



Propriétés écologiques des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum*: de l'écophysiologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème

Pauline Roux

► To cite this version:

Pauline Roux. Propriétés écologiques des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum*: de l'écophysiologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème. Sciences de la Terre. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU4026 . tel-03851976

HAL Id: tel-03851976

<https://theses.hal.science/tel-03851976>

Submitted on 14 Nov 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 598

Sciences de la Mer et du littoral

Spécialité : *Ecologie Marine*

Par

Pauline ROUX

Propriétés écologiques des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* : de l'écophysiologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème

Ecological properties of *Lepidodinium chlorophorum* blooms: from cellular ecophysiology to ecosystem impacts

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 23 Juin 2022

**Unité de recherche : Ifremer, Unité Littoral, Laboratoire Environnement Ressources Morbihan
Pays de la Loire**

Rapporteurs avant soutenance :

Urania CHRISTAKI Professeure des universités, Université du Littoral Côte d'Opale, LOG (France)

Francisco RODRIGUEZ-HERNANDEZ Senior scientist, Instituto Español de Oceanografía, IEO-CSIC (Espagne)

Composition du Jury :

Rapporteuse : **Urania CHRISTAKI** Professeure des universités, Université du Littoral Côte d'Opale, LOG (France)

Rapporteur : **Francisco RODRIGUEZ-HERNANDEZ** Senior scientist, Instituto Español de Oceanografía, IEO-CSIC (Espagne)

Président : **Laurent BARILLÉ** Professeur des universités, Nantes Université, MMS (France)

Examinatrice : **Yolanda DEL AMO** Maître de conférences des universités, Université de Bordeaux, EPOC (France)

Examineur : **Rodolphe LEMÉE** Professeur des universités, Sorbonne Université, LOV (France)

Dir. de thèse : **Raffaele SIANO** Cadre de recherche – HDR, Ifremer, DYNECO-Pelagos (France)

Co-dir. de thèse : **Mathilde SCHAPIRA** Cadre de recherche, Ifremer, LER-MPL (France)

Co-encadrant de thèse : **Elodie FLEURY** Cadre de recherche, Ifremer, PFOM-PI - LEMAR (France)

Cette thèse est dédiée à mes parents

Résumé

Les efflorescences de dinoflagellés toxiques ou nuisibles en milieu marin côtier sont des phénomènes fréquemment observés à l'échelle mondiale. La prolifération massive de certaines espèces peut notamment engendrer une coloration de l'eau de mer et impacter les activités économiques locales telles que le tourisme ou la production conchylicole. C'est le cas des efflorescences du dinoflagellé non-toxique *Lepidodinium chlorophorum* connu pour produire des Eaux Colorées Vertes (ECV) le long de la côte Atlantique Française et plus particulièrement en Bretagne sud. Des mortalités d'organismes marins ont été associées à ces événements sans toutefois pouvoir faire directement le lien de cause à effet. La production de Particules Exo-polymériques Transparentes (TEP), visqueuses et riches en carbone, pourrait représenter une propriété nuisible de ce dinoflagellé. Cette thèse fournit de premiers éléments de compréhension sur l'écologie de *L. chlorophorum* à travers une approche multidisciplinaire allant de la biologie cellulaire de l'espèce à l'impact sur l'écosystème. Plus précisément, quatre thématiques principales ont été abordées : (i) le rôle des interactions entre *L. chlorophorum* et son consortium bactérien dans la production de TEP, (ii) la dynamique d'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*, (iii) la dynamique spatio-temporelle et les propriétés biogéochimiques d'une ECV, (iv) l'effet potentiel de ce dinoflagellé sur la physiologie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les données ont été acquises à partir d'expérimentations en laboratoire en conditions contrôlées mais également au cours d'échantillonnages *in situ*.

La première question de la thèse a été abordée par des expérimentations en laboratoire. Trois souches de *L. chlorophorum* ont été cultivées en batch dans des conditions pseudo-axéniques et non-axéniques. Nos résultats suggèrent que l'interaction entre *L. chlorophorum* et ses bactéries associées pourrait avoir un effet négatif sur la croissance de *L. chlorophorum* et induire une surproduction TEP par ce dinoflagellé. Bien que d'importantes concentrations en carbone organique particulaire aient été mesurées, la viscosité du milieu n'a pas varié entre les conditions testées. Néanmoins, cette étude a clairement démontré que *L. chlorophorum* est le principal producteur de TEP.

Le second objectif de la thèse a été traité en analysant, par métabarcoding, l'ADN environnemental provenant d'échantillons de sédiment (janvier-février 2019) et d'eau de mer (septembre-mars 2019-2020 et 2020-2021). Pour la première fois, le genre *Lepidodinium* a été détecté en faibles abondances en hiver et l'augmentation de son abondance était positivement corrélée à des apports d'ammonium provenant de la re-suspension de sédiment. Bien que des traces d'ADN correspondant au genre *Lepidodinium* aient été détectées dans les sédiments (<1%), aucun kyste benthique de l'espèce n'a été observé par microscopie remettant en question leur existence sur le terrain. En période non-productive, des formes de résistance pélagiques temporaires de *L. chlorophorum* pourraient se maintenir dans la colonne d'eau en attendant des conditions environnementales favorables à leur germination.

En 2019, un suivi de terrain réalisé en microscopie optique a montré la présence de *L. chlorophorum* dans la colonne d'eau entre mai et novembre, avec un maximum d'abondance en été. Les apports d'eau douce et la stratification thermique ont été favorables à la prolifération de ce dinoflagellé et à l'apparition d'une ECV en baie de Vilaine en juillet. Des images satellitaires ont montré l'importance des courants de marée dans la distribution spatiale de cette ECV. Nos résultats suggèrent que la reminéralisation bactérienne des TEP, présents en grande quantité au sein de cette ECV, pourrait fournir des nutriments inorganiques régénérés permettant le maintien de cette efflorescence pendant plus d'un mois. Les TEP pourraient donc finalement être un avantage écologique pour *L. chlorophorum*, tout en causant des hypoxies néfastes pour l'écosystème.

Enfin, la réponse physiologique de l'huître *C. gigas* exposée à *L. chlorophorum* a été étudiée en conditions contrôlées. Les huîtres ont été exposées à différentes concentrations de *L. chlorophorum* pendant 48 h puis une phase de récupération de 24h a été étudiée à l'échelle individuelle en utilisant un banc écophysiologique. Ce dinoflagellé a été filtré puis ingéré par l'huître, induisant la présence de glycoconjugués acides au sein des tubules digestifs. Après l'exposition à *L. chlorophorum*, les données acquises suggèrent une filtration altérée à court terme probablement due à la présence de TEP. De plus, *L. chlorophorum* pourrait être mal assimilé par *C. gigas*, contrairement à d'autres micro-algues. Une ECV se maintenant plusieurs semaines dans l'environnement pourrait donc affecter l'huître creuse *C. gigas*.

Ces travaux fournissent un premier schéma conceptuel de l'écologie de *L. chlorophorum*. Ils constituent également une base de référence pour de prochaines études qui pourront être menées au sein d'autres écosystèmes impactés par les efflorescences de cette espèce.

Mots-clés: *Lepidodinium chlorophorum*. ; Dinoflagellés ; Efflorescences algales nuisibles ; Eaux colorées vertes ; Ecologie côtière ; Particules Exo-polymériques Transparentes ; Reminéralisation ; Hypoxie ; Ammonium ; ADN environnemental ; Viscosité ; Ecophysiologie ; *Crassostrea gigas*

Abstract

Harmful algal blooms linked to the development of dinoflagellates in the coastal environment are a common phenomenon worldwide. The massive proliferation of some species can cause a discoloration of the surface seawater affecting economic activities such as tourism or shellfish production. Blooms of the non-toxic dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* known to produce Green Seawater Discolorations (GSD) in Southern Brittany, have been associated with mass mortalities of shellfish. The production of Transparent Exopolymer Particles (TEP), viscous and carbon-rich, could represent a harmful property of this dinoflagellate. This PhD thesis provides first elements on the ecology of *L. chlorophorum* through a multidisciplinary approach ranging from cell biology to ecosystem impact. In particular, four main themes were addressed: (i) the interactions between *L. chlorophorum* and its bacterial consortium in the TEP production, (ii) the bloom initiation dynamics of *L. chlorophorum*, (iii) the spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of a GSD, and finally (iv) the potential effect of this dinoflagellate on the ecophysiology of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. The data were acquired both from experiments in a controlled environment in the laboratory and from samples collected in the field.

The first question of the thesis was addressed through laboratory approach. Three strains of *L. chlorophorum* were cultivated in batch under pseudo-axenic and non-axenic conditions. Our results suggest that the interaction between *L. chlorophorum* and its associated bacteria could have a negative effect on the growth of *L. chlorophorum* and induce an overproduction of TEP by this dinoflagellate. Although high concentrations of particulate organic carbon were measured, the viscosity did not vary under both conditions. Nevertheless, this study clearly demonstrated that *L. chlorophorum* is the main producer of TEP.

The second objective of the thesis was addressed by analysing environmental DNA from sediment (January-February 2019) and seawater (September-March 2019-2020 and 2020-2021) samples, by metabarcoding. For the first time, the genus *Lepidodinium* was detected in low abundances in winter and the increase in abundance was positively correlated with ammonium inputs from the resuspension of the sediment. Although rare DNA corresponding to the genus *Lepidodinium* were detected in the sediments (<1%), no benthic cysts of the species were observed by microscopy questioning the existence of resting cysts in the sediment. During non-productive periods, resistance pelagic stage of *L. chlorophorum* could thrive in the water column awaiting favourable environmental conditions to germinate.

In 2019, microscopy-based monitoring in the field has shown the presence of *L. chlorophorum* in the water column from May to November, with maximum abundance in summer. Freshwater inputs and thermal stratification of the water column were favourable to the proliferation of this dinoflagellate and to the establishment of a GSD in July the Vilaine Bay. Remote sensing highlighted the importance of tidal currents being a primary driver of surface distribution of the GSD. Moreover, our results suggest that bacteria, through the remineralisation of the large amount of TEP present within the GSD, could provide regenerated inorganic nutrients sustaining bloom development for more than one month. Therefore, TEP might correspond to an ecological advantage for *L. chlorophorum*, conversely causing negative effects on the environment and its biological resources through hypoxia.

Finally, the physiological response of the oyster *C. gigas* exposed to *L. chlorophorum* was studied under controlled conditions. Oysters were exposed to different concentrations of *L. chlorophorum* for 48h, followed by a 24h recovery phase studied in an ecophysiological measurement system. This dinoflagellate was filtered and ingested by the oyster, inducing the production of acid glycoconjugates by the digestive tubules. The results have suggested an impaired filtration shortly after the exposition to *L. chlorophorum*, probably due to the presence of TEP during the exposure phase. In addition, *C. gigas* could have a low assimilation efficiency for this dinoflagellate, unlike other micro-algae. These results suggest that a GSD that continues in the field during several weeks, as it was observed in 2019, could affect the cupped oyster *C. gigas*.

This work provides a first conceptual model of the ecology of *L. chlorophorum* in Southern Brittany. These first insights into the ecological properties of *L. chlorophorum* in southern Brittany and the potential impacts generated on bivalves constitute the baseline for further studies in other ecosystems impacted by blooms of this species.

Keywords: *Lepidodinium chlorophorum*. ; Dinoflagellates ; Harmful algal blooms ; Green seawater discolorations ; Coastal ecology ; Transparent exo-polymeric particles ; Remineralisation ; Hypoxia ; Ammonium ; Environmental DNA ; Viscosity ; Ecophysiology ; *Crassostrea gigas*

Remerciements

Cette thèse est issue d'une collaboration entre différentes équipes de recherche évoluant dans des disciplines variées. Cela n'a pas toujours été évident de jongler entre les différents avis et disciplines mais le résultat de ce partage scientifique et humain est le plus beau des enseignements. Je voudrais remercier l'ensemble des personnes impliquées de près ou de loin dans ce projet.

J'aimerais tout d'abord remercier les partenaires financiers de ce projet, l'Agence de l'Eau, La Région Pays de la Loire, la Direction Scientifique de l'Ifremer et le GdR Phycotox, mais aussi le SMIDAP, et plus particulièrement Philippe Glize, pour sa collaboration.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse, Urania Christaki, Yolanda Del Amo, Francisco Rodriguez-Hernandez, Laurent Barillé et Rodolphe Lemée. Je suis très honorée que vous ayez accepté d'évaluer ma thèse.

Je voudrais remercier chaleureusement les membres de mon comité de thèse, Hélène Hégaret, Pascal Claquin et Laurent Seuront pour leur bienveillance et leurs conseils avisés.

De tout cœur, je remercie mes encadrants de thèse Mathilde Schapira, Elodie Fleury et Raffaele Siano pour la confiance qu'ils m'ont accordé pour mener à bien ce projet.

Je souhaite tout particulièrement remercier mon directeur de thèse pour m'avoir encouragée tout au long de cette thèse. Raffaele, merci pour la passion que tu mets dans ton travail et que tu sais si bien transmettre, pour ta rigueur scientifique et pour ces longues discussions toutes plus enrichissantes les unes que les autres. Merci d'avoir su me pousser lorsque cela était nécessaire mais également de m'avoir rassurée dans les moments de doute. Cette thèse aura été une succession de rebondissements, parfois inattendus, mais aussi et surtout de jolies découvertes et de beaux moments humains.

Je voudrais également remercier Mathilde pour m'avoir supportée en direct tout au long de ma thèse. Merci d'avoir toujours été à l'écoute, de m'avoir soutenue et encouragée dans les bons moments mais aussi lors de certaines étapes qui me paraissaient parfois infranchissables. Merci pour tous les moments partagés, au labo mais aussi sur le terrain (même sous la neige !) et lors de nos déplacements. Merci d'avoir su partager sans compter toutes tes connaissances et d'avoir toujours trouvé une réponse à mes multiples questionnements existentiels !

Merci pour votre enthousiasme, votre énergie positive et votre amour de la science ! J'espère avoir la chance de retravailler avec vous un jour.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres du laboratoire LER-MPL pour leur accueil, pour leur grand investissement dans ce projet et pour avoir toujours fait en sorte que tout se passe au mieux. Merci pour toute l'énergie que vous avez pu mettre dans les nombreuses sorties de terrain et les multiples analyses de laboratoire. Je souhaite en particulier remercier Karine d'avoir été ma Boussole dès mon arrivée au laboratoire ! Merci à Anne pour avoir souvent refait le monde avec moi (et pour ce fameux pull de drague !). Merci aussi à Olivier pour avoir toujours eu la PATATE ! Merci à vous tous d'avoir fait de cette thèse une expérience scientifique et humaine extraordinaire.

Parmi les nombreuses personnes impliquées dans ce projet, je souhaiterais remercier Christine, Corinne, Agata, Laetitia et Sylvia (Ifremer, EM₃B) pour avoir partagé avec moi vos connaissances en biochimie au cours de la première partie de ma thèse.

Je remercie également Pierre, Victor et Maria-Laura (MMS, Université de Nantes) pour m'avoir permis de découvrir les applications liées aux images satellitaires.

Merci à Audrey, Aouregan, Gwenaël, Nicolas et Kenneth (Ifremer, LER-BO) pour leur implication de ce projet que ce soit pour la recherche de kystes ou pour la biologie moléculaire. En particulier, un grand merci à Aouregan et Gwenaël pour avoir tenté de développer cette fameuse qPCR. J'ai conscience de l'énergie et du temps que vous y avez consacré et je tiens à vous en remercier sincèrement.

Je remercie grandement Julien et Joëlle (Ifremer, Dyneco-Pelagos) pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé lors de mon séjour à Plouzané et pour m'avoir transmis vos connaissances en biologie moléculaire. Merci également à la plateforme d'analyse bio-informatique de Brest, en particulier à Cyril, pour les traitements bio-informatiques.

Je voudrais remercier les « huîtreologues » du laboratoire Ifremer, PFOM-PI et notamment de la station d'Argenton. Un grand merci à Elodie, Fabrice, Marianne, Kevin et Hélène qui m'ont permis de découvrir une nouvelle discipline. Je n'oublie pas Pascale et Isabelle qui ont largement contribué au bon déroulement des expérimentations. Merci ! Je souhaiterais également remercier les professionnels ostréicoles impliqués dans le projet. Je pense bien entendu à Jean-Luc Retailleau et Maxime dont le soutien a été précieux dans la mise en place du suivi des huîtres sur le terrain.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de participer à l'encadrement de plusieurs stagiaires que je tiens à remercier très amicalement. Coralie, Théo, Stacy et Coline, j'ai vraiment apprécié travailler avec vous. Merci !

D'autres personnes ont également contribué à ce projet de thèse, je pense notamment à Sabine, Elise, Calypso, Douglas... et bien d'autres. Merci à tous pour votre aide !

Au fil du temps, de belles amitiés se construisent. Parmi elles, je voudrais remercier mes « glouglous » préférés Tim et Fiona, Ma Soso ninja et Sophie l'Aventurière qui ont été présents tout au long de ma thèse, toujours prêts à prendre un verre, organiser une randonnée ou des weekends festifs permettant de relâcher la pression. Je pense également aux amis que j'ai eu trop peu la possibilité de voir ces derniers temps, Marina, Elsa, Marie-Caroline et Camille « la Chenille ». Avec vous, rien ne change avec le temps et ça, c'est très précieux ! Je remercie aussi les « Parisiens », Inès, Quentin, Marine, François et Camille qui ont suivi ma thèse de près. Merci les copains !

Je souhaite remercier très fort les amis de toujours, ceux auprès desquels je me suis construite. Les amis du Sud, Alexandre, Joséphine et Sylvain ! Merci pour tout ce que vous m'avez apporté depuis l'enfance. Aujourd'hui, loin des yeux mais toujours près du cœur !

J'adresse des remerciements tout particuliers à ma belle-famille, Marie-Claude, Lionel, Blandine, Adrien pour leur soutien, ainsi qu'à ma famille dont les membres sont bien trop nombreux pour être tous cités. Une dédicace spéciale à ma Mamie « Coco des Bois » qui, à travers les appels du vendredi soir, a suivi l'évolution de ma thèse au fur et à mesure.

Je voudrais sincèrement remercier ma petite sœur, Marie, pour toutes nos grandes discussions sans fin, pour les moments musicaux et les promenades en mer, ainsi que pour les multiples séances de révision parfois très intenses mais aussi très drôles « l'Homme est le plus petit roseau de l'Univers, mais un roseau qui pense ». Merci pour tout !

Je remercie du fond du cœur mes parents qui m'ont toujours soutenue et qui sont incontestablement mes plus grands supporters ! Merci de m'avoir fait découvrir le milieu marin, d'avoir tout fait pour que je puisse réaliser des études passionnantes et d'avoir cru en moi en toutes circonstances. Vous m'avez tout donné, vous êtes mes piliers, mes soutiens. Aujourd'hui, j'espère vous rendre fiers.

Gautier, je n'ai pas assez de mots pour te remercier ! Pour commencer, merci de ne pas être parti en courant lorsque je t'ai annoncé que je me lançais dans une thèse. Tu m'as toujours soutenue dans mes choix et poussée à donner le meilleur de moi-même. Tu as partagé les moments de joie et de tristesse tout au long de ma thèse. Un GIGANTESQUE MERCI pour avoir écouté mes monologues interminables ! Merci aussi pour les bons petits plats et pour m'avoir aidée jusqu'au bout en réalisant la mise en page finale de ce manuscrit. En sciences, on s'intéresse souvent à l'incertitude d'une mesure. Toi, tu es ma certitude. Je t'aime.

“ La mer est tout ! Elle couvre les sept dixièmes du globe terrestre. Son souffle est pur et sain. C’est l’immense désert où l’Homme n’est jamais seul, car il sent frémir la vie à ses côtés. La mer n’est que le véhicule d’une surnaturelle et prodigieuse existence ; elle n’est que mouvement et amour ; c’est l’infini vivant...”

Le capitaine Nemo, au professeur Aronnax

Vingt Mille Lieues sous les mers, Jules Verne, Ed. Hetzel, coll. “Voyages extraordinaires”,
1870, partie I, chapitre X, p. 74

Liste des publications

Articles publiés

Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Sinquin, C., Marchand, L., Zykwinska, A., Delbarre-Ladrat, C., Schapira, M. (2021) Bacteria enhance the production of extracellular polymeric substances by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Scientific Reports* **11**, 4795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84253-2>

Georges Des Aulnois, M., **Roux, P.**, Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Hervé, F., Savar, V., Bormans, M., Amzil, Z. (2019) Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of *Microcystis aeruginosa* Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **85**(21), e01614-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01614-19>

Articles soumis

Roux, P., Siano, R., Souchu, P., Collin, K., Schmitt, A., Manach, S., Retho, M., Pierre-Duplessix, O., Marchand, L., Collic-Jouault, S., Pochic, V., Zoffoli, M. L., Gernez, P. and Schapira, M. Spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of Green Seawater Discolorations caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (in review).

Articles en cours de préparation

Roux, P., Schapira, M., Mertens, K., André, C., Terre-Terrillon, A., Schmitt, A., Manach, S., Collin, K., Serghine, J., Noel, C., Siano, R. Bloom initiation dynamics of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* assessed by environmental DNA. *Progress in Oceanography* (in prep.).

Roux, P., Ragueneau, S., Schapira, M., Siano, R., Pernet, F., Queau, I., Malestroit, P., Tallec, K., Hégaret, H., Corona, J., Fleury, E. Ecophysiological response of the cupped oyster *Crassostrea gigas* exposed to the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* (in prep.).

Liste des communications

Conférences internationales

Roux, P., Schapira, M., Fleury, E., Siano, R. (2022) Ecological properties of the green seawater discoloration forming dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*: from cellular ecophysiology to ecosystem impacts. International Conference on modern and fossil dinoflagellates (DINO12). 4-8 July 2022, Las Palmas de Gran Canaria, Spain (*Abstract submitted*).

Roux, P., Schapira, M., Fleury, E., Siano, R. (2021) The harmful effect of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*: from water discolorations to impact on cultivated bivalves. *Poster*. International Conference on Harmful Algae (ICHA). 10-15 October 2021, La Paz, Mexico (Virtual meeting).

Roux, P., Siano, R., Fleury, E., Mertens, K., N., André, C., Cochenne Laureau, N., Schapira, M. (2019) Dynamics of the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* in Southern Brittany: controlling factors and consequences for exploited ecosystems. *Speed Talk*. Oceanext. 3-5 July 2019, Nantes, France.

Georges Des Aulnois, M., **Roux, P.**, Malo, F., Caruana, A., Briand, E., Bormans, M., Amzil, Z. (2018) Physiological responses and toxins production of *Microcystis aeruginosa* acclimated to different salinities. *Oral*. International Conference on Harmful Algae (ICHA). 21-26 October 2018, Nantes, France.

Jauzein, C., **Roux, P.**, Lemée, R. (2018) From growth to aging, roles and fates of lysosomes (orange-red bodies) in benthic dinoflagellate cells. *Poster*. International Conference on Harmful Algae (ICHA). 21-26 October 2018, Nantes, France.

Colloques nationaux

Roux, P., Schapira, M., Mertens, K.N., André, C., Terre-Terrillon, A., Schmitt, A., Manach, S., Colin, K., Serghine, J. Noel, C. Siano, R. (2022) Bloom initiation dynamics of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* assessed by environmental DNA. Colloque GdR Phycotox. 31 mai – 1 juin 2022, Plouzané, France (*Abstract submitted*).

Ragueneau, S., **Roux, P.**, Queau, I., Malestroit, P., Siano, R., Schapira, M., **Fleury, E.** (2021) Ecophysiology of the cupped oyster *Crassostrea gigas* exposed to the green algae *Lepidodinium chlorophorum*. *Oral*. Colloque d'Ecophysiologie Animale (CEPA). 2-4 November 2021, Montpellier, France.

Zoffoli, L., Gernez, P., Pochic, V., **Roux, P.**, Siano, R., Schmitt, A., Retho, M., Pierre-Duplessix, O., Schapira, M. (2021) Evaluating synergy between *in situ* and satellite observations to observe phytoplankton blooms. *Oral*. Colloque ILICO/EVOLECO. 2-5 November 2021, La Rochelle, France.

Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Sinquin, C., Marchand, L., Zykwinska, A., Delbarre-Ladrat, C., Schapira, M. (2020) Bacteria enhance the production of extracellular polymeric matrix by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Oral*. Colloque GdR Phycotox. 4-6 November 2020 (Virtual meeting).

Roux, P., Siano, R., Fleury, E., Schapira, M. (2020) Dynamique des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* en Bretagne Sud. *Oral*. Journées REPHY Ifremer. 5-6 February 2020, Nantes, France.

Roux, P., Curd, A., Antoine, V., Chapelle, A., Le Gac-Abernot, C., Schapira, M., Siano, R. (2019) PHENOMER : Mieux connaître la phénologie des micro-algues grâce aux observations des citoyens. *Oral*. Colloque Les Sciences Marines pour Tous. 6 June 2019, Paris, France.

Roux, P., Siano, R., Fleury, E., Mertens, K., N., André, C., Cochenne Laureau, N., Schapira, M. (2019) Dynamics of the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* in Southern Brittany: controlling factors and consequences for exploited ecosystems. *Oral*. Colloque GdR Phycotox. 14-17 May 2019, Plouzané, France.

Vulgarisation scientifique

Articles

Cette micro-algue qui se cache derrière les eaux colorées vertes de Bretagne Sud. <https://theconversation.com/cette-micro-algue-qui-se-cache-derriere-les-eaux-colorees-vertes-de-bretagne-sud-149749>. The Conversation. 10 Janvier 2021.

Reportages / Interviews

Web-série de La Solitaire du Figaro « Ils vivent la mer autrement : portrait de Pauline Roux (Ifremer) » <https://www.youtube.com/watch?v=3SrflDs5Bl8>. Département Loire-Atlantique. Juillet 2021.

Web-série « Thésèz-vous ? » <https://www.youtube.com/watch?v=gym8e5uXR-w>. Chaîne YouTube de l'Ifremer. Juin 2021.

Loire-Atlantique : les colorations vertes de l'océan pourraient impacter la survie des coquillages. <https://france3-regions.francetvinfo.fr/pays-de-la-loire/loire-atlantique/loire-atlantique-colorations-vertes-ocean-pourraient-impacter-survie-coquillages-1854656.html>. France 3, Pays de la Loire. 17 Juillet 2020.

Concours

Ma Thèse en 180 secondes. https://www.youtube.com/watch?v=XVI_4xkvKkQ (24 min 47). Finale Nantaise 2021. Stéréolux. Mars 2021.

Evènements

Fête de la Science. 30^e édition. « Détecter des indices de l'activité humaine dans l'environnement littoral ? Suivez les océanographes de l'Ifremer dans leur enquête ! ». Museum d'histoire naturelle de Nantes. Octobre 2021.

Table des matières

Résumé	I
Abstract	III
Remerciements	V
Liste des publications	XI
Liste des communications	XII
Table des matières	1
Liste des figures	7
Liste des tableaux	13
Abréviations	15
Introduction générale	17
1. Protistes marins	19
2. Le phytoplancton	22
2.1. Rôle clé du phytoplancton dans les flux de matière au sein des systèmes aquatiques	22
2.2. Le phytoplancton marin : un océan de diversité	24
2.3. Les efflorescences phytoplanctoniques en milieu côtier	26
3. Dinoflagellés	29
3.1. Distribution et écologie	29
3.2. Cycle de vie	31
3.3. Évolution des plastides	34
4. L'espèce <i>Lepidodinium chlorophorum</i> , (Elbrächter and Schnepf) Hansen, Botes and Salas, 2007	36
4.1. Classification de <i>Lepidodinium chlorophorum</i>	39
4.2. Méthodes de détection	42
4.2.1. Microscopie optique	42
4.2.2. Contenu pigmentaire	42
4.2.3. Sciences participatives	43
4.2.4. ADN environnemental	44
4.3. Distribution	45
4.4. Écologie	49
4.5. Particules exo-polymériques transparentes (TEP) : un trait biologique particulièrement développé chez <i>L. chlorophorum</i>	52
5. Conséquences des eaux colorées vertes à <i>L. chlorophorum</i> sur les écosystèmes exploités	55
5.1. Conséquences sur les organismes marins	55

5.2. Rôle potentiel des TEP sur les mortalités.....	57
Objectifs de la thèse	59
Chapitre 1 Rôle des bactéries dans la production de substances polymériques extracellulaires par le dinoflagellé vert <i>Lepidodinium chlorophorum</i>.....	65
<i>Contexte de l'étude</i>	67
<i>Financement</i>	68
<i>Contribution des auteurs</i>	68
1. Introduction	70
2. Material and methods.....	73
2.1. Microalgal strains and culture conditions	73
2.2. Antibacterial protocol.....	74
2.3. Experimental set-up for <i>L. chlorophorum</i> cultures	74
2.4. Biological, biochemical and chemical analyses	75
2.5. EPS determination: TEP and SEP analyses	76
2.6. POC determination	78
2.7. Viscosity measurements.....	78
2.8. Statistical analyses.....	79
3. Results	79
3.1. Antibiotic protocol.....	79
3.2. <i>Lepidodinium chlorophorum</i> growth.....	80
3.3. EPS characterisation	81
3.4. Viscosity changes in seawater	87
3.5. Comparison between non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions	88
4. Discussion.....	90
<i>Acknowledgements</i>	96
<i>Author contributions statement</i>	96
5. Appendix	97
Chapitre 2 Dynamique d'initiation d'une efflorescence de <i>Lepidodinium chlorophorum</i> évaluée par ADN environnemental.....	103
<i>Contexte de l'étude</i>	105
<i>Financement</i>	106
<i>Contribution des auteurs</i>	106
1. Introduction	108
2. Material and methods.....	112
2.1. Study area.....	112
2.2. Sampling strategy	112

2.3.	eDNA analysis from water samples and sediment	114
2.4.	Physico-chemical and biological variables of the water column	116
2.5.	Single cell-PCR and hatching experiments of cysts from surface sediments	117
2.6.	Statistical analysis	118
3.	Results	119
3.1.	Protistan pelagic community	119
3.2.	<i>Lepidodinium</i> distribution in the water column and environmental parameters	123
3.3.	<i>Lepidodinium</i> distribution in the sediment	126
4.	Discussion	130
4.1.	<i>Lepidodinium</i> during non-favorable growth condition	130
4.2.	Environmental factors triggering <i>Lepidodinium</i> bloom initiation	133
4.3.	The origin of <i>Lepidodinium</i> bloom inoculum	134
5.	Conclusions	137
	<i>Acknowledgements</i>	138
	<i>Author contributions statement</i>	138
6.	Appendix	139
	Chapitre 3 Dynamique spatio-temporelle et propriétés biogéochimiques des eaux colorées vertes causées par le dinoflagellé <i>Lepidodinium chlorophorum</i>	147
	<i>Contexte de l'étude</i>	149
	<i>Financement</i>	150
	<i>Contribution des auteurs</i>	150
1.	Introduction	152
2.	Material and Methods	155
2.1.	Study area	155
2.2.	Seasonal monitoring in 2019	156
2.3.	Specific GSD sampling in summer 2019	157
2.4.	Analytical procedure of physicochemical and biological variables	158
2.5.	Satellite data and processing	160
2.6.	Statistical analyses	162
3.	Results	162
3.1.	<i>Lepidodinium chlorophorum</i> seasonal variation in 2019	162
3.2.	Analysis of a GSD event	165
3.2.1.	Spatial dynamics of a GSD	165
3.2.2.	GSD biogeochemical composition	168

3.2.3. Relationship of <i>L. chlorophorum</i> with other biogeochemical parameters	170
4. Discussion.....	171
4.1. Physical factors influencing <i>L. chlorophorum</i> bloom dynamics	171
4.2. Biogeochemical specificity of <i>L. chlorophorum</i> blooms	173
4.3. Potential harmful effects of <i>L. chlorophorum</i> blooms on the environment.	175
5. Conclusions	176
<i>Acknowledgements</i>	177
<i>Author contributions statement</i>	177
6. Appendix	178
Chapitre 4 Ecophysiologie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> exposée au dinoflagellé vert <i>Lepidodinium chlorophorum</i>	187
<i>Contexte de l'étude</i>	189
<i>Financement</i>	190
<i>Contribution des auteurs</i>	190
1. Introduction	192
2. Material and methods.....	195
2.1. Biological material.....	195
2.1.1. Oysters.....	195
2.1.2. Algae cultures.....	195
2.2. Experimental design	196
2.2.1. Experiment 1	197
2.2.2. Experiment 2	197
2.2.3. Experiment 3	198
2.3. Environmental parameters during exposure	200
2.4. Histological analysis after exposure	200
2.4.1. Hematoxylin-Eosin staining.....	201
2.4.2. Multichromic histology	201
2.5. Ecophysiological measurement.....	202
2.6. Statistical analysis.....	203
3. Results	204
3.1. Exposure experiment	204
3.1.1. Physicochemical experimental conditions.....	204
3.1.2. Phytoplankton and TEP concentrations.....	204
3.1.1. Histological analyses	207
3.2. Recovery phase	209

4.	Discussion.....	209
4.1.	Cupped oysters successfully ingest <i>L. chlorophorum</i> cells under controlled conditions	209
4.2.	Short-term consequences of <i>L. chlorophorum</i> exposure on physiological rates of cupped oysters.....	213
5.	Conclusion.....	215
	<i>Acknowledgements</i>	216
	<i>Author contributions statement</i>	216
6.	Appendix	217
	Discussion générale et perspectives	223
	Annexes	253
	Annexe I.....	255
	Annexe II.....	257
	Annexe III.....	263
	Annexe IV	267
	Références Bibliographiques.....	273

Liste des figures

Figure 1. Arbre du vivant des eucaryotes présentant 7 super-groupes contenant l'ensemble des protistes marins.....	21
Figure 2. Importance du phytoplancton dans les océans.	23
Figure 3. Comparaison de la gamme de tailles du phytoplancton par rapport aux objets macroscopiques.....	25
Figure 4. Photographies d'eaux colorées	28
Figure 5. Principales caractéristiques morphologiques d'une cellule mobile typique d'un dinoflagellé « armé ».....	30
Figure 6. Représentation schématique du cycle de vie d'un dinoflagellé.....	32
Figure 7. Représentation schématique de l'évolution des plastes des dinoflagellés.....	35
Figure 8. Arbre phylogénétique des dinoflagellés.....	37
Figure 9. <i>Lepidodinium chlorophorum</i> contenant des plastes dérivés de chlorophytes. .	38
Figure 10. Photographie aérienne d'une efflorescence de <i>L. chlorophorum</i>	38
Figure 11. Analyse phylogénétique du genre <i>Gymnodinium</i> incluant <i>Lepidodinium</i>	40
Figure 12. Recensement des observations du genre <i>Lepidodinium</i> (en rouge) et des deux espèces <i>L. viride</i> (en jaune) et <i>L. chlorophorum</i> (en vert) selon les différentes techniques de détection utilisées : microscopie (cercles), biologie moléculaire (triangles) et observation satellitaire (étoiles).....	46
Figure 13. Cartographie résumant les observations de <i>L. chlorophorum</i> dans le cadre du réseau de surveillance REPHY sur la période allant de 1999 à 2018.	47
Figure 14. Eaux colorées signalées par les citoyens en 2013, 2014 et 2015 et taxons dominants identifiés par les taxonomistes phytoplanctoniques du consortium Phenomer dans les échantillons d'eau.	48
Figure 15. Zone côtière de Bretagne sud (France, Atlantique Nord-Est) s'étendant de l'Île de Noirmoutier (Vendée) à la Presqu'Île de Quiberon (Morbihan).	49
Figure 16. Kystes provenant d'une station d'échantillonnage d'eau de mer située La Brèche d'Hermanville (Calvados, France) maintenus en culture de laboratoire.	51
Figure 17. TEP associés à une cellule de <i>Lepidodinium chlorophorum</i>	53
Figure 18. Représentation schématique de la création d'une grande réserve de matière organique dissoute, par les organismes phytoplanctoniques, à partir de laquelle les TEP sont formées par coagulation	54
Figure 19. Eaux colorées vertes à <i>L. chlorophorum</i> associées à des mortalités.....	57

Figure 20. <i>Lepidodinium chlorophorum</i> concentrations (cell mL ⁻¹ ; solid lines) and bacterial concentrations (bacterial cell mL ⁻¹ ; dashed lines) for the three <i>L. chlorophorum</i> strains analysed under A) non-axenic (NA) and B) pseudo-axenic (PA) culture conditions.	81
Figure 21. Mean TEP concentrations (mg Xeq L ⁻¹) measured under A) non-axenic (NA), B) pseudo-axenic (PA) conditions and mean cell normalised TEP production (mg Xeq cell ⁻¹) estimated under C) NA, D) PA conditions for the three <i>L. chlorophorum</i> strains during the different growth phases.	83
Figure 22. Monosaccharide composition, proteins and sulphate (wt %) of SEP from supernatants, at three growth times, for all three <i>L. chlorophorum</i> strains under non-axenic (NA) conditions: A) RCC1489, C) KL1C4, E) MAR1D2 and pseudo-axenic (PA) conditions: B) RCC1489, D) KL1C4, F) MAR1D2	86
Figure 23. HPSEC profiles (with UV and RI detectors) of culture supernatants obtained for three <i>L. chlorophorum</i> strains, at three growth times, under non-axenic (NA) conditions: A) RCC1489, C) KL1C4, E) MAR1D2 and pseudo-axenic (PA) conditions: B) RCC1489, D) KL1C4, F) MAR1D2.	87
Figure 24. PCA, applied on the dataset (Table S2), summarising the similarities and differences between non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) samples.	89
Figure 25. Relative abundance (%) of the protistan groups detected with eDNA metabarcoding.	120
Figure 26. Relative abundance (%) of the 15 most abundant genera of dinophyceae within the protistan community detected with eDNA metabarcoding.	122
Figure 27. Spatio-temporal variability of biological and physicochemical parameters along the water column at the station Basse Michaud during both autumn-winter periods.	125
Figure 28. PCA summarizing the similarities and differences in environmental factors and the relative abundance of <i>Lepidodinium</i> genus at the two sampling stations during both autumn-winter periods.	127
Figure 29. <i>Lepidodinium</i> eDNA distribution in the sediment.	129
Figure 30. Location of the three sampling stations of the Vilaine Bay (Nord Dumet, Ouest Loscolo) and Quiberon Bay (Men er Roue) monitored in 2019 in Southern Brittany coast (NE Atlantic, France).	156
Figure 31. Variations in hydrological parameters associated with phytoplankton recorded in 2019 at the three sampling stations of the Vilaine Bay (Ouest Loscolo, Nord Dumet) and Quiberon Bay (Men er Roue).	164

Figure 32. (A–F) Examples of Sentinel-2 images (11, 16, and 21 July 2019) acquired during the green seawater discoloration (GSD) event in summer 2019.	166
Figure 33. Relative abundances (%) of the main microphytoplankton groups observed inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the green seawater discoloration.....	167
Figure 34. Spatial distribution of biological and physicochemical parameters: (A) <i>L. chlorophorum</i> concentrations, (B) temperature, (C) salinity, (D) silicates (DSi), (E) ammonium (NH ₄), (F) phosphates (DIP), (G) dissolved organic nitrogen (DON), and (H) transparent exopolymer particles (TEP), measured inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the GSD	169
Figure 35. Experimental design (A) and sampling schedule (B). Only the exposure experiment EXP2 is presented in this study.	199
Figure 36. Total phytoplankton ($\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$; A, B) et TEP concentrations ($\mu\text{g Xeq L}^{-1}$; C, D) measured during the 48h exposure experiment EXP2 in the control tanks (without oysters; open symbols) and in the oyster tanks (containing oysters; filled symbols).	206
Figure 37. Histological analysis (multichromic stained paraffin sections) of digestive tubules of <i>Crassostrea gigas</i> exposed to (A) the LC-bloom condition (<i>L. chlorophorum</i> bloom concentration) or (B) the TL condition (<i>T. lutea</i>), observed using a light microscope.....	208
Figure 38. (A) Individual clearance rate of oysters as a function of food regime and time during the recovery phase. Letters represent significant differences for the food $\times$ time interaction on clearance rate for each time independently (repeated measures ANOVA). The inset shows clearance rate as a function of food regime only. (B) Individual respiration rate of oysters during the recovery phase. * indicate the effect of time on the respiration rate (repeated measures ANOVA). The inset shows respiration rate as a function of food regime only. Open circles represent individuals and solid lines represent mean.	210
Figure 39. Absorption Efficiency (%) of oysters as a function of food during the recovery phase. Results are expressed as mean $\pm$ SD.....	211
Figure 40. Schéma conceptuel de l'écologie de l'espèce <i>L. chlorophorum</i>	225

Figures Supplémentaires

Figure S1. HPSEC profiles (RI detectors) of culture supernatants obtained for three <i>L. chlorophorum</i> strains at stationary phase: RCC1489, KL1C4, MAR1D2 under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions.	100
Figure S2. Electrophoretic analysis of <i>L. chlorophorum</i> (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2 strains) culture supernatants at the stationary phase under NA and PA conditions after SYPRO™ Ruby (A), Schiff (B) and Stains All (C) staining.	101

Figure S3. Rarefaction curves.....	139
Figure S4. NMDS summarising the similarities and differences in dinophycean communities between both sampling stations	140
Figure S5. Relative abundance (%) of the 15 most abundant genera of Dinophyceae within the protistan community observed at light microscopy.....	141
Figure S6. Temporal variability of biological and physicochemical parameters along the water column at the station Ouest Loscolo during both autumn-winter periods.....	142
Figure S7. Stratification index (ϵ) computed for each sampling date	143
Figure S8. Spearman correlation matrix for all biological and physicochemical parameters measured at the two sampling stations during both autumn-winter periods	143
Figure S9. Diversity of common cysts of the Loire and Vilaine estuaries.	145
Figure S10. Single-cell PCR of cyst identification.	145
Figure S11. Relative abundances (%) of the main microphytoplankton groups observed in 2019: Cryptophyceae (blue), diatom (yellow), dinoflagellate (dark green), and <i>Lepidodinium chlorophorum</i> (light green)	178
Figure S12. (A) Dissolved oxygen concentrations, (B) salinity, (C) temperature recorded by an autonomous buoy (Nord Dumet station) at the subsurface (light blue) and WSI (dark blue).	179
Figure S13. Vilaine River flow data ($\text{m}^3 \text{sec}^{-1}$) recorded from May to December 2019. .	179
Figure S14. Variations of nitrogen ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2$), ammonium (NH_4), phosphate (DIP), and silicate (DSi) concentrations recorded from May to December 2019 at the three sampling stations of the Vilaine (Ouest Loscolo, Nord Dumet) and Quiberon Bays (Men er Roue).	180
Figure S15: Spatial distribution of biological and physicochemical parameters: (A) chlorophyll <i>a</i> (Chl <i>a</i>), (B) nitrites (NO_2), (C) nitrogen (NO_3), (D) dissolved organic carbon (DOC), particulate organic (E) carbon (POC), and (F) nitrogen (PON) concentrations, measured inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the GSD	181
Figure S16. Electrophoretic analysis of the St1 supernatant, collected inside the GSD (subsurface), after toluidine blue staining.....	182
Figure S17. ATR-FTIR spectra of the St1 supernatant, collected inside the GSD.....	182
Figure S18. Boxplot of the variations of subsurface physicochemical measurements (temperature, salinity, turbidity, chlorophyll <i>a</i> , and nutrient concentrations) between 1998 and 2019 at Vilaine Bay (Ouest Loscolo station) and Quiberon Bay (Men er Roue station) (REPHY dataset).	184

Figure S19. Nutrient concentrations: (A) silicates (DSi), (B) phosphates (DIP), and (C) ammonium (NH ₄), along the salinity gradient. Concentrations recorded on July 8, 2019, at a more upstream station in the Vilaine Estuary (salinity = 32), were added to evaluate the origin of these inorganic nutrients.	185
Figure S20. Variations in physicochemical parameters recorded during the 48h-exposure experiment EXP2	219
Figure S21. Grazing (G) calculated during the 48h-exposure experiment EXP2	220
Figure S22. Histological analysis (Hematoxylin-eosin stained slide) of mantle and stomach of <i>Crassostrea gigas</i> , exposed to the LC-bloom condition, observed using a light microscope ..	221

Figures Annexes

Figure A1. Analyses en qPCR réalisées avec le couple d’amorces : LEPICHLO-ITS-FW/LEPICHLO-ITS-RV (396 pb), sur les cinq souches de <i>L. chlorophorum</i>	258
Figure A2. Analyses en qPCR réalisées avec les amorces (A) Lepido2526Fw/LepidoRv et (B) Lepido2529Fw/LepidoRv sur des extraits d’ADN issus de différentes cultures de dinoflagellés.	260
Figure A3. Détection du genre <i>Lepidodinium</i> par qPCR dans les sédiments	261
Figure A4. Localisation des 5 baies : Brest (station « Lanvéoc »), Douarnenez (station « Kervel »), Concarneau (station « Concarneau »), Quiberon (station « Men er Roué ») et Vilaine (station « Ouest Loscolo ») d’où proviennent les séries temporelles REPHY étudiées sur la période allant de 1998 à 2019.	264
Figure A5. Nombre d’observations de <i>L. chlorophorum</i> au sein de chacune des baies suivies dans le cadre du réseau REPHY entre 1998 et 2019.	265
Figure A6. A gauche, le site atelier de cette étude est localisé au niveau du Traict de Penbé, en baie de Vilaine. A droite, le point de suivi hydro-biologique (Merquel) et le point de suivi des huîtres (Penbé) sont localisés plus précisément.....	268
Figure A7. Évolution de la concentration en oxygène dissous dans l’eau de mer en surface (en mg L ⁻¹) du 4 juillet au 3 août 2019.....	269
Figure A8. Évolution de l’indice de Lawrence and Scott (LS) calculé à partir des huîtres âgées de 18 mois	270
Figure A9. Expérimentation en milieu contrôlé visant à étudier la physiologie de l’huître creuse <i>C. gigas</i> exposée à <i>L. chlorophorum</i>	271

Liste des tableaux

Table 1. SEP yields (Y ; g L ⁻¹) from culture supernatants for the three <i>L. chlorophorum</i> strains during the different growth phases under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions.	85
Table 2. Mean relative excess viscosity η (%) during each growth phase under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions ($n = 9$) for the three studied <i>L. chlorophorum</i> strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2).	88
Table 3. Maximum TEP concentration (TEP _{max} ; mg Xeq L ⁻¹) produced by different phytoplankton species grown in cultures (mostly non-axenic).	92
Table 4. Abundances of <i>L. chlorophorum</i> recorded at the fluorescence maximum depth (F _{max}) in 2019 at Nord Dumet, Ouest Loscolo and Men er Roue stations.	164
Table 5. Satellite-derived estimation of bloom surface using Sentinel-2 images.	165
Table 6. Mean intensities of histological figures in <i>Crassostrea gigas</i> mantle, gills, stomach, intestine and digestive tubules after 48h of exposure to LC-bloom, LC-low and TL conditions (EXP2).	208

Tableaux supplémentaires

Table S1. Mean bacteria per <i>L. chlorophorum</i> cell (mean $\pm$ s.d.) enumerated during the three different growth phases (lag: "Lag"; exponential: "Expo."; stationary: "Stat.") for the three different strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2) in non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions.	97
Table S2. Mean parameters (mean $\pm$ s.d.) measured during the three different growth phases (lag: "Lag"; exponential: "Expo."; stationary: "Stat.") for the three different strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2) in non-axenic and pseudo-axenic conditions.	98
Table S3. Soluble Extracellular Polymers (SEP) from pellets characterized during the three different growth phases (lag: "Lag"; exponential: "Expo."; stationary: "Stat.") for the three different strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2) in non-axenic and pseudo-axenic conditions ($n = 1$).	99
Table S4. Weight-average molecular weight (M _w) and recovery yield of polysaccharides and proteins in the culture supernatants obtained for three <i>L. chlorophorum</i> strains (stationary phase): RCC1489, KL1C4 and MAR1D2 under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions.	99

Table S5. Sediment granulometry measured using a laser particle size. Data were grouped by size class according to Blott and Pie (2001). Stations are located on the map in Figure 29...	144
Table S6. Citizen observations of Green Seawater Discolorations (GSD) during the summer 2018 and maximum abundances of <i>L. chlorophorum</i> cells associated to these events in our study area (www.phenomer.org)	146
Table S7. Molar ratio between carbon (C) and nitrogen (N) in particulate and dissolved organic fractions, inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the GSD at the subsurface and WSI.	181
Table S8. Spearman correlation matrix for all biological and physicochemical parameters at the (A) subsurface and (B) WSI	183
Table S9. Summary of experimental design.	217
Table S10. Initial morphological parameters of the oysters <i>Crassostrea gigas</i> (T ₀) used for the three exposure experiments (EXP1, EXP2, EXP3).	218
Table S11. Summary of the repeated measures ANOVAs on the effect of food regime (LC-bloom, LC-low, TL), time (from 1.4h to 20.6h) and exposure experiment (EXP1, EXP2, EXP3; random) on clearance and respiration rates measured during the 24h-recovery phase.	218

Tableaux Annexes

Table A1. Caractéristiques des amorces spécifiques à <i>L. chlorophorum</i>	258
Table A2. Description des nouvelles amorces créées dans la région de l'ITS1.	259

Abbreviations

AE: Absorption Efficiency	NA: Non-Axenic
ASV: Amplicon Sequence Variants	NH ₄ : Ammonium
Chl <i>a</i> : Chlorophyll <i>a</i>	NO ₂ : Nitrite
CO ₂ : Carbon dioxide	NO ₃ +NO ₂ : Nitrate + Nitrite
CR: Clearance Rate	O ₂ : Oxygen
DCE: Directive Cadre sur l'Eau	OM: Organic Matter
DEB: Dynamic Energy Budget	PA: Pseudo-Axenic
DIN: Dissolved Inorganic Nitrogen	PCA: Principal Components Analysis
DIP: Dissolved Inorganic Phosphorus	PCR: Polymerase Chain Reaction
DOC: Dissolved Organic Carbon	PO ₄ : Phosphorus
DON: Dissolved Organic Nitrogen	POC: Particulate Organic Carbon
DSi: Dissolved Silicate	PON: Particulate Organic Nitrogen
ECV: Eau Colorée Verte	RCC: Roscoff Culture Collection
eDNA: environmental DNA	REPHY: Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
EPS: Extracellular Polymeric Substances	RR: Respiration Rate
EXP: Experiment	S2: Sentinel-2
F _{max} : Fluorescence Maximum depth	Sal: Salinity
<i>F_v/F_m</i> : maximum quantum efficiency of the photosystem II	SEP: Soluble Extracellular Polymers
Gal: Galactose	SiOH: Silicate
GSD: Green Seawater Discoloration	St: Station
HAB: Harmful Algal Bloom	T°: Temperature
ITS: Internal Transcribed Spacer	TEP: Transparent Exo-polymeric Particles
L8: Landsat-8	TL: <i>T. lutea</i> condition
LC-bloom: <i>L. chlorophorum</i> bloom condition	WSI: Water-Sediment Interface
LC-low: <i>L. chlorophorum</i> in low concentration	ε: stratification index
LQ: Limit of Quantification	μ: growth rate
MOLIT: Mer Ouverte Littoral	η: relative viscosity excess

Introduction générale

1. Protistes marins

Les protistes sont des organismes microscopiques eucaryotes unicellulaires (Schlegel and Hülsmann, 2007 ; Burki *et al.*, 2021). Comme l'ensemble des eucaryotes, ils possèdent un noyau, dans lequel l'ADN est stocké, et une architecture cellulaire complexe soutenue par un cytosquelette. Ces protistes présentent des tailles, formes et fonctions très variées (Caron *et al.*, 2012 ; Keeling and Burki, 2019 ; Burki *et al.*, 2020). En outre, différents comportements alimentaires ou « stratégies trophiques » sont représentés : (i) l'autotrophie se définit comme la capacité d'un organisme à produire de la matière organique à partir de la réduction de matière inorganique et d'une source d'énergie externe telle que la lumière. Cette réaction est appelée photosynthèse ; (ii) l'hétérotrophie est la capacité d'un organisme à se nourrir de substances organiques qu'il ne peut pas lui-même synthétiser. Il peut s'agir de consommateurs primaires de bactéries et/ou d'organismes autotrophes, de prédateurs ou de parasites. L'hétérotrophie serait le mode de nutrition le plus répandu chez les protistes (Singer *et al.*, 2021) ; (iii) la mixotrophie caractérise un organisme capable de se nourrir par autotrophie aussi bien que par hétérotrophie (Selosse *et al.*, 2017).

Les protistes sont présents au sein de tous les groupes d'eucaryotes constituant l'arbre du vivant (Figure 1). En effet, 7 grands groupes d'eucaryotes, contenant des protistes, sont définis (Worden *et al.*, 2015). Les Opisthokonta sont constitués d'organismes très divers tels que les champignons et les métazoaires mais aussi des protistes tels que les membres appartenant au groupe des Choanoflagellata. Les Amoebozoa représentent un grand groupe de protozoaires ainsi que de protistes hétérotrophes amorphes se déplaçant grâce à des flux endoplasmiques (*e.g.*, *Amoeba proteus*). Les Excavata regroupent une grande variété de cellules libres ou symbiotiques (notamment les euglénozoaires). Les Archaeplastida rassemblent des eucaryotes caractérisés par des pigments verts (Chlorophytes : Prasinophyceae, Pedinophyceae notamment) ou rouge (Rodophytes). Le groupe des Rhizaria contient des membres provenant des Radiolaria, Foraminifera et Acantharia qui produisent respectivement des structures squelettiques de silice, carbonate de calcium et sulfate de strontium. Leur

écologie est mal connue mais le groupe contient à la fois des hétérotrophes et des phototrophes symbiotiques non-constitutifs (Decelle *et al.*, 2015). Les Stramenopiles possèdent deux flagelles distincts pendant au moins une partie de leur cycle de vie. Parmi eux, les Bacillariophyta, ou diatomées, sont largement représentées en milieu marin. La plupart d'entre elles ont perdu leurs flagelles et contiennent des plastes rouges (Falkowski *et al.*, 2004). Ces micro-organismes sont caractérisés par une structure complexe composée de silicate (Hallegraeff, 1986 ; Durkin *et al.*, 2016). Enfin, les Alveolata constituent un groupe hétérogène des protistes. Leur principale caractéristique morphologique est la présence d'alvéoles corticales. La plupart d'entre eux se regroupent en trois phylums principaux partageant tous un même ancêtre commun (Cavalier-Smith, 1993 ; Leander and Keeling, 2003 ; Hoppenrath, 2017) : (i) les apicomplexes (Apicomplexa ; parasites notamment responsables d'infections humaines), (ii) les ciliés (Ciliophora ; hétérotrophes recouverts de cils impliqués dans la locomotion) et, (iii) les dinoflagellés (Dinophyta) qui sont des protistes flagellés présentant une large diversité de stratégies trophiques (Stoecker, 1999 ; Jeong *et al.*, 2010). Enfin, les Haptophytes (comprenant les Coccolitophoridés et les *Phaeocystis*) et les Cryptophytes constituent des groupes distincts dont l'histoire évolutive reste mal connue de nos jours.

Une grande majorité des protistes photosynthétiques possèdent des plastes d'origine cyanobactérienne (Reyes-Prieto *et al.*, 2007 ; Howe *et al.*, 2008). En effet, le premier eucaryote photosynthétique serait issu d'une endosymbiose « primaire » entre un eucaryote phagotrophe et une cyanobactérie ayant eu lieu il y a 1,6 milliard d'années (Yoon *et al.*, 2004 ; Khan *et al.*, 2020). Les algues rouges, les algues vertes, les plantes terrestres et les glaucophytes sont probablement les descendants directs de ce premier phototrophe eucaryote : leurs plastes sont dits « primaires » (Palmer, 2003 ; Keeling *et al.*, 2005 ; Reyes-Prieto and Bhattacharya, 2007). Au cours de l'évolution, les plastes ont été distribués dans des groupes phylogénétiques divergents par le biais de multiples endosymbioses « secondaires » entre des eucaryotes non photosynthétiques (hôtes) et des eucaryotes possédant des plastes primaires (endosymbiontes) (Bhattacharya *et al.*, 2004 ; Keeling, 2004). Les plastes secondaires dérivés des algues rouges sont aujourd'hui retrouvés chez (i) *Chromera velia* (Alveolata, Chromerida, Chromeraceae), (ii) la majorité des dinoflagellés photosynthétiques, (iii) les Haptophytes, (iv) les Cryptophytes, et (v) les

Straménopiles. D'autre part, les plastes secondaires des Chlorarachniophytes et des euglènes sont dérivés des algues vertes (Douglas and Penny, 1999 ; Sanchez-Puerta *et al.*, 2007).

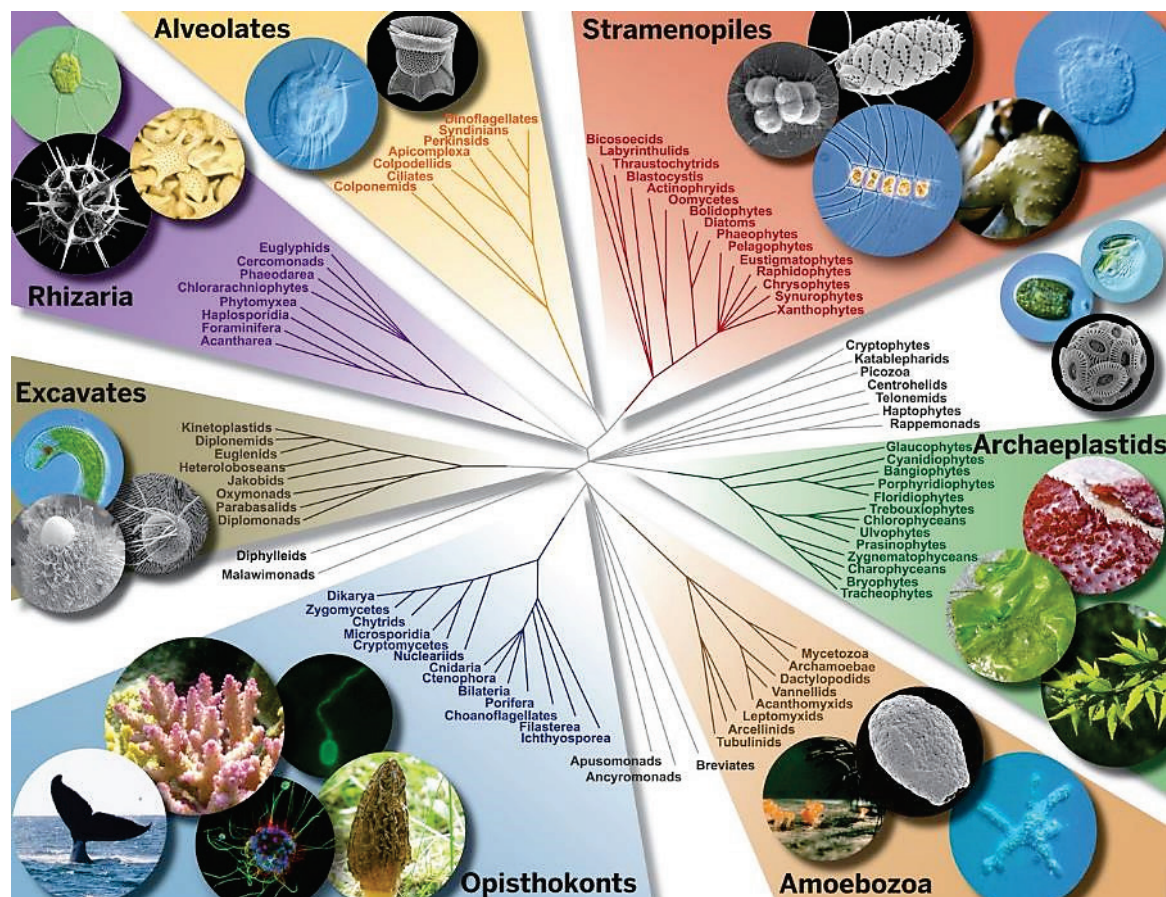


Figure 1. Arbre du vivant des eucaryotes présentant 7 super-groupes contenant l'ensemble des protistes marins (Worden *et al.*, 2015).

Les groupes de protistes marins étaient initialement classifiés selon des critères morphologiques et par stratégie trophique. A la fin du vingtième siècle, de nouvelles méthodes de biologie moléculaire ont émergé engendrant une multiplication des études menées sur l'écologie et l'évolution des protistes. Aujourd'hui, certains scientifiques considèrent les protistes comme des eucaryotes en excluant les champignons, les plantes et les animaux tandis que d'autres excluent également les macro-algues (Klouch, 2016). Par ailleurs, les protistes regroupent des espèces ayant des histoires évolutives variées, ne partageant pas toutes un même ancêtre commun. On parle de groupe paraphylétique.

Bien que de nombreux aspects de la phylogénie des eucaryotes restent incertains (Adl *et al.*, 2005), les protistes sont présents partout autour du monde. Dans les océans, ils constituent la plus grande partie de la diversité eucaryote (de Vargas *et al.*, 2015). Parmi eux, les microorganismes phytoplanctoniques jouent un rôle majeur au sein des écosystèmes marins.

2. Le phytoplancton

2.1. Rôle clé du phytoplancton dans les flux de matière au sein des systèmes aquatiques

Le plancton représente les organismes vivants, allant des virus (nanomètres) aux méduses (mètres), présents en suspension dans les écosystèmes aquatiques (Reynolds, 2006). Au sein de ces organismes planctoniques, le phytoplancton est défini comme l'ensemble des protistes photosynthétiques (micro-algues et cyanobactéries). Le phytoplancton assimile les nutriments (azote-N, phosphore-P et parfois silice-Si) produit de l'oxygène (O_2), fixe le carbone atmosphérique sous la forme de dioxyde de carbone (CO_2) et le convertit en matière organique carbonée via l'énergie lumineuse (Figure 2A). Ces microorganismes phytoplanctoniques sont capables de réguler le CO_2 atmosphérique tout en assurant environ 45% de la production d'oxygène sur Terre (Field, 1998 ; Geider *et al.*, 2001). Ils jouent donc un rôle essentiel dans le cycle biogéochimique du carbone en assurant son export vers l'océan profond, et participent ainsi à la régulation du réchauffement climatique global.

Par ailleurs, en tant que « producteur primaire », le phytoplancton est à la base des réseaux trophiques aquatiques (Kirchman, 1999) (Figure 2B). Dans un premier temps, les relations entre organismes marins ont été conceptualisées par une chaîne alimentaire linéaire. Au sein de ce modèle, le phytoplancton constitue une source alimentaire pour les consommateurs primaires (zooplancton), maillon intermédiaire faisant le lien avec l'échelon supérieur de la chaîne (poissons, mammifères) (Fourquez, 2012). A chaque

échelon, une partie de l'énergie fixée par photosynthèse est transformée en biomasse par respiration. Dans ce schéma, la contribution des procaryotes hétérotrophes marins (incluant les bactéries et les archaebactéries) était donc considérée comme mineure. Par la suite, Pomeroy (1974) a mis en avant l'importance de ces procaryotes hétérotrophes au sein des réseaux trophiques en suggérant qu'ils pouvaient participer directement aux flux de carbone et d'énergie (Pomeroy, 1974). Il compléta ainsi la chaîne alimentaire linéaire en y ajoutant une composante microbienne. Azam *et al.* (1983) ont ensuite clairement introduit le terme de « boucle microbienne ».

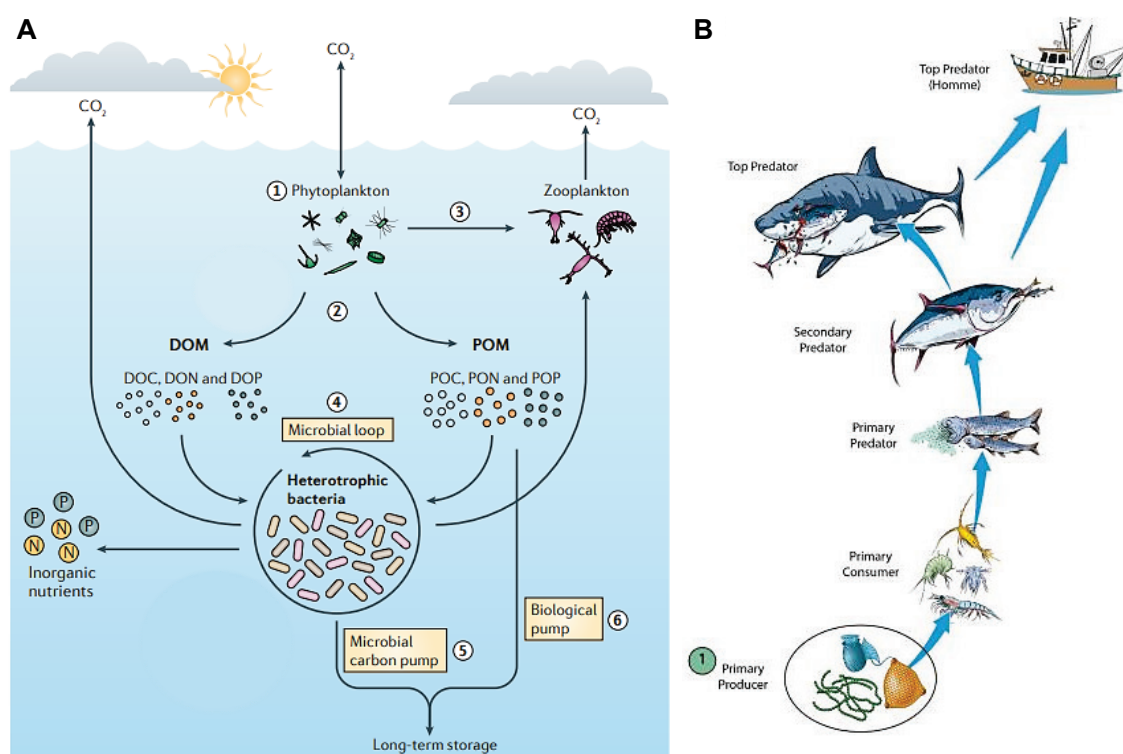


Figure 2. Importance du phytoplancton dans les océans. **A)** Le fonctionnement de la pompe biologique d'après Buchan *et al.* (2014). **B)** Une illustration simplifiée de la chaîne trophique pélagique (Demory, 2017).

Au sein de la boucle microbienne (Figure 2A), les bactéries peuvent être consommées par les protozoaires (protistes hétérotrophes mobiles tels que les flagellés par exemple), qui peuvent eux-mêmes être consommés par des organismes ciliés. Lors de cette action de broutage par les consommateurs primaires, des substances extracellulaires peuvent être libérées dans l'environnement. Ces dernières sont alors susceptibles d'être de nouveau utilisées par les bactéries. De cette manière, la boucle microbienne (i) fournit

une ressource pour les consommateurs primaires et, (ii) soutient la production primaire par le processus de reminéralisation. En effet, les bactéries sont responsables de l'assimilation d'une partie de la matière organique dissoute (MOD), riche en carbone, dans les océans via le processus de respiration bactérienne (Azam *et al.*, 1983 ; Sherr and Sherr, 1994 ; Khodse and Bhosle, 2011). C'est ainsi que la dégradation ou « reminéralisation » de la MOD par le compartiment bactérien produit du CO₂ et des éléments nutritifs régénérés tels que l'ammonium (NH₄) et le phosphate (PO₄) dissous (Kirchman, 1994 ; Buchan *et al.*, 2014). Les éléments nutritifs produits lors de cette reminéralisation peuvent ensuite soutenir la production primaire (Stocker, 2012). Ainsi, on estime que cette boucle microbienne traite environ 50% de la production primaire (Fenchel, 2008 ; Kirchman *et al.*, 2009).

2.2. Le phytoplancton marin : un océan de diversité

Le phytoplancton marin présente une très large diversité de taille (Finkel *et al.*, 2010) allant de quelques µm à plusieurs mm (Figure 3) et de traits physiologiques, métaboliques et comportementaux, assurant ainsi diverses fonctions écologiques (Falkowski *et al.*, 2004 ; Litchman and Klausmeier, 2008 ; de Vargas *et al.*, 2015). Cette diversité taxonomique est illustrée par plusieurs milliers d'espèces phytoplanctoniques. En milieu marin, 6 principaux groupes d'organismes phytoplanctoniques ont été identifiés sur la base de critères morphologiques, cytologiques, biochimiques et reproductifs : les cyanobactéries, les Chlorophyta, les Haptophyta, les Cryptophyta, les Stramenopiles et les Alveolata.

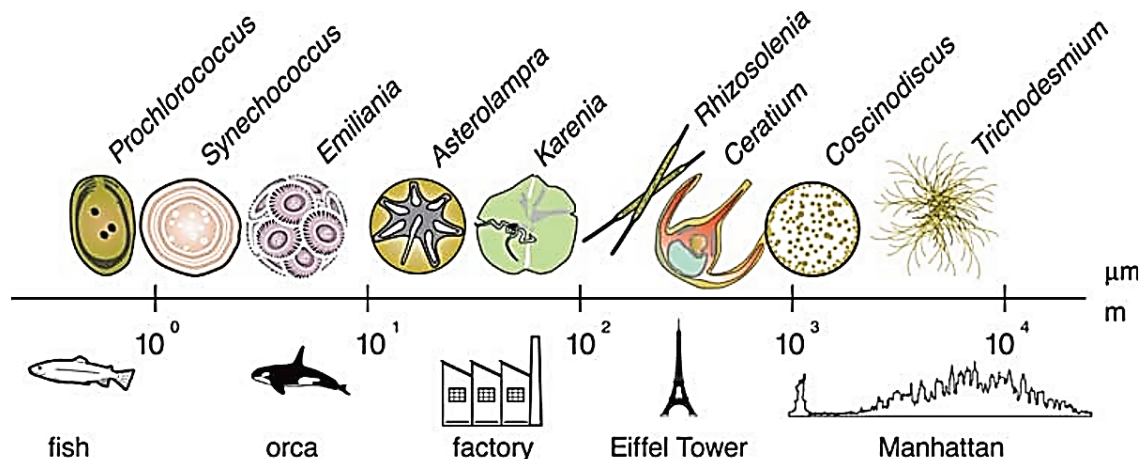


Figure 3. Comparaison de la gamme de tailles du phytoplancton par rapport aux objets macroscopiques (Finkel *et al.*, 2010).

Les cyanobactéries représentent les principaux organismes marins procaryotes capables de réaliser la photosynthèse. Elles ont été observées dans la plupart des écosystèmes marins. Deux genres principaux de cyanobactéries ont été décrits : *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. *Prochlorococcus* est le genre le plus abondant et a été identifié à l'aide de la cytométrie en flux (Chisholm *et al.*, 1988). Bien qu'il soit moins abondant, *Synechococcus* est plus facilement détectable car il possède un pigment spécifique, la phycoérythrine (Johnson and Sieburth, 1979).

D'autre part, 5 groupes principaux d'organismes phytoplanctoniques eucaryotes ont été définis. Les Chlorophyta sont issus de la lignée verte des protistes (Lewis and McCourt, 2004) et comprennent certains des plus petits eucaryotes connus, comme *Ostreococcus* (Derelle *et al.*, 2006). Les coccolithophores appartiennent quant à eux aux Haptophyta phototrophes, dont le membre le plus représenté est *Emiliania huxleyi*. Ils sont caractérisés par une structure composée de carbonate de calcium et peuvent donc influencer les cycles biogéochimiques (Holligan *et al.*, 1993). Les Cryptophyta sont moins connus mais sont caractérisés par un pigment photosynthétique particulier, appelé phycobiliprotéine (Kieselbach *et al.*, 2018). Au sein des Stramenopiles, les diatomées sont des organismes phototrophes abondants au niveau de l'océan globale et jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques (Benoiston *et al.*, 2017). En effet, ces diatomées sont caractérisées par la présence d'une enveloppe rigide appelée frustule

composée de silice. Enfin, les Alveolata sont principalement représentés par les dinoflagellés, généralement caractérisés par la présence de 2 flagelles et d'une thèque composée de plaques de cellulose.

De nombreux facteurs environnementaux contrôlent la diversité et les successions du phytoplancton (*i.e.*, facteurs biotiques, abiotiques). En effet, les fluctuations des conditions environnementales ont un impact majeur sur le fonctionnement des écosystèmes marins, en particulier au sein des écosystèmes côtiers représentant des zones très dynamiques.

2.3. Les efflorescences phytoplanctoniques en milieu côtier

Les zones marines côtières couvrent moins de 10% de la surface de la Terre, mais elles fournissent jusqu'à 40% des services écosystémiques (Costanza *et al.*, 1997, 2014). Ce sont des zones vulnérables soumises à une pression anthropique croissante (Kjerfve, 1994 ; Gregg *et al.*, 2005) et subissant de profondes modifications liées au changement climatique global (Boyce *et al.*, 2010). Les secteurs côtiers sont particulièrement influencés par (i) les apports d'eau douce provenant des fleuves et rivières (Peierls *et al.*, 2012 ; Hall *et al.*, 2013), (ii) les vents (Iverson *et al.*, 1974 ; Carstensen *et al.*, 2005), (iii) les marées (Cloern, 1996), (iv) la balance précipitation/évaporation ainsi que par (v) les flux de chaleur en surface de l'eau de mer (Cloern *et al.*, 2005). Ces éléments sont susceptibles d'affecter les paramètres physico-chimiques du milieu tels que les concentrations en nutriments, la salinité, la température et la pénétration de la lumière conditionnant ainsi la production primaire (Trombetta, 2019). Dans des conditions environnementales favorables, permettant la duplication cellulaire, des efflorescences associées à une forte production de biomasse peuvent être observées (Cloern *et al.*, 1996). Ces efflorescences côtières sont généralement dominées par une seule espèce. Au sein des régions tempérées, il s'agit généralement d'une espèce appartenant au groupe des diatomées ou des dinoflagellés (Carstensen *et al.*, 2015).

Les facteurs déterminants l'initiation de ces efflorescences côtières sont encore mal connus car les systèmes sont très variés. En effet, chaque système présente des

caractéristiques géologiques, topologiques et environnementales différentes (Trombetta, 2019). De plus, les efflorescences côtières peuvent être fugaces et localisées ce qui les rend difficiles à étudier. La plupart du temps, les apports d'eau douce riche en nutriments fournis par les fleuves et rivières favorisent l'initiation d'efflorescences. Cependant, un débit trop élevé peut avoir l'effet inverse via le phénomène de dispersion horizontale (Peierls *et al.*, 2012). Dans certains systèmes non-limités par les nutriments, une augmentation de l'intensité lumineuse à la fin de l'hiver peut également initier des efflorescences (Glé *et al.*, 2007). En zone côtière, la production primaire joue un rôle économique crucial en soutenant la pêche et l'aquaculture (Houde and Rutherford, 1993 ; Bacher *et al.*, 1998). Cette production primaire joue également un rôle écologique majeur en fournissant des habitats pour les différentes espèces et en participant ainsi au maintien de la biodiversité (Costanza *et al.*, 1997).

Cependant, certains organismes phytoplanctoniques sont dits nuisibles (« Harmful » en anglais) lorsque leur prolifération induit un effet négatif sur l'écosystème, la santé humaine ou les activités économiques d'une zone géographique (Zingone *et al.*, 2000). Parmi les milliers d'espèces phytoplanctoniques décrites en milieu marin (Reynolds, 2006), environ 140 sont capables de synthétiser des toxines susceptibles d'impacter la santé humaine (Moestrup *et al.*, 2009) et 300 peuvent former des eaux colorées rouges potentiellement nocives. En effet, certaines efflorescences peuvent provoquer une coloration de l'eau de mer en surface (Siano *et al.*, 2020 ; Hallegraeff *et al.*, 2021; Tsikoti and Genitsaris, 2021) (Figure 4). La couleur de l'eau dépend alors de la composition pigmentaire de l'espèce qui se développe. Ces eaux colorées peuvent être rouges, par exemple dans le cas de la prolifération du dinoflagellé *Noctiluca scintillans* (Figure 4A, B, C) mais peuvent également présenter une coloration verte par exemple lors de la prolifération du dinoflagellé *Lepidodinium chlorophorum* (Figure 4D, E, F), ou brune s'il s'agit de diatomées ou de certaines espèces de Raphidophytes (*e.g.*, *Heterosigma akashiwo*, *Pseudochattonella verruculosa* ; Siano *et al.*, 2020). En outre, la prolifération de la Prymnesiophyceae *Phaeocystis globosa* a été associée à la sécrétion de grandes quantités de mucus formant des « mousses blanches » malodorantes en milieu agité (Schapira, 2005). Ces colorations de l'eau de mer peuvent avoir un impact négatif sur les activités économiques en zone côtière, plus particulièrement sur le tourisme en période

estivale. Par ailleurs, certains événements d'eaux colorées ont été associés à des mortalités d'organismes marins sessiles ou vigiles sur les zones impactées (Hara and Chihara, 1987 ; Sournia *et al.*, 1992 ; Siano *et al.*, 2020). Il est intéressant de noter qu'une grande partie des phénomènes d'eaux colorées observés en zone côtière sont la conséquence de la prolifération massive de dinoflagellés.

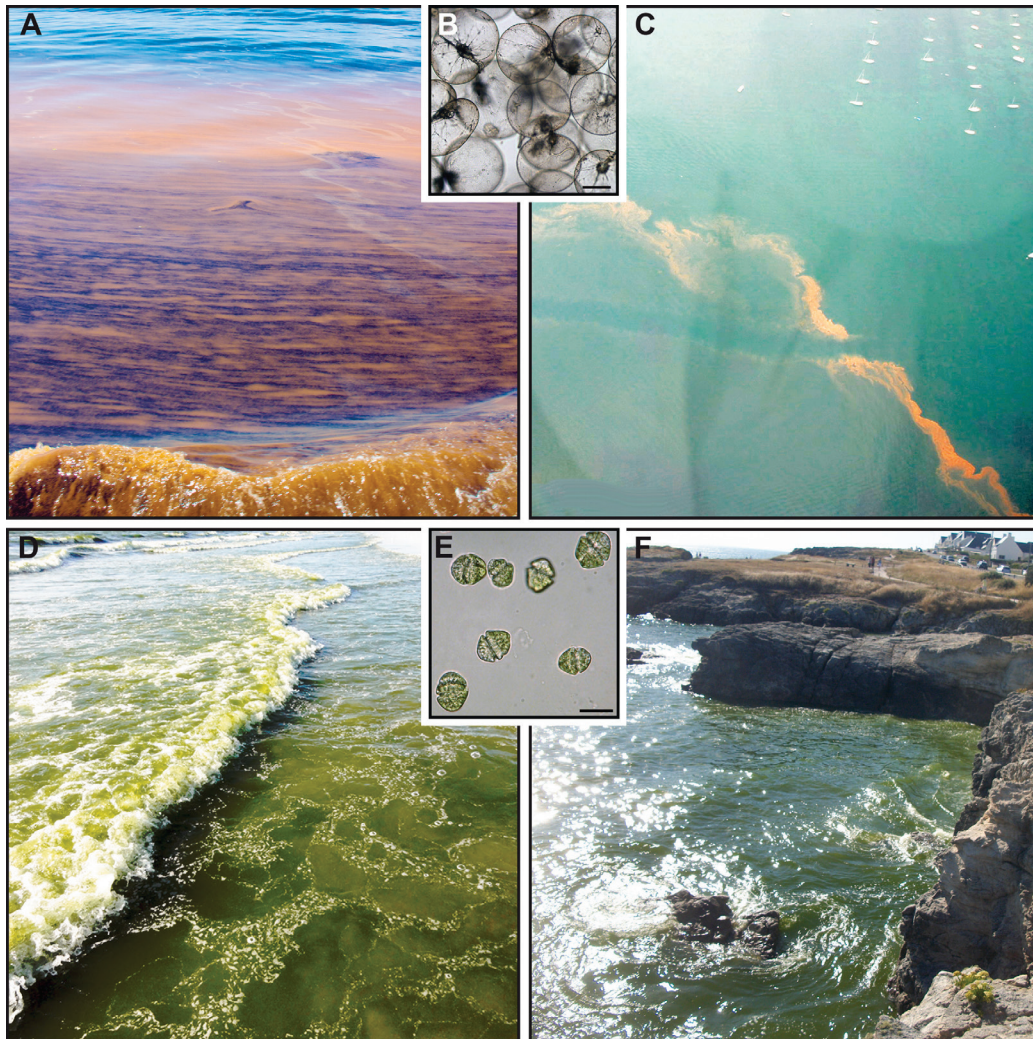


Figure 4. Photographies d'eaux colorées rouges (A, C) causées par *Noctiluca scintillans* (B, barre d'échelle : 50 µm). Photographies d'eaux colorées vertes (D, F), causées par *Lepidodinium chlorophorum* (E, barre d'échelle : 20 µm) (d'après Siano *et al.*, 2020).

3. Dinoflagellés

3.1. Distribution et écologie

Parmi les Alveolata, les dinoflagellés (ou Dinophytes ou Péridiniens) sont caractérisés par une large diversité morphologique associée à une importante variabilité écologique. En fonction de leurs caractéristiques morphologiques et de leur cycle de vie, ces dinoflagellés sont classés selon 9 grands ordres : les Gonyaulacales, les Péridinales, les Gymnodinales, les Suessiales, les Prorocentrales, les Dinophysiales, les Blastodinales, les Phytodinales et les Noctilucales. Actuellement, on compte environ 2000 à 2500 espèces décrites (Taylor *et al.*, 2008 ; Gómez, 2012). Ces dinoflagellés constituent l'un des principaux groupes de producteurs primaires à la base des réseaux trophiques en milieu marin (Falkowski *et al.*, 2004). En effet, on estime qu'environ 50% des espèces connues de dinoflagellés seraient photosynthétiques (Gómez, 2012). Par ailleurs, il a été démontré que l'abondance des différents ordres de dinoflagellés dépendrait principalement de leur classe de taille, avec des abondances plus importantes au sein du pico-plancton (Le Bescot *et al.*, 2016). Ces eucaryotes unicellulaires vivent sous forme libre planctonique ou benthique. Leurs stratégies trophiques sont très diversifiées, pouvant mêler autotrophie, hétérotrophie et mixotrophie (Stoecker, 1999 ; Price *et al.*, 2016). Bien que le mode de vie libre soit le plus couramment observé chez les dinoflagellés (Gómez, 2012), ces derniers peuvent également être impliqués dans différents types d'interactions avec d'autres organismes tels que : la symbiose (récifs coralliens notamment ; Pearse and Muscatine, 1971), la kleptoplastie (utilisation des chloroplastes d'un organisme par un autre organisme; Minnhagen *et al.*, 2008), ainsi que le parasitisme (Park *et al.*, 2004).

Les dinoflagellés sont caractérisés par la présence de deux flagelles leur permettant de nager (Figure 5). Ces deux flagelles, l'un transversal (le long du cingulum) et l'autre longitudinal (provenant du sulcus), induisent un déplacement de la cellule selon un mouvement hélicoïdal (Fenchel, 2001). Cette capacité de nage permet ainsi à la cellule de se déplacer dans la colonne d'eau à la recherche de nutriments ou de se diriger vers une proie (Sheng *et al.*, 2010). De plus, certaines espèces sont caractérisées par la

présence d'une thèque composée de cellulose (Figure 5). On parle alors de dinoflagellés « armés » (Okolodkov and Dodge, 1997 ; Lee *et al.*, 2015). D'un point de vue intracellulaire, leur noyau (ou dinocaryon) contient des chromosomes condensés qui le rendent facilement observable en microscopie optique. De plus, le génome de ces protistes est caractérisé par une taille importante (de 0,2 à 200 pg d'ADN ; Veldhuis *et al.*, 1997; LaJeunesse *et al.*, 2005) et est constitué de séquences d'ADN répétées non codantes (Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 2005).

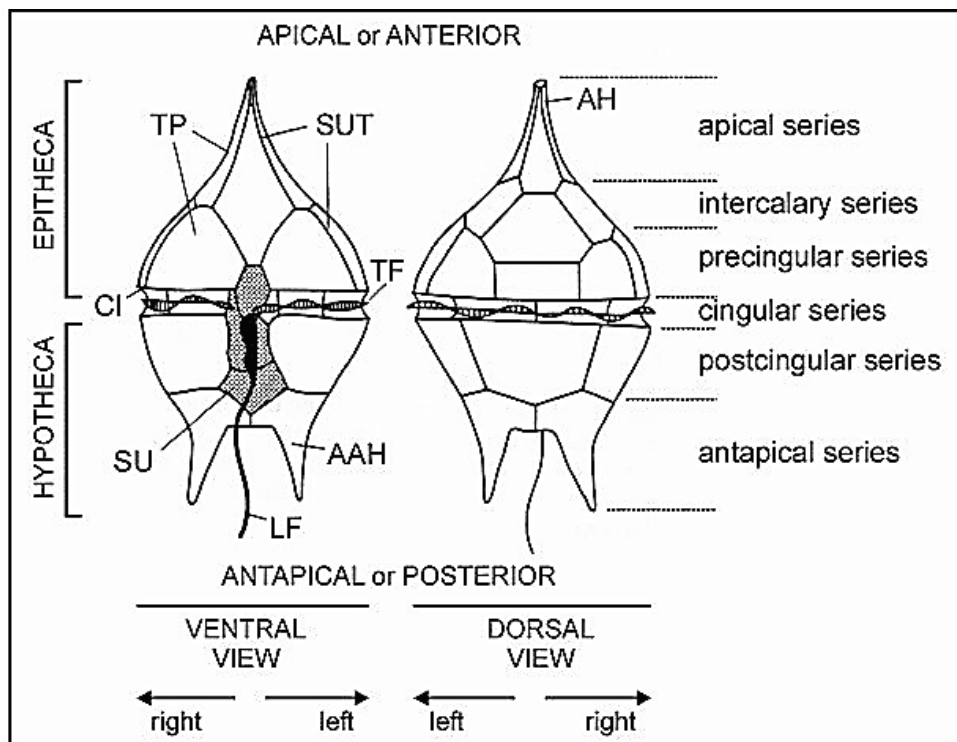


Figure 5. Principales caractéristiques morphologiques d'une cellule mobile typique d'un dinoflagellé « armé » (d'après Evitt, 1985). AAH : corne antapicale ; AH : corne apicale ; CI : cingulum ; LF : flagelle longitudinal ; SU : sulcus ; SUT : suture entre les plaques thécales ; TF : flagelle transversal ; TP : plaques thécales.

Les dinoflagellés sont répartis dans la plupart des écosystèmes aquatiques mondiaux (Murray *et al.*, 2016). La majorité de ces espèces sont marines (environ 90%) et plus particulièrement présentes dans les estuaires, lagunes et autres zones protégées (*i.e.*, faible turbulence). En effet, la turbulence peut diminuer la capacité de nage de ces organismes entraînant leur sédimentation (Havskum *et al.*, 2005). C'est pourquoi la stratification de la colonne d'eau, généralement associée à une augmentation de température estivale en zone tempérée, est considérée comme une condition physique

essentielle permettant l'initiation des efflorescences de dinoflagellés (Smayda, 2002a). En outre, de nombreuses efflorescences de dinoflagellés nuisibles tels que *Alexandrium catenella* (Giacobbe *et al.*, 1996 ; Anderson *et al.*, 2012 ; Yamamoto *et al.*, 2013 ; Condie *et al.*, 2019) et *Dinophysis* spp. (Velo-Suarez *et al.*, 2009 ; Díaz *et al.*, 2021) se produisent dans les eaux stratifiées de différents systèmes côtiers. D'autre part, la prolifération de dinoflagellés est souvent associée à des apports en nutriments importants provenant de l'environnement terrestre ou des remontées d'eaux profondes (*i.e.*, upwelling). En effet, la prolifération des dinoflagellés phototrophes apparaît principalement limitée par les éléments nutritifs tels que le phosphore et l'azote (Not *et al.*, 2012). En outre, certaines espèces sont capables de stocker ces nutriments, ce qui leur confère un avantage écologique par rapport à d'autres espèces (Labry *et al.*, 2008). Bien que les facteurs environnementaux favorisant les efflorescences de dinoflagellés en milieu côtier soient encore mal connus, ces proliférations pourraient être en partie liées à la germination de kystes de résistance représentant une caractéristique commune du cycle de vie de nombreux dinoflagellés.

3.2. Cycle de vie

La plupart des dinoflagellés présentent un cycle de vie reposant sur l'alternance entre une phase végétative planctonique et une phase de résistance, en général benthique (Figure 6). Globalement, la reproduction asexuée (Figure 6A) débute par une phase haploïde (n) au cours de laquelle une cellule mère va se diviser par mitose pour former plusieurs cellules filles identiques. Cependant, c'est la reproduction sexuée (Figure 6B) qui va permettre, via la production et la fusion de gamètes, la formation de planozygotes. Généralement, ces planozygotes diploïdes ($2n$) se transforment en kystes de résistance (hypnozygote) entourés d'une double membrane. Cette reproduction sexuée est donc une source de brassage génétique. Plus de 10% des 2000 espèces décrites de dinoflagellés marins seraient capables de former des kystes (Bravo and Figueroa, 2014).

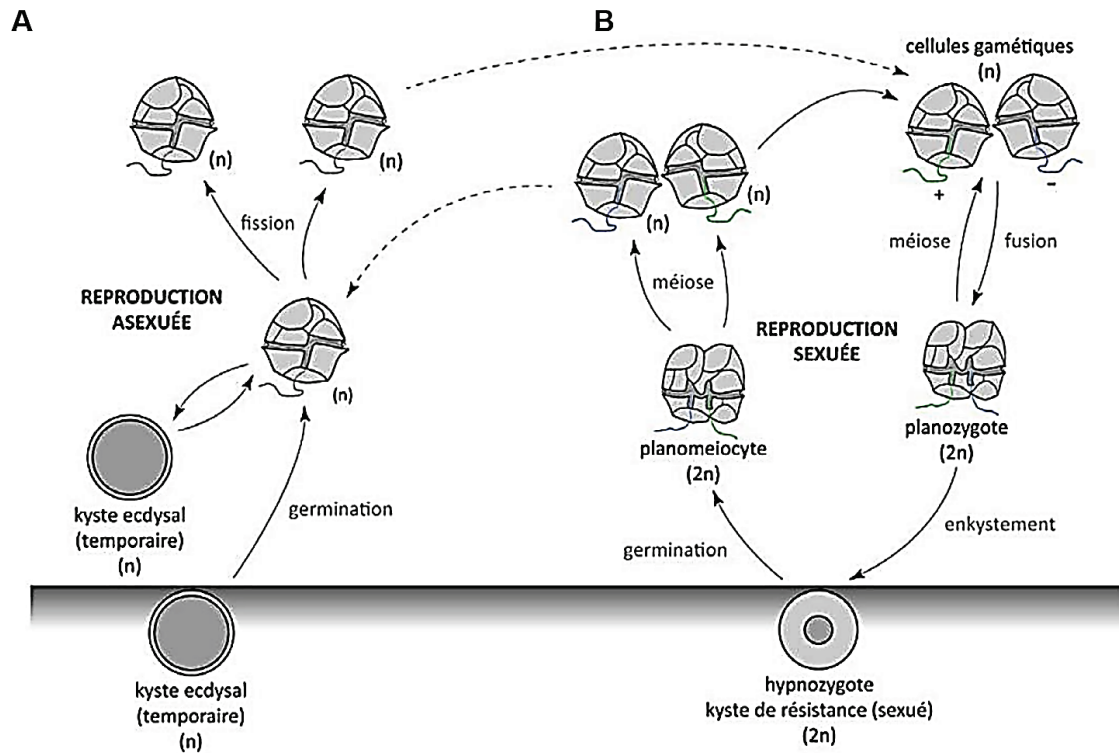


Figure 6. Représentation schématique du cycle de vie d'un dinoflagellé. **(A)** Reproduction asexuée. **(B)** Reproduction sexuée (d'après Le Bescot, 2014).

La reproduction sexuée (Figure 6B) est souvent déclenchée lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : modification de la salinité ou de la température, diminution des concentrations en nutriments ou de l'irradiance (Anderson, 1998 ; Moore *et al.*, 2015 ; Brosnahan *et al.*, 2020). Des kystes de résistance peuvent alors s'accumuler dans le sédiment et y rester pendant plusieurs années (Wyatt and Jenkinson, 1997) en attendant que des conditions environnementales propices à leur germination s'établissent. Généralement, une période de dormance « obligatoire » d'une durée variable (de 12 heures à 12 mois) et spécifique à chaque espèce est nécessaire avant une nouvelle germination de ces kystes (Anderson and Keafer, 1987; Kremp and Anderson, 2000). Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, les dinoflagellés peuvent re-germer et éventuellement initier une nouvelle efflorescence (Rengefors and Anderson, 1998).

Les cellules végétatives des dinoflagellés peuvent également s'enkyster temporairement (Figure 6A) afin de supporter de rapides variations des paramètres

environnementaux (Anderson, 1998). Pour ce faire, les cellules perdent leur thèque ainsi que leurs flagelles et s'arrondissent. Ces kystes haploïdes (n) sont dits « temporaires » (Bravo *et al.*, 2010). En effet, ils possèdent une unique membrane nommée pellicule (Sekida *et al.*, 2001) et n'ont pas de période de dormance obligatoire.

Toutefois, la formation de kystes benthiques n'a jamais été observé chez certains dinoflagellés appartenant par exemple aux genres *Dinophysis* ou *Prorocentrum* (Smayda and Trainer, 2010) alors même qu'ils sont connus pour produire des efflorescences. En effet, certaines espèces peuvent passer l'hiver en faibles concentrations cellulaires dans la colonne d'eau ($< 100 \text{ cells L}^{-1}$; Record *et al.*, 2021) en attendant le réchauffement et la stratification thermique de cette dernière pour proliférer (Gilbert *et al.*, 2018). Par exemple, l'espèce *Karenia mikimotoi* a été détectée en faibles concentrations dans des échantillons d'eau de mer prélevés en Rade de Brest au cours de la période hivernale ($5\text{-}10 \text{ cells L}^{-1}$; Gentien, 1998). Cette diversité d'espèces qui persistent à des niveaux indétectables dans la colonne d'eau forment la « biosphère rare » (Sogin *et al.*, 2006) pouvant se développer lors de fluctuations des paramètres environnementaux (Logares *et al.*, 2014). Il a donc été suggéré que certaines espèces de dinoflagellés ne formeraient pas de kystes benthiques et pourraient se maintenir dans la colonne d'eau, sous une forme de résistance pélagique, lorsque les conditions environnementales sont défavorables.

Malgré un grand nombre d'études, le cycle de vie de certains dinoflagellés reste relativement mal connu. En effet, certains stades du cycle de vie sont difficiles à identifier soit parce que : (i) ils présentent des similarités génétiques et morphologiques avec le stade végétatif (Figueroa and Bravo, 2014), (ii) ils sont présents en faible abondance et sur une courte durée, (iii) ou bien parce qu'on connaît mal les éléments à observer (Montresor *et al.*, 2016). De plus, il est difficile d'isoler des souches monoclonales du milieu naturel, de les maintenir en culture ainsi que de reconstituer *in vitro* les conditions environnementales complexes. Néanmoins, la connaissance du cycle de vie des espèces reste indispensable à la compréhension de la dynamique d'initiation des efflorescences. En particulier, la compréhension du cycle de vie des espèces nuisibles apparaît primordiale pour tenter d'identifier de potentielles zones et périodes à risque.

3.3. Évolution des plastes

Parmi les espèces de dinoflagellés connues, environ 50% seraient photosynthétiques (Gomez, 2012). La plupart d'entre eux possèdent des plastes dérivés d'algues rouges (Yoon *et al.*, 2005 ; Janouskovec *et al.*, 2010) contenant de la chlorophylle *a* et *c* ainsi qu'un caroténoïde particulier : la péricidine, issu d'une endosymbiose secondaire. Cependant, de multiples remplacements des plastes contenant de la péricidine, via des endosymbioses secondaires sérielles et/ou tertiaires (Figure 7), ont été observés au cours de l'évolution des dinoflagellés (Saldarriaga *et al.*, 2001).

La composition pigmentaire et les analyses phylogénétiques des gènes codés par les plastes ont permis d'identifier 5 types de plastes (Zapata *et al.*, 2012 ; Gavalès-Olea *et al.*, 2016) (Figure 7). Parmi eux, on retrouve : (i) les plastes contenant de la péricidine classiquement observés chez les dinoflagellés tel que *Alexandrium* sp., (ii) les plastes dérivés des Haptophyta représentés par les genres *Karenia*, *Karlodinium* et *Takayama* (Takishita *et al.*, 1999, 2000 ; Tengs *et al.*, 2000), (iii) les plastes dérivés des diatomées retrouvés au sein d'un petit groupe taxonomique comprenant *Durinskia baltica*, *Kryptoperidinium foliaceum* et *Peridinium quinquecorne* (Chesnick *et al.*, 1996 ; Horiguchi and Takano, 2006), (iv) les plastes dérivés des Cryptophyta observés au sein du genre *Dinophysis* (même s'ils pourraient également être acquis par kleptoplastie au cours du cycle de vie de la cellule), (v) les plastes dérivés des algues vertes chez les dinoflagellés du genre *Lepidodinium* (Watanabe *et al.*, 1987 ; Takishita *et al.*, 2008) (Figure 7). De par son évolution et donc de sa composition pigmentaire, le genre *Lepidodinium* occupe une place particulière parmi les dinoflagellés.

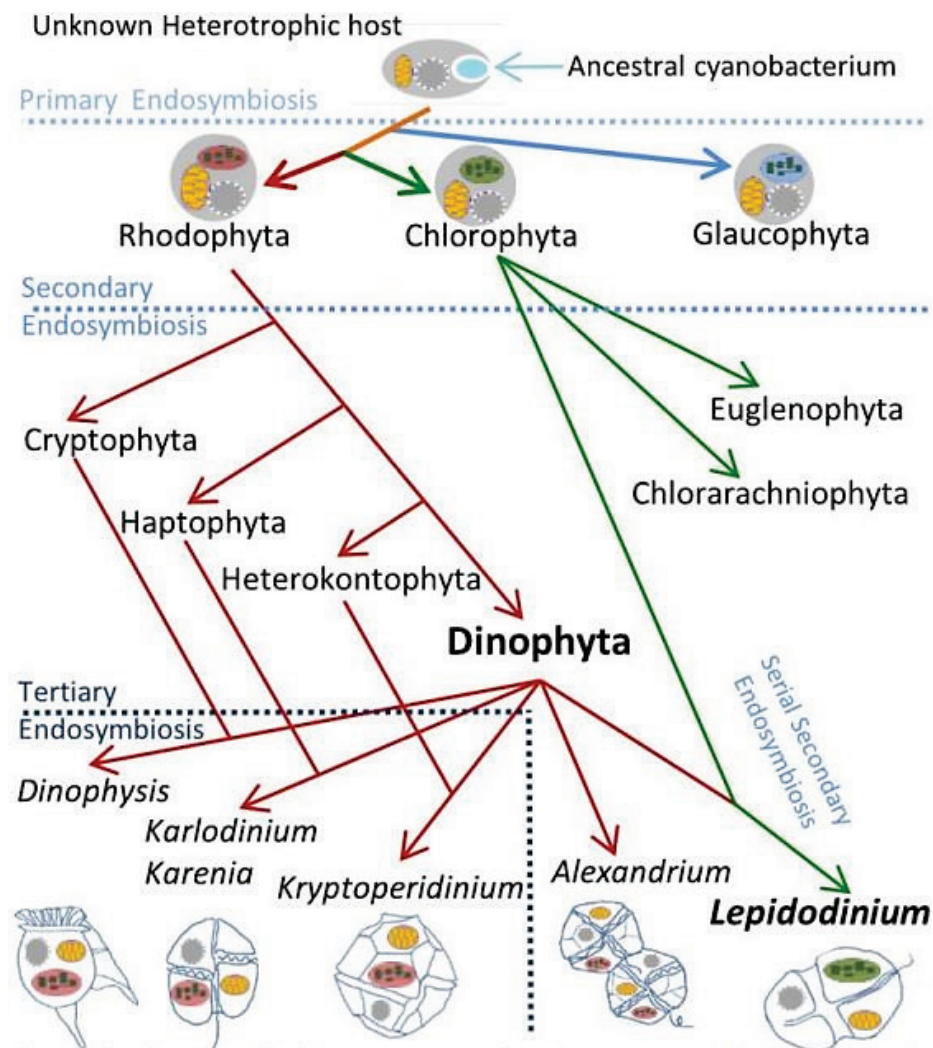


Figure 7. Représentation schématique de l'évolution des plastes des dinoflagellés. Les flèches rouges et vertes indiquent les lignées évolutives rouges et vertes. Les genres de dinoflagellés sont indiqués comme exemples de types de pigments tels que définis par Zapata *et al.*, 2012 (d'après Gavalás-Olea *et al.*, 2016).

4. L'espèce *Lepidodinium chlorophorum*, (Elbrächter and Schnepf) Hansen, Botes and Salas, 2007

Au sein des dinoflagellés, le genre *Lepidodinium* est reconnaissable par sa couleur verte qui lui est spécifique (Siano *et al.*, 2009). D'un point de vue phylogénétique, le genre *Lepidodinium* constitue un clade distinct, démontrant qu'il aurait suivi une lignée évolutive différente au sein des Gymnodiniales (Figure 8). Cette séparation monophylétique du clade *Lepidodinium* permet de bien identifier le genre à l'aide d'outils génétiques (qPCR et métabarcoding). A ce jour, seules deux espèces appartenant au genre *Lepidodinium* ont été identifiées à travers le monde : *L. viride* (Watanabe *et al.*, 1990) et *L. chlorophorum* (Elbrachter and Schnepf, 1996 ; Hansen, Botes and Salas, 2007). Les deux espèces possèdent des plastes verts et une gamme de taille similaire (Honsell and Talarico, 2004). Cependant, *L. viride* se distingue par la présence d'écailles à la surface de ses cellules qui ne sont pas présentes chez son congénère *L. chlorophorum* (Siano *et al.*, 2009).

Lepidodinium chlorophorum appartient à la classe des Dynophyceae, ordre des Gymnodiniales, genre *Lepidodinium*. Il s'agit d'un dinoflagellé « nu » car il ne possède pas de thèque (Waller and Kořený, 2017). Ses cellules sont de forme ovoïde dont la taille varie entre 18-33 µm en longueur et 12-18 µm en largeur (Elbrachter and Schnepf, 1996) (Figure 9). Cette espèce non-toxique présente une forte coloration verte en microscopie optique. En effet, *L. chlorophorum* est caractérisé par un contenu pigmentaire particulier composé de néoxanthine, violaxanthine, chlorophylle *a* et *b*, ainsi que d'un nouveau caroténoïde majoritaire (Zapata *et al.*, 2012). Ce dernier a été décrit par Gavalàs-Olea *et al.* (2016) et ainsi nommé lepidoxanthine. Le dinoflagellé *L. chlorophorum* est ainsi connu pour sa capacité à produire des eaux colorées vertes en milieu marin (Figure 10).

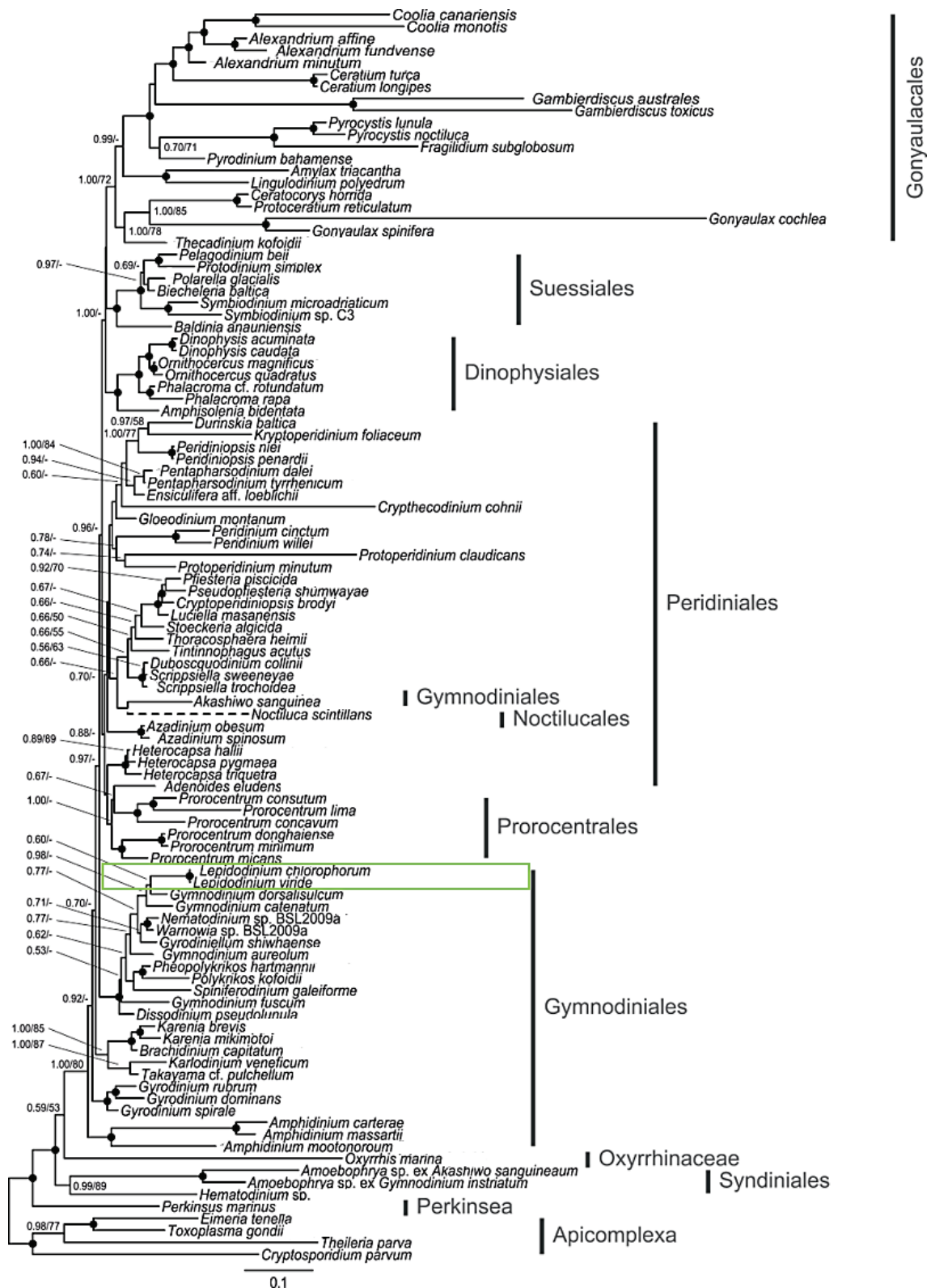


Figure 8. Arbre phylogénétique des dinoflagellés réalisé à partir de l'ADNr et de gènes de protéines nucléaires (d'après Orr *et al.*, 2012). Phylogénie concaténée, déduite à partir de : 18S+5,8S+28S+actine+beta+tubuline+hsp90. L'arbre phylogénétique est reconstruit en utilisant la méthode bayésienne.

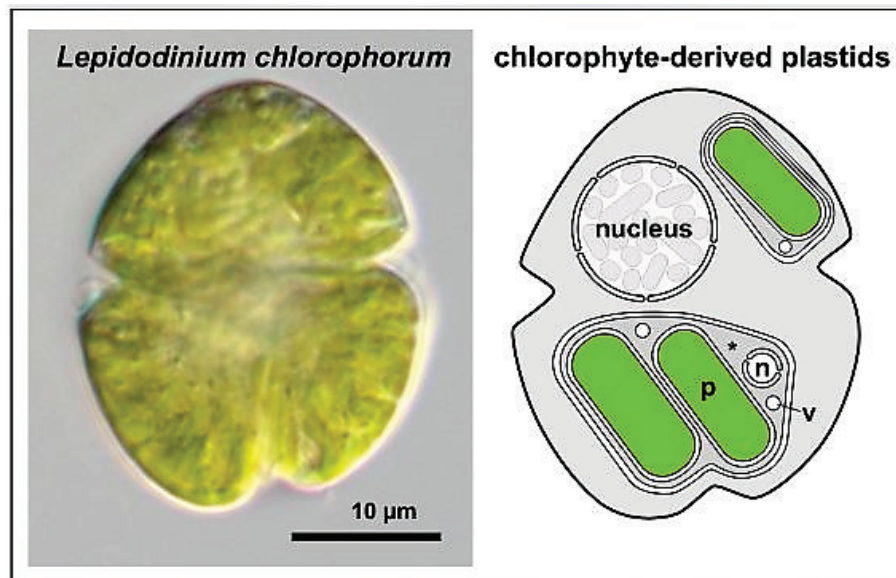


Figure 9. *Lepidodinium chlorophorum* contenant des plastes dérivés de chlorophytes. Les plastes (p) sont entourés de quatre membranes, avec une double membrane autour de chaque plaste, et une autre double membrane séparant l'endosymbionte de l'hôte. Entre ces doubles membranes se trouvent des structures reliques du cytoplasme de l'endosymbionte, dont des ribosomes apparents (*), des vésicules (v) et un possible nucléomorphe (n). Photographie de Kazuya Takahashi (Waller and Koreny, 2017).



Figure 10. Photographie aérienne d'une efflorescence de *L. chlorophorum* localisée à Préfailles (France, 44), le 1^{er} Aout 2014 (Minyvel, Yves Le Médec).

4.1. Classification de *Lepidodinium chlorophorum*

Dès 1987, Watanabe *et al.* ont étudié les caractéristiques morphologiques et structurales d'un nouveau dinoflagellé présentant une coloration verte. Ce dinoflagellé s'est révélé similaire aux membres constituant le genre *Gymnodinium* bien qu'il possède de fines écailles à sa surface et des chloroplastes différents de ceux généralement observés chez les dinoflagellés. En effet, une analyse pigmentaire avait mis en évidence en plus de la chlorophylle *a*, la présence de chlorophylle *b*, pigment inhabituel chez les dinoflagellés (Watanabe *et al.*, 1987). Les scientifiques ont alors suggéré que ces pigments pourraient provenir d'un endosymbionte issu de la lignée des prasinophyceae (Watanabe *et al.*, 1987). En 1990, les mêmes auteurs ont indiqué que ce dinoflagellé pourrait appartenir à la famille des Gymnodiniaceae (ordre : Gymnodiniales) et le nommèrent *Lepidodinium viride* (Watanabe *et al.*, 1990).

En parallèle, des recherches ont été menées sur une micro-algue responsable d'une importante coloration verte de l'eau de mer au large de Helgoland en mer du Nord au cours de l'été 1990. A cette époque, des efflorescences similaires avaient été observées en mer Adriatique (Honsell *et al.*, 1988) et sur la côte Atlantique ouest française (Sournia *et al.*, 1992). Ces événements ont été associés à la prolifération (78×10^6 cellules par litre d'eau de mer) d'un petit dinoflagellé gymnodinoïde présentant des plastes verts et décrit sous le nom de *Gymnodinium chlorophorum* par Elbrachter and Schnepf en 1996. Un contenu pigmentaire composé de chlorophylle *a* et *b* ainsi que de prasinoxanthine avait été observé tandis que l'absence de chlorophylle *c* et de péridinine avait été remarquée, suggérant que ce dinoflagellé comporterait un endosymbionte potentiellement issu de la lignée des algues vertes prasinophyceae (Elbrachter and Schnepf, 1996). Bien que *G. chlorophorum* soit très similaire à *L. viride*, l'absence d'écailles à sa surface avait entraîné son classement au sein du genre *Gymnodinium* (Elbrachter and Schnepf, 1996). C'est en 2007 qu'une analyse phylogénétique a démontré une étroite relation entre *L. viride* et *G. chlorophorum* (Hansen *et al.*, 2007 ; Figure 11). Sur la base d'analyses morphologiques, pigmentaires et phylogénétiques, le genre *Lepidodinium* a donc été modifié pour englober l'espèce *Lepidodinium chlorophorum* (Hansen *et al.*, 2007). Toutefois, à ce jour, aucune

étude n'a proposé d'hypothèse permettant d'expliquer la présence d'écailles chez *L. viride* contrairement à son congénère *L. chlorophorum*.

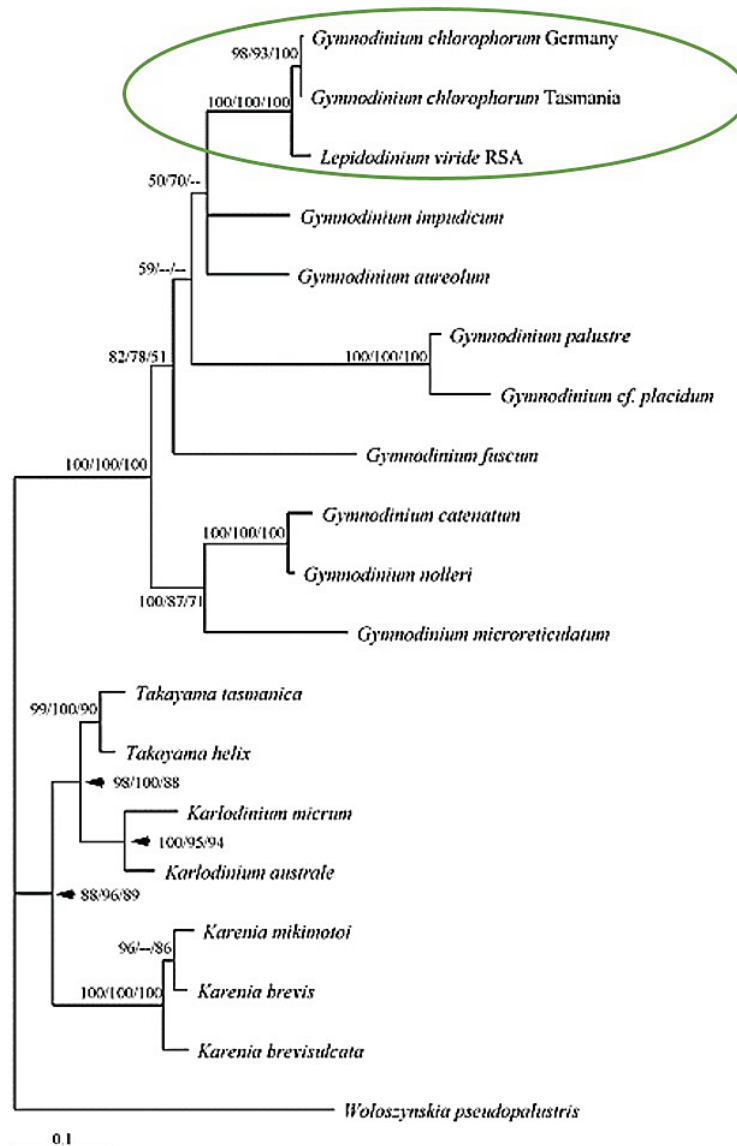


Figure 11. Analyse phylogénétique du genre *Gymnodinium* incluant *Lepidodinium*, utilisant la méthode bayésienne, avec *Wołoszynskia pseudopalustris* comme groupe extérieur. Longueur de l'arbre = 1130 ; CI = 0,629 ; RI = 0,691 ; HI = 0,371. Le clade formé par *G. chlorophorum* et *L. viride* (cercle vert) est caractérisé par une valeur de soutien très élevée et se trouve être le plus proche de *G. aureolum* et *G. impudicum*. Donc, *L. viride* forme un groupe frère de *G. chlorophorum* et diffère de cette espèce par 3,75% de sa séquence LSU partielle. La distance génétique entre *L. viride* et *G. chlorophorum* est considérablement moins importante qu'entre de nombreuses espèces du genre *Gymnodinium* incluses dans l'analyse (d'après Hansen *et al.*, 2007).

La présence de pigments verts, notamment la chlorophylle *b*, chez les membres du genre *Lepidodinium* suggère un remplacement des plastes chez ces dinoflagellés au cours de leur évolution (Watanabe *et al.*, 1987). *L. viride* et *L. chlorophorum* possèdent en effet des plastes entourés de quatre membranes contenant des génomes plastidiques ayant une affinité phylogénétique importante avec les algues vertes. Dans un premier temps, une étude concernant la phylogénie des gènes codés par les plastes de *L. chlorophorum* a confirmé que ces derniers étaient bien dérivés d'un membre du groupe des Chlorophyta, sans toutefois pouvoir préciser davantage son origine (Takishita *et al.*, 2008). De plus, Minge *et al.* (2010) ont démontré que *L. chlorophorum* exprimait des protéines plastidiques ayant des origines diverses, probablement acquises par transfert endosymbiotique de gènes (Minge *et al.*, 2010). Bien qu'une première hypothèse basée sur la présence de prasinoxanthine suggérait que les plastes verts de *L. chlorophorum* pourraient être le vestige d'un prasinophyceae endosymbiotique, des analyses phylogénétiques plus récentes ont établi que cet endosymbionte appartiendrait finalement au groupe des algues vertes pedinophyceae (Matsumoto *et al.*, 2011, 2012 ; Kamikawa *et al.*, 2015 ; Jackson *et al.*, 2018). En effet, Matsumoto *et al.* (2012) ont étudié la composition pigmentaire d'une culture de *L. chlorophorum* (NIES-1868) et n'ont trouvé aucune trace de prasinoxanthine. Ce résultat était cohérent avec des analyses phylogénétiques menées précédemment ayant exclu les prasinophyceae des candidats potentiels (Matsumoto *et al.*, 2011). Enfin, une analyse phylogénétique de 52 protéines codées par les plastes de *L. chlorophorum* a rapproché cette espèce exclusivement d'un pedinophyceae, *Pedinomonas minor*, indiquant que les plastes verts du genre *Lepidodinium* étaient bien dérivés d'un pedinophyceae endosymbiotique ou d'une algue verte étroitement liée aux pedinophyceae (Kamikawa *et al.*, 2015). Ce résultat a été confirmé par Jackson *et al.* (2018) lors de la mise en place d'analyses plus poussées sur la phylogénie des plastes. Des analyses d'horloge moléculaire ont également permis de préciser la chronologie probable des événements d'endosymbiose secondaire, estimant à ~ 553 Ma la divergence de la lignée plastidiale de *Lepidodinium* par rapport à ses sœurs pedinophyceae (Jackson *et al.*, 2018).

4.2. Méthodes de détection

4.2.1. Microscopie optique

En France, *L. chlorophorum* est observé et quantifié depuis 1984 par le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) créé par l'Ifremer, en particulier sur la côte Atlantique (Belin and Soudant, 2018). La coloration verte des cellules de *L. chlorophorum* les rend facilement observables et identifiables en microscopie optique au sein d'échantillons naturels non fixés. Cependant, l'utilisation de fixateurs tels que le Lugol (acide) a tendance à atténuer cette coloration verte et à modifier la forme de la cellule (Schapira *et al.*, 2021). Ainsi, cette méthode de fixation, utilisée en routine dans le cadre de la surveillance REPHY, rend les cellules difficilement identifiables en microscopie optique et plus particulièrement en début d'efflorescence lorsque les abondances cellulaires sont relativement faibles dans la colonne d'eau.

4.2.2. Contenu pigmentaire

Le contenu pigmentaire spécifique de *L. chlorophorum* permet d'identifier ses efflorescences par imagerie satellitaire (Morozov *et al.*, 2013 ; Sourisseau *et al.*, 2016). Au Chili, de grandes efflorescences de *L. chlorophorum* ont été détectées par satellite (programme Copernicus) au cours de l'été austral 2020 (Rodriguez-Benito *et al.*, 2020). En France, Sourisseau *et al.* (2016) ont développé des indices permettant d'identifier *L. chlorophorum* grâce aux données satellitaires. De cette manière, les scientifiques ont pu mettre en évidence la régularité de ces efflorescences et leur étendue le long de la côte Atlantique française (Sourisseau *et al.*, 2016). Cependant, cette technique présente certaines limites. En effet, la couverture nuageuse et l'importante turbidité mesurée en milieu côtier peuvent perturber le signal. De plus, *L. chlorophorum* serait capable de réaliser des migrations verticales dans la colonne d'eau (Sournia *et al.*, 1992). Or, les données acquises grâce à l'imagerie satellitaire ne concernent que la couche d'eau de mer

de surface. Donc, cette méthode d'observation ne peut informer que partiellement de la dynamique spatiale et temporelle de ce dinoflagellé (Schapira *et al.*, 2021).

L'identification et l'estimation de la biomasse de cette espèce par analyse pigmentaire a également été envisagée, notamment via la détection de la lepidoxanthine (Gavalàs-Olea *et al.*, 2016), qui pourrait être un marqueur spécifique. Cependant, la quantité de lepidoxanthine par cellule de *L. chlorophorum* serait insuffisante pour être détectée lorsque les abondances cellulaires sont faibles en milieu naturel. A notre connaissance, aucune étude n'a tenté de développer une telle méthode de détection.

Compte tenu de la spécificité du contenu pigmentaire de *L. chlorophorum*, la méthode de cytométrie en flux a été évaluée pour l'identification et l'énumération des cellules. En Baie de Seine, la signature cytométrique spécifique de cette espèce a permis d'identifier cette dernière parmi les autres groupes phytoplanctoniques en milieu naturel (Serre-Fredj *et al.*, 2021). Cependant, le dénombrement de *L. chlorophorum* par cytométrie en flux a montré une importante variabilité des abondances cellulaires par rapport à la microscopie optique soulignant la difficulté d'obtenir un dénombrement rigoureux des cellules de cette espèce en cytométrie en flux (Schapira *et al.*, 2021).

4.2.3. Sciences participatives

Les sciences participatives peuvent également permettre de recueillir des informations sur les efflorescences d'espèces engendrant une coloration visible de l'eau de mer (cf. Figure 4). C'est le cas des efflorescences de *L. chlorophorum* qui sont visibles à l'œil nu. Les usagers du littoral peuvent donc aider les scientifiques à recueillir des données sur ces phénomènes d'eaux colorées vertes. En France, le programme de surveillance citoyenne Phenomer (www.phenomer.org), porté par l'Ifremer depuis l'été 2013, a permis de recenser des eaux colorées vertes s'étant développées en dehors de stations fixes de suivi des communautés phytoplanctoniques échantillonnées en routine (Siano *et al.*, 2020). Cependant, les efflorescences phytoplanctoniques colorées sont parfois très localisées et fugaces. Certaines limites inhérentes à cette pratique ont été mises en évidence par Siano *et al.* (2020) telles que (i) l'identification d'un phénomène « anormal »

(couleur inhabituelle de l'eau de mer) par le grand public, (ii) la réactivité des citoyens face aux risques écologiques potentiels ainsi que, (iii) la rapidité d'analyse en laboratoire d'une grande quantité d'échantillons d'eau de mer.

4.2.4. ADN environnemental

Plus récemment, le développement de méthodes de biologie moléculaire a permis de détecter de manière précise les espèces présentes dans les communautés phytoplanctoniques *in situ*. En particulier, l'ADN environnemental contribue à caractériser de manière exhaustive les communautés de protistes marins ainsi qu'à identifier les taxa présents en faibles abondances dans la colonne d'eau et les kystes présents dans les sédiments. L'ADN environnemental est défini comme le matériel génétique présent dans des échantillons naturels incluant les organismes entiers, les cellules mais aussi l'ADN extracellulaire (Ficetola *et al.*, 2008 ; Barnes and Turner, 2016 ; Ruppert *et al.*, 2019 ; Pawlowski *et al.*, 2021). Cet ADN environnemental peut être étudié par metabarcoding : une méthode génétique semi-quantitative basée sur l'amplification et le séquençage à haute fréquence d'une région spécifique de l'ADN ribosomique (*e.g.*, 16S pour les bactéries, 18S pour la plupart des eucaryotes ou ITS pour les champignons) (Dollive *et al.*, 2012 ; Taberlet *et al.*, 2012 ; Segata *et al.*, 2013). Les analyses de l'ADN environnemental peuvent ainsi compléter les méthodes microscopiques classiques en révélant une plus grande diversité et en augmentant la résolution taxonomique (Deiner *et al.*, 2017). Plus spécifiquement, le genre *Lepidodinium* a déjà été identifié dans des jeux de données issus d'analyses en metabarcoding de l'ADN environnemental réalisées dans différentes zones géographiques (Gran-Stadniczeňko *et al.*, 2018 ; Mitra *et al.*, 2021 ; Georges *et al.*, 2021 ; Qiu *et al.*, 2021). Bien que le metabarcoding de l'ADN environnemental fournisse une caractérisation plus exhaustive des communautés de protistes, cette technique présente elle aussi des limites qui peuvent complexifier l'interprétation de ces données, par exemple (i) l'origine de l'ADN étudié (intra ou extracellulaire) ou encore (ii) la persistance de l'ADN dans l'eau de mer (Drouet *et al.*, 2021). D'autres méthodes génétiques pourraient permettre une détection quantitative et spécifique de l'espèce *L. chlorophorum* (*e.g.*, FISH,

qPCR). Cependant, de telles méthodes n'ont pas encore été développées pour ce genre de dinoflagellé ni pour les deux espèces qui le composent.

L'étude de la phénologie de *L. chlorophorum* nécessite donc le déploiement de différentes méthodes de détection. Ces difficultés d'observation peuvent en partie être à l'origine du peu d'informations acquises jusqu'à présent concernant la distribution et l'écologie de cette espèce.

4.3. Distribution

Très peu d'études ont été menées sur la distribution de *L. chlorophorum* et peu d'observations de cette espèce ont été recensées à travers le monde (Figure 12). Jusqu'à présent, les deux espèces du genre *Lepidodinium* ont principalement été observées en zones tempérées (Figure 12). Cependant, un effort d'échantillonnage accru apparaît nécessaire pour mieux appréhender l'aire de répartition du genre *Lepidodinium* à l'échelle mondiale.

Plus spécifiquement, une première souche de l'espèce *L. viride* a été isolée en 1985 sur la côte nord du Japon (souche Y-100 ; Watanabe *et al.*, 1987) tandis qu'une suivante a été découverte en Afrique du sud en 1997 (souche CTCC 17 ; Hansen *et al.*, 2007). Néanmoins, *L. viride* a principalement été observé en mer Méditerranée (Figure 12), notamment dans le Golfe de Naples (Italie ; Siano *et al.*, 2009) et le long de la côte Catalane (Espagne ; René, 2014 ; Sampedro *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, cette espèce n'a cependant jamais été détectée le long de la côte Atlantique française.

La distribution de l'espèce *L. chlorophorum* est relativement mieux répertoriée à travers le monde (Figure 12). Bien que de rares études aient mis en évidence la présence de cette espèce en zone tropicale, notamment dans le Golfe de Californie (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014), en mer Rouge (Georges *et al.*, 2021) ainsi que le long de la côte Pakistanaise (Khokhar *et al.*, 2021), cette dernière a principalement été observée en zone tempérée. En effet, *L. chlorophorum* a été identifié le long de la côte Algérienne (Illoul *et al.*, 2008) tandis que Takishita *et al.* (2008) ont pu isoler une cellule de cette espèce en

mer de Chine orientale (souche NIES-1867). De rares observations ont également montré la présence de cette espèce au niveau des côtes de la Tasmanie (Hansen *et al.*, 2007 ; McCarthy, 2013) ainsi que près des côtes d'Amérique du sud comme par exemple, au Chili (Iriarte *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Benito *et al.*, 2020) et en Argentine (Uhart *et al.*, 2009). En Europe, certains travaux ont permis de recenser la présence de *L. chlorophorum* en mer Adriatique (Honsell and Talarico, 2004), en mer du Nord (Elbrächter and Schnepf, 1996), le long de la côte Belge (Mitra *et al.*, 2021) ou encore au Danemark (Karlson *et al.*, 2021). Cependant, la présence de *L. chlorophorum* est bien mieux documentée en Manche (Napoléon *et al.*, 2014 ; Serre-Fredj *et al.*, 2021) et dans le Golfe de Gascogne (Sournia *et al.*, 1992 ; Sourisseau *et al.*, 2016 ; Benedetti *et al.*, 2019 ; Belin *et al.*, 2021).

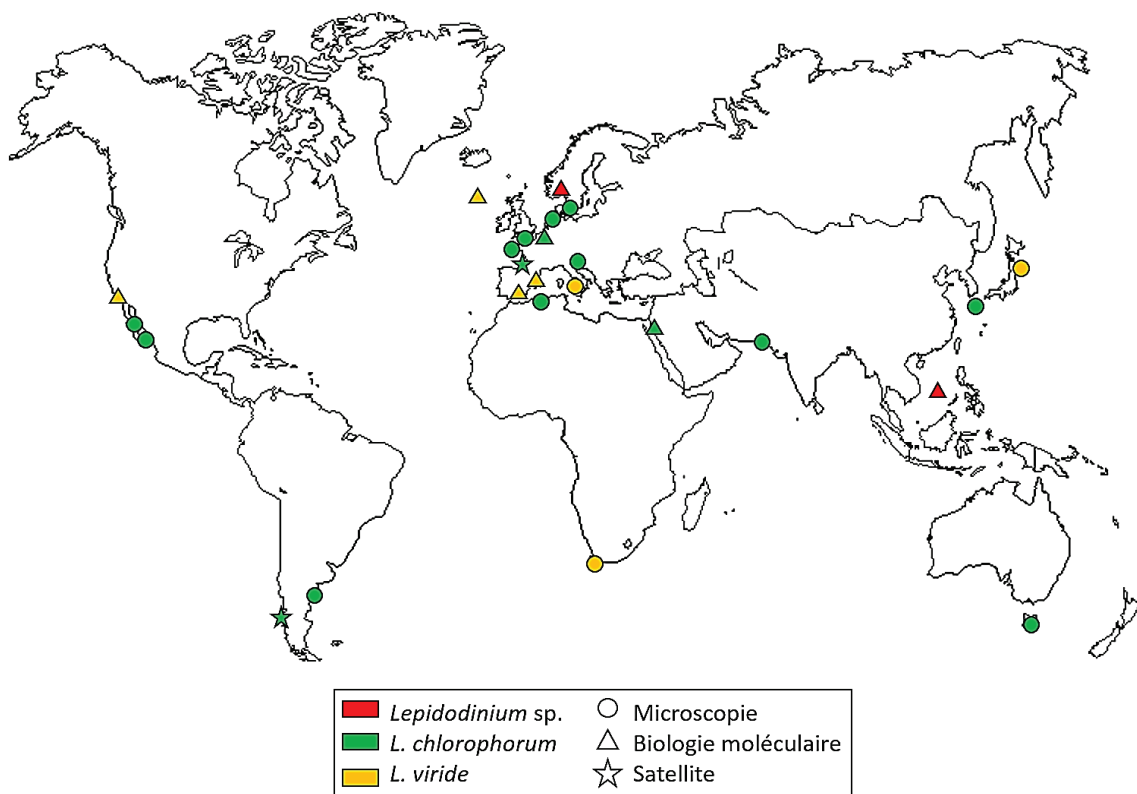


Figure 12. Recensement des observations du genre *Lepidodinium* (en rouge) et des deux espèces *L. viride* (en jaune) et *L. chlorophorum* (en vert) selon les différentes techniques de détection utilisées : microscopie (cercles), biologie moléculaire (triangles) et observation satellitaire (étoiles).

En France, les données issues du réseau de surveillance REPHY ont montré que des proliférations accrues de *L. chlorophorum* (concentrations cellulaires $> 10^6$ cellules par litre d'eau de mer) se produisent régulièrement en Bretagne sud (Belin *et al.*, 2021 ; Figure 13). Depuis le premier épisode d'eau colorée verte à *L. chlorophorum* observé en 1982 (Sournia *et al.*, 1992), ces événements ont lieu presque chaque année.

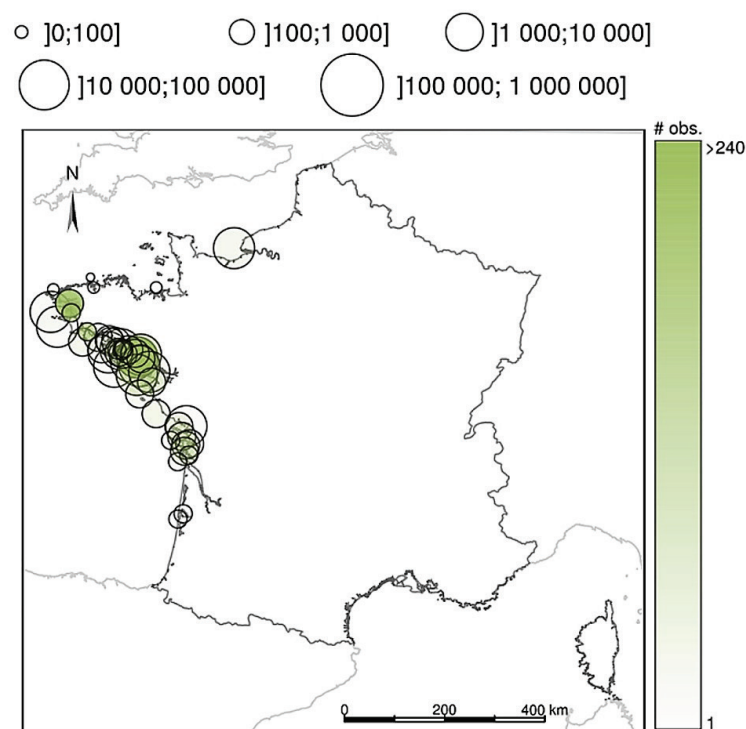


Figure 13. Cartographie résumant les observations de *L. chlorophorum* dans le cadre du réseau de surveillance REPHY sur la période allant de 1999 à 2018. Les résultats sont présentés par gamme de concentrations, en cellules par litre d'eau de mer. La taille des symboles est proportionnelle au P90 de la concentration cellulaire. La transparence des cercles varie linéairement avec le nombre d'observations de *L. chlorophorum* (cercle transparent = 1 observation ; cercle opaque = 240 observations) (d'après Belin *et al.*, 2021).

Les observations référencées dans le cadre du projet de science participative Phenomer ont confirmé que les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* étaient les phénomènes les plus fréquemment détectés sur le secteur entre 2013 et 2015 (Siano *et al.*, 2020) (Figure 14). Sur le même secteur, le projet Phenomer a également permis de recenser des eaux colorées vertes entre 2016 et 2018. Enfin, un inventaire des eaux colorées observées sur cette zone a mis en évidence une augmentation de la fréquence des épisodes d'eaux colorées vertes depuis les années 1980 (Projet DIETE ; Souchu *et al.*,

2018). Ces proliférations apparaissent donc récurrentes et massives sur le secteur côtier de Bretagne sud (Souchu *et al.*, 2018; Siano *et al.*, 2020).

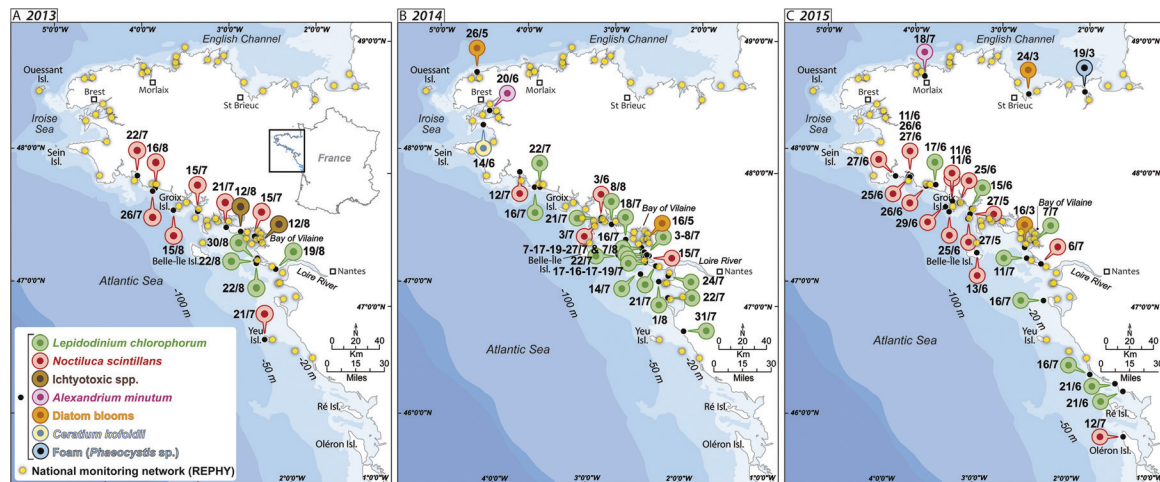


Figure 14. Eaux colorées signalées par les citoyens en 2013, 2014 et 2015 et taxons dominants identifiés par les taxonomistes phytoplanctoniques du consortium Phenomer dans les échantillons d'eau. Les stations d'échantillonnage du système national de surveillance du phytoplancton REPHY de l'Ifremer sont également indiquées (Siano *et al.*, 2020).

Cette zone côtière de Bretagne sud (Figure 15), sous l'influence des panaches de la Loire et de la Vilaine, est un secteur très impacté par le phénomène d'eutrophisation anthropique (Ratmaya *et al.*, 2019). En outre, la Loire est le plus long fleuve de France (1012 km) avec un bassin versant de 117 000 km² tandis que le bassin versant de la Vilaine représente un dixième de sa taille, avec une superficie de 10 800 km². La Loire et la Vilaine sont donc les principales sources de nutriments dans le nord du Golfe de Gascogne et jouent un rôle majeur dans l'eutrophisation des eaux côtières du sud de la Bretagne (Guillaud *et al.*, 2008 ; Ménesguen *et al.*, 2018, 2019). L'eutrophisation anthropique est définie comme l'ensemble des réponses biogéochimiques d'un écosystème aquatique à un enrichissement en nutriments, azote et phosphore (Smith, 2003 ; Pinay *et al.*, 2017), se manifestant par une augmentation de la production de matière organique (Nixon, 1995 ; Cloern, 2001). L'enrichissement des écosystèmes aquatiques en nutriments est majoritairement provoqué par les rejets d'eaux usées domestiques et industrielles et les activités agricoles. Or, l'augmentation de la biomasse phytoplanctonique ainsi que l'intensification et la multiplication des efflorescences d'espèces phytoplanctoniques

toxiques ou nuisibles peuvent être des symptômes de l'eutrophisation couramment observés à l'échelle globale (Cloern, 2001 ; Heisler *et al.*, 2008 ; Glibert *et al.*, 2011).

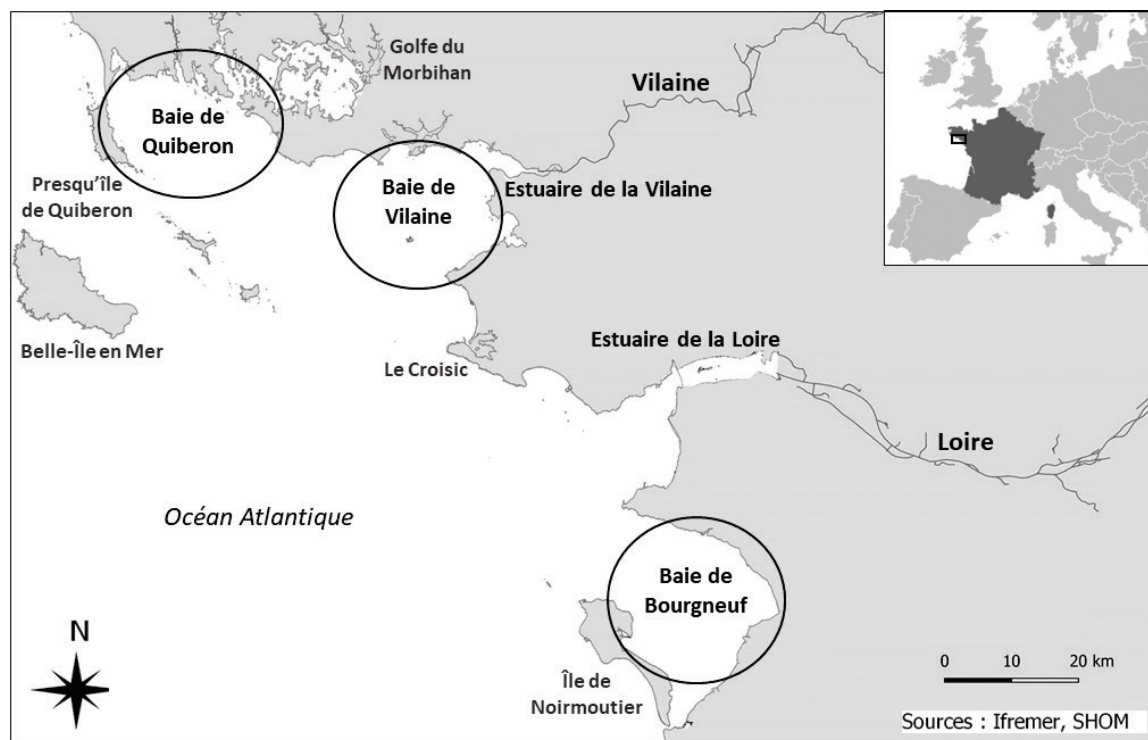


Figure 15. Zone côtière de Bretagne sud (France, Atlantique Nord-Est) s'étendant de l'Île de Noirmoutier (Vendée) à la Presqu'île de Quiberon (Morbihan). Cette zone se trouve sous l'influence des panaches de la Loire et de la Vilaine. Les baies de Bourgneuf, Quiberon et Vilaine sont localisées.

4.4. Écologie

Tout comme sa distribution, l'écologie de *L. chlorophorum* est relativement mal connue car cette espèce reste très peu étudiée de nos jours. En France, ce dinoflagellé non-toxique est principalement présent en Bretagne sud et à proximité de l'estuaire de la Loire (Sournia *et al.*, 1992 ; Belin *et al.*, 2021 ; cf. Figure 15). Il est observé d'Avril à Novembre dans la colonne d'eau avec des abondances maximales enregistrées en période estivale (Sourisseau *et al.*, 2016), pouvant atteindre des concentrations excédant 10 millions de cellules par litre d'eau de mer (Belin *et al.*, 2021). Cependant, de rares efflorescences ont déjà été observées au début du printemps, lorsque l'intensité lumineuse commence à augmenter (Karasiewicz *et al.*, 2020). En milieu contrôlé, il a été

suggéré que ce dinoflagellé pouvait supporter d'importantes variations de température (12 à 30°C ; Claquin *et al.*, 2008) indiquant qu'il s'agit d'une espèce eurythermale. De plus, *L. chlorophorum* se développe principalement dans les eaux côtières sous l'influence de panaches fluviaux (Sournia *et al.*, 1992 ; Sourisseau *et al.*, 2016). Le dinoflagellé *L. chlorophorum* est donc considéré comme une espèce euryhaline. De manière plus générale, une étude récente a décrit la niche écologique de ce dinoflagellé qui se caractérise par des conditions environnementales estivales (*i.e.*, irradiance, salinité et température élevées associées à de faibles concentrations en nutriments ; Karasiewicz *et al.*, 2020). D'autre part, des études ont suggéré que *L. chlorophorum* pourrait être capable de migrer dans la colonne d'eau. En effet, dans le Golfe de Gascogne, Sourisseau *et al.* (2016) ont enregistré de fortes abondances de *L. chlorophorum* ($< 10^6$ cells L⁻¹ à 25m de profondeur) localisées au niveau de la pycnocline lorsque la colonne d'eau était stratifiée. Toutefois, la migration verticale n'a jamais été directement observée pour cette espèce.

Les connaissances concernant les conditions nutritives soutenant la croissance de *L. chlorophorum* restent parcellaires. A l'instar de nombreux dinoflagellés (Bressler and Ahmed, 1984), *L. chlorophorum* pourrait avoir une forte affinité pour l'ammonium. En effet, une étude *in situ* menée au sud du Chili a mis en évidence l'activité de la glutamine synthétase, principale enzyme assimilant l'ammonium, au sein d'une efflorescence de *L. chlorophorum* (Iriarte *et al.*, 2005).

D'autre part, la présence d'un pédoncule d'alimentation chez *L. chlorophorum* (cité comme *Gymnodinium chlorophorum*) a été observée pour la première fois en 2005 par microscopie électronique, suggérant que cette espèce pourrait être mixotrophe (Hansen and Moestrup, 2005). Cependant, l'utilisation réelle de ce pédoncule par les cellules n'a jamais été observée. Par la suite, certaines études menées en laboratoire en conditions contrôlées ont utilisé le genre *Lepidodinium* comme prédateur (Wai *et al.*, 2017 ; Deng *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2021). Comme pour de nombreux autres dinoflagellés, Liu *et al.* (2021) ont suggéré que le genre *Lepidodinium* serait mixotrophe facultatif, c'est-à-dire qu'il présenterait un mode de vie phototrophique obligatoire mais pourrait ajuster son alimentation phagocytaire en fonction des concentrations en nutriments inorganiques présentes dans le milieu. Dans le contexte du réchauffement climatique, ces mêmes chercheurs ont formulé l'hypothèse selon laquelle les mixotrophes, tels que *Lepidodinium*

sp., deviendraient plus hétérotrophes et présenteraient des taux de croissance plus élevés dans les océans en cours de réchauffement (Liu *et al.*, 2021). Cependant, ces travaux ont été menés sur le genre *Lepidodinium* sans préciser davantage l'espèce étudiée et, à notre connaissance, la mixotrophie n'a pas encore été clairement établie chez l'espèce *L. chlorophorum*.

Concernant le cycle de vie de *L. chlorophorum*, l'existence de kystes de résistance a été suggérée par les observations de Sournia *et al.* (1992). En effet, Sournia *et al.* (1992) auraient observé des kystes dans des échantillons d'eau de mer frais ainsi que dans des échantillons conservés au formol et au glutaraldéhyde. Toutefois, la fixation des échantillons pourrait avoir induit un enkystement. Les scientifiques ont décrit des kystes sphériques présentant une double membrane et dont le noyau reste visible à l'intérieur (Sournia *et al.*, 1992) (Figure 16). Par ailleurs, aucune germination de kystes n'avait alors été observée à partir d'échantillons d'eau de mer au cours d'une incubation *in vitro* de 3 mois en laboratoire (Sournia *et al.*, 1992). Ainsi, la formation de kystes benthiques par *L. chlorophorum* n'a pas été clairement établie. Comme pour d'autres dinoflagellés, la formation de stades de résistance pélagiques ne peut donc pas être exclue.



Figure 16. Kystes provenant d'une station d'échantillonnage d'eau de mer située La Brèche d'Hermanville (Calvados, France) maintenus en culture de laboratoire. Diamètre = 19-21 μm (Ch. Billard) (Sournia *et al.*, 1992).

Afin de mieux comprendre les déterminismes des efflorescences de *L. chlorophorum*, il reste donc à mettre en évidence les facteurs environnementaux contrôlant la dynamique spatio-temporelle de ce dinoflagellé. De plus, la question se pose de savoir si ces efflorescences de *L. chlorophorum* pourraient dériver d'une germination et/ou de la prolifération de formes de résistance de l'espèce.

4.5. Particules exo-polymériques transparentes (TEP) : un trait biologique particulièrement développé chez *L. chlorophorum*

Les micro-organismes marins, autotrophes et hétérotrophes, peuvent excréter de grandes quantités de carbone sous la forme de substances polymériques extracellulaires (Extracellular Polymeric Substances ; EPS). En effet, chez les organismes phytoplanctoniques, une part non négligeable du carbone fixé au cours de la photosynthèse n'est pas intégrée dans les composés structurels, fonctionnels ou de réserve des cellules, mais peut être excrétée sous forme de substances dissoutes riches en polysaccharides (Passow, 2002 ; Wotton, 2004 ; Morelle, 2017). Cependant, le phytoplancton n'est pas la seule source d'EPS dans les océans. Plusieurs études ont notamment démontré la sécrétion d'exo-polysaccharides par des bactéries marines (Thornton, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Xiao and Zheng, 2016).

Une des rares études menées en laboratoire sur *L. chlorophorum* a mis en évidence des concentrations élevées de particules exo-polymériques transparentes (TEP) au sein de cultures non-axéniques de cette espèce (Figure 17). Les TEP constituent la fraction particulaire des EPS (Bhaskar and Bhosle, 2005). Ils sont définis comme des particules (*i.e.*, Taille > 0,22 μm) pouvant être colorées par le Bleu Alcian (Alldredge *et al.*, 1993 ; Passow, 2002). En conditions contrôlées, Claquin *et al.* (2008) ont mesuré des concentrations en TEP jusqu'à 10 fois plus élevées au sein des cultures de *L. chlorophorum* que celles mesurées dans les cultures de 7 autres espèces phytoplanctoniques appartenant à 3 phyla différents (Heterokontophyta, Dinophyta et Haptophyta). Dans cette étude, les concentrations en TEP les plus faibles ont été relevées dans les cultures d'*Isochrysis galbana* (6 mg xanthane équiv $[\text{mg chl } a]^{-1} \text{d}^{-1}$) tandis que les plus élevées ont été mesurées chez *L. chlorophorum* (380 mg xanthane équiv $[\text{mg chl } a]^{-1} \text{d}^{-1}$). En outre, les auteurs ont suggéré que la température (de 12 à 30°C pour *L. chlorophorum*) n'affecterait pas significativement la production de TEP mesurée dans les cultures de *L. chlorophorum* contrairement aux autres micro-algues étudiées (Claquin *et al.*, 2008). Cette même étude a permis d'estimer la proportion de carbone fixé par photosynthèse et excrétée sous la forme de TEP par les différentes espèces testées. Ainsi, cette proportion s'élèverait à

70,8% pour *L. chlorophorum* tandis que, chez les autres espèces, elle ne représenterait que 6,7 à 30% du carbone fixé (Claquin *et al.*, 2008).

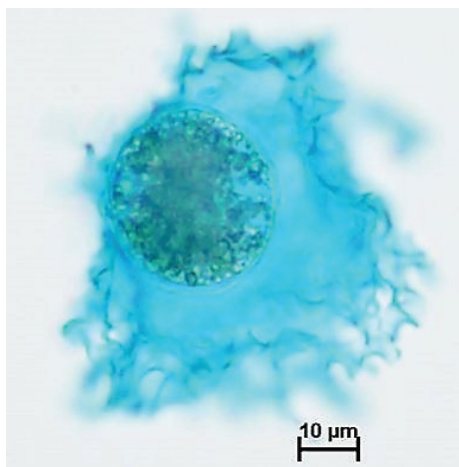


Figure 17. TEP associés à une cellule de *Lepidodinium chlorophorum*. Les TEP sont teintées en bleu par le Bleu Alcian (d'après Claquin *et al.*, 2008).

En milieu marin, la formation des TEP peut présenter deux grandes étapes (Passow, 2002 ; Mari *et al.*, 2017) (Figure 18) : (i) une étape « biologique » lorsque le phytoplancton ou les bactéries sécrètent des exo-polysaccharides sous forme dissoute dans l'environnement. Cette sécrétion dépend de l'espèce et/ou de la souche, de l'état physiologique de la cellule et des conditions de croissance (Hong *et al.*, 1997 ; Engel, 2002) ; (ii) une étape « physique » lorsque les exo-polysaccharides coagulent pour former des agrégats de plus grande taille, riches en matière organique, appelés TEP (Figure 18). Cette formation de TEP est notamment conditionnée par des facteurs physiques tels que la turbulence (Schuster and Herndl, 1995 ; Stoderegger and Herndl, 1999 ; Passow, 2000) et la température (Simon *et al.*, 2014).

Les TEP jouent donc un rôle majeur au sein des écosystèmes. En effet, ils forment de parfaits microenvironnements au sein desquels l'activité bactérienne est élevée (Alldredge and Gotschalk, 1989 ; Schapira *et al.*, 2012a, b). De plus, les TEP ont tendance à accélérer la sédimentation de la matière organique vers les fonds marins, pouvant ainsi favoriser les phénomènes d'hypoxie en milieu côtier (Passow *et al.*, 2001). D'autre part, les TEP représentent une portion conséquente de la production primaire disponible pour les consommateurs et entretiennent donc les réseaux trophiques. Cette matière

organique, plus couramment appelée neige marine, a donc un impact non-négligeable sur les cycles biogéochimiques (Passow *et al.*, 2001 ; Mari *et al.*, 2017 ; Bittar *et al.*, 2018). Les TEP sont également susceptibles de modifier les propriétés rhéologiques de l'eau de mer en augmentant sa viscosité (Passow, 2002), ce qui a déjà été démontré lors d'efflorescences de *Phaeocystis globosa* (Seuront *et al.*, 2006, 2007 ; Kesaulya *et al.*, 2008 ; Seuront and Vincent, 2008). De telles modifications de la viscosité peuvent avoir des conséquences sur les processus se déroulant à micro-échelle (*i.e.*, infection virale, acquisition d'éléments nutritifs, interactions proies-prédateurs). Par exemple, il a été démontré que des modifications de viscosité de l'eau de mer pouvaient contrôler la fréquence de battement des cils chez *Mytilus edulis* et donc impacter le taux de filtration chez les moules (Riisgard and Larsen, 2007).

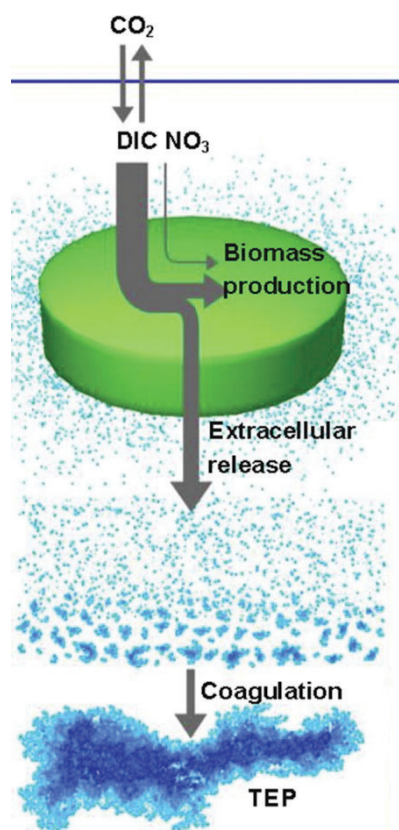


Figure 18. Représentation schématique de la création d'une grande réserve de matière organique dissoute, par les organismes phytoplanctoniques, à partir de laquelle les TEP sont formées par coagulation (d'après Mari *et al.*, 2017).

Ainsi, de fortes concentrations en TEP au sein d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* pourraient avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement des écosystèmes et en partie expliquer les mortalités d'organismes marins sessiles et vagiles présents au sein de ces écosystèmes. Pour valider cette hypothèse, il reste cependant à estimer les quantités de TEP produites lors d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* en milieu naturel. Par ailleurs, les bactéries peuvent aussi produire des exo-polysaccharides et donc former des TEP. Or, la production de TEP par *L. chlorophorum* a été montrée en culture non axénique (Claquin *et al.*, 2008). Afin de comprendre la dynamique de production des TEP au cours d'une efflorescence, il convient donc d'identifier le rôle des bactéries et de *L. chlorophorum* dans cette production. Enfin, nous ne connaissons pas la composition des exo-polysaccharides produits par *L. chlorophorum* et/ou ses bactéries associées, et ne savons pas si cette composition varie au cours des différentes phases d'une efflorescence. Ces connaissances sont essentielles pour mieux comprendre et évaluer les processus de dégradation de cette matière organique au cours du temps.

5. Conséquences des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* sur les écosystèmes exploités

5.1. Conséquences sur les organismes marins

Dès les années 90, les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* ont été associées à des mortalités massives de poissons et de bivalves en Bretagne sud (Maggi *et al.*, 1982 ; Merceron, 1987 ; Chapelle *et al.*, 1994). Plus précisément, des mortalités d'organismes marins ont été enregistrées au cours de l'été 1988 près des Sables d'Olonne (Vendée). Ces mortalités ont touché les moules, les huîtres, certains mollusques, crevettes, crabes et petits crustacés (Sournia *et al.*, 1992). Il reste toutefois difficile d'évaluer les pourcentages de mortalité sur ces espèces. En 2012, des mortalités de moules de plus de 40% ont été enregistrées en baie de Vilaine (Cochennec-Laureau *et al.*, 2018). Des mortalités de poissons (*e.g.*, soles, lançons, vives), de méduses, de mollusques et de crabes associées à

des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* ont également été recensées en baie de Vilaine en 2014 (Siano *et al.*, 2020 ; Figure 19). En 2018, des pertes importantes de coquillages (plus particulièrement d'huîtres et de moules) ont été observées sur les zones de production conchylicole du Morbihan et de Loire Atlantique suite aux eaux colorées vertes recensées sur la même zone entraînant ainsi des pertes substantielles pour les professionnels. Les observations réalisées par l'Ifremer lors de ces épisodes ont montré la présence d'un mucus de couleur verte sur les coquillages (Figure 19C), sans pour autant faire directement le lien de cause à effet entre ces mortalités et les efflorescences vertes de *L. chlorophorum*.

Par ailleurs, la filtration des cellules de *L. chlorophorum* par les bivalves, et plus particulièrement par l'huître creuse *Crassostrea gigas*, n'a jamais été mise en évidence. Ce dinoflagellé a été suspecté d'être à l'origine d'une diminution de l'assimilation pouvant aller jusqu'à l'arrêt total de la croissance chez ce bivalve (Bourlès *et al.*, 2009 ; Alunno-Bruscia *et al.*, 2011 ; Thomas *et al.*, 2016). C'est en effet l'hypothèse proposée d'après des résultats de modélisation mécanistique utilisant la théorie des budgets énergétiques (DEB ; Kooijman, 2010). Plus précisément, ce modèle permet de quantifier la prise d'énergie par l'animal et son allocation aux fonctions de croissance, développement, reproduction ou maintenance au sein d'un organisme. Il a ainsi permis de modéliser la croissance de *C. gigas* en fonction des communautés phytoplanctoniques présentes *in situ* (Thomas *et al.*, 2016). De cette manière, Alunno-Bruscia *et al.* (2011) ont mis en évidence des résultats contrastés entre la croissance simulée des huîtres par le modèle DEB et la croissance des huîtres observée au cours d'une efflorescence de *L. chlorophorum* en baie de Quiberon en septembre 2001. Cette espèce, soupçonnée d'être non comestible pour *C. gigas*, a donc été retirée du modèle permettant de faire ainsi coïncider les données de croissance observées *in situ* et celles prédites par le modèle. Cependant, cette hypothèse n'a encore jamais été validée expérimentalement. Il reste donc à analyser si les efflorescences vertes de *L. chlorophorum* pourraient affecter l'huître creuse via des effets directs (filtration, assimilation, ingestion) ou indirects (métabolisme, croissance, défenses immunitaires).

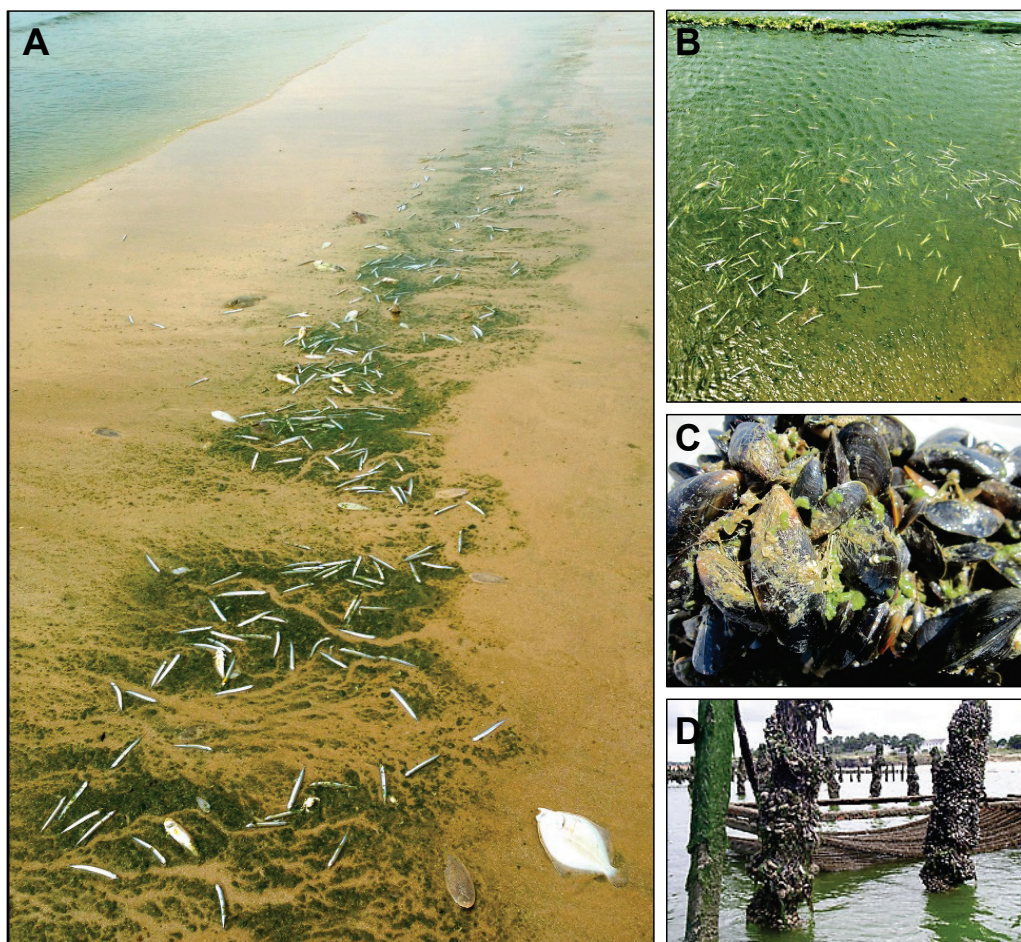


Figure 19. Eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* associées à des mortalités de poissons localisées en baie de Vilaine en 2014 (**A, B** ; Siano *et al.*, 2020). Moules du bouchot recouvertes d'un mucus vert en baie de Pont Mahé en juillet 2012 (**C** ; Ifremer, LER-MPL). Eau colorée à *L. chlorophorum* observée dans le Morbihan en 2007 (**D** ; Ifremer, LER-MPL).

5.2. Rôle potentiel des TEP sur les mortalités

Ces épisodes de mortalité de bivalves pourraient également être en lien avec la production accrue de TEP par *L. chlorophorum*, augmentant ainsi la quantité de matière organique produite lors d'une efflorescence et accélérant son taux de sédimentation vers le fond de l'océan. Cette production massive de TEP pourrait alors contribuer à accentuer les épisodes d'hypoxie (oxygène dissous $< 2,9 \text{ mg L}^{-1}$; Diaz and Rosenberg, 2008), connus pour impacter les activités de nutrition et de respiration des bivalves (Sobral and Widdows, 1997 ; Hicks and McMahon, 2002). Plus particulièrement, la sensibilité de

l'huître creuse *C. gigas* face à l'hypoxie dépend de sa classe d'âge, avec un impact plus important sur le naissain (Stanisière *et al.*, 2013). Dans la littérature, il a été reporté que le stress hypoxique pourrait provoquer une cascade de processus moléculaires et physiologiques chez l'huître creuse (David *et al.*, 2005). Dans de telles conditions, le métabolisme énergétique de cet organisme serait perturbé (Le Moullac *et al.*, 2007). Plus précisément, il a été démontré que la défense anti-oxydante et la chaîne respiratoire seraient les principaux processus biologiques régulés à la hausse en conditions hypoxiques, suggérant que l'hypoxie pourrait causer un stress oxydatif chez *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2010). Par ailleurs, David *et al.* (2005) ont suggéré que le système immunitaire inné de *C. gigas* serait affaibli en cas d'hypoxie contribuant potentiellement à la mortalité de ces animaux. Des conditions anoxiques pourraient également augmenter le risque que l'huître creuse héberge des pathogènes bactériens tel que *Vibrio campbellii* (Macey *et al.*, 2008). Bien que l'effet direct des TEP produites par *L. chlorophorum* sur les bivalves reste à élucider, les conditions hypoxiques/anoxiques post-efflorescence pourraient représenter une cause majeure de mortalité de la faune (Sournia *et al.*, 1992 ; Siano *et al.*, 2020).

D'autre part, les TEP ont été associées à des augmentations de la viscosité de l'eau de mer (Jenkinson, 1986 ; Passow, 2002 ; Seuront *et al.*, 2006). Or, il a été démontré que des modifications de viscosité du milieu pouvaient avoir un effet sur la fréquence de battement des cils chez *Mytilus edulis* et donc impacter le taux de filtration chez les moules (Riisgard and Larsen, 2007). Chez l'huître creuse, Gobler *et al.* (2013) ont démontré que *C. virginica* diminuait son taux de filtration lorsqu'elle était nourrie avec des concentrations élevées de la micro-algue pelagophyceae *Aureoumbra lagunensis*, connue pour engendrer des eaux colorées brunes. Bien que cette micro-algue ne soit pas toxique, ses proliférations ont été associées à des concentrations importantes d'exo-polymères excrétés dans le milieu. Des scientifiques ont ainsi suggéré que le caractère « collant » de ces exo-polymères pourrait affecter le transport des particules vers la bouche via l'altération du battement des cils (Galimany *et al.*, 2017). Il reste donc à démontrer si la production de TEP par *L. chlorophorum* pourrait affecter la physiologie de l'huître creuse *C. gigas*.

Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse vise à mieux comprendre la dynamique des efflorescences vertes de *L. chlorophorum* sur le littoral ainsi que les processus physico-chimiques et biologiques conduisant aux mortalités de bivalves observées au cours de ces épisodes. Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse a été d'étudier la physiologie et l'écologie de ce dinoflagellé, plus particulièrement sa production de substances polymériques extracellulaires (EPS), afin de mieux comprendre son potentiel effet nuisible sur la faune marine. Pour répondre à cet objectif, je me suis intéressée à plusieurs aspects allant de la biologie cellulaire de l'espèce à l'impact sur l'écosystème. Plus spécifiquement, j'ai cherché: (i) à identifier la source de production des EPS entre *L. chlorophorum* et ses bactéries associées; (ii) à mieux comprendre la dynamique d'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum* sur la zone côtière Loire-Vilaine; (iii) à décrire les variations saisonnières de cette espèce *in situ* et à caractériser les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum*; (iv) à étudier les impacts d'une exposition à *L. chlorophorum* sur les mécanismes physiologiques de l'huître creuse *C. gigas*.

Mon premier chapitre de thèse cherche à **identifier la source de production des EPS entre *L. chlorophorum* et son consortium bactérien associé**. Pour ce faire, trois souches de *L. chlorophorum* ont été cultivées en batch dans des conditions pseudo-axéniques et non-axéniques. Les concentrations en TEP ont été mesurées au cours des différentes phases de croissance et la composition des précurseurs des TEP, les exopolysaccharides, excrétés a été caractérisée. Les concentrations en carbone organique particulaire ont été mesurées afin d'évaluer la part de carbone fixé par photosynthèse excrétée sous la forme de TEP. Des mesures de viscosité du milieu de culture ont été effectuées afin de mieux comprendre les conséquences potentielles des efflorescences de *L. chlorophorum* sur l'écosystème.

Au cours du second chapitre de cette thèse, j'ai cherché à mieux **comprendre la dynamique d'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine en période non-productive**. Pour ce faire, une analyse de l'ADN environnemental extrait à la fois (i) de sédiments superficiels prélevés en janvier-février 2019 et, (ii) d'échantillons d'eau de mer acquis au cours de deux campagnes menées respectivement de septembre 2019 et 2020 à mars 2020 et 2021, a été complétée par des expériences de PCR sur cellule unique et de germination des kystes menées *in vitro*. Les

paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau (température, salinité, nutriments etc.) ont également été suivis afin d'évaluer si des changements environnementaux pourraient avoir un effet sur la phase d'initiation d'une efflorescence.

Le troisième chapitre de ma thèse vise à **décrire le cycle saisonnier de *L. chlorophorum* et à documenter les propriétés biogéochimiques de ses efflorescences.** Pour ce faire, un suivi *in situ* a été mené en 2019 pour caractériser le cycle saisonnier de cette espèce. L'échantillonnage a été réalisé, tous les 15 jours, sur 2 stations situées en baie de Vilaine et 1 station située en baie de Quiberon. Afin de décrire la dynamique spatio-temporelle et les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte *in situ*, un échantillonnage spécifique a été réalisé en juillet 2019 et associé à l'étude de données satellitaires. La concentration et la composition des EPS produites *in situ* ont été caractérisées. La contribution des TEP (fraction particulaire) au pool de carbone organique a été estimée afin d'évaluer les effets potentiels de cette propriété biologique de *L. chlorophorum* sur le fonctionnement de l'écosystème.

Enfin, mon quatrième chapitre de thèse s'attache à **étudier la physiologie de l'huître creuse *C. gigas* exposée au dinoflagellé vert *L. chlorophorum*.** Pour ce faire, les huîtres ont été exposées pendant 48h à deux concentrations de *L. chlorophorum* : une faible concentration et une concentration équivalente à une efflorescence en milieu naturel. Les résultats ont été comparés à une condition contrôle correspondant à la micro-algue fourrage *Tisochrysis lutea*. La capacité de filtration de *L. chlorophorum* par l'huître a été étudiée via le suivi des concentrations cellulaires de l'eau de mer au sein des bacs expérimentaux tandis que la capacité d'ingestion de ces cellules a été évaluée par des analyses histologiques réalisées directement sur les huîtres. Une phase de récupération de 24h (nourrissage standard avec *T. lutea*) a ensuite été étudiée à l'aide d'un banc écophysiologique. Les taux de filtration et de respiration, ainsi que l'efficacité d'assimilation des huîtres préalablement exposées aux différentes conditions ont été mesurés. Les résultats ont été interprétés en lien avec la production de TEP par *L. chlorophorum*.

Le dernier chapitre consiste en une discussion générale des résultats obtenus et des conclusions déduites au cours de ma thèse ainsi que des perspectives envisagées pour les compléter.

Cette thèse est rédigée sous la forme d'articles scientifiques en anglais correspondant aux questions scientifiques posées et à de potentielles publications. Chaque chapitre est précédé d'une introduction décrivant le contexte de l'étude et la contribution des auteurs. Une annexe complémentaire est associée à chacun des chapitres afin de détailler les données et expérimentations non-incluses dans les potentielles publications (Annexes page 253).

Chapitre 1

Rôle des bactéries dans la production
de substances polymériques
extracellulaires par le dinoflagellé vert
Lepidodinium chlorophorum

Contexte de l'étude

Depuis 1982, des eaux colorées vertes dues au développement du dinoflagellé *L. chlorophorum* (Elbrächter and Schnepf, 1996 ; Hansen *et al.*, 2007) sont enregistrées presque chaque année en Bretagne sud (Siano *et al.*, 2020). Bien que cette espèce ne soit pas toxique, ses proliférations ont été associées à des mortalités massives d'organismes marins (Sournia *et al.*, 1992 ; Chapelle *et al.*, 1994). Une première étude a suggéré que *L. chlorophorum* était capable d'excréter une grande quantité de particules exopolymériques transparentes (TEP) riches en carbone (Claquin *et al.*, 2008). Les TEP, ainsi que les polymères extracellulaires solubles (SEP), sont des substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par certains micro-organismes (Bhaskar and Bhosle, 2005) dont le phytoplancton (*e.g.*, Passow, 2002 ; Underwood *et al.*, 2004) et les bactéries marines (*e.g.*, Thornton, 2015 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Xiao and Zheng, 2016). D'un point de vue écologique, ces EPS ont tendance à accélérer la sédimentation de la matière organique de la surface vers le fond marin (Passow *et al.*, 2011 ; Mari *et al.*, 2017 ; Bittar *et al.*, 2018). De cette manière, les EPS peuvent favoriser les épisodes d'hypoxie/anoxie lors de la dégradation de cette matière organique par les bactéries. Par ailleurs, les EPS peuvent augmenter la viscosité de l'eau de mer (Jenkinson, 1986 ; Alldredge and Gotschalk, 2012). Bien que *L. chlorophorum* soit connu pour produire de grandes quantités de TEP, cette production n'a été démontrée qu'en conditions non-axéniques (Claquin *et al.*, 2008). Il reste donc à savoir si cette production d'EPS est assurée par les cellules phytoplanctoniques ? Par le consortium bactérien associé ? Ou encore, si elle pourrait être le fruit d'une interaction entre les cellules de *L. chlorophorum* et ses bactéries ? Ces réponses sont essentielles pour mieux comprendre la dynamique de production des EPS.

Ce premier chapitre de thèse a donc pour objectif d'identifier le principal producteur d'EPS dans les cultures entre les cellules de *L. chlorophorum* et son consortium bactérien. Trois souches de *L. chlorophorum* ont été cultivées en batch dans des conditions (i) pseudo-axéniques et (ii) non-axéniques. Les concentrations en TEP ont été mesurées aux différentes phases de croissance et les SEP ont été caractérisés. Enfin, la part de carbone fixé excrétée sous la forme de TEP ainsi que l'impact de cette production sur la viscosité du milieu ont été évalués afin de mieux comprendre les conséquences de ces efflorescences sur l'écosystème.

Financement

Cette étude a été menée dans le cadre du projet LepidoPen « Les eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum* et leurs conséquences sur les productions aquacoles en région Pays de la Loire : de l'acquisition de connaissances vers un futur système d'alerte » financé par la Région Pays de la Loire (projet porté par M. Schapira, Ifremer LER-MPL).

Contribution des auteurs

Les expériences ont été conçues par R. Siano, M. Schapira et moi-même. Les deux souches locales ont été isolées par le laboratoire Ifremer LER-BO et séquencées par G. Bilien. J'ai mis en place et assuré le maintien des cultures de *L. chlorophorum* à Nantes et j'ai également développé un protocole d'axénisation des souches. Pour ce faire, j'ai réalisé de nombreux tests sur les différentes étapes de « nettoyage » des cultures (*e.g.*, filtration, ajout de surfactants, centrifugation) et testé deux cocktails d'antibiotiques à différentes concentrations afin de développer un protocole permettant de réduire au maximum l'abondance bactérienne tout en préservant l'intégrité et la croissance des cellules de *L. chlorophorum*. J'ai réalisé les comptages cellulaires de *L. chlorophorum* en microscopie optique, les mesures d'abondances bactériennes en cytométrie en flux, ainsi que les mesures de concentrations en TEP et de viscosité. Les concentrations en nutriments inorganiques et en carbone organique ont été analysées par K. Collin (Ifremer, LER-MPL). Par ailleurs, une collaboration avec le laboratoire Ifremer EM3B nous a permis de décrire la composition des SEP. J'ai participé à la préparation des échantillons en vue des analyses biochimiques relatives à cette caractérisation qui ont été réalisées par L. Marchand et C. Sinquin. Les résultats issus de ces analyses ont été traités par C. Delbarre-Ladrat et A. Zykwinska. J'ai compilé l'ensemble des données, réalisé les analyses statistiques, proposé des figures et rédigé un article scientifique sous la supervision de R. Siano et M. Schapira. Cet article a été publié dans le journal *Scientific Reports*.

Bacteria enhance the production of extracellular polymeric substances by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*

P. Roux¹, R. Siano^{2,*}, K. Collin¹, G. Bilien³, C. Siquin⁴, L. Marchand⁴, A. Zykwinska⁴, C. Delbarre-Ladrat⁴ and M. Schapira¹

¹Ifremer, LITTORAL, F-44300 Nantes, France

²Ifremer, DYNECO, F-29280 Plouzané, France

³Ifremer, LITTORAL, F-29900 Concarneau, France

⁴Ifremer, BRM, F-44300 Nantes, France

*Corresponding author: raffaele.siano@ifremer.fr

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84253-2>

Abstract:

High biomasses of the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* cause green seawater discolorations along Southern Brittany (NE Atlantic, France). The viscosity associated to these phenomena has been related to problems in oyster cultivation. The harmful effect of *L. chlorophorum* might originate from the secretion of Extracellular Polymeric Substances (EPS). To understand whether the EPS are produced by *L. chlorophorum* or its associated bacteria, or if they are a product of their interaction, batch cultures were performed under non-axenic and pseudo-axenic conditions for three strains. Maximum dinoflagellate cell abundances were observed in pseudo-axenic cultures. The non-sinking fraction of polymers (Soluble Extracellular Polymers, SEP), mainly composed of proteins and the exopolysaccharide sulphated galactan, slightly increased in pseudo-axenic cultures. The amount of Transparent Exopolymer Particles (TEP) per cell increased under non-axenic conditions. Despite the high concentrations of Particulate Organic Carbon (POC) measured, viscosity did not vary. These results suggest that the *L. chlorophorum*-bacteria interaction could have a detrimental consequence on the dinoflagellate, translating in a negative effect on *L. chlorophorum* growth, as well as EPS overproduction by the dinoflagellate, at concentrations that should not affect seawater viscosity.

Key-words: *Lepidodinium chlorophorum*; Dinoflagellate; Culture; Bacteria; Interactions; TEP; EPS; Harmful effect

1. Introduction

Green seawater discolorations have been recorded in Southern Brittany (North East Atlantic, France) every year since 1982 (Siano *et al.*, 2020). These phenomena are the consequences of a massive development of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* (Elbrächter and Schnepf, 1996; Hansen *et al.*, 2007), a species characterised by bright green plastids inherited from a secondary endosymbiosis with a chlorophyte (Kamikawa *et al.*, 2015; Gavalás-Olea *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2018). *Lepidodinium chlorophorum* is not known to produce toxigenic substances for humans or marine fauna. However, blooms of the species have been associated with mass mortalities of fishes and cultured bivalves (Sournia *et al.*, 1992; Chapelle *et al.*, 1994). The potential harmful effect of *L. chlorophorum* blooms in coastal waters remains to be elucidated, as well as the phenology and physiology of this peculiar dinoflagellate, which have barely been studied so far.

Under laboratory conditions, *L. chlorophorum* excretes a large amount of Transparent Exopolymer Particles (TEP; Claquin *et al.*, 2008), which are defined as particles (size > 0.22 µm) stainable with Alcian Blue (Alldredge *et al.*, 1993; Passow, 2002). These particles are the result of TEP-precursor aggregation, mainly composed of exopolysaccharides. The TEP are composed of a large amount of carbon and may play a key role in biogeochemical cycling and in the structure and function of the pelagic food chain (Verdugo *et al.*, 2004; Azam and Malfatti, 2007). Indeed, TEP aggregations tend to accelerate the sedimentation of organic matter from the surface to the seabed (Passow *et al.*, 2001; Mari *et al.*, 2017; Bittar *et al.*, 2018) and can increase seawater viscosity (Jenkinson, 1986; Passow, 2002). The TEP accumulations during blooms of *L. chlorophorum* in both the seabed and in the water column may create microenvironments promoting bacterial activity (Alldredge and Gotschalk, 1989; Schapira *et al.*, 2012a, b), followed by high organic carbon degradations and potential anoxia conditions, likely causing fauna mortalities. As a consequence, the high production of TEP by this bloom-forming dinoflagellate could result in an indirect harmful property of *L. chlorophorum*.

The TEP, together with Soluble Extracellular Polymers (SEP) corresponding to non-sinking fraction of polymers, constitute the Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by some marine microorganisms (Bhaskar and Bhosle, 2005). The SEP controls the floc formation rate and directly influences aggregate formation (Passow, 2002); it therefore contributes, as TEP, to the modification of seawater viscosity. Beyond *L. chlorophorum*, other species belonging to different phytoplankton classes produce TEP, such as other dinoflagellates (Passow, 2002), diatoms (Passow and Alldredge, 1995; Passow, 2002; Gärdes *et al.*, 2011; Nosaka *et al.*, 2017; Burns *et al.*, 2019), prymnesiophyceae (Riebesell *et al.*, 1995; Passow, 2002; Alderkamp *et al.*, 2007; Burns *et al.*, 2019) and cyanobacteria (Grossart *et al.*, 1997; Iuculano *et al.*, 2017). However, phytoplankton is not the only source of EPS in oceans. Indeed, many studies have demonstrated the exudation of exopolysaccharides by marine bacteria (Thornton, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Xiao and Zheng, 2016). Marine microorganisms produce EPS to promote microbial adhesion (Thavasi and Banat, 2014) and/or to release metabolic-excess waste products (Decho and Gutierrez, 2017). Therefore, EPS can promote the formation of microalgae aggregates, initiate cell adhesion to a substrate and create biofilm matrix (Parker, 2013). Furthermore, EPS can protect cells against dewatering and toxic substances and can serve as energy and carbon sinks responding to stress (Xiao and Zheng, 2016). The EPS produced by microorganisms are mainly composed of exopolysaccharides, proteins (enzymes and structural proteins), nucleic acid (DNA) and lipids (Bhaskar and Bhosle, 2005; Xiao and Zheng, 2016; Decho and Gutierrez, 2017). Humic substances and inorganic components are also found within EPS. Specifically, exopolysaccharides produced by bacteria consist of mannose (Man), rhamnose (Rha), glucose (Glc), galactose (Gal) and galacturonic acid (GalA) (Bhaskar and Bhosle, 2005; Xiao and Zheng, 2016; Decho and Gutierrez, 2017). They are characterised by a high proportion of uronic acid (Zhang *et al.*, 2015). The protein fraction interacts with polysaccharides and other components to form a stable extracellular matrix. For example, sulphates can generate flocs in the presence of deoxy sugars (Zhou *et al.*, 1998).

The production and composition of EPS is influenced by various factors including species, strain, substrate type, nutrient availability, environmental conditions (temperature, pH, shear force and salinity), physiology and age of the culture (Xiao and

Zheng, 2016). Laboratory studies have shown a high variability among species in terms of the quantity of EPS produced (Passow, 2002; Claquin *et al.*, 2008; Fukao *et al.*, 2010; Xiao and Zheng, 2016). For a given species, the amount of TEP produced strongly depends on its environmental growing conditions. Indeed, previous studies have shown an increase in TEP production with an increase in temperature (Claquin *et al.*, 2008; Seebah *et al.*, 2014), a limitation by nutrients (Staats *et al.*, 2000; Passow, 2002; Underwood *et al.*, 2004; Thornton, 2014) or an increase in CO₂ partial pressure (Engel *et al.*, 2014). The physiological state of the cells can also strongly condition the quantity of TEP produced, as a close relationship has been established between TEP formation and cell death processes (Thornton and Chen, 2017). Moreover, a study suggested the importance of bacteria as mediators of bacteria-associated TEP formation coupled to the supply of usable dissolved organic matter, including TEP precursors (Sugimoto, 2007). *Lepidodinium chlorophorum* may be listed among the species capable of producing high amounts of TEP (Claquin *et al.*, 2008). However, the production of TEP by *L. chlorophorum* cultures has been demonstrated only under non-axenic conditions (Claquin *et al.*, 2008). To the best of our knowledge, no study has investigated the relative contribution, if any, to the EPS production by this dinoflagellate and its associated bacteria. Given that both dinoflagellate and bacteria may produce EPS, it is questionable which microorganism is responsible for EPS production in both natural and cultivated *L. chlorophorum* - bacterial consortia or whether the interaction between both microorganisms can cause an increase in EPS production.

With the aim of identifying the source of EPS production among *L. chlorophorum* and its associated bacteria, we used batch cultures of three strains cultivated under pseudo-axenic (PA) and non-axenic (NA) conditions. We estimated the concentration of TEP at different growth phases under both culture conditions. To further investigate the EPS, for the first time, the SEP was characterised by the contents in proteins, polysaccharides and inorganic compounds, such as sulphur. Finally, we investigated the potential impact of EPS produced by *L. chlorophorum* on viscosity in culture to better understand the consequences of *L. chlorophorum* blooms on ecosystem functioning and potential bloom-associated oyster mortalities.

2. Material and methods

2.1. Microalgal strains and culture conditions

Three strains of *L. chlorophorum* were used in this study: 1) RCC1489 (RCC: Roscoff Culture Collection; <http://roscoff-culture-collection.org/>) isolated in the Seine Bay (Normandy, France) in 2005, 2) KL1C4 (IFR CC 18-001, RCC6910) isolated in the Douarnenez Bay (Northern Brittany, France) in 2018 and 3) MAR1D2 (IFR CC 19-001, RCC6911) isolated in the Vilaine Bay (Southern Brittany, France) in 2019. The three strains were maintained in culture in L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993) without Si, at 20°C under a 12:12 hour light: dark cycle, with 90 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination.

All strains were genetically identified by Sanger sequencing using the Large Sub Unit (LSU) (28S) region of the ribosomal DNA (rDNA). Extraction of *L. chlorophorum* strains DNA and PCR amplification were carried out using the PCRBIO Rapid Extract PCR Kit (PCR BIOSYSTEMS LTD. London). The DNA was extracted from a 20- μL aliquot at the exponential growth phase following the manufacturer's recommendations, except for the dilution step, where 190 μL of nuclease-free water (instead of 900 μL) were added in the protease deactivation step. The PCR was performed using primers D1R-D3B (Scholin *et al.*, 1994; Nunn *et al.*, 1996). The PCR cycling comprised an initial 2 min heating step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 56°C for 15 s and an extension at 72°C for 30 s. The PCR-amplified products were analysed on a 1% agarose TAE gel (ethidium bromide; BET 1X) and purified using the ExoSAP-IT PCR Product Cleanup reagent (AFFYMETRIX, Cleveland, OH, USA). The Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (APPLIED BIOSYSTEMS, Tokyo, Japan) and ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS) were used for amplicon sequencing. Sequences were verified on the National Center for Biotechnology Information website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using Nucleotide Blast. Sequences of strains KL1C4 and MAR1D2 were deposited on GenBank under the accession numbers MT850080 and MT850081.

2.2. Antibacterial protocol

To reduce the abundance of bacteria in *L. chlorophorum* cultures, an antibacterial protocol was applied as follows. For each strain, 40 mL of cultures were sampled at the exponential growth phase. Samples were gently filtered through 3- μ m polycarbonate membrane filters (WHATMAN Nuclepore Track-Etched Membrane). The filtrates were discarded and the cells rinsed with 40 mL sterile L1 medium. The solution containing the cells was then centrifuged (1,000 g for 10 min at 20°C). This washing step was repeated three times. Finally, the pellets were re-suspended in sterile L1 medium for further axenization. To eliminate epiphytic bacteria of the dinoflagellate cell wall, samples were incubated with Tween-80 (0.005%) at 20°C for 10 min. Thereafter, samples were washed twice in a row with sterile L1 medium. Finally, based on a specific mix of antibiotics (X100, CORNING, 30-002-CI), 100 IU penicillin and 100 μ g streptomycin per mL of culture were added. To confirm the effect of this axenization protocol on *L. chlorophorum* cultures, heterotrophic bacteria were enumerated following Marie *et al.* (1997), using an Accuri C6 flow cytometer (BECTON DICKINSON) equipped with blue (488 nm) and red (640 nm) lasers, detectors of forward (FSC) and side (SSC) light scatter, and four fluorescence detectors: 530 $\pm$ 15 nm (FL1), 585 $\pm$ 20 nm (FL2), > 670 nm (FL3) and 675 $\pm$ 12.5 nm (FL4). Briefly, bacteria were stained with SYBR Green I, then counted based on plots of red fluorescence versus green fluorescence and of side scatter versus green fluorescence.

2.3. Experimental set-up for *L. chlorophorum* cultures

The three strains of *L. chlorophorum* were cultivated for 16 days in non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) batch cultures at 20°C under a 12:12 hour light: dark cycle, with 90 μ mol photon $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination. For PA cultures, antibiotics were added at the beginning of the experiment (day 0) to maintain the lowest abundance of bacteria during the experiment. Nine 500 mL flasks were inoculated with 2,000 cells mL^{-1} for each strain under both NA and PA conditions. In three of these flasks, subsamples were collected every 2 days to evaluate *L. chlorophorum* and bacterial concentrations over time. At three

selected phases of cellular growth (lag phase on day 2, exponential growth on day 9 and stationary phase on day 16), culture subsamples were collected from three flasks per growth phases. This strategy was chosen to obtain sufficient biomass allowing analyses in triplicate of maximum photochemical efficiency of the photosystem (II), inorganic nutrients concentrations, POC and TEP concentrations and viscosity. Analyses of SEP were performed on the pooled biomass remaining from triplicate samples of each growth phase.

2.4. Biological, biochemical and chemical analyses

To quantify *L. chlorophorum* cells, 1.5-mL triplicates were fixed with acidic Lugol's solution (1% final concentration) and stored at 4°C until analysis. Cell enumeration was performed in a 1-mL Sedgewick Rafter Counting Cell under an inverted microscope (LEICA DMI3000B). Growth rate (μ) was calculated during exponential growth using the least-squares regression method (Wood *et al.*, 2005). For bacterial cell determination, 1-mL triplicates were fixed with glutaraldehyde (0.1% final concentration) (SIGMA-ALDRICH) and stored at -80°C until analysis. Enumeration was carried out using an Accuri C6 flow cytometer.

The photo-physiological status of *L. chlorophorum* cells during the experiment was verified by measuring the maximum quantum efficiency of the photosystem II (Fv/Fm) at 450 nm, using an Aquapen-C 100 fluorimeter (PHOTON SYSTEMS INSTRUMENTS). Three mL triplicates were maintained in the dark for 15 min, following standard protocols (Kromkamp and Forster, 2003), before measurements.

To follow nutrient concentrations of *L. chlorophorum* cultures during the experiments, 7 mL (x 2) were sampled from three flasks, for three different growth phases, and stored directly at -20°C for the determination of dissolved inorganic nitrogen (*i.e.*, $N = NO_3^- + NO_2^- + NH_4^+$) and phosphate concentrations (PO_4^{3-}). Triplicates were analysed with an auto-analyser (SEAL ANALYTICAL AA3) following standard protocols (Aminot and Kérouel, 2007). Limits of quantification were 0.5 μ M for $NO_3^- + NO_2^-$, 0.05 μ M for NO_2^- , 0.05 μ M for PO_4^{3-} and 0.05 μ M for NH_4^+ .

2.5. EPS determination: TEP and SEP analyses

For the three different growth phases, the concentration of TEP was determined using a semi-quantitative method based on the colorimetric determination of the amount of dye complexed with extracellular particles (Claquin *et al.* (2008) adapted from Passow and Alldredge (1995)). Culture subsamples of 5-20 mL were gently filtered through 0.4 μm polycarbonate membrane filters (WHATMAN Nuclepore Track-Etched Membrane) and stored at -20°C until analysis. Particles retained on the filters were stained with 5 mL of 0.02% Alcian blue (SIGMA) in 0.06% acetic acid (pH 2.5). Alcian blue is a hydrophilic cationic dye that complexes anionic molecules bearing negative substituents such as carboxyl or sulphate groups. After centrifugation at 4,000 g for 30 min, supernatants were removed and filters were further centrifuged several times with 5 mL of MilliQ water until all excess dye was removed from the pellet. After one night of drying at 50°C , 6 mL of 80% H_2SO_4 were added, and 2 h later, the absorption of the supernatant was measured using a spectrometer at 787 nm (SHIMADZU UV-2600). Alcian blue absorption was calibrated using a solution of Xanthan gum (X). The TEP concentrations are expressed in mg Xeq L^{-1} .

To characterise SEP, approximately 900 mL of culture biomass were centrifuged (4,000g for 30 min at 20°C). Supernatants were concentrated and desalted by using an ultra-filtration system (PELLICON MILLIPORE) with a 5-kD cut-off membrane and freeze-dried. Pellets were fixed for 1 hour at 20°C with a solution of 5% formol/ethanol (w/w), dialysed against water (3.5 kD porous membrane) to eliminate salts and freeze-dried. Pellets were then solubilised in water for 1 h at 60°C to recover SEP eventually associated with *L. chlorophorum* cells. Supernatants recovered after centrifugation (4,000 g for 15 min) were freeze-dried. Prior to analyses, all samples were solubilised in water at 3 mg/mL. The protein content was estimated according to the bicinchoninic-acid protein assay (BCA), and Bovine Serum Albumin was used as standard (Smith *et al.*, 1985). Monosaccharide composition was determined by gas chromatography (GC) analysis of trimethylsilyl derivatives after acid methanolysis (Kamerling *et al.*, 1975). Briefly, supernatants were hydrolysed using MeOH/HCl for 4h at 100°C . Myo-inositol was used as internal standard. The methyl glycosides thus obtained were then converted to trimethylsilyl derivatives using N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and

trimethylchlorosilane (BSTFA :TMCS) 99 :1 (MERCK). Gas chromatography (GC-FID, AGILENT TECHNOLOGIES 6890N) was used for separation and quantification of the per-O-trimethylsilyl methyl glycosides formed. The sulphur content was determined by elementary analysis performed at the BioCIS-UMR 8076 (Châtenay-Malabry, France). The molecular weights of proteins and polysaccharides were determined by HPSEC (High Performance Size-Exclusion Chromatography, HPLC Prominence SHIMADZU Co, Kyoto, Japan) coupled on-line with a multiangle light scattering detector MALS (Dawn Heleos-II, WYATT TECHNOLOGY, Santa Barbara, CA, USA), a differential refractive detector (RI) (Optilab WYATT TECHNOLOGY, Santa Barbara, CA, USA) and a UV detector at 280 nm. Samples with concentrations from 2 to 3 mg mL⁻¹ were solubilised and filtered on a 0.45 µm syringe filter; 100 µL were injected on a PL aquagel-OH mixed, 8 µm (AGILENT) guard column (U 7.5 mm × L 50 mm), and a PL aquagel-OH mixed (AGILENT) separation column. Elution was carried out at 1 mL min⁻¹ with 0.1 M ammonium acetate. The chromatogram was further processed with Astra 6.1 Software (WYATT TECHNOLOGY). The refractive index increments used were dn/dc = 0.145 mL g for polysaccharides and 0.185 mL g for proteins. Polyacrylamide and agarose gel electrophoresis was applied to refine the polymer composition. The SDS-PAGE with a 10% polyacrylamide separating gel was prepared following the common method of Laemmli (1970). Briefly, 25 µL of each sample were loaded on a gel; 1% agarose gel was prepared in TAE (40 mM Tris base, 1.1 mL/L acid acetic, 2 mM EDTA). Samples were mixed 4:1 (v/v) with a sample loading buffer (0.5 M Tris HCl pH 6.8, glycerol, 0.5 M EDTA, 0.5% w/v bromophenol), and 10 µL of the sample were loaded onto a gel. Gels were run in TAE buffer at 150 V. After migration, gels were stained with Stains-All to detect anionic polysaccharides as previously described (Rigouin *et al.*, 2009). Carbohydrates were also revealed by Schiff staining (Dubray and Bezard, 1982), while proteins were detected by Sypro Ruby staining (Sypro Ruby protein gel stain, INVITROGEN). The *Escherichia coli* strain O111:B4 lipopolysaccharide, Bovine Serum Albumin, and different polysaccharides (galactan sulphate with 7.7% sulphur content, dextran sulphate sodium salt from *Leuconostoc* spp. (MW 500 000 with 16.0-19.0% sulphur and MW 50 000 with 16.0-19.0% sulphur; SIGMA-ALDRICH, Saint Quentin Fallavier, France)) were used as references.

2.6. POC determination

To estimate the amount of particulate carbon due to the entire TEP produced by *L. chlorophorum* and/or associated bacteria, 10-20 mL triplicates (from three different flasks) were gently filtered onto combusted GF/F filters (WHATMAN Nuclepore; for 4 h at 450°C) and stored at -20°C until analysis. After removal of carbonates with phosphoric acid (Aminot and Kérouel, 2004), filters were treated using a CHN element analyser (Flash 2000, THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA) to measure POC concentration. To estimate the carbon enrichment due to antibiotics addition in Pseudo-Axenic (PA) cultures, POC concentration was measured on three replicates of L1 medium with antibiotics and the mean value was subtracted.

2.7. Viscosity measurements

Viscosity measurements were conducted on 2-mL triplicate samples using an Ubbelohde viscometer and following the procedure described by Seuront *et al.* (2007). The measured viscosity η_m (cP) is the sum of a physically controlled viscosity component $\eta_{T,S}$ (cP) and a biologically controlled viscosity component η_{Bio} (cP):

$$\eta_m = \eta_{T,S} + \eta_{Bio} \quad (1)$$

For non-axenic and pseudo-axenic conditions, the physically controlled components $\eta_{T,S}$ were estimated from viscosity measurements conducted respectively on sterile L1 medium or sterile L1 medium with antibiotics.

The biologically induced viscosity excess η_{Bio} (cP) was subsequently defined for each water sample as:

$$\eta_{Bio} = \eta_m - \eta_{T,S} \quad (2)$$

The relative viscosity excess η (%) was then calculated as follows:

$$\eta = \frac{(\eta_m - \eta_{T,S})}{\eta_{T,S}} \quad (3)$$

Viscosity measurements were conducted at constant temperature. A thermometer (DOSTMANN ELECTRONIC P655) and conductometer (HACH CDC401) were used to measure temperature and salinity, respectively.

2.8. Statistical analyses

Data are presented as triplicate means with standard deviation (s.d.). The number of samples per group of variables was small ($n < 10$), which implies that the hypotheses of normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity of residuals (Bartlett test) were not verified. Therefore, non-parametric tests of Kruskal-Wallis and post hoc multiple comparison were carried out to check the statistical significance of the differences observed among the data of the three strains and the three different growth phases. Wilcoxon signed-rank test was applied to check differences between non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions. Statistical analyses were performed using the R software (R Core Team, 2018). A Principal Components Analysis (PCA), conducted with the *FactoMineR* package (Lê *et al.*, 2008), was applied to assess differences and similarities between samples under NA and PA conditions. Dinoflagellate and bacterial cell abundances, concentrations of TEP and POC as well as nutrient concentrations were used as quantitative variables. Time (in days) and excess of viscosity (in percentage) were used as illustrative variables. The representation of confidence ellipses (95% confidence interval) around the barycentre of each condition allowed to distinguish data group.

3. Results

3.1. Antibiotic protocol

Our axenization protocol did not result in a complete removal of bacteria from the cultures. This process allowed to drastically reduce the number of bacteria per cell of

dinoflagellate, which decreased from $1,030 \pm 199$ in the non-axenic culture (NA) to 104 ± 2 bacteria cell⁻¹ after axenization for the strain RCC1489. For *L. chlorophorum* KL1C4, $1,639 \pm 443$ bacteria cell⁻¹ were enumerated in the NA culture against only 80 ± 1 bacteria cell⁻¹ after axenization. Therefore, 90 and 95% of bacteria per cell could be eliminated via axenization in RCC1489 and KL1C4 cultures, respectively. For *L. chlorophorum* MAR1D2, the number of bacteria per cell decreased from 204 ± 10 in NA conditions to 121 ± 17 bacteria cell⁻¹ after axenization. Overall, 41% of bacteria were removed per cell. We therefore assume that our experiments were conducted under pseudo-axenic conditions (PA) (Table S1).

3.2. *Lepidodinium chlorophorum* growth

Lepidodinium chlorophorum growth was analysed for all three strains in both NA and PA culture conditions (Figure 20). For the NA condition (Figure 20A), similar maximum *L. chlorophorum* concentrations were observed for RCC1489 ($1.4 \cdot 10^4 \pm 646$ cells mL⁻¹), KL1C4 ($1.2 \cdot 10^4 \pm 462$ cells mL⁻¹) and MAR1D2 ($1.4 \cdot 10^4 \pm 1549$ cells mL⁻¹). For the PA condition (Figure 20B), the maximum abundance of *L. chlorophorum* was twice as high as that of the NA condition (RCC1489: $2.2 \cdot 10^4 \pm 577$; KL1C4: $2.4 \cdot 10^4 \pm 390$; MAR1D2: $2.4 \cdot 10^4 \pm 492$ cells mL⁻¹) ($p = 0.05$ for each strain, one-tailed Wilcoxon signed-rank test). For the NA condition, the maximum bacterial concentration varied between strains, with the MAR1D2 concentration ($3 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^5$ bacteria mL⁻¹) being lower than those of RCC1489 ($7 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$ bacteria mL⁻¹) and KL1C4 ($9 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$ bacteria mL⁻¹) (Figure 20A). In PA cultures, bacterial growth slowed down, and maximum bacterial concentrations ($\approx 2 \cdot 10^6$ bacteria mL⁻¹) remained lower than the minimal values observed in NA for the three strains (Figure 20). Despite the difference in dinoflagellate cell max and bacterial cell numbers, *L. chlorophorum* growth rates (μ), calculated during the exponential phase under NA and PA conditions, were similar for all strains and conditions, ranging from 0.24 and 0.31 day⁻¹. Over time, the maximum quantum efficiency of the photosystem II (F_v/F_m) ranged from 0.55 ± 0.00 to 0.72 ± 0.02 (Table S2). These are near-optimal values obtained for chlorophyll b containing organisms (Gordillo *et al.*, 2001; Ekelund and Aronsson, 2007).

No significant difference was observed regarding (F_v/F_m) values between NA and PA conditions ($p = 0.8$ for RCC1489; $p = 0.3$ for KL1C4; $p = 0.2$ for MAR1D2, two-tailed Wilcoxon signed-rank test). These results indicate a high photosystem II efficiency and, consequently, a good photo-physiological status of the cells throughout the experiment in all culture conditions and for the three studied strains.

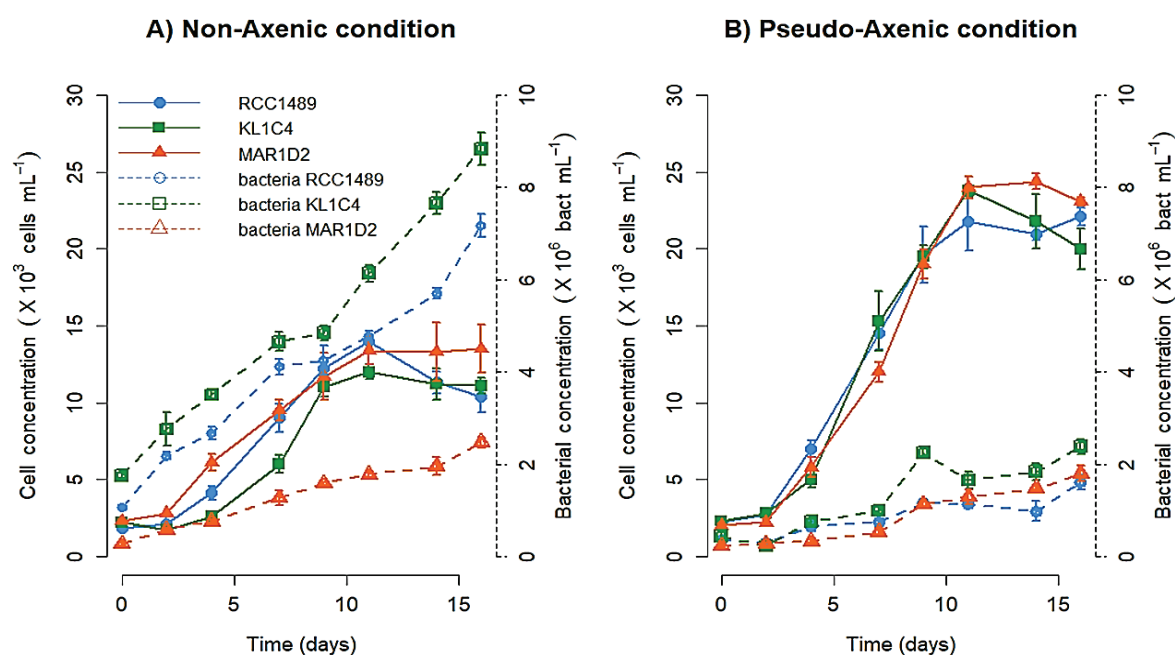


Figure 20. *Lepidodinium chlorophorum* concentrations (cell mL^{-1} ; solid lines) and bacterial concentrations (bacterial cell mL^{-1} ; dashed lines) for the three *L. chlorophorum* strains analysed under **A)** non-axenic (NA) and **B)** pseudo-axenic (PA) culture conditions. Symbols represent means and error bars represent the standard deviations from triplicate cultures.

3.3. EPS characterisation

For all strains, the TEP concentration increased significantly between the lag and stationary phases ($p = 0.02$ for each strain, two-tailed Kruskal Wallis test) under both NA and PA conditions (Figure 21). Similar maximum TEP concentrations were observed under the NA condition for RCC1489 (17.4 ± 1.2 mg Xeq L^{-1}), KL1C4 (15.8 ± 2.1 mg Xeq L^{-1}) and MAR1D2 (17.2 ± 4.9 mg Xeq L^{-1}) (Figure 21A) and under the PA condition (RCC1489: 9.9 ± 0.9 ; KL1C4: 11.1 ± 1.5 ; MAR1D2: 14.7 ± 5.1 mg Xeq L^{-1}) (Figure 21B). For all strains, no statistically significant difference was observed regarding TEP concentrations between NA

and PA conditions ($p = 0.1$ for RCC1489; $p = 0.1$ for KL1C4; $p = 0.7$ for MAR1D2, two-tailed Wilcoxon signed-rank test) (Figure 21A, B). This allows to hypothesize that dinoflagellate cells are the main producer of TEP and that bacterial TEP production is negligible. In addition, similar maximal particulate organic carbon (POC) concentrations were observed under the NA condition for RCC1489 ($20.4 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$), KL1C4 ($18.6 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$) and MAR1D2 ($17.5 \pm 0.8 \text{ mg L}^{-1}$) and under the PA condition (RCC1489: 16.8 ± 0.8 ; KL1C4: 16.9 ± 0.1 ; MAR1D2: $16.9 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$) (Table S2). Assuming that majority of TEP production is ascribable to dinoflagellate, we can estimate maximum TEP production per dinoflagellate cell. This value did not vary among strains. Values ranged between $1.3 \cdot 10^{-6} \pm 2.5 \cdot 10^{-7}$ for MAR1D2 and $2.4 \cdot 10^{-6} \pm 1.5 \cdot 10^{-7} \text{ mg Xeq cell}^{-1}$ for KL1C4 under the NA condition (Figure 21C) and between $7.3 \cdot 10^{-7} \pm 6.2 \cdot 10^{-8}$ for KL1C4 and $9.2 \cdot 10^{-7} \pm 1.4 \cdot 10^{-7} \text{ mg Xeq cell}^{-1}$ for MAR1D2 in PA cultures (Figure 21D). While no significant differences were observed among strains, maximum TEP per cell was significantly higher under NA than under PA for all three strains ($p = 0.05$ for each strain, one-tailed Wilcoxon signed-rank test) (Figure 21C, D). For the strain RCC1489, TEP production per microalgal cell remained constant over time under both NA and PA conditions. In fact, no significant differences were observed among growth phases ($p = 0.06$, two-tailed Kruskal Wallis test) (Figure 21C, D). In contrast, for strain KL1C4, TEP per dinoflagellate cell decreased significantly between lag and exponential phases ($p = 0.02$, two-tailed Kruskal Wallis test) under both NA and PA conditions (Figure 21C, D). A different pattern was observed for strain MAR1D2. While TEP per microalgal cell remained constant over time under NA conditions (Figure 21C), a significant decrease was observed between lag and exponential phases under PA conditions ($p = 0.03$, two-tailed Kruskal Wallis test) (Figure 21D).

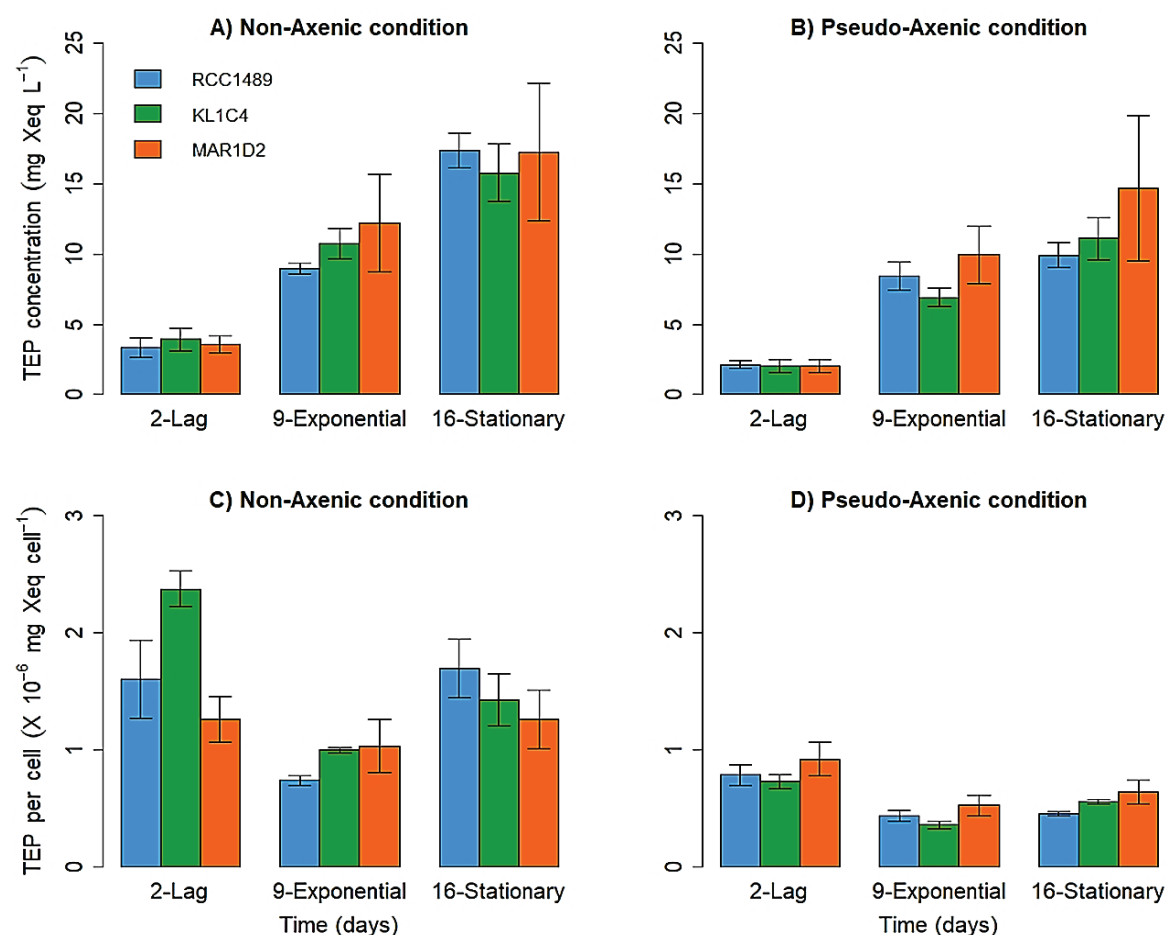


Figure 21. Mean TEP concentrations (mg Xeq L⁻¹) measured under **A)** non-axenic (NA), **B)** pseudo-axenic (PA) conditions and mean cell normalised TEP production (mg Xeq cell⁻¹) estimated under **C)** NA, **D)** PA conditions for the three *L. chlorophorum* strains during the different growth phases. Error bars represent standard deviation (n = 3).

During the stationary phase, SEP yields were higher under PA than under NA conditions for the three strains. For all strains under both NA and PA conditions, SEP yields increased over time except for the strain KL1C4 under NA conditions (Table 1). The SEP yields in *L. chlorophorum* culture supernatants were characterised for protein, sugar and sulphur contents (Figure 22). The analyses revealed that SEP were mainly composed of proteins (< 20%), followed by neutral sugars (< 10%) and sulphur (3-6%). The composition of SEP was similar for the three strains. Their composition varied only slightly between different growth phases, under both NA (Figure 22A, C, E) and PA conditions (Figure 22B, D, F). Amongst neutral sugars, Gal was present in high amounts in SEP of all strains. The highest Gal content was detected in SEP from MAR1D2 in the stationary phase, in both NA (8.9 wt% Gal) and PA (8.2 wt% Gal) conditions. Traces of other neutral sugars such as Glc,

Man, Rha and fucose (Fuc) were also detected in several samples. Anionic sugars, glucuronic acid (GlcA) and GalA, were only observed for SEP in the KL1C4 strain under NA conditions (Figure 22C), and their presence could be explained by contamination of the supernatant by bacterial cell membranes during sample preparation. A similar composition was obtained for SEP closely associated with *L. chlorophorum* cells solubilised from pellets (Table S3). The amount of sulphur detected in the samples was similar for each strain and independent from the growth phase. Sulphur can be associated with sugars and proteins. SEP from RCC1489 and KL1C4 strains were only composed of proteins and sulphur at the lag phase (Figure 22B, D). To deepen the SEP characterisation under NA and PA conditions, HPSEC-MALS analyses were performed (Figure 23). Several peaks were observed on HPSEC elution profiles of proteins (followed by UV detector), suggesting the presence of several protein populations (Table S4). Although HPSEC profiles were similar among the three *L. chlorophorum* strains at different growth phases, they clearly varied between NA and PA conditions. Only in NA cultures, protein aggregates of high molecular weight were produced ($\geq 1,000,000$ g mol, Table S4). Less heterogeneous protein populations were observed in PA cultures. These proteins were mainly of medium and low molecular weights. In contrast to proteins, HPSEC profiles of polysaccharides (RI detector, Figure S1) were similar in both culture conditions for the three *L. chlorophorum* strains. Three main peaks were distinguished (Table S4), highlighting the presence of three polysaccharide fractions of high molecular ($> 1,000,000$ g/mol), medium and low molecular weights. Similar polysaccharides were produced in either NA or PA conditions, with slightly higher amounts under NA. Some protein and polysaccharide peaks eluted at the same time from HPSEC-MALS might suggest the existence of glycoproteins or the presence of proteins and polysaccharides linked together by ionic interactions. To assess whether the polymers are polysaccharides, proteins or glycoprotein conjugates, we analysed SEP components from stationary phases on SDS-PAGE and agarose gel electrophoresis (Figure S2). No difference between NA and PA conditions and between strains was observed. Despite Sypro Ruby sensitive staining for proteins, none of them was observed in the samples. Proteins quantified in the samples by colorimetric assay and HPSEC-MALS could not be revealed by different staining techniques, which leads us to infer that protein aggregates could not enter into the gel and migrate properly prior to be detected by staining. However, electrophoresis allowed to assess the presence of a

polysaccharidic fraction that was clearly stained by Stains-All cationic dye. The migration of this polysaccharide in electrophoresis, suggests the presence of sulphated galactose polymer, such as sulphated galactan. Indeed, similar migration patterns were observed for galactan sulphate and dextran sulphate used as references.

Table 1. SEP yields (Y ; g L^{-1}) from culture supernatants for the three *L. chlorophorum* strains during the different growth phases under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions. nd: not determined because values were overestimated due to the presence of salts.

Condition	<i>L. chlorophorum</i> strains					
	RCC1489		KL1C4		MAR1D2	
	NA	PA	NA	PA	NA	PA
Mean Y (g L^{-1})						
Lag	$7.8 \cdot 10^{-3}$	nd	$1.8 \cdot 10^{-2}$	nd	$9.9 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$
Exponential	$8.1 \cdot 10^{-3}$	$5.2 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$8.0 \cdot 10^{-3}$	$6.4 \cdot 10^{-3}$
Stationary	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$3.6 \cdot 10^{-2}$	$4.4 \cdot 10^{-2}$	$4.7 \cdot 10^{-2}$

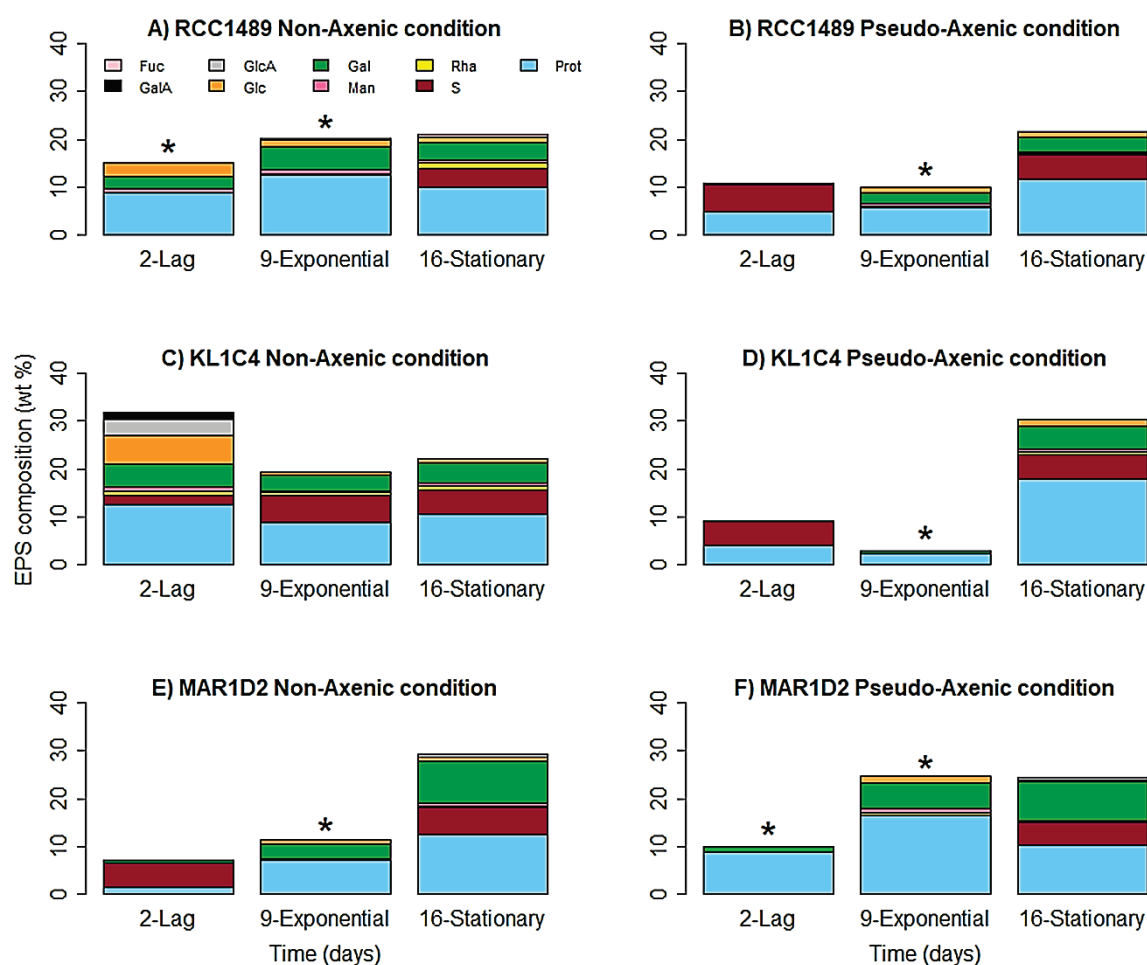


Figure 22. Monosaccharide composition, proteins and sulphate (wt %) of SEP from supernatants, at three growth times, for all three *L. chlorophorum* strains under non-axenic (NA) conditions: **A)** RCC1489, **C)** KL1C4, **E)** MAR1D2 and pseudo-axenic (PA) conditions: **B)** RCC1489, **D)** KL1C4, **F)** MAR1D2 (n = 1). Prot: Proteins; S: Sulphur; Rha: Rhamnose; Man: Mannose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; GlcA: Glucuronic acid; GalA: Galacturonic acid; Fuc: Fucose. * Samples were not analysed for their sulphur content due to insufficient sample amount for elementary analysis.

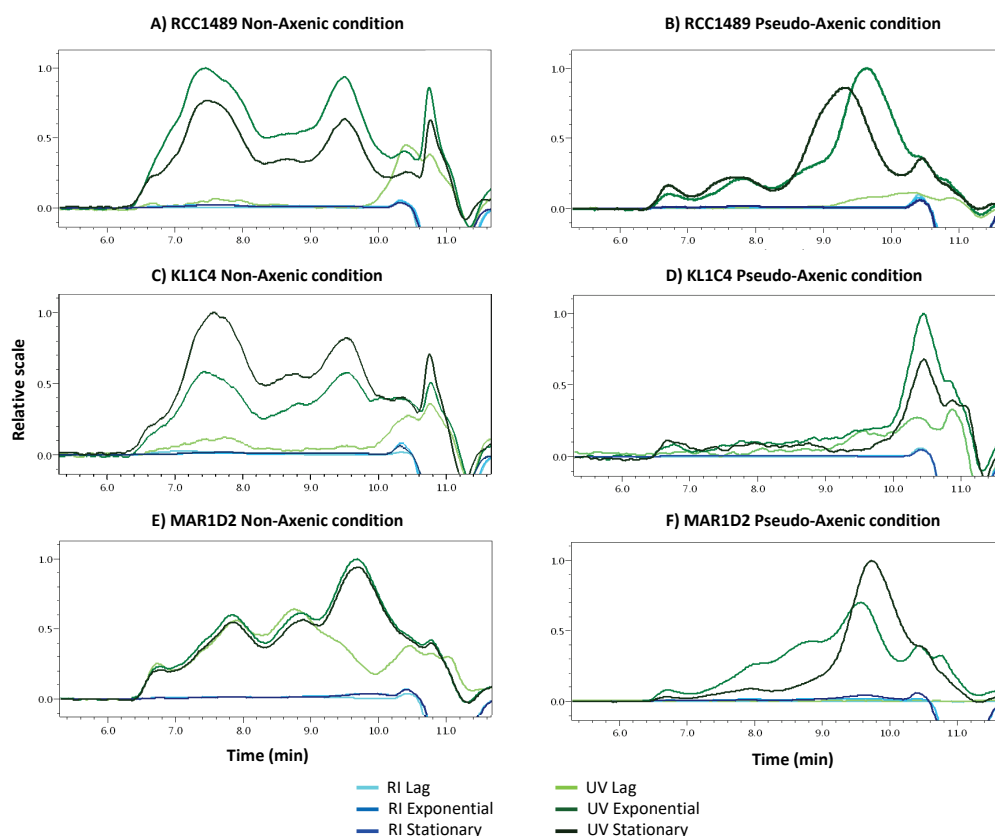


Figure 23. HPSEC profiles (with UV and RI detectors) of culture supernatants obtained for three *L. chlorophorum* strains, at three growth times, under non-axenic (NA) conditions: **A)** RCC1489, **C)** KL1C4, **E)** MAR1D2 and pseudo-axenic (PA) conditions: **B)** RCC1489, **D)** KL1C4, **F)** MAR1D2. (Astra 6.1 Software (WYATT TECHNOLOGY)).

3.4. Viscosity changes in seawater

Under both conditions, the maximum viscosity excess (η) for all *L. chlorophorum* strains was $2.7\% \pm 0.4 - 0.5$ (Table 2). No difference was observed between the excess of viscosity under NA and PA conditions during cell growth.

Table 2. Mean relative excess viscosity η (%) during each growth phase under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions (n = 9) for the three studied *L. chlorophorum* strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2).

Condition	<i>L. chlorophorum</i> strains					
	RCC1489		KL1C4		MAR1D2	
	NA	PA	NA	PA	NA	PA
Mean η (%)						
Lag $\pm$ s.d.	2.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.4
Exponential $\pm$ s.d.	2.7 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.2
Stationary $\pm$ s.d.	2.0 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 1.6	2.0 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3

3.5. Comparison between non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions

Principal Components Analysis (PCA), computed on all data collected (Table S2), summarises the differences between NA and PA culture conditions (Figure 24). The PCA described 79.6% of the total variance along two principal dimensions (Dim1 and Dim2). The Dim1 explained *L. chlorophorum* cell and bacteria concentrations, [TEP] and [POC] as well as $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$ and $[\text{PO}_4^{3-}]$. [TEP] was positively correlated with [POC], while $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$ and $[\text{PO}_4^{3-}]$ were negatively correlated with *L. chlorophorum* cell, [TEP] and [POC]. In our PCA analysis, $[\text{NH}_4^+]$ was the variable most correlated with Dim2. For strains RCC1489 and KL1C4, PCA provided a clear distinction between samples under NA and PA conditions (Figure 24). Indeed, NA conditions were positively associated with higher concentrations of bacteria and ammonium, in particular during the stationary phase of *L. chlorophorum* growth. In contrast, PA conditions were positively associated with lower bacterial concentrations and higher *L. chlorophorum* cell concentrations (Figure 24). [TEP] and [POC] were similar under NA and PA conditions. Relative viscosity excess, used as an illustrative variable, was not correlated with any culture condition. For strain MAR1D2, PCA did not provide a clear distinction between samples under NA and PA conditions

because initial bacterial concentrations were lower than those of other strains under NA condition.

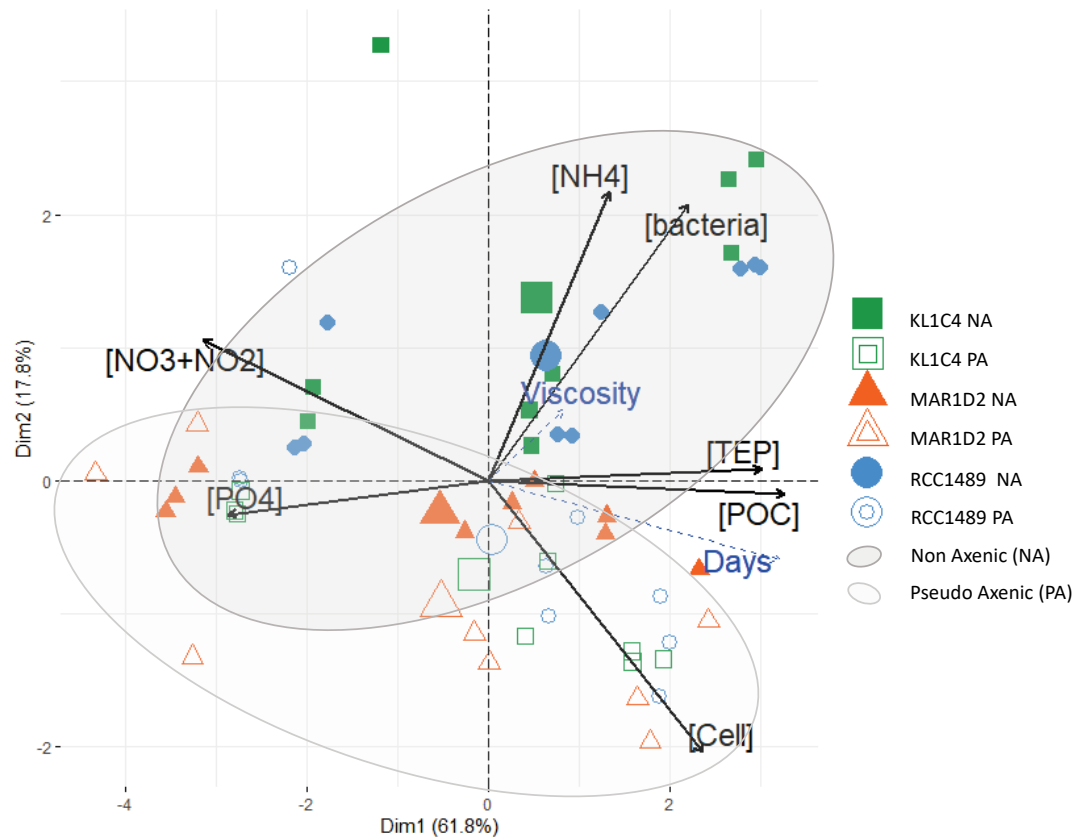


Figure 24. PCA, applied on the dataset (Table S2), summarising the similarities and differences between non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) samples. Dim1 and Dim2 together describe 79.6% of the total variance. Black arrows are quantitative variables used to calculate PCA: bacterial cell concentration ([bacteria] in bacteria cells mL⁻¹: Dim1 = 0.65; Dim2 = 0.61); dinoflagellate cell concentration ([Cell] in cells mL⁻¹: Dim1 = 0.70; Dim2 = -0.60); TEP concentration ([TEP] in mg Xeq L⁻¹: Dim1 = 0.89; Dim2 = 0.03); particulate organic carbon concentration ([POC] in mg L⁻¹: Dim1 = 0.96; Dim2 = -0.03); nitrogen ([NO3+NO2] in μM: Dim1 = -0.92; Dim2 = 0.31), phosphate ([PO4] in μM: Dim1 = -0.85; Dim2 = -0.07) and ammonium concentrations ([NH4] in μM: Dim1 = 0.39; Dim2 = 0.64). Dashed blue arrows are illustrative variables: time ([Days] in numbers) and relative excess viscosity ([Viscosity] in percentage). Strains were represented as follows: RCC1489 (blue circles), KL1C4 (green squares) and MAR1D2 (orange triangle) under NA (filled symbols) and PA conditions (open symbols). Larger symbols (barycentre of each group) and confidence ellipses (95% confidence interval) allowed to distinguish NA (black ellipse) and PA (grey ellipse) conditions.

4. Discussion

Interactions between phytoplankton and heterotrophic bacteria can be mutualistic, competitive or parasitic (Cole, 1982; Joint *et al.*, 2002; Amin *et al.*, 2012; Ramanan *et al.*, 2016) and can be regulated by algicidal activities (Ray and Bagchi, 2001). Our results show that similar rates (ranging from 0.24 to 0.31 day⁻¹) and any limitation by nutrients characterised the growth of *L. chlorophorum* under both NA and PA conditions. However, *L. chlorophorum* maximum abundances were twice as high in PA than in NA conditions. The antibiotic treatment under PA condition at the beginning of our experiment did not affect the photo-physiological capacities of *L. chlorophorum*, since (F_v/F_m) values remained sufficiently high (> 0.55) throughout the experiment without any variation between PA and NA conditions. Indeed, penicillin and streptomycin, used in our treatment, had already shown that an effective bacteriostatic effect did not affect phytoplankton growth (Oremland and Capone, 1988; Middelburg and Nieuwenhuize, 2000; Mulholland *et al.*, 2010; Prieto *et al.*, 2016). We suggest that in our culture conditions, bacteria might have negatively affected *L. chlorophorum* growth, reducing the maximal cell concentrations reachable by our *L. chlorophorum* strains. Indeed, bacteria can strongly affect the growth rate and the maximal biomass reached at the stationary phase of microalgae (Dakhama *et al.*, 1993; Bowman, 2007; Meseck *et al.*, 2007). Guerrini *et al.* (1998) observed an 80% decrease in the cell density of *Cylindrotheca fusiformis* in the presence of bacteria. The algicide effect on microalgae might be caused by the bacterial production of active molecules, as previously reported, such as thermostable benzoic acid produced by the bacterium *Thalassospira* sp. ZR-2 against the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* (Lu *et al.*, 2016), chitinase from *Chitinimonas prasina* LY03 on *Alexandrium tamarense* (Li *et al.*, 2016) and deinoxanthin produced by *Deinococcus xiangnanensis* Y35, inhibiting the dinoflagellate *A. tamarense* (Li *et al.*, 2015). Furthermore, Lovejoy *et al.* (1998) observed that unarmoured gymnodinoid dinoflagellates (including *Gymnodinium catenatum*) were more sensitive to algicidal bacteria than armoured dinoflagellates (*Alexandrium minutum* and *A. catenella*). For *L. chlorophorum* as well, the absence of theca could facilitate the negative effect of algicidal bacteria. Our study contributes to the understanding of the interactions between dinoflagellate and bacteria,

evidencing a complex relationship between the dinoflagellate *L. chlorophorum* and its associated bacterial consortia. However, before concluding on this relationship, varied culture conditions, bacterial isolation and specific observation of the dinoflagellate phycosphere should be investigated.

Total TEP concentrations were similar under both NA and PA conditions for the three *L. chlorophorum* cultivated strains throughout the dinoflagellate growth phases. The SEP yields were higher under PA than under NA conditions. If bacteria had contributed to the EPS production in our culture conditions, we would expect to find higher TEP and SEP concentrations in NA conditions. Hence, our study suggests that *L. chlorophorum* was the main producer of EPS in this dinoflagellate-bacteria consortium. In this study, the maximal TEP concentration produced by *L. chlorophorum* was about 17.4 mg Xeq L⁻¹, one of the highest concentrations ever measured in monospecific phytoplankton cultures (Table 3). Moreover, similar maximum TEP concentrations were observed for all strains, suggesting that TEP production was not dependent on intraspecific variability. However, the three strains had been isolated on the French Atlantic coast, while *L. chlorophorum* has been observed in other countries in Europe (Honsell and Talarico, 2004) as well as in Chile (Iriarte *et al.*, 2005), California (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014) and Australia (McCarthy, 2013). Therefore, the variation in TEP production among strains could be due to biogeographical issues. To answer this question, strains from different environments, localities and latitudes should be analysed.

Table 3. Maximum TEP concentration (TEP_{max}; mg Xeq L⁻¹) produced by different phytoplankton species grown in cultures (mostly non-axenic). CCMP: Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton; PML: Plymouth Marine Laboratory; UNC: University of North Carolina; RCC: Roscoff Culture Collection; NS: North Sea isolate; SBC: isolated from the Santa Barbara Channel, off California; AS: Ariake Sound isolate (Japan); OW: Oyashio Waters (Japan).

Species, strain	Class	TEP _{max} (mg Xeq L ⁻¹)	Reference
<i>Chaetoceros affinis</i> , CCMP 159	Bacillariophyceae	1.1	Passow, 2002
<i>Chaetoceros</i> sp., NS isolate		2.8	Passow, 2002
<i>Chaetoceros</i> sp., UNC 1201		~ 1.1	Burns <i>et al.</i> , 2019
<i>Coscinodiscus granii</i> , AS isolate	Bacillariophyceae	13.2	Fukao <i>et al.</i> , 2010
<i>Skeletonema</i> sp., AS isolate	Bacillariophyceae	22.4	Fukao <i>et al.</i> , 2010
<i>Eucampia zodiacus</i> , AS isolate	Bacillariophyceae	16.9	Fukao <i>et al.</i> , 2010
<i>Melosira nummuloides</i> , NS isolate	Bacillariophyceae	0.3	Passow, 2002
<i>Nitzschia</i> sp., SBC isolate	Bacillariophyceae	3.2	Passow, 2002
<i>Rhizosolenia calcar-avis</i> , CCMP 1518	Bacillariophyceae	0.4	Passow, 2002
<i>Rhizosolenia setigera</i> , AS isolate		23.5	Fukao <i>et al.</i> , 2010
<i>Stephanopyxis turris</i> , CCMP 815	Bacillariophyceae	9.3	Passow, 2002
<i>Thalassiosira nordenskiöldii</i> , OW isolate	Bacillariophyceae	1.5	Nosaka <i>et al.</i> , 2017
<i>Thalassiosira pseudonana</i> , CCMP 1335		~ 0.8	Burns <i>et al.</i> , 2019
<i>Thalassiosira rotula</i> , Meunier, NS isolate		0.6	Passow, 2002
<i>Thalassiosira</i> sp., UNC 1203		~ 0.7	Burns <i>et al.</i> , 2019
<i>Thalassiosira weissflogii</i> , CCMP 1336		0.4	Gärdes <i>et al.</i> , 2011
<i>Emiliania huxleyi</i> , non-calcifying strain, PML 92d	Prymnesiophyceae	0.7	Passow, 2002
<i>Phaeocystis globosa</i> , CCMP 2754	Prymnesiophyceae	~ 0.5	Burns <i>et al.</i> , 2019
<i>Gonyaulax polyedra</i> , CCMP 406	Dinophyceae	0.3	Passow, 2002
<i>Tetraselmis suecica</i> , NS isolate	Chlorodendrophyceae	0.9	Passow, 2002
<i>Prochlorococcus marinus</i> , RCC 0156	Cyanophyceae	1.5	luculano <i>et al.</i> , 2017

In NA conditions, *L. chlorophorum* cell abundances were lower and the TEP amount produced per dinoflagellate cell was higher. This suggests that bacteria, in addition to having an algicidal effect on *L. chlorophorum* growth, induce the overproduction of TEP. *In vitro* data from this study confirm the observations reported by Passow (2002) that bacteria do not generate significant amounts of TEP *in situ*, but that high bacterial concentrations may induce high TEP production rates by phytoplankton (Azam and Smith, 1991; Smith *et al.*, 1995). For example, bacteria may contribute to the generation of TEP by enzymatic hydrolysis of diatom surface mucus (Schuster and Herndl, 1995). Therefore, bacterial activity may stabilise TEP and increase accumulation rates (Schuster and Herndl, 1995). In order to establish a carbon footprint in *L. chlorophorum*, TEP produced per cell (mg Xeq cell⁻¹) was converted to carbon, following the work of Engel and Passow (2001). These conversions allowed the estimation of the percentage of carbon which was excreted

in the form of TEP under NA and PA conditions. Conversion factors of 0.8 and 0.7, respectively, were calculated for NA and PA conditions according to Engel and Passow (2001) equations. Under the NA condition, 62-76% of carbon were excreted in the form of TEP for the three strains at day 9 of the cell culture. This result corroborates the percentage found by Claquin *et al.* (2008) who measured, in non-axenic conditions, that for the RCC1489 strain, 70.8% of carbon were excreted as TEP. Under PA conditions, only 43-61% of carbon were excreted as TEP for all three strains. This result suggests that a higher proportion of the carbon fixed by photosynthesis would be allocated to TEP excretion under NA conditions.

For the first time, we characterised SEP produced by *L. chlorophorum*, which were mainly composed of proteins and exopolysaccharides, namely sulphated galactan. The total amount of analysed molecules was limited to a maximum of 30% (w/w) of the dry mass. The analysis of non-purified samples always gives incomplete results. Indeed, gas chromatography analysis of the sugar composition involves a hydrolysis step and a derivatization step to make the compounds volatile. Therefore, the hydrolysis might be incomplete, driving under-evaluated amounts. In addition, the presence of macromolecules in the water-soluble extracts, especially the polyanionic ones, might hinder the total elimination of salt. Nevertheless, galactose represented the main monosaccharide component with proteins and sulphur. The composition of the SEP produced by dinoflagellates is still poorly known. Some studies have focused more specifically on the composition of exopolysaccharides. The presence of Gal residues seems to be a common feature of dinoflagellate exopolysaccharides. Hasui *et al.* (1995) demonstrated that the marine dinoflagellate *Margalefidinium polykrikoides* (cited as *Cochlodinium polykrikoides*) produced sulphated exopolysaccharides mainly composed of Man, Gal, Glc and uronic acid. Yim *et al.* (2007) characterised the exopolysaccharide produced by the marine dinoflagellate *Gyrodinium impudicum* KG03 and found that it was highly sulphated and mainly composed of Gal residues. In 2011, Mandal *et al.* (2011) showed that the toxic dinoflagellate *Amphidinium carterae* produced an exopolysaccharide composed of Gal and Glc residues. Our results suggest that *L. chlorophorum* could also produce a sulphated exopolysaccharide composed mainly of Gal,

suggesting that galactose-based exopolysaccharide is a common characteristic among dinoflagellates.

It is questionable whether the high production of EPS, and in particular of TEP, could bring biological and/or ecological benefits to *L. chlorophorum* or if this production is a signal of cellular stress. The TEP production by phytoplankton has been classically described as a consequence of nutrient stress (Staats *et al.*, 2000; Passow, 2002; Underwood *et al.*, 2004). However, dinoflagellate cells were not limited by nutrients in our culture condition or in those previously tested on this species (Claquin *et al.*, 2008). The experimentation in nutrient-depleted cultures is needed to verify if the higher EPS production results from nutrient stress in *L. chlorophorum* culture. In addition, for a given species, the amount of TEP produced strongly depends on other abiotic parameters, especially temperature (Claquin *et al.*, 2008; Seebah *et al.*, 2014) and partial CO₂ pressure (Engel *et al.*, 2014). Light and temperature were constant during our experiment, and pH did not vary between the two culture conditions, suggesting that the evolution of partial CO₂ pressure was similar under NA and PA conditions. The mucoid phase could protect *L. chlorophorum* cells against algicidal compounds produced by bacteria. Indeed, EPS can protect cells against toxic substances and can serve as energy and carbon source in stress responses (Xiao and Zheng, 2016). This hypothesis seems to follow the higher production of TEP per cell that we measured for *L. chlorophorum* in the presence of bacteria. Waiting for new experiments in cellular stress conditions, we can conclude so far that the EPS production by *L. chlorophorum* is a response to a potential algicidal effect of bacteria present in cultures of the dinoflagellate. Nevertheless, in order to validate our hypothesis, culture experiments under axenic condition are needed.

Recent studies have shown that exopolymers produced by phytoplankton can strongly increase the viscosity of seawater (Jenkinson, 1986; Kesaulya *et al.*, 2008; Seuront and Vincent, 2008). *In situ*, Seuront *et al.* (2006) demonstrated that the increase in viscosity ranged from 8.8% before the appearance of *Phaeocystis globosa* to 259% during a bloom of this species. The mucus secreted by *P. globosa* and the subsequent increase in seawater viscosity may be an environmental engineering strategy that *P. globosa* uses to dampen turbulence and to protect colony integrity (Seuront *et al.*, 2007). In addition, the exudates released by *P. globosa* and the subsequent increase in viscosity might be

considered as an antipredator adaptive strategy that ensures the completion of its life cycle in highly turbulent environments (Seuront *et al.*, 2007). Therefore, biologically increased seawater viscosity might have significant impacts on a range of ecological processes (Seuront *et al.*, 2010). Indeed, TEP provide physical structure to microhabitats by retaining trace elements and organic-rich matter. They may also act as barriers to diffusion and create patchiness in chemical properties. These microzones would affect the chemotactic behaviour of protozoa and their predation rate (Passow, 2002). Despite the high TEP concentrations measured in *L. chlorophorum* cultures, no increase in viscosity was observed under any condition tested. The physicochemical properties of EPS are attributed to their diverse and complex chemistry and change with species diversity, age and growth conditions (Bhaskar and Bhosle, 2005). Physical factors, such as turbulence regime, may have an impact on the formation and persistence/dispersal of TEP *in situ*, as shear enhances the coagulation of TEP-precursors (Schuster and Herndl, 1995; Stoderegger and Herndl, 1999; Passow, 2002) and can modify seawater viscosity. Our culture conditions were carried out in a steady turbulence regime, and thus, our experiments can be hardly extrapolated to *in situ* conditions. We can neither conclude on the effect of turbulence on TEP production *in situ* nor on the potential ecological impact and effect of this production on bloom phenology. Measurements of seawater viscosity and bacterial concentration during a bloom of *L. chlorophorum* are needed to verify the experimental hypothesis advanced in this study.

In situ analyses could also contribute to elucidate the effect of excreted TEP on bivalves. Indeed, TEP aggregations tend to accelerate the sedimentation of organic matter from the surface to the seabed (Passow *et al.*, 2001; Mari *et al.*, 2017; Bittar *et al.*, 2018). The rapid sedimentation of this high quantity of organic carbon could accentuate hypoxia and therefore contribute to the mortalities of natural or cultivated bivalve populations. The large amount of TEP excreted by *L. chlorophorum* could also enhance remineralisation processes in the water column and close to the water-sediment interface. As shown in our study, TEP production was associated with high POC concentrations. In addition, this dinoflagellate is not an edible prey by oysters on the basis of Dynamic Energy Budget (DEB) modelling (Alunno-Bruscia *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016). It remains to be demonstrated that the non-palatability of this prey by oyster could depend on TEP

production. *In situ* coupled to *in vitro* experiments focused on the interaction between *L. chlorophorum* and oysters could complete the analyses on the ecological and eventually harmful impact of this dinoflagellate. Beyond our specific case, this study could provide an example of how an environmental impact could be addressed integrating cellular biology, physiological and ecological approaches.

Acknowledgements

This work was carried out in the frame of the PhD of P.R., financed by Ifremer and Region Pays de la Loire (project LEPIDO-PEN, n°2019_06582). The authors wish to thank Audrey Duval for the isolation of *L. chlorophorum* strains, Anne Schmitt and Calypso Bouvier for kind help and support during the experiment, Sabine Stachowski-Haberkorn for dedicated assistance in bacterial enumeration and Elise Robert for particulate organic carbon measurements. The authors wish to thank Laurent Seuront, Pascal Claquin and Sylvia Collic-Jouault for their kind assistance and helpful comments on the results. PR, RS, KC, GB and MS are part of GDR PHYCOTOX, a CNRS/IFREMER network on Harmful Algal Blooms (<https://www.phycotox.fr/>). Finally, the authors thank the anonymous reviewers for their careful reading of our manuscript and their insightful comments and suggestions.

Author contributions statement

P.R., M.S., R.S. conceived the experiments. P.R. and M.S. conducted the experiments. P.R., M.S., G.B., K.C., C.S. and L.M. analysed the samples. P.R., M.S., R.S., A.Z., C.S. and C.D.L. analysed the results and prepared the figures. P.R., M.S and R.S wrote the manuscript. All authors reviewed and accepted the final version of the manuscript.

5. Appendix

Table S1. Mean bacteria per *L. chlorophorum* cell (mean $\pm$ s.d.) enumerated during the three different growth phases (lag: “Lag”; exponential: “Expo.”; stationary: “Stat.”) for the three different strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2) in non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions. Mean and standard deviation values were calculated from the values measured in the three replicates (n = 3). The percentage of axenization was calculated with the following formula:

$$\text{Axenization (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{PA}}{\text{NA}} * 100 \right).$$

Strain	Time (days)	Growth phase	NA (bacteria cell ⁻¹)	PA (bacteria cell ⁻¹)	Axenization (%)
RCC1489	2	Lag	1030 $\pm$ 199	104 $\pm$ 2	90
	9	Expo.	348 $\pm$ 19	59 $\pm$ 10	83
	16	Stat.	697 $\pm$ 84	71 $\pm$ 4	90
KL1C4	2	Lag	1639 $\pm$ 443	80 $\pm$ 1	95
	9	Expo.	450 $\pm$ 43	115 $\pm$ 6	74
	16	Stat.	795 $\pm$ 40	119 $\pm$ 2	85
MAR1D2	2	Lag	204 $\pm$ 10	121 $\pm$ 17	41
	9	Expo.	136 $\pm$ 16	60 $\pm$ 5	56
	16	Stat.	184 $\pm$ 23	78 $\pm$ 7	58

Table S2. Mean parameters (mean $\pm$ s.d.) measured during the three different growth phases (lag: “Lag”; exponential: “Expo.”; stationary: “Stat.”) for the three different strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2) in non-axenic and pseudo-axenic conditions. Mean and standard deviation were calculated from the values measured in the three replicates ($n = 3$). Cell concentration (*L. chlorophorum*; cells mL⁻¹); Bacterial concentration (Bacteria; bact. mL⁻¹); Maximum quantum yield of the photosystem II (Fv/Fm); Transparent exo-polymers particles concentration (TEP; mg Xeq L⁻¹); Particulate organic carbon concentration (POC; mg L⁻¹); Nitrate (NO₃⁻), Nitrite (NO₂⁻), Ammonium (NH₄⁺) and Phosphorus (PO₄³⁻) concentrations are expressed in μ M; Relative excess of viscosity (Viscosity; %).

Strains	Growth phase	<i>L. chlorophorum</i> (cells mL ⁻¹)	Fv/Fm (450 nm)	Bacteria (bact. mL ⁻¹)	TEP (mg Xeq L ⁻¹)	POC (mg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (μ M)	NO ₂ ⁻ (μ M)	NH ₄ ⁺ (μ M)	PO ₄ ³⁻ (μ M)	pH	Viscosity (%)
NON-AXENIC												
RCC1489	Lag	2 10 ³ $\pm$ 5 10 ²	0.68 $\pm$ 0.01	2 10 ⁶ $\pm$ 7 10 ⁴	3.4 $\pm$ 0.7	6.2 $\pm$ 0.2	868.5 $\pm$ 11.8	2.5 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	34.0 $\pm$ 0.0	8.1 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.4
	Expo.	12 10 ³ $\pm$ 4 10 ²	0.66 $\pm$ 0.02	4 10 ⁶ $\pm$ 3 10 ⁵	9.0 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 1.3	725.4 $\pm$ 4.4	5.2 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.7	27.3 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.4
	Stat.	10 10 ³ $\pm$ 1 10 ³	0.65 $\pm$ 0.01	7 10 ⁶ $\pm$ 2 10 ⁵	17.4 $\pm$ 1.2	20.4 $\pm$ 0.2	663.8 $\pm$ 5.1	10.2 $\pm$ 3.4	1.8 $\pm$ 0.2	24.7 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.4
KL1C4	Lag	2 10 ³ $\pm$ 3 10 ²	0.65 $\pm$ 0.01	3 10 ⁶ $\pm$ 3 10 ⁵	3.9 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 0.2	882.0 $\pm$ 11.0	4.0 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	34.3 $\pm$ 0.6	8.1 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.4
	Expo.	11 10 ³ $\pm$ 6 10 ²	0.64 $\pm$ 0.01	5 10 ⁶ $\pm$ 1 10 ⁵	10.8 $\pm$ 1.1	14.3 $\pm$ 0.7	794.1 $\pm$ 1.1	4.9 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.3	30.0 $\pm$ 0.0	8.5 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 1.1
	Stat.	11 10 ³ $\pm$ 5 10 ²	0.61 $\pm$ 0.01	9 10 ⁶ $\pm$ 3 10 ⁵	15.8 $\pm$ 2.1	18.6 $\pm$ 0.5	692.8 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.4	26.0 $\pm$ 0.0	8.6 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.4
MAR1D2	Lag	2 10 ³ $\pm$ 3 10 ¹	0.72 $\pm$ 0.02	6 10 ⁶ $\pm$ 2 10 ⁴	3.5 $\pm$ 0.6	6.6 $\pm$ 0.4	931.5 $\pm$ 4.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	50.7 $\pm$ 2.3	8.2 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.5
	Expo.	12 10 ³ $\pm$ 2 10 ²	0.68 $\pm$ 0.01	2 10 ⁶ $\pm$ 2 10 ⁴	12.2 $\pm$ 3.5	13.5 $\pm$ 1.4	778.5 $\pm$ 4.0	6.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.4	32.7 $\pm$ 0.6	8.6 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.5
	Stat.	14 10 ³ $\pm$ 2 10 ³	0.55 $\pm$ 0.00	3 10 ⁶ $\pm$ 1 10 ⁵	17.2 $\pm$ 4.9	17.5 $\pm$ 0.8	669.3 $\pm$ 5.1	9.4 $\pm$ 1.4	0.9 $\pm$ 0.2	29.7 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3
PSEUDO-AXENIC												
RCC1489	Lag	2 10 ³ $\pm$ 9 10 ¹	0.71 $\pm$ 0.01	3 10 ⁶ $\pm$ 6 10 ³	2.1 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.2	886.9 $\pm$ 11.3	1.6 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	34.7 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.4
	Expo.	20 10 ³ $\pm$ 2 10 ³	0.67 $\pm$ 0.01	1 10 ⁶ $\pm$ 9 10 ⁴	8.4 $\pm$ 1.0	12.2 $\pm$ 0.4	700.7 $\pm$ 1.9	4.3 $\pm$ 2.7	1.5 $\pm$ 0.5	28.0 $\pm$ 0.0	8.7 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.3
	Stat.	22 10 ³ $\pm$ 6 10 ²	0.62 $\pm$ 0.01	2 10 ⁶ $\pm$ 1 10 ⁵	9.9 $\pm$ 0.9	16.8 $\pm$ 0.8	583.3 $\pm$ 8.3	7.1 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.5	25.7 $\pm$ 0.6	8.6 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 1.6
KL1C4	Lag	2 10 ³ $\pm$ 1 10 ²	0.70 $\pm$ 0.01	2 10 ⁶ $\pm$ 5 10 ³	2.0 $\pm$ 0.4	3 $\pm$ 0.1	880.4 $\pm$ 5.1	1.6 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	35.0 $\pm$ 0.0	8.2 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.2
	Expo.	20 10 ³ $\pm$ 8 10 ²	0.64 $\pm$ 0.01	1 10 ⁶ $\pm$ 9 10 ⁴	7.0 $\pm$ 0.7	12.2 $\pm$ 0.3	702.2 $\pm$ 5.1	4.8 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.5	30.0 $\pm$ 0.0	8.7 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.4
	Stat.	20 10 ³ $\pm$ 1 10 ³	0.62 $\pm$ 0.01	2 10 ⁶ $\pm$ 1 10 ⁵	11.1 $\pm$ 1.5	16.9 $\pm$ 0.1	598.4 $\pm$ 2.5	6.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.4	28.0 $\pm$ 0.0	8.6 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.8
MAR1D2	Lag	2 10 ³ $\pm$ 2 10 ²	0.71 $\pm$ 0.01	3 10 ⁶ $\pm$ 3 10 ⁴	2.0 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.2	946.8 $\pm$ 9.0	2.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.3	48.0 $\pm$ 8.5	7.9 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.4
	Expo.	19 10 ³ $\pm$ 9 10 ²	0.69 $\pm$ 0.01	1 10 ⁶ $\pm$ 4 10 ⁴	10.0 $\pm$ 2.1	10.6 $\pm$ 0.6	754.1 $\pm$ 6.0	5.9 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.8	33.0 $\pm$ 0.0	8.7 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.2
	Stat.	23 10 ³ $\pm$ 3 10 ²	0.67 $\pm$ 0.01	2 10 ⁶ $\pm$ 1 10 ⁵	14.7 $\pm$ 5.1	16.9 $\pm$ 1.1	597.1 $\pm$ 16.8	13.0 $\pm$ 1.3	0.8 $\pm$ 0.6	30.0 $\pm$ 1.0	8.7 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.3

Table S3. Soluble Extracellular Polymers (SEP) from pellets characterized during the three different growth phases (lag: “Lag”; exponential: “Expo.”; stationary: “Stat.”) for the three different strains (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2) in non-axenic and pseudo-axenic conditions (n = 1). Monosaccharide composition, proteins and sulphur are expressed in percentage of weight (wt %). Prot: Proteins; Rha: Rhamnose; Fuc: Fucose; Man: Mannose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; GlcA: Glucuronic acid; GalA: Galacturonic acid; S: Sulphur; nd: not determined.

Sample (pellet)	Time (days)	Growth phase	Prot (wt %)	Rha (wt %)	Fuc (wt %)	Man (wt %)	Gal (wt %)	Glc (wt %)	GlcA (wt %)	GalA (wt %)	S (wt %)
NON-AXENIC											
RCC1489	2	Lag	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	9	Expo.	11.8	0	0	0.2	1.4	0.3	0	0	2.7
	16	Stat.	5.7	0.3	0	0.2	1.9	0.6	0	0	2.9
KL1C4	2	Lag	11.8	0	0	0	0.3	0.3	0	0	nd
	9	Expo.	8.2	0.4	0	0.3	2.9	0.7	0	0	3.6
	16	Stat.	5.1	0.3	0	0.2	2	0.4	0	0	3.3
MAR1D2	2	Lag	4.7	0	0	0	1.1	0	0	0	nd
	9	Expo.	14.2	0	0	0	3.5	0.5	0	0	3.1
	16	Stat.	7.9	0	0	0	2.3	0.2	0	0	4.7
PSEUDO-AXENIC											
RCC1489	2	Lag	4.1	0	0	0.1	0.8	0.2	0	0	3.4
	9	Expo.	17.8	0.4	0	0.3	2.3	0.6	0	0	3.6
	16	Stat.	27.6	0	0	0	0	0	0	0	5.0
KL1C4	2	Lag	4.9	0	0	0.1	0.7	0	0	0	3.7
	9	Expo.	25.3	0.2	0	0.3	1.9	0.3	0	0	6.9
	16	Stat.	7.4	0	0	0	0.6	0.1	0	0	4.1
MAR1D2	2	Lag	3.3	0	0	0	0	0	0	0	nd
	9	Expo.	12.6	0	0	0	1.9	0	0	0	3.6
	16	Stat.	5.9	0	0	0	1.3	0	0	0	3.7

Table S4. Weight-average molecular weight (Mw) and recovery yield of polysaccharides and proteins in the culture supernatants obtained for three *L. chlorophorum* strains (stationary phase): RCC1489, KL1C4 and MAR1D2 under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions.

Strain Stationary phase	Mw Polysaccharide (g/mol) (Recovery (%))			Mw Protein (g/mol) (Recovery (%))		
	Pic 1 6.4-8.4 (min)	Pic 2 8.4-10.2 (min)	Pic 3 10.2-10.6 (min)	Pic 1 6.4-8.4 (min)	Pic 2 8.4-10.2 (min)	Pic 3 10.2-10.6 (min)
RCC1489 (NA)	9.953 10 ⁶ (12.5)	1.252 10 ⁶ (6.9)	3.320 10 ⁵ (3.3)	1.110 10 ⁶ (1.5)	1.757 10 ⁵ (1.1)	5.979 10 ⁴ (0.08)
RCC1489 (PA)	6.271 10 ⁶ (10.0)	4.746 10 ⁵ (7.1)	4.239 10 ⁴ (13.0)	6.211 10 ⁵ (1.2)	1.399 10 ⁵ (5.0)	3.612 10 ³ (0.7)
KL1C4 (NA)	1.076 10 ⁷ (9.4)	2.290 10 ⁶ (7.0)	5.119 10 ⁵ (6.9)	1.549 10 ⁶ (1.5)	3.885 10 ⁵ (1.4)	1.239 10 ⁴ (0.2)
KL1C4 (PA)	2.535 10 ⁶ (1.3)	3.478 10 ⁵ (0.9)	6.296 10 ³ (4.9)	2.859 10 ⁵ (0.1)	5.787 10 ⁵ (0.3)	2.906 10 ³ (0.1)
MAR1D2 (NA)	7.169 10 ⁶ (9.3)	2.954 10 ⁵ (21.4)	7.246 10 ⁴ (9.2)	9.778 10 ⁵ (1.5)	3.943 10 ⁴ (2.7)	4.824 10 ³ (0.3)
MAR1D2 (PA)	4.787 10 ⁶ (4.7)	1.252 10 ⁵ (17.2)	3.440 10 ⁴ (6.7)	5.516 10 ⁵ (0.7)	2.367 10 ⁴ (5.1)	4.229 10 ³ (0.8)

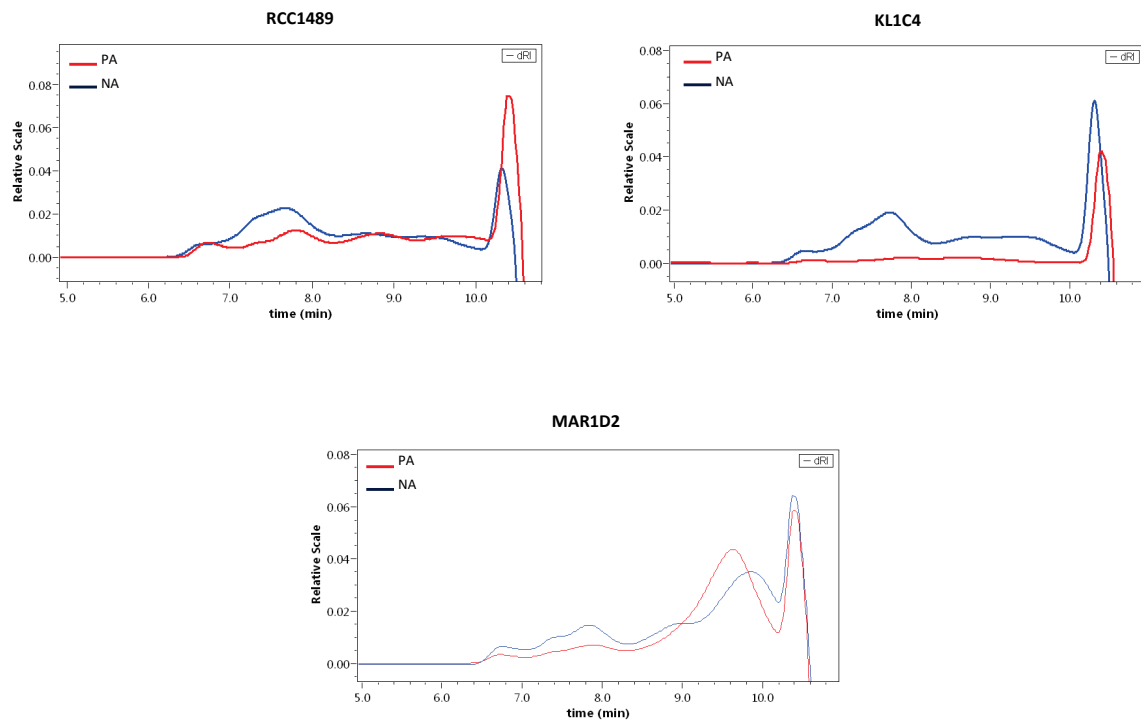


Figure S1. HPSEC profiles (RI detectors) of culture supernatants obtained for three *L. chlorophorum* strains at stationary phase: RCC1489, KL1C4, MAR1D2 under non-axenic (NA) and pseudo-axenic (PA) conditions.

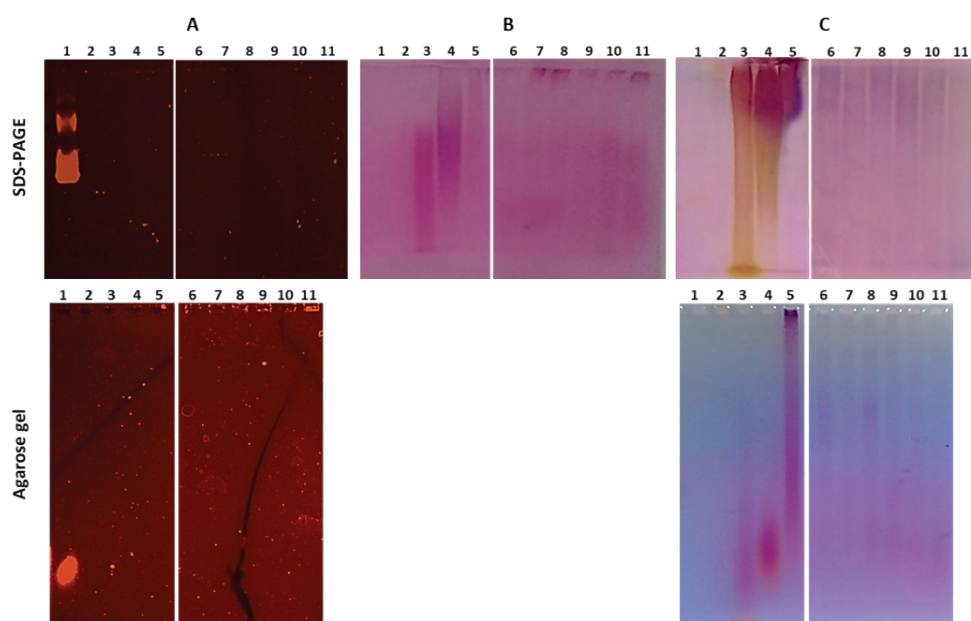


Figure S2. Electrophoretic analysis of *L. chlorophorum* (RCC1489, KL1C4 and MAR1D2 strains) culture supernatants at the stationary phase under NA and PA conditions after SYPROTM Ruby (A), Schiff (B) and Stains All (C) staining. Lanes 1 to 5: references as follows, lane 1: Bovine Serum Albumin, lane 2: *E. coli* O111:B4 LPS, lane 3: Galactan sulphate 7.7% S, lane 4: Dextran sulphate sodium salt (MW 50 000, 16.0-19.0% S), lane 5: Dextran sulphate sodium salt (MW 500 000, 16.0-19.0% S). Lanes 6 and 7: RCC1489 under NA and PA conditions, lanes 8 and 9: KL1C4 under NA and PA conditions and lanes 10 and 11: MAR1D2 under NA and PA conditions.

Chapitre 2

Dynamique d'initiation d'une
efflorescence de *Lepidodinium*
chlorophorum évaluée par ADN
environnemental

Contexte de l'étude

Les efflorescences vertes de *Lepidodinium chlorophorum* (Elbrächter and Schnepf, 1996 ; Hansen *et al.*, 2007) sont récurrentes le long de la côte Atlantique Française en période estivale (Karasiewicz *et al.*, 2020 ; Siano *et al.*, 2020). Malgré les conséquences potentiellement néfastes sur le fonctionnement des écosystèmes et les usages (tourisme, aquaculture), très peu d'études ont été menées sur l'écologie de cette espèce. Afin de mieux comprendre la dynamique d'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*, il est nécessaire de rechercher la présence de cette espèce lorsque les conditions sont défavorables à sa prolifération (période automnale-hivernale). Si certaines espèces persistent à des niveaux faibles dans la colonne d'eau toute l'année (Sogin *et al.*, 2006), d'autres produisent des kystes de résistance benthiques. En effet, plus de 10% des 2000 espèces de dinoflagellés marins décrites sont connues pour produire des kystes de résistance benthiques (Bravo and Figueroa, 2014). Bien que la formation de kystes par *L. chlorophorum* ait été suggérée par Sournia *et al.* (1992) dans des échantillons d'eau de mer, cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée par biologie moléculaire. Afin de mieux appréhender l'origine et l'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*, il est essentiel de mieux connaître son cycle de vie et plus particulièrement d'élucider sous quelle forme (kystes de résistance benthiques ou maintien de cellules dans la colonne d'eau) ce dinoflagellé résiste aux conditions défavorables. De la même manière, il est nécessaire d'identifier les conditions environnementales pouvant initier ces efflorescences.

Dans ce contexte, ce second chapitre vise à mieux comprendre la dynamique d'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine. Pour cela, des expériences de PCR sur cellule unique et de germination des kystes ont été menées *in vitro* et complétées par une analyse de l'ADN environnemental extrait à la fois (i) de sédiments superficiels prélevés en janvier-février 2019 et, (ii) d'échantillons d'eau de mer acquis au cours de deux campagnes menées de septembre à mars, en 2019-2020 et en 2020-2021. Les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau (température, salinité, nutriments etc.) ont également été suivis afin d'évaluer quels changements environnementaux pourraient initier une efflorescence.

Financement

La recherche de kystes dans les sédiments a été menée dans le cadre du projet EPICE « Les Efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* au large de la Loire et de la Vilaine : Déterminisme et conséquences sur la qualité des masses d'eau côtières » financé par l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne (projet porté par M. Schapira, Ifremer LER-MPL). Les analyses en métabarcoding de l'ADN environnemental ont été financées par le GdR Phycotox dans le cadre du mini-projet PICCOLO « Recherche de formes de résistance de *Lepidodinium chlorophorum* par analyse d'ADN environnemental dans la colonne d'eau en Bretagne sud » (porté par P. Roux).

Contribution des auteurs

Les expérimentations ont été conçues par R. Siano, M. Schapira et moi-même. Les campagnes d'échantillonnage de la colonne d'eau ont été réalisées par toute l'équipe du laboratoire Ifremer LER-MPL. La campagne d'échantillonnage des sédiments a été menée par les équipes du LER-MPL et du LER-BO, et R. Siano (Dyneco-Pelagos). A. Schmitt et S. Manach ont identifié et dénombré les organismes phytoplanctoniques en microscopie optique. K. Collin a mesuré les concentrations en nutriments inorganiques et j'ai analysé les concentrations en TEP. Concernant les échantillons de sédiments, les analyses de granulométrie ont été effectuées par K. Collin. La recherche de kystes dans les sédiments (PCR et germination) a été menée par C. André au cours d'un stage de Master 2 principalement encadré par K. Mertens (Ifremer, LER-BO) tandis que les extractions d'ADN issus des sédiments ont été effectuées par A. Terre-Terrillon. J'ai préparé les échantillons pour le métabarcoding lors d'un séjour au laboratoire Ifremer Dyneco-Pelagos. J'ai réalisé les 124 extractions d'ADN à partir des filtres d'eau de mer. Sous la supervision de J. Serghine, j'ai dosé l'ADN total extrait des échantillons d'eau de mer et de sédiments puis je les ai amplifiés par PCR classique. Le séquençage des 158 ADN amplifiés a été réalisé par la plateforme d'analyses Genotoul (Toulouse) puis, C. Noel (Ifremer, IRSI) a effectué les analyses bio-informatiques (assignation des séquences etc.). Enfin, j'ai compilé et traité l'ensemble des données acquises, appliqué des analyses statistiques, proposé des figures synthétiques et rédigé un article sous la supervision principale de R. Siano. Cet article sera très prochainement soumis au journal *Progress in Oceanography*.

Bloom initiation dynamics of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* assessed by environmental DNA

P. Roux¹, M. Schapira¹, K.N. Mertens², C. André², A. Terre-Terrillon², A. Schmitt¹, S. Manach³, K. Collin¹, J. Serghine⁴, C. Noel⁵, R. Siano^{5,*}

¹Ifremer, LITTORAL, F-44300 Nantes, France

²Ifremer, LITTORAL, F-29900 Concarneau, France

³Ifremer, LITTORAL, F-56100 Lorient, France

⁴Ifremer, DYNECO, F-29280 Plouzané, France

⁵Ifremer, IRSI, Service de Bioinformatique (SeBiMER), Plouzané, France

*Corresponding author: raffaele.siano@ifremer.fr

Abstract:

Green seawater discolorations caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* have been frequently observed along Southern Brittany (NE Atlantic, France). This study aims at a better understanding of the dynamics of the *L. chlorophorum* bloom initiation using the metabarcoding of the environmental DNA (eDNA). Sediments (eDNA and cyst samples) collected in January-February 2019 and water samples from two stations collected at three water depths in September-March 2019-2020 and 2020-2021 (eDNA and environmental parameters) were analysed. The protistan community was dominated by dinoflagellates and was homogenous in the water column. Amplicon Sequence variants (ASVs) associated to the genus *Lepidodinium* were detected in winter at low relative abundances (minimum: 0.01%). Increase in *Lepidodinium* abundances were positively correlated with pulses of ammonium re-suspended from bottom sediments. Although *Lepidodinium* eDNA (<1%) was detected in the sediments, no cyst morphotypes could be associated to *Lepidodinium*, nor germination experiments revealed *Lepidodinium*-like cells, questioning the existence of sexual resting cysts of this species in the seed bank. It is hypothesized that temporary *Lepidodinium* cells remained present in the water column at low concentration during the autumn-winter period, awaiting ammonium input from sediments to initiate growth and that blooms develop when water column stratification and river input provide favourable environmental conditions for biomass increases.

Key-words: *Lepidodinium chlorophorum*; Green Seawater discoloration; HABs; Cysts; Sediment resuspension; eDNA, Ammonium

1. Introduction

High-biomass phytoplankton blooms may result in seawater discoloration worldwide (Siano *et al.*, 2020; Hallegraeff *et al.*, 2021; Tsikoti and Genitsaris, 2021). Among those, Green Seawater Discoloration (GSD) can be linked to the massive proliferation of the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. The capacity of this species to form GSD is due to the presence of green-coloured plastids (Matsumoto *et al.*, 2011) inherited from a secondary endosymbiosis with a chlorophyte (Kamikawa *et al.*, 2015; Gavalás-Olea *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2018). *Lepidodinium chlorophorum* is a cosmopolitan species. Blooms have been observed in coastal waters worldwide: in Chile (Iriarte *et al.*, 2005; Rodríguez-Benito *et al.*, 2020), California (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014), Australia (McCarthy, 2013), as well as in Europe (Honsell and Talarico, 2004; Sourisseau *et al.*, 2016; Siano *et al.*, 2020, Serre-Fredj *et al.*, 2021; Roux *et al.*, submitted). Along the French Atlantic coast, blooms of this unarmoured dinoflagellate (Elbrächter and Schnepf, 1996; Hansen *et al.*, 2007) are mainly observed during summer (Karasiewicz *et al.*, 2020; Siano *et al.*, 2020; Roux *et al.*, submitted).

Lepidodinium chlorophorum has been described as a eurythermal and euryhaline dinoflagellate (Elbrächter and Schnepf, 1996; Claquin *et al.*, 2008). The water column stratification and river inputs could favour the development of the bloom (Sourisseau *et al.*, 2016). Blooms can last for more than a month (Siano *et al.*, 2020), presumably sustained by the bacterial remineralisation of the organic matter and especially the Transparent Exo-polymer Particles (TEP) highly produced by this dinoflagellate *in situ* (Roux *et al.*, submitted). Long-lasting blooms may trigger hypoxia, likely contributing to mass mortalities of fishes and cultivated bivalves (Sournia *et al.*, 1992; Chapelle *et al.*, 1994; Siano *et al.*, 2020 ; Roux *et al.*, submitted). To improve our understanding of the ecology of this species, the dynamics of bloom initiation still needs study.

To elucidate bloom onset dynamics, a possible strategy is to study the hydrological factors that could enhance species development when cellular concentrations are low (Reynolds, 1984, 1998; Reynolds *et al.*, 2001). At mid latitude European waters, winter is perceived as an unfavourable season for growth of autotrophic micro-eukaryotic species.

Biomasses reported during the winter period do not correspond to massive surface accumulations but rather moderate to low concentrations distributed over a large part of the water column (Zingone *et al.*, 2010). Some species may overwinter in low numbers in the water column (<100 cells L^{-1}), remaining below detection limits used in microscopy-based monitoring. This part of the biosphere, consisting in species that persist at low or undetectable levels, is known as the rare biosphere (Sogin *et al.*, 2006). Species of the rare biosphere might develop when ecological (seasonal and/or ecosystem) changes occur in the environment (Logares *et al.*, 2014). Planktonic species of the rare biosphere may develop when seawater warming, thermal stratification, nutrient and light availability are favourable for the species to develop (Glibert *et al.*, 2018). Another strategy used by different protist groups to persist in an ecosystem under unfavourable environmental conditions is the production of resting stages, which correspond to a dormant life-strategy phase, which is generally benthic. Dormant stages are common for the life cycle of many planktonic organisms (Von Dassow and Montresor, 2011). As for dinoflagellates, more than 10% of the approximately 2000 known marine dinoflagellate species produce cysts as part of their life cycle (Bravo and Figueroa, 2014). The presence of an endogenous biological clock in dinoflagellates regulated by unfavourable environmental changes (*e.g.*, nutrient limitation and temperature decrease) triggers resting cyst formation (Anderson and Keafer, 1987; Matrai *et al.*, 2005; Brosnahan *et al.*, 2020). In spring, benthic cyst resuspension may occur due to physical resuspension caused by waves and currents, mechanical disturbance of the sediment (benthic or pelagic organisms' bioturbation; Kirn *et al.*, 2005) or bottom trawling (Pilska *et al.*, 1998). High nutrient inputs from sediment associated to an increase in water temperature and light and oxygen availability, may activate release from dormancy (Brosnahan *et al.*, 2020) and lead to cyst germination (Anderson, 1980; Anderson *et al.*, 1987, 2005a, b). These geminated cells may represent the inoculum of a new seasonal bloom (Butman *et al.*, 2014). Although, based on culture observations, Sournia *et al.* (1992) suggested the formation of resting cysts by *L. chlorophorum* in water samples, this hypothesis has not been verified *in situ* and by molecular biology. In addition, the physical and biological factors that may favour cyst germination are still unknown.

The study of the bloom initiation can focus on detecting low species concentrations in the water column in order to describe the increase in abundance occurring prior to the bloom phase. Studies on the dynamics of blooms are sometimes associated to the detection of the seed bank(s), explaining the spatiality and the recurrence of blooms (Anderson, 1997; Anderson *et al.*, 2005a, b; Klouch *et al.*, 2016). Yet, in routine microscopy studies, some species are very difficult to detect at low abundances because low volumes of water are analysed and species can be misidentified when few cells are observed. In addition, the search for specific cysts in the natural environment is very difficult due to morphological similarity of cysts belonging to different species (Bravo and Figueroa, 2014), their low abundance, or due to the lack of awareness of what we should be looking for (Montresor *et al.*, 2016).

Environmental DNA (eDNA) can help to identify both taxa of low abundance in the water column and cysts in the sediments when the morphological characteristics of the cysts are not discriminative. eDNA is defined as the genetic material present in environmental samples such as sediment and water, including cells, extracellular DNA and potentially whole organisms (Ficetola *et al.*, 2008; Barnes and Turner, 2016; Ruppert *et al.*, 2019; Pawlowski *et al.*, 2021). eDNA analyses can complement classical microscopic methods by targeting different species from the same sample, sampling greater diversity, and increasing taxonomic resolution (Deiner *et al.*, 2017). For instance, the eDNA metabarcoding approach allows the automated identification of multiple species from a single environmental sample containing organisms or degraded DNA (Taberlet *et al.*, 2012) and allows therefore to accurately describe communities. This method is based on the amplification and high-throughput sequencing of a specific barcode region (*e.g.*, 16S for bacteria, 18S for most eukaryotes, and ITS regions for fungi) (Dollive *et al.*, 2012; Taberlet *et al.*, 2012; Segata *et al.*, 2013). However, some issues can complicate the interpretation of eDNA data: 1) the origin of intracellular DNA (from living cells) or extracellular DNA (from cell death) and, 2) eDNA persistence in marine systems (Palmer *et al.*, 1993; Dupray *et al.*, 1997; Sassoubre *et al.*, 2016; Andruszkiewicz *et al.*, 2017; Drouet *et al.*, 2021).

eDNA metabarcoding of sediment samples allowed to describe the marine eukaryotic communities (*e.g.*, Pawlowski *et al.*, 2011; Guardiola *et al.*, 2015; Siano *et al.*, 2021), and shifts in protist sedimentary communities in relation to human impact have

been identified with this approach (*e.g.*, Siano *et al.*, 2021). Many studies investigated the composition and relative abundance of plankton species in the water column through metabarcoding (*e.g.*, Brannock *et al.*, 2016; Gran-Stadniczeňko *et al.*, 2018; Sze *et al.*, 2018; Minicante *et al.*, 2019; Ramond *et al.*, 2019, 2021; Liu *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021). However, this method have given new significance to rare taxa (*i.e.*, those with low local relative abundance; Sogin *et al.*, 2006) (Burki *et al.*, 2021). For instance, Logares *et al.* (2015) hypothesised that this rare biosphere could contain more diversity than taxa frequently observed, suggesting that abundant species could be a minority in the field while rare species could represent the highest protist richness. In addition, eDNA has useful applications in detecting invasive species, the continued presence of native species thought to be extinct, and other elusive species occurring in low densities that would be difficult to detect by traditional means (Ruppert *et al.*, 2019). Metabarcoding of the eDNA is therefore an appropriate method to detect rare species and their changes in abundances over the time in relation to environmental changes.

This study provides an explanation for the *L. chlorophorum* bloom initiation using the Loire-Vilaine coastal area as a case study, given the local recurrence of blooms of this species. Sediments (eDNA and cyst samples) collected in January–February 2019 were studied. Samples collected at three water depths in September–March 2019–2020 and 2020–2021 (eDNA and environmental parameters) were analysed. In the absence of established genetic methods to detect the species *L. chlorophorum* (FISH, qPCR), the metabarcoding of eDNA in the pelagic and benthic environment was used to study the rare occurrence of this species prior to its development while single-cell PCR and hatching experiments of cysts was applied to search for the cyst stage in surface sediments.

2. Material and methods

2.1. Study area

The Northern Bay of Biscay, and more precisely the Vilaine-Loire coastal zone in southern Brittany (France), is a favoured environment for *L. chlorophorum* since it is frequently affected by GSD caused by this species (Belin *et al.*, 2021; Siano *et al.*, 2020). The Vilaine and Loire Rivers directly influence this coastal area: 70 and 850 m³ s⁻¹ mean annual flow, respectively (Lazure *et al.*, 2009). The two rivers, especially the Loire, are the main nutrient sources in the northern Bay of Biscay and play a major role in the eutrophication of coastal waters in southern Brittany (Guillaud *et al.*, 2008; Ménesguen *et al.*, 2018, 2019). The location and extent of the two river plumes vary according to the flow of rivers, tidal currents as well as the strength and direction of the winds. In winter, the Loire river plume can be oriented towards the northwest along the coast, with a dilution of 20 to 100 fold by the time it reaches Vilaine Bay. In periods of very high flow, the plume can extend seaward (Ménésguen and Dussauze, 2015; Ménesguen *et al.*, 2018). The Vilaine river plume generally spreads throughout the bay before moving westward (Chapelle *et al.*, 1994). The water circulation within the Vilaine Bay is characterised by low tidal and residual currents, and is mainly driven by tide, wind, and river flow (Lazure and Salomon, 1991; Lazure and Jégou, 1998). Haline stratification is high from February to June in response to high river runoff and relatively low vertical mixing, whereas thermal stratification occurs between May and mid-September (Puillat *et al.*, 2004).

2.2. Sampling strategy

To assess the presence of *L. chlorophorum* and the accompanying protistan community in the water column during periods of low concentration of this species, the seawater was sampled offshore the Loire and Vilaine Rivers during two surveys carried out in two autumn-winter seasons, respectively from September 2019 to March 2020 and

from September 2020 to March 2021. Sampling was conducted fortnightly at high tide at two stations: Ouest Loscolo (in the Vilaine bay; 9 m water depth) and Basse Michaud (offshore the Loire River; 28 m water depth). Water samples were collected using a 5 L Niskin bottle at three water depths: subsurface (0–1 m), mid-depth and 1 m above the Water Sediment Interface (WSI) for both eDNA and light microscopy analyses of micro-phytoplankton identification and enumeration. For eDNA samples, 500–1000 mL water samples were collected and immediately placed into plastic flasks. Samples were filtered through 3 μm polycarbonate filters (Whatman®). Filters were stored in 5 mL cryotubes, immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until molecular biology analysis. For microscopic analyses, one-litre water of each sample were fixed with Lugol's iodine solution (2% f.c.), and stored in the dark at 4°C until laboratory analyses. Water samples aliquots were also processed for chlorophyll *a* concentration ([Chl*a*]; $\mu\text{g L}^{-1}$), inorganic nutrients concentrations (nitrogen [DIN], silicates [DSi] and phosphates [DIP]; μM) and concentrations of TEP ([TEP]; $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$). In addition, vertical profiles of seawater temperature ($^{\circ}\text{C}$), salinity and turbidity (FNU) were performed with a multi-parameters probe (NKE MP6) from subsurface to WSI. The stratification index was calculated from the density variations according to Hansen and Rattray (1966):

$$\varepsilon = \frac{\rho_{WSI} - \rho_{surface}}{\rho_{mean}} \quad (4)$$

where ρ_{WSI} is the density measured at the WSI, $\rho_{surface}$ is the density measured at the subsurface and ρ_{mean} is the mean density measured along the water column. Under homogeneous conditions, $\varepsilon=0$, whereas under conditions of maximum vertical density stratification, ε will be around 25×10^{-3} (Hansen and Rattray, 1966).

In order to verify the presence of *L. chlorophorum* cysts in the sediments, duplicate samples were collected for hatching experiments and eDNA analysis at 17 stations in the Loire-Vilaine area during the winter period (January-February 2019; Table S5). These stations were defined according to four criteria: 1) records of *L. chlorophorum* blooms in summer 2018, 2) presence of fine-grained sediments to obtain higher cyst concentrations (*e.g.*, Lewis, 1988) and better eDNA preservation (Boere *et al.*, 2011), 3) accessibility of the site, and 4) site geomorphology and geography to have a high accumulation of cysts (harbours, bay, etc). For eDNA analyses, sediments were stored in 60 mL sterile cryotubes,

flash frozen in liquid nitrogen *in situ* and stored at -80°C until genetic analysis, following procedures explained in Pawlowski *et al.* (2021). For morphological analyses, cysts were collected in 50 mL Falcon tubes and para-filmed and covered by aluminum foil and kept at 4°C until microscopy analyses. Sediment granulometry analyses were performed using a laser particle size (Mastersizer 3000). Data were processed in Gradistat package developed by Gregoire *et al.* (2017) and were grouped by size class according to Blott and Pye (2001) (Table S5).

2.3. eDNA analysis from water samples and sediment

Total DNA from sample filters was extracted using the NucleoSpin® Plant II DNA kit (Macherey Nagel, Hoerd, France). DNA was extracted with one lysis buffer, one lysozyme solution (Sigma) and one buffer composed of proteinase K (Macherey Nagel) for 2 h at 56°C (500 rpm). The DNA extract was washed/purified three times before elution in a final volume of 100 μL of elution buffer (5 min at 65°C) following the manufacturer's instructions. Total DNA from 10 g of wet sediment was extracted using the PowerMaxSoil® DNA isolation kit (MO BIO Laboratories Inc.), following the manufacturer's instruction. Total genomic DNA was eluted in a final volume of 5 mL of elution buffer. In order to check contamination, blank extractions with nuclease-free water were performed. All DNA extracts were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay kit (Invitrogen™, Waltham, MA, USA) using a spectrophotometer (BioTek® FLx800, Winooski, VT, USA). Total DNA concentrations extracts from filters varied between 0.06 and 13.20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (3.79 ± 2.50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) while DNA extracts from the sediments varied between 0.09 and 36.69 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (15.54 ± 8.63 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Final DNA concentration was normalized to 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ when possible.

The V4 region of the 18S rDNA gene, a marker gene region conserved but highly variable across the taxa of the protistan community, was amplified using PCR performed with a taq polymerase (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer; Thermo Scientific) and eukaryote-specific primers (Stoeck *et al.*, 2010): Forward (NGS-TAREuk454FWD1) : 5' CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TCC AGC ASC YGC GGT AAT TCC 3', Reverse (NGS-TAREukREV3) : 5' GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAC TTT

CGT TCT TGA TYR A 3'. PCR amplification was performed three times for each DNA extract (from a single filter). The PCR protocol was composed of a denaturation step at 98 °C for 30 s, followed by two sets of cycles: 1) 12 × [98 °C (10 s), 53 °C (30 s) and 72 °C (30 s)], 2) 18 × [98 °C (10 s), 48 °C (30 s) and 72 °C (30 s)]. Thereafter, a final step of elongation at 72 °C for 10 min was carried out. Amplification results were verified by gel electrophoresis (1% agarose). In order to check contamination, blank amplifications with nuclease-free water were performed. Triplicate samples were pooled before sequencing.

Sequencing was performed at the GeT-PlaGe platform using Illumina Mi-Seq (<http://get.genotoul.fr/>). Raw dataset was available at XXXX. Raw data were analysed using the SAMBA v3.0.1 workflow (Noël *et al.*, 2021; <https://github.com/ifremer-bioinformatics/samba>) developed by the SeBiMER (Ifremer's Bioinformatics Core Facility), a Standardized and Automatized MetaBarcoding Analysis workflow using DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) and QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019) with default parameters unless otherwise indicated. Briefly, raw data integrity after sequencing was checked using a SAMBA checking process. Afterward, sequencing primers were trimmed from reads, and reads where primers were not found have been filtered. Then, DADA2 was used to filter bad quality reads, correct sequencing errors, overlap paired reads, infer Amplicon Sequence Variants (ASVs), and remove chimeras. To correct the known diversity overestimation generated by the ASV inference from DADA2, an additional step of ASV clustering has been performed using dbOTU3 algorithm (Olesen *et al.*, 2017) relying on both phylogenetic distance and distribution of ASVs to group them together. ASV taxonomy were assigned using a Naïve Bayes classifier against the PR² database (PR²; Guillou *et al.*, 2013 ; 4.13.0). 4,662,679 raw reads (29,511 average/sample ± 6,611) were obtained through the sequencing of 124 water samples and 34 sediment samples corresponding to 7,732 ASVs (392 average/sample ± 133). Rarefaction curves showed that the sequencing effort applied was sufficient to describe the protist diversity, with an overall higher number of reads in the sediment samples than in the water samples (Figure S3).

As this study focuses exclusively on protists, all reads assigned to Metazoa and Plantae (Embryophyceae) and Macroalgae (Ulvophyceae, Rodophyceae) were excluded. After cleaning the dataset to the protistan community, 3,777,109 reads (23,906 average/sample ± 7,502) were obtained corresponding to 6,788 ASVs (362 average/sample

± 122). Read abundance of ASVs assigned to a same genus were combined. Three ASVs were found assigned to the genus *Lepidodinium*. The dataset was normalised by calculating relative abundances of the phyla and genera over the total protistan community. For simplicity, in this paper we refer to the abundance of genus *Lepidodinium* meaning the relative abundance of the three ASV (cumulated values read number) over the whole protistan abundances. In particular, relative abundances of the 15 most abundant genera of Dinophyceae, including the genus *Lepidodinium*, were analysed.

2.4. Physico-chemical and biological variables of the water column

Micro-phytoplankton ($> 20\mu\text{m}$) abundance and community diversity were assessed using an inverted microscope (Zeiss, Axio Observer). Samples were gently homogenized before settling in 10 mL sub-sample for $> 12\text{h}$ in Hydro-Bios counting chambers (Utermöhl, 1958). The limit of quantification was 100 cells L^{-1} . Relative abundances of most abundant genera of Dinophyceae were calculated.

Total phytoplankton biomass was estimated through [Chl a]. 500–1000 mL water samples were filtered through GF/F filters (Whatman®) and stored at -20°C until analysis. Chlorophyll was extracted in 10 mL of 90% acetone in the dark at 4°C during 12h and analysed by monochromatic spectrophotometry (Aminot and Kérouel, 2004).

The concentration of TEP was determined using a semi-quantitative method based on the colorimetric determination of the amount of dye complexed with extracellular particles (Claquin *et al.* (2008) adapted from Passow and Alldredge, 1995; Roux *et al.*, 2021). Briefly, triplicate samples of 50–150 mL were gently filtered through $0.4\ \mu\text{m}$ polycarbonate membrane filters (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membrane). Particles retained on the filter were stained with Alcian Blue solution (Sigma). The filters were incubated in 80 % sulphuric acid for 2h. Absorbance was read at 787 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2600). The TEP concentrations are expressed in $\mu\text{g Xanthan equiv L}^{-1}$.

For inorganic nutrients, 300 mL water samples were pre-filtered through $41\ \mu\text{m}$ directly from Niskin bottle. For dissolved silicate ($\text{DSi}=\text{Si}(\text{OH})_4^-$) concentrations, water

samples were filtered through 0.45 µm acetate cellulose membrane and stored at 4°C until analysis. Water samples for the determination of Dissolved Inorganic Nitrogen ($\text{DIN} = \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$) and Phosphorus ($\text{DIP} = \text{PO}_4^{3-}$) were stored directly at -20°C. For inorganic nutrients, samples were analysed using an auto-analyser (Seal analytical AA3) following standard protocols (Aminot and Kérouel, 2007). Limits of quantification were 0.4 µM for DSi, 0.5 µM for $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ and 0.05 µM for DIP, NH_4^+ . Uncertainty of measurement were 12% for DSi, 10% for $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, 15% for DIP and 27% for NH_4^+ .

2.5. Single cell-PCR and hatching experiments of cysts from surface sediments

Single cyst isolation was applied to try to identify *L. chlorophorum* cysts. The sodium polytungstate method of Bolch (1997) was used to extract cysts from surface sediments from five sampling stations: Nord Dumet (NODU), Estuaire Vilaine (ESTV), Pont Mahé (PMAE), Pornichet (PORV) and Pointe Saint Gildas (GILV). 80 cysts, resembling the *L. chlorophorum* resting cyst morphotype observed in culture by Sournia *et al.* (1992), were cleaned in four drops of distilled water, then isolated in new tubes, and stored at -20°C. For species identification, single cell PCR were carried out, following the procedure described in Mertens *et al.* (2012).

In order to verify the presence of cysts in the sediments, hatching experiments were carried out using of eight out of 17 sampled stations. Surface sediments from six stations: Pénerf (PENF), ESTV, NODU and PMAE located in the northernmost part of the study area and two stations (PORV and Gourmalon (GOUR)) positioned further south were selected given that *L. chlorophorum* blooms regularly occur here. The sediments were pre-sieved using a 125 µm mesh to remove larger particles, and then sieved through a 20 µm mesh. The fraction smaller than 20 µm was sieved through a 10 µm mesh nylon filter. Thus, three sediment size categories were obtained: 125–20 µm, 20–10 µm, and < 20 µm. Hatching experiments were carried out with samples of all size fractions. Fractionated sediments were deposited using a micropipette in 12-well plates containing L1/2 (Guillard and Hargraves, 1993) and K/2 (Keller *et al.*, 1987) media and stored at 16 and 18° C with a

12:12 day: night cycle. A total of 60 12-well plates were prepared this way. 576 strains were isolated from these wells and were identified using an inverted microscope.

2.6. Statistical analysis

The spatio-temporal distribution of biological and physicochemical parameters was represented by a section scope using the software Ocean Data View 5.3.0 (Schlitzer, 2020). All statistical analyses were performed in R software (R Core Team). Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) analyses were performed to explore community patterns between both stations applying the `monoMDS` function (Vegan R package). Confidence ellipses (95% confidence interval) allowed to distinguish group-stations. The Spearman correlation matrix was calculated for all parameters in order to study relationships between eDNA data on *Lepidodinium* (ASVs relative abundance of the genus) and other environmental parameters. A Principal Components Analysis (PCA), conducted with the `FactoMineR` package, was applied to assess differences and similarities of autumn-winter samples between the two stations. For this analysis, relative abundances of the genus *Lepidodinium* within the protistan community, temperature, salinity, turbidity, depth, concentrations of dissolved oxygen and TEP as well as nutrient concentrations were used as quantitative variables. The representation of confidence ellipses (95% confidence interval) around the barycenter of each condition allowed distinguishing data groups.

3. Results

3.1. Protistan pelagic community

Protistan communities were similar between subsurface (0–1m), mid depth (5–13 m, depending on stations) and WSI (10–26 m) for both stations during both autumn-winter periods (Figure 25A–F). Alveolata dominated the entire dataset in terms of relative abundance (mean $\pm$ SD; $63.1 \pm 12.4\%$), followed by Stramenopiles ($19.7 \pm 1.3\%$), Hacrobia ($7.4 \pm 5.6\%$), Rhizaria ($4.4 \pm 3.3\%$), Archaeplastida ($2.3 \pm 2.6\%$), Opisthokonta ($1.0 \pm 0.8\%$) and Apusozoa ($0.1 \pm 0.2\%$). Relative abundances of Amoebozoa and Excavata were less than 0.1%. Unknown eukaryotes (eukaryotic ASVs not assigned to any taxonomic level) represented $2.1 \pm 1.8\%$ of the total protists. Within Alveolata, Dinophyta was the most abundant phylum, accounting for $92.5 \pm 6.4\%$ of the total Alveolata in the entire dataset. Dinophyceae (including dinoflagellates) was the most abundant class within the phylum Dinophyta ($69.2 \pm 26.2\%$).

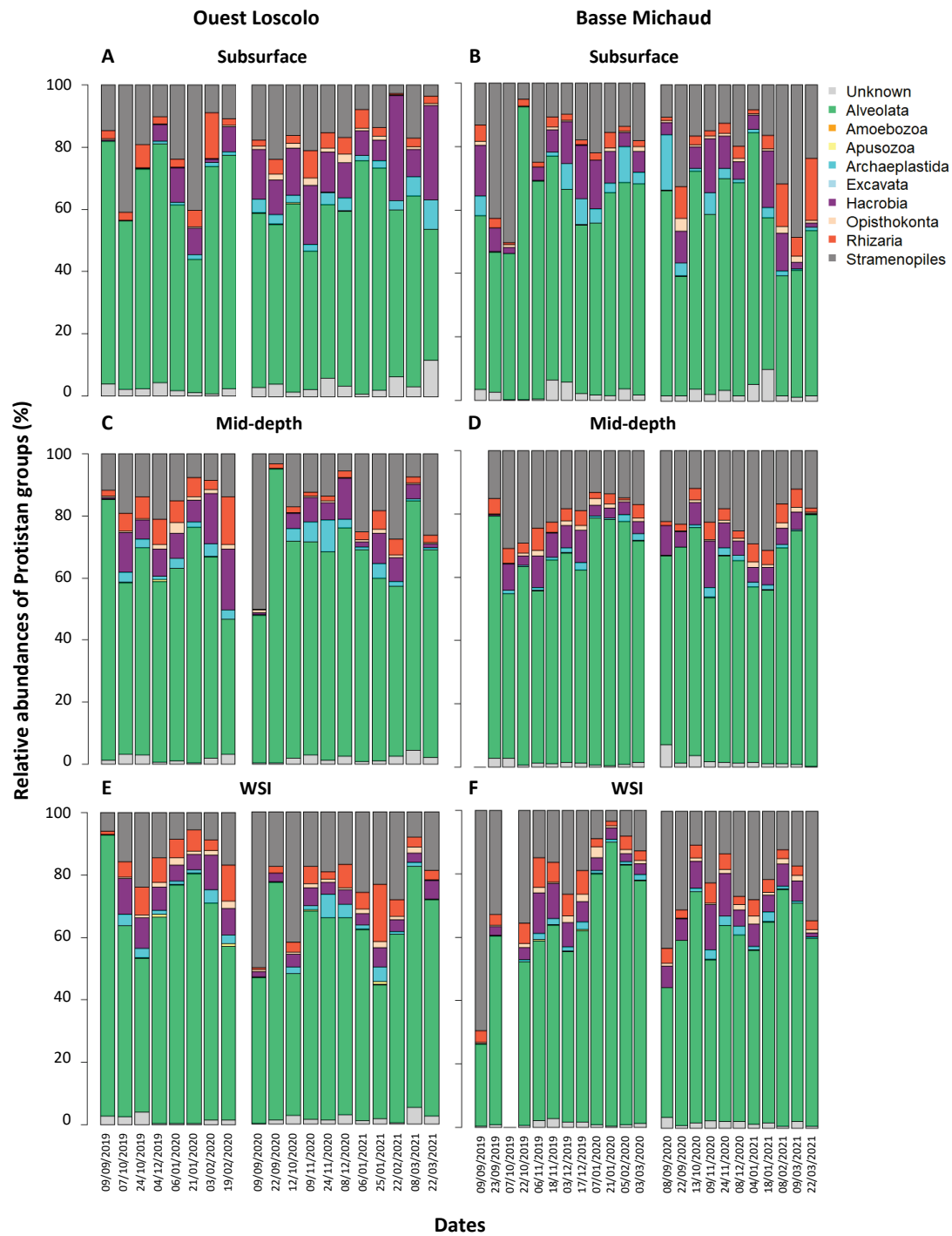


Figure 25. Relative abundance (%) of the protistan groups detected with eDNA metabarcoding. Water samples were collected at three depths during both autumn-winter periods: from September 2019 to March 2020 and from September 2020 to March 2021. Protistan communities were investigated at the station Ouest Loscolo (Vilaine Bay): (A) subsurface, (C) mid-depth, (E) WSI; and at the station Basse Michaud (offshore the Loire River): (B) subsurface, (D) mid-depth, (F) WSI.

The 15 most abundant genera of Dinophyceae accounted for an average of $38.2 \pm 20.3\%$ of the total dinophycean community. They were in descending order: *Heterocapsa* ($11.1 \pm 14.5\%$), *Gyrodinium* ($10.2 \pm 14.5\%$), *Gymnodinium* ($5.6 \pm 5.4\%$), *Warnowia* ($2.0 \pm 4.7\%$), *Biecheleria* ($1.7 \pm 2.3\%$), *Prorocentrum* ($1.7 \pm 1.7\%$), *Lepidodinium* ($1.6 \pm 4.6\%$), *Torodinium* ($0.9 \pm 1.3\%$), *Tripos* ($0.9 \pm 1.7\%$), *Pelagodinium* ($0.6 \pm 1.2\%$), *Gonyaulax* ($0.5 \pm 0.8\%$), *Lingulodinium* ($0.5 \pm 2.3\%$), *Alexandrium* ($0.4 \pm 0.8\%$), *Scrippsiella* ($0.4 \pm 1.1\%$) and *Polykrikos* ($0.3 \pm 0.5\%$) (Figure 26A–F). The dinophycean community was similar between both stations (Figure 26A–F and Figure S4). Relative abundances of the genus *Lepidodinium* varied from 0% to 20.5% (Figure 26A–F). In 2019, the highest relative abundances of *Lepidodinium* were recorded at the subsurface at the station Basse Michaud, representing 5.1%, 20.5% and 6.3% of the total protistan community on 22 October, 6 and 18 November 2019, respectively (Figure 26B). At the station Ouest Loscolo, the highest abundances of *Lepidodinium* were recorded at the subsurface on 24 November (9.8%) and 8 December 2020 (3.7%; Figure 26A). At both stations, *Lepidodinium* was also found at mid and WSI depths, at lower abundances (Basse Michaud: $0.7 \pm 1.2\%$; Ouest Loscolo: $0.3 \pm 0.6\%$).

The eDNA method (Figure 26) and inverted microscopy showed contrasting results (Figure S5). The 15 most abundant dinophycean groups determined using inverted microscopy (Figure S5) were different from those defined by the eDNA method (Figure 26). In general, the dinophycean community varied between both stations particularly at subsurface. Nevertheless, *Lepidodinium* was observed by microscopy in nine out of 124 samples analysed (Figure S5), when the genus was also detected with eDNA (Figure 26). *Lepidodinium* was only detected at the station Ouest Loscolo with the highest relative abundances within the total protistan community observed at the subsurface (Figure S5A) on 24 November (0.9%) and 8 December 2020 (1.3%).

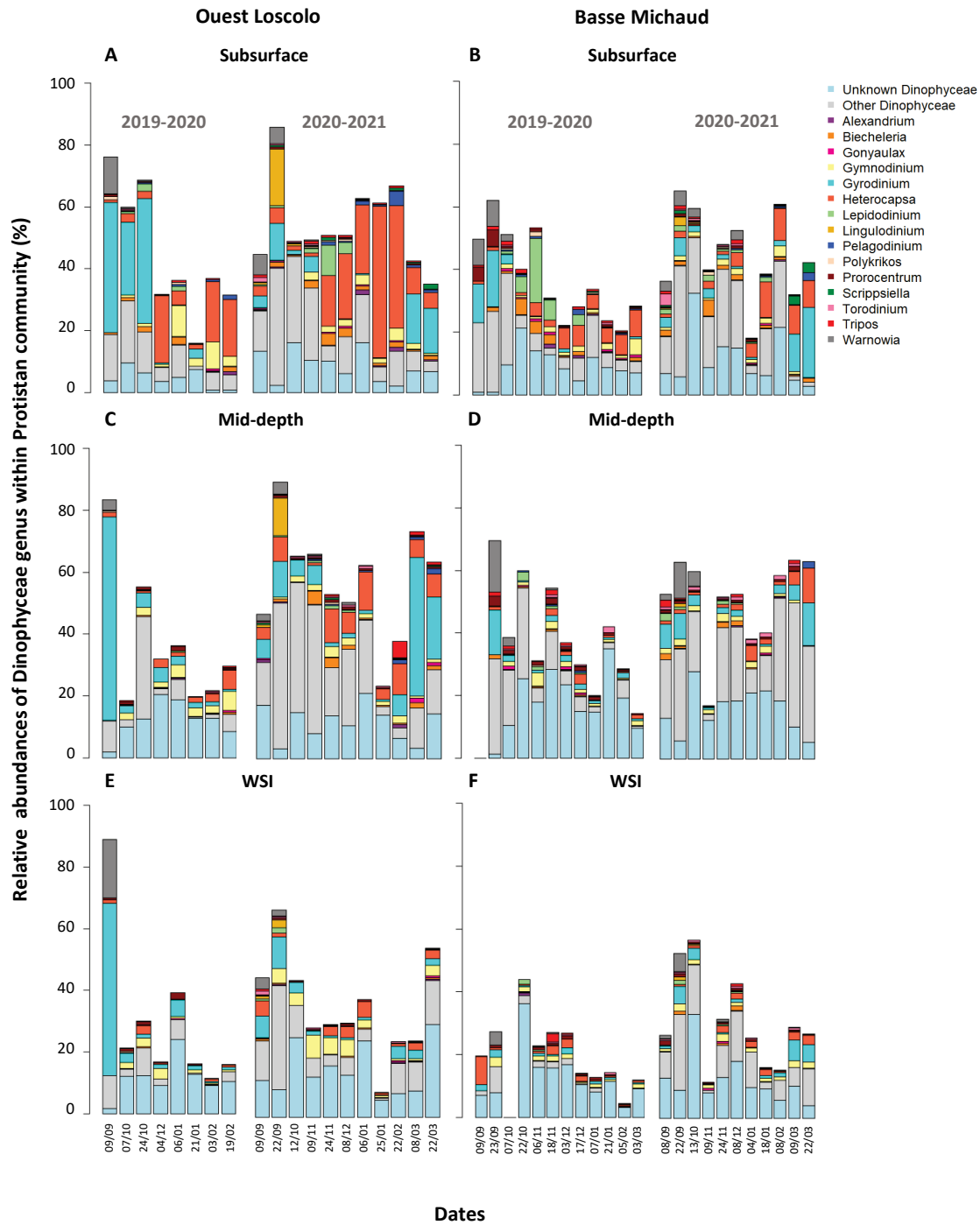


Figure 26. Relative abundance (%) of the 15 most abundant genera of dinophyceae within the protistan community detected with eDNA metabarcoding. Water samples were collected at three depths during both autumn–winter periods: from September 2019 to March 2020 and from September 2020 to March 2021. Dinophyceae communities were investigated at the station Ouest Loscolo (Vilaine Bay): (A) subsurface, (C) mid-depth, (E) WSI; and at the station Basse Michaud (offshore the Loire River): (B) subsurface, (D) mid-depth, (F) WSI.

3.2. *Lepidodinium* distribution in the water column and environmental parameters

Spatio-temporal patterns of relative abundances of the genus *Lepidodinium* were related to physicochemical characteristics of the water column (Figure 27 and Figure S6). Similar patterns were observed at both stations; those of Basse Michaud are here described in details as an example (Figure 27A–L).

Homogenous temperatures were recorded along the water column during both autumn-winter periods, suggesting vertical mixing during the sampling period. At the station Basse Michaud (Figure 27), seawater temperature decreased from 14.9 ± 1.6 (9 September 2019) to $11.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ (3 March 2020; Figure 27A) in autumn-winter 2019–2020 period, and from 17.7 ± 1.0 (8 September 2020) to $10.8 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ (22 March 2021; Figure 27B) in 2020–2021. During both autumn periods, homogenous salinity of 34.4 ± 0.9 was measured in the water column (Figure 27C, D). During winters, freshwater inputs from Loire River reached the station Basse Michaud as suggested by a decrease in subsurface salinity in December and January (Figure 27C, D). Indeed, subsurface salinity sharply decreased from 31.8 to 22.6 (3 and 17 December 2019, respectively; Figure 27C) and from 33.6 (8 December 2020) to 26.8 (4 January 2021; Figure 27D). Stratification index values (Figure S7) confirmed that a vertical mixing of the water column was observed in September–October ($\varepsilon < 0.05$) and a haline stratification occurred during the winter periods ($\varepsilon > 0.05$) with lower salinity at the subsurface than at the WSI for both years (Figure 27C, D). Similar patterns were observed for the station Ouest Loscolo that was influenced by the freshwater inputs from both rivers (Loire and Vilaine) (Figure S6A–D).

At Basse Michaud, turbidity ranged from 0.6 to 9.3 FNU at the subsurface and from 1.4 to 14.2 FNU at the WSI during autumn-winter 2019–2020 (Figure 27E). In particular, turbidity increased in the water column on 6 November 2019 with 6.3 and 12.0 FNU recorded at the subsurface and WSI respectively (Figure 27E), suggesting a resuspension of the sediment. At this date, resuspension of the sediment was associated with high $[\text{NH}_4]$ in the entire water column (Figure 27G), but more particularly at subsurface. Indeed, $[\text{NH}_4]$ sharply increased between 22 October and 6 November 2019 when the highest values of

2.90, 1.67 and 1.41 μM were observed at the subsurface, mid-depth and WSI, respectively (Figure 27G). A similar dynamics was observed on 9 November 2020 when an increase in turbidity up to 7.3 FNU at the WSI (Figure 27F) corresponded to an increase in $[\text{NH}_4]$ in the water column (subsurface: 1.51 μM ; mid-depth: 1.63 μM ; WSI: 1.59 μM ; Figure 27H). At the station Ouest Loscolo (Figure S6E-H), similar increase in $[\text{NH}_4]$, associated to higher turbidity values potentially caused by sediment resuspension, was observed on 7 October 2019 (range: 3.4–3.9 μM ; Figure S6G) and on 12 October 2020 (range: 2.1–3.0 μM ; Figure S6H).

From September 2019 to March 2020, relative abundances of *Lepidodinium* recorded at the station Basse Michaud using eDNA ranged from 0 to 20.5% with the highest value calculated on 6 November 2019 at the subsurface (Figure 27I), when the highest $[\text{NH}_4]$ were measured (Figure 27G). In autumn–winter 2020–2021, relative abundances were lower, ranging from 0 to 2% (Figure 27J) at the same station. In contrast, no *Lepidodinium* cells were observed using inverted microscopy during both autumn–winter periods at the station Basse Michaud (Figure 27K–L). Highest abundances of *Lepidodinium* in correspondence with highest $[\text{NH}_4]$ were also observed at the station Ouest Loscolo. Indeed, eDNA data showed the presence of the genus *Lepidodinium* during both autumn–winter periods with maximal relative abundances calculated at the subsurface on 24 October 2019 (2%; Fig S4I) and 24 November 2020 (9.8%; Figure S6J) when the highest $[\text{NH}_4]$ were measured in the water column (Figure S6G, H). At this station, the high abundance of *Lepidodinium* was verified by microscope counts. Indeed, maximal cell concentrations of 600 cells L^{-1} (Figure S6K) were measured on 24 October 2019 (eDNA: 2%; Figure S6I) and 5 200 cells L^{-1} (Figure S6L) on 24 November 2020 (eDNA: 9.8%; Figure S6J) at subsurface.

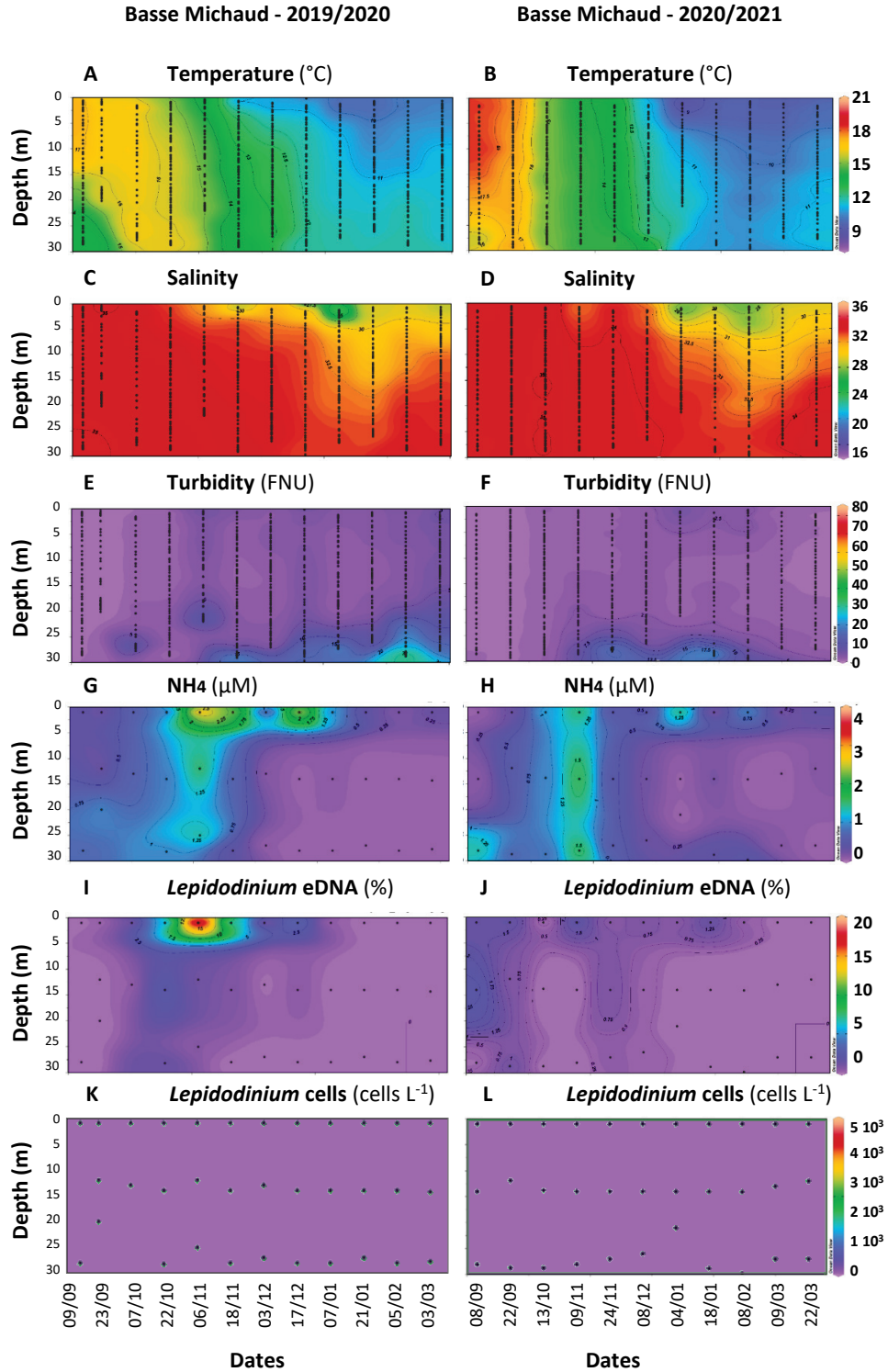


Figure 27. Spatio-temporal variability of biological and physicochemical parameters along the water column at the station Basse Michaud during both autumn-winter periods. (A–B) Temperature (°C); (C–D) Salinity; (E–F) Turbidity (FNU); (G–H) Concentrations of ammonium (NH₄; μM); (I, J) Relative abundance of *Lepidodinium* genus within the protistan community (%) detected by eDNA metabarcoding; (K–L) Relative abundance of *Lepidodinium* cells within the protistan community (cells L⁻¹) observed using an inverted microscope (Ocean Data View, 5.3.0).

A Principal Components Analysis (PCA) of the measured environmental parameters and the relative abundances of the genus *Lepidodinium* is shown in Figure 28. The PCA described 76% of the total data variance along three principal dimensions (Dim1, Dim2 and Dim3). The Dim1 explained temperature, salinity, [O₂] as well as [NO₃+NO₂], [DIP] and [DSi]. Nutrient concentrations and [O₂] were negatively correlated with salinity. The Dim2 explained depth, turbidity and [TEP]. Turbidity was positively correlated with [TEP] and depth. In this PCA analysis, relative abundance of *Lepidodinium* and [NH₄] were the variables most correlated with Dim3. While the relative abundance of *Lepidodinium* was positively correlated with [NH₄] and temperature, it was negatively correlated with depth.

Spearman correlations (Figure S8) corroborated the positive correlation between *Lepidodinium*, [NH₄] ($r=0.33$; $p<0.05$) and temperature ($r=0.30$; $p<0.05$). In contrast, *Lepidodinium* was negatively correlated with depth ($r=-0.24$; $p<0.05$) and turbidity ($r=-0.25$; $p<0.05$). No significant correlation was established between salinity and *Lepidodinium*.

3.3. *Lepidodinium* distribution in the sediment

To assess whether resuspension of *Lepidodinium* cysts in the water column could explain the presence of this species at subsurface after germination, field cysts analyses (germination experiments and cyst microscopy observations), single-cyst isolation and PCR identification, and sedimentary eDNA analyses were performed.

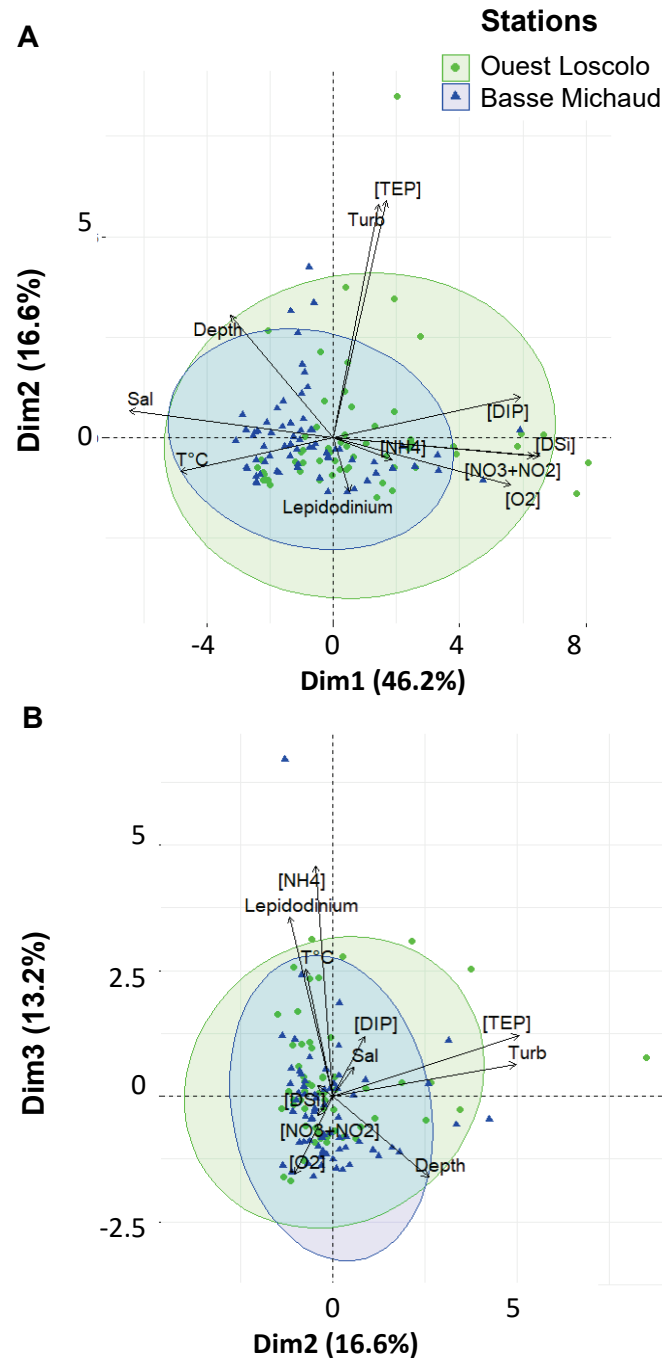


Figure 28. PCA summarizing the similarities and differences in environmental factors and the relative abundance of *Lepidodinium* genus at the two sampling stations during both autumn-winter periods. **(A)** Dim1, Dim2 and **(B)** Dim3 together describe 76% of the total variance. Black arrows are quantitative variables used to calculate PCA: relative abundance of *Lepidodinium* eDNA within the protistan community (*Lepidodinium*, %); TEP concentration (*[TEP]*, $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$); nitrogen (*[NO3+NO2]*, μM); phosphate (*[DIP]*, μM); silicates (*[DSi]*, μM) and ammonium concentrations (*[NH4]*, μM); turbidity (*Turb*, FNU); oxygen saturation (*[O2]*, %); salinity (*Sal*); temperature (*Temp*, $^{\circ}\text{C}$) and depth (*Depth*, m). Water samples are represented as follows: Basse Michaud station (blue triangles); Ouest Loscolo station (green circles). Confidence ellipses (95% confidence interval) allowed to distinguish stations: Basse Michaud (blue ellipse) and Ouest Loscolo (green ellipse).

The analyses of the three size classes showed the presence of a greater number of cysts in the > 20µm sediment size class. Germination experiments showed the presence of the dinoflagellate species *Alexandrium minutum*, *Gymnodinium aureolum*, *Heterocapsa* sp., *Scrippsiella* sp., *Sourniaea diacantha*, *Protoceratium reticulatum* and *Levanderina fissa*. Cysts of other species were detected under light microscopy: *Gymnodinium impudicum*, *Lejeunecysta* sp., *Lingulodinium machaerophorum*, *Sourniaea diacantha*, *Spiniferites belerius*, *Votadinium* sp., *Votadinium spinosum*. Other cysts not unambiguously attributable to a genus were also identified: spiny brown cysts (see some examples in Figure S9A–I). Since no resting cysts of *Lepidodinium* had been identified, 80 cysts corresponding to morphotypes resembling for size, morphology, green colour content to the *Lepidodinium* cyst morphotypes described by Sournia *et al.* (1992) (Figure S10A) were identified through single-cell PCR. Of the 80 cysts, only eight were successfully sequenced. Three were identified (identity 90–99% with reference sequence) as the freshwater species *Poterioochromonas malhamensis* (Ochromonadaceae) (Figure S10B), three were 90% related to a dinoflagellate species of the genus *Ensiculifera* sp. (Figure S10C), one was 94% close to *Ebria tripartita* (Cercozoa; Figure S10D) and one was 91% related to the ciliate *Strombidiniopsis batos* (Figure S10E). In conclusion, all these analyses failed to verify the presence of *Lepidodinium* resting cysts in the sediments of the analysed stations.

The eDNA data showed traces of the genus *Lepidodinium* at all stations and in different grain sizes (from clayey to sandy sediments; Figure 29 and Table S5), except for the NOIR station in both replicates. However, the relative abundance of *Lepidodinium* within the sedimentary protistan community was always very low (<1%). The maximal relative abundance of *Lepidodinium* was measured at the station PMAE where *Lepidodinium* represented 0.74% of the total protistan community in the sediments (Figure 29). eDNA of the genus *Lepidodinium* was slightly more abundant in the Vilaine Bay (0.24 to 0.74%) than offshore the Loire River (0 to 0.45%).

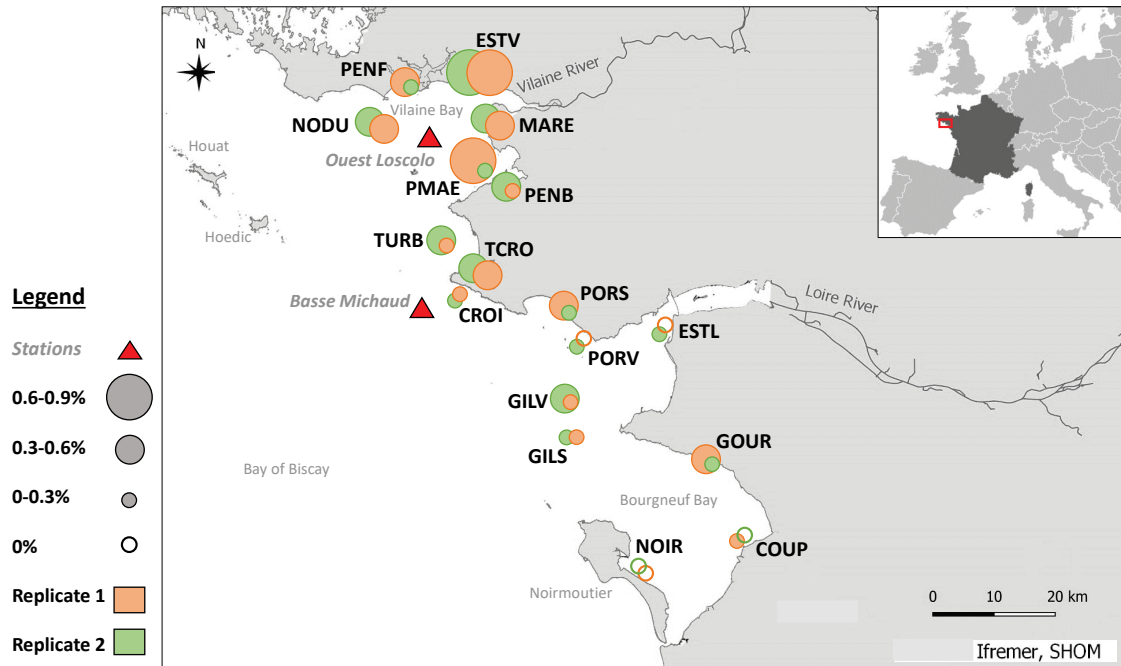


Figure 29. *Lepidodinium* eDNA distribution in the sediment. Duplicate sediment samples (orange and green circles) were collected at each sampling station in January-February 2019: La Coupelasse (COUP), Croisic Large (CROI), Estuaire Loire (ESTL), Estuaire Vilaine (ESTV), Pointe Saint Gildas (GILS and GILV), Gourmalon (GOUR), Maresclé (MARE), Nord Dumet (NODU), Noirmoutier (NOIR), Penbé (PENB), Pénerf (PENF), Pont Mahé (PMAE), Pornichet (PORS and PORV), Traict du Croisic (TCRO) and La Turballe (TURB). The size of the circles represents a scale of rare relative abundances of *Lepidodinium* eDNA within the protistan community (%). Water samples were collected at the two sampling stations (red triangles) during both autumn–winter periods: from September 2019 to March 2020 and from September 2020 to March 2021.

4. Discussion

The coupling between biogeochemical and eDNA analyses of sediment and water samples across two stations and during two autumn-winter seasonal surveys suggested that NH_4 input from sediments contributes to the initiation of the bloom of the green dinoflagellate genus *Lepidodinium*. The development of blooms of the dinoflagellate until the formation of water discoloration was not the objective of this study. Previous results demonstrated that water stratification and river inputs control the development of high biomass blooms of *L. chlorophorum* which were then sustained by bacterial remineralization of the organic matter (TEP) produced by this dinoflagellate (Roux *et al.* submitted). The current analyses, despite focused over a specific area where *L. chlorophorum* blooms occurs, may contribute to understand bloom dynamic initiation in other areas of the world where species of the genus are present.

4.1. *Lepidodinium* during non-favorable growth condition

In order to study a phytoplankton species bloom onset, it is needed to analyze the environmental parameters that allow positive cell growth in the field (Reynolds, 1984, 1998; Reynolds *et al.*, 2001), that here we call bloom initiation. This is the reason why this study voluntarily focused on the period (autumn–winter, from September to March) of the year when *L. chlorophorum* is less abundant and not blooming in our study area (Belin and Soudant, 2018; Roux *et al.*, submitted). In general, the composition of protistan communities during non-productive periods have gained less attention in ecological studies because of less interest for food chain and bloom (including harmful species) dynamics analyses (Zingone *et al.*, 2010). This is also the case in our study area, where studies focused on the autumn-winter season are rare. However, since 1987 and even during non-productive phytoplankton periods, the French Phytoplankton and Phycotoxin monitoring network has acquired information on phytoplankton communities along French coasts (REPHY) using microscopic methods (Belin and Soudant, 2018). Therefore,

some information about the autumn-winter phytoplankton community composition can be derived. Among the most abundant taxa, some Stramenopiles genera (*Skeletonema*, *Asterionella*, *Asterionellopsis*) were observed in all seasons including autumn-winter periods (Belin and Soudant, 2018). In contrast, some other Stramenopiles (*Pseudonitzschia*, *Chaetoceros*, *Leptocylindrus*) as well as Alveolata genera such as *Lepidodinium* and *Prorocentrum* were observed in all seasons except in winter (December–February; Belin and Soudant, 2018). Our eDNA data showed a similar protistan composition over the sampling period, at both stations (Figure S4) and across the water column (Figure 25). In particular, Dinophyceae (including dinoflagellates) represented a large part of the total protistan community. The 15 most abundant genera observed were: *Heterocapsa*, *Gyrodinium*, *Gymnodinium*, *Warnowia*, *Biecheleria*, *Prorocentrum*, *Lepidodinium*, *Torodinium*, *Tripos*, *Pelagodinium*, *Gonyaulax*, *Lingulodinium*, *Alexandrium*, *Scrippsiella* and *Polykrikos*. Zingone *et al.* (2010) also demonstrated that the composition of winter phytoplankton populations in the Gulf of Naples (Italy, Mediterranean Sea) was similar at different depths due to the homogenizing effect of the vertical turbulence.

Along the French coasts, some studies investigated the communities of marine microorganisms using molecular approaches. For example, Caracciolo *et al.* (2021) used eDNA metabarcoding to confirm the seasonal dynamics of marine protists communities on the English Channel while Lambert *et al.* (2021) studied the seasonal succession of marine microorganisms on the NW Mediterranean coast focusing on the winter period (January-March). In southern Brittany, to our knowledge, our study is the first specifically exploring the autumn-winter protistan community with a new tool, the eDNA metabarcoding, that provides an quite exhaustive characterisation of the relative abundance of protist genera and groups as well as the detection of rare taxa in the environment. Yet, this method does not always provide accurate analyses of species abundances, but rather relative abundance of genus or taxa identified at even higher taxonomic levels. This limit is due to the taxonomic resolution of the primers used for the amplification of the eDNA and the potential bias due to its PCR amplification and high-throughput sequencing. Pending the development of species-specific genetic-based method (qPCR, FISH) to study the ecology of *L. chlorophorum*, we considered metabarcoding semi-quantitative data of ASVs assigned to the genus *Lepidodinium*

enough informative for our study. Indeed, the genus is currently composed of only two species (*L. chlorophorum* and *L. viride*; Watanabe *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 2007; Siano *et al.*, 2009) and so far, *L. viride* has not been identified in our study area. Hence, while remaining cautious about the interpretation of our data, we consider that our evaluation of the relative abundance of the genus *Lepidodinium* approximate the abundance of *L. chlorophorum* in our study area.

While *Lepidodinium* has never been observed in winter in the frame of the REPHY network, our study based on an eDNA approach showed traces of the genus *Lepidodinium* in December and January. The development of molecular methods has improved our understanding of marine protists (Caron *et al.*, 2012; Pedros-Alios, 2012; Logares *et al.*, 2014). As in our study, the difference of phytoplankton composition between classical microscopic identification and eDNA-based methods have been highlighted (Zimmermann *et al.*, 2015; Abad *et al.*, 2016; Ruppert *et al.*, 2019; MacKeigan *et al.*, 2022). Yet, both methods provided similar results in seasonal protist community composition using long-term data series. Indeed, Caracciolo *et al.* (2021) investigated patterns of planktonic protist community succession in temperate latitudes using data from both microscopy count and eDNA metabarcoding collected over eight years (2009-2016) and found similar ecological patterns with both methods. Although microscopy does not consider the smallest taxa and eDNA metabarcoding can overestimate or underestimate the proportions of taxa for which DNA is more easily extracted and amplified (Santi *et al.*, 2021), a combination of both methods allows to assess absolute species abundance while improving taxonomic resolution, and therefore reveal great diversity (Caracciolo *et al.*, 2021).

The eDNA metabarcoding can be used to accurately identify the rare species and their dynamics. Regarding local communities, Logares *et al.* (2014) defined Operational Taxonomic Units as “rare” when their abundances were below 0.01%, following other studies of bacteria (Galand *et al.*, 2009; Pedros-Alios, 2012) and protists (Mangot *et al.*, 2013). Other studies recorded few dominant protistan taxa and a large number of rare ones from marine and freshwater communities (Stoeck *et al.*, 2009, 2010; Cheung *et al.*, 2010; Nolte *et al.*, 2010; Mangot *et al.*, 2013; Logares *et al.*, 2014). These rare marine microbes could increase in abundance following environmental perturbations or changes

(Caron and Countway, 2009). eDNA allowed to detect *Lepidodinium* abundance even at < 1% of abundance (minimum value: 0.01%) while it is known that, during GSD events, it can represent more than 90% of the whole micro-phytoplankton community (Roux *et al.*, submitted). In addition, the increase in this dinoflagellate from rare to high concentrations (from 0 to 20.5% of *Lepidodinium* at the station Basse Michaud) has been detected. Therefore, eDNA analyses not only allowed a more exhaustive characterisation of the protistan community, and specifically of the dinoflagellate community composition, but also the detection of the dynamics of *Lepidodinium* during non-bloom periods.

4.2. Environmental factors triggering *Lepidodinium* bloom initiation

Our observations showed that the maximal relative abundance of *Lepidodinium* was correlated with the maximal [NH₄] that followed an increase in turbidity at the water sediment interface (WSI). The accumulation of NH₄ in the sediments was well documented (*e.g.*, Rosenfeld, 1979; Blackburn and Henriksen, 1983; Chapelle *et al.*, 2000; Gribsholt *et al.*, 2005). In the Vilaine bay, Ratmaya *et al.* (2022) measured constant values of NH₄ around 300 µM below 5 cm in September 2015 while values could exceeding 1200 µM on June and August. In this area, the authors highlighted that the dissolved organic nitrogen concentrations measured in pore-water of sediments were within the same range as [NH₄] (Ratmaya *et al.*, 2022) and were in the same order of magnitude as those reported in the Chesapeake Bay (Burdige and Zheng, 1998) and the St. Lawrence estuary (Alkhatib *et al.*, 2013). Several studies showed that adsorption and desorption of NH₄ to sediments could be reversible and that exchangeable NH₄ can be released into interstitial water when the environmental conditions change (Morin and Morse, 1999; Morse and Morin, 2005; Fitzsimons *et al.*, 2006; Ospina-Alvarez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Therefore, when the water column is not stratified, resuspension of sediments could induce an increase in [NH₄] in the water column and promote phytoplankton growth. Indeed, many marine phytoplankton species showed glutamine synthetase (GS) activity, the major ammonium-assimilating enzyme, demonstrating a strong affinity for NH₄ (Bressler and Ahmed, 1984). This strong affinity also concerns dinoflagellates (*e.g.*, Collos *et al.*, 2007; Seeyave *et al.*,

2009; Jauzein *et al.*, 2017). In a coastal area of Southern Chile, Iriarte *et al.* (2005) detected GS activity in a *L. chlorophorum* (cited as *Gymnodinium* cf. *chlorophorum*) bloom under low [DIN], suggesting that *L. chlorophorum* could present high NH_4 affinity and assimilation rate (Iriarte *et al.*, 2005). In addition, in previous studies focused of the *L. chlorophorum* bloom development, we suggested that bacteria remineralisation, producing regenerated NH_4 , could sustain *L. chlorophorum* bloom for a long period (Roux *et al.* submitted). The co-occurrence of the higher abundances of *Lepidodinium* and NH_4 showed in this study corroborates the hypothesis that *L. chlorophorum in situ* has a strong affinity for NH_4 but also suggests that pulse in NH_4 can cause rapid growth of this dinoflagellate. Culture experiments under laboratory conditions are now needed to confirm whether the NH_4 is an important nutrient substrate for *Lepidodinium* growth.

Although the assimilation of NH_4 might have promoted the growth of *Lepidodinium* cells during the autumn-winter period, we did not observe any bloom of this species during our survey. A previous study highlighted that *L. chlorophorum* was associated to a summer-like ecological niche defined by high temperature, salinity and irradiance (Karasiewicz *et al.*, 2020). In addition, water column stratification and river inputs could trigger (Sourisseau *et al.*, 2016) and sustain (Roux *et al.*, submitted) *L. chlorophorum* blooms. During autumn-winter period, the increase in subsurface abundance of *L. chlorophorum* did not coincide with water column stratification and summer conditions. Therefore, we suggest that the environmental conditions occurred during bloom initiation in our survey did not favour the development of *L. chlorophorum*. We suggest that NH_4 resuspension from sediment could also occur later in the year, during spring-summer time (April-June), when high temperatures cause stratification of the water column, prior to the observation of high-biomass bloom regularly causing water discoloration in summer (July).

4.3. The origin of *Lepidodinium* bloom inoculum

The species that most likely to develop in a water-body may be those that have regularly produced populations in the past, presumably because they were most likely to

be able to provide the relatively large inoculum of vegetative cells required to initiate tangible increase when conditions favour their growth (Reynolds, 1984). For dinoflagellates, the bloom inoculum is often represented by cells germinated from cysts. Cyst formation is a common characteristic underlying bloom initiation, termination and the dispersion of dinoflagellates (Díaz *et al.*, 2018). They may remain viable for years until the favourable environmental conditions for their germination (McQuoid *et al.*, 2002; Lundholm *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011; Miyazono *et al.*, 2012). Some studies have shown that cysts tend to concentrate in fine-grained sediments (Anglès *et al.*, 2010). Kirn *et al.* (2005) observed *Alexandrium fundyense* cysts in the water column in the Gulf of Maine in winter and spring and, attributed them to resuspension of the sediments by waves and currents. They suggested that cysts from resuspension are important in inoculating spring blooms (Kirn *et al.*, 2005; Brosnahan *et al.*, 2020). In many coastal areas, the location of cyst accumulations could determine the location of resulting blooms (Anderson *et al.*, 2014). For example, surveys during seasonal bloom of *A. fundyense* in the Gulf of Maine demonstrated the link between seedbed and the areas of bloom initiation (Crespo *et al.*, 2011) and the same was found for *A. minutum* in the Bay of Brest using genetic methods for identifying seed banks (Klouch *et al.*, 2016). Similar results have been observed in European coastal waters such as in Thau Lagoon, France (Genovesi *et al.*, 2009), Cork Harbour, Ireland (Ní Rathaille and Raine, 2011) and Arenys de Mar harbour, Spain (Anglès *et al.*, 2010, 2012).

All our attempts to identify cysts of *L. chlorophorum* in the field failed. Blooms of this species were recorded in southern Brittany during the summer of 2018, previously to the start of our bi-seasonal monitoring in 2019 and 2020 (Table S6). Yet, hatching experiments and cyst identification based single-cell PCR techniques carried from sediment samples collected in January-February 2019 did not reveal the presence of resting cysts of *L. chlorophorum*. Our study showed the presence of rare (<1%) relative abundance of *Lepidodinium* eDNA in the sediments of our study area. This result could suggest the existence of cysts in the sediment but at very low concentration. However, it is suggested that extracellular DNA can represent a relevant fraction of the total DNA stored in the sediments (Pietramellara *et al.*, 2009). Considering all precautions taken for obtaining high quality eDNA data in the sediments (the collection of muddy sediment

which enhance the possibility to have better preserved DNA and the application of agreed procedures for benthic eDNA sampling suggested in Pawlowski *et al.* (2021)), we exclude bias in our sampling strategy and genetic procedures. However, we cannot exclude that our eDNA correspond to extracellular DNA which sank from surface to the bottom of the water column. Indeed, we did not compare DNA extraction methods for analysing protistan communities in the sediments as done in other studies (Siano *et al.*, 2021) and we used classical DNA extraction kits (Power Soil Max) that consider both the extracellular and intracellular eDNA fractions.

Another possibility is that the inoculum of *Lepidodinium* could originate from the water column. Cells of *L. chlorophorum* might be present in the water column at very low concentration and likely in a temporary quiescent stage, awaiting for better environmental conditions to grow. Indeed, for some dinoflagellates belonging to the genera *Dinophysis* and planktonic *Prorocentrum*, cysts have never been isolated from sediments (Smayda and Trainer, 2010). Some species can overwinter in low numbers remained below detection limits (<100 cells L^{-1}) (Sogin *et al.*, 2006; Record *et al.*, 2021) waiting for seawater warming and thermal stratification to develop blooms (Glibert *et al.*, 2018). This is the case of *Karenia mikimotoi* which forms blooms along the western European shelf, and for which a number of low winter concentrations (5–10 cells L^{-1}) have been observed in the Bay of Brest, France (Gentien, 1998). For *L. chlorophorum*, Sournia *et al.* (1992) observed cysts of this dinoflagellate in water samples. The authors described spherical cysts, characterized by a double membrane with the dinokaryon remaining visible inside (Sournia *et al.*, 1992). However, this hypothesis has not been confirmed by molecular analyses and it is not known whether these cysts originated from the water column or from the resuspension of sediments. Pending the clear identification of resting cysts in field sediment samples, we cannot exclude that *Lepidodinium* may thrive in the water column at low concentrations during autumn-winter awaiting for NH_4 input from sediments to start growing, and for higher temperature and water stratification to bloom.

5. Conclusions

This study investigated the autumn-winter protistan community composition (September–March) with the metabarcoding of the eDNA and allowed to demonstrate the rare presence of this genus in December and January, although *Lepidodinium* has never been observed in winter by light microscopy. In addition, the increase in this dinoflagellate abundance was detected during the non-productive period providing, for the first time, an explanation of *L. chlorophorum* bloom onset. Indeed, the coupling between biogeochemical and eDNA analyses of water samples during the two autumn-winter surveys (September–March) suggested that NH_4 pulses after sediment resuspension contribute to the initiation of a *Lepidodinium* bloom. This result confirmed that *L. chlorophorum* has a strong affinity for NH_4 in the field. We hypothesize that NH_4 resuspension from sediment could also occur later in the year (April–June), when high temperature and water column stratification could favour the development of a bloom.

Furthermore, although GSD caused by *L. chlorophorum* were recorded in coastal southern Brittany during the summer of 2018, no cysts of this species were observed in our study. In contrast, eDNA metabarcoding showed the presence of rare abundance of *Lepidodinium* eDNA in the sediments. This result could suggest the existence of cysts at very low concentration or the presence of extracellular DNA. Pending unambiguous identification of cysts in field sediment samples, it is suggested that *Lepidodinium* could thrive in the water column at low concentration during autumn-winter period (resistant pelagic stage), awaiting for NH_4 input from sediments to start growing, and for higher temperature and water stratification to bloom.

Acknowledgements

This work was carried out in the frame of the PhD of Pauline Roux, financed by Ifremer, Agence de l'Eau Loire Bretagne (project EPICE [180408801]), Region Pays de la Loire (project LEPIDO-PEN [06582 2019]), and was supported by the GDR PHYCOTOX, a CNRS/Ifremer network on Harmful Algal Blooms (<https://www.phycotox.fr/>). The authors thank Ifremer-LER/MPL staff for their technical contributions and the Ifremer Plateforme d'Analyse Sédimentaire (PAS) for technical support during granulometry analyses. The authors wish to thank Julien Quéré for dedicated assistance in DNA extraction.

Author contributions statement

Pauline Roux: Formal analysis, Data curation, Writing original Draft; **Kenneth Neil Mertens:** Investigation; Writing - Review & Editing; **Coralie André:** Investigation, Visualization; **Aouregan Terre-Terrillon:** Investigation, Visualization; **Karine Collin:** Investigation, Visualization; **Anne Schmitt:** Investigation, Visualization; **Soazig Manach:** Investigation, Visualization; **Joelle Serghine:** Investigation, Visualization; **Cyril Noel:** Investigation, Visualization; **Mathilde Schapira:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Funding acquisition; **Raffaele Siano:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - Review & Editing. All authors reviewed and accepted the final version of the manuscript.

6. Appendix

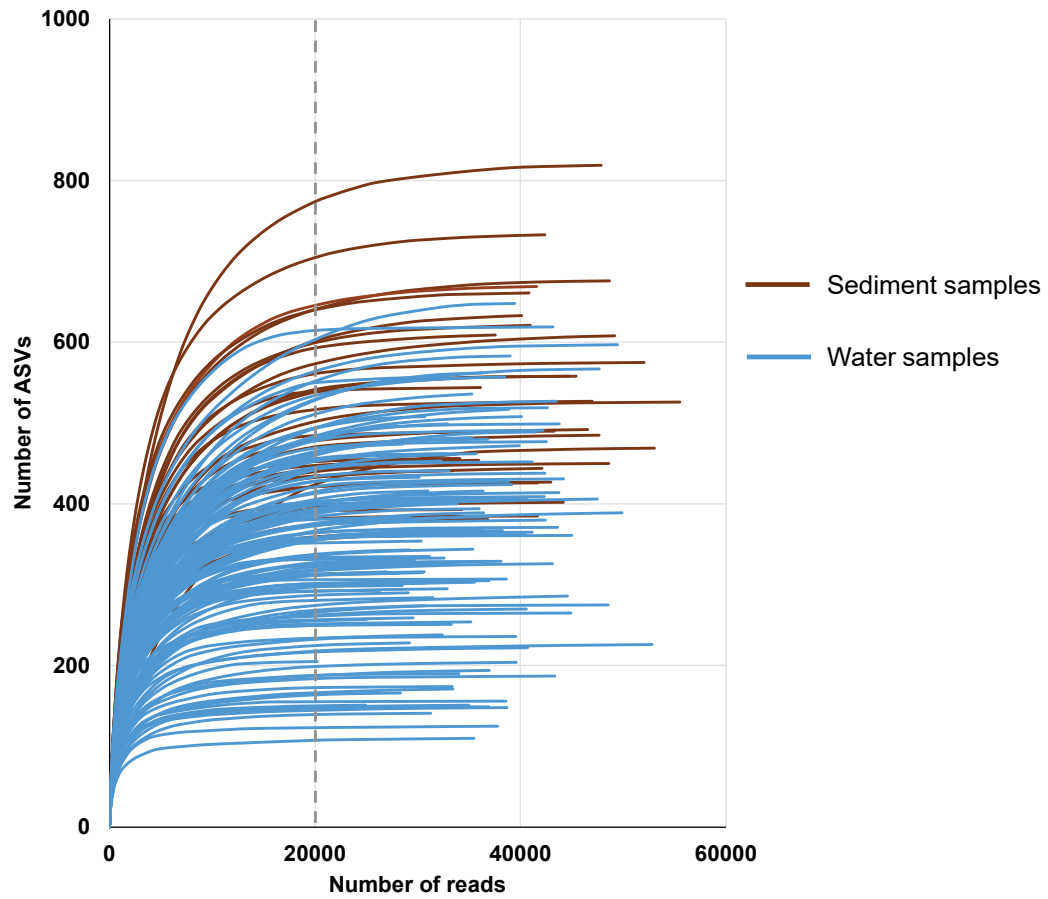


Figure S3. Rarefaction curves for each water samples (N=124; in blue) and sediment samples (N=34; in brown) collected in this study.

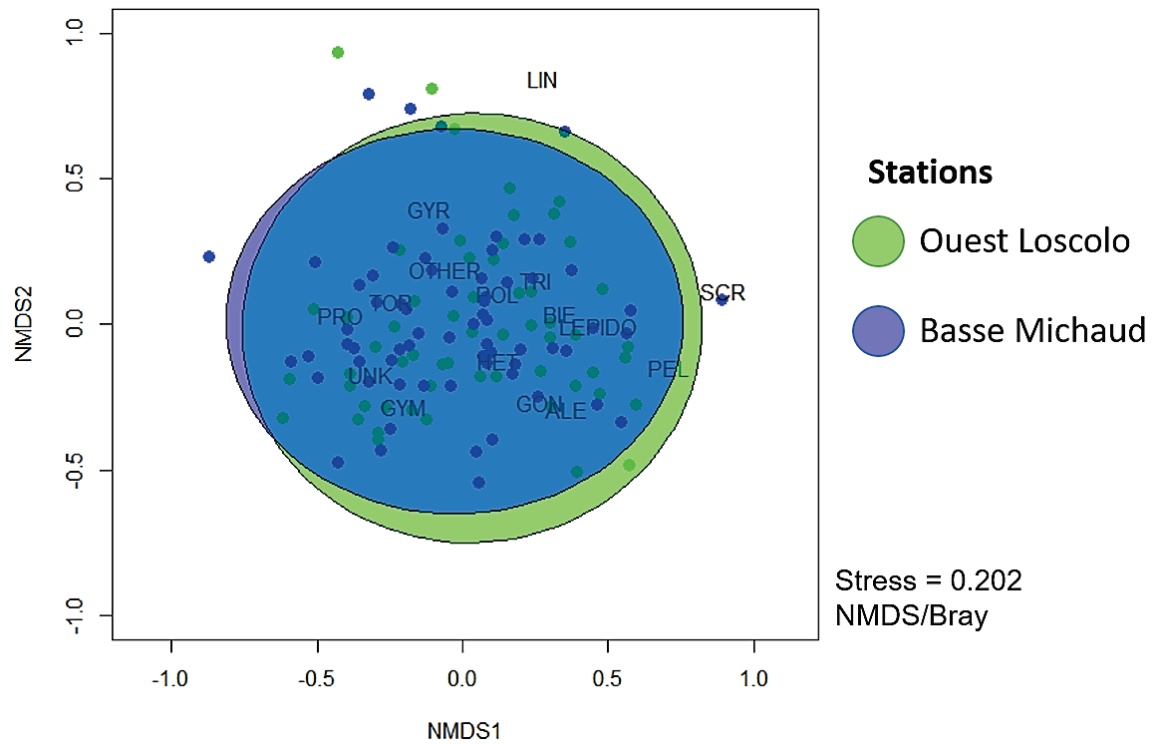


Figure S4. NMDS summarising the similarities and differences in dinophycean communities between both sampling stations (stress = 0.202). Labels represent the 15 most abundant genera of Dinophyceae: *Alexandrium* (ALE), *Biecheleria* (BIE), *Gonyaulax* (GON), *Gymnodinium* (GYM), *Gyrodinium* (GYR), *Heterocapsa* (HET), *Lepidodinium* (LEPIDO), *Lingulodinium* (LIN), *Pelagodinium* (PEL), *Polykrikos* (POL), *Prorocentrum* (PRO), *Scrippsiella* (SCR), *Torodinium* (TOR), *Tripos* (TRI), *Warnowia* (WAR). Other genera of Dinophyceae (OTHER) and ASVs not assigned to any dinophycean genus (UNK) are represented. Water samples, collected during both autumn-winter periods, are represented as follows: samples from Basse Michaud station (blue circles) and Ovest Loscolo station (green circles). Confidence ellipses (95% confidence interval) allowed to distinguish the dinophycean communities between both stations: Basse Michaud (blue ellipse) and Ovest Loscolo (green ellipse).

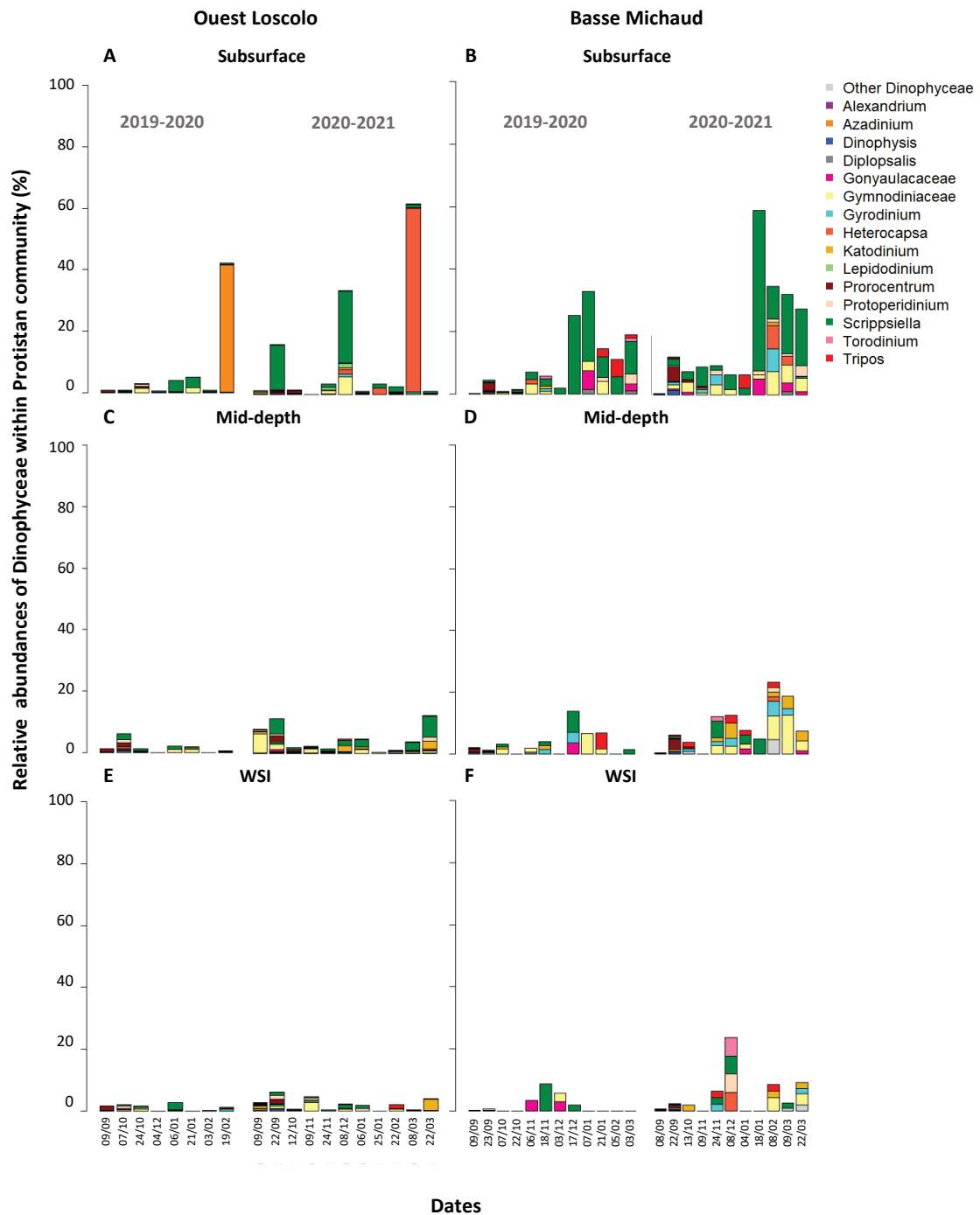


Figure S5. Relative abundance (%) of the 15 most abundant genera of Dinophyceae within the protistan community observed at light microscopy. Water samples were collected at three depths during both autumn-winter periods: from September 2019 to March 2020 and from September 2020 to March 2021. Dinophyceae communities were investigated at the Ouest Loscolo station (Vilaine Bay): (A) subsurface, (C) mid-depth, (E) WSI; and at the station Basse Michaud (offshore the Loire River): (B) subsurface, (D) mid-depth, (F) WSI.

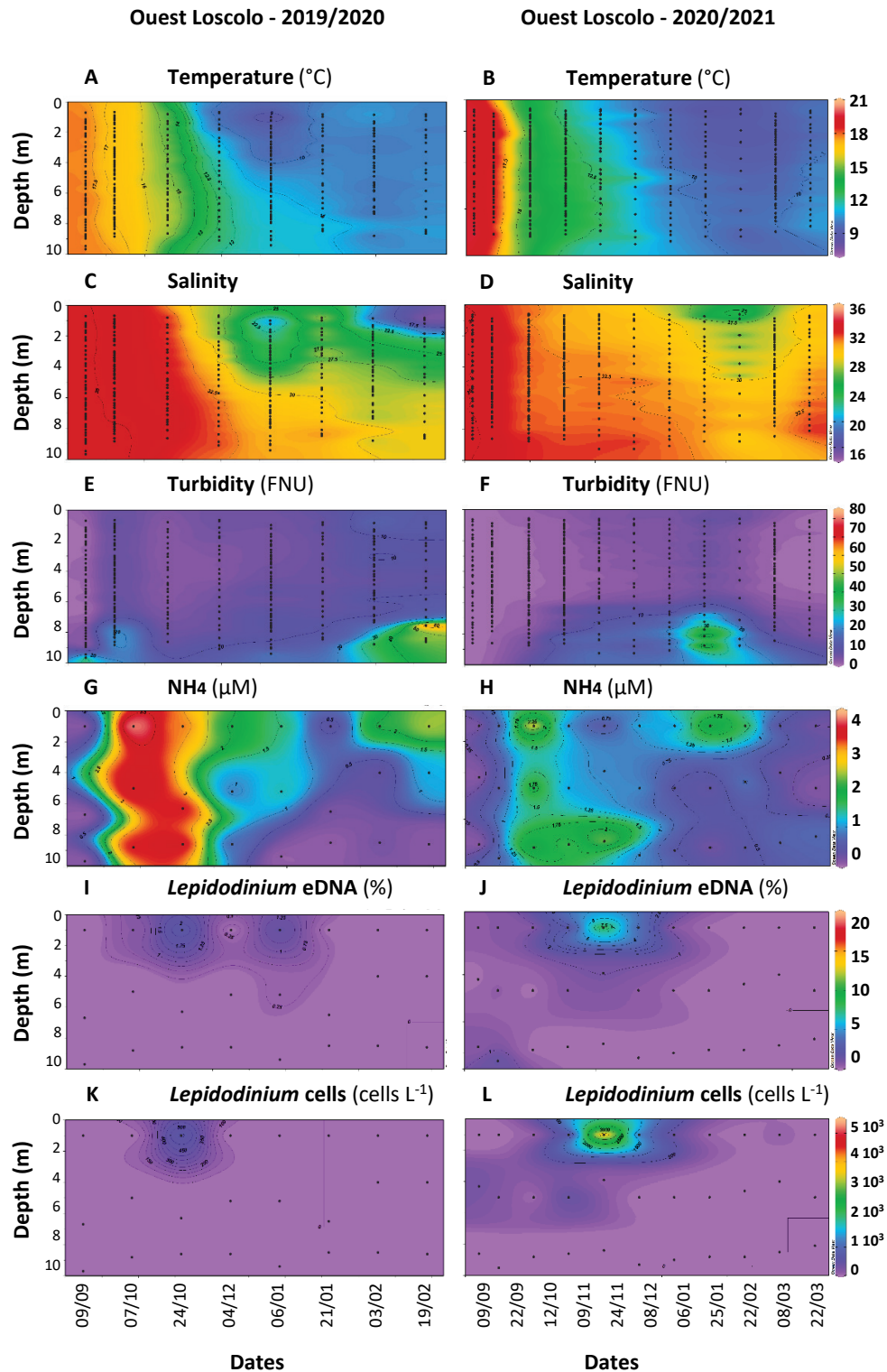


Figure S6. Temporal variability of biological and physicochemical parameters along the water column at the station Ouest Loscolo during both autumn-winter periods. **(A, B)** Temperature (°C); **(C, D)** Salinity; **(E, F)** Turbidity (FNU); **(G, H)** Concentrations of ammonium (NH₄; μM); **(I, J)** Relative abundance of *Lepidodinium* genus within the protistan community (%) detected by eDNA metabarcoding; **(K, L)** Relative abundance of *Lepidodinium* cells within the protistan community (cells L⁻¹) observed using an inverted microscope (Ocean Data View, 5.3.0).

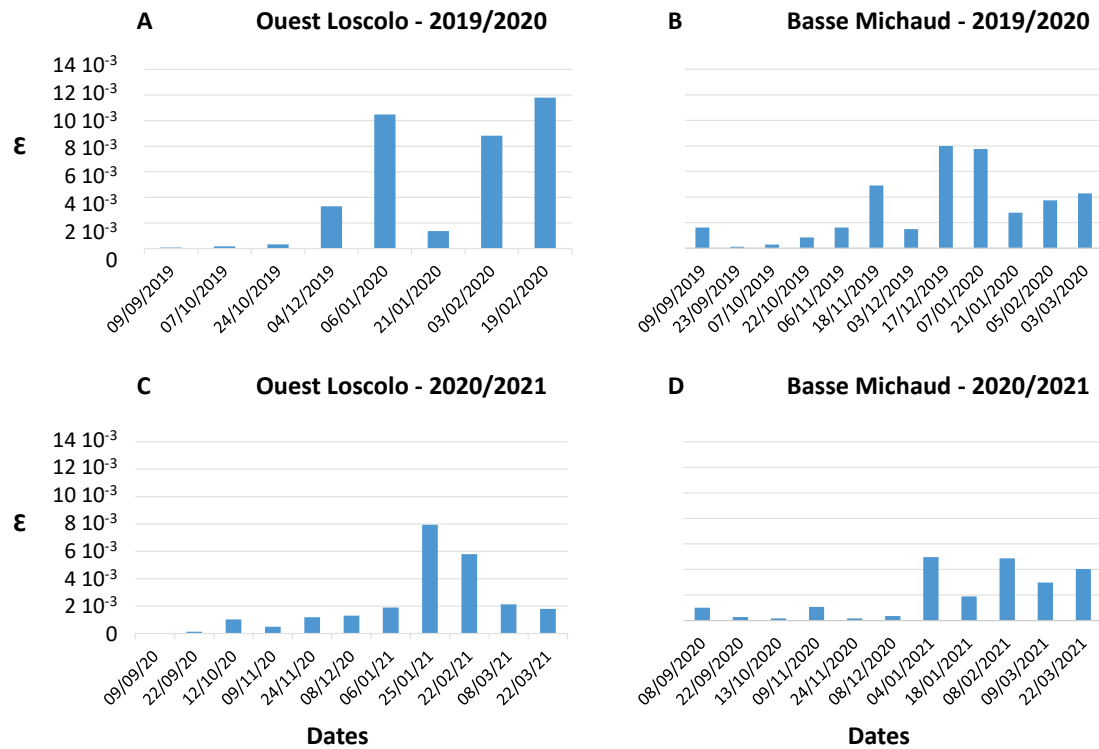


Figure S7. Stratification index (ϵ) computed for each sampling date (**A, C**) at the Ouest Loscolo station and (**B, D**) at the Basse Michaud station during both autumn-winter periods: from September 2019 to March 2020 and from September 2020 to March 2021.

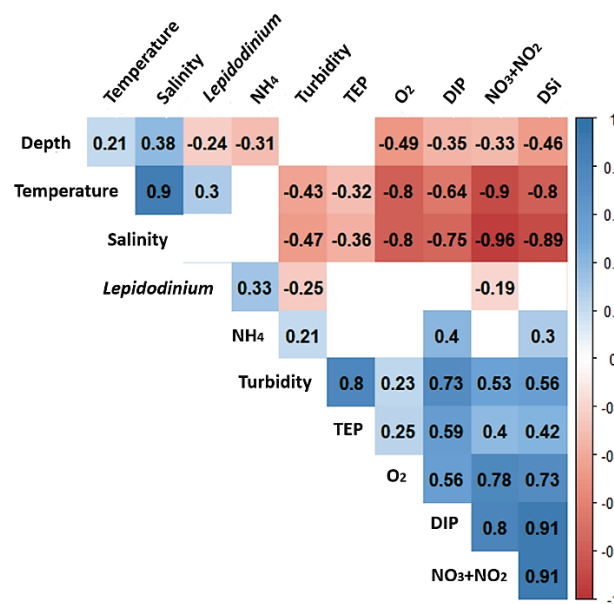


Figure S8. Spearman correlation matrix for all biological and physicochemical parameters measured at the two sampling stations during both autumn-winter periods (N=124; $p < 0.05$).

Table S5. Sediment granulometry measured using a laser particle size. Data were grouped by size class according to Blott and Pie (2001). Stations are located on the map in Figure 29.

Station	Sample	< 8 µm	8 - 32 µm	32 - 63 µm	63 - 125 µm	125 - 500 µm	> 500 µm	Type of sediment
Pénerf	PENF	1.00	56.52	11.02	14.46	1.85	0.13	Mud
Nord Dumet	NODU	1.88	78.30	12.38	5.17	1.90	0.35	
Estuaire Vilaine	ESTV	1.02	78.23	13.10	5.73	1.92	0.00	
Gourmalon	GOUR	1.36	79.33	9.04	4.92	5.26	0.09	
Maresclé	MARE	0.36	23.92	8.58	12.78	41.31	13.05	Sandy mud
Pont Mahé	PMAE	1.10	54.60	18.78	17.54	7.99	0.00	
Penbé	PENB	0.30	17.04	15.13	30.90	36.05	0.62	
La Turballe	TURB	0.75	31.45	8.09	25.14	31.16	3.39	
Traict du Croisic	TCRO	0.56	30.67	3.39	18.01	44.83	2.54	
Croisic Large	CROI	0.81	61.55	9.37	12.22	15.89	0.11	
Pornichet	PORV	1.44	63.13	7.97	8.38	16.97	2.11	
Point Saint Gildas	GILV	0.36	24.97	5.57	19.47	45.65	3.98	
Estuaire Loire	ESTL	1.19	63.03	6.78	11.56	16.92	0.51	
Noirmoutier	NOIR	0.34	28.27	10.65	15.20	38.82	6.76	
La Coupelasse	COUP	0.68	30.48	5.04	2.00	58.55	3.22	
Pornichet	PORS	0.01	7.83	1.63	10.56	65.07	14.80	Sand
Point Saint Gildas	GILS	0.00	4.86	1.21	7.61	44.75	41.23	

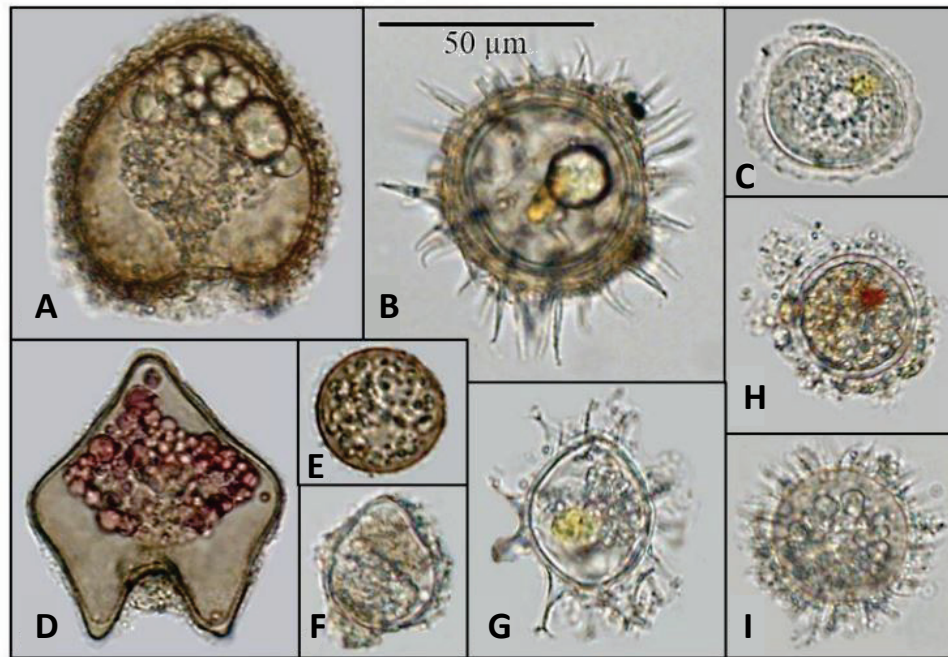


Figure S9. Diversity of common cysts of the Loire and Vilaine estuaries. (A) *Votadinium spinosum*, (B) *Lingulodinium machaerophorum*, (C) Cysts of *Gymnodinium impudicum*, (D) Cyst of *Protoperidinium oblongum*, (E) Cyst of *Diplopsalids*, (F) Cyst of *Gonyaulax verior*, (G) Cyst of *Spiniferites belerius*, (H) Cyst of *Alexandrium minutum*, (I) Brown spiny cyst.

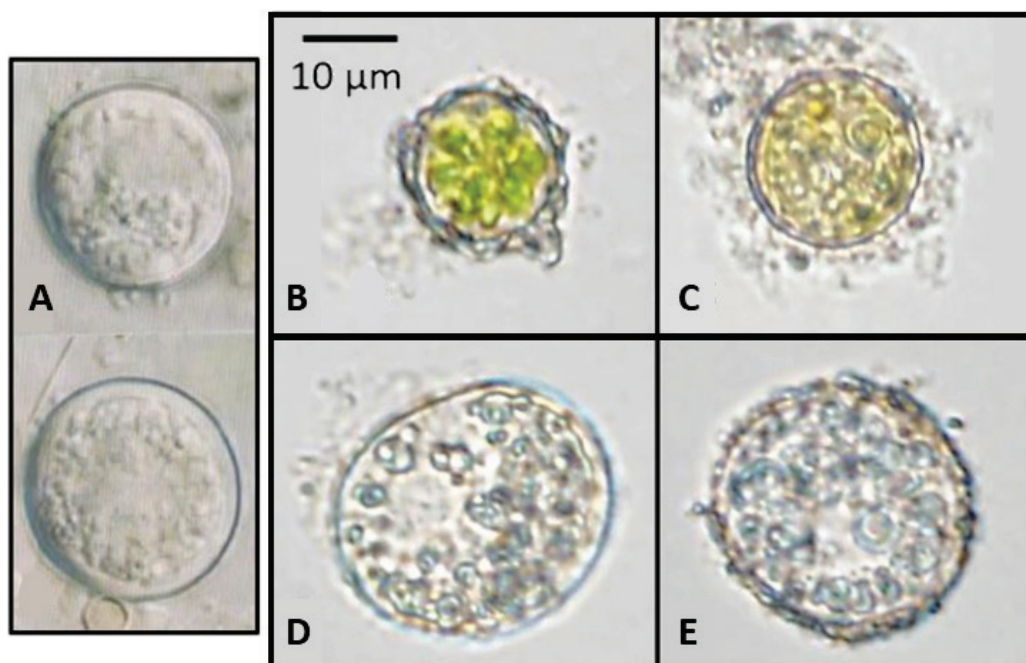


Figure S10. Single-cell PCR of cyst identification. (A) Cysts of *L. chlorophorum* observed by Sournia *et al.* (1992), (B) *Poterioochromonas malhamensis*, (C) Cyst of Dinoflagellate, (D) Cysts of Cercozoa, (E) Cysts of Ciliate.

Table S6. Citizen observations of Green Seawater Discolorations (GSD) during the summer 2018 and maximum abundances of *L. chlorophorum* cells associated to these events in our study area (www.phenomer.org) Sampling stations are located on the map in Figure 29.

Stations	Sample	Date of citizen observation of GSD (Phenomer)	<i>L. chlorophorum</i> maximum abundances (cells L ⁻¹)	Date of maximum
La Coupelasse	COUP	/		
Croisic Large	CROI	/		
Estuaire Loire	ESTL	/		
Estuaire Vilaine	ESTV	17/07/18	95.0 × 10 ⁶	17/07/18
Pointe Saint Gildas	GILDS	06/08/18		
Pointe Saint Gildas	GILDV	06/08/18		
Gourmalon	GOUR	03/08/18	2.0 × 10 ⁶	03/08/18
Maresclé	MARE	12/07/18	15.0 × 10 ⁶	17/07/18
Nord Dumet	NODU	/	6.0 × 10 ⁵	23/07/18
Noirmoutier	NOIR	/		
Penbé	PENB	25/07/18	5.1 × 10 ⁶	25/07/18
Pénerf	PENF	/	1.5 × 10 ⁶	31/07/18
Pont Mahé	PMAE	/	30.0 × 10 ⁶	23/07/18
Pornichet	PORS			
Pornichet	PORV	05/08/18	3.0 × 10 ⁶	05/08/18
Traict du Croisic	TCRO			
La Turballe	TURB			

Chapitre 3

Dynamique spatio-temporelle et
propriétés biogéochimiques des eaux
colorées vertes causées par le
dinoflagellé *Lepidodinium*
chlorophorum

Contexte de l'étude

Dans les systèmes côtiers, les efflorescences phytoplanctoniques sont contrôlées par des facteurs physiques (*e.g.*, débit fluvial, nutriments, température) et biologiques (*e.g.*, broutage, parasitisme, infections virales). Lorsqu'elles se produisent à forte biomasse, ces efflorescences peuvent induire une coloration de la surface de l'eau de mer (Siano *et al.*, 2020). Ces épisodes peuvent avoir un effet négatif sur le tourisme (Zingone and Enevoldsen, 2000) et le fonctionnement des écosystèmes. Bien que la présence de *Lepidodinium chlorophorum* soit relativement bien documentée (*e.g.* Honsell *et al.*, 1988 ; Elbrachter and Schnepf, 1996 ; Karasiewicz *et al.*, 2020 ; Siano *et al.*, 2020 ; Serre-Fredj *et al.*, 2021), les propriétés biologiques et écologiques qui font le succès de cette espèce dans l'environnement n'ont pas encore été élucidées. Les efflorescences vertes de *L. chlorophorum*, principalement observées en été (Belin *et al.*, 2021), pourraient être soutenues par le recyclage de l'azote organique en ammonium (Iriarte, 2005 ; Sourisseau *et al.*, 2016). Par ailleurs, ce dinoflagellé a été observé dans les panaches fluviaux et de fortes densités ont été ponctuellement mesurées au niveau de la pycnocline, dans des eaux stratifiées (Sourisseau *et al.*, 2016). En conditions contrôlées non-limitantes, *L. chlorophorum* excrète une grande quantité de TEP (Claquin *et al.*, 2008 ; Roux *et al.*, 2021). Si l'effet direct de ces TEP sur la faune marine reste à démontrer, les hypoxies/anoxies post-efflorescence sont suspectées d'être une cause majeure de mortalité (Sournia *et al.*, 1992 ; Siano *et al.*, 2020). Cependant, aucune étude n'a cherché à savoir si cette production de TEP représentait un avantage écologique pour *L. chlorophorum*.

Ce troisième chapitre cherche à décrire le cycle saisonnier de *L. chlorophorum* et à documenter les propriétés biogéochimiques de ses efflorescences en baie de Vilaine.

Un suivi *in situ* a été mené en 2019 pour caractériser le cycle saisonnier de cette espèce. Afin de décrire la dynamique spatio-temporelle et les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte, un échantillonnage spécifique a été réalisé en juillet 2019 au cœur d'une eau colorée verte et couplé à l'étude de données satellitaires. La concentration et la composition des EPS produites *in situ* ont été caractérisées. Enfin, la contribution des TEP (fraction particulaire des EPS) au pool de carbone organique a été estimée afin d'évaluer les effets potentiels de cette propriété biologique de *L. chlorophorum* sur le fonctionnement de l'écosystème.

Financement

Cette étude a été menée dans le cadre du projet LepidoPen « Les eaux colorées vertes à *Lepidodinium chlorophorum* et leurs conséquences sur les productions aquacoles en région Pays de la Loire : de l'acquisition de connaissances vers un futur système d'alerte » financé par la Région Pays de la Loire (projet porté par M. Schapira, Ifremer LER-MPL).

Contribution des auteurs

Les plans d'échantillonnage ont été conçus par M. Schapira, R. Siano et moi-même. Toute l'équipe du LER-MPL a participé aux sorties sur le terrain dans le cadre du suivi saisonnier. M. Schapira, O. Pierre-Duplessix, K. Collin, A. Schmitt et moi-même avons réalisé l'échantillonnage spécifique au sein de l'eau colorée verte. M. Retho a traité les données acquises par la bouée haute-fréquence MOLIT. Les analyses de concentrations en Chla ont été réalisées par A. Schmitt. L'identification et le dénombrement des organismes phytoplanctoniques en microscopie optique ont été effectués par A. Schmitt et S. Manach tandis que les analyses de nutriments inorganiques ont été menées par K. Collin et O. Pierre-Duplessix. K. Collin a également réalisé les analyses de concentrations en carbone organique et j'ai réalisé les mesures de concentrations en TEP. Le laboratoire Ifremer EM3B a caractérisé la composition des SEP récoltés *in situ* par le biais d'analyses biochimiques menées par L. Marchand et dont les résultats ont été traités par S. Collic-Jouault. Enfin, P. Gernez, V. Pochic et M.L. Zoffoli, exerçant au laboratoire MMS (Mer Molécule Santé) de l'Université de Nantes, ont étudié les données satellitaires permettant de décrire la variabilité spatio-temporelle de l'eau colorée verte échantillonnée. J'ai compilé l'ensemble des résultats, appliqué des analyses statistiques et proposé des figures synthétisant ce jeu de données conséquent. J'ai rédigé un article sous la supervision de M. Schapira et R. Siano. Au cours de cette rédaction, P. Souchu m'a apporté son expertise concernant les cycles de nutriments et de carbone. Cet article a été soumis au journal *Estuarine, Coastal and Shelf Science* et a été accepté avec corrections mineures.

Spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of Green Seawater Discolorations caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*

P. Roux¹, R. Siano², P. Souchu¹, K. Collin¹, A. Schmitt¹, S. Manach³, M. Retho³,
O. Pierre-Duplessix¹, L. Marchand⁴, S. Colliet-Jouault⁴, V. Pochic⁵, M. L.
Zoffoli⁵, P. Gernez⁵, M. Schapira^{1,*}

¹Ifremer, LITTORAL, F-44300 Nantes, France

²Ifremer, DYNECO, F-29280 Plouzané, France

³Ifremer, LITTORAL, F-56100 Lorient, France

⁴Ifremer, BRM, F-44300 Nantes, France

⁵Nantes Université, Institut des Substances et Organismes de la Mer, ISOMer, UR 2160, F-44000 Nantes, France

*Corresponding author: mathilde.schapira@ifremer.fr

Abstract:

Green seawater discoloration (GSD) caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* can affect the recreational use and the tourism economy along Southern Brittany (NE Atlantic, France). Hypoxic conditions associated with phytoplankton biomass recycling are suspected to cause fauna mortalities. A monitoring field campaign was performed in 2019 to characterise the seasonal variability of this species. *Lepidodinium chlorophorum* was observed from May to November, with a maximum abundance and associated GSD in June–July. Specific GSD sampling demonstrated a dominance of *L. chlorophorum* within micro-phytoplankton, and documented its vertical variability. Satellite observation was used to compute the surface extent of the GSD. Remote sensing highlighted the importance of small-scale temporal variability, with tidal currents being a primary driver of surface distribution of the GSD. Freshwater inputs and thermal stratification contributed to promoting and structuring the bloom of *L. chlorophorum*. High concentrations of phosphate and ammonium, as well as of transparent exopolymer particles (TEP), were recorded within the GSD. Bacteria, through cells and TEP remineralisation, could provide inorganic nutrients to sustain bloom development. Hence, TEP production might correspond to an ecological advantage for the dinoflagellate for self-feeding its blooms, conversely causing negative effects on the environment and its biological resources through hypoxia.

Key-words: *Lepidodinium chlorophorum*; Coastal waters; HABs; TEP; Hypoxia; Remote sensing

1. Introduction

Phytoplankton blooms in marine coastal ecosystems could lead to the accumulation of a high biomass of photosynthetic microorganisms (protists and cyanobacteria; Cloern, 1996). These accumulations often occur at the land-sea interface when the cellular positive net growth surpasses biomass losses, an equation resulting from the interplay of biological and physical environmental parameters. In coastal systems, phytoplankton blooms are controlled by physical factors, such as inputs from river flow (Peierls *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2013), coastal upwelling (Brown and Ozretich, 2009), atmospheric deposition (Paerl, 1997), wind (Iverson *et al.*, 1974; Carstensen *et al.*, 2005), nutrient availability (Margalef, 1978), tidal mixing and stratification (Cloern, 1996), heat waves that set up thermal stratification (Cloern *et al.*, 2005), increasing residence time of water (Odebrecht *et al.*, 2015), seasonal changes in temperature, and solar irradiance (Shikata *et al.*, 2008), and biological variables, such as benthic and planktonic grazing pressure (Carstensen *et al.*, 2007; Cloern *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2008), parasites (Siano *et al.*, 2011; Garvetto *et al.*, 2018), and viral infections (Suttle, 2007).

When occurring at a high biomass, these natural phenomena may cause surface seawater discoloration (*i.e.*, green, red, brown) and/or foam production, thus altering the appearance of coastal waters (Siano *et al.*, 2020) and can have significant impacts on ecosystem functions and services. By altering the aesthetic quality of the coastal areas, seawater discoloration may have a negative effect on tourism (Zingone and Enevoldsen, 2000), and the remineralisation of the high volume of biomass produced during intense blooms may create hypoxic/anoxic conditions that are deleterious for marine aquaculture (Sournia *et al.*, 1992). The increase in the distribution and severity of these events may be driven by climate change (Hallegraeff, 2010; Gobler *et al.*, 2017). However, a better understanding of the dynamics and consequences of water discolorations in coastal areas is still needed.

Seawater discoloration in marine coastal waters is produced by different photosynthetic protists and cyanobacteria. Different shades of red discolorations may be induced by the massive development of various dinoflagellates (*e.g.*, *Noctiluca scintillans*;

Quevedo *et al.*, 1999; Cabal *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2020) and ciliates (*e.g.*, *Mesodinium rubrum*; Zhang *et al.*, 2020). While dark brown discolorations caused by diatoms are frequently reported worldwide, other phytoplankton species of the phylum Ochrophyta (Heterokontophyta) could also be responsible for dark brown discolorations, including members of the class Raphidophyta and Dictyochophyta (Siano *et al.*, 2020). Green-pigmented microalgal classes (Prasinophyta and Cyanophyta) are known to frequently cause green blooms. The capacity of the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* to form green seawater discoloration (GSD) is due to the presence of a green plastid (Matsumoto *et al.*, 2011) inherited from a secondary endosymbiosis with a chlorophyte (Kamikawa *et al.*, 2015; Gavalás-Olea *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2018). Blooms of this unarmoured dinoflagellate (Elbrachter and Schnepf, 1996; Hansen *et al.*, 2007) have been observed in coastal waters worldwide, including Chile (Iriarte *et al.*, 2005; Rodríguez-Benito *et al.*, 2020), California, USA (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014), Australia (McCarthy, 2013), and Europe (Honsell and Talarico, 2004; Sourisseau *et al.*, 2016). GSDs due to the massive development of *L. chlorophorum* have been reported in Southern Brittany every year since 1982 (Sournia *et al.*, 1992; Siano *et al.*, 2020).

Although the occurrence of *L. chlorophorum* is relatively well documented (Honsell *et al.*, 1988; Sournia *et al.*, 1992; Paulmier *et al.*, 1995; Elbrachter and Schnepf, 1996; Sourisseau *et al.*, 2016; Karasiewicz *et al.*, 2020; Siano *et al.*, 2020; Serre-Fredj *et al.*, 2021), the biological and ecological properties that make this species successful in the environment have not yet been fully elucidated. *Lepidodinium chlorophorum* is a dinoflagellate species that has reached very high abundance ($> 10^6$ cells L⁻¹) along the Atlantic French coast over the last 20 years (Sourisseau *et al.*, 2016). Blooms of *L. chlorophorum*, which are mainly observed during summer (Siano *et al.*, 2020; Belin *et al.*, 2021), could be supported by the recycling of organic nitrogen in its ammonium form (Sourisseau *et al.*, 2016). This eurythermal and euryhaline dinoflagellate (Elbrachter and Schnepf, 1996; Claquin *et al.*, 2008) has been observed in river plumes (Sournia *et al.*, 1992; Sourisseau *et al.*, 2016), and the highest densities have been reported occasionally at the pycnocline in stratified waters (Sourisseau *et al.*, 2016). In 2010, especially high densities of *L. chlorophorum* were observed across the Loire River plume (Sourisseau *et al.*, 2016). Furthermore, as with most dinoflagellates, several studies suggested that *L.*

chlorophorum could be considered mixotrophic (Jeong *et al.*, 2010; Sourisseau *et al.*, 2016). The mixotrophic or pure autotrophic characteristic may have strong implications for understanding bloom dynamics. However, while a strain of *Lepidodinium* sp., isolated recently from subtropical coastal waters, has been shown to be a facultative mixotroph (Liu *et al.*, 2021), to our knowledge, the mixotrophy of *L. chlorophorum* has not yet been clearly established. Moreover, the life cycle of *L. chlorophorum* has rarely been studied thus far. Furthermore, benthic cyst production has not been observed, and despite some observations in culture (Sournia *et al.*, 1992), the existence of temporary cysts in the field remains unclear.

Lepidodinium chlorophorum is not known to produce toxigenic substances for human or marine fauna, but under non-limiting culture conditions, it excretes a large amount of transparent exopolymer particles (TEP; Claquin *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2021) which may impact marine fauna. TEP are composed of a large amount of carbon, and their aggregations tend to accelerate organic matter sedimentation (Passow *et al.*, 2001; Mari *et al.*, 2017; Bittar *et al.*, 2018). Blooms of *L. chlorophorum* have been associated with mass mortalities of fish and cultivated bivalves along the Atlantic French coast (Sournia *et al.*, 1992; Chapelle *et al.*, 1994; Siano *et al.*, 2020), and numerical models have suggested that oysters (*i.e. Crassostrea gigas*) may be negatively affected when feeding upon *L. chlorophorum* (Alunno-Bruscia *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016). If the direct effect of TEP produced by *L. chlorophorum* on marine fauna remains to be elucidated, post-bloom hypoxic/anoxic conditions associated with the recycling of high biomass (phytoplankton cells and TEP) are suspected to be a major cause of fauna mortalities (Sournia *et al.*, 1992; Siano *et al.*, 2020). However, to our knowledge, no study has investigated whether the high production of TEP *in situ* may provide an ecological advantage for *L. chlorophorum*.

This study aimed to describe seasonal variation of *L. chlorophorum* as well as to document bloom biogeochemical properties in the Vilaine Bay (NE Atlantic, France), a coastal area regularly impacted by eutrophication and subsequent algal proliferation (Ratmaya *et al.*, 2019). A specific monitoring field campaign was performed in 2019 to characterise the seasonal variation of this species. To further investigate GSD dynamics, high-resolution satellite data were combined with *in situ* sampling during a GSD event in July 2019. The concentration and composition of extracellular polymeric substances

produced during *L. chlorophorum* GSD were characterised and compared with a recent culture study (Roux *et al.*, 2021). Finally, the potential contribution of TEP produced by *L. chlorophorum* on the organic carbon pool was investigated to further assess the potential effects of this biological property of *L. chlorophorum* on ecosystem functioning.

2. Material and Methods

2.1. Study area

South Brittany has been identified as a hot spot for *L. chlorophorum* bloom development in France (Belin *et al.*, 2021), therefore *L. chlorophorum* abundance was analysed in two bays of this coast: Quiberon and Vilaine (Figure 30). These bays were selected based on the recurrent observations of *L. chlorophorum* within the phytoplankton community (Siano *et al.*, 2020; Belin *et al.*, 2021).

Quiberon Bay is a shallow bay (15 m) characterised by weak tidal currents and receive indirect freshwater inputs, as the Loire and Vilaine River plumes tend to spread toward the NW and remain confined along the coast, particularly during early spring (Lazure and Jégou, 1998). Low freshwater inputs combined with low vertical mixing cause strong haline stratification in this bay (Planque *et al.*, 2004). From spring to mid-September, thermal stratification is superimposed onto the haline stratification. During thermal stratification, W/NW winds may induce local upwelling (Lazure and Jégou, 1998; Puillat *et al.*, 2004, 2006).

Vilaine Bay is a 69 km² shallow (10 m) bay directly influenced by the Vilaine and Loire Rivers, with a mean annual flow of 70 and 850 m³ s⁻¹, respectively (Lazure *et al.*, 2009). The Loire River plume generally spreads NW with a dilution of 20- to 100-fold by the time it reaches the Vilaine (Ménèsguen and Dussauze, 2015; Ménèsguen *et al.*, 2018). The Vilaine River plume generally spreads throughout the bay before moving westward (Chapelle *et al.*, 1994). A dam located 8 km from the mouth regulate freshwater discharge and was constructed in 1970 to prevent saltwater intrusion upstream (Traini *et al.*, 2015).

The Vilaine Estuary is the most sheltered estuary of the French Atlantic coast; the water residence time in the bay varies from 10–20 days depending on the season and is generally longer during calm periods (Chapelle *et al.*, 1994). The water circulation is characterized by low tidal and residual currents and is mainly driven by tide, wind, and river flow (Lazure and Salomon, 1991; Lazure and Jégou, 1998). Haline stratification is strong from February to June in response to high river runoff and relatively low vertical mixing, whereas thermal stratification occurs between May and mid-September (Puillat *et al.*, 2004). The Vilaine Bay has undergone eutrophication for several decades mainly due to the high nutrient inputs from the Vilaine and Loire Rivers (Rossignol-Strick, 1985; Ratmaya *et al.*, 2019).

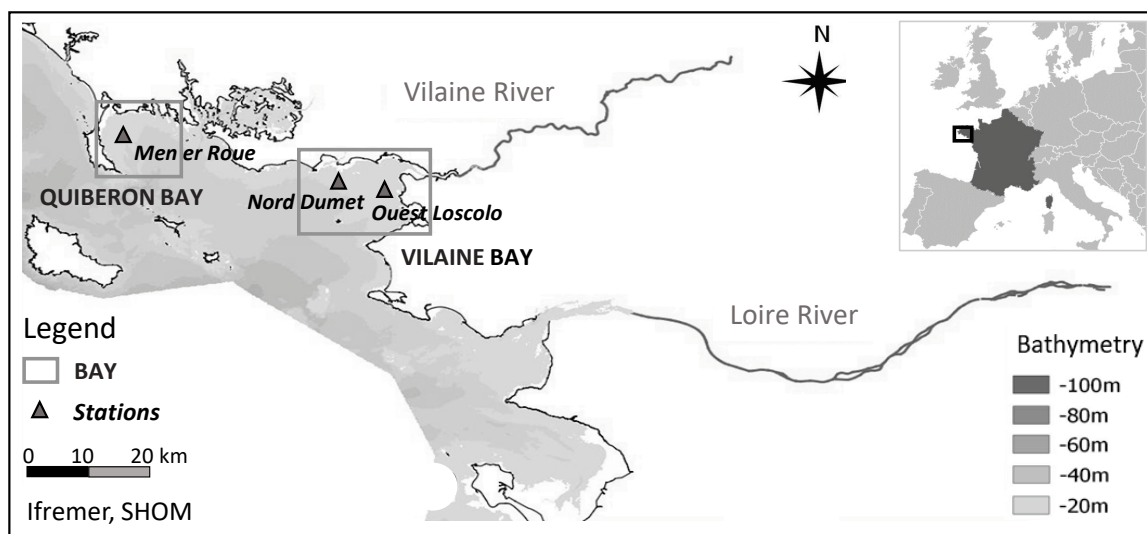


Figure 30. Location of the three sampling stations of the Vilaine Bay (Nord Dumet, Ouest Loscolo) and Quiberon Bay (Men er Roue) monitored in 2019 in Southern Brittany coast (NE Atlantic, France).

2.2. Seasonal monitoring in 2019

To determine the period for *L. chlorophorum* bloom occurrence, monitoring was performed in Quiberon and Vilaine bays from May to December 2019. Sampling was conducted fortnightly at high tide (± 2 h) at three stations: Men er Roue (Quiberon Bay), Ouest Loscolo, and Nord Dumet (Vilaine Bay; Figure 30). Vertical profiles of seawater temperature ($^{\circ}\text{C}$), salinity, turbidity (nephelometric turbidity unit; NTU), and *in vivo* fluorescence (fluorescein fluorescence unit; FFU) were performed with a multi-parameter

probe (NKE MP6) from the subsurface to the Water-Sediment Interface (WSI; 8–14 m, depending on stations). Water samples were collected using a 5 L Niskin bottle at three depths: subsurface (0–1 m), 1 m above the WSI, and at the fluorescence maximum (F_{max}) when present. Water sample aliquots were processed for microphytoplankton identification and enumeration and for chlorophyll *a* concentration ([Chl*a*]; $\mu\text{g L}^{-1}$). Dissolved inorganic nitrogen, phosphorus and silicates concentration ([DIN, DIP, DSi]; μM) were measured as well as TEP ([TEP]; $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$) and particulate organic carbon concentration ([POC]; μM). Analytical procedures are described in section 2.4. At the Nord Dumet station, these data were collected every fortnight, in addition to temperature, salinity, and dissolved oxygen concentrations, which were acquired continuously and autonomously by the MOLIT buoy of the COAST-HF network (Coastal Ocean observing SysTem-High Frequency). This instrumented buoy measured these parameters in 1-h intervals at the subsurface and 1 m above the WSI (Retho *et al.*, 2020). Data on the river flow was extracted from the French hydrologic database (<http://www.hydro.eaufrance.fr/>). Daily wind data were retrieved from the weather station Belle Ile – Le Talus (47°17'39"N; 3°13'05"E) from the Météo-France observation network (<https://donneespubliques.meteofrance.fr/>).

2.3. Specific GSD sampling in summer 2019

On July 9, 2019, a specific sampling method was implemented to investigate the spatial structure and hydrological changes caused by the massive development of *L. chlorophorum*. Along a seaward transect, six stations were sampled at high tide: three stations inside and three stations outside the GSD. Sampling was performed as previously described. To further investigate the organic matter produced during an *L. chlorophorum* bloom, several additional parameters were measured: concentrations of dissolved organic carbon ([DOC]; μM) and nitrogen ([DON]; μM), and nitrite concentration ([NO₂]; μM). Moreover, to investigate the composition of the soluble fraction of the extracellular polymeric substances (soluble extracellular polymers, SEP) present within a bloom of *L. chlorophorum*, a subsurface water sample was collected at St1. To complete the

characterisation of this bloom event, satellite data were used to estimate its extent and duration.

2.4. Analytical procedure of physicochemical and biological variables

For inorganic nutrients, 300 mL water samples were pre-filtered through 41 μm pore silk directly from the Niskin bottle. For dissolved silicate (*i.e.*, $\text{DSi} = \text{Si}(\text{OH})_4^-$) concentrations, water samples were filtered through 0.45 μm acetate cellulose membrane and stored at 4°C until analysis. Water samples for the determination of dissolved inorganic nitrogen (*i.e.*, $\text{DIN} = \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$) and phosphorus (*i.e.*, $\text{DIP} = \text{PO}_4^{3-}$) were stored directly at -20°C. Samples were analysed using an auto-analyser (Seal analytical AA3) following standard protocols (Aminot and Kérouel, 2007). The limits of quantification (LQ) were 0.4 μM for DSi, 0.5 μM for $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, and 0.05 μM for DIP, NH_4^+ , and NO_2^- . Measurement uncertainty measurement was 12% for DSi, 10% for $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, 15% for DIP, and 27% for NH_4^+ .

Total dissolved nitrogen concentrations ([TDN]) was measured using the persulphate oxidation method (Raimbault *et al.*, 1999; Aminot and Kérouel, 2004) and then analysed in segmented continuous flow on the auto-analyser according to Aminot and Kérouel (2007). [DON] were calculated by the difference between [TDN] and [DIN].

To estimate [POC] in the GSD, 100–250 mL were gently filtered onto combusted GF/F filters (Whatman® Nuclepore™; for 4 h at 450°C) and stored at -20°C until analysis. After removal of carbonates with phosphoric acid, filters were treated using a CHN element analyser (Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) to measure [POC] and nitrogen ([PON]) concentrations (Aminot and Kérouel, 2004). [DOC] were measured on the filtrates collected in acid washed and pre-combusted glass tubes and stored at -20°C. Analyses were conducted using a TOC meter (Shimadzu TOC-V_{CSH}). Measurement uncertainty was 12%.

The extracellular polymeric substances were analysed to: 1) estimate [TEP] in the GSD and 2) characterise the composition of SEP present within a bloom of *L. chlorophorum*. [TEP] was determined using a semi-quantitative method based on the

colorimetric determination of the amount of dye complexed with extracellular particles (Claquin *et al.*, 2008, adapted from Passow and Alldredge, 1995) as described in Roux *et al.* (2021). Briefly, triplicate samples of 50–150 mL were gently filtered through 0.4 μm polycarbonate membrane filters (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membrane). Particles retained on the filter were stained with Alcian Blue (Sigma) solution. The filters were soaked in 80% sulphuric acid for 2 h and absorbance read at 787 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2600). The TEP concentrations are expressed in μg xanthan equiv L^{-1} . To characterise the SEP present within a bloom of *L. chlorophorum*, 1 L of subsurface water sample collected at St1, located inside the GSD, was centrifuged (4000 g for 30 minutes at 4°C), and protein and monosaccharide contents were characterised (Roux *et al.*, 2021). To confirm the presence of a sulphated polysaccharide, SEP were analysed by both electrophoresis analysis (PAGE gel) and ATR-FTIR spectroscopy and compared to sulphated polysaccharide standards (galactan sulphate MW 80,000, 7.7% S extracted from *Asparagopsis armata*; dextran sulphate sodium salt MW 50,000, 16.0–19.0% S from Sigma D-8787; dextran sulphate sodium salt MW 500,000, 16.0–19.0% S from Sigma D-6001). The PAGE gel (10% w/v acrylamide) was prepared in 1.5 M Tris HCl buffer at pH 8.8 containing ammonium persulphate (0.05% w/v) and tetramethylethylenediamine (Temed). Polyacrylamide stacking gel (4% w/v acrylamide) was prepared in 0.5 M Tris HCl at pH 6.8, ammonium persulphate (10% w/v), and Temed. Samples (40 μL) were prepared in loading buffer (0.5 M Tris HCl pH 6.8, glycerol, 0.5 M EDTA, 0.5% w/v bromophenol) and then loaded on polymerised acrylamide gels. The gel was fixed for 30 minutes in 12.5% (v/v) trichloroacetic acid and stained for 15 minutes with toluidine blue (triméthylthionine hydrochloride) solution at 1% (w/v acetone 80%) and then bleached for 2 h with acetic acid 1%. The FT-IR spectra of the sample and standards were recorded at room temperature using OPUS software at the absorbance mode from 4000 to 400 cm^{-1} (100 scans) with a resolution of 4 cm^{-1} using a Golden Gate single reflection diamond ATR system in a Bruker IFS-55 spectrometer.

Phytoplankton biomass was estimated through [Chl a]. Water samples (500–1000 mL) were filtered through GF/F filters (Whatman®) and stored at -20°C until analysis. Inside the GSD, only 5–50 mL water samples were filtered. Chlorophyll was extracted in 10 mL of 90% acetone in the dark at 4°C for 12 h and analysed by monochromatic

spectrophotometry (Aminot and Kérouel, 2004). Microphytoplankton ($> 20 \mu\text{m}$) abundance and community diversity were assessed using an inverted microscope (Zeiss, Axio Observer). One-litre water samples were fixed with Lugol iodine solution (2% f.c.) and stored in the dark at 4°C . Samples were gently homogenised before settling in 10 mL sub-sample for $> 12 \text{ h}$ in Hydro-Bios counting chambers (Utermöhl, 1958). Limits of quantification was 100 cells L^{-1} . In addition, non-fixed 10 mL sub-samples were observed under light microscopy with the aim of confirming the identification of *L. chlorophorum*. Samples collected inside the GSD were diluted 10 times with filtered seawater ($0.2 \mu\text{m}$). The relative abundance of the main microphytoplankton groups that were clearly identifiable by light microscopy (dinoflagellates, diatoms, cryptophyceae) was calculated. Ciliophora, euglenoidea and pymnesiophyceae were pooled into a group named "Other". Genera or species $\geq 3\%$ were represented.

2.5. Satellite data and processing

Previous studies have demonstrated that blooms of *L. chlorophorum* can be detected from satellite remote sensing (Sourisseau *et al.*, 2016; Rodríguez-Benito *et al.*, 2020). Satellite remote-sensing can detect phytoplankton in the top layer of the water column, from the surface down to the penetration depth (which roughly corresponds to the Secchi depth). Using *in situ* reflectance measurements, the penetration depth was estimated to vary from 2.6 m in bloom areas where *L. chlorophorum* was highly concentrated to 19 m outside the bloom waters (Lee *et al.*, 2005).

In the present study, two types of satellite data were used to study the spatial distribution of *L. chlorophorum* during the GSD event in 2019. First, a Landsat-8 (L8) image from 9 July 2019 was selected because it was acquired on the same day as the GSD field samples. Although L8 did not offer the optimal spectral resolution to accurately detect phytoplankton blooms, it was still useful to roughly observe patches of high [Chl a] at a spatial resolution of 30 m (Caballero *et al.*, 2020). L8 data were processed using the POLYMER atmospheric correction (Steinmetz *et al.*, 2011), and [Chl a] was roughly estimated using the OC3 algorithm (O'Reilly *et al.*, 1998).

Second, satellite images from the Sentinel-2 (S2) mission were used to monitor the bloom's spatial distribution and estimate its surface extent in summer 2019. Due to its high spatial resolution (20 m), revisit time (5 days), and radiometric specifications (10 spectral bands in the visible and near-infrared (NIR) spectral domain), S2 is able to detect phytoplankton blooms in optically complex coastal waters (Caballero *et al.*, 2020). Top-of-atmosphere Level-1C data were downloaded from the Copernicus Open Access Hub and corrected from the atmospheric signal to compute the remote-sensing reflectance (R_{rs}). Three distinct methods of atmospheric correction (AC) were used, and the estimation of the bloom's surface area was eventually computed as the average from the three methods. The combination of several AC methods was chosen here to filter out radiometric uncertainties and provide a robust estimation of the bloom extent from satellite data. In complement to Sen2cor, the default AC implemented by the European Space Agency (Main-Knorn *et al.*, 2017), two other common AC methods were used: POLYMER (Steinmetz *et al.*, 2011) and GRS (Harmel *et al.*, 2018).

A visual inspection of the S2 imagery over the study area from May to August 2019 was performed to select all images showing a green discoloration typical of an *L. chlorophorum* bloom (Siano *et al.*, 2020). Only images showing a conspicuous colour were selected and further processed. Selected images were mostly cloud free and made it possible to accurately detect the bloom's spatial distribution and to compute its areal extent. Partially cloudy images were not used in quantitative analyses but were still useful to investigate bloom temporal dynamics. Bloom detection was performed using an NIR-to-red band ratio algorithm (Gilerson *et al.*, 2010). The reflectance peak near 700 nm is a well-known feature of Chl a -rich waters (Gitelson, 1992), and the ability of the $R_{rs}(705)/R_{rs}(665)$ ratio to detect high concentration of chlorophyll- a (typically $> 7 \mu\text{g L}^{-1}$) has been previously demonstrated (Lavigne *et al.*, 2021). Red-edge algorithms are known to perform satisfactorily in coastal turbid waters due to the influence of the Chl a absorption band around 675 nm as well as the limited interference of non-algal particles (Gernez *et al.*, 2017, Zeng and Binding, 2019) on the NIR-to-red band-ratio. A radiometric threshold of $R_{rs}(705)/R_{rs}(665) > 1.05$ was used here as a bloom indicator for *L. chlorophorum*. This threshold was obtained empirically by comparing each cloud-free S2 image with the R_{rs} spectra of 50 pixels located inside the bloom vs. 50 pixels outside the

bloom. While a recent satellite study of a massive *L. chlorophorum* bloom in southern Chile (Rodríguez-Benito *et al.*, 2020) used a threshold corresponding to $R_{rs}(705)/R_{rs}(665) > 1$, we applied a more conservative threshold to reduce the number of false positives. An additional radiometric criterion was further used to detect *L. chlorophorum* using its typical green reflectance peak near 560 nm (Sourisseau *et al.*, 2016). Using the same empirical method, we determined that a threshold of $R_{rs}(560)/R_{rs}(490) > 1.2$ improved the discrimination between bloom and non-bloom areas; the combination of both thresholds allowing to efficiently detect GSD pixels, even among the optically complex waters of the Vilaine estuary. Finally, a geometric mask was applied to remove submerged macroalgae surrounding shallow rocky shores, and mudflats where microphytobenthos biofilms could be visible below clear shallow waters.

2.6. Statistical analyses

The spatial distribution of biological and physicochemical parameters during the GSD event were represented by a section scope using the software Ocean Data View (ODV) 5.3.0 (Schlitzer, 2020). As the number of samples per group of variables was low ($n < 10$), the hypotheses of normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity of residuals (Bartlett test) were not verified. The Spearman correlation matrix was calculated for all parameters at the subsurface and WSI. Statistical analyses were performed using R software 3.6.1 (R Core Team, 2019).

3. Results

3.1. *Lepidodinium chlorophorum* seasonal variation in 2019

From May to December 2019 (Figure 31A-U), *L. chlorophorum* was observed both at the subsurface and WSI samples at the three sampling stations (Figure 31S, T, U and

Figure S11). The highest abundances were recorded at the Fmax depth (Table 4) or at the WSI, demonstrating that the highest *L. chlorophorum* abundance might occur at different water depths. Indeed, the maximal abundance of *L. chlorophorum* was measured below the subsurface depth on July 22 at Nord Dumet (2.6×10^5 cells L⁻¹ at 10.5 m; Table 4) and Ouest Loscolo (1.9×10^5 cells L⁻¹ at the WSI; Figure 31T), and on August 6 at station Men er Roue (5.0×10^5 cells L⁻¹ at 5.6 m; Table 4).

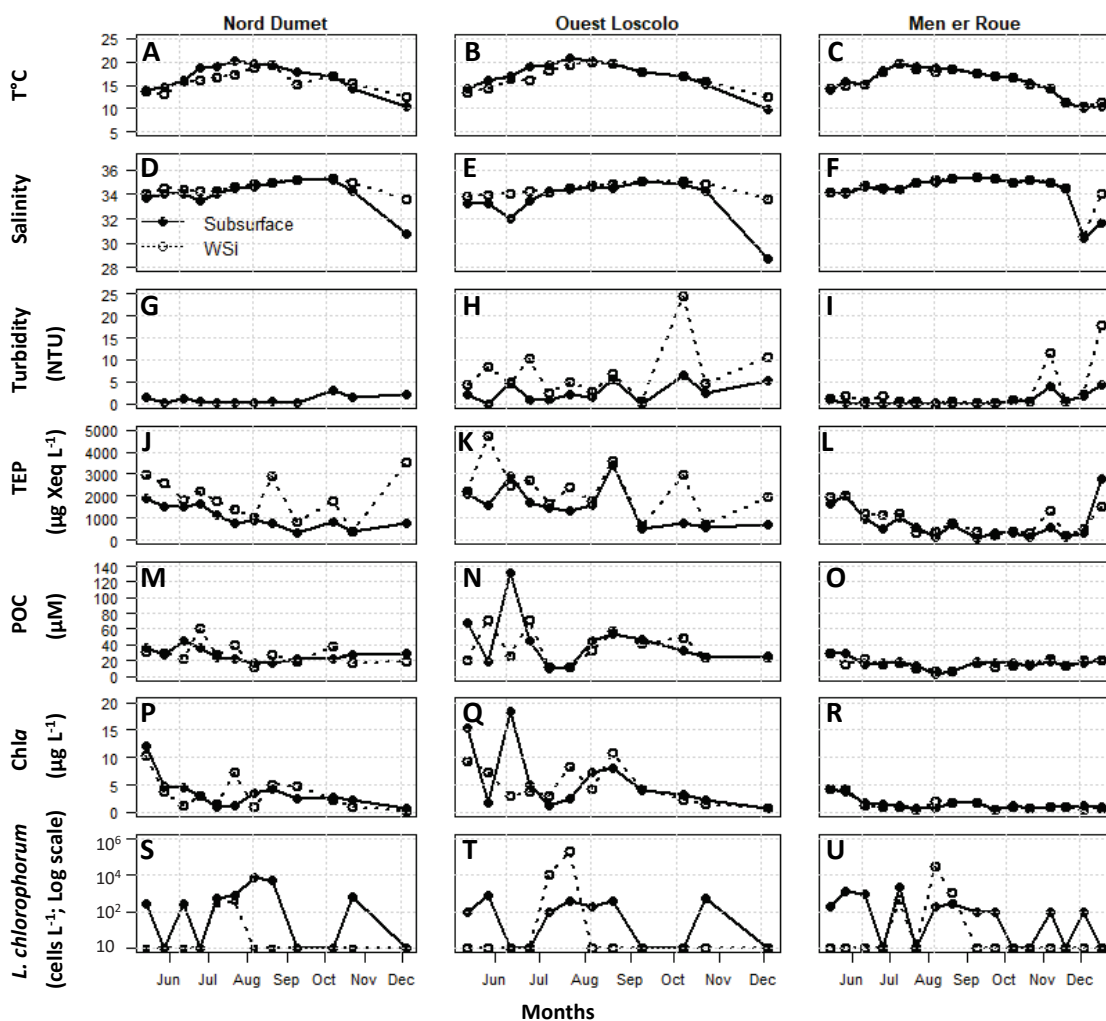
At the Nord Dumet station, data from the MOLIT buoy showed a strong decrease in oxygen concentration on July 27 at the WSI (2.4 mg L⁻¹; Figure S12A), following high *L. chlorophorum* abundance (2.6×10^5 cells L⁻¹ at 10.5 m), [Chl*a*] (7.3 µg L⁻¹; Figure 31P), and [POC] (39 µM; Figure 31M) registered on July 22 at the Nord Dumet station. In addition, an increase in [TEP] was measured at the WSI between August 6 (1028 µg Xeq L⁻¹) and August 20 (2882 µg Xeq L⁻¹; Figure 31J). One month earlier than this bloom (June 7), an increase in the Vilaine River flow was observed (Figure S13). During this period, the average flow was higher (39 m³ sec⁻¹) than the usual summer average (10 m³ sec⁻¹), with a maximum of 69 m³ sec⁻¹ (Figure S13). The freshwater input subsequently reached station Nord Dumet, as suggested by the subsurface salinity decrease on June 17 (Figure 31D and Figure S12B). Then, water column thermal stratification occurred from June 26 to July 22, with higher temperatures at the subsurface than at the WSI (Figure 31A and Figure S12C).

The freshwater input was also observed at station Ouest Loscolo, as shown by the salinity decrease in June–July (32.0; Figure 31E) and the subsurface increase in nutrient concentrations ([NO₃+NO₂] = 5.7 µM; [DIP] = 0.27 µM; [DSi] = 8.8 µM; Figure S14). This event was followed on July 22 by an increase in the number of *L. chlorophorum* cells (1.9×10^5 cells L⁻¹; Figure 31T and Figure S11D) and [Chl*a*] (8.2 µg L⁻¹; Figure 31Q) at the WSI.

In the bay of Quiberon, the station Men er Roue was less influenced by freshwater inputs than the stations of Vilaine Bay and the salinity remained stable around 34 throughout the summer (Figure 31F). However, a *L. chlorophorum* bloom was observed at the Fmax depth (5.0×10^5 cells L⁻¹; Table 4) and at the WSI (3.1×10^4 cells L⁻¹; Figure 31U and Figure S11F) on August 6, when a thermocline was recorded.

Table 4. Abundances of *L. chlorophorum* recorded at the fluorescence maximum depth (Fmax) in 2019 at Nord Dumet, Ouest Loscolo and Men er Roue stations.

Station	Date	<i>L. chlorophorum</i> (cells L ⁻¹)	Depth (m)
Nord Dumet	11 June 2019	1.3×10^3	6.5
Nord Dumet	08 July 2019	9.0×10^2	13.0
Nord Dumet	22 July 2019	2.6×10^5	10.5
Nord Dumet	09 September 2019	0	11.0
Ouest Loscolo	09 September 2019	0	6.7
Men er Roue	06 August 2019	5.0×10^5	5.6

**Figure 31.** Variations in hydrological parameters associated with phytoplankton recorded in 2019 at the three sampling stations of the Vilaine Bay (Ouest Loscolo, Nord Dumet) and Quiberon Bay (Men er Roue). Abundances of *L. chlorophorum* (cells L⁻¹) are represented in logarithmic scale. Solid lines represent values measured at the subsurface, and dashed lines represent values obtained at the WSI. Values measured at the Fmax depth are not included in the figure and are presented in Table 4.

3.2. Analysis of a GSD event

3.2.1. Spatial dynamics of a GSD

Green seawater discolorations were conspicuously visible on Sentinel-2 images (Figure 32) during the GSD event. *In situ* measurements performed within the GSD (see below) confirmed that the bloom visible on the S2 images was dominated by *L. chlorophorum*, at surface concentration $> 10^6$ cells L⁻¹ in the greenest waters. The high spatial resolution (20 m) of S2 images made it possible to study *L. chlorophorum* surface distribution over the whole study area, thus usefully complementing station-based monitoring (see 3.1). While satellite monitoring was occasionally hampered by cloud cover, the screening of cloud-free S2 observations suggested that the GSD started around mid-June and had vanished by late July / early August (Table 5). The influence of tidal circulation appeared to be a primary driver of the GSD spatial structure: patches of high chlorophyll concentration were transported inside the Vilaine Estuary at high tide (Figure 32A, B) and moved seaward during ebb (Figure 32C, D). At low tide, the GSD was concentrated along a narrow frontal zone outside the estuary (Figure 32E, F). During the GSD event, the bloom surface area varied from 2.37 to 12.95 km² with a maximum around late June–early July (Table 5).

Table 5. Satellite-derived estimation of bloom surface using Sentinel-2 images (NA = Bloom visible; surface not computed due to cloud cover), the tidal phase, and the water height difference compared to low tide were obtained from the data of the Oceanographic and Hydrological Service of the French National Navy (SHOM).

Date	Bloom surface (km ²)	Tide type	Water height difference compared to low tide (m)	Tidal phase
16 June 2019	NA	spring	1.72	flow tide
21 June 2019	2.67 (+/- 1.08)	neap	0.44	ebb tide
26 June 2019	12.95 (+/- 1.66)	neap	1.89	high tide
01 July 2019	NA	spring	1.72	flow tide
06 July 2019	11.12 (+/- 4.75)	spring	0.61	ebb tide
11 July 2019	2.46 (+/- 1.14)	neap	3.00	high tide
16 July 2019	2.37 (+/- 0.98)	neap	1.01	flow tide
21 July 2019	2.91 (+/- 1.03)	neap	0.57	ebb tide

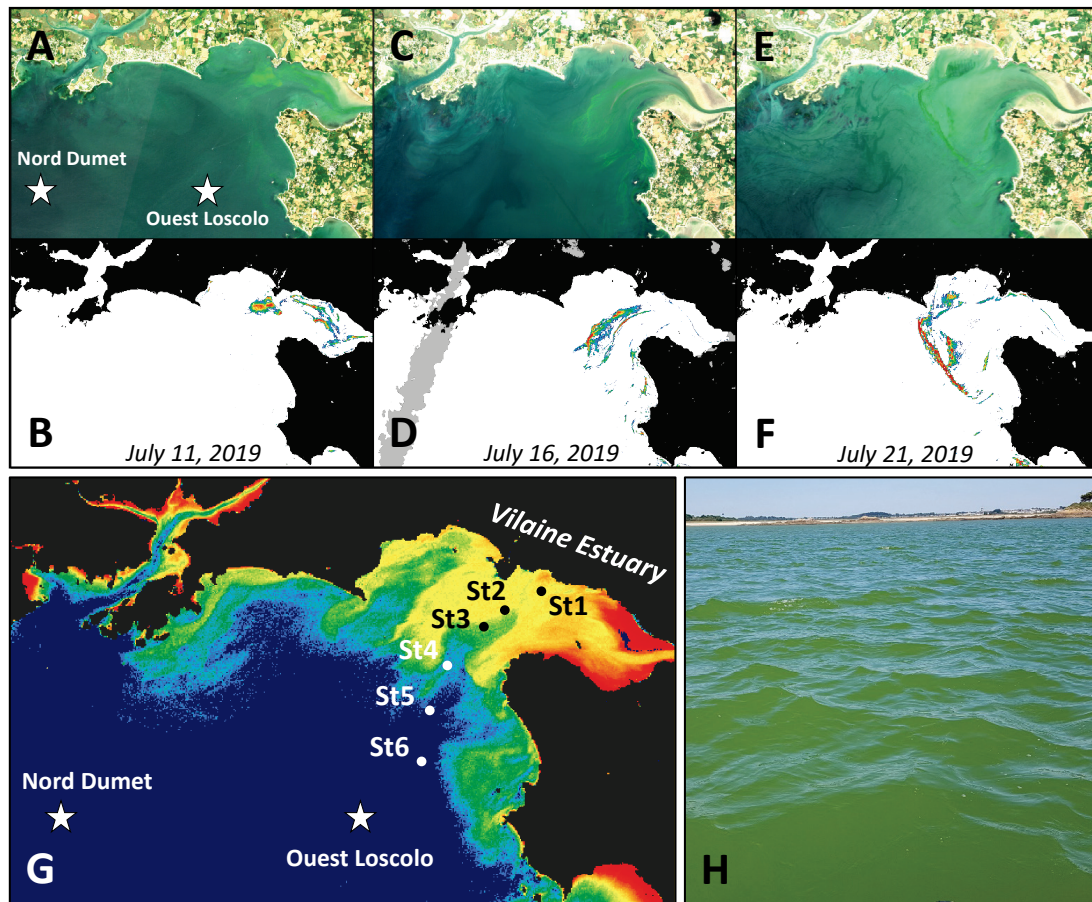


Figure 32. (A–F) Examples of Sentinel-2 images (11, 16, and 21 July 2019) acquired during the green seawater discoloration (GSD) event in summer 2019. Upper panel: RGB images; lower panel: the reflectance ratio $R_{rs}(705)/R_{rs}(665)$ is shown as a proxy of chlorophyll *a* concentration. (G) Location of regular stations in the Vilaine Bay, as well as the additional stations specifically sampled during the GSD field experiment on July 9, 2019. The map shows a qualitative estimate of the chlorophyll *a* concentration estimated from the Landsat-8 image acquired 9 July 2019. (H) Field picture of GSD caused by *Lepidodinium chlorophorum*.

In situ sampling made it possible to document the composition of the microphytoplankton community within the GSD patch on July 9, 2019. Three stations (St1-3) of the radial sampling were located in extremely green waters, as highlighted by both satellite and *in situ* observations (Figure 32G, H), whereas the remaining sampling stations (St4-6) were located outside the GSD patch (Figure 32G). Analyses of the microphytoplankton community composition confirmed that the GSD corresponded to a high relative abundance of *L. chlorophorum* (Figure 33). Within the GSD, *Lepidodinium chlorophorum* represented more than 95% of total microphytoplankton abundance at

both sampling depths (Figure 33A, B). Outside the GSD, *L. chlorophorum* was relatively less abundant at the subsurface (relative abundance < 23%, Figure 33A, C) than at the WSI. At St4, while *L. chlorophorum* dominated the microphytoplankton community at the WSI (> 94%; Figure 33B, D), other dinoflagellates, such as *Gymnodinium* spp., *Gyrodinium* spp., *Scripsiella* spp., and *Protoperidinium* spp., dominated at the subsurface (Figure 33C). From St4 seaward, the proportion of dinoflagellates within the microphytoplankton community tended to decrease for the benefit of *Leptocylindrus* spp., which was the most dominant diatom genus at the subsurface at St6 (Figure 33C). The diatom genus *Chaetoceros* spp. and the dinoflagellate *Dinophysis* spp. were only detected ($\geq 3\%$) at the WSI at St6 (Figure 33D).

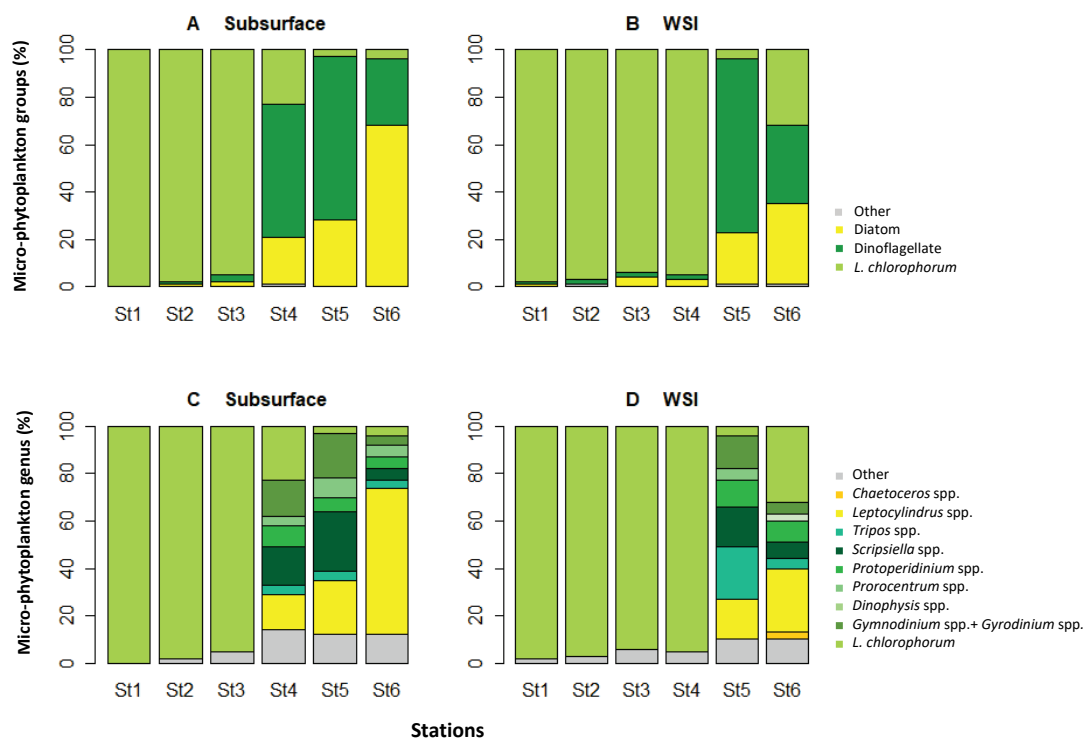


Figure 33. Relative abundances (%) of the main microphytoplankton groups observed inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the green seawater discoloration (A) at the subsurface and (B) WSI: diatom (yellow), dinoflagellate (dark green), and *Lepidodinium chlorophorum* (light green). Relative abundances (%) of the main microphytoplankton genus observed (C) at the subsurface and (D) WSI.

Following these changes in the phytoplankton community, both *Chla* and *L. chlorophorum* concentrations sharply declined from nearshore to offshore. The highest

phytoplankton biomass was recorded at St1, with [Chl a] ranging from 38 $\mu\text{g L}^{-1}$ at the WSI to 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ at the subsurface (Figure S15A). *Lepidodinium chlorophorum* abundance was up to 2000-fold higher at the subsurface inside the GSD (St1) than outside the GSD (St6; Figure 34A). The highest *L. chlorophorum* abundance was recorded at the subsurface at St1 (8.9×10^6 cells L^{-1}), and the lowest was observed at the subsurface at St6 (4.1×10^3 cells L^{-1} ; Figure 34A). At the WSI, *L. chlorophorum* was observed throughout the sampled area, with values ranging from 3.2×10^6 cells L^{-1} within the GSD (St1) to 53.4×10^3 cells L^{-1} outside the GSD (St6, Figure 34A).

A decreasing temperature gradient was observed seaward from St1 ($19.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$) to St6 ($18.4 \pm 0.8^\circ\text{C}$) at both sampling depths (Figure 34B). In contrast, salinity increased seaward, both in subsurface waters (from 32.4 to 34.1) and at the WSI (from 33.8 to 34.0; Figure 34C). While [DSi] declined gradually along the salinity gradient from 21 μM at St1 to 13.7 μM at St6 at the subsurface (Figure 34D), other inorganic nutrient concentrations followed a spatial pattern similar to that observed for *L. chlorophorum* abundance. Moreover, the highest [NO $_2$] (Figure S15B), [NH $_4$] (Figure 34E), and [DIP] (Figure 34F) were recorded at the subsurface within the GSD (at St1, [NO $_2$], [NH $_4$], and [DIP] were 0.14, 0.48, and 1.63 μM , respectively). In contrast, [NO $_3$] was very low throughout the sampling area, with values remaining below the limit of quantification (*i.e.*, $\text{LQ} < 0.5 \mu\text{M}$) at the six sampling stations and both depths (Figure S15C).

3.2.2. GSD biogeochemical composition

[DON] (Figure 34G) and [DOC] (Figure S15D) showed a spatial pattern similar to that of *L. chlorophorum* abundance, with a subsurface maximum at St1 (66 and 655 μM , respectively). Subsequently, [DON] and [DOC] decreased sharply seaward, with the lowest values at St6 ([DON] $< 12 \mu\text{M}$; [DOC] $< 200 \mu\text{M}$). The DOC/DON ratio was lower inside (St1, subsurface: 9.9; WSI: 7.4) than outside the GSD (St6, subsurface: 16.0; WSI: 13.8; Table S7). In contrast, the POC/PON ratio was higher inside (St1, subsurface: 11.5; WSI: 11.2) than outside the GSD (St6, subsurface: 7.1; WSI: 6.7; Table S7). [POC] and [PON] (Figure S15E, F) followed the same pattern as the dissolved fraction. The highest [POC] and [PON]

were measured at the subsurface at St1 (1163 and 101 μM , respectively). The highest [TEP] was recorded at St1, ranging from 3579 at the WSI to 24446 $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ at the subsurface (Figure 34H). The [TEP] also dramatically decreased seaward and reached a very low value at St6, with concentrations of 677 and 455 $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$ at the WSI and subsurface, respectively (Figure 34H). At the subsurface, [TEP] was up to 50-fold higher inside (St1) than outside the GSD (St6).

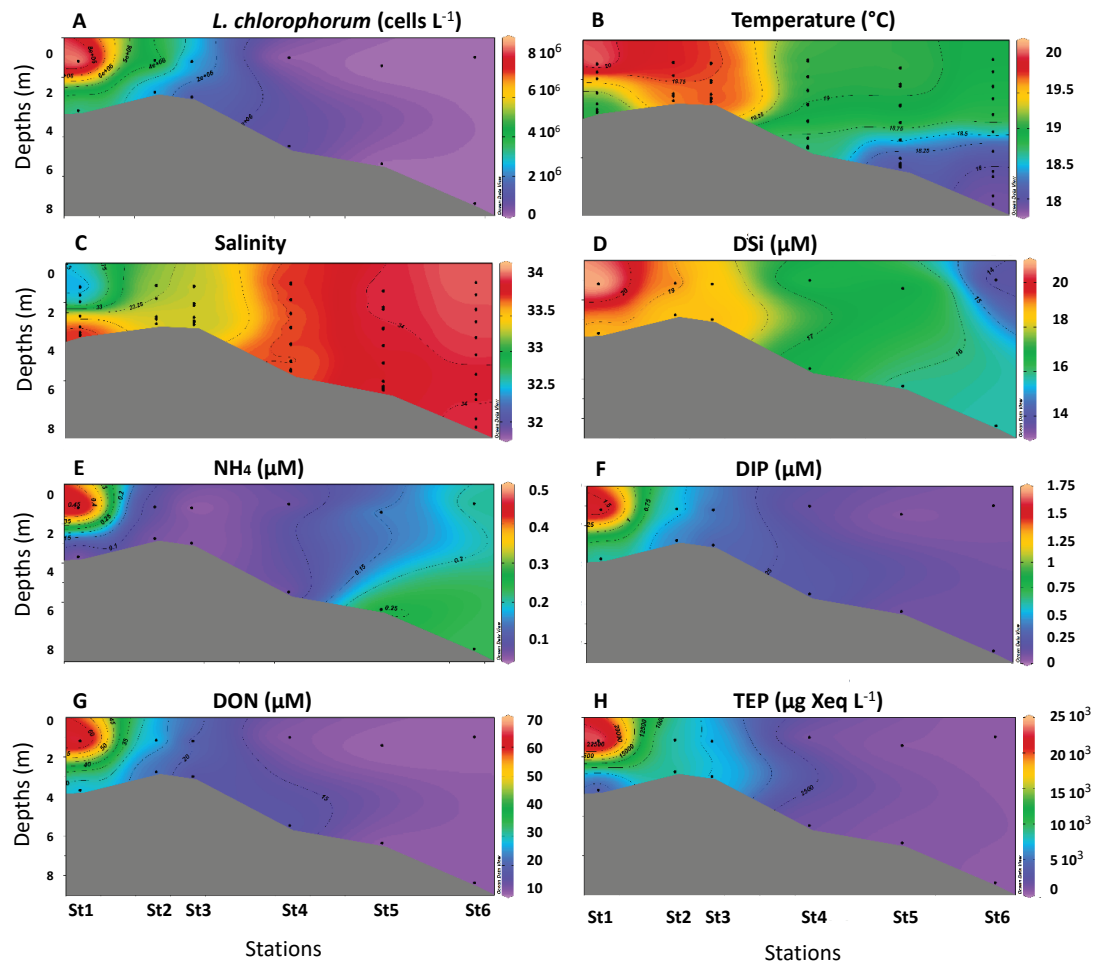


Figure 34. Spatial distribution of biological and physicochemical parameters: (A) *L. chlorophorum* concentrations, (B) temperature, (C) salinity, (D) silicates (DSi), (E) ammonium (NH_4), (F) phosphates (DIP), (G) dissolved organic nitrogen (DON), and (H) transparent exopolymer particles (TEP), measured inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the GSD (Ocean Data View, 5.3.0).

The SEP from the St1 supernatant, collected at the subsurface inside the GSD, were mainly composed of proteins and neutral monosaccharides. Both galactose and glucose were predominant over other neutral monosaccharides that were also detected, such as rhamnose and mannose. For electrophoresis gels (Figure S16), the St1 supernatant presented a similar profile (a polydisperse blot) to galactan sulphate (molecular weight; MW 80000) and dextran sulphate (MW 50000). The absence of a smear in the stacking gel, as observed with dextran sulphate (MW 500000), indicated that no high molecular weight chains were present in the sample. The SEP molecular weight of St1 was probably below 100,000. The colour intensity of the St1 supernatant was close to that of galactan sulphate, suggesting a similar sulphur content close to 8%. Moreover, its electrophoretic mobility and profile indicated a similar molecular weight and polydispersity to those of standard galactan sulphate. The ATR-FTIR spectra were characteristic of polysaccharides with a broad absorption band attributed to the O-H stretching vibration above 3000 cm^{-1} and an intense absorption between 1650 and 1050 cm^{-1} , corresponding to characteristic bands of polysaccharides (Figure S17). Moreover, at 2931 cm^{-1} , a band assigned to the C-H symmetrical stretching vibration was also present. The presence of sulphate groups was confirmed in all polysaccharides with strong absorption bands at 1230 cm^{-1} , which corresponded to the asymmetrical stretching vibration of the sulphate ester groups (S=O), and at 813 and 815 cm^{-1} , which was assigned to the C-O-S vibration; these bands were more intense in the highly sulphated dextran sulphate.

3.2.3. Relationship of *L. chlorophorum* with other biogeochemical parameters

Lepidodinium chlorophorum cells number was positively correlated with [Chl a], [DIP], [NO $_2$] and [DON] ($r > 0.90$; $p < 0.05$) at the subsurface (Table S8A). [TEP] was also correlated with *L. chlorophorum* concentration ($r = 0.94$; $p < 0.05$) and [POC] ($r = 1$; $p < 0.05$) at the subsurface (Table S8A). In contrast, [NH $_4$] was negatively correlated with [Chl a] and *L. chlorophorum* cells number ($r = -0.89$; $p < 0.05$) at the WSI (Table S8B). Overall, *L. chlorophorum* cells were positively correlated with temperature, concentration of dissolved and particulate organic matter, and [NH $_4$] and [DIP].

4. Discussion

The dinoflagellate *L. chlorophorum* is an example of a phytoplankton species causing GSD worldwide (Honsell and Talarico, 2004; Iriarte *et al.*, 2005; McCarthy, 2013; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014; Rodríguez-Benito *et al.*, 2020). The present study described the seasonal variation of this species in the Southern Brittany coast and characterized some biogeochemical properties of a GSD event of this species, for the first time.

4.1. Physical factors influencing *L. chlorophorum* bloom dynamics

Our results confirmed that *L. chlorophorum* occurs from May to November in South Brittany (Sournia *et al.*, 1992; Sourisseau *et al.*, 2016; Siano *et al.*, 2020). While the environmental parameter variations observed in 2019 are congruent with the main seasonal dynamics generally recorded in the Vilaine and Quiberon bays (Figure S18), the year 2019 was characterised by a significant increase in the Vilaine River flow during late May - early June (Figure S13). This intermittent freshwater input, occurring during a period of nutrient depletion in the Vilaine Bay, may have contributed to the *L. chlorophorum* bloom development observed thereafter in mid-June 2019. The establishment of water column thermal stratification might have contributed to creating favourable conditions for the development of the bloom. Indeed, the highest *L. chlorophorum* concentration and bloom surface extent (Table 5) were recorded in July when the water column was stratified.

Water-mass stratification is considered an essential physical condition that dinoflagellates require to bloom (Margalef, 1978; Smayda, 2002a). Previous studies highlighted the occurrence of high densities of *Alexandrium catenella* (Giacobbe *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2013; Condie *et al.*, 2019) and *Dinophysis* sp. (Velo-Suarez *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2021) in subsurface thin layers, in correspondence with the pycnocline (Nielsen *et al.*, 1990; Kononen *et al.*, 2003; Lips *et al.*, 2010). In these layers, primary production can exceed surface production (Richardson *et al.*, 2000). For *L.*

chlorophorum, Sourisseau *et al.* (2016) observed high densities at the pycnocline in stratified areas. Our study showed that the influence of the Vilaine River and the establishment of thermal stratification might affect the development of *L. chlorophorum* in the water column, corroborating previous studies suggesting that *L. chlorophorum* blooms could be correlated with freshwater input from rivers (Sournia *et al.*, 1992; Karasiewicz *et al.*, 2020). These environmental conditions could correspond to the Type I habitat (shallow, nutrient-enriched, nearshore waters) described by Smayda (2002b), in which small gymnodinoid species, such as *L. chlorophorum*, tend to predominate.

As wind speed (< 8 knots; mainly from N to NE sectors), vertical mixing (neap tide period) and Vilaine River flow remained low for more than one month, the GSD event documented in the present study could then be considered an ideal case to study the effects of tidal variations on phytoplankton distribution in a macro tidal estuary.

Satellite observations highlighted the influence of short-scale variability on the bloom surface extent and spatial distribution associated with semi-diurnal tidal dynamics. The location of *L. chlorophorum* patches detected by high-resolution remote sensing was consistent with biophysical modelling, where the accumulation of phytoplankton biomass is driven by the interplay between local processes, such as horizontal transport along the main river channel, cross-estuary oscillations, lateral sloshing (Lucas *et al.*, 1999a), and variability in phytoplankton growth rates and population dynamics (Lucas *et al.*, 1999b).

Red-edge algorithms are not affected by changes in turbidity associated with river plumes, and the high-resolution Sentinel-2 observations proved useful in estimating the temporal and spatial dynamics of the GSD in the first optical layer (*i.e.*, the top 3 m) during summer. However, the detection of relatively high *L. chlorophorum* abundance at the depth of fluorescence maximum and/or below the pycnocline suggest that a significant part of the bloom's biomass may remain undetectable from passive satellite remote sensing.

4.2. Biogeochemical specificity of *L. chlorophorum* blooms

The distribution of TEP in marine ecosystems results from the balance between sources, consumption by organisms, and sinks (Alldredge *et al.*, 1998; Passow, 2002). In 2019, the seasonal [TEP] measured in the Vilaine and Quiberon bays were in the highest range of values recorded in coastal seawaters at different locations of the world (Passow, 2002). Higher [TEP] are frequently reported in productive areas or during blooms (Engel, 2004; Corzo *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2006; Ortega-Retuerta *et al.*, 2009, 2010; Bar-Zeev *et al.*, 2011). For *L. chlorophorum*, enrichment experiments on the natural population have shown that [TEP] increased by a factor of 3 in DIP enrichment and by a factor of 1.9 in both DIN and DIN/DSi enrichments (Serre-Fredj *et al.*, 2021). Our study confirmed that a *L. chlorophorum* bloom could produce a high [TEP] *in situ*. Moreover, subsurface concentrations of *L. chlorophorum* and [TEP] measured inside the GSD were similar to the values obtained by Roux *et al.* (2021) under laboratory conditions (12×10^6 cells L⁻¹ and 17×10^3 µg Xeq L⁻¹, respectively). In addition, SEP collected inside the GSD were mainly composed of proteins, glucose and galactose, and the presence of sulphated exopolysaccharides was observed. These results corroborate the SEP composition previously found under laboratory conditions (Roux *et al.*, 2021). Therefore, *L. chlorophorum* could produce a sulphated exopolysaccharide composed mainly of galactose, confirming that galactose-based exopolysaccharide is a common characteristic among dinoflagellates (Hasui *et al.*, 1995; Yim *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2011). While sources of TEP and SEP from terrestrial freshwater inputs cannot be completely excluded (Attermeyer *et al.*, 2019), these results reported high TEP concentrations within a GSD and suggest that *L. chlorophorum* is the main responsible for this production.

Subsurface [DIP] and [NH₄] were drastically higher inside than outside the GSD. Concentrations recorded on July 8, 2019 at the most upstream station in the Vilaine Estuary (salinity = 32.0) were used to evaluate the origin of these inorganic nutrients (Figure S19). The behaviour of DSi along the salinity gradient was conservative (Figure S19A) while those of DIP and NH₄ denote a production inside the GSD (Figure S19B, C). These results suggest that important nutrient recycling might occur inside the GSD. This hypothesis is supported by the high subsurface dissolved organic matter concentrations.

Indeed, DON may be released by exudation from phytoplankton and bacteria (Bronk and Ward, 1999; Diaz and Raimbault, 2000) or from cell death or viral lysis (Fuhrman, 1999). While allochthonous sources of DON from terrestrial runoff, leaching from plant detritus and soils into streams, rivers, and sediments, and atmospheric deposition cannot completely be excluded, other parameters tend to support the hypothesis of intense remineralisation processes inside the GSD.

The POC/PON ratio was higher than the Redfield ratio ($C/N = 106/16$; Redfield, 1958) inside the GSD, suggesting an accumulation of TEP and detrital organic matter produced by *L. chlorophorum* in subsurface waters. In contrast, the DOC/DON ratio was lower inside than outside the GSD. These results suggest that organic matter, produced by *L. chlorophorum* and maintained in subsurface waters, could provide a microenvironment promoting bacterial development and remineralisation processes (Alldredge and Gotschalk, 1989; Schapira *et al.*, 2012a, b). Through the microbial loop, bacteria could provide regenerated inorganic nutrients (Caron, 1994). Moreover, previous studies highlighted that *L. chlorophorum* could present high ammonium assimilation rates (Iriarte *et al.*, 2005; Karasiewicz *et al.*, 2020). Presumably, inorganic nutrients regenerated by bacterial remineralisation within the GSD might sustain the development of *L. chlorophorum* cells. This could be especially prevalent during calm periods (neap tide and low wind) when the water residence time is longer in the Vilaine Bay (Chapelle *et al.*, 1994). Furthermore, the studied bloom was observed by satellite image for more than one month, confirming bloom duration deduced by citizen observations in this area (Siano *et al.*, 2020). As shown under laboratory conditions (Roux *et al.*, 2021), a strong relationship was suggested between *L. chlorophorum* and its associated bacterial consortia through remineralisation processes within a GSD. However, the bacterial compartment within a GSD remains to be investigated.

4.3. Potential harmful effects of *L. chlorophorum* blooms on the environment

TEP aggregation tends to accelerate the sedimentation of organic matter from the surface to the seabed (Passow *et al.*, 2001; Mari *et al.*, 2017; Bittar *et al.*, 2018). As demonstrated in a previous study performed under laboratory conditions (Roux *et al.*, 2021), our results confirmed that TEP produced during a bloom of *L. chlorophorum* were associated with high [POC] *in situ*. To establish the carbon footprint of an *L. chlorophorum* bloom, a conversion factor of 0.51 was used to convert from $\mu\text{g Xeq}$ to μgC (TEP-C; Passow and Engel, 2001). Considering the TEP-C and POC values reported in this study, the TEP-C contribution to the POC pool (TEP-C%POC) was estimated. In subsurface waters, the TEP-C ranged from 3509 to 12468 $\mu\text{g L}^{-1}$ inside the GSD and from 232 to 467 $\mu\text{g L}^{-1}$ outside the GSD. The TEP-C%POC contribution was higher inside (59–89%: St1, St2, St3) than outside (44–61%: St4, St5, St6) the GSD. Therefore, TEP contribute to carbon export and can represent a significant fraction of the carbon pool in our study, as well as others (Passow *et al.*, 2001; Mari *et al.*, 2017; Bittar *et al.*, 2018). In the estuarine system, Annane *et al.* (2015) showed that TEP-C combined with phytoplankton-C were major contributors to the carbon pool (41 and 54%, respectively) and could significantly contribute to the decrease in oxygen concentration in the bottom layer by respiration/remineralisation processes.

Our observations suggested that the large amount of TEP (carbon-rich) excreted by *L. chlorophorum* could enhance remineralisation processes in the water column and could accentuate hypoxia close to the WSI. Oxygen concentrations measured during summer 2019 supported this hypothesis. Indeed, low oxygen concentrations (2.4 mg L^{-1}) were recorded at the WSI by the autonomous buoy located at the Nord Dumet station following an *L. chlorophorum* bloom. These low oxygen concentrations could have extensive consequences for marine fauna. For many benthic invertebrates, the hypoxia threshold is about 2.9 mg L^{-1} or less (Herreid, 1980; Rosenberg *et al.*, 1991; Diaz and Rosenberg, 2008). The reduction in feeding activity and oxygen consumption is a commonly observed response to hypoxia in bivalves (Sobral and Widdows, 1997; Hicks and McMahon, 2002). However, more data regarding oxygen concentrations at the WSI are needed to confirm these results. *In situ* and *in vitro* experiments focused on the interaction between *L.*

chlorophorum and bivalves could complete the analyses on the ecological and potentially harmful impact of this dinoflagellate.

5. Conclusions

The marine green dinoflagellate *L. chlorophorum* can cause summer GSD along Southern Brittany (NE Atlantic, France), particularly in the eutrophic Vilaine Bay. *Lepidodinium chlorophorum* occurred from May to November, with a maximum abundance during summer (June–July). Occasionally, the highest abundances of *L. chlorophorum* were recorded at the Fmax depth or deeper. The development of the GSD could be promoted by freshwater inputs (a few weeks before the bloom), sea-surface warming, and thermohaline stratification. The GSD spatial distribution was then influenced by tidal variability, with seaward and landward movements associated with ebb and flow tide, respectively.

Lepidodinium chlorophorum produced a large amount of TEP (carbon-rich). In addition, the SEP produced by this species were mainly composed of sulphated galactan. The high secretion of extracellular polymeric substances, a biological trait particularly developed by this dinoflagellate in comparison to other species, could confer a specific ecological advantage to *L. chlorophorum*. The production of TEP would enhance bacteria remineralisation, which would provide nutrients to sustain the bloom for a long period, especially during calm conditions (low wind, and persistent water column stratification). However, the large amount of TEP excreted within the GSD could have a harmful effect on the environment, causing marine fauna and cultivated bivalve mortalities through the enhancement of oxygen reduction, especially close to the WSI. Further studies are needed to investigate the role of bacteria within the GSD and to fully assess the role of GSD on oxygen concentration and potential impact on bivalves.

Acknowledgements

This work was carried out in the frame of the PhD of PR, financed by Ifremer and Region Pays de la Loire (project LEPIDO-PEN [06582 2019]), and was supported by the Centre National d' Etudes Spatiales (TOSCA projects LASHA and OSYNICO). The authors thank IFREMER-LER/MPL staff for their technical contributions. The authors wish to thank Calypso Bouvier for dedicated assistance in TEP measurements, Elise Robert for particulate organic carbon measurements, and Arnaud Fillaudeau for ATR-FTIR analysis. The authors acknowledge the USGS and the European Space Agency (ESA) for the Landsat-8 and Sentinel-2 observations. We would like to thank Tristan Harmel (Géosciences Environnement Toulouse, GET) and Kien Trung (Laboratoire d'Océanologie et Géosciences, LOG) for the atmospheric correction of satellite data. Pauline Roux, Mathilde Schapira, Raffaele Siano, Karine Collin, Anne Schmitt, Olivier Pierre-Duplessix, Michael Retho, and Soazig Manach are part of GDR PHYCOTOX, a CNRS/IFREMER network on Harmful Algal Blooms (<https://www.phycotox.fr/>). Finally, the authors thank the anonymous reviewers for their careful reading of our manuscript and their insightful comments and suggestions.

Author contributions statement

Pauline Roux: Formal analysis, Data curation, Writing original Draft; **Raffaele Siano**: Conceptualization, Writing - Review & Editing; **Philippe Souchu**: Writing - Review & Editing; **Karine Collin**: Investigation, Visualization; **Anne Schmitt**: Investigation, Visualization; **Soazig Manach**: Investigation, Visualization; **Michael Retho**: Investigation, Visualization; **Olivier Pierre-Duplessix**: Investigation, Visualization; **Laetitia Marchand**: Investigation, Visualization; **Sylvia Colliet-Jouault**: Writing - Review & Editing; **Victor Pochic**: Investigation, Visualization; **Maria Laura Zoffoli**: Investigation, Writing - Review & Editing; **Pierre Gernez**: Investigation, Visualization, Writing - Review & Editing; **Mathilde Schapira**: Conceptualization, Methodology, Supervision; Project administration, Funding acquisition. All authors reviewed and accepted the final version of the manuscript.

6. Appendix

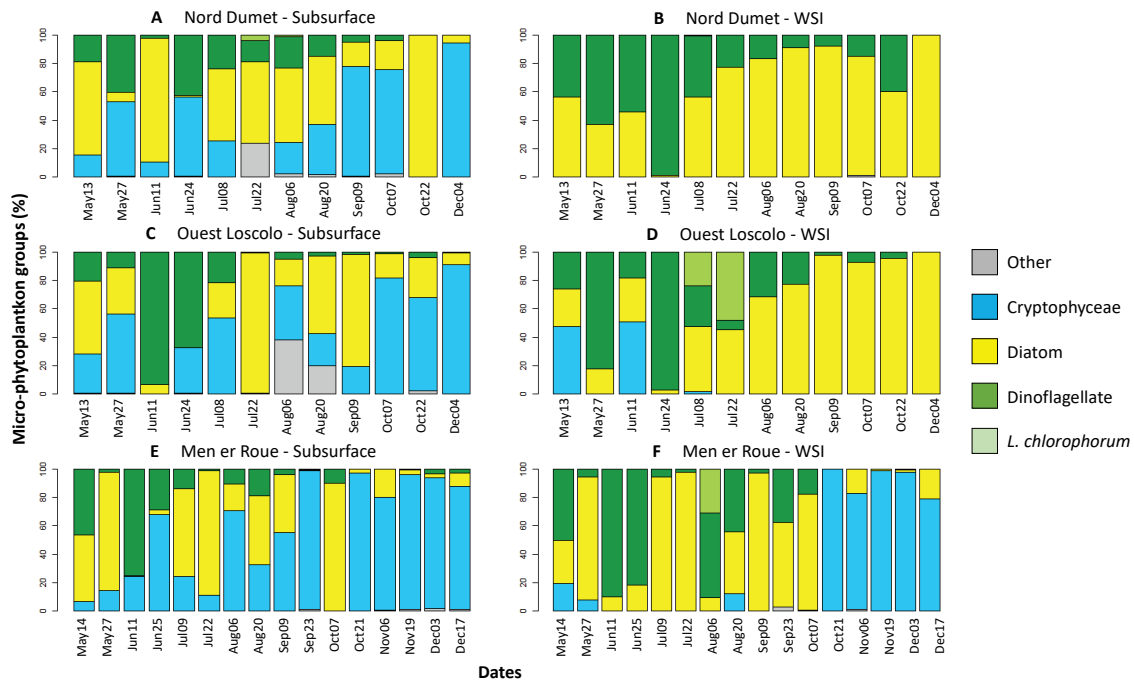


Figure S11. Relative abundances (%) of the main microphytoplankton groups observed in 2019: Cryptophyceae (blue), diatom (yellow), dinoflagellate (dark green), and *Lepidodinium chlorophorum* (light green). For the three sampling stations (Nord Dumet, Ouest Loscolo, Men er Roue), values were measured (A, C, E) at the subsurface and (B, D, F) water sediment interface (WSI).

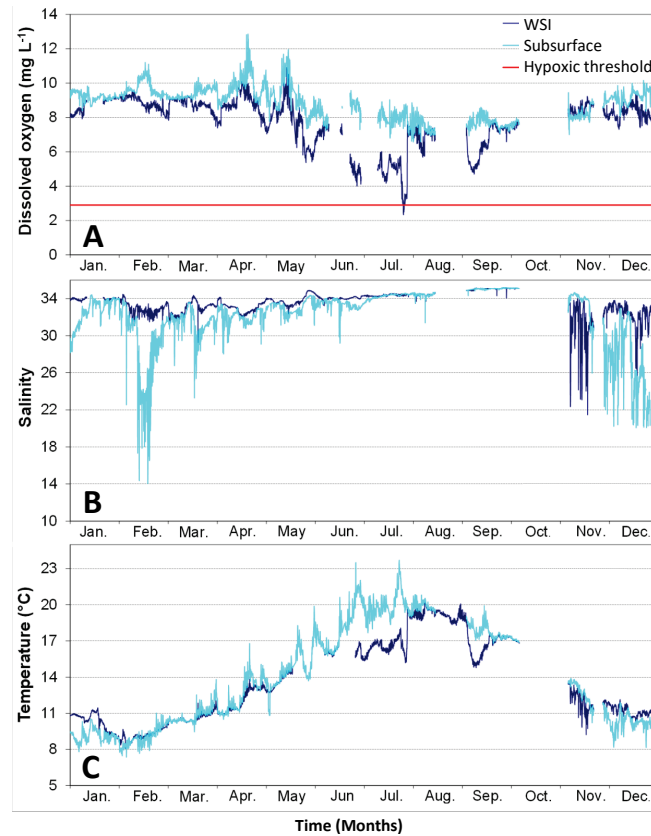


Figure S12. (A) Dissolved oxygen concentrations, (B) salinity, (C) temperature recorded by an autonomous buoy (Nord Dumet station) at the subsurface (light blue) and WSI (dark blue). The red line represents the hypoxic threshold (2.9 mg L⁻¹).

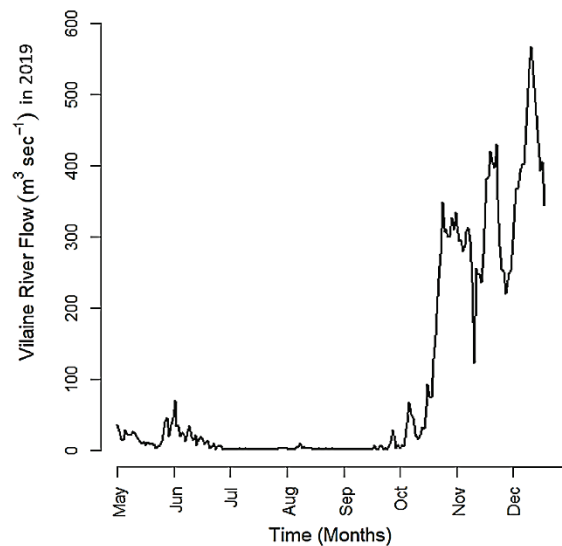


Figure S13. Vilaine River flow data (m³ sec⁻¹) recorded from May to December 2019. Data were extracted from the French hydrologic database (<http://www.hydro.eaufrance.fr/>).

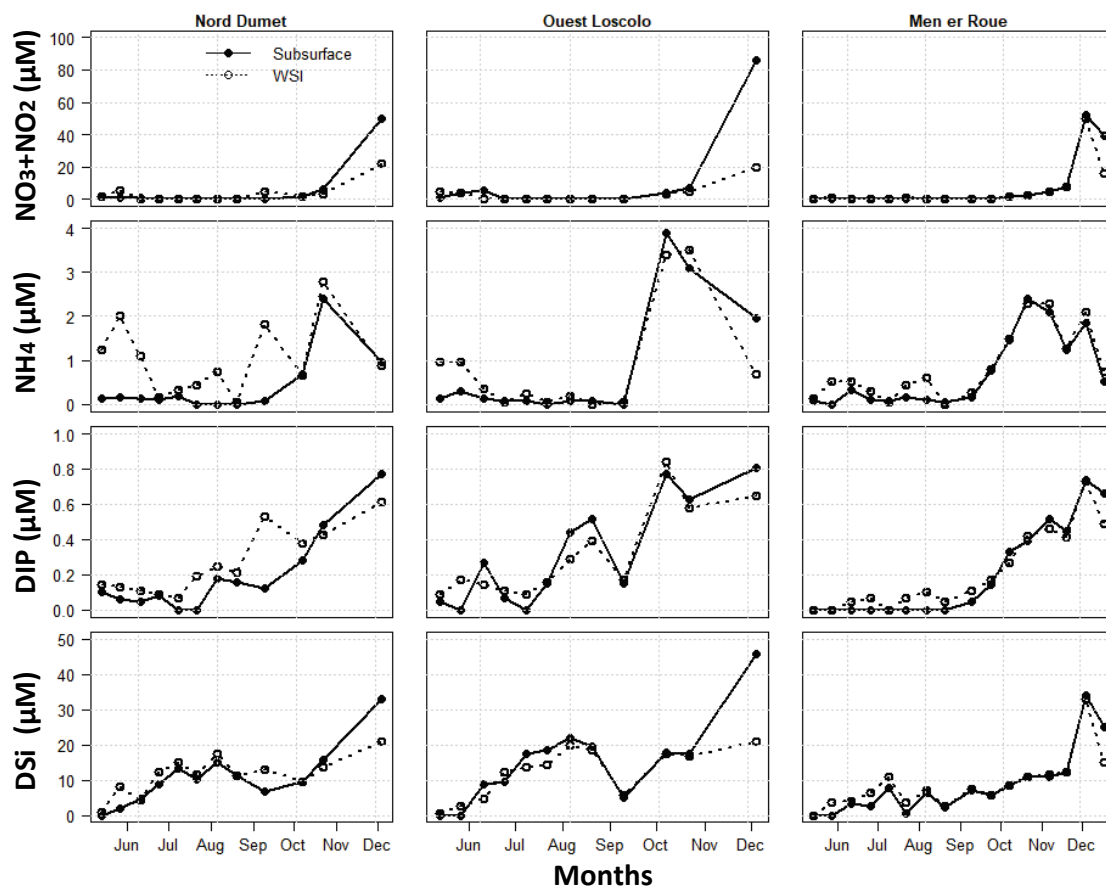


Figure S14. Variations of nitrogen ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2$), ammonium (NH_4), phosphate (DIP), and silicate (DSi) concentrations recorded from May to December 2019 at the three sampling stations of the Vilaine (Ouest Loscolo, Nord Dumet) and Quiberon Bays (Men er Roue). Solid lines represent values measured at the subsurface, and dashed lines represent values obtained at the WSI.

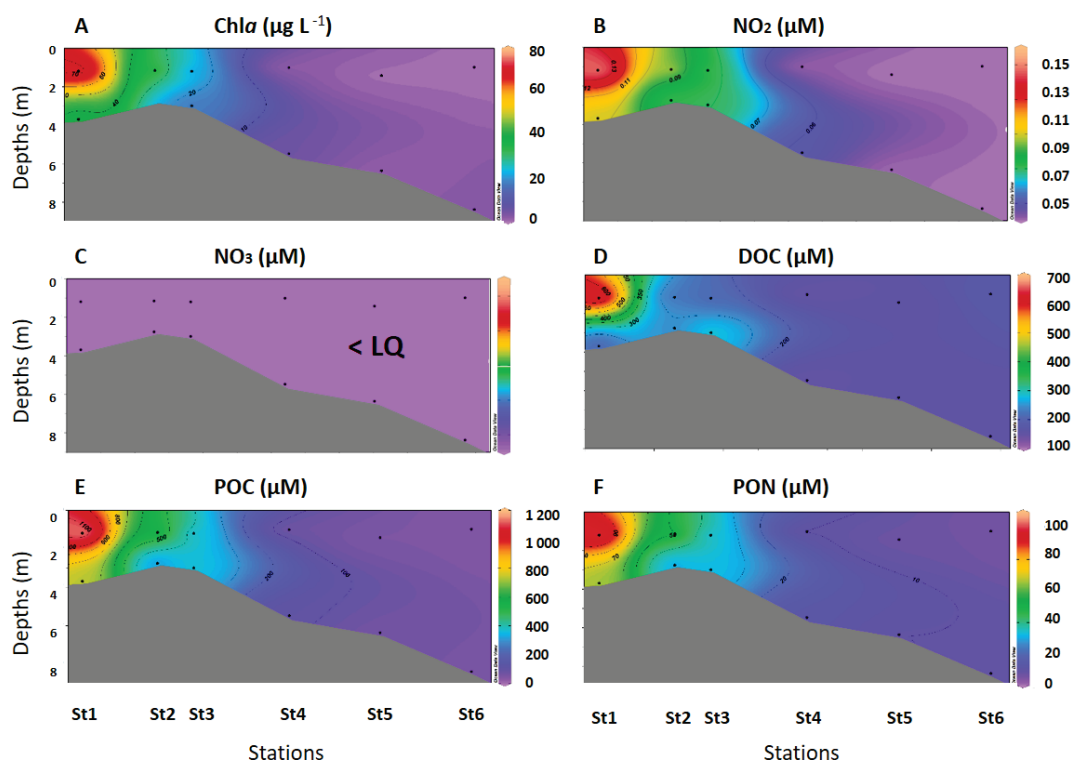


Figure S15: Spatial distribution of biological and physicochemical parameters: (A) chlorophyll *a* (Chla), (B) nitrites (NO₂), (C) nitrogen (NO₃), (D) dissolved organic carbon (DOC), particulate organic (E) carbon (POC), and (F) nitrogen (PON) concentrations, measured inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the GSD (Ocean Data View, 5.3.0).

Table S7. Molar ratio between carbon (C) and nitrogen (N) in particulate and dissolved organic fractions, inside (St1, St2, St3) and outside (St4, St5, St6) the GSD at the subsurface and WSI.

RATIO	POC/PON	DOC/DON
Inside GSD		
St1 Subsurface	11.5	9.9
St1 WSI	11.2	7.4
St2 Subsurface	11.2	7.5
St2 WSI	9.9	10.5
St3 Subsurface	10.8	11.7
St3 WSI	11.4	20.0
Outside GSD		
St4 Subsurface	7.4	12.6
St4 WSI	8.8	8.7
St5 Subsurface	7.0	15.0
St5 WSI	6.7	14.7
St6 Subsurface	7.1	16.0
St6 WSI	6.7	13.8

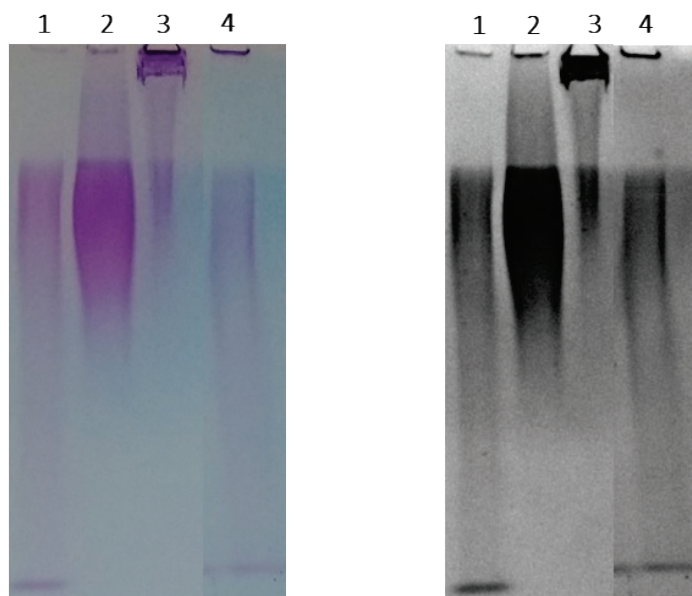


Figure S16. Electrophoretic analysis of the St1 supernatant, collected inside the GSD (subsurface), after toluidine blue staining. Lane 1: galactan sulphate (MW 80000, 7.7% S), lane 2: dextran sulphate sodium salt (MW 50000, 16.0–19.0% S), lane 3: dextran sulphate sodium salt (MW 500000, 16.0–19.0% S), and lane 4: St1 supernatant.

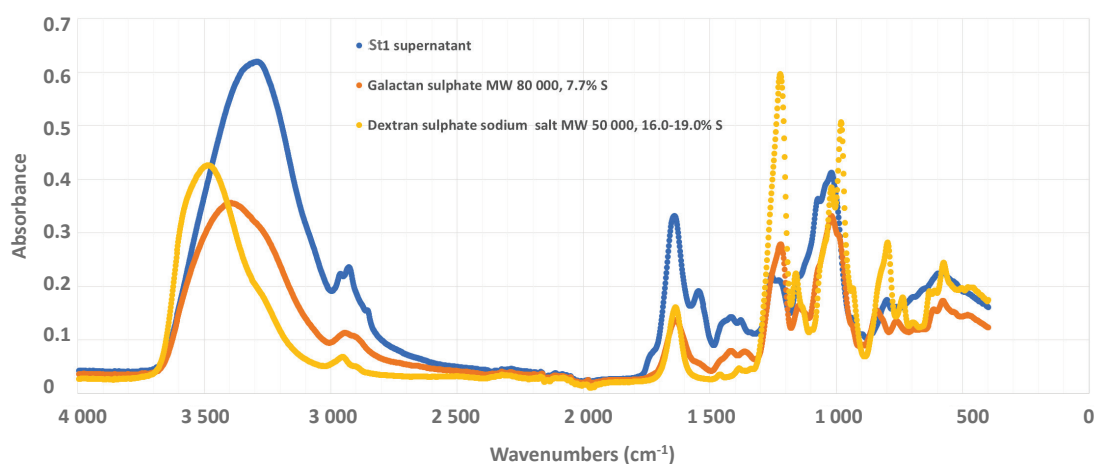
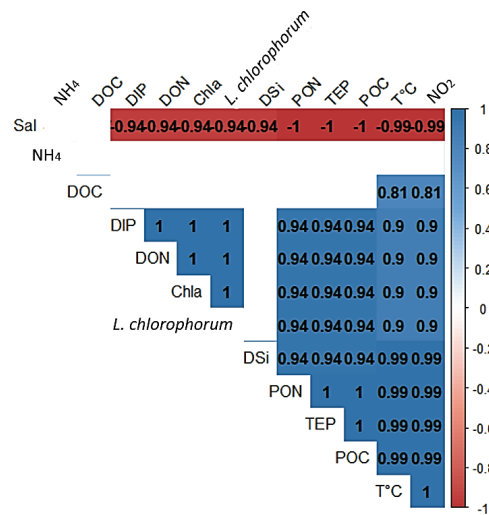


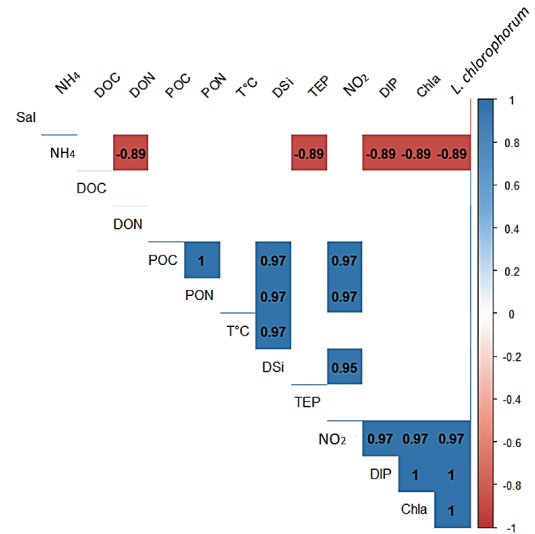
Figure S17. ATR-FTIR spectra of the St1 supernatant, collected inside the GSD (subsurface), and standards as follows: galactan sulphate (MW 80000, 7.7% S) and dextran sulphate sodium salt (MW 50000, 16.0–19.0% S).

Table S8. Spearman correlation matrix for all biological and physicochemical parameters at the (A) subsurface and (B) WSI (n=6; p<0.05). Six stations were sampled in the Vilaine Bay during the GSD field experiment on July 9, 2019.

A Subsurface



B WSI



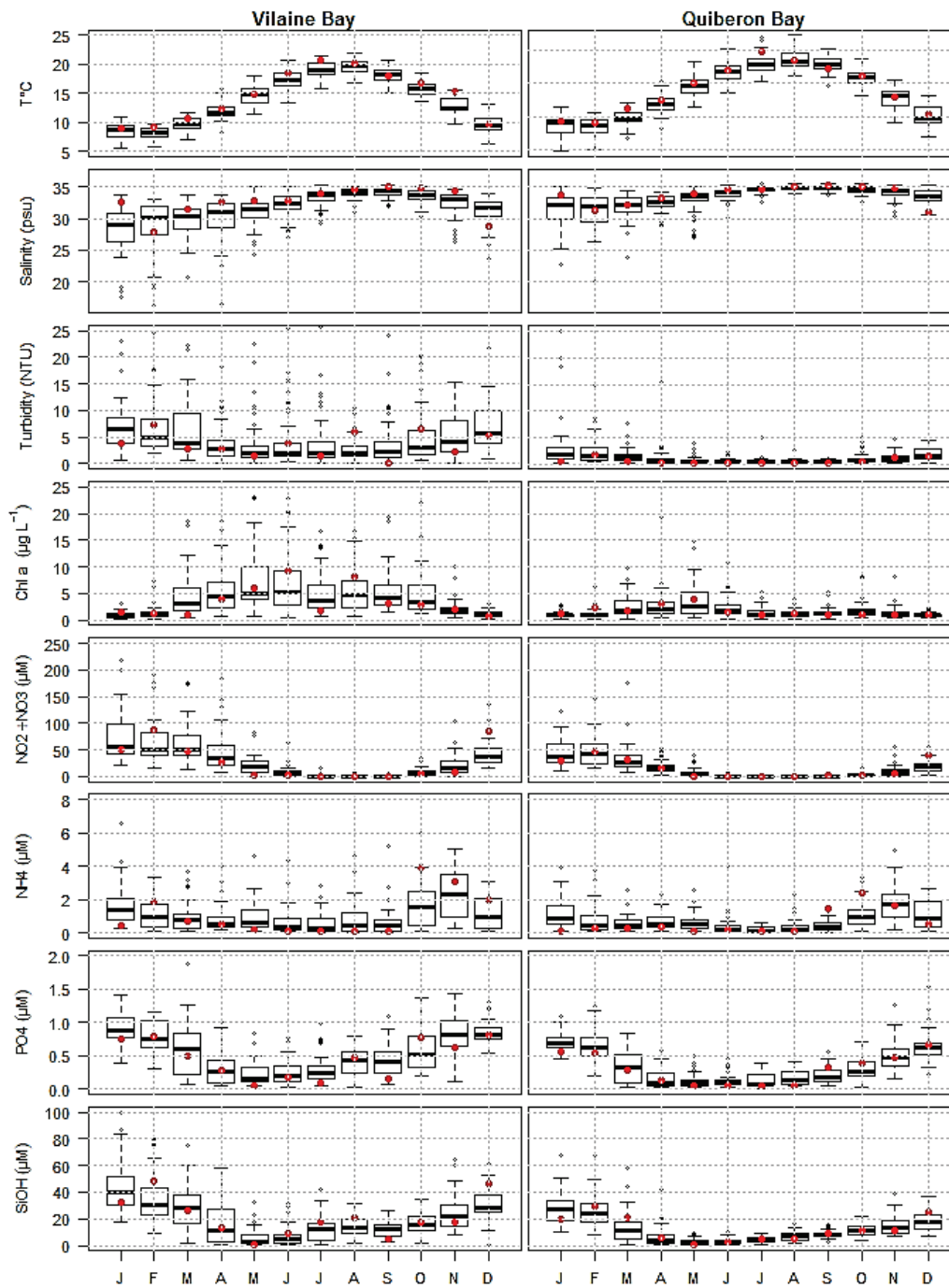


Figure S18. Boxplot of the variations of subsurface physicochemical measurements (temperature, salinity, turbidity, chlorophyll *a*, and nutrient concentrations) between 1998 and 2019 at Vilaine Bay (Ouest Loscolo station) and Quiberon Bay (Men er Roue station) (REPHY dataset). The horizontal line denotes the median value for each month, and the box represents the first and third quartiles. Red circles represent median values for each month calculated in 2019.

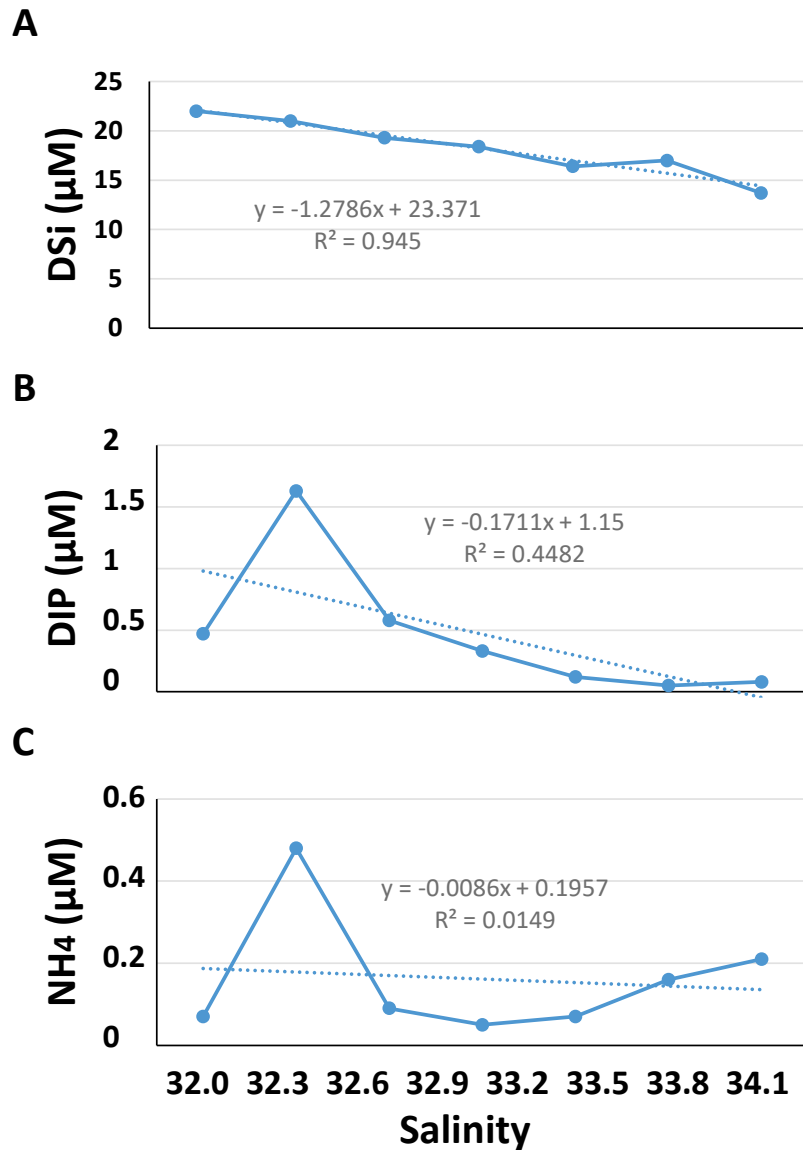


Figure S19. Nutrient concentrations: **(A)** silicates (DSi), **(B)** phosphates (DIP), and **(C)** ammonium (NH₄), along the salinity gradient. Concentrations recorded on July 8, 2019, at a more upstream station in the Vilaine Estuary (salinity = 32), were added to evaluate the origin of these inorganic nutrients.

Chapitre 4

Ecophysiologie de l'huître creuse

Crassostrea gigas exposée au
dinoflagellé vert *Lepidodinium*
chlorophorum

Contexte de l'étude

En période estivale, des eaux colorées vertes liées à la prolifération du dinoflagellé *L. chlorophorum* sont fréquemment observées en Bretagne sud (Siano *et al.*, 2020). Bien que cette espèce ne produise pas de toxine, ces événements ont été associés à des mortalités d'organismes marins (Sournia *et al.*, 1992 ; Chapelle *et al.*, 1994), notamment de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Cette dernière est considérée comme une espèce clé en Europe. En effet, sa production annuelle est d'environ 100 000 tonnes, soit 2 % de la production mondiale. La France, l'Irlande et les Pays-Bas sont les principaux producteurs (96 %) (EUMOFA, 2017 ; Chiesa *et al.*, 2021). Ces épisodes de mortalités peuvent donc avoir de lourdes conséquences sur l'économie locale. C'est pourquoi un premier modèle DEB (Dynamic Energy Budget ; Pouvreau *et al.*, 2006), basé sur la quantification de la prise d'énergie par l'huître et son allocation aux fonctions de croissance, développement, reproduction ou maintenance, a été développé afin de modéliser la croissance de l'huître creuse en fonction des différentes espèces de phytoplancton présentes dans le milieu (Alunno-Bruscia *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016). Des résultats contrastés ont été obtenus entre la croissance simulée par le modèle et celle observée *in situ* lors d'une efflorescence de *L. chlorophorum*. Les auteurs ont suggéré que l'huître aurait une très faible capacité à assimiler ce dinoflagellé. Cependant, cette hypothèse, basée uniquement sur cette approche numérique, n'a jamais été testée expérimentalement.

Dans un premier temps, un suivi *in situ* de croissance et de mortalité des huîtres creuses *C. gigas* de 2 classes d'âge a été mis en place afin d'évaluer le potentiel impact d'une efflorescence de *L. chlorophorum* sur ces paramètres (cf. Annexe 4). Toutefois, les difficultés rencontrées lors de ce suivi (*e.g.*, suspicion de la présence du parasite *Haplosporidium costale* et la destruction des lots présents sur le terrain en 2019 en accord avec le principe de précaution, ainsi que la crise du Covid-19 empêchant le suivi régulier des lots *in situ* en 2020) n'ont pas permis de répondre à cette question (cf. Annexe 4). C'est pourquoi des expérimentations en milieu contrôlé ont été réalisées afin d'apporter de premiers éléments de réponse concernant l'écophysiologie de *C. gigas* exposée à *L. chlorophorum*.

Ce quatrième chapitre vise donc à étudier les conséquences d'une exposition à *L. chlorophorum* sur la physiologie de l'huître creuse *C. gigas*. Des huîtres ont été

exposées pendant 48h à deux concentrations de *L. chlorophorum* : une concentration faible et une concentration équivalente à celle pouvant être observée lors d'une efflorescence en milieu naturel. Les résultats ont été comparés à une condition contrôle correspondant à la micro-algue fourrage *Tisochrysis lutea*. Les conséquences directes de l'exposition à *L. chlorophorum* ont été évaluées, en lien avec sa production de TEP. La capacité de filtration des huîtres a été testée via le suivi des concentrations cellulaires dans les bacs expérimentaux et leur capacité d'ingestion a été évaluée par des analyses histologiques. Les conséquences à court terme ont été évaluées par des mesures individuelles (en banc écophysologique) réalisées pendant une phase de récupération de 24h au cours de laquelle les huîtres étaient nourries en continu avec *T. lutea*. Les taux de filtration et de respiration, ainsi que l'efficacité d'assimilation des huîtres préalablement exposées aux différentes conditions ont été mesurés.

Financement

Cette étude a été menée dans le cadre du projet CLOCLO « Ecophysiologie de l'huître creuse exposée à *Lepidodinium chlorophorum* » financé par la Direction Scientifique de l'Ifremer en 2020-2021 (porté par M. Schapira, Ifremer LER-MPL et E. Fleury, Ifremer PFOM-PI).

Contribution des auteurs

Le plan expérimental a été conçu par E. Fleury et M. Alunno-Bruscia. Les expériences en laboratoire ont été menées dans le cadre du stage de Master 2 de S. Ragueneau. I. Queau, P. Malestroit, M. Schapira, R. Siano et moi-même avons participé au déroulement des expérimentations réalisées au sein des installations du laboratoire Ifremer PFOM-PI à Argenton. K. Tallec et F. Pernet nous ont aidé à traiter et à interpréter les données issues du banc écophysologique. H. Hégaret et J. Garcia Corona ont apporté leur expertise concernant l'interprétation des analyses histologiques réalisées. J'ai retravaillé l'ensemble des données obtenues à la suite du stage de M2 et rédigé, sous la direction principale de E. Fleury, un premier projet de publication qui fait l'objet de ce chapitre de thèse.

Ecophysiological response of the cupped oyster *Crassostrea gigas* exposed to the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*

P. Roux¹, S. Ragueneau², M. Schapira¹, R. Siano³, F. Pernet², I. Queau², P. Malestroit³, K. Tallec², H. Hégaret², J. Garcia Corona², E. Fleury²

¹Ifremer, LITTORAL, F-44300 Nantes, France

²Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280 Plouzané, France

³Ifremer, DYNECO, F-29280 Plouzané, France

Abstract :

Green seawater discolorations (GSDs) caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* are frequently observed in the summer along the southern Brittany coast (NE Atlantic, France). Although *L. chlorophorum* does not produce toxins, GSDs are suspected to cause fauna mortalities. Here, we investigate the physiological response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *L. chlorophorum*. Oysters were exposed for 48-hours to a low concentration (500 cells mL⁻¹) and a bloom concentration (7500 cells mL⁻¹) of *L. chlorophorum* and compared to controls fed with the haptophyte *Tisochrysis lutea*. The direct consequences of *L. chlorophorum* exposure were assessed through histological analysis. Then, the 24h-recovery phase was studied using an individual ecophysiological measurement system (oysters fed continuously with *T. lutea*). Oysters successfully ingest *L. chlorophorum* cells, despite affecting the digestive tubules cells through the production of acid glycoconjugates. Oysters previously exposed to a bloom concentration of *L. chlorophorum* exhibited significantly lower clearance rates than animals exposed to *T. lutea*, but their assimilation efficiency were twofold higher than the control. These effects could be probably ascribed to the production of transparent exopolymer particles by *L. chlorophorum*. This increased assimilation during the recovery phase is perhaps a compensation for a decrease that would have occurred during the exposure phase. For the first time, laboratory experiments contributed to the understanding of oyster mortalities observed during GSDs in the field.

Key-words: Oyster *Crassostrea gigas*, *Lepidodinium chlorophorum*, Dinoflagellate, HABs, TEP, Ecophysiology, Clearance rate, Feeding behaviour

1. Introduction

Green seawater discolorations (GSDs) caused by the massive development of the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* have been recorded in southern Brittany (NE Atlantic, France) every year since 1982 (Siano *et al.*, 2020). The capacity of this species to form GSDs is due to the presence of a green plastid (Matsumoto *et al.*, 2011) inherited from a secondary endosymbiosis with a chlorophyte (Kamikawa *et al.*, 2015; Gavalás-Olea *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2018). This unarmored, roundish dinoflagellate measures 20 μm in diameter (Elbrächter and Schnepf, 1996; Hansen *et al.*, 2007) and has been observed in coastal waters worldwide (*e.g.*, McCarthy, 2013; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2014; Rodríguez-Benito *et al.*, 2020; Siano *et al.*, 2020; Serre-Fredj *et al.*, 2021). Along the French Atlantic coast, *L. chlorophorum* can reach very high abundance ($> 10^6$ cells L^{-1} ; Sourisseau *et al.*, 2016), especially in the eutrophic waters of the Vilaine bay. GSDs are frequently observed during summer in this bay (Belin *et al.*, 2021), where they can persist for over a month (Siano *et al.*, 2020) presumably through the recycling of organic matter (Roux *et al.*, submitted). Post-bloom hypoxic/anoxic conditions associated with this recycling process are suspected to be a major cause of fauna mortalities (Siano *et al.*, 2020). Indeed, although *L. chlorophorum* does not produce toxins, GSDs caused by this dinoflagellate have been associated with mass mortalities of fishes and cultured bivalves (Sournia *et al.*, 1992; Chapelle *et al.*, 1994; Siano *et al.*, 2020).

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the best known non-native organisms living on the coasts of NW Europe (Troost, 2010; Alunno-Bruscia *et al.*, 2011). This cupped oyster is a key economic species in Europe. Indeed, the annual production is about 100 000 tons, approximately 2% of the world production, with France, Ireland, and the Netherlands being the main producers (96%) (EUMOFA, 2017; Chiesa *et al.*, 2021). In 2006, a first Dynamic Energy Budget (DEB) model was developed for *C. gigas*, based on physical and chemical assumptions related to individual energy allocation (Kooijman, 2010). It described the rates at which oysters assimilate and use energy for growth and reproduction (Pouvreau *et al.*, 2006). Ecophysiological modeling suggested that *L. chlorophorum* did not contribute to oyster growth, likely due to very low assimilation (

Bourlès *et al.*, 2009; Alunno-Bruscia *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016). To our knowledge, despite the frequency and duration of *L. chlorophorum* blooms along the Atlantic French coast and their potential consequences on local oysters farming, the inedibility of *L. chlorophorum* for oysters has not been validated experimentally.

Suspension-feeding bivalves have adopted several strategies for controlling the quantity and the quality of ingested particulate matter (Macdonald and Ward, 1994), including regulation of 1) feeding duration (Foster-Smith, 1975), 2) clearance rates (Hawkins *et al.*, 2001), and 3) pseudo-feces production (particles rejected before ingestion; Newell and Jordan, 1983). Phytoplankton is the primary source of food for bivalves, as a consequence growth and reproductive activities of bivalves follow the annual cycle of phytoplankton biomass (Kang *et al.*, 2006). Previous studies have shown that nano-phytoplankton (2-20 µm) can be retained by suspended-feeding mollusks at an efficiency of 80–100% (*e.g.*, Prins *et al.*, 1998). More specifically, the oyster *C. gigas* has a high clearance rate for >5 µm particles, including flagellates, microphytoplankton and ciliates (Dupuy *et al.*, 2000). In temperate coastal waters, diatoms are known to be the main source of food for oysters (Dupuy *et al.*, 2000; Pernet *et al.*, 2012) and energetic condition of marine bivalves varies with food quality and availability (Delaporte *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Pernet *et al.*, 2012).

Furthermore, high abundances of some phytoplankton species can influence the feeding behavior of bivalves (Bayne, 2002), by over-loading their ingestion capacity (Beninger and St-Jean, 1997) or by decreasing clearance rates in response to their toxicity (Hégaret *et al.*, 2007). Indeed, it has been reported that the oyster *C. gigas* could reduce clearance, ingestion, and biodeposition rates when exposed to Harmful Algal Bloom (HAB) species such as the dinoflagellate *Alexandrium sp.* (Bougrier *et al.*, 2003; Lassus *et al.*, 2004; Pousse *et al.*, 2018). The dinoflagellate *L. chlorophorum* does not produce toxins, but anoxia caused by high biomass bloom concentration, such as GSD, are considered as one potential harmful effect caused by microalgae on biological exploited resources (Sournia *et al.*, 1992). Giving the coincidence of problems observed on cultivated oysters during GSD, it is questionable the existence of a direct (harmful substances production) or indirect (anoxia) effect of *L. chlorophorum* on oysters. To our knowledge, no study have investigated whether the cells of *L. chlorophorum* can be filtered by the oyster *C. gigas*,

especially at high concentrations such as those encountered in a GSD bloom, and whether oysters are affected anyhow by the ingestion of this dinoflagellate.

Beyond its ability to form large blooms in coastal waters, *L. chlorophorum* excrete large amounts of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures (Claquin *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2021) and in the field (Roux *et al.*, submitted). The TEP, defined as particles ($>0.22\ \mu\text{m}$) stained with Alcian Blue (Alldredge *et al.*, 1993; Passow, 2002), could impair protozoan grazing (Liu and Buskey, 2000) and affect filtration rate in bivalves (Riisgård and Larsen, 2007). In the natural environment, TEP can modify particle size-spectrum by coagulating small particles into large ones, including phytoplankton cells, due to their stickiness (Passow *et al.*, 2001). Moreover, exopolymers could affect the ingestion of oysters, as previously observed for *C. virginica* exposed to high densities of *Aureoumbra lagunensis*, a non-toxic pelagophyceae known to cause brown tides (Gobler *et al.*, 2013; Galimany *et al.*, 2017). Although Roux *et al.* (submitted) suggested that the recycling of TEP excreted by a GSD could accentuate hypoxia likely contributing to fauna mortalities, it is also questionable whether high TEP concentrations produced by *L. chlorophorum* could alter the filtration, ingestion and assimilation processes of the oyster *C. gigas*.

Here we investigate the physiological response of the Pacific oyster *C. gigas* exposed to the green dinoflagellate *L. chlorophorum*. Oysters were exposed for 48h to low or high concentrations of *L. chlorophorum* and then left for 24h to recover on a standard diet. In parallel, control oysters were maintained on the standard diet for 72 hours. We evaluated the direct impact of the *L. chlorophorum* exposure on oyster tissues through histological analysis. The short-term consequences of *L. chlorophorum* exposure on oysters were assessed through measurements of clearance and respiration rates and absorption efficiency during the recovery phase. We expected that oysters exposed to *L. chlorophorum* would reduce their metabolic rate, as is usually the case with a poor quality (or toxic or fasting) diet and thus compensate during the recovery period. This experiment is the first attempt at a physiological explanation of oyster mortalities caused by GSDs observed in the natural environment.

2. Material and methods

2.1. Biological material

2.1.1. Oysters

The oysters were produced at the Ifremer hatchery facilities in Argenton (Brittany, France) on September 8, 2020 following procedures described in Petton *et al.* (2015). The broodstock consisted of 100 adults originating from ten different cohorts collected in the natural environment between 2010 and 2020, in Fouras (Marennes-Oléron, France). At 40 days old, the juveniles were moved to the Ifremer growing facilities in Bouin (Vendée). On February 2021, oysters were returned to Argenton and kept for 30 days in a 500 L flow-through tank at $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Oysters were fed daily with a mixed diet consisted of the Prymnesiophyceae *Tisochrisis lutea* (CCAP927/14), and the diatom *Chaetoceros gracilis* (CCAP 1010/3; 1:1 in dry weight). These conditions were adapted between the three sets of experiments (reduction of food and temperature) to ensure that oysters had similar morphological characteristics.

2.1.2. Algae cultures

The dinoflagellate *L. chlorophorum* strain RCC6911 (RCC: Roscoff Culture Collection; <http://roscof-culture-collection.org/>) isolated in the Vilaine Bay (southern Brittany, France) in 2019 was grown in several 500 mL batch culture using autoclaved filtered seawater supplemented with L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993) without Si. In total, 40 L of culture were available for each exposure experiment, which was the maximum volume that we could produce in our laboratory facilities. Cultures were maintained at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a dark:light cycle of 12:12 h, and were harvested in exponential growth phase (8 days; $\sim 13 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) for the feeding experiments.

Cultures of *T. lutea* (CCAP927/14) were obtained from the Argenton hatchery (Ifremer – France). Cultures were produced in 300 L cylinders containing 1 μm filtered seawater enriched with Conway medium (Walne, 1970) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, air-CO₂ (0.45%) mix aerated, and with continuous light ($78 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cultures were harvested in exponential growth phase (6 days; $\sim 9 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) for the feeding experiments.

2.2. Experimental design

Our experimental design consists of two phases: an initial exposure of 48h to different diets followed by a recovery of 24h under a standard diet. Three sets of experiments (EXP1, EXP2 and EXP3) were conducted over the period of March-April 2021 (Table S9). Prior to the start of each experiment, initial biometric analysis were performed. Oysters had similar morphological characteristics between the three experiments (ANOVA, $P > 0.05$, $N = 10$ individuals; Table S10). For exposure phase, oysters, fasted for 72h to clear their gut, were randomly placed in batch tanks and exposed to different diets. For each feeding condition, an additional tank, without oysters, was used as control in order to follow the growth dynamic of phytoplankton cultures throughout the experiment. All tanks were equipped with a pump (Aqua-power 200, SuperFish, at 200 L h^{-1}) to limit the sedimentation of phytoplankton cells, and an oxygen bubbler (Hobby; 50 mm). The temperature of the room was $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and light was continuous ($78 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on average in the room). The different algal regimes were maintained for 48h with two feedings per day, separated by 5 hours. Seawater temperature, salinity, pH, oxygen saturation and phytoplankton cell concentrations were measured for 90 min after each feeding ($T_0 = 0\text{h}$, $T_1 = 5\text{h}$, $T_2 = 24\text{h}$ and $T_3 = 29\text{h}$) both in the oyster tanks and in the control tanks (Table S9). Photo-physiological status of phytoplankton cells (F_V/F_M) was measured at the beginning and end of each feeding (Table S9). For recovery phase, oysters previously exposed to different diets were placed in individual chambers of an ecophysiological measurement system (Pousse *et al.*, 2018) for 24h. This system allows to measure continuously physiological rates of eight individual oysters and one control blank (without oyster). The tested oysters were continuously fed with *T. lutea* to measure the

consequence of prior exposures on individual clearance and respiration rates, and absorption efficiency. We overall measured physiological rates in 12-13 individual oysters for each condition (Table S9).

2.2.1. Experiment 1

On 16 March 2021, a first experiment (EXP1) was carried out to determine whether the oysters could filter cells of *L. chlorophorum*. 65 oysters were placed in 7 L tanks and exposed to three feeding conditions: 1) seawater without phytoplankton, 2) a control condition with *T. lutea* (5×10^4 cells mL⁻¹; TL) and 3) *L. chlorophorum* in low concentration (5×10^2 cells mL⁻¹; LC-low), corresponding to the same bio-volume as *T. lutea* (Table S9). Three additional control tanks were used to follow the growth dynamic of phytoplankton cultures. Physicochemical parameters and phytoplankton cell concentrations were measured every 30 min for 90 min after each feeding (0h, 5h, 24h and 29h). The F_V/F_M values and TEP concentrations were measured at the beginning and end of each feeding (Table S9). For the recovery phase, physiological rates of 2, 3 and 3 oysters previously exposed to seawater, TL and LC-low conditions respectively, were investigated (Table S9).

2.2.2. Experiment 2

On 12 April 2021, a second experiment (EXP2) was performed to investigate the impact of bloom concentration of *L. chlorophorum* on oysters (Table S9 and Figure 35). The effect of *L. chlorophorum* in high concentration (7.5×10^3 cells mL⁻¹; LC-bloom) was compared with the other two diets (LC-low and TL, Figure 35A). 65 oysters were placed in 7 L tanks. Three additional control tanks were used to follow the growth dynamic of phytoplankton cultures (Figure 35A). Seawater temperature, salinity, pH, oxygen saturation and phytoplankton cell concentrations were monitored more accurately than in the first experiment. Indeed, these parameters were measured every 10 min for 90 min after each feeding (0h, 5h, 24h and 29h) both in the oyster tanks and in the control tanks

(Figure 35B). The F_V/F_M values and TEP concentrations were measured at the beginning and end of each feeding (Figure 35B). In addition, ten oysters per condition were randomly collected for histological analysis after 48h of exposure (Figure 35B). In this study, we focused on the results obtained in this exposure experiment (EXP2) because it was the most accurate experiment (Figure 35). For the recovery phase, physiological rates of 2, 2 and 4 oysters previously exposed to TL, LC-low and LC-bloom conditions respectively, were assessed (Table S9; Figure 35).

2.2.3. Experiment 3

On 27 April 2021, an additional experiment (EXP3) was conducted to increase the number of replicates available for recovery analysis (Table S9). Due to logistical constraints, in particular the limited amount of *L. chlorophorum* culture available, only 25 oysters were placed in 3.5 L tanks (Table S9). For each feeding (0h, 5h, 24h and 29h), we carefully checked that initial phytoplankton concentrations in TL, LC-low and LC-bloom conditions were similar to previous experiments (EXP1 and EXP2), and F_V/F_M values were verified. Three additional control tanks were used to follow the growth dynamic of phytoplankton cultures. Physicochemical parameters and phytoplankton cell concentrations were measured every 30 min for 90 min after each feeding (Table S9). TEP concentration was not assessed during this exposure experiment (Table S9). For the recovery phase, eight oysters previously exposed to each feeding condition were studied: TL (N=8), LC-low (N=8) and LC-bloom (N=8) (Table S9).

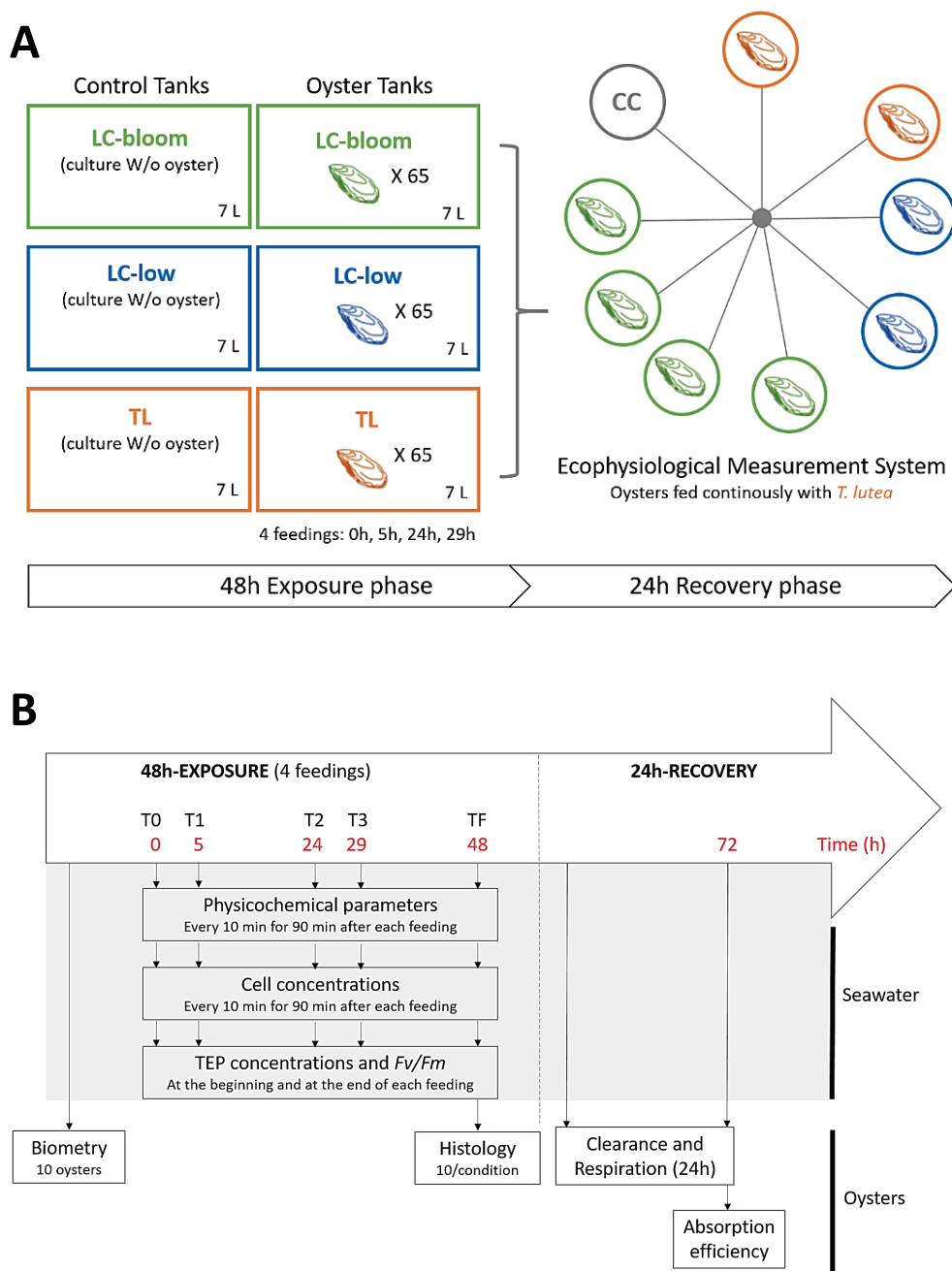


Figure 35. Experimental design (A) and sampling schedule (B). Only the exposure experiment EXP2 is presented in this study. Feedings were represented as follows: T0 (0h), T1 (5h), T2 (24h) and T3 (29h). The 48h-exposure phase consists of three tanks containing oysters corresponding to three food regimes (LC-bloom, LC-low and TL), and three control tanks without oysters. The direct impact of *L. chlorophorum* on oysters was assessed through histological analysis (48h). During the 24h-recovery phase, oysters were fed continuously with *T. lutea* within an ecophysiological measurement system composed of nine individual chambers (including one control chamber without oyster (CC)). Clearance and respiration rates as well as absorption efficiency were measured individually to assess the short-term consequences of a *L. chlorophorum* exposure on oyster ecophysiology.

2.3. Environmental parameters during exposure

Temperature (°C), pH, salinity and oxygen saturation (%) were measured using a multi-parameter probe (WTW Multi 3430) in all exposure tanks to ensure that environmental conditions were favorable to the development of oysters (*i.e.*, Le Moullac *et al.*, 2007).

After each feeding, 5 mL seawater samples were analyzed to estimate phytoplankton cell concentrations using a Beckman Coulter Multisizer (range: 0-200 μm^3 for *T. lutea* and 400-6000 μm^3 for *L. chlorophorum*). Cell concentrations were expressed in cell volume (μm^3) per mL^{-1} .

The photo-physiological status of phytoplankton cells was controlled by measuring the maximum quantum efficiency of the photosystem II (F_V/F_M) at 455 nm (Flash Pulse = 20%), using an Aquapen-C 100 fluorimeter (Photon Systems Instruments). Three mL triplicates were maintained in the dark for 15 min before measurement, following standard protocols (Kromkamp and Forster, 2003).

The concentration of TEP was determined using a semi-quantitative method based on the colorimetric determination of the amount of dye complexed with extracellular particles (Claquin *et al.*, 2008 adapted from Passow and Alldredge, 1995). Briefly, triplicate samples of 20 mL were gently filtered through 0.4 μm polycarbonate membrane filters (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membrane). Particles retained on the filter were stained with Alcian Blue solution (Sigma). After one night of drying at 50°C, 6 mL of 80% H_2SO_4 were added, and 2 h later, the absorption of the supernatant was measured using a spectrometer at 787 nm (Shimadzu UV-2600). Alcian blue absorption was calibrated using a solution of Xanthan gum (X). The TEP concentrations are expressed in $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$.

2.4. Histological analysis after exposure

After 48h of exposure (EXP2), 30 individuals corresponding to ten oysters per condition were sampled for respectively 1) Hematoxylin-eosin staining, in order to identify

potential lesions, and 2) multichromic staining, allowing visualization of acidic polysaccharides, glycogen and proteins in the samples. Oysters tissues were fixed immediately in Davidson's solution (Shaw and Battle, 1957) at 4°C for 48h. Samples were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with xylene and embedded in paraffin wax.

2.4.1. Hematoxylin-Eosin staining

In order to assess whether exposure to *L. chlorophorum* cells could affect oysters tissues, a Hematoxylin-eosin staining was performed on the preserved oyster samples. Five-µm thick sections of the paraffin blocks were cut, mounted on glass slides and stained with Harry's Hematoxylin-Eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967). The stained slides were observed under a light microscope (Zeiss Axio Observer). Five organs were observed: mantle, gills, stomach, intestine and digestive tubules. The tissues were observed in order to identify potential lesions, such as deformation or vacuolation of the epithelia, hemocytic infiltrations or diapedesis in the different tissues of oysters. The results were categorized from 0 to 3 according to the degree of lesions (Fabioux *et al.*, 2005).

2.4.2. Multichromic histology

Histological multichromic analysis was performed following standard protocols (Costa and Costa, 2012; Rodrigo *et al.*, 2015). Briefly, sections (5 µm thick) were cut, mounted on glass slides, deparaffinated and rehydrated in a regressive series of ethanol before staining. Staining procedure was employed as follows: Alcian Blue (30 min); Periodic acid (10 min); Schiff's reagent (20 min); Hematoxylin (2 min) and Picric Acid (5 min). Alcian Blue and Periodic Acid-Schiff's were employed for the histochemical detection of acid polysaccharides and glycogen, respectively. All dyes were applied in the dark and at room temperature (20°C), with the exception of Picric Acid solution (preheated to 50–60°C) and Schiff's reagent (6–8°C). Afterwards being dehydrated, slides were cleared with xylene and mounted in resin. All analysis were carried out using a light microscope

(Zeiss Axio Observer). A blue stain indicates a production of acidic compounds while a purple stain reveals a production of neutral compounds by the cells.

2.5. Ecophysiological measurement

An ecophysiological measurement system was used to determine the individual clearance ($L\ h^{-1}\ g^{-1}\ dw\ std$) and respiration ($mg\ O_2\ h^{-1}\ g^{-1}\ dw\ std$) rates of oysters, after 48h of exposition of our three conditions (Pousse *et al.*, 2018). This system consists of nine identical 0.54 L flow-through acrylic chambers supplied with *T. lutea* culture pumped from a tank. Each chamber contained one single oyster, except one empty control chamber. Flow rate in the chamber was adjusted to $40\ mL\ min^{-1}$ by means of two peristaltic pumps (Masterflex L/S 7551, Cole Parmer, USA). The seawater temperature ($^{\circ}C$) and the fluorescence (FFU) were measured for 15 min in the outflow of each chamber by a WTW multiparameter meter (WTW Multi 3430) and a fluorometer (WETstar chlorophyll, WETLABS, Philomat, USA). Calibration lines obtained from cell counts allowed recalculating phytoplankton cell concentrations from fluorescence. These instruments were connected to a computer for the visualization and acquisition of high frequency time series data. The fluorescence of the water out-flowing from chambers 2 to 8 (containing oysters) was monitored sequentially for 15 min cycle; between each chamber containing an oyster, the control chamber (chamber 1) was also measured for 15 min. This protocol allowed the monitoring of each chamber every 3.5h during 24 hours.

For each trial, the individual clearance rate (CR) of each oyster was estimated as:

$$CR = fl \times \frac{(C_{CC} \times C_N)}{C_{CC}} \quad (5)$$

where fl is the flow rate through the chamber ($L\ h^{-1}$), C_{CC} is the concentration of phytoplankton in the control chamber (CC) and C_N is the concentration of phytoplankton in a chamber with one oyster (Bayne, 2017; Tallec *et al.*, 2021). The individual respiration rate (RR) is defined as:

$$RR = fl \times (O_{CC} \times O_N) \quad (6)$$

where fl is the flow rate through the chamber ($L\ h^{-1}$), O_{CC} and O_N are the concentrations of O_2 ($mg\ O_2\ L^{-1}$) in the control chamber and in a chamber with one oyster, respectively (Savina and Pouvreau, 2004; Tallec *et al.*, 2021). At the end of each run, oysters were sacrificed and stored at $-20^{\circ}C$ before measuring the dry flesh weight in order to calculate mass standardized clearance and respiration rates for an equivalent individual of 1 g dry tissue (Bayne *et al.*, 1987; Tallec *et al.*, 2021).

After 24h, absorption efficiency (AE, %) of organic matter (OM) from ingested *T. lutea* cell ($OM_{T.lutea} = 94\%$) was calculated according to Conover's method by collecting feces from each chamber:

$$AE = \frac{f-e}{(1-e)\times f} \quad (7)$$

where f corresponds to the organic fraction of the diet and e is the organic fraction of the feces (Conover, 1966; Iglesias *et al.*, 1998).

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed in R software 3.6.1 (R Core Team, 2019). Normality and variance homogeneity were verified using Shapiro–Wilk and Levene's methods, respectively. For initial biometric data, an ANOVA was carried out in order to check differences in morphological characteristics as a function of experiment (EXP1, EXP2 and EXP3). For histopathology results, a unilateral Mann–Whitney U test was used to assess the effect of *L. chlorophorum* after 48h of exposure on oyster tissues. A mixed model ANOVAs were performed to determine differences in the clearance and respiration rates as a function of food regime, time and experiment (Table S11). Main factors were food regime (LC-low, TL, LC-bloom) and time. The experiment (EXP1, EXP2, EXP3) was considered as a random factor. The repeated option was applied to the time to take into account temporal dependence. Where differences were detected, least-square means multiple comparison tests were used to determine which means were significantly different. In addition, an ANOVA was carried out to check significant differences of absorption efficiency data as a function of food regime and experiment.

3. Results

3.1. Exposure experiment

3.1.1. Physicochemical experimental conditions

Physicochemical parameters were monitored in the six tanks (three oyster tanks and three control tanks without oysters) of the exposure experiment 2 (Figure S20A-H). Temperature and salinity remained stable during the 48h of exposure with a mean value of $20.6 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ (Figure S20A, B) and 35.4 ± 0.4 (Figure S20C, D), respectively. During the 90 min following each feeding, pH (Figure S20F) as well as oxygen saturation (Figure S20H) decreased, consistent with respiration and consumption of phytoplankton cells by the oysters. Indeed, oxygen saturation showed a high temporal variability in the LC-low and LC-bloom conditions, ranging from 86.1 to 105.3% (Figure S20H). In contrast, oxygen saturation remained stable for the three control tanks (without oysters) with an average value of $98.7 \pm 1.8\%$ (Figure S20G).

3.1.2. Phytoplankton and TEP concentrations

For the control tanks (without oysters), phytoplankton concentration, measured by cell volume per unit volume of water ($\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$), was up to 10-fold higher in the LC-bloom condition than in the TL and LC-low conditions (Figure 36A). In addition, the total feeding phytoplankton concentration showed different temporal patterns under the different cultures. Indeed, phytoplankton concentration remained relatively stable in the LC-low and TL conditions but declined by a factor 2 in the LC-bloom condition (from 1.5×10^7 to $6.4 \times 10^6 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$) (Figure 36A). The maximum quantum efficiency of the photosystem II (F_V/F_M) was 0.6 ± 0.1 for the *L. chlorophorum* cultures and was 0.7 ± 0.0 for the TL condition over time, suggesting a good photo-physiological status of the two species. Therefore, the decrease in cell concentration in the LC-bloom condition (Figure 36A) was probably caused

by the sedimentation of *L. chlorophorum* cells, as suggested by the presence of aggregates in this control tank (data not shown). Similar (F_V/F_M) values were recorded in the oyster tanks, which also indicates the good physiological state of the algae for these conditions. However, during the 90 min following each feeding, cell concentration drastically decreased from an average of $1.4 \times 10^7 (\pm 1.6 \times 10^6)$ to $4.9 \times 10^5 (\pm 1.6 \times 10^5) \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ in the LC-bloom condition (Figure 36B). Similarly, cell concentration decreased from an average of $1.3 \times 10^6 (\pm 1.8 \times 10^5)$ to $1.7 \times 10^5 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1} (\pm 7.1 \times 10^4)$ in the LC-low condition, and from $2.6 \times 10^6 (\pm 3.6 \times 10^5)$ to $1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1} (\pm 4.8 \times 10^4)$ in the TL condition (Figure 36B). For the three feeding conditions, oysters filtered more than 85% of the available phytoplankton in 90 min after each feeding (Figure 36B and Figure S21). Therefore, oysters successfully filtered *L. chlorophorum* cells.

In the three control tanks (without oysters), TEP concentration increased over time (Figure 36C). In particular, maximum TEP concentration was measured in the LC-bloom condition after 48h of exposure ($9681 \pm 1566 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$) and was twice as high as values obtained in the LC-low and TL conditions (Figure 36C). In the tanks containing oysters (Figure 36D), an increase in TEP concentration was observed in the LC-low (from 621 ± 35 to $3527 \pm 402 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$) and TL conditions (from 1034 ± 161 to $4331 \pm 577 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$) during the 48h of exposure while a different pattern was observed in the LC-bloom condition. From 0h to 24h of exposure, TEP concentration was higher in the LC-bloom condition ($3031 \pm 936 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$) than in the LC-low and TL conditions (1217 ± 483 and $1201 \pm 605 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$, respectively). However, TEP concentration in the LC-bloom condition decreased by 60% during the 90 min following the first feeding, and then stabilized until the end of the exposure ($3327 \pm 245 \mu\text{g Xeq L}^{-1}$) (Figure 36D).

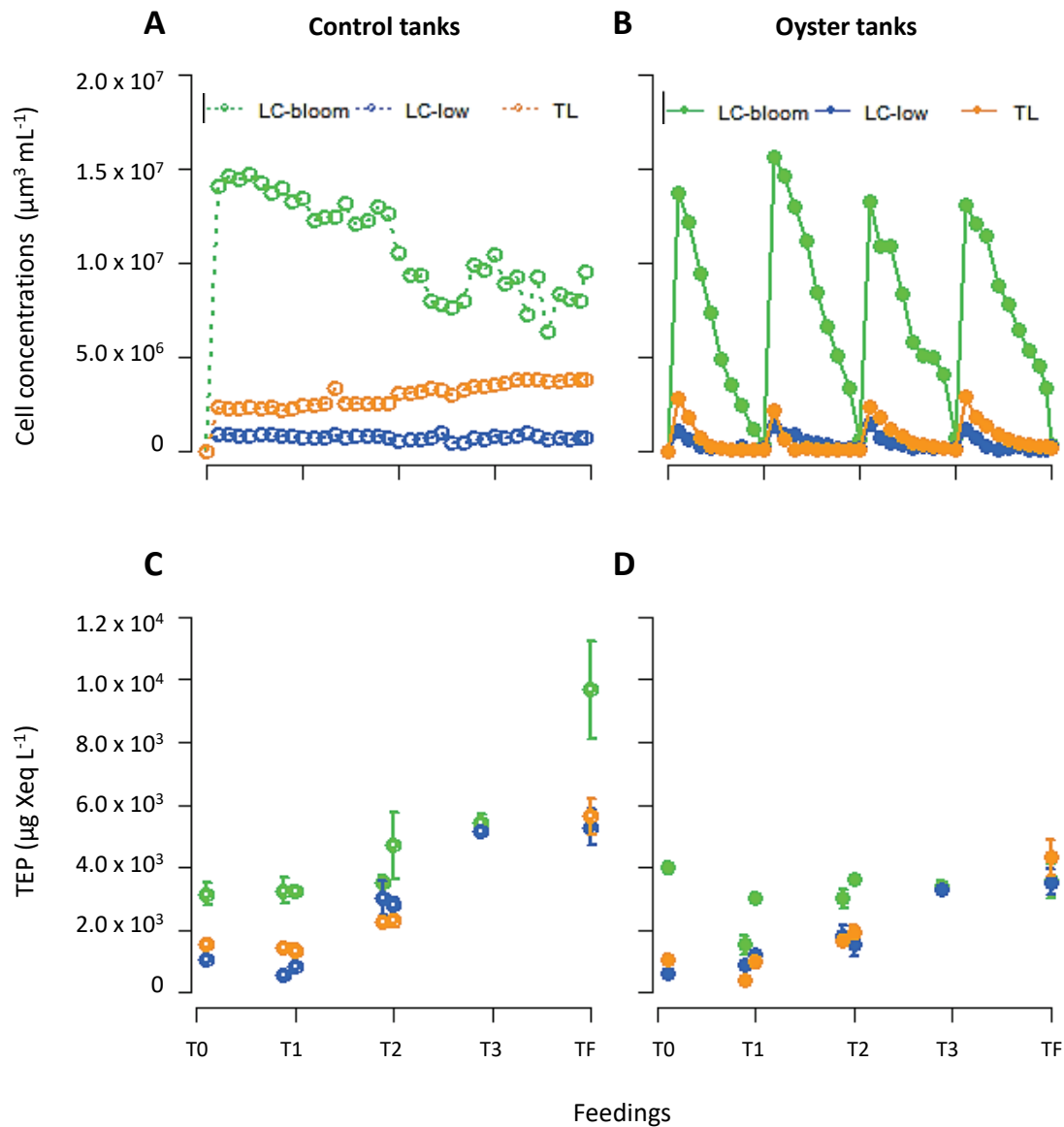


Figure 36. Total phytoplankton ($\mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$; **A, B**) et TEP concentrations ($\mu\text{g Xeq L}^{-1}$; **C, D**) measured during the 48h exposure experiment EXP2 in the control tanks (without oysters; open symbols) and in the oyster tanks (containing oysters; filled symbols). Cell concentration was recorded every 10 min for 90 min following each feeding (T0=0h, T1=5h, T2=24h, T3=29h) and TEP concentration was measured only at the beginning and end of each feeding. Feeding conditions are represented as follows: *L. chlorophorum* bloom concentration (LC-bloom; green circles), *L. chlorophorum* in low concentration (LC-low; blue circles) and *T. lutea* (TL; orange circles).

3.1.1. Histological analyses

After 48h of exposure, 30 slides corresponding to ten oysters per condition were stained with Hematoxylin-eosin in order to compare the possible presence of tissue lesions (Table 6). The histological sections corresponding to the TL condition did not reveal any abnormalities, except for some diapedesis phenomena in the oyster stomach. For the LC-bloom and LC-low conditions, some individuals showed lesions in different organs such as digestive tubules, mantle, intestine and gills. Specifically, hemocyte diapedesis as well as vacuolation in the epithelium of the stomach were observed (Figure S22). Nevertheless, almost no significant differences were observed in the intensity of histological lesions between the three feeding conditions, except for hemocyte diapedesis in the epithelium of stomach which was significantly lower in the LC-low than in the LC-bloom and TL conditions ($P<0.05$; Table 6).

To further investigate the potential effects of the different conditions, the same individuals were also subjected to multichromic staining, allowing visualization of acidic polysaccharides, glycogen and proteins in the samples (Figure 37). Microscopic analysis of the multichromic stained slides revealed a difference in the staining of the cells of the epithelia of the digestive tubules ranging from violet to blue, depending on the conditions. The percentage of slides with blue-stained digestive tubule cells represented 70% for the LC-bloom condition (Figure 37A), 40% for the LC-low condition and only 10% for the TL condition (Figure 37B). This result showed the presence of acidic polysaccharides within digestive tubules of oysters previously exposed to a bloom of *L. chlorophorum* (LC-bloom; Figure 37A).

Table 6. Mean intensities of histological figures in *Crassostrea gigas* mantle, gills, stomach, intestine and digestive tubules after 48h of exposure to LC-bloom, LC-low and TL conditions (EXP2). Results are expressed as mean of stage intensity $\pm$ SD (N=10 per condition), with stage 0 = absence, stage 1= light, stage 2 = moderate and stage 3 = heavy. Letters indicate significant differences between conditions (Mann–Whitney U test; $P < 0.05$)

Organs	Pathologies	Condition		
		LC-bloom	LC-low	TL
Mantle	Deformation	0.5 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.9
	Vacuolation in the epithelium	1.2 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 1.0
	Vacuolation in the mucus cells	0.6 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.7	0.4 $\pm$ 1.0
Gills	Vacuolation	0.6 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.1
	Hemocyte infiltration	1.2 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.7
Stomach	Hemocyte diapedesis	1.9 $\pm$ 0.9a	0.9 $\pm$ 0.3b	1.8 $\pm$ 0.8a
	Vacuolation	0.8 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.8
Intestine	Hemocyte diapedesis	1.5 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.7
	Vacuolation	1.1 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.4
Digestive tubules	Deformation in the epithelium	0.8 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 1.1	1.2 $\pm$ 0.9

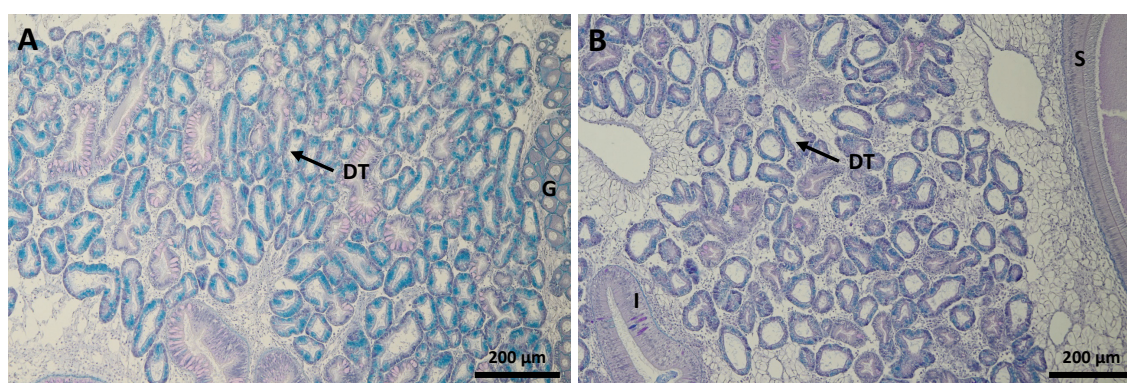


Figure 37. Histological analysis (multichromic stained paraffin sections) of digestive tubules of *Crassostrea gigas* exposed to (A) the LC-bloom condition (*L. chlorophorum* bloom concentration) or (B) the TL condition (*T. lutea*), observed using a light microscope (VivaTome Zeiss Axio Z1, x 40). DT: digestive tubule; G: gonad; S: stomach; I: intestine. Scale bars: 200 μ m.

3.2. Recovery phase

Food and time interacted in their effect on clearance rate (Table S11). At the beginning of the recovery phase, clearance rate was 2.3-2.7 time higher in the TL condition than in the LC-low and LC-bloom conditions (Figure 38A). Clearance rate of oysters in the TL condition declined gradually throughout the experiment and became similar to that observed in the other conditions after 11h for which it was stable (Figure 38A). The respiration rate varied as a function of time and food regime (Table S11 and Figure 38B). Respiration was stable throughout the recovery period but increased slightly at the end (Figure 38B). Overall, respiration rate of oysters was lower in animals fed LC-low. Finally, absorption efficiency of oysters previously exposed to LC-bloom and LC-low conditions was twice as high as that of the TL condition ($P<0.05$; Figure 39).

4. Discussion

4.1. Cupped oysters successfully ingest *L. chlorophorum* cells under controlled conditions

Most bivalves capture particles greater than 6 μm to an efficiency close to 100%, with capture decreasing nonlinearly for particles of smaller size (Palmer and Williams, 1980; Riisgård, 1988; Rosa *et al.*, 2018). However, despite the range of feeding mechanisms, there are still nutritious particles (*e.g.*, living autotrophic and heterotrophic cells) too small or too large for many suspension feeders to retain and ingest (Defossez and Hawkins, 1997; Bone *et al.*, 2003; Ward and Shumway, 2004; Kach and Ward, 2008). For the first time, the present study demonstrated that the oyster *C. gigas* was able to filter *L. chlorophorum* cells. As the cells of *L. chlorophorum* measure $\sim 20 \mu\text{m}$, this result is congruent with others studies highlighting that *C. gigas* can filter particles ranging from 2 to 30 μm (Barillé *et al.*, 2003), including HAB species such as *Alexandrium* sp. (*e.g.*, Pousse *et al.*, 2018), and has a high clearance rate for $>5 \mu\text{m}$ particles (Dupuy *et al.*, 2000).

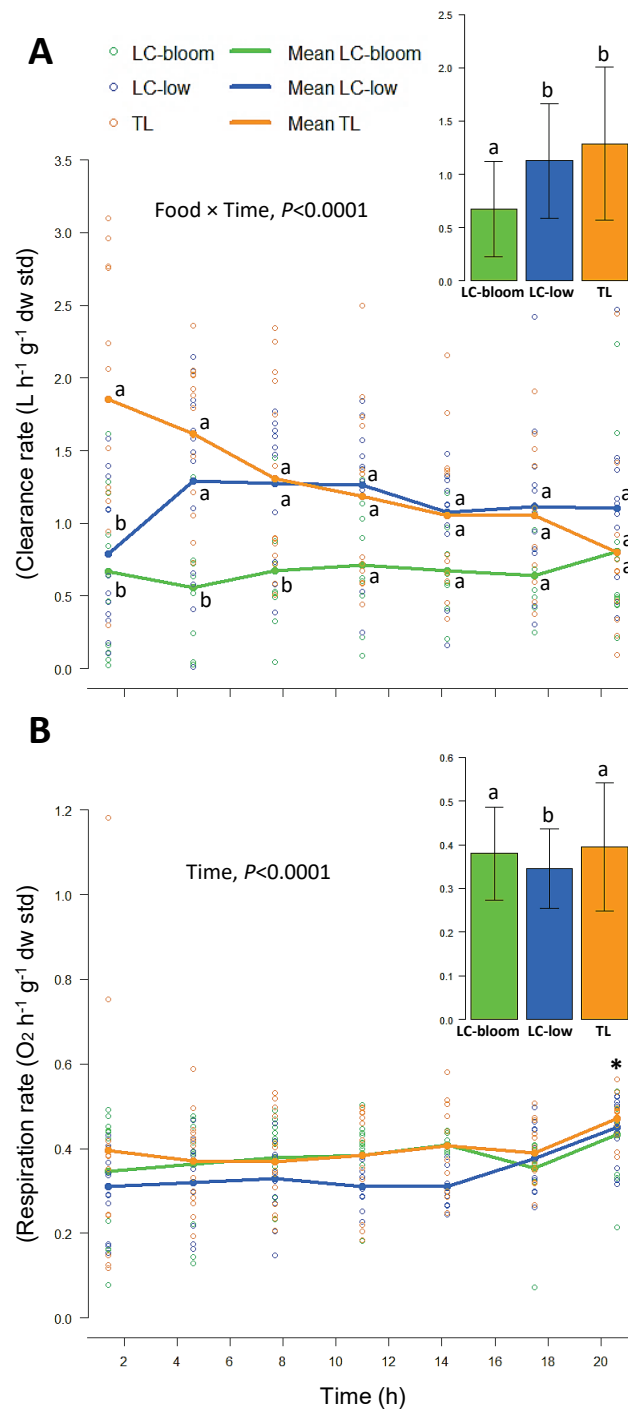


Figure 38. (A) Individual clearance rate of oysters as a function of food regime and time during the recovery phase. Letters represent significant differences for the food × time interaction on clearance rate for each time independently (repeated measures ANOVA). The inset shows clearance rate as a function of food regime only. (B) Individual respiration rate of oysters during the recovery phase. * indicate the effect of time on the respiration rate (repeated measures ANOVA). The inset shows respiration rate as a function of food regime only. Open circles represent individuals and solid lines represent mean.

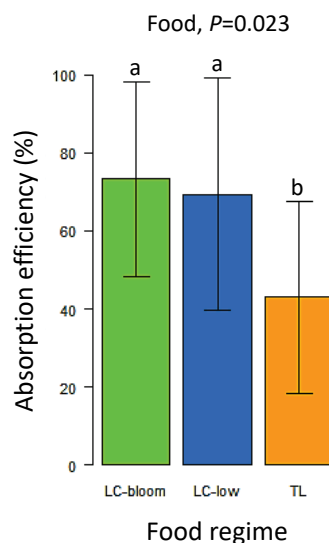


Figure 39. Absorption Efficiency (%) of oysters as a function of food during the recovery phase. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Letters indicate significant differences between food regimes (ANOVA; $P < 0.05$)

In our exposure conditions, oysters successfully filter *L. chlorophorum* cells despite the presence of large amounts of TEP. Indeed, the highest TEP concentration was recorded in the control tank for the LC-bloom condition (7.5×10^3 cells mL^{-1} and 9.0×10^3 $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$). Abundance of *L. chlorophorum* cells and TEP concentration were relatively similar to the values obtained under laboratory culture conditions (12×10^6 cells L^{-1} and 17×10^3 $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$; Roux *et al.*, 2021) and inside a GSD *in situ* (9×10^6 cells L^{-1} and 24×10^3 $\mu\text{g Xeq L}^{-1}$; Roux *et al.*, submitted). In the field, Marín Leal *et al.* (2008) suggested that *C. gigas* feed predominantly on phytoplankton and, to a lesser extent, on microphytobenthos and detritus. In addition, suspension-feeding molluscs could ingest marine aggregates and their constituent picoplankton-size particles (Kach and Ward, 2008). Thus, aggregation processes associated with TEP production may affect the feeding efficiency and the food quality for shellfish (Prieto *et al.*, 2001). Furthermore, many benthic suspension feeders have been shown to produce significant amounts of TEP under field and laboratory conditions (Li *et al.*, 2008), including the oyster *C. virginica* (McKee *et al.*, 2005). While TEP production by oysters cannot be completely excluded (McKee *et al.*, 2005), concentrations of TEP measured in control tanks confirmed that *L. chlorophorum* was the main producer of TEP under experimental conditions, and that it did not inhibit total filtration in LC-bloom

condition after a few hours. However, these results, obtained under controlled conditions (with sequential feedings and unrealistic turbulent regime), remain to be confirmed in the field. More particularly, in coastal ecosystems, biological and physical processes could deeply affect the coagulation of particles (Passow *et al.*, 2001) and therefore strongly modify the particles size spectrum available for Pacific oysters during a GSD event.

Histological analyses were performed to assess whether the exposure to *L. chlorophorum* cells could affect oysters tissues. HAB exposures, especially dinoflagellates, can cause histopathological lesions in exposed bivalves (Lassudrie *et al.*, 2020). The most common alterations observed within bivalve tissues are often: vacuolation, oedema, melanization of gills and mantle, signs of irritation (mucus production) and digestive tubules sloughing and atrophy (Haberkorn *et al.*, 2010; Hégaret *et al.*, 2010, 2012; Medhioub *et al.*, 2012; Lassudrie *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2019). Gobler *et al.* (2008) highlighted that the presence of the dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* induced an inflammatory response in shellfish tissue, which might be related to the extracellular polysaccharides produced by this species (Gobler *et al.*, 2008). In the present study, while Hematoxylin-eosin staining revealed some lesions (hemocyte diapedesis and vacuolation of epithelia) in different organs of oysters previously exposed to *L. chlorophorum*, no significant differences were observed in the intensity of histological lesions among food regimes. However, oysters were exposed to relatively low concentrations of cells compared to those generally used to assess the impact of dinoflagellates on oyster tissues. Therefore, we cannot completely exclude that higher cell concentrations of *L. chlorophorum* could induce potential histological lesions on oyster tissues.

Furthermore, multichromic staining showed that 70% of the slides corresponding to animals exposed to LC-bloom condition were characterized by blue-stained digestive tubule cells, in contrast to animals exposed to the TL control condition, for which only 10% of the slides presented such coloration. This blue-stain highlights the presence of acidic polysaccharides in digestive tubule cells under LC-bloom condition (Costa and Costa, 2012) suggesting an inflammatory response of the digestive tubules of cupped oysters exposed to *L. chlorophorum*. Indeed, the secretion of acidic glycoconjugates by different organisms has been reported as a response to stress as well as to exposure to pathogens or toxic substances (Izzetoğlu *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2014; Dezfuli *et al.*, 2016; Ghosh, 2020).

However, the hypothesis that the blue staining are indeed TEP residues excreted by *L. chlorophorum* in the environment (Claquin *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2021) and presumably filtered by oysters cannot be completely excluded. Nevertheless, this result suggest that the oyster *C. gigas* was able to ingest *L. chlorophorum*, which represents an innovative result compared to the current literature. Moreover, our result suggested that a bloom of this dinoflagellate could affect the digestive tubules of the oyster. Further exposure experiments will be required to understand precisely the potential long-term impacts.

4.2. Short-term consequences of *L. chlorophorum* exposure on physiological rates of cupped oysters

Several studies have investigated the direct impact of HAB exposure on oyster physiological rates. For example, it has been reported that the oyster *C. gigas* could reduce clearance, ingestion, and biodeposition rates when exposed to HAB species like *Alexandrium* sp. (Bougrier *et al.*, 2003; Lassus *et al.*, 2004; Pousse *et al.*, 2018). In addition, Keppler *et al.* (2005) demonstrated that a 4-day exposure to the toxic species *Heterosigma akashiwo* induce a lysosomal destabilization in oysters which continue to increase after 7 days of recovery. Our study assessed for the first time the consequences of *L. chlorophorum* exposure on oyster ecophysiology during the 24h recovery phase in an ecophysiological measurement system fed continuously with the control algae *T. lutea*. During the recovery phase, our results demonstrated that clearance rate measured between 1.4h and 11h was significantly higher in the TL control condition than in the LC-bloom and LC-low conditions. Clearance rate of suspension-feeding bivalves has been considered as the main responsive component of feeding behaviour under fluctuating environmental conditions (Hawkins *et al.*, 2001; Cranford *et al.*, 2005). During the exposure phase, oysters in the LC-bloom condition were exposed to a large amount of TEP produced by *L. chlorophorum*, which could strongly increase the viscosity of seawater (Jenkinson, 1986; Passow, 2002; Kesaulya *et al.*, 2008; Seuront and Vincent, 2008). For example, Seuront *et al.* (2006) have shown a significant increase in excess viscosity during a *Phaeocystis globosa* bloom, a species known to produce a large amount of TEP. However,

modification of seawater viscosity could have major consequences on filtration processes. Indeed, seawater viscosity has been shown to control the cilia beat frequency in *Mytilus edulis* and then modification of seawater viscosity could strongly affect filtration rate in mussels (Riisgård and Larsen, 2007). Although seawater viscosity was not estimated in our study, we hypothesize that TEP excreted by *L. chlorophorum* at bloom concentration could affect the oyster gills, resulting in a lowering clearance rate at least for 24h after exposure.

Previous studies have shown a decrease in *C. virginica* clearance rate when fed with high densities of *A. lagunensis*, known to excrete exopolymers under laboratory conditions and form dense brown tides (Gobler *et al.*, 2013). The authors suggested that pseudo-feces production by the oyster *C. virginica* was not enough to compensate for the high seston loads during *A. lagunensis* bloom (Gobler *et al.*, 2013). In the field, Galimany *et al.* (2017) have shown a decrease in clearance rate while absorption efficiency remained constant, suggesting that oysters were able to sustain their feeding requirements on the brown tide (Galimany *et al.*, 2017). The stickiness of the exopolymers could inhibit the activity of cilia and affect the transport of particles to the mouth (Galimany *et al.*, 2017). Interestingly, during the short-term recovery, oysters previously exposed to *L. chlorophorum* bloom showed a lower clearance rate phase (between 1.4h and 11h) compared to the control while absorption efficiency was doubled. This increased assimilation during the recovery phase is perhaps a compensation for a decrease that would have occurred during the exposure phase. Furthermore, our results corroborate the previous hypothesis based on the DEB model, suggesting that oysters could have a low assimilation efficiency for *L. chlorophorum* (Bourlès *et al.*, 2009; Alunno-Bruscia *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016). To validate this hypothesis, further experiments on the nutritional value of *L. chlorophorum* cells are needed.

In our experimental conditions, the exposition of oyster to *L. chlorophorum* did not appear to strongly affect the individual respiration rate during recovery. However, recent field study has reported high TEP concentrations (carbon-rich) inside a GSD and have shown the setting of hypoxia (2.4 mg L^{-1}) following this event (Roux *et al.*, submitted). The authors suggested that bacterial remineralisation might sustain bloom development for more than one month and cause hypoxia, likely contributing to bivalve mortality (Roux *et al.*, submitted). For many benthic invertebrates, the hypoxia threshold is about 2.9 mg L^{-1}

(Herreid, 1980; Rosenberg *et al.*, 1991; Diaz and Rosenberg, 2008). The reduction in feeding activity and oxygen consumption is a commonly observed response to hypoxia in bivalves (Sobral and Widdows, 1997; Hicks and McMahon, 2002). Therefore, an increase in exposure time would provide further information on the potential effect of *L. chlorophorum* through the hypoxia phenomena and its high production of TEP. Nevertheless, we hypothesize that 1) the low clearance rate measured during the recovery phase as well as 2) the potential altered assimilation efficiencies suggested in this study, combined with 3) potential hypoxic effect of a long-lasting GSD, could significantly affect the ecophysiology of cupped oysters in the field. This combined effect may explain oyster's mortalities that have been reported along the French Atlantic coast following GSD events (Sournia *et al.*, 1992; Chapelle *et al.*, 1994; Siano *et al.*, 2020).

5. Conclusion

For the first time, our study demonstrated that the oyster *C. gigas* was able to filter and ingest the cells of *L. chlorophorum*. However, the production of acid glycoconjugates by the digestive tubules suggested that the ingestion of this dinoflagellate could induce an inflammatory response in the digestive system. During the short-term recovery phase, oysters previously exposed to a bloom of *L. chlorophorum* showed a lower clearance rate compared to the control (between 1.4h and 11h) while absorption efficiency was doubled. This increased assimilation during the recovery phase is perhaps a compensation for a decrease that would have occurred during the exposure phase. We formulate the hypothesis that the production of TEP by *L. chlorophorum* represent a harmful effect for the oyster. This negative effect would have a particular relevance especially when a GSD occurs for more than one month in the field. Beyond our experimental results, this observation is supported by the previous hypothesis based on the DEB model, suggesting that oysters could have a low assimilation efficiency for *L. chlorophorum*. However, we cannot exclude that hypoxic conditions that can occur after a bloom, and previously reported in the field, could represent an additional harmful effect on oysters. Therefore, the production of TEP by *L. chlorophorum* could affect oyster ecophysiology through

several hypotheses: 1) assimilation difficulties and clogging of the gills preventing the animal from feeding, 2) physiological weakening of the poorly nourished animals, making them more sensitive to external hazards (pathogens, predation, and hypoxia) or, 3) simply by a large hypoxic effect. To conclude, further *in vitro* and *in situ* experiments on seawater viscosity, nutritional quality of *L. chlorophorum* cells and oyster ecophysiology are needed, through longer exposure times and higher cell concentrations, to confirm these hypotheses. Beyond our specific case, this study could provide an example of how an environmental impact could be addressed by combining approaches measuring both physiological impacts on animals and ecological impacts on the direct environment.

Acknowledgements

This work was carried out in the frame of the PhD of Pauline Roux, financed by Ifremer (project CLOCLO, “éCophysioLOGie de l’huître creuse exposée à *Lepidodinium ChLOrophorum*”) and Region Pays de la Loire (project LEPIDO-PEN [06582 2019]). The authors thank IFREMER PFOM-PI staff for their technical contributions. The authors wish to thank Marianne Alunno-Bruscia for dedicated assistance in the installation of the ecophysiological measurement system, Anne Schmitt for TEP measurements, Claudie Quéré and Valerian Le Roy for biochemical laboratory analysis. We would also like to thank SMIDAP and especially Philippe Glize for the interest and advice given on the project. Pauline Roux, Mathilde Schapira, Hélène Hégaret and Raffaele Siano are part of GDR PHYCOTOX, a CNRS/IFREMER network on Harmful Algal Blooms (<https://www.phycotox.fr/>).

Author contributions statement

Conceptualization, E.F., F.P., M.S., P.R. and R.S.; methodology, E.F., F.P., J.G.C. and H.H.; formal analysis, P.R., K.T. and S.R.; investigation, E.F., I.Q., P.M., P.R., R.S. and S.R.; data curation, P.R. and S.R.; writing-original draft preparation, P.R.; writing-review and editing, E.F., F.P., H.H., J.G.C., M.S., R.S.; visualization, P.R. and S.R.; project administration, E.F. and M.S.; funding acquisition, M.S.

6. Appendix

Table S9. Summary of experimental design. Only the 48h-exposure experiment EXP2 was detailed in this study (in yellow). For the 24h-recovery phase, animals studied in the three exposure experiments were pooled (in yellow). mo.: month; Nb.: number of oysters; L: liter; T°: temperature; Sal.: salinity; O₂: oxygen saturation; [Cells]: cell concentration; [TEP]: TEP concentration; *F_v/F_m*: the maximum quantum efficiency of the photosystem II.

Date	Age (mo.)	Initial biometry (Nb.)	48-h exposure phase (4 feedings per exposure)					Histology 48h (Nb.)	24-h recovery phase	
			Biological and Physicochemical parameters	Feeding regime	Oyster Tank (L)	Nb.	Control Tank (L)		Nb.	Physiology
			EXP1						Run 1	
16/03/21	6	10	T°, Sal., O2, pH and [Cells] : every 30 min for 90 min after each feeding [TEP], Fv/Fm : beginning/end of each feeding	LC-low TL No food	7 7 7	65 65 65	7 7 7		3 3 2	Clearance Respiration Absorption
			EXP2						Run 2	
12/04/21	7	10	T°, Sal., O2, pH and [Cells] : every 10 min for 90 min after each feeding [TEP], Fv/Fm: beginning/end of each feeding	LC-low TL LC-bloom	7 7 7	65 65 65	7 7 7	10 10 10	2 2 4	Clearance Respiration Absorption
			EXP3						Run 3, 4 and 5	
27/04/21	7	5	T°, Sal., O2, pH and [Cells] : every 30 min for 90 min after each feeding Fv/Fm: beginning/end of each feeding	LC-low TL LC-bloom	3.5 3.5 3.5	25 25 25	3.5 3.5 3.5		8 8 8	Clearance Respiration Absorption

Table S10. Initial morphological parameters of the oysters *Crassostrea gigas* (T₀) used for the three exposure experiments (EXP1, EXP2, EXP3). Significant differences were tested by ANOVA test ($P < 0.05$).

Biometry	EXP1	EXP2	EXP3	Significance
T ₀	(N=10)	(N=10)	(N=5)	P-value
Length (mm)	28.8 ± 1.5	34.1 ± 12.0	24.5 ± 2.5	0.646
Width (mm)	23.3 ± 4.7	26.0 ± 9.0	19.8 ± 2.8	0.557
Total weight (g)	2.4 ± 0.6	3.7 ± 2.3	1.7 ± 0.2	0.850
Shell weight (g)	1.8 ± 0.5	2.6 ± 1.6	1.3 ± 0.2	0.750
Wet flesh weight (g)	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.484
Dry flesh weight (g)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.607

Table S11. Summary of the repeated measures ANOVAs on the effect of food regime (LC-bloom, LC-low, TL), time (from 1.4h to 20.6h) and exposure experiment (EXP1, EXP2, EXP3; random) on clearance and respiration rates measured during the 24h-recovery phase.

Source of variation	Dfn	Dfd	F value	P-value
Clearance rate				
Food	2	33	4.43	0.0197
Experiment	2	33	5.71	0.0074
Time	6	181	1.43	0.2056
Food × Time	12	181	4.11	<0.0001
Respiration rate				
Food	2	33	4.98	0.0129
Experiment	2	33	61.00	<0.0001
Time	6	191	5.66	<0.0001
Food × Time	12	191	1.26	0.2467

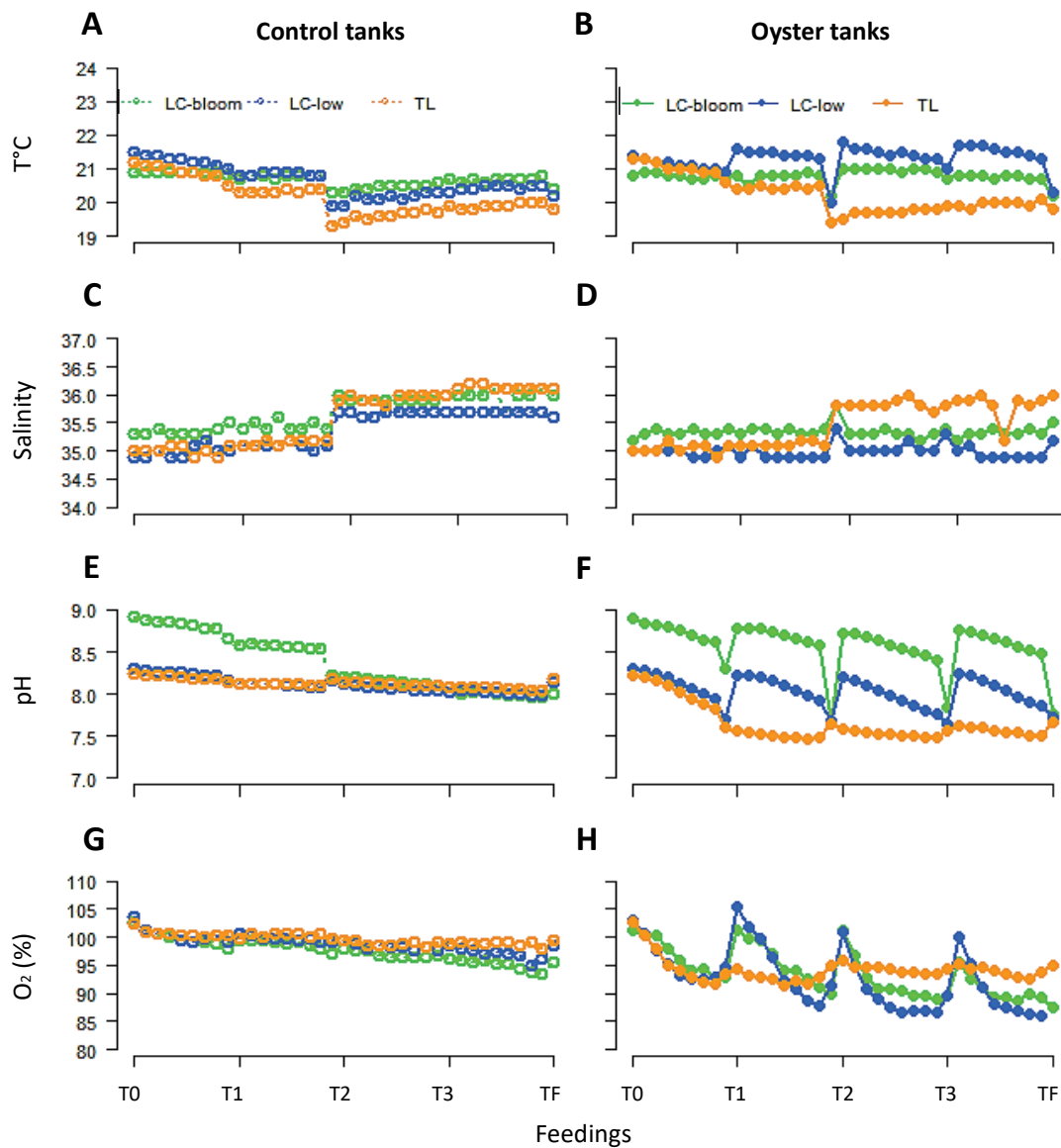


Figure S20. Variations in physicochemical parameters recorded during the 48h-exposure experiment EXP2: temperature (°C; **A, B**), salinity (**C, D**), pH (**E, F**) and oxygen saturation (%; **G, H**) in the control tanks (without oysters; open symbols) and in the oyster tanks (containing oysters; filled symbols). After each feeding (T0=0h, T1=5h, T2=24h, T3=29h), parameters were recorded every 10 min for 90 min. Feeding conditions are represented as follows: *L. chlorophorum* bloom concentration (LC-bloom; green circles), *L. chlorophorum* in low concentration (LC-low; blue circles) and *T. lutea* (TL; orange circles).

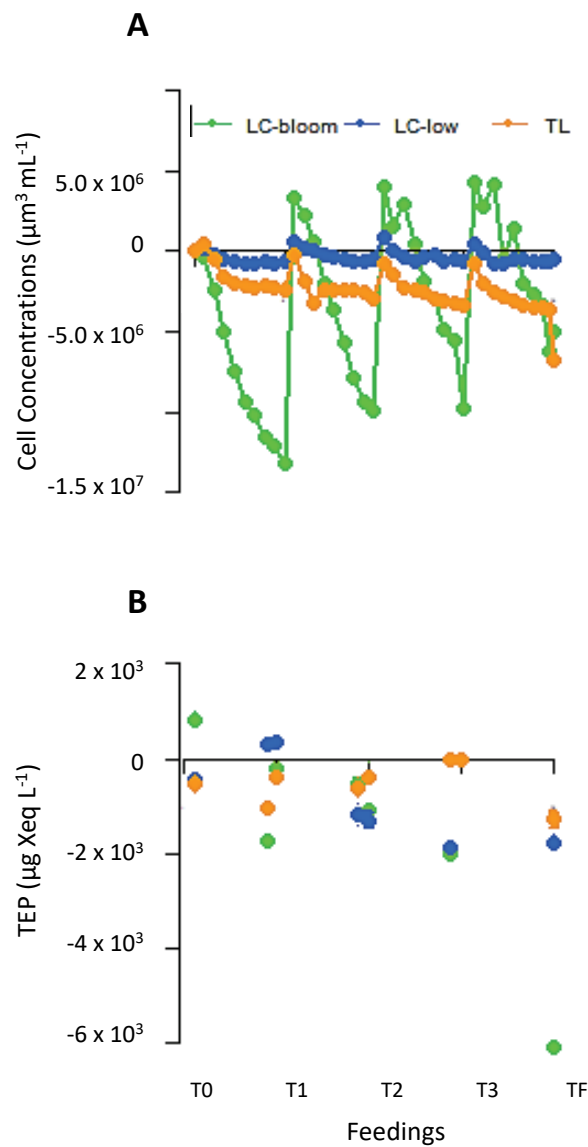


Figure S21. Grazing (G) calculated during the 48h-exposure experiment EXP2: $G = [\text{oyster tank}] - [\text{control tank}]$ (see Figure 36). **(A)** Phytoplankton ($\mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$) and **(B)** TEP concentrations ($\mu\text{g Xeq L}^{-1}$). Cell concentration was recorded every 10 min for 90 min following each feeding (T0=0h, T1=5h, T2=24h, T3=29h) and TEP concentration was measured only at the beginning and end of each feeding. Feeding conditions are represented as follows: *L. chlorophorum* bloom concentration (LC-bloom; green circles), *L. chlorophorum* in low concentration (LC-low; blue circles) and *T. lutea* (TL; orange circles).

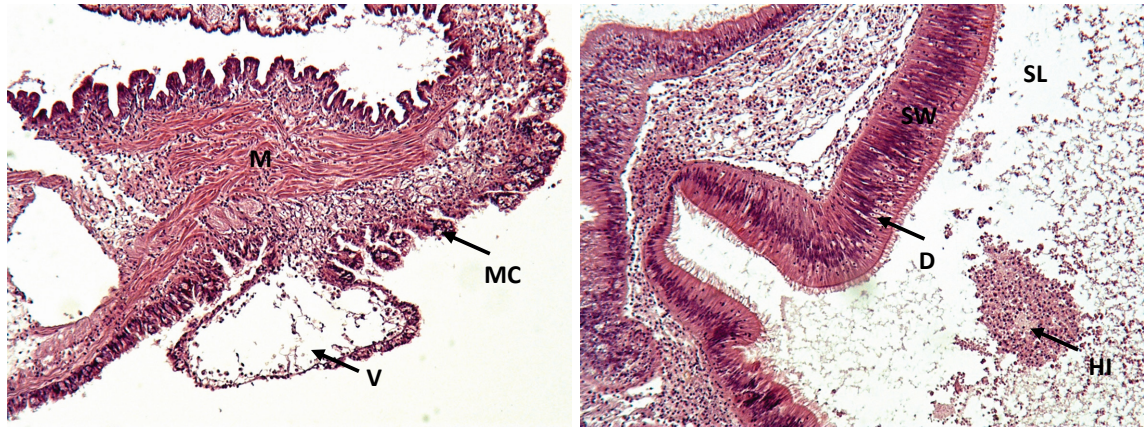


Figure S22. Histological analysis (Hematoxylin-eosin stained slide) of mantle and stomach of *Crassostrea gigas*, exposed to the LC-bloom condition, observed using a light microscope (VivaTome Zeiss Axio Z1). **(A)** Mantle (x100). M: mantle; MC: mucus cell; V: vacuolation of mucus cells. **(B)** Stomach (X100). SW: stomach wall; SL: stomach lumen; D: hemocyte diapedesis; HI: hemocyte aggregation in the lumen of stomach.

Discussion générale et perspectives

Cette thèse de doctorat fournit un premier schéma conceptuel de l'écologie du dinoflagellé *L. chlorophorum* (Figure 40) à travers une approche multidisciplinaire, allant de la biologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème.

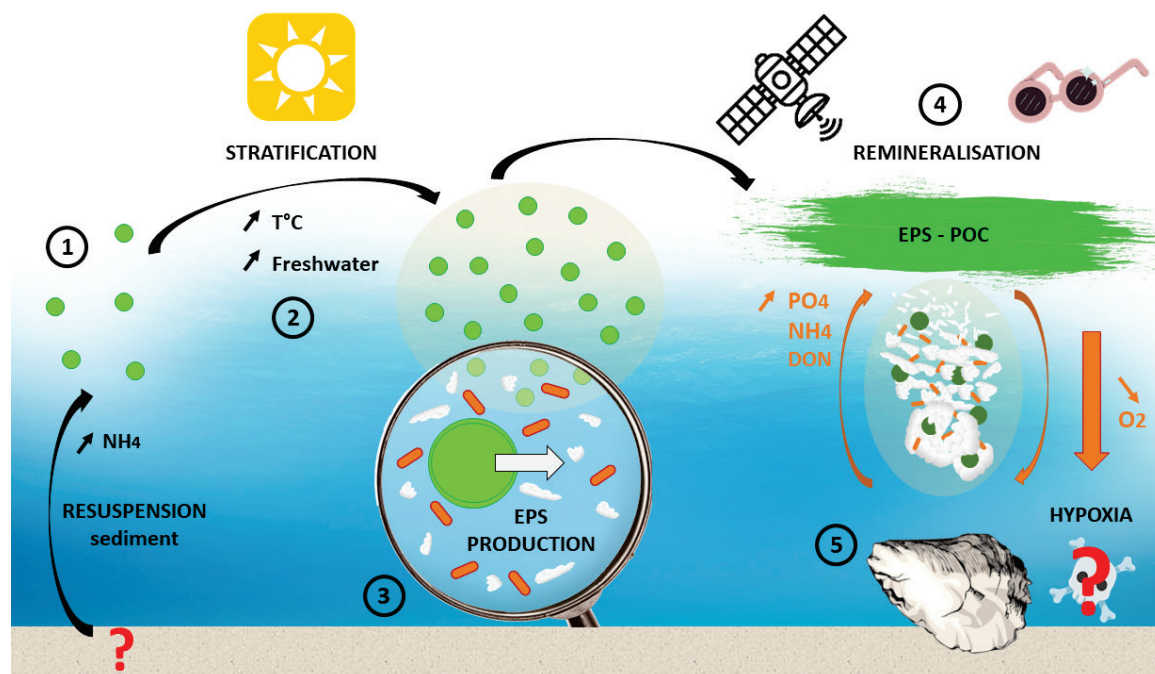


Figure 40. Schéma conceptuel de l'écologie de l'espèce *L. chlorophorum*. **(1)** Apport ponctuel de NH_4 dans la colonne d'eau, provenant notamment de la re-suspension de sédiments, associé à la détection de *L. chlorophorum* dans la colonne d'eau (cellules vertes). **(2)** Conditions estivales marquées par une stratification thermique ($T^\circ\text{C}$) de la colonne d'eau et des apports fluviaux ponctuels en nutriments associés à la prolifération de *L. chlorophorum*. **(3)** Production d'EPS (particules blanches) par *L. chlorophorum* en interaction avec son consortium bactérien (bâtonnets oranges). **(4)** Eau colorée verte due à la prolifération massive de *L. chlorophorum*. Ces événements peuvent être observés à l'œil nu (lunettes ; cf. projet Phénomère) et étudiés par imagerie satellitaire. La matière organique produite lors de cet événement peut sédimenter rapidement vers le fond. Une forte reminéralisation de cette matière organique (EPS – POC) par les bactéries produirait des éléments nutritifs régénérés (PO_4 , NH_4 , DON) nécessaires au maintien de l'efflorescence tout en engendrant une réduction des concentrations en oxygène sur le fond (O_2). **(5)** Phénomènes d'hypoxie post-efflorescence en profondeur pouvant potentiellement impacter la survie des organismes filtreurs marins.

Différents aspects de l'écologie de cette espèce ont été étudiés : (i) le rôle des interactions entre *L. chlorophorum* et son consortium bactérien dans la production d'EPS, (ii) la dynamique d'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*, (iii) la dynamique spatio-temporelle et les conséquences d'une eau colorée verte sur les cycles biogéochimiques, (iv) l'effet potentiel de ce dinoflagellé sur la physiologie de l'huître creuse *C. gigas*. L'originalité de cette thèse repose sur la diversité des approches mises en place pour tenter de mieux comprendre l'écologie de *L. chlorophorum* en couplant

notamment des expérimentations en milieu contrôlé en laboratoire et des campagnes d'échantillonnage sur le terrain, ainsi que des disciplines variées (écophysiologie cellulaire, biogéochimie, chimie organique, télédétection, écologie, génomique environnementale, biologie animale). Les objectifs principaux de ces travaux sont ici discutés dans un cadre plus large afin d'ouvrir sur de nouvelles perspectives de recherche, et permettre d'améliorer nos connaissances sur l'écologie du dinoflagellé nuisible *L. chlorophorum*.

La discussion de cette thèse de doctorat est une synthèse des recherches menées sur le dinoflagellé modèle *L. chlorophorum*. Elle est structurée en suivant le schéma conceptuel proposé en Figure 40.

(1) Apports ponctuels en éléments nutritifs et dynamique d'initiation d'une efflorescence

Forme de résistance

Une multitude de facteurs biotiques et abiotiques peuvent jouer un rôle majeur dans les mécanismes d'initiation des efflorescences de dinoflagellés. En particulier, cette dynamique d'initiation dépend de leur cycle de vie et de leur capacité à produire des kystes de résistance benthiques. En effet, l'inoculum d'une efflorescence de dinoflagellés est généralement issu de cellules ayant germé à partir de kystes de résistance benthiques (Díaz *et al.*, 2018). Ils peuvent constituer des « banques de kystes » au sein des sédiments jouant un rôle majeur dans la spatialité et la récurrence des efflorescences (Anderson, 1997 ; Anderson *et al.*, 2005a, b ; Klouch *et al.*, 2016) en particulier au sein de certaines zones confinées (Genovesi *et al.*, 2009 ; Anglès *et al.*, 2010, 2012 ; Crespo *et al.*, 2011 ; Ní Rathaille and Raine, 2011). Si elles existent pour *L. chlorophorum*, ces banques de kystes pourraient donc être considérées comme des zones à risque. Au sein d'échantillons d'eau de mer, Sournia *et al.* (1992) avaient suggéré la formation de kystes de résistance par *L. chlorophorum*. Cependant, l'existence de ces kystes *in situ* ainsi que leur présence dans les sédiments superficiels de la zone n'a pas été établie à ce jour.

Au cours de cette thèse, l'ADN du genre *Lepidodinium* a été détecté dans la colonne d'eau en période défavorable (automne-hiver) mais également en très faible abondance relative dans les sédiments superficiels (<1% ; cf. Chapitre 2). Dans les sédiments, ce résultat a été confirmé par l'analyse des échantillons en qPCR (cf. Annexe 2). Étant donné qu'aucun kyste de résistance benthique, présentant un morphotype similaire à celui décrit par Sournia *et al.* (1992), n'a été observé dans les sédiments en microscopie et au cours des expériences de germination, nous avons suggéré que les traces d'ADN du genre *Lepidodinium* pourraient correspondre à de l'ADN extracellulaire, issu d'efflorescences antérieures, ayant sédimenté sur le fond (Pietramellara *et al.*, 2009). Ces résultats tendent à montrer que *L. chlorophorum* ne formerait pas de kystes de résistance benthiques, mais que l'espèce pourrait se maintenir dans la colonne d'eau pendant la période défavorable à son efflorescence.

Certaines espèces peuvent en effet passer l'hiver en faibles abondances cellulaires dans la colonne d'eau (<100 cells L⁻¹) (Sogin *et al.*, 2006 ; Record *et al.*, 2021). Par exemple, la formation de kystes benthiques n'a jamais été observée chez certains dinoflagellés appartenant aux genres *Dinophysis* ou *Prorocentrum* (Smayda and Trainer, 2010). Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, ces espèces dites holoplanctoniques ne bénéficient pas de la protection offerte par les kystes de résistance benthiques et dépendent donc d'autres mécanismes de survie. Certaines d'entre elles pourraient alors s'accumuler verticalement dans la colonne d'eau en couches fines (Moita *et al.*, 2006, Velo-Suárez *et al.*, 2008) formant des « banques de kystes pélagiques » (Smayda, 2002a). Ces dernières se développeraient dans des régions où l'énergie cinétique est relativement faible. Cette stratégie, basée sur la population, fournirait donc aux dinoflagellés holoplanctoniques une option de survie et de reproduction (Smayda, 2002). De plus, ce type de kystes temporaires pélagiques présenterait une capacité de germination rapide (Smayda and Trainer, 2010). En l'absence d'observation claire de kystes de résistance benthiques de *L. chlorophorum*, nous avons donc proposé l'hypothèse selon laquelle ce dinoflagellé pourrait évoluer en faibles concentrations dans la colonne d'eau en période défavorable, peut être sous la forme de kystes temporaires pélagiques non mobiles et asexués. Cette hypothèse pourrait contribuer à expliquer la présence régulière de *L. chlorophorum* en Bretagne sud alors que ce dernier est plus rarement observé en

Bretagne nord (cf. Annexe 3). En effet, si des températures plus basses pourraient limiter l'expansion de cette espèce vers la partie nord de la zone (Karasiewicz *et al.*, 2020), les courants de marée et donc l'énergie cinétique y sont également plus importants. Ainsi, les conditions hydrodynamiques en Bretagne nord pourraient être moins favorables à l'établissement de banques de kystes pélagiques et donc à la prolifération de *L. chlorophorum*. Bien que la distribution de *L. chlorophorum* reste relativement mal connue, la formation de kystes pélagiques par cette espèce pourrait potentiellement jouer un rôle dans sa distribution globale notamment via le phénomène de dispersion par les courants ou encore par les eaux de ballast des navires par exemple.

D'autre part, au sein de l'upwelling ibérique, Reguera (2002) a suggéré que *Dinophysis* pourrait produire des « petites cellules » asexuées (« small cells », en anglais) lui permettant de survivre à des conditions environnementales défavorables. Lorsque les conditions redeviennent favorables, ces petites cellules retrouveraient un comportement de nage classique et pourraient réensemencer les populations (Reguera, 2002). La formation de petites cellules a été suggérée chez divers dinoflagellés holoplanctoniques évoluant au sein d'upwellings tels que *Akashiwo sanguinea*, *Karenia mikimotoi*, *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum* (Silva and Faust, 1995). En tant que cellules végétatives résultant d'une diminution successive de taille lors des divisions cellulaires, les petites cellules sont capables de croître de manière accélérée. La formation de petites cellules par *L. chlorophorum* n'a jamais été observée jusqu'à présent. Néanmoins, l'augmentation relativement rapide de l'abondance du genre *Lepidodinium* en automne (cf. Chapitre 2) ne serait pas incompatible avec la formation de petites cellules caractérisées par une croissance accélérée. D'un point de vue écologique, ce comportement présenterait un trait adaptatif différent de la capacité d'hivernage que représente la formation de kystes de résistance benthiques.

Toutefois, certains facteurs environnementaux, comme les conditions nutritives, sont également susceptibles de contrôler la duplication cellulaire et donc l'initiation d'une efflorescence de *L. chlorophorum*.

Éléments nutritifs régénérés

Au cours de cette thèse, une corrélation entre les concentrations en NH_4 et la présence de *L. chlorophorum* dans la colonne d'eau a été mise en évidence à l'échelle saisonnière. En effet, la détection du genre *Lepidodinium* par ADN environnemental en période non-productive (automne-hiver) a été associée à une re-suspension des sédiments ayant enrichi la colonne d'eau en NH_4 (cf. Chapitre 2). De la même manière, en baie de Vilaine, une augmentation des concentrations en NH_4 a été enregistrée en profondeur au début de la période estivale 2019, période précédant l'eau colorée verte à *L. chlorophorum* échantillonnée dans le cadre de cette thèse (cf. Chapitre 3). Cette augmentation de NH_4 pourrait être liée à la reminéralisation d'une efflorescence antérieure, comme suggéré par les concentrations printanières en chlorophylle *a* (cf. Chapitre 3). A petite échelle, cette corrélation a été retrouvée au sein d'une eau colorée verte (cf. Chapitre 3), suggérant qu'un important phénomène de reminéralisation pourrait s'y dérouler. Nous avons donc proposé l'hypothèse selon laquelle un apport ponctuel en NH_4 , qu'il provienne (i) de la re-suspension de sédiments, (ii) de la reminéralisation d'une efflorescence antérieure ou encore (iii) d'apports fluviaux, pourrait favoriser l'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum*.

Par ailleurs, une étude antérieure menée par Iriarte *et al.* (2005) avait mis en évidence l'activité de la glutamine synthétase (GS), l'enzyme principale permettant l'assimilation du NH_4 , au sein d'une efflorescence de *L. chlorophorum* (cité comme *Gymnodinium cf. chlorophorum*). Cette étude avait suggéré que *L. chlorophorum* serait capable d'utiliser le NH_4 *in situ* (Iriarte *et al.*, 2005). A deux échelles d'observation, nos résultats tendent donc à confirmer cette hypothèse. Dans la littérature, il a été reporté que le phytoplancton utiliserait préférentiellement des formes réduites de l'azote (McCarthy, 1980), notamment le NH_4 présentant une structure moins complexe et nécessitant par conséquent moins d'énergie pour être assimilé. En particulier, cette affinité pour le NH_4 est relativement bien documentée chez certains dinoflagellés (*e.g.*, Collos *et al.*, 2007 ; Seeyave *et al.*, 2009 ; Jauzein *et al.*, 2017).

D'un point de vue plus général, la potentielle affinité de *L. chlorophorum* pour le NH_4 pourrait aller dans le sens d'une expansion de cette espèce au sein des zones eutrophisées. De nos jours, les rejets d'eaux usées domestiques et industrielles ainsi que les activités agricoles sont les causes principales de l'enrichissement en nutriments des écosystèmes aquatiques. En particulier, ces rejets sont relativement riches en éléments nutritifs organiques (*e.g.*, urée, acides aminés) ainsi qu'en nutriments inorganiques régénérés tel que le NH_4 . Or, bien que ces rejets soient généralement traités par les stations d'épuration, des débordements peuvent exister sur certaines zones. L'intensification et la multiplication des efflorescences d'espèces phytoplanctoniques toxiques ou nuisibles sont reconnues parmi les symptômes de l'eutrophisation couramment observés à l'échelle globale (Cloern, 2001 ; Heisler *et al.*, 2008 ; Glibert *et al.*, 2011) pouvant conduire à des phénomènes d'hypoxie impactant durablement le fonctionnement des écosystèmes. Si l'affinité de *L. chlorophorum* pour le NH_4 est vérifiée, cette caractéristique physiologique pourrait apporter des éléments de compréhension concernant la récurrence et l'intensification des eaux colorées vertes observées en Bretagne sud au cours des vingt dernières années (Souchu *et al.*, 2018). Il apparaît donc essentiel de vérifier la potentielle affinité de *L. chlorophorum* pour le NH_4 en conditions contrôlées en laboratoire. Dans ce contexte d'eutrophisation des eaux côtières, la question de l'assimilation de la forme azotée que représente l'urée par *L. chlorophorum* peut également être posée. A long terme, ces premiers éléments de compréhension pourraient être potentiellement utilisés pour proposer des mesures de gestion et de prévention des risques liés au développement de *L. chlorophorum* sur les zones touchées.

Cependant, bien que le genre *Lepidodinium* ait été détecté dans la colonne d'eau en période défavorable suite à un apport en NH_4 (cf. Chapitre 2), aucune efflorescence n'a été observée à cette même période (automne-hiver) suggérant qu'un apport ponctuel en NH_4 pourrait favoriser l'initiation d'une efflorescence sans toutefois permettre une prolifération cellulaire accrue. D'autres facteurs environnementaux pourraient donc jouer un rôle majeur dans le développement d'une efflorescence de *L. chlorophorum*.

(2) Conditions physiques favorisant le développement d'une efflorescence

Le suivi saisonnier réalisé en 2019 a permis d'observer une cooccurrence entre le développement des efflorescences de *L. chlorophorum* et la stratification accrue des masses d'eau côtières, à l'instar de ce qui est généralement observé chez les dinoflagellés.

En effet, la stratification de la colonne d'eau est généralement décrite comme un facteur physique essentiel à la prolifération des dinoflagellés (Margalef, 1978 ; Smaya, 2002) qui seraient, à l'inverse, fragilisés par une turbulence accrue. Des études antérieures menées sur l'écologie d'espèces nuisibles ont notamment démontré la prolifération d'*Alexandrium catenella* (Giacobbe et al., 1996; Anderson et al., 2012; Yamamoto et al., 2013; Condie et al., 2019) et de *Dinophysis* sp. (Velo-Suarez et al., 2009; Díaz et al., 2021) au niveau de la pycnocline dans des eaux stratifiées. Au cours de cette thèse, les abondances maximales de *L. chlorophorum* ont été enregistrées en été (cf. Chapitre 3 et Annexe 3). A cette période, (i) l'augmentation de la température des eaux de surface, associée à (ii) des marées de mortes-eaux (*i.e.*, faibles courants de marée) et à (iii) un faible régime de vent, sont susceptibles de favoriser la stratification de la colonne d'eau engendrant la prolifération du dinoflagellé *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 3).

Au cours de ce même suivi saisonnier, les concentrations cellulaires maximales de *L. chlorophorum* ont été observées à la profondeur correspondant au maximum de fluorescence (Fmax). Plus rarement, ce dinoflagellé a également été observé au fond de la colonne d'eau (cf. Chapitre 3). Ces résultats suggèrent que *L. chlorophorum* pourrait réaliser une migration verticale dans la colonne d'eau. En effet, Sourisseau et al., (2016) avaient également enregistré de fortes abondances de *L. chlorophorum* ($< 10^6$ cells L⁻¹ à 25m de profondeur) au niveau de la pycnocline et avaient suggéré que cette espèce pourrait migrer verticalement. Nos données corroborent ces observations. En outre, cette migration verticale pourrait permettre à *L. chlorophorum* d'utiliser des éléments nutritifs localisés à proximité du fond ou au niveau de la pycnocline. En effet, certains dinoflagellés seraient capables de consommer de multiples formes d'azote présentes à différentes profondeurs (Dagenais-Bellefeuille and Morse, 2013 ; Glibert et al., 2016). Or, en baie de

Vilaine, la période estivale est notamment caractérisée par la régénération d'éléments nutritifs provenant des sédiments superficiels (en particulier le NH_4 et le PO_4). Le dinoflagellé *L. chlorophorum* pourrait donc migrer verticalement pour accéder à ces éléments nutritifs. Cette suggestion rejoint l'hypothèse précédemment développée concernant l'importance des formes régénérées de nutriments dans l'initiation des efflorescences de *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 2 et 3). Par ailleurs, d'autres organismes peuvent être présents en profondeur, tels que des nano-flagellés ou des bactéries, attirés par ces conditions nutritives favorables. Si la mixotrophie est vérifiée chez l'espèce *L. chlorophorum* (Liu *et al.*, 2021), ces organismes pourraient représenter des proies consommables par cette espèce. D'autre part, une luminosité trop importante ou encore la présence de prédateurs en surface pourraient également contribuer à expliquer la présence de *L. chlorophorum* en profondeur. Toutefois, la migration verticale n'a jamais été directement observée chez cette espèce. Il est donc possible que *L. chlorophorum* soit simplement « retenu » au niveau de la pycnocline par des phénomènes physiques (*e.g.*, gradient de densité des masses d'eau). Il pourrait ainsi profiter de cette zone caractérisée par une faible turbulence pour proliférer (cf. Chapitre 3). Néanmoins, la stratification de la colonne d'eau, notamment favorisée par (i) le réchauffement des eaux de surface et (ii) les apports ponctuels en eau douce provenant des fleuves, semble représenter un facteur physique majeur contrôlant le développement des efflorescences de *L. chlorophorum*.

A l'échelle globale, il a été suggéré que le réchauffement climatique pourrait favoriser la prolifération des dinoflagellés (*e.g.*, Cheung *et al.*, 2021) et donc potentiellement de *L. chlorophorum*. Bien que ce sujet reste largement débattu au sein de la communauté scientifique, plusieurs études ont mis en évidence un potentiel effet positif du réchauffement sur la prolifération des dinoflagellés (*e.g.*, Xiao *et al.*, 2018 ; Wells *et al.*, 2020). Ces organismes pourraient présenter une grande tolérance physiologique à une large gamme de températures : c'est notamment le cas pour l'espèce eurythermale *L. chlorophorum* (Claquin *et al.*, 2008). La stratification thermique est une autre raison pour laquelle les dinoflagellés peuvent proliférer dans des eaux relativement chaudes (Wells *et al.*, 2020). Lorsque la température atmosphérique augmente, le réchauffement des eaux de surface induit une stratification de la colonne d'eau et une diminution de la disponibilité des nutriments en surface. Dans ces conditions, les dinoflagellés profitent de

leur capacité à migrer verticalement afin d'atteindre les nutriments présents en dessous de la thermocline (Smayda, 2002b ; Ji and Franks, 2007 ; Litchman and Klausmeier, 2008 ; Lin *et al.*, 2018 ; Xiao *et al.*, 2018).

Toutefois, les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* observées en Bretagne sud sont généralement mono-spécifiques suggérant que cette espèce serait plus compétitive que d'autres espèces de dinoflagellé. En conditions estivales, caractérisées par une forte stratification de la colonne d'eau et de faibles concentrations en éléments nutritifs, il est donc probable que *L. chlorophorum* ait développé une stratégie écologique spécifique contribuant à son succès dans l'environnement.

(3) Production de substances polymériques extracellulaires au sein d'une efflorescence : un avantage écologique

Au sein des écosystèmes marins, la présence d'EPS est principalement due à l'activité biologique. Ces substances peuvent être libérées par les cellules phytoplanctoniques (*e.g.*, Passow, 2002 ; Underwood *et al.*, 2004 ; Claquin *et al.*, 2008), mais également par les bactéries métaboliquement actives (*e.g.*, Grossart, 1999 ; Stoderegger and Herndl, 1999 ; Passow, 2002 ; Ortega-Retuerta *et al.*, 2010), les macro-algues (*e.g.* Ramaiah *et al.*, 2001), certains bivalves (*e.g.*, McKee *et al.*, 2005) ou lors de la lyse cellulaire suite à une dégradation bactérienne, une infection virale ou le broutage par des prédateurs (*e.g.*, Baldi *et al.*, 1997 ; Shibata *et al.*, 1997). Concernant le phytoplancton, il a été suggéré qu'une part non négligeable du carbone fixé par photosynthèse ne serait pas intégrée dans les composés structurels, fonctionnels ou de réserve des cellules, mais serait excrétée sous forme de substances dissoutes riches en polysaccharides (Passow, 2002 ; Underwood *et al.*, 2004 ; Wotton, 2004). Néanmoins, toutes les espèces phytoplanctoniques ne produisent pas d'EPS et les quantités produites présentent une forte variabilité inter-espèce.

Production accrue d'EPS par L. chlorophorum

Au cours de nos expérimentations en laboratoire, les concentrations en TEP (fraction particulaire des EPS) mesurées dans les cultures de trois souches de *L. chlorophorum* étaient largement plus importantes que les valeurs reportées dans la littérature pour d'autres micro-algues marines (cf. Table 3 ; Chapitre 1). Les trois souches testées ayant été isolées dans des zones géographiques différentes, ceci suggère que la production de TEP par *L. chlorophorum* serait un trait biologique caractéristique de cette espèce. Par ailleurs, ce résultat corrobore les observations de Claquin *et al.* (2008) qui avaient mesuré des concentrations en TEP jusqu'à 10 fois plus élevées dans les cultures non-axéniques de *L. chlorophorum* que dans les cultures de 7 autres espèces phytoplanctoniques. Ces fortes concentrations en TEP mesurées en culture (cf. Chapitre 1) ont été vérifiées au sein d'une eau colorée verte (cf. Chapitre 3). En effet, les concentrations en TEP mesurées sur le terrain étaient du même ordre de grandeur que celles mesurées en culture ($\times 10^4 \mu\text{g eqX L}^{-1}$) pour des concentrations cellulaires similaires ($\times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$). En milieu marin, les TEP et leurs précurseurs ont été observés dans une large diversité d'écosystèmes allant de l'océan ouvert (*e.g.*, Nosaka *et al.*, 2017) aux zones estuariennes (*e.g.*, Wetz *et al.*, 2009 ; Morelle *et al.*, 2017). Les concentrations les plus importantes sont généralement associées à des proliférations phytoplanctoniques (Riebesell *et al.*, 1995 ; Grossart *et al.*, 1997 ; Hong, 1997 ; Mari and Burd, 1998 ; Passow, 2002). A l'échelle mondiale, leurs concentrations sont très variables avec des valeurs reportées dans la littérature allant jusqu'à $14\,800 \mu\text{g eqX L}^{-1}$ (*e.g.* ; Radic *et al.*, 2005), confirmant que les concentrations en TEP mesurées au sein de l'eau colorée verte échantillonnée figuraient bien parmi les concentrations les plus importantes mesurées en milieu marin (cf. Chapitre 3).

Par ailleurs, nous avons pu montrer que *L. chlorophorum* était le principal producteur de TEP. En effet, des expériences en conditions contrôlées ont mis en évidence des concentrations en TEP similaires dans des cultures non-axéniques et pseudo-axéniques (cf. Chapitre 1). Des études antérieures menées en cultures vont dans le même sens, suggérant que les organismes phytoplanctoniques seraient l'une des principales sources de TEP en milieu marin (Kiorboe and Hansen, 1993 ; Passow and Alldredge, 1994 ;

Passow, 2002). La recherche infructueuse de bactéries productrices d'exo-polysaccharides (*i.e.*, précurseurs des TEP) au sein des consortiums bactériens isolés à partir des trois souches de *L. chlorophorum* étudiées (cf. Annexe 1) ainsi que la mise en évidence de la production d'exo-polysaccharides par *L. chlorophorum* tendent à renforcer cette hypothèse. En effet, en culture (cf. Chapitre 1) comme au sein d'une eau colorée verte sur le terrain (cf. Chapitre 3), la présence d'un exo-polysaccharide sulfaté principalement composé de galactose a été observée. Dans la littérature, la production de ce type d'exo-polysaccharide est relativement bien documentée chez les dinoflagellés (Hasui *et al.*, 1995 ; Yim *et al.*, 2007 ; Mandal *et al.*, 2011). Cette caractéristique pourrait donc représenter un trait biologique commun au sein des dinoflagellés. Dans l'environnement, la composition des exo-polysaccharides est notamment connue pour contrôler la formation d'agrégats (Passow, 2002) et donc de TEP. D'un point de vue écologique, la composition des exo-polysaccharides pourrait influencer les processus de dégradation de la matière organique et donc potentiellement impacter le fonctionnement des écosystèmes côtiers. Dans ce contexte, plusieurs hypothèses pourraient contribuer à expliquer (i) pourquoi les cellules de *L. chlorophorum* alloueraient-elles une part importante de leur carbone fixé par photosynthèse à la production d'EPS, et (ii) si une telle production pourrait conférer un avantage écologique à cette espèce.

Réponse à un stress nutritif

La production d'EPS est couramment décrite comme une réponse des cellules phytoplanctoniques à un stress nutritif (Alldredge *et al.*, 1993 ; Staats *et al.*, 2000 ; Passow, 2002). En particulier, la production de TEP par le phytoplancton a été associée à une limitation en DIN dans l'environnement (Corzo *et al.*, 2000 ; Beauvais *et al.*, 2003 ; Deng *et al.*, 2016) ou à un fort rapport DIN/DIP (Mari *et al.*, 2005). Une étude récente, menée via des incubations *in situ*, a mis en évidence une surproduction de TEP par *L. chlorophorum* lors de limitations en DIN ou DIP (Serre-Fredj *et al.*, 2021). Les TEP étant considérées comme un débordement de carbone, cette surproduction serait physiologiquement cohérente. En effet, les stress nutritionnels ne permettent pas une assimilation correcte

du carbone dans les différentes voies métaboliques. Le carbone peut donc être accumulé sous forme d'hydrates de carbone dont une partie peut être excrétée sous la forme d'exopolysaccharides (Serre-Fredj *et al.*, 2021). Toutefois, bien qu'aucune limitation en nutriments n'ait été testée au cours de nos expérimentations en laboratoire, des concentrations importantes en TEP ont été mesurées dans les cultures de *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 1). La production d'EPS par cette espèce ne serait donc pas uniquement liée à un stress nutritif. Des expérimentations sur des cultures monospécifiques axéniques pourraient être menées en condition de stress nutritif afin d'évaluer si les cellules de *L. chlorophorum* produiraient davantage d'EPS.

Par ailleurs, l'échantillonnage mené au cœur d'une eau colorée verte a confirmé la présence d'une grande quantité de TEP associée à des concentrations plus élevées en NH_4 et PO_4 à l'intérieur de l'eau colorée verte par rapport à celles mesurées à l'extérieur. Ces résultats suggèrent qu'un important phénomène de reminéralisation bactérienne pourrait s'y dérouler (cf. Chapitre 3). Lorsque les concentrations en éléments nutritifs sont faibles dans la colonne d'eau en période estivale, la production accrue d'EPS par *L. chlorophorum* pourrait représenter un avantage écologique pour cette espèce en créant un microenvironnement riche en matière organique et donc favorable au développement bactérien (Alldredge and Gotschalkt, 1989; Schapira *et al.*, 2012a, b). En effet, la reminéralisation bactérienne pourrait fournir des éléments nutritifs régénérés permettant à l'efflorescence de « s'auto-alimenter ». Cette hypothèse est en partie corroborée par les données obtenues en culture montrant une forte corrélation entre la présence de bactéries et les concentrations en NH_4 (cf. Chapitre 1). D'un point de vue écologique, cette production accrue d'EPS pourrait donc être considérée comme une réponse physiologique des cellules face à des concentrations en nutriments limitées dans le milieu, confortant ainsi l'hypothèse proposée par Serre-Fredj *et al.* (2021).

Protection contre des composés algicides

Par ailleurs, bien que *L. chlorophorum* ait été identifié comme étant le principal producteur de TEP dans nos conditions de culture non-limitantes, la présence de bactéries a induit une réduction du taux de croissance des cellules de *L. chlorophorum* associée à une surproduction de TEP (cf. Chapitre 1). Il a été reporté par la littérature que la production accrue d'EPS par les organismes phytoplanctoniques pourrait permettre aux cellules de se protéger contre des substances toxiques (Xiao and Zheng, 2016). En effet, des études antérieures ont suggéré que la production de molécules algicides par certaines bactéries pourrait avoir un effet néfaste sur la physiologie des micro-algues (Li *et al.*, 2015, 2016 ; Lu *et al.*, 2016). L'absence de thèque chez *L. chlorophorum* pourrait le rendre plus vulnérable face aux composés algicides, à l'instar de ce qui a été montré chez d'autres dinoflagellés « nus » (Lovejoy *et al.*, 1998). Si la production d'EPS par cette espèce pourrait lui permettre de « cultiver » certaines bactéries bénéfiques dans son environnement proche et donc de favoriser la production d'éléments nutritifs régénérés par reminéralisation (cf. Chapitre 3), ces EPS pourraient également protéger les cellules de *L. chlorophorum* face à des composés algicides présents dans l'environnement (Xiao and Zheng, 2016 ; cf. Chapitre 1).

Modification des processus écologiques à micro-échelle

L'abondance des TEP et de leurs précurseurs (*i.e.*, exo-polysaccharides) dans la colonne d'eau peut modifier la viscosité de l'eau de mer (Jenkinson, 1986). La viscosité est considérée comme la propriété fondamentale d'un fluide permettant de définir les plus petites échelles d'espace susceptibles d'influencer les micro-organismes aquatiques. Si la viscosité a longtemps été considérée comme essentiellement contrôlée par la température (Miyake and Koizumi, 1948), des travaux récents ont montré que les EPS produits par le phytoplancton pouvaient augmenter la viscosité de l'eau de mer (*e.g.*, Jenkinson, 1986 ; Jenkinson and Biddanda, 1995 ; Seuront *et al.*, 2006, 2007, 2010 ;

Kesaulya *et al.*, 2008 ; Seuront and Vincent, 2008). Or, la viscosité contrôle les processus hydrodynamiques caractéristiques de la micro-échelle, qui est l'échelle à laquelle se déroule la majeure partie des processus écologiques tels que l'infection virale (Fuhrman, 1999), l'absorption de nutriments (Karp-Boss *et al.*, 1996, Blackburn *et al.*, 1998), la formation d'agrégats (Kiørboe *et al.*, 2001) et les interactions proies-prédateurs (Gerritsen and Strickler, 1977). Ces modifications de la viscosité de l'eau de mer pourraient par ailleurs avoir un impact significatif sur la prise de nourriture, sa disponibilité et/ou le colmatage des branchies chez les bivalves filtreurs (*e.g.* Riisgard and Larsen, 2007 ; Larsen and Riisgard, 2009). En ce sens, la production accrue d'EPS par *L. chlorophorum* pourrait lui conférer un avantage écologique.

Si aucune modification de viscosité n'a été observée dans les cultures de trois souches de *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 1), différents facteurs environnementaux (*e.g.*, température, turbulence) interagissent avec les EPS en milieu naturel, et peuvent engendrer une modification de viscosité (Schuster and Herndl, 1995; Stoderegger and Herndl, 1999 ; Passow, 2000 ; Simon *et al.*, 2014). Or, ces paramètres n'ont pas pu être reproduits en laboratoire. L'existence d'une modification significative de la viscosité de l'eau de mer au sein d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* où les concentrations en TEP sont très importantes, ne doit donc pas être exclue (Seuront *et al.*, 2006). En raison de contraintes matérielles et logistiques, aucune mesure de viscosité n'a pu être effectuée en milieu naturel au cours de cette thèse. Ces mesures seront cependant nécessaires pour mieux comprendre les modifications environnementales engendrées par les efflorescences de *L. chlorophorum* et leurs potentielles conséquences sur l'écosystème.

En milieu naturel, il n'est pas exclu que la production d'EPS puisse jouer divers rôles écologiques combinés : (i) protection des cellules de *L. chlorophorum* face à de potentiels composés toxiques, (ii) réponse physiologique face à un stress nutritif et, (iii) modification des processus écologiques à micro-échelle notamment des relations proies-prédateurs. Si le rôle écologique de la formation d'EPS par *L. chlorophorum* n'a pas pu être complètement élucidé, ces premiers résultats suggèrent le rôle essentiel de la production d'EPS dans le succès de *L. chlorophorum* et dans le maintien des eaux colorées vertes.

(4) Reminéralisation et maintien dans le temps d'une efflorescence

Reminéralisation bactérienne

Comme exposé précédemment, la production en grande quantité d'EPS, riches en matière organique, lors d'une efflorescence verte de *L. chlorophorum* pourrait engendrer la formation de microenvironnements favorables au développement bactérien. Ce développement bactérien pourrait alors accentuer le processus de reminéralisation de la matière organique et donc produire des éléments nutritifs régénérés susceptibles d'être utilisés par *L. chlorophorum*. En effet, au sein de la boucle microbienne, les substances extracellulaires libérées dans l'environnement par l'action de broutage ou par sécrétion du phytoplancton peuvent être utilisées pour la respiration bactérienne (Azam *et al.*, 1983 ; Sherr and Sherr, 1994 ; Khodse and Bhosle, 2011) produisant ainsi du CO₂ et des éléments nutritifs régénérés tels que le NH₄ et le PO₄. En baie de Vilaine, les concentrations en NH₄ et PO₄ étaient bien plus importantes au cœur de l'eau colorée verte qu'à l'extérieur de cette dernière (cf. Chapitre 3). De plus, nous avons montré que, en conditions de culture en laboratoire, la présence de bactéries pouvait induire une réduction du taux de croissance de *L. chlorophorum* tout en engendrant une surproduction de TEP par ce dinoflagellé (cf. Chapitre 1). D'un point de vue écologique, la croissance de *L. chlorophorum* pourrait donc être limitée au profit d'une production accrue d'EPS afin d'attirer les bactéries et donc de favoriser la reminéralisation bactérienne au sein de son efflorescence. Afin de valider cette hypothèse, il sera cependant nécessaire d'étudier les communautés bactériennes présentes au sein d'une efflorescence *in situ*, que ce soit en terme d'abondance, de composition mais aussi d'activités enzymatiques.

Toutefois, le microenvironnement riche en matière organique mis en place au sein d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* peut attirer différents types d'organismes faisant partie intégrante de la boucle microbienne. En effet, il a été reporté dans la littérature que les TEP seraient colonisés par des bactéries mais également par des protozoaires, du phytoplancton et des métazoaires dont les concentrations pourraient

être 100 à 10 000 fois plus élevées au sein de ces agrégats que dans le milieu environnant (Simon *et al.*, 2002 ; Lyons *et al.*, 2007 ; Shapiro *et al.*, 2014). Or, comme pour d'autres dinoflagellés, il a été suggéré que le genre *Lepidodinium* pourrait être mixotrophe (Hansen and Moestrup, 2005 ; Ng *et al.*, 2017 ; Liu *et al.*, 2021). Si la mixotrophie est vérifiée chez l'espèce *L. chlorophorum*, cette dernière pourrait alors consommer des organismes hétérotrophes, tels que des nano-flagellés par exemple, et ainsi participer à la production de NH_4 au sein de l'eau colorée.

Néanmoins, à petite échelle, une boucle microbienne intense pourrait permettre aux eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* de se maintenir dans le temps (i) en produisant des éléments nutritifs régénérés utilisés par *L. chlorophorum* mais également (ii) en favorisant la concentration de petits flagellés que *L. chlorophorum* pourrait consommer.

Dynamique spatio-temporelle

Au cours de cette thèse, le déploiement de différentes méthodes de détection a permis de mieux appréhender la dynamique saisonnière de *L. chlorophorum*. En particulier, le suivi réalisé par microscopie optique en 2019 a confirmé la présence de l'espèce *L. chlorophorum* entre mai et novembre dans la colonne d'eau, corroborant ainsi les observations réalisées dans le cadre du réseau de surveillance REPHY (Belin and Soudant, 2018) (cf. Chapitre 3 ; Annexe 3). Cependant, cette stratégie d'échantillonnage, réalisée à marée haute, sur des stations fixes et à pas de temps réguliers, n'a pas pu capturer toute la dynamique spatio-temporelle des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum*. En effet, en période estivale, les concentrations maximales observées sur les stations échantillonnées étaient de l'ordre de 10^5 cells L^{-1} alors que les eaux colorées vertes observées sur la zone à cette même période pouvaient atteindre 10^6 cells L^{-1} . Ces observations mettent en évidence à quel point les eaux colorées vertes peuvent être fugaces et très localisées. Les recensements réalisés dans le cadre du projet de science participative Phénomex (Siano *et al.*, 2020), associés à l'étude de données satellitaires, ont contribué à la détection précoce des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* en dehors des stations fixes suivies par le réseau de surveillance REPHY. Ces méthodes de détection

ont ainsi permis de compléter les rares informations disponibles concernant la dynamique spatio-temporelle de ces événements.

Les données satellitaires ont notamment mis en évidence le rôle majeur des courants de marée sur la dynamique spatio-temporelle de ces efflorescences (cf. Chapitre 3). En effet, il est apparu que la surface d'une eau colorée verte pouvait évoluer dans le temps en fonction des courants de marée, conditionnant ainsi les zones potentiellement impactées. Par ailleurs, dans des conditions hydrodynamiques calmes (*i.e.*, stratification, marée de morte-eau, faible régime de vent), les images satellitaires ont montré qu'une eau colorée verte pouvait se maintenir pendant plus d'un mois et s'étendre sur plusieurs km² (13 km² ; cf. Chapitre 3). Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle la production d'EPS au sein d'une efflorescence de *L. chlorophorum* pourrait permettre à cette dernière de se maintenir dans le temps (cf. Chapitre 3). Les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* étant suspectées d'accentuer les épisodes d'hypoxie (Sournia *et al.*, 1992 ; Siano *et al.*, 2020), ces nouvelles informations suggèrent que les zones touchées pourraient être relativement larges. En baie de Vilaine, des hypoxies accrues pourraient avoir des conséquences majeures sur le fonctionnement des écosystèmes côtiers en impactant notamment les coquillages cultivés au sein des parcs conchylicoles de la zone (Rossignol-Strick *et al.*, 1985 ; Sournia *et al.*, 1992 ; Chapelle *et al.*, 1994).

(5) Impact sur l'écosystème et sur les ressources aquacoles

Les eaux colorées peuvent avoir un effet négatif sur le tourisme (Zingone and Enevolden, 2000) et sur le fonctionnement des écosystèmes. Depuis les années 1990, des mortalités d'organismes marins sont régulièrement recensées en Bretagne sud à la suite d'eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* (Sournia *et al.*, 1992 ; Chapelle *et al.*, 1994 ; Siano *et al.*, 2020). Il a été suggéré que ces mortalités pourraient être dues à des conditions hypoxiques/anoxiques post-efflorescence. La spécificité de ce dinoflagellé réside dans sa capacité à produire des EPS susceptibles : (i) d'accentuer les épisodes d'hypoxie, et/ou (ii) d'impacter directement la physiologie des bivalves filtreurs. Au cours de cette thèse, l'effet potentiel d'une efflorescence de *L. chlorophorum* a été évalué sur un modèle biologique

caractéristique de la zone de Bretagne sud : l’huître creuse *C. gigas*, espèce clé de l’économie française.

Filtration, ingestion et assimilation

A l’échelle de l’individu, des expérimentations ont été réalisées en conditions contrôlées afin d’étudier les conséquences d’une exposition à *L. chlorophorum* sur la physiologie de *C. gigas*. Dans les conditions testées, nos résultats montrent que *L. chlorophorum* serait filtré et ingéré par cette dernière (cf. Chapitre 4). Toutefois, ces expérimentations ont été limitées par les volumes de culture de *L. chlorophorum* disponibles, ne permettant que des temps d’exposition relativement courts (48h en nourrissages séquentiels ; cf. Chapitre 4) par rapport à ce que l’on peut observer sur le terrain (*i.e.*, plus d’un mois ; cf. Chapitre 3). De plus, comme pour les expérimentations réalisées sur les cultures de *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 1), ces expositions ont été menées en milieu contrôlé donc en absence de turbulence et de courants de marée. Or, ces paramètres physiques peuvent être impliqués dans les processus de coagulation des exo-polysaccharides et donc dans la formation des TEP (Schuster and Herndl, 1995; Stoderegger and Herndl, 1999 ; Passow, 2000) susceptibles de modifier la viscosité de l’eau de mer *in situ*. De telles modifications de la viscosité pourraient impacter le comportement de filtration de l’huître *C. gigas*, comme démontré pour la moule *Mytilus edulis* (Riisgård and Larsen, 2007). En milieu naturel, la coagulation de TEP peut également engendrer une modification de la taille des particules et donc des cellules de *L. chlorophorum*. L’huître creuse *C. gigas* étant capable de filtrer des particules appartenant à un spectre de taille défini (2-30 μm ; Barillé *et al.*, 2003), la gangue de mucus entourant les cellules de *L. chlorophorum* sur le terrain pourrait augmenter leur volume cellulaire et donc les faire sortir de ce spectre de taille (Passow *et al.*, 2001). En l’état, ces résultats sont donc difficilement transposables aux conditions environnementales. Néanmoins, l’ingestion des cellules de *L. chlorophorum* pourrait engendrer la production de composés glycoconjugués acides par les tubules digestifs de l’huître, suggérant un impact négatif de la filtration de *L. chlorophorum* sur le système digestif de cette dernière (Izzetoğlu *et al.*,

2014; Martins *et al.*, 2014; Dezfuli *et al.*, 2016; Ghosh, 2020). Dans la littérature, il a été démontré que certaines espèces de dinoflagellés produisant des polysaccharides extracellulaires pouvaient induire une réponse inflammatoire des tissus de coquillages : c'est notamment le cas du dinoflagellé *Cochlodinium polykrikoides* (Gobler *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les résultats obtenus lors de la phase de récupération des huîtres indiquent qu'une exposition à *L. chlorophorum* pourrait avoir un effet négatif sur la physiologie de l'huître à court terme. En effet, les huîtres préalablement exposées à *L. chlorophorum* ont présenté un taux de filtration individuel significativement plus faible que les huîtres témoins (cf. Chapitre 4). Des études antérieures ont notamment montré une diminution du taux de filtration de l'huître *C. virginica* lorsqu'elle est exposée à *Aureoumbra lagunensis* (pélagophyceae), espèce connue pour excréter des exopolymères (Gobler *et al.*, 2013 ; Galimany *et al.*, 2017). Comme démontré par Riisgård and Larsen (2007), le caractère « collant » des exo-polymères pourrait inhiber l'activité des cils et ainsi affecter le transport des particules vers la bouche (Galimany *et al.*, 2017). De plus, au sein de notre étude, une efficacité d'assimilation deux fois plus élevée a été mesurée chez les huîtres préalablement exposées à *L. chlorophorum* par rapport aux huîtres témoins. De manière spéculative, nous avons suggéré que cette assimilation accrue observée en phase de récupération pourrait être un mécanisme de compensation en réponse à une plus faible assimilation au cours de la phase d'exposition à *L. chlorophorum*. Les cellules de *L. chlorophorum* pourraient donc être filtrées, ingérées mais seraient potentiellement mal assimilées. Cette observation corrobore les résultats obtenus par le modèle DEB suggérant que l'huître aurait une faible capacité à assimiler *L. chlorophorum* (Bourlès *et al.*, 2009; Alunno-Bruscia *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016). Toutefois, en milieu naturel, il n'est pas exclu que des phénomènes d'hypoxie post-efflorescence puissent également contribuer aux épisodes de mortalités régulièrement observés en Bretagne sud.

Hypoxies post-efflorescences

A la suite d'une eau colorée verte, des épisodes d'hypoxie ($< 2,9 \text{ mg L}^{-1}$; Diaz and Rosenberg (2008)) ont été mesurés en juillet 2019 à proximité du fond au large de la baie de Vilaine (cf. Chapitre 3) et sur le site côtier de Penbé (cf. Annexe 4). Or, en cultures non-axéniques, le pourcentage de carbone fixé par les cellules de *L. chlorophorum* et excrété sous la forme de TEP représentait 62 à 76% (cf. Chapitre 1). Cette estimation est similaire à celle de Claquin *et al.* (2008) qui avaient estimé que 70,8% du carbone fixé par les cellules de *L. chlorophorum* en cultures non-axéniques était excrété sous la forme de TEP. Au cœur d'une eau colorée verte, les TEP représentaient également jusqu'à 89% du carbone particulaire (cf. Chapitre 3), contribuant donc de manière significative au pool de carbone produit. Dans les systèmes estuariens, les TEP et le phytoplancton ont été identifiés comme les principaux contributeurs au pool de carbone (41 et 54%, respectivement) pouvant ainsi influencer de manière significative la diminution de la concentration en oxygène sur le fond via le processus de reminéralisation (*e.g.*, Annane *et al.*, 2015). Cette importante concentration en matière organique présente au sein d'une eau colorée verte pourrait donc accentuer les hypoxies estivales observées en baie de Vilaine (cf. Chapitre 3 et Annexe 4).

Une période d'hypoxie de quelques jours a été observée sur le site côtier de PenBé, suite à l'épisode d'eau colorée verte observé sur ce même site en juillet 2019 (cf. Annexe 4). L'effet des hypoxies sur les organismes benthiques, sessiles ou vagiles, est relativement bien documenté dans la littérature (Thornton, 2002). En effet, il a été démontré que les hypoxies côtières pouvaient considérablement affecter la physiologie et le comportement des organismes benthiques (Rosenberg *et al.*, 1991 ; David *et al.*, 2005). Bien que certains organismes, tel que le homard *Homarus gammarus*, pourraient tolérer des concentrations en O_2 dissous comprises entre 0,5 et 1 mg L^{-1} pendant plusieurs jours (Rosenberg *et al.*, 1991), d'autres espèces, telle que la langoustine commune (*Nephrops norvegicus*), pourraient abandonner le sédiment s'exposant ainsi à la prédation (Diaz and Rosenberg, 1995). Les conditions hypoxiques sont notamment connues pour impacter les activités de nutrition et de respiration chez les bivalves (Sobral and Widdows, 1997 ; Hicks and McMahon, 2002). En cas de stress hypoxique, le métabolisme énergétique de l'huître creuse est perturbé (Le Moullac *et al.*, 2007). En effet, il a été démontré que la défense

anti-oxydante et la chaîne respiratoire seraient les principaux processus biologiques régulés à la hausse en conditions hypoxiques, engendrant un stress oxydatif chez *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2010). Par ailleurs, David *et al.* (2005) ont suggéré que le système immunitaire inné de *C. gigas* serait affaibli en cas d'hypoxie contribuant potentiellement à la mortalité de ces animaux. En outre, des conditions anoxiques pourraient (i) augmenter le risque que l'huître creuse héberge des pathogènes bactériens (Macey *et al.*, 2008) ou encore (ii) faciliter les processus d'infection, par exemple, par la micro-algue *Perkinsus marinus* (Anderson *et al.*, 1998). Bien que *P. marinus* n'ait jamais été observé en Atlantique, il n'est pas exclu que de telles conditions puissent faciliter l'infection de l'huître creuse par d'autres pathogènes, bactéries ou parasites. Au cours de cette thèse, le suivi de croissance mené sur le site de Penbé a montré une réduction significative de l'indice de remplissage des huîtres (*i.e.*, Lawrence and Scott) suite à une eau colorée verte à *L. chlorophorum*. Cependant, nous n'avons pas pu différencier l'impact potentiel de *L. chlorophorum* et l'effet « ponte » des huîtres diploïdes ayant eu lieu à la même période (cf. Annexe 4). Il n'a donc pas été possible de conclure sur un potentiel impact de *L. chlorophorum*, et/ou de l'hypoxie observée, sur la croissance des huîtres creuses *in situ*. La mise en place d'un nouveau suivi d'huîtres triploïdes, en relation étroite avec les ostréiculteurs de la zone d'étude, apparaît indispensable pour mieux évaluer les impacts écologiques et économiques liés aux efflorescences de *L. chlorophorum*.

De manière plus générale, l'impact de l'hypoxie sur la biocénose dépend de la durée, de l'étendue et de la sévérité des événements hypoxiques (Gray *et al.*, 2002, Wu, 2002, Levin *et al.*, 2009). Les effets se font ressentir à différentes échelles allant du moléculaire à l'écosystémique (Wu, 2002). L'ensemble des réponses des organismes à l'hypoxie, se traduit au niveau écosystémique par la disparition temporaire ou définitive des espèces les plus sensibles (Utne-Palm *et al.*, 2010), entraînant des altérations des réseaux trophiques (Breitburg *et al.*, 1997) et des cycles biogéochimiques (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2010). Dans le contexte de pressions anthropiques croissantes et du changement climatique global, les hypoxies estivales favorisées par les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* pourraient donc impacter durablement l'écosystème dans son ensemble et *in fine* fragiliser les services écosystémiques et usages fournis par la zone côtière (*e.g.*, pêche, aquaculture etc.).

La production accrue de TEP par *L. chlorophorum* pourrait donc affecter la physiologie de l'huître à travers plusieurs hypothèses potentiellement combinées en milieu naturel. L'huître creuse pourrait présenter des difficultés à assimiler les cellules de *L. chlorophorum* ou ses branchies pourraient être colmatées par les TEP empêchant ainsi l'animal de se nourrir (cf. Chapitre 4). Un affaiblissement physiologique de l'huître mal nourrie, pourrait également la rendre plus sensible aux dangers extérieurs (*e.g.* prédation, agents pathogènes). De surcroît, les TEP peuvent piéger un grand nombre de particules virales et augmentent donc le risque de contamination des bivalves par des pathogènes de taille nanométrique (Hanley *et al.*, 2018). De par leur propriété « collante », les TEP peuvent également contribuer à la formation d'agglomérats de micro-plastiques (Summers *et al.*, 2018), pouvant eux-mêmes modifier le comportement d'alimentation et perturber les processus de reproduction chez *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2010). Enfin, une hypoxie accrue liée à la production d'une grande quantité de TEP par *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 1 et 3) pourrait également affecter la physiologie de *C. gigas*. Par ailleurs, les eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* pouvant se maintenir sur une longue période (cf. Chapitre 3), ces effets délétères combinés pourraient significativement impacter la survie des huîtres creuses. Des expériences complémentaires permettant de tester des temps d'exposition plus longs et des concentrations cellulaires plus élevées apparaissent cependant nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

Conclusions

Cette thèse fournit un premier schéma conceptuel de l'écologie de *L. chlorophorum* (Figure 40). Plus spécifiquement, les propriétés écologiques d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* ont été étudiées à travers différentes approches allant de la physiologie cellulaire de l'espèce à son impact sur l'écosystème.

Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence que :

- *L. chlorophorum* pourrait être une espèce holoplanctonique ne formant donc pas de kystes de résistance benthiques. Il pourrait se maintenir dans la colonne d'eau pendant la période défavorable (automne-hiver) (i) en faibles concentrations cellulaires, (ii) sous la forme de kystes temporaires pélagiques, ou encore (iii) sous la forme de « small cells », non contraintes par des conditions de germination spécifiques et présentant donc une capacité de prolifération accélérée lorsque les conditions redeviennent favorables.
- *L. chlorophorum* pourrait présenter une forte affinité pour le NH_4 . En effet, des corrélations positives entre les concentrations cellulaires en *L. chlorophorum* et les concentrations en NH_4 dans le milieu naturel ont été observées à petite- et méso-échelles. Des apports ponctuels en éléments nutritifs régénérés tels que le NH_4 et le PO_4 via (i) les fleuves, les rivières ou les rejets anthropiques (à la côte et/ou en mer); (ii) la re-suspension de sédiments ou (iii) la reminéralisation d'une efflorescence antérieure, pourraient donc favoriser le développement des efflorescences de *L. chlorophorum*.
- Les efflorescences de *L. chlorophorum* sont conditionnées par la stratification de la colonne d'eau en période estivale. Sur la zone d'étude, cette stratification pourrait être favorisée par (i) le réchauffement des eaux de surface ; (ii) les périodes de mortes-eaux ; (iii) les faibles régimes de vent. Dans ces conditions, les images satellites ont permis d'estimer que l'étendue d'une eau colorée verte

pouvait atteindre 13 km², représentant une zone à risque pour les hypoxies relativement large.

- *L. chlorophorum* est bien le principal producteur d'EPS. Il est probable que cette production représente un avantage écologique pour ce dinoflagellé en jouant un rôle de (i) protection contre les prédateurs ou (ii) contre les substances toxiques présentes dans le milieu, et (iii) en créant un microenvironnement riche en matière organique et donc propice au développement bactérien. Ces bactéries peuvent alors reminéraliser la matière organique et fournir des nutriments inorganiques régénérés permettant le maintien d'une efflorescence de *L. chlorophorum* pendant plus d'un mois. Par ailleurs, les résultats acquis mettent en évidence de profondes modifications de l'environnement physico-chimique de la colonne d'eau et suggèrent la formation de micro-habitats au sein des eaux colorées vertes, en lien étroit avec la production d'EPS. De telles modifications de l'écosystème pourraient ainsi modifier les processus écologiques à micro-échelle (*e.g.*, relations proies-prédateurs, disponibilité des nutriments, infection virale). En ce sens, *L. chlorophorum* pourrait être considéré comme une « espèce ingénieur » à l'échelle spatiale et temporelle d'une efflorescence. En effet, en écologie benthique, les espèces ingénieurs sont définies comme des organismes pouvant modifier directement ou indirectement la disponibilité des ressources pour d'autres espèces, en provoquant des changements d'état physique des matériaux biotiques ou abiotiques créant ainsi des habitats (Jones *et al.*, 1994). Chez les organismes phytoplanctoniques, cette hypothèse a déjà été suggérée pour les efflorescences de *Phaeocystis globosa* (Seuront *et al.*, 2007).
- La reminéralisation de la matière organique au sein d'une eau colorée verte pourrait accentuer les phénomènes d'hypoxie. Si aucune surmortalité n'a été observée sur le terrain, des expérimentations *in vitro* ont suggéré que la production d'EPS par *L. chlorophorum* pourrait avoir un effet négatif sur la physiologie de l'huître creuse *C. gigas* selon plusieurs hypothèses potentiellement

combinées en milieu naturel : (i) des difficultés d'assimilation et un colmatage des branchies empêchant l'huître de se nourrir ; (ii) un affaiblissement physiologique de l'huître mal nourrie, la rendant plus sensible aux dangers extérieurs (plastiques, pathogènes, prédation et hypoxie) ou, (iii) un effet hypoxique important.

Cette thèse suggère que le potentiel effet nuisible de *L. chlorophorum* pourrait être lié à sa production élevée d'EPS susceptible d'impacter le fonctionnement des écosystèmes côtiers. Au-delà de notre modèle d'étude, ces travaux de thèse pourraient fournir un exemple de la manière dont un impact environnemental peut être abordé en intégrant des approches de biologie cellulaire, physiologie et écologie. De plus, ces premiers éléments de compréhension concernant les propriétés écologiques de *L. chlorophorum* en Bretagne sud constituent la base de nouvelles études qui pourraient être menées au sein d'autres écosystèmes touchés par les efflorescences de cette espèce.

Perspectives

Dans un contexte de changements globaux incluant notamment le réchauffement climatique et l'eutrophisation anthropique, la question d'une potentielle expansion de *L. chlorophorum* à travers le monde peut être posée. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre les investigations sur l'écologie de ce dinoflagellé afin de pouvoir potentiellement prédire l'apparition des épisodes d'eaux colorées vertes dans différents secteurs ainsi que de prévenir les conséquences écologiques et économiques associées.

Afin de mieux comprendre les raisons de la production accrue d'EPS par *L. chlorophorum*, des études complémentaires pourraient être menées en laboratoire et sur le terrain. Notamment, des expérimentations *in vitro* en condition de stress nutritif pourraient être réalisées afin d'évaluer si les cellules de *L. chlorophorum* produiraient davantage d'EPS dans ces conditions. A l'échelle de la cellule, une approche en microfluidique pourrait permettre d'élucider les mécanismes cellulaires à la base de l'interaction entre les cellules de *L. chlorophorum* et leur consortium bactérien dans la production

d'EPS (*e.g.*, Girault *et al.*, 2021). D'autre part, l'évaluation des abondances bactériennes ainsi que l'estimation du potentiel excès de viscosité au sein d'une eau colorée verte *in situ* apparaissent nécessaires à la validation de l'hypothèse concernant la reminéralisation accrue au sein de cette dernière.

Enfin, une approche multi-omique non-ciblée menée, (i) dans un premier temps en cultures axéniques puis, (ii) au sein d'une eau colorée verte mono-spécifique sur le terrain, pourrait permettre d'identifier la voie de synthèse des EPS, c'est-à-dire les gènes exprimés, transcrits ainsi que les protéines et les métabolites impliqués dans la production d'EPS. Cette approche pourrait apporter de nouvelles hypothèses concernant le rôle écologique de cette production d'EPS chez *L. chlorophorum*. Le même type d'approche pourrait être mis en place afin d'étudier le devenir des EPS dans l'environnement et plus particulièrement la voie de dégradation des EPS via de potentielles exo-enzymes.

Des expérimentations en culture pourraient également être réalisées afin de vérifier la potentielle affinité de *L. chlorophorum* pour l'ammonium en définissant clairement les constantes d'assimilation de cet élément nutritif par ce dinoflagellé. De la même manière, des enrichissements au N¹⁵ pourraient être effectués lors d'incubation *in situ* afin d'évaluer la capacité d'assimilation de cette forme réduite d'azote marqué par *L. chlorophorum*.

Par ailleurs, il serait intéressant de développer des outils de biologie moléculaire spécifiques à l'espèce *L. chlorophorum*. Une méthode de qPCR spécifique pourrait ainsi permettre de mieux recenser cette espèce à l'échelle globale et d'acquérir des informations complémentaires concernant son cycle de vie et sa saisonnalité (cf. Annexe 2). D'autre part, ces travaux de thèse suggèrent que, à elle seule, la stratégie d'échantillonnage réalisée dans le cadre du REPHY (points fixes, pas de temps régulier, prélèvements uniquement en surface à marée haute) ne peut pas amener les éléments nécessaires à une meilleure compréhension de la dynamique des efflorescences vertes de *L. chlorophorum* puisque ces dernières sont fugaces et très localisées. Cette stratégie pourrait être améliorée en multipliant les profondeurs d'échantillonnage de manière systématique et en proposant des campagnes spécifiques en lien avec la détection d'évènements ponctuels par images satellitaires et/ou via le projet de sciences participatives Phenomer (<https://www.phenomer.org/>). A titre d'exemple, il pourrait être

pertinent de réaliser un échantillonnage sur 24h au sein d'une eau colorée verte afin d'étudier plus précisément la distribution verticale de cette espèce au cours du temps et donc en fonction de la marée.

En collaboration avec les conchyliculteurs de la zone, un nouveau suivi de croissance et de mortalité des huîtres creuses *C. gigas* pourrait être mis en place sur un site fréquemment impacté par des efflorescences de *L. chlorophorum*. Il serait alors judicieux d'utiliser des animaux triploïdes (3N) afin de s'affranchir du phénomène de ponte ayant lieu à la même période que les efflorescences de *L. chlorophorum* sur la zone (cf. Annexe 4). Ce nouveau suivi permettrait également de s'affranchir des limitations liées aux conditions de laboratoire (*e.g.*, concentrations et volumes cellulaires disponibles, absence de turbulence et de courants de marée). Au cours de ce suivi, des prélèvements de tissus pourraient être réalisés sur les animaux avant, pendant et après une efflorescence de *L. chlorophorum* afin (i) de vérifier la production de glycoconjugués acides par les tubules digestifs de l'huître *in situ* et (ii) d'observer certaines lésions histologiques généralement constatées lors d'efflorescences d'autres micro-algues nuisibles. D'autre part, afin de s'affranchir des limitations liées aux volumes et aux concentrations cellulaires lors d'expérimentations en laboratoire, il serait envisageable de développer une méthode de culture de *L. chlorophorum* dans des cylindres de 300L au sein d'une infrastructure adaptée. De la même manière, il serait probablement possible de simuler des TEP en laboratoire, en terme de composition et de modification de la viscosité du milieu, afin d'observer leur impact sur la physiologie de l'huître creuse en conditions contrôlées. L'ensemble de ces propositions permettraient (i) de pouvoir conclure sur un potentiel effet de *L. chlorophorum* sur la mortalité de l'huître creuse *C. gigas* et (ii) d'approfondir nos connaissances sur la réponse physiologique de cette dernière lors d'une exposition prolongée à ce dinoflagellé.

Annexes

Annexe I

Etude de la capacité du consortium bactérien associé au dinoflagellé *L. chlorophorum* à produire des exo-polysaccharides

Stage de BTS Biotechnologie (Novembre 2019 – Janvier 2020) ; Théo Grenet.

Encadrante principale : Pauline Roux (Ifremer, LER-MPL) ; Co-encadrante : Christine Delbarre-Ladrat (Ifremer, EM3B).

Afin d'approfondir notre étude sur le rôle des interactions entre *L. chlorophorum* et ses bactéries associées dans la production de substances polymériques extracellulaires (EPS), j'ai encadré un stage de BTS en collaboration avec le laboratoire EM3B¹ (Ifremer, Nantes). Il s'agissait d'étudier la production potentielle d'un exo-polysaccharide principalement composé de galactane sulfaté (retrouvé dans les efflorescences de *L. chlorophorum in situ*) par les consortiums bactériens isolés à partir des 3 souches de *L. chlorophorum* utilisées pour étudier la production d'EPS en laboratoire: RCC1489, KL1C4 et MAR1D2 (cf. Chapitre 1).

Pour ce faire, la croissance des consortiums bactériens a été testée sur différents milieux de culture liquides à base de milieu L1 (propice au développement de *L. chlorophorum*) ou Zobell (propice au développement des bactéries marines ; Zobell, 1941) et dans deux conditions de température 20°C et 30°C. L'objectif était de se rapprocher le plus possible des conditions de culture de *L. chlorophorum* (L1 à 20°C). Cependant, ces essais ont montré une biomasse bactérienne bien plus importante en milieu Zobell qu'en milieu L1. Dans les conditions testées, des analyses en électrophorèse ont montré une production en faible quantité d'un exo-polysaccharide par les consortiums bactériens isolés à partir des souches de *L. chlorophorum* RCC1489 et KL1C4, ce qui n'a pas été le cas

¹ EM3B : Ecosystèmes Microbiens & Molécules Marines pour les Biotechnologies

pour le consortium bactérien isolé à partir de la souche MAR1D2. En outre, certaines colonies isolées ont montré des phénotypes d'aspect mucoïde, ce qui pourrait suggérer une production d'exo-polysaccharides en faible quantité.

Par la suite, nous avons travaillé sur des colonies bactériennes isolées afin d'identifier une potentielle bactérie productrice d'exo-polysaccharides. Or, une production d'exo-polysaccharides quasiment nulle a alors été observée. Ce résultat suggère que la ou les bactérie(s) présente(s) dans le consortium initial et qui pourrai(en)t produire des exo-polysaccharides n'a(ont) pas pu être isolée(s), et ce malgré les 504 repiquages effectués. Il se peut également que les conditions de développement de ces bactéries ne soient pas optimales (*e.g.*, milieu, température, substrat de croissance). Finalement, le séquençage de l'ADN de quelques bactéries soupçonnées de produire un exo-polysaccharide en très faible quantité a montré la présence d'une majorité de bactéries des genres *Marinobacter* et *Pseudoalteromonas*.

Pour conclure, aucun résultat n'a pu mettre clairement en évidence la production d'un exo-polysaccharide ayant un profil d'électrophorèse similaire aux exo-polysaccharides produits lors d'une efflorescence de *L. chlorophorum in situ* (et en culture non-axénique). Des études complémentaires seraient nécessaires pour pouvoir confirmer que les bactéries associées à *L. chlorophorum* ne produisent pas l'exo-polysaccharide recherché. Dans les conditions de croissance testées, nos résultats suggèrent que, si les consortiums bactériens associés aux différentes souches de *L. chlorophorum* étaient capables de produire un exo-polysaccharide sulfaté, ce serait en très faible quantité. Cette conclusion, même partielle, conforte les résultats obtenus lors des expérimentations sur les cultures de *L. chlorophorum* en conditions non-axéniques et pseudo-axéniques (cf. Chapitre 1).

Annexe II

Mise en place d'une méthode de PCR en temps réel (qPCR) pour identifier et quantifier spécifiquement l'espèce *L. chlorophorum* in situ

Projet PICCOLO financé par le GdR Phycotox et porté par P. Roux.

Expérimentations menées par le laboratoire Ifremer LER-BO : A. Terre-Terrillon, G. Bilien et N. Chomérat.

Collaboration internationale : A. Penna et S. Casabianca (Univ. Urbino, Italie).

Une analyse semi-quantitative menée en métabarcoding a permis de détecter la présence rare du genre *Lepidodinium* au sein de sédiments collectés en janvier-février 2019 (cf. Chapitre 2). Or, le genre *Lepidodinium* est constitué de deux espèces : *L. chlorophorum* et *L. viride*. Bien que *L. viride* n'ait jamais été observé en Bretagne sud, une méthode quantitative spécifique à *L. chlorophorum* permettrait de mieux recenser cette espèce. Afin de quantifier l'espèce *L. chlorophorum*, une méthode de qPCR spécifique doit donc être développée.

Dans le cadre de la recherche de kystes de *L. chlorophorum* dans les sédiments (stage M2 Coralie André ; projet EPICE), un premier couple d'amorces spécifiques à l'espèce *L. chlorophorum* a été créé afin d'amplifier par PCR classique les extraits d'ADN obtenus. Dans la région de l'ITS1 (Internal Transcribed Spacer), ces amorces spécifiques formaient un amplicon constitué de 396 paires de bases (pb) (Table A1). Cette première approche a permis d'identifier l'espèce sans toutefois pouvoir quantifier son abondance. Afin de gagner en sensibilité d'identification et d'obtenir des données quantitatives, la technique de qPCR a été développée.

Table A1. Caractéristiques des amorces spécifiques à *L. chlorophorum*.

Amorces spécifiques (396 pb)	Séquence 5' → 3'	T _m (°C)
LEPICHLO_ITS_FW	TTTGACGTCATCATTCTATCATTCCTTTTCGAT	53
LEPICHLO_ITS_RV	ACGCCCCGACGTCGCGCAGCAAACAAGCTATC	63

Dans le cadre du projet PICCOLO, ces mêmes amorces utilisées pour la PCR classique ont été testées pour la mise au point de la méthode de qPCR spécifique à *L. chlorophorum*. En culture, un profil particulier en « double bosses » a été observé démontrant un manque de spécificité de l'amplification (Figure A1). De nombreux tests ont alors été réalisés afin d'optimiser cette méthode (*e.g.*, ratio d'amorces, nombre de cycles, type de kit qPCR). Cependant, cette double amplification a été de nouveau observée, et ce, pour cinq souches de *L. chlorophorum* provenant de zones géographiques différentes (Figure A1). En qPCR, ce résultat a suggéré que les amorces testées n'étaient pas spécifiques de l'espèce *L. chlorophorum*.

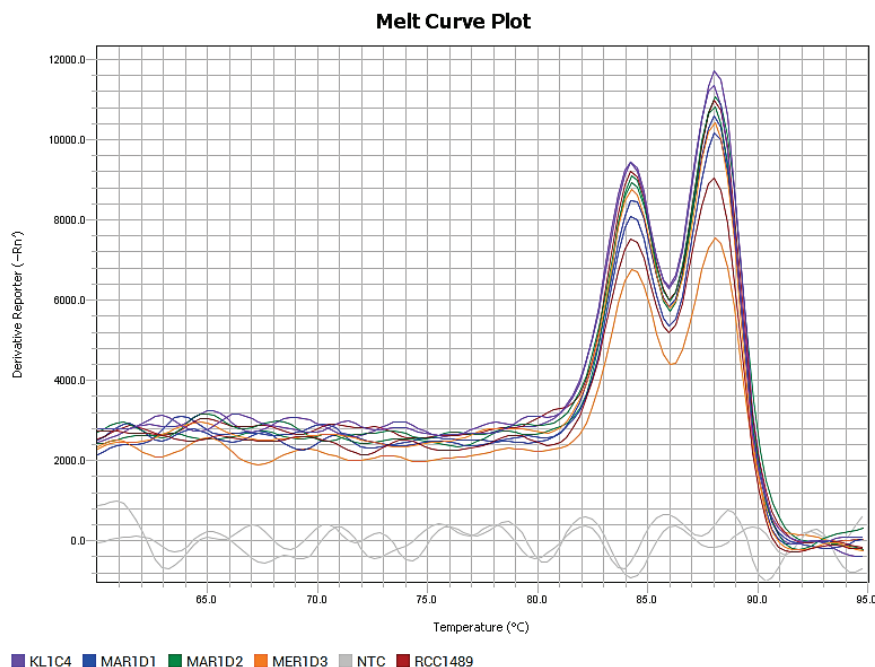


Figure A1. Analyses en qPCR réalisées avec le couple d'amorces : LEPICHLO-ITS-FW/LEPICHLO-ITS-RV (396 pb), sur les cinq souches de *L. chlorophorum* maintenues en laboratoire. Souche de *L. chlorophorum* KL1C4 (en violet), MAR1D1 (en bleu), MAR1D2 (en vert), MER1D3 (en orange) et RCC1489 (en rouge). Témoin négatif eau (NTC ; en gris).

Par la suite, une collaboration avec A. Penna et S. Casabianca (Université de Urbino, Italie) a finalement permis d'établir que les amorces utilisées en PCR classique ne possédaient pas les critères permettant d'optimiser la technique de qPCR. En particulier, la région d'ADN amplifiée est apparue trop longue (en général < 150 pb en qPCR, au lieu des 396 pb en PCR classique). De nouvelles amorces formant un amplicon plus court de 100 pb, ont donc été créées dans la région de l'ITS1 (Table A2).

Table A2. Description des nouvelles amorces créées dans la région de l'ITS1.

Amorce	Séquence	Longueur (pb)	T _m (°C)
Lepido2526F	GGCTGCCTTTCGTGCAAACG	20	64
Lepido2529F	TGCCTTTCGTGCAAACG	17	52
LepidoRv	GCCATCGAAAGGAATGATAGAATGATG	27	51.6

De manière encourageante, un profil présentant une amplification spécifique (« pic unique ») a été observé avec ces nouvelles amorces (Figure A2). Plus précisément, les deux couples d'amorces (Lepido2526F/LepidoRv et Lepido2529F/LepidoRv) n'ont pas amplifié d'ADN correspondant au dinoflagellé *Gymnodinium impudicum*, espèce génétiquement proche. L'ADN extrait d'une culture de *L. viride* a également été utilisé comme contrôle négatif de l'amplification (souche MC730-LV1 décrite par Siano *et al.*, 2009, transférée par A. Zingone et C. Minucci de la Stazione Zoologica A. Dohrn de Naples, Italie). Or, les amorces choisies ont amplifié à la fois *L. chlorophorum* et *L. viride* présentant des T_m (°C) relativement proches (compris entre 86 et 87°C ; Figure A2). Ces résultats démontrent donc que ces couples d'amorces ne sont pas spécifiques à l'espèce *L. chlorophorum* mais seulement au genre *Lepidodinium*. D'autre part, cette méthode de qPCR reste semi-quantitative car, à ce jour, aucune courbe standard de quantification des gènes ciblés par rapport au nombre de cellules de *Lepidodinium* n'a été développée.

Ces analyses ont démontré que la région de l'ITS1 de la petite sous-unité de l'ADN ribosomique (18S) n'est pas assez variable pour distinguer *L. chlorophorum* de *L. viride*. Il faudrait donc poursuivre le développement de cette technique en cherchant de nouveaux

gènes (*e.g.*, mitochondries, chloroplastes) susceptibles de présenter des différences pour une meilleure discrimination entre les 2 espèces. En conditions de laboratoire, il serait nécessaire de travailler sur plusieurs souches de *L. chlorophorum* et *L. viride*, présentant des origines géographiques différentes, afin de prendre en compte la variabilité populationnelle.

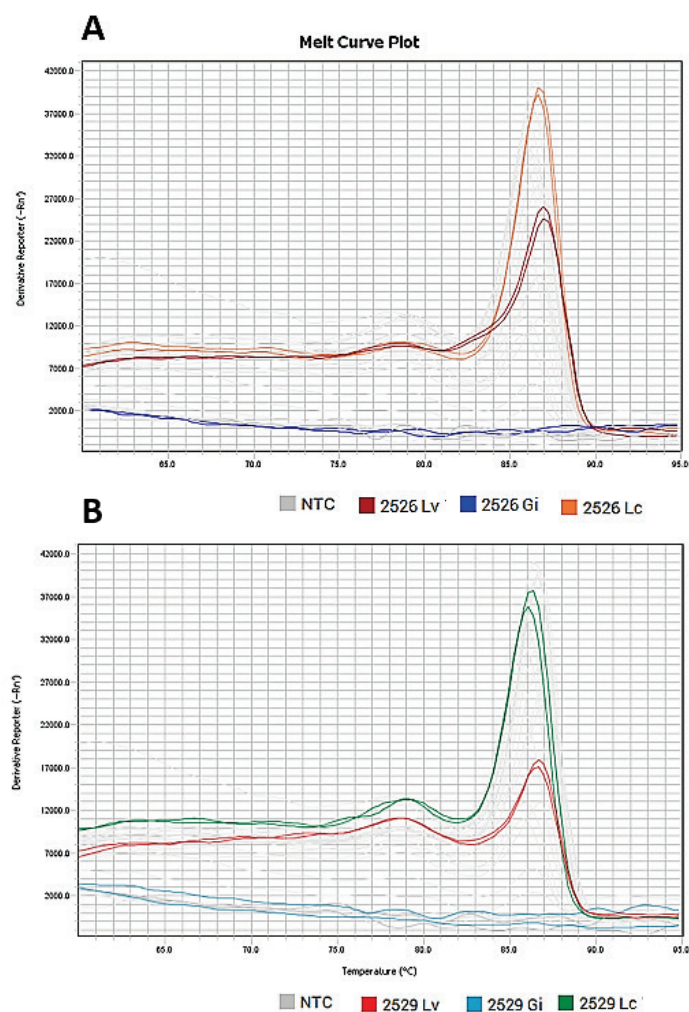


Figure A2. Analyses en qPCR réalisées avec les amorces **(A)** Lepido2526Fw/LepidoRv et **(B)** Lepido2529Fw/LepidoRv sur des extraits d'ADN issus de différentes cultures de dinoflagellés: *Gymnodinium impudicum* (Gi), *L. viride* (Lv) et *L. chlorophorum* (Lc). NTC représente le témoin négatif eau.

Néanmoins, le couple Lepido2526Fw/LepidoRv a été retenu pour étudier l'abondance relative de l'ADN correspondant au genre *Lepidodinium* dans les sédiments collectés (cf. Chapitre 2). Au sein de ces derniers, le genre *Lepidodinium* a été détecté en très faible abondance (Figure A3). En effet, les résultats positifs étaient en dessous de la

limite de quantification de la qPCR, définie à 100 cellules. Cette limite de quantification n'a donc pas permis de réaliser une vraie analyse de distribution de ce genre sur la zone d'étude. Malgré les difficultés rencontrées, les données obtenues en qPCR ont permis de conforter les données issues des analyses en métabarcoding (cf. Chapitre 2) qui montraient la présence en faible quantité d'ADN correspondant au genre *Lepidodinium* dans les sédiments. Les données de qPCR corroborent donc l'hypothèse émise dans le Chapitre 2 de cette thèse, à savoir que l'ADN rare du genre *Lepidodinium* détecté dans les sédiments pourrait correspondre à de l'ADN extracellulaire ayant sédimenté sur le fond. Ces données remettent donc en question la formation de kystes de résistance benthiques par l'espèce *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 2).

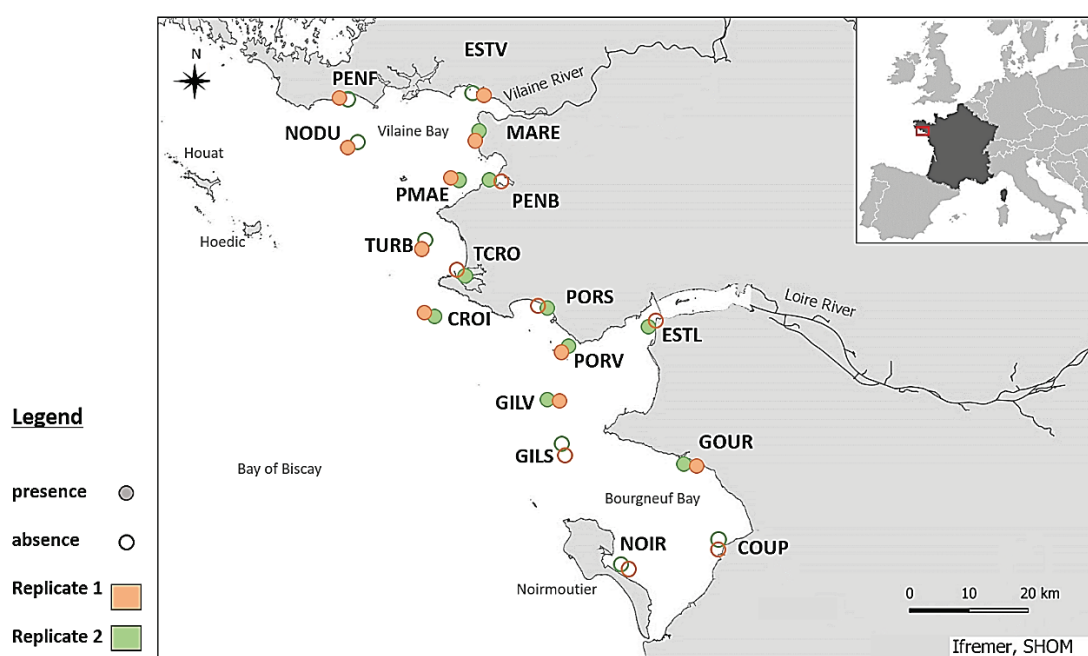


Figure A3. Détection du genre *Lepidodinium* par qPCR dans les sédiments (ADN extrait à partir de 10g de sédiment via le kit d'extraction PowerMaxSoil®). Des échantillons de sédiment ont été prélevés en duplicata (cercles orange et vert) à chaque station d'échantillonnage en janvier-février 2019 : La Coupelasse (COUP), Croisic Large (CROI), Estuaire Loire (ESTL), Estuaire Vilaine (ESTV), Pointe Saint Gildas (GILS et GILV), Gourmalon (GOUR), Maresclé (MARE), Nord Dumet (NODU), Noirmoutier (NOIR), Penbé (PENB), Penerf (PENF), Pont Mahé (PMAE), Pornichet (PORS et PORV), Traict du Croisic (TCRO) et La Turballe (TURB). Les cercles pleins montrent la détection du genre *Lepidodinium* en dessous de la limite de quantification de la qPCR développée (100 cellules), tandis que les cercles vides représentent l'absence de ce genre dans les sédiments.

Annexe III

Etude de la phénologie des efflorescences de *L. chlorophorum*. Analyse des séries à long terme acquises dans le cadre du réseau d'observation REPHY² de l'Ifremer

Le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY ; <https://www.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Surveillance/REPHY>) a été créé par l'Ifremer en 1984, suite à l'observation de nombreuses intoxications de type diarrhéique chez les consommateurs de coquillages sur les côtes bretonnes. Ces intoxications avaient pour origine le développement de *Dinophysis*. Il s'agit d'un réseau national dont la couverture est assurée par douze laboratoires côtiers. Ce réseau a pour objectifs : (i) d'observer l'ensemble des espèces phytoplanctoniques des eaux côtières et (ii) de surveiller plus particulièrement les espèces produisant des toxines dangereuses pour les consommateurs de coquillages.

Dans ce contexte, j'ai analysé les données acquises dans le cadre du REPHY afin (i) d'étudier la dynamique saisonnière des efflorescences de *L. chlorophorum* à l'échelle interannuelle et (ii) d'identifier les facteurs environnementaux contrôlant ces efflorescences.

Pour ce faire, nous avons choisi d'analyser uniquement les données issues de la stratégie « FLORE TOTALE ». Cette stratégie vise à identifier et dénombrer chacune des espèces phytoplanctoniques (> 20 µm), toxiques ou non, présentes dans un échantillon d'eau de mer. L'étape suivante a été de choisir les stations d'échantillonnage et la période d'étude. En France, la zone la plus fréquemment touchée par les efflorescences de *L. chlorophorum* est la Bretagne sud (Belin and Soudant, 2018; Belin *et al.*, 2021). La Bretagne sud est donc la zone la plus indiquée pour étudier l'écologie de cette espèce. Parmi les stations REPHY de Bretagne sud, nous avons choisi celles répondant à trois

² REPHY : Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales

critères: (i) la récurrence des observations de *L. chlorophorum*, (ii) la régularité de la fréquence d'échantillonnage et (iii) la disponibilité des données environnementales. D'autre part, nous avons pris en compte les changements d'observateurs ainsi que les périodes de formation de ces derniers à la taxonomie du phytoplancton, susceptibles d'introduire une rupture dans les séries temporelles. Nous nous sommes finalement concentrés sur la période d'étude allant de 1998 à 2019, pour les stations situées en baies de Vilaine (« Ouest Loscolo »), de Quiberon (« Men er Roué »), de Concarneau (« Concarneau »), de Douarnenez (« Kervel ») et de Brest (« Lanvéoc »), où des observations de *L. chlorophorum* ont été régulièrement recensées (Figure A4).

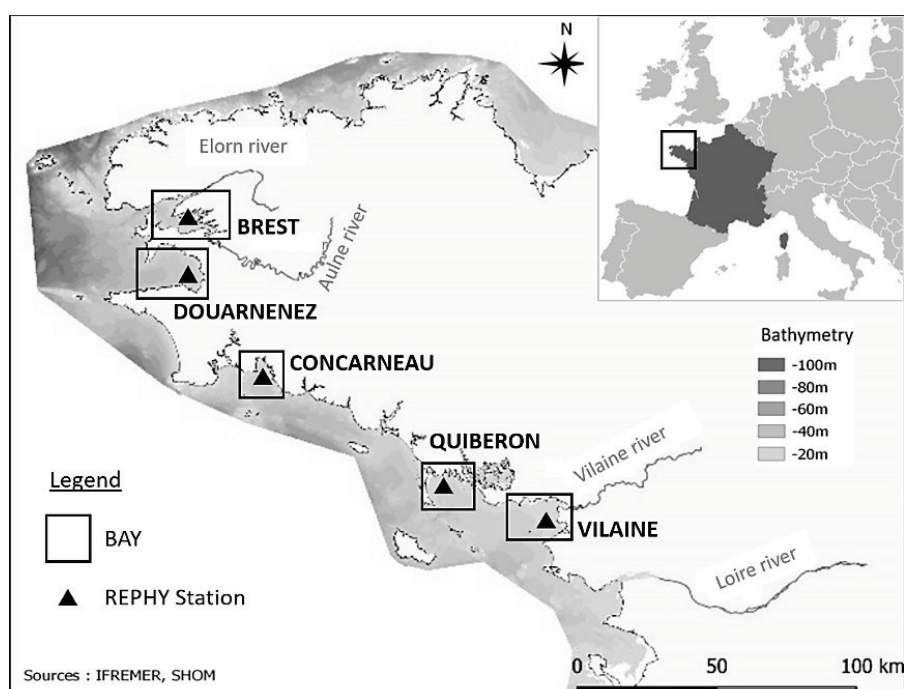


Figure A4. Localisation des 5 baies : Brest (station « Lanvéoc »), Douarnenez (station « Kervel »), Concarneau (station « Concarneau »), Quiberon (station « Men er Roué ») et Vilaine (station « Ouest Loscolo ») d'où proviennent les séries temporelles REPHY étudiées sur la période allant de 1998 à 2019.

Au cours des deux dernières décennies, *L. chlorophorum* a été plus fréquemment observé dans la partie nord que dans la partie sud de la zone d'étude (Figure A5). Entre 1998 et 2019, le nombre d'observations a dépassé 145 dans les baies de Concarneau (N=168), Douarnenez (N=145) et Brest (N=194), alors qu'il était inférieur à 85 dans les baies de Quiberon (N=83) et de Vilaine (N=82) (Figure A5). Cependant, les efflorescences (abondances $> 10^5$ cells L^{-1} ; seuil défini par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)) étaient plus

fréquentes dans la partie sud, donc dans les baies de Vilaine (29% des observations) et de Quiberon (17%), que dans la partie nord (6%, 4% et 12% dans les baies de Concarneau, Douarnenez et Brest, respectivement). Concernant le cycle saisonnier de cette espèce, *L. chlorophorum* est observé entre mai et novembre, avec des concentrations maximales (pouvant atteindre 10^6 cells L^{-1}) entre juillet et septembre sur les 5 sites étudiés. Cette saisonnalité avait été précédemment décrite par Belin and Soudant (2018).

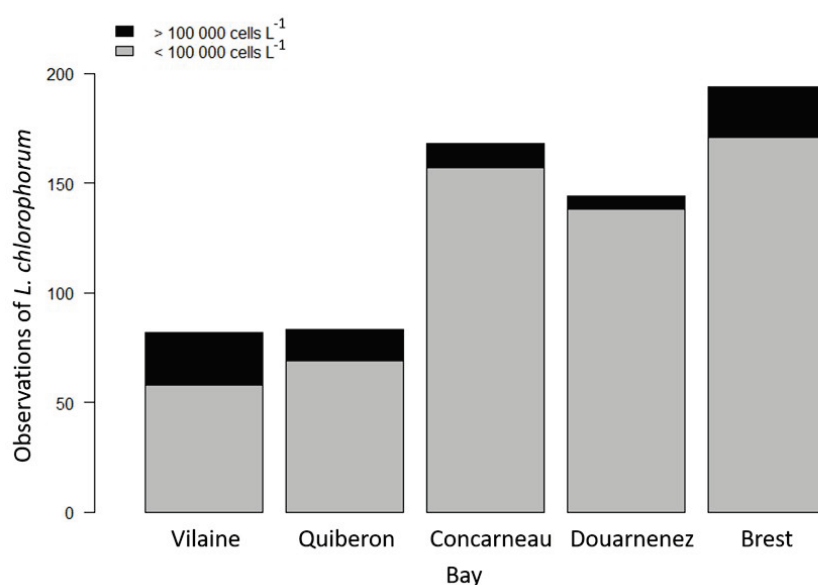


Figure A5. Nombre d'observations de *L. chlorophorum* au sein de chacune des baies suivies dans le cadre du réseau REPHY entre 1998 et 2019. Une efflorescence de *L. chlorophorum* est définie comme un évènement présentant des concentrations cellulaires $> 10^5$ cells L^{-1} (stratégie DCE).

Au cours de cette étude, la phase de démarrage d'une efflorescence n'a pas pu être caractérisée car *L. chlorophorum* est difficile à identifier lorsqu'il est présent en faibles concentrations cellulaires dans les échantillons fixés. En effet, la fixation au Lugol modifie l'aspect (taille, forme, couleur) de la cellule ce qui la rend difficilement identifiable parmi les autres Gymnodiniacées. De plus, l'échantillonnage à un point fixe, tel qu'il est réalisé dans le cadre du REPHY, n'est probablement pas la meilleure stratégie pour identifier la dynamique des efflorescences vertes de *L. chlorophorum* puisque ces dernières peuvent être fugaces et très localisées. D'autre part, les concentrations en nutriments étaient disponibles uniquement à partir de 2008 pour les baies de Concarneau, Douarnenez et Brest, et seulement entre novembre et février en baies de Douarnenez et Brest (stratégie

d'échantillonnage DCE). Ce jeu de données n'a donc pas permis de répondre aux objectifs de la thèse. Des analyses statistiques plus poussées seraient probablement nécessaires pour apporter des éléments de réponse concernant la phénologie des efflorescences de *L. chlorophorum* à l'échelle interannuelle.

Un suivi saisonnier a été mis en place en avril 2019 et pendant deux années consécutives (cf. Chapitre 3). Ce suivi environnemental, réalisé sur 6 stations contrastées situées au large de la Loire et de la Vilaine, avait pour objectif d'apporter de nouveaux éléments de réponse concernant la phénologie de l'espèce *L. chlorophorum* (e.g., facteurs environnementaux contrôlant le développement des efflorescences, distribution verticale de *L. chlorophorum*). Par ailleurs, afin de mieux appréhender les conséquences des efflorescences de *L. chlorophorum* sur le fonctionnement des écosystèmes, des échantillonnages spécifiques au sein d'eaux colorées vertes étaient prévus au cours de ces deux années d'étude. Ainsi, une eau colorée verte à *L. chlorophorum* a été échantillonnée en juillet 2019 (cf. Chapitre 3). Afin de compléter les données acquises concernant les propriétés biogéochimiques d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum*, l'échantillonnage d'une nouvelle eau colorée verte devait être réalisé au cours de l'été 2020. Les objectifs fixés pour ce nouvel échantillonnage étaient (i) d'estimer les concentrations bactériennes présentes au sein d'une eau colorée verte et (ii) de mesurer un potentiel excès de viscosité *in situ*. Cependant, il n'a pas été possible de programmer un tel échantillonnage dans le contexte de la crise sanitaire liée au Covid-19. De la même manière, le suivi environnemental qui devait se poursuivre en 2020 a été largement tronqué durant le confinement. Ainsi, aucune donnée n'a pu être acquise entre mars et fin juin 2020. Il a donc été décidé de poursuivre l'échantillonnage en 2021 et ma thèse a été prolongée de 9 mois afin de pouvoir notamment échantillonner une nouvelle eau colorée verte au cours de l'été 2021. Toutefois, l'été 2021 a été marqué par des conditions environnementales atypiques (e.g., forts débits de la Loire et de la Vilaine au mois de juillet, températures relativement faibles pendant tout l'été). Si *L. chlorophorum* a pu être observé sur différentes stations, aucune eau colorée verte n'a été recensée au cours de cette dernière année de suivi.

Annexe IV

Étude de l'impact des efflorescences de *L. chlorophorum* sur la croissance et la mortalité des huîtres creuses

Stage de fin d'étude Intechmer (Mai – Septembre 2021) ; Coline Giraud.

Encadrante principale : Mathilde Schapira ; Co-encadrantes : Pauline Roux et Anne Schmitt (Ifremer, LER-MPL).

L'objectif de cette partie de ma thèse était d'étudier les conséquences d'une eau colorée verte à *L. chlorophorum* sur la croissance et la mortalité de l'huître creuse *Crassostrea gigas in situ*. Pour ce faire, un suivi sur le site de « Penbé » (Loire-Atlantique) a été mis en place en Avril 2019 et assuré par le laboratoire Ifremer, LER-MPL (Figure A6). Ce site a été choisi car : (i) il est situé sur une zone conchylicole régulièrement impactée par des eaux colorées vertes à *L. chlorophorum* associées à des mortalités de coquillages, (ii) il est facilement accessible en morte eau et (iii) les structures expérimentales ont pu être hébergées chez un professionnel. Des huîtres creuses *C. gigas* diploïdes NSI (Naissain Standard Ifremer) de 2 classes d'âge (naissain et 18 mois) ont été suivies tous les 15 jours, pour les paramètres de mortalité et de croissance. Ces huîtres NSI provenaient de l'écloserie de la station Ifremer d'Argenton (production) puis de Bouin (pré-grossissement). Les individus étaient issus d'une cohorte d'huîtres creuses exemptes de pathogènes et n'ayant jamais été en contact avec le milieu naturel et donc avec des espèces de micro-algues potentiellement nuisibles. Sur le terrain, le protocole était similaire à celui réalisé par le réseau national ECOSCOPA (https://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole) afin de pouvoir comparer les données avec d'autres sites et périodes. De plus, les paramètres de température, salinité, pression et oxygène dissous ont été suivis à haute fréquence (15 minutes) à l'aide de sondes multi-paramètres placées à proximité des poches expérimentales tandis que les autres paramètres hydrologiques (nutriments, turbidité, concentrations en TEP) et

phytoplanctoniques étaient suivis chaque semaine entre juin et septembre puis, tous les mois en dehors de cette période sur le site de Merquel (Figure A6).

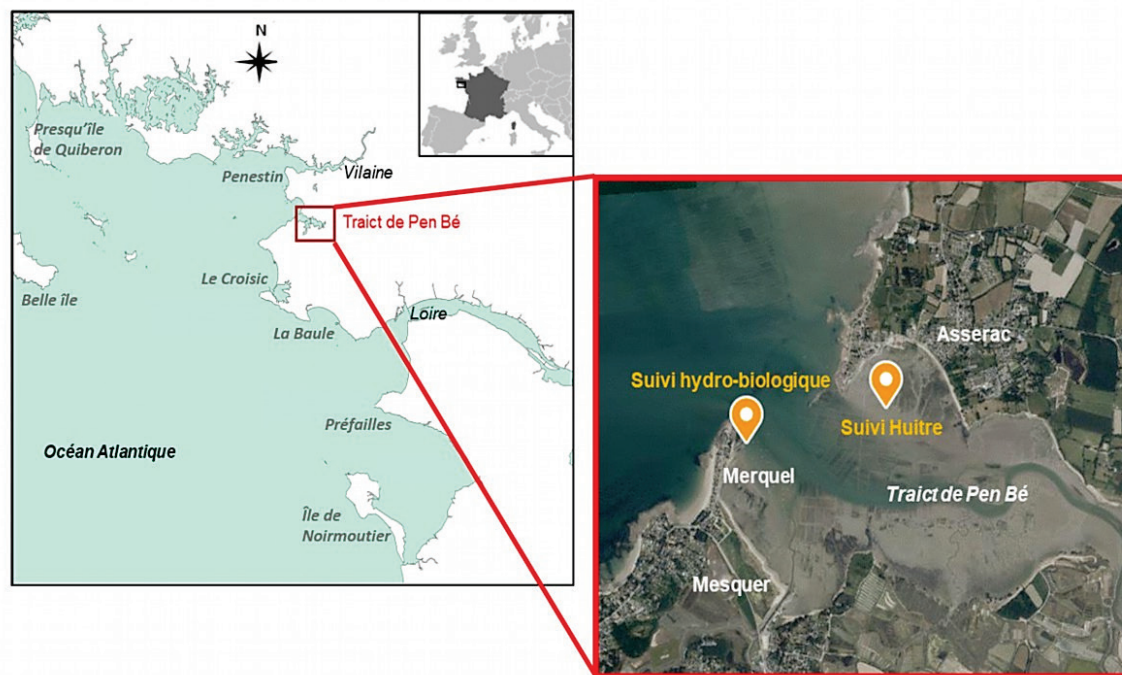


Figure A6. A gauche, le site atelier de cette étude est localisé au niveau du Traict de Penbé, en baie de Vilaine. A droite, le point de suivi hydro-biologique (Merquel) et le point de suivi des huîtres (Penbé) sont localisés plus précisément (échelle 17 055, Géoportail : source Ifremer).

Cependant, les lots d'huîtres NSI initialement déployés sur le terrain en Avril 2019 ont dû être retirés à la fin du mois de juin par principe de précaution suite à la suspicion de la présence du parasite *Haplosporidium costale* au sein des lots produits dans les infrastructures de Bouin. Suite à cet épisode imprévu, de nouveaux lots fournis par le professionnel associé au projet (non NSI – mélange d'individus diploïdes (2N) et triploïdes (3N)) ont alors été déployés, au début du mois de juillet 2019.

Sur le site de Penbé, des concentrations en oxygène dissous en dessous du seuil d'hypoxie ($2,9 \text{ mg L}^{-1}$; Diaz and Rosenberg, 2008) ont été mesurées à la fin juillet 2019, faisant suite à une efflorescence de *L. chlorophorum* ($> 10^6 \text{ cells L}^{-1}$ mesurées en période de mortes eaux) (Figure A7). Cependant, aucune surmortalité n'a été observée suite à cet événement. Bien que l'indice de remplissage des huîtres âgées de 18 mois (indice de Lawrence and Scott ; LS) montre une diminution significative à cette même période (Figure A8), le mélange d'individus 2N et 3N mis en poches n'a pas permis de conclure sur un

potentiel effet de cette efflorescence sur la croissance de l'huître *C. gigas*. En effet, le phénomène de ponte observé chez les individus 2N peut entraîner une diminution temporaire de cet indice de remplissage, contrairement aux huîtres 3N qui sont stériles et ne pondent pas. Il n'a donc pas été possible de dissocier l'effet de la ponte et un potentiel effet lié à la présence *L. chlorophorum*. Par ailleurs, le changement de lot d'huîtres au début du mois de juillet 2019, donc au début de l'efflorescence de *L. chlorophorum*, ne permet pas de conclure sur une conséquence potentielle de ces efflorescences sur la croissance ou la mortalité des huîtres creuses. Néanmoins, malgré les difficultés rencontrées, nous avons pu mettre en évidence des diminutions importantes des concentrations en oxygène dissous en lien avec une efflorescence de *L. chlorophorum*, pouvant atteindre des niveaux inférieurs au seuil d'hypoxie des bivalves, sur les parcs à huîtres.

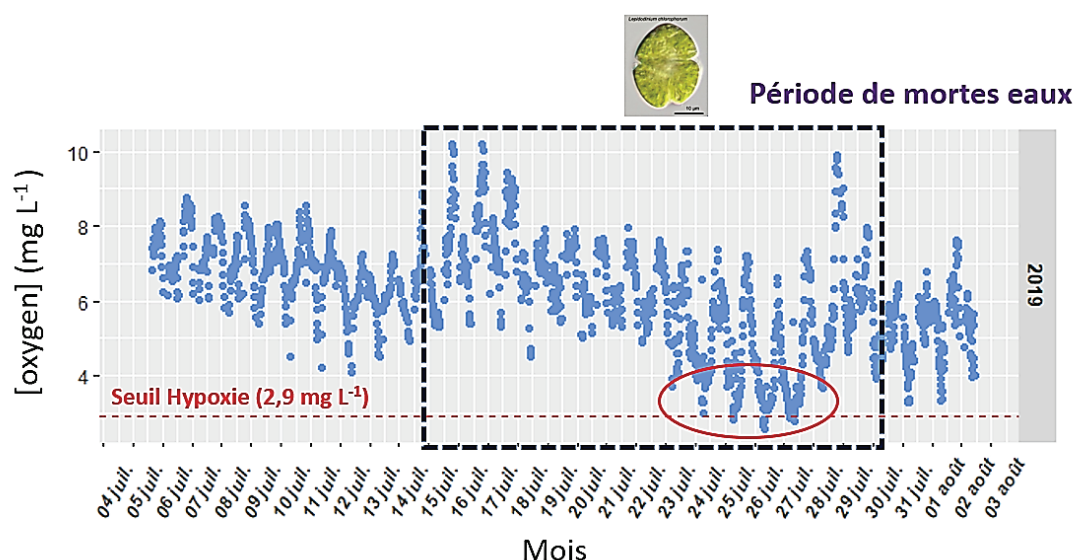


Figure A7. Évolution de la concentration en oxygène dissous dans l'eau de mer en surface (en mg L^{-1}) du 4 juillet au 3 août 2019. Le trait pointillé rouge représente le seuil d'hypoxie des bivalves, seuil fixé à $2,9 \text{ mg L}^{-1}$ d'après Diaz and Rosenberg, 2008. Le cercle rouge représente la période d'hypoxie (du 23 au 27 juillet 2019). Une efflorescence de *L. chlorophorum* a été détectée en période de mortes eaux (cadre noir).

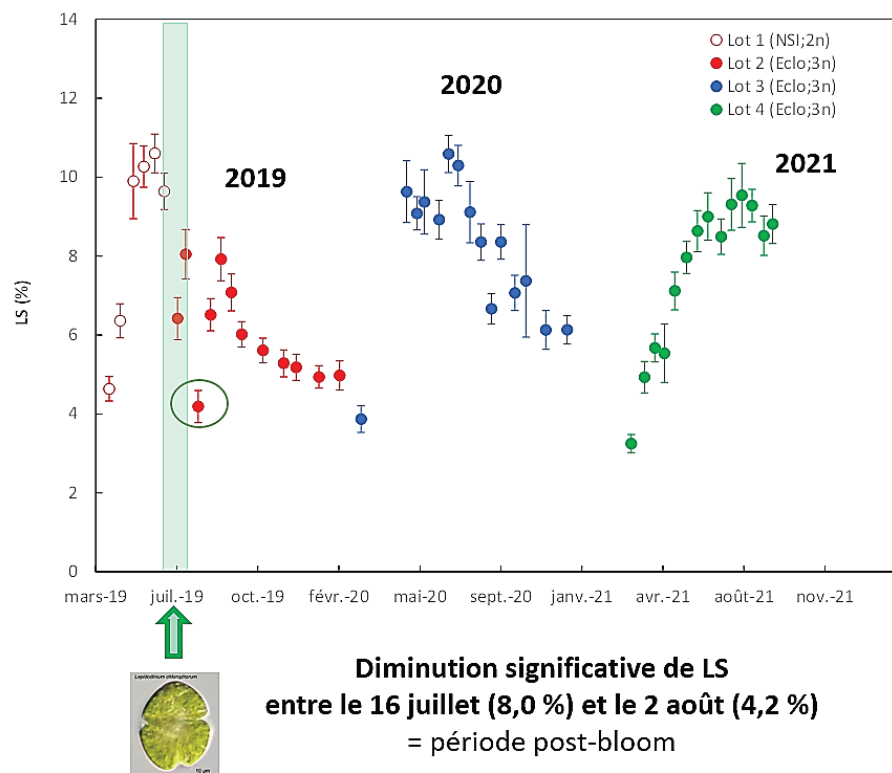


Figure A8. Évolution de l'indice de Lawrence and Scott (LS) calculé à partir des huîtres âgées de 18 mois au cours des années 2019 (en rouge), 2020 (en bleu) et 2021 (en vert). Le cadre vert identifie la période d'efflorescence de *L. chlorophorum*. En 2019, les cercles rouges vides représentent le Lot-1 (NSI Ifremer, 2N) et les cercles rouges colorés représentent le lot-2 (fourni par le professionnel, 3N). Ce changement de lot fait suite à la crise *Haplosporidium costale*.

Un nouveau suivi a donc été initié en Mars 2020 (lots non NSI – 3N uniquement). Des lots de 2 classes d'âge (naissain et 18 mois) ont été déployés sur le site de Penbé. Cependant, la crise du Covid-19 a de nouveau engendré une suspension du suivi environnemental pendant plusieurs mois. Ce suivi s'est finalement poursuivi au cours de l'année 2021 (lots non NSI – 3N uniquement ; 2 classes d'âge) dont la période estivale a été caractérisée par des conditions environnementales atypiques et l'absence d'efflorescence de *L. chlorophorum*.

Ces 3 années de suivi n'ont donc pas permis de répondre aux objectifs de la thèse. Néanmoins, nous avons pu mesurer des concentrations en oxygène dissous inférieures au seuil d'hypoxie suite à l'épisode intense d'eau colorée verte observé au cours du mois de juillet 2019. Ces conditions de désoxygénation pourraient avoir des conséquences importantes sur la physiologie des bivalves. Par ailleurs, afin d'évaluer l'effet potentiel

d'une efflorescence de *L. chlorophorum* sur l'huître creuse *in situ*, un suivi de croissance et de mortalité d'individus triploïdes (3N) pourrait être mis en place afin de s'affranchir de « l'effet ponte (2N) » se produisant à la même période que les efflorescences à *L. chlorophorum* (période estivale).

Suite aux différentes difficultés rencontrées, et afin d'apporter de premiers éléments de compréhension relatifs aux impacts potentiels des eaux colorées vertes sur la physiologie de l'huître creuse *C. gigas*, des expérimentations en milieu contrôlé ont été conduites en 2021, dans le cadre de ma thèse (projet CLOCLO, financé par la Direction Scientifique de l'Ifremer). Ces expérimentations font l'objet du chapitre 4 du présent manuscrit (Figure A9).

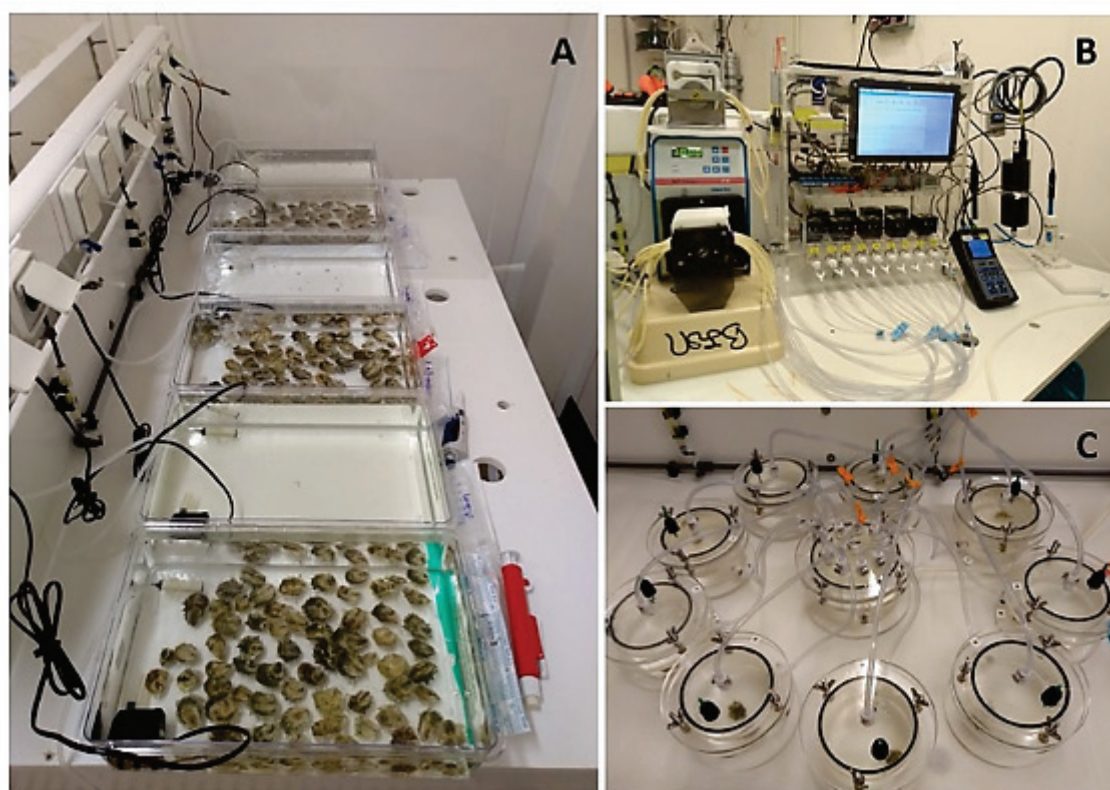


Figure A9. Expérimentation en milieu contrôlé visant à étudier la physiologie de l'huître creuse *C. gigas* exposée à *L. chlorophorum* (cf. Chapitre 4). **(A)** Phase d'exposition des huîtres à trois régimes différents (LC-bloom, LC-low et TL). Les trois bacs sans huîtres permettent de suivre le comportement des cultures de micro-algue au cours du temps. **(B)** Banc écophysologique. **(C)** Enceintes individuelles.

Références Bibliographiques

-A-

- Abad, D., Albaina, A., Aguirre, M., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Iriarte, A., *et al.* (2016) Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? A comparative study with microscopy. *Marine Biology* **163**(149), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2920-0>
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**(5), 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Alderkamp, A.C., Buma, A.G.J., and van Rijssel, M. (2007) The carbohydrates of *Phaeocystis* and their degradation in the microbial food web. *Biogeochemistry* **83**, 99–118. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9078-2>
- Alkhatib, M., Del Giorgio, P.A., Gelinas, Y., and Lehmann, M.F. (2013) Benthic fluxes of dissolved organic nitrogen in the lower St. Lawrence estuary and implications for selective organic matter degradation. *Biogeosciences* **10**(11), 7609–7622. <https://doi.org/10.5194/bg-10-7609-2013>
- Allredge, A.L., and Gotschalk, C.C. (1989) Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Research* **36**(2), 159–171. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(89\)90131-3](https://doi.org/10.1016/0198-0149(89)90131-3)
- Allredge, A.L., Passow, U., and Haddock, S.H.D. (1998) The characteristics and transparent exopolymer particle (TEP) content of marine snow formed from thecate dinoflagellates. *Journal of Plankton Research* **20**(3), 393–406. <https://doi.org/10.1093/plankt/20.3.393>
- Allredge, A.L., Passow, U., and Logan, B.E. (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research* **40**(6), 1131–1140. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(93\)90129-Q](https://doi.org/10.1016/0967-0637(93)90129-Q)
- Alunno-Bruscia, M., Bourlès, Y., Maurer, D., Robert, S., Mazurié, J., Gangnery, A., *et al.* (2011) A single bio-energetics growth and reproduction model for the oyster *Crassostrea gigas* in six Atlantic ecosystems. *Journal of Sea Research* **66**(4), 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.07.008>
- Amin, S.A., Parker, M.S., and Armbrust, E.V. (2012) Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**(3), 667–684. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00007-12>
- Aminot, A., and Kérouel, R. (2004) *Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses*. Ed. Ifremer, France. 336 pp. ISBN 2-84433-133-5 [In French]
- Aminot, A., and Kérouel, R. (2007) *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu*. Ed. Ifremer, France. 188 pp. ISBN-13 978-2-7592-0023-8 [In French]
- Anderson, D.M. (1980) Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *Journal of Phycology* **16**(2), 166–172. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1980.tb03013.x>
- Anderson, D.M. (1997) Bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species in the northeastern U.S. *Limnology and Oceanography* **42**(5), 1009–1022. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1009
- Anderson, D.M. (1998) *Physiology and bloom dynamics of toxic Alexandrium species, with emphasis on life cycle transitions*. In: Physiological Ecology of harmful Algal Blooms. NATO Advanced Science Institutes Series G, Ecological Sciences. Ed. Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **41**, pp. 29–48
- Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., and Montresor, M. (2012) The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* **14**, 10–35. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.012>
- Anderson, D.M., and Keafer, B.A. (1987) An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature* **325**, 616–617. <https://doi.org/10.1038/325616a0>
- Anderson, D.M., Keafer, B.A., Kleindinst, J.L., McGillicuddy, D.J., Martin, J.L., Norton, K., *et al.* (2014)

- Alexandrium fundyense* cysts in the Gulf of Maine: Long-term time series of abundance and distribution, and linkages to past and future blooms. *Deep-Sea Research* **103**, 6–26. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.10.002>
- Anderson, D.M., Keafer, B.A., McGillicuddy, D.J., Mickelson, M.J., Keay, K.E., Scott L.P., *et al.* (2005a) Initial observations of the 2005 *Alexandrium fundyense* bloom in southern New England: General patterns and mechanisms. *Deep-Sea Research* **52**(19-21), 2856–2876. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.09.004>
- Anderson, D.M., Stock, C.A., Keafer, B.A., Nelson, A.B., Thompson, B., McGillicuddy, D.J., *et al.* (2005b) *Alexandrium fundyense* cyst dynamics in the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research* **2**(19-21), 2522-2542. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.06.014>
- Anderson, D.M., Taylor, C.D., and Armbrust, E.V. (1987) The effects of darkness and anaerobiosis on dinoflagellate cyst germination. *Limnology and Oceanography* **32**(2), 340–375. <https://doi.org/10.4319/lo.1987.32.2.0340>
- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Calvo, L.R., Unger, M.A., and Bureson, E.M. (1998) Effects of tributyltin and hypoxia on the progression of *Perkinsus marinus* infections and host defence mechanisms in oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Fish Diseases* **21**(5), 371–380. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00128.x>
- Andruszkiewicz, E.A., Sassoubre, L.M., and Boehm, A.B. (2017) Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One* **12**(9), e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>
- Anglès, S., Garcés, E., Reñé, A., and Sampedro, N. (2012) Life-cycle alternations in *Alexandrium minutum* natural populations from the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae* **16**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.12.006>
- Anglès, S., Jordi, A., Garcés, E., Basterretxea, G., and Palanques, A. (2010) *Alexandrium minutum* resting cyst distribution dynamics in a confined site. *Deep-Sea Research* **57**(3–4), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2009.09.002>
- Annane, S., St-Amand, L., Starr, M., Pelletier, E., and Ferreyra, G.A. (2015) Contribution of transparent exopolymeric particles (TEP) to estuarine particulate organic carbon pool. *Marine Ecology Progress Series* **529**, 17–34. <https://doi.org/10.3354/meps11294>
- Attermeyer, K., Andersson, S., Catalán, N., Einarsdottir, K., Groeneveld, M., Székely, A.J., and Tranvik, L.J. (2019) Potential terrestrial influence on transparent exopolymer particle concentrations in boreal freshwaters. *Limnology and Oceanography* **64**(6), 2455–2466. <https://doi.org/10.1002/lno.11197>
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., and Thingstad, F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* **10**, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Azam, F., and Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature* **5**, 782–791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Azam, F., and Smith, D.C. (1991) *Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view*. In: Particle Analysis in Oceanography. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg. *NATO Advanced Science Institutes Series* **27**, pp. 213–236. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75121-9_9

-B-

- Bacher, C., Duarte, P., Ferreira, J.G., Héral, M., and Raillard, O. (1997) Assessment and comparison of the Marennes-Oléron Bay (France) and Carlingford Lough (Ireland) carrying capacity with ecosystem models. *Aquatic Ecology* **31**(4), 379–394. <https://doi.org/10.1023/A:1009925228308>
- Baldi, F., Minacci, A., Saliot, A., Mejanelle, L., Mozetic, P., Turk, V., and Malej, A. (1997) Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Marine Ecology Progress Series* **153**, 45–57. <https://doi.org/10.3354/meps153045>

- Barillé, L., Haure, J., Pales-Espinosa, E., and Moranchais, M. (2003) Finding new diatoms for intensive rearing of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture* **217**(1-4), 501–514. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00257-0)
- Barnes, M.A., and Turner, C.R. (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* **17**, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Bar-Zeev, E., Berman, T., Rahav, E., Dishon, G., Herut, B., Kress, N., and Berman-Frank, I. (2011) Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in the eastern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* **431**, 107–118. <https://doi.org/10.3354/meps09110>
- Bayne, B.L. (2002) Physiological comparison between Pacific oysters *Crassostrea gigas* and Sydney Rock oysters *Saccostrea glomerata*: food, feeding and growth in a shared estuarine habitat. *Marine Ecology Progress Series* **232**, 163–178. <https://doi.org/doi:10.3354/meps232163>
- Bayne, B.L. (2017) *Biology of Oysters*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier Inc. **41**, 860 pp. ISBN 978-0-12-803472-9
- Bayne, B.L., Hawkins, A. J. S., and Navarro, E. (1987) Feeding and digestion by the mussel (*Bivalvia* : Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **111**(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90017-7)
- Beauvais, S., Pedrotti, M.L., and Lemée, R. (2003) Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* **262**, 97–109. <https://doi.org/10.3354/meps262097>
- Belin, C., and Soudant, D. (2018) *Trente années d'observation des microalgues et des toxines d'algues sur le littoral*. Ed. QUAE, France. 261 pp. 978275922942 ISSN [In French]
- Belin, C., Soudant, D., and Amzil, Z. (2021) Three decades of data on phytoplankton and phycotoxins on the French coast: Lessons from REPHY and REPHYTOX. *Harmful Algae* **102**, 101733. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101733>
- Benedetti, F., Jalabert, L., Sourisseau, M., Beker, B., Cailliau, C., Desnos, C., et al. (2019) The seasonal and inter-annual fluctuations of plankton abundance and community structure in a North Atlantic Marine Protected Area. *Frontiers in Marine Science* **6**(214), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00214>
- Beninger, P.G., and St-Jean, S. (1997) Particle processing on the labial palps of *Mytilus edulis* and *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Ecology Progress Series* **147**, 117–127. <https://doi.org/10.3354/meps147117>
- Benoiston, A.S., Ibarbalz, F.M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., and Bowler, C. (2017) The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **372**(1728), 1-10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>
- Bhaskar, P.V., and Bhosle, N.B. (2005) Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science* **88**(1), 45-53. <https://www.jstor.org/stable/24110092>
- Bhattacharya, D., Yoon, H.S., and Hackett, J.D. (2004) Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *BioEssays* **26**(1), 50–60. <https://doi.org/10.1002/bies.10376>
- Bittar, T.B., Passow, U., Hamaraty, L., Bidle, K.D., and Harvey, E.L. (2018) An updated method for the calibration of transparent exopolymer particle measurements. *Limnology and Oceanography Methods* **16**(10), 621-628. <https://doi.org/10.1002/lom3.10268>
- Blackburn, N., Fenchel, T., and Mitchell, J. (1998) Microscale Nutrient Patches in Planktonic Habitats Shown by Chemotactic Bacteria. *Science* **282**(5397), 2254-2256. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2254>
- Blackburn, T.H., and Henriksen, K. (1983) Nitrogen cycling in different types of sediments from Danish waters. *Limnology and Oceanography* **28**(3), 477–493. <https://doi.org/10.4319/LO.1983.28.3.0477>
- Blott, S.J., and Pye, K. (2001) Gradistat: A grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surface Processes and Landforms* **26**(11), 1237–1248. <https://doi.org/10.1002/esp.261>

- Boere, A.C., Sinninghe D.J.S., Rijpstra, W.I.C., Volkman, J.K., and Coolen, M.J.L. (2011) Source-specific variability in post-depositional DNA preservation with potential implications for DNA based paleoecological records. *Organic Geochemistry* **42**(10), 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.08.005>
- Bolch, C.J.S. (1997) The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia* **36**(6), 472–478. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-36-6-472.1>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., *et al.* (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bone, Q., Carré, C., and Chang, P. (2003) Tunicate feeding filters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **83**(5), 907–919. <https://doi.org/10.1017/S002531540300804Xh>
- Bougrier, S., Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., and Truquet, P. (2003) Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquatic Living Resources* **16**(4), 347–352. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(03\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(03)00080-9)
- Bourlès, Y., Alunno-Bruscia, M., Pouvreau, S., Tollu, G., Leguay, D., Arnaud, C., *et al.* (2009) Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *Journal of Sea Research* **62**(2–3), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.03.002>
- Bowman, L.P. (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* **5**(4), 220–241. <https://doi.org/10.3390%2Fmd504220>
- Boyce, D.G., Lewis, M.R., and Worm, B. (2010) Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* **466**, 591–596. <https://doi.org/10.1038/nature09268>
- Brannock, P.M., Ortmann, A.C., Moss, A.G., and Halanynch, K.M. (2016) Metabarcoding reveals environmental factors influencing spatio-temporal variation in pelagic micro-eukaryotes. *Molecular Ecology* **25**(15), 3593–3604. <https://doi.org/10.1111/mec.13709>
- Bravo, I., and Figueroa, R.I. (2014) Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms* **2**(1), 11–32. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2010011>
- Bravo, I., Fraga, S., Figueroa, R.I., Pazos, Y., Massanet, A., and Ramilo, I. (2010) Bloom dynamics and life cycle strategies of two toxic dinoflagellates in a coastal upwelling system (NW Iberian Peninsula). *Deep-Sea Research*, **57**(3–4), 222–234. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2009.09.004>
- Breitburg, D.L., Loher, T., Pacey, C.A., and Gerstein, A. (1997) Varying effects of low dissolved oxygen on trophic interactions in an estuarine food web. *Ecological Monographs* **67**(4), 489–507. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1997\)067\[0489:VEOLD0\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1997)067[0489:VEOLD0]2.0.CO;2)
- Bressler, S.L., and Ahmed, S.I. (1984) Detection of glutamine synthetase activity in marine phytoplankton: optimization of the biosynthetic assay. *Marine Ecology Progress Series* **14**(2–3), 207–217. <https://www.jstor.org/stable/44634730>
- Bronk, D.A., and Ward, B.B. (1999) Gross and net nitrogen uptake and DON release in the euphotic zone of Monterey Bay, California. *Limnology and Oceanography* **44**(3), 573–585. <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3.0573>
- Brosnahan, M.L., Fischer, A.D., Lopez, C.B., Moore, S.K., and Anderson, D.M. (2020) Cyst-forming dinoflagellates in a warming climate. *Harmful Algae* **91**, 101728. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101728>
- Brown, C.A., and Ozretich, R.J. (2009) Coupling between the coastal ocean and Yaquina Bay, Oregon: Importance of oceanic inputs relative to other nitrogen sources. *Estuaries and Coasts* **32**, 219–237. <https://doi.org/10.1007/s12237-008-9128-6>
- Buchan, A., LeClerc, G.R., Gulvik, C.A., and González, J.M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology* **12**(10), 686–698.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>

- Burdige, D.J., and Zheng, S. (1998) The biogeochemical cycling of dissolved organic nitrogen in estuarine sediments. *Limnology and Oceanography* **43**(8), 1796–1813. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.8.1796>
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., and Simpson, A.G.B. (2020) The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* **35**(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>
- Burki, F., Sandin, M.M., and Jamy, M. (2021) Diversity and ecology of protists revealed by metabarcoding. *Current Biology* **31**(19), 1267–1280. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.066>
- Burns, W.G., Marchetti, A., and Ziervogel, K. (2019) Enhanced formation of transparent exopolymer particles (TEP) under turbulence during phytoplankton growth. *Journal of Plankton Research* **41**(3), 349–361. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbz018>
- Butman, B., Aretxabaleta, A. L., Dickhudt, P.J., Dalyander, P.S., Sherwood, C.R., Anderson, D.M., *et al.* (2014) Investigating the importance of sediment resuspension in Alexandrium fundyense cyst population dynamics in the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research* **103**, 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.10.011>

-C-

- Cabal, J., González-Nuevo, G., and Nogueira, E. (2008) Mesozooplankton species distribution in the NW and N Iberian shelf during spring 2004: Relationship with frontal structures. *Journal of Marine Systems* **72**(1-4), 282–297. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.05.013>
- Caballero, I., Fernández, R., Escalante, O.M., Mamán, L., and Navarro, G. (2020) New capabilities of Sentinel-2A/B satellites combined with in situ data for monitoring small harmful algal blooms in complex coastal waters. *Scientific Reports* **10**, 8743. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65600-1>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., and Holmes, S.P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caracciolo, M., Rigaut-Jalabert, F., Romac, S., Mahé, F., Gac, J.-P., Arsenieff, L., *et al.* (2021) Seasonal temporal dynamics of marine protists communities in tidally mixed coastal waters. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.09.15.460302>
- Caron, D.A., 1994. Inorganic Nutrients, Bacteria, and the Microbial Loop. *Microbial Ecology* **28**(2), 295–298. <https://doi.org/10.1007/BF00166820>
- Caron, D.A., and Countway, P.D. (2009) Hypotheses on the role of the protistan rare biosphere in a changing world. *Aquatic Microbial Ecology* **57**(3), 227–238. <https://doi.org/10.3354/ame01352>
- Caron, D.A., Countway, P.D., Jones, A.C., Kim, D.Y., and Schnetzer, A. (2012) Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science* **4**, 467–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802>
- Carstensen, J., Frohn, L.M., Hasager, C.B., and Gustafsson, B.G. (2005) Summer algal blooms in a coastal ecosystem: the role of atmospheric deposition versus entrainment fluxes. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **62**(4), 595–608. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.09.026>
- Carstensen, J., Henriksen, P., and Heiskanen, A.S. (2007) Summer algal blooms in shallow estuaries: Definition, mechanisms, and link to eutrophication. *Limnology and Oceanography* **52**(1), 370–384. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.1.0370>
- Carstensen, J., Klais, R., and Cloern, J.E. (2015) Phytoplankton blooms in estuarine and coastal waters: Seasonal patterns and key species. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **162**, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.005>
- Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews* **57**(4), 953–994. <https://doi.org/10.1128/mr.57.4.953-994.1993>

Bibliographic references

- Chapelle, A., Lazure, P., and Ménesguen, A. (1994) Modelling Eutrophication Events in a Coastal Ecosystem. Sensitivity Analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **39**(6), 529–548. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(06\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(06)80008-9)
- Chapelle, A., Ménesguen, A., Deslous-Paoli, J.M., Souchu, P., Mazouni, N., Vaquer, A., and Millet, B. (2000) Modelling nitrogen, primary production and oxygen in a Mediterranean lagoon. Impact of oysters farming and inputs from the watershed. *Ecological Modelling* **127**(2–3), 161–181. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(99\)00206-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(99)00206-9)
- Chen, Y., Xu, Q., Gibson, K., and Chen, N. (2021) Metabarcoding dissection of harmful algal bloom species in the East China Sea off Southern Zhejiang Province in late spring. *Marine Pollution Bulletin* **169**, 112586. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112586>
- Chesnick, J.M., Morden, C.W., and Schmieg, A.M. (1996) Identity of the endosymbiont of *Peridinium foliaceum* (Pyrrophyta): analysis of the rbcLS Operon. *Journal of Phycology* **32**(5), 850–857. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00850.x>
- Cheung, M.K., Au, C.H., Chu, K.H., Kwan, H.S., and Wong, C.K. (2010) Composition and genetic diversity of picoeukaryotes in subtropical coastal waters as revealed by 454 pyrosequencing. *ISME Journal* **4**, 1053–1059. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.26>
- Cheung, Y.Y., Cheung, S., Mak, J., Liu, K., Xia, X., Zhang, X., *et al.* (2021) Distinct interaction effects of warming and anthropogenic input on diatoms and dinoflagellates in an urbanized estuarine ecosystem. *Global Change Biology* **27**(15), 3463–3473. <https://doi.org/10.1111/gcb.15667>
- Chiesa, S., Lucentini, L., Chainho, P., Plazzi, F., Angélico, M.M., Ruano, F., *et al.* (2021) One in a million: Genetic diversity and conservation of the reference *Crassostrea angulata* population in europe from the sado estuary (Portugal). *Life* **11**(11), 1173. <https://doi.org/10.3390/life11111173>
- Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericket, R., Waterbury, J.B., and Welschmeyert, N.A. (1988) A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Letters to Nature* **334**, 340–343. <https://doi.org/10.1038/334340a0>
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., and Veron, B. (2008) Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology* **51**(1), 1–11. <https://doi.org/10.3354/ame01187>
- Cloern, J.E. (1996) Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Reviews of Geophysics* **34**(2), 127–168. <https://doi.org/10.1029/96RG00986>
- Cloern, J.E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* **210**, 223–253. <https://doi.org/10.3354/meps210223>
- Cloern, J.E., Jassby, A.D., Thompson, J.K., and Hieb, K.A. (2007) A cold phase of the East Pacific triggers new phytoplankton blooms in San Francisco Bay. *PNAS* **104**(47), 18561–18565. <https://doi.org/www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0706151104>
- Cloern, J.E., Schraga, T.S., and Lopez, C.B. (2005) Heat Wave Bring an Unprecedented Red Tide to San Francisco Bay. *Ocean Science* **86**(7), 66–66. <https://doi.org/10.1029/2005EO070003>
- Cochennec-Laureau, N., Schapira, M., Bouget, J.-F., Manach, S., Retho, M., Le Merrer, Y., *et al.* (2018) *Expertise sur le contexte hydro-climatologique de la Baie de Pénestin pour décrire les conditions physico-chimiques environnementales et l'impact possible sur les mortalités de moules*. DDTM 56 – Direction Départementale des territoires et de la mer du Morbihan, Délégation Mer et Littoral (DML), Pôle gestion de l'espace littoral et maritime, service aménagements mer et littoral (SAMEL), Unité Cultures Marine., Ref. LER/MPL/18.54/Tm – courrier du 31/07/2018, 37 pp. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00457/56879/> [In French]
- Cole, J.J. (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**, 291–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.13.110182.001451>
- Collos, Y., Vaquer, A., Laabir, M., Abadie, E., Laugier, T., Pastoureaud, A., and Souchu, P. (2007) Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon,

- southern France. *Harmful Algae* **6**(6), 781–789. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.04.003>
- Condie, S.A., Oliver, E.C.J., and Hallegraeff, G.M. (2019) Environmental drivers of unprecedented *Alexandrium catenella* dinoflagellate blooms off eastern Tasmania, 2012–2018. *Harmful Algae* **87**, 101628 <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101628>
- Conover, R.J. (1966) Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography* **11**(3), 338–345. <https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.3.0338>
- Corzo, A., Morillo, J.A., and Rodriguez, S. (2000) Production of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation. *Aquatic Microbial Ecology* **23**(1), 63–72. <https://doi.org/10.3354/ame023063>
- Corzo, A., Rodríguez-Gálvez, S., Lubian, L., Sangrá, P., Martínez, A., and Morillo, J.A. (2005) Spatial distribution of transparent exopolymer particles in the Bransfield Strait, Antarctica. *Journal of Plankton Research* **27**(7), 635–646. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi038>
- Costa, P.M., and Costa, M.H. (2012) Development and application of a novel histological multichrome technique for clam histopathology. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**(3), 411–414. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.013>
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., *et al.* (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **387**, 253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>
- Costanza, R., de Groot, R., Sutton, P., van der Ploeg, S., Anderson, S.J., Kubiszewski, I., *et al.* (2014) Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change* **26**(1), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.04.002>
- Cranford, P.J., Armsworthy, S.L., Mikkelsen, O.A., and Milligan, T.G. (2005) Food acquisition responses of the suspension-feeding bivalve *Placopecten magellanicus* to the flocculation and settlement of a phytoplankton bloom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **326**(2), 128–143. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.012>
- Crespo, B.G., Keafer, B.A., Ralston, D.K., Lind, H., Farber, D., and Anderson, D.M. (2011) Dynamics of *Alexandrium fundyense* blooms and shellfish toxicity in the Nauset Marsh System of Cape Cod (Massachusetts, USA). *Harmful Algae* **12**, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.009>
- Cui, Z., Xu, Q., Gibson, K., Liu, S., and Chen, N. (2021) Metabarcoding analysis of harmful algal bloom species in the Changjiang Estuary, China. *Science of the Total Environment* **782**, 146823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146823>

-D-

- Dagenais-Bellefeuille, S., and Morse, D. (2013) Putting the N in dinoflagellates. *Frontiers in Microbiology* **4**, 369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00369>
- Dakhama, A., de la Noüe, J., and Lavoie, M.C. (1993) Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* **5**, 297–306. <https://doi.org/10.1007/BF02186232>
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., and Moraga, D. (2005) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *The FEBS Journal* **272**(21), 5635–5652. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x>
- Decelle, J., Romac, S., Stern, R.F., Bendif, E.M., Zingone, A., Audic, S., *et al.* (2015) PhytoREF: A reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular Ecology Resources* **15**(6), 1435–1445. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12401>
- Decho, A.W., and Gutierrez, T. (2017) Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Frontiers in Microbiology* **8**, 922. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00922>
- Defossez, J.M., and Hawkins, A.J.S. (1997) Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large

- particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Marine Biology* **129**, 139–147. <https://doi.org/10.1007/s002270050154>
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., *et al.* (2017) Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* **26**(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., and Samain, J.F. (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* **254**(1–4), 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.006>
- Demory, D. (2017) Impact de la température sur le phytoplancton et ses interactions avec les virus. Océanographie. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. *PhD Thesis* [In French]. NNT : 2017PA066167. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01653093>
- Deng, L., Cheung, S., and Liu, H. (2020) Protistal Grazers Increase Grazing on Unicellular Cyanobacteria Diazotroph at Night. *Frontiers in Marine Science* **7**, 135. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00135>
- Deng, W., Cruz, B.N., and Neuer, S. (2016) Effects of nutrient limitation on cell growth, TEP production and aggregate formation of marine *Synechococcus*. *Aquatic Microbial Ecology* **78**(1), 39–49. <https://doi.org/10.3354/ame01803>
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A.Z., Robbens, S., *et al.* (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *PNAS* **103**(31), 11647–11652. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604795103>
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., *et al.* (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* **348**(6237), 1–11. <https://doi.org/10.1126/science.1261605>
- Dezfuli, B.S., Bosi, G., DePasquale, J.A., Manera, M., and Giari, L. (2016) Fish innate immunity against intestinal helminths. *Fish and Shellfish Immunology* **50**, 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.002>
- Díaz, F., and Raimbault, P. (2000) Nitrogen regeneration and dissolved organic nitrogen release during spring in a NW Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions): implications for the estimation of new production. *Marine Ecology Progress Series* **197**, 51–65. <https://www.jstor.org/stable/24855744>
- Díaz, P.A., Molinet, C., Seguel, M., Díaz, M., Labra, G., and Figueroa, R.I. (2018) Species diversity and abundance of dinoflagellate resting cysts seven months after a bloom of *Alexandrium catenella* in two contrasting coastal systems of the Chilean Inland Sea. *European Journal of Phycology* **53**(3), 410–421. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1455111>
- Díaz, P.A., Perez-Santos, I., Alvarez, G., Garreaud, R., Pinilla, E., Diaz, M., *et al.* (2021) Multiscale physical background to an exceptional harmful algal bloom of *Dinophysis acuta* in a fjord system. *Science of Total Environment* **773**, 145621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145621>
- Díaz, R.J., and Rosenberg, R. (1995) Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural response of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* **33**, 245–303.
- Díaz, R.J., and Rosenberg, R. (2008) Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science* **321**(5891), 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Dollive, S., Peterfreund, G.L., Sherrill-Mix, S., Bittinger, K., Sinha, R., Hoffmann, C., *et al.* (2012) A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome Biology* **13**(R60), 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-7-r60>
- Douglas, S.E., and Penny, S.L. (1999) The Plastid Genome of the Cryptophyte Alga, *Guillardia theta*: Complete Sequence and Conserved Synteny Groups Confirm Its Common Ancestry with Red Algae. *Molecular Evolution* **48**, 236–244. <https://doi.org/10.1007/pl00006462>
- Drouet, K., Jauzein, C., Herviot-Heath, D., Hariri, S., Laza-Martinez, A., Lecadet, C., *et al.* (2021) Current distribution and potential expansion of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. siamensis* towards the warming waters of the Bay of Biscay, North-East Atlantic. *Environmental Microbiology*

23(9), 4956–4979. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15406>

- Dubray, G., and Bezar, G. (1982) A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **119**(2), 325–329. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90593-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90593-0)
- Dupray, E., Caprais, M.P., Derrien, A., and Fach, P. (1997) *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. *Journal of Applied Microbiology* **82**(4), 507–510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00143.x>
- Dupuy, C., Vaquer, A., Lam-Höai, T., Rougier, C., Mazouni, N., Lautier, J., *et al.* (2000) Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Marine Ecology Progress Series* **205**, 171–184. <https://doi.org/10.3354/meps205171>
- Durkin, C.A., Koester, J.A., Bender, S.J., and Armbrust, E.V. (2016) The evolution of silicon transporters in diatoms. *Journal of Phycology* **52**(5), 716–731. <https://doi.org/10.1111/jpy.12441>

-E-

- Ekelund, N.G.A., and Aronsson, K.A. (2007) Changes in chlorophyll a fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. *Environmental and Experimental Botany* **59**(1), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.004>
- Elbrächter, M., and Schnepf, E. (1996) *Gymnodinium chlorophorum*, a new, green, bloom-forming dinoflagellate (Gymnodiniales, Dinophyceae) with a vestigial prasinophyte endosymbiont. *Phycologia* **35**(5), 381–393. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-5-381.1>
- Engel, A. (2002) Direct relationship between CO₂ uptake and transparent exopolymer particles production in natural phytoplankton. *Journal of Plankton Research* **24**(1), 49–53. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.1.49>
- Engel, A. (2004) Distribution of transparent exopolymer particles (TEP) in the northeast Atlantic Ocean and their potential significance for aggregation processes. *Deep-Sea Research* **51**(1), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2003.09.001>
- Engel, A., and Passow, U. (2001) Carbon and nitrogen content of transparent exopolymer particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Marine Ecology Progress Series* **219**, 1–10. <https://doi.org/10.3354/meps219001>
- Engel, A., Piontek, J., Grossard, H.-P., Riebesell, U., Schulz, K.G., and Sperling, M. (2014) Impact of CO₂ enrichment on organic matter dynamics during nutrient induced coastal phytoplankton blooms. *Journal of Plankton Research* **36**(3), 641–657. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt125>
- EUMOFA (2017) Observatoire Européen des marchés des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture. N°2/2017. Available online: <https://www.eumofa.eu/> (accessed on 24 February 2022).
- Evitt, W.R. (1985) Sporopollenin Dinoflagellate Cysts, their morphology and interpretation. *Micropaleontology* **32**(3), 282–285. <https://doi.org/10.2307/1485622>

-F-

- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., and Pouvreau, S. (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* **250**(1–2), 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.038>
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., and Taylor, F.J.R. (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **305**(5682), 354–360. <https://doi.org/10.1126/science.1095964>
- Fenchel, T. (2001) How Dinoflagellates Swim. *Protist* **152**(4), 329–338. <https://doi.org/10.1078/1434-4610->

00071

- Fenchel, T. (2008) The microbial loop - 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **366**(1–2), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.07.013>
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., and Falkowski, P. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**(5374), 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Finkel, Z.V., Beardall, J., Flynn, K.J., Quigg, A., Rees, T.A.V., and Raven, J.A. (2010) Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research* **32**(1), 119–137. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp098>
- Fitzsimons, M.F., Millward, G.E., Revitt, D.M., and Dawit, M.D. (2006). Desorption kinetics of ammonium and methylamines from estuarine sediments: Consequences for the cycling of nitrogen. *Marine Chemistry* **101**(1–2), 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.12.006>
- Foster-Smith, R.L. (1975) The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **17**(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90075-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90075-1)
- Fourquez, M. (2012) Rôle des bactéries hétérotrophes dans le couplage des cycles du fer et du carbone dans l’océan. Océanographie Biologique. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. *PhD Thesis* [In French]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15404.90247>
- Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**, 541–548. <https://doi.org/10.1038/21119>
- Fukao, T., Kimoto, K., and Kotani, Y. (2010) Production of transparent exopolymer particles by four diatom species. *Fisheries Science* **76**, 755–760. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0265-z>

-G-

- Galand, P.E., Casamayor, E.O., Kirchman, D.L., and Lovejoy, C. (2009) Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *PNAS* **106**(52), 22427–22432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908284106>
- Galimany, E., Lunt, J., Freeman, C.J., Reed, S., Segura-García, I., and Paul, V.J. (2017) Feeding behavior of eastern oysters *Crassostrea virginica* and hard clams *Mercenaria mercenaria* in shallow estuaries. *Marine Ecology Progress Series* **567**, 125–137. <https://doi.org/10.3354/meps12050>
- Gárate-Lizárraga, I., Muñetón-Gómez, M.S., Pérez-Cruz, B., and Díaz-Ortíz, J.A. (2014) Bloom of *Gonyaulax spinifera* (Dinophyceae: Gonyaulacales) in ensenada de la Paz Lagoon, Gulf of California. *CICIMAR Oceanides* **29**(1), 11–18. <http://dx.doi.org/10.37543/oceanides.v29i1.130>
- Gärdes, A., Iversen, M.H., Grossart, H.P., Passow, U., and Ullrich, M.S. (2011) Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME Journal* **5**, 436–445. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.145>
- Garvetto, A., Nézan, E., Badis, Y., Bilien, G., Arce, P., Bresnan, E., *et al.* (2018) Novel Widespread Marine Oomycetes Parasitising Diatoms, Including the Toxic Genus *Pseudo-nitzschia*: Genetic, Morphological, and Ecological Characterisation. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2918. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02918>
- Gavalás-Olea, A., Álvarez, S., Riobó, P., Rodríguez, F., Garrido, J.L., and Vaz, B. (2016) 19,19'-Diacyloxy Signature: An Atypical Level of Structural Evolution in Carotenoid Pigments. *Organic Letters* **18**(18), 4642–4645. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02272>
- Geider, R., Delucia, E., Falkowski, P., Finzi, A., Grime, J., Grace, J., *et al.* (2001) Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global*

- Change Biology* **7**(8), 849–882. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2001.00448.x>
- Genovesi, B., Laabir, M., Masseret, E., Collos, Y., Vaquer, A., and Grzebyk, D. (2009) Dormancy and germination features in resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). *Journal of Plankton Research* **31**(10), 1209–1224. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp066>
- Gentien, P. (1998) Bloom dynamics and ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* species complex. In : *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Eds. Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. NATO Advanced Science Institutes Series G: Ecological Sciences, Springer **41**, pp. 155-173
- Georges, O., Fernández, S., Martinez, J.L., and Garcia-Vazquez, E. (2021) DNA metabarcoding illustrates biological pollution threats of Red Sea - Dead Sea water conveyance to Dead Sea biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* **168**, 112451. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112451>
- Gernez, P., Doxaran, D., and Barillé, L. (2017) Shellfish aquaculture from space: potential of Sentinel2 to monitor tide-driven changes in turbidity, chlorophyll concentration and oyster physiological response at the scale of an oyster farm. *Frontiers in Marine Science* **4**, 137. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00137>
- Gerritsen, J., and Strickler, J.R. (1977) Encounter Probabilities and Community Structure in Zooplankton: a mathematical Model. *Journal of the Fisheries Board of Canada* **34**(1), 73-82. <https://doi.org/10.1139/f77-008>
- Ghosh, S. (2020) *Sialic acids and sialoglycoconjugates in the biology of life, health and disease*. Ed. Academic Press Elsevier. 358 pp. ISBN : 9780128161265
- Giacobbe, M.G., Oliva, F.D., and Maimone, G. (1996) Environmental Factors and Seasonal Occurrence of the Dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP Potential Producer, in a Mediterranean Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **42**(5), 539–549. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0035>
- Gilerson, A.A., Gitelson, A.A., Zhou, J., Gurlin, D., Moses, W., Ioannou, I., and Ahmed, S.A. (2010) Algorithms for remote estimation of chlorophyll-a in coastal and inland waters using red and near infrared bands. *Optics Express* **18**(23), 24109-24125. <https://doi.org/10.1364/OE.18.024109>
- Girault, M., Siano, R., Labry, C., Latimier, M., Jauzein, C., Beneyton, T., et al. (2021) Variable inter and intraspecies alkaline phosphatase activity within single cells of revived dinoflagellates. *The ISME Journal* **15**, 2057-2069. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00904-2>
- Gitelson, A. (1992) The peak near 700 nm on radiance spectra of algae and water: relationships of its magnitude and position with chlorophyll concentration. *International Journal of Remote Sensing* **13**(17), 3367-3373. <https://doi.org/10.1080/01431169208904125>
- Glé, C., Del Amo, Y., Bec, B., Sautour, B., Froidefond, J.M., Gohin, F., et al. (2007) Typology of environmental conditions at the onset of winter phytoplankton blooms in a shallow macrotidal coastal ecosystem, Arcachon Bay (France). *Journal of Plankton Research* **29**(11), 999–1014. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm074>
- Glibert, P.M., Berdalet, E., Burford, M.A., Pitcher, G.C., and Zhou, M. (2018) *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*. Ed. Springer, Ecological Studies **232**, 461 pp. ISBN : 978-3-319-70068-7
- Glibert, P.M., Fullerton, D., Burkholder, J.M., Cornwell, J.C., and Kana, T.M. (2011) Ecological Stoichiometry, Biogeochemical Cycling, Invasive Species, and Aquatic Food Webs: San Francisco Estuary and Comparative Systems. *Reviews in Fisheries Science* **19**(4), 358–417. <https://doi.org/10.1080/10641262.2011.611916>
- Glibert, P.M., Wilkerson, F.P., Dugdale, R.C., Raven, J.A., Dupont, C.L., Leavitt, P.R., et al. (2016) Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnology and Oceanography* **61**(1), 165–197. <https://doi.org/10.1002/lno.10203>
- Gobler, C.J., Berry, D.L., Anderson, O.R., Burson, A., Koch, F., Rodgers, B.S., et al. (2008) Characterization, dynamics, and ecological impacts of harmful *Cochlodinium polykrikoides* blooms on eastern Long

- Island, NY, USA. *Harmful Algae* **7**(3), 293–307. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.12.006>
- Gobler, C.J., Doherty, O.M., Hattenrath-Lehmann, T.K., Griffith, A.W., Kang, Y., and Litaker, R.W. (2017) Ocean warming since 1982 has expanded the niche of toxic algal blooms in the North Atlantic and North Pacific oceans. *PNAS* **114**(19), 4975–4980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619575114>
- Gobler, C.J., Koch, F., Kang, Y., Berry, D.L., Tang, Y.Z., Lasi, M., *et al.* (2013) Expansion of harmful brown tides caused by the pelagophyte, *Aureoumbra lagunensis* DeYoe et Stockwell, to the US east coast. *Harmful Algae* **27**, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.04.004>
- Gómez, F. (2012) A checklist and classification of living dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *CICIMAR Océanides* **27**(1), 65–140. <https://doi.org/10.37543/oceanides.v27i1.111>
- Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Chavarria, J., and Niell, F.X. (2001) Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis*. *Photosynthesis Research* **68**, 225–235. <https://doi.org/10.1023/a:1012969324756>
- Gran-Stadniczeńko, S., Egge, E., Hostyeva, V., Logares, R., Eikrem, W., and Edvardsen, B. (2018) Protist Diversity and Seasonal Dynamics in Skagerrak Plankton Communities as Revealed by Metabarcoding and Microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **66**(3), 494–513. <https://doi.org/10.1111/jeu.12700>
- Gray, J.S., Wu, R.S.S., and Or, Y.Y. (2002) Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Marine Ecology Progress Series* **238**, 249–279. <https://doi.org/10.3354/meps238249>
- Gregg, W.W., Casey, N.W., and McClain, C.R. (2005) Recent trends in global ocean chlorophyll. *Geophysical Research Letters* **32**(3), 1–5. <https://doi.org/10.1029/2004GL021808>
- Gregoire, G., Le Roy, P., Ehrhold, A., Jouet, G., and Garlan, T. (2017) Control factors of Holocene sedimentary infilling in a semi-closed tidal estuarine-like system: the bay of Brest (France). *Marine Geology* **385**, 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2016.11.005>
- Gribsholt, B., Boschker, H.T.S., Struyf, E., Andersson, M., Tramper, A., De Brabandere, L., *et al.* (2005) Nitrogen processing in a tidal freshwater marsh: A whole-ecosystem ¹⁵N labeling study. *Limnology and Oceanography* **50**(6), 1945–1959. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.6.1945>
- Grossart, H.P. (1999) Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology* **19**(1), 1–11. <https://doi.org/10.3354/ame019001>
- Grossart, H.P., Simon, M., and Logan, B.E. (1997) Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. *Limnology and Oceanography* **42**(8), 1651–1659. <https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.8.1651>
- Guardiola, M., Uriz, M.J., Taberlet, P., Coissac, E., Wangenstein, O.S., and Turon, X. (2015) Deep-sea, deep-sequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLoS One* **11**(4), e0153836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139633>
- Guerrini, F., Mazzotti, A., Boni, L., and Pistocchi, R. (1998) Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology* **15**(3), 247–253. <http://doi.org/10.3354/ame015247>
- Guillard, R.R.L., and Hargraves, P.E. (1993) *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **32**(3), 234–236. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1>
- Guillaud, J.F., Aminot, A., Delmas, D., Gohin, F., Lunven, M., Labry, C., and Herbland, A. (2008) Seasonal variation of riverine nutrient inputs in the northern Bay of Biscay (France), and patterns of marine phytoplankton response. *Journal of Marine Systems* **72**(1–4), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.03.010>
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, *et al.* (2013) The Protist Ribosomal Reference database (PR2): A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research* **41**(D1), D597–D604. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>

-H-

- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., *et al.* (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* **9**(5), 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.01.003>
- Hall, N.S., Paerl, H.W., Peierls, B.L., Whipple, A.C., and Rossignol, K.L. (2013) Effects of climatic variability on phytoplankton community structure and bloom development in the eutrophic, microtidal, New River Estuary, North Carolina, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **117**, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.10.004>
- Hallegraeff, G.M. (1986) Taxonomy and morphology of the marine plankton diatoms *Thalassionema* and *Thalassiothrix*. *Diatom Research* **1**(1), 57–80. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1986.9704958>
- Hallegraeff, G.M. (2010) Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology* **46**(2), 220–235. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x>
- Hallegraeff, G.M., Enevoldsen, H., and Zingone, A. (2021) Global harmful algal bloom status reporting. *Harmful Algae* **102**, 101992. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101992>
- Hanley, K.T., Wuertz, S., Schriewer, A., Passow, U., Smith, W., Olin, P., and Shapiro, K. (2018) Effects of salinity and transparent exopolymer particles on formation of aquatic aggregates and their association with norovirus. *Science of the Total Environment* **643**, 1514–1521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.300>
- Hansen, D.V, and Rattray, M. (1966) New dimensions in estuary classification. *Limnology and Oceanography* **11**(3), 319–326. <https://www.jstor.org/stable/2833361>
- Hansen, G., Botes, L., and de Salas, M. (2007) Ultrastructure and large subunit rDNA sequences of *Lepidodinium viride* reveal a close relationship to *Lepidodinium chlorophorum* comb. nov. (= *Gymnodinium chlorophorum*). *Phycological Research* **55**(1), 25–41. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00442.x>
- Hansen, G., and Moestrup, Ø. (2005) Flagellar apparatus and nuclear chambers of the green dinoflagellate *Gymnodinium chlorophorum*. *Phycological Research* **53**(2), 169–181. <https://doi.org/10.1111/j.1440-183.2005.00383.x>
- Hara, Y., and Chihara, M. (1987) Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of the Raphidophycean Alga *Heterosigma akashiwo*. *The Botanical Magazine, Tokyo* **100**, 151–163. <https://doi.org/10.1007/BF02488320>
- Harmel, T., Chami, M., Tormos, T., Reynaud, N., and Danis, P.A. (2018) Sunlight correction of the Multi-Spectral Instrument (MSI)-SENTINEL-2 imagery over inland and sea waters from SWIR bands. *Remote Sensing of Environment* **204**, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2017.10.022>
- Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., and Shigeta, S. (1995) *In vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *International Journal of Biological Macromolecules* **17**(5), 293–297. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)98157-T](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)98157-T)
- Havskum, H., Hansen, P.J., and Berdalet, E. (2005) Effect of turbulence on sedimentation and net population growth of the dinoflagellate *Ceratium tripos* and interactions with its predator, *Fragilidium subglobosum*. *Limnology and Oceanography* **50**(5), 1543–1551. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1543>
- Hawkins, A.J.S., Fang, J.G., Pascoe, P.L., Zhang, J.H., Zhang, X.L., and Zhu, M.Y. (2001) Modelling short-term responsive adjustments in particle clearance rate among bivalve suspension-feeders: separate unimodal effects of seston volume and composition in the scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **262**(1), 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00282-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00282-9)
- Hégaret, H., Brokordt, K.B., Gaymer, C.F., Lohrmann, K.B., García, C., and Varela, D. (2012) Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern

- scallop *Argopecten purpuratus*. *Harmful Algae* **18**, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.04.006>
- Hégaret, H., Smolowitz, R.M., Sunila, I., Shumway, S.E., Alix, J., Dixon, M., and Wikfors, G.H. (2010) Combined effects of a parasite, QPX, and the harmful-alga, *Prorocentrum minimum* on northern quahogs, *Mercenaria mercenaria*. *Marine Environmental Research* **69**(5), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.12.008>
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., and Shumway, S.E. (2007) Diverse feeding responses of five species of bivalves mollusc when exposed to there species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research* **26**(2), 549–559. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[549:DFROFS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[549:DFROFS]2.0.CO;2)
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., *et al.* (2008) Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* **8**(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>
- Herreid, C.F. (1980) Hypoxia in invertebrates. *Comparative Biochemisty and Physiology* **67**(3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(80\)80002-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(80)80002-8)
- Hicks, D.W., and McMahon, R.F. (2002) Respiratory responses to temperature and hypoxia in the nonindigenous Brown Mussel, *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), from the Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **277**(1), 61–78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00276-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00276-9)
- Holligan, P.M., Fcrrmindcz, E., Aikcn, J., Balch, W.M., Boyd, P., Burkill, P.H., *et al.* (1993) A biogeochemical study of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*, in the North Atlantic. *Global Biogeochemical Cycles* **7**(4), 879–900. <https://doi.org/10.1029/93GB01731>
- Hong, Y., Smith, W.O., and While, A.-M. (1997) Studies on transparents exopolymer particles (TEP) produced in the Ross Sea (Anatartica) and by *Phaeocystis Antartica* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology* **33**(3), 368–376. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00368.x>
- Honsell, G., and Talarico, L. (2004) *Gymnodinium chlorophorum* (Dinophyceae) in the Adriatic Sea: Electron microscopical observations. *Botanica Marina* **47**(2), 152–166. <https://doi.org/10.1515/BOT.2004.016>
- Honsell, G., Talarico, L., and Cabrini, M. (1988) Interesting ultrastructural features of a green dinoflagellate. *Giornale Botanico Italiano* **122**(1-2), 76–78
- Hoppenrath, M. (2017) Dinoflagellate taxonomy — a review and proposal of a revised classification. *Marine Biodiversity* **47**, 381–403. <https://doi.org/10.1007/s12526-016-0471-8>
- Horiguchi, T. (2006) Algae and their chloroplasts with particular reference to the dinoflagellates. *Paleontological Research* **10**(4), 299–309. <https://doi.org/10.2517/prpsj.10.299>
- Houde, E.D., and Rutherford, E.S. (1993) Recent Trends in Estuarine Fisheries: Predictions of Fish Production and Yield. *Estuaries* **16**(2), 161–176. <https://doi.org/10.2307/1352488>
- Howe, C.J., Barbrook, A.C., Nisbet, R.E.R., Lockhart, P.J., and Larkum, A.W.D. (2008) The origin of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **363**(1504), 2675–2685. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0050>
- Huang, H., Xu, Q., Gibson, K., Chen, Y., and Chen, N. (2021) Molecular characterization of harmful algal blooms in the Bohai Sea using metabarcoding analysis. *Harmful Algae* **106**, 102066. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102066>

—|—

- Iglesias, J.I.P., Urrutia, M.B., Navarro, E., and Ibarrola, I. (1998) Measuring feeding and absorption in suspension-feeding bivalves: An appraisal of the biodeposition method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **219**(1–2), 71–86. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00175-5)
- Illoul, H., Masó, M., Fortuño, J.-M., Cros, L., Morales-Blake, A., and Séridji, R. (2008) Potentially harmful microalgae in coastal waters of the Algiers area (Southern Mediterranean Sea). *Cryptogamie Algologie* **29**(3), 261–278.

- Iriarte, J.L., Quiñones, R.A., and González, R.R. (2005) Relationship between biomass and enzymatic activity of a bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) in southern Chile (41° S): a field approach. *Journal of Plankton Research* **27**(2), 159–166. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh167>
- Iuculano, F., Mazuecos, I.P., Reche, I. and Agusti, S. (2017) Prochlorococcus as a possible source for transparent exopolymer particles (TEP). *Frontiers in Microbiology* **8**, 709. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00709>
- Iverson, R.L., Curl, H.C., O'Connors, H.B., Kirk, J.D., and Zakar, K. (1974) Summer phytoplankton blooms in Auke Bay, Alaska, driven by wind mixing of the water column. *Limnology and Oceanography* **19**(2), 271–278. <https://doi.org/10.4319/lo.1974.19.2.0271>
- Izzetoğlu, S., Şahar, U., Şener, E., and Devenci, R. (2014) Determination of sialic acids in immune system cells (coelomocytes) of sea urchin, *Paracentrotus lividus*, using capillary LC-ESI-MS/MS. *Fish and Shellfish Immunology* **36**(1), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.029>

-J-

- Jackson, C., Knoll, A.H., Chan, C.X., and Verbruggen, H. (2018) Plastid phylogenomics with broad taxon sampling further elucidates the distinct evolutionary origins and timing of secondary green plastids. *Scientific Reports* **8**, 1523. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18805-w>
- Janouškovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukeš, J., and Keeling, P.J. (2010) A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *PNAS* **107**(24), 10949–10954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003335107>
- Jauzein, C., Couet, D., Blasco, T., and Lemée, R. (2017). Uptake of dissolved inorganic and organic nitrogen by the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* **65**, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.005>
- Jenkinson, I.R. (1986) Oceanographic implications of non-newtonian properties found in phytoplankton cultures. *Nature* **323**, 435–437. <https://doi.org/10.1038/323435a0>
- Jenkinson, I.R., and Biddanda, B.A. (1993) Bulk-phase viscoelastic properties of seawater relationship with plankton components. *Journal of Plankton Research* **17**(12), 2251–2274. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.12.2251>
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Kang, N.S., Rho, J.R., Seong, K.A., Park, J.W., et al. (2010a) Ecology of *Gymnodinium aureolum*. I. Feeding in western Korean waters. *Aquatic Microbial Ecology* **59**(3), 239–255. <https://doi.org/10.3354/ame01394>
- Jeong, H. J., Yoo, Y., Kim, J.S., Seong, K.A., Kang, N.S., and Kim, T.H. (2010b) Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal* **45**(2), 65–91. <https://doi.org/10.1007/s12601-010-0007-2>
- Ji, R., and Franks, P.J.S. (2007) Vertical migration of dinoflagellates: Model analysis of strategies, growth, and vertical distribution patterns. *Marine Ecology Progress Series* **344**, 49–61. <https://doi.org/10.3354/meps06952>
- Johnson, P., and Sieburth, J. (1979) Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography* **24**(5), 928–935. <https://doi.org/10.4319/LO.1979.24.5.0928>
- Joint, I., Henriksen, P., Fonnes, G.A., Bourne, D., Thingstad, T.F., and Riemann, B. (2002) Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology* **29**(2), 145–159. <https://doi.org/10.3354/ame029145>
- Jones, C.G., Lawton, J.H., and Shachak, M. (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**, 373–386. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4018-1_14

-K-

- Kach, D.J., and Ward, J.E. (2008) The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton-size particles by suspension-feeding molluscs. *Marine Biology* **153**, 797–805. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0852-4>
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F.G., and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochemical Journal* **151**(3), 491-495. <https://doi.org/10.1042/bj1510491>
- Kamikawa, R., Tanifuji, G., Kawachi, M., Miyashita, H., Hashimoto, T., and Inagaki, Y. (2015) Plastid genome-based phylogeny pinpointed the origin of the green-colored plastid in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Genome Biology and Evolution* **7**(4), 1133–1140. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv060>
- Kang, C.K., Lee, Y.W., Choy, E.J., Shin, J.K., Seo, I.S., and Hong, J.S. (2006) Microphytobenthos seasonality determines growth and reproduction in interannual bivalves. *Marine Ecology Progress Series* **315**, 113–127. <https://doi.org/10.3354/meps315113>
- Karasiewicz, S., Chapelle, A., Bacher, C., and Soudant, D. (2020) Harmful algae niche responses to environmental and community variation along the French coast. *Harmful Algae* **93**, 101785. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101785>
- Karlson, B., Andersen, P., Arneborg, L., Cembella, A., Eikrem, W., John, U., *et al.* (2021) Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae* **102**, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101989>
- Karp-boss, L., Boss, E., and Jumars, P.A. (1996) Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanography and Marine Biology: Annual review* **34**, 71–107
- Keeling, P.J. (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany* **91**(10), 1481–1493. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1481>
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D.G., Lang, B.F., Lee, R.W., Pearlman, R.E., *et al.* (2005) The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* **20**(12), 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.09.005>
- Keeling, P.J., and Burki, F. (2019) Progress towards the Tree of Eukaryotes. *Current Biology* **29**(16), R808–R817. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.031>
- Keller, M.D., Selin, R.C., Claus, W., and Guillard, R.R.L. (1987) Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology* **23**(4), 633-638. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04217.x>
- Keppeler, C.J., Hoguet, J., Smith, K., Ringwood, A.H., and Lewitus, A.J. (2005) Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* **4**(2), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.05.002>
- Kesaulya, I., Leterme, S.C., Mitchell, J.G., and Seuront, L. (2008) The impact of turbulence and phytoplankton dynamics on foam formation, seawater viscosity and chlorophyll concentration in the eastern English Channel. *Oceanologia* **50**, 167-182
- Khan, A.K., Kausar, H., Jaferi, S.S., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B.H., and Anjum, S. (2020) An insight into the algal evolution and genomics. *Biomolecules* **10**(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biom10111524>
- Khodse, V.B., and Bhosle, N.B. (2011) Bacterial utilization of size-fractionated dissolved organic matter. *Aquatic Microbial Ecology* **64**(3), 299–309. <https://doi.org/10.3354/ame01529>
- Khokhar, F.N., Ahmed, N., Ali, A., Gabol, K., Khooharo, A.R., Faheem, M., *et al.* (2021) Distribution and abundance of dinoflagellates from the coastal waters of karachi, pakistan, northern part of the arabian sea. *Brazilian Journal of Biology* **82**, e245124. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.245124>
- Kieselbach, T., Cheregi, O., Green, B.R., and Funk, C. (2018) Proteomic analysis of the phycobiliprotein antenna of the cryptophyte alga *Guillardia theta* cultured under different light intensities. *Photosynthesis Research* **135**(1–3), 149–163. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0400-0>

- Kjørboe, T., and Hansen, J.L.S. (1993) Phytoplankton aggregate formation: observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *Journal of Plankton Research* **15**(9), 993–1018. <https://doi.org/10.1093/plankt/15.9.993>
- Kjørboe, T., Ploug, H., and Thygesen, U.H. (2001) Fluid motion and solute distribution around sinking aggregates. I. Small-scale fluxes and heterogeneity of nutrients in the pelagic environment. *Marine Ecology Progress Series* **211**, 1–13. <https://doi.org/10.3354/meps211001>
- Kirchman, D.L. (1994) The Uptake of Inorganic Nutrients by Heterotrophic Bacteria. *Microbial Ecology* **28**(2), 255–271. <https://doi.org/10.1007/BF00166816>
- Kirchman, D.L. (1999) Phytoplankton death in the sea. *Nature* **398**, 293–294. <https://doi.org/10.1038/18570>
- Kirchman, D.L., Morán, X.A.G., and Ducklow, H. (2009) Microbial growth in the polar oceans - Role of temperature and potential impact of climate change. *Nature Reviews Microbiology* **7**(6), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2115>
- Kirn, S.L., Townsend, D.W., and Pettigrew, N.R. (2005) Suspended *Alexandrium* spp. hypnozygote cysts in the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research* **52**(19-21), 2543–2559. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.06.009>
- Kjerfve, B. (1994) Coastal Lagoon Processes. *Chapter 1 Coastal Lagoons*. Ed. Kjerfve, B. Elsevier Oceanography Series. **60**, pp. 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0422-9894\(08\)70006-0](https://doi.org/10.1016/S0422-9894(08)70006-0)
- Klouch, K.Z. (2016) Paléoécologie des protistes à partir d'archives biologiques provenant d'écosystèmes marins côtiers. Ecologie, Environnement. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. *PhD Thesis* [In French]. NNT : 2016PA066280. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01499148/>
- Klouch, K.Z., Schmidt, S., Andrieux-Loyer, F., Le Gac, M., Hervio-Heath, D., Qui-Minet, Z.N., *et al.* (2016) Historical records from dated sediment cores reveal the multidecadal dynamic of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Bay of Brest (France). *FEMS Microbiology Ecology* **92**(7), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw101>
- Kononen, K., Huttunen, M., Hällfors, S., Gentien, P., Lunven, M., Huttula, T., *et al.* (2003) Development of a deep chlorophyll maximum of *Heterocapsa triquetra* Ehrenb. at the entrance to the Gulf of Finland. *Limnology and Oceanography* **48**(2), 594–607. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.2.0594>
- Kooijman, S.A.L.M. (2010) *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press. 424 pp. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511565403>
- Kremp, A., and Anderson, D.M. (2000) Factors regulating germination of resting cysts of the spring bloom dinoflagellate *Scrippsiella hangoei* from the northern Baltic Sea. *Journal of Plankton Research* **22**(7), 1311–1327. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.7.1311>
- Kromkamp, J.C., and Forster, R.M. (2003) The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology* **38**(2), 103–112. <https://doi.org/10.1080/0967026031000094094>

-L-

- Labry, C., Erard-Le Denn, E., Chapelle, A., Fauchot, J., Youenou, A., Crassous, M.P., *et al.* (2008) Competition for phosphorus between two dinoflagellates: A toxic *Alexandrium minutum* and a non-toxic *Heterocapsa triquetra*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **358**(2), 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.025>
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685. <http://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lajeunesse, T.C., Lambert, G., Andersen, R.A., Coffroth, M.A., and Galbraith, D.W. (2005) *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *Journal of Phycology* **41**(4), 880–886. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2005.04231.x>

Bibliographic references

- Lambert, S., Lozano, J.C., Bouget, F.Y., and Galand, P.E. (2021) Seasonal marine microorganisms change neighbours under contrasting environmental conditions. *Environmental Microbiology* **23**(5), 2592–2604. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15482>
- Larsen, P.S., and Riisgård, H.U. (2009) Viscosity and not biological mechanisms often controls the effects of temperature on ciliary activity and swimming velocity of small aquatic organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **381**(2), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.09.021>
- Lassudrie, M., Hégaret, H., Wikfors, G.H., and da Silva, P.M. (2020) Effects of marine harmful algal blooms on bivalve cellular immunity and infectious diseases: A review. *Developmental and Comparative Immunology* **108**, 103660. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103660>
- Lassudrie, M., Soudant, P., Richard, G., Henry, N., Medhioub, W., da Silva, P.M., et al. (2014) Physiological responses of Manila clams *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure. *Aquatic Toxicology* **154**, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.002>
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., et al. (2004) Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **17**(2), 207–214. <https://doi.org/10.1051/alr:2004012>
- Lavigne, H., Van der Zande, D., Ruddick, K., Dos Santos, J.C., Gohin, F., Brotas, V., and Kratzer, S. (2021) Quality-control tests for OC4, OC5 and NIR-red satellite chlorophyll-a algorithms applied to coastal waters. *Remote Sensing of Environment* **255**, 112237. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2020.112237>
- Lazure, P., Garnier, V., Dumas, F., Herry, C., and Chifflet, M. (2009) Development of a hydrodynamic model of the Bay of Biscay. Validation of hydrology. *Continental Shelf Research* **29**(8), 985–997. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2008.12.017>
- Lazure, P., and Jégou, A.M. (1998) 3D modelling of seasonal evolution of Loire and Gironde plumes on Biscay Bay continental shelf. *Oceanologica Acta* **21**(2), 165–177. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(98\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(98)80006-6)
- Lazure, P., and Salomon, J.C. (1991) Coupled 2-D and 3-D modelling of coastal hydrodynamics. *Oceanologica Acta* **14**(2), 173–180
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*. **25**, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Leander, B.S., and Keeling, P.J. (2003) Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **18**(8), 395–402. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00152-6)
- Le Bescot, N. (2014) Patrons de biodiversité à l'échelle globale chez les dinoflagellés planctoniques marins. Sciences du Vivant. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. *PhD Thesis* [In French]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00974287v1>
- Le Bescot, N., Mahé, F., Audic, S., Dimier, C., Garet, M. J., Poulain, J., et al. (2016) Global patterns of pelagic dinoflagellate diversity across protist size classes unveiled by metabarcoding. *Environmental Microbiology* **18**(2), 609–626. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13039>
- Lee, S.Y., Jeong, H.J., Kang, N.S., Jang, T.Y., Jang, S.H., and Lajeunesse, T.C. (2015) *Symbiodinium tridacnidorum* sp. nov., a dinoflagellate common to Indo-Pacific giant clams, and a revised morphological description of *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, emended Trench & Blank. *European Journal of Phycology* **50**(2), 155–172. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1018336>
- Lee, Z.P., Du, K.P., and Arnone, R. (2005) A model for the diffuse attenuation coefficient of downwelling irradiance. *Journal of Geophysical Research* **110**(C2), 1–10. <https://doi.org/10.1029/2004JC002275>
- Le Moullac, G., Quéau, I., Le Souchu, P., Pouvreau, S., Moal, J., Coz, J.R., and Samain, J.F. (2007) Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research* **3**(5), 357–366. <https://doi.org/10.1080/17451000701635128>
- Levin, L.A., Ekau, W., Gooday, A.J., Jorissen, F., Middelburg, J.J., Naqvi, S.W.A., et al. (2009) Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos. *Biogeosciences* **6**, 2063–2098.

- <https://doi.org/10.5194/bg-6-2063-2009>
- Lewis, J. (1988) Cysts and sediments: *Gonyaulax Polyedra* (*Lingulodinium machaerophorum*) in Loch Creran. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **68**(4), 701–714. <https://doi.org/10.1017/S0025315400028812>
- Lewis, L.A., and McCourt, R.M. (2004) Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* **91**(10), 1535–1556. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>
- Li, B., Ward, J.E., and Holohan, B.A. (2008) Transparent exopolymer particles (TEP) from marine suspension feeders enhance particle aggregation. *Marine Ecology Progress Series* **357**, 67–77. <https://doi.org/10.3354/meps07290>
- Li, Y., Lei, X., Zhu, H., Zhang, H., Guan, C., Chen, Z., et al. (2016) Chitinase producing bacteria with direct algicidal activity on marine diatoms. *Scientific Reports* **6**, 21984. <http://doi.org/10.1038/srep21984>
- Li, Y., Zhu, H., Lei, X., Zhang, H., Guan, C., Chen, Z., et al. (2015) The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. Y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Journal of Hazardous Materials* **290**, 87–95. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.070>
- Lin, C.H., Flynn, K.J., Mitra, A., and Glibert, P.M. (2018) Simulating effects of variable stoichiometry and temperature on mixotrophy in the harmful dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. *Frontiers in Marine Science* **5**, 320. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00320>
- Lips, U., Lips, I., Liblik, T., and Kuvaldina, N. (2010) Processes responsible for the formation and maintenance of sub-surface chlorophyll maxima in the Gulf of Finland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **88**(3), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.04.015>
- Litchman, E., and Klausmeier, C.A. (2008) Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**, 615–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173549>
- Liu, H., and Buskey, E.J. (2000) The exopolymer secretions (EPS) layer surrounding *Aureoumbra lagunensis* cells affects growth, grazing, and behavior of protozoa. *Limnology and Oceanography* **45**(5), 1187–1191. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.5.1187>
- Liu, K., Ng, H.Y.T., Zhang, S., and Liu, H. (2021) Effects of temperature on a mixotrophic dinoflagellate (*Lepidodinium* sp.) under different nutritional strategies. *Marine Ecology Progress Series* **678**, 37–49. <https://doi.org/10.3354/meps13865>
- Liu, S., Gibson, K., Cui, Z., Chen, Y., Sun, X., and Chen, N. (2020) Metabarcoding analysis of harmful algal species in Jiaozhou Bay. *Harmful Algae* **92**, 101772. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101772>
- Liu, Y., Zhang, J., Zhao, L., Li, Y., Dai, Y., and Xie, S. (2015). Distribution of sediment ammonia-oxidizing microorganisms in plateau freshwater lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 4435–4444. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6341-z>
- Logares, R., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Christen, R., et al. (2014) Patterns of rare and abundant marine microbial eukaryotes. *Current Biology* **24**(8), 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.050>
- Logares, R., Mangot, J.F., and Massana, R. (2015) Rarity in aquatic microbes: Placing protists on the map. *Research in Microbiology* **166**(10), 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.09.009>
- Lovejoy, C., Bowman, J.P., and Hallegraeff, G.M. (1998) Algicidal effects of a novel marine *Pseudomonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium* and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(8), 2806–2813. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.2806-2813.1998>
- Lu, X., Zhou, B., Xu, L., Liu, L., Wang, G., Liu, X., and Tang, X. (2016) A marine algicidal *Thalassiosira* and its active substance against the harmful algal bloom species *Karenia mikimotoi*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 5131–5139. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7352-8>
- Lucas, L.V., Koseff, J.R., Monismith, S.G., Cloern, J.E., and Thompson, J.K. (1999a) Processes governing phytoplankton blooms in estuaries. II: The role of horizontal transport. *Marine Ecology Progress Series*

187, 17-30. <https://doi.org/10.3354/meps187017>

Lucas, L.V., Koseff, J.R., Cloern, J.E., Monismith, S.G., and Thompson, J.K. (1999b) Processes governing phytoplankton blooms in estuaries. I: The local production-loss balance. *Marine Ecology Progress Series* **187**, 1-15. <https://doi.org/10.3354/meps187001>

Lundholm, N., Ribeiro, S., Andersen, T.J., Koch, T., Godhe, A., Ekelund, F., and Ellegaard, M. (2011). Buried alive - Germination of up to a century-old marine protist resting stages. *Phycologia* **50**(6), 629–640. <https://doi.org/10.2216/11-16.1>

Lyons, M.M., Lau, Y.T., Carden, W.E., Ward, J.E., Roberts, S.B., Smolowitz, R., *et al.* (2007) Characteristics of marine aggregates in shallow-water ecosystems: Implications for disease ecology. *EcoHealth* **4**(4), 406–420. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0134-0>

-M-

Macdonald, B.A., and Ward, J.E. (1994) Variation in food quality and particle selectivity in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Ecology Progress Series* **108**(3), 251–264. <https://www.jstor.org/stable/24846156>

Macey, B.M., Achiliu, I.O., Burnett, K.G., and Burnett, L.E. (2008) Effects of hypercapnic hypoxia on inactivation and elimination of *Vibrio campbellii* in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(19), 6077–6084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00317-08>

MacKeigan, P.W., Garner, R.E., Monchamp, M.E., Walsh, D.A., Onana, V.E., Kraemer, S.A., *et al.* (2022) Comparing microscopy and DNA metabarcoding techniques for identifying cyanobacteria assemblages across hundreds of lakes. *Harmful Algae* **113**, 102187. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102187>

Maggi, P., Mastouri, A., and Soulard, L. (1985) *Analyse des facteurs climatiques susceptibles de jouer un rôle dans les apparitions d'eaux colorées en baie de Vilaine, durant l'année 1982*. Ed. Ifremer, France. Rapport, 33 pp. [In French]

Main-Knorn, M., Pflug, B., Louis, J., Debaecker, V., Müller-Wilm, U., and Gascon, F. (2017) Sen2Cor for Sentinel-2. *SPIE* **10427**, 1042704. <https://doi.org/10.1117/12.2278218>

Mandal, S.K., Singh, R.P., and Patel, V. (2011) Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Secreted by a Toxic Dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and Its Probable Role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microbial Ecology* **62**, 518–527. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9852-5>

Mangot, J.F., Domaizon, I., Taib, N., Marouni, N., Duffaud, E., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Short-term dynamics of diversity patterns: Evidence of continual reassembly within lacustrine small eukaryotes. *Environmental Microbiology* **15**(6), 1745–1758. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12065>

Margalef, R. (1978) Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* **1**(4), 493–509

Mari, X., and Burd, A. (1998) Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Marine Ecology Progress Series* **163**, 63–76. <https://doi.org/10.3354/meps163063>

Mari, X., Passow, U., Migon, C., Burd, A. B., and Legendre, L. (2017) Transparent exopolymer particles: Effects on carbon cycling in the ocean. *Progress in Oceanography* **151**, 13-37. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2016.11.002>

Mari, X., Rassoulzadegan, F., Brussaard, C.P.D., and Wassmann, P. (2005) Dynamics of transparent exopolymeric particles (TEP) production by *Phaeocystis globosa* under N- or P-limitation: A controlling factor of the retention/export balance. *Harmful Algae* **4**(5), 895–914. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.12.014>

Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., and Vaultot, D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural

- populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(1), 186-193. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.186-193.1997>
- Marín Leal, J.C., Dubois, S., Orvain, F., Galois, R., Blin, J.L., Ropert, M., *et al.* (2008) Stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) and modelling as tools to estimate the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Marine Biology* **153**, 673–688. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0841-7>
- Martins, E., Figueras, A., Novoa, B., Santos, R.S., Moreira, R., and Bettencourt, R. (2014) Comparative study of immune responses in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and the shallow-water mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged with *Vibrio* bacteria. *Fish and Shellfish Immunology* **40**(2), 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.018>
- Martoja, R., and Martoja-Pierson, M. (1967) *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Ed. Masson et Cie Paris, France. 323 pp. [In French]
- Matrai, P., Thompson, B., and Keller, M. (2005) Circannual excystment of resting cysts of *Alexandrium* spp. from eastern Gulf of Maine populations. *Deep-Sea Research* **52**(19–21), 2560–2568. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.06.013>
- Matsumoto, T., Kawachi, M., Miyashita, H., and Inagaki, Y. (2012) Prasinoxanthin is absent in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum* strain NIES-1868: Pigment composition and 18S rRNA phylogeny. *Journal of Plant Research* **125**, 705–711. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0486-6>
- Matsumoto, T., Shinozaki, F., Chikuni, T., Yabuki, A., Takishita, K., Kawachi, M., *et al.* (2011) Green-colored Plastids in the Dinoflagellate Genus *Lepidodinium* are of Core Chlorophyte Origin. *Protist* **162**(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.07.001>
- McCarthy, J.J. (1980) The Physiological Ecology of Phytoplankton. *Nitrogen*. Ed. I. Morris pp. 191–234. University of California Press, Berkeley
- McCarthy, P.M. (2013) Census of Australian Marine Dinoflagellates. Australian Biological Resources Study, Canberra. http://www.anbg.gov.au/abrs/Dinoflagellates/index_Dino.html. Accessed 8 March 2022
- McKee, M.P., Ward, J.E., MacDonald, B.A., and Holohan, B.A. (2005) Production of transparent exopolymer particles (TEP) by the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* **288**, 141–149. <https://doi.org/10.3354/meps288141>
- McQuoid, M.R., Godhe, A., and Nordberg, K. (2002) Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. *European Journal of Phycology* **37**(2), 191–201. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003670>
- Medhioub, W., Lassus, P., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Sechet, V., *et al.* (2012) Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Aquaculture* **358–359**, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.023>
- Ménesguen, A., Desmit, X., Dulière, V., Lacroix, G., Thouvenin, B., Thieu, V., and Dussauze, M. (2018) How to avoid eutrophication in coastal seas? A new approach to derive river-specific combined nitrate and phosphate maximum concentrations. *Science of Total Environment* **628–629**, 400–414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.025>
- Ménesguen, A., and Dussauze, M. (2015) *Détermination des “bassins récepteurs” marins des principaux fleuves français de la façade Manche-Atlantique, et de leurs rôles respectifs dans l'eutrophisation phytoplanctonique des masses d'eau DCE et des sous-régions DCSMM. Phase 1 (2013) : Calcul de scénarios optimaux à partir des "bassins récepteurs". Phase 2 (2014) : Simulation de scénarios imposés et des scénarios optimaux*. Ed. Ifremer, France. 332 pp. [In French] <https://archimer.ifremer.fr/doc/00333/44422/>
- Ménesguen, A., Dussauze, M., Dumas, F., Thouvenin, B., Garnier, V., Lecornu, F., and Répécaud, M. (2019) Ecological model of the Bay of Biscay and English Channel shelf for environmental status assessment part 1: Nutrients, phytoplankton and oxygen. *Ocean Modelling* **133**, 56–78. <https://doi.org/10.1016/j.ocemod.2018.11.002>

Bibliographic references

- Merceron, M. (1987) *Mortalités de poissons en baie de Vilaine (Juillet 1982) Causes-Mécanismes-Propositions d'action*. Ed. Ifremer, France. 163 pp. [In French]
- Mertens, K.N., Bradley, L.R., Takano, Y., Mudie, P.J., Marret, F., Aksu, A.E., *et al.* (2012) Quantitative estimation of Holocene surface salinity variation in the Black Sea using dinoflagellate cyst process length. *Quaternary Science Reviews* **39**, 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2012.01.026>
- Meseck, S.L., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Alix, J.H., and Kapareiko, D. (2007) Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. *Journal of Applied Phycology* **19**, 229–237. <http://doi.org/10.1007/s10811-006-9128-5>
- Middelburg, J.J., and Nieuwenhuize, J. (2000) Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the nitrate-rich Thames estuary. *Marine Ecology Progress Series* **203**, 13–21. <http://doi.org/10.3354/meps203013>
- Minge, M.A., Shalchian-Tabrizi, K., Tørresen, O.K., Takishita, K., Probert, I., Inagaki, Y., *et al.* (2010) A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 191. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-191>
- Minicante, A.S., Piredda, R., Quero, G.M., Finotto, S., Bernard-Aubry, F., Bastianini, M., *et al.* (2019) Habitat Heterogeneity and Connectivity: Effects on the Planktonic Protist Community Structure at Two Adjacent Coastal Sites (the Lagoon and the Gulf of Venice, Northern Adriatic Sea, Italy) Revealed by Metabarcoding. *Frontiers in Microbiology* **10**, 2736. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02736>
- Minnhagen, S., Carvalho, W.F., Salomon, P.S., and Janson, S. (2008) Chloroplast DNA content in *Dinophysis* (Dinophyceae) from different cell cycle stages is consistent with kleptoplasty. *Environmental Microbiology* **10**(9), 2411–2417. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01666.x>
- Mitra, A., Flynn, K.J., Maselli, M., Hansen, P.J., Gypens, N., Martin, J.L., *et al.* (2021) Seasonal Distribution Of Non-Constitutive Mixoplankton Across Arctic, Temperate and Mediterranean Coastal Waters. Zenodo. 50 pp. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5993620>
- Miyake, Y., and Koizumi, M. (1948) The measurements of the viscosity coefficient of sea water. *Journal of Marine Research* **7**, 63–66
- Miyazono, A., Nagai, S., Kudo, I., and Tanizawa, K. (2012) Viability of *Alexandrium tamarense* cysts in the sediment of Funka Bay, Hokkaido, Japan: Over a hundred year survival times for cysts. *Harmful Algae* **16**, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.001>
- Moestrup, Ø., Akselmann-Cardella, R., Churro, C., Fraga, S., Hoppenrath, M., Iwataki, M., *et al.* (2009) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae [WWW Document]. UR <http://www.marinespecies.org/hab> (accessed 4.1.22)
- Moita, M.T., Sobrinho-Gonçalves, L., Oliveira, P.B., Palma, S., and Falcão, M. (2006) A bloom of *Dinophysis acuta* in a thin layer off North-West Portugal. *African Journal of Marine Science* **28**(2), 265–269. <https://doi.org/10.2989/18142320609504160>
- Montresor, M., Vitale, L., D'Alelio, D., and Ferrante, M.I. (2016) Sex in marine planktonic diatoms: insights and challenges. *Perspectives in Phycology* **3**(2), 61–75. <https://doi.org/10.1127/pip/2016/0045>
- Moore, S.K., Bill, B.D., Hay, L.R., Emenegger, J., Eldred, K.C., Greengrove, C.L., *et al.* (2015) Factors regulating excystment of *Alexandrium* in Puget Sound, WA, USA. *Harmful Algae* **43**, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.01.005>
- Morelle, J. (2017) Dynamique spatiale et temporelle de la production primaire dans l'estuaire de Seine. Biodiversité. Normandie Université. *PhD Thesis* [In French]. NNT : 2017NORMC252. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01729055>
- Morelle, J., Schapira, M., and Claquin, P. (2017) Dynamics of phytoplankton productivity and exopolysaccharides (EPS and TEP) pools in the Seine Estuary (France, Normandy) over tidal cycles and over two contrasting seasons. *Marine Environmental Research* **131**, 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.09.007>
- Moreno Díaz de la Espina, S., Alverca, E., Cuadrado, A., and Franca, S. (2005) Organization of the genome

- and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: The amazing dinoflagellates. *European Journal of Cell Biology* **84**(2–3), 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.01.002>
- Morin, J., and Morse, J.W. (1999) Ammonium release from resuspended sediments in the Laguna Madre estuary. *Marine Chemistry* **65**(1–2), 97–110. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00013-4)
- Morozov, E., Pozdnyakov, D., Smyth, T., Sychev, V., and Grassl, H. (2013) Space-borne study of seasonal, multi-year, and decadal phytoplankton dynamics in the Bay of Biscay. *International Journal of Remote Sensing* **34**(4), 1297–1331. <https://doi.org/10.1080/01431161.2012.718462>
- Morse, J.W., and Morin, J. (2005) Ammonium interaction with coastal marine sediments: Influence of redox conditions on K*. *Marine Chemistry* **95**(1–2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.08.008>
- Mulholland, M.R., Rocha, A.M., and Boncillo, G.E. (2010) Incorporation of leucine and thymidine by estuarine phytoplankton: Implications for bacteria productivity estimates. *Estuarine Coasts* **34**, 310–325. <http://doi.org/10.1007/s12237-010-9366-2>
- Murray, S. A., Suggett, D.J., Doblin, M.A., Kohli, G.S., Seymour, J.R., Fabris, M., and Ralph, P.J. (2016) Unravelling the functional genetics of dinoflagellates: a review of approaches and opportunities. *Perspectives in Phycology* **3**(1), 37–52. <https://doi.org/10.1127/pip/2016/0039>
- N-**
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., and Claquin, P. (2014) Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the english channel. *Marine Ecology Progress Series* **505**, 49–64. <https://doi.org/10.3354/meps10772>
- Neves, R.A.F., Santiago, T.C., Carvalho, W.F., Silva, E.S., da Silva, P.M., and Nascimento, S.M. (2019) Impacts of the toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* on the brown mussel *Perna perna*: Shell-valve closure response, immunology, and histopathology. *Marine Environmental Research* **146**, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.03.006>
- Newell, R.I.E., and Jordan, S.J. (1983) Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* **13**, 47–53. <https://doi.org/10.3354/MEPS013047>
- Ng, W.H.A., Liu, H., and Zhang, S. (2017) Diel variation of grazing of the dinoflagellate *Lepidodinium* sp. and ciliate *Euplotes* sp. on algal prey: The effect of prey cell properties. *Journal of Plankton Research* **39**(3), 450–462. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbx020>
- Nielsen, T.G., Kiørboe, T., and Bjørnsen, P.K. (1990) Effects of a *Chrysochromulina polylepis* subsurface bloom on the planktonic community. *Marine Ecology Progress Series* **62**(1/2), 21–35. <https://doi.org/10.3354/meps062021>
- Ní Rathaille, A., and Raine, R. (2011) Seasonality in the excystment of *Alexandrium minutum* and *Alexandrium tamarense* in Irish coastal waters. *Harmful Algae* **10**(6), 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.015>
- Nixon S.W. (1995) Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* **41**(1), 199–219. <https://doi.org/10.1080/00785236.1995.10422044>
- Noël, C., Quintric L., Cormier, A., Leroi, L., and Durand, P. (2021) SAMBA: Standardized and Automated MetaBarcoding Analyses workflow. [WorkflowHub. https://doi.org/10.48546/WORKFLOWHUB.WORKFLOW.156.1](https://doi.org/10.48546/WORKFLOWHUB.WORKFLOW.156.1)
- Nolte, V., Pandey, R.V., Jost, S., Medinger, R., Ottenwälder, B., Boenigk, J., and Schlötterer, C. (2010) Contrasting seasonal niche separation between rare and abundant taxa conceals the extent of protist diversity. *Molecular Ecology* **19**(14), 2908–2915. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04669.x>
- Nosaka, Y., Yamashita, Y., and Suzuki, K. (2017) Dynamics and origin of transparent exopolymer particles in

the Oyashio region of the Western Subarctic Pacific during the spring diatom bloom. *Frontiers in Marine Science* **4**, 79. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00079>

Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Simon, N., Vaulot, D., and Probert, I. (2012) Chapter One - Diversity and Ecology of Eukaryotic marine Phytoplankton. *Advances in Botanical Research*. **64**, 1-53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00001-3>

Nunn, G.B., Theisen, B.F., Christensen, B., and Arctander, P. (1996) Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda. *Journal of Molecular Evolution* **42**, 211-223. <https://doi.org/10.1007/BF02198847>

-O-

Odebrecht, C., Abreu, P.C., and Carstensen, J. (2015) Retention time generates short-term phytoplankton blooms in a shallow microtidal subtropical estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **162**, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.03.004>

Okolodkov, Y., and Dodge, J.D. (1997) Morphology of some rare and unusual dinoflagellates from the north-eastern Atlantic. *Nova Hedwigia* **64**(3-4), 353-365. <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/64/1997/353>

Olesen, S.W., Duvallet, C., and Alm, E.J. (2017) dbOTU3: A new implementation of distribution-based OTU calling. *PloS one* **12**(5), e0176335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176335>

O'Reilly, J.E., Maritorena, S., Mitchell, B.G., Siegel, D.A., Carder, K.L., Garver, S.A., *et al.* (1998) Ocean color chlorophyll algorithm for SeaWiFS. *Journal of Geophysical Research* **103**(C11), 24937-24953. <https://doi.org/10.1029/98JC02160>

Oremland, R.S., and Capone, D.G. (1988) Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* **10**, 285-383. http://doi.org/10.1007/978-1-4684-5409-3_8

Orr, R.J.S., Murray, S.A., Stüken, A., Rhodes, L., and Jakobsen, K.S. (2012) When Naked Became Armored: An Eight-Gene Phylogeny Reveals Monophyletic Origin of Theca in Dinoflagellates *PLoS ONE* **7**(11), e50004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050004>

Ortega-Retuerta, E., Duarte, C.M., and Reche, I. (2010) Significance of bacterial activity for the distribution and dynamics of transparent exopolymer particles in the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* **59**, 808-818. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9640-7>

Ortega-Retuerta, E., Reche, I., Pulido-Villena, E., Agustí, S., and Duarte, C.M. (2009) Uncoupled distributions of transparent exopolymer particles (TEP) and dissolved carbohydrates in the Southern Ocean. *Marine Chemistry* **115**(1-2), 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2009.06.004>

Ospina-Alvarez, N., Caetano, M., Vale, C., Santos-Echeandía, J., Bernárdez, P., and Prego, R. (2014) Exchange of nutrients across the sediment-water interface in intertidal ria systems (SW Europe). *Journal of Sea Research* **85**, 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.002>

-P-

Paerl, H.W. (1997) Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as "new" nitrogen and other nutrient sources. *Limnology and Oceanography* **42**(5), 1154-1165. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1154

Palmer, C.J., Tsai, Y.-L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C., and Sangermano, L.R. (1993) Detection of *Legionella* Species in Sewage and Ocean Water by Polymerase Chain Reaction, Direct Fluorescent-Antibody, and Plate Culture Methods. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(11), 3618-3624. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3618-3624.1993>

Palmer, J.D. (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *Journal of Phycology* **39**(1), 4-11. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02185.x>

- Palmer, R.E., and Williams, L.G. (1980) Effect of particle concentration on filtration efficiency of the bay scallop *Argopecten irradians* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Ophelia* **19**(2), 163–174. <https://doi.org/10.1080/00785326.1980.10425514>
- Park, G.M., Wonho, Y., and Coats, D.W. (2004) Parasites and Phytoplankton, with Special Emphasis on Dinoflagellate Infections. *Journal of Eukaryote Microbiology* **51**(2), 145–155. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00539.x>
- Parker, C. (2013) The effect of environmental stressors on biofilm formation of *Chlorella vulgaris*. Appalachian State University. *Master thesis*
- Passow, U. (2000) Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Marine Ecology Progress Series* **192**, 1–11. <https://doi.org/10.3354/meps192001>
- Passow, U. (2002) Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography* **55**(3-4), 287–333. [https://doi.org/10.1016/S0079-6611\(02\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6611(02)00138-6)
- Passow, U., and Alldredge, A.L. (1994) Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Marine Ecology Progress Series* **113**, 185–198. <https://doi.org/10.3354/meps113185>
- Passow U., and Alldredge A.L. (1995) A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography* **40**(7), 1326–1335. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1326>
- Passow, U., and Engel, A. (2001) Carbon and nitrogen content of transparent exopolymer particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Marine Ecology Progress Series* **219**, 1–10. <https://doi.org/10.3354/meps219001>
- Passow, U., Shipe, R.F., Murray, A., Pak, D.K., Brzezinski, M.A., and Alldredge, A.L. (2001) The origin of transparent exopolymer particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Continental Shelf Research* **21**(4), 327–346. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00101-1)
- Paulmier, G., Berland, B., Billard, C., and Nezan, E. (1995) *Gyrodinium corsicum* nov. sp. (Gymnodiniales, Dinophycees), organisme responsable d'une «eau Verte» dans l'Etang marin de Diana (Corse), en Avril 1994. *Cryptogamie Algologie* **16**, 77–94 [In French]
- Pawlowski, J., Bruce, K., Panksep, K., Aguirre, F.I., Amalfitano, S., Apothéoz-Perret-Gentil, L., et al. (2021) Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. *Science in Total Environment* **818**, 151783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151783>
- Pawlowski, J., Christen, R., Lecroq, B., Bachar, D., Shahbazkia, H.R., Amaral-Zettler, L., and Guillou, L. (2011) Eukaryotic richness in the abyss: Insights from pyrotag sequencing. *PLoS One* **6**(4), e18169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018169>
- Pearse, V.B., and Muscatine, L. (1971) Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biological Bulletin* **141**(2), 350–363. <https://doi.org/10.2307/1540123>
- Pedrós-Aliós, C. (2012) The rare bacterial biosphere. *Annual Review of Marine Science* **4**, 449–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100948>
- Peierls, B.L., Hall, N.S., and Paerl, H.W. (2012) Non-monotonic responses of phytoplankton biomass accumulation to hydrologic variability: A comparison of two coastal plain North Carolina Estuaries. *Estuaries and Coasts* **35**, 1376–1392. <https://doi.org/10.1007/s12237-012-9547-2>
- Pernet, F., Malet, N., Pastoureaud, A., Vaquer, A., Quéré, C., and Dubroca, L. (2012) Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. *Journal of Sea Research* **68**, 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.11.004>
- Petersen, J.K., Nielsen, T.G., van Duren, L., and Maar, M. (2008) Depletion of plankton in a raft culture of *Mytilus galloprovincialis* in Ría de Vigo, NW Spain. I. Phytoplankton. *Aquatic Biology* **4**(2), 113–125. <https://doi.org/10.3354/ab00124>
- Petton, B., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Alunno-Bruscia, M., and Le Roux, F. (2015) *Crassostrea gigas*

- mortality in France: The usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in Microbiology* **6**, 686. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00686>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G., and Nannipieri, P. (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils* **45**, 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Pilskaln, C.H., Churchill, J.H., and Mayer, L.M. (1998) Resuspension of Sediment by Bottom Trawling in the Gulf of Maine and Potential Geochemical Consequences. *Conservation Biology* **12**(6), 1223–1229. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.0120061223.x>
- Pinay, G., Gascuel, C., Menesguen, A., Souchon, Y., Le Moal, M., Levain, A., et al. (2017) *Eutrophisation : Manifestations, causes, conséquences et prédictibilité*. Ed. CNRS - Ifremer - INRA – Irstea, France. 148 pp. [In French]
- Planque, B., Lazure, P. and Jégou, A.M. (2004) Detecting hydrological landscapes over the Bay of Biscay continental shelf in spring. *Climate Research* **28**(1), 41–52. <https://doi.org/10.3354/cr028041>
- Pomeroy, L.R. (1974). The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *BioScience* **24**(9), 499–504. <https://doi.org/10.2307/1296885>
- Pousse, É., Flye-Sainte-Marie, J., Alunno-Bruscia, M., Hégaret, H., and Jean, F. (2018) Sources of paralytic shellfish toxin accumulation variability in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Toxicon* **144**, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.12.050>
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., and Alunno-Bruscia, M. (2006) Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research* **56**(2), 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2006.03.007>
- Price, D.C., Farinholt, N., Gates, C., Shumaker, A., Wagner, N.E., Bienfang, P., and Bhattacharya, D. (2016) Analysis of *Gambierdiscus* transcriptome data supports ancient origins of mixotrophic pathways in dinoflagellates. *Environmental Microbiology* **18**(12), 4501–4510. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13478>
- Prieto, A., Barber-Lluch, E., Hernán-Ruiz, M., Martínez-García, S., Fernández, E., and Teira, E. (2016) Assessing the role of phytoplankton-bacterioplankton coupling in the response of microbial plankton to nutrient additions. *Journal of Plankton Research* **38**(1), 55–63. <http://doi.org/10.1093/plankt/fbv101>
- Prieto, L., Navarro, G., Cózar, A., Echevarría, F., and García, C.M. (2006) Distribution of TEP in the euphotic and upper mesopelagic zones of the southern Iberian coasts. *Deep-Sea Research* **53**(11–13), 1314–1328. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.03.009>
- Prieto, L., Sommer, F., Stibor, H., and Koeve, W. (2001) Effects of planktonic copepods on transparent exopolymeric particles (TEP) abundance and size spectra. *Journal of Plankton Research* **23**(5), 515–525. <https://doi.org/10.1093/plankt/23.5.515>
- Prins, T.C., Smaal, A.C., and Dame, R.F. (1998) A review of the feedbacks between bivalve grazing and ecosystem processes. *Aquatic Ecology* **31**, 349–359. <https://doi.org/10.1023/A:1009924624259>
- Puillat, I., Lazure, P., Jégou, A.M., Lampert, L., and Miller, P.I. (2004) Hydrographical variability on the French continental shelf in the Bay of Biscay, during the 1990s. *Continental Shelf Research* **24**(10), 1143–1163. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2004.02.008>
- Puillat, I., Lazure, P., Jégou, A.M., Lampert, L., and Miller, P.I. (2006) Mesoscale hydrological variability induced by northwesterly wind on the French continental shelf of the Bay of Biscay. *Scientia Marina* **70**(S1), 15–26. <https://doi.org/10.3989/scimar.2006.70s115>

-Q-

- Qiu, D., Huang, L., Zhuang, Y., Zhong, Y., Tan, Y., Li, X., et al. (2021) Dinoflagellate-targeted PCR reveals highly abundant and diverse communities of parasitic dinoflagellates in and near Zhubi Reef, South China

Sea. *Coral Reefs* **40**(6), 1931–1939. <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02168-w>

Quevedo, M., Gonzalez-Quiros, R., and Anadon, R. (1999) Evidence of heavy predation by *Noctiluca scintillans* on *Acartia clausi* (Copepoda) eggs off the central Cantabrian coast (NW Spain). *Oceanologica Acta* **22**(1), 127–131. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(99\)80039-5](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(99)80039-5)

-R-

Radić, T., Kraus, R., Fuks, D., Radić, J., and Pečar, O. (2005) Transparent exopolymeric particles' distribution in the northern Adriatic and their relation to microphytoplankton biomass and composition. *Science of the Total Environment* **353**(1–3), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.013>

Raimbault, P., Pouvesle, W., Diaz, F., Garcia, N., and Sempere, R. (1999) Wet-oxidation and automated colorimetry for simultaneous determination of organic carbon, nitrogen and phosphorus dissolved in seawater. *Marine Chemistry* **66**(3–4), 161–169. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00038-9)

Ramaiah, N., Yoshikawa, T., and Furuya, K. (2001) Temporal variations in transparent exopolymer particles (TEP) associated with a diatom spring bloom in a subarctic ria in Japan. *Marine Ecology Progress Series* **212**, 79–88. <https://doi.org/10.3354/meps212079>

Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M., and Kim, H.S. (2016) Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* **34**(1), 14–29. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>

Ramond, P., Siano, R., Schmitt, S., de Vargas, C., Marié, L., Memery, L., and Sourisseau, M. (2021) Phytoplankton taxonomic and functional diversity patterns across a coastal tidal front. *Scientific Reports* **11**, 2682. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82071-0>

Ramond, P., Sourisseau, M., Simon, N., Romac, S., Schmitt, S., Rigaut-Jalabert, F., *et al.* (2019) Coupling between taxonomic and functional diversity in protistan coastal communities. *Environmental Microbiology* **21**(2), 730–749. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14537>

Ratmaya, W., Laverman, A.M., Rabouille, C., Akbarzadeh, Z., Andrieux-Loyer, F., Barillé, L., *et al.* (2022) Temporal and spatial variations in benthic nitrogen cycling in a temperate macro-tidal coastal ecosystem: Observation and modeling. *Continental Shelf Research* **235**, 104649. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2022.104649>

Ratmaya, W., Soudant, D., Salmon-Monviola, J., Plus, M., Cochennec-Laureau, N., Goubert, E., *et al.* (2019) Reduced phosphorus loads from the Loire and Vilaine rivers were accompanied by increasing eutrophication in the Vilaine Bay (south Brittany, France). *Biogeosciences*. **16**(6), 1361–1380. <https://doi.org/10.5194/bg-16-1361-2019>

Ray, S., and Bagchi, S.N. (2001) Nutrients and pH regulate algicide accumulation in cultures of the cyanobacterium *Oscillatoria laetevirens*. *New Phytologist* **149**(3), 455–460. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00061.x>

R Core Team (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Record, N.R., Countway, P.D., Kanwit, K., and Fernández-Robledo, J.A. (2021) Rise of the rare biosphere: Thinking beyond climate envelopes for forecasting harmful algal blooms. *Elementa* **9**(1), 00056. <https://doi.org/10.1525/elementa.2020.00056>

Redfield, A.C. (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *American Journal of Science* **46**(3), 205–221. <https://www.jstor.org/stable/27827150>

Reguera, B. (2002) *Small cells in Dinophysis spp.: a life cycle strategy for phytoplankters with a holoplanktonic way of living?* In: Life History of Microalgal Species Causing Harmful Blooms. Ed. Official Publications of the European Communities. pp. 60–63

Reñé, A., Camp, J., and Garcés, E. (2015) Diversity and phylogeny of Gymnodiniales (Dinophyceae) from the NW Mediterranean Sea revealed by a morphological and molecular approach. *Protist* **166**(2), 234–263.

- <https://doi.org/10.1016/j.protis.2015.03.001>
- Rengefors, K., and Anderson, D.M. (1998) Environmental and endogenous regulation of cyst germination in two freshwater dinoflagellates. *Journal of Phycology* **34**(4), 568–577. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340568.x>
- [dataset] REPHY - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters (2021) REPHY dataset - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters. Metropolitan data. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/47248>
- [dataset] Retho, M., Quemener, L., Le Gall, C., Repecaud, M., Souchu, P., Gabellec, R., and Manach S. (2020) MOLIT Vilaine data and metadata from Coriolis Data Centre. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/46529>
- Reyes-Prieto, A., and Bhattacharya, D. (2007) Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Molecular Biology and Evolution* **24**(11), 2358–2361. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm186>
- Reyes-Prieto, A., Weber, A.P.M., and Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annual Review of Genetics* **41**, 147–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Reynolds, C.S. (1984) Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environment variability. *Freshwater Biology* **14**(2), 111–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00027.x>
- Reynolds, C.S. (1998) What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? *Hydrobiologia* **369**, 11–26. <https://doi.org/10.1023/A:1017062213207>
- Reynolds, C.S. (2006) *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press. pp. 535. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145>
- Reynolds, C.S., Irish, A.E., and Elliott, J.A. (2001) The ecological basis for simulating phytoplankton responses to environmental change (PROTECH). *Ecological Modelling* **140**(3), 271–291. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(01\)00330-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(01)00330-1)
- Ribeiro, S., Berge, T., Lundholm, N., Andersen, T.J., Abrantes, F., and Ellegaard, M. (2011) Phytoplankton growth after a century of dormancy illuminates past resilience to catastrophic darkness. *Nature Communications* **2**, 311. <https://doi.org/10.1038/ncomms1314>
- Richardson, K., Visser, A.W., and Pedersen, F.B. (2000) Subsurface phytoplankton blooms fuel pelagic production in the North Sea. *Journal of Plankton Research* **22**(9), 1663–1671. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.9.1663>
- Riebesell, U., Reigstad, M., Wassmann, P., Noji, T., and Passow, U. (1995) On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (haricot): Significance of *Phaeocystis*-derived mucus for vertical flux. *Neth. Journal of Sea Research* **33**(2), 193–203. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(95\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0077-7579(95)90006-3)
- Rigouin, C., Delbarre Ladrat, C., Sinquin, C., Collicec-Jouault, S., and Dion, M. (2009) Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **76**(2), 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.022>
- Riisgård, H. (1988) Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of Northeast American bivalves. *Marine Ecology Progress Series* **45**, 217–223. <https://doi.org/10.3354/meps045217>
- Riisgård, H.U., and Larsen, P.S. (2007) Viscosity of seawater controls beat frequency of water-pumping cilia and filtration rate of mussels *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* **343**, 141–150. <https://doi.org/10.3354/meps06930>
- Rodrigo, A.P., Costa, M.H., Alves De Matos, A.P., Carrapiço, F., and Costa, P.M. (2015) A Study on the Digestive Physiology of a Marine Polychaete (*Eulalia viridis*) through Microanatomical Changes of Epithelia During the Digestive Cycle. *Microscopy and Microanalysis* **21**(1), 91–101. <https://doi.org/10.1017/S143192761401352X>
- Rodríguez-Benito, C.V., Navarro, G., and Caballero, I. (2020) Using Copernicus Sentinel-2 and Sentinel-3 data to monitor harmful algal blooms in Southern Chile during the COVID-19 lockdown. *Marine Pollution*

- Bulletin* **161**(A), 111722. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111722>
- Rosa, M., Ward, J.E., and Shumway, S.E. (2018) Selective Capture and Ingestion of Particles by Suspension-Feeding Bivalve Molluscs: A Review. *Journal of Shellfish Research* **37**(4), 727–746. <https://doi.org/10.2983/035.037.0405>
- Rosenberg, R., Hellman, B., and Johansson, B. (1991) Hypoxic tolerance of marine benthic fauna. *Marine Ecology Progress Series* **79**, 127–131. <https://doi.org/10.3354/meps079127>
- Rosenfeld, J.K. (1979) Ammonium adsorption in nearshore anoxic sediments. *Limnology and Oceanography* **24**(2), 356–364. <https://doi.org/10.4319/lo.1979.24.2.0356>
- Rossignol-Strick, M. (1985) A marine anoxic event on the Brittany coast, July 1982. *Journal of Coastal Research* **1**(1), 11–20. <https://www.jstor.org/stable/4297005>
- Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Sinquin, C., Marchand, L., et al. (2021) Bacteria enhance the production of extracellular polymeric substances by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Scientific Reports* **11**, 4795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84253-2>
- Roux, P., Siano, R., Souchu, P., Collin, K., Schmitt, A., Manach, S., et al. (2022) Spatio-temporal dynamics and biogeochemical properties of Green Seawater Discolorations caused by the marine dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (submitted)
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., and Rahman, M.S. (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* **17**, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

-S-

- Saldarriaga, J.F., Taylor, F.J.R., Keeling, P.J., and Cavalier-Smith, T. (2001) Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *Journal of Molecular Evolution* **53**(3), 204–213. <https://doi.org/10.1007/s002390010210>
- Sampedro, N., Fraga, S., Penna, A., Casabianca, S., Zapata, M., Grünwald, C.F., et al. (2011) *Barrufeta bravensis* gen. Nov. Sp. Nov. (dinophyceae): A new bloom-forming species from the northwest mediterranean sea. *Journal of Phycology* **47**(2), 375–392. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00968.x>
- Sanchez-Puerta, M.V., Lippmeier, J.C., Apt, K.E., and Delwiche, C.F. (2007) Plastid Genes in a Non-Photosynthetic Dinoflagellate. *Protist* **158**(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.09.004>
- Santi, I., Kasapidis, P., Karakassis, I., and Pitta, P. (2021) A comparison of DNA metabarcoding and microscopy methodologies for the study of aquatic microbial eukaryotes. *Diversity* **13**(5), 180. <https://doi.org/10.3390/d13050180>
- Sassoubre, L.M., Yamahara, K.M., Gardner, L.D., Block, B.A., and Boehm, A.B. (2016) Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science and Technology* **50**(19), 10456–10464. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03114>
- Savina, M., and Pouvreau, S. (2004) A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboïdes* and *Glycymeris glycymeris*. *Aquaculture* **239**(1–4), 289–306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.029>
- Schapira, M. (2005) Dynamique spatio-temporelle de *Phaeocystis globosa* en Manche Orientale: Effets de la turbulence et des apports sporadiques en sels nutritifs. Ecosystèmes Fossiles et Actuels. Université des Sciences et Technologies de Lille. *PhD Thesis* [In French]
- Schapira, M., McQuaid, C.D., and Froneman, P.W. (2012a) Metabolism of free-living and particle-associated prokaryotes: Consequences for carbon flux around a Southern Ocean archipelago. *Journal of Marine Systems* **90**(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2011.08.009>
- Schapira, M., McQuaid, C.D., and Froneman, P.W. (2012b) Free-living and particle-associated prokaryote metabolism in giant kelp forests: Implications for carbon flux in a sub-Antarctic coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **106**, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.04.031>

- Schapira, M., Roux, P., André, C., Mertens, K.N., Bilien, G., Terret-Terrillon, A., *et al.* (2021) *Les efflorescences de Lepidodinium chlorophorum au large de la Loire et de la Vilaine: Déterminisme et conséquences sur la qualité des masses d'eau côtières*. Projet EPICE – Rapport final. Ed. Ifremer, France. 46 pp. [In French] <https://archimer.ifremer.fr/doc/00724/83598/>
- Schlegel, M., and Hülsmann, N. (2007) Protists - A textbook example for a paraphyletic taxon. *Organisms Diversity and Evolution* **7**(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2006.11.001>
- Schlitzer, R. (2020) Ocean Data View 5.3.0. <http://odv.awi.de>
- Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M., and Anderson, D.M. (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* **30**(6), 999–1011. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x>
- Schuster, S., and Herndl, G.J. (1995) Formation and significance of transparent exopolymeric particles in the northern Adriatic Sea. *Marine Ecology Progress Series* **124**, 227–236. <https://doi.org/10.3354/meps124227>
- Seebah, S., Fairfield, C., Ullrich, M.S., and Passow, U. (2014) Aggregation and sedimentation of *Thalassiosira weissflogii* (diatom) in a warmer and more acidified Future Ocean. *PLoS ONE* **9**(11), e112379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112379>
- Seeyave, S., Probyn, T.A., Pitcher, G.C., Lucas, M.I., and Purdie, D.A. (2009) Nitrogen nutrition in assemblages dominated by *Pseudo-nitzschia* spp., *Alexandrium catenella* and *Dinophysis acuminata* off the west coast of South Africa. *Marine Ecology Progress Series* **379**, 91–107. <https://doi.org/10.3354/meps07898>
- Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T.L., Morgan, X.C., Garrett, W.S., and Huttenhower, C. (2013) Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology* **9**(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.22>
- Sekida, S., Horiguchi, T., and Okuda, K. (2001) Development of the cell covering in the dinoflagellate *Scrippsiella hexapraecingula* (Peridinales, Dinophyceae). *Phycological Research* **49**(3), 163–176. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2001.00237.x>
- Selosse, M.A., Charpin, M., and Not, F. (2017) Mixotrophy everywhere on land and in water: the grand écart hypothesis. *Ecology Letters* **20**(2), 246–263. <https://doi.org/10.1111/ele.12714>
- Serre-Fredj, L., Jacqueline, F., Navon, M., Izabel, G., Chasselin, L., Jolly, O., *et al.* (2021) Coupling high frequency monitoring and bioassay experiments to investigate a harmful algal bloom in the Bay of Seine (French-English Channel). *Marine Pollution Bulletin* **168**, 112387. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112387>
- Seuront, L., Lacheze, C., Doubell, M.J.J., Seymour, J.R., Van Dongen-Vogels, V., Newton, K., *et al.* (2007) The influence of *Phaeocystis globosa* on microscale spatial patterns of chlorophylla and bulk-phase seawater viscosity. *Biogeochemistry* **83**, 173–188. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9097-z>
- Seuront, L., Leterme, S.C., Seymour, J.R., Mitchell, J.G., Ashcroft, D., Noble, W., *et al.* (2010) Role of microbial and phytoplankton communities in the control of seawater viscosity off East Antarctica (30–80° E). *Deep-Sea Research* **57**(9–10), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.09.018>
- Seuront L., and Vincent, D. (2008) Increased seawater viscosity, *Phaeocystis globosa* spring bloom and *Temora longicornis* feeding and swimming behaviours. *Marine Ecology Progress Series* **363**, 131–145. <https://doi.org/10.3354/meps07373>
- Seuront, L., Vincent, D., and Mitchell, J.G. (2006) Biologically induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring bloom. *Journal of Marine Systems* **61**(3–4), 118–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.04.010>
- Shapiro, K., Krusor, C., Mazzillo, F.F.M., Conrad, P.A., Largier, J.L., Mazet, J.A.K., and Silver, M.W. (2014) Aquatic polymers can drive pathogen transmission in coastal ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B* **281**(1795), 1–9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1287>
- Shaw, B.L., and Battle, H.I. (1957) The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster,

- Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* **35**(3), 325–347. <https://doi.org/10.1139/z57-026>
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J., Adolf, J.E., and Place, A.R. (2010) A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion. *PNAS* **107**(5), 2082–2087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912254107>
- Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (1994) Bacterivory and Herbivory: Key Roles of Phagotrophic Protists in Pelagic Food Webs. *Microbial Ecology* **28**(2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/BF00166812>
- Shibata, A., Kogure, K., Koike, I., and Ohwada', K. (1997) Formation of submicron colloidal particles from marine bacteria by viral infection. *Marine Ecology Progress Series* **155**, 303–307. <https://doi.org/10.3354/meps155303>
- Shikata, T., Nagasoe, S., Matsubara, T., Yoshikawa, S., Yamasaki, Y., Shimasaki, Y., *et al.* (2008) Factors influencing the initiation of blooms of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* and the diatom *Skeletonema costatum* in a port in Japan. *Limnology and Oceanography* **53**(6), 2503–2518. <https://doi.org/10.2307/40058340>
- Siano, R., Alves-De-Souza, C., Foulon, E., Bendif, E. M., Simon, N., Guillou, L., and Not, F. (2011) Distribution and host diversity of *Amoebophryidae* parasites across oligotrophic waters of the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*. **8**(2), 267–278. <https://doi.org/10.5194/bg-8-267-2011>
- Siano, R., Chapelle, A., Antoine, V., Michel-Guillou, E., Rigaut-Jalabert, F., Guillou, L., *et al.* (2020) Citizen participation in monitoring phytoplankton seawater discolorations. *Marine Policy* **117**, 103039. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.01.022>
- Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Montresor, M., and Zingone, A. (2009) Unarmoured and thin-walled dinoflagellates from the Gulf of Naples, with the description of *Woloszynskia cincta* sp. nov. (Dinophyceae, Suessiales). *Phycologia* **48**(1), 44–65. <https://doi.org/10.2216/08-61.1>
- Siano, R., Lassudrie, M., Cuzin, P., Briant, N., Loizeau, V., Schmidt, S., *et al.* (2021) Sediment archives reveal irreversible shifts in plankton communities after World War II and agricultural pollution. *Current Biology* **31**(12), 2682–2689. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.079>
- Silva, E.S., and Faust, M.A. (1995) Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. *Phycologia* **34**(5), 396–408. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-34-5-396.1>
- Simon, M., Grossart, H.P., Schweitzer, B., and Ploug, H. (2002) Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* **28**(2), 175–211. <https://doi.org/10.3354/ame028175>
- Simon, H., Lipsewiers, Y.A., Giebel, H. A., Wiltshire, K.H., Simon, M., and Lipsewiers, Y.A. (2014) Temperature effects on aggregation during a spring diatom bloom. *Limnology and Oceanography* **59**(6), 2089–2100. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.6.2089>
- Singer, D., Seppey, C.V.W., Lentendu, G., Dunthorn, M., Bass, D., Belbahri, L., *et al.* (2021) Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. *Environment International* **146**, 106262. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106262>
- Smayda, T.J. (2002a) Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks.” *Harmful Algae* **1**(1), 95–112. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00010-0)
- Smayda, T.J. (2002b) Adaptive Ecology, Growth Strategies and the Global Bloom Expansion of Dinoflagellates. *Journal of Oceanography* **58**, 281–294. <https://doi.org/10.1023/A:1015861725470>
- Smayda, T.J., and Trainer, V.L. (2010) Dinoflagellate blooms in upwelling systems: Seeding, variability, and contrasts with diatom bloom behaviour. *Progress in Oceanography* **85**(1–2), 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2010.02.006>
- Smith, V.H. (2003) Eutrophication of Freshwater and Coastal Marine Ecosystems A Global Problem. *Environmental Sciences and Pollution Research* **10**(2), 126–139. <https://doi.org/10.1065/esor2002.12.142>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**(1), 76–85.

- [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smith, D.C., Steward, G.F., Long, R.A., and Azam, F. (1995) Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Research* **42**(1), 75-97. [https://doi.org/10.1016/0967-0645\(95\)00005-B](https://doi.org/10.1016/0967-0645(95)00005-B)
- Sobral, P., and Widdows, J. (1997) Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Biology* **127**, 455–461. <https://doi.org/10.1007/s002270050033>
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., *et al.* (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *PNAS* **103**(32), 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Souchu, P., Cochenne-Laureau, N., Ratmaya, W., Retho, M., Andrieux-Loyer, F., Le Merrer, Y., *et al.* (2018) *Diagnostic étendu de l'eutrophisation (DIETE) Rôle des sédiments dans le cycle des nutriments et impacts sur l'eutrophisation de la baie de Vilaine (2014-2017)*. Rapport de contrat RST/LER/MPL/18.04. Ed. Ifremer, France. 237 pp. [In French] <https://archimer.ifremer.fr/doc/00425/53695/>
- Sourisseau, M., Jegou, K., Lunven, M., Quere, J., Gohin, F., and Bryere, P. (2016) Distribution and dynamics of two species of Dinophyceae producing high biomass blooms over the French Atlantic Shelf. *Harmful Algae* **53**, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.016>
- Sournia, A., Belin, C., Billard, C., Erard-Le Denn, E., Fresnel, J., Lassus, P., *et al.* (1992) The repetitive and expanding occurrence of green, bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) on the coasts of France. *Cryptogamie Algologie* **13**(1), 1–13
- Staats, N., Stal, L.J., and Mur, L.R. (2000) Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca fusiformis*: effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **249**(1), 13–27. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00166-0)
- Stanisiere, J.-Y., Mazurie, J., Bouget, J.-F., Langlade, A., Gabellec, R., Retho, M., *et al.* (2013) *Les risques conchyliques en Baie de Quiberon. Troisième partie: risque d'hypoxie pour l'huître creuse Crassostrea gigas*. Les risques conchyliques en Baie de Quiberon. Rapport final du projet Risco 2010-2013. RST/LER/MPL/13.21 Ed. Ifremer, France. 72 pp. [In French] <https://doi.org/10.13155/29131>
- Steinmetz, F., Deschamps, P.Y., and Ramon, D. (2011) Atmospheric correction in presence of sun glint: application to MERIS. *Optical Express* **19**(10), 9783-9800. <https://doi.org/10.1364/OE.19.009783>
- Stocker, R. (2012) Marine Microbes See a Sea of Gradients. *Science* **338**(6107), 628–633. <https://doi.org/10.1126/science.1208929>
- Stoderegger, K.E., and Herndl, G.J. (1999) Production of exopolymer particles by marine bacterioplankton under contrasting turbulence conditions. *Marine Ecology Progress Series* **189**, 9-16. <https://doi.org/10.3354/meps189009>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M.D.M., Breiner, H.W., and Richards, T.A. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology* **19**(1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>
- Stoeck, T., Behnke, A., Christen, R., Amaral-Zettler, L., Rodriguez-Mora, M.J., Chistoserdov, A., *et al.* (2009) Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. *BMC Biology* **7**, 72. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-72>
- Stoecker, D.K. (1999) Mixotrophy among Dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**(4), 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04619.x>
- Sugimoto, K., Fukuda, H., Abdul B.M., and Koike, I. (2007) Bacterial contribution to formation of transparent exopolymer particles (TEP) and seasonal trends in coastal waters of Sagami Bay, Japan. *Aquatic Microbial Ecology* **46**(1), 31-41. <https://doi.org/10.3354/ame046031>
- Summers, S., Henry, T., and Gutierrez, T. (2018) Agglomeration of nano- and microplastic particles in seawater by autochthonous and de novo-produced sources of exopolymeric substances. *Marine*

- Pollution Bulletin* **130**, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.039>
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., and Moraga, D. (2010) Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Marine Genomics* **3**(3–4), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2010.08.005>
- Suttle, C.A. (2007) Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Sze, Y., Miranda, L.N., Sin, T.M., and Huang, D. (2018) Characterising planktonic dinoflagellate diversity in Singapore using DNA metabarcoding. *Metabarcoding Metagenomics* **2**, e25136. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.25136>
- T-**
- Taberlet P, Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., and Willerslev, E. (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* **21**(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Takishita, K., Kawachi, M., Noël, M.H., Matsumoto, T., Kakizoe, N., Watanabe, M.M., *et al.* (2008) Origins of plastids and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Gene* **410**(1), 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.11.008>
- Takishita, K., Nakano, K., and Uchida, A. (2000) Origin of the plastid in the anomalously pigmented dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* (Gymnodiniales, Dinophyta) as inferred from phylogenetic analysis based on the gene encoding the large subunit of form I-type RuBisCO. *Phycological Research* **48**(2), 85–89. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2000.00189.x>
- Takishita, K., and Uchida, A. (1999) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of *psbA* from the dinoflagellates: Origin of the dinoflagellate plastid. *Phycological Research* **47**(3), 207–216. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.1999.00163.x>
- Taltec, K., Paul-Pont, I., Petton, B., Alunno-Bruscia, M., Bourdon, C., Bernardini, I., *et al.* (2021) Amino-nanopolystyrene exposures of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos induced no apparent intergenerational effects. *Nanotoxicology* **15**(4), 477–493. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1879963>
- Taylor, F.J.R., Hoppenrath, M., and Saldarriaga, J.F. (2008) Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation* **17**(2), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9258-3>
- Tengs, T., Dahlberg, O.J., Shalchian-Tabrizi, K., Klaveness, D., Rudi, K., Delwiche, C.F., and Jakobsen, K.S. (2000) Phylogenetic Analyses Indicate that the 19'Hexanoyloxy-fucoxanthin-Containing Dinoflagellates Have Tertiary Plastids of Haptophyte Origin. *Molecular Biology and Evolution* **17**(5), 718–729. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026350>
- Thavasi, R., and Banat, I.M. (2014) *Biosurfactant and bioemulsifiers from marine sources*. In: Biosurfactants: Research Trends and Applications. Eds. Mulligan, C.N, Sharma, S.K., Mudhoo, A. CRC Press. pp. 125–146. <https://doi.org/10.1201/b16383-6>
- Thomas, Y., Pouvreau, S., Alunno-Bruscia, M., Barillé, L., Gohin, F., Bryere, P., and Gernez, P. (2016) Global change and climate-driven invasion of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) along European coasts: a bioenergetics modelling approach. *Journal of Biogeography* **43**(3), 568–579. <https://doi.org/10.1111/jbi.12665>
- Thornton, D.C.O. (2002) Diatom aggregation in the sea: Mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology* **37**(2), 149–161. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003657>
- Thornton, D.C.O. (2014) Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. *European Journal of Phycology* **49**(1), 20–46. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.875596>
- Thornton, D.C.O., and Chen, J. (2017) Exopolymer production as a function of cell permeability and death in

- a diatom (*Thalassiosira weissflogii*) and a cyanobacterium (*Synechococcus elongatus*). *Journal of Phycology* **53**(2), 245-260. <https://doi.org/10.1111/jpy.12470>
- Traini, C., Proust, J.N., Menier, D., and Mathew, M.J. (2015) Distinguishing natural evolution and human impact on estuarine morpho-sedimentary development: A case study from the Vilaine Estuary, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **163**(B), 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.06.025>
- Trombetta, T. (2019) Initiation des efflorescences phytoplanctoniques en zone côtière: le rôle de la température et des interactions biologiques. Sciences Agricoles. Université Montpellier. *PhD Thesis* [In French]. NNT : 2019MONTG088. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02868643>
- Troost, K. (2010) Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *Journal of Sea Research* **64**(3), 145–165. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.02.004>
- Tsikoti, C., and Genitsaris, S. (2021) Review of harmful algal blooms in the coastal mediterranean sea, with a focus on greek waters. *Diversity* **3**(8), 396. <https://doi.org/10.3390/d13080396>

-U-

- Uhart, M.M., Rowntree, V., Sironi, M., Chrife, A., Mohamed, N., Pozzi, L.M., *et al.* (2009) Continuing southern right whale mortality events at Península Valdés, Argentina. *Journal of Cetacean Research and Management* **61**(BRG18), 1–10
- Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., and Waldron, K. (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology* **40**(2), 293-304. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03076.x>
- Utermöhl, H. (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitteilungen-Internationale Vereinigung fur Limnologie* **9**(1), 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>
- Utne-Palm, A.C., Salvanes, A.G.V, Currie, B., Kaartvedt, S., Nilsson, G.E., Braithwaite, V.A., *et al.* (2010) Trophic Structure and Community Stability in an Overfished Ecosystem. *Science* **329**(5989), 333–336. <https://doi.org/10.1126/science.1190708>

-V-

- Vaquer-Sunyer, R., and Duarte, C.M. (2010) Sulfide exposure accelerates hypoxia-driven mortality. *Limnology and Oceanography* **55**(3), 1075–1082. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.3.1075>
- Veldhuis, M.W., Cucci, T.L., and Sieracki, M.E. (1997) Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. *Journal of Phycology* **33**(3), 527–541. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00527.x>
- Velo-Suárez, L., González-Gil, S., Gentien, P., Lunven, M., Bechemin, C., Fernand, L., *et al.* (2008) Thin Layers of *Pseudo-nitzschia* spp. and the Fate of *Dinophysis acuminata* during an Upwelling-Downwelling Cycle in a Galician Ria. *Limnology and Oceanography* **53**(5), 1816–1834. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.5.1816>
- Velo-Suárez, L., Reguera, B., Garcés, E., and Wyatt, T. (2009) Vertical distribution of division rates in coastal dinoflagellate *Dinophysis* spp. populations: implications for modelling. *Marine Ecology Progress Series* **385**, 87–96. <https://doi.org/10.3354/meps08014>
- Verdugo, P, Alldredge, A.L., Azam, F., Kirchman, D.L., Passow, U., and Santschi, P.H. (2004) The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry* **92**(1-4), 67-85. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.06.017>
- Von Dassow, P., and Montresor, M. (2011) Unveiling the mysteries of phytoplankton life cycles: Patterns

and opportunities behind complexity. *Journal of Plankton Research* **33**(1), 3–12. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq137>

-W-

- Waller, R.F., and Kořený, L. (2017) Plastid Complexity in Dinoflagellates: A Picture of Gains, Losses, Replacements and Revisions. *Advances in Botanical Research* **84**, 105–143. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.06.004>
- Walne, P.R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fisheries Investigations London* **26**(5), 1-62
- Ward, J.E., and Shumway, S.E. (2004) Separating the grain from the chaff: Particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **300**(1–2), 83–130. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002>
- Watanabe, M.M., Suda, S., Inouya, I., Sawaguchi, T., and Chihara, M. (1990) *Lepidodinium viride* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyta), a green dinoflagellate with a chlorophyll *a*- and *b*-containing endosymbiont. *Journal of Phycology* **26**(4), 741–751. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00741.x>
- Watanabe, M.M., Takeda, Y., Sasa, T., Suda, S., and Sawaguchi, T. (1987) A green dinoflagellate with chlorophyll *a* and *b*: morphology, fine structure of the chloroplast and chlorophyll composition. *Journal of Phycology* **23**(2), 382–389. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04148.x>
- Wells, M.L., Karlson, B., Wulff, A., Kudela, R., Trick, C., Asnaghi, V., *et al.* (2020) Future HAB science: Directions and challenges in a changing climate. *Harmful Algae* **91**, 101632. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101632>
- Wetz, M.S., Robbins, M.C., and Paerl, H.W. (2009) Transparent exopolymer particles (TEP) in a river-dominated estuary: Spatial-temporal distributions and an assessment of controls upon TEP formation. *Estuaries and Coasts* **32**(3), 447–455. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9143-2>
- Wood, A.M., Everroad, R.C., and Wingard, L.M. (2005) *Measuring growth rates in microalgal cultures*. In: Algal culturing techniques. Ed. Andersen, R.A., Elsevier Academic press. pp. 269-285.
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S J., Wilken, S., Zimmerman, A.E., and Keeling, P.J. (2015) Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* **347**(6223), 1-10. <https://doi.org/10.1126/science.1257594>
- Wotton, R.S. (2004) The ubiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Scientia Marina* **68**(1), 13–21. <https://doi.org/10.3989/scimar.2004.68s113>
- Wu, R.S.S. (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin* **45**(1-2), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00061-9)
- Wyatt, T. and Jenkinson, I.R. (1997) Notes on *Alexandrium* population dynamics. *Journal of Plankton Research* **19**(5), 551-575. <https://doi.org/10.1093/plankt/19.5.551>

-X-

- Xiao, R., and Zheng, Y. (2016) Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances* **34**(7), 1225-1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Xiao, W., Liu, X., Irwin, A.J., Laws, E.A., Wang, L., Chen, B., *et al.* (2018) Warming and eutrophication combine to restructure diatoms and dinoflagellates. *Water Research* **128**, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.051>

-Y-

- Yamamoto, K., Tsujimura, H., Nakajima, M., and Harrison, P.J. (2013) Flushing rate and salinity may control the blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in a river/estuary in Osaka Bay, Japan. *Journal of Oceanography* **69**, 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10872-013-0203-7>
- Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., and Lee, H.K. (2007) Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresource Technology* **98**(2), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.021>
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., and Bhattacharya, D. (2004) A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **21**(5), 809–818. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh075>
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Van Dolah, F.M., Nosenko, T., Lidie, K.L., and Bhattacharya, D. (2005) Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Molecular Biology and Evolution* **22**(5), 1299–1308. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi118>

-Z-

- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., and Garrido, J.L. (2012) Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series* **465**, 33–52. <https://doi.org/10.3354/meps09879>
- Zeng, C., and Binding, C. (2019) The effect of mineral sediments on satellite chlorophyll-a retrievals from line-height algorithms using red and near-infrared bands. *Remote Sensing* **11**(19), 2306. <https://doi.org/10.3390/rs11192306>
- Zhang, W., Dong, Z., Zhang, C., Sun, X., Hou, C., Liu, Y., *et al.* (2020) Effects of physical-biochemical coupling processes on the *Noctiluca scintillans* and *Mesodinium* red tides in October 2019 in the Yantai nearshore, China. *Marine Pollution Bulletin* **160**, 111609. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111609>
- Zhang, Z., Chen, Y., Wang, R., Cai, R., Fu, Y., and Jiao, N. (2015) The fate of marine bacterial exopolysaccharide in natural marine microbial communities. *PLoS ONE* **10**(11), e0142690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142690>
- Zhou, J., Mopper, K., and Passow, U. (1998) The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography* **43**(8), 1860–1871. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.8.1860>
- Zimmermann, J., Glöckner, G., Jahn, R., Enke, N., and Gemeinholzer, B. (2015) Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources* **15**(3), 526–542. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>
- Zingone, A., Dubroca, L., Iudicone, D., Margiotta, F., Corato, F., d'Alcalà, M.R., *et al.* (2010) Coastal Phytoplankton Do Not Rest in Winter. *Estuaries and Coasts* **33**, 342–361. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9157-9>
- Zingone, A., and Enevoldsen, O.H. (2000) The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean and Coastal Management* **43**(8–9), 725–748. [https://doi.org/10.1016/S0964-5691\(00\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0964-5691(00)00056-9)
- Zobell C. (1941) Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research* **4**, 42–75

Titre : Propriétés écologiques des efflorescences de *Lepidodinium chlorophorum* : de l'écophysiologie cellulaire à l'impact sur l'écosystème

Mots clés : *Lepidodinium chlorophorum*, Efflorescences algales nuisibles, Ecologie côtière, Particules Exo-polymériques Transparentes, ADN environnemental, *Crassostrea gigas*

Résumé : En Bretagne sud, les Eaux Colorées Vertes (ECV) engendrées par *Lepidodinium chlorophorum* sont associées à des mortalités de bivalves. Cependant, la biologie et l'écologie de ce dinoflagellé restent peu étudiées. Ce travail fournit un premier modèle conceptuel de son écologie. *L. chlorophorum* produit des Particules Exo-polymériques Transparentes (TEP) et les bactéries induisent une surproduction de TEP. Dans la colonne d'eau, *Lepidodinium* a été détecté en faibles abondances en période non productive et ses efflorescences seraient initiées par des apports d'ammonium. Aucun kyste benthique n'a été observé dans les sédiments, remettant en question leur existence. Les apports d'eau douce et la stratification seraient favorables au développement d'une ECV. La télédétection a montré l'importance des courants de marée dans la dynamique spatiale d'une ECV.

La reminéralisation bactérienne des TEP fournirait des nutriments nécessaires au maintien de l'ECV pendant plus d'un mois. Si les TEP confèreraient donc un avantage écologique à cette espèce, ils pourraient toutefois impacter l'écosystème. La physiologie de l'huître *Crassostrea gigas* exposée à *L. chlorophorum* a été étudiée en conditions contrôlées. L'huître serait capable de filtrer et d'ingérer ce dinoflagellé. Cependant, la présence de glycoconjugués acides au sein des tubules digestifs, une filtration altérée et une assimilation perturbée ont été observées, suggérant qu'une exposition à long terme pourrait affecter l'huître creuse. Cet aperçu de l'écologie de *L. chlorophorum* constitue une base de référence pour de prochaines études qui pourront être menées au sein d'autres écosystèmes impactés par cette espèce.

Title : Ecological properties of *Lepidodinium chlorophorum* blooms: from cellular ecophysiology to ecosystem impacts

Keywords : *Lepidodinium chlorophorum*, Harmful algal blooms, Coastal ecology, Transparent exopolymer particles, Environmental DNA, *Crassostrea gigas*

Abstract: Green Seawater Discolorations (GSD) caused by the proliferation of *Lepidodinium chlorophorum* in southern Brittany are associated with mass mortalities of bivalves. Few information is available regarding the biology and ecology of this dinoflagellate. This work provides a first ecological conceptual model of this species. *L. chlorophorum* is the main producer of Transparent Exopolymer Particles (TEP) and bacteria induce an overproduction of TEP. The genus *Lepidodinium* was detected at low abundances in the water column during the non productive period and bloom initiation may be induced by ammonium inputs. Any benthic cysts were observed in the sediment, questioning their existence. Freshwater inputs and stratification may trigger the development of a GSD. Remote sensing showed the importance of tidal currents in the spatial dynamics of the GSD.

Bacterial remineralisation of TEP may sustain the bloom for more than one month. While TEP could confer an ecological benefit for *L. chlorophorum*, this organic matter could negatively impact the ecosystem. The physiological recovery of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to GSD concentrations was studied under controlled conditions. The oyster is able to filter and ingest this dinoflagellate. However, the presence of acidic glycoconjugates within the digestive tubules, impaired filtration and disturbed assimilation have been observed, suggesting that long-term exposure could affect the cupped oyster. These first insights into the ecological properties of *L. chlorophorum* in southern Brittany constitute the baseline for further studies in other ecosystems impacted by this species.