effectuées sur les cellules d'*Ostreopsis cf ovata* du golfe de Tunis. (a) DV/W; (b) DV/AP avec (DV) diamètre dorso-ventral, (W) le diamètre transversal, (AP) diamètre antéro-postérieur (modifié d'après Accoroni *et al.*, 2012).

2.3 Dénombrement des microalgues

2.3.1 Méthode de comptage des microalgues au microscope inversé

Les cellules planctoniques et épiphytes ont été fixées avec une solution de formaldéhyde à 5 % puis fixées par le Lugol acide (après l'optimisation). Les cellules ont été comptées avec un microscope inversé (IMT2 Olympus).

Les concentrations de cellules planctoniques dans les échantillons d'eau ont été déterminées selon la méthode d'Utermöhl (Utermöhl, 1958) dans des chambres contenant 25 ml d'eau de mer. La sédimentation a duré 24 heures avant de procéder au comptage des cellules. La concentration des cellules planctoniques a été exprimée en nombre de cellules par décimètre cube (cell. dm^{-3}).

Les cellules épiphytes ont été comptées avec des chambres de Sedgwick Rafter (1 ml). La concentration des cellules épiphytes a été exprimée en nombre de cellules par gramme de

pois de macroalgues fraîches (cell. g^{-1} MF). Les taxons des micro-algues ont été identifiés selon diverses clés d'identification, Hallegraeff *et al.* (1995), Tomas *et al.* (1996), Faust et Gualledge (2002) et Moestrup *et al.* (2009).

2.3.2 Méthode de comptage automatique (OPR) et moléculaire (MOL)

L'un des principaux objectifs du projet M3-HABs est la mise en place d'une stratégie commune basée, sur l'optimisation des méthodes de comptage d'*Ostreopsis* et l'élaboration d'approches de comptage rapide et automatique (MOL et OPR), ces méthodes alternatives de comptages ont été essayées sur les échantillons d'*Ostreopsis cf. ovata* de l'année 2015 en provenance de la station de Salammbô.

2.3.2.1 Méthode de comptage automatique (OPR) des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis (Station de Salammbô)

La méthode de comptage automatique des cellules d'*Ostreopsis* a été réalisée à l'institut de biophysique, Conseil national de recherches à Gênes en Italie.

La méthode de reconnaissance optique (Optical Recognition Method OPR) comprend trois composantes : une plateforme de microscopie, une platine motorisée XYZ pour les échantillons et un logiciel doté d'un algorithme d'identification spécialisé. Le système a été décrit en détail d'après l'étude de Sbrana *et al.*, (2017).

La plate-forme matérielle est basée sur une conception de microscopie personnalisée avec un objectif 10 × plan-apo de transmission. L'étape XY est motorisée par un commercial contrôleur de moteur pas à pas (Phytron GmbH, Munich, Allemagne)

L'acquisition de l'image est effectuée en exploitant une connexion Ethernet haut débit relié à un ordinateur. Une plateforme a été développée pour abriter les deux chambres de sédimentation d'Utermöhl et Sedgewick-Rafter. Tous les périphériques du système (caméra CCD, contrôleur de moteurs, LED d'éclairage) sont connectés à un PC et pilotés par un logiciel développé à Labview (National Instruments, USA) (Figure 34) .



Figure 34 : Dispositif utilisé pour le comptage automatique (OPR) des cellules d'*O. cf. ovata*.

Le logiciel prend en charge toutes les tâches de la procédure d'acquisition : initialisation, calibrage, mouvement de trame de l'échantillon sur l'objectif et l'acquisition d'images. En mode comptage, chaque image est analysée par une procédure afin d'obtenir le nombre de cellules d'*Ostreopsis* à l'intérieur du champ de vision.

L'architecture logicielle est composée d'un ensemble de modules fonctionnant sur les images numériques fournies par le moteur d'acquisition et au moyen de l'informatique. Au final, on obtient une image sur laquelle apparaît le nombre de cellules.

La reconnaissance automatique des cellules à partir des images obtenues au moyen de la microscopie numérique est l'un des problèmes les plus "classiques" dans la reconnaissance de formes.

La solution est souvent adaptée pour des cellules spécifiques, mais quelques aspects sont communs à toute approche. Les étapes sont résumées comme suit :

- extraire tous les «objets» intéressants de l'image (segmentation);
- évaluer un vecteur de descripteurs (caractéristiques) pour chaque objet;
- classer chaque vecteur afin d'identifier uniquement ceux appartenant à un ensemble donné d'espèces.

Le but de la segmentation de l'image est de sélectionner tous les objets "intéressants" à l'intérieur de l'image, compte tenu des conditions de base visant à définir un ensemble d'objets apparentés à des cellules.

L'extraction des caractéristiques permet de calculer, pour chaque objet, un ensemble de descripteurs permettant une bonne discrimination entre les "vraies" cellules et celles qui sont considérées comme "fausses". Ici la "vraie" classe est composée seulement par les spécimens d'*O. cf. ovata*, tandis que le "faux" est fait par tous les autres objets visibles à l'intérieur de l'image, en gardant l'attention sur le fait que certaines d'entre elles peuvent fusionner. L'ensemble de fonctionnalités doit être aussi grand que nécessaire pour capturer tous les aspects importants.

La dernière étape concerne la classification des patrons, c'est-à-dire la réponse la plus probable à la question de savoir si l'objet actuel, numéroté par son vecteur caractéristique, appartient à *O. cf. ovata* ou non. Ce problème peut être résolu avec de nombreux algorithmes différents, basés sur des algorithmes de classification statistique, formés sur un jeu de données vecteurs. La supervision d'experts est essentielle pour définir un ensemble de la cartographie entre certains vecteurs de caractéristiques et la correspondance exacte de l'objet.

Dans le système OPR, des choix spécifiques ont été faits en termes d'algorithmes et de paramètres, conduisant à une machine calibrée capable de traiter avec les tests d'intercalibrage de manière totalement autonome.

2.3.2.2 Méthode de comptage moléculaire (qPCR) des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis (Station de Salammbô)

Cette méthode de comptage moléculaire des cellules d'*Ostreopsis* a été réalisée dans le département des sciences biomoléculaires à l'université d'Urbino à Urbino en Italie.

○ Traitement des échantillons

Un volume allant de 1 à 50 mL et de 1 à 10 mL des échantillons de microalgues planctoniques et benthiques, respectivement, ont été lysés comme décrit dans Casabianca *et al.*, (2014). Les échantillons ont été centrifugés à 4000 tr. min⁻¹ pendant 10 min. ou à 12000 tr. min⁻¹ pendant 10 min à température ambiante, les culots ont été lavés avec 1 mL d'eau de mer artificielle filtrée, puis centrifugés 11000 tr. min⁻¹ pendant 15 min et stockés à -80°C ou directement traité.

Les culots sont ensuite remis en suspension et lysés en utilisant un protocole basé sur un cycle de congélation / décongélation dans 500 µL de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH

8,3, KCl 50 mM, 0,5 % P40 de Nonidet, 0,5% de Tween 20, CaCl₂ 2,5 mM, 0,1 mg/ml de protéinase K).

La suspension a été incubée à 55°C pendant 3 h et agitée toutes les 20 min. Les échantillons ont ensuite été incubés à 100°C pendant 5 min, pour inactiver la protéinase K et centrifugés à 12000 tr. min⁻¹ pendant 1 min pour précipiter les débris cellulaires. Le surnageant, ou extrait brut, a été transféré dans de nouveaux tubes, et a été dilué à 1:10 pour les expériences de qPCR.

- Les essais de qPCR

Les essais de qPCR ont été réalisés comme décrit par Casabianca *et al.*, (2014), dans un volume final de 25 µL en utilisant le kit the Hot-Rescue Real-time PCR Kit SG (Diatheva, Fano, Italy), les des amorces à une concentration finale de 300 nM, 0,5 U d'ADN Taq Hot-Rescue polymérase et 2 µL d'extraits bruts non dilués et des échantillons environnementaux dilués à 1:10. Les réactions d'amplification ont été réalisées en utilisant un système de PCR en temps réel Step-one (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Les conditions de cyclage thermique consistaient en 10 min à 95 °C, suivies de 40 cycles à 95 °C pendant 15 s et 40 cycles à 60 °C.

- Analyse des données qPCR

Pour les essais d'acquisition de données qPCR les analyses subséquentes ont été réalisées à l'aide du logiciel StepOne V.2.3. Une courbe de dissociation a été générée après chaque amplification pour vérifier la spécificité de l'amplicon et dimères d'amorces. Les courbes standards générées automatiquement ont été acceptées lorsque la pente était comprise entre 3,38 et 3,32 (98-100% efficacité) et le coefficient de corrélation était d'au moins 0,97.

2.4 Mesure des paramètres abiotiques

Les variables environnementales ont été mesurées sur le terrain de façon concomitante avec l'échantillonnage des micro-algues benthiques et planctoniques, au niveau de chaque station de prélèvement.

2.4.1.1 la température de l'eau, la salinité, la teneur en oxygène dissous et pH

Une sonde multiparamétrique (HANNA, HI 9829) a été utilisée pour mesurer la température de l'eau ($\pm 0,15^\circ\text{C}$) et la salinité (0,01), la teneur en oxygène dissous (0,10 mg/L) et le pH ($\pm 0,02$ pH).

2.4.1.2 Dosage des éléments nutritifs

Des échantillons d'eau ont été recueillis à une profondeur de 30 à 50 cm dans des bouteilles de polypropylène de 1 litre transportés dans une glacière puis conservés à une température de 4°C . Une fois au laboratoire, la mesure des teneurs en nutriments inorganiques: azote total NT, ammonium NH_4^+ , nitrites NO_2^- , nitrates NO_3^- , orthophosphates PO_4^{3-} , phosphore total PT et silicates $\text{Si}(\text{OH})_4$ sont analysés à l'aide d'un autoanalyseur BRAN et LUEBBE 3 et les concentrations ont été déterminées par colorimétrie à l'aide d'un spectromètre UV-visible (JHA 6705) (APHA, 1992) au service d'Hydrobiologie du centre INSTM de La Goulette.

2.5 Estimation de la biomasse chlorophyllienne

A l'instar du dosage des éléments nutritifs, la teneur en chlorophylle *a* (Chl *a*) a été estimée à partir d'échantillons recueillis suivant la même technique décrite ci-dessus. La chlorophylle *a* a été extraite dans 10 ml d'acétone à 90% à 4°C pendant 24 h à l'obscurité après filtration à l'aide d'un filtre de type Millipore de porosité $0,7 \mu\text{m}$. La concentration de l'extrait a été déterminée à l'aide d'un spectromètre UV-visible (PU-8800). au service d'Hydrobiologie du centre INSTM de La Goulette.

3 Modèle prévisionnel des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *ovata* du golfe de Tunis

L'un des objectifs de ce travail est la mise en place d'une stratégie commune basée sur l'établissement de modèles de prévision qui s'appuient sur des variables environnementales facilement mesurables afin d'améliorer la connaissance générale des risques liés à la prolifération des cellules d'*Ostreopsis*.

3.1 Acquisition des données pour la modélisation

3.1.1 Données recueillies sur les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata*

Les données sur les concentrations de cellules d'*Ostreopsis* des échantillons d'eau de mer et sur les macrophytes ont été collectées au niveau des 7 stations du golfe de Tunis étudiées dans la présente étude (Figure 35) entre 2013 et 2015. Les échantillons ont été collectés pendant les saisons estivales et automnales, du mois de Juin jusqu'au mois de Novembre. La validation du modèle a ensuite été effectuée sur des échantillons prélevés une fois par semaine du 14 juin 2016 au 18 Novembre 2016 sur 5 stations : Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR), Sidi Ali el Mekki (SM), Cap Zebib (CZ) et Salammbô (S).



Figure 35 : Localisation des stations de prélèvement le long du golfe de Tunis.

3.1.2 Acquisition des variables pour la modélisation

Les variables utilisées dans la présente étude sont les suivantes:

- Les périodes des prélèvements à savoir : Les années, les saisons, les mois et les dates d'échantillonnage.
- Les paramètres environnementaux qui sont : La température de l'eau de mer, la salinité.

- Les paramètres météorologiques qui incluent : La température de l'air, la vitesse du vent, la pression atmosphérique et la pluviométrie.

Les variables : Années, saisons, dates, mois, la température de l'eau de mer, salinité ont été obtenues à partir de mesures *in situ* (Hachani *et al.*, 2018).

Les données météorologiques pour l'ensemble de données 2013-2015 ont été obtenues à partir de modèles marins globaux. La température de l'air, la pression atmosphérique et la pluviométrie ont été obtenues du modèle de MEDITERRANEAN SEA PHYSICS REANALYSIS, et les données sur les vents du modèle GLOBAL OCEAN WIND OBSERVATIONS CLIMATOLOGY. Ces derniers font partie des produits Copernicus marins de l'UE (<http://www.copernicus.eu>). En ce qui concerne le jeu de données de 2016 utilisé pour la validation du modèle, les données environnementales ont été obtenues à partir de mesures prises *in situ* et les données météorologiques ont été obtenues à partir de mesures réalisés par l'Institut National de la Météorologie de Tunisie (I.N.M).

3.2 Construction du modèle prédictif

Le modèle prédictif des concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* a été construit à l'aide de la méthode d'apprentissage automatique (Machine-learning) en utilisant la fonction "Quantile Regression Forests" (QRF). Les algorithmes de la fonction (QRF) se basent sur des approches statistiques pour donner à un système piloté par ordinateur la capacité de se créer une base de données de référence à partir d'une analyse de données mesurées (environnementales, météorologiques) permettant l'adaptation des calculs dans une perspective prédictive (Meinshausen, 2006). Cette approche a été recommandée après la comparaison de plusieurs techniques de modélisation (Ottaviani *et al.*, 2015). Elle est basée sur la méthode de "forêts aléatoires" ou Random Forests (Breiman, 2001), qui forme un ensemble d'arbres en utilisant des observations indépendantes pour chaque arbre, seul un sous-échantillon des données est utilisé pour faire l'entraînement du modèle (la base de données de référence). De plus, seul un sous-ensemble aléatoire de variables prédictives est pris en compte pour la sélection du point de partage au niveau de chaque nœud. La fonction (QRF) permet de générer toute une distribution de valeurs prédites pour chaque combinaison d'entités en entrée. Les forêts aléatoires sont utiles pour modéliser des relations complexes entre des entités en entrée et des variables de sortie, sans supposer aucune information sur la forme spécifique de la relation ni

sur la distribution de probabilité des quantités impliquées. Dans la présente étude, le modèle de régression a été construit en utilisant 10 caractéristiques comme prédicteurs (les données mesurées). Il s'agit des: années d'échantillonnage, saisons, les dates, mois, de la température de l'eau de mer, de la salinité, de la température de l'air, de la vitesse du vent, de la pression atmosphérique et de la pluviométrie. Les concentrations d'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes sont les variables de réponses. Elles sont exprimées sous forme de logarithme décimal (\log_{10}). Au total, 335 entrées étaient présentes dans le principal jeu de données, et chaque arbre a été développé à l'aide d'un échantillon initialisé contenant environ 60% de toutes les données, avec 5 variables essayées à chaque division. Au total, 500 arbres ont été produits et l'importance des variables est évaluée comme une diminution moyenne de la précision, exprimée sous la forme d'une erreur quadratique moyenne (EQM). (EQM) est une mesure caractérisant la précision de l'estimation de l'importance des différentes variables utilisées pour la prédiction. La qualité de l'ajustement pour ce modèle a été évaluée visuellement en traçant les valeurs prédites moyennes par rapport aux données historiques (2013-2015), et en traçant les données résiduelles par rapport aux valeurs historiques (données 2013-2015). Après cette évaluation visuelle préliminaire, la statistique R^2 , le coefficient de corrélation de Pearson et la moyenne quadratique (RMS) ont été calculés pour une évaluation numérique de la corrélation entre les valeurs prédites et historiques.

3.3 Validation du modèle : Sensibilité et taux de faux positifs

La validation du modèle a été réalisée en générant des prévisions de concentrations d'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau et sur les macroalgues en utilisant les données météorologiques appropriées générées chaque semaine du 14 Juin 2016 au 18 Novembre 2016 par l'Institut National de la Météorologie de Tunisie (I.N.M). Ces valeurs ont ensuite été comparées aux mesures réelles de la concentration d'*Ostreopsis*. Afin de mieux décrire la sensibilité du modèle, deux seuils de 10 000 cellules L^{-1} pour l'abondance d'*Ostreopsis* cf. *ovata* dans la colonne d'eau et 10 000 cell. g^{-1} MF ont été pris en compte. Ces seuils correspondent au passage de la phase d'alerte à la phase d'urgence en cas de production d'une efflorescence massive d'*Ostreopsis* cf. *ovata* (Funari *et al.*, 2015). Lorsque la probabilité à laquelle une concentration *in situ* est supérieure à 10 000 cellules cette dernière est considérée comme étant correctement prédite en tant que condition de «vraie efflorescence», et a été calculée pour les quantiles 0,1, 0,5, 0,87 et 0,99. Les quantiles 0.1, 0.5 et 0.99 ont été choisis

pour représenter l'ensemble de la plage de quantiles. Le choix du quantile 0,87 faisait suite à un compromis entre taux de faux positifs et la sensibilité. De même, la probabilité de prédire par erreur les événements d'efflorescence est définie lorsque les concentrations mesurées étaient inférieures au seuil spécifié de 10 000 cellules en tant que condition de «fausse efflorescence», c'est-à-dire le taux de faux positif qui a été calculé aussi pour les quantiles 0,1, 0,5, 0,87 et 0,99.

4 Les analyses statistiques

L'analyse statistique a été produite par le logiciel R 2.15.0 (R Core Team development, 2012) en utilisant les deux packages “Vegan” (Oksanen *et al.*, 2011) et “Pgirmess” (Giraudoux, 2012).

Pour le Modèle prévisionnel des efflorescences d'*Ostreopsis*, les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide de R (R Core Team development, 2015) en utilisant le package «quantregForest» (Meinshausen, 2017).

4.1.1 Analyse de variance (ANOVA)

L'analyse ANOVA sert à comparer les moyennes d'une variable pour des groupes qui se distinguent par deux ou plusieurs facteurs. Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été utilisée pour évaluer la variabilité des paramètres environnementaux entre les stations et les saisons, la variabilité des espèces en fonction des périodes de prélèvement et la nature du substrat, ainsi que la variabilité de taille des souches d'*Ostreopsis* collectées dans les différents sites d'étude. Le coefficient de corrélation de Spearman. a été utilisé pour tester les relations potentielles entre les variables et les paramètres météorologiques.

4.1.2 Analyse de la redondance (ARD)

Cette analyse statistique permet la mise en évidence de la relation entre des observations, des variables réponses et des variables explicatives (Ter Braak, 1986). Dans notre cas les sites étudiées sont "les observations", les espèces de dinoflagellés épiphytes sont "les variables réponses" et les paramètres environnementaux sont "les variables explicatives". Une analyse

de la redondance (ARD) a été réalisée pour mettre en évidence les effets des spécificités de chaque station, saison, nature du substrat et profondeur, ainsi que des paramètres physico-chimiques (température de l'eau, salinité, pH et O₂ dissous, NT, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PT, PO₄³⁻ et Si(OH)₄) sur l'abondance des dinoflagellés épiphytes.

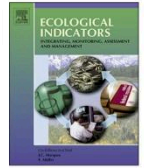
4.1.3 Modèles additifs généralisés (GAM)

Les modèles additifs généralisés sont considérés comme une généralisation non paramétrique des régressions linéaires. En raison de leur flexibilité, les GAM sont utilisés pour l'étude des relations entre les espèces et de multiples prédicateurs. Les GAM ont été utilisés pour mettre en évidence les relations non linéaires entre les covariables (température de l'eau, salinité, pH et O₂ dissous, NT, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PT, PO₄³⁻ et Si(OH)₄) et la variable réponse qui est l'abondance des espèces d'*Ostreopsis cf. ovata* au cours des saisons estivales des années 2015 et 2016.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Indicators

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

Original Articles

Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: Application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea



Cécile Jauzein^{a,b,*}, Laury Açaf^{b,c}, Stefano Accoroni^d, Valentina Asnaghi^{e,f}, Anna Fricke^{g,h}, Mohamed Amine Hachaniⁱ, Marie abboud-Abi Saab^c, Mariachiara Chiantore^{e,f}, Luisa Mangialajo^{b,g}, Cecilia Totti^{d,e}, Imen Zaghmouriⁱ, Rodolphe Lemée^b

^a IFREMER, Centre de Brest, DYNECO PELAGOS, F-29280 Plouzané, France

^b Sorbonne Université, CNRS-INSU, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, LOV UMR 7093, F-06230 Villefranche sur mer, France

^c National Council for Scientific Research, National Center for Marine Sciences, BP 534, Batroun, Lebanon

^d Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, via Breccia Bianche, 60131 Ancona, Italy

^e CoNISMa, Piazzale Flaminio 9, 00196 Rome, Italy

^f DiSTAV, Università di Genova, Cso Europa 26, 16132 Genoa, Italy

^g Université Côte d'Azur, CNRS, ECOMERS, Parc Valrose 28, Avenue Valrose, 06108 Nice, France

^h Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Florida 4750, Bahía Blanca B8000FWB, Argentina

ⁱ National Institute of Marine Sciences and Technologies, 28 rue 2 mars 1934, Carthage Salammbô, Tunisia

ARTICLE INFO

Keywords:

Patchiness

Macrophyte substrate

Artificial substrate

Recommendations for monitoring

ABSTRACT

Toxic blooms of *Ostreopsis* spp. are greatly challenging to monitor due to the complexity and variability of cell repartition among benthic and pelagic compartments. This results in marked differences in employed methodologies for the survey of their dynamics and hampers the definition of the associated toxic risk. The present study aims at testing and improving common methodologies used for sampling, processing and counting of field samples. It contributes to the identification of the most suitable strategies for the monitoring and mitigation of *Ostreopsis* blooms in coastal waters. For a sampling based on the collection of macrophytes, the role of the fixative addition and of agitation steps in the efficiency of epiphytic cell collection was defined. For planktonic estimations, the influence of the volume used for concentrating water samples was characterized as a function of *Ostreopsis* cell abundance. The deployment of artificial substrates was tested and confirmed strong advantages of this new sampling methodology, including an integration of a part of the spatial and temporal variability of the cell distribution.

1. Introduction

Toxic dinoflagellate species of the genus *Ostreopsis* are distributed worldwide, from tropical to temperate areas, and are particularly widespread along the coasts of the Mediterranean Sea (Accoroni and Totti, 2016; Mangialajo et al., 2011; Parsons et al., 2012). Their toxicity is associated with the synthesis of palytoxin-like compounds that include isobaric palytoxin, ovatoxins (Uchida et al., 2013; Brissard et al., 2014; García-Altare et al., 2015) and mascarenotoxins (Rossi et al., 2010; Scalco et al., 2012). Intense blooms of *Ostreopsis* were related to noxious effects on human health, including skin irritations and respiratory disorder observed in swimmers and beach-goers (Del Favero et al., 2012; Tichadou et al., 2010; Vila et al., 2016). Deleterious effects

of *Ostreopsis* blooms were also reported on marine invertebrates (Guidi-Guilvard et al., 2012; Pagliara and Caroppo, 2012; Gorbi et al., 2013). To date, however, the knowledge of the ecology and ecotoxicology associated with *Ostreopsis* blooms is still scanty. Active compounds that can have deleterious effects have not been fully identified and/or characterized yet (Ciminiello et al., 2014; Vila et al., 2016). Epidemiology studies can provide crucial information about the link between *Ostreopsis* cell abundances and their toxic impacts. When considering *Ostreopsis* blooms, this approach shows some strong limitations, however. Primarily, clinical symptoms associated with exposure to *Ostreopsis* are non-specific and can be easily misinterpreted (Vila et al., 2016). Secondly, estimates of *Ostreopsis* cell density are intrinsically challenging because the distribution of cells during blooms is highly

* Corresponding author at: IFREMER, Centre de Brest, DYNECO PELAGOS, F-29280 Plouzané, France.

E-mail address: cecile.jauzein@ifremer.fr (C. Jauzein).

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.089>

Received 18 January 2018; Received in revised form 27 March 2018; Accepted 29 March 2018
1470-160X/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

complex and variable, fluctuating between both benthic and pelagic compartments (Accoroni and Totti, 2016). This type of distribution poses major problems for the formulation of optimized sampling protocols and for the assessment of the relationship between abundance and toxicity.

Cells of *Ostreopsis* spp. are predominantly benthic, epiphytic on macroalgae but also located on hard substrates such as rocks, sand or mollusk shells (Faust, 1995; Parsons et al., 2012; Totti et al., 2010; Vila et al., 2001). On the seabed, *Ostreopsis* cells, like other benthic microalgae, are extremely patchy in distribution (GEOHAB, 2012). This patchiness probably reflects small-scale variations in habitat characteristics, such as differences in exposure to turbulence or variety of substrates (Parsons and Preskitt, 2007; Totti et al., 2010). Cells of *Ostreopsis* spp. are also commonly observed in the water column (Vila et al., 2001; Mangialajo et al., 2011), as free-living cells or agglutinated in mucilaginous aggregates that can float in the water column or accumulate at the sea surface. Field observations during *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo blooms in the Bay of Villefranche-sur-mer (France) showed that mucilaginous aggregates often accumulate at the air-water interface during the daylight, and especially in the afternoon (Jauzein and Lemée, pers. observation), suggesting the existence of a diel rhythm in vertical migrations of aggregates (Vila et al., 2008).

Ostreopsis mucilage seems to play a central role in the vertical distribution of cells. On the bottom, mucous filaments allow for the attachment of cells to surfaces (Honsell et al., 2013). For resuspended cells, extracellular mucilage can increase the buoyancy of cells by reducing the density of algal particles (Reynolds, 2007). The mucilage matrix is also probably responsible for diel vertical migrations of dense aggregates of *Ostreopsis* cells in the water column. Migrations of aggregates, moving upward with sunrise and downward at sunset, have already been described for benthic microorganisms, including a mixture of diatoms, cyanobacteria and dinoflagellates, by Faust and Gullede (1996). They are probably driven by the formation of gas bubbles that are trapped in the mucous matrix and regulate the buoyancy of mucilaginous aggregates. As specifically described for benthic cyanobacteria (World Health Organization, 2003) and diatoms (Fernández-Méndez et al., 2014), the diel formation of such gas bubbles can be defined from the balance between oxygen production by photosynthesis and consumption by respiration.

The complex and variable repartition of *Ostreopsis* cells, from the bottom to the water column, greatly complicates the design and implementation of quantitative sampling strategies for a suitable monitoring of *Ostreopsis* blooms and other BHABs (Giussani et al., 2017). This has resulted in marked differences in methodologies currently employed and reported in the literature, applied to the study of ecology and population dynamics of benthic toxic dinoflagellates. The need for reaching a consensus regarding protocols employed for the sampling, treatment and analyses of BHABs is stressed so that meaningful comparisons can be made among studies (GEOHAB, 2012). It also opens perspectives for new technologies to be developed and validated (e.g. Tester et al., 2014; Jauzein et al., 2016; Mangialajo et al., 2017; Vassalli et al., 2018) in order to improve the precision and representativeness of data collection. The aim of the present study was to test, improve and validate major current protocols used for estimation of abundances of benthic harmful dinoflagellates, with a specific focus on *Ostreopsis* spp. In the framework of the EU project M3-HABs (<http://m3-habs.net/>), several techniques were compared, including sampling strategies (in particular the test of artificial substrate deployment), isolation techniques for epiphytic microalgae, and counting procedures. The present work allows for going further on the definition of the most suitable strategies for the monitoring and mitigation of BHABs.

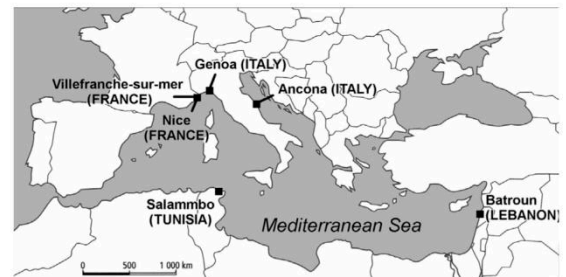


Fig. 1. Map showing the locations of the six sites sampled for the monitoring of *Ostreopsis* blooms in the Mediterranean Sea.

2. Material and methods

2.1. Study sites

Dynamics of *Ostreopsis* blooms were monitored in six different coastal zones of the Mediterranean Sea. Two sites were located in the French Mediterranean coast (Villefranche-sur-mer and Nice); the others were located in Tunisia (Salammbô), Lebanon (Batroun) and Italy (Quarto and Ancona) (Fig. 1). All these sites are characterized by sheltered rocky coasts and similar dominant macroalgal communities (Table 1). The *Ostreopsis* species detected in the study areas were *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo in coastal waters of France, Tunisia and Italy and *Ostreopsis fattorussoi* Accoroni, Romagnoli et Totti in Lebanon. The presence of *O. cf. ovata* was also recorded in Lebanese coastal waters, but was almost negligible (Casabianca and Penna, pers. comm.).

2.2. Optimization of sampling methods

In each study area, three stations, about 10 m apart from each other, were simultaneously monitored during intensive surveys and used to test three different sampling methods. First, concentrations of planktonic *Ostreopsis* cells in the water column were estimated 20 cm above the bottom, over a seabed covered by macroalgae and situated at about 50 cm depth. For this planktonic sampling, plastic bottles were filled with 250 mL of seawater and then capped under water. These samples were collected in the morning (between 8:00 and 10:00 am, local time), taking care to avoid mechanical resuspension of benthic cells during sampling that could have artificially increased planktonic concentrations.

Second, abundances of benthic cells of *Ostreopsis* were estimated from the collection of macrophytes. This benthic sampling was performed in the morning, at about 50 cm depth, targeting the most abundant macroalgal species of the site. For each benthic sample, between 5 and 15 g of fresh weight of macroalgae were carefully collected with the surrounding seawater, using a 250 mL plastic bottle that was capped under water.

The third sampling method was based on the deployment of artificial substrates that allowed for the collection of planktonic and resuspended *Ostreopsis* cells. Artificial substrates consisted of rectangular pieces (2.5 cm × 27 cm) of window screen (1.3 mm porosity) that were fixed on a rigid frame as described in Jauzein et al. (2016). Each frame was attached to a weight and a small subsurface float in order to maintain the device at about 50 cm depth. With the fixation systems, artificial substrates were held tightly on both sides and naturally positioned perpendicularly to the water flow. Artificial substrates were deployed on the same stations where benthic and planktonic samples were collected. They were incubated for 24 h, a period that ended when planktonic and benthic samples were taken. Pieces of artificial substrates were collected using scissors and plastic bottles of 250 mL, as described in Jauzein et al. (2016).

Table 1
Main characteristics of the study sites and *Ostreopsis* blooms that were monitored.

Site (country)	Coordinates		Typology of the site	Ostreopsis bloom characteristics			Maximal abundance of benthic cells	Macroalgal communities (main genera)	
	Latitude N	Longitude E		Timing	Year				
					Start	Peak			End
Rochambeau, Villefranche-sur-mer (France)	43°41'35"	7°18'31"	Natural rocky shore and protective stone boulders, sheltered environment	2014	06/25	07/09	08/06	529 × 10 ³ cells.g ⁻¹ fw	Erect macroalgae (<i>Dictyota</i> spp., <i>Halopteris scoparia</i>)
Lanterne Beach, Nice (France)	43°40'38"	7°13'51"	Protective stone boulders along airport facilities	2015	06/25	07/16	07/23	813 × 10 ³ cells.g ⁻¹ fw	Erect macroalgae (<i>Dictyota</i> spp., <i>Halopteris scoparia</i>)
Passetto, Ancona (Italy)	43°36'35"	13°32'27"	Rocky coast and sheltered environment	2015	07/30	09/11	11/09	260 × 10 ³ cells.g ⁻¹ fw	Erect macroalgae (<i>Halopteris scoparia</i> , <i>Dictyota</i> spp.)
Quarto, Genova (Italy)	44°23'17"	8°59'38"	Natural rocky shore, shallow, rather sheltered from sea wave	2015	06/25	07/04	08/12	2289 × 10 ³ cells.g ⁻¹ fw	Erect macroalgae (<i>Halopteris scoparia</i>)
Salammbô (Tunisia)	36°50'35"	10°19'37"	Natural rocky shore, sheltered environment	2015	07/28	10/27	11/03	380 × 10 ³ cells.g ⁻¹ fw	Erect macroalgae (<i>Sargassum</i> spp., articulated corallinales such as <i>Corallina</i> spp. and <i>Ellisolandia</i> spp.)
Batroun (Lebanon)	34°15'05"	35°39'25"	Natural rocky shore, rather sheltered from sea wave	2015	06/04	08/17	08/28	15 × 10 ³ cells.g ⁻¹ fw	Erect macroalgae (articulated corallinales such as <i>Corallina</i> spp. and <i>Ellisolandia</i> spp.)

Right after sampling, all bottles were brought back to the laboratory in less than one hour and fixed with acidic Lugol's solution (1% final concentration). Planktonic samples were immediately stored at 4 °C in the dark until analysis and processed in less than a month. Before counting, sedimentation columns were used to concentrate planktonic samples according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1958). For each sample, a 50 mL subsample was left to settle for 24 h, then planktonic *Ostreopsis* cells were enumerated using an inverted microscope (Axiovert 40 Zeiss light microscope at 100× or 200× magnification).

Samples from biological and artificial substrates were treated similarly. After addition of the fixative, sampling bottles were vigorously shaken for 10 s in order to dislodge epiphytic *Ostreopsis* cells, then substrates were rinsed two times with 100 mL of FSW (Filtered Sea Water) to optimize cell collection efficiency. Water collected after agitation and washing was passed through a 500 µm meshed filter and mixed. The total volume obtained for each sample was recorded. A 50 mL subsample was then taken and stored at 4 °C in the dark until processing. For macroalgal samples, the macroalgae put aside was wrung out and immediately weighted. *Ostreopsis* cells were enumerated using a 1 mL Sedgewick Rafter Counting Cell examined with light microscope (Axio Scope.A1 Zeiss microscope at 100× or 200× magnifications). Cell abundances on macroalgal samples were expressed as number of cells per gram of fresh weight of macroalgae (cells.g⁻¹ fw), while abundances on artificial substrates were expressed as cells per cm² according to Weisstein (2013) and Tester et al. (2014).

Data from all the three different sampling methods are here reported for the Bay of Villefranche-sur-mer site (France) for summers 2014 and 2015. Data from all the other sites, located in France, Italy, Tunisia and Lebanon, refer to summer 2015 and consist of benthic and artificial substrates data only.

During the *O. cf. ovata* bloom that occurred in the Bay of Villefranche-sur-mer (France) in 2015, an additional experiment was specifically set up for characterizing the efficiency of *Ostreopsis* cell collection using artificial substrates. For this purpose, several deployment durations were tested for the artificial substrates in the field. During this bloom event, three pieces of artificial substrates were incubated weekly in each of the three stations monitored in order to follow bloom dynamics. This number of pieces was drastically increased during an exceptional sampling day, with the deployment of twelve pieces of artificial substrates in two stations. For this experiment, three independent frames were set up in each station, holding four pieces of artificial substrates each. One piece of substrate was carefully collected on each frame after 4 h, 8 h, 12 h and 24 h of deployment, using 250 mL plastic bottles. Samples were treated as described above.

2.3. Optimization of the detachment of epiphytic microalgal cells from macroalgae

In the Bay of Villefranche-sur-mer (France), additional samples of macrophytes were collected during the *O. cf. ovata* blooms in 2014 and 2015 in order to test and optimize methods for cell detachment. Each year, two sets of sampling were done: one under low level (< 20,000 cells.g⁻¹ fw) and one under high level (> 100,000 cells.g⁻¹ fw) of epiphytic *O. cf. ovata* abundances. Each time, fifteen benthic samples of the same macroalgal species (either *Halopteris scoparia* or *Dictyota* spp. or *Laurencia* spp.) were taken in the same surface (1 m²) of sea bottom, at about 50 cm depth. Sampling was performed using plastic bottles that were filled with 5 to 20 g fw of macroalgal thallus and ~250 mL of surrounding seawater, and then capped under water. This specific sampling was used to analyze the role of the fixative addition and of the washing steps in the efficiency of the separation between macroalgal substrate and epiphytic *Ostreopsis* cells.

Three conditions were tested during the processing of these benthic samples (Fig. 2): the separation step was performed without fixative addition (only seawater) or after addition of either acidic Lugol's solution or non-acidic Lugol's solution at 1% final concentration. Five

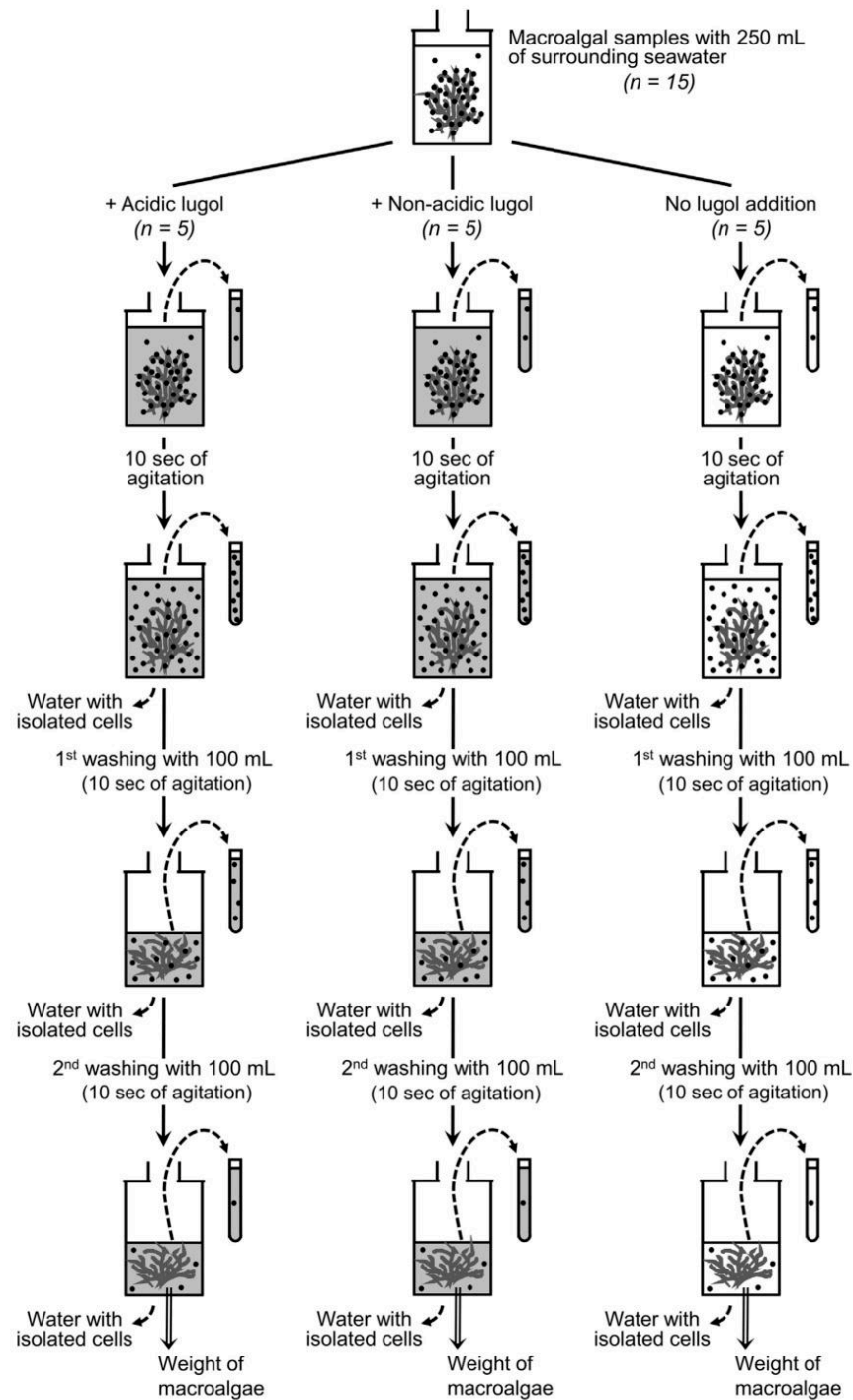


Fig. 2. Experimental procedures used for estimating the role of the fixative addition and of the washing steps in the efficiency of the separation between epiphytic *Ostreopsis* cells and macroalgal substrate. The number of replicated samples is indicated in italic. Four sets of this experiment were conducted, under low *versus* high levels of benthic abundance of *Ostreopsis* cells, and during two successive years of survey.

replicates were analyzed per condition. For each individual sample, several sub-samples (10 mL) were collected during the successive detachment procedures. They allowed for estimations of the resuspended

microalgal cell concentration (*i*) before the agitation of the benthic sample, (*ii*) after 10 s of agitation of the benthic sample, (*iii*) at the end of the 1st washing step (after 10 s of agitation of the macroalgal sample

in 100 mL of FSW), (iv) at the end of the 2nd washing step, and (v) in the final volume combining water collected after agitation and washing of the benthic sample (Fig. 2). Every sub-samples of the series collected without fixative addition were then spiked with 100 μL of acidic Lugol's solution (1% final concentration) for their preservation. All sub-samples were kept at 4°C in the dark until analysis. Replicated cell counts of *O. cf. ovata* cells were done using a 1 mL Sedgewick Rafter Counting Cell and light microscope (Axio Scope.A1 Zeiss microscope). They allowed for estimations of the contribution of each step (from agitation to washing of the macroalgal substrate) in the detachment and collection of epiphytic *Ostreopsis* cells.

2.4. Optimization of counting techniques

Tests were run in order to estimate the accuracy of the counting of planktonic *Ostreopsis* cells using the Utermöhl method. Surveys done in the Bay of Villefranche-sur-mer (France) in 2014 and 2015 allowed for the collection of 78 planktonic samples during the development and decline of *O. cf. ovata* blooms. For all these samples, a 50 mL aliquot was settled in a sedimentation chamber for 24 h before enumeration of *Ostreopsis* cells on an inverted microscope, as described above. For 38 of the available samples, showing cell concentrations ranging from 140 cells.L⁻¹ to 14,000 cells.L⁻¹, additional measurements were done from two additional aliquots: one aliquot of 10 mL was simultaneously settled for 4 h, and another aliquot of 100 mL was settled for 48 h. Fourteen samples collected from artificial substrates during the monitoring of the *O. cf. ovata* blooms were also treated similarly, in order to increase the number of estimations at high concentration levels. Estimates of *Ostreopsis* cell concentrations obtained after sedimentation of 10 mL (settled 4 h), 50 mL (settled 24 h) or 100 mL (settled 48 h) were compared. All the sedimentation chambers (HydroBios©) used had the same diameter but varied in height for defining volumes of 10 mL, 50 mL or 100 mL.

2.5. Statistical analyses

Linear regression analyses were used to compare different sampling and counting procedures, such as planktonic versus benthic sampling or artificial substrates versus benthic sampling, as well as for comparing various volumes of sedimentation of planktonic samples. The level of significance for regression slopes was set at $p < 0.05$. When testing conditions helping for the detachment of *Ostreopsis* epiphytic cells from macroalgae, analyses of variances were performed to identify and characterize the influence of significant factors on data distribution. A three-way ANOVA was used to determine the influence of the level of abundance (low or high), the year of survey, and the type of fixative addition on the proportion of cells detached from the macroalgal substrate before and after successive agitation steps. For each step, a second set of analysis was run after pooling the data as a function of the factors highlighted as significant in the three-way ANOVA. Before agitation of benthic samples, data obtained under low versus high levels of abundance were normally distributed and Student's t-test was used to compare their means. Additional analyses of variance were conducted on data sets obtained during the processing of benthic samples, to determine the impact of the type of fixative addition on the detachment of epiphytic cells. When variances were homogeneous, data were analyzed by one-way ANOVA and Fisher's Least Significant Difference (LSD) test was performed to determine pairwise differences of means between data groups; data series of the washing steps followed these assumptions. For data series obtained after 10 s of agitation, variances were not homogeneous and were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test and Bonferroni test. Finally, for testing the efficiency of the Utermöhl method for counting planktonic *Ostreopsis* cells, cell abundances obtained after settlement of 10 or 100 mL were standardized by the level of abundance obtained for 50 mL settlement and expressed as percentages. The distribution of these relative cell abundances was

compared to the fixed value of 100% by one-sample t-tests in order to define if these values were significantly different from the reference counts (obtained for 50 mL samples). All the statistical analyses were performed using the Statgraphics® Centurion 18 software.

3. Results

3.1. Optimization of sampling methods

The intense surveys of *Ostreopsis cf. ovata* blooms that occurred in the Bay of Villefranche-sur-mer (France) in 2014 and 2015 allowed for the collection of samples under various levels of *O. cf. ovata* cell abundance. Those blooms lasted from mid-June to the end of July. Maximal abundances of 1.29×10^6 and 1.35×10^6 cells.g⁻¹ fw were recorded in the benthic communities in mid-July, in 2014 and 2015, respectively. When data were expressed as means between the three monitoring stations and log transformed, planktonic concentrations of *O. cf. ovata* cells were positively correlated with benthic abundances and characterized by the linear regression model $Y = 0.555 X$ ($r^2 = 0.73$, $p < 0.01$). Planktonic concentrations in this data set were estimated from 50 mL aliquots of seawater. A detailed analysis of the data showed that the associated methodology was not sensitive enough to allow for precise measurements all along the density gradient tested, however. When considering a representation of the data for each station, the pattern of distribution of planktonic concentrations as a function of benthic ones showed a deviation from a linear correlation model: under low levels of abundance, several series of points clustered as a function of planktonic concentration levels, when some zero values were recorded (Fig. 3A). This low precision of planktonic counts was noted for benthic concentrations lower than 13,500 cells.g⁻¹ fw. Using the linear regression model defined above, this threshold corresponded to a planktonic concentration of 196 cells.L⁻¹, that is about 200 cells.L⁻¹.

Abundances of *Ostreopsis* cells collected from artificial substrates showed a positive correlation with benthic abundances. This relationship was observed when data were expressed per station in Villefranche Bay (Fig. 3B) or as mean values between stations across all study sites (Fig. 3C), and without any apparent drift in data distribution. When combining mean values obtained from the six different coastal zones of the Mediterranean Sea that were monitored, the final data set was modeled by $Y = 0.641 X + 2.346$ ($r^2 = 0.55$, $p < 0.01$), where the abundance collected from artificial substrates (Y , in cell.100 cm⁻²) is expressed as a function of benthic abundance (X , in cells.g⁻¹ fw). This data set also fitted well with the equation defined by Tester et al. (2014) (Fig. 3C); this other linear regression model was parameterized from data that were in a different range of abundances (between 0 and 1,300 cells.g⁻¹ fw) than the one of the present study (between 1,100 and 813,000 cells.g⁻¹ fw).

In order to estimate the efficiency of sampling using artificial substrates in detail, different deployment durations were tested in the field, in the Bay of Villefranche-sur-mer. Similar results were obtained from the two stations where the experiment was conducted. Variations of abundance of collected *Ostreopsis* cells showed a saturating kinetic as a function of time (Fig. 4): abundances increased almost linearly with time during the first few hours, then the cell recruitment rate slowed down until the abundance reached a plateau. With the set-up of artificial substrates used in the present study, the concentration of cells collected over 8 h and 12 h exceeded 60 and 80% of the maximal abundances recorded after 24 h, respectively.

3.2. Optimization of the detachment of microalgal epiphytic cells from macroalgae

Four sets of experiments were conducted in the Bay of Villefranche-sur-mer (France), in order to define the role of the fixative addition and the efficiency of the washing steps in the detachment of epiphytic

Ostreopsis cells from their macroalgal substrate. Two sets were conducted per year, targeting low versus high levels of abundance. The addition of fixative before the separation step did not show a significant effect on the total number of isolated *O. cf. ovata* cells (Fig. 5A). When pooling the data from the different detachment procedures for each set of the experiment, high levels of abundance were characterized by

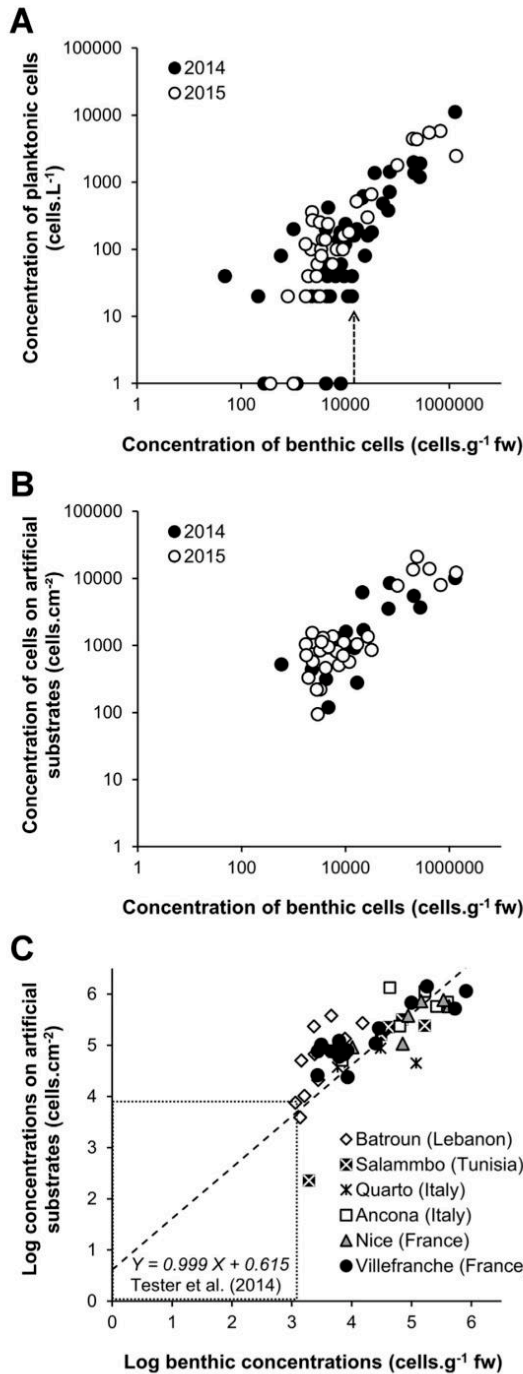


Fig. 3. Abundances of *Ostreopsis* cells estimated in the planktonic fraction (A) and collected from the deployment of artificial substrates (B and C), expressed as a function of benthic abundances. Data are plotted for each station (three per site) that were monitored in the Bay of Villefranche-sur-mer (France) (A and B) and as mean values between stations for each of the six sites of survey (C), located in France, Italy, Tunisia and Lebanon. The arrow shown in panel A corresponds to the threshold of 13,500 cells.g⁻¹ fw. In the panel C, data are log-transformed and the linear regression model shown is the one reported by Tester et al. (2014) for the same genus, from surveys conducted in coastal areas of Belize and Malaysia. The square indicates the range of concentration values used by Tester et al. (2014) for data fitting.

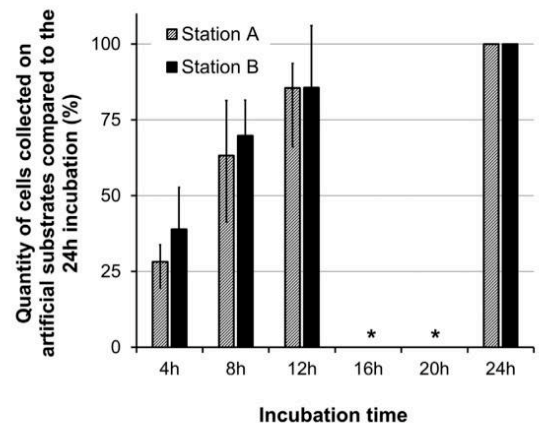


Fig. 4. Kinetics of *Ostreopsis* cells' accumulation on artificial substrates (window screens) deployed in the Bay of Villefranche-sur-mer (France) during summer 2015. Stations A and B are located on the same study site and are only 10 m apart from each other. Values correspond to mean abundances (\pm standard deviation) compiled from three replicate pieces of substrate that were held on three different rigid frames. Data are expressed as percentages relatively to the mean level of abundance estimated for 24 h deployment. Stars indicate missing data, when considering a regular increase in incubation time every 4 h.

average values ($n = 15$) of $15.8 \times 10^4 (\pm 0.6 \times 10^4)$ cells.g⁻¹ fw and $24.7 \times 10^4 (\pm 9.0 \times 10^4)$ cells.g⁻¹ fw in 2014 and 2015, respectively, while low levels of abundance were defined from respective average values of $1.2 \times 10^4 (\pm 0.6 \times 10^4)$ cells.g⁻¹ fw and $0.6 \times 10^4 (\pm 0.3 \times 10^4)$ cells.g⁻¹ fw. A strong variability was noted among replicated samples (Fig. 5A): a factor up to 4 was observed between the minimum and the maximum benthic concentrations that were estimated on the same macroalgal species and in the same 1 m² of seabed.

A three-way ANOVA was performed to determine the influence of three factors (the low or high level of abundance, the year of survey, and the type of fixative addition) on the proportion of *O. cf. ovata* cells detached from the macroalgal substrate during the processing of benthic samples (Fig. 2, Table 2). According to the results obtained, the quantity of isolated *O. cf. ovata* cells before agitation of the sample was significantly affected by the level of abundance and the year of survey ($p < 0.001$), while the type of fixative addition did not show a significant effect (Table 2). Conversely, after 10 s of agitation of the macroalgal substrate in the surrounding seawater or during each of the washing steps, the type of fixative addition had a significant effect on the proportion of isolated microalgal cells ($p < 0.001$), while neither the level of abundance nor the year of survey had a significant influence (Table 2).

When focusing on data obtained before agitation of benthic samples, the level of abundance of epiphytic *O. cf. ovata* cells had a significant effect on the proportion of detached cells (Fig. 5B): for the two years of survey, the proportion of cells loosely attached to the substrate was lower when the benthic concentration was high (t -test, $n = 15$,

$p < 0.001$ for 2014 data and $p < 0.005$ for 2015 data). Thus, the agitation steps had a higher contribution to the collection of epiphytic microalgal cells under high levels of benthic abundance.

Data obtained after carrying out each agitation step (conducted either in the surrounding seawater or during washings) were pooled as a function of the only significant factor highlighted: the type of fixative

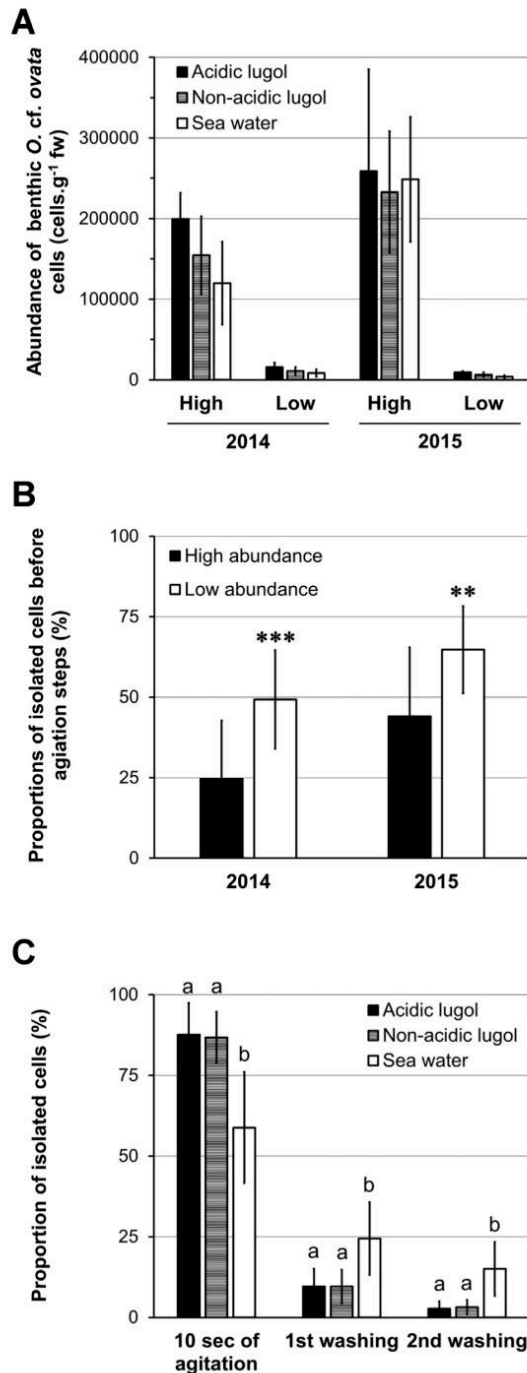


Fig. 5. Contribution of fixative addition and of washing steps in the detachment of epiphytic *Ostreopsis* cells from their macroalgal substrate. Benthic abundances in the Bay of Villefranche-sur-mer (France), estimated after agitating the macroalgal substrate in the surrounding seawater and performing two successive washing steps, with or without initial addition of acidic Lugol's and non-acidic Lugol's solution (A). Details on the relative proportion of cells collected before (B) and after each of the agitation steps (C). Data plotted in panels B and C were pooled as a function of the significant factors identified from a three-way ANOVA. This ANOVA was used to determine the influence of the low or high level of abundance, the year of survey, and the type of fixative addition on the proportion of cells detached from the macroalgal substrate (Table 2). In the end, data correspond to average values (\pm standard deviation) and respective numbers of pooled samples are $n = 5$, $n = 15$ and $n = 20$ for panel A, B and C. Statistically significant differences are indicated by asterisks when a t-test was run (Panel B, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and by letters when data were analyzed by either Kruskal-Wallis and Bonferroni tests or ANOVA and Fishers LSD tests (Panel C, $p < 0.001$).

addition ($n = 20$, Fig. 5C). No significant difference was observed if acidic Lugol's solution was used instead of non-acidic Lugol's solution. Results showed that 10 s of agitation of the macroalgal substrate allowed for the collection of a significantly higher number of *O. cf. ovata* cells if the fixative was added before the separation step (Fig. 5C). Conversely, the contribution of each washing step in epiphytic cell detachment was significantly higher for samples processed in seawater than for samples fixed with Lugol's solution (Fig. 5C). The proportion of cells isolated during the two washing steps reached 40 (± 18)% when the separation step was done in seawater; this proportion was 13 (± 7)% if the procedures were done after addition of Lugol's solution. Specifically, when benthic samples were immediately fixed with Lugol's solution, the second washing step allowed for recovering only 2.9 (± 2.3)% of the total number of epiphytic *O. cf. ovata* cells from benthic samples.

A potential correlation between the percentage of isolated cells and the weight of macroalgal substrate was tested for each agitation step (in the surrounding seawater or during washings) and each type of fixative addition ($n = 20$). These analyses were performed to test if a maximal weight of macroalgae can be defined for 250 mL sampling bottles, over which microalgal epiphytic cells could not be dislodged efficiently due to the high volume of macroalgal biomass. Some trends were apparent: for every series of samples (with or without fixative addition), the percentage of cells isolated after 10 s of agitation in the surrounding water tended to decrease with increasing macroalgal weight. Conversely, the percentage of cells isolated after each washing step tended to be positively correlated with the weight of macroalgae. However, when using linear regression models to simulate these data sets, none of these trends was significant (r^2 comprised between 0.01 and 0.23 and $p > 0.05$). Thus, in the present study, the quantity of biomass of macroalgae (between 5 and 20 g fw) was not defined as a potential factor of variation in the proportion of isolated benthic cells.

3.3. Optimization of counting techniques

A series of counts of *O. cf. ovata* planktonic cells was performed using different sedimentation volumes of either 10, 50 or 100 mL. For these planktonic samples, the comparison of data sets showed significant positive correlations between cell counts done using a 10 mL column, or a 100 mL column, and the reference counts done with the 50 mL column. Respective linear models were described by $Y = 0.975 X$ ($r^2 = 0.98$, $p < 0.001$) and $Y = 0.889 X$ ($r^2 = 0.99$, $p < 0.001$) for the 10 mL and the 100 mL counts, when expressed as a function of the 50 mL counts. In comparison to the regression model $Y = X$, the slopes obtained suggested a potential underestimation of cell concentration when using a 100 mL column, instead of a 50 mL column.

In order to characterize these relationships in more details, values obtained after sedimentation of 10 or 100 mL were expressed as

Table 2

Statistical analyses of data obtained when characterizing conditions helping for the detachment of epiphytic *Ostreopsis* cells from macroalgal substrate during the treatment of benthic samples. These results correspond to a three-way ANOVA used to determine the influence of three variables on the proportion of detached *O. cf. ovata* cells: the low or high level of benthic abundance, the year of survey (2014 or 2015), and the type of fixative addition (no addition, initial addition of acidic Lugol's solution, initial addition of non-acidic Lugol's solution). Four sets of data were analyzed: they correspond to abundances measured before the agitation of macroalgal samples, after 10 s of agitation of the macroalgal samples and after one or two successive washing steps of the macroalgae with FSW.

	Level of abundance		Year of survey		Type of fixative condition	
	Significance	p value	Significance	p value	Significance	p value
Before agitation of the macroalgal sample	Yes	p < 0.001	Yes	p < 0.001	No	p = 0.458
After 10 s of agitation of the macroalgal sample	No	p = 0.052	No	p = 0.098	Yes	p < 0.001
End of the 1st washing of the macroalgal substrate	No	p = 0.065	No	p = 0.363	Yes	p < 0.001
End of the 2nd washing of the macroalgal substrate	No	p = 0.130	No	p = 0.805	Yes	p < 0.001

percentages, relatively to 50 mL counts. This allowed for running a standardization of the data sets according to the overall level of concentration and to analyze the sensitivity of the method regarding low-density levels. When doing so, a threshold of 3,000 cells.L⁻¹ could be defined, under which the variability of estimations increased when the level of abundance decreased (Fig. 6A–C). This increase in variability was described in details with coefficients of variation (CV), analyzing their dependence on the minimal level of abundance fixed for the data set. For both series of standardized data (10 mL and 100 mL), CV was stable over the gradient of cell concentration tested, on condition that planktonic concentrations were higher than 3,000 cells.L⁻¹ (Fig. 6C). Interestingly, increasing the number of data taken into account in CV

estimations by adding values of abundance lower than this threshold increased the dispersion of data distribution (Fig. 6C). The threshold of 3,000 cells.L⁻¹ corresponded to 150 cells counted in 50 mL. This means that counting less than 150 cells per slide decreased the precision of the measurements performed using the Utermöhl method. Current results also showed that counting cells after sedimentation of 10 mL was surprisingly efficient. Indeed, for most of the samples, using a 10 mL sedimentation column instead of 100 mL column only induced a slight increase in measurement variability (Fig. 6C). A strong difference in signal variability was noted between the two series of data when planktonic concentrations were lower than 1,000 cells.L⁻¹; this concentration corresponded to less than 10 cells counted in 10 mL.

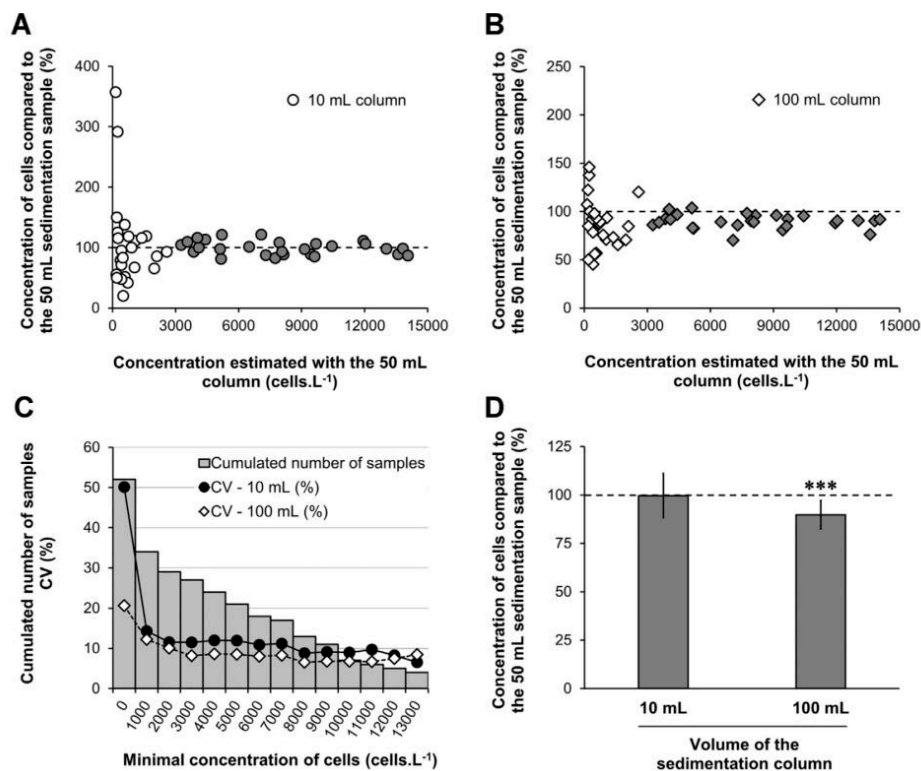


Fig. 6. Efficiency of counting planktonic concentration of *Ostreopsis* cells using the Utermöhl method. Estimations of *Ostreopsis* cell concentrations after settlement of 10 mL (A) and 100 mL (B) of seawater, reported as percentages of the associated counts done from 50 mL settlement. Comparison of these relative abundance data sets in terms of coefficient of variation, considered as a function of the number of cumulated samples and the range of abundance (C), and average values (\pm standard deviation) for data that were normally distributed ($> 3,000$ cells.L⁻¹, $n = 27$) (D). The dashed lines on panels A, B and C correspond to the level 100%, showing an equality between concentrations estimated using either a 10 mL or a 100 mL column of sedimentation, compared to the reference count done with a 50 mL column. On the panel D, results of statistical analyses comparing relative counts to the value 100% are shown (one-sample t-test, $n = 27$, *** $p < 0.001$).

When considering only values for which the level of precision of the reference counts was optimal (planktonic concentrations higher than $3,000 \text{ cells.L}^{-1}$), relative abundances from 10 mL and 100 mL counts were normally distributed and could be compared to the fixed value of 100% that was representative of the 50 mL counts. Data analysis showed no significant difference between cell counts performed using either a 10 mL column or a 50 mL column (relative data were not significantly different from 100%, one-sample t-test, $n = 27$, $p = 0.88$) (Fig. 6D). However, results clearly confirmed that counting *O. cf. ovata* cells using a 100 mL sedimentation column induced a significant underestimation of planktonic concentrations (percentages were significantly lower than 100%, one-sample t-test, $n = 27$, $p < 0.001$) (Fig. 6D). This underestimation corresponded to approximately 10% of the optimal cell counts.

4. Discussion

4.1. Monitoring of the benthic stock

The majority of field surveys that aim at understanding the ecology of *Ostreopsis* spp. target the benthic pool, quantifying epiphytic *Ostreopsis* cells by collection of macrophytes (Okolodkov et al., 2007; Shears and Ross, 2009; Carnicer et al., 2015). This sampling choice is motivated by the fact that benthic populations of *Ostreopsis* represent the main stock of cells during bloom events. In the frame of alert systems, this is also a reason why Mangialajo et al. (2011) recommended to policy makers and managers to primarily monitor benthic abundances: these estimations of the benthic pool are considered more conservative and more representative of bloom dynamics than planktonic concentrations. Additionally, for the mitigation of BHABs, the processing of benthic samples (from sampling to data analysis) does not require more than few hours, a fundamental characteristic for a timely alert in a management perspective.

This macrophyte-based collection method shows some important limitations and disadvantages, however. First, the replicability of cell quantification is strongly affected by the fact that epiphytic *Ostreopsis* cells are extremely patchy in distribution (GEOHAB, 2012). This patchiness may be partly explained by a preference that *Ostreopsis* cells can show for some particular macroalgal species, groups or morphologies (Parsons and Preskitt, 2007; Totti et al., 2010). It could also come from small-scale variations in micro-hydrodynamics conditions. In the present study, such a patchy distribution was evident for *O. cf. ovata*, when comparing levels of abundance estimated for different sets of benthic samples that were collected in the same area of seabed and on the same macroalgae species: a factor up to 4 was observed between the minimum and the maximum concentrations for a single set of replicated samples. Strong patchiness poses a major problem for design and execution of macrophyte-based sampling (GEOHAB, 2012). It makes it necessary to have a high level of replication per site in order to obtain reliable data, representative of benthic population abundance.

The sampling of benthic microalgal populations based on the collection of macrophytes has two other inherent problems. One relates to habitat disruption and may become problematic in case of intense survey. Another is associated with the required standardization of data sets. Benthic microalgal cell abundances can be normalized either per unit of surface area or of fresh or dry weight of macrophyte substrate (e.g. Totti et al., 2010). For ecological studies, a normalization of benthic abundances to a known surface area is the only one allowing for a comparison with estimations done from hard substrates. However, the 3D morphology of macroalgae often makes the estimation of surface area complex and challenging. Thus, most of the recent ecological studies have continued to report benthic abundances expressed per unit of weight of macrophytes (e.g. Selina et al., 2014; Carnicer et al., 2015). This diversity in potential standardization of benthic abundances can limit the making of meaningful comparisons among studies.

Finally, another issue in the precision and reliability of benthic

measurements results from the diversity of methodologies that are currently employed, and reported in previous studies, for the processing of macrophyte samples. One of the goals of the present study was to optimize the treatment of macrophyte samples for the monitoring of BHABs, focusing on the separation step between epiphytic *Ostreopsis* cells and their biotic substrates. According to previous reports on *Ostreopsis* blooms, macrophyte samples are always shaken in ambient seawater to dislodge epiphytic microalgal cells. However, this separation step is sometimes performed without any fixative addition (e.g. Totti et al., 2010) or after fixation of samples with either addition of acidic Lugol's solution (Cohu et al., 2011) or non-acidic Lugol's solution (e.g. Mangialajo et al., 2008), or formaldehyde (e.g. Okolodkov et al., 2007). Similarly, benthic cell counts are sometimes performed on the water collected after a single agitation step (e.g. Shears and Ross, 2009), whereas other studies report measurements performed after rinsing the macrophyte substrate twice (e.g. Cohu et al., 2011) or even more than three times (e.g. Totti et al., 2010). The present study allows for a clarification of the potential role of fixative addition, agitation and washing in the efficiency of the separation step in order to go further in the definition of standardized protocols.

Present results showed that the proportion of *Ostreopsis* cells loosely attached to biotic substrates was lower when the benthic cell abundances were high. This suggests that the formation of dense mucilaginous mats, where *Ostreopsis* cells are embedded, makes epiphytic cells harder to detach and to be resuspended. In terms of survey, this also indicates that the more the bloom develops, the more the agitation steps become crucial for the collection of epiphytic *Ostreopsis* cells. Furthermore, according to present results, the addition of fixative (either acidic or non-acidic Lugol's solution) does favor the detachment of *Ostreopsis* cells from their biotic substrates during the agitation steps. In fact, in fixed benthic samples, 97% of *Ostreopsis* cells are detached and collected after the completion of an agitation step and a single washing of the macroalgal substrate, whatever the level of benthic concentration is. This proportion appears satisfactory in terms of collection efficiency. Without addition of Lugol's solution, a second washing of the substrate is mandatory: it provides the collection of still about 15% of the attached cells' pool. In the end, when two successive washing steps are completed, levels of benthic abundances estimated with or without initial addition of Lugol's solution are not significantly different. Thus, these successive agitation steps compensate for the poor detachment efficiency of benthic *Ostreopsis* cells in seawater. When identifying suitable strategies in the frame of alert systems, it is important to limit as much as possible time-consuming tasks. In this case, collected macrophyte samples should be immediately fixed with Lugol's solution and the separation step should include a unique washing of the macrophyte substrate. For ecological studies, researchers can choose to either fix or not fix collected macrophyte samples before the separation step, knowing that similar estimations of benthic abundances of *Ostreopsis* are obtained when macrophyte material is rinsed twice.

4.2. Monitoring of the planktonic cell abundances

During bloom development and maintenance, numerous cells of *Ostreopsis* are commonly observed in the water column, while the main stock of the population is located on the seabed (Vila et al., 2001; Vila et al., 2016; Mangialajo et al., 2017). Part of these planktonic cells are considered as free-living and resuspended. In terms of survey, the presence of *Ostreopsis* cells in the water column provides the opportunity to follow bloom dynamics from the direct sampling of seawater in the water column. This sampling choice can be motivated by the fact that, as observed in present results and reported in other field studies (Vila et al., 2001; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Mangialajo et al., 2011; Asnaghi et al., 2012), planktonic concentrations of *Ostreopsis* cells showed a positive correlation with benthic abundances. Monitoring the planktonic compartment is interesting because it shows some important advantages: (i) the sampling is easy to perform, (ii) is not destructive,

and (iii) allows for a partial integration of the complexity of the spatial distribution of *Ostreopsis* cells (in particular regarding the benthic patchiness). In the frame of alert systems, the planktonic fraction is also thought to be more directly related to the level of risk for human health than the benthic pool. Indeed, acute health disorders that were reported in the presence of *Ostreopsis* blooms mainly came from direct contact with seawater (skin irritations) and/or to toxic marine aerosols (respiratory irritations) (Vila et al., 2016).

Planktonic sampling for the monitoring of BHABs shows some limitations, however. A first one comes from the signal variability as a function of time, commonly higher for planktonic cell abundances than benthic ones. One main factor of this variability is linked with turbulence. Sudden turbulent conditions due to wave action can induce a resuspension of epiphytic *O. cf. ovata* cells (Accoroni and Totti, 2016; Mangialajo et al., 2017). This can lead to abrupt changes in planktonic cell abundances that are not representative of bloom dynamics (Mangialajo et al., 2011; Vila et al., 2008). Furthermore, planktonic concentrations recorded at a fixed depth can also vary due to changes in the vertical distribution of mucilaginous aggregates. In an optimized sampling protocol, diel variations in cell repartition make it necessary to perform a rigorous sampling of *Ostreopsis* cells in the water column at a fixed depth and a fixed time of the day.

The present study highlights other potential issues associated with the precision of planktonic estimations, but also defines ways to avoid them using an appropriate protocol. During the survey of *Ostreopsis* blooms in the Bay of Villefranche-sur-mer (France), all samples from the planktonic fraction were counted using a 50 mL sedimentation chamber. This sampling and counting strategy showed a lower sensitivity than other tested procedures based on the collection of substrates. Such condition can be seen as a limitation for its usefulness in risk assessment of BHAB effects, in particular for early detection of BHAB development and anticipation of the toxic risk (Landsberg et al., 2005). The low sensitivity of planktonic estimations can be improved, however, by settling a higher volume of sample, typically of 100 mL instead of 50 mL. Under low levels of abundance, increasing the sedimentation volume allows for increasing the number of enumerated cells, and so the precision of the measurement.

In order to go further on the definition of an optimized protocol, the efficiency of counting using the Utermöhl method can be characterized by threshold values of abundance. According to present results, when using 50 mL chambers, estimations are only approximate for abundances lower than 200 cells.L⁻¹ but have a maximal accuracy for abundances higher than 3,000 cells.L⁻¹. Thus, under low levels of *Ostreopsis* abundance (< 3,000 cells.L⁻¹), it is advisable to use a high volume of settlement, ideally of 100 mL, in order to optimize precision of estimations thanks to an increase in the number of enumerated cells. When concentrations are higher than the threshold of 3,000 cells.L⁻¹, abundances estimated using the Utermöhl method are significantly underestimated (10%) when using a 100 mL column, instead of a 10 to 50 mL chamber. This underestimation probably comes from an attachment of *Ostreopsis* cells to edges of columns during the sedimentation process, promoted by the cellular production of mucus and aggravated by elevated levels of cell density. High cylinders (≥ 100 mL) are often not recommended in monitoring programs because of the attachment of organisms to the wall of columns and the formation of convection currents, which hinder cell sedimentation (Salmaso et al., 2017). A fixation of samples with formaldehyde might be a way to avoid this issue, but this was not tested here. In present results, addition of Lugol's solution was shown to help detachment of *Ostreopsis* cells from their substrate under agitation, but this effect did not appear efficient enough to avoid attachment of cells during gravity sedimentation. Thus, for moderate to high concentration of *Ostreopsis* cells in the seawater (> 3,000 cells.L⁻¹), optimal estimations of planktonic cell density are obtained settling no more than 50 mL of sample before counting.

In the frame of alert systems, the usefulness of planktonic survey is

limited by the time required for the treatment of samples. Considering this issue, 100 mL column are not adapted to monitoring programs requiring fast feedback as they impose at least two days of settlement. Conversely, the present study points to the interest of using a 10 mL sedimentation column in order to shorten counting procedures: counting only ten or so cells in 10 mL already provide good estimations of planktonic concentrations, when densities can be estimated in a day (from sampling to counting). In the frame of ecological studies, precision of measurements is leading protocol choices, so higher volumes of sedimentation will be preferred.

4.3. Monitoring using the deployment of artificial substrates

As an alternative to the traditional macrophyte-based collection method or seawater sampling, a promising sampling strategy relies on the use of artificial substrates. Artificial substrates can be deployed in the field and allow for a concentration and easy collection of resuspended benthic cells (Tester et al., 2014). Several types of material have already been deployed as artificial substrates in the frame of BHAB monitoring, including test tube brushes and plastic plates (Bomber and Aikman, 1989) or nylon ropes (Faust, 2009). Parsons et al. (2017) recently tested the use of PVC tiles, burlap fabric and fiberglass window screens for the monitoring of the benthic toxic dinoflagellate *Gambierdiscus* in the Florida Keys. In this last study, correlations reported between cell abundances collected on artificial substrates versus specific macrophyte species were weak, but similar to relationships obtained when comparing cell densities among different macrophyte hosts. Furthermore, during this survey, artificial substrates were retrieved one month after their deployment in the field; this long duration might have increased the variability of cell density of epiphytic populations. Indeed, recruitment and colonization of artificial substrates by benthic microalgal cells are direct consequences of immigration, disturbance and emigration of cells from the surrounding seawater on a short timescale (hours or days). Over weeks or months, other biological factors are also influencing the epiphytic microalgal community, including cell division, death or grazing (Dalu et al., 2014 and references herein). Biological interactions, such as allelopathy or competition, may also lead to a divergence of the epiphytic community over time that can make the pool of recruited cells less representative of the surrounding seawater (Tester et al., 2014).

Based on the above, Tester et al. (2014) recently reported a standardized method for the deployment of fiberglass screens for the monitoring of BHABs, based on short-term incubations (less than two days). Some optimizations of this latest methodology were recently described by Jauzein et al. (2016), including the definition of a new set-up and of an optimal mesh porosity of the substrates. In the present study, the efficiency of *Ostreopsis* cell collection using this optimized set-up, based on the deployment of screens, was characterized in more details.

Results from the present study corroborate correlations defined by Tester et al. (2014) between abundances of *Ostreopsis* cells collected on fiberglass screens and levels of benthic abundances. Tester et al. (2014) parameterized a linear regression model in a very low range of cell concentrations; *Ostreopsis* benthic abundances were comprised between 0 and 1,300 cells.g⁻¹ fw. Interestingly, this model fitted well with data of the present study that consisted of moderate to high level of abundances (from 1,100 to 813,000 cells.g⁻¹ fw). This comparison between studies confirms the good sensitivity of the sampling strategy based on the deployment of artificial substrates for the monitoring of *Ostreopsis* blooms. It is also interesting to note that the data set reported by Tester et al. (2014) pooled results from three different sites located in coastal waters of Belize and Malaysia, while the present study compiled results obtained from five different coastal zones of the Mediterranean Sea (Table 1). This shows that the correlation between abundances collected on artificial substrates and on macrophytes is highly robust, whatever the coastal zone is (and the associated physico-chemical

conditions are), whoever the operator is and whatever the level of abundance is.

As discussed above, the sampling method based on the use of artificial substrates appears as well adapted to comparisons between sites and studies. This assumption can be justified by the fact that this methodology shows two main advantages: (i) collected abundances are not dependent on variations in composition and distribution of macrophytes in time and space and (ii) data can be easily standardized per unit of surface area (Tester et al., 2014). Another strength of this methodology relies on the time of incubation in the field that allows for an integrated estimation of the level of abundance in the surrounding seawater. Such integration combines a spatial dimension, that reduces the impact of the patchy benthic distribution, and a temporal dimension that can take into account diel migration of cells in the water column. In the end, cells collected on artificial substrates after few hours of deployment may provide a better representation of the BHAB population in a defined station than snapshots based on the sampling of few grams of macroalgae or few hundreds of mL of seawater.

Concerning potential disadvantages, main constraints linked with the use of artificial substrates are due to time-consuming tasks. Several hours of incubation are necessary for the recruitment of resuspended benthic cells. In the frame of alert system, this limits the possibility of making quick estimations of abundances of BHABs that can be useful when the toxic risk is high. The incubation duration also requires a double visit to the sampling site, once to deploy the substrates and again to retrieve them (Tester et al., 2014).

The recent set-up defined by Jauzein et al. (2016) for the deployment of fiberglass screens in the field helps for limiting these disadvantages. In the first standardized protocol reported by Tester et al. (2014), pieces of fiberglass screens are attached to a rope and suspended freely in the water during the incubation. With this set-up, an accumulation of *Ostreopsis* cells on screens was observed during the first 24 h, then densities of collected cells reached a plateau (Tester et al., 2014). Such a plateau, corresponding to an equilibrium between immigration and emigration rates, was also reached after 24 h when screens were held tight on both sides and maintained perpendicular to the water flow according to Jauzein et al. (2016). Both protocols lead to significant differences in cell recruitment rate, however, when considering time-scales lower than 24 h. In the study of Tester et al. (2014), only 5% of the maximal abundance were collected after 12 h of incubation. Present results show that this proportion reached 80% over 12 h, and more than 60% over 8 h, when using the modified set-up. With such an improved collection efficiency, artificial substrates can be considered an interesting tool not only for the monitoring of BHABs, but also for alert systems as they provide good estimations of population abundances in less than a day. On a broader point of view, the definition of the most suitable strategies for the monitoring and mitigation of BHABs would benefit from a comparison of this sampling strategy (based on the deployment of artificial substrates) with other recently defined methodologies, such as the use of a Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI) (Mangialajo et al., 2017).

5. Conclusion

Toxic blooms of *Ostreopsis* are challenging to monitor due to the complexity and variability of cell repartition among benthic and pelagic compartments. The present study makes a detailed comparison between methods currently employed for the survey of BHABs. It contributes to the identification of the most suitable strategies for the monitoring and alert setting for *Ostreopsis* blooms in coastal waters. For the treatment of macroalgal samples, an optimization of the separation step, allowing for the isolation of epiphytic cells, was defined: an early addition of Lugol increases the efficiency of *Ostreopsis* cell detachment and no more than two washings of the substrate are recommended. Planktonic surveys may be an interesting option for a quick estimation of the toxic risk but are not well adapted to monitoring purposes. The influence of the

sedimentation volume used for concentrating water samples was characterized as a function of *Ostreopsis* cell abundance. Finally, the deployment of artificial substrates appears as a very promising sampling strategy for the monitoring of *Ostreopsis* blooms, in the frame of both ecological surveys and mitigation of BHABs. The strength of this new methodology is based on two main advantages: (i) an independence from the macroalgal substrate helping for comparison of data sets between sites and studies and (ii) an integration of the spatial and temporal variations of the *Ostreopsis* cell distribution during blooms. Such characterization of methods is a prerequisite for reaching a consensus regarding the definition of common protocols for the monitoring and mitigation of BHABs.

Acknowledgements

This work was supported by the European Union under the ENPI CBC Mediterranean Sea Basin Programme, within the project M3-HABs. Authors wish to thank Julie Rostan and Cédric Darbon and Anna Maria Rossi for their help in field work and counting. French authors are part of the national French GDR PHYCOTOX (CNRS and Ifremer).

References

- Accoroni, S., Totti, C., 2016. The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: a review. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 7 (1), 1–15.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717–730.
- Asnaghi, V., Bertolotto, R., Giussani, V., Mangialajo, L., Hewitt, J., Thrush, S., Moretto, P., Castellano, M., Rossi, A., Povero, P., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., 2012. Interannual variability in *Ostreopsis ovata* bloom dynamic along Genoa coast (North-western Mediterranean): a preliminary modeling approach. *Cryptogamie, Algologie* 33 (2), 181–189.
- Bomber, J.W., Aikman, K.E., 1989. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanogr.* 6, 291–311.
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lemée, R., Chomérat, N., Hess, P., Amzil, Z., 2014. Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins purification. *Mar. Drugs* 12, 2851–2876.
- Carnicer, O., Guallar, C., Andree, K.B., Diogène, J., Fernández-Tejedor, M., 2015. *Ostreopsis cf. ovata* dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors. *Environ. Res.* 143, 89–99.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C., et al., 2014. First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3532–3540.
- Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.-P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.-M., Lemée, R., 2011. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2681–2691.
- Dalu, T., Froneman, P.W., Chari, L.D., Richoux, N.B., 2014. Colonisation and community structure of benthic diatoms on artificial substrates following a major flood event: a case of the Kowie River (Eastern Cape, South Africa). *Water SA* 40 (3), 471–479.
- Del Favero, G., Sosa, S., Pelin, M., D'Orlando, E., Florio, C., Lorenzon, P., Poli, M., Tubaro, A., 2012. Sanitary problems related to the presence of *Ostreopsis* spp. in the Mediterranean Sea: a multidisciplinary scientific approach. *Ann. Ist. Super. Sanità* 48 (4), 407–414.
- Faust, M.A., 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *J. Phycol.* 31, 996–1003.
- Faust, M.A., Gulledge, R.A., 1996. Associations of microalgae and meiofauna in floating detritus at a mangrove island, Twin Cays, Belize. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197, 159–175.
- Faust, M.A., 2009. Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef-mangrove ecosystem. *Belize. Atoll Res. Bull.* 569, 1–30.
- Fernández-Méndez, A., Wenzhöfer, F., Peeken, I., Sørensen, H.L., Glud, R.N., Boetius, A., 2014. Composition, buoyancy regulation and fate of ice algal aggregates in the Central Arctic Ocean. *PLoS One* 9 (9), e107452.
- García-Altare, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Carnicer, O., de la Iglesia, P., Forino, M., Diogène, J., Ciminiello, P., 2015. The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis cf. ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MSn. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1191–1204.
- GEOHAB, 2012. Core research project: HABs in benthic systems. In: Berdalet, E., Tester, P., Zingone, A. (Eds.), *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark, pp. 64.
- Giussani, V., Asnaghi, V., Pedroncini, A., Chiantore, M., 2017. Management of harmful benthic dinoflagellates requires targeted sampling methods and alarm thresholds. *Harmful Algae* 68, 97–104.
- Gorbi, S., Avio, G.C., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Graziosi, T., Regoli, F., 2013. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis*

- cf. *ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. Fish Shellfish Immunol. 35, 941–950.
- Guidi-Guilvard, L.D., Gasparini, S., Lemée, R., 2012. The negative impact of *Ostreopsis cf. ovata* on phytal meiofauna from the coastal NW Mediterranean. Cryptogamie Algologie 33 (2), 121–128.
- Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. PLoS One 8, e57291.
- Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis cf. ovata* using artificial substrates: optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. Mar. Pollut. Bull. 107, 300–304.
- Landsberg, J., Dolah, F.V., Doucette, G., 2005. Marine and estuarine harmful algal blooms: Impacts on human and animal health. In: Belkin and Colwell (Ed.), Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. Springer, New York, pp. 165–215.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemée, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. Mar. Pollut. Bull. 56, 1209–1214.
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., René, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. Toxicon 57 (3), 408–420.
- Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemée, R., 2017. Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): a new method for the quantification of benthic harmful algal blooms. Harmful Algae 64, 1–10.
- Okolodkov, Y.B., Campos-Bautista, G., Gárate-Lizárraga, I., González-González, J.A.G., Hoppenrath, M., Arenas, V., 2007. Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. Aquat. Microb. Ecol. 47 (3), 223–237.
- Pagliara, P., Caroppo, C., 2012. Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). Toxicon 60, 1203–1214.
- Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. Harmful Algae 6, 658–669.
- Parsons, M.L., Aligizaki, K., Dechraoui Bottein, M.Y., Fraga, S., Morton, S.L., Penna, A., Rhodes, L., 2012. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. Harmful Algae 14, 107–129.
- Parsons, M.L., Brandt, A.L., Ellsworth, A., Leynse, A.K., Rains, L.K., Anderson, D.M., 2017. Assessing the use of artificial substrates to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys. Harmful Algae 68, 52–66.
- Reynolds, C.S., 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. Hydrobiologia 578, 37–45.
- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V., 2010. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Toxicon 56 (8), 1381–1387.
- Salmaso, N., Bernard, C., Humbert, J.-F., Akçaalan, R., Albay, M., Ballot, A., Catherine, A., Fastner, J., Häggqvist, K., Horecká, M., Izidorczyk, K., Köker, L., Komárek, J., Maloufi, S., Mankiewicz-Bocezek, J., Metcalf, J.S., Quesada, A., Quiblier, C., Yéprémian, C., 2017. Basic guide to detection and monitoring of potentially toxic cyanobacteria. In: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, A. (Eds.), Chap. 6, Part III. Sampling, Monitoring and Risk Management. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis Wiley, pp. 46–69.
- Scalco, E., Brunet, C., Marino, F., Rossi, R., Soprano, V., Zingone, A., Montresor, M., 2012. Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. Harmful Algae 17, 25–34.
- Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyskhvartsev, D.I., Orlova, T.Yu., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. Harmful Algae 32, 1–10.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*: an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. Harmful Algae 8, 916–925.
- Tester, P.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Usup, G., Vandersea, M.W., Leav, C.P., Teen, L.P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M.A., Litaker, R.W., 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: comparison of artificial and natural substrate methods. Harmful Algae 39, 8–25.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosseil, H., Lemée, R., Kantin, R., Lasalle, J.-L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., De Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. Clin. Toxicol. 48, 839–844.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. Harmful Algae 9, 233–239.
- Uchida, H., Taira, Y., Yasumoto, T., 2013. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 27, 1999–2008.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9, 1–38.
- Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Asnaghi, V., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lemée, R., Hachani, M.A., Souad, Turki, S., Açaf, L., Abboud-Abi, Saab M., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. Ecol. Indic. 85, 1092–1100.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellates assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. Aquat. Microb. Ecol. 26 (1), 51–60.
- Vila, M., Masó, M., Sampedro, N., 2008. The genus *Ostreopsis* in recreational waters of the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): is this the origin of human respiratory difficulties? In: Moestrup, Ø. (Ed.), Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4–8 September 2006. ISSHA and IOC of UNESCO, pp. 334–336.
- Vila, M., Abós-Herrándiz, R., Isern-Fontanet, J., Álvarez, J., Berdalet, E., 2016. Establishing the link between *Ostreopsis cf. ovata* blooms and human health impacts using ecology and epidemiology. Sci. Mar. 80, 107–115.
- Weisstein, E.W., 2013. Steinmetz Solid. From MathWorld—A Wolfram Web Resource, <http://mathworld.wolfram.com/SteinmetzSolid.html> (accessed 03.03.2014).
- World Health Organization, 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: coastal and fresh waters. Chapter 8: Algae and cyanobacteria in fresh water. World Health Organization, Geneva, Switzerland. pp. 136–158.

Chapitre 3

Suivi saisonnier des microalgues épiphytes du golfe de Tunis

Chapitre 3. Suivi saisonnier des microalgues épiphytes du golfe de Tunis

Ce chapitre expose une première investigation des eaux côtières du golfe de Tunis par une étude de la distribution saisonnière des microalgues épiphytes et dans la colonne d'eau. Un échantillonnage saisonnier à trois profondeurs (0,5 ; 1 et 3 m) allant du mois d'octobre 2013 jusqu'au mois d'octobre 2014 a été effectué au niveau de 06 stations du golfe de Tunis : Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR), Korbous (K), Salammbô (S), Gammarth (G) et Sidi Ali el Mekki (SM). Ces stations ont été préalablement choisies selon les critères suivants (i) le type de substrat, (ii) l'exposition et (iii) la couverture végétale. Les interactions entre le développement des microalgues épiphytes et plusieurs paramètres environnementaux : Physico-chimiques (température de l'eau, salinité, oxygène dissous et pH), les teneurs en nutriments (NT, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PT, PO_4^{3-} et Si(OH)_4) et Météorologiques (température de l'air, vitesse des vents et pluviométrie) ont été analysées.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la journal *Harmful Algae* (Hachani *et al.*, 2018) sous la forme :

Hachani, M.A., Dhib, A., Fathalli, A., Ziadi, B., Turki, S., Aleya, L., 2018. **Harmful epiphytic dinoflagellate assemblages on macrophytes in the Gulf of Tunis**. *Harmful Algae* 77, 29–42.

Chapitre 3. Suivi saisonnier des microalgues épiphytes du golfe de Tunis

1 Distribution saisonnière des microalgues épiphytes et dans la colonne d'eau du golfe de Tunis

1.1 Les conditions environnementales des eaux littorales du golfe de Tunis

La température de l'eau varie significativement entre les saisons (ANOVA, $F = 173,8$, $p < 0,001$) et les stations d'échantillonnage (ANOVA, $F = 4,49$, $p < 0,001$). Les valeurs de la température de l'eau les plus élevées ont été enregistrées en été dans les stations Gammarth (G) et Salammbô (S), et sont de l'ordre de $28,3^{\circ}\text{C}$ et $29,6^{\circ}\text{C}$ respectivement. La salinité, est marquée par des pics de l'ordre de (37,7 à 37,8) qui ont été enregistrés au printemps et en été. La salinité a été caractérisée par des tendances similaires parmi les stations de prélèvement, avec des variations toutefois significatives selon les saisons (ANOVA, $F = 43,1$; $p < 0,001$) (Tableau 7). De même, le pH a varié significativement selon les saisons (ANOVA, $F = 215,7$; $p < 0,001$) mais pas entre les stations. Les valeurs maximales ont été enregistrées en été et ont atteint 9,34 (Tableau 7). Des différences significatives de la teneur en oxygène dissous ont été enregistrées en fonction des saisons (ANOVA, $F = 22,59$; $p < 0,001$), avec des variations marquées entre les stations (ANOVA, $F = 7,38$; $p < 0,001$). Les valeurs les plus élevées ont été relevées au printemps et en automne, en particulier dans les stations Sidi Daoud (SD) et Sidi Rais (SR) ($12,2$ et $21,9 \text{ mg L}^{-1}$) (Tableau 7).

Les nitrates, l'ammonium, les silicates et l'azote total ont varié significativement selon les saisons (ANOVA, $p < 0,001$ pour chaque nutriment), mais pas entre les stations d'échantillonnage (ANOVA, $p > 0,05$ pour chaque nutriment). Les valeurs les plus élevées des teneurs en nitrates et en ammonium ont été enregistrées en automne et en hiver, tandis que des concentrations maximales en silicates ont été signalées en été. Les valeurs les plus élevées en azote total se sont manifestées en automne et au printemps (Tableau 7). Les teneurs en nitrites, orthophosphates et phosphore total ont été marquées par des différences significatives, selon la saison et la station de prélèvement (ANOVA, $p < 0,001$ pour chaque

élément nutritif) (Tableau 7). Les teneurs en phosphore total et en orthophosphates ont été enregistrées en particulier à la station Salammbô (S) au printemps (4,04 et 0,32 μM , respectivement) et en automne (5,47 et 0,56 μM , respectivement). Les valeurs les plus élevées des teneurs en nitrites ont également été enregistrées en automne et au printemps (0,36 et 0,33 μM , respectivement), dans les stations Gammarth (G) et Sidi Rais (SR). Les paramètres météorologiques (température de l'air, vitesse du vent et pluies) ont beaucoup fluctué avec les saisons (Tableau 7). Les températures maximales ont été de l'ordre de 28°C et ont été enregistrées au printemps et en été. La vitesse du vent a été la plus élevée durant l'automne 2014, et est de l'ordre de 4,6 m s^{-1} . La saison humide correspondant à l'hiver a été marquée par des quantités maximales de pluie de l'ordre de 2 mm.

Résultats et discussions

Tableau 7 : Paramètres météorologiques et variables abiotiques enregistrés pour chaque saison dans le golfe de Tunis. (www.wunderground.com et www.worldweatheronline.com).

Saisons	Automne 2013			Hiver 2014			Printemps 2014			Eté 2014			Automne 2014		
	min	max	moyenne	Min	max	moyenne	Min	max	moyenne	min	Max	moyenne	min	max	moyenne
Paramètres Météorologiques															
Température de l'air (°C)	24,00	29,00	25,30	12,00	16,00	14,00	20,00	28,00	23,00	26,00	28,00	26,60	26,00	27,00	26,20
Vitesse du Vent (m s ⁻¹)	1,34	2,10	1,60	1,50	3,10	2,60	2,10	4,60	3,00	3,60	4,10	4,10	1,94	5,10	4,30
Pluviométrie (mm)	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Variables physico-chimiques															
Température de l'eau (°C)	14,90	26,00	21,40	14,20	19,50	16,00	24,10	26,30	25,20	25,00	29,60	26,70	19,80	24,20	22,60
Salinité	35,00	37,00	36,00	34,70	35,70	35,20	37,50	37,80	37,70	37,30	37,70	37,50	35,00	37,00	35,90
pH	8,32	8,56	8,47	8,43	8,72	8,60	8,15	8,65	8,30	8,80	9,34	9,05	8,06	8,32	8,20
Oxygène (mg L ⁻¹)	4,50	21,90	15,23	5,64	7,90	6,98	8,30	12,20	10,50	5,30	10,40	6,28	8,20	10,80	9,03
Nutriments (µM)															
NO ₂ ⁻	0,03	0,36	0,18	0,01	0,18	0,11	0,10	0,33	0,20	0,05	0,08	0,06	0,08	0,27	0,14
NO ₃ ⁻	0,73	3,77	1,57	1,32	3,32	1,95	0,99	1,56	1,19	0,59	1,30	0,93	2,76	4,21	3,30
NH ₄ ⁺	2,25	4,23	3,07	2,13	5,38	3,29	0,63	1,10	0,85	0,88	2,04	1,37	0,77	3,51	1,59
PO ₄ ³⁻	0,12	0,56	0,28	0,09	0,16	0,12	0,14	0,32	0,23	0,04	0,22	0,12	0,07	0,26	0,14
Si (OH) ₄	4,27	5,74	5,10	1,36	3,24	2,68	2,62	4,04	3,09	3,12	13,89	8,82	3,57	10,81	6,65
NT	9,84	12,67	10,69	10,24	13,12	11,55	13,98	20,02	17,60	9,74	12,19	11,22	11,32	14,32	12,58
PT	3,16	5,47	3,94	2,07	3,62	2,68	2,62	4,04	3,09	0,86	1,46	1,17	1,98	3,88	2,95
DIN	3,13	7,99	4,81	4,10	6,95	5,34	1,78	3,54	2,23	1,53	2,88	2,37	3,76	6,93	5,03
DIN/DIP	8,64	64,29	21,92	30,40	90,11	46,65	6,92	19,07	10,92	12,20	67,40	26,88	24,21	64,68	40,65

1.2 Le phytoplancton des eaux côtières du golfe de Tunis

Dans la colonne d'eau, 71 espèces de microalgues ont été recensées (Tableau 12), et sont principalement représentées par les Dinoflagellés (50,70 % de l'abondance totale), suivies des Diatomées (39,43 % de l'abondance totale) et des Cyanobactéries (9,85 % de l'abondance totale). Certaines de ces espèces sont connues pour être épiphytes, comme *Ostreopsis* sp., *P. lima* et *C. monotis* qui ont été retrouvées dans la colonne d'eau, à l'échelle de toutes les stations sur toute la période d'étude. Les cellules d'*Ostreopsis* sp. ont été dominantes avec un pic qui a atteint en été $2,3 \times 10^4$ cell. dm^{-3} à 0,5 m de profondeur dans la station de Sidi Rais (SR). Des corrélations significatives ont été trouvées entre les cellules épiphytes et planctoniques d'*Ostreopsis* sp. ($n = 161$; $r = 0,54$; $p = 0$), *P. lima* ($n = 161$; $r = 0,41$; $p = 0$) et *C. monotis* ($n = 161$; $r = 0,29$; $p = 0$) (Figure 38). La faible vitesse du vent et la température de l'air élevée ont eu un impact positif sur les abondances d'*Ostreopsis* sp., de *P. lima* et de *C. monotis* dans la colonne d'eau. En revanche, des corrélations négatives ont été relevées en fonction des précipitations (Tableau 8).

Résultats et discussions

Tableau 8 : Concentrations moyennes (cell. dm⁻³) des espèces de microalgues dominantes dans la colonne d'eau (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014). (*) Taxons strictement benthiques.

Espèces de phytoplancton	SD	SR	K	SM	G	S	Automne 2013	Hiver 2014	Printemps 2014	Été 2014	Automne 2014
Dinophyceae											
<i>Alexandrium catenella</i> (Whedon and Kofoid) Balech. 1985	53±46	66.7±23.1	496±103	0	120±19.5	461.3±31.6	0	454.8±155.5	70±20	60±84.9	0
<i>Coolia monotis</i> * Meunier. 1919	60±28.3	266.7±56.6	120±69.3	240±56.6	350±56.57	280±84.9	0	0	20±28	244.7±28.3	0
<i>Prorocentrum lima</i> * Dodge. 1975	180±28.3	982.2±140.5	173.3±23.1	88±28.3	62.86±17.89	80±28.3	70.3±23.1	0	52±15.1	417.1±29.8	200±28
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg. 1833	160±69.3	26.7±23.1	30±20	33.3±16.3	0	70±60	90.9±20	34.3±15.1	55±14.1	20±28.1	20±28.3
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller. 1918	173.3±92.4	291.4±56.6	314.3±20	20±28	80±56.57	1.51×10 ⁴ ±141.4	0	1.25×10 ⁴ ±140	106±19.6	0	55±20.7
<i>Ostreopsis</i> sp.*	260±28.3	7531.8±1242.1	720±160	3153.7±84.9	898.46±140.48	1740±220	75±23.1	33.3±16.3	33.3±16.3	3359.7±1579.3	84±18.5
<i>Scrippsiella</i> sp.	317.6±38	612±21.4	112.7±33.3	51.8±14.1	110±20.1	191.1±40.8	53.3±23	133.9±50.1	211.8±42.5	1340±282.8	126.7±21.4
Bacillariophyceae											
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve. 1873	0	125.7±17.9	60±23	0	324±20.9	55±21.3	0	200±20.7	50±23.1	0	0
<i>Cylindrotheca closterium</i> Reimann and Lewin. 1964	26.7±23.1	102.9±53.7	20±28.3	2.4±9.6	2.1±9.1	20±8.4	84±52	40±17.9	20.7±28	0	26.7±23.1
<i>Licmophora gracilis</i> * (Ehrenberg) Grunow. 1867	208±65.7	104±61.1	30±20	40±28.3	40±57.6	20±28.3	61.2±20	90±28.3	0	40±56.6	20±28.3
<i>Navicula</i> sp.	32±17.9	1535.7±61.1	26.7±23.1	50±23.1	60±28.28	60±40	47.3±28.3	30±28	0	866.7±23.1	20±28.3
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grunow) Mereschkowsky. 1902	120±20.7	50±20	26.7±23	1.2±6.9	0	60±13.4	51.4±19.5	53.3±23.1	26.7±23.1	136±23	0
Cyanobacteria											
<i>Oscillatoria</i> sp.	193.8±23	83.3±21	130±23	4.7±13.1	32.6±12.1	40±21.9	72.5±18.1	84±20.5	32±12.8	440±214.2	88±15.1

1.3 Occurrence des espèces de microalgues épiphytes du golfe de Tunis

Dans la présente étude 16 espèces végétales marines ont été recensées. Elles sont principalement composées de Rhodophycées avec 44 %, les Phéophycées avec 31 %, et les Chlorophycées et les Magnoliophytes avec 13 % (Tableau 10). Sur les macrophytes collectées le long du golfe de Tunis, 20 espèces de microalgues ont été observées, principalement des Dinoflagellés (60 % de l'abondance totale), suivies des Diatomées (30 % de l'abondance totale) et des Cyanobactéries (10 % de l'abondance totale) (Tableau 12). Parmi les Dinoflagellés, 3 espèces connues pour être potentiellement toxiques ont été récurrentes dans toutes les stations de prélèvement et en toutes saisons. *Ostreopsis* sp. a été d'abord détectée en octobre 2013 dans la station Sidi Daoud (SD) à une profondeur de 0,5 m, avec une faible abondance (28,75 cell. g⁻¹ MF), alors que son pic d'abondance (1,03 × 10⁴ cell. g⁻¹ MF) a été enregistré en août 2014 à Sidi Ali Mekki (SM). L'espèce *Prorocentrum lima* a été marquée par une abondance maximale de l'ordre de 1,3×10⁴ cell. g⁻¹ MF dans la station (SM) en août 2014. Concernant la 3^{ème} espèce de Dinoflagellé à savoir *Coolia monotis*, l'abondance maximale a été enregistrée à la station Korbous (K) en octobre 2014 (865 cell. g⁻¹ MF) (Tableau 9 ; Figure 38).

Par contre, aucune corrélation significative n'a été observée entre la distribution des Dinoflagellés épiphytes (*O. sp.*, *P. lima* et *C. monotis*) et la nature du substrat macrophytes (ANOVA, $p > 0,05$) (Figure 36). En effet, les abondances maximales d'*Ostreopsis* sp., de *P. lima* et de *C. monotis* ont été enregistrées aussi bien chez les macroalgues que chez les phanérogames. Les proliférations du Dinoflagellé *Ostreopsis* sp. ont été enregistrées au niveau des feuilles de *Cymodocea nodosa* et de *Padina pavonica* (algue brune). Pour *P. lima*, des concentrations maximales ont été relevées au niveau des feuilles de *Cymodocea nodosa* et de *Dictyota dichotoma* (algue brune). Les plus fortes abondances de *C. monotis* ont été observées au niveau des feuilles de *Cymodocea nodosa* et de *Jania rubens* (algue rouge) (Figure 37).

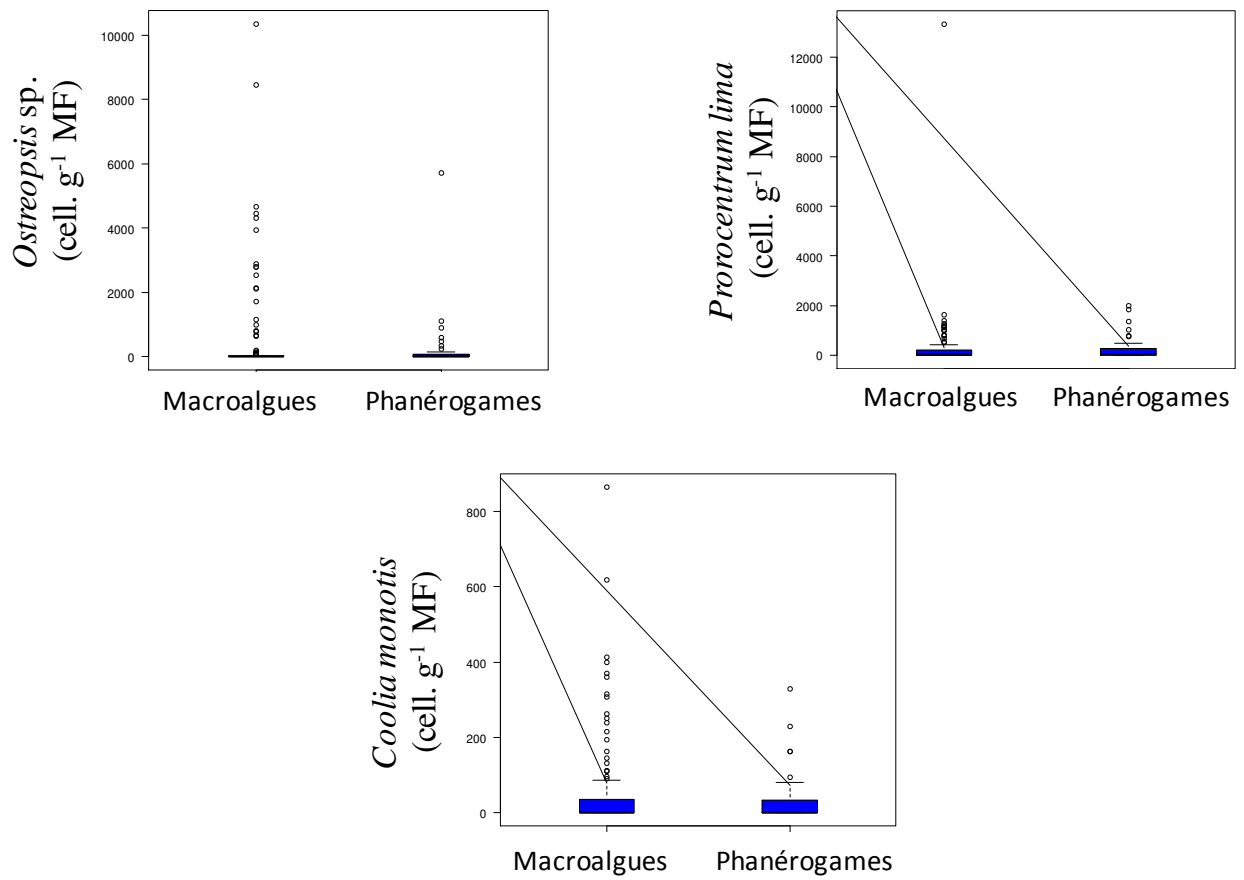


Figure 36 : Variation de l'abondance des Dinoflagellés épiphytes (*Ostreopsis sp.*, *P. lima* et *C. monotis*) en fonction de la nature du substrat (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).

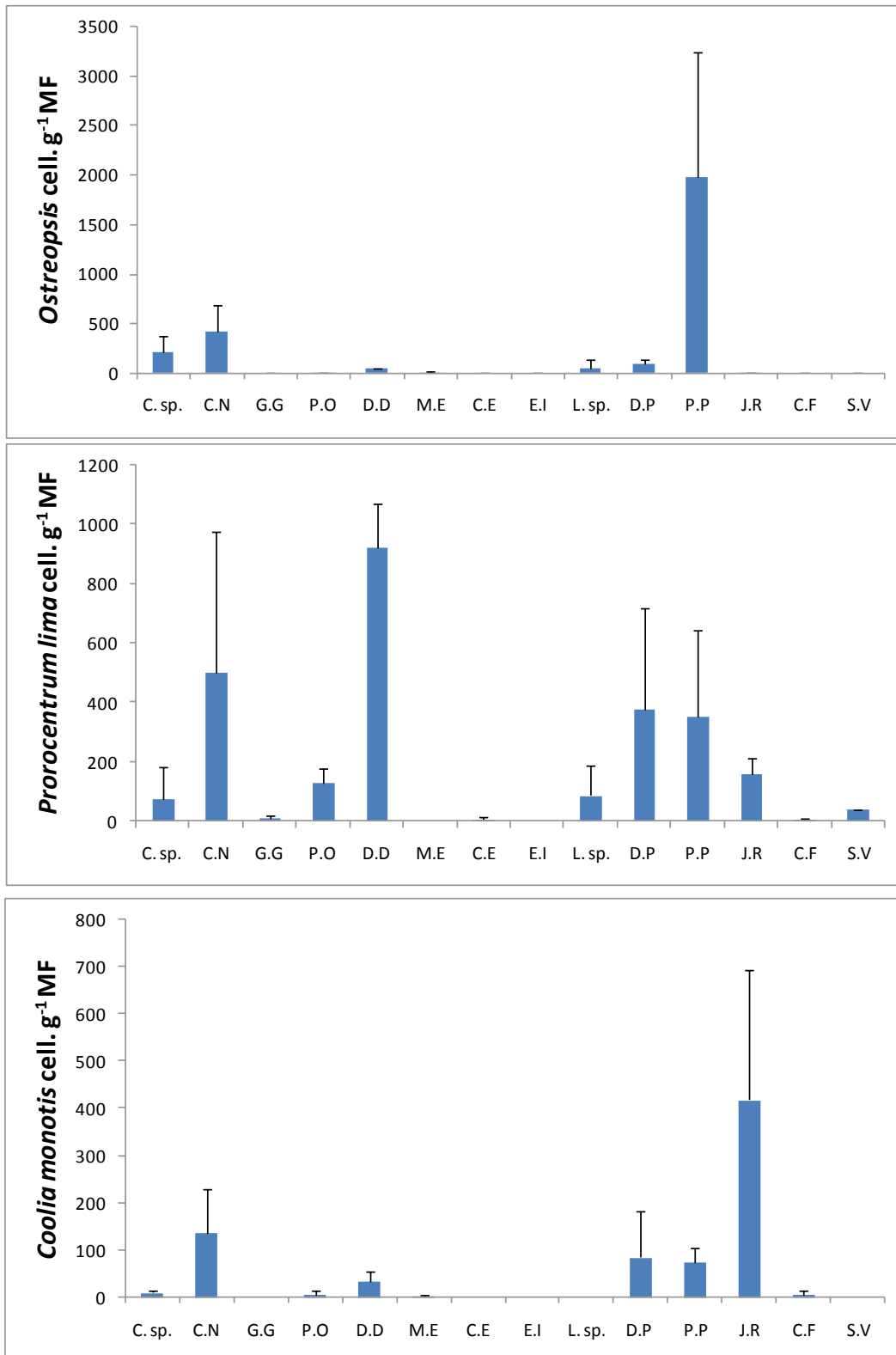


Figure 37 : Variation de l'abondance d'*Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* et *Coolia monotis* en fonction des espèces de macrophytes. Macrophytes : *Cystoseria* sp. (C. sp), *Cymodocea nodosa* (C.N), *Gracilaria gracilis* (G.G), *Posidonia oceanica* (P.O), *Dictyota dichotoma* (D.D), *Mesophyllum expansum* (M.E), *Corallina elongata* (C.E), *Enteromorpha intestinalis* (E.I), *Laurencia* sp. (L. sp), *Dictyopteris polypodioides* (D.P), *Padina pavonica* (P.P), *Jania rubens* (J.R), *Codium fragile* (C.F), *Sargassum vulgare* (S.V). (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).

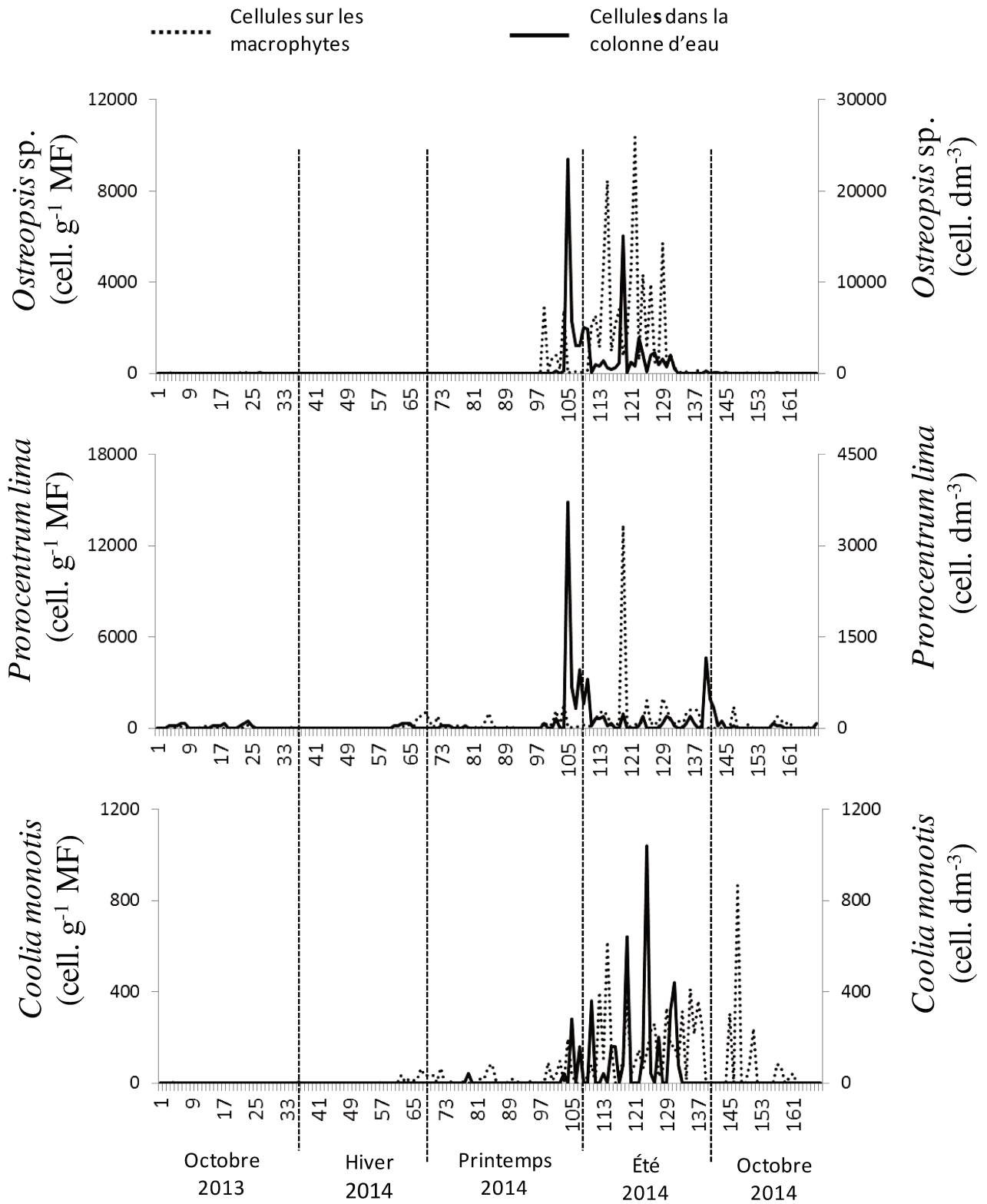


Figure 38 : Tendence temporelle de l'abondance d'*Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* et *Coolia monotis* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).

Tableau 9 : Concentrations moyennes (cell. g⁻¹ MF) des principales espèces de microalgues épiphytes sur les macrophytes (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014). (*) Taxons strictement planctoniques.

Espèces épiphytes	SD	SR	K	SM	G	S	Automne 2013	Hiver 2014	Printemps 2014	été 2014	Automne 2014
Dinophyceae											
<i>Coolia monotis</i> Meunier. 1919	310.7±79.9	50.7±5	547.6±174.2	165.4±66.7	154.32±11.55	218.1±117.1	3.2±0.6	3.1±0.8	38.2±7.4	231.8±35.5	90.9±38.2
<i>Prorocentrum lima</i> Dodge. 1975	1107±259.8	177.3±45.7	849.6±183.2	1611.5±50.7	583.05±167.54	446.9±52.8	127.7±24.7	14.6±2.7	435.4±41.8	1458.1±66.2	264.4±100.1
<i>Ostreopsis</i> sp.	2834.9±70	127.7±18.5	3313±299.8	3703.9±464.2	1840±274.45	3300.6±67.4	26.1±24.9	10.2±5	4.5±2.3	4290.2±970.4	82.1±11.9
Bacillariophyceae											
<i>Licmophora gracilis</i> (Ehrenberg) Grunow. 1867	398.7±131.6	4169±370	8.3×103±737.9	1758.5±219.2	219.43±89.56	845.7±13.4	0	247.4±11.4	69.4±3.3	656.5±13.7	3.17×104±195.5
<i>Navicula</i> sp.*	5672.3±301.8	5018.4±1009.8	9247.8±1244	5194.2±654.9	1942.60±805.26	4651.5±2166.5	23.4±7.6	201.4±7.7	110.4±14.5	1079.8±57.9	7778.9±451
<i>Striatella unipunctata</i> Agardh. 1832	281.2±46.7	1421.1±244.1	656±64.7	753.2±48	20.26±2.22	5.1±1.4	86.4±16.4	18.2±1.8	7.1±1.8	725.9±104.9	556.1±69.5
Cyanobacteria											
<i>Oscillatoria</i> sp.*	2827.2±679.5	4478.8±789.8	1.15×104±1673.7	2694.1±764.9	1604.0±59.8	3293.2±936.4	37.9±7.8	1004.5±16.9	221.6±62.8	0	7564.2±756.9

Tableau 10 : Inventaire des macrophytes. (r) Thalles ramifiés, (nr) Thalles non ramifiés, (f) Feuilles X: présence dans la station (SD) Sid Daoud, (SR) Sidi Rais, (K) Korbous, (SM) Sid Ali el Mekki, (G) Gamarth, (S) Salammbô (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).

Macrophytes	Types de Thalles	SD	SR	K	SM	G	S
Macroalgae							
Chlorophyta							
<i>Enteromorpha intestinalis</i> Linnaeus	nr						X
<i>Codium fragile</i> (Suringar) Hariot	r					X	
Rhodophyta							
<i>Gracilaria gracilis</i> (Stackhouse) M. Steentoft. L.M. Irvine et W.F. Farnham	r	X					X
<i>Gelidium</i> sp.	r						X
<i>Corallina elongata</i> J.Ellis & Solander							X
<i>Corallina officinalis</i> Linnaeus / R.H.Walker. J.Brodiev et L.M.Irvine	r				X		
<i>Laurencia</i> sp.		X				X	
<i>Mesophyllum expansum</i> (Philippi) Cabioch et M.L. Mendoza	r	X	X				
<i>Jania rubens</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	r			X	X		
Phaeophyceae							
<i>Cystoseria</i> sp.	r	X	X	X	X		X
<i>Dictyopteris polypodioides</i> (A.P. De Candolle) J.V. Lamouroux	nr	X					
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V. Lamouroux	nr	X	X		X	X	X
<i>Padina pavonica</i> (Linnaeus) Thivy	nr			X	X		X
<i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh	r					X	X
Magnoliophyta							
<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Asch.	f	X	X			X	X
<i>Posidonia oceanica</i> (Linnaeus) Delile	f	X	X	X		X	

1.4 Interactions entre les conditions du milieu et l'abondance des espèces de Dinoflagellés épiphytes : *P. lima*, *C. monotis* et *Ostreopsis* sp. des eaux côtières du golfe de Tunis

Des corrélations significatives ont été trouvées suite aux analyses réalisées entre les variations des concentrations des Dinoflagellés épiphytes et l'heure du prélèvement (Figures 39). L'échantillonnage réalisé entre 8h30 et 10h30 semble être le plus approprié pour les proliférations d'*Ostreopsis* sp. (ANOVA, $F = 13,13$; $p < 0,001$), *P. lima* (ANOVA, $F = 2,48$; $p = 0,01$) et *C. monotis* (ANOVA, $F = 2,65$; $p = 0,009$).

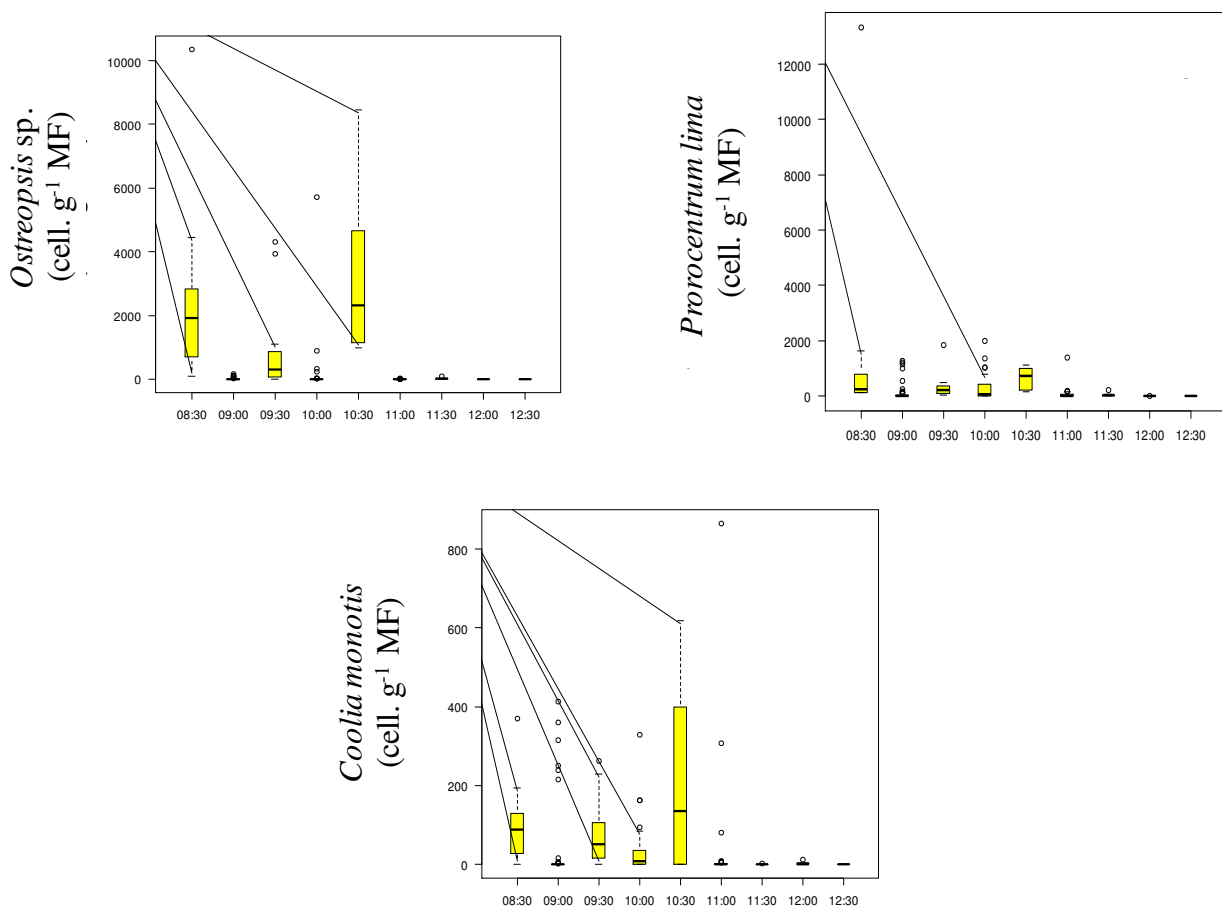


Figure 39 : Variation de l'abondance des Dinoflagellés épiphytes (*O. sp.*, *P. lima* et *C. monotis*) en fonction de l'heure d'échantillonnage (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).

Une différence significative portant sur l'abondance des Dinoflagellés épiphytes a été enregistrée entre les différentes stations de prélèvements (ARD, $F = 4,7$; $p < 0,001$). Cette variabilité spatiale explique 12,69 % des changements chez les Dinoflagellés épiphytes présents, avec seulement l'axe 1 de la ARD suggérant un effet significatif sur la distribution des 3 espèces signalées ($p < 0,05$, Figure 40). Concernant *Ostreopsis* sp., des corrélations positives avec les axes 1 et 2 de la ARD nous ont permis de mettre en évidence une association avec la station de Korbous (K) et celle de Salammbô (S). *Prorocentrum lima* se distingue par un axe 1 de la ARD négatif et semble être davantage liée aux stations Sidi Rais (SR) et Sidi Daoud (SD) alors que *Coolia monotis* a un score ARD négatif, associé principalement aux stations de Sidi Ali el Mekki (SM) et de Gammarth (G) (Figure 40).

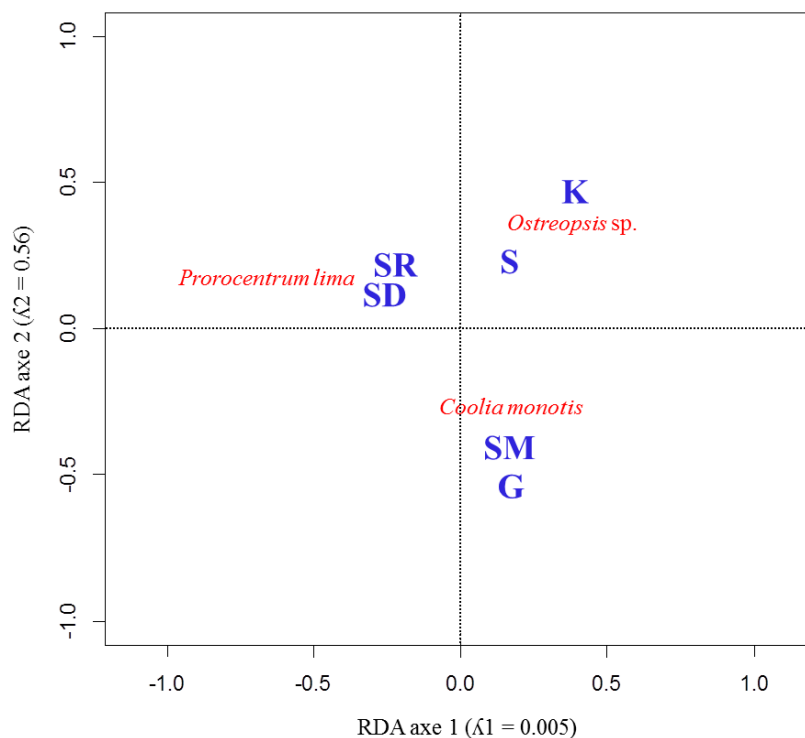


Figure 40 : Association entre les principales espèces de Dinoflagellés épiphytes et les stations de prélèvements. Les valeurs propres des deux premiers axes sont indiquées par λ_1 et λ_2 (golfe de Tunis, octobre 2013 à octobre 2014).

L'abondance des Dinoflagellés épiphytes subit également un changement significatif selon les saisons (ARD, $F = 15,47$; $p = 0,001$). La variabilité temporelle explique 22,06 % des changements sur les abondances des espèces de Dinoflagellés épiphytes, puisque les axes ARD 1 et 2 supportent un effet significatif de cette variabilité ($p < 0,05$, Figure 41). *P. lima* et *C. monotis* semblent se développer pendant la saison printanière. *Ostreopsis* sp. se démarque clairement avec un axe 1 de la ARD positif et semble proliférer pendant la saison estivale. L'hiver et l'automne ont des scores positifs sur l'axe 2 de la ARD, ce qui indique qu'il n'y a pas de corrélation entre l'abondance des espèces de Dinoflagellés épiphytes, enregistrée au cours de ces périodes.

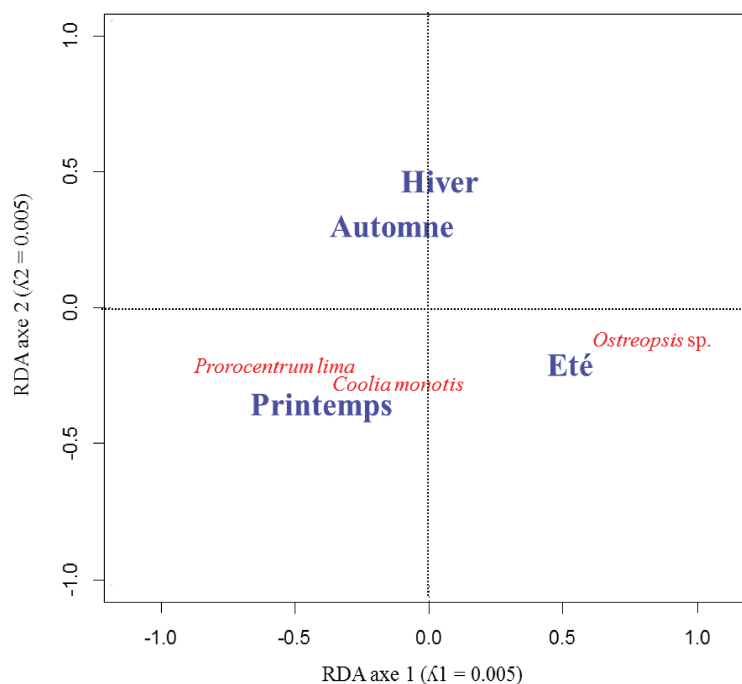


Figure 41 : Tendances des Dinoflagellés épiphytes en fonction des saisons. Les valeurs propres des deux premiers axes sont indiquées par λ_1 et λ_2 (golfe de Tunis octobre 2013 à octobre 2014).

A partir de nos prélèvements des microalgues épiphytes effectués en fonction de la profondeur, une différence significative portant sur l'abondance des Dinoflagellés épiphytes a été relevée en fonction de la profondeur (ARD, $F = 3,59$; $p = 0,004$). Ce facteur explique 4,17 % des changements dans les abondances des Dinoflagellés épiphytes (DE), avec seulement l'axe 1 de la ARD qui supporte un effet significatif ($p < 0,05$, Figure 42, a). Une association a été observée entre l'abondance de *P. lima* et la profondeur de 0,5 m. Les espèces *Ostreopsis* sp. et *C. monotis* ont été collectées aussi bien aux profondeurs 0,5 m que 1 mètre.

Des corrélations significatives ont été trouvées entre les abondances des Dinoflagellés épiphytes et les variables physico-chimiques telles que le pH (ARD, $F = 28,77$; $p < 0,001$), la température de l'eau (ARD, $F = 5,07$; $p = 0,002$), la teneur en oxygène dissous O_2 (ARD, $F = 5,28$; $p = 0,001$), l'azote total NT (ARD, $F = 4,86$; $p = 0,002$) et la teneur en nitrites NO_2^- (ARD, $F = 3,73$; $p = 0,01$). Les variations des facteurs physico-chimiques expliquent 22,76 % des changements portant sur l'abondance des Dinoflagellés épiphytes, l'axe 1 de la ARD ayant un score positif et l'axe 2 de la ARD ayant un score négatif. Par conséquent, les abondances de l'*Ostreopsis* sp. ont été associées à la température de l'eau et au pH. La présence de *P. lima* semble être tributaire de la teneur en oxygène dissous O_2 et aux nitrites NO_2^- . *C. monotis* semble être tributaire des variations des teneurs en azote total NT (Figure 42, b).

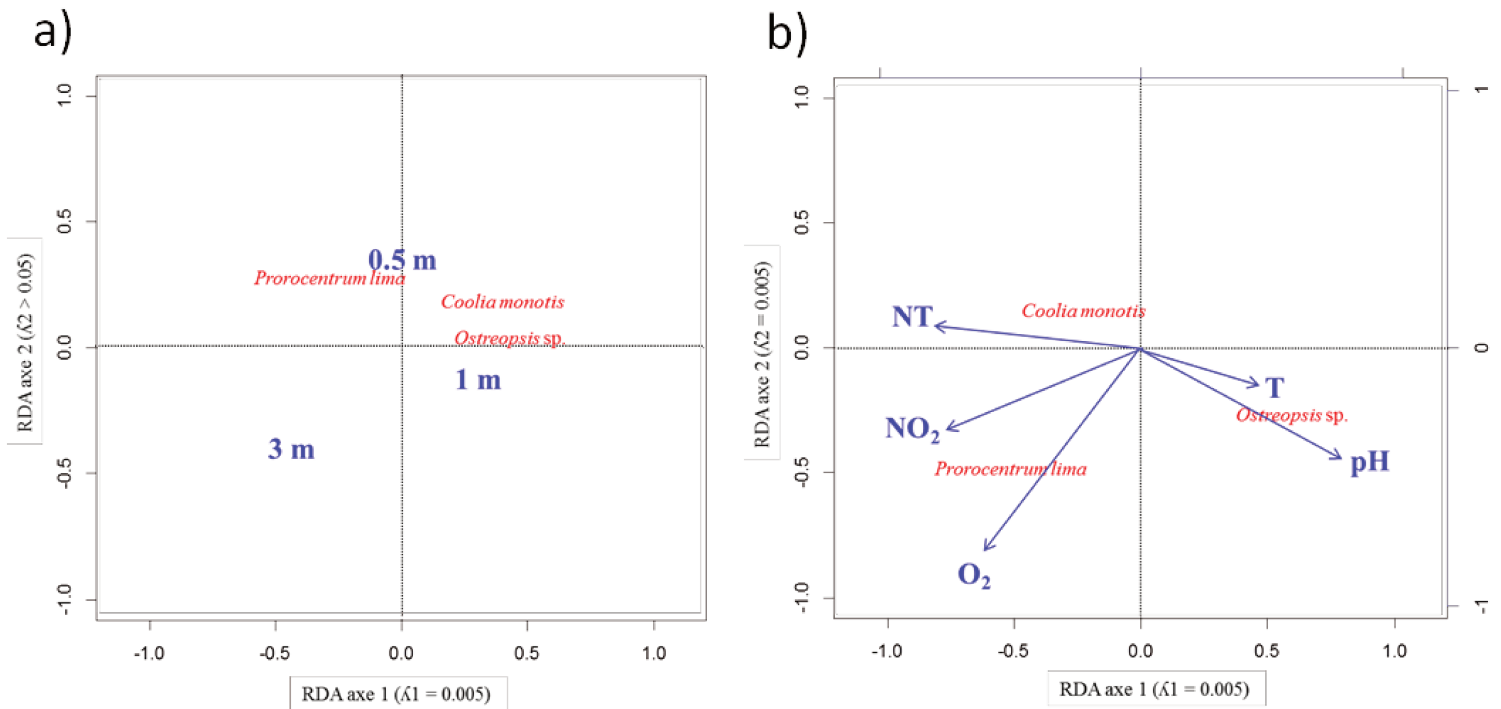


Figure 42 : Interactions entre les facteurs abiotiques et les Dinoflagellés épiphytes (a) La profondeur de la station de prélèvement, (b) Les facteurs physico-chimiques. Les valeurs propres des deux premiers axes sont indiquées par λ_1 et λ_2 (golfe de Tunis octobre 2013 à octobre 2014).

La présence des cellules d'*Ostreopsis* sp., *P. lima* et *C. monotis* sur les macrophytes est significativement liée à la vitesse du vent et à la température de l'air lorsque cette dernière présente des valeurs élevées. En revanche, des corrélations négatives ont été trouvées entre ces espèces et les précipitations (Tableau 11).

Tableau 11 : Corrélations enregistrées entre les paramètres météorologiques et l'abondance des espèces de microalgues (*Ostreopsis* sp., *P. lima* et *C. monotis*) présentes sur les macrophytes et dans la colonne d'eau.

Dinoflagellés	<i>Ostreopsis</i> sp.		<i>Prorocentrum lima</i>		<i>Coolia monotis</i>	
	Macrophytes	Colonne d'eau	Macrophytes	Colonne d'eau	Macrophytes	Colonne d'eau
Température de l'air (°C)	r = 0,23	r = 0,24	r = 0,26	r = 0,37	r = 0,27	r = 0,29
	p = 0,003	p = 0,002	p = 0,001	p = 0	p = 0,001	p = 0
Vitesse du Vent (m sec ⁻¹)	r = 0,21	r = 0,38	r = 0,52	r = 0,36	r = 0,2	r = 0,24
	p = 0,005	p = 0	p = 0,001	p = 0	p = 0,01	p = 0,002
Pluviométrie (mm)	-	r = -0,34	r = -0,22	r = -0,25	r = -0,29	-
		p = 0,001	p = 0,005	p = 0,001	p = 0,001	

1.5 Scénario des événements des efflorescences associées aux microalgues épiphytes du golfe de Tunis

L'évolution des événements d'efflorescence des 3 espèces de Dinoflagellés connues pour être potentiellement toxiques, *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* et *Coolia monotis*, a mis en évidence le déterminisme des facteurs environnementaux sur le déclenchement des proliférations signalées dans le golfe de Tunis (Figure 43).

Les proliférations d'*Ostreopsis* sp. semblent être liées à une synergie entre deux facteurs, la température de l'eau et le pH. En été, les températures de l'eau atteignent des valeurs de l'ordre de 24°C à 27°C, au-dessus desquelles l'abondance de cette espèce diminue significativement, aussi bien sur les macrophytes que dans la colonne d'eau. Le même comportement a été enregistré pour le pH, pour lequel une valeur de 9,34 favoriserait la présence d'*Ostreopsis* sp. Cette abondance serait indirectement liée avec les lits de macrophytes existants sachant que ces dernières contribuent à l'augmentation de l'alcalinité par la photosynthèse et jouent donc un rôle important dans la structuration des assemblages benthiques.

Les épisodes d'efflorescence de *P. lima* et *C. monotis* se produisent principalement au printemps. La prolifération de *P. lima* semble être liée à des plages optimales de la teneur moyenne en oxygène dissous, de l'ordre de $10,5 \text{ mg L}^{-1}$, et de la teneur moyenne en nitrites, de l'ordre de $0,20 \text{ }\mu\text{M}$, au cours de cette saison. L'abondance de *C. monotis* suit également la même tendance et serait principalement influencée par la teneur moyenne en azote total (TN) qui est de l'ordre de $17,6 \text{ }\mu\text{M}$ au printemps.

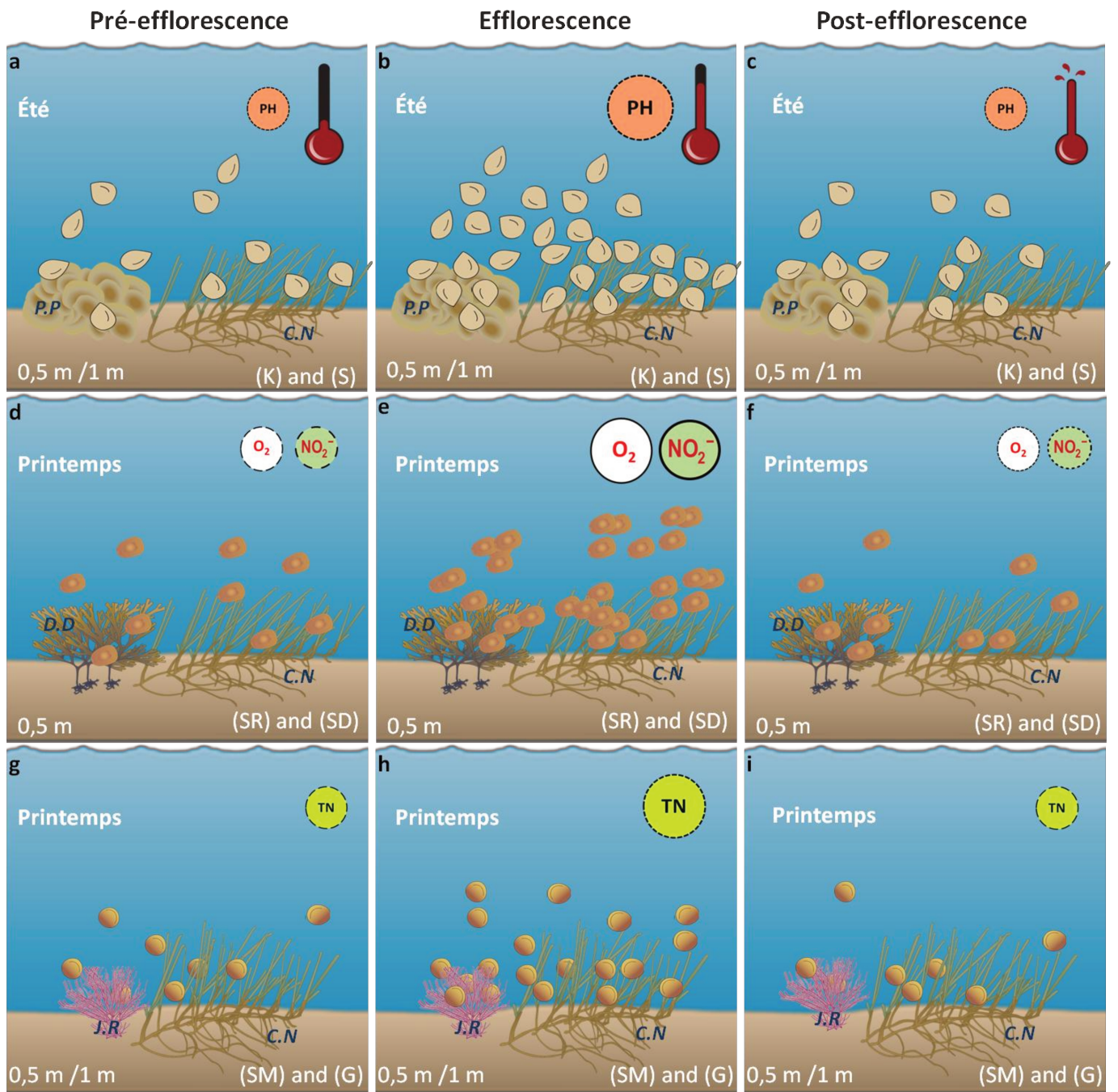


Figure 43 : Scénario des événements associés aux efflorescences des microalgues épiphytes du golfe de Tunis. (a, b, c) *Ostreopsis* sp., (d, e, f) *Prorocentrum lima*, (g, h, i) *Coolia monotis* (Macrophytes collectés : *Cymodocea nodosa* (C.N), *Padina pavonica* (P.P), *Dictyota dichotoma* (D.D), *Jania rubens* (J.R)).

Tableau 12 : Inventaire des microalgues planctoniques et épiphytes potentiellement toxiques du golfe de Tunis (octobre 2013 à octobre 2014), (Min) Concentrations minimales, (Max) Concentrations maximales, (DSP) Diarrhetic Shellfish Poisoning, (HA) Hypoxie/Anoxie, (PSP) Paralytic Shellfish Poisoning, (ASP) Amnesic Shellfish Poisoning, (PLTX) Palytoxine, (Y) Yessotoxine, (E) Efflorescence, (P) Planctoniques, (E) Epiphytes.

Microalgues	Types de l'habitat	Types de nuisances	Min (cell. dm ⁻³)	Max (cell. dm ⁻³)	Moyenne (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Moyenne (cell. g ⁻¹ MF)
Dinophyceae								
<i>Akashiwo sanguinea</i> Hirasaka, 1922	P	BF	40	80	46,66±16,32	-	-	-
<i>Alexandrium catenella</i> (Whedon and Kofoid) Balech, 1985	P	PSP	40	2240	397,5±465	-	-	-
<i>Amphidium</i> sp.	P		40	160	73,33±46,76	-	-	-
<i>Coolia monotis</i> Meunier, 1919	P/E	Cooliatoxine	40	1040	247±263	1	865	102±109
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparède and Lachmann, 1859	P	DSP	40	40	-	-	-	-
<i>Dinophysis sacculus</i> Stein, 1883	P	DSP	40	80	46,66±16,32	-	-	-
<i>Dinophysis</i> sp.	P		40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Diploneis</i> sp.	P		40	160	66,66±44,72	-	-	-
<i>Diplopsalis</i> sp.	P/E		40	160	57,77±31,35	17	17	-
<i>Diplopelta</i> sp.	P		120	120	-	-	-	-
<i>Gonyaulax polyedra</i> Stein, 1883	P	Y	40	80	60±28,28	-	-	-
<i>Gonyaulax spinifera</i> Diesing, 1866	P	Y	40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Gonyaulax</i> sp.	P		40	80	50 ±20	-	-	-
<i>Gymnodinium aureolum</i> Daugbjerg and Henriksen, 2000	P		120	640	350 ±215	-	-	-
<i>Gymnodinium impudicum</i> (S.Fraga and I.Bravo) Gert Hansen and Ø.Moestrup, 2000	P/E	E	40	1.23×10 ⁵	1.31×10 ⁴ ±2.15×10 ⁴	-	-	-
<i>Gyrodinium spirale</i> (Bergh) Kofoid & Swezy 1921	P		40	40	-	-	-	-

Tableau 12 (Suite) : Inventaire des microalgues planctoniques et épiphytes potentiellement toxiques du golfe de Tunis (octobre 2013 à octobre 2014), (Min) Concentrations minimales, (Max) Concentrations maximales, (DSP) Diarrhetic Shellfish Poisoning, (HA) Hypoxie/Anoxie, (PSP) Paralytic Shellfish Poisoning, (ASP) Amnesic Shellfish Poisoning, (PLTX) Palytoxine, (Y) Yessotoxine, (E) Efflorescence, (P) Planctoniques, (E) Epiphytes.

Microalgues	Types de l'habitat	Types de nuisances	Min (cell. dm ⁻³)	Max (cell. dm ⁻³)	Moyenne (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Moyenne (cell. g ⁻¹ MF)
<i>Polykrikos</i> sp.	P		40	40	-	-	-	-
<i>Prorocentrum concavum</i> Fukuyo, 1981	P/E	DSP	40	600	175±191	135	135	-
<i>Prorocentrum gracile</i> Schütt, 1895	P/E	E	40	40	40 ±0	2	865	137 ±322
<i>Prorocentrum lima</i> Dodge, 1975	P/E	DSP	40	3720	187 ±445	1	1.33×10 ⁴	460 ±330,23
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg, 1833	P/E	BF/HA	40	200	65 ±47	1	6	3 ±2,16
<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller, 1933	P	Neurotoxine	40	120	52 ±24	-	-	-
<i>Prorocentrum mexicanum</i> Osorio-Tafall 1942	P		40	40	-	-	-	-
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller, 1918	P/E	E	40	1.73×10 ⁵	6,05×10 ³ ±2,85×10 ⁴	45	45	-
<i>Protoberidinium conicum</i> (Gran) Balech, 1974	P		40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Protoberidinium diabolus</i> (Cleve) Balech, 1974	P		40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Protoberidinium divergens</i> (Ehrenberg) Balech, 1974	P		40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Protoberidinium</i> sp.	P		40	120	57,77 ±29	-	-	-
<i>Pyrophacus</i> sp.	P		40	40	-	-	-	-
<i>Scrippsiella trochoidea</i> Stein, 1883	P	E	40	560	113 ±98,55	-	-	-
<i>Scrippsiella</i> sp.	P/E	E	400	4960	2,68×10 ³ ±3,22×10 ³	10	10	-
<i>Scrippsiella</i> sp1.	P	E	40	1680	394 ±392	-	-	-
<i>Ostreopsis</i> sp.	P/E	PLTX	40	2.35×10 ⁴	1490±935	34	1.03×10 ⁵	2005±2472

Tableau 12 (Suite) : Inventaire des microalgues planctoniques et épiphytes potentiellement toxiques du golfe de Tunis (octobre 2013 à octobre 2014), (Min) Concentrations minimales, (Max) Concentrations maximales, (DSP) Diarrheic Shellfish Poisoning, (HA) Hypoxie/Anoxie, (PSP) Paralytic Shellfish Poisoning, (ASP) Amnesic Shellfish Poisoning, (PLTX) Palytoxine, (Y) Yessotoxine, (E) Efflorescence, (P) Planctoniques, (E) Epiphytes.

Microalgues	Types de l'habitat	Types de nuisances	Min (cell. dm ⁻³)	Max (cell. dm ⁻³)	Moyenne (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Moyenne (cell. g ⁻¹ MF)
<i>Oxyphysis oxytoxoides</i> Kofoid, 1926	P		40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Oxytoxum scolopax</i> Stein, 1883	P		40	80	44,44±13,33	-	-	-
<i>Tripos furca</i> (Ehrenberg) Claparède and Lachmann, 1859	P/E	HA	40	80	45,71 ±15,11	-	-	-
<i>Tripos fusus</i> (Ehrenberg) Dujardin 1841	P		40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Tripos muelleri</i> Bory in J.V.Lamouroux, Bory & Deslongschamps 1827	P		40	40	-	-	-	-
<i>Tripos trichoceros</i> (Ehrenberg) Kofoid, 1881	P		40	40	40 ±0	-	-	-
Bacillariophyceae								
<i>Achnanthes taeniata</i> Grunow, 1880	P		120	200	160 ±56,56	-	-	-
<i>Bacillaria</i> sp.	P		40	280	120 ±138,56	-	-	-
<i>Bacteriastrum</i> sp.	P		40	40	-	-	-	-
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve, 1873	P/E	E	40	1080	192 ±147,53	13	13	-
<i>Chaetoceros socialis</i> Lauder, 1864	P	E	40	400	186 ±119,84	-	-	-
<i>Chaetoceros</i> sp.	P	E	40	80	50±20	-	-	-
<i>Chaetoceros</i> sp1	P	E	40	960	247,5 ±255	-	-	-
<i>Chaetoceros</i> sp2	P	E	40	80	53,33 ±23	-	-	-
<i>Climacosphenia</i> sp.	P		40	200	60±50,77	-	-	-
<i>Cocconeis</i> sp.	P		40	40	-	-	-	-

Tableau 12 (Suite) : Inventaire des microalgues planctoniques et épiphytes potentiellement toxiques du golfe de Tunis (octobre 2013 à octobre 2014), (Min) Concentrations minimales, (Max) Concentrations maximales, (DSP) Diarrheic Shellfish Poisoning, (HA) Hypoxie/Anoxie, (PSP) Paralytic Shellfish Poisoning, (ASP) Amnesic Shellfish Poisoning, (PLTX) Palytoxine, (Y) Yessotoxine, (E) Efflorescence, (P) Planctoniques, (E) Epiphytes.

Microalgues	Types de l'habitat	Types de nuisances	Min (cell. dm ⁻³)	Max (cell. dm ⁻³)	Moyenne (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Moyenne (cell. g ⁻¹ MF)
<i>Cylindrotheca closterium</i> Reimann and Lewin, 1964	P	E	40	240	67,5±61,48	-	-	-
<i>Diploneis</i> sp.	P		40	80	46,66±16,32	-	-	-
<i>Gyrosigma</i> sp.	P		40	240	85,71±66	-	-	-
<i>Guinardia</i> sp.	P/E		40	640	160±84,85	273	1.98×10 ⁴	6027±6970
<i>Licmophora gracilis</i> (Ehrenberg) Grunow, 1867	P/E		40	280	89,30±77,50	6	4.38×10 ⁵	1,63×10 ⁴ ±2,33×10 ³
<i>Navicula</i> sp.	P/E		40	6654	422,25±108	12	2.54×10 ⁴	7589±4852,49
<i>Navicula</i> sp1	P		40	120	65±36,65	-	-	-
<i>Navicula</i> sp2	P		40	280	110±114	-	-	-
<i>Nitzschia linearis</i> Smith, 1853	P		40	120	62,85±31,47	-	-	-
<i>Nitzschia</i> sp.	P/E		40	2520	157±83,65	1	4224	247±812,26
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	P	ASP	80	240	160±65,31	-	-	-
<i>Rhizosolenia styliformis</i> Brightwell, 1858	P		40	80	53,33 ±23	-	-	-
<i>Thalassionema nitzshoides</i> (Grunow) Mereschkowsky, 1902	P/E	E	40	520	82,66 ±122	8	383	158±168,46
<i>Thalassionema</i> sp	P		40	480	217,77 ±137,35	-	-	-
<i>Thalassiosira</i> sp.	P		40	120	60±30,23	-	-	-
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve, 1873	P	HA	40	360	109,53±83,56	-	-	-
<i>Striatella unipunctata</i> Agardh, 1832	P/E		40	80	56±21,09	18	2340	514±573

Tableau 12 (Suite): Inventaire des microalgues planctoniques et épiphytes potentiellement toxiques du golfe de Tunis (octobre 2013 à octobre 2014), (Min) Concentrations minimales, (Max) Concentrations maximales, (DSP) Diarrheic Shellfish Poisoning, (HA) Hypoxie/Anoxie, (PSP) Paralytic Shellfish Poisoning, (ASP) Amnesic Shellfish Poisoning, (PLTX) Palytoxine, (Y) Yessotoxine, (E) Efflorescence, (P) Planctoniques, (E) Epiphytes.

Microalgues	Types de l'habitat	Types de nuisances	Min (cell. dm ⁻³)	Max (cell. dm ⁻³)	Moyenne (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Moyenne (cell. g ⁻¹ MF)
Cyanobactéries								
<i>Anabaena</i> sp.	P	PSP/Anatoxine	40	40	40 ±0	-	-	-
<i>Chroococcus</i> sp.	P/E		40	40	40 ±0	2	136	46±40,18
<i>Lyngbya</i> sp.	P	Lyngbyatoxine	280	280	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	P/E	Cytotoxine	40	1080	96,15 ±59,24	3	706	233±321,43
<i>Spirulina</i> sp.	P		40	40	40 ±0	-	-	-

1.6 Discussion

Dans la présente étude, les Dinoflagellés sont le groupe dominant observé au niveau des différentes stations du golfe de Tunis, tant sur les macrophytes que dans la colonne d'eau. Les espèces *Ostreopsis* sp., *P. lima* et *C. monotis* en sont les plus abondantes. D'autres études signalent une dominance et une association similaires de ces trois dinoflagellés dans les eaux peu profondes de la Tunisie (Tableau 13 a,b,c) et dans la mer Méditerranée (Penna *et al.*, 2005 ; Streftaris et Zenetos, 2006 ; Zingone *et al.*, 2006 ; Ignatiades et Gotsis-Skretas, 2010 ; Blanfuné *et al.*, 2015). Des concentrations élevées et préoccupantes de ces 3 espèces épiphytes ont été enregistrées et ont déjà été signalées par Turki (2005) dans le golfe de Tunis (Baie de la Marsa), sans pour autant atteindre des concentrations aussi élevées, notamment pour *Ostreopsis* sp., (jusqu'à 10^4 cell. g^{-1} MF). la découverte des fortes abondances de ces espèces épiphytes est probablement due aux investigations menées à plus grande échelle dans le golfe de Tunis, et de manière concomitante sur plusieurs substrats parmi 17 espèces de macrophytes (Tableau 10). Malheureusement, la plupart des études sur le golfe de Tunis ont été rapportées dans la colonne d'eau et les quelques publications disponibles sur les communautés épiphytes traitent de zones restreintes et d'un ou deux substrats, principalement les magnoliophytes (Tableau 13a,b,c). Dans tous les cas, la tendance à l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des BHABs est susceptible de se poursuivre (Rhodes, 2011). Chez les Dinoflagellés, ces phénomènes sont notamment observés pour le genre *Ostreopsis* (Blanfuné *et al.*, 2015).

Bien que les 3 taxons de Dinoflagellés, *Ostreopsis* sp., *P. lima* et *C. monotis*, soient fréquemment associés, différentes préférences environnementales et saisonnières ont été notées. Les effets allélopathiques peuvent entraîner une compétition entre eux, puisque ces espèces produisent des composés chimiques inhibant la prolifération d'autres microalgues (Legrand *et al.*, 2003 ; Alcoverro *et al.*, 2004 ; Granéli *et al.*, 2008 ; Peirano *et al.*, 2011).

L'hétérogénéité spatiale des abondances d'*Ostreopsis* sp., de *P. lima* et de *C. monotis* peut également refléter une préférence pour des zones spécifiques qui combinent toutes les conditions nécessaires à leurs proliférations. Ceci est particulièrement vrai pour *Ostreopsis* sp., qui était plus abondante aux stations de Korbous (K) et Salammbô (S), car ces sites sont

des baies rocheuses naturelles peu profondes avec de faibles régimes hydrodynamiques. Par contre, d'autres sites tel que Sidi Daoud (SD), caractérisés par des eaux agitées, sont moins favorables (Chang *et al.*, 2000 ; Vila *et al.*, 2001b ; Simoni *et al.*, 2003 ; Shears et Ross, 2009 ; Totti *et al.*, 2010). Malgré ces conditions en apparence défavorables pour la prolifération des microalgues, *P. lima* a été dominante au niveau de la station de Sidi Daoud. Sa prolifération peut s'expliquer par sa résistance à l'hydrodynamisme élevé du milieu (Dhib *et al.*, 2013).

L'abondance des cellules d'*Ostreopsis* sp., de *P. lima* et de *C. monotis* subit également un changement significatif en réponse à différents paramètres environnementaux. En effet, les résultats obtenus montrent qu'*Ostreopsis* sp. est présente tout au long de l'année, avec une abondance maximale en été lorsque les conditions optimales de croissance sont combinées, en particulier les températures de l'eau de mer, comme déjà montré lors des études réalisées dans les régions tempérées (Simoni *et al.*, 2004 ; Ungaro *et al.*, 2010 ; Mangialajo *et al.*, 2011 ; Ben Brahim *et al.*, 2015). Cependant, lorsque les températures de l'eau dépassent 28,3°C, leur abondance diminue. En plus de la température de l'eau, la salinité semble jouer un rôle dans la prolifération des Dinoflagellés benthiques (Tindall et Morton, 1998). En fait, l'abondance la plus élevée d'*Ostreopsis* sp. a été observée lorsque la salinité et la température de l'eau de mer ont atteint leurs valeurs maximales (Turki, 2005 ; Pistocchi *et al.*, 2011 ; Pezolesi *et al.*, 2014), ce qui n'est pas confirmé par les analyses statistiques réalisées sur la salinité durant la période d'étude. On peut donc supposer que l'influence de la salinité sur la prolifération d'*Ostreopsis* sp. peut être masquée en raison de la variation non significative de la salinité selon la station (test ANOVA). Par exemple, en été, quand les pics d'abondance d'*Ostreopsis* sp. aux stations (S) et (K) ont été atteints, les pics de salinité sont similaires au niveau de toutes les stations et n'ont montré aucune variation significative qui pourrait prouver une quelconque influence sur la prolifération microalgale d'*Ostreopsis* sp..

Les valeurs du pH semblent également avoir un effet significatif sur *Ostreopsis* sp. En effet, il est bien connu que les macrophytes contribuent à l'augmentation de l'alcalinité par photosynthèse et jouent un rôle important dans la structuration des assemblages benthiques (Orth *et al.*, 1984 ; Boström *et al.*, 2006). La prolifération d'*Ostreopsis* sp. semble avoir une préférence pour *Cymodocea nodosa* et *Padina pavonica* sur lesquels les concentrations maximales d'*Ostreopsis* sp. ont été enregistrées, notamment dans les stations (S) et (K).

Dans l'ensemble, ces résultats pourraient fournir un aperçu de l'importance des stations (S) et (K) qui peuvent être considérées comme des niches parfaites pour *Ostreopsis* sp., sous des conditions favorables telles que le régime hydrodynamique, la température de l'eau en période estivale et les espèces de macrophytes caractéristiques.

L'abondance d'*Ostreopsis* et la saturation en oxygène n'ont pas montré une nette corrélation, malgré une augmentation de la teneur en oxygène dissous pendant la période d'efflorescence d'*Ostreopsis* en été. De plus, les résultats n'ont montré aucun impact des nutriments sur l'abondance d'*Ostreopsis* sp. Cependant, les nutriments ont été déterminants dans la croissance des espèces d'*Ostreopsis* selon Vila *et al.*, (2001a), Cochu *et al.*, (2011 ; 2013) et Accoroni *et al.*, (2015). Les concentrations des éléments nutritifs ne semblent pas être un facteur limitant pour les variations des populations d'*Ostreopsis* sp. du golfe de Tunis. Le développement des efflorescences de *P. lima* et *C. monotis* semble être plus étroitement lié au printemps. Les pics de ces 2 espèces se produisent avant celui d'*Ostreopsis* sp., cela peut être expliqué par l'existence d'un modèle de succession entre ces 3 espèces nuisibles. La présence d'une telle succession peut être confirmée par une autre, déjà détectée dans la région de La Marsa du golfe de Tunis avec des proliférations de *P. lima* et *C. monotis* en automne-printemps et une efflorescence d'*Ostreopsis* sp. en été (Turki, 2005). Des modèles de succession possibles et la séparation de niches entre les Dinoflagellés potentiellement toxiques dans les assemblages épiphytiques ont également été relevés par Aligizaki *et al.* (2009) et Cochu et Lemée (2012). Les valeurs élevées des nitrites signalées au printemps semblent améliorer la prolifération de *P. lima*, ce qui est confirmé par d'autres travaux (Parsons et Preskitt, 2007 ; Varkitzi *et al.*, 2010). De plus, la prolifération de *P. lima* semble être liée à des valeurs élevées de la teneur en oxygène dissous, ce qui est probablement en relation directe avec la croissance végétative rapide de la plupart des macrophytes au printemps. La forte abondance de *C. monotis*, en corrélation avec de fortes concentrations d'azote total au printemps, a déjà été observée dans les eaux tunisiennes, en particulier dans le lac de Tunis où la prolifération récurrente de *C. monotis* a eu lieu à la fin du printemps et au début de l'été, et qui a montré une corrélation avec de fortes concentrations en nutriments azotés (Armi *et al.*, 2010). D'une manière globale, les 3 espèces de Dinoflagellés épiphytes ont été dominantes durant la saison chaude de l'année avec des corrélations positives trouvées lorsque la température de l'air est la plus élevée. L'action du vent faciliterait le mélange intensif des masses d'eau en favorisant ainsi la dispersion des microalgues épiphytes dans la colonne d'eau (Vila *et al.*, 2001b ; Totti *et al.*, 2010). De même, les corrélations négatives

entre ces microalgues et les précipitations peuvent s'expliquer par une diminution de la salinité, un facteur important dans la prolifération des Dinoflagellés benthiques (Tindall et Morton, 1998 ; Pistocchi *et al.*, 2011 ; Pezolesi *et al.*, 2014). La profondeur favorable au développement d'*Ostreopsis* sp. est généralement comprise entre 0,5 et 1 m, accompagné d'une prolifération d'*Ostreopsis* sp. qui diminue avec la profondeur, ce qui met en évidence l'impact de l'intensité lumineuse sur la distribution verticale des espèces (Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Okolodkov *et al.*, 2007 ; Mangialajo *et al.*, 2008 ; Shears et Ross, 2009 ; Totti *et al.*, 2010). Les résultats obtenus nous ont permis de relever les mêmes tendances de la distribution côtière en faible profondeur pour les microalgues *Ostreopsis* sp. aussi bien que pour *P. lima* et *C. monotis*. Cependant, Mabrouk *et al.* (2011) et Cohu et Lemée (2012) ont signalé la présence de ces 3 espèces de Dinoflagellés, à plus grande profondeur (jusqu'à 50 m). Compte tenu de la diversité des espèces de macrophytes présentes dans le golfe de Tunis, en particulier dans les eaux côtières peu profondes, seules les espèces les plus représentatives de chaque station et au cours de chaque saison ont été collectées. Aucune corrélation ou préférence significative n'a été observée entre les espèces de Dinoflagellés étudiées et la nature du substrat (macroalgues ou magnoliophytes marins) (Faust *et al.*, 1996 ; Turki 2005, Battocchi *et al.*, 2010 ; Totti *et al.*, 2010 ; Mabrouk *et al.*, 2014 ; Moncer *et al.*, 2017). Les corrélations entre les Dinoflagellés épiphytes et planctoniques appartenant à la même espèce ont été évidentes. Cela peut être dû aux rythmes biologiques du détachement cellulaire à partir du macrophyte (Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Mangialajo *et al.*, 2011) ou à la remise en suspension causée par les baigneurs. Ceci illustre le rôle important des macrophytes en tant que source importante des microalgues dans la colonne d'eau. Les vents forts sont souvent un phénomène de grande importance dans les eaux peu profondes, contribuant au mélange intensif des masses d'eau côtières (Klinkenberg et Schumann, 1994 ; Telesh, 2004 ; Telesh *et al.*, 2008).

Tableau 13a : Abondances des espèces d'*Ostreopsis* détectées dans le golfe de Tunis depuis 2001. cell. dm⁻³ (colonne d'eau) et cell. g⁻¹ MF (cellules épiphytes). (-) Aucune donnée disponible.

	Sites	Abondances par saison	Max (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Substrat	Références
<i>Ostreopsis siamensis</i>	Lagune de Bizerte	été-Automne	250	-	-	Turki et El Abed (2001)
	Lac de Tunis	Printemps-été	100	-	-	
	Lac de Tunis	-	1200	-	-	Turki (2004)
	Lagune de Bizerte	-	1520	-	-	
	Remel	-	120	-	-	
	Ras Zebib	-	120	-	-	
	Cap de Bizerte	-	40	-	-	
	Raoued	-	360	-	-	
	Baie de la Marsa	été/ Automne (T°=27°C; S=37.5)	-	3.6x10 ³	<i>Posidonia oceanica</i>	Turki (2005)
	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Lagune de Bizerte	été	-	21	<i>Cymodocea nodosa</i>
Bizerte		Printemps	-	2	<i>Ulva rigida</i>	
			-	43	<i>Zostera noltei</i>	
Baie de Bizerte		Automne	-	1947	<i>Cymodocea nodosa</i>	

Tableau 13b : Abondances de l'espèce *Prorocentrum lima* détectée dans le golfe de Tunis depuis 2001. cell. dm⁻³ (colonne d'eau) et cell. g⁻¹ MF (cellules épiphytes). (-) Aucune donnée disponible.

	Sites	Abondances par saison	Max (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Substrat	Références
<i>Prorocentrum lima</i>	Lac de Tunis	-	-	34	<i>Cymodocea nodosa</i>	Turki and El Abed (2001)
	Lagune de Ghar El Melh	Hiver	1.5x10 ⁴	-	-	
	Lac de Tunis	Automne	3440	-	-	
	Lagune de Bizerte	Printemps	1520	-	-	
	Remel	Automne	200	-	-	
	Ras Zebib	Automne	80	-	-	
	Cap de Bizerte	Automne	200	-	-	
	Ras Angela	Automne	400	-	-	
	Kalät Andalous	Printemps	700	-	-	
	Raoued	été	200	-	-	
Baie de la Marsa	été (T=27°C; S=37)	-	2.2x10 ⁴	<i>Cymodocea nodosa</i>	Turki (2005)	
Lagune de Bizerte	Printemps (T=15°C; S=34)	7.25x10 ⁴	-	-	Sahraoui <i>et al.</i> (2013)	
Lagune de Ghar El Melh	été (T=27.6°C ; S=51.2)	1400	6x10 ³	<i>Ruppia cirrhosa</i>	Dhib <i>et al.</i> (2015)	
Lagune de Bizerte	Automne	-	8576	<i>C. nodosa</i>	Ben Gharbia (2018)	
Baie de Bizerte	été	-	6,43	<i>U. rigida</i>		
Baie de Bizerte	été	-	1604	<i>C. nodosa</i>		

Tableau 13c : Abondances de l'espèce *Coolia monotis* détectée dans le golfe de Tunis depuis 2001. cell. dm⁻³ (colonne d'eau) et cell. g⁻¹ MF (cellules épiphytes). (-) Aucune donnée disponible.

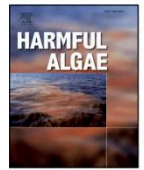
	Sites	Abondances par saison	Max (cell. dm ⁻³)	Max (cell. g ⁻¹ MF)	Substrat	Références
<i>Coolia monotis</i>	Lac de Tunis	-	300	-	-	Turki (2004)
	Lagune de Bizerte	-	120	-	-	
	Remel	-	40	-	-	
	Ras Zebib	-	360	-	-	
	Cap de Bizerte	-	560	-	-	
	Ras Angela	-	80	-	-	
	Raoued	-	80	-	-	
	Baie de la Marsa	Automne (T=26; S=36.8)	-	8.4x10 ²	<i>C. nodosa</i>	
Lac de Tunis	Printemps (T= 14.6-29.7°C; S=37.8-42.6)	5x10 ⁵	-	-	Armi <i>et al.</i> (2010)	
Lagune de Ghar El Melh	-	840	-	-	Dhib <i>et al.</i> (2015)	
Lagune de Bizerte	Printemps	-	67	<i>C. nodosa</i>	Ben Gharbia (2018)	
		-	9	<i>Z. noltei</i>		
		-	11	<i>U. rigida</i>		
Baie de Bizerte	Printemps	-	1181	<i>C. nodosa</i>		



Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

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



Harmful epiphytic dinoflagellate assemblages on macrophytes in the Gulf of Tunis

Mohamed Amine Hachani^{a,b}, Amel Dhib^{a,b}, Afef Fathalli^a, Boutheina Ziadi^a, Souad Turki^a, Lotfi Aleya^{b,*}

^a Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), Centre la Goulette, Tunisie et la Faculté des Sciences de Tunis, Tunisia
^b Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, University of Franche-Comté, F-25030 Besançon, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Ostreopsis sp.
Prorocentrum lima
Coolia monotis
 Environmental factors
 Gulf of Tunis

ABSTRACT

The spatio-temporal distribution of epiphytic and planktonic microalgae coupled with environmental factors was investigated for a one-year period in the Gulf of Tunis (northeastern Tunisia). Harmful microalgae assemblages were dominated by three toxic epiphytic dinoflagellates: *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*. They were observed, both on macrophytes (1.03×10^5 cells g⁻¹ FW; 1.3×10^4 cells g⁻¹ FW and 865 cells g⁻¹ FW, respectively) and in the water column (2.35×10^4 cells L⁻¹; 3.72×10^3 cells L⁻¹; 1.04×10^3 cells L⁻¹, respectively). Species abundances decreased with depth and maximum concentrations were found in shallow waters (0.5–1 m). The highest species abundance was registered both on macroalgae and seagrass with no special preference observed for either of these substrates. Redundancy analyses (RDA) show significant changes in these species abundances according to sites and seasons. The proliferation of *Ostreopsis* sp. is widespread in summer, when water temperature is warm, and especially in bay zones. The occurrence of *P. lima* and *C. monotis* blooms was mainly correlated to nutrients. In this study, macrophyte beds in the Gulf of Tunis were a reservoir of potentially toxic species that could pose a real threat, both to ecosystems and to public health.

1. Introduction

Harmful benthic dinoflagellates (BHAB) have aroused the interest of scientists over the last decade due to their increasing distribution, from tropical waters to temperate zones such as the Mediterranean Sea (Hallegraeff, 1993; Van Dolah, 2000; Masó and Garcés, 2006; Aligizaki et al., 2008; Rhodes, 2011). The most common harmful benthic dinoflagellate species, *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*, are mainly epiphytic, found on macrophytes and are following the same increasing trends (Vila et al., 2001a; Aligizaki et al., 2009; Ignatiades and Gotsis-Skretas, 2010; GEOHAB, 2012; Blanfuné et al., 2015). Blooms of the epiphytic species *Ostreopsis* are increasingly observed in several areas of the Mediterranean (Penna et al., 2005; Aligizaki et al., 2008; CoHu et al., 2011; Accoroni and Totti, 2016), causing negative impacts on both ecosystems and human health (Deeds and Schwartz, 2010; Ramos and Vasconcelos, 2010) due to production of palytoxin (PLTX) and the palytoxin-like compounds called ovatoxins (OVTXs) (Ciminiello et al., 2008; Aligizaki et al., 2008; Accoroni et al., 2011). Like *Ostreopsis*, *P. lima* produces okadaic acid (OA) and can cause DSP events (Faust, 1991; Nascimento et al., 2005; Rhodes et al., 2006), while *Coolia monotis* synthesizes cooliatxin (Holmes et al., 1995). The

toxicity of the former species makes their monitoring necessary.

In this context, research institutes, universities, environmental agencies and technological enterprises based along Mediterranean coasts (including Tunisia) came together under the umbrella of a EU funded project, to reduce the hazards related to harmful benthic algae. The M3-HABs project was launched in January 2014 in order to increase awareness and implement measures to manage harmful benthic algal blooms in the Mediterranean Basin through the development of common monitoring procedures, automated counting methods and predictive modeling tools.

In Tunisia, the first phase of this project investigated the harmful benthic dinoflagellates in the Gulf of Tunis. Despite the critical situation of this part of the coast, which is the most urbanized and industrialized area in the country, little attention has been paid to large-scale spatial and temporal distribution of phytoplankton communities, especially the harmful benthic dinoflagellates in the shallow Gulf coastal waters. Most of the previously existing studies treated only a restricted geographic area (Daly Yahia-Kefi et al., 2001; Turki, 2005; Aissaoui et al., 2014) or nearby lagoons (Romdhane et al., 1998; Sakka Hlaili et al., 2006; Sahaoui et al., 2009; Armi et al., 2011; Smida et al., 2012; Turki et al., 2006, 2014; Dhib et al., 2015).

* Corresponding author.
 E-mail address: lotfi.aleya@univ-fcomte.fr (L. Aleya).

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.006>
 Received 12 March 2018; Received in revised form 10 June 2018; Accepted 10 June 2018
 1568-9883/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

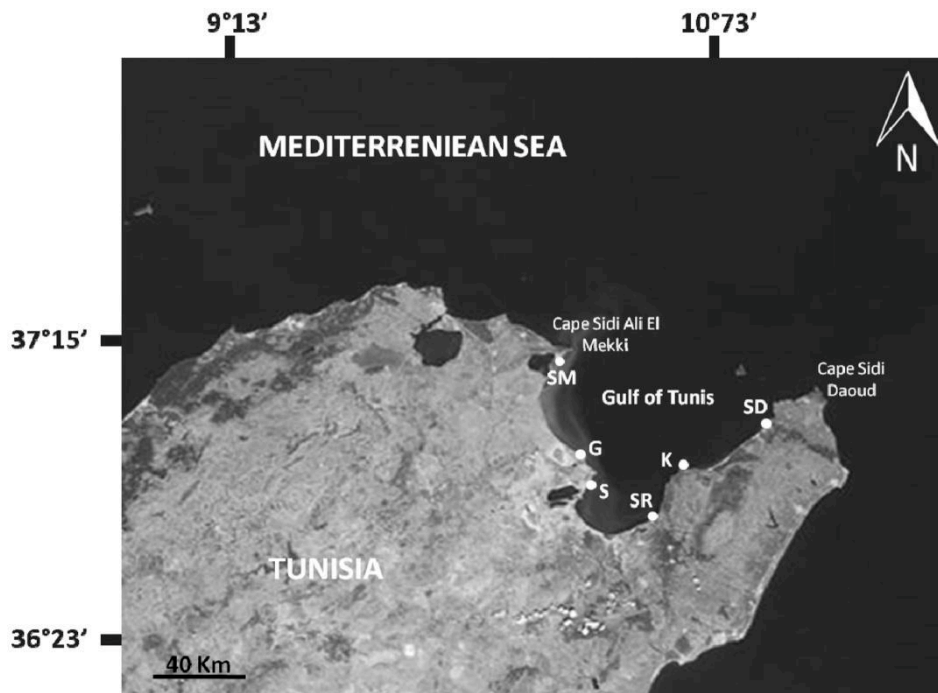


Fig. 1. Geographic localization of the Gulf of Tunis and sampling stations.

From October 2013 to October 2014, the authors examined community composition and abundance of planktonic and epiphytic microalgal species at 54 stations in the Gulf of Tunis. In this study, the research focus is on the distribution of harmful epiphytic dinoflagellates and the influence of different substrata (macroalgae and seagrass) and the involved environmental factors in their bloom dynamics.

2. Material and methods

2.1. Study area

The study was conducted along the shores of the Gulf of Tunis, located in northeastern Tunisia (between 37°15′/36°47′, 76°N and 10°53′, 60′/10°15′, 77°E) and extending about 230 km from Cape Sidi Ali El Mekki to Cape Sidi Daoud (Fig. 1). The Gulf of Tunis is characterized by an average depth of its coastal waters of approximately 11.22 m and offshore waters of about 57.25 m (MEDD, 2009). It is also marked by strong and frequent northwesterly winds in autumn and winter. In spring and summer, less frequently, winds blow from the east and southeast (Brahim et al., 2015).

Temperatures in the Gulf are relatively moderate with an annual average of 23 °C. The lowest monthly mean temperatures extend from December to May (10–26 °C). The highest average temperature is observed in August (32 °C) (www.worldweatheronline.com). The gulf's watershed, which encompasses Tunisia's most urbanized and industrialized region, discharges directly or indirectly into the Gulf and is drained by a branched hydrographic network, consisting of four sources, the Medjerda River, El Khlij Channel, Oued Meliane and Oued El Bey and two large lagoons, Ghar El Melh and the Lake of Tunis. For a few years, the littoral of Tunis gulf has been subjected to industrial, urban and tourist development. For a few years, the littoral of Tunis gulf has been subjected to industrial, urban and tourist develop

2.2. Sampling

Six sites were sampled: Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR), Korbous (K), Sidi Ali el Makki (SM), Gammarth (G) and Salammbô (S) (Fig. 1). Except for Sidi Daoud, which is composed of natural rocky substrate, and Sidi Rais, which consists of a barrier reef of *Posidonia oceanica* meadows, all the sites are characterized by a sandy substrate. The Gammarth and Sidi Daoud sites are exposed to the most turbulent hydrodynamic conditions (Table 1). Samples were collected by snorkeling and diving, following the procedure described in Cohu et al. (2013). Each site was sampled once per season (autumn 2013, winter 2014, spring 2014, summer 2014 and autumn 2014). Samples were collected in triplicate (10 m apart) at 0.5, 1 and 3 m depth (Table 1). Sub-sites were chosen randomly (n = 270 observations).

Seawater samples were collected in a 500 ml plastic flask, approximately 20 cm above the macrophytes to determine planktonic dinoflagellate concentrations. Samples have to be taken in a specific order: water samples were taken first, in order to avoid over estimation

Table 1
Sampling site characteristics, GPS location, bottom type and exposure.

Sites	GPS Location		Substrate	Exposure	Depth (m)
	N	E			
Sidi Daoud (SD)	37° 2'16.24"	10°54'14.48"	Rocky	Exposed	0.5 ; 1 ; 3
Sidi Rais (SR)	36°46'13.18"	10°32'55.99"	Matte	Sheltered	0.5 ; 1 ; 3
Korbous (K)	36°52'53.86"	10°39'56.89"	Rocky	Sheltered	0.5 ; 1 ; 3
Sidi Ali el Makki (SM)	37°10'31.31"	10°15'55.90"	Sandy	Sheltered	0.5 ; 1 ; 3
Gammarth (G)	36°53'50.59"	10°19'15.42"	Sandy	Exposed	0.5 ; 1 ; 3
Salammbô (S)	36°50'11.17"	10°19'33.73"	Rocky/Sandy	Sheltered	0.5 ; 1 ; 3

Table 2
List of macrophytes taxa sampled in the Gulf of Tunis. Thallus morphotypes have been subdivided in branched (b), non-branched (nb) and leaves (l). X: presence of macrophyte in the station.

Macrophytes taxa	Thallus Morphotype	SD	SR	K	SM	G	S
Macroalgae							
Chlorophyta							
<i>Enteromorpha intestinalis</i> Linnaeus	nb						X
<i>Codium fragile</i> (Suringar) Hariot	b					X	
Rhodophyta							
<i>Gracilaria gracilis</i> (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine et W.F. Farnham	b	X					
<i>Corallina officinalis</i> Linnaeus / R.H.Walker, J.Brodiev et L.M.Irvine	b				X		
<i>Laurencia</i> sp.		X				X	
<i>Mesophyllum expansum</i> (Philippi) Cabioch et M.L. Mendoza	b	X	X				
<i>Jania rubens</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	b			X	X		
Phaeophyceae							
<i>Cystoseria</i> sp.	b	X	X	X	X		
<i>Dictyopteris polypodioides</i> (A.P. De Candolle) J.V. Lamouroux	nb	X					
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V. Lamouroux	nb	X	X		X	X	X
<i>Padina pavonica</i> (Linnaeus) Thivy	nb			X	X		
<i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh	b					X	
Magnoliophyta							
<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Asch.	l	X	X			X	X
<i>Posidonia oceanica</i> (Linnaeus) Delile	l	X	X	X		X	

due to induced resuspension of cells, followed by macrophyte samples. Samples of each macroalgae or seagrass were carefully placed in plastic bags with the surrounding seawater, avoiding, as much as possible, any loss to determine epiphytic dinoflagellate abundance. During the 2 h of transport, samples were kept at ambient conditions in rigid plastic boxes and were treated immediately treated once in the lab. Depending on their growth cycle and environmental disturbance, some macrophyte species were absent at certain sites or depths, particularly in winter, and therefore could not be collected. Once in the laboratory, the

samples were shaken vigorously and filtered through a 500 µm mesh to separate macrophytes from water containing microalgae. The macrophytes were then rinsed twice with 100 ml of 0.2 µm filtered seawater to recover a maximum of microalgae and weighed (fresh weight) (Table 2).

Environmental variables were measured in the field concomitantly with microalgae sampling. A WTW multiparametric probe was used to record water temperature (°C) and salinity. Water samples were collected at 30–50 cm depth in 1000 ml polypropylene bottles. In the laboratory, inorganic nutrients (ammonium, nitrite, nitrate, phosphate, silicate) were analyzed with a BRAN and LUEBBE AutoAnalyzer 3 and concentrations were determined via the colorimetric method using a UV–vis (JENWAY 6705) spectrophotometer (APHA, 1992). Meteorological parameters were taken from websites specialized in weather forecasting (www.wunderground.com and www.worldweatheronline.com).

2.3. Microalgae enumeration

Planktonic and epiphytic cells were fixed with a 5% formaldehyde solution for both water and macrophyte samples. Cells were counted with an inverted microscope (IMT2 Olympus). Concentrations of planktonic cells in the water samples were calibrated with the Utermöhl method (Utermöhl, 1958) in chambers holding 25 ml of seawater. Sedimentation lasted 24 h before counting. Sub-samples (1 ml) of epiphytic communities (Turki, 2005) were counted with Sedgwick Rafter chambers according to the Utermöhl method. All observed epiphytic microalgae were counted. Epiphytic cells were expressed as the number of cells per gram of fresh macroalgae weight (cells g⁻¹ FW). Microalgae cell taxa were identified according to various identification keys, Hallegraef et al. (1995); Tomas et al. (1996); Faust and Gulledge (2002) and Moestrup et al. (2009).

2.4. Statistical analysis

A one-way variance analysis (ANOVA) was used to assess environmental variability among stations and seasons, as well as species variability among sampling times and sampled substrata. Potential relationships between variables and meteorological parameters were tested by Spearman’s correlation coefficient. Redundancy analysis (RDA) was performed to highlight the structuring effects of sites,

Table 3
Abiotic variables and meteorological parameters recorded for each season in the Gulf of Tunis.

Seasons	Autumn 2013			Winter 2014			Spring 2014			Summer 2014			Autumn 2014		
	min	max	average	min	max	average	min	max	average	min	max	average	min	max	average
Physical variables															
Temperature (°C)	14.9	26	21.4	14.2	19.5	16	24.1	26.3	25.2	25	29.6	26.7	19.8	24.2	22.6
Salinity	35	37	36	34.7	35.7	35.2	37.5	37.8	37.7	37.3	37.7	37.5	35	37	35.9
PH	8.32	8.56	8.47	8.43	8.72	8.6	8.15	8.65	8.3	8.8	9.34	9.05	8.06	8.32	8.2
Oxygen (mg L ⁻¹)	4.5	21.9	15.23	5.64	7.90	6.98	8.30	12.2	10.50	5.3	10.4	6.28	8.2	10.8	9.03
Meteorological Parameters															
Air Temperature (°C)	24	29	25.3	12	16	14	20	28	23	26	28	26.6	26	27	26.2
Wind speed (m sec ⁻¹)	1.34	2.1	1.6	1.5	3.1	2.6	2.1	4.6	3	3.6	4.1	4.1	1.94	5.1	4.3
Rain (mm)	0	0	0	0	2	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nutrients (µmol L⁻¹)															
NO ₂ ⁻	0.03	0.36	0.18	0.01	0.18	0.11	0.10	0.33	0.20	0.05	0.08	0.06	0.08	0.27	0.14
NO ₃ ⁻	0.73	3.77	1.57	1.32	3.32	1.95	0.99	1.56	1.19	0.59	1.30	0.93	2.76	4.21	3.30
NH ₄ ⁺	2.25	4.23	3.07	2.13	5.38	3.29	0.63	1.10	0.85	0.88	2.04	1.37	0.77	3.51	1.59
PO ₄ ³⁻	0.12	0.56	0.28	0.09	0.16	0.12	0.14	0.32	0.23	0.04	0.22	0.12	0.07	0.26	0.14
Si(OH) ₄	4.27	5.74	5.10	1.36	3.24	2.68	2.62	4.04	3.09	3.12	13.89	8.82	3.57	10.81	6.65
T-N	9.84	12.67	10.69	10.24	13.12	11.55	13.98	20.02	17.60	9.74	12.19	11.22	11.32	14.32	12.58
T-P	3.16	5.47	3.94	2.07	3.62	2.68	2.62	4.04	3.09	0.86	1.46	1.17	1.98	3.88	2.95
DIN	3.13	7.99	4.81	4.10	6.95	5.34	1.78	3.54	2.23	1.53	2.88	2.37	3.76	6.93	5.03
DIN/DIP	10.88	34.49	20.26	30.40	70.95	46.97	6.92	12.92	10.16	12.2	67.40	27.70	24.21	64.68	40.65

Table 4 Average concentrations (cells g⁻¹FW) of the most frequent microalgae species found in the macrophytes leaves in the six sites of the Gulf of Tunis. Species marked with an asterisk are known as planktonic taxa.

Phytoplankton taxa	SD	SR	K	SM	G	S	Autumn 2013	Winter 2014	Spring 2014	Summer 2014	Autumn 2014
Dinophyceae											
<i>Coilia monotis</i>	310.7 ± 79.9	50.7 ± 5	547.6 ± 174.2	165.4 ± 66.7	154.32 ± 11.55	218.1 ± 117.1	3.2 ± 0.6	3.1 ± 0.8	38.2 ± 7.4	231.8 ± 35.5	90.9 ± 38.2
Meunier, 1919											
<i>Prorocentrum lima</i>	1107 ± 259.8	177.3 ± 45.7	849.6 ± 183.2	1611.5 ± 50.7	583.05 ± 167.54	446.9 ± 52.8	127.7 ± 24.7	14.6 ± 2.7	435.4 ± 41.8	1458.1 ± 66.2	264.4 ± 100.1
Dodge, 1975											
<i>Ostreopsis</i> sp.	2834.9 ± 70	127.7 ± 18.5	3313 ± 299.8	3703.9 ± 464.2	1840 ± 274.45	3300.6 ± 67.4	26.1 ± 24.9	10.2 ± 5	4.5 ± 2.3	4290.2 ± 970.4	82.1 ± 11.9
Bacillariophyceae											
<i>Litopenhora gracilis</i> (Ehrenberg)	398.7 ± 131.6	4169 ± 370	8.3 × 10 ³ ± 737.9	1758.5 ± 219.2	219.43 ± 89.56	845.7 ± 13.4	0	247.4 ± 11.4	69.4 ± 3.3	656.5 ± 13.7	3.17 × 10 ⁴ ± 195.5
Grunow, 1867											
<i>Navicula</i> sp.*	5672.3 ± 301.8	5018.4 ± 1009.8	9247.8 ± 1244	5194.2 ± 654.9	1942.60 ± 805.26	4651.5 ± 2166.5	23.4 ± 7.6	201.4 ± 7.7	110.4 ± 14.5	1079.8 ± 57.9	7778.9 ± 451
<i>Striatella unipunctata</i> Agardh, 1832	281.2 ± 46.7	1421.1 ± 244.1	656 ± 64.7	753.2 ± 48	20.26 ± 2.22	5.1 ± 1.4	86.4 ± 16.4	18.2 ± 1.8	7.1 ± 1.8	725.9 ± 104.9	556.1 ± 69.5
Cyanobacteria											
<i>Oscillatoria</i> sp.*	2827.2 ± 679.5	4478.8 ± 789.8	1.15 × 10 ⁴ ± 1673.7	2694.1 ± 764.9	1604.0 ± 59.8	3293.2 ± 936.4	37.9 ± 7.8	1004.5 ± 16.9	221.6 ± 62.8	0	7564.2 ± 756.9

seasons and depth, along with physical (temperature, salinity, pH and oxygen) and chemical (NT, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PT, PO₄³⁻ and Si (OH)₄) parameters on epiphytic dinoflagellate abundance. Species abundance was normalized prior to analysis. Statistical analysis was produced by R 2.15.0 (R Development Core Team, 2012) with “Vegan” (Oksanen et al., 2011) and “Pgrimmess” (Giraudeau, 2012) packages.

3. Results

3.1. Environmental conditions

Water temperature varied significantly among seasons (ANOVA, F = 173.8, p < 0.001) and sampling sites (ANOVA, F = 4.49, p < 0.001). The highest water temperature values were recorded in summer at G and S stations, with 28.3 °C and 29.6 °C, respectively. Salinity presented similar trends among the sampling stations but varied significantly according to seasons (ANOVA, F = 43.1, p < 0.001), with peaks in spring (37.8) and summer (37.7) (Table 3). Likewise, pH varied significantly with seasons (ANOVA, F = 215.7, p < 0.001) though not between stations. Maximum values were recorded in summer, with 9.34 (Table 3).

Oxygen concentrations (O₂) differed significantly between seasons (ANOVA, F = 22.59, p < 0.001), with marked variations among the stations (ANOVA, F = 7.38, p < 0.001). The highest values were noted in spring and autumn, especially at SD and SR stations (12.2 and 21.9 mg L⁻¹) (Table 3).

Nitrate, ammonium, silicate and total nitrogen (TN) varied significantly among seasons (ANOVA, p < 0.001 for each nutrient), but not among sampling stations (ANOVA, p > 0.05 for each nutrient). The highest values of nitrate and ammonium were recorded in autumn and winter, whereas maximum concentrations of silicate were detected in summer and the highest values of total nitrogen in autumn and spring (Table 3).

Nitrite, orthophosphate and total phosphorus (TP) varied both according to season and station (ANOVA, p < 0.001 for each nutrient) (Table 3). Total phosphorus and orthophosphate were detected especially at Salammbô station in spring (4.04 and 0.32 µmol L⁻¹, respectively) and autumn (5.47 and 0.56 µmol L⁻¹, respectively). Nitrite's highest values were also registered in autumn and spring (0.36 and 0.33 µmol L⁻¹, respectively), but at G and SR stations.

Meteorological parameters (Air temperature, wind speed and rain) fluctuated importantly according to season (Table 3). Maximum temperature values were 28 °C and were recorded from spring to summer. The highest wind speed value was recorded during autumn 2014. Wet season corresponded to winter and registered a maximum rain value of 2 mm.

3.2. Microalgae species present on macrophytes

Twenty microalgae species were observed on macrophytes, mainly dinoflagellates (12; 60% of total abundance), followed by diatoms (6; 30% of total abundance) and then cyanobacteria (2; 10% of total abundance) (Table 4). Three harmful dinoflagellate species were present in the epiphytic community at the six sites and in all seasons. *Ostreopsis* sp. was present at low abundance (28.75 cells g⁻¹ FW), in a sample collected at 0.5 m depth at Sidi Daoud (SD) in October 2013, while its maximal abundance (1.03 × 10⁴ cells g⁻¹ FW) was recorded in August 2014 at Sidi Ali Makki (SM). For *Prorocentrum lima*, maximum abundance (1.3 × 10⁴ cells g⁻¹ FW) was also detected at SM in August 2014. *Coilia monotis* maximal abundance was found at K station in October (865 cells g⁻¹ FW).

3.3. Environmental correlations of epiphytic dinoflagellates

A significant difference in epiphytic dinoflagellate (ED) abundance was recorded between sampling sites (RDA, F = 4.7, p < 0.001). This

Table 5
Average concentrations (cells L⁻¹) of the most frequent microalgae species found in the water column in the six sites of the Gulf of Tunis. Species marked with an asterisk are known as benthic taxa.

Phytoplankton taxa	SD	SR	K	SM	G	S	Autumn 2013	Winter 2014	Spring 2014	Summer 2014	Autumn 2014
Dinophyceae											
<i>Alexandrium catenella</i> (Whedon and Kofoid) Balech, 1985	53 ± 46	66.7 ± 23.1	496 ± 103	0	120 ± 19.5	461.3 ± 31.6	0	454.8 ± 155.5	70 ± 20	60 ± 84.9	0
<i>Coolia monoidis</i> * Meunier, 1919	60 ± 28.3	266.7 ± 56.6	120 ± 69.3	240 ± 56.6	350 ± 56.57	280 ± 84.9	0	0	20 ± 28	244.7 ± 28.3	0
<i>Prorocentrum lima</i> * Dodge, 1975	180 ± 28.3	982.2 ± 140.5	173.3 ± 23.1	88 ± 28.3	62.86 ± 17.89	80 ± 28.3	70.3 ± 23.1	0	52 ± 15.1	417.1 ± 29.8	200 ± 28
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg, 1833	160 ± 69.3	26.7 ± 23.1	30 ± 20	33.3 ± 16.3	0	70 ± 60	90.9 ± 20	34.3 ± 15.1	55 ± 14.1	20 ± 28.1	20 ± 28.3
<i>Prorocentrum trisetium</i> Schiller, 1918	173.3 ± 92.4	291.4 ± 56.6	314.3 ± 20	20 ± 28	80 ± 56.57	1.51 × 10 ⁴ ± 141.4	0	1.25 × 10 ⁴ ± 140	106 ± 19.6	0	55 ± 20.7
<i>Ostreopsis</i> sp.*	260 ± 28.3	7531.8 ± 1242.1	720 ± 160	3153.7 ± 84.9	898.46 ± 140.48	1740 ± 220	75 ± 23.1	33.3 ± 16.3	33.3 ± 16.3	3359.7 ± 1579.3	84 ± 18.5
<i>Scrippsiella</i> sp.	317.6 ± 38	61.2 ± 21.4	112.7 ± 33.3	51.8 ± 14.1	110 ± 20.1	191.1 ± 40.8	53.3 ± 23	133.9 ± 50.1	211.8 ± 42.5	1340 ± 282.8	126.7 ± 21.4
Bacillariophyceae											
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve, 1873	0	125.7 ± 17.9	60 ± 23	0	324 ± 20.9	55 ± 21.3	0	200 ± 20.7	50 ± 23.1	0	0
<i>Cylindrotheca closterium</i> Reimann and Lewin, 1964	26.7 ± 23.1	102.9 ± 53.7	20 ± 28.3	2.4 ± 9.6	2.1 ± 9.1	20 ± 8.4	84 ± 52	40 ± 17.9	20.7 ± 28	0	26.7 ± 23.1
<i>Licmophora gracilis</i> * (Ehrenberg) Grunow, 1867	208 ± 65.7	104 ± 61.1	30 ± 20	40 ± 28.3	40 ± 57.6	20 ± 28.3	61.2 ± 20	90 ± 28.3	0	40 ± 56.6	20 ± 28.3
<i>Navicula</i> sp.	32 ± 17.9	1535.7 ± 61.1	26.7 ± 23.1	50 ± 23.1	60 ± 28.28	60 ± 40	47.3 ± 28.3	30 ± 28	0	866.7 ± 23.1	20 ± 28.3
<i>Thalassionema nitshioides</i> (Grunow) Mereschkowsky, 1902	120 ± 20.7	50 ± 20	26.7 ± 23	1.2 ± 6.9	0	60 ± 13.4	51.4 ± 19.5	53.3 ± 23.1	26.7 ± 23.1	136 ± 23	0
Cyanobacteria											
<i>Oscillatoria</i> sp.	193.8 ± 23	83.3 ± 21	130 ± 23	4.7 ± 13.1	32.6 ± 12.1	40 ± 21.9	72.5 ± 18.1	84 ± 20.5	32 ± 12.8	440 ± 214.2	88 ± 15.1

Table 6
Correlations found between meteorological parameters and the abundance of microalgae species both on macrophytes and water column.

Dinoflagellates	<i>Ostreopsis</i> sp.		<i>Prorocentrum lima</i>		<i>Coolia monotis</i>	
	Macrophytes	Water column	Macrophytes	Water column	Macrophytes	Water column
Air Temperature (°C)	r = 0.23 p = 0.003	r = 0.24 p = 0.002	r = 0.26 p = 0.001	r = 0.37 p = 0	r = 0.27 p = 0	r = 0.29 p = 0
Wind speed (m s ⁻¹)	r = 0.21 p = 0.005	r = 0.38 p = 0	r = 0.52 p = 0	r = 0.36 p = 0	r = 0.2 p = 0.01	r = 0.24 p = 0.002
Rain (mm)	–	r = -0.34 p = 0	r = -0.22 p = 0.005	r = -0.25 p = 0.001	r = -0.29 p = 0	–

Table 7
Chronological summary of harmful microalgae species in the Gulf of Tunis detected in previous studies. Maximum cell concentrations are indicated in cells L⁻¹ and cells g⁻¹ FW. Season of maximum abundance included temperature and salinity values if available. The symbol (–) indicates no data available.

	Location	Season of max. abundance	Max (cells L ⁻¹)	Max (cells g ⁻¹ FW)	Sampled substrate	References	
<i>Ostreopsis siamensis</i>	Bizerte Lagoon	Summer/Autumn	250	–	–	Turki and El Abed (2001)	
	Lake of Tunis	Spring/Summer	100	–	–		
	Lake of Tunis	–	1200	–	–	Turki (2004)	
	Bizerte Lagoon	–	1520	–	–		
	Remel	–	120	–	–	Turki (2005)	
	Ras Zebib	–	120	–	–		
	Bizerte Cape	–	40	–	–		
	Raoued	–	360	–	–		
	Bay of Marsa	Summer/Autumn (T = 27 °C; S = 37.5)	–	3.6 × 10 ³	<i>Posidonia oceanica</i>		
<i>Prorocentrum lima</i>	Lake of Tunis	–	–	34	<i>Cymodocea nodosa</i>	Turki and El Abed (2001)	
	Ghar El Melh Lagoon	Winter	1.5 × 10 ⁴	–	–		
	Lake of Tunis	Autumn	3440	–	–	Turki (2004)	
	Bizerte Lagoon	Spring	1520	–	–		
	Remel	Autumn	200	–	–	Turki (2005)	
	Ras Zebib	Autumn	80	–	–		
	Bizerte Cape	Autumn	200	–	–		
	Ras Angela	Autumn	400	–	–		
	Kalāt Andalous	Spring	700	–	–		
	Raoued	Summer	200	–	–		
	Bay of Marsa	Summer (T = 27 °C; S = 37)	–	2.2 × 10 ⁴	<i>Cymodocea nodosa</i>		
	Bizerte Lagoon	Spring (T = 15 °C; S = 34)	7.25 × 10 ⁴	–	–		
Ghar El Melh Lagoon	Summer (T = 27.6 °C; S = 51.2)	1400	6 × 10 ³	<i>Ruppia cirrhosa</i>	Dhib et al. (2015)		
<i>Coolia monotis</i>	Lake of Tunis	–	300	–	–	Turki (2004)	
	Bizerte Lagoon	–	120	–	–		
	Remel	–	40	–	–	Turki (2005)	
	Ras Zebib	–	360	–	–		
	Bizerte Cape	–	560	–	–		
	Ras Angela	–	80	–	–		
	Raoued	–	80	–	–		
	Bay of Marsa	Autumn (T = 26; S = 36.8)	–	8.4 × 10 ²	<i>C. nodosa</i>		
	Lake of Tunis	Spring (T = 14.6-29.7 °C; S = 37.8-42.6)	5 × 10 ⁵	–	–		Armi et al. (2010)
	Ghar El Melh Lagoon	–	840	–	–		Dhib et al. (2015)

spatial variability explains 12.69% of changes in ED abundances, with only RDA axis 1 supporting a significant effect on this variability (p < 0.05; Fig. 3).

Ostreopsis sp. has positive RDA axes 1 and 2 scores, indicative of clear association with Korbous (K) and Salammbô (S) stations. *Prorocentrum lima* stands out with a negative RDA axis 1 and appears to be further linked to Sidi Rais (SR) and Sidi Daoud (SD) stations. *Coolia monotis* has a negative RDA score, associated mainly with Sidi Ali el Makki (SM) and Gammarth (G) stations.

ED abundance also undergoes a significant change according to season (RDA, F = 15.47, p = 0.001). Temporal variability explains 22.06% of changes in ED abundances, with RDA axes 1 and 2 both

supporting a significant effect on it (p < 0.05; Fig. 4). *P. lima* and *C. monotis* appear to be associated with the spring season. *Ostreopsis* sp. clearly stands out with a positive RDA axis 1 and appears to be associated with summer. Winter and autumn have positive RDA axis 2 scores, indicative of no clear correlation with any ED species.

A significant difference in epiphytic dinoflagellate (ED) abundance was detected according to depth (RDA, F = 3.59, p = 0.004). This factor explains 4.17% of changes in ED abundances, with only RDA axis 1 supporting a significant effect on this variability (p < 0.05; Fig. 5). An association was observed between *P. lima* and the depth of 0.5 m. *Ostreopsis* sp. and *C. monotis* were both found at depths of 0.5 and 1 m.

Significant correlations were found between ED abundances and

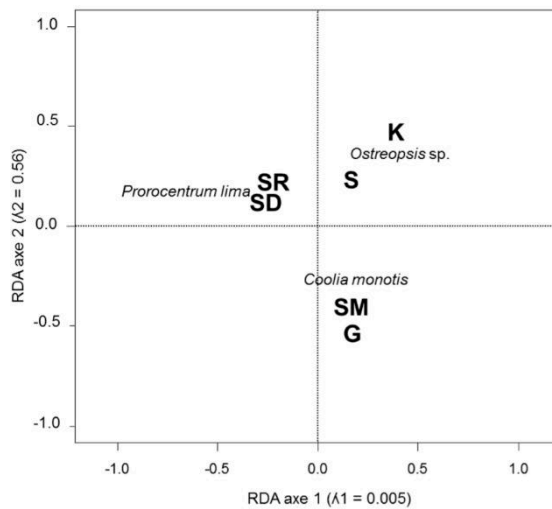


Fig. 2. RDA TriPlot depicting association between epiphytic dinoflagellates and sampling stations in the Gulf of Tunis. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2 .

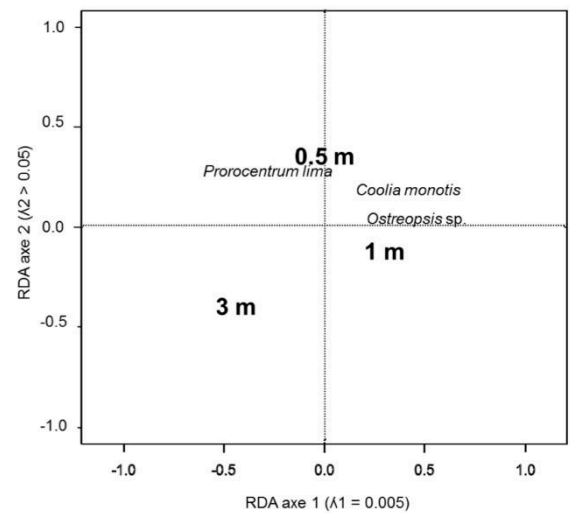


Fig. 4. RDA TriPlot depicting association between epiphytic dinoflagellates and sampled depths in the Gulf of Tunis. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2 .

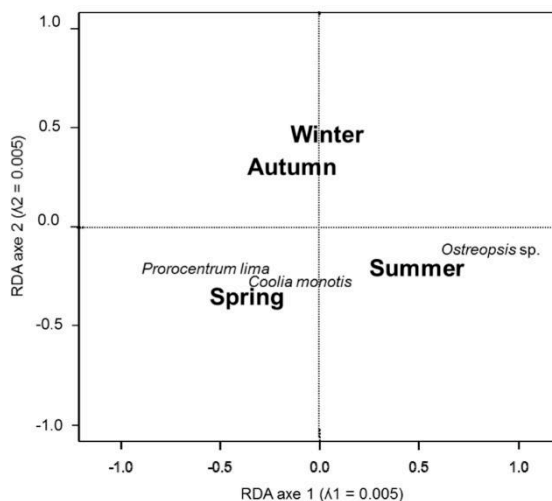


Fig. 3. RDA TriPlot depicting association between epiphytic dinoflagellates and sampling season in the Gulf of Tunis. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2 .

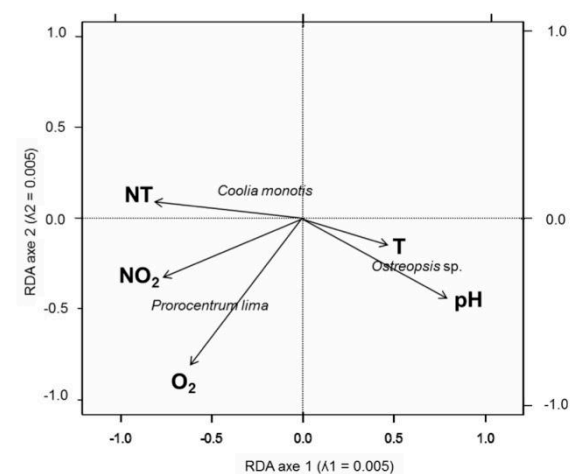


Fig. 5. RDA TriPlot depicting association between epiphytic dinoflagellates and environmental factors in the Gulf of Tunis. Eigenvalues of the first two axes are indicated by λ_1 and λ_2 .

physico-chemical variables, such as, pH (RDA, $F = 28.77$, $p < 0.001$), water temperature (RDA, $F = 5.07$, $p = 0.002$), oxygen (RDA, $F = 5.28$, $p = 0.001$), TN (RDA, $F = 4.86$, $p = 0.002$) and NO_2^- (RDA, $F = 3.73$, $p = 0.01$).

Physico-chemical fluctuations explain 22.76% of changes in ED abundance with RDA axis 1 having a positive score and RDA axis 2 a negative score and, thus, associated with water temperature and pH. *P. lima* has negative axes 1 and 2 scores and appears to be related to oxygen and NO_2^- . *C. monotis* seems to be linked to TN fluctuations.

Positive correlations were found between high air temperature and wind, with the presence of *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C. monotis* on macrophytes. In contrast, negative correlations were found between these species and rainfall (Table 6).

Significant correlations were found between ED fluctuations and sampling times (Fig. 6A,C,E). Sampling between 8h30 and 10h30

appears to be a suitable time for the proliferation of *Ostreopsis* sp. (ANOVA, $F = 13.13$, $p < 0.001$), *P. lima* (ANOVA, $F = 2.48$, $p = 0.01$) and *C. monotis* (ANOVA, $F = 2.65$, $p = 0.009$).

No significant correlations were found between ED distribution and the sampled substrata (ANOVA, $p > 0.05$, Fig. 6B, D, F). Indeed, the maximum abundances of *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C. monotis* were found in both macroalgae and seagrass. For *Ostreopsis* sp., the highest proliferations were registered in the leaves of *Cymodocea nodosa* (seagrass) and *Padina pavonica* (macroalgae). For *P. lima*, maximum concentrations were detected in the leaves of *Cymodocea nodosa* (seagrass) and *Dictyota dichotoma* (macroalgae). For *C. monotis*, the highest abundances were found in the leaves of *Cymodocea nodosa* (seagrass) and *Jania rubens* (macroalgae).

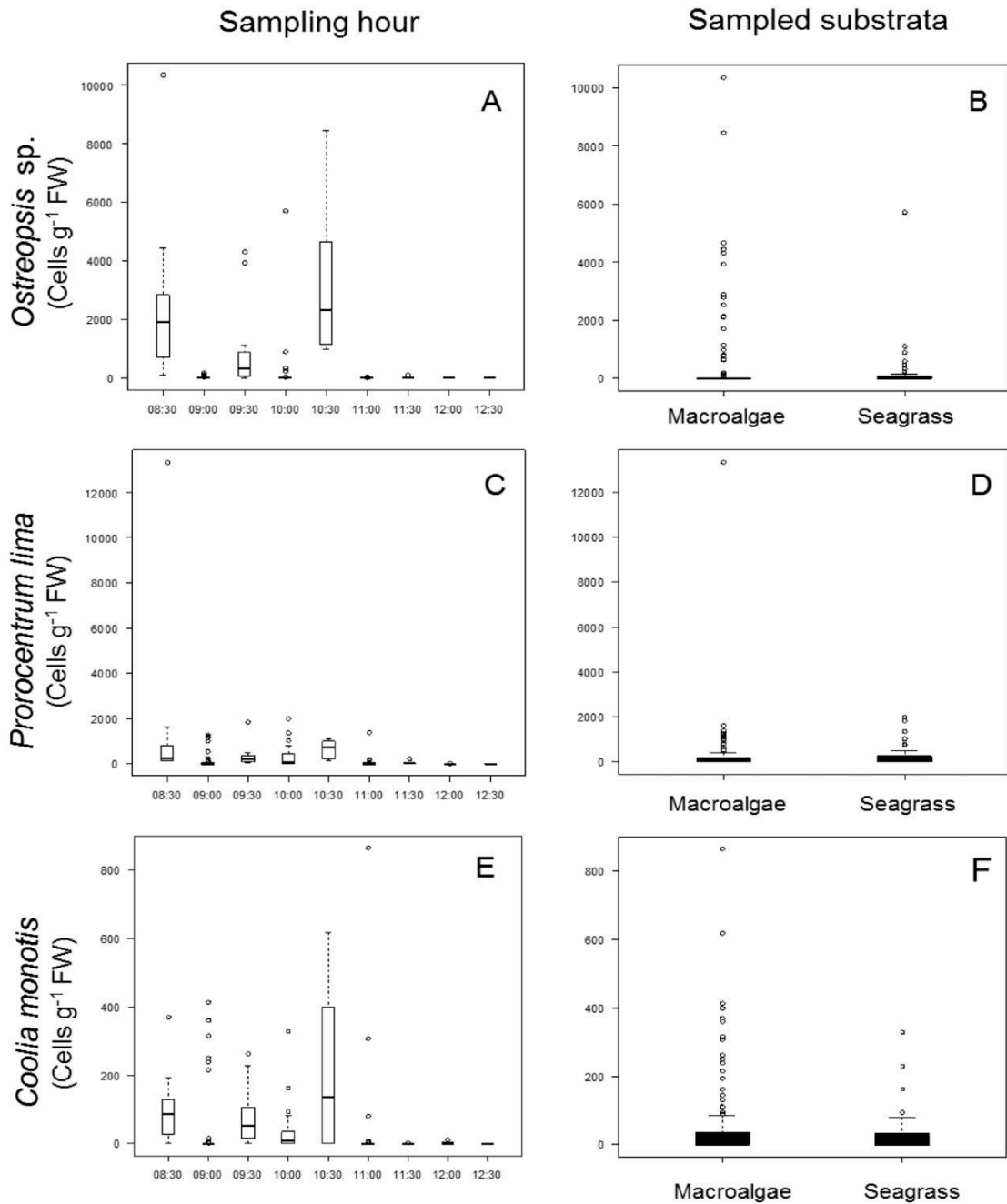


Fig. 6. Boxplots depicting abundance variation of epiphytic dinoflagellates according to sampling time and sampled substrata in the Gulf of Tunis.

3.4. Microalgae species present in water column

Seventy-one microalgae species were observed in the water column (Appendix Table A1), represented mainly by dinoflagellates (50.70% of total abundance), followed by diatoms (39.43% of total abundance) and then cyanobacteria (9.85% of total abundance) (Table 5). Some of these species are known to be epiphytic, such as *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C.*

monotis which were found in the water column at all sites and throughout the sampling periods, especially *Ostreopsis* sp., with a peak of 2.3×10^4 cells L^{-1} at 0.5 m depth recorded at Sidi Rais (SR) during summer. Significant correlations were found between epiphytic and planktonic dinoflagellates belonging to the same species: *Ostreopsis* sp. ($r = 0.54$; $p = 0$), *P. lima* ($r = 0.41$; $p = 0$) and *C. monotis* ($r = 0.29$; $p = 0$) (Fig. 7).

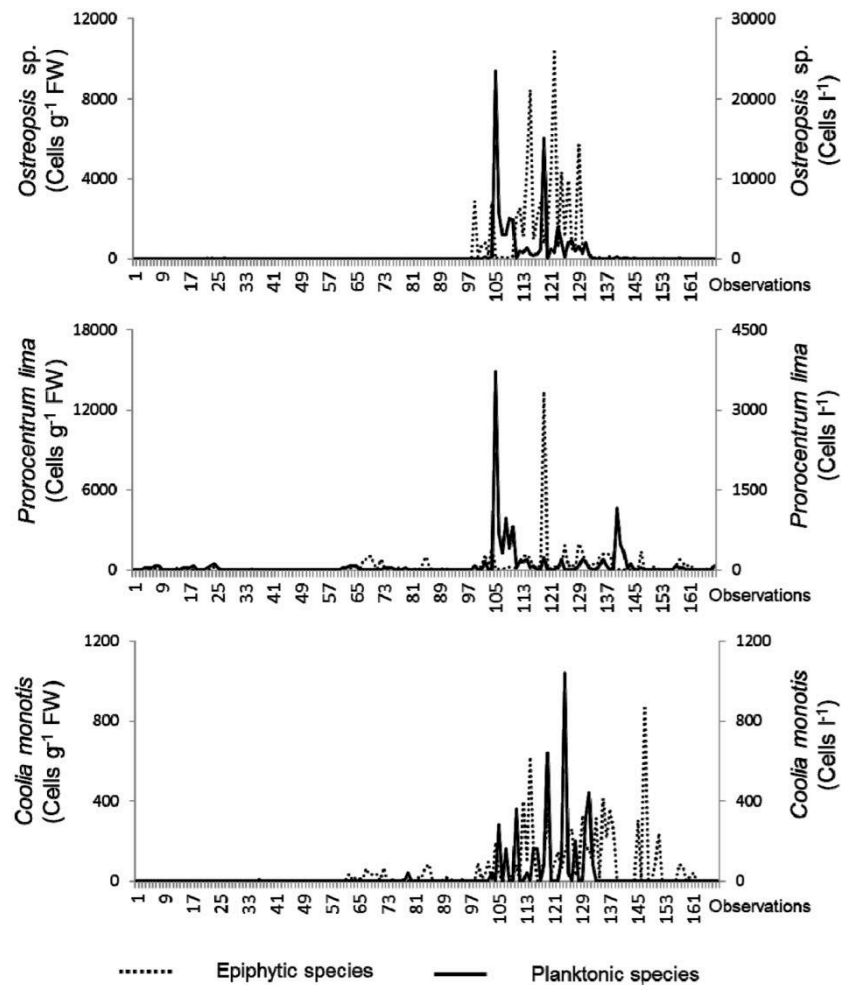


Fig. 7. Variability of some dinoflagellate species in the water column and on macrophytes.

Wind and high air temperature were positively correlated with *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C. monotis* abundances in the water column. In contrast, negative correlations were found for rainfall (Table 6).

4. Discussion

In the present study, dinoflagellates were the dominant group observed at the different Gulf of Tunis sites, both on macrophytes and in the water column, with *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C. monotis* being the most abundant. Other studies report a similar dominance and association of these three dinoflagellates in the shallow waters of Tunisia (Table 7) and the Mediterranean Sea (Penna et al., 2005; Streftaris and Zenetos, 2006; Zingone et al., 2006; Ignatiades and Gotsis-Skretas, 2010; Blanfuné et al., 2015). In this study, high concentrations of these three epiphytic species were registered. *Ostreopsis* sp. has not been observed in the region before with such abundance (up to 10⁴ cells g⁻¹ FW), though Turki (2005) has noted both *P. lima* and *C. monotis*. Such recorded abundances are likely due to the extensive area explored here concomitantly with the 14 macrophytes also examined for hosted microalgae. Unfortunately, the majority of studies of the Gulf of Tunis have been reported from the water column and the few available articles on epiphytic communities deal with restricted areas and one or two

hosts, mainly seagrass (Table 7) and, thus, did not allow better comparison with the present results. In all cases, the trend of increasing BHAB in frequency and intensity is likely to continue (Rhodes, 2011). Among dinoflagellates, these phenomena are observed in particular for the genus *Ostreopsis* (Blanfuné et al., 2015 and references therein).

Though the three dinoflagellate taxa are frequently associated, different environmental and seasonal preferences were noted (see RDA, Figs. 2 and 3). Allelopathic effects may lead to competition among them, since the three species produce chemical compounds inhibiting the proliferation of other microalgae (Legrand et al., 2003; Alcoverro et al., 2004; Granéli et al., 2008; Peirano et al., 2011).

The spatial heterogeneity of *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C. monotis* abundances may also reflect a preference for specific areas that combine all the necessary conditions for their proliferation. This is particularly true for *Ostreopsis* sp., which was more abundant at Korbous (K) and Salammbó (S) stations as these are natural shallow rocky bays with low hydrodynamic regimes. Such conditions promote *Ostreopsis* sp. proliferation while other sites such as SD, characterized by rough waters, are less favorable to species proliferation (Chang et al., 2000; Vila et al., 2001b; Simoni et al., 2003; Shears and Ross, 2009; Totti et al., 2010). Despite the SD conditions, *P. lima* was dominant at this site. Its proliferation can be explained by its resistance to high hydrodynamics

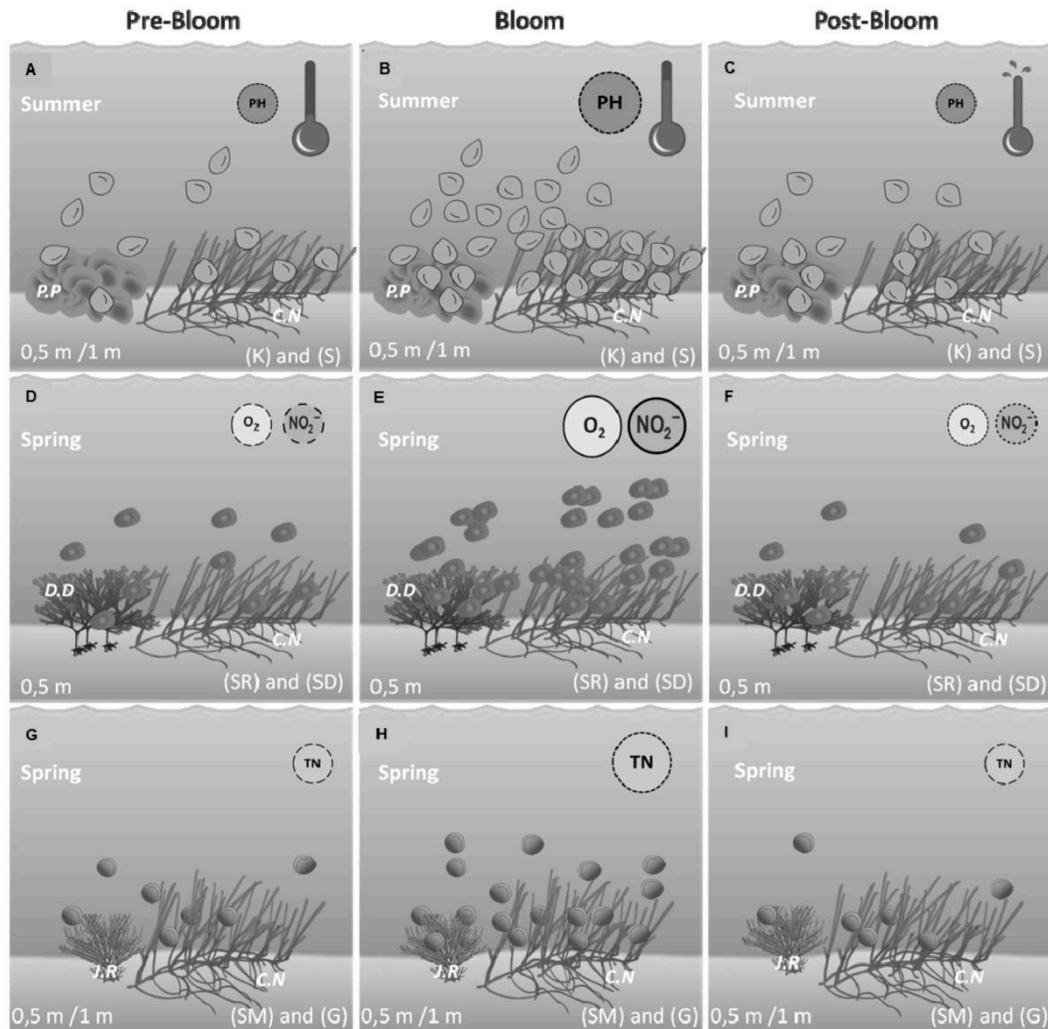


Fig. 8. Scenario of bloom events of *Ostreopsis* sp. (A–C), *Prorocentrum lima* (D–F) and *Coolia monitis* (G–I) in the Gulf of Tunis. (Macrophytes: *Cymodocea nodosa* (C.N); *Padina pavonica* (P.P); *Dictyota dichotoma* (D.D); *Jania rubens* (J.R)).

(Dhib et al., 2013).

The abundance of *Ostreopsis* sp., *P. lima* and *C. monitis* also undergoes a significant change in response to different environmental parameters. Indeed, the results show that *Ostreopsis* sp. is present throughout the year, with highest abundance in summer when optimal growth conditions are combined, especially seawater temperatures, as already shown in temperate areas (Simoni et al., 2004; Turki, 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Shears and Ross, 2009; Ungaro et al., 2010; Mangialajo et al., 2011; Ben brahim et al., 2015). However, when temperatures exceed 28.3 °C, *Ostreopsis* sp. abundance begins to fall. In addition to temperature, salinity appears to play a role in benthic dinoflagellate proliferation (Tindall and Morton, 1998). In fact, the highest abundance of *Ostreopsis* sp. was observed when salinity and seawater temperature reached their maximum values (Turki, 2004; Pistocchi et al., 2011; Pezзолesi et al., 2014), which is not supported by the present statistical results for salinity. It can thus be hypothesized

that the influence of salinity on *Ostreopsis* sp. proliferation may be masked because of the non-significant variation of salinity according to station (ANOVA test). For instance, in summer, when *Ostreopsis* sp. abundance peaks at S and K stations, similar peaks of salinity were observed at all stations without significant variation that could prove its influence on *Ostreopsis* sp. proliferation.

The pH values also appear to have a significant effect on *Ostreopsis* sp. fluctuations. Indeed, it is well known that macrophytes contribute to increasing alkalinity by photosynthesis and are typically considered to act as an ecosystem engineer by playing an important role in structuring benthic assemblages (Orth and Van Montfrans, 1984; Boström et al., 2006; Bos et al., 2007). The proliferation of *Ostreopsis* sp. was then indirectly in close relation with macrophyte beds existing at S and K stations (Table 2) such as *Cymodocea nodosa* and *Padina pavonica* on which the maximum *Ostreopsis* sp. concentrations were already registered.

Overall, this could furnish insight into the importance of S and K stations as a perfect niche for *Ostreopsis* sp., containing a group of favored conditions such as hydrodynamic regime, summer temperature and typical macrophytes.

Ostreopsis abundances and oxygen saturation did not show a clear correlation, despite the decrease in the dissolved oxygen content during the *Ostreopsis* bloom period in summer. Moreover, the results did not show any impact of nutrients on the *Ostreopsis* sp. abundance. However, in other studies, nutrients were crucial in *Ostreopsis* species growth (Vila et al., 2001a; Cohu et al., 2011, 2013; Accoroni et al., 2015). Nutrient concentrations did not appear to be a limiting factor on *Ostreopsis* sp. fluctuations in the Gulf of Tunis.

The bloom development of *P. lima* and *C. monotis* appears to be more closely related to the spring. The peak appearance of these two species before *Ostreopsis* sp. may imply the existence of a succession pattern between these three harmful species. The presence of such a succession may be supported by another, previously detected in the same region with autumn-spring proliferation of *P. lima* and *C. monotis* and summer blooms of *Ostreopsis* sp. (Turki, 2005). Possible succession patterns and niche separation between potentially toxic dinoflagellates in epiphytic assemblages has also been suggested by other authors (Aligizaki et al., 2009; Cohu and Lemée, 2012).

The high nitrite values detected in spring seem to improve the proliferation of *P. lima*, which has already been reported in other studies (Parsons and Preskitt, 2007; Varkitzi et al., 2010). Additionally, *P. lima* proliferation appears to be related to high oxygen values, which is probably in direct relation with the rapid vegetative growth of most macrophytes in spring.

The high abundance of *C. monotis*, in correlation with high concentrations of total nitrogen in spring, has been previously observed in Tunisian waters, particularly in the Lake of Tunis, where recurrent *C. monotis* proliferation took place in late spring and early summer, in correlation with high concentrations of nitrogenous nutrients (Armi et al., 2010).

The three species clearly preferred the warm season with positive correlations found with warmer air temperature. The wind facilitates the intensive mixing of water masses and thus helps the dispersion of epiphytic microalgae in the water column (Vila et al., 2001b; Totti et al., 2010). Likewise, negative species correlations with rainfall may be explained by decreased salinity, an important factor in benthic dinoflagellate proliferation (Tindall and Morton, 1998; Pistocchi et al., 2011; Pezzolesi et al., 2014).

The preferred depth for *Ostreopsis* sp. proliferation is, generally, between 0.5 and 1 m, while beyond 3 m depth *Ostreopsis* sp. proliferation declines, showing the impact of light intensity on the species vertical distribution (Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Okolodkov et al., 2007; Mangialajo et al., 2008; Shears and Ross, 2009; Totti et al., 2010). This is concomitant with the present results that show the same trends of *Ostreopsis* sp. distribution at depth. The two species *P. lima* and *C. monotis* follow the same trend as *Ostreopsis* sp., with a vertical distribution decrease. However, some authors have reported the presence of these three dinoflagellate species at greater depths (Mabrouk et al., 2011; Cohu and Lemée, 2012).

Given the variety of macrophyte species present in the Gulf of Tunis, especially in shallow coastal waters, only the most representative species from each site and during each season were collected. No significant correlations or preferences were observed between the studied dinoflagellate species and the nature of the sampled substrate

(macroalgae or seagrass) (Faust et al., 1996; Turki, 2005; Battocchi et al., 2010; Totti et al., 2010; Mabrouk et al., 2014; Moncer et al., 2017).

Correlations between the epiphytic and planktonic dinoflagellates belonging to the same species were obvious. This may be due to biological rhythms of cell detachment from the macrophyte (Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Mangialajo et al., 2011) or to resuspension caused by swimmers. This illustrates the great role of macrophytes as an important source of microalgae to the water column. Strong winds are often a notable pattern in coastal and shallow waters as they contribute to the intensive mixing of water masses (Klinkenberg and Schumann, 1994; Telesh, 2004; Telesh et al., 2008).

4.1. Scenario of bloom events in the Gulf of Tunis

The evolution of bloom events for the three harmful epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*, appears to follow a defined mechanism in the Gulf of Tunis (Fig. 8).

The blooms of *Ostreopsis* sp. appear to be related to a synergy between two factors, water temperature and pH. In summer, temperatures reach an optimum, ranging from 24 to 27 °C. Above this range, species abundance decreases significantly, both on the macrophytes and in the water column. The same pattern is observed for pH for which a rise of 9.34 increases *Ostreopsis* sp. abundance, probably due to its indirect relation with the existing macrophyte beds.

Bloom episodes of *P. lima* and *C. monotis* occur mainly in spring. Proliferation of *P. lima* appears to be linked to optimal ranges of oxygen (an average of 10.5 mg L⁻¹) and nitrite (an average of 0.20 μmol L⁻¹) during this season. *C. monotis* abundance follows the same pattern, as well, and is mainly impacted by the total nitrogen rate (an average of 17.6 μmol L⁻¹ in spring).

5. Conclusion

This first study of the Gulf of Tunis shows that no zone sampled was devoid of episodes of toxic epiphytic dinoflagellates, the most critical seasons being summer (for *Ostreopsis* sp.) and spring (for *C. monotis* and *P. lima*). A marked preference was also noted for specific areas (Korbous and Salammbô for *Ostreopsis* sp.), (Sidi Daoud and Sidi Rais for *P. lima*) and Sidi Ali el Makki and Gammarth for *C. monotis*). The species' favored habitats, along with relevant ecological factors, have now become clearer. As these cells are easily resuspended in the water column, hydrodynamism can, therefore, enhance or hinder their development. Due to the harm potentially caused by *Ostreopsis* sp. and the highest concentrations detected on macrophytes, monitoring programs, particularly of Tunisia's shallow coastal waters, should include epiphytic microalgal studies for early warning of harmful algae presence.

Acknowledgements

This study was conducted by Mohamed Amine Hachani as a part of his PhD research (co-directed at the University of Franche-Comté, CNRS 6249, Besançon, France, and at the Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Tunisia). This publication has been produced with the financial assistance of the European Union under the ENPI CBC Mediterranean Sea Basin Program (M3-HABs project). We express our appreciation to the editor Professor Sandra E. Shumway and the anonymous reviewers for helping to improve our paper. [SS]

Appendix A

Table A1

List of planktonic and epiphytic microalgae detected in the water column and on macrophytes during the study period; Max: maximal concentrations; DSP: diarrhetic shellfish poisoning; HA: hypoxia/anoxia; PSP: paralytic shellfish poisoning; ASP: amnesic shellfish poisoning; PTX: palytoxin; Y: yassotoxin; BF: bloom forming; P: species found with plankton; E: species found with epiphytes.

Microalgae	Habitat types	Nuisance types	Max (cells L ⁻¹)	Max (cells g ⁻¹ FW)
Dinophyceae				
<i>Akashiwo sanguinea</i> Hirasaka, 1922	P	BF	40	–
<i>Alexandrium catenella</i> (Whedon and Kofoid) Balech, 1985	P	PSP	1160	–
<i>Amphidium</i> sp.	P		160	–
<i>Coolia monotis</i> Meunier, 1919	P/E	Cooliatoxin	1040	865
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparède and Lachmann, 1859	P	DSP/ OA	40	–
<i>Dinophysis sacculus</i> Stein, 1883	P	DSP	80	–
<i>Diploneis</i> sp.	P		160	–
<i>Diplopsalis</i> sp.	P		160	–
<i>Gonyaulax polyedra</i> Stein, 1883	P	Y	80	–
<i>Gonyaulax spinifera</i> Diesing, 1866	P	Y	40	–
<i>Gonyaulax</i> sp.	P	Y	80	–
<i>Gymnodinium aureolum</i> Daugbjerg and Henriksen, 2000	P		640	–
<i>Gymnodinium catenatum</i> Graham, 1943	P	DSP	1.23 × 10 ⁵	–
<i>Gymnodinium sanguinum</i> Hirasaka, 1922	P	BF	40	–
<i>Gyrodinium spirale</i> (Bergh) Kofoid & Swezy 1921	P		40	–
<i>Polykrikos</i> sp.	P		40	–
<i>Prorocentrum concavum</i> Fukuyo, 1981	P	DSP/ OA	600	–
<i>Prorocentrum gracile</i> Schütt, 1895	P/E	BF	40	865
<i>Prorocentrum lima</i> Dodge, 1975	P/E	DSP/ OA	3720	1.33 × 10 ⁴
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg, 1833	P/E	BF/HA	200	6
<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller, 1933	P	Neurotoxin	120	–
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller, 1918	P/E	BF	1.73 × 10 ⁵	45
<i>Protoperidinium conicum</i> (Gran) Balech, 1974	P		40	–
<i>Protoperidinium diabolus</i> (Cleve) Balech, 1974	P		40	–
<i>Protoperidinium divergens</i> (Ehrenberg) Balech, 1974	P		40	–
<i>Protoperidinium</i> sp.	P		40	–
<i>Pyrophacus</i> sp.	P		40	–
<i>Scrippsiella trochoidea</i> Stein, 1883	P	BF	280	–
<i>Scrippsiella</i> spp.	P	BF	4960	–
<i>Ostreopsis</i> sp.	P/E	PTX	2.35 × 10 ⁴	1.03 × 10 ⁵
<i>Oxyphysis oxytoxoides</i> Kofoid, 1926	P		40	–
<i>Oxytoxum scolopax</i> Stein, 1883	P		40	–
<i>Tripos furca</i> (Ehrenberg) Claparède and Lachmann, 1859	P	HA	80	–
<i>Tripos trichoceros</i> (Ehrenberg) Kofoid, 1881	P		40	–
Bacillariophyceae				
<i>Achnanthes taeniata</i> Grunow, 1880	P		200	–
<i>Bacillaria</i> sp.	P		280	–
<i>Bacteriastrium</i> sp.	P		40	–
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve, 1873	P	BF	1080	–
<i>Chaetoceros socialis</i> Lauder, 1864	P	BF	400	–
<i>Chaetoceros</i> spp.	P	BF	400	–
<i>Climacosphenia</i> sp.	P		200	–
<i>Cocconeis</i> sp.	P		40	–
<i>Cylindrotheca closterium</i> Reimann and Lewin, 1964	P	BF	40	–
<i>Gyrosigma</i> sp.	P		200	–
<i>Guinardia</i> sp.	P		640	–
<i>Licmophora gracilis</i> (Ehrenberg) Grunow, 1867	P/E		280	4.38 × 10 ⁵
<i>Navicula</i> spp.	P/E		6654	2.54 × 10 ⁴
<i>Nitzschia linearis</i> Smith, 1853	P		120	–
<i>Nitzschia</i> sp.	P		2520	–
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	P	ASP	240	–
<i>Rhizosolenia styliformis</i> Brightwell, 1858	P		80	–
<i>Thalassionema nitzshioides</i> (Grunow) Mereschkowsky, 1902	P	BF	520	–
<i>Thalassiosira</i> sp.	P		120	–
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve, 1873	P	HA	280	–
<i>Striatella unipunctata</i> Agardh, 1832	P/E		80	2340
Cyanobacteria				
<i>Anabaena</i> sp.	P	PSP/Anatoxin	40	–
<i>Chroococcus</i> sp.	P		40	–
<i>Lyngbya</i> sp.	P	Lyngbyatoxin	280	–
<i>Oscillatoria</i> sp.	P	Cytotoxin	1080	–
<i>Spirulina</i> sp.	P		40	–

References

Rhodes, L.L., Holland, P., McNabb, P., Selwood, A.I., Adamson, J.E., Quilliam, M.A., 2006. Molluscan shellfish safety. In: Henshilwood (Ed.), Galway, Ireland, pp. 235–241. Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. *Procentrum lima* Strains from New Zealand: DSP Toxin Profiles and Uptake and Conversion in Greenshell Mussel, 2004.

Accoroni, S., Totti, C., 2016. The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: a review. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 7, 1–15.

Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2512–2519.

Accoroni, S., Glibert, P.M., Pichierrì, S., Romagnoli, T., Marini, M., Totti, C., 2015. A conceptual model of annual *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae* 45, 14–25.

Aissaoui, A., Dhib, A., Reguera, B., Ben Hassine, O.K., Turki, S., Aleya, L., 2014. First evidence of cell deformation occurrence during a *Dinophysis* bloom along the shores of the Gulf of Tunis (SW Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 39, 191–201.

Alcoverro, T., Pérez, M., Romero, J., 2004. Importance of within-shoot epiphyte distribution for the carbon budget of seagrasses: the example of *Posidonia oceanica*. *Bot. Mar.* 47.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717–730.

Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicol.* 51, 418–427.

Aligizaki, K., Katikou, P., Baxevanis, A.D., Abatzopoulos, T.J., 2009. Potentially toxic epiphytic *Procentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters. *Harmful Algae* 8, 299–311.

APHA (American Public Health Association), 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. AmericanPublicHealthAssociation, Washington, DC.

Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Ben Maiz, N., 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environ. Monit. Assess.* 164, 423–433.

Armi, Z., Milandri, A., Turki, S., Hajjem, B., 2011. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium tamarense* in the North Lake of Tunis: bloom characteristics and the occurrence of paralytic shellfish toxin. *Afr. J. Aquat. Sci.* 36, 47–56.

Battocchi, C., Totti, C., Vila, M., Masó, M., Capellacci, S., Accoroni, S., Reñé, A., Scardi, M., Penna, A., 2010. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1074–1084.

Ben brahim, M., Feki, M., Bouain, A., 2015. Occurrences of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in relation with environmental factors in Kerkennah Island (Southern coast of Tunisia). *J. Coast. Life Med.* 3, 596–599.

Blanfuné, A., Boudouresque, C.F., Grosseil, H., Thibaut, T., 2015. Distribution and abundance of *Ostreopsis* spp. and associated species (Dinophyceae) in the northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 12332–12346.

Bos, A.R., Bouma, T.J., de Kort, G.L.J., van Katwijk, M.M., 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: sediment accretion and modification. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 74, 344–348.

Boström, C., Jackson, E.L., Simenstad, C.A., 2006. Seagrass landscapes and their effects on associated fauna: a review. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 68, 383–403.

Brahim, M., Abdelfattah, A., Sammari, C., Aleya, L., 2015. Surface sediment dynamics along with hydrodynamics along the shores of Tunis Gulf (north-eastern Mediterranean). *J. Afr. Earth Sci.* 103, 30–41.

Chang, F.H., Shimizu, Y., Hay, B., Stewart, R., Mackay, G., Tasker, R., 2000. Three recently recorded *Ostreopsis* spp. (Dinophyceae) in New Zealand: temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 34, 29–39.

Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 19, 111–120.

Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata*, *Procentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cah. Biol. Mar.* 53, 373–380.

Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.-P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.-M., Lemée, R., 2011. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2681–2691.

Cohu, S., Mangialajo, L., Thibaut, T., Blanfuné, A., Marro, S., Lemée, R., 2013. Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 24, 32–44.

Daly Yahia-Kefi, O., NéZan, É., Daly Yahia, M.N., 2001. Sur la présence du genre *Alexandrium halim* (Dinoflagellés) dans la baie de Tunis (Tunisie). *Oceanol. Acta* 24, 17–25.

Deeds, J.R., Schwartz, M.D., 2010. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicol.* 56, 150–162.

Dhib, A., Frossard, V., Turki, S., Aleya, L., 2013. Dynamics of harmful dinoflagellates driven by temperature and salinity in a northeastern Mediterranean lagoon. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3369–3382.

Dhib, A., Fertouna-Bellakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2015. Harmful planktonic and epiphytic microalgae in a Mediterranean Lagoon: the contribution of the macrophyte *Ruppia cirrhosa* to microalgae dissemination. *Harmful Algae* 45, 1–13.

Faust, M.A., 1991. Morphology of ciguatera-causing *Procentrum lima* (pyrophyta) from widely differing sites. *J. Phycol.* 27, 642–648.

Faust, M.A., Gualledge, R.A., 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Department of Systematic Biology – Biology National Museum of Natural History, Washington, DC 144 pp.

Faust, M.A., Morton, S.L., Quod, J.P., 1996. Further SEM study of marine dinoflagellates: the genus *ostreopsis* (dinophyceae). *J. Phycol.* 32, 1053–1065.

GEOHAB, 2012. Core research project: HABS in benthic systems. In: Berdalet, E., Tester, P., Zingone, A. (Eds.), Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark 64 pp.

Giraoudoux, P., 2012. *Pgirmess: Data Analysis in Ecology*. <http://perso.orange.fr/giraoudoux>.

Granéli, E., Vidyarthana, N.K., Funari, E., Cumaratunga, R., 2008. Climate change and benthic Dinoflagellates the *Ostreopsis ovata* case Hong Kong, 3–7 November, 2008. Proceedings of the 13th International Conference on Harmful Algae.

Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.

Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., 1995. Manual on harmful microalgae. IOC Manuals and Guides. UNESCO pp. 551.

Holmes, M.J., Lewis, R.J., Jones, A., Hoy, A.W.W., 1995. Coolitoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (dinophyceae). *Nat. Toxins* 3, 355–362.

Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., 2010. A review on toxic and harmful algae in Greek coastal waters (E. Mediterranean Sea). *Toxins* 2, 1019–1037.

Klinkenberg, G., Schumann, R., 1994. Micro-organism activity in aggregate layers in shallow eutrophic brackish water as influenced by wind induced mixing: an experimental approach. *Neth. J. Aquat. Ecol.* 28, 421–426.

Légrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O., Granéli, E., 2003. Allelopathy in phytoplankton – biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42, 406–419.

Mabrouk, L., Hamza, A., Brahim, M.B., Bradai, M.N., 2011. Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia: temporal and depth distribution of microepiphytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32, 148–161.

Mabrouk, L., Ben Brahim, M., Hamza, A., Bradai, M.N., 2014. Temporal and spatial zonation of macroepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia. *Marine Ecology* 36, 77–92.

Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemee, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1209–1214.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicol.* 57, 408–420.

Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB): problematic and conditions that induce them. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 620–630.

MEDD, 2009. Etude de pré-investissement sur la dépollution du golfe de Tunis – Titre II: Caractérisation du golfe de Tunis. Groupement COMETE Engineering, pp. 1–286.

Moestrup, Ø., Akselmann, R., Fraga, S., Hoppenrath, M., Iwataki, M., Komárek, J., Larsen, J., Lundholm, N., Zingone, A. (Eds) (2009 onwards). IOC - UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <http://www.marinespecies.org/hab> on 2018-04-25.

Moncer, M., Hamza, A., Feki-Sahnoun, W., Mabrouk, L., Bel Hassen, M., 2017. Variability patterns of epibenthic microalgae in eastern Tunisian coasts. *Sci. Mar.* 81, 487.

Nascimento, S.M., Purdie, D.A., Morris, S., 2005. Morphology, toxin composition and pigment content of *Procentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. *Toxicol.* 45, 633–649.

Okolodkov, Y., Campos-Bautista, G., Gárate-Lizárraga, I., González-González, J., Hoppenrath, M., Arenas, V., 2007. Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* 47, 223–237.

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. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Orth, R.J., Van Montfrans, J., 1984. Epiphyte-seagrass relationships with an emphasis on the role of micrograzing: a review. *Aquat. Bot.* 18, 43–69.

Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai’i. *Harmful Algae* 6, 658–669.

Peirano, A., Cocito, S., Banfi, V., Cupido, R., Damasso, V., Farina, G., Lombardi, C., Mauro, R., Morri, C., Roncarolo, I., Saldaña, S., Savini, D., Sgorbini, S., Silvestri, C., Stoppelli, N., Torricelli, L., Bianchi, C.N., 2011. Phenology of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: medium and long-term cycles and climate inferences. *Aquat. Bot.* 94, 77–92.

Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobó, P., Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences. *J. Phycol.* 41, 212–225.

Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Fratangeli, F., Dell’Aversano, C., Dello Iacovo, E., Tartaglione, L., 2014. Growth dynamics in relation to the production of the main cellular

- components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. Harmful Algae 36, 1–10.
- Pistocchi, R., Pezolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. Toxicon 57, 421–428.
- R Development Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. R Development Core Team, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Ramos, V., Vasconcelos, V., 2010. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. Mar. Drugs 8, 2021–2037.
- Rhodes, L., 2011. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. Toxicon 57, 400–407.
- Romdhane, M.S., Eilertsen, H.C., Daly Yahia, O., Daly Yahia, M.N., 1998. Toxic dinoflagellate blooms in Tunisia lagoons: causes, and consequences for aquaculture. Harmful Algae 80–83.
- Sahraoui, I., Hlaili, A.S., Mabrouk, H.H., Léger, C., Bates, S.S., 2009. Blooms of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* h. peragallo in Bizerte Lagoon (Tunisia, SW Mediterranean). Diatom Res. 24, 175–190.
- Sahraoui, I., Bouchouicha, D., Mabrouk, H.H., Hlaili, A.S., 2013. Driving factors of the potentially toxic and harmful species of *Prorocentrum* Ehrenberg in a semi-enclosed Mediterranean lagoon (Tunisia, SW Mediterranean). Mediterranean Mar. Sci. 14, 353–362.
- Sakka Hlaili, A., Chikhaoui, M.A., El Grami, B., Hadj Mabrouk, H., 2006. Effects of N and P supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 333, 79–96.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. Harmful Algae 8, 916–925.
- Simoni, F., Gaddi, A., Paolo, C.D., Lepri, L., 2003. Harmful epiphytic dinoflagellate on Tyrrhenian Sea reefs. Harmful Algae News 24, 13–14.
- Simoni, F., Di Paolo, C., Gori, L., Lepri, L., Mancino, A., Falaschi, A., 2004. Further investigation on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima* on the macroalgae of artificial and natural reefs in the Northern Tyrrhenian Sea. Harmful Algae News 26, 6–7.
- Smida, D., Sahraoui, I., Mabrouk, H.H., Sakka Hlaili, A., 2012. Dynamique saisonnière du genre *Alexandrium* (dinoflagellé potentiellement toxique) dans la lagune de Bizerte (Nord de la Tunisie) et contrôle par les facteurs abiotiques environnants. C. R. Biol. 335, 406–416.
- Streftaris, N., Zenetos, A., 2006. Alien marine species in the Mediterranean—the 100 ‘Worst Invasives’ and their impact. Mediterranean Mar. Sci. 7, 87.
- Telesh, I.V., 2004. Plankton of the Baltic estuarine ecosystems with emphasis on Neva Estuary: a review of present knowledge and research perspectives. Mar. Pollut. Bull. 49, 206–219.
- Telesh, I.V., Golubkov, S.M., Alimov, A.F., 2008. The Neva Estuary ecosystem. In: Schiewer, U. (Ed.), Ecology of Baltic Coastal Waters. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg pp. 259–284.
- Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. NATO ASI Series G41. Springer-Verlag, Berlin pp. 293–313.
- Tomas, C.R., Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., Steidinger, K.A., Tanger, K., Thronsen, J., Heimdal, B.R., 1996. In: Tomas, C. (Ed.), Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego, CA p. 589.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. Harmful Algae 9, 233–239.
- 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 31. Bulletin Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, pp. 83–96.
- Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the gulf of Tunis. Cah. Biol. Mar. 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., Harzallah, A., Sammari, C., 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the lake of Bizerte and the Gulf of Gabes. Cah. Biol. Mar. 47, 253–259.
- Turki, S., Dhib, A., Fertouna-Bellakhal, M., Frossard, V., Balti, 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.
- Ungaro, N., Pastorelli, A.M., Di Festa, T., Galise, I., Romano, C., Assennato, G., Blonda, V., Perrino, V., 2010. Annual trend of the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in two sites along the Southern Adriatic coast. Biol. Mar. Mediterranea 17, 183–184.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9, 1–38.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environ. Health Perspect. 108, 133–141.
- Varkitzi, I., Pagou, K., Granéli, E., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C., Pavlidou, A., Montesanto, B., Economou-Amilli, A., 2010. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. Harmful Algae 9, 304–311.
- Vila, M., Camp, J., Garcés, E., Maso, M., Delgado, M., 2001a. High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. J. Plankton Res. 23, 497–514.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001b. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. Aquat. Microb. Ecol. 26, 51–60.
- Zingone, A., Siano, R., D'Alelio, D., Sarno, D., 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). Harmful Algae 5, 321–337.

Chapitre 4

Efflorescences d'*O. cf. ovata* du golfe de Tunis

Chapitre 4. Efflorescences d'*O. cf. ovata* du golfe de Tunis

Après avoir caractérisé la variabilité saisonnière des abondances des microalgues épiphytes, nous sommes intéressés plus particulièrement aux variations des microalgues du G. *Ostreopsis*. Suite à la localisation des sites et de la période d'apparition des microalgues du G. *Ostreopsis* dans le golfe de Tunis. L'étude présentée dans ce Chapitre a ainsi été menée au niveau de 5 stations : Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR), Sidi Ali el Mekki (SM), Cap Zebib (CZ) et Salammbô (S). Afin de mettre en évidence un éventuel impact de la nature des macrophytes la plupart des stations sont caractérisés par un substrat rocheux avec une couverture végétale constituée de macroalgues, à l'exception de Sidi Rais caractérisé par un récif barrière de *Posidonia oceanica*. Les stations de Sidi Daoud et Cap Zebib ont été choisies afin de mettre en évidence un éventuel impact de l'exposition à un fort hydrodynamisme. La station de Salammbô présentait tous les critères préférentiels pour le développement des microalgues du G. *Ostreopsis* nous l'avons donc considérée comme la station de référence. Dans la première partie de ce chapitre nous avons essayé d'identifier les espèces du G. *Ostreopsis* des souches en provenance des 5 stations d'échantillonnage, à partir de (i) la disposition, la morphologie et les dimensions des thèques et (ii) une analyse morphométrique basée sur des mesures du diamètre dorso-ventral (DV), le trans-diamètre (W), le diamètre antéro-postérieur (AP) et les ratios DV/AP, DV/W et AP/W. Nous avons ensuite réalisé durant la saison estivale un suivi avec une fréquence d'échantillonnage hebdomadaire pendant deux années successives (2015 et 2016). Les interactions entre le développement d'*Ostreopsis cf. ovata* et plusieurs paramètres environnementaux : Physico-chimiques (température de l'eau, salinité, oxygène dissous et pH), les teneurs en nutriments (NT, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PT, PO₄³⁻ et Si(OH)₄) et les teneurs en chlorophylle *a* ont été analysées. L'un des principaux objectifs du projet M3-HABs est la mise en place d'une stratégie commune basée sur l'élaboration d'approches de comptage rapide et automatique d'*Ostreopsis* (MOL et OPR), nous avons donc essayé ces méthodes alternatives de comptages sur des échantillons de l'année 2015 en provenance de la station de Salammbô. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à une nouvelle approche basée sur l'établissement d'un modèle de prévision qui s'appuie sur des variables environnementales facilement mesurables, cela dans le but de la détection préventive et l'amélioration des connaissances générales des risques liés aux efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* dans les eaux côtières du golfe de Tunis.

Chapitre 4. Efflorescences d'*O. cf. ovata* du golfe de Tunis

1 Identification des espèces du Genre *Ostreopsis* du golfe de Tunis

1.1 Caractères d'identification morphologique

1.1.1 Description des cellules

Les espèces du G. *Ostreopsis* provenant des 5 stations de prélèvement Salammbô (S), Sidi Daoud (SD), Sidi Rais (SR) Sidi Ali el Mekki (SM) et Cap Zebib (CZ) sont de forme ovale. (Figure 44 a,b). La surface des plaques est lisse et couverte par des pores de forme arrondie. La plaque du pore apical Po présente les mêmes caractéristiques, elle est légèrement incurvée et située du côté dorsal gauche de l'épithèque. Elle est directement en contact avec les plaques 1', 2', 3', 2'' et 3''. Sa longueur (L) varie de 3,66 à 8,82 μm , la largeur (l) entre 0,80 à 1,97 μm et un rapport L/l de l'ordre de 2,62 à 9,16 μm (n=1206) (Figure 44 a,b).

Au niveau de l'épithèque, la plaque 1', située au centre est grande et hexagonale. Elle est en contact avec les plaques 2', 3', 1'', 2'', 6'' et 7'' avec une longueur qui varie de 16,79 à 31,91 μm , une largeur de 4,01 à 9,88 μm et un rapport L/l de l'ordre de 2,27 à 4,93 μm (n=1206) (Tableau 14). La plaque 3' pentagonale, du côté dorsal gauche de l'épithèque est connectée aux plaques 1', 2', 3'', 4'', 5'' et 6''. La plaque 1'' est quadrangulaire et connectée aux plaques 2'', 1' et 7''. La plaque 2'' est longue, connectée aux plaques 1', 2' et 3''. La plaque 3'' est mince et située entre 2'' et 4'', entourée latéralement par les plaques 2' et 3'. Les plaques 4'' et 5'' sont quadrangulaires liées entre elles et avec la plaque 3'. La plaque 6'' pentagonale est large et liée à la plaque 7'' qui est quadrangulaire.

Au niveau de l'hypothèque, la plaque 1p est pentagonale et allongée entourée par les plaques 1''', 2''', 3''', 4'''' et 5'''. La longueur varie de 13,69 à 24,49 μm , la largeur comprise entre 4,48 à 10,80 μm et un rapport L/l de l'ordre de 2,04 à 3,83 μm (n=1206). Les plaques 3''' et 4'''' sont

larges et respectivement liées aux plaques 2''' et 5'''. Les plaques 1''', 1'''' et 2'''' sont très proches du pore ventral et difficiles à différencier. Le cingulum, étroit à l'équateur de la cellule, longe la cellule, ayant une largeur de l'ordre de 1,04 à 2,88 µm (Tableau 14).

Tableau 14 : Mensurations effectuées sur les plaques thécales des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis (1') Plaque de l'épithèque, (Po) Pore apical, (1p) Plaque de l'hypothèque et cingulum, (S) Salammbô, (SD) Sidi Daoud, (SR) Sidi Rais, (SM) Sidi Ali el Mekki, (CZ) Cap Zebib. (juillet 2015 et juillet 2016) (n=1206).

Plaques		Po (µm)			1' (µm)			1p (µm)			Cingulum (µm)
		L	l	L/l	L	l	L/l	L	l	L/l	L
S	Maximum	7,9	1,97	9,16	30,64	9,88	4,17	24,49	10,16	3	2,88
	Minimum	5,09	0,8	3,71	19,85	6,34	2,64	17,27	7,12	2,11	1,29
	Moyenne	7,01	1,37	5,36	25,31	8,26	3,09	21,17	8,37	2,54	1,9
	Ecart type	0,48	0,25	1,06	2,23	0,71	0,29	1,57	0,71	0,21	0,37
SD	Maximum	7,17	1,58	7,55	26,87	8,45	4,56	22,35	9,23	3,62	2,32
	Minimum	3,66	0,89	2,62	18,34	4,72	2,89	16,64	4,99	2,04	1,33
	Moyenne	6,06	1,20	5,24	23,82	7,12	3,38	19,11	6,90	2,82	1,85
	Ecart type	0,76	0,22	1,28	1,93	0,91	0,37	1,53	1,17	0,40	0,26
SR	Maximum	8,82	1,68	7,46	31,91	9,55	3,69	22,49	10,80	2,92	2,40
	Minimum	5,85	0,87	4,18	16,79	5,87	2,27	15,87	6,13	2,08	1,04
	Moyenne	6,86	1,19	5,85	22,60	7,55	3,03	20,70	8,57	2,43	1,70
	Ecart type	0,65	0,19	0,79	3,39	1,11	0,46	1,92	1,05	0,23	0,38
SM	Maximum	7,45	1,59	7,72	26,36	8,09	4,93	22,02	8,32	3,56	1,98
	Minimum	5,13	0,86	3,22	18,17	4,01	3,16	16,82	4,73	2,42	1,24
	Moyenne	6,55	1,14	5,84	22,83	6,22	3,73	18,69	6,70	2,82	1,47
	Ecart type	0,56	0,15	0,88	2,31	1,04	0,47	1,35	0,82	0,32	0,18
CZ	Maximum	7,12	1,52	6,90	26,79	7,78	4,35	24,24	9,00	3,83	1,87
	Minimum	4,98	0,97	3,82	20,66	5,23	2,92	13,69	4,48	2,54	1,08
	Moyenne	5,99	1,18	5,16	23,50	6,62	3,59	18,77	6,16	3,08	1,36
	Ecart type	0,57	0,14	0,86	1,61	0,78	0,39	2,56	1,12	0,35	0,26

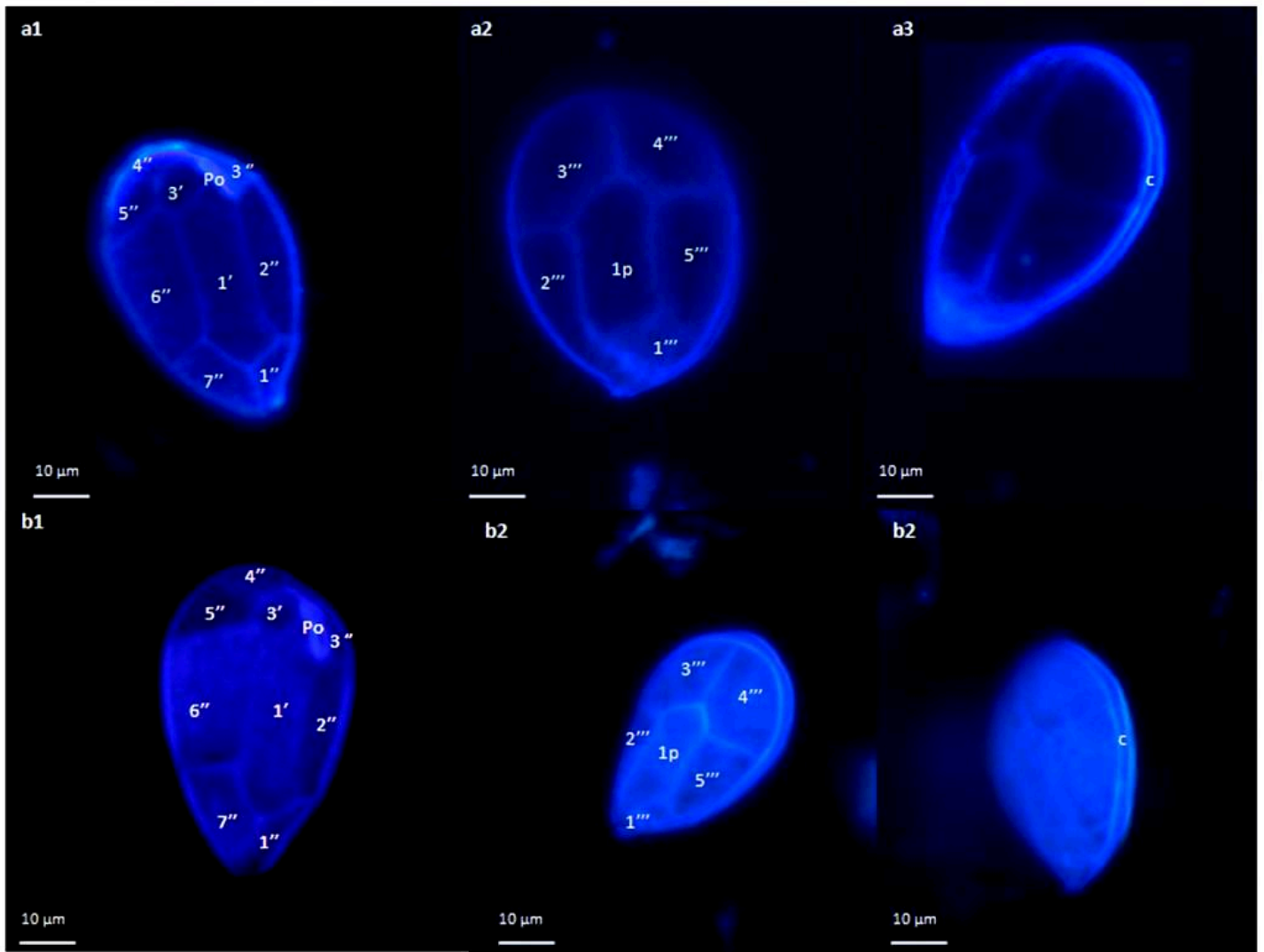


Figure 44a : Description des cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* des stations de prélèvements, (a1, a2, a3) Salammbô, (b1, b2, b3) Cap Zebib (en vue apicale, antapicale, vue latérale), (golfe de Tunis, juillet 2015 et juillet 2016).

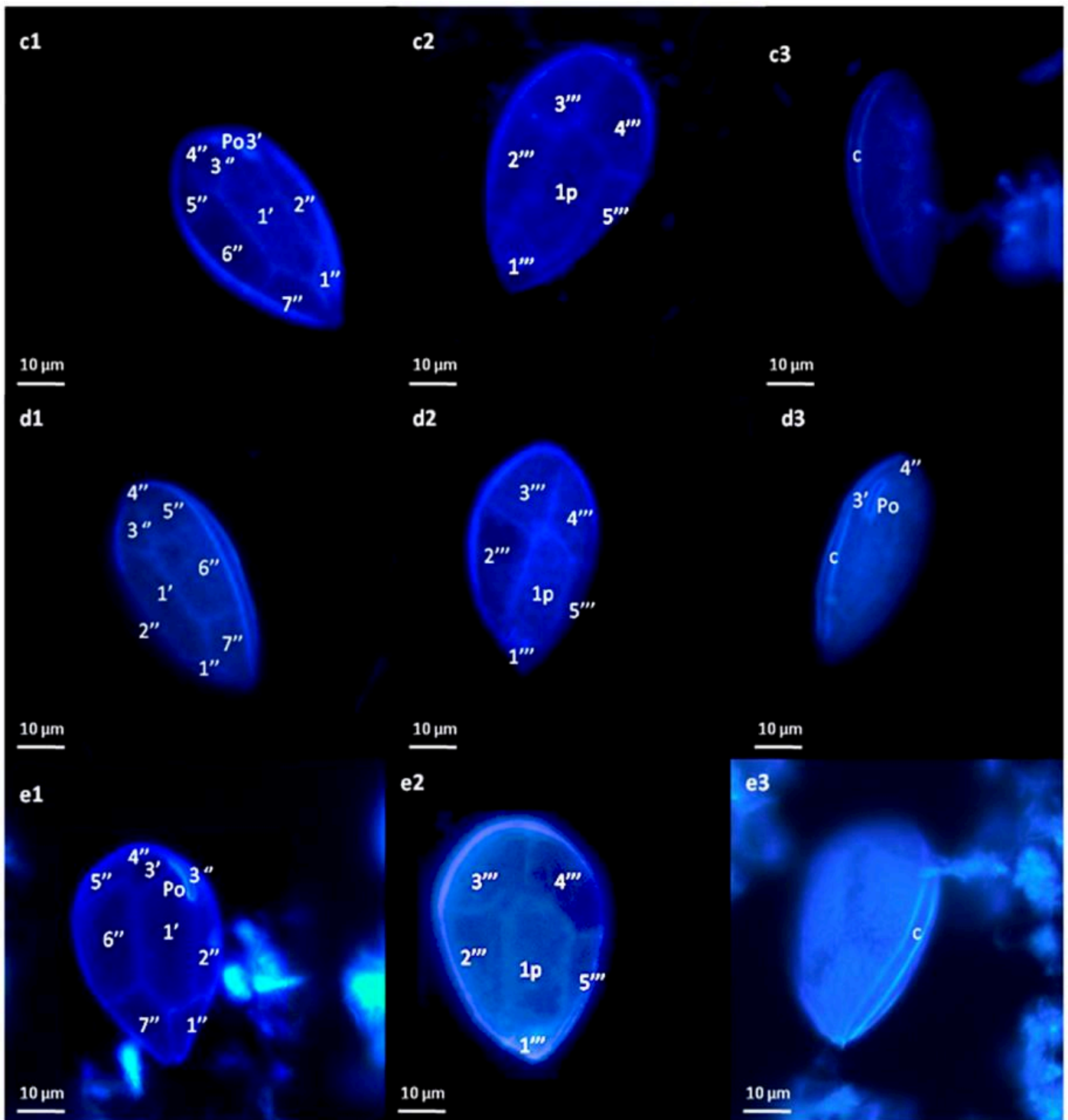


Figure 44b : Description des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* des stations de prélèvements, (c1, c2, c3) Sidi Daoud, (d1, d2, d3) Sidi Ali el Mekki, (e1, e2, e3) Sidi Rais (en vue apicale, antapicale, vue latérale), (golfe de Tunis, juillet 2015 et juillet 2016).

1.1.2 L'étude morphométrique

L'analyse morphométrique effectuée sur les échantillons collectés au niveau des 5 stations du golfe de Tunis nous a permis de mettre en évidence une grande variabilité de la taille des cellules allant de 16,88 à 48,04 μm pour le diamètre dorso-ventral (DV), de 10,57 à 34,53 μm pour le diamètre transversal (W) et de l'ordre de 8,85 à 24,73 μm pour le diamètre antéro-postérieur (AP). Le rapport DV/AP est compris entre 0,26 et 3,91 μm (Tableau 15).

En comparant les mensurations recueillies sur les différentes cellules d'*Ostreopsis* au niveau des différentes stations du golfe de Tunis, celles du site Cap Zebib (CZ) sont marquées par le plus faible diamètre dorso-ventral (DV) avec une moyenne de l'ordre de $34,25 \pm 2,17 \mu\text{m}$, contrairement à celles de Salammbô (S), qui sont les plus longues, avec $37,77 \pm 3,24 \mu\text{m}$. Le rapport dorso-ventral sur le diamètre antéro-postérieur (DV/AP) varie de 0,26 à 3,91 μm , dont le plus élevé a été attribué aux cellules provenant de la station de Sidi Ali El Mekki (SM) avec une moyenne de $2,98 \pm 0,31 \mu\text{m}$ (Tableau 15 ; Figure 45). Notons que les dimensions du diamètre dorso-ventral (DV) des cellules en provenance des sites abrités se sont révélées significativement plus petites, particulièrement celles de la station de Sidi Ali el Mekki (SM) ($p < 0,0001$) par rapport aux autres cellules situées au niveau des stations exposées à hydrodynamisme intense.

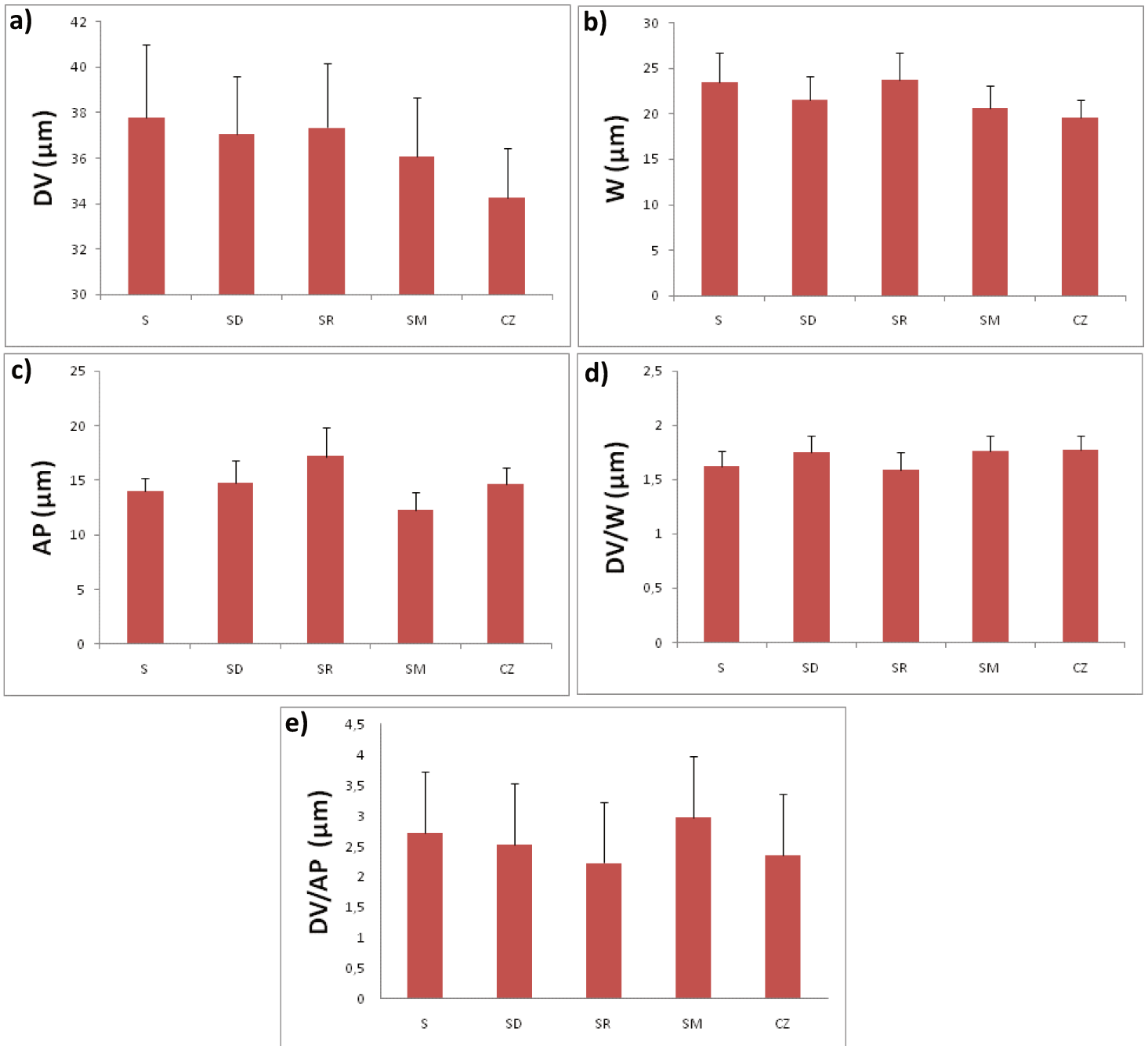


Figure 45 : Mensurations des cellules d’*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis. (a) Diamètre dorso-ventral (DV), (b) Transdiamètre (W), Diamètre antéro-postérieur (AP), le rapport (DV/W), le rapport (DV/AP), (juillet 2015 et juillet 2016).

L’analyse de la variance réalisée nous a permis de confirmer une variabilité significative au niveau du diamètre dorso-ventral (DV), le transdiamètre (W), le diamètre antéro-postérieur (AP) et au niveau du rapport DV/AP. Le diamètre dorso-ventral (DV) varie significativement

entre les stations d'échantillonnage (ANOVA, $F = 9,147$; $p < 0,0001$). Les valeurs les plus élevées ont été rapportées aux cellules des stations (S) et (SR), avec respectivement $48,04 \mu\text{m}$ et $44,79 \mu\text{m}$. Le transdiamètre (W) a été caractérisée par des tendances similaires avec des variations significatives selon les stations de prélèvement, en particulier en provenance de la station (S) avec $34,53 \mu\text{m}$ et (SR) avec $30,44 \mu\text{m}$ (ANOVA, $F = 9,61$; $p < 0,0001$), (Tableau 15). De même, le diamètre antéropostérieur (AP) a varié significativement selon les stations (ANOVA, $F = 15,457$; $p < 0,0001$). Les valeurs maximales ont été enregistrées dans la station de Sidi Rais (SR) avec $24,73 \mu\text{m}$ et la station de Sidi Daoud (SD) avec $21,5 \mu\text{m}$ (Tableau 15). Des variations marquées du rapport DV/AP ont été enregistrées en fonction des stations (ANOVA, $F = 25,197$; $p < 0,0001$). Les valeurs les plus élevées ont été relevées en particulier dans les stations SM et SD ($3,91$ et $3,38 \mu\text{m}$ respectivement) (Tableau 15).

Tableau 15 : Caractéristiques morphométriques des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* au niveau des stations de prélèvement (DV) Diamètre dorso-ventrale, (W) Transdiamètre (AP) Diamètre antéro-postérieur (golfe de Tunis, juillet 2015 et juillet 2016) (n=1206).

SITES		DV (μm)	W (μm)	AP (μm)	DV/AP (μm)	DV/W (μm)	AP/W (μm)
S	Maximum	48,04	34,53	19,3	3,28	2,05	0,82
	Minimum	16,88	10,57	9,89	0,26	0,15	0,52
	Moyenne	37,77	23,53	13,98	2,72	1,62	0,64
	Ecart type	3,24	3,12	1,17	0,20	0,14	0,05
SD	Maximum	43,81	28,95	21,50	3,38	2,43	1,08
	Minimum	25,76	14,46	11,18	1,63	1,41	0,48
	Moyenne	37,04	21,54	14,80	2,53	1,75	0,69
	Ecart type	2,58	2,58	1,99	0,30	0,16	0,09
SR	Maximum	44,79	30,44	24,73	3,00	2,10	0,92
	Minimum	27,54	15,39	12,35	1,53	1,33	0,54
	Moyenne	37,35	23,76	17,19	2,23	1,59	0,71
	Ecart type	2,84	2,98	2,69	0,31	0,16	0,09
SM	Maximum	42,20	28,55	19,54	3,91	3,04	1,53
	Minimum	28,57	12,81	8,85	1,99	1,43	0,48
	Moyenne	36,09	20,66	12,24	2,98	1,76	0,60
	Ecart type	2,55	2,38	1,61	0,31	0,15	0,09
CZ	Maximum	40,5	23,6	19,14	3,04	2,43	0,97
	Minimum	27,66	12,25	11,46	1,84	1,46	0,56
	Moyenne	34,25	19,56	14,64	2,36	1,77	0,75
	Ecart type	2,17	1,93	1,48	0,20	0,13	0,06

1.2 Discussion

L'identification des différentes espèces d'*Ostreopsis* est souvent basée sur des caractères morphologiques. Toutefois, la disposition thécale similaire rend difficile la distinction entre espèces. De plus les descriptions récentes (Faust *et al.*, 1996 ; Chang *et al.*, 2000) et anciennes (Schmidt, 1901 ; Fukuyo, 1981) de ces Dinoflagellés semblent être contradictoires, comme rapporté par Penna *et al.* (2005) et Aligizaki et Nikolaidis (2006).

La tabulation des plaques thécales des cellules d'*Ostreopsis* au niveau des 5 stations du golfe de Tunis est la même que celle des autres espèces du G. *Ostreopsis* déjà décrites (Po, 3', 7", 6C, 5"', 2"' et 1p) selon Faust *et al.*, (1996). L'épithèque et l'hypothèque sont de tailles similaires, avec une organisation similaire des plaques thécales. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que les cellules de l'*Ostreopsis* des eaux côtières du golfe de Tunis a montré une large gamme de taille (DV : 16,88-48,04 μm , W : 10,57-34,53 μm , AP : 9,89–19,3 μm , Po : 3,66-8,82 μm , 1' : 16,79-31,91 μm et 1p : 13,69-24,49 μm). Cette grande variabilité de la taille a été déjà rapportée pour des cellules d'*Ostreopsis* en provenance d'autres régions (Fukuyo, 1981; Tognetto *et al.*, 1995 ; Faust *et al.*, 1996 ; Chang *et al.*, 2000 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Selina et Orlova, 2010 ; Honsell *et al.*, 2011 ; Selina et Levchenko, 2011 ; Nascimento *et al.*, 2012a, b) ainsi qu'à partir des cultures de souches isolées à partir de différentes régions (Besada *et al.*, 1982 ; Pin *et al.*, 2001 ; Guerrini *et al.*, 2010, Monti *et al.*, 2007 ; Penna *et al.*, 2005 ; Rossi *et al.* 2010 ; Nascimento *et al.*, 2012a) (Tableau 16 a,b).

La forme et l'organisation des plaques des cellules d'*Ostreopsis* du golfe de Tunis correspondent aux illustrations de Fukuyo (1981). Les mensurations réalisées sur le pore apical (Po) des cellules d'*Ostreopsis* du golfe de Tunis, ont présenté des valeurs similaires aux souches décrites par Penna *et al.* (2005), Monti *et al.*, (2007) dans la Mer du Nord de l'Adriatique, Selina et Levchenko (2011) en Russie, Kang *et al.* (2013) au détroit de Jeju en Corée et Zhang *et al.*, (2018) dans la Mer de Chine méridionale. Cependant, elles sont plus faibles que celles décrites par David *et al.* (2013) (côte Atlantique, péninsule ibérique) et Abdennadher *et al.*, 2017 (golfe de Gabès) en sachant que ces auteurs ont étudié des cellules issues de culture (Tableau 16 a,b). En ce qui concerne la plaque 1', les mesures rapportées aux cellules d'*O. cf. ovata* du golfe de Tunis sont similaires à celles relevées par Abdennadher *et al.* (2017) et Zhang *et al.*, (2018), alors qu'elles sont plus petites par rapport à celles décrites

par David *et al.* (2013). Les mesures de la plaque 1p sont similaires à celles de Kang *et al.* (2013) et Zhang *et al.*, (2018) et plus petites comparées aux autres souches (Tableau 16 a,b).

Le diamètre dorsoventral (DV) est similaire à la plupart des souches sauf pour celles mesurées par Fukuyo (1981), Monti *et al.* (2007), qui sont plus longues. Quant aux diamètre antéro-postérieur (AP) et le transdiamètre (W) des souches du golfe de Tunis, semblent s'accorder avec les mesures réalisées sur les autres souches (Tableau 16 a,b).

Les formes cellulaires exprimées par les rapports DV/W (1,25–2,05 μm) sont similaires à celles décrites par les autres auteurs (Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Monti *et al.*, 2007 ; Selina et Levchenko, 2011 ; David *et al.*, 2013 ; Kang *et al.*, 2013 ; Abdennadher *et al.* 2017 ; Zhang *et al.*, 2018) (Tableau 16 a,b). En comparant avec les études morphologiques réalisées sur des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* collectées sur les côtes tunisiennes, particulièrement du golfe de Gabès (Abdennadher *et al.*, 2017) et de la baie de Bizerte (Ben Gharbia *et al.*, 2016), une certaine similitude apparaît entre elles dans la forme cellulaire exprimée par le rapport DV/W. Néanmoins, on remarque que les souches du golfe de Tunis se rapprochent plus de celles de la baie de Bizerte de point de vue diamètre dorsoventral (DV) et le transdiamètre (W).

D'autre part, il faut tenir compte du fait que la comparaison des mesures réalisées sur les cellules d'*Ostreopsis* à la fois sur des échantillons naturels et de culture n'est pas identique d'après Aligizaki et Nikolaidis (2006). Le rapport dorso-ventral / diamètre antéro-postérieur (DV/AP) a été proposé comme un caractère différenciant les espèces *O. ovata* de *O. siamensis*, car ces espèces ont une forme et des dimensions très proches. Le DV/AP est plus élevé (> 4) pour *O. siamensis* que pour *O. ovata* (< 2) (Penna *et al.*, 2005 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006). Le rapport DV/AP des cellules *O. cf. ovata* du golfe de Tunis est compris entre 1,95–3,28, avec une valeur moyenne de $2,53 \pm 0,37$. Ces valeurs diffèrent des données de la littérature (Tableau 16 a,b), mais se rapprochent d'autres mesures effectuées pour les souches en provenance du nord de l'Adriatique de l'ordre de 2,4 (Monti *et al.*, 2007) ; 2,33 (Guerrini *et al.*, 2010) et 2,31 (Accoroni *et al.*, 2012).

Nos résultats soulignent que les cellules d'*Ostreopsis* sont caractérisées par un diamètre dorso-ventral (DV) significativement plus élevé dans les sites exposés que dans les sites abrités, ce qui est conforme à ceux trouvés par Accoroni *et al.*, (2012) sur les côtes de la Riviera de Conero (Mer du Nord de l'Adriatique). Ces derniers auteurs ont montré que le régime hydrodynamique a un impact direct sur le taux de croissance. En effet, les cellules

d'*Ostreopsis* issues des sites abrités, considérés comme des conditions favorables, seraient principalement dans une phase de croissance exponentielle, induisant une prolifération intense. Par contre, il a été démontré dans des conditions expérimentales que dans une situation d'hydrodynamisme intense, certaines espèces de Dinoflagellés ont une plus grande taille suite à une diminution de leurs taux de croissance (Sullivan et Swift, 2003 ; Sullivan *et al.*, 2003 ; Berdalet *et al.*, 2007). Ce phénomène peut différer d'une espèce à l'autre (Sullivan et Swift, 2003) et est plus marqué chez les espèces de grande taille ayant une forme aplatie (Berdalet *et al.*, 2007) comme par exemple chez les espèces du G. *Ostreopsis*.

Faute d'une analyse moléculaire sur les différentes espèces d'*Ostreopsis* provenant des différents stations de prélèvement, nous ne pouvons pas confirmé de manière définitive l'espèce d'*Ostreopsis* présente dans chacune des stations échantillonnées le long du golfe de Tunis. Néanmoins, les mensurations réalisées sur ces dernières se rapprochent de celles du golfe de Gabès (Abdennather *et al.*, 2017) et celles de la baie de Bizerte (Ben Gharbia *et al.*, 2016) sachant que ces études ont confirmé l'espèce comme étant *Ostreopsis* cf. *ovata* par le biais d'une étude moléculaire.

Tableau 16 : Comparaison des mensurations des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis par rapport aux données recueillies dans d'autres régions.

	DV (µm)	W (µm)	AP (µm)	DV/AP (µm)	DV/W (µm)	Po (µm)	l' (µm)	lp (µm)	Références	Zones d'étude
<i>O. ovata Fukuyo</i>	50–56	25–35	-	-	-	-	-	-	Fukuyo (1981)	Océan Pacifique (Polynésie française, Nouvelle-Calédonie, mer de Chine orientale)
<i>O. cf. ovata</i>	34–67	25–40	16–25	-	-	-	-	-	Tognetto <i>et al.</i> (1995)	Mer Tyrrhénienne moyenne (région du Lazio)
	47–55	27–35	-	-	-	8	-	27	Faust <i>et al.</i> (1996)	Mer des Caraïbes (Belize et Porto Rico), Océan Indien (Archipel des Mascareignes), Océan Pacifique (mer de Chine orientale)
	38–50	25–35	-	-	-	-	-	-	Chang <i>et al.</i> (2000)	Nouvelle Zélande (Sud-Ouest du Océan Pacifique)
	27–65	19–57	-	<2	-	6,9–9,6	-	-	Penna <i>et al.</i> (2005)	Mer Baléare, Mer Catalane, Mer Ionienne, Mer Ligure, Mer Tyrrhénienne, Nord-Est Atlantique, Mer du Nord
	26–62	13–48	14–36	≈2	1,77	10,9	-	-	Aligizaki et Nikolaidis (2006)	Nord de la mer Égée
	40,7–59,2	25,9–40,7	15–30	2,4	1,7–1,8	6,6–9	-	30	Monti <i>et al.</i> (2007)	golfe de Trieste, Rovinj (Nord de la mer Adriatique)

Tableau 16 (Suite) : Comparaison des mensurations des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis par rapport aux données recueillies dans d'autres régions.

	DV (µm)	W (µm)	AP (µm)	DV/AP (µm)	DV/W (µm)	Po (µm)	l' (µm)	lp (µm)	Références	Zones d'étude
<i>O. cf. ovata</i>	29–75	18–51	15–39	2,33	-	-	-	-	Guerrini <i>et al.</i> (2010)	Riviera Conero (Nord de la mer Adriatique)
	28,1	20,8	17,5	-	-	-	-	-	Sato <i>et al.</i> (2011)	Côte pacifique occidentale, Japon
	36–60	24–45	15–30	-	1,2–2,3	6,3–8,3	-	-	Selina et Levchenko (2011)	Mer du Japon (côtes Russe)
	19–75	13–60	10–31	2,31±0,37	-	-	-	-	Accoroni <i>et al.</i> (2012)	Riviera Conero (Nord de la mer Adriatique)
	55–84	30–62	-	-	1,2–1,9	9,6–13,5	40,5 – 53,5	34 – 46,9	David <i>et al.</i> (2013)	péninsule ibérique (Côte atlantique)
	31,9–38,9	22,2–30,6	20,8–30,6	1,3–1,8	1,1–1,3	4,77–6,77	-	13,4–18,8	Kang <i>et al.</i> (2013)	Détroit de Jeju (île de Jeju, Corée)
	41,85–58,51	32,92–45,28	-	-	-	-	-	-	Ben Gharbia <i>et al.</i> (2016)	Baie de Bizerte, Tunisie
	27–65	19–57	15–46	1,11–2,2	1,21–2	8,82–12,14	25,2–33,33	28,12 – 39,5	Abdennadher <i>et al.</i> (2017)	Golfe de Gabès, Tunisie
	35–65	20–40	-	-	-	-	-	-	Gomèz <i>et al.</i> (2017)	São Paulo, Brésil
	39,9 – 56,4	30,4 – 47,4	-	-	1,1 – 1,5	7,1 – 9,7	24,0 – 33,5	12,7 – 25,5	Zhang <i>et al.</i> (2018)	Île de Hainan, mer de Chine méridionale
	16,88–48,04	10,57–34,53	9,89–19,3	1,95–3,28	1,25–2,05	3,66–8,82	16,79–31,91	13,69–24,49	Présent travail	Golfe de Tunis, Tunisie

2 Variations spatio-temporelles de l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis

2.1 Variations spatio-temporelles de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*

2.1.1 Variations spatio-temporelles de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* en 2015

Durant la saison estivale de l'année 2015, les cellules épiphytes d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été observées pour la première fois en très faible abondance (25 cell. g⁻¹ MF) sur *Cystoseria* sp. le 11 juin à Sidi Daoud (SD). Dans la colonne d'eau, la présence de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* a été détectée, le 12 juin à Sidi Ali el Mekki (SM) (13 cell. dm⁻³). Le premier pic portant sur les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* a été enregistré le 9 juillet à (SD) dans la colonne d'eau avec 1,25 x 10³ cell. dm⁻³ alors que le premier pic des cellules épiphytes a été détecté plus tard sur *Cymodocea nodosa*, le 23 juillet à Sidi Rais (SR) soit 1,41 x 10³ cell. g⁻¹MF. Par la suite, de fortes densités d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été observées sur toute la période d'étude (Figure 46).

L'abondance maximale des cellules épiphytes d'*Ostreopsis cf. ovata* de l'ordre de 3,78 x 10⁴ cell. g⁻¹MF a été observée le 24 juillet à la station Cap Zebib (CZ) sur *Dictyopteris polypodioides*. La concentration maximale de l'ordre de 5,25 x 10³ cell. dm⁻³ dans la colonne d'eau a été enregistrée durant le mois d'août à la station Sidi Daoud (SD). A partir de la mi-août jusqu'à la fin septembre, les abondances des cellules épiphytes et planctoniques ont diminué dans tous les sites, sauf pour Cap Zebib où la concentration des cellules épiphytes est demeurée assez élevée par rapport aux autres stations avec 1,82 x 10⁴ cell. g⁻¹ MF sur *Padina pavonica* contre 1,73 x 10² cell. dm⁻³ dans la colonne d'eau (Figure 46).

2.1.2 Variations spatio-temporelles de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* en 2016

Les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphytes et planctoniques ont été observées pour la première fois à Sidi Daoud (SD) à des concentrations de l'ordre de $8,25 \times 10^3$ cell. g⁻¹ MF sur *Cystoseria* sp., et 40 cell. dm⁻³ dans la colonne d'eau. Le premier pic d'*Ostreopsis cf. ovata* a été enregistré dans la colonne d'eau le 9 juillet à (SD) avec une concentration qui a atteint $1,19 \times 10^3$ cell. dm⁻³. Par la suite, de fortes densités d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été observées dans la colonne d'eau sur toute la période d'échantillonnage (Figure 46).

L'abondance maximale épiphyte ($1,08 \times 10^5$ cell. g⁻¹ MF) a été enregistrée sur *Dictyopteris polypodioides* le 21 juillet à Cap Zebib (CZ). La concentration maximale dans la colonne d'eau est de $1,00 \times 10^4$ cell. dm⁻³. Elle a été détectée durant le mois de juillet à Sidi Daoud (SD). De même, de fortes densités d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été observées au cours des deux dernières semaines de juillet dans les trois stations (SD), (SM) et (CZ).

A partir de la mi-août jusqu'à la fin septembre, les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* sur les macrophytes et dans la colonne d'eau ont diminué sauf pour la station de Cap zebib où nous avons observé un pic de $3,01 \times 10^4$ cell. g⁻¹ MF sur *Padina pavonica* et aussi pour le site (SR) où nous avons enregistré une concentration de $9,48 \times 10^3$ cell. dm⁻³ dans la colonne d'eau (Figure 46).

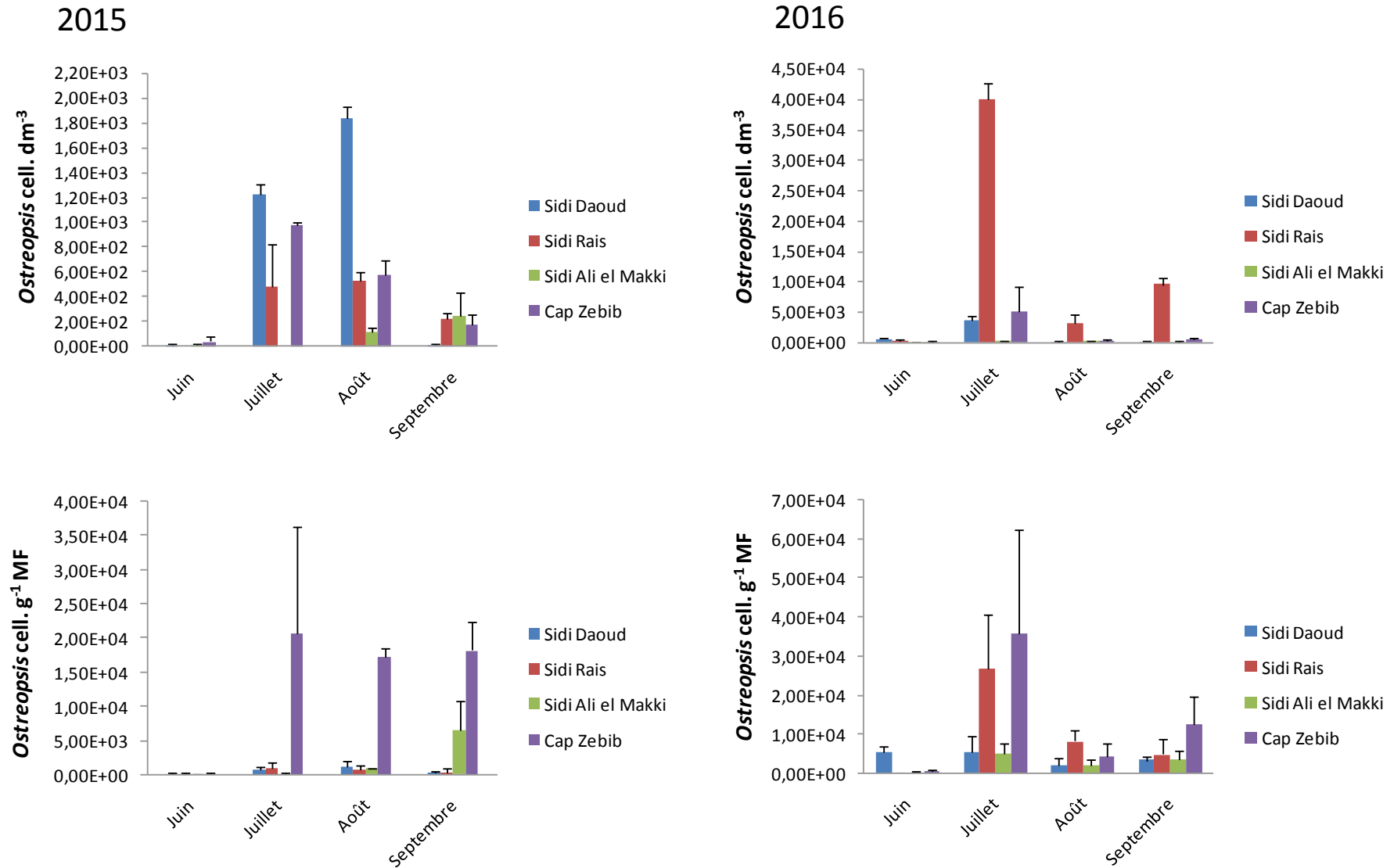


Figure 46: Abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphytes et planctoniques (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

Dans l'ensemble, durant la période du suivi 2015 et 2016 l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* a montré une variation annuelle significative (ANOVA, $F = 4.94$; $p = 0,02$). L'année 2016 est marquée par les proliférations les plus importantes avec un pic de concentration d'*Ostreopsis* sur macrophyte de $1,08 \times 10^5$ cell. g^{-1} MF et une concentration dans la colonne d'eau de $1,00 \times 10^4$ cell. dm^{-3} alors que pour 2015 le pic de concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphytes était de l'ordre de $3,78 \times 10^4$ cell. g^{-1} MF contre $5,25 \times 10^3$ cell. dm^{-3} dans la colonne d'eau (Figure 47).

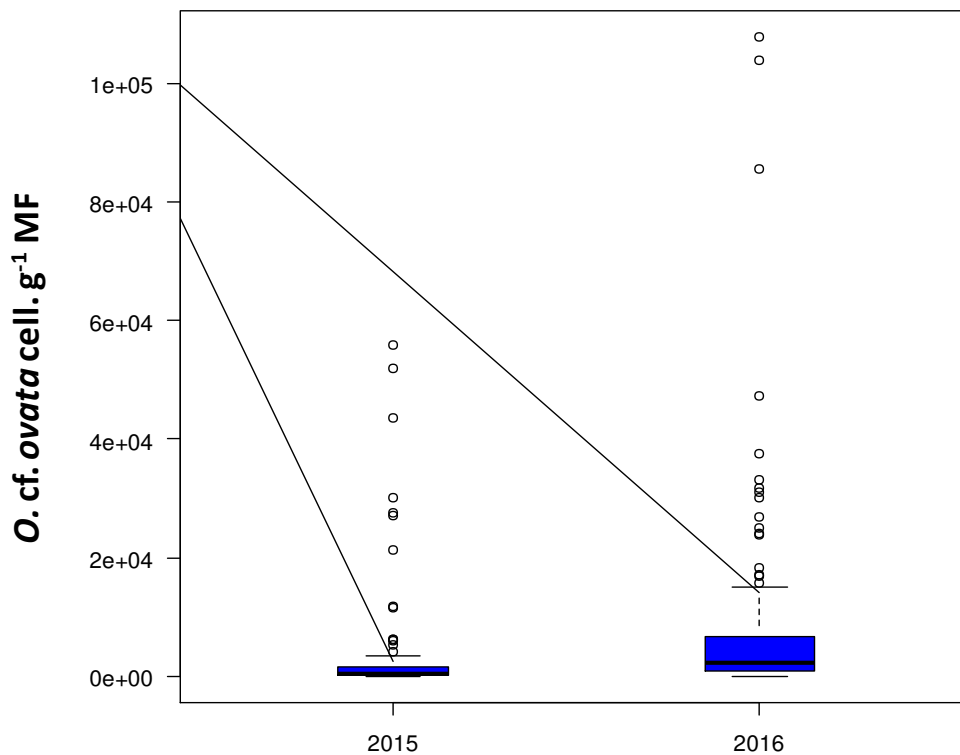


Figure 47 : Variations annuelles de l'abondance totale d'*Ostreopsis cf. ovata*, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

Des corrélations significatives ont été trouvées entre l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* et les différents mois de la saison estivale-automnale (ANOVA, $F = 8,39$; $p < 0,001$). Les valeurs les plus élevées ont été relevées durant l'été, de juillet à août mais aussi durant le mois de septembre. Néanmoins, le développement saisonnier été standard, en effet des corrélations non significatives ont été trouvées entre la concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* et les saisons (ANOVA, $p > 0,05$) (Figure 48).

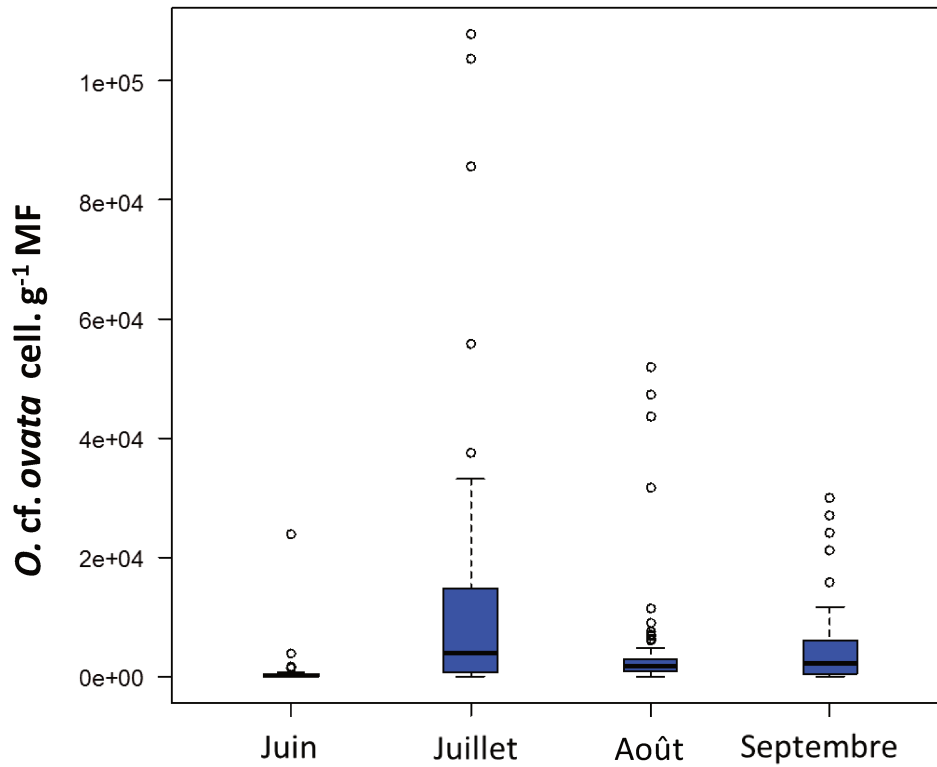


Figure 48 : Variations mensuelles de l'abondance totale d'*Ostreopsis cf. ovata*, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

Concernant la variation spatiale, une forte hétérogénéité était évidente. Une différence significative dans l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* a été enregistrée entre les stations d'échantillonnage. Les plus fortes concentrations sont enregistrées dans la station de Cap Zebib (CZ) suivie des stations de Sidi Daoud (SD) et Sidi Ali el Mekki (SM) (Figure 49).

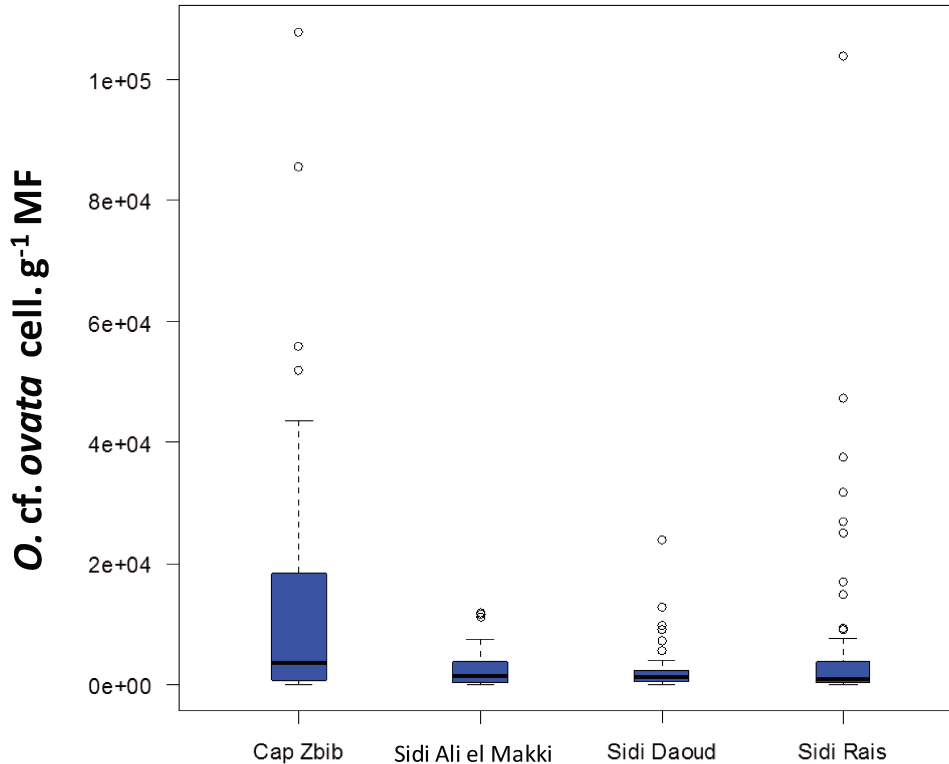


Figure 49 : Variation spatiale de l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata*, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

Outre la variation significative entre les stations, il y a une variabilité importante à petite échelle spatiale qui a été observée à plusieurs dates d'échantillonnage au cours des deux années. Cela se manifeste par les grands écart-types associés aux abondances moyennes d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphytes.

L'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* subit également un changement hautement significatif selon le type de substrat (ANOVA, $F = 13,61$; $p < 0,001$). Le substrat rocheux semble être le plus favorable au développement des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* à l'encontre du substrat sableux. A l'instar du type de substrat, une corrélation hautement significative a été trouvée entre l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* et la nature des macrophytes (ANOVA, $F = 7,69$; $p = 0,002$). En effet, les macroalgues ont abrité plus d'*Ostreopsis cf. ovata* que les phanérogames et les concentrations maximales d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été enregistrées sur l'algue brune *Dictyopteris polypodioides* (Figure 50).

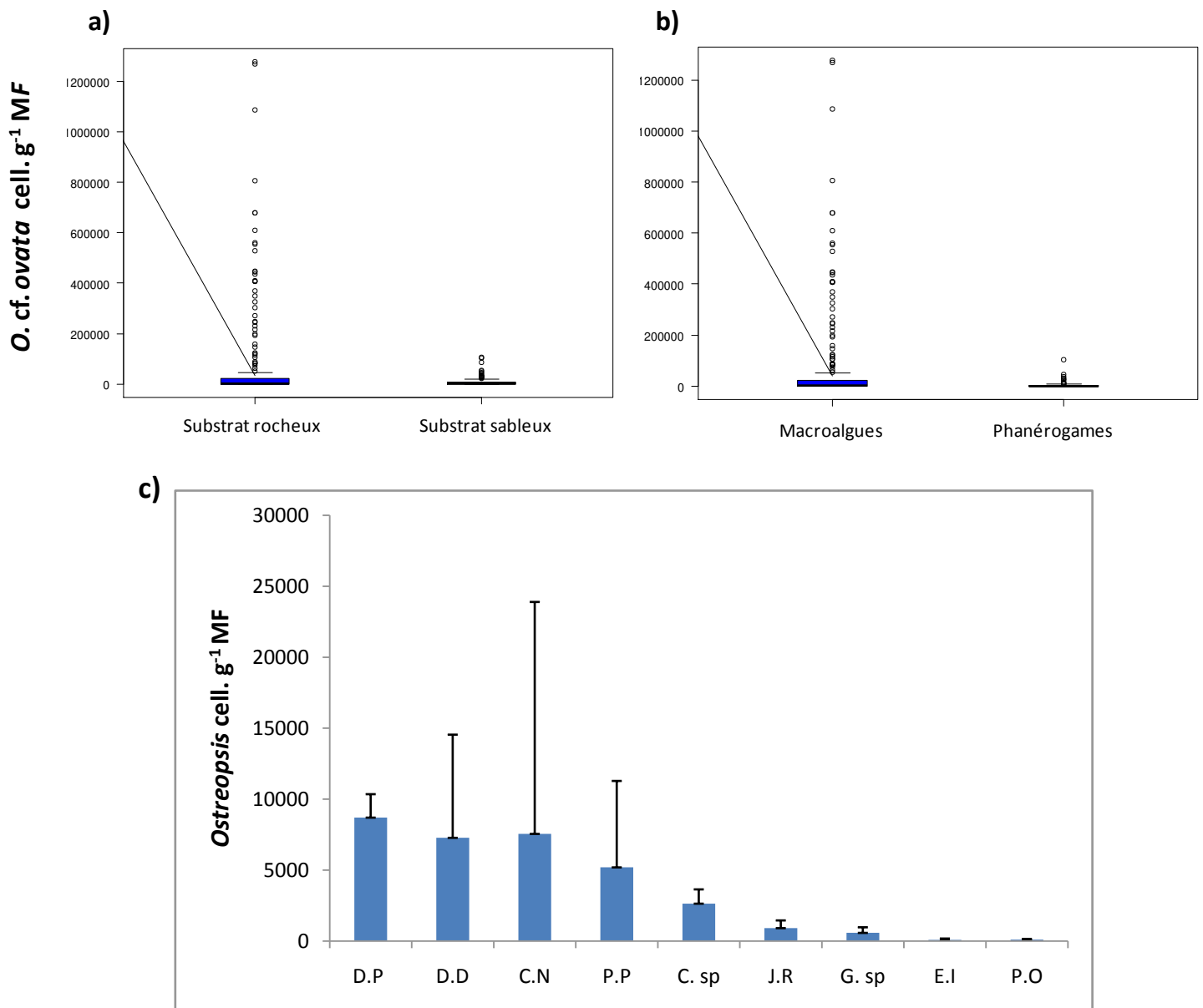


Figure 50 : Variations de l'abondance d'*O. cf. ovata* (cell. g⁻¹ MF) golfe de Tunis en fonction de : (a) Nature du substrat, (b) Groupes de macrophytes et (c) Espèces de macrophytes. Macrophytes : *Dictyopteria polypodioides* (D.P), *Dictyota dichotoma* (D.D), *Cymodocea nodosa* (C.N), *Padina pavonica* (P.P), *Cystoseria* sp. (C. sp), *Jania rubens* (J.R), *Gelidium* sp.(G. sp), *Enteromorpha intestinalis* (E.I), *Posidonia oceanica* (P.O), (étés 2015 et 2016).

2.2 Interactions entre l'abondance des populations d'*Ostreopsis cf. ovata* et les conditions du milieu du golfe de Tunis

Au cours des périodes d'échantillonnage 2015 et 2016, une interaction a été mise en évidence entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* dans les stations de Sidi Daoud (SD),

Sidi Rais (SR), Sidi Ali el Mekki (SM) et Cap Zebib (CZ) et de certains facteurs environnementaux qui sont la température de l'eau, la salinité et la teneur en azote totale.

2.2.1 La température de l'eau et la salinité

En utilisant les modèles additifs généralisé (GAM), la température de l'eau et la salinité ont été retenues, comme principales covariables environnementales déterminantes pour la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* durant les deux années du suivi. Les deux covariables environnementales représentaient ensemble 12,4% de l'écart de la variabilité de l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata*. Une relation non linéaire significative a été observée entre l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* et la température de l'eau ($F > 4,62$) ainsi qu'avec la salinité ($F > 8,54$). Le 3D plot illustrant ces relations met en évidence l'effet positif de la température sur l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la plage de 26 à 28°C et l'effet positif de la salinité à partir de la valeur 34 (Figure 51).

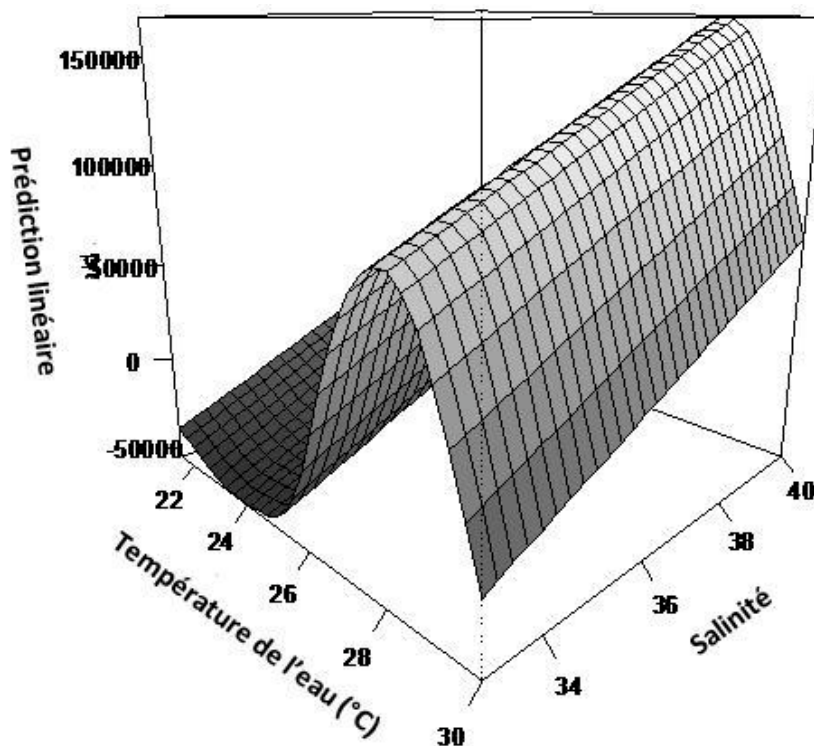


Figure 51 : Relation entre l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* et la température de l'eau et la salinité, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

2.2.2 Les teneurs en azote total

Les modèles additifs généralisés (GAM) montrent également une forte corrélation entre les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* et les teneurs en azote total ($F = 2,8$; $p = 0,001$, Figure 50), expliquant 7,39 % de l'écart de la variabilité dans la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata*. En effet, le pics d'*Ostreopsis cf. ovata* coïncide avec des teneurs élevées en azote total (Figure 52).

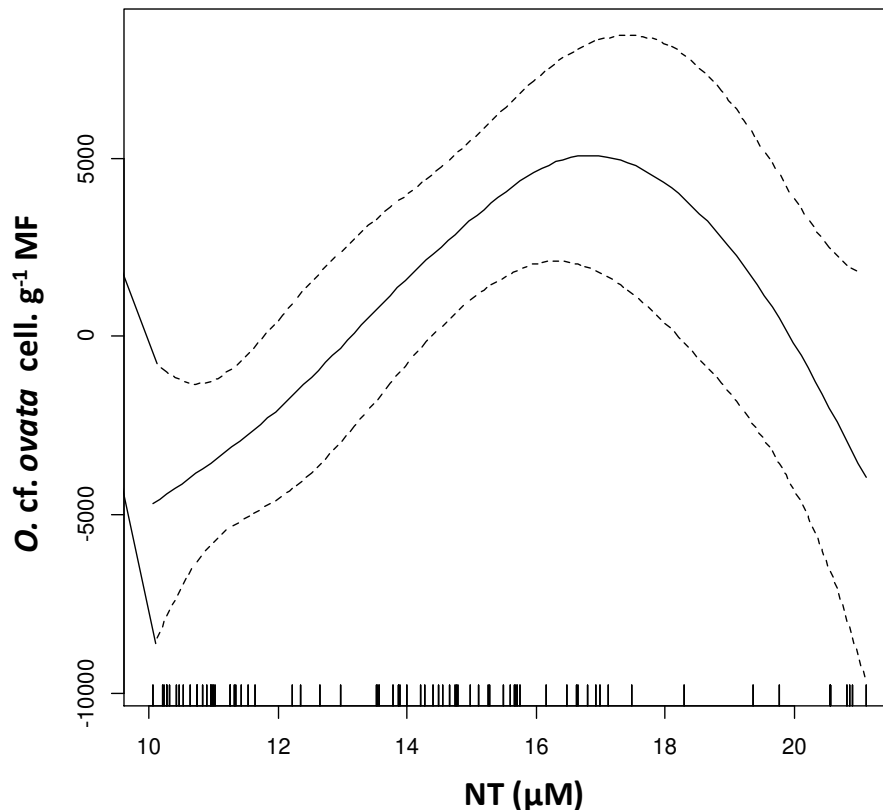


Figure 52 : Relation entre l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* et la teneur en azote total, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

2.3 Interactions entre *Ostreopsis cf. ovata* et les espèces de Dinoflagellés épiphytes : *P. lima*, *C. monotis* du golfe de Tunis

Durant la période d'étude, une tendance de prolifération similaire a été remarquée chez les différentes espèces de microalgues épiphytes (Figure 53). En effet le test de Spearman a montré des corrélations significatives entre les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphytes et planctoniques. ($r = 0,73$; $p = 0$). Une forte corrélation a été trouvée entre l'abondance de

Ostreopsis cf. ovata épiphyte et celles des Dinoflagellés *Prorocentrum lima* ($r = 0,29$; $p = 0$) et *Coolia monotis* ($r = 0,37$; $p = 0$).

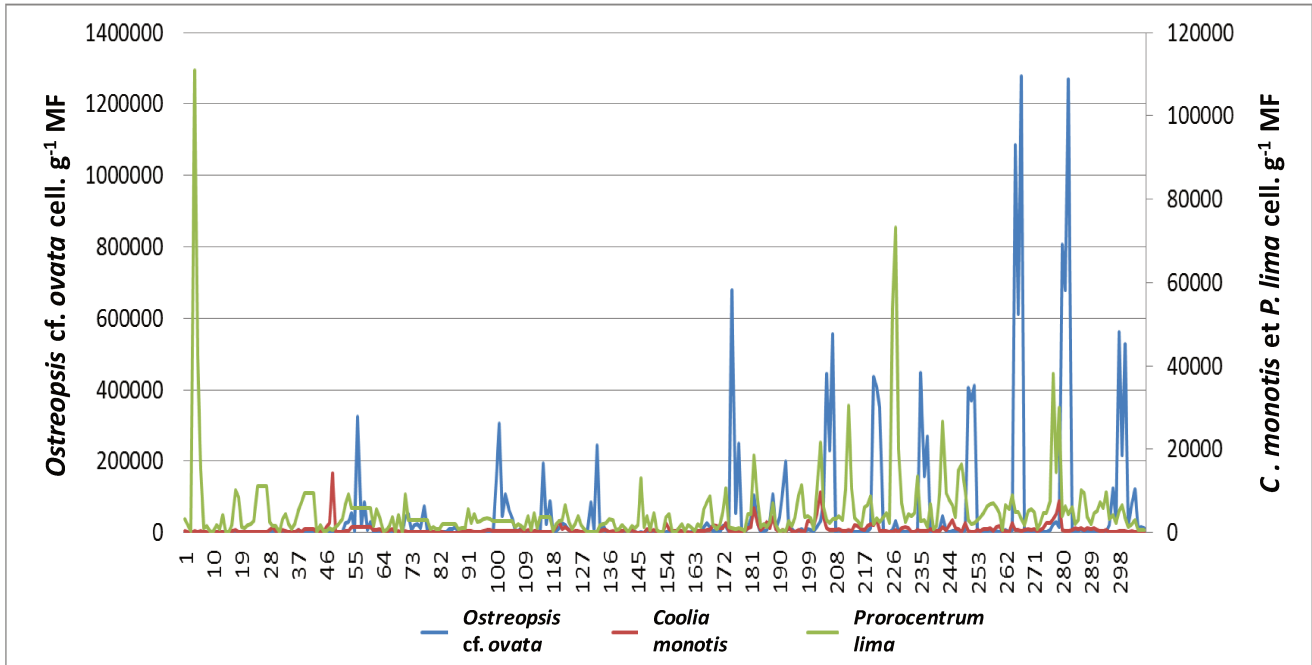


Figure 53 : Abondance des espèces de microalgues épiphytes *Ostreopsis cf. ovata*, *Coolia monotis* et *Prorocentrum lima* (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

2.4 Déterminisme des proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la station de Salammbô

2.4.1 Evolution temporelle des proliférations d'*Ostreopsis cf. ovata*

Les tendances temporelles de la concentration d' *Ostreopsis cf. ovata* étaient différentes entre les deux années de surveillance estivale comme le montre la Figure 54. Au cours de l'été 2015, les premières cellules sporadiques sont apparues le 2 juillet et les abondances s'amplifient et forment 2 pics de concentration, le premier le 6 octobre sur *Sargassum vulgare* ($3,70 \times 10^5 \pm 8,38 \times 10^4$ cell. g⁻¹ MF) et la deuxième le 20 octobre sur *Corallina elongata* ($3,80 \times 10^5 \pm 9,50 \times 10^4$ cell. g⁻¹ MF). Au cours de l'été 2016, la première apparition des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*. a été enregistrée le 15 juin, mais contrairement à 2015, nous remarquons que les 2 pics de concentrations se produisent plus tôt, à savoir le 23 août ($9,91 \pm 2,54 \times 10^5$ cell. g⁻¹ MF) et le 30 août ($9,17 \pm 2,35 \times 10^5$ cell. g⁻¹ MF), enregistrés sur

Sargassum vulgare. Puis la concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* a diminué durant les derniers jours de novembre.

Les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau suivent la même tendance que les abondances épiphytes pour les deux années. Cependant, contrairement aux abondances épiphytes, les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* planctoniques étaient nettement plus élevées en 2016 qu'en 2015. En effet, l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* a atteint la concentration maximale le 15 septembre. Elle était de l'ordre de $2,88 \pm 1,72 \times 10^4$ cell. dm^{-3} . Comparé à l'efflorescence d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphyte, le pic des cellules dans la colonne d'eau est survenu deux semaines plus tôt. Puis au cours des semaines suivantes, la concentration des cellules dans la colonne d'eau a diminué jusqu'à $1,20 \times 10^3 \pm 6,93 \times 10^2$ cell. dm^{-3} et finalement un autre pic, le dernier, le 20 octobre qui a atteint $2,22 \times 10^4 \pm 7,24 \times 10^3$ cell. dm^{-3} . En 2016, l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau est marquée par un seul pic remarquable qui survient le 13 juillet atteignant $5,11 \pm 2,35 \times 10^5$ cell. dm^{-3} , suivi par d'autres moins importants. Néanmoins, on note qu'avant chaque floraison épiphyte (environ une semaine avant) une augmentation de la concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau a été enregistrée (Figure 54).

En plus de la variation temporelle significative d'*Ostreopsis cf. ovata*, une variabilité importante à petite échelle spatiale (entre sites d'échantillonnage) a également été observée à plusieurs dates d'échantillonnage au cours des deux années, comme le montrent les grands écart-types associés aux abondances moyennes épiphytes et dans la colonne d'eau.

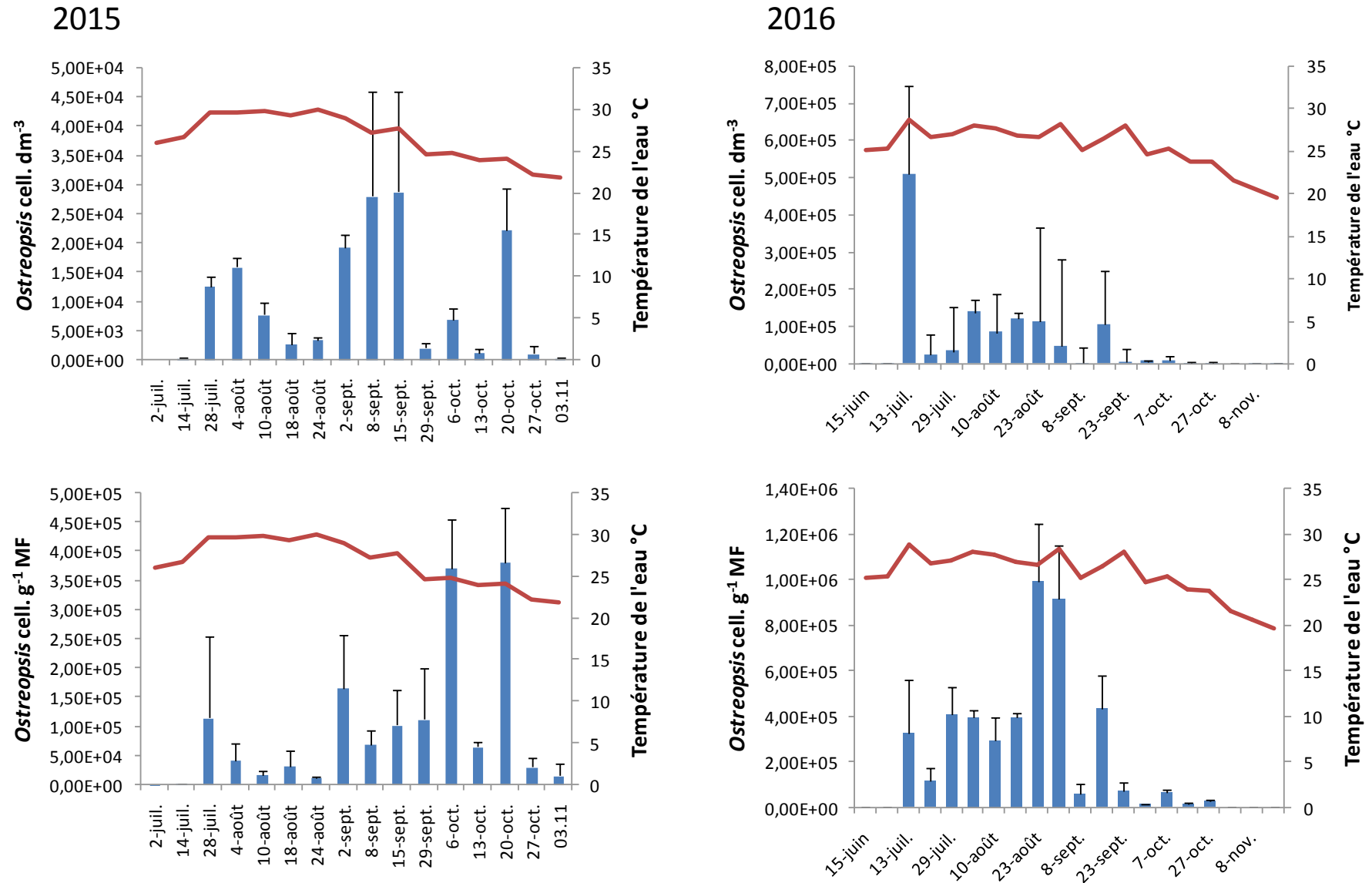


Figure 54 : Abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphytes et planctoniques dans la station de Salammbo, (golfe de Tunis, étés 2015 et 2016).

Sur l'ensemble de la période d'échantillonnage, l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* a montré une variation significative entre 2015 et 2016 (ANOVA, $F = 7,29$; $p = 0,008$). Pour la station de Salammbô (S) l'année 2016 est marquée par les proliférations les plus importantes avec un pic de concentration benthique de $9,91 \times 10^5$ cell. g^{-1} MF et un pic de $5,11 \times 10^5$ cell. dm^{-3} dans la colonne d'eau. En 2015, le pic benthique d'*Ostreopsis cf. ovata* a atteint $3,80 \times 10^5$ cell. g^{-1} MF et le pic planctonique était de $2,88 \times 10^4$ cell. dm^{-3} (Figure 55).

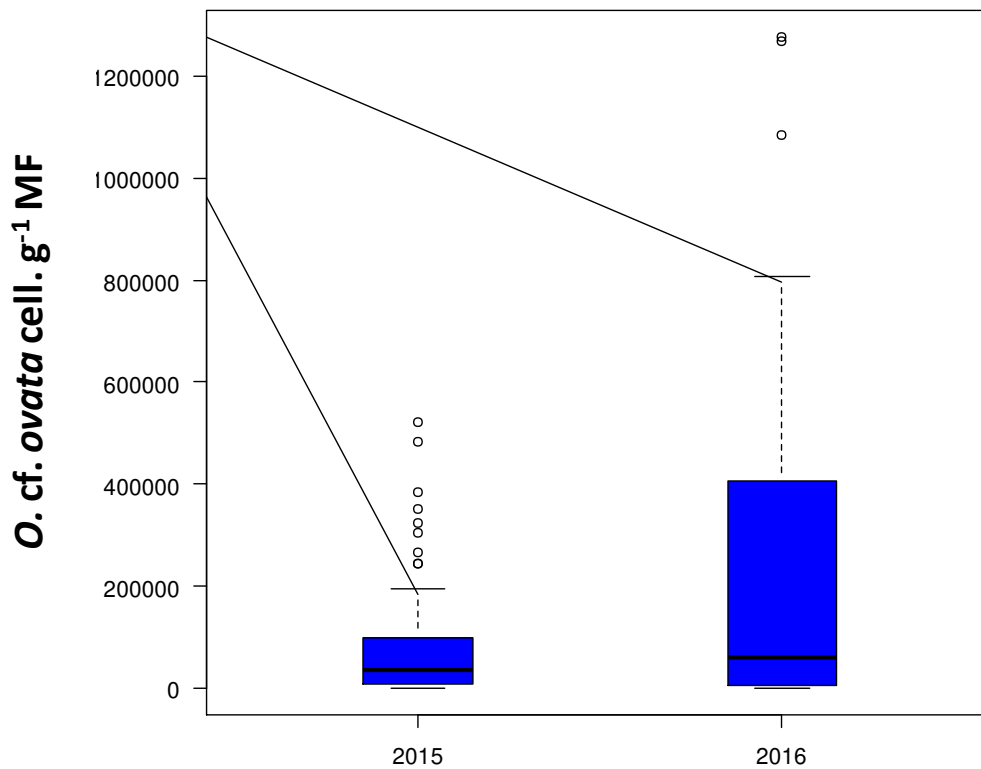


Figure 55 : Variations annuelles de l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* (Salammbô, saisons estivales 2015 et 2016).

La croissance saisonnière d'*Ostreopsis cf. ovata* au niveau de la station (S) est non significative (ANOVA, $p > 0,05$), par contre des corrélations significatives ont été trouvées entre les abondances d'*Ostreopsis cf. ovata* et les mois (ANOVA, $F = 8,39$; $p < 0,001$). Les valeurs les plus élevées ont été relevées durant l'été, de juillet à août mais aussi durant l'automne au mois de septembre et octobre (Figure 56).

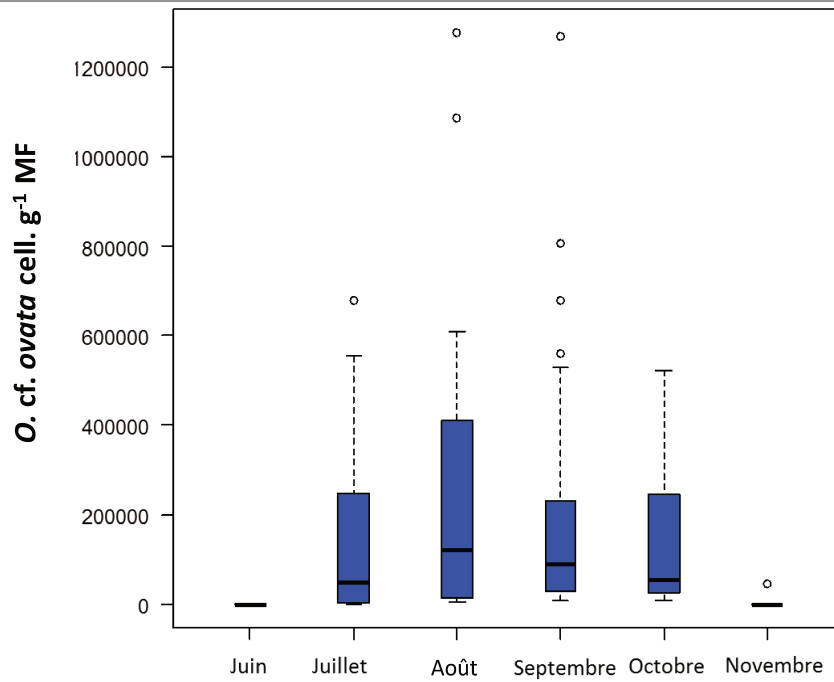


Figure 56 : Variations mensuelles de l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* (Salammbô, saisons estivales 2015 et 2016).

En fonction des espèces hôtes de macroalgues, une corrélation hautement significative a été établie entre l'abondance de l'*Ostreopsis cf. ovata* et les espèces de macrophytes (ANOVA, $F = 10,37$; $p < 0,001$). En effet, les macroalgues *Sargassum vulgare* et *Gelidium sp.* ont abrités les concentrations les plus importantes d'*Ostreopsis cf. ovata* (Figure 57).

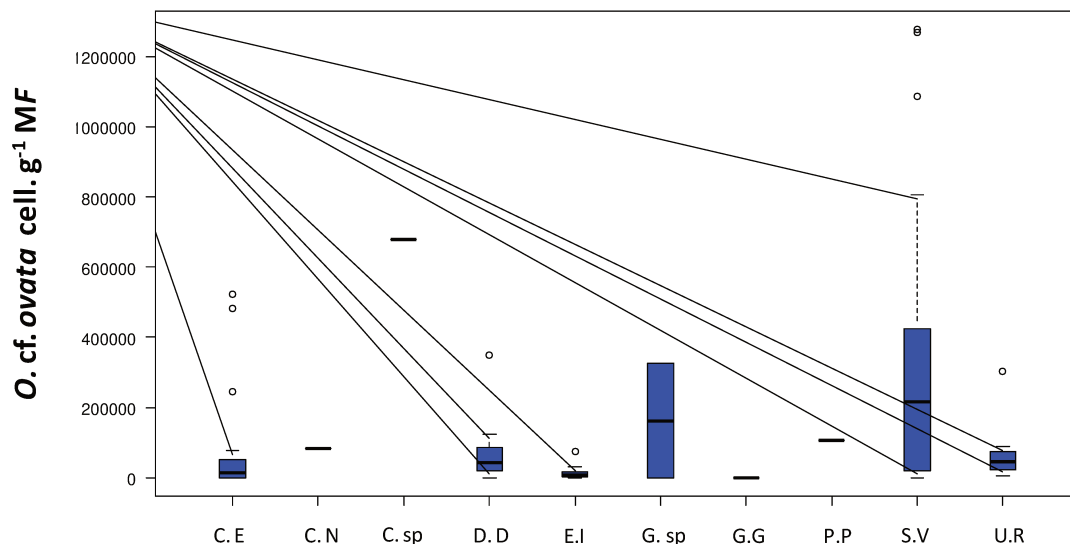


Figure 57 : Variations de l'abondance d'*O. cf. ovata* (cell. g⁻¹ MF) en fonction des espèces de macrophytes. *Corallina elongata* (C.E), *Cymodocea nodosa* (C.N), *Cystoseria sp.* (C. sp), *Dictyota dichotoma* (D.D), *Enteromorpha intestinalis* (E.I), *Gelidium sp.*(G. sp), *Gracilaria gracilis* (G.G), *Padina pavonica* (P.P), *Sargassum vulgare* (S.V), *Ulva rigida* (U.R).

2.4.2 Méthode de comptage automatique (OPR) et moléculaire (MOL)

La comparaison entre les trois méthodes de comptage a été réalisée sur les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* collectées au niveau de la station de Salammbô en 2015. La corrélation entre les méthodes automatiques (optiques et moléculaires) et le comptage manuel standard est indiquée dans la Figure 58 en se basant sur des échantillons d'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau et benthiques collectés au niveau du site de Salammbô. Les points simples représentent la moyenne de 3 répétitions d'une même mesure pour chaque méthode; la taille des points a été choisie pour correspondre à l'incertitude de la répétition typique d'environ 10-15%. Le coefficient de corrélation de Pearson est présenté pour chaque mesure afin de fournir une évaluation numérique de la corrélation entre les méthodes. L'efficacité des méthodes automatiques par rapport à la méthode manuelle se manifeste par un seuil d'alerte plus critique, ce paramètre s'avère essentiel dans une situation où l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* commence à croître et pour laquelle une estimation est cruciale pour gérer la prolifération et prévoir tout danger potentiel. À son tour, l'analyse des résultats a été concentrée dans une région que nous avons appelée région sensible, cette région est mise en évidence sur la Figure 58 comme une bande centrale blanche. Tous les paramètres statistiques ont été calculés en ne tenant compte que des points de confiance situés à l'intérieur de cette région, en négligeant les concentrations très élevées et très faibles.

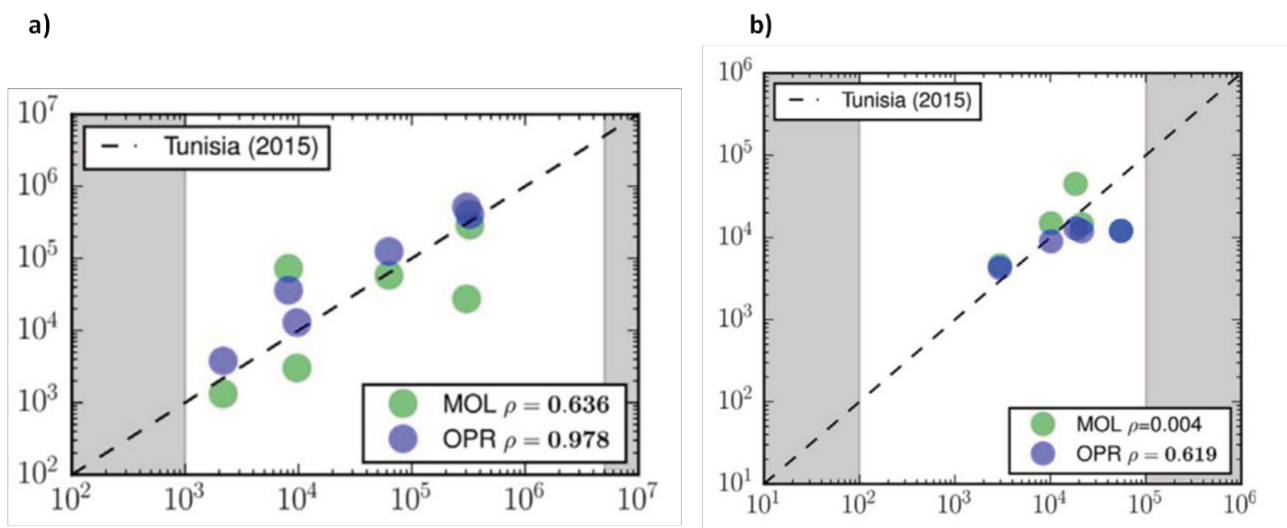


Figure 58 : Comparaison des méthodes de comptage automatiques et du comptage manuel pour les microalgues. (a) épiphytes, (b). planctoniques. Les points bleus et les points verts représentent la numération optique [OPR] et la numération par qPCR moléculaire [MOL] respectivement. La ligne en pointillé représente la bissectrice. (Salammbô, été 2015).

2.4.3 Interactions entre l'abondance des populations d'*Ostreopsis cf. ovata* et les paramètres environnementaux

Au cours de la période d'échantillonnage durant les années 2015 et 2016, une interaction a été mise en évidence entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le site de Salammbô (S) et des facteurs environnementaux, particulièrement la température de l'eau, la salinité, la teneur en oxygène dissous, les concentrations en nitrite NO_2^- , nitrate NO_3^- , silicate $\text{Si}(\text{OH})_4$ et la teneur en chlorophylle *a*.

2.4.3.1 La température de l'eau

Les modèles additifs généralisés (GAM) montrent une forte corrélation entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et la température de l'eau ($F = 4,19$; $p = 0,001$) expliquant 21,8 % de l'écart de la variabilité dans la prolifération de l'*Ostreopsis cf. ovata*. En effet, le pic de concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* coïncide avec des valeurs de température élevées entre 26 et 28°C. En dépassant ce seuil, la concentration commence à décliner (Figure 59 a).

2.4.3.2 La salinité

Les modèles additifs généralisés (GAM) montrent une forte corrélation entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et la salinité ($F = 8,29$; $p = 0,001$) justifiant 30.4% de de l'écart de la variabilité dans la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata*. En effet, les deux pics de concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* coïncident avec des valeurs de salinité comprises entre 37,5 et 38,5 (Figure 59 b).

2.4.3.3 Les teneurs en oxygène dissous

Les modèles additifs généralisés (GAM) montrent une forte corrélation entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et la teneur en oxygène dissous ($F = 4,64$; $p = 0,001$) expliquant 26,7% de l'écart de la variabilité dans la prolifération de l'*Ostreopsis cf. ovata*. En effet, les deux pics d'*Ostreopsis cf. ovata* concordent avec des valeurs d'oxygène élevées (Figure 59 e).

2.4.3.4 Les nutriments

Une interaction a été mise en évidence entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et les teneurs en nitrites NO_2^- , nitrates NO_3^- et silicates $\text{Si}(\text{OH})_4$.

- **Les nitrites NO_2^-**

Les GAM montrent une corrélation significative entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et une forte teneur en nitrites ($F = 8,43$; $p < 0,001$). Ce nutriment a représenté 30,7% de l'écart de la variabilité de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* (Figure 59 c). En effet, la prolifération de l'*Ostreopsis cf. ovata* atteint son maximum lorsque les concentrations en nitrites sont fortes.

- **Les nitrates NO_3^-**

Les GAM montrent une corrélation significative de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et une faible teneur en nitrates ($F = 8,57$; $p < 0,001$). Ce nutriment a représenté 33,8% de l'écart de la variabilité de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* (Figure 59 d). En effet, la prolifération de l'*Ostreopsis cf. ovata* atteint son maximum lorsque les concentrations en nitrate sont faibles.

- **Les silicates $\text{Si}(\text{OH})_4$**

Les GAM ont montré une corrélation significative entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et les faibles concentrations en silicates ($F = 8,29$; $p < 0,001$). Le silicate explique 27% de l'écart de la variabilité de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* (Figure 59 f). En effet, deux pics de concentration des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été détectés lorsque les teneurs en silicates étaient inférieures à $6 \mu\text{M}$.

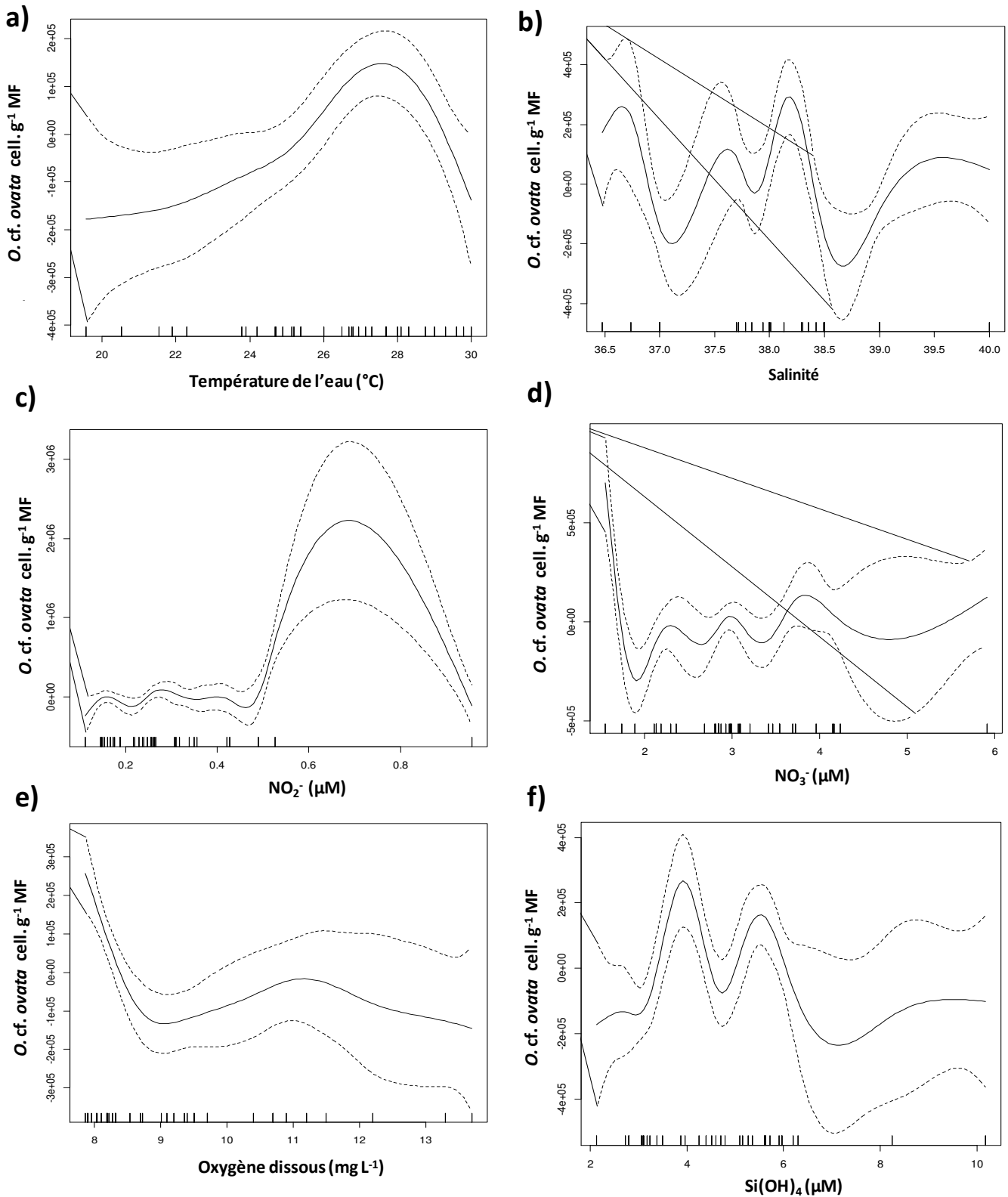


Figure 59 : Incertitude sur l'abondance des cellules d'*O. cf. ovata* en fonction des facteurs abiotiques. (a) Température de l'eau, (b) Salinité, (c) Teneur en nitrites, (d) Teneur en nitrates, (e) Teneur en oxygène dissous, (f) Teneur en silicates (Station de Salammbô, étés 2015 et 2016).

2.4.3.5 la teneur en chlorophylle *a*

Les GAM ont montré une corrélation significative entre l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* et les fortes concentrations en chlorophylle *a* ($F = 7,28$; $p < 0,001$). La teneur en chlorophylle *a* a représenté 25,1% de l'écart de la variabilité de l'abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* (Figure 60).

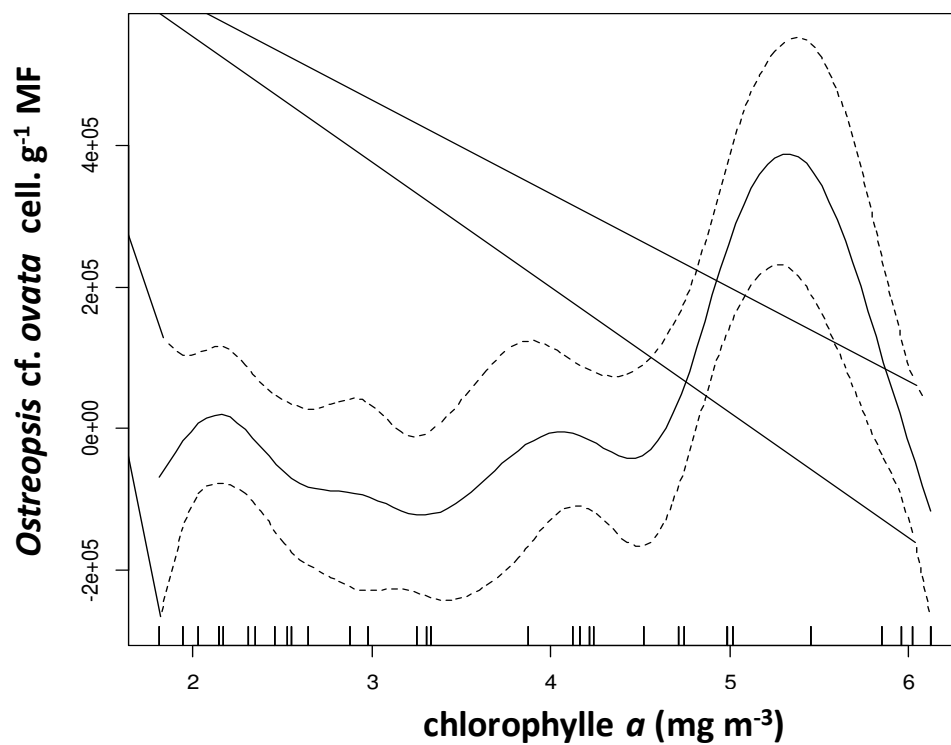


Figure 60 : Abondance des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* en fonction de la teneur en chlorophylle *a* (Station de Salammbô, étés 2015 et 2016).

2.5 Discussion

Avec une concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* épiphyte maximale de $9,91 \times 10^5$ cell. g⁻¹ MF sur *Sargassum vulgare*, et une concentration dans la colonne d'eau de l'ordre de $5,11 \times 10^5$ cell. dm⁻³ à Salammbô (S) durant l'été 2016, les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* mesurées lors de ce travail dans le golfe de Tunis sont les plus élevées jamais recensées sur les côtes Tunisiennes (Turki, 2005 ; Turki *et al.*, 2006 ; Mabrouk *et al.*, 2014 ; Ben Brahim *et al.*, 2015 ; Ben Gharbia *et al.*, 2016 ; Abdennadher *et al.*, 2017). Sur le reste des côtes du pays, les abondances épiphytes les plus élevées d'*Ostreopsis cf. ovata* atteignent des concentrations de l'ordre du millier de cellules (10³) par gramme de Poids Frais de macroalgue : $0,5 \times 10^3$ cell. g⁻¹ MF à Chebba (Mahdia, centre de la Tunisie) (Moncer *et al.*, 2017) et $3,6 \times 10^3$ cell. g⁻¹ MF et à la Baie de la Marsa (Nord de la Tunisie) (Turki, 2005). Les abondances dans la colonne d'eau les plus importantes sur les côtes tunisiennes sont enregistrées le long du golfe de Gabès aussi bien au niveau du port de Sfax (7×10^3 cell. dm⁻³), le long des côtes de l'île de Djerba ($8,8 \times 10^3$ cell. dm⁻³) (Abdennadher *et al.*, 2017) que sur les côtes de l'archipel de Kerkennah ($86,67$ cell. dm⁻³) (Ben Brahim *et al.*, 2015; Feki *et al.*, 2016).

Les abondances mesurées sur le flanc nord de Méditerranée sont généralement plus élevées. Sur les macrophytes, les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* ont atteint $7,25 \times 10^6$ cell. g⁻¹ MF en Catalogne (Mangialajo *et al.*, 2011), $2,54 \times 10^6$ cell. g⁻¹ MF en mer Ligure (Mangialajo *et al.*, 2008), $1,70 \times 10^6$ cell. g⁻¹ MF dans le Nord de la mer Adriatique (Totti *et al.*, 2010) et $8,54 \times 10^6$ cell. g⁻¹ MF à la Baie Villefranche-sur-Mer en France (Cohu *et al.*, 2013). Cependant, les abondances planctoniques mesurées sont généralement plus faibles, avec des valeurs maximales de 386×10^3 cell. dm⁻³ en Catalogne (Mangialajo *et al.*, 2011), 213×10^3 cell. dm⁻³ à Monaco (Cohu *et al.*, 2011) 93×10^3 cell. dm⁻³ en mer Adriatique (Accoroni *et al.*, 2011), 87×10^3 cell. dm⁻³ en mer Ligure (Mangialajo *et al.*, 2008) et 25×10^3 cell. dm⁻³ en mer Egée (Aligizaki et Nikolaidis, 2006). Ces tendances concordent avec les résultats obtenus dans cette étude.

Une corrélation entre les abondances benthiques et les concentrations de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau a été évidente le long de la période des suivis de 2015 et 2016 dans toutes les stations étudiées. Les pics de concentration apparaissent en général de manière décalée de quelques jours. Ce phénomène est récurrent et a été signalé

dans plusieurs études (Vila *et al.*, 2001b ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Mangialajo *et al.*, 2008 ; Totti *et al.*, 2010 ; Accoroni *et al.*, 2011 ; Cohu *et al.*, 2013 ; Hachani *et al.*, 2018). Il peut être dû aux rythmes biologiques du détachement cellulaire du macrophyte et la mise en suspension des cellules benthiques par migration verticale (Aligizaki et Nikolaidis, 2006, Mangialajo *et al.*, 2011) ou à la remise en suspension causée par les baigneurs. Ceci illustre le rôle important des macrophytes en tant que source importante de microalgues dans la colonne d'eau. Sans oublier le rôle des vents forts qui représentent un phénomène notable dans les eaux côtières et peu profondes, car ils contribuent aussi au mélange intensif des masses d'eau (Kleshenberg et Schumann, 1994, Telesh, 2004, Telesh *et al.*, 2008).

Durant les suivis réalisés en 2015 et 2016 le long du golfe de Tunis, les efflorescences ont été principalement détectées durant la saison estivale entre les mois de juillet et août. Cette période correspond à une phase de pics de concentration d'*Ostreopsis cf. ovata*. Cette tendance générale s'applique à la quasi-totalité des régions méditerranéennes où des efflorescences s'observent à la même période d'une année à l'autre. Malgré cette tendance générale, notre étude a démontré l'existence d'une certaine variabilité temporelle dans l'apparition des périodes d'efflorescence sur chaque station étudiée. En effet, les pics de concentration peuvent apparaître plus ou moins tardivement d'une année à une autre. Ainsi, en 2015 à Cap Zebib, le principal pic de concentration a été observé en juillet, et un autre plus tard est apparu en septembre. Le site de Salammbô s'est aussi distingué par un pic de concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* durant le mois d'octobre en 2015. Un second épisode d'efflorescence d'*Ostreopsis cf. ovata* s'est déclenché à la fin de l'été, voire au début de l'automne, et semble constituer un phénomène relativement fréquent, puisque ces répétitions d'efflorescence ont été observées dans plusieurs sites de Catalogne (Mangialajo *et al.*, 2008), du Sud-Est de la France et de Ligurie italienne du début à la fin du mois d'octobre (Totti *et al.*, 2010 ; Accoroni *et al.*, 2011). La tendance temporelle du développement d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis peut être liée aux variations saisonnières de la température de l'eau de mer et de la salinité. En fait, l'abondance la plus élevée d'*Ostreopsis cf. ovata* a été observée lorsque la salinité et la température de l'eau de mer ont atteint leurs valeurs optimales (Turki, 2004 ; Pistocchi *et al.*, 2011 ; Pezolesi *et al.*, 2014 ; Tawong *et al.*, 2015 ; Hachani *et al.*, 2018). En effet, la corrélation positive observée entre la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* et la température a déjà été démontrée dans des zones tempérées (Simoni *et al.*, 2004 ; Ungaro *et al.*, 2010 ; Mangialajo *et al.*, 2011 ; Ben Brahim *et al.*, 2015) mais aussi dans les zones tropicales (Ballantine *et al.*, 1985, 1988 ; Morton *et al.*, 1992 ;

Okolodkov *et al.*, 2007). D'autres variables environnementales agissent en concert avec l'effet de la température de l'eau et créent des conditions optimales favorables au déclenchement des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata*.

En plus de la variation temporelle, une variation spatiale est observée le long du littoral du golfe de Tunis, entre des stations distantes de quelques kilomètres à plusieurs centaines de kilomètres. La variabilité des abondances d'*Ostreopsis cf. ovata* à une échelle similaire a été rapportée dans plusieurs études (Grzebyk *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 2000 ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Parsons et Preskitt, 2007 ; Cohu *et al.*, 2013). Durant les deux années de suivi, certaines stations apparaissent plus propices au développement d'*Ostreopsis cf. ovata* que d'autres. La tendance spatiale du développement d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis se reflète par l'apparition des premiers pics (dans la colonne d'eau et épiphyte) durant le début du mois de juillet particulièrement dans les sites de Sidi Daoud (SD) et de Sidi Rais (SR) qui se trouvent à l'Est du golfe de Tunis, alors que les abondances maximales sont enregistrées à la fin du mois de juillet correspondant à la période de floraison principale observée pour plusieurs zones méditerranéenne (Mangialajo *et al.*, 2008, 2011 ; Cohu *et al.*, 2011, 2013). Parmi toutes les stations de prélèvement, Cap Zebib (CZ) et Salammbô (S) qui sont situés sur le flanc Ouest du golfe de Tunis détiennent les valeurs de concentration benthique les plus élevées (avec $1,08 \times 10^5$ et $9,91 \times 10^5$ cell. g^{-1} MF respectivement). Cette hétérogénéité spatiale dans le développement d'*Ostreopsis cf. ovata* peut alors refléter une réelle préférence pour des zones spécifiques. En effet les stations (S) et (CZ) présentent des caractéristiques similaires du point de vue de la nature du substrat (roches naturelles) et couverture végétale. Cependant dans notre cas les caractéristiques hydrodynamiques semblent avoir un effet minime sur la prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata*, bien que des études antérieures aient suggéré la préférence d'*Ostreopsis cf. ovata* pour les zones abritées (Grzebyk *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 2000 ; Vila *et al.*, 2001b ; Simoni *et al.*, 2003 ; Shears et Ross, 2009 ; Totti *et al.*, 2010 ; Mabrouk., 2011). L'impact anthropique pourrait constituer un autre facteur déterminant dans l'augmentation des abondances benthiques et planctoniques d'*Ostreopsis cf. ovata*, notamment pour la station de Salammbô qui se caractérise par les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* les plus importantes et les plus maintenues dans le temps, aussi bien dans le compartiment benthique que dans la colonne d'eau. Comparée aux autres stations de l'étude, cette zone est la plus sujette à l'urbanisation. Elle a connu des modifications des habitats côtiers suite aux constructions portuaires, industrielles et de plaisance qui favoriseraient l'apparition de masses d'eau confinées et potentiellement

eutrophes. A cela s'ajoutent les rejets de polluants anthropiques qui provoqueraient un accroissement très net des concentrations en nutriments, et pourraient ainsi favoriser l'apparition des efflorescences. Ce phénomène a été constaté dans les îles de North Line (océan Pacifique) où une augmentation des abondances d'*Ostreopsis* sp. liée à un changement dans le recouvrement macrophytique a été corrélée aux perturbations anthropiques (Briggs et Leff, 2007), ou encore le long de zone côtière de Apulian (sud de l'Italie) où une corrélation entre le développement d'*O. cf. ovata* et la contamination microbiologique de nature anthropique a été observée par Ungano *et al.* (2010). Des tendances similaires ont été émises aussi pour la mer Ligure par Cohu *et al.*, (2013) et plus récemment par Meroni *et al.*, (2018) le long de la côte de Gênes (nord de l'Italie).

Une forte variation des abondances d'*Ostreopsis cf. ovata* a été observée entre plusieurs substrats biotiques le long du golfe de Tunis. Cette espèce semble avoir une éventuelle préférence pour ses hôtes. En effet, les plus fortes abondances ont été trouvées sur les algues brunes, notamment, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris polypodioides*, *Padina pavonica*, *Sargassum vulgare* et *Giliduum* sp. Les algues vertes et les phanérogames recensent des concentrations plus faibles. Cette discrimination concorde avec plusieurs études réalisées sur les côtes Méditerranéennes (Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Monti *et al.* 2007 ; Mangialajo *et al.*, 2008 ; Mangialajo *et al.*, 2011 ; Totti *et al.*, 2010 ; Cohu et Lemée, 2012). Cette tendance pourrait aussi expliquer les fortes corrélations entre l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* et les substrats rocheux qui sont plus favorables au développement des algues brunes. En revanche, dans d'autres cas, cette affinité n'est pas évidente et des différences significatives d'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* par rapport à d'autres macroalgues peuvent être observées (Vila *et al.*, 2001b ; Okolodkov *et al.*, 2007). En réalité, différents facteurs peuvent entrer en jeu dans la sélection de l'hôte d'*Ostreopsis cf. ovata*, tels que la forme ou la surface disponible sur le substrat (Vila *et al.*, 2001b ; Aligizaki et Nikolaidis, 2006 ; Parsons et Preskitt, 2007 ; Totti *et al.*, 2010). De plus, les effets allélopathiques (stimulants ou inhibiteurs) que peuvent avoir les macrophytes sur les microalgues benthiques ou inversement, pourraient être un facteur déterminant dans la relation microalgue-macrophyte (Grzebyk *et al.*, 1994 ; Jin et Dong, 2003 ; Wang *et al.*, 2007 ; Ben Gharbia *et al.*, 2017).

En général plusieurs études attestent du rôle clé des nutriments et de leur disponibilité sur la croissance des Dinoflagellés et parfois même sur l'ampleur des évènements de HABs (Sellner *et al.*, 2003 ; Al-Ghelani *et al.*, 2005 ; Glibert *et al.*, 2005b ; Glibert et Burkholder, 2006 ;

Maso et Garces, 2006 ; Heisler *et al.*, 2008). Pour *Ostreopsis cf. ovata*, certains travaux ont démontré l'absence de toute corrélation entre sa prolifération et les teneurs en sels nutritifs (Delgado *et al.*, 2006 ; Shears et Ross, 2009) ou une corrélation limitée (Vila *et al.*, 2001a ; Cohu., 2011 ; Hachani *et al.*, 2018). Néanmoins, Accoroni *et al.*, (2015), ont relevé une action synergique entre la température optimale de l'eau ($> 25^{\circ}\text{C}$) et les nutriments, en particulier les apports de phosphate ($> 0.2 \mu\text{M}$), sur les efflorescences associées à *Ostreopsis cf. ovata*. Cette synergie provoque le déclenchement du processus de croissance par la germination des kystes et la prolifération des cellules, qui sera maintenue grâce à l'assimilation de PO_4^{3-} . Nos résultats ont montré que les deux pics d'*Ostreopsis cf. ovata* ont coïncidé avec de faibles concentrations en nitrites, nitrates, azote total et silicates. Cette tendance a été confirmée par Accoroni *et al.*, (2011). Les faibles concentrations de nitrite semblent être liées à la prolifération de l'espèce de Dinoflagellé *Prorocentrum lima* qui prolifère à la même période qu'*Ostreopsis cf. ovata*. Cette relation a déjà été signalée dans d'autres études (Parsons et Preskitt, 2007, Varkitzi *et al.*, 2010). A l'instar de *P. lima*, des espèces de Diatomées semblent aussi suivre la même tendance de prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* ce qui explique probablement la diminution de la concentration du silicate nécessaire à leur croissance. De plus, les résultats n'ont montré aucun impact des nutriments sur l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les concentrations d'éléments nutritifs ne semblent pas être un facteur limitant pour les fluctuations des concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis (Hachani *et al.*, 2018). Cette constatation pourrait être expliquée par le caractère mixotrophe des ces espèces qui peuvent réduire leur besoin en nutriments inorganiques en optant pour une source organique par le biais de la phagotrophie. Par conséquent, la croissance d'*Ostreopsis cf. ovata* pourrait se produire en se détournant des sels nutritifs du milieu (Faust et Morton, 1995 ; Faust, 1998 ; Stoecker *et al.*, 2006 ; Burkholder *et al.*, 2008 ; Ignatiades et Gotsis-Skretas, 2010).

Lors des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata*, la quantité d'oxygène dissous est un facteur essentiel à prendre en considération durant le suivi dans le milieu. Dans notre cas, la saturation en oxygène a augmenté entre la période de pré-efflorescence et l'efflorescence estivale, puis elle a fortement diminué après l'épisode de l'efflorescence. Durant cette étude, nous avons remarqué que les deux pics d'*Ostreopsis cf. ovata* ont coïncidé avec des valeurs élevées en oxygène. Ce résultat démontre l'importance de l'effet de l'augmentation de l'oxygène sur le déclenchement des épisodes d'efflorescence. La diminution de l'oxygène est probablement liée à la décomposition de la matière organique pendant l'efflorescence

d'*Ostreopsis cf. ovata*. Ce phénomène a été observé pendant les épisodes de prolifération d'autres dinoflagellés nocifs (Zingone et Enevoldsen, 2000 ; Al-Ghelani *et al.*, 2005 ; Ning *et al.*, 2009). En outre, nos résultats ont démontré une corrélation significative entre les teneurs en chlorophylle *a* dans l'eau et les abondances d'*Ostreopsis cf. ovata*. Cette relation serait probablement due à la croissance d'*Ostreopsis cf. ovata* en périodes d'efflorescences. Comme pour toute microalgue autotrophe ou mixotrophe, ces résultats confirment les observations rapportées en Méditerranée (Ungaro *et al.*, 2010) et en milieu tropical (Parsons et Preskitt, 2007).

Les épisodes de prolifération d'algues nuisibles (HABs) étant de plus en plus fréquents, la gestion et la surveillance de ces événements n'est pas toujours évidente et conduisent à des réactions souvent tardive. En conséquence, un fort besoin d'approches innovantes se fait sentir dans la perspective de la gestion et de l'anticipation de ce phénomène. Afin de contribuer au développement d'outils de gestion rentables des risques associés à la prolifération des Dinoflagellés du genre *Ostreopsis cf. ovata* le long des côtes méditerranéennes, l'un des principaux objectifs du projet M3-HABs est la mise en place d'une stratégie commune basée, entre autres, sur l'optimisation des méthodes de comptage d'*Ostreopsis cf. ovata* et l'élaboration d'approches de comptage rapide et automatique dans le but d'une gestion plus fiable et rapide. Ce résultat escompté n'est pas évident à atteindre par la méthode de comptage manuel qui nécessite du temps et un haut degré d'expertise taxonomique. Ainsi, il a été impératif de mettre en place de vastes plans d'échantillonnage avec des échelles temporelles et spatiales globales afin de remédier aux risques des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* qui peuvent produire de fortes quantités de toxines (14-75 pg / cellule dans des échantillons de terrain et 10-200 pg / cellule en culture) (Accoroni *et al.*, 2011 ; Funari *et al.*, 2015). Deux autres méthodes ont été testées et comparées à la méthode de comptage manuel ; il s'agit de la méthode de reconnaissance optique-automatique (OPR) et la méthode de comptage moléculaire (MOL) (Vassali *et al.*, 2018).

D'une manière générale, les méthodes de comptage alternatives testées dans la présente étude d'*Ostreopsis cf. ovata* sont, dans une large mesure, en bon accord avec les résultats manuels, fournissant des coefficients de Pearson supérieurs à 0,5 dans presque toutes les situations d'efflorescence, à la fois pour les échantillons planctoniques et benthiques.

Dans l'ensemble, la méthode MOL présentait une tendance à surestimer légèrement le décompte, tandis que le système OPR sous-estimait généralement la valeur du comptage

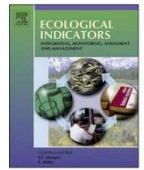
manuel. Cette tendance générale est claire à l'intérieur de la région de confiance où les mesures OPR sont systématiquement inférieures au résultat du comptage manuel, alors que les valeurs MOL sont plus élevées. Ce comportement est associé à la nature différente des approches. En fait, l'OPR est basé sur un algorithme de reconnaissance, explicitement réglé pour éviter de compter les débris ou les grands agrégats, conduisant à un nombre légèrement inférieur de cellules tachetées. Au lieu de cela, l'approche MOL est basée sur l'évaluation du contenu moléculaire de l'échantillon, quel que soit l'état des organismes, incluant ainsi dans le compte la contribution des cellules brisées qui auraient été négligées par un comptage manuel. En principe, étant donné la nature systématique de ce désaccord, il pourrait être éliminé en effectuant une normalisation a posteriori des résultats.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Indicators

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



Original Article

Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea



Massimo Vassalli^{a,*}, Antonella Penna^{b,n}, Francesca Sbrana^a, Silvia Casabianca^{b,n}, Nikolla Gjerci^c, Samuela Capellacci^{b,n}, Valentina Asnaghi^{d,n}, Ennio Ottaviani^c, Valentina Giussani^{d,j}, Laura Pugliese^{b,n}, Cécile Jauzein^{e,f}, Rodolphe Lemée^e, Mohamed Amine Hachani^g, Souad Turki^g, Laury Açaf^m, Marie Abboud-Abi Saab^m, Anna Fricke^{h,i}, Luisa Mangialajo^{e,h}, Rosella Bertolotto^j, Cecilia Totti^{k,n}, Stefano Accoroni^k, Elisa Berdalet^l, Magda Vila^l, Mariachiara Chiantore^{d,n}

^a Institute of Biophysics, National Research Council, Genova, Italy

^b Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino, Urbino, Italy

^c OnAir srl, Genova, Italy

^d University of Genova, Genova, Italy

^e Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSU-CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

^f IFREMER, Centre de Brest, DYNECO PELAGOS, F-29280 Plouzané, France

^g Laboratoire Milieu Marin, Instm Centre la Goulette, la Houlette, Tunis, Tunisia

^h Université Côte d'Azur, CNRS, ECOMERS, Nice, France

ⁱ Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Florida 4750, Bahía Blanca, B8000FWB, Argentina

^j Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Ligure (ARPAL), Genova, Italy

^k Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

^l Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de ciències del mar, CSIC, Barcelona, Spain

^m National Council for Scientific Research / National Center for Marine Sciences, Beirut, Batroun, Lebanon

ⁿ Consorzio Nazionale Interuniversitario per le Scienze del Mare (CoNISMa), Roma, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Ostreopsis spp.
Monitoring
Harmful algae
Molecular recognition
Optical Recognition
Automatic identification
Mediterranean Sea

ABSTRACT

This paper describes the adoption and validation of two innovative methods for the automated count of *Ostreopsis* spp. concentration in sea water: a molecular assay based on RT-qPCR and an opto-electronic device implementing automatic recognition algorithms. The proposed approaches were tested on samples coming from different locations along the Mediterranean Sea and compared with the standard counting method based on microscopy observation by a taxonomy expert. The results demonstrate the effectiveness of both automatic approaches which provide a valuable tool, mostly cost and time effective, for the establishment of wide pan-Mediterranean monitoring strategies of *Ostreopsis* spp. blooms. Moreover, the two automatic methods demonstrated the ability to discriminate for the presence of a different but similar species, *O. fattorussoi*, for which new species-specific qPCR primers were developed.

1. Introduction

Over the last decade, episodes of exceptional blooms of microalgae *Ostreopsis* spp., have been reported repeatedly along the coasts of the Mediterranean Sea. *Ostreopsis* is a potentially toxic benthic dinoflagellate that, when reaching high concentration during its blooms, may cause dangerous side effects to human health and marine organisms, therefore being deleterious for commercial activities, tourism, fishery and aquaculture. *Ostreopsis* proliferates in shallow and sheltered waters, usually characterized by low hydrodynamics and by rocky

bottoms covered by macroalgal vegetation, forming mucilaginous aggregates (Honsell et al., 2011; Giussani et al., 2015). In presence of wave motion, these dinoflagellates can be resuspended in the water column, giving rise to flocculates and sometimes to surface foam, which can be conveyed in marine aerosols (Ciminiello et al., 2014). Traces of putative palytoxin, among the most powerful non peptidic marine toxins known to date, and ovatoxins are found in *Ostreopsis* samples (Ciminiello et al., 2006, 2012), and *Ostreopsis* blooms were associated to mass death of benthic organisms (sea urchins, limpets and barnacles) (Amzil et al., 2012; Shears and Ross, 2009) and intoxication to humans,

* Corresponding author.

E-mail address: massimo.vassalli@cnr.it (M. Vassalli).

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.063>

Received 15 February 2017; Received in revised form 26 July 2017; Accepted 31 July 2017
1470-160X/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

characterized by irritation of the upper airways, coughing, rhinorrhoea, shortness of breath, muscle and joint pain, fever and irritation of the mucous membranes of the eye and skin (Gallitelli et al., 2005; Durando et al., 2007; Ciminiello et al., 2012).

Notwithstanding the Mediterranean scale of the emerging phenomenon, still little has been produced in terms of guidelines for managing risks associated to blooms in the Mediterranean countries. As far as *Ostreopsis* spp. is concerned, no European or international official thresholds in the water (planktonic concentrations) or on macroalgae (benthic concentrations) have been proposed, yet. Since almost all Italian coastal regions are affected by *O. cf. ovata* blooms and being Italy one of the Mediterranean countries that earlier experienced some of the most noxious events (Ciminiello et al., 2006), in early 2007 a manual on the management of the risk associated to *O. cf. ovata* blooms along the Italian coasts was produced by a group of experts put in charge by the Ministry of Health, formed by the Italian Central Health Institute, Regional Environmental Agencies and scientists. These guidelines were recently updated (Funari et al., 2014, 2015), differentiating thresholds according to environmental conditions: cells concentration between 10,000 and 30,000 cells/L produces a shift from routine phase to alert phase in case of environmental conditions considered favourable to *O. cf. ovata* proliferation, while a shift to the emergency phase is set at 30,000 cells/L, only in case of conditions that are favourable to bloom events and to aerosol production. Similarly, in France, since 2007, the French National Health Agency (Direction General de la Santé) indicated a “Warning” threshold at 4000 cell/L and an “Alert” threshold at 30,000 cell/L (Tichadou et al., 2010), since 2009, thresholds have been increased respectively to 30,000 cell/L (Warning) and 100,000 cell/L (Alert). All these thresholds refer to concentrations in the water column. In Spain, the Catalan Water Agency (ACA) setted the threshold at ~100,000 cells/g of macroalgae (fresh weight) or ~10,000 cells/L.

Direct count of algal abundance has been so far the commonly used methodology in accounting for bloom events. Nevertheless, microalgae identification and counting require a great deal of taxonomic expertise, in addition to being time consuming and impractical for processing a large number of samples in the monitoring activities, such as those performed during the summer period for satisfying the sanitary regulatory requirements for bathing waters. The long processing time implies that these operations are carried out at a frequency that may not be appropriate to promptly generate early warning for bathing water associated and productive activities.

In the framework of the ENPI-CBCMED M3-HABs Project, standardized protocols for sampling and counting, together with innovative counting techniques, were produced and tested in a cross-Mediterranean perspective, in order to improve monitoring design. In the Mediterranean Sea, *Ostreopsis* spp. can include various *Ostreopsis* species including *O. cf. ovata*, *O. cf. siamensis* and the recently described *O. fattorussoi*, which was found in the eastern Mediterranean coastal waters (Lebanon and Cyprus) (Penna et al., 2010, 2014; Accoroni et al., 2016). Generally, all *Ostreopsis* species are extremely difficult to be identified by optical microscopy; meanwhile, they can be detected by PCR and qPCR based assays using species-specific primers (Battocchi et al., 2010; Perini et al., 2011; Casabianca et al., 2014).

Different protocols relying on traditional optical microscopy and two different approaches (automatic opto-electronic and molecular qPCR counting methods) were carried out on the same environmental samples (benthic and planktonic). Results were compared and intercalibrated also with the traditional optical counting method in order to assess reliability of automated identification and different counting methods.

2. Materials and methods

2.1. Study area and sampling procedure

A total of 70 macroalgae (all from the same macroalgal species, *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau) and 60 seawater samples were collected in triplicate at various Mediterranean sites for the intercalibration exercise: Salammbô (Tunisia), Batroun (Lebanon), Nice and Rochambeau (France), Genoa (Liguria, Italy), Alghero (Sardinia, Italy), Ancona (Marche, Italy) and Llanerres (Spain). Samples were fixed with 1% acidic lugol solution, and stored at +4 °C until counting analyses by microscopy, opto-electronic and qPCR systems.

Samples were collected during summer of 2014 and 2015. To avoid counting variations associated to differences in the sampling protocol between the different research groups involved in the intercalibration activities, a common procedure was agreed at the end of 2014 in the framework of M3-HABs project and applied at all sampling stations during 2015 campaign. The data collected during both sampling seasons were used in the present work and the agreed and shared protocol used for the 2015 sampling season is reported below.

The sampling frequency was adapted to seasonal variations of *Ostreopsis* blooms in each surveyed Mediterranean area. In the northern Mediterranean Sea, blooms are often occurring between July and August, extending also in September–October. Monitoring of such blooms was performed from June to October, with a sampling frequency of at least once per week, increased to every 2–3 days in the blooming period. In the eastern Mediterranean Sea, samples were collected weekly in the blooming period and monthly all over the year. For each station, water samples (1 L) were collected (indicated as planktonic throughout this paper) before benthic ones (0.5 L), in order to avoid a mechanical re-suspension of benthic cells that might artificially increase planktonic concentrations. Benthic substrates were sampled at 0.5 m depth and planktonic samples were collected at 20 cm above the substrate (corresponding to 0.3 m depth). In order to ensure replication, at least three stations were considered for each site, spaced apart approximately 10 m. The list of sampling stations with the total number of collected replicates is reported in Table 1.

The sampling of benthic substrates was performed by collecting seawater samples and macrophytes (the brown alga *Halopteris scoparia*), using the protocol reported in Mangialajo et al. (2011). In short, isolation of epiphytic cells from macroalgal benthic samples was performed by vigorously shaking (for 10 s) the macrophyte samples, then rinsing with 100 mL of filtered seawater (0.2 µm) and shaking two times. Counting was performed on 1 mL, using the Sedgewick Rafter chamber and cells abundances are reported as number of *Ostreopsis* per gram of macroalgae, after oven drying at 60 °C the macroalgal sample. For water samples, the Utermöhl method was used, where a sub-sample (in the standardized protocol for *Ostreopsis*: 50 mL) is poured in a cylinder/chamber complex and left to settle for typically 24 h before observation at the inverted microscope. Counting is performed on the whole surface of the chamber or across transects, in order to count a minimum number of 200 cells per sample. Concentrations are reported as cells/L.

2.2. Sample conservation

Environmental samples were fixed using 1% (vol/vol) of acidic Lugol solution (final concentration). Samples were collected at different phases of the bloom (development, peak and decline), in order to improve the intercalibration of counting methods at different cell concentration levels. The samples were processed for the three different counting methods (optical and opto-electronic microscopy, and molecular qPCR assay) in less than one month in order to avoid any deterioration of samples.

Table 1

List of sampling stations. For each station, the LSU gene copy number cell⁻¹ determined by qPCR assay from environmental samples are indicated. Only for Batroun, Lebanon the gene copy number cell⁻¹ was determined on ITS-5.8S gene. The number of studied samples (collected and analysed in triplicate by all three methods) divided by year was also reported. France samples from Nice and Rochambeau have different rDNA calibration but they were counted and analysed together.

Sampling station	rDNA gene copy number cell ⁻¹ (± S.D.)	Collected samples			
		Plankton		Benthic	
		2014	2015	2014	2015
Genova, Liguria, Italy	4851 ± 116	3	11	5	9
Llavaneres, Spain	1974 ± 144	n.a.	5	6	4
Rochambeau, France	22269 ± 7406	8	10	14	10
Nice, France	46458 ± 2394	//	//	//	//
Alghero, Sardinia, Italy	94723 ± 10202	n.a.	6	n.a.	6
Salammo, Tunisia	2009 ± 175	n.a.	5	n.a.	6
Ancona, Marche, Italy	41788 ± 3466	n.a.	5	n.a.	5
Batroun, Lebanon	8333 ± 4616	n.a.	5	n.a.	5

2.3. Manual counting [MAN]

Macroalgal benthic samples were counted using a Sedgewick Rafter Counting chamber (1 mL) and a classical optical microscope. For water samples, the Utermöhl method was used, where a sub-sample (in the standardized protocol for *Ostreopsis*: 50 mL) is poured in a cylinder/chamber complex and left to settle for typically 24 h before observation at the inverted microscope. Counting is performed on the whole surface of the chamber or, in case of high concentration, along two orthogonal transects (cross-like).

2.4. Molecular counting method [MOL]

2.4.1. Sample processing

A volume ranging from 1 to 50 mL and from 1 to 10 mL of water and benthic samples, respectively, were lysed as described in Casabianca et al. (2014). Briefly, samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min or at 12,000 rpm for 10 min at room temperature; the pellets were washed with 1 mL filtered artificial seawater, then centrifuged at 11,000 rpm for 15 min and stored at -80 °C or directly processed. Pellets were resuspended and lysed using a freeze/thaw cycle protocol in 500 µL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.5% Nonidet P40, 0.5% Tween 20, 2.5 mM CaCl₂, 0.1 mg/mL Proteinase K). The suspension was incubated at 55 °C for 3 h and vortexed every 20 min. Samples were then incubated at 100 °C for 5 min, to inactivate the proteinase K and centrifuged at 12,000 rpm for 1 min to precipitate cell debris. The supernatants, or crude extracts, were transferred into new tubes, and were diluted at 1:10 for the qPCR experiments.

2.4.2. PCR primer design and specificity

Species-specific primers for the Mediterranean *O. fattorussoi* were designed based on 5.8S-ITS rDNA sequences of *O. fattorussoi* L1000 (accession no. LT220223), and L1020 (accession no. LT220224) from Batroun, Lebanon, and *O. fattorussoi* C1005 (accession no. LT220222) and C1012 (accession no. LN875554) from Vassiliko Bay, Cyprus. The multiple sequence alignments were constructed using ClustalX2 ver. 2.0 (Larkin et al., 2007). Primers were designed using Primer-BLAST (Ye et al., 2012). The species-specific primers for the amplification of 104 bp (T_m = 78 °C) fragment of the 5.8S-ITS rDNA gene were: *O. fattorussoi* str clade sp. F 5'-TAAATGAAGGGTGCAGCCAAT-3'; *O. fattorussoi* str clade sp. R 5'-GTACCAAGGTGATACCCAAGT-3'. The species-specificity of the primers was first examined *in silico* using BLAST, and then, tested in qPCR on purified genomic DNA. The total genomic DNA was extracted as described in Penna et al. (2010) from cultured *Ostreopsis* spp. strains and other dinoflagellate genera, including also *Ostreopsis* strains collected in different geographical areas, as well as environmental samples previously checked by light microscopy for the presence and/or absence of the *Ostreopsis* spp.

2.4.3. Standard curves for the *Ostreopsis* spp. quantification

Site-specific environmental standard curves for *O. cf. ovata* and *O. fattorussoi* LSU rDNA (LSU-STD) and 5.8S-ITS rDNA (ITS-STD), respectively, were constructed as described in Casabianca et al. (2014). Moreover, a plasmid standard curve for *O. cf. ovata* was obtained as described in Perini et al. (2011), while the standard curve for *O. fattorussoi* was constructed, from the purified PCR product generated from the DNA of *O. fattorussoi* L1000 following the method described in Penna et al. (2010).

2.4.4. The qPCR assay of *Ostreopsis* spp.

The qPCR assay of *O. cf. ovata* and *O. fattorussoi* was performed in a final volume of 25 µL using the Hot-Rescue Real-time PCR Kit SG (Diatheva, Fano, Italy), primers at a final concentration of 300 nM, 0.5 U of Hot-Rescue Taq DNA polymerase, and 2 µL undiluted and 1:10 diluted crude extracts of environmental samples. Amplification reactions were carried out using a Step-one Real-time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The thermal cycling conditions consisted of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 40 cycles at 60 °C. The *O. cf. siamensis* qPCR targeting the LSU rDNA genes assay was performed as previously described by Casabianca et al. (2014).

2.4.5. PCR data analysis

For qPCR assay, acquisition of data and subsequent analyses were carried out using StepOne software v. 2.3. A dissociation curve was generated after each amplification run to check for amplicon specificity and primer dimers. The automatically generated standard curves were accepted when the slope was between 3.38 and 3.32 (98–100% efficiency) and the correlation coefficient was at least 0.97.

2.5. Optical recognition and counting method [OPR]

The Optical Recognition Method (OPR) is composed of three main components: a dedicated microscopy platform, an XYZ motorized stage and a custom software implementing a specialized identification algorithm. The system was previously described in detail (Sbrana et al., 2017) and the main components are here recalled.

The hardware platform is based on a custom microscopy design (VacuumFAB srl, Milano, Italy), featuring a 10X plan-apo objective in transmission mode. The XY stage is motorized through a commercial stepper motor controller (Phytron GmbH, Munich, Germany) connected to the PC via USB. Image acquisition is performed using a DMK 23G274 GigE camera (The Imaging Source, Bremen, Germany) exploiting a fast ethernet connection to a dedicated adapter on the PC. A mechanical interface to the commercial K-frame was developed to house both Utermöhl and Sedgewick-Rafter deposition chambers.

All the peripherals of the system (CCD camera, motors controller,

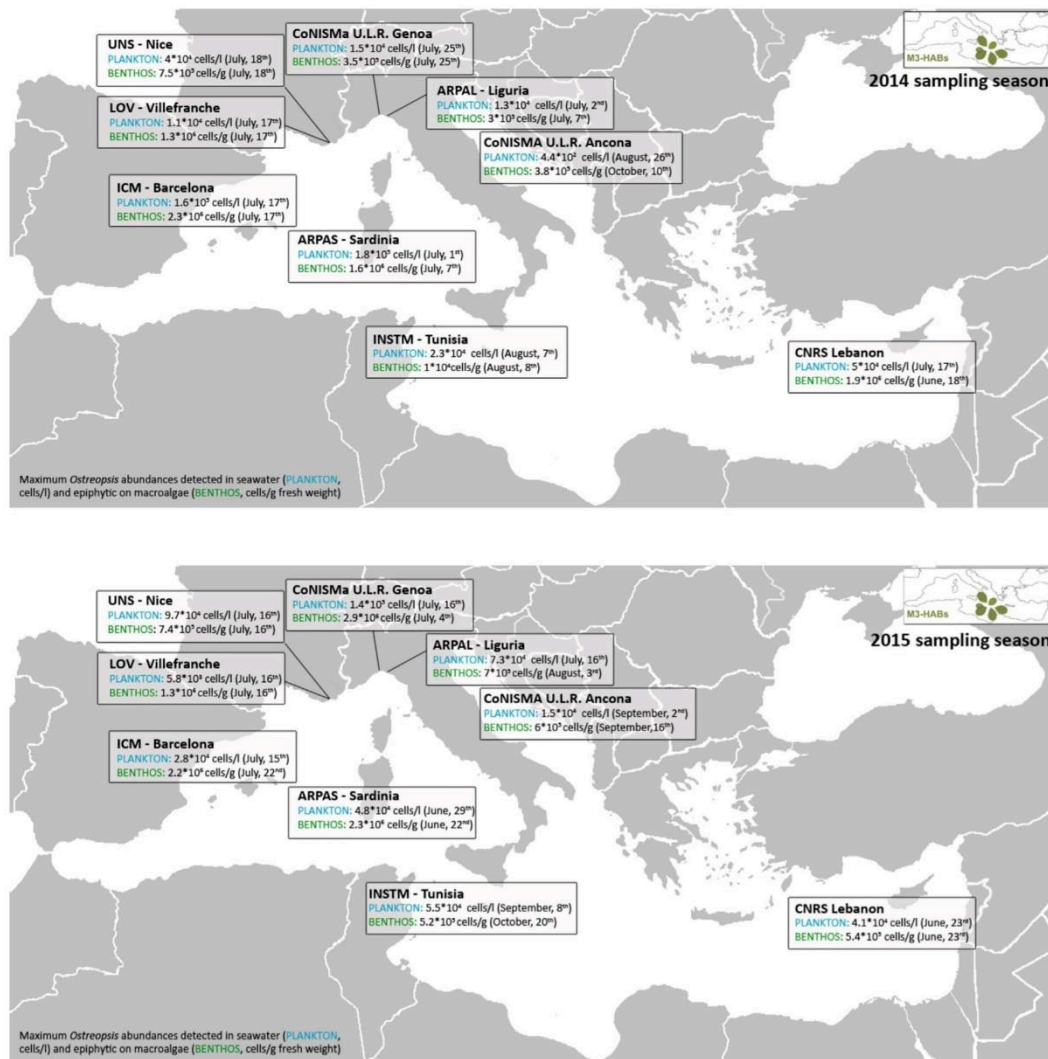


Fig. 1. Maximum abundance of *Ostreopsis* cells in seawater and on macroalgae during 2014 (a) and 2015 (b) summer season in the sampled locations along the Mediterranean Sea.

illumination LED) are connected to a PC and driven by a custom software developed in Labview (National Instruments, TX, USA). The software takes care of all the duties of the acquisition procedure: initialization, calibration, raster motion of the sample over the objective and image acquisition. In counting mode, each image is analyzed by a dedicated procedure to obtain the number of spotted *Ostreopsis* cells inside the field of view.

The software architecture is composed by a set of modules operating on digital images provided by the acquisition engine and computing, as final output, the number of cells in each image.

The automatic cell recognition in digital microscopy images is one of the most “classical” problems in image-based pattern recognition. The solution is often customized for specific types of cells to be counted, but a few aspects are common to every approach. They can be summarized as a list of step to be performed:

- to extract all interesting “objects” from the image (segmentation);
- to evaluate a vector of descriptors (features) for each object;
- to classify each vector in order to identify only those belonging to a

given set of species.

The aim of image segmentation is to select all “interesting” objects inside the image, given some basic conditions to be met by them. The result is a set of objects that could be interpreted as cells.

Feature extraction computes, for each object, a set of descriptors allowing a good discrimination between the “true” cells and “false” ones. Here the “true” class is composed only by the *O. ovata* specimens, while the “false” one is made by all other items visible inside the images, keeping attention to the fact that some of them may be confusing. The feature set should be as large as needed to capture all important aspects of the problem.

The last step deals with pattern classification, that means to find the most probable answer to the question whether the current object, described by its feature vector, belongs to the *O. ovata* class or not. This problem can be solved with many different algorithms, based on different statistical classification algorithms trained over a dataset of supervised vectors. Expert supervision is essential to define a set of known mapping between some feature vectors and the corresponding correct

class.

In the OPR system, specific choices have been made in terms of algorithms and parameters, leading to a trained machine able to deal with the intercalibration tests in a fully autonomous way.

2.6. Statistical analysis

In order to quantify the agreement of the automatic methods to the manual one, we calculated the Pearson's correlation coefficient ρ . This parameter provides a quantitative measure of the linear dependence between two set of measures A and B. If set B comes from a certified instrument (in the specific case, the manual count) and the other set (A) comes from a new instrument (any of the automated methods), the Pearson's coefficient is a measure of how well the new method A could be calibrated to be in full agreement with the certified one, B. In linear correlation analysis, the ρ is closely related with the coefficient of determination R^2 or, in other words, ρ^2 represents per percentage of the variance of B which is explained by A. In mathematical terms, ρ is defined as:

$$\rho(A, B) = \frac{\text{cov}(A, B)}{\sigma_A \sigma_B} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

where σ indicates the standard deviation of the dataset and cov is the covariance and the last step follows from the definition of covariance and standard deviation for a sample of n measurements. The Pearson's coefficient ranges between -1 and $+1$, with 0 indicating no correlation. We highlighted values of ρ larger than 0.5 , being considered to provide a satisfactory agreement. Additionally, for the cumulative graph of Fig. 4, we also provided the p value, roughly indicating the probability to find an uncorrelated system producing datasets that have a Pearson's correlation at least as extreme as the one computed from these datasets. The use of Pearson's statistical test while comparing an automatic counter with a reference one obtained with careful manual inspection of each sample, is motivated by the fact that automatic counters are based, in several cases, on a statistical decision test. For instance, imaging systems select "objects" inside images and decide if they are or not members of a given biological class (target). This type of automatic decision presents two type of errors (false positives and false negatives), whose rates can be evaluated after experimental tests.

3. Results

3.1. Quantification of *Ostreopsis* spp. in environmental samples

Environmental samples of macroalgae and surface seawater collected at the four Mediterranean coastal sites during the summers of 2014 and 2015 were analysed by standard light and opto-electronic microscopy and qPCR assay. Data are reported in Fig. 1a and b, where maximum concentrations in seawater and on macroalgae are displayed as well as the time of the year when they were recorded for each summer period (data from traditional optical microscopy).

During the two consecutive summer seasons, concentrations in the water and on macroalgae followed seasonal trends (with higher values reached earlier along the Lebanese coasts), in July in the western Mediterranean basin, and later, in August-October, in Tunisia and Northern Adriatic Sea. Highest concentrations were measured along the Ligurian coast both in the water (in Chiavari, $1.4 \cdot 10^5$ cells/L on July 16th, 2015), and on macroalgae (in Genova Quarto, $2.9 \cdot 10^6$ cells/g on July 4th, 2015).

3.2. *Ostreopsis fattorussoi* qPCR specificity assay

The species-specificity of primers for *O. fattorussoi*, designed to target 5.8S-ITS rDNA region, was checked as reported in Material and Methods. Primers were highly specific for this species as positive PCR

amplification was obtained only with strains of *O. fattorussoi* from eastern Mediterranean (Crete, Cyprus and Lebanon). Further, positive PCR amplifications were obtained in plankton and benthic samples containing target species-specific cells of *O. fattorussoi*. Negative results by qPCR assay were achieved on environmental samples where the *Ostreopsis* spp. was not observed by light microscopy or on environmental samples containing *O. cf. ovata* (data not shown).

3.3. Curve characterization of qPCR assay

The environmental samples were analysed for the presence of the *O. cf. ovata*, *O. cf. siamensis* and *O. fattorussoi*. The *O. cf. ovata* was found in all benthic and water samples with exception of Batroun locality (Lebanon), where only the *O. fattorussoi* was found. No PCR amplification were obtained for the presence of *O. cf. siamensis* (data not shown).

The seven different site-specific LSU-STD and one 5.8-ITS STD curves for *O. cf. ovata* and *O. fattorussoi*, respectively, showed a PCR efficiency of 98–100%, a linear correlation of 5 log₁₀($R^2 = 0.97$ – 0.99) and a quantification limit of 0.0008 cells per PCR reaction. The reproducibility analysed as CV_{Ct} mean inter-assay variability of different environmental standard curves was 0.6% (range 8–0.0008 cells).

The mean pLSUO for *O. cf. ovata* and pITSO for *O. fattorussoi* standard curves ($R^2 = 0.99$) showed 96% and 102% efficiency ($y = -3.42x + 34.76$ and $y = -3.27 + 33.39$, respectively) with a linear correlation of 5 log linear range and a sensitivity of 2 copies/reaction (Ct mean = 33.09 ± 0.09 and 36.98 ± 0.08 for pLSUO and pITSO, respectively). The reproducibility was assayed using the pLSUO and pITSO curves and the CV_{Ct} mean values were 2.5% and 2.6%, respectively, while, the CV_{Cn} mean values were 32% and 37%, respectively.

The *O. cf. ovata* LSU rDNA and *O. fattorussoi* ITS-5.8S rDNA copy numbers per cell in environmental samples are presented in Table 1.

3.4. Intercalibration

The correlations between automatic methods (optical and molecular) and the standard manual counting are reported in Fig. 2 for planktonic samples and Fig. 3 for benthic samples. Only sites for which at least 3 samples were collected and counted with all methods, for summer 2014 and 2015, are reported. Single dots represent the average of 3 replicates of the same measurement for each method; the size of the dots was chosen to match the typical repetition incertitude of about 10–15%. The Pearson's correlation coefficient is reported for each dataset, to provide a numerical evaluation of the correlation between the methods. From the point of view of the environmental managing authority, the effectiveness of automatic methods with respect to the manual one is more critical near the alert threshold, in a situation in which the population is starting to grow, and for which a correct estimate is crucial for managing the bloom and forecasting any potentially upcoming criticality. In turn, the analysis of the results was focused in a region we called *sensible region*, defined taking ± 1 decade around the threshold concentration (see Section 4). This region is highlighted in Figs. 2–4 as a white central band. All statistical parameters were calculated taking into account only points lying inside this confidence region, neglecting very high and very low concentrations.

The overall agreement between counting methods is shown in Fig. 4 in which all planktonic and benthic data for all sites are plotted together (panels A and B). Statistical Pearson's correlation coefficient was calculated using only data points lying inside the sensible region (see Section 3.3), indicated in white. Overall, more than 50 different measurements were recorded and plotted in Fig. 4, allowing to associate a meaningful p -value to the proposed linear regression. Panels C and D of the same figure provide a closer look to the region around the alert threshold (10^4 cells/L for plankton and 10^5 cells/g for benthos, see discussion). The coloured areas provide a visual information about the

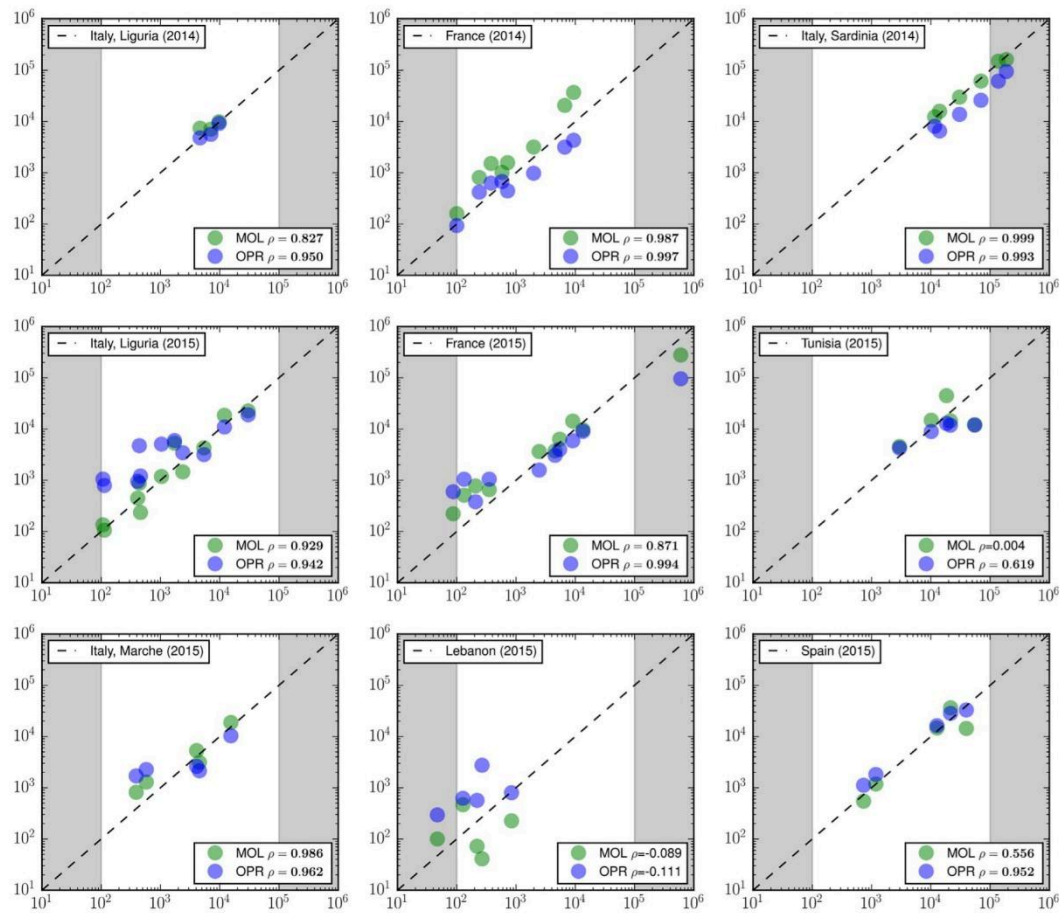


Fig. 2. Comparison of automatic methods versus manual counting for planktonic samples. Blue and green dots represent optical recognition [OPR] and molecular [MOL] qPCR counts, respectively. Only values lying inside the white region (sensible region, in white, see text) were considered for the statistical analysis. The dashed line represents the bisector, to which points should align in case of perfect identity of the methods. For each sampling period and location (indicated in the legend) relevant statistical values are reported (see Section 2). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

effectiveness of automatic methods with respect to the manual one (taken as a reference), in providing reliable alerts. In particular, dots found in the yellow area are associated to false alarms (points for which manual count is lower than threshold while the automatic one is above), while the red area hosts critical points, for which manual count would trigger an alert and the automatic one would not.

4. Discussion and conclusions

Manual counting methods, although their wide application, are time consuming and require a high degree of taxonomical expertise. The lack of fast and automatic counting approaches is nowadays hindering the possibility to set up wide sampling designs with relevant temporal and spatial scales for providing reliable alerts. This issue is particularly stringent for *Ostreopsis* species for which the correct identification is often challenging, due to the extreme variability of morphological features. Moreover, accurate species-specific identification and enumeration are crucial to address the connection to the toxicity of the sample which has been shown to depend on several biological and environmental factors (Tartaglione et al., 2015). As a consequence a strong need for innovative approaches is felt in the perspective of risk management of *Ostreopsis* blooms.

In this study, we report the development of two advanced

procedures, specifically a new qPCR assay for specific *O. fattorussoi* quantification and an automatic opto-electronic procedure. *O. fattorussoi* was described recently in the eastern Mediterranean Sea, and it showed to produce low toxin amounts (0.28–0.94 pg/cell) (Accoroni et al., 2016; Tartaglione et al., 2015), respect to the *O. cf. ovata* (14–75 pg/cell in field samples and 10–200 pg/cell in culture) (Accoroni et al., 2011; Funari et al., 2015). The species-specific primers were designed on the ITS-5.8S rDNA sequence. An environmental standard curve for *O. fattorussoi* was generated for Batroun (Lebanon) sampling site, as well as for the other Mediterranean sampling sites using LSU rDNA standard curves for the estimation of *O. cf. ovata* abundance (Casabianca et al., 2014). The similar efficiencies of environmental and plasmid standard curves allowed the estimation of rDNA copy number per *O. fattorussoi* and *O. cf. ovata* cell in each sampling site. The reproducibility, analysed as CV_{Ct} mean inter assay variability, confirmed the reliability and accuracy of the technical set-up over time and over a low range of quantification. In the environmental samples from all Mediterranean coastal sites, *O. cf. ovata* was detected with the exception of Lebanese site where only *O. fattorussoi* was found. Finally, *Ostreopsis* spp. abundance was determined by qPCR assay and compared with optical recognition and manual counting methods.

In order to test the comparability of the three methods, during the

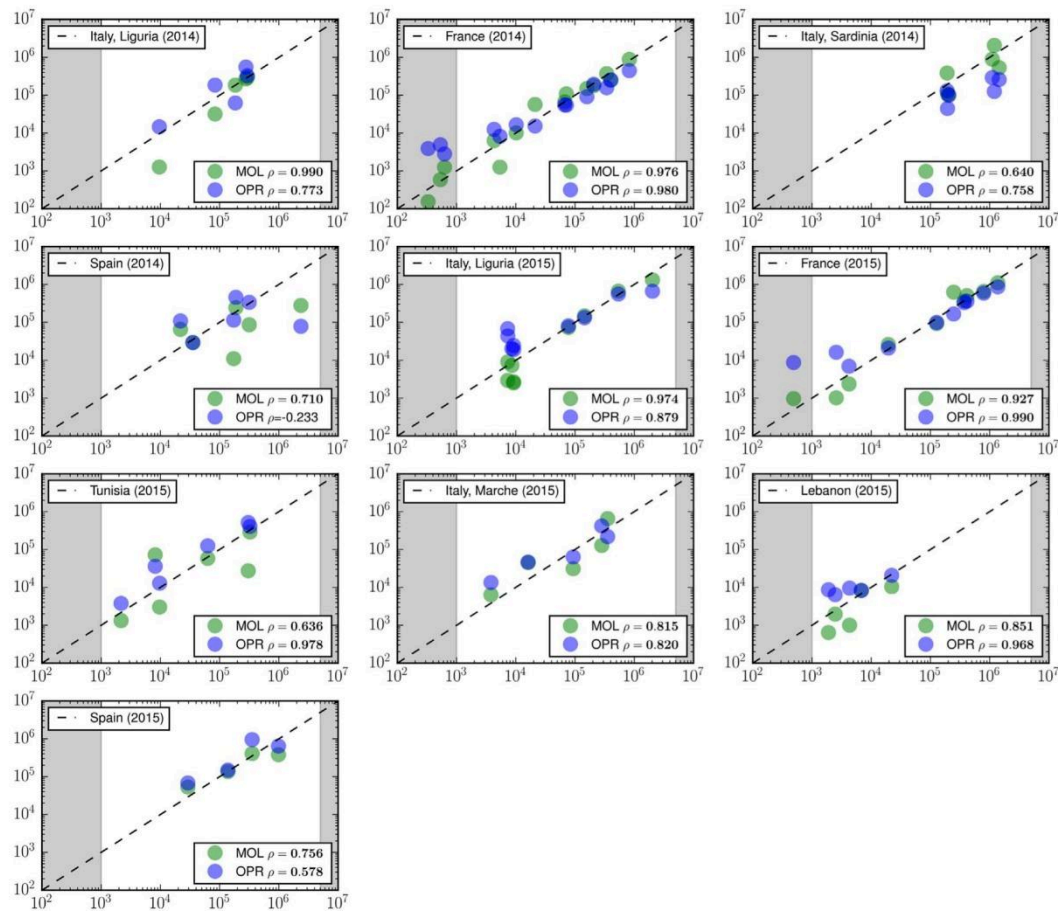


Fig. 3. Comparison of automatic methods versus manual counting for benthic samples. Blue and green dots represent optical recognition [OPR] and molecular [MOL] qPCR counts, respectively. Only values lying inside the white region (sensible region, in white, see text) were considered for the statistical analysis. The dashed line represents the bisector, to which points should align in case of perfect identity of the methods. For each sampling period and location (indicated in the legend) relevant statistical values are reported (see Section 2). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

sampling campaigns 2014 and 2015, a common protocol was agreed among all the participant partners, taking particular care for steps potentially affecting automatic methods. In particular, classical sampling methods require a fixation of the samples using chemical preservatives, typically formaldehyde or Lugol at various concentrations. While the fixation agent is normally not relevant for standard optical microscopy identification, it plays a crucial role for automatic methods (different preservatives provide strongly different optical images and may significantly alter the sample).

The results of the sampling campaigns 2014 and 2015 are reported in Figs. 2 and 3, presenting the data separate for each sampling site. Alternative counting procedures tested in the present study of *Ostreopsis* spp. are, to a large extent, in good agreement with manual results, providing Pearson's coefficients higher than 0.5 in almost all situations, for both planktonic and benthic samples. Interestingly, this good agreement over the Mediterranean Sea was obtained with the MOL method, which intrinsically requires a site-specific calibration, but also with the OPR method that was initially calibrated on a set of samples from the Liguria Region and the obtained template was directly applied for the rest of the analysis. In principle, the calibration of the OPR method could also be repeated with a site-specific perspective, possibly providing an even larger agreement with the local MAN counting, but the results of Figs. 2 and 3 already suggest the robustness of both

approaches against regional variations.

Looking in detail at Fig. 2, it appears that one site, Lebanon, is showing a very low correlation for plankton sampling using either OPR or MOL methods. In the case of OPR this discrepancy is expected because all samples (including Lebanese ones) were analysed using the same template, designed for *O. ovata*, which is not effective in *O. fattorussoi* identification. Moreover, the low correlation for the MOL method is probably due to the highest variability of the rDNA copy number cell⁻¹ in the *O. fattorussoi* determined from environmental water samples.

A general view of the results is reported in Fig. 4A (plankton) and B (benthos). The region for lower concentration (under the lower threshold of the sensitive region) is clearly characterized by a larger error. The deviation from the expected line (black dashed) is smaller and almost constant inside the sensitive region, while it starts increasing again above the higher threshold.

Overall, the MOL method presented a tendency to slightly over-estimate the count, while the OPR system typically under-estimated the guess. This general trend is clear inside the confidence region where OPR measurements are systematically lower than the MAN count, while MOL values are higher. This behavior is associated to the different nature of the approaches. In fact, OPR is based on a recognition algorithm, explicitly tuned to avoid counting debris or large aggregates,

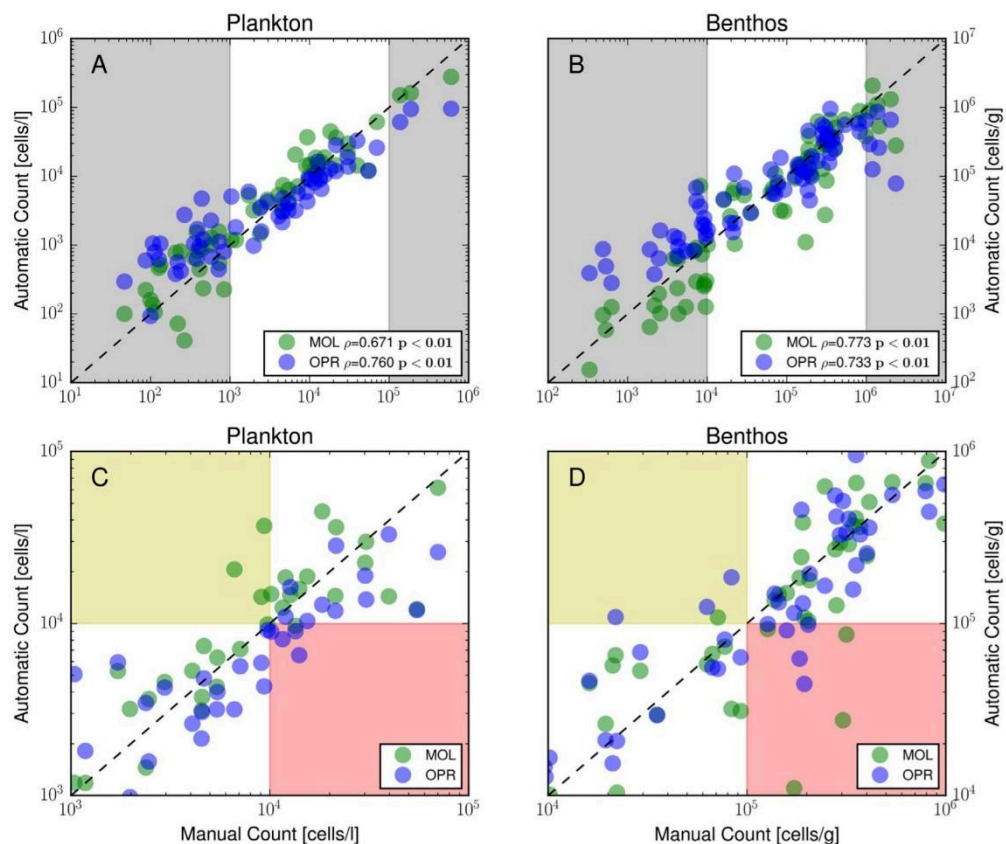


Fig. 4. Overall comparison of automatic methods versus manual counting for water (left) and benthic (right) samples. Optical recognition (OPR, blue) and molecular (MOL, green) counts are reported as a function of the corresponding manual count. Only values lying inside the sensible region (white region, see text) were considered for the statistical analysis. The dashed line represents the bisector, to which points should align in case of perfect identity of the methods. All sampling points are plotted together for both years of activity (2014 and 2015), planktonic (panel A) and benthic (panel B). For each plot, relevant statistical values are indicated. A zoom of the two plots around the threshold concentration is reported in panels C and D, in which the red area corresponds to missed alert events and the yellow area to false alarms (see text for details). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

leading to a slightly lower number of spotted cells. Instead, the MOL approach is based on the evaluation of the molecular content of the sample, regardless of the state of the organisms, thus including in the count the contribution of broken cells which would have been neglected by a manual count. In principle, given the systematic nature of this disagreement, it could be eliminated performing an *a posteriori* normalization of the results.

In a management perspective, we decided to particularly focus on the agreement of the two automatic methods with the manual one in detecting when thresholds are exceeded (Fig. 4C and D), herein set at 10⁴ cells/L for planktonic samples (according to governmental guidelines (Funari et al., 2014, 2015)) and 10⁵ cells/g of macroalgae (according to Spanish regulation and authors experience) for benthic ones. The colored areas provide visual information about errors in providing alerts: samples falling in the red area are undetected alerts (compared to MAN), while those falling in the yellow areas refer to false alarms (compared to MAN).

In conclusion, both MOL and OPR methods proved to be robust and reliable in a risk management perspective, with a fundamental agreement in alert detection potential compared to MAN, providing a strong potential for application and uptake from relevant stakeholders in charge of the institutional monitoring.

Acknowledgements

This publication has been produced with the financial assistance of the European Union under the ENPI CBC Mediterranean Sea Basin Programme. Authors wish to thank Laia Viure and Luca Nitopi for unvaluable support in the field and in the laboratory. Magda Vila also acknowledges the support of the Spanish Government (MINECO) through the project OstreoRisk (CTM2014-53818-R).

References

Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern adriatic sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2512–2519.

Accoroni, S., Romagnoli, T., Penna, A., Capellacci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Abboud-Abi Saab, M., Giussani, V., Asnaghi, V., et al., 2016. *Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (dinophyceae) a new benthic toxic *ostreopsis* species from the eastern mediterranean sea. *J. Phycol.*

Amzil, Z., Sibat, M., Chomerat, N., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Lemee, R., Nezan, E., Sechet, V., 2012. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *ostreopsis cf. ovata* blooms on the french mediterranean coast. *Mar. Drugs* 10, 477–496.

Battocchi, C., Totti, C., Vila, M., Masó, M., Capellacci, S., Accoroni, S., Reñé, A., Scardi, M., Penna, A., 2010. Monitoring toxic microalgae *ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the mediterranean sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1074–1084.

- Casabianca, S., Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Giussani, V., Chiantore, M., Penna, A., 2014. Monitoring toxic *ostreopsis* cf. *ovata* in recreational waters using a QPCR based assay. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 102–109.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. The genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal. Chem.* 78, 6153–6159.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Battocchi, C., Crinelli, R., Carloni, E., Magnani, M., et al., 2012. Unique toxin profile of a mediterranean *ostreopsis* cf. *ovata* strain: HPLC-MS characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1243–1252.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedetti, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C., et al., 2014. First finding of *ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3532–3540.
- Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini, R., Icardi, G., 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005–2006, in northwest Italy. *Euro Surveill.* 12.
- Funari, E., Manganelli, M., Testai, E., 2014. *Ostreopsis* cf. *ovata*: linee guida per la gestione delle fioriture negli ambienti marino costieri in relazione a balneazione e altre attività ricreative. Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 14/19), Roma.
- Funari, E., Manganelli, M., Testai, E., 2015. *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities. *Harmful Algae* 50, 45–56.
- Gallitelli, M., Ungaro, N., Addante, L.M., Procacci, V., Gentiloni Silver, N., Sabbà, C., 2005. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA* 293, 2595.
- Giussani, V., Sbrana, F., Asnaghi, V., Vassalli, M., Faimali, M., Casabianca, S., Penna, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., et al., 2015. Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 44, 46–53.
- Honsell, G., De Bortoli, M., Boscolo, S., Dell'Aversano, C., Battocchi, C., Fontanive, G., Penna, A., Berti, F., Sosa, S., Yasumoto, T., et al., 2011. Harmful dinoflagellate *ostreopsis* cf. *ovata* fukuyoi: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7051–7059.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentini, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., et al., 2007. Clustal w and clustal x version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Gossel, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *ostreopsis* proliferation along the northern mediterranean coasts. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicol.* 57, 408–420.
- Penna, A., Battocchi, C., Capellacci, S., Fraga, S., Aligizaki, K., Lemée, R., Vernesi, C., 2014. Mitochondrial, but not rDNA, genes fail to discriminate dinoflagellate species in the genus *ostreopsis*. *Harmful Algae* 40, 40–50.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riobó, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *ostreopsis* schmidt. *J. Biogeogr.* 37, 830–841.
- Penna, A., Perini, F., Dell'Aversano, C., Capellacci, S., Tartaglione, L., Giacobbe, M.G., Casabianca, S., Fraga, S., Ciminiello, P., Scardi, M., 2015. The sxt gene and paralytic shellfish poisoning toxins as markers for the monitoring of toxic alexandrium species blooms. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14230–14238.
- Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Accoroni, S., Totti, C., Penna, A., 2011. New approach using the real-time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. *PLoS ONE* 6, e17699.
- Sbrana, F., Landini, E., Gjerci, N., Viti, F., Ottaviani, E., Vassalli, M., 2017. Ovmeter: an automated 3D-integrated opto-electronic system for *ostreopsis* cf. *ovata* bloom monitoring. *J. Appl. Phycol.*
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *ostreopsis*: an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 8, 916–925.
- Tartaglione, L., Mazzeo, A., Dell'Aversano, C., Forino, M., Giussani, V., Capellacci, S., Penna, A., Asnaghi, V., Faimali, M., Chiantore, M., et al., 2015. Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *ostreopsis* sp. from Cyprus island: structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 915–932.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Gossel, H., Lemée, R., Kantin, R., Lasalle, J.L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., de Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol. (Phila. Pa.)* 48, 839–844.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* 13, 134.

Modèle prévisionnel des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis.

Après avoir caractérisé la variabilité saisonnière des abondances des microalgues épiphytes ainsi que les variations estivales des abondances d'*Ostreopsis cf. ovata* dans les eaux côtières du golfe de Tunis, nous nous sommes intéressés dans cette deuxième partie de ce chapitre à une nouvelle approche basée sur la modélisation prédictive, cela dans le but de la détection préventive des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata*, afin de contribuer au développement d'outils de gestion rentables des risques environnementaux, sanitaires et économiques associés à la prolifération de ces dernières. Le modèle que nous avons utilisé pour la prédiction des concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* a été construit à l'aide de la méthode d'apprentissage automatique (Machine-learning) en utilisant la fonction "Quantile Regression Forests" (QRF). Les techniques d'apprentissage automatique prennent des observations et utilisent divers algorithmes pour apprendre à faire des prédictions. La fonction (QRF) permet de générer une base de données de référence à partir d'une analyse de données permettant l'adaptation de ses calculs dans une perspective prédictive. La fonction (QRF) est utile pour modéliser des relations complexes entre les entités en entrée et les variables de sortie. Dans la présente étude, le modèle a été construit en utilisant des variables à savoir les périodes des prélèvements, les paramètres environnementaux et les paramètres météorologiques comme prédicteurs, se sont les variables de sortie et les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes au niveau des 7 stations de prélèvement du golfe de Tunis, recueillies dans la présente étude durant la période allant de 2013 à 2015 qui sont les entités en entrée. La précision de l'estimation de l'importance des différentes variables utilisées pour la prédiction a été exprimée sous la forme d'une erreur quadratique moyenne (EQM). La qualité de l'ajustement pour ce modèle a été évaluée visuellement en traçant les valeurs prédites moyennes par rapport aux données historiques (2013-2015), et en traçant les données résiduelles par rapport aux valeurs historiques (données 2013-2015). Après cette évaluation visuelle préliminaire, la statistique R², le coefficient de corrélation de Pearson et la moyenne quadratique (RMS) ont été calculés pour une évaluation numérique. La validation du modèle a ensuite été réalisée sur les échantillons prélevés en 2016 en générant des prévisions de concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau et sur les macroalgues en fonction des données météorologiques de l'année 2016.

3 Modèle prévisionnel des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *ovata* du golfe de Tunis.

3.1 Modèle prédictif

L'importance des variables utilisées est illustré dans la Figure 61. Lorsque ces prédictions sont permutées de manière aléatoire, la variable la plus importante pour prédire la concentration d'*Ostreopsis* cf. *ovata* dans la colonne d'eau est la température de l'eau qui présente un pourcentage de 36,9% de la précision. Suivie par les facteurs ci-après : les mois d'échantillonnage, la salinité et la vitesse du vent. Lorsque leurs valeurs sont permutées de manière aléatoire dans le modèle de prédiction, le pourcentage de la précision est de l'ordre de 27,6%, 26,4% et 25,9% respectivement. Les dates d'échantillonnages, la Température de l'air et la Pression atmosphérique, semblent d'une importance moindre pour prédire la concentration d'*O.* cf. *ovata* dans la colonne d'eau, puisqu'elles produisent un pourcentage de la précision de 21,8%, 21,7% et 18,6% respectivement. Enfin, la pluviométrie, les saisons et les années d'échantillonnage semblent avoir peu d'importance pour contribuer à la précision globale du modèle avec pourcentage d'augmentation de EQM de 16,1%, 12,7% et 12,3% respectivement (Figure 61, a).

Concernant la prédiction de la concentration d'*Ostreopsis* cf. *ovata* sur les macrophytes, deux variables sont les plus importantes : les mois d'échantillonnage et la vitesse du vent qui présentent un pourcentage de la précision de 32,9% et 31,8% respectivement. Suivie par les variables ci-après : la température de l'eau et les années d'échantillonnage, avec un pourcentage de la précision de l'ordre de 28,8% et 27,4% respectivement. La salinité et les dates d'échantillonnage, présentent le même pourcentage de la précision égal à 24,4%. La Température de l'air et, semble d'une importance moindre pour prédire la concentration d'*O.* cf. *ovata* sur les macrophytes, produisant un pourcentage de la précision de 20,7%. Enfin, la pression atmosphérique, les saisons et la pluviométrie semblent avoir peu d'importance pour contribuer à la précision globale du modèle avec un pourcentage d'augmentation de EQM de 17,8%, 14,5% et 11,5% respectivement (Figure 61, b).

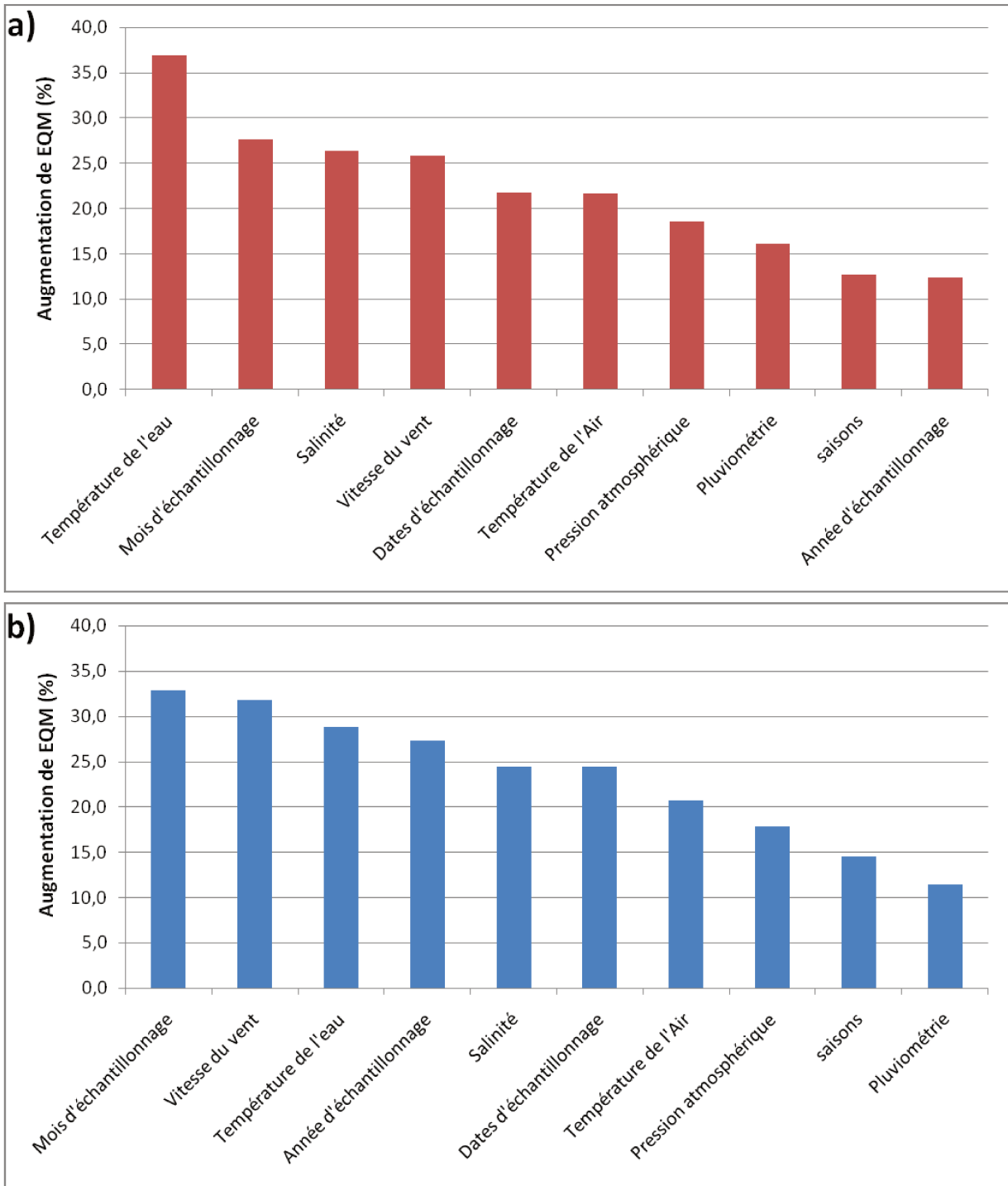


Figure 61 : Prédiction de la concentration des cellules d'*O. cf. ovata* à partir de la pondération de chaque variable utilisée dans le modèle "Quantile Random Forests".(a) dans la colonne d'eau, (b) sur les macrophytes (golfe de Tunis, 2013-2016).

Une corrélation très significative (Tableau 17) entre les valeurs prédites et observées de la concentration en \log_{10} d'*O. cf. ovata* dans la colonne a été mise en évidence (Figure 62, a). Dans le cas où certaines concentrations faibles sont observées, les concentrations d'*O. cf.*

ovata prédites tendent à être plus élevées que celles observées, ce qui suggère une tendance de ce modèle à surestimer la concentration d'*O. cf. ovata* dans la colonne lorsque ces concentrations concernées sont <100 cell. dm^{-3} . Cette tendance est confirmée par l'analyse visuelle des résidus (Figure 62, b), qui ont tendance à être positifs aux faibles concentrations observées d'*O. cf. ovata* dans la colonne.

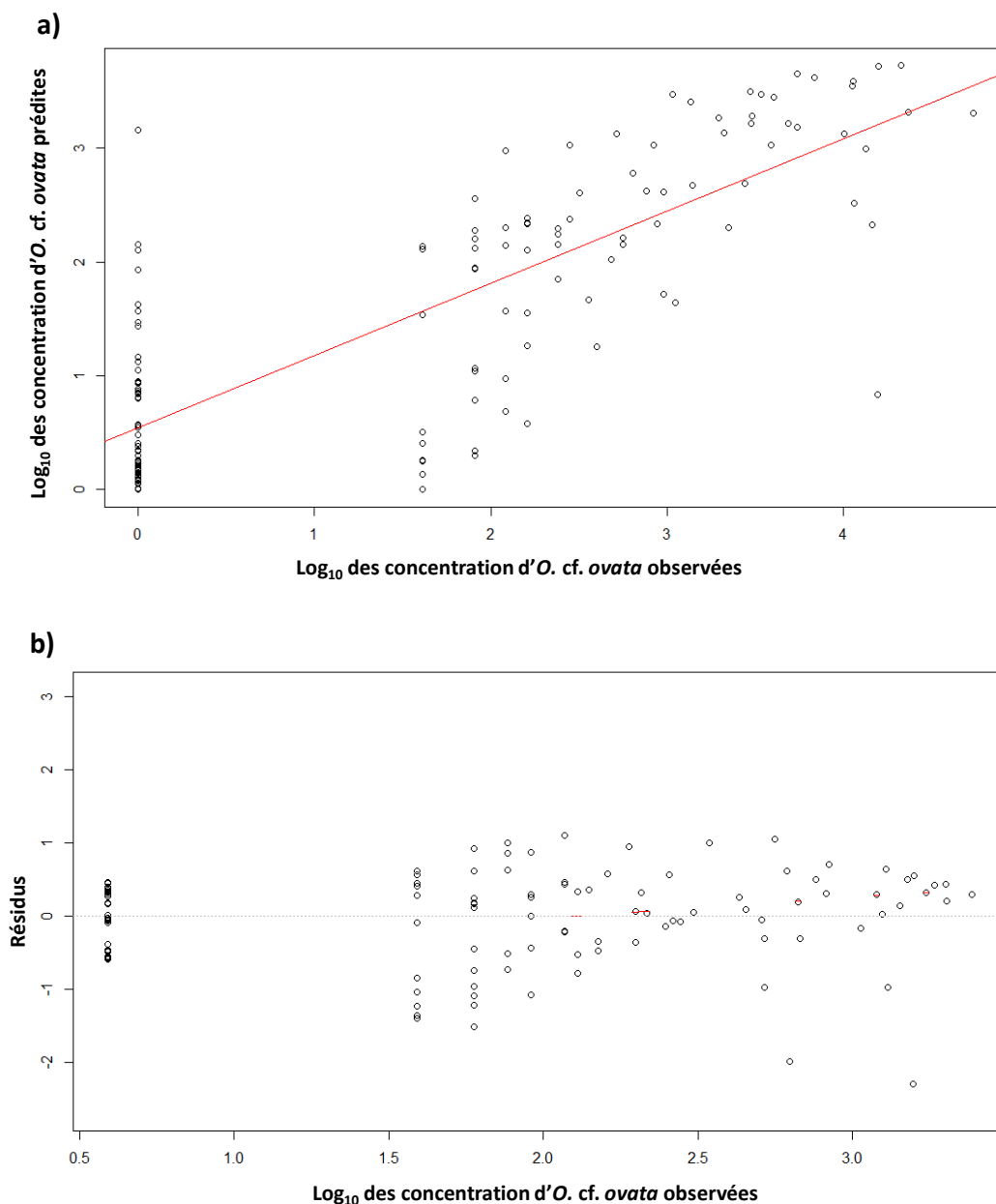


Figure 62 : Précision des prévisions dans la colonne d'eau. (a) Concentrations moyennes des cellules d'*O. cf. ovata* estimées par rapport aux valeurs réelles. (b) Résidus des concentrations moyennes estimées par rapport aux valeurs réelles. (golfe de Tunis, 2013-2016).

A l'instar des concentrations d'*O. cf. ovata* dans la colonne, une corrélation très significative a été trouvée aussi entre les concentrations en \log_{10} prédites et observées d'*O. cf. ovata* sur les macrophytes (Tableau 17). De plus, il semble que le modèle surestime aussi certaines faibles concentrations observées d'*O. cf. ovata* sur les macrophytes ($<100 \text{ cell. g}^{-1} \text{ MF}$) (Figure 63, a). Cette tendance est confirmée par l'analyse visuelle des résidus qui ont tendance à être positifs aux faibles concentrations observées d'*O. cf. ovata* sur les macrophytes (Figure 63, b).

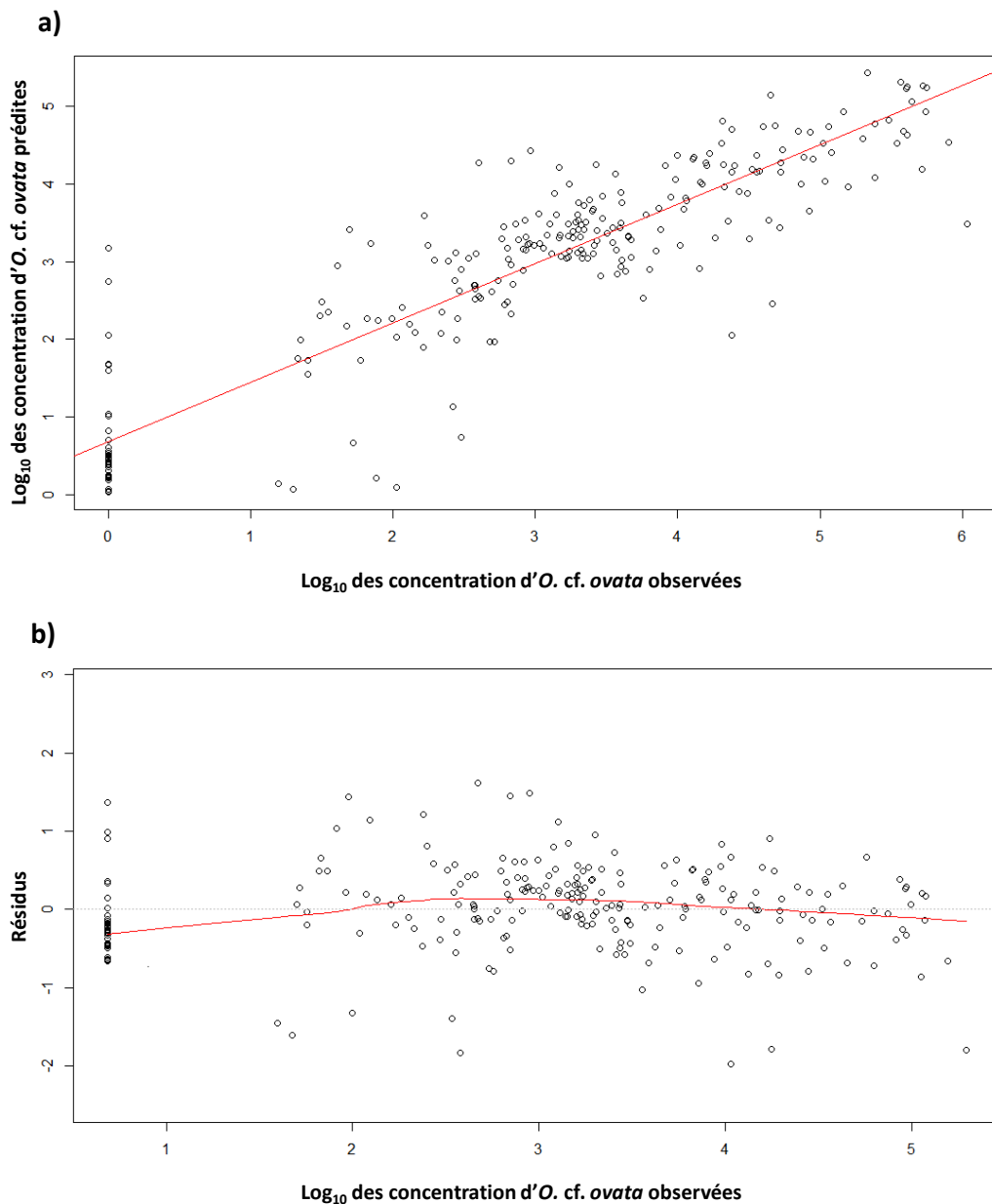


Figure 63 : Précision des prévisions sur les macrophytes. (a) Concentrations moyennes des cellules d'*O. cf. ovata* estimées par rapport aux valeurs réelles. (b) Résidus des concentrations moyennes estimées par rapport aux valeurs réelles. (golfe de Tunis, 2013-2016).

Tableau 17 : Analyses statistiques, R^2 , le coefficient de corrélation de Pearson ρ , (RMS) moyenne quadratique des valeurs estimées par rapport aux valeurs réelles des concentrations en log10 d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes .

	Coefficient	Valeurs	p-value
<i>O. cf. ovata</i> dans la colonne d'eau	R^2	0,80	p-value<0,001
	Pearson ρ	0,89	p-value<0,001
	RMS	0,63	
<i>O. cf. ovata</i> sur les macrophytes	R^2	0,72	p-value<0,001
	Pearson ρ	0,85	p-value<0,001
	RMS	0,68	

3.2 Validation du modèle : Sensibilité et taux de faux positifs

Au cours de la campagne d'échantillonnage de la saison estivale 2016, 8 événements d'efflorescence ont été étudiés dans la colonne d'eau et 13 sur les macrophytes, sur les 19 mesures de concentration d'*O. cf. ovata* totale rassemblées. Pour les prédictions des efflorescences dans la colonne d'eau, au quantile 0,1, le modèle a toujours prédit les conditions «sans efflorescence» (taux de faux positifs = 0, sensibilité = 0). Des résultats similaires sont également présentés pour le quantile 0,5, où pas d'efflorescence détectée alors qu'un seul événement «sans efflorescence» a été correctement détecté (taux de faux positifs = 0,09, sensibilité = 0). Les prévisions au quantile 0,87 identifiaient correctement 6 efflorescences sur 8 et deux événements «sans efflorescence» sur les 11 mesures (taux de faux positifs = 0,18, sensibilité = 0,75). Les prévisions générées par le quantile 0,99 ont pu identifier correctement les 8 événements d'efflorescence, néanmoins le quantile 0,99 a conduit à 11 alertes de prolifération erronées sur un total de 11 mesures de concentration cellulaire inférieures au seuil de prolifération (taux de faux positifs = 1, sensibilité = 1) (Tableau 18).

Concernant les prédictions des efflorescences sur les macrophytes, au quantile 0,1, le modèle a dans tous les cas prédit des conditions «sans efflorescence» (taux de faux positifs = 0, sensibilité = 0). Pour le quantile 0,5, le modèle a réussi la prédiction de 5 événements d'efflorescence sur 13 et 2 événements «sans efflorescence» sur 6 (taux de faux positifs =

0,33, sensibilité = 0,38). Les prévisions au quantile 0,87 identifiaient correctement 12 efflorescences sur 13 et un seul événement «sans efflorescence» sur les 6 mesures «sans efflorescence» (taux de faux positifs = 0,08, sensibilité = 0,92). Les prévisions générées par le quantile 0,99 ont pu identifier correctement les 13 événements d'efflorescence, néanmoins le quantile 0,99 a conduit dans ce cas aussi à 6 alertes de prolifération erronées sur un total de 6 mesures de concentration cellulaire inférieures au seuil de prolifération (taux de faux positifs = 1, sensibilité = 1) (Tableau 18).

Tableau 18 : Sensibilité du modèle prévisionnel et taux de faux positifs pour les prédictions générées par rapport aux données enregistrés dans le golfe de Tunis.

	Quantiles	Sensibilité	Faux positifs
<i>O. cf. ovata</i> dans la colonne d'eau	0,1	0	0
	0,5	0	0,09
	0,87	0,75	0,18
	0,99	1	1
<i>O. cf. ovata</i> sur les macrophytes	0,1	0	0
	0,5	0,38	0,33
	0,87	0,92	0,08
	0,99	1	1

3.3 Discussion

Les épisodes de prolifération d'algues nuisibles (HABs) étant de plus en plus fréquents, la gestion de la surveillance de ces événements n'est pas toujours évidente. En effet, la méthode classique de comptage direct des cellules des microalgues toxiques est jusqu'à présent la procédure qui prime pour effectuer leur suivi saisonnier, bien que cette méthode nécessite une grande connaissance taxonomique et est coûteuse en temps en plus de la grande difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons dans une perspective de surveillance (Sellner *et al.*, 2003). Cela a poussé la communauté scientifique à établir d'autres méthodes alternatives qui impliquent l'utilisation d'une approche de modélisation prédictive dans le but de la détection préventive de ces efflorescences, afin de contribuer au développement d'outils de gestion rentables des risques environnementaux, sanitaires et économiques associés à la prolifération des dinoflagellés du genre *Ostreopsis* le long des côtes méditerranéennes. Plusieurs approches de modélisation ont été testées pour la prévention des efflorescences des HABs (Lee *et al.*,

2003 ; Robson et Hamilton 2004 ; Muttill et Chau 2006 ; Hamilton *et al.*, 2009 ; Anderson *et al.*, 2010 ; Blauw *et al.*, 2010 ; Raine *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Franks, 2018), avec plus ou moins de succès. Toutes ces méthodes sont limitées dans leur applicabilité par le fait qu'elles dépendent, au moins en partie, de la collecte de données environnementales sur le terrain pour générer des prédictions utiles.

Une des catégories de modèle destinée à la prédiction des efflorescences des HABs est composée de modèles statistiques empiriques qui sont généralement utilisés pour quantifier les relations entre les observations, dans le but de prédire la valeur d'une variable à partir des mesures d'autres variables. Les modèles statistiques empiriques peuvent décrire le système à travers des corrélations statistiques. Ces modèles sont le plus souvent utilisés en tant qu'outils de prévision ou de gestion. Cela est dû à leur facilité de manipulation relative par rapport aux modèles dynamiques, plus axés sur le calcul en utilisant des équations pour faire évoluer les conditions initiales dans le temps (Franks, 2018).

Parmi les nombreuses applications des modèles statistiques empiriques, il y a les approches d'apprentissage automatique (Machine-learning). Les approches d'apprentissage automatique pour la prédiction des HABs sont de plus en plus utilisées (Andonegi *et al.*, 2011 ; Carvalho *et al.*, 2011 ; Mulia *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2015 ; Were *et al.*, 2015 ; Béjaoui *et al.*, 2016, 2018). Les techniques d'apprentissage automatique prennent des observations et utilisent divers algorithmes pour apprendre à faire des prédictions (Franks, 2018).

Récemment Asnaghi *et al.*, (2017) ont utilisé une nouvelle approche d'apprentissage automatique prédictive basée sur un algorithme de "Quantile Random Forests" (QRF) ou "forêts aléatoires" (Breiman, 2001). Ce modèle a pu décrire l'abondance d'*O. cf. ovata* dans la colonne d'eau sur les côtes de Gênes (mer Ligure, nord-ouest de la Méditerranée) en réponse aux variables météorologiques du milieu. Les algorithmes de la fonction (QRF) se basent sur des approches statistiques pour donner à un système piloté par ordinateur la capacité de se créer une base de données de référence à partir d'une analyse de données météorologiques et permettent l'adaptation de ses calculs dans une perspective prédictive (Meinshausen, 2006). Ce modèle bénéficie d'une grande flexibilité dans les prévisions générées, le rendant ainsi utilisable comme outil de prédiction des concentrations d'*Ostreopsis* par les agences environnementales et de santé publique. Une alternative à la nécessité de la collecte des données de terrain par l'utilisation des données résultant des modèles météorologiques, présente une grande flexibilité du fait que des prédictions peuvent être générées à des

quantiles choisis. Le modèle proposé dans cette étude de forêts est capable de prédire avec précision l'abondance d'*O. cf. ovata* dans la colonne d'eau en réponse à des variables météorologiques. L'application du modèle proposé semble être appropriée comme un outil nouveau et utile pour prévenir et agir de manière efficace lors d'épisodes d'efflorescence d'*O. cf. ovata*. Cette flexibilité nous a poussé à tester ce modèle pour la prédiction de la fluctuation des concentrations d'*O. cf. ovata* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes le long du golfe de Tunis. L'application du modèle dans la présente étude a permis de mettre en évidence les facteurs importants qui entrent dans le mécanisme de la prolifération des cellules d'*O. cf. ovata*. Pour l'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau La température de l'eau de mer semble être le facteur le plus important avec un pourcentage d'augmentation de EQM de 36,9% (Figure 64 a, b). Ce résultat confirme la tendance du développement d'*Ostreopsis* souvent lié aux variations de la température de l'eau de mer (Simoni *et al.*, 2004 ; Ungaro *et al.*, 2010 ; Mangialajo *et al.*, 2011 ; Ben Brahim *et al.*, 2015 ; Hachani *et al.*, 2018). Dans le cas d'*O. cf. ovata* sur macrophytes il semble que les facteurs les plus importants sont les mois d'échantillonnage et la vitesse du vent qui présentent un pourcentage de la précision de 32,9% et 31,8% respectivement suivis directement par la température de l'eau avec un pourcentage d'augmentation de EQM de 28,8%. Ce résultat révèle l'impact que peut avoir le facteur vitesse du vent sur l'abondance d'*O. cf. ovata* sur les macrophytes. En effet des études antérieures ont suggéré la préférence d'*Ostreopsis* pour les zones abritées (Grzebyk *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 2000 ; Vila *et al.*, 2001b ; Simoni *et al.*, 2003, Shears et Ross, 2009 ; Totti *et al.*, 2010 ; Mabrouk *et al.*, 2011).

L'application de l'algorithme (QRF) a permis aussi de mettre en évidence la robustesse de ce modèle (Tableau 17) illustré par la forte corrélation trouvée entre les concentrations observées (historiques) d'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau et sur les macrophytes par rapport aux concentrations d'*O. cf. ovata* prédites. Notons que le modèle a tendance à surestimer les faibles concentrations particulièrement les concentrations inférieures à 100 cell. dm⁻³ pour d'*O. cf. ovata* dans la colonne d'eau et les concentrations d'*O. cf. ovata* inférieures à 100 cell. g⁻¹ MF sur les macrophytes. Cette tendance était relevée aussi par Asnaghi *et al.*, (2017) qui ont observé la même tendance avec les concentrations inférieures à 1000 cell. L⁻¹. De plus les résultats de la validation confirme le pouvoir prédictif de ce modèle, notamment par la possibilité de choisir le quantile pour répondre aux exigences pour la gestion des zones côtières, cela est dans le but de prédire avec précision le plus grand nombre possible d'efflorescences. Cette flexibilité de générer des prévisions selon un quantile choisi de

manière spécifique rend l'approche "Quantile Random Forests" (QRF) hautement adaptative. Néanmoins, les modèles d'apprentissage automatique prédictifs basés sur "Quantile Random Forests" (QRF) ne peuvent être interprétés que dans les limites des données utilisées pour les créer. Cela représente une forte contrainte à la prévision face à des conditions changeantes telles que celles induites par le changement climatique et anthropique.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce mémoire de thèse a eu pour objectif de caractériser la distribution et la variabilité spatio-temporelle des Dinoflagellés épiphytes potentiellement toxiques notamment celle des microalgues du G. *Ostreopsis* dans le golfe de Tunis. Cette zone est considérée comme la plus peuplée du territoire Tunisien subissant ainsi une forte pression anthropique, principalement par l'action directe de l'expansion des activités agricoles, industrielles, urbaines, portuaires ainsi que l'accroissement saisonnier lié aux activités touristiques. Le golfe de Tunis constitue un terrain propice aux efflorescences microalgales nocives.

Le suivi saisonnier des microalgues du golfe de Tunis a tout d'abord permis de mettre en évidence que les Dinoflagellés représentent le groupe dominant observé sur les différentes stations, tant sur les macrophytes que dans la colonne d'eau. Les espèces *Ostreopsis* sp., *P. lima* et *C. monotis* sont les plus abondants, ainsi qu'aucune zone échantillonnée n'était dépourvue d'épisodes de proliférations de ces dernières.

Une saisonnalité est marquée dans les événements d'efflorescence des 3 espèces de Dinoflagellés connues pour être potentiellement toxiques, *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum lima* et *Coolia monotis*. Les saisons les plus critiques étant l'été (pour *Ostreopsis* sp.) et le printemps (pour *C. monotis* et *P. lima*). Cette évolution est due à l'impact des facteurs environnementaux sur le déclenchement des proliférations. Les proliférations d'*Ostreopsis* sp. semblent être liées à une synergie entre deux facteurs ; la température de l'eau et le pH. En été, les températures de l'eau atteignent des valeurs de l'ordre de 24°C à 27°C, au-dessus desquelles l'abondance de cette espèce diminue significativement, aussi bien sur les macrophytes que dans la colonne d'eau. Le même comportement a été enregistré pour le pH, pour lequel une valeur de 9,34 favoriserait la présence d'*Ostreopsis* sp. Cette abondance serait indirectement liée avec les lits de macrophytes existants. Les épisodes d'efflorescences de *P. lima* et *C. monotis* se produisent principalement au printemps. La prolifération de *P. lima* semble être liée à des plages optimales de la teneur moyenne en oxygène dissous et en nitrites, au cours de cette saison. L'abondance de *C. monotis* suit également la même tendance qui serait principalement influencée par la teneur moyenne en azote total au printemps.

Parmi les objectifs définis de ce travail, l'identification de l'espèce du *G. Ostreopsis* présente dans les eaux côtières du golfe de Tunis. L'identification a été basée sur la disposition et la morphologie des plaques thèques, par l'utilisation de la méthode à épifluorescence après coloration des cellules au fluorochrome (Calcofluor). Une analyse morphométrique a été réalisée sur un total de 1206 cellules du Dinoflagellés du *G. Ostreopsis*. Les mensurations effectuées sur des échantillons collectés au niveau des 5 stations de prélèvement du golfe de Tunis a permis de mettre en évidence une grande variabilité de la taille des cellules au niveau des différentes stations du golfe de Tunis. Les cellules d'*Ostreopsis* du site Cap Zebib (CZ) ont été marquées par le plus faible diamètre dorso-ventral (DV), contrairement à celles de Salammbô (S) et Sidi Rais (SR). Notons que les dimensions du diamètre dorso-ventral (DV) des cellules en provenance des sites abrités se sont révélées significativement plus petites, particulièrement par rapport aux autres sites situés au niveau des stations exposées à un fort hydrodynamisme. Le transdiamètre (W) a été caractérisé par des tendances similaires avec des variations significatives selon les stations de prélèvement. De même, pour le diamètre antéro-postérieur (AP). Le rapport dorso-ventral sur le diamètre antéro-postérieur (DV/AP) varie également selon le site d'étude, le plus élevé a été mesuré pour les cellules provenant de la station de Sidi Ali El Mekki (SM).

Lors du suivi estival pendant les années 2015 et 2016 les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* sont les plus élevées jamais recensées sur les côtes tunisiennes avec une concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* maximale de $9,91 \times 10^5$ cell.g⁻¹ MF de *Sargassum vulgare*, et une concentration dans la colonne d'eau de l'ordre de $5,11 \times 10^5$ cell. dm⁻³ à Salammbô durant l'été 2016. De plus, une corrélation entre les abondances des cellules à l'état benthique et les concentrations de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau, a été établie durant toute la période du suivi de 2015 et 2016, au niveau de toutes les stations de prélèvement.

Durant les suivis réalisés en période estivale 2015 et 2016, le long des eaux cotières du golfe de Tunis, les efflorescences ont été principalement enregistrées entre les mois de juillet et août. Cette période correspond à une phase de pics des concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata*. Notre étude a démontré l'existence d'une certaine variabilité temporelle dans l'apparition des périodes d'efflorescence au niveau de chaque station de prélèvement. En effet, les pics peuvent apparaître plus ou moins tardivement d'une année à une autre. Ainsi, en 2015, à Cap zebib, le principal pic a été signalé en juillet, et un autre en septembre. De même, la station de Salammbô a été marquée par un pic d'*Ostreopsis cf. ovata* durant le mois d'octobre en 2015.

L'apparition d'un second épisode d'efflorescence d'*Ostreopsis cf. ovata* s'est manifesté à la fin de l'été, voir au début de l'automne. La tendance temporelle du développement d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis peut être liée aux variations saisonnières de la température de l'eau de mer et de la salinité. En fait, l'abondance la plus élevée d'*Ostreopsis cf. ovata* a été observée lorsque la salinité et la température de l'eau de mer ont atteint des valeurs élevées. L'importance de l'action des variables environnementales, qui agissent en concert avec l'effet de la température de l'eau et créent des conditions optimales favorables au déclenchement des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata*. En effet, nos résultats ont montré que les pics d'*Ostreopsis cf. ovata* ont coïncidé avec de faibles concentrations en nitrites, nitrates, azote total et silicates. De plus, les résultats n'ont montré aucun impact des nutriments sur l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les concentrations d'éléments nutritifs ne semblent pas être un facteur limitant pour les fluctuations des concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans le golfe de Tunis.

Lors des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata*, la teneur en oxygène dissous a augmenté entre la période de pré-efflorescence et l'efflorescence estivale, puis elle a fortement diminué après l'épisode de l'efflorescence. Durant cette étude, nous avons remarqué que les deux pics d'*Ostreopsis cf. ovata* ont coïncidé avec des valeurs élevées en oxygène. En outre, nos résultats ont démontré une corrélation significative entre les teneurs en chlorophylle *a* dans l'eau et les abondances d'*Ostreopsis cf. ovata*.

En plus de la variation temporelle, une variation spatiale a été relevée le long du littoral du golfe de Tunis, entre des stations distantes de quelques kilomètres à plusieurs centaines de kilomètres. Il semble que certaines stations apparaissent plus propices au développement d'*Ostreopsis cf. ovata* que d'autres. A grande échelle, les efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis semblent tributaires des facteurs écologiques qui caractérisent chaque station étudiée. En effet, les stations Salammbô (S) et Cap Zebib (CZ) présentent des caractéristiques similaires du point de vue de la nature du substrat (roches naturelles) et couverture végétale notamment, les algues brunes, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris polypodioides*, *Padina pavonica*, *Sargassum vulgare* et *Gilidium* sp.. Les variabilités à petite et micro-échelle ont également été décrites, cette dernière étant probablement influencée par les turbulences localisées qui peuvent donc améliorer ou entraver leur développement. Cette hétérogénéité des abondances à micro-échelle suggère aussi une distribution en patchs des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*.

L'impact anthropique pourrait constituer un autre facteur déterminant dans l'augmentation des abondances des cellules à l'état benthique et planctonique d'*Ostreopsis cf. ovata*, notamment pour la station de Salammbô qui se caractérise par les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* les plus importantes et les plus maintenues dans le temps, cette zone étant la plus sujette à l'urbanisation. Elle a connu des modifications des habitats côtiers suite aux constructions portuaires, industrielles et de plaisance qui favoriseraient l'apparition de masses d'eau confinées et potentiellement eutrophes.

L'ampleur de l'explosion des proliférations des espèces du G. *Ostreopsis* à l'échelle mondiale, notamment en Méditerranée, s'est traduite par la mise en place de programmes de surveillance nationaux et internationaux (IOC-HAB, GEOHAB, ECOHAB, EUROHAB, REPHY, etc.) dont l'objectif est de favoriser une gestion efficace de ces événements. En conséquence, un fort besoin d'approches innovantes se fait sentir dans la perspective de la gestion et de l'anticipation de ce phénomène. Le projet M3-HABs s'intègre dans cette dynamique afin de contribuer au développement d'outils de gestion fiables des risques associés à la prolifération des Dinoflagellés du genre *Ostreopsis* le long des côtes méditerranéennes. L'un des principaux objectifs du projet M3-HABs est la mise en place d'une stratégie commune basée, sur l'optimisation des méthodes de comptage d'*Ostreopsis* et l'élaboration d'approches de comptage rapide et automatique (MOL et OPR) et aussi l'utilisation d'une approche de modélisation prédictive dans le but de la détection préventive et une gestion plus fiable et rapide de ces efflorescences *Ostreopsis cf. ovata*.

D'une manière générale, les méthodes alternatives de comptage MOL et OPR testées dans la présente étude d'*Ostreopsis cf. ovata* sont, dans une large mesure, en bon accord avec les résultats du comptage manuel, à la fois pour les échantillons planctoniques et benthiques. Ces méthodes se sont avérées robustes et fiables dans une perspective de gestion des risques, avec un accord fondamental sur le potentiel de détection des alertes par rapport à la méthode manuelle, offrant ainsi un fort potentiel d'application et d'appropriation par les acteurs concernés.

L'approche de la modélisation prédictive des cellules *Ostreopsis cf. ovata* du golfe de Tunis a permis de mettre en évidence les facteurs qui entrent dans le mécanisme de la prolifération des cellules d'*O. cf. ovata*. Pour *Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau, la température de l'eau de mer semble être le facteur le plus important avec un pourcentage d'augmentation de EQM de 36,9 %. Dans le cas d' *O. cf. ovata*, sur les macrophytes, il semble que les facteurs,

(i) mois d'échantillonnage et (ii) vitesse du vent sont les plus importants, avec un pourcentage de la précision de 32,9 % et 31,8 % respectivement.

En apportant de nouvelles connaissances sur l'écologie des Dinoflagellés épiphytes potentiellement toxiques notamment celle des microalgues du G. *Ostreopsis* dans le golfe de Tunis, plusieurs voies de recherche sont envisageables :

- La réalisation d'une analyse moléculaire afin d'avoir la confirmation définitive de l'espèce du genre *Ostreopsis* en provenance des sur les 5 stations du golfe de Tunis, et préciser s'il y a éventuellement différents groupes monophylétiques correspondant à ces populations,
- L'élaboration du profil toxinique d'*Ostreopsis* dans le but de mettre en évidence les analogues de l'ovatoxine détectée dans les souches d'*Ostreopsis* du golfe de Tunis,
- L'étude des effets toxicologiques des efflorescences d'*Ostreopsis* par des mortalités d'invertébrés comme les crustacés, les bivalves, les gastéropodes et les échinodermes,
- Une étude des efflorescences sur plusieurs années le long des eaux littorales du golfe de Tunis avec un suivi régulier des abondances d'*Ostreopsis*, durant les mois favorables à sa prolifération, dans le but de mieux comprendre les interactions entre ces dernières et les paramètres environnementaux,
- Inclure les efflorescences d'*Ostreopsis* dans la surveillance sanitaire des eaux de baignade dans le réseau des analyses microbiologiques instauré par les services d'hygiène du Ministère de la Santé publique. Compte tenu des risques sanitaires inhérents de ce phénomène récurrent, il serait judicieux d'intégrer cette microalgue potentiellement toxique parmi les indicateurs de la qualité des eaux de baignade.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abboud-Abi Saab, M., 1989. Les dinoflagellés des eaux côtières libanaises - espèces rares ou nouvelles du phytoplancton marin. *Lebanese Science Bulletin* 5, 5-16.
- Abboud-Abi Saab, M., Fakhri, M., Sadek, E., Matar, N., 2013. Seasonal and Spatial Variations of the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis* in the Lebanese Coastal Waters (Eastern Mediterranean). *Cryptogam. Algal.* 33(1), 57–67.
- Abraham, W.M., Bourdelais, A.J., Ahmed, A., Serebriakov, L., Baden, D.G., 2005. Effects of Inhaled Brevetoxins in Allergic Airways: Toxin-Allergen Interactions and Pharmacologic Intervention. *Environmental Health Perspectives* 113, 632-637.
- Abdennadher, 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. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 106, 102-111.
- Abdennadher, M., Zouari, A.B., Sahnoun, W.F., Alverca, E., Penna, A., Hamza, A., 2017. *Ostreopsis* cf. *ovata* in the Gulf of Gabès (south-eastern Mediterranean Sea): morphological, molecular and ecological characterization. *Harmful Algae* 63, 56–67.
- Accoroni, S., Glibert, P.M., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M., Totti, C., 2015. A conceptual model of annual *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae* 45, 14–25.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* 62, 2512–2519.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Penna, A., Capellacci, S., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Tartaglione, L., Abboud-Abi Saab, M., Giussani, V., Asnaghi, V., Chiantore, M., Totti, C., 2016. *Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea. *Journal of Phycology* 52, 1064–1084.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Colombo, F., Totti, C., 2012. Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases. *Harmful Algae* 19, 15–22.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Totti, C. 2014. New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 34, 7-16.

- Accoroni, S., Totti, C., 2016. The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: a review. *Advances in Oceanography and Limnology* 7,1-15.
- Adachi, M., Kanno, T., Okamoto, R., Itakura, S., Yamaguchi, M., Nishijima, T., 2003. Population structure of *Alexandrium* (Dinophyceae) cyst formation-promoting bacteria in Hiroshima Bay, Japan. *Appl Environ Microbiol* 69, 6560–6568.
- Aissaoui, A., Dhib, A., Reguera, B., Ben Hassine, O.K., Turki, S., Aleya, L., 2014. First evidence of cell deformation occurrence during a *Dinophysis* bloom along the shores of the Gulf of Tunis (SW Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 39, 191–201.
- Aissaoui, A., Turki, S., Ben Hassine, O.K., 2012. occurrence of harmful dinoflagellates in the punic harbors of carthage (gulf of Tunis, Tunisia) and their correlations with the physicochemical parameters. *Bulletin Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de Salammbô* 39, 127-140.
- Alcoverro, T., Pérez, M., Romero, J., 2004. Importance of within-shoot epiphyte distribution for the carbon budget of seagrasses: the example of *Posidonia oceanica*. *Botanica Marina* 47, 307–312.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51, 418–427.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717–730.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., Katikou, P., Baxevanis, A.D., Abatzopoulos, T.J., 2009. Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters. *Harmful Algae* 8, 299–311.
- Alloisio, S., Giussani, V., Nobile, M., Chiantore, M., Novellino, A., 2016. Microelectrode array (MEA) platform as a sensitive tool to detect and evaluate *Ostreopsis cf. ovata* toxicity. *Harmful Algae* 55, 230–237.
- Al-Ghelani, H.M., AlKindi, A.Y.A., Amer, S., Al-Akhzami, Y.K., 2005. Harmful Algal Blooms: Physiology, Behavior, Population Dynamics and Global Impacts- A Review. *Journal For Science* 10, 1-30.
- Alcala, A.C., Alcala, L.C., Garth, J.S., Yasumura, D., Yasumoto, T., 1988. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 26, 105-107.
- Àlvarez, J., Pedrol, A., Parro, I., Goxenci, J., De Torres, M., Manzanera, M., Planas, C., Cosculluela, G., Lopez, A., Masó, M., Vila, M., Isalt, R., 2005. Brote epidémico de sintomatología irritativa en Sant Andreu de Llanereres: ¿el origen está en el agua del mar?, XXIII Reunión de la Sociedad Española de Epidemiología, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

- Alvarez-Salgado, X.A., Figueiras, F.G., Perez, F.F., Groom, S., Nogueira, E., Borges, A.V., Chou, L., Castro, C.G., Moncoiffé, G., Ríos, A.F., Miller, A.E.J., Frankignoulle, M., Savidge, G., Wollast, R., 2003. The Portugal coastal counter current of NW Spain: new insights on its biogeochemical variability. *Prog. Oceanogr.* 56, 281–321.
- Amaro, A.M., Fuentes, M.S., Ogalde, S.R., Venegas, J.A., Suárez-Isla, B.A., 2005. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J Eukaryot Microbiol* 52, 191–200.
- Amin, S.A., Hmelo, L.R., van Tol, H.M., Durham, B.P., Carlson, L.T., Heal, K.R., Morales, R.L., Berthiaume, C.T., Parker, M.S., Djunaedi, B., Ingalls, A.E., Parsek, M.R., Moran, M.A., Armbrust, E.V., 2015. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* 522, 98–101.
- Amorim, A., Veloso V., Battocchi C., Penna, A., 2011. Occurrence of *Ostreopsis cf. siamensis* in the upwelling coast of Portugal (NE Atlantic). International Conference on *Ostreopsis* Development. Villefranche-sur-mer.
- Amorim, A., Nolasco, R., Oliveira, P.B., Silva, T., Silva, A., Domingues, B., Brotas, V., Dubert, J., Moita, M.T., 2014. Seeding of *Gymnodinium catenatum* blooms in Iberian shelf waters. ICES CM 2014/H: 20.
- Amzil, Z., Sibat, M., Chomerat, N., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Lemee, R., Nezan, E., Sechet, V., 2012. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the French Mediterranean coast. *Mar. Drugs* 10, 477–496.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., Abadie, E., 2007. Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Mar. Drugs* 5, 168–179.
- Anderson, C.R., Sapiano, M.R.P., Krishna Prasad, M.B., Long, W., Tango, P.J., Brown, C. W., Murtugudde, R., 2010. Predicting potentially toxicogenic *Pseudo-Nitzschia* blooms in the Chesapeake Bay. *J. Mar. Syst.* 83, 127–140.
- Anderson, D.M., 1995. Toxic red tides and harmful algal blooms : A practical challenge in coastal oceanography. *Reviews of Geophysics* 33, Suppl.
- Anderson, D.M. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean Coast. Manage.* 52, 342-47.
- Anderson, D.M., Boerlage, S.F.E., Dixon, M.B., 2017. (Eds), Harmful Algal Blooms (HABs) and Desalination: A Guide to Impacts, Monitoring and Management. Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, (IOC Manuals and Guides No.78.) (English.) (IOC/2017/MG/78), 539 pp.
- Anderson, D.M., Cembella, D.A., Hallegraeff M.G., 2012. Progress in understanding harmful algal blooms (HABs): Paradigm shifts and new technologies for research, monitoring and management. *Annual Review of Marine Science* 4, 143-176.

- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25 (4B), 704–726.
- Anderson, D.M., Hoagland, P., Kaoru, Y., White, A.W., 2000. Estimated annual economic impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States. Technical Report WHOI2000-11, Woods Hole Oceanographic Institute, 100 pp.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Binder, B.J., 1984. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* : Cyst yield in batch cultures. *Journal of Phycology* 20, 418-425.
- Anderson, D.M., Rengefors, K., 2006. Community assembly and seasonal succession of marine dinoflagellates in a temperate estuary: The importance of life cycle events. *Limnology and Oceanography* 51, 860-873.
- Anderson, D.M., White, A.W., 1989. Toxic Dinoflagellates and Marine Mammal Mortalities : Proceedings of an Expert Consultation held at the Woods Hole Oceanographic Institution, in: Institution, W.H.O. (Ed.). Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, 70 pp.
- Andonegi, E., Fernandes, J.A., Quincoces, I., Irigoien, X., Uriarte, A., Pérez, A., Howell, D., Stefánsson, G., 2011. The potential use of a Gadget model to predict stock responses to climate change in combination with Bayesian networks: the case of Bay of Biscay anchovy. *J. Mar. Sci.* 68, 1257–1269.
- APAL (Agence de Protection et d'Aménagement du Littoral), 2016. Rapport des activités 2016. 52 pp.
- APHA (American Public Health Association), 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- Armi, Z., Milandri, A., Turki, S., Hajjem, B., 2011. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium tamarense* in the North Lake of Tunis: bloom characteristics and the occurrence of paralytic shellfish toxin. *African Journal of Aquatic Science* 36, 47–56.
- Armi, Z., Trabelsi, E., Turki, S., Ben Maiz, N., Mahmoudi, E., 2012. Composition and dynamics of potentially toxic dinoflagellates in a shallow Mediterranean lagoon. *Int. J. Oceanogr. Hydrobiol.* 41, 25–35.
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Ben Maiz, N., 2008. Nutrient loading and occurrence of Potentially Harmful Phytoplankton species in the North Lake of Tunis (Tunisia). *Cah. Biol. Mar.* 49, 311 - 321.
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Ben Maiz, N., 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environmental Monitoring and Assessment* 164, 423–433.

- Artigas, P., Gadsby, D.C., 2003. Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin induced channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 501-505.
- Artigas P., Gadsby D.C., 2004. Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump-channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J. Gen. Physiol.* 123, 357–376.
- Ashton, M., Rosado, W., Govind, N.S., Tosteson, T.R., 2003. Culturable and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Toxicon*, 42, 419-424.
- Asnaghi, V., Bertolotto, R., Giussani, V., Mangialajo, L., Hewitt, J., Thrush, S., Moretto, P., Castellano, M., Rossi, A., Povero, P., 2012. Interannual variability in *Ostreopsis ovata* bloom dynamic along Genoa coast (North-western Mediterranean): a preliminary modeling approach. *Cryptogamie Algologie* 33, 181-89.
- Asnaghi, V., Pecorino, D., Ottaviani, E., Pedroncini, A., Bertolotto, R.M., Chiantore, M., 2017. A novel application of an adaptable modeling approach to the management of toxic microalgal bloom events in coastal areas. *Harmful Algae* 63, 184–192.
- Backer, L.C., Fleming, L.E., Rowan, A., Cheng, Y.S., Benson, J., Pierce, R.H., Zaias, J., Bean, J., Bossart, G.D., Johnson, D., Quimbo, R., Baden, D.G., 2003. Recreational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events. *Harmful Algae* 2, 19-28.
- Ballantine, D.L., Bardales, A.T., Tosteson, T.R., Durst, H.D., 1985. Seasonal abundance of *Gambierdiscus toxicus* and *Ostreopsis* sp. in coastal waters of southwest Puerto Rico. *Proceedings of the fifth international coral reef congress. Tahiti* 4, 417-422.
- Ballantine, D.L., Tosteson, T.R., Bardales, A.T., 1988. Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 119, 201-212.
- Barone, R., 2007. Behavioural trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: the spider's strategy. *Harmful Algae News* 33, 1-3.
- Battocchi, C., 2009. Molecular identification of *Ostreopsis* species in Mediterranean coastal waters using fluorescent oligonucleotide probes. *Harmful Algae News* 39, 8-9.
- Battocchi, C., Totti, C., Vila, M., Masó, M., Capellacci, S., Accoroni, S., Reñé, A., Scardi, M., Penna, A., 2010. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1074–1084.
- Baudoux, A.C., Noordeloos, A.A.M., Veldhuis, M.J.W., Brussaard, C.P.D., 2006. Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during two spring blooms in temperate coastal waters. *Aquatic Microbial Ecology* 44, 207–217.

- Béjaoui, B., Armi, Z., Ottaviani, E., Barelli, E., Gargouri-Ellouz, E., Chérif, R., Turki, S., Solidoro, C., Aleya, L., 2016a. Random Forest model and TRIX used in combination to assess and diagnose the trophic status of Bizerte Lagoon, southern Mediterranean. *Ecological Indicators* 71, 293–301.
- Béjaoui, B., Ottaviani, E., Barelli, E., Ziadi, B., Dhib, A., Lavoie, M., Gianluca, C., Turki, S., Solidoro, C., Aleya, L., 2018. Machine learning predictions of trophic status indicators and plankton dynamic in coastal lagoons. *Ecological Indicators* 95, 765–774.
- Belin, C., Claisse, D., Daniel, A., Fleury, E., Miossec, L., Piquet, J. C., Ropert, M., Boisseaux, A., Lamoureux, A., Soudant, D., 2013. Qualité du Milieu Marin Littoral Synthèse Nationale de la Surveillance 2013. Ifremer report, 75 pp.
- Ben Brahim, M., Feki, M., Bouain, A., 2015. Occurrences of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in relation with environmental factors in Kerkennah Island (Southern coast of Tunisia). *Journal of Coastal Life Medicine* 3, 596-599.
- Ben Brahim, M., Hamza, A., Ben Ismail, S., Mabrouk, L., Bouain, A., Aleya, L., 2013. What factors drive seasonal variation of phytoplankton, protozoans and metazoans on leaves of *Posidonia oceanica* and in the water column along the coast of the Kerkennah Islands, Tunisia? *Mar. Pollut. Bull.* 71, 286–298.
- Ben Charrada, R., 1997 . L'hydrodynamique et l'écologie du complexe Golfe –Lacs de Tunis. Contribution à la modélisation de l'écosystème pélagique des eaux côtières de Tunis. Thèse de Doctorat en Génie Hydraulique, ENIT, 400 pp.
- Ben Gharbia, H., Yahia, O., Amzil, Z., Chomérat, N., Abadie, E., Masseret, E., Sibat, M., Zmerli Triki, H., Nouri, H., Laabir, M., 2016. Toxicity and Growth Assessments of Three Thermophilic Benthic Dinoflagellates (*Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*) Developing in the Southern Mediterranean Basin. *Toxins* 8, 297.
- Ben Gharbia, H., Kéfi-Daly Yahia, O., Cecchi, P., Masseret, E., Amzil, Z., Herve, F., Rovillon, G., Nouri, H., M'Rabet, C., Couet, D., Zmerli Triki, H., Laabir, M., 2017. New insights on the species-specific allelopathic interactions between macrophytes and marine HAB dinoflagellates. *PLOS ONE* 12, e0187963.
- Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., Moore, S. K., Hoagland, P., Enevoldsen, H., 2016. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 96, 61–91.
- Berdalet, E., Peters, F., Koumandou, V.L., Roldan, C., Guadayol, O., Estrada, M., 2007. Species specific physiological response of dinoflagellates to quantified small scale turbulence. *Journal of Phycology* 43, 965–977.
- Berdalet, E., Tester, P., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M., Zingone A., 2017. Harmful algal blooms in benthic systems: Recent progress and future research. *Oceanography* 30, 36–45.

- Berdalet, E., Tester, P., Zingone, A., 2012. GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark, 62 pp.
- Besada, E.G. 1982. Study of the morphology, toxicity and sterol composition of marine tropical benthic dinoflagellates: family *Ostreopsidiae*. M.S. Thesis, University of Houston, Texas, 89 pp.
- Biré, R., Trotereau, S., Lemée, R., Oregioni, D., Delpont, C., Krysz, S., Guérin T., 2015. Hunt for palytoxins in a wide variety of marine organisms harvested in 2010 on the French Mediterranean coast. *Marine Drugs* 13,5425–5446.
- Blanfuné, A., Boudouresque, C.F., Grosseil, H., Thibaut, T., 2015. Distribution and abundance of *Ostreopsis* spp. and associated species (Dinophyceae) in the northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 12332–12346.
- Blauw, A.N., Los, F.J., Huisman, J., Peperzak, L., 2010. Nuisance foam events and *Phaeocystis globosa* blooms in Dutch coastal waters analyzed with fuzzy logic. *J. Mar. Syst.* 83, 115–126.
- Bolch, C.J.S., Subramanian, T.A., Green, D.H., 2011. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) requires marine bacteria for growth. *J Phycol* 47, 1009–1022.
- Bomber, J.W., Aikman, K.E., 1989. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanogr.* 6, 291–311.
- Boström, C., Jackson, E.L., Simenstad, C.A., 2006. Seagrass landscapes and their effects on associated fauna: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 68, 383–403.
- Bottalico, A., Milella, P., Felicini, G.P. 2002. Fioritura di *Ostreopsis* sp. (Dinophyta) nel porto di Otranto. Riunione Scientifica Annuale del Gruppo di lavoro per l'Algologia - Società Botanica Italiana. Chioggia.
- Bouchouicha, S.D., Sahraoui, I., Hadj, M.H., Sakka, H.A., 2012. Dynamique saisonnière du genre *Alexandrium* (dinoflagellé potentiellement toxique) dans la lagune de Bizerte (Nord de la Tunisie) et contrôlé par les facteurs abiotiques environnants. *C.R. Biologies* 335, 406-416.
- Brahim, M., Koutitonsky, V., Béjaoui, B., Sammari, C., 2007. Simulation numérique du transport des sables sous l'effet des vents dans le golfe de Tunis. *Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer Salammbô* 34, 666–679.
- Bratbak, G., Egge, J.K., Hedal, M., 1993. Viral mortality of the marine alga *emiliana huxleyi* (haptophyceae) and termination of algal blooms. *Marine Ecology Progress Series* 93, 39–48.

- Bratbak, G., Heldal, M., Thingstad, T.F., Tuomi, P., 1996. Dynamics of virus abundance in coastal seawater. *FEMS Microbiological Ecology* 19, 263–269.
- Bravo, I., Vila, M., Magadán, S., Rial, P., Rodriguez, F., Fraga, S., Franco, J.M., Riobó, P., Sala M.M., 2010. Studies on cultures of *Ostreopsis cf ovata*: life cycle observations. 14th International Conference on Harmful Algae, Conference Proceedings, Crete, 3-5.
- Breiman, L., 2001. Random forests. *Mach. Learn.* 45, 5–32.
- Briggs, A., Leff, M., 2007. A comparison of toxic dinoflagellate densities along a gradient of human disturbance in the North Line Islands. Final Report. Stanford University.
- Brissard, C., Hervé, F., Sibat, M., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., Herrenknecht, C., 2015. Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification. *Journal of Chromatography A* 1388, 87-101.
- Brussaard, C.P.D., 2004. Viral control of phytoplankton populations - a review. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, 125–138.
- Burkholder, J.M., Azanza, R.V., Sako, Y., 2006. The Ecology of Harmful Dinoflagellates, in: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 413 pp
- Burkholder, J.M., Glasgow, H.B., Deamer-Melia, N.J., Springer, J., Parrow, M.W., Zhang, C., Cancellieri, P.J., 2001. Species of the toxic *Pfiesteria* complex, and the importance of functional type in data interpretation. *Env. Health Perspect.* 109, 667-679.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Skelton, H.M., 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8, 77–93.
- Burkholder, J.M., Hallegraeff, G.M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H.A., Oldach, D.W., Parrow, M.W., Sullivan, M.J., Zimba, P.V., Allen, E.H., Kinder, C.A., Mallin, M.A., 2007. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. *Harmful Algae* 6, 486–518.
- Campbell, L., Olson, R.J., Sosik, H.M., Abraham, A., Henrichs, D.W., Hyatt, C.J., Buskey, E.J., 2010. FIRST HARMFUL DINOPHYSIS (DINOPHYCEAE, DINOPHYSALES) BLOOM IN THE U.S. IS REVEALED BY AUTOMATED IMAGING FLOW CYTOMETRY. DINOPHYSIS DYNAMICS FROM IMAGING FLOWCYTOBOT. *Journal of Phycology* 46, 66–75.
- Carey, C., Ewing, H., Cottingham, K., Weathers, K., Thomas, R., Haney, J., 2012. Occurrence, toxicity, and potential ecological consequences of the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata* for low-nutrient lakes in the northeastern United States. *Aquat. Ecol.* 46, 395–409.
- Carlson, R.D., Tindall, D.R., 1985. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands, in: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York, 171–176.

- Caron, D.A., Garneau, M.E., Seubert, E., Howard, M.D., Darjany, L., Schnetzer, A., Cetinić, I., Filteau, G., Lauri, P., Jones, B., Trussell, S., 2009. Harmful algae and their potential impacts on desalination operations off southern California. *Water Research* 44, 385-416.
- Carmichael, W., 2008. A world overview—one hundred-twenty seven years of research on toxic cyanobacteria—where do we go from here? *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 105–125.
- Carvalho, L., Miller, C.A., Scott, E.M., Codd, G.A., Davies, P.S., Tyler, A.N., 2011. Cyanobacterial blooms: statistical models describing risk factors for national-scale lake assessment and lake management. *Sci. Total Environ.* 409, 5353–5358.
- Casabianca, S., Casabianca, A., Riobó, P., Franco, J. M., Vila, M., Penna, A. 2013. Quantification of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR assay in marine aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3788-95.
- Casabianca, S., Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Giussani, V., Chiantore, M., Penna, A., 2014. Monitoring toxic *Ostreopsis* cf. *ovata* in recreational waters using a qPCR based assay. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 102–109.
- Cecchi, P., Garrido, M., Collos, Y., Pasqualini, V., 2016. Water flux management and phytoplankton communities in a Mediterranean coastal lagoon. Part II: Mixotrophy of dinoflagellates as an adaptive strategy? *Marine Pollution Bulletin* 108, 120–133.
- Chang, F.H., Shimizu, Y., Hay, B., Stewart, R., Mackay, G., Tasker, R., 2000. Three recently recorded *Ostreopsis* spp. (Dinophyceae) in New Zealand: Temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34, 29–39.
- Cheng, Y.S., Villareal, T.A., Zhou, Y., Gao, J., Pierce, R.H., Wetzel, D., Naar, J., Baden, D.G., 2005. Characterization of red tide aerosol on the Texas coast. *Harmful Algae* 4, 87-94.
- Cho, J.Y., 2012. Algicidal activity of marine *Alteromonas* sp. KNS-16 and isolation of active compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 76, 1452–1458.
- Ciminiello, P., Aversano, C.D., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Analytical Chemistry* 78, 6153-6159.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., 2012. Isolation and structure elucidation of Ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *Journal of the American Chemical Society* 134, 1869-1875.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 111–120.

- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 2735–2744.
- Ciminiello, P., Manganello, M., Penna, A., Totti, C., Zingone, A., 2014. Alghe tossiche e *Ostreopsis cf. ovata* nelle acque di balneazione. In: Funari, E., Manganello, M., Testai, E. [Eds.] *Ostreopsis cf. ovata*: linee guida per la gestione delle fioriture negli ambienti marino costieri in relazione a balneazione e altre attività ricreative. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 5-9.
- Cochlan, W.P., Herndon, J., Kudela, R.M., 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 8, 111–118.
- Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cah.Biol. mar.* 53, 373-380.
- Cohu, S., Mangialajo, L., Thibaut, T., Blanfuné, A., Marro, S., Lemée, R., 2013. Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 24, 32–44.
- Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.-P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.-M., Lemée, R., 2011. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 62, 2681–2691.
- Congestri, R., Di Pippo, F., De Philippis, R., Buttino I., Paradossi, G., Albertano, P. 2006. Seasonal succession of phototrophic biofilms in an Italian wastewater treatment plant: Biovolume, spatial structure and exopolysaccharides. *Aquat Microb Ecol* 45, 301-312.
- Crenn, K., Duffieux, D., Jeanthon, C., 2018. Bacterial Epibiotic Communities of Ubiquitous and Abundant Marine Diatoms Are Distinct in Short-and Long-Term Associations. *Frontiers in microbiology* 9, 2879.
- Daly-Yahia-Kéfi, O., 1998. Le phytoplancton de la baie de Tunis: analyse systématique, biogéographique, quantitative et synécologique des Diatomées et des Dinoflagellés. Thèse de doctorat. Département des Sciences Biologiques. Université de Tunis II, Tunis. 332 pp.
- Daly Yahia-Kefi, O., Nézan, É., Daly Yahia, M.N., 2001. Sur la présence du genre *Alexandrium* Halim (Dinoflagellés) dans la baie de Tunis (Tunisie). *Oceanologica Acta* 24, 17–25.
- Daly Yahia-Kéfi, O., Souissi, S., Gomez, F., Daly Yahia, M.N., 2005. Spatiotemporal distribution of the dominant diatom and Dinoflagellate species in the Bay of Tunis (SW Mediterranean Sea). *Mediterranean Marine Science* 6, 17–34.

- Dammak-Zouari H., 2011. Le phytoplancton dans les milieux dégradés (Port et Eaux de ballast) du golfe de Gabès : Genèse, Diversité, Caractérisation et Risques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques. Faculté des Sciences de Sfax: 214 pp.
- David, H., Ganzedo, U., Laza-Martínez, A., Orive, E. 2012. Relationships between the presence of *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Atlantic coast of the Iberian Peninsula and sea-surface temperature. *Cryptogamie, Algologie* 33, 199-207.
- David, H., Laza-Martínez, A., Miguel, I., Orive, E., 2013. *Ostreopsis* cf. *siamensis* and *Ostreopsis* cf. *ovata* from the atlantic iberian peninsula: morphological and phylogenetic characterization. *Harmful Algae* 30, 44–55.
- Davidson, K., Tett, P., Gowen, R., 2011. Harmful Algal Blooms. Hester, R.E., Harrison, R.M. (eds.), *Issues in Environmental Science and Technology*. Cambridge. Chapitre 3. In : Royal Society of Chemistry, 95–127.
- Delegrange, A., 2015. Impact du phytoplancton sur les juvéniles de bar (*Dicentrarchus labrax*) en milieu aquacole. Approches in situ et expérimentales. Thèse de doctorat : Université du Littoral Côte d'Opale, France, 202 pp.
- Delgado, M., Estrada, M., Camp, J., Fernandez, J.V., Santmarti, M., Lleti, C., 1990. Development of a toxic *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) bloom in the harbour of Sant Carles de la Rapita (Ebro Delta, northwestern Mediterranean). *Scientia Marina* 54, 1-7.
- Delgado, G., Lechuga-Devéze, C.H., Popowski, G., Troccoli, L., Salinas, C.A., 2006. Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Revista de Biología Tropical* 54, 299-310.
- Demory, D., Arsenieff, L., Simon, N., Six, C., Rigaut-Jalabert, F., Marie, D., Ge, P., Bigeard, E., Jacquet, S., Sciandra, A., Bernard, O., Rabouille, S., Baudoux, A.C., 2017. Temperature is a key factor in *Micromonas*-virus interactions. *The ISME journal* 11, 601-612.
- DGSAM – MEHAT, 2005. Etude de la variation du niveau de la mer dans sept ports. Par IHE.
- Dhib, A., Fertouna-Bellakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2015. Harmful planktonic and epiphytic microalgae in a Mediterranean Lagoon: The contribution of the macrophyte *Ruppia cirrhosa* to microalgae dissemination. *Harmful Algae* 45, 1–13.
- Dhib, A., Fertouna Bellakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2016. Driving factors of Dinoflagellates cyst distribution in surface sediments of a Mediterranean lagoon with limited access to the sea. *Marine Pollution Bulletin* 112, 303–312.
- Dhib, A., Frossard, V., Turki, S., Aleya, L., 2013. Dynamics of harmful dinoflagellates driven by temperature and salinity in a northeastern Mediterranean lagoon. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3369–3382.

- Dorantes-Aranda, J.J., Nichols, P.D., David Waite, T., Hallegraeff, G.M., 2013. Strain variability in fatty acid composition of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) and its relation to differing ichthyotoxicity toward rainbow trout gill cells. *Journal of Phycology* 49, 427–438.
- Drake, L.A., Meyer, A.E., Forsberg, R.L., Baier, R.E., Doblin, M.A., Heinemann, S., Johnson, W.P., Koch, M., Rublee, P.A., Dobbs, F.C., 2005. Potential invasion of microorganisms and pathogens via ‘interior hull fouling’: biofilms inside ballast water tanks. *Biological Invasions* 7, 969–982.
- Drake, L.A., Doblin, M.A., Dobbs, F.C., 2007. Potential microbial bioinvasions via ships’ ballast water, sediment, and biofilm. *Marine Pollution Bulletin* 55, 333–341.
- Drira, Z., 2009. Contribution à la compréhension du fonctionnement du Golfe de Gabès: Etude des caractéristiques dynamiques et structurales des communautés phytozooplanctoniques en relation avec la variabilité environnementale et les caractéristiques hydrographiques des zones côtières et océaniques. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de Sfax et Université de Franche-Comté : 229 pp.
- Doucette, G.J., Cembella, A.D., Boyer, G.L., 1989. Cyst formation in the red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarens* (dinophyceae) : effects of iron stress. *Journal of Phycology* 25, 721–731.
- Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Gasparini, L.M., Icardi, G., 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005–06, in north-west Italy. *Euro surveillance* 12.
- Edwards, M., Johns, D.G., Leterme, S.C., Svendsen, E., Richardson, A.J., 2006. Regional climate change and harmful algal blooms in the northeast Atlantic. *Limnology and Oceanography* 51, 820–829.
- Elgarch, A., Vale, P., Rifai, S., Fassouane, A., 2008. Detection of diarrhetic shellfish poisoning and azaspiracid toxins in Moroccan mussels: Comparison of the LC-MS method with the commercial immunoassay kit. *Mar. Drugs* 6, 587–594.
- Escalera, L., Benvenuto, G., Scalco, E., Zingone, A., Montresor, M., 2014. Ultrastructural features of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae). *Protist* 165, 260–74.
- FAO, 2004. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper-Food and Agriculture Organization of the United Nations 80, 278 pp.
- Faust, K., Raes, J., 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* 10, 538–550.
- Faust, M.A., 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology* 31, 996–1003.

- Faust, M.A., 1998. Mixotrophy in tropical benthic dinoflagellates. Harmful Algae Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae, Vigo, Spain, 1997, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, France, 390-393.
- Faust, M.A., 1999. Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov. Phycologia 38, 92-99.
- Faust, M.A., 2009. Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef–mangrove ecosystem, Belize. Atoll Research Bulletin. 569, 1–30.
- Faust, M.A., Morton, S.L., 1995. Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). Journal of Phycology 31, 456-463.
- Faust, M.A., Morton, S.L., Quod, J.P., 1996. FURTHER SEM STUDY OF MARINE DINOFLAGELLATES: THE GENUS *OSTREOPSIS* (DINOPHYCEAE)1. Journal of Phycology 32, 1053–1065.
- Faust, M.A., Gualledge, R.A. 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Department of Systematic Biology – Biology National Museum of Natural History. Washington, DC. 144 pp.
- Feki, M., Brahim, M.B., Feki-Sahnoun, W., Mahfoudi, M., Sammari, C., Hamza, A., 2016. SEASONAL AND DAILY FLUCTUATION OF DINOFLAGELLATES DURING SPRING TIDE PERIODS IN KERKENNAH ISLANDS (SOUTHERN COAST OF TUNISIA). Life and Environment 66, 1–12.
- Feki, W., Hamza, A., Bel Hassen, M., Rebai A., 2008. Les efflorescences phytoplanctoniques dans le golfe de Gabès (Tunisie) au cours de dix ans de surveillance (1995-2005). Bull. inst. Nat. Technol. Mer Salammbô 35, 105–116.
- Feki W., Hamza A., Frossard V., Abdennadher M., Hannachi I., Jacquot, M., Belhassen M., Aleya L., 2013. What are the potential drivers of blooms of the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis*? A 10-year study in the Gulf of Gabes, Tunisia, southwestern Mediterranean Sea. Harmful Algae 23, 8-18.
- Ferrante, M., Conti, G.O., Fiore, M., Rapisarda, V., Ledda, C., 2013. Harmful Algal Blooms In The Mediterranean Sea: Effects On Human Health. Capsula Eburnea 8.
- Ferrier, M., Martin, J.L., Rooney-Varga, J.N., 2002. Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. J Appl Microbiol 92, 706–716.
- Fensome, R.A., Saldarriaga, J.F., Taylor, F.J.R., 1999. Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies. Grana 38, 66-80.
- Fertouna-Bellakhal, M., Dhib, A., Béjaoui, B., Turki, S., Aleya, L., 2014. 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. Marine Pollution Bulletin 84, 347–362.

- Fertouna-Bellakhal, M., Dhib, A., Fathalli, A., Bellakhal, M., Chomérat, E., Laabir, M., Turki, S., Aleya, L., 2015. *Alexandrium pacificum* Litaker sp. nov (G IV): Resting cyst distribution and toxin profile of vegetative cells in Bizerte Lagoon (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 48, 69–82.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237–240.
- Figueroa, R.I., Bravo, I., Garcés, E., 2006. Multiple routes of sexuality in *Alexandrium Taylori* (dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 42, 1028–1039.
- Figueroa, R.I., Garcés, E., Camp, J., 2010. Reproductive plasticity and local adaptation in the host–parasite system formed by the toxic *Alexandrium minutum* and the dinoflagellate parasite *Parvilucifera sinerae*. *Harmful Algae* 10, 56–63.
- Figueroa, R.I., Garcés, E., Massana, R., Camp, J., 2008. Description, host-specificity, and strain selectivity of the dinoflagellate parasite *Parvilucifera sinerae* sp nov (Perkinsozoa). *Protist* 159, 563–578.
- Figueredo, C.C., Giani, A., Bird, D.F., 2007. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of phycology* 43, 256–265.
- Fire, S., Flewelling, L., Stolen, M., Noke Durden, W., de Wit, M., Spellman, A., Wang, Z., 2015. Brevetoxin-associated mass mortality event of bottlenose dolphins and manatees along the east coast of Florida, USA. *Marine Ecology Progress Series* 526, 241–251.
- Fistarol, G.O., Legrand, C., Rengefors, K., Graneli, E., 2004. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology* 6, 791–798.
- Fleming, L.E., Backer, L.C., Baden, D.G., 2005a. Overview of Aerosolized Florida Red Tide Toxins: Exposures and Effects. *Environmental Health Perspectives* 113, 618–620.
- Fleming, L.E., Kirkpatrick, B., Backer, L.C., Bean, J.A., Wanner, A., Dalpra, D., Tamer, R., Zaias, J., Cheng, Y.S., Pierce, R., Naar, J., Abraham, W.M., Clark, R., Zhou, Y., Henry, M.S., Johnson, D., Van De Bogart, G., Bossart, G.D., Harrington, M., Baden, D.G., 2005b. Initial Evaluation of the Effects of Aerosolized Florida Red Tide Toxins (Brevetoxins) in Persons with Asthma. *Environmental Health Perspectives* 113, 650–657.
- Foissner, W., Hawksworth, D.L., 2009. *Protist Diversity and Geographical Distribution*. Springer Science and Business Media, 211 pp.
- Forster, G., 1979. Mortality of the bottom fauna and fish in St. Austell Bay and neighbouring areas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 59, 517–520.

- Fraga, S., Rodríguez, F., 2014. Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinoflagellate. *Protist* 165, 839–853.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Bravo, I., Zapata, M., Marañón, E., 2012. Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms. *Cryptogam. Algol.* 33, 171–79.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11,10–22.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P., Bravo, I., 2016. *Gambierdiscus balechii* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean). *Harmful Algae* 58, 93–105.
- France, J., Mozetic, P., 2006. Ecological characterization of toxic phytoplankton species (*Dinophysis* spp., Dinophyceae) in Slovenian mariculture areas (Gulf of Trieste, Adriatic Sea) and the implications for monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 5, 1504–1516.
- Francis, T.B., Wolkovich, E.M., Scheuerell, M.D., Katz, S.L., Holmes, E.E., Hampton, S., 2014. Shifting regimes and changing interactions in the Lake Washington, U.S.A., plankton community from 1962-1994. *PLoS ONE* 9, e110363.
- Franks, P.J.S., 2018. Recent Advances in Modelling of Harmful Algal Blooms. In: Glibert, P., Berdalet, E., Burford, M., Pitcher, G., Zhou, M., (eds) *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* 232, 359–377.
- Fukuyo, Y., 1981. Taxonomical Study on Benthic Dinoflagellates Collected in Coral Reefs *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47, 967-978.
- Funari, E., Manganelli, M., Testai, E., 2015. *Ostreospis* cf. *ovata* blooms in coastal water: italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities. *Harmful Algae* 50, 45–56.
- Gaines, G, Elbrächter, M., 1987. Heterotrophic nutrition. In: Taylor FJR (ed) *The biology of dinoflagellates. Botanical Monographs*, vol 21. Blackwell Science Publications, Oxford, 224–268.
- Gallitelli, M., Ungaro, N., Procacci, V., Silver, N.G., Sabbà, C., 2005. Respiratory Illness as a Reaction to Tropical Algal Blooms Occurring in a Temperate Climate. *Journal of the American Medical Association* 293, 2599-2600.
- Gangemi, E., Giacobbe, M., Fraga, S., 2006. The ciguateric species complex in the Capo Peloro Lagoons (Messina, Sicily). *Biol. Mar. Med.* 13.
- Garcés, E., Camp, J., 2012. “Habitat changes in the Mediterranean Sea and the consequences for Harmful Algal Blooms formation,” in *Life in the Mediterranean Sea: A Look at Habitat Changes*, ed N. Stambler (New York, NY: Nova Science Publishers, Inc.),

519–541.

- García-Altres, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Carnicer, O., de la Iglesia, P., Forino, M., Diogène, J., Ciminiello, P., 2014. The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MSⁿ. *Anal. Bioanal. Chem.* 1-14.
- Gaydos, J.K., 2006. Bottlenose Dolphins and Brevetoxins: A Coordinated Research and Response Plan, in: NOAA (Ed.), 46 pp.
- GEOHAB, 2006. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: Eutrophication and HABs. SCOR and IOC, Paris and Baltimore, 74 pp.
- GEOHAB, 2012. Core research project: HABs in benthic systems. In: Berdalet E., Tester P., Zingone A. (Eds.), Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark, 64 pp.
- Giacobbe, M.G., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R., Yang, X., 2000. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). *Phycologia* 39, 177–182.
- Giraudoux, P., 2012. Pgirness: Data Analysis in Ecology <<http://perso.orange.fr/giraudoux/>>
- Giussani, V., Costa, E., Pecorino, D., Berdalet, E., De Giampaulis, G., Gentile, M., Fuentes, V., Vila, M., Penna, A., Chiantore, M., Garaventa, F., Lavorano, S., Faimali, M., 2016. Effects of the harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on different life cycle stages of the common moon jellyfish *Aurelia* sp. *Harmful Algae* 57, 49–58.
- Glibert, P.M., Anderson, D.M., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K.G., 2005a. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* 18, 137–147.
- Glibert, P.M., Allen, J.I., Artioli, Y., Beusen, A., Bouwman, L., Harle, J., Holmes, R., Holt, J., 2014. Vulnerability of coastal ecosystems to changes in harmful algal bloom distribution in response to climate change: projections based on model analysis. *Global Change Biology* 20, 3845-3858.
- Glibert, P.M., Allen, J.I., Bouwman, A.F., Brown, C.W., Flynn, K.J., Lewitus, A.J., Madden, C.J., 2010. Modeling of HABs and eutrophication Status, advances, challenges. *J. Mar. Syst.* 83, 262-275.
- Glibert, P.M., Berdalet, E., Burford, M.A., Pitcher, G.C., Zhou, M., 2018. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. *Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* 232, 461 pp.
- Glibert, P.M., Burkholder, J., 2006. The complex relationships between increases in fertilization of the earth, coastal eutrophication and proliferation of harmful algal blooms. *Ecology of harmful algae*. Springer, 341-54.
- Glibert, P.M., Seitzinger, S., Heil, C.A., Burkholder, J.M., Parrow, M.W., Codispoti, L.A., Kelly, V., 2005b. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful

- algal blooms. *Oceanography* 18, 198–209.
- Glibert, P.M., Harrison, J., Heil, C., Seitzinger, S., 2006. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry* 77, 441–463.
- Gollasch, S., 2007. International collaboration on marine bioinvasions – The ICES response. *Marine Pollution Bulletin* 55, 353–359.
- Gomez, F., 2003. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*: an invader in the Mediterranean Sea. *Acta Botanica Croatia* 62, 65–72.
- Gomez, F., Claustre, H., 2003. The genus *Asterodinium* (Dinophyceae) as possible biological indicator of warming in the western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* 83, 173–174.
- Granéli, E., Turner, J.T., 2006. *The ecology of harmful algae*. Springer, New York, NY, 431 pp.
- Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaratunga, R., 2008. Climate change and benthic Dinoflagellates the *Ostreopsis ovata* case. In: *Proceedings of the 13th International Conference on Harmful Algae*, Hong Kong, 3–7 November, 2008.
- Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaratunga, P.R.T., Scenati, R., 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae* 10, 165–172.
- Grattan, L.M., Holobaugh, S., Morris, J.G., 2016. Harmful Algal Blooms and Public Health. *Harmful algae* 57, 2–8.
- Gross, E., 1999. Allelopathy in benthic and littoral areas : case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submersed macrophytes. In: *INDERJIT*, ed. and others. *Principles and Practices in Plant Ecology*. Boca Raton, Fla. CRC Press, 179–199.
- Grzebyk, D., Berland, B., 1996. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research*, 18, 1837–1849.
- Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin, B.A., Bosi, C., Arnoux, A., 1994. Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of Mayotte Island (S.W. Indian Ocean). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 178, 51-66.
- Grzebyk, D., Denardou, A., Berland, B., Pouchus, Y.F., 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Journal of Plankton Research* 19, 1111-1124.
- Grzebyk, D., Sechet, V., 2003. Toxinogénèse et physiologie cellulaire. In: Frémy, J.M., Lassus, P. (Eds.), *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer, Brest, 191-228.

- Guerrini, F., Pezolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55, 211–220.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 05 April 2018.
- Gómez F., 2012. A checklist and classification of living dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *CICIMAR Océanides.*, 27, 67–143.
- Gómez, F., Qiu, D., Lopes, R.M., Lin, S., 2017. Morphological and molecular characterization of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae) from Brazil (South Atlantic Ocean). *Rev. Biol. Trop.* 65, 11.
- Guan, C., Guo, X., Cai, G., Zhang, H., Li, Y., Zheng, W., Zheng, T., 2014. Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus* sp. LP-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species. *Biol Control* 76, 79–86.
- Hachani, M.A., Dhib, A., Fathalli, A., Ziadi, B., Turki, S., Aleya, L., 2018. Harmful epiphytic dinoflagellate assemblages on macrophytes in the Gulf of Tunis. *Harmful Algae* 77, 29–42.
- Hachani, M.A., Ziadi, B., Langar, H., Djallouli, S.A., Turki, S., Aleya, L., 2016. The mapping of the *Posidonia oceanica* (L.) Delile barrier reef meadow in the southeastern Gulf of Tunis (Tunisia). *Journal of African Earth Sciences* 121, 358–364.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.
- Hallegraeff, G.M., 1998. Transport of toxic dinoflagellates via ships ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Marine Ecology Progress Series* 168, 297–309.
- Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology*. UNESCO Publishing, Paris, 25–49.
- Hallegraeff, G.M., 2010. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge *Journal of Phycology* 46, 220–235.
- Hallegraeff, G.M., 2014. Harmful Algae and their Toxins: Progress, Paradoxes and Paradigm Shifts, in: Rossini, G., (Ed.), *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae Volume 1*, 3–20.
- Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., 1995. *Manual on Harmful Microalgae*, in: *IOC Manuals and Guides*, UNESCO, 551 pp.

- Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., Enevoldsen, H.O., 2004. Manual on Harmful Marine Microalgae 2nd revised edition. UNESCO, Paris, 793 pp.
- Hallegraeff, G.M., Bolch, C.J., 1992. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *Journal of Plankton Research* 14, 1067–1084.
- Hallegraeff, G.M., Valentine, J.P., Marshall, J.A., Bolch, C.J., 1997. Temperature tolerances of toxic dinoflagellate cysts: application to the treatment of ships ballast water. *Aquatic Ecology* 31, 47–52.
- Hamilton, G., McVinish, R., Mengersen, K., 2009. Bayesian model averaging for harmful algal bloom prediction. *Ecol. Appl.* 19, 1805–1814.
- Hamza, A., 2003. Le statut du phytoplancton dans le golfe de Gabès. Thèse de Doctorat en sciences biologique. Faculté des Sciences de Sfax, 297 pp.
- Hannachi, I., 2010. Organisation, biodiversité et structure des peuplements phytoplanctoniques et ciliaires des zones côtières et océaniques de la Tunisie (Golfe de Gabès, golfe d'Hammamet, golfe de Tunis et canal de Sicile). Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques (Tunisie) et en Sciences de la Vie et de l'Environnement (France). Faculté des Sciences de Sfax et Université de Franche-Comté, 227 pp.
- HARRNESS, 2005. Harmful Algal Research and Response: A National Environmental Science Strategy 2005–2015., in: Ramsdell, J.S., Anderson, D.M., Glibert, P.M. (Eds.). Ecological Society of America, Washington, DC.
- Hasle, G.R., Syversten, E.E., 1997. Marine diatoms, in: Tomas, C.R. (Ed.) Identifying marine phytoplankton. Academic, St. Petersburg, 5–385.
- Heil, C.A., Bird, P., Dennison, W.C., 1998. Macroalgal habitat presence of ciguatera dinoflagellates at Heron Island, a coral cay in the southeastern Great Barrier Reef, Australia. In: Reguera, B., et al. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 52–53.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8, 3–13.
- Hold, G.L., Smith, E.A., Harry Birkbeck, T., Gallacher, S., 2001. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 36, 223–234.
- Holmes, M.J., Gillespie, N.C., Lewis, R.J., 1988. Toxicity and morphology of *Ostreopsis* cf. *siamensis* cultured from a ciguatera endemic region of Queensland, Australia. *Proceedings of 6th International of Coral Reef Symposium* 3, 49-54.

- Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. New Insights on Cytological and Metabolic Features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A Multidisciplinary Approach. PLoS ONE 8, e57291.
- Honsell, G., De Bortoli, M., Boscolo, S., Dell'Aversano, C., Battocchi, C., Fontanive, G., Penna, A., Berti, F., Sosa, S., Yasumoto, T., Ciminiello, P., Poli, M., Tubaro, A., 2011. Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. Environmental Science and Technology 46, 7051–7059.
- Horner, R.A., Garrison, D.L., Plumley, F.G., 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. west coast. Limnology and Oceanography 42, 1076-1088.
- Hoppenrath, M., Leander, B.S., 2008. Molecular Phylogeny of *Parvilucifera prorocentri* (Alveolata, Myzozoa): Insights into Perkinsid Character Evolution. Journal of Eukaryotic Microbiology 56, 251–256.
- Hoppenrath, M., Murray, S.A., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates -unveiling their worldwide biodiversity. Schweizerbart Science, Stuttgart, 276 pp.
- Howard, M.D.A., Cochlan, W.P., Ladizinsky, N., Kudela, R.M., 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. Harmful Algae 6, 206–217.
- Huang, C., Qi, Y., 1997. The abundance cycle and influence factors on red tide phenomena of *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae) in Dapeng Bay, the South China Sea. Journal of Plankton Research 19, 303-318.
- Huntley, M., Sykes, P., Rohan, S., Marin, V., 1986. Chemically-mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. Marine Ecology Progress Series 28, 105-120.
- Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., 2010. A Review on Toxic and Harmful Algae in Greek Coastal Waters (E. Mediterranean Sea). Toxins 2, 1019–1037.
- Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., Metaxatos A., 2007. Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) present in Greek coastal waters, Harmful Algae 6, 153-165.
- Illoul, H., Hernández, F.R., Vila, M., Adjias, N., Younes, A.A., Bournissa, M., Koroghli, A., Marouf, N., Rabia, S., Ameer, F.L.K., 2012. The genus *Ostreopsis* along the Algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode. Cryptogam. Algol. 33, 209–216.
- Ingarao, C., Pagliani, T., 2009. *Ostreopsis* cf. *ovata* on Abruzzo coast, W Adriatic. Harmful Algae News 39, 4-5.

- Ianora, A., Bentley, M.G., Caldwell, G.S., Casotti, R., Cembella, A.D., Engström-Öst, J., Halsband, C., Sonnenschein, E., Legrand, C., Llewellyn, C.A., 2011. The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: An emerging field. *Mar. Drugs* 9, 1625–1648.
- INM, 2018. Données météorologiques (2013-2016) de l'Institut National de la Météorologie.
- INS (Institut national de la statistique), 2017. Tunisie en chiffres / Statistiques Tunisie. 53 pp.
- Ismael, A., Halim, Y., 2006. First record of *Ostreopsis* spp. In Egyptian waters with a description of *O. mediterraneus* sp. twelfth international conference on harmful algae Copenhagen, Denmark, 197 pp.
- Ismael A., Halim Y., 2011. Potentially harmful *Ostreopsis* spp. in the coastal waters of Alexandria - Egypt. *Medit. Mar. Sci.* 13, 208–212.
- Jakobsen, R., Hansen, P.J., Daugbjerg, N., Andersen, N.G., 2012. The fish-killing dictyochophyte *Pseudochattonella farcimen*: Adaptations leading to bloom formation during early spring in Scandinavian waters. *Harmful Algae* 18, 84–95.
- Jacquet, S., Heldal, M., Iglesias-Rodriguez, D., Larsen, A., Wilson, W., Bratbak, G., 2002. Flow cytometric analysis of an *Emiliania huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquatic Microbial Ecology* 27, 111–124.
- Jauzein, C., Açaf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., abboud-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: Application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecological Indicators* 91, 116–127.
- Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis* cf. *ovata* using artificial substrates: Optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. *Marine Pollution Bulletin* 107, 300–304.
- Jin., Q., Dong, S., 2003. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense*. *J Exp Mar Bio Ecol.* 293, 41–55.
- Kang, N.S., Jeong, H.J., Lee, S.Y., Lim, A.S., Lee, M.J., Kim, H.S., Yih, W., 2013. Morphology and molecular characterization of the epiphytic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the temperate waters off Jeju Island, Korea. *Harmful Algae* 27, 98–112.
- Kacem, I., 2009. Effet du taux de la salinité d'eau sur l'efflorescence du dinoflagellé marin *Alexandrium catenella* dans la Lagune de Bizerte, Tunisie. Colloque international Toxicologie Environnementale et Agroalimentaire dans l'espace francophone.
- Keating, K. I. 1977. Allelopathic influence of blue-green bloom sequences in a eutrophic lake. *Science* 196, 885–887.

- Kibler, S., Holland, W., Vandersea, M., Faust, M., Litaker, R., Tester, P., Ho, K., Zhou, M., Qi, Y. 2008. A collection method for ciguatera-associated dinoflagellates. *Harmful Algae*, Ho, K.-C., MJ Zhou, and YZ Qi (eds.). Environmental Publication House, Hong Kong, 205–208.
- 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. *Aquatic Microbial Ecology* 29, 279-286.
- Kirkpatrick, B., Fleming, L.E., Squicciarini, D., Backer, L.C., Clark, R., Abraham, W.M., Benson, J., Cheng, Y.S., Johnson, D., Pierce, R., Zaias, J., Bossart, G.D., Baden, D.G., 2004. Literature Review of Florida Red Tide: Implications for Human Health Effects. *Harmful Algae* 3, 99-115.
- Kirkpatrick, B., Fleming, L.E., Backer, L.C., Bean, J.A., Tamer, R., Kirkpatrick, G., Kane, T., Wanner, A., Dalpra, D., Reich, A., Baden, D.G., 2006. Environmental exposures to Florida red tides: Effects on emergency room respiratory diagnoses admissions. *Harmful Algae* 5, 526-533.
- Kling, H.J., Watson, S.B., McCullough, G.K., Stainton, M.P., 2011. Bloom development and phytoplankton succession in Lake Winnipeg: a comparison of historical records with recent data. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 14, 219–224.
- Klinkenberg, G., Schumann, R., 1994. Micro-organism activity in aggregate layers in shallow eutrophic brackish water as influenced by wind induced mixing; an experimental approach. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28, 421–426.
- Kudela, R.M., Berdalet, E., Bernard, S., Burford, M., Fernand, L., Lu, S., Roy, S., Tester, P., Usup, G., Magnien, R., Anderson, D.M., Cembella, A., Chinain, M., Hallegraeff, G., Reguera, B., Zingone, A., Enevoldsen, H., Urban, E., 2015. Harmful algal blooms : A scientific summary for policy makers. IOC/INF-1320, IOC/UNESCO: Paris, France, 20 pp.
- Kudela, R.M., Lane, J.Q., Cochlan, W.P., 2008. The potential role of anthropogenically derived nitrogen in the growth of harmful algae in California, USA. *Harmful Algae* 8, 103–110.
- Laabir, M., Grignon-Dubois., M., Masseret, E., Rezzonico, B., Soteras, G., Rouquette, M., Rieuvilleneuve, F, Cecchi, P., 2013. Algicidal effects of *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. Extracts on the neuro-toxic bloom-forming dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquat Bot.* 111, 16–25.
- Lassus, P., Berthome, J.P., 1988. Status of 1987 algal blooms in IFREMER. ICES/annex, III C.M. 33, 5–13.
- Laza-Martinez, A., Orive, E. Miguel, I., 2011. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology* 46, 45-65.

- Leaw, C.P., Lim, P.T., Ahmad, A., Usup, G., 2001. Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Mar. Biotechnol.* 3, 246-25.
- Lee, J.H.W., Huang, Y., Dickman, M., Jayawardena, A.W., 2003. Neural network modeling of coastal algal blooms. *Ecol. Model.* 159, 179–201.
- Lee, R.E., 2007. *Phycology*, Fourth edition. Cambridge, 560 pp.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O., Graneli, E., 2003. Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42, 406-419.
- Lei, X., Li, D., Li, Y., Chen, Z., Chen, Y., Cai, G., Yang, X., Zheng, W., Zheng, T., 2015. Comprehensive insights into the response of *Alexandrium tamarense* to algicidal component secreted by a marine bacterium. *Front Microbiol* 6.
- Lemée, R., Blanfuné, A., Cohu, S., Gasparini, S., Guidi-Guilvard, L., Marro, S., Pedrotti, M.L., Simon, N., Mangialajo, L., Thibaut, T., Amzil, Z., Ganzin, N., Nezan, E., Chomerat, N., le Duff, F., D., K., De Forges de Parny, A., Hoareau, L., Soliveres, O., 2010. MEDIOS - Rapport final - Le développement des dinoflagellés toxiques du genre *Ostreopsis* sur le littoral de la Méditerranée Nord Occidentale : mise en évidence des zones à risque et première évaluation des impacts écologiques, sanitaires et socio-économiques. 58 pp.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., Bernard, C., Hennion, M.C., 2004. FIRST EVIDENCE OF PALYTOXIN ANALOGUES FROM AN *OSTREOPSIS MASCARENENSIS* (DINOPHYCEAE) BENTHIC BLOOM IN SOUTHWESTERN INDIAN OCEAN. *Journal of Phycology* 40, 1042–1051.
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Madden, V.J., Noga, E.J., Tester, P.A., 2002. Life cycle of the hetero-trophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 38, 442–63.
- Liu, J., Lewitus, A.J., Brown, P., Wilde, S.B., 2008. Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton. *Harmful Algae* 7, 1–10.
- Louppis, A.P., Badeka, A.V., Katikou, P., Paleologos, E.P., Kontominas, M.G., 2010. Determination of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and related esters in Greek mussels using HPLC with fluorometric detection, LC-MS/MS and mouse bioassay. *Toxicon* 55, 724–733.
- López-García, P., Moreira, D., 2008. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology* 159, 67–73.
- Lundgren, V.M., Roelke, D.L., Brooks, B.W., Granéli, E., Davis, S.L., Baty, T., Scott, W.C., 2015. *Prymnesium parvum* invasion success into coastal bays of the Gulf of Mexico: Galveston Bay case study. *Harmful Algae* 43, 31–45.
- Lovejoy, C., Bowman, J.P., Hallegraeff, G.M., 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl*

- Environ Microbiol 64, 2806–2813.
- Lu, X., Zhou, B., Xu, L., Liu, L., Wang, G., Liu, X., Tang, X., 2016. A marine algicidal *Thalassospira* and its active substance against the harmful algal bloom species *Karenia mikimotoi*. Appl Microbiol Biotechnol 100, 5131–5139.
- Mabrouk, L., Hamza, A., Bradai, M.-N., 2014. Variability in the Structure of Planktonic Microalgae Assemblages in Water Column Associated with *Posidonia oceanica* (L.) Bed in Tunisia. Journal of Marine Biology, 1–7.
- Mabrouk, L., Hamza, A., Brahim, M.B., Bradai, M.-N., 2011. Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia: Temporal and depth distribution of microepiphytes. Marine Ecology 32, 148–161.
- Mabrouk, L., Hamza, A., Mahfoudi, M., Bradai, M.N., 2012. Spatial and temporal variations of epiphytic *Ostreopsis siamensis* on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in Mahdia (Tunisia). Cahiers de biologie marine 53, 19–27.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemee, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. Marine Pollution Bulletin 56, 1209–1214.
- Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemee, R., 2017. Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms. Harmful Algae 64, 1–10.
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. Toxicon 57, 408–420.
- Martins, C.A., Alvito, P., Tavares, M.J., Doucette, G., Franca, S., Joa, M., Pereira, P., 2003. Reevaluation of production of paralytic shellfish toxin by bacteria associated with dinoflagellates of the Portuguese coast. Appl Environ Microbiol 69, 5693–5698.
- Meroni, L., Chiantore, M., Petrillo, M., Asnaghi, V., 2018. Habitat effects on *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom dynamics. Harmful Algae 80, 64–71.
- Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. Marine Pollution Bulletin 53, 620–630.
- Maso, M., Garcés, E., Pagès, F., Camp, J., 2003. Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species Scientia Marina 67, 107–111.
- Mattos Nascimento, S., Monteiro, P.O., Leite Ferreira, C.E., González-Rodríguez, E., 2008. *Ostreopsis ovata* blooms on Rio de Janeiro coast. Harmful Algae News 37, 1–4.

- Mayali, X., Azam, F., 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 139–144.
- MEDD, 2009. Etude de pré-investissement sur la dépollution du golfe de Tunis – Titre II : Caractérisation du golfe de Tunis. Groupement COMETE Engineering, 286 pp.
- Meinshausen, N., 2017. QuantregForest: Quantile Regression Forests. R Package Version 1.3-7. <http://CRAN.R-project.org/package=quantregForest>.
- Meinshausen, N., 2006. Quantile regression forests. *J. Mach. Learn. Res.* 7, 983–999.
- Meunier, F.A., Mercado, J.A., Molgó, J., Tosteson, T.R., Escalona de Motta, G., 1997. Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparations by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Brit. J. Pharmacol.* 121, 1224–1230.
- Mercado, J. A., Viera, M., Escalona de Motta, G., Tosteson, T. R., González, I., Silva, W., 1994. An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacologic action of *Ostreopsis lenticularis* extracts. *Toxicon* 32, 256.
- Migliaccio, O., Castellano, I., Di Cioccio, D., Tedeschi, G., Negri, A., Cirino, P., Romano, G., Zingone, A., Palumbo, A., 2016. Subtle reproductive impairment through nitric oxide-mediated mechanisms in sea urchins from an area affected by harmful algal blooms. *Scientific Reports* 6, 26086.
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., Santis, B.D., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G.J., Vespermann, A., 2009. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009–1021.
- Moestrup, Ø., Akselmann, R., Fraga, S., Hoppenrath, M., Iwataki, M., Komárek, J., Larsen, J., Lundholm, N., Zingone, A., (Eds) (2009 onwards). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <http://www.marinespecies.org/hab> on 2018-04-25.
- Moestrup, Ø., Hansen, G., Daugbjerg, N., Lundholm, N., Overton, J., Vestergard, M., Steinfeldt, S.J., Calado, A.J., Hansen, P.J., 2014. The dinoflagellates *Pfiesteria shumwayae* and *Luciella masanensis* cause fish kills in recirculation fish farms in Denmark. *Harmful Algae* 32, 33–39.
- Moita, M.T., Pazos, Y., Rocha, C. Nolasco, R., Oliveira, P.B., 2016. Toward predicting *Dinophysis* blooms off NW Iberia: a decade of events. *Harmful Algae* 53, 17–32.
- Moncer, M., Hamza, A., Feki-Sahnoun, W., Mabrouk, L., Bel Hassen, M., 2017. Variability patterns of epibenthic microalgae in eastern Tunisian coasts. *Scientia Marina* 81, 487.
- Monti, M., Cecchin, E., 2012. Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions. *Cryptogam. Algal.* 33, 113–119.

- Monti, M., Minocci, M., Beran, A., Ives, L., 2007. First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 54, 598–601.
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W., 1992. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 157, 79–90.
- Moore, R.E., Bartolini, G., 1981. Structure of palytoxin. *Journal of the American Chemical Society* 103, 2491–2494.
- Mulia, I.E., Tay, H., Roopsekhar, K., Tkalich, P., 2013. Hybrid ANN–GA model for predicting turbidity and chlorophyll a concentrations. *J. Hydro-environ. Res.* 7, 279–299.
- Munday, R., 2011. Palytoxin toxicology: animal studies. *Toxicon* 57, 470–477.
- Muttill, N., Chau, K.W., 2006. Neural network and genetic programming for modelling coastal algal blooms. *Int. J. Environ. Pollut.* 28, 223–238.
- Nagasaki, K., Ando, M., Itakura, S., Imai, I., Ishida, Y., 1994. Viral mortality in the final stage of *heterosigma akashiwo* (raphidophyceae) red tide. *Journal of Plankton Research* 16, 1695–1599.
- Nascimento, S.M., Purdie, D.A., Morris, S., 2005. Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. *Toxicon* 45, 633–649.
- Nascimento, S.M., Corrêa, E.V., Menezes, M., Varela, D., Paredes, J., Morris, S., 2012a. Growth and toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. *Harmful Algae* 13, 1–9.
- Nascimento, S.M., França, J.V., Gonçalves, J.E.A., Ferreira, C.E.L., 2012b. *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 64, 1074–1078.
- Nakajima, T., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1981. Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47, 1029–1033.
- Nicholls, K.H., Beaver, J.L., Estabrook, R.H., 1982. Lake-wide odors in Ontario and New Hampshire caused by *Chrysochromulina breviturrita* Nich. (Prymnesiophyceae). *Hydrobiologia* 96, 91–95.
- Ning, X., Lin, C., Hao, Q., Liu, C., Le, F., Shi, J., 2009. Long term changes in the ecosystem in the northern South China Sea during 1976–2004. *Biogeosciences* 6, 2227–2243.
- NOAA, 2004. Interim Report on the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Unusual Mortality Event Along the Panhandle of Florida March–April 2004, 36 pp.
- Noe-Nygaard, N., Surlyk, F., Piasecki, S., 1987. Bivalve mass mortality caused by toxic dinoflagellate blooms in a Berriasian–Valanginian lagoon, Bornholm, Denmark

- Palaios 2, 263–273.
- Noges, P., Mischke, U., Laugaste, R., Solimini, A., 2010. Analysis of changes over 44 years in the phytoplankton of Lake Vrtsjarv (Estonia): the effect of nutrients, climate and the investigator on phytoplankton-based water quality indices. *Hydrobiologia* 646, 33–48.
- Norén, F., Moestrup, Ø., Rehnstam-Holm, AS., 1999. *Parvilucifera infectans* Norén et Moestrup gen.et.sp .nov.(Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *Eur J Protistol* 35, 233–254.
- Norris, D. R., Bomber, J. W., Balech, E., 1985. Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G., [Eds.] *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, Amsterdam, 39–44.
- Occhipinti-Ambrogi, A., 2007. Global change and marine communities: Alien species and climate change. *Marine Pollution Bulletin* 55, 342–352.
- Occhipinti-Ambrogi, A., Savini, D., 2003. Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* 46, 542–551.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimoaloto, M., Naoki, H., Yasumoto, T., 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 37, 55–56.
- Okolodkov, Y., Campos-Bautista, G., Gárate-Lizárraga, I., González-González, J., Hoppenrath, M., Arenas, V., 2007. Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology* 47, 223–237.
- 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. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Olenina, I., Wasmund, N., Hajdu, S., Jurgensone, I., Gromisz, S., Kownacka, J., Toming, K., Vaiciute, D., Olenin, S., 2010. Assessing impacts of invasive phytoplankton: The Baltic Sea case. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1691–1700.
- Orth, R.J., Van Montfrans, J., 1984. Epiphyte-seagrass relationships with an emphasis on the role of micrograzing: A review. *Aquatic Botany* 18, 43–69.
- Ottaviani, E., Asnaghi, V., Chiantore, M., Pedroncini, A., Bertolotto, R., 2015. Statistical methods for the analysis of *Ostreopsis ovata* bloom events from meteo-marine data. Proceedings of CLADAG 2015 10th Scientific Meeting of the Classification and Data Analysis Group of the Italian Statistical Society, Cagliari (Italy), 8–10.
- Paerl, H.W., Paul, V., 2011. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46, 1349–1363.
- Park, M.G., Kim, M., Kim, S., 2014. The Acquisition of Plastids/Phototrophy in Heterotrophic Dinoflagellates. *Acta Protozoologica* 53, 39–50.

- Park, M.G., Kim, S., Kim, H., Myung, G., Kang, Y., Yih, W., 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Microbial Ecology* 45, 101–106.
- Park, Y., Cho, K.H., Park, J., Cha, S.M., Kim, J.H., 2015. Development of early-warning protocol for predicting chlorophylla concentration using machine learning models in freshwater and estuarine reservoirs, Korea. *Sci. Total Environ.* 502, 31–41.
- Parrow, M., Burkholder, J.M., Deamer, N.J., Zhang, C., 2002. Vegetative and sexual reproduction in *Pfiesteria* spp. (Dinophyceae) cultured with algal prey, and inferences for their classification. *Harmful Algae* 1, 5–33.
- Parsons, M.L., Aligizaki, K., Dechraoui Bottein, M.Y., Santiago, F., Morton, S.L., Penna, A., Rhodes, L., 2012. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology and toxicology. *Harmful Algae* 14, 107–129.
- Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai‘i. *Harmful Algae* 6, 658–669.
- Pavela-Vrancic, M., Mestrovic, V., Marasovic, I., Gillman, M., Furey, A., James, K.J., 2002. DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40, 1601–1607.
- Pearce, I., Marshall, J.A., Hallegraeff, G.M., 2001. Toxic epiphytic dinoflagellates from east coast Tasmania, Australia. *Harmful Algal Blooms*, 54–57.
- Peirano, A., Cocito, S., Banfi, V., Cupido, R., Damasso, V., Farina, G., Lombardi, C., Mauro, R., Morri, C., Roncarolo, I., Saldaña, S., Savini, D., Sgorbini, S., Silvestri, C., Stoppelli, N., Torricelli, L., Bianchi, C.N., 2011. Phenology of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: Medium and long-term cycles and climate inferences. *Aquatic Botany* 94, 77–92.
- Penna, A., Battocchi, C., Capellacci, S., Fraga, S., Aligizaki, K., Lemée, R., Vernesi, C., 2014. Mitochondrial, but not rDNA, genes fail to discriminate dinoflagellate species in the genus *Ostreopsis*. *Harmful Algae* 40, 40–50.
- Penna, A., Bertozzini, E., Battocchi, C., Galluzzi, L., Giacobbe, M.G., Vila, M., Garces, E., Lugliè, A., Magnani, M., 2007. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods. *Journal of Plankton Research* 29, 19–38.
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobó, P., Vernesi, C., 2005. CHARACTERIZATION OF *OSTREOPSIS* AND *COOLIA* (DINOPHYCEAE) ISOLATES IN THE WESTERN MEDITERRANEAN SEA BASED ON MORPHOLOGY, TOXICITY AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 5.8S rDNA SEQUENCES. *Journal of Phycology* 41, 212–225.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riobo, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Journal of Biogeography* 37, 380–841.

- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Perini, F., Cappellacci, S., Casabianca, A., Riobó, P., Giacobbe, M. G., Totti, C., Accoroni, S., Vila, M., Reñé, A., Scardi, M., Aligizaki, K., Nguyen-Ngco, L., Vernesi, C., 2012. Genetic diversity of the genus *Ostreopsis* Schmidt: phylogeographical considerations and molecular methodology applications for field detection in the Mediterranean Sea. *Cryptogam. Algal.* 33, 153–63.
- Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Accoroni, S., Totti, C., Penna, A., 2011. New Approach Using the Real-Time PCR Method for Estimation of the Toxic Marine Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in Marine Environment. *PLoS ONE* 6, e17699.
- Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2012. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water research* 46, 82–92.
- Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Fratangeli, F., Dell’Aversano, C., Dello Iacovo, E., Tartaglione, L., 2014. Growth dynamics in relation to the production of the main cellular components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 36, 1–10.
- Pfiester, L.A., Anderson, D.M., 1987. Dinoflagellate reproduction, in: Taylor, F.J.R. (Ed.), *The biology of dinoflagellates*. Botanical Monographs, 611–648.
- Pin, L.C., Teen, L.P., Ahmad, A., Usup, G., 2001. Genetic Diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Marine Biotechnology* 3, 246–255.
- Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell’Aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon* 57, 421–428.
- Prassopoulou, E., Katikou, P., Georgantelis, D., Kyritsakis, A., 2009. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon* 53, 214–227.
- Quéguiner, B., 2013. *Structure et Fonctionnement des Ecosystèmes Pélagiques Marins*. Centre d’Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université ; CNRS ; LOBUMR 6535, Laboratoire d’Océanographie et de Biogéochimie, OSU/Centre d’Océanologie de Marseille, 93 pp.
- R Development Core Team, 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing. R Development Core Team, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.
- R Core Team, 2015. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Raine, R., McDermott, G., Silke, J., Lyons, K., Nolan, G., Cusack, C., 2010. A simple short range model for the prediction of harmful algal events in the bays of southwestern Ireland. *J. Mar. Syst.* 83, 150–157.

- Ramdani, M., Elkhiaati, N., Flower, R.J., Thompson, J.R., Kraiem, M.M., Ayache, F., Ahmed, M.H., 2004. Environmental influences on the qualitative and quantitative composition of phytoplankton and zooplankton in North African coastal lagoons. *Hydrobiologia* 622, 113–131.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J., Blanco, J., 2014. *Dinophysis* Toxins: Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish. *Mar. Drugs* 12, 394–461.
- Rhodes, L.L., 2011. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 57, 400–407.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34, 371–383.
- Rhodes, L.L., Smith, K.F., Munday, R., Selwood, A.I., McNabb, P.S., Holland, P.T., Bottein, M.Y., 2010. Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands. *Toxicon* 56, 751–758.
- Rhodes, L., Towers, N., Briggs, L., Munday, R., Adamson, J., 2002. Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *N.Z.J. Mar. Freshw. Res.* 36, 631–636.
- Ricciardi, A., 2007. Are Modern Biological Invasions an Unprecedented Form of Global Change? *Conservation Biology* 21, 329–336.
- Richlen, M. L., Lobel, P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 421, 51–66.
- Robson, B.J., Hamilton, D.P., 2004. Three-dimensional modelling of a *Microcystis* bloom event in the Swan River estuary, Western Australia. *Ecol. Modell.* 174, 203–222.
- Rolland, J.L., Medhioub, W., Vergnes, A., Abi-khalil, C., Savar, V., Abadie, E., Masseret, E., Amzil, Z., Laabir, M., 2014. A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella*. *Marine Drugs* 12, 5035.
- Rolton, A., Vignier, J., Soudant, P., Shumway, S.E., Bricelj, V.M., Volety, A.K., 2014. Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on early development of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Aquatic Toxicology* 155, 199–206
- Romdhane, M.S., Eilertsen, H.C., Daly Yahia, O., Daly Yahia, M.N., 1998. Toxic Dinoflagellate blooms in Tunisia lagoons: causes, and consequences for aquaculture. *Harmful Algae*, 80–83.
- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V., 2010. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization

- time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 56, 1381–1387.
- Sahraoui, I., Hlaili, A.S., Mabrouk, H.H., Léger, C., Bates, S.S., 2009. BLOOMS OF THE DIATOM GENUS *PSEUDO-NITZSCHIA* H. PERAGALLO IN BIZERTE LAGOON (TUNISIA, SW MEDITERRANEAN). *Diatom Research* 24, 175–190.
- Sahraoui, I., Bouchouicha, D., Mabrouk, H.H., Hlaili, A.S., 2013. Driving factors of the potentially toxic and harmful species of *Prorocentrum* Ehrenberg in a semi-enclosed Mediterranean lagoon (Tunisia, SW Mediterranean). *Mediterranean Marine Science* 14, 353–362.
- Sakka Hlaili, A., Chikhaoui, M.A., El Grami, B., Hadj Mabrouk, H., 2006. Effects of N and P supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333, 79–96.
- Sakata, T., 2000. Control of harmful microalgae by microorganisms. In: Ishida, Y., Honjo, T. et al. (Eds.), *Mechanisms, prediction and mitigation of harmful algal blooms in Japan*. The Japan Fisheries Resource Conservation Association, Tokyo, 215–235.
- Sasikumar, N., Venugopalan, V.P., Azariah, J., Nair, K.V.K., 1989. After effects of a dinoflagellate bloom on the hard bottom community in Kalpakkam coastal waters. *Mahasagar Dona Paula* 22, 159–164.
- Sanseverino, I., Conduto, D., Pozzoli, L., Dobricic, S., Lettieri, T., 2016. *Algal bloom and its economic impact*. European Commission, Joint Research Centre, Publications Office, Luxembourg, 48 pp.
- Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P., Rustighi, C., 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Ambientale* 17, 17–23.
- Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Sakanari, H., Tawong, W., Hariganeya, N., Smith, K., Rhodes, L., Yasumoto, T., Taira, Y., Suda, S., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2011. Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific Coast, with Special Reference to a Novel Clade from Japan. *PLoS ONE* 6, e27983.
- Sbrana, F., Landini, E., Gjerci, N., Viti, F., Ottaviani, E., Vassalli, M., 2017. OvMeter: an automated 3D-integrated opto-electronic system for *Ostreopsis cf. ovata* bloom monitoring. *Journal of Applied Phycology* 29, 1363–1375.
- Scalco, E., Brunet, C., Marino, F., Rossi, R., Soprano, V., Zingone, A., Montresor, M., 2012. Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. *Harmful Algae* 17, 25–34.
- Scatasta, S., Stolte, W., Granéli, E., Weikard, H.P., Van Ierland, E., 2004. *Harmful algal blooms in European marine waters: socio-economic analysis of selected case studies*. Kalmar University, Sweden, 189 pp.
- Schmidt, J., 1901. Flora of Koh Chang. Contributions to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. *Peridinales. Botanische Tidsskrift* 24, 212–221.

- Scholin, C., Doucette G., Jensen S., Roman B, Pargett D., Marin III R., Preston C., Jones W., Feldman J., Everlove C., Harris A., Alvarado N., Massion E., Birch J., Greenfield D., Vrijenhoek R., Mikulski C., Jones K., 2009. Remote detection of marine microbes, small invertebrates, harmful algae, and biotoxins using the Environmental Sample Processor (ESP). *Oceanography* 22, 158–167.
- Scoging, A.C., 1998. Marine biotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 84, 41–50.
- Seguin, G., Braconnot, J.C., Elkaim, B., 1997. *Le plancton*. Presses universitaires de France, 125 pp.
- Sekerci, Y., Petrovskii, S., 2015. Mathematical Modelling of Plankton–Oxygen Dynamics Under the Climate Change. *Bulletin of Mathematical Biology* 77, 2325–2353.
- Selina, M.S., Levchenko, E.V., 2011. Species composition and morphology of dinoflagellates (Dinophyta) of epiphytic assemblages of Peter the Great Bay in the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology* 37, 23–32.
- Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Yu., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species, *Harmful Algae* 32, 1–10.
- Selina, M.S., Orlova, T.Y., 2010. First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan. *Botanica Marina* 53, 243–249.
- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J., 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 383–406.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 8, 916–925.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2010. Toxic cascades: multiple anthropogenic stressors have complex and unanticipated interactive effects on temperate reefs. *Ecology Letters* 13, 1149–1159.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., 2007. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 352, 187–197.
- Shumway, S.E., Allen, S.M., Dee Boersma, P., 2003. Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae* 2, 1–17.
- Siegel, D.A., Buesseler, K.O., Doney, S.C., Sailley, S.F., Behrenfeld, M.J., and Boyd, P.W. 2014. Global assessment of ocean carbon export by combining satellite observations and food-web models, *Global Biogeochemistry Cycles* 28, 181–196.
- Sierra Beltran, A., Palafox-Uribe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic Diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35, 447–453.

- Silva, N.J., Tang, K.W., Lopes, R.M., 2013. Effects of microalgal exudates and intact cells on subtropical marine zooplankton. *Journal of Plankton Research* 35, 855–865.
- Simoni, F., Gaddi, A., Paolo, C.D., Lepri, L., 2003. Harmful epiphytic dinoflagellate on Tyrrhenian Sea reefs. *Harmful Algae News* 24, 13–14.
- Simoni, F., Di Paolo, C., Gori, L., Lepri, L., Mancino, A., Falaschi, A., 2004. Further investigation on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima* on the macroalgae of artificial and natural reefs in the Northern Tyrrhenian Sea. *Harmful Algae News* 26, 6–7.
- Skinner, M.P., Brewer, T.D., Johnstone, R., Fleming, L.E., Lewis, R.J., 2011. Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific Islands (1998 to 2008). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1416.
- Smayda, T.J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic. In: Graneli, E., Gundersen, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, 29–40.
- Smayda, T.J., 1997a. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography* 42, 1137–1153.
- Smayda, T.J., 1997b. What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography* 42, 1132–1136.
- Smayda, T.J., 2002. Adaptive Ecology, Growth Strategies and the Global Bloom Expansion of Dinoflagellates. *Journal of Oceanography* 58, 281–294.
- Smayda, T.J., Reynolds, C.S., 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *Journal of Sea Research* 49, 95–106.
- Smida, D., Sahraoui, I., Mabrouk, H.H., Sakka Hlaili, A., 2012. Dynamique saisonnière du genre *Alexandrium* (dinoflagellé potentiellement toxique) dans la lagune de Bizerte (Nord de la Tunisie) et contrôle par les facteurs abiotiques environnants. *Comptes Rendus Biologies* 335, 406–416.
- Sournia, A., 1986. Atlas du phytoplancton marin. Cyanophycées, Dictyochophycées, Raphidophycées. Edition du CNRS. 219 pp.
- Sournia, A., 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In : Lassus, P., Arzul, G., Erard, P., Gontier, C., Marcaillou-Le-Baut (eds), *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier Publishing, Paris, 103–102.
- Søndergaard, M., Jeppesen, E., Lauridsen, T.L., Skov, C., Van Nes, E.H., Roijackers, R., Lammens, E., Portielje, R., 2007. Lake restoration: successes, failures and long-term effects. *J. Appl. Ecol.* 44, 1095–1105.
- Sotka, E.E., McCarty, A., Monroe, E. A., Oakman, N., Van Dolah, F.M., 2009. Benthic Herbivores are not deterred by Brevetoxins Produced by the Red Tide Dinoflagellate *Karenia Brevis*. *Journal of Chemistry and Ecology* 35, 851–859.

- Spatharis, S., Dolapsakis, N.P., Economou-Amilli, A., Tsirtsis, G., Danielidis, D.B., 2009. Dynamics of potentially harmful microalgae in a confined Mediterranean Gulf—Assessing the risk of bloom formation. *Harmful Algae* 8, 736–743.
- Steidinger, K.A., Tangen, K., 1997. Dinoflagellates. In: Tomas C.R., (Eds.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, New York, 387–584.
- Stoecker, D., Tillmann, U., Granéli, E., 2006. Phagotrophy in Harmful Algae *Ecological Studies* 189, 177–187.
- Stock, C.A., John, J.G., Rykaczewski, R.R., Asch, R.G., Cheung, W.W., Dunne, J.P., Friedland, K.D., Lam, V.W., Sarmiento, J.L., Watson, R.A., 2017. Reconciling fisheries catch and ocean productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 1441–1449.
- Stoner, A., 1979. Species-specific predation on amphipod crustacea by the pinfish *Lagodon rhomboides*: mediation by macrophyte standing crop. *Marine Biology* 55, 201–207.
- Streftaris, N., Zenetos, A., 2006. Alien Marine Species in the Mediterranean - the 100 ‘Worst Invasives’ and their Impact. *Mediterranean Marine Science* 7, 87 pp.
- Su, J.F., Shao, S.C., Huang, T.L., Ma, F., Jin, L.S., Zhang, K., 2016. Algicidal effects and denitrification activities of *Acinetobacter* sp. J25 against *Microcystis aeruginosa*. *J Environ Chem Eng* 4, 1002–1007.
- Su, J.Q., Yang, X.R., Zheng, T.L., Tian, Y., Jiao, N.Z., Cai, L.Z., Hong, H.S., 2007. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 6, 799–810.
- Sullivan, J.M., Swift, E., 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *Journal of Phycology* 39, 83–94.
- Sullivan, J.M., Swift, E., Donaghay, P.L., Rines, J.E.B., 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae* 2, 183–199.
- Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361.
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5, 801–812.
- Tahri-Joutei, L., Maghraoui, M., Boutaïb, R., 2003. Toxic Phytoplankton and Phycotoxins in the Mediterranean coast of Morocco from 1994 to 2000. In *Molluscan Shellfish Safety*, Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R., Eds., Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: Santiago de Compostela, Spain, 187–195.
- Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi, T., 2003. *Ostreopsis* sp. a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 42, 29–33.

- Tartaglione, L., Mazzeo, A., Dell'Aversano, C., Forino, M., Giussani, V., Capellacci, S., Penna, A., Asnaghi, V., Faimali, M., Chiantore, M., Yasumoto, T., Ciminiello, P., 2016. Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 915–932.
- Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2014. Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand. *Harmful Algae* 37, 160–171.
- Tawong, W., Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2015. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of benthic dinoflagellates *Ostreopsis* spp. from Thailand. *Harmful Algae* 44, 37–45.
- Taylor, F.J.R., 1979. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: D.L. Taylor and H.H. Seliger, Editors, *Toxic Dinoflagellate Blooms*, Elsevier/North-Holland, New York, 71–76.
- Taylor, F.J.R., 1989. Phylum dinoflagellata, Chap. 24, 419–437. In: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M and Chapman, DJ (eds) *Hand-book of the Protoctista*. Boston: Jones and Barlett, 914 pp.
- Taylor, F.J.R., 2006. Dinoflagellates, in: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Taylor, F.J.R., Hoppenrath, M., Saldarriaga, J.F., 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity Conservation* 17, 407–418.
- Taylor, F.J., Taylor, N.J., Walsby, J.R., 1985. A bloom of the planktonic diatom, *Ceratulina pelagica*, off the coast of the Northeastern New Zealand in 1983, and its contribution to an associated mortality of fish and benthic fauna. *Internat. Rev. ges Hydrobiol.* 70, 773–95.
- Teen, L.P., Gires, U., Pin, Leaw C.P., 2012. Harmful algal blooms in Malaysian waters. *Sains Malaysiana* 41, 1509–1515.
- Telesh, I.V., 2004. Plankton of the Baltic estuarine ecosystems with emphasis on Neva Estuary: a review of present knowledge and research perspectives. *Marine Pollution Bulletin* 49, 206–219.
- Telesh, I.V., Golubkov, S.M., Alimov, A.F., 2008. The Neva Estuary Ecosystem, in: Schiewer, U. (Ed.), *Ecology of Baltic Coastal Waters*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 259–284.
- Ter Braak, C.J.F., 1985. Correspondence analysis of incidence and abundance data: properties in terms of a unimodal response model. *Biometrics* 41, 859–873.
- Tester, P.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Usup, G., Vandersea, G., Leaw, C.P., Lim, P.T., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M.A., Litaker, R.W., 2014. Sampling harmful

- benthic dinoflagellates: Comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39, 8–25.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grossel, H., Lemée, R., Kantin, R., Lasalle, J.L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., de Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical Toxicology* 48, 839–844.
- Tiffany, W.J., Heyl, M.G., 1978. Invertebrate mass mortality induced by a *Gymnodinium breve* red tide in gulf of Mexico waters at sarasota, Florida. *Journal of Environmental Science and Health* 13, 653–662.
- Tillmann, U., John, U., 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellates: An allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Marine Ecology Progress Series* 230, 47–58.
- Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D.M., Cembella A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI Series G41. Springer-Verlag, Berlin, 293–313.
- Tognetto, L., Bellato, S., Moro, I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Botanica Marina* 38, 291–295.
- Tomas, C.R., Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., Steidinger, K.A., Tanger, K., Throndsen, J., Heimdal, B.R., 1996. In: Tomas, C. (Ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego, CA, 589 pp.
- Tosteson, T.R., 1995. "The diversity and origins of toxins in ciguatera fish poisoning". *P. R Health Sci. J.* 14, 29–117.
- Touahria, T., Seridji, R., 2011. Monitoring of the potentially toxic genera *Ostreopsis*, *Coolia* and *Prorocentrum* (Dinophyceae) in the Bou Ismail Bay (Algerian coast). *International Conference on Ostreopsis Development*. Villefranchesur-mer.
- Townsend, D.W., Pettigrew, N.R., Thomas, A.C., 2001. Offshore blooms of the red tide dinoflagellate, *Alexandrium* sp. in the Gulf of Maine. *Continental Shelf Research* 21, 347–369.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233–239.
- Trainer, V.L., Baden, D.G., 1999. High affinity binding of red tide neurotoxins to marine mammal brain. *Aquatic Toxicology* 46, 139–148.
- Triki, H.Z., Laabir, M., Lafabrie, C., Malouche, D., Bancon-Montigny, C., Gonzalez, C., Deidun, A., Pringault, O., Daly-Yahia, O.K., 2017. Do the levels of industrial

- pollutants influence the distribution and abundance of dinoflagellate cysts in the recently-deposited sediment of a Mediterranean coastal ecosystem? *Science of The Total Environment* 595, 380–392.
- 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. *Bulletin Institut National des Sciences et Technologies de la 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., Dhib, A., Fertouna-Bellakhal, M., Frossard, V., Balti, 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)? *Ecological Engineering* 67, 39–47.
- Turki, S., Harzallah, A., Sammari, C., 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the lake of Bizerte and the Gulf of Gabes. *Cahiers De Biologie Marine* 47, 253–259.
- Uchida, T., 1991. Sexual reproduction of *Scrippsiella trochoidea* isolated from Muroran Harbor Hokkaido. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1215.
- Uchida, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, Y., Honjo, T., 1995. The red-tide dinoflagellate *Heterocapsa* sp. kills *Gyrodinium instriatum* by cell contact. *Marine Ecology Progress Series* 118, 301–303.
- Uchida, H., Taira, Y., Yasumoto, T., 2013. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 27, 1999–2008.
- Uhlig, G., Sahling, G., 1990. Long-term studies on *Noctiluca scintillans* in the German Bight population dynamics and red tide phenomena 1968–1988. *Netherlands Journal of Sea Research* 25, 101–112.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y., Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65, 2585–2588.
- Ungaro, N., Marano, G., Pastorelli, A. M., Marzano, M. C., Pompei, M., 2005. Presenza di Ostreopsidiaceae nel basso Adriatico, *Rapporti ISTISAN 05/29*. Istituto Superiore di Sanità, Roma.

- Ungaro, N., Pastorelli, A.M., Di Festa, T., Galise, I., Romano, C., Assennato, G., Blonda, V., Perrino, V., 2010. Annual trend of the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in two sites along the Southern Adriatic coast. *Biologica Marina Mediterranea* 17, 183–184.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T., 1995. Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of the American Chemical Society* 117, 5389–5390.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9, 1–38.
- Vale, C., Ares, I.R., 2007. Biochemistry of palytoxins and ostreocins. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, 95–118.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence. *Environmental Health Perspectives* 108, 133–141.
- Van Lenning, K., Vila M, Masó M., Garcés, E., Anglés, S., Sampedro, N., Morales-Blake, A., Camp, J., 2007. Short-term variations in development of a recurrent toxic *Alexandrium minutum* dominated bloom induced by meteorological conditions. *Journal of Phycology* 43, 892–907.
- Vanucci, S., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Guerrini, F., 2012. Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 15, 78–90.
- Varkitzi, I., Pagou, K., Granéli, E., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C., Pavlidou, A., Montesanto, B., Economou-Amilli, A., 2010. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Harmful Algae* 9, 304–311.
- Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Asnaghi, V., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lemée, R., Hachani, M.A., Turki, S., Açaf, L., Saab, M.A.A., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecological Indicators* 85, 1092–1100.
- Velo-Suárez, L., Reguera, B., Garcés, E., Wyatt, T., 2009. Vertical distribution of division rates in coastal dinoflagellate *Dinophysis* spp. populations: implications for modeling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 385, 87–96.
- Verma, A., Hoppenrath, M., Dorantes-Aranda, J.J., Harwood, D.T., Murray, S.A., 2016. Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis* (Dinophyceae) and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon. *Harmful Algae* 60, 116–130.
- Vila, M., Abós-Herrándiz, R., Isern-Fontanet, J., Àlvarez, J., Berdalet, E., 2016. Establishing the link between *Ostreopsis cf. ovata* blooms and human health impacts using ecology

- and epidemiology. *Scientia Marina* 80, 107–115.
- Vila, M., Camp, J., Garcés, E., Maso, M., Delgado, M., 2001a. High Resolution Spatio-temporal Detection of Potentially Harmful Dinoflagellates in Confined Waters of the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 23, 497–514.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001b. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 26, 51–60.
- Vila, M., Maso, M., 2005. Phytoplankton functional groups and harmful algal species in anthropogenically impacted waters of the NW Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 69, 31–45.
- Vila, M., Masó, M., Sampedro, N., Illoul, H., Arin, L., Garcés, E., Giacobbe, M.G., Alvarez, J., Camp, J., 2008. The genus *Ostreopsis* in recreational waters of the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): is this the origin of human respiratory difficulties?, *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae*, 334–336.
- Von Stosch, H.A., 1973. Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *European Journal of Phycology* 8, 105–134.
- Wang, J., Tang, D., Sui, Y., 2010. Winter phytoplankton bloom induced by subsurface upwelling and mixed layer entrainment southwest of Luzon Strait. *J. Mar. Syst.* 83, 141–149.
- Wang, Z.H., Qi Y.Z., Yang Y.F., 2007. Cyst formation: an important mechanism for the termination of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) bloom. *Journal of Plankton Research*, 29, 209–218.
- Watson, S.B., Molot, L., 2013. Harmful algal blooms. In: Féraud, J.F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, 575–596.
- Watson, S.B., Brownlee, B., Satchwill, T., McCauley, E., 1999. The use of solid phase microextraction (SPME) to monitor for major organoleptic compounds produced by chrysophytes in surface waters. *Water Sci. Technol.* 40, 251–256.
- Watson, S.B., Whitton, B.A., Higgins, S.N., Paerl, H.W., Brooks, B.W., Wehr, J.D., 2014. Harmful algal blooms. In *Freshwater Algae of North America*, 2nd ed.; Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 873–920.
- Were, K., Bui, D.T., Dick, Ø.B., Singh, B.R., 2015. A comparative assessment of support vector regression, artificial neural networks, and random forests for predicting and mapping soil organic carbon stocks across an Afrotropical landscape. *Ecol. Indic.* 52, 394–403.
- Zenetos, A., Çinar, M.E., Pancucci-Papadopoulou, M.A., Harmelin, J.G., Furnari, G., Andaloro, F., Bellou, N., Streftaris, N., Zibrowius, H., 2005. Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species.

- Mediterranean Marine Science 6, 63–118.
- Zenetos, A., Pancucci-Papadopoulou, M.A., Zogaris, S., Papastergiadou, E., Vardakas, L., Aligizaki, K., Economou, A.N., 2009. Aquatic alien species in Greece (2009): tracking sources, patterns and effects on the ecosystem. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 12, 135–172.
- Zhang, H., Lu, S., Li, Y., Cen, J., Wang, H., Li, Q., Nie, X., 2018. Morphology and molecular phylogeny of *Ostreopsis* cf. *ovata* and *O. lenticularis* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea: *Ostreopsis* spp. from Hainan Island. *Phycological Research* 66, 3–14.
- Zhang, X., Tian, X., Ma, L., Feng, B., Liu, Q., Yuan, L., Fan, C., Huang, H., Yang, Q., 2015. Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J Biosci Med* 3, 23–28.
- Zingone, A., Enevoldsen, H.O., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean and Coastal Management* 43, 725–748.
- Zingone, A., Wyatt, T., 2005. Harmful algal blooms: keys to the understanding of the phytoplankton ecology. In: Robinson, A. R., Brink, K.H. (Eds.) *The Sea*. Harvard University Press, Harvard, 867–926.
- Zingone, A., Siano, R., D’Alelio, D., Sarno, D., 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5, 321–337.
- Zohary, T., Nishri, A., Sukenik, A., 2012. Present-absent: a chronicle of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* from Lake Kinneret. *Hydrobiologia* 698, 161–174.